

1. INTRODUCCIÓ

La meva decisió sobre aquest tema és perquè em va agradar moltíssim i perquè era una cosa nova per a mi. Primer vaig fer les pràctiques en diferents laboratoris, utilitzant materials nous que mai havia vist. Veure tots els treballadors fent diferents coses em va motivar moltíssim perquè el meu objectiu és arribar a ser com ells, és a dir, treballar amb ganes i interès per tal d'esbrinar coses noves per a mi.

A més, a mesura que anava fent les pràctiques cada vegada m'agradava i aprenia més fins que em vaig enamorar de la investigació que estava fent i això va fer que fes el treball de recerca sobre aquest tema.

Finalment, el que m'ha impactat d'aquest tema és com partint d'una cosa tan petita com un gen podem arribar a visualitzar una proteïna que és el producte de l'expressió d'aquest gen. Això mai ho havia pensat ni ho havia fet, i en veure-ho i a la vegada fer-ho em semblava fins i tot màgia, art.

L'objectiu d'aquest treball és la localització de la proteïna verda fluorescent en cèl·lules de mamífer, concretament en les cèl·lules d'un ronyó de mico.

Per a poder fer aquest treball necessitem saber una mica sobre la biologia molecular.

1.1. Biologia molecular

És la part de la biologia que estudia els éssers vius i els fenòmens vitals d'acord a les propietats de la seva estructura molecular. La molècula és la part més petita d'un element o compost pur que manté les propietats químiques i físiques característiques d'aquell element o compost. Una molècula està formada per dos o més àtoms units per una força d'origen elèctric que es diu enllaç.

El seu objectiu és l'estudi de poder separar substàncies molt petites d'altres substàncies sense que perdin les seves propietats i busca comprendre les interaccions entre els diversos sistemes cel·lulars, incloent-hi les relacions entre ADN, ARN i la síntesi de proteïnes, així com aprendre com estan regulades aquestes interaccions. Com per exemple la síntesi d'una proteïna a partir de l'ADN.

1.1.1.ADN

L'àcid desoxiribonucleòtid, freqüentment abreujat **ADN**, constitueix el principal component del material genètic de la immensa majoria dels organismes, juntament amb l'ARN, sent el component químic primari dels cromosomes i el material amb el qual els gens estan codificats.

La funció principal de l'ADN és mantenir a través del codi genètic, la informació genètica necessària per a crear un ésser viu idèntic a aquell del que prové (o gairebé similar, en el cas de barrejar-se amb altra cadena com és el cas de la reproducció sexual). La funció principal de l'herència ha de ser un procés de transferència d'informació que permeti sintetitzar, a partir de l'ADN, les altres molècules que constitueixen els éssers vius.

1.1.2. ARN

L'àcid ribonucleic (ARN o RNA) és un àcid nucleic, polímer lineal de nucleòtids formant una llarga cadena. L'eix de la cadena ho formen grups fosfat

i sucres ribosa de forma alternativa del que pren el seu nom. Els nucleòtids de l'ARN contenen el sucre ribosa i entre les seves bases nitrogenades a l'uracil, a diferència de l'àcid desoxiribonucleic (ADN) el sucre del qual és una desoxiribosa i conté a la timina en comptes de l'uracil. La funció principal de l'ARN és servir com intermediari de la informació que duu l'ADN en forma de gens i la proteïna final codificada per aquests gens.

1.1.3. Pas de l'ADN a les PROTEÏNES

El conjunt de bases nitrogenades: A(adenina),T(timina),G(guanina),C (citosina) i (U(uracil)) en cas d'ARN) formen l'anomenat codi genètic que podem dir que és el diccionari de l'ADN, el qual és la clau que permet a la cèl·lula traduir la informació de l'ADN en proteïnes.

Les proteïnes és sintetitzen al citoplasma de la cèl·lula , però al citoplasma no hi ha ADN. En canvi si que hi ha un ARN, que es forma a partir de l'ADN al nucli.

Hi ha varis tipus d'ARN, però els més importants són:

- **ARN MISSATGER (ARN_m)** és el que intervé en la síntesi de les proteïnes ,és a dir, porta la informació continguda en l'ADN. Després aquest missatge serà traduït en una proteïna.
- **ARN RIBOSÓMIC (ARN_r)** està present en els ribosomes, orgànuls intracel·lulars implicats en la síntesi de proteïnes. La seva funció és llegir els ARN_m i formar la proteïna corresponent.
- **ARN de transferència (ARN_t)** és un tipus d'àcid ribonucleic encarregat de transportar els aminoàcids als ribosomes per incorporar-los a les proteïnes, durant el procés de síntesi proteica. Els ARN_t reconeixen els ARN_m i transfereixen un aminoàcid determinat a la cadena de proteïna que s'està sintetitzant. Segons la informació de l'ARN_m, els ARN_t posen els diferents aminoàcids en el lloc adequat per sintetitzar una cadena polipeptídica.

Per tant hi ha dos tipus de processos importants en la síntesis de proteïnes:

1. TRANSCRIPCIÓ: pas de l'ADN a l'ARN

A partir de l'ADN es sintetitzen tots els diferents tipus d'ARN.

Per sintetitzar ARN fa falta:

*ADN

*Ribonucleòtids, que formen l'ARN amb les bases nitrogenades corresponents(A,C,G,U).

*ARN-polimerasa, un enzim que permet la síntesi d'ARN.

És el primer procés de l'expressió genètica. Durant la transcripció genètica, les seqüències d'ADN són transcrites a ARN mitjançant l'enzim anomenat ARN-polimerasa. La transcripció produeix ARN missatger com primer pas de la síntesi de proteïnes. La transcripció de l'ADN també pot anomenar-se síntesi de l'ARN missatger.

2. TRADUCCIÓ: de l'ARN a les PROTEÏNES

A partir de la seqüència de l'ARNm (que s'ha format a partir d'ADN), se sintetitzarà una seqüència determinada d'aminoàcids, que pot donar lloc a un pèptid (si la seqüència és curta) o a una proteïna. En aquest procés intervenen els ribosomes i multitud d'enzims, però també fan falta:

- mARN
- molècules d'ARNt
- aminoàcids

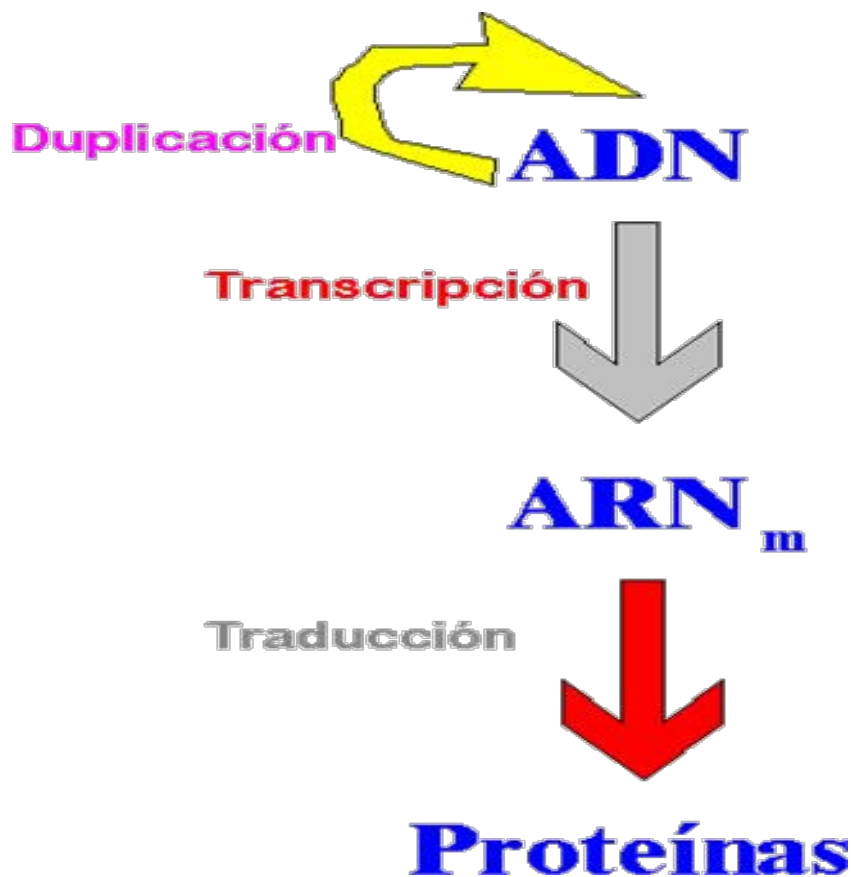


Fig. 1 De l'ADN a PROTEINES

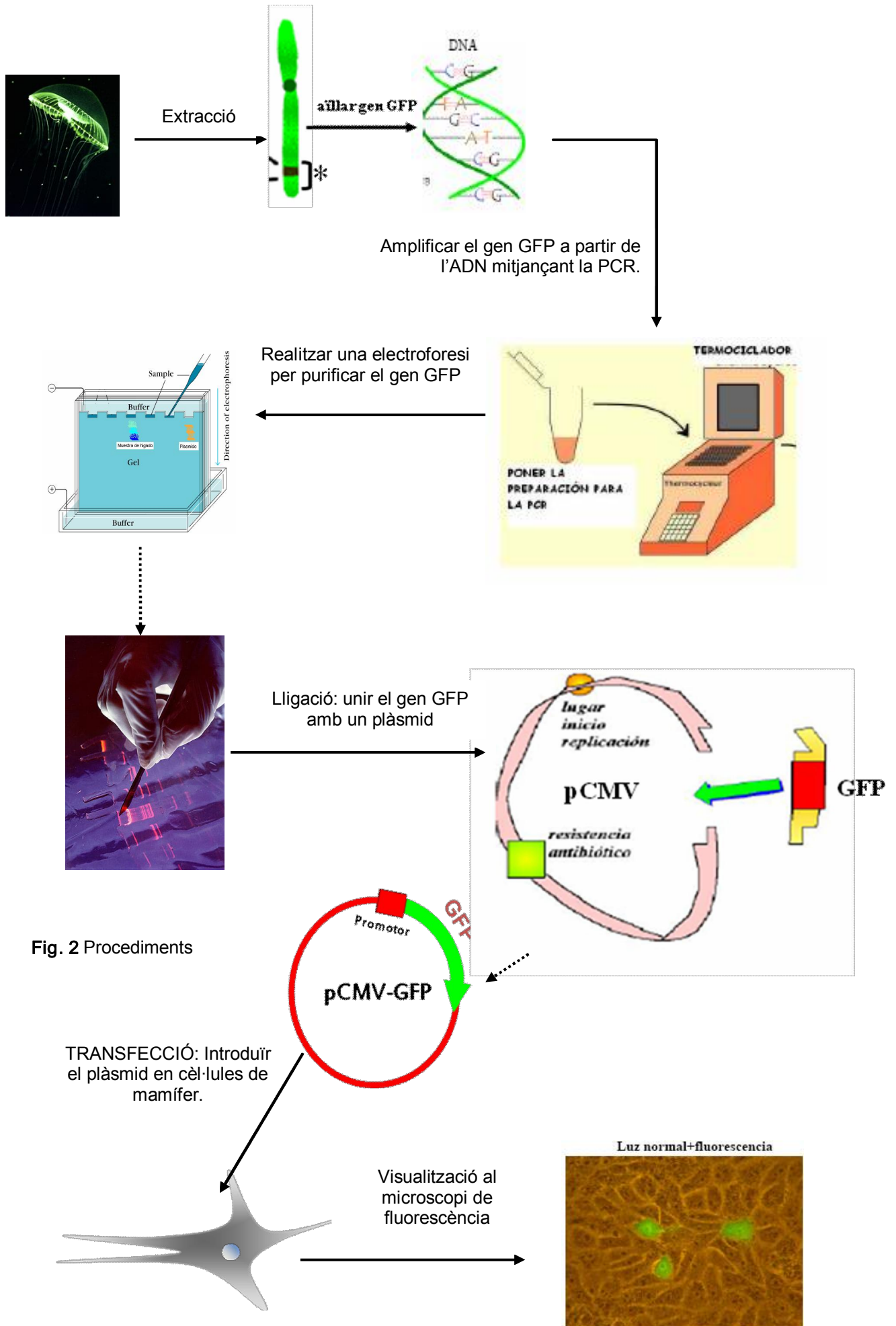
1.2. Passes de la investigació

En aquest treball d'investigació el primer que cal fer es obtenir el **gen** de la **proteïna fluorescent verda (GFP, green fluorescent protein)**. El gen es defineix com una seqüència lineal de nucleòtids d'ADN o d'ARN que és essencial per a una funció específica. És considerat com la unitat d'emmagatzematge d'informació i unitat d'herència al transmetre aquesta informació a la descendència. La realització d'aquesta funció no requereix de la traducció del gen ni tan sols de la seva transcripció. Els gens estan localitzats als cromosomes, al nucli cel·lular, i es disposen en línia al llarg de cadascun dels cromosomes. Cada gen ocupa al cromosoma una posició determinada anomenada locus. El conjunt de gens d'una espècie s'anomena genoma.

La proteïna verda fluorescent (GFP) es produïda per la medusa *Aequorea victoria*. Aquesta medusa té una forma de campana flotant i el seu cos es casi sempre transparent i amb un 95% d'aigua. Es caracteritza principalment per la presentació de dues proteïnes: una d'elles és fosforescent (ecuatorina) que produeix llum blava i la segona es la proteïna verda fluorescent que produeix llum verda. Aquí la que ens interessa és la segona proteïna.

Les passes que cal seguir són les següents:

1. Primer de tot necessitem el **gen** (la informació genètica) de la **GFP (Green fluorescent protein)**.
2. S'haurien d'aconseguir moltes còpies del gen, per tant necessitem fer una **PCR (Polymerase Chain Reaction)** que consisteix en una tècnica que té com objectiu l'amplificació del gen.
3. Posteriorment s'haurà d'expressar la proteïna GFP. Per això necessitem clonar el gen en un plàsmid. Un plàsmid consisteix en unes molècules d'ADN extracrosòmic circular o lineal que tenen la característica de que es poden replicar en bacteris i a més són resistents als antibiòtics o a altres productes.
4. Els bacteris incorporen còpies del plàsmid resistent als antibiòtics que nosaltres els posem. En el nostre cas el plàsmid que ens interessa és el que té el gen de la GFP. Deixem créixer el bacteri que conté el plàsmid amb el gen de la GFP, aconseguint-ne així moltes còpies.
5. Finalment agafem el plàsmid on hi ha el gen de la GFP i el posem en **cèl·lules de mamífers (Vero)**, unes cèl·lules cultivades *in vitro*, obtingudes a partir d'un ronyó de mico, amb l'objectiu de veure la llum verda de la **GFP**.



2.Nucli

2.1. Amplificació del gen de la GFP

Si volem treballar amb un gen qualsevol, hem d'amplificar-lo mitjançant la tècnica anomenada **reacció en cadena per la polimerasa (PCR)**.

2.1.1. Per a què serveix la PCR?

La reacció en cadena de la polimerasa coneguda com **PCR** (Polymerase Chain Reaction) és una tècnica de biologia molecular ideada per Kary Mullis, que té per objectiu obtenir un gran nombre de còpies d'un fragment d'ADN particular. En aquest cas l'utilitzaren per amplificar el gen de la proteïna verda fluorescent. Aquesta tècnica es fonamenta en la funció de l'ADN-polimerasa (taq-polimerasa) de replicar segments d'ADN, i utilitza altes temperatures per poder separar les cadenes d'ADN i després baixes temperatures perquè així els cebadors puguin unir-se a les cadenes que ja estaven separades. Amb la taq polimerasa s'aconsegueix que a partir dels primers i els nucleòtids pugui copiar la cadena motlle. Aquest procés es va repetint contínuament aconseguint en poc temps un gran número de còpies.

2.1.2. Elements de la PCR

Per el funcionament de la PCR calen els següents elements:

- **ADN de medusa:** on hi ha el gen de la proteïna verda fluorescent.
- **Els “primers” (cebadors):** seqüències curtes d'ADN que contenen un grup 3'hidroxil lliure. Aquesta seqüència és complementaria a la cadena motlle i actua com punt d'inici per afegir nucleòtids amb la fi de copiar aquesta cadena complementaria. Es necessiten dos cebadors per a la reacció de PCR. Un a l'extrem 3' i l'altre complementari al final de l'altre

cadena. Els cebadors són d' aproximadament 20 nucleòtids. Aquesta seqüència conté uns quants nucleòtids que han de ser complementaris al principi i al final del gen de la GFP. Els cebadors actuen com marcadors del lloc d'inici de l'enzim Taq-polimerasa.

- La **taq polimerasa**: és un enzim aïllat de la bactèria *Thermophilus aquaticus*. És capaç d'incorporar nucleòtids lliures a l'extrem 3' del cebador unit a la cadena principal; formant així una cadena complementaria. L'enzim té la característica de suportar temperatures elevades sense desnaturalitzar-se i mantenir una mitjana d'extensió de 60 nucleòtids per segon en regions riques en unions G-C.
- Els **dNTPs**: són els desoxinucleòtids trifosfats que es necessiten per poder amplificar una seqüència d'ADN. A més són el substrat de la Taq-polimerasa, que els incorpora en la cadena que està sintetitzant en direcció 5'-3'. Després d'ajuntar els cebadors amb la taq-polimerasa amplificarà el nostre gen afegint els dNTPs a la cadena.
- **Control negatiu**: conté tots els components necessaris per a la reacció de la PCR menys l'ADN motlle. Per contra conté el mateix volum que s'afegia d'ADN, però d'aigua estèril.
És important en totes les tècniques i ens assegura que el resultat obtingut de la mostra és "real" ja que ens diu que no hi ha contaminacions, es a dir, si al control negatiu hi ha amplificació d'ADN no podem estar segurs que la GFP que ve de l'ADN de la medusa és real perquè vol dir que en algun component hi hauria ADN contaminant.

En resum, per fer la PCR cal tenir els següents components:

MOSTRA	CONTROL NEGATIU
1µl d'ADN de la medusa	aigua
4µl de primer up	4µl de primer up
4µl de primer down	4µl de primer down
2µl de dNTPS (A, C,T,G)	2µl de dNTPS (A, C,T,G)
5µl de buffer	5µl de buffer
1µl de Taq (Polimerasa)	1µl de Taq (Polimerasa)
33µl d'aigua	33µl d'aigua
50µl total	50µl total

Es van agafar dos tubs petits (ependorf) i en un es van posar tots els components de la mostra i a l'altre els del control negatiu. Després es van agitar per barrejar tots els components que hi ha en cada eppendorf. Un cop fet això es van posar els dos tubs al termociclador.

2.1.3. Com funciona?

La PCR funciona a partir d'un **termociclador**, també conegut com **màquina de PCR** o **reciclador tèrmic de PCR** és un aparell usat en Biologia Molecular que permet realitzar els cicles de temperatures necessaris. El model més comú consisteix en un bloc de resistència elèctrica que distribueix a través d'una placa una temperatura



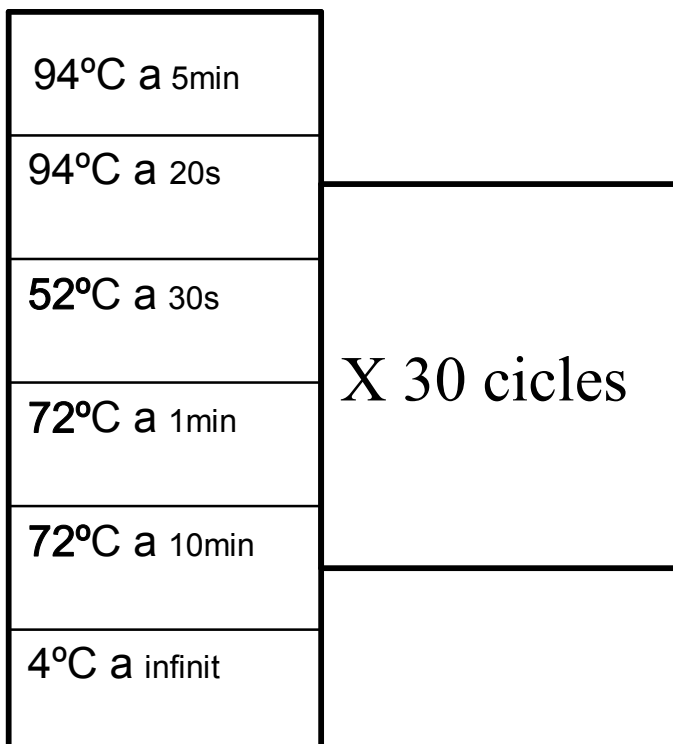
Fig. 3 Termociclador

homogènia durant temps que poden ser programables, normalment amb rangs de temperatura de 4°C a 96 °C. Atès que les reaccions incubades en l'aparell són en solucions aquoses, solen incloure una placa de tapa escalfada constantment a 103°C per a evitar la condensació d'aigua

en les tapes dels tubs on passa la reacció, i així evitar que els dissolts es concentrin, que d'altra forma modificaria les condicions òptimes per a l'enzim polimerizant.

Dins del termociclador col·loquem els eppendorfs i el programem amb les temperatures i temps necessaris, repetint-ho 30 cops.

Aquestes seran les temperatures i els temps que aplicarem al termociclador:



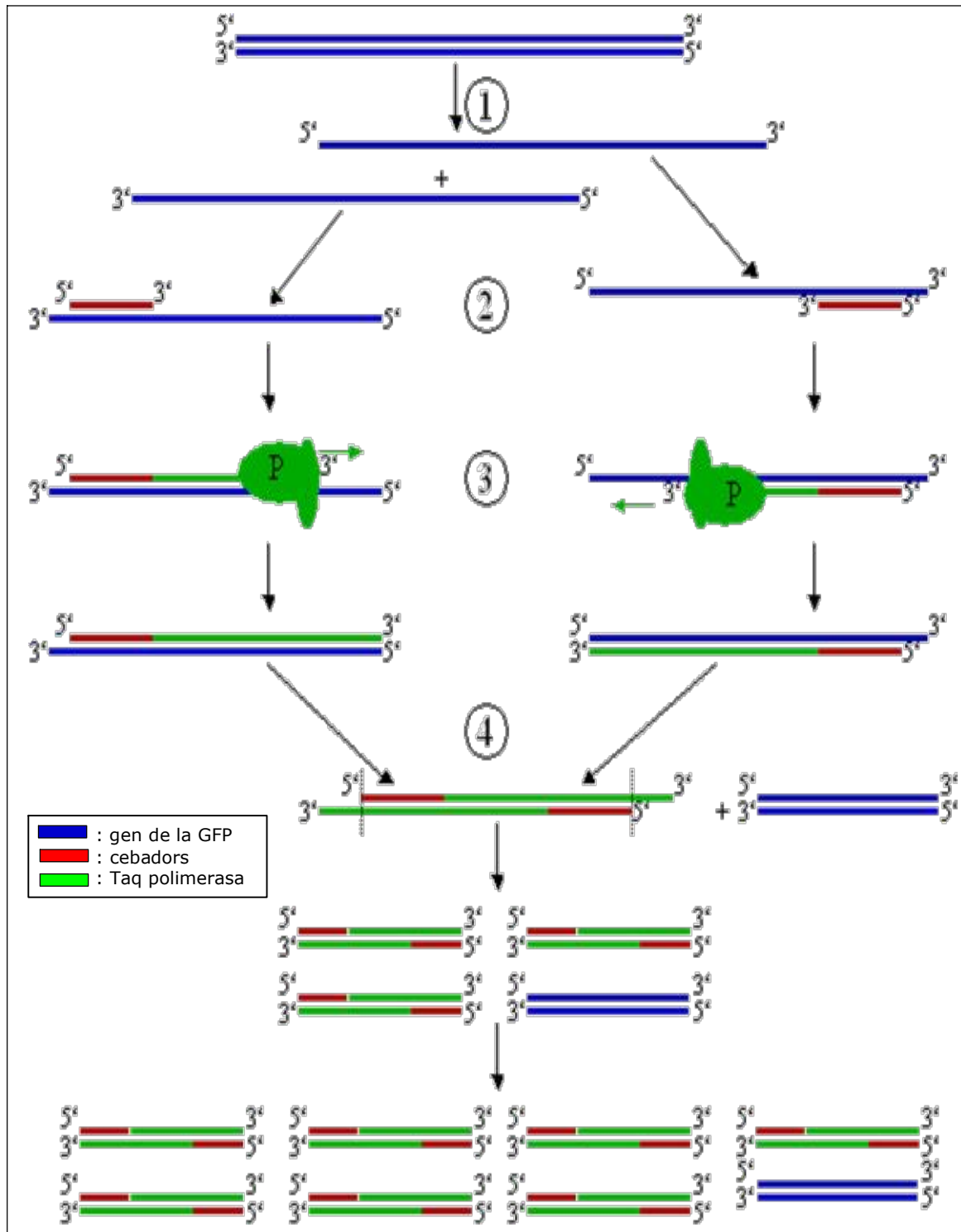


Fig. 4 Esquema de la PCR amb els cebadors i la polimerasa.

El procés de la PCR consisteix, segons l'esquema:

1. Separem les dos cadenes de la doble hèlix d'ADN mitjançant temperatures altes: 94°C.
2. Posem un cebador a l'inici de la primera cadena i un altre cebador al final de la cadena complementaria mitjançant temperatures baixes: 52°C.
3. La taq-polimerasa s'uneix als cebadors i replica les cadenes motlle, formant noves cadenes complementàries
4. Tenim les dues cadenes noves amb els cebadors més la doble cadena original. Aquestes s'aniran replicant contínuament.

Com a resultat de la PCR obtenim moltes còpies del gen de la proteïna verda fluorescent.

2.2. Gel d'electroforesi

Una vegada hem amplificat el gen de la GFP amb la tècnica de la PCR utilitzem l'electroforesi de gel per purificar el gen.

2.2.1. Per a què serveix el gel d'electroforesi?

En el nostre experiment hem utilitzat l'electroforesi en gel d'agarosa per purificar el gen de la GFP que hem amplificat mitjançant la PCR.

El **Gel d'electroforesi** és una tècnica que permet separar molècules basant-se en propietats físiques com la mida, la forma o el punt isoelèctric. El gel d'electroforesi s'utilitza generalment amb propòsits analítics, però pot ser una tècnica preparativa per a purificar molècules parcialment abans d'aplicar una PCR, una clonació o una seqüenciació d'ADN.

La primera part del nom, **gel**, fa referència a la matriu emprada a separar les molècules. Per separar proteïnes el gel sol ser fet per diferents concentracions d'acrilamida. En canvi, per a separar seqüències d'àcids nucleics, la matriu emprada és agarosa purificada. En ambdós casos, el gel forma una matriu sòlida però porosa amb aspecte semblant a la gelatina que permetrà el pas del components.

La segona part del nom, **electroforesi**, fa referència a la força electromotriu que és emprada per a empènyer o desplaçar les molècules a través de la matriu del gel. Al situar les molècules en el gel i aplicant-hi una diferència de potencial elèctric (corrent elèctric), les molècules es mouran a través de la matriu a diferents velocitats, cap al càtode, si estan carregades positivament, o cap a l'ànode, si estan carregades negativament. En el cas dels àcids nucleics, de naturalesa àcida, la direcció d'emigració és dels elèctrodes negatius cap als positius.

2.2.2. Elements de l'electroforesi

El gel que nosaltres utilitzarem es fa a partir dels components següents:

- **Agarosa:** es un polisacàrid format per galactoses alfas i betes que s'extreu de les algues dels gèneres *Gellidium* i *Gracillaria*. L'agarosa es soluble en aigua a temperatures superiors als 65°C, depenent del grau de substitucions hidroxietílicas de les seves cadenes laterals. L'agarosa és un producte natural que forma una matriu inert i no tòxica que suposa una eina indispensable en gran quantitat de tècniques de Biologia Molecular, Bioquímica i Biologia Cel·lular. El seu ús més estès és per construir gels que permetin separar molècules d'ADN mitjançant electroforesi.
- **Buffer (amortidor):** solució amortidora o una solució tampó és un tipus de solució que necessita els canvis de concentració d'ions hidroni i hidròxid. Per tant als canvis de pH, malgrat s'hi afegixin petites quantitat d'àcid, de base o bé es dilueixi. Aquestes solucions consisteixen en un àcid feble i la seva base conjugada (el més habitual), o bé una base feble i el seu àcid conjugat (menys comú). Aquesta capacitat de retenció del pH és conseqüència de l'equilibri entre l'àcid feble (HA) i la seva base conjugada.
- **Bromur d'etidi:** Després de l'electroforesi, quan les molècules més petites ja han arribat fins a l'ànode, les molècules d'interès del gel poden ser tenyides per a fer-les visibles. Per a la tinció s'utilitza bromur d'etidi que permet la visualització de l'ADN mitjançant els raig ultraviolats.

2.2.3.Com funciona?

Per a la fabricació del gel cal posar:

- Buffer
- 0,5g d'Agarosa (que fa que el líquid es converteix en sòlid)
- 10 μ l de bromur d'etidi (que s'uneix l'ADN i així fa que podem veure l'ADN amb llum U.V.).

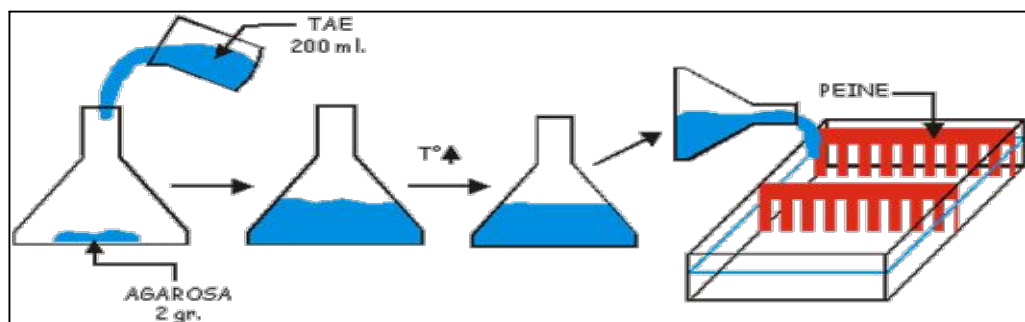
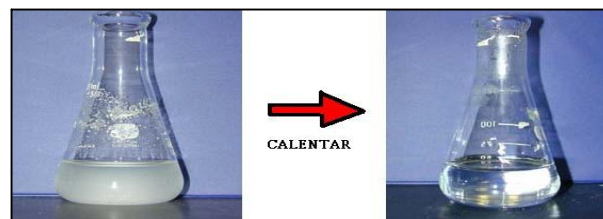


Fig. 5 Formació del gel d'agarosa.

Abans de posar el gel a la cubeta es col·loca la pinta, que és un utensili que utilitzem per fer els pouets (forats necessaris per realitzar el procediment de l'electroforesi) abans de que l'agarosa es converteixi en sòlid.

Després de fer el gel vam treure la pinta (que esta de color vermell) i als pouets resultants posarem:

- Marcador: es posa en un dels pouets per saber quan mesura l'ADN. Els marcadors són components amb una mida coneguda. Serveixen per determinar la mida i la molècula d'interès, en aquest cas l'ADN. S'utilitzaran les bandes que veurem amb el revelat del gel sota la llum ultraviolada, per comparar-les amb les de les molècules d'interès.

- Loading Buffer (tampó de càrrega): és un líquid blau que barregem amb l'ADN que teníem a l'ependorf. Serveix per donar més densitat a l'ADN i que aquest pugui baixar fàcilment pel pouet del gel.
- Control negatiu: aigua que es posa per saber si la nostra mostra està bé.

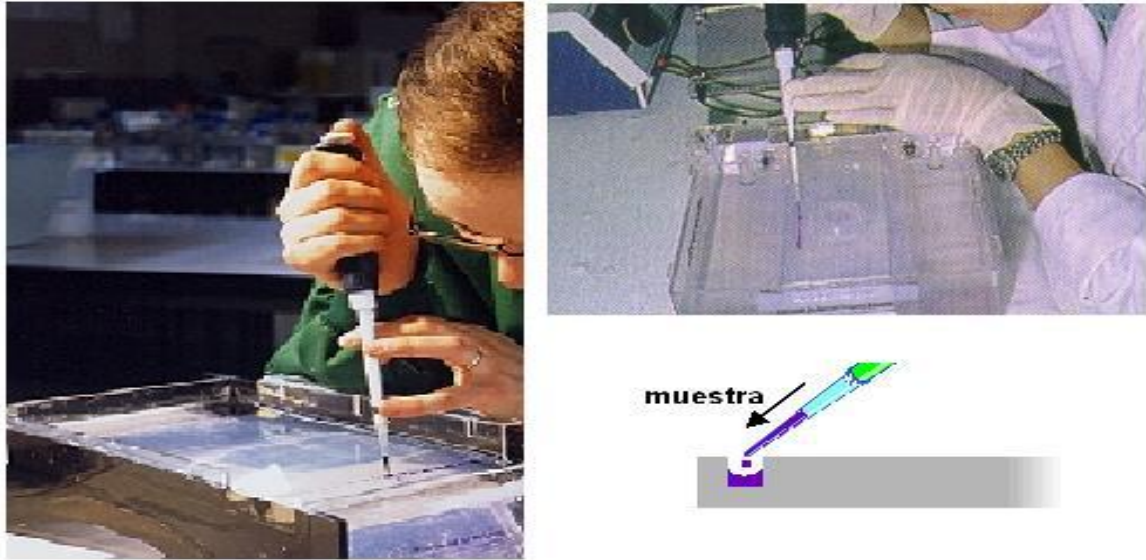


Fig. 6 En aquestes fotos es pot veure com es carrega el gel amb els diferents elements que hem dit abans.

Finalment apliquem electricitat a la cubeta. Després de mitjà hora aproximadament, vam treure el gel i el posem sota les llums ultraviolades per a poder veure l'ADN gràcies al bromur d'etidi i poder fotografiar-lo. Quan ja l'hem vist el passem a una altra màquina que també té llums ultraviolades per a tallar l'ADN del nostre gen. El tros que hem tallat el posem en un eppendorf i mitjançant un procés anomenat "KIT d'extracció" separem el gen de la GFP dels altres productes que tenia.

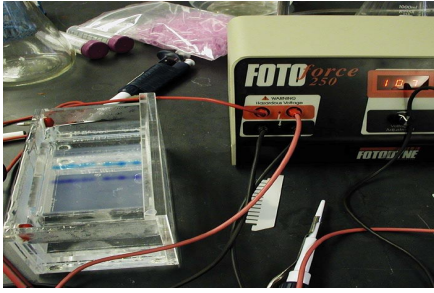


Fig. 7 En aquesta foto es veu com apliquem electricitat. Com que els àcids nucleics tenen una carrega elèctrica negativa es dirigeixen cap al pol positiu.

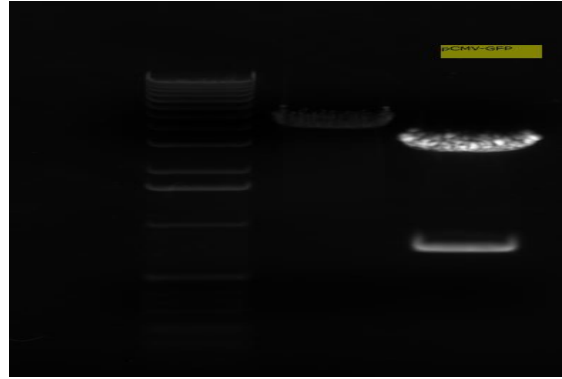


Fig. 8 En aquesta foto es veu el nostre gen amb els components de la mescla una vegada posats en el gen i després posats en el Transil-luminador.

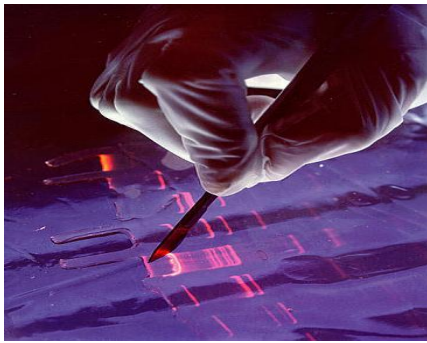


Fig. 9 En aquesta foto es veu com tallem el tros de l'ADN de la GFP

2.3.Unió del gen amb un plàsmid

Un cop tenim el gen purificat mitjançant l'electroforesi i després de separar-lo dels altres productes el posarem en un plàsmid.

2.3.1. Per a què serveix un plàsmid?

Els plàsmids són molècules d'ADN extracromosòmic circular o lineal, es repliquen i transcriuen independentment de l'ADN cromosòmic. Estan presents normalment en bacteris, i en algunes ocasions en organismes eucariotes. El nombre de plàsmids pot variar, depenent del seu tipus, des d'una sola còpia fins a alguns centenars per cèl·lula. El terme plàsmid va ser presentat per primera vegada pel biòleg molecular nord-americà Joshua Lederberg el 1952. Les molècules d'ADN plasmídica, adopten una conformació tipus doble hèlix igual que l'ADN dels cromosomes, encara que, per definició, es troben fora dels mateixos. S'han trobat plàsmids en gairebé tots els bacteris. A diferència de l'ADN cromosòmic, els plàsmids no tenen proteïnes associades. En la majoria dels casos es considera material genètic innecessari. No obstant això, posseeix informació genètica important per als bacteris. Per exemple, els gens que codifiquen per a les proteïnes que les fa resistents als antibiòtics estan, freqüentment, en els plàsmids. Hi ha alguns plàsmids integratius, que tenen la capacitat d'inserir-se en el cromosoma bacterià. És a dir, trenca el cromosoma i es situa al mig, amb la qual cosa, automàticament la maquinària cel·lular també reproduïx el plàsmid. Quan aquest plàsmid s'ha inserit se'ls dona el nom d'episoma.

Resistència als antibiòtics :

Els plàsmids sovint contenen gens o paquets de gens que li confereixen un avantatge selectiu, la qual cosa els dona l'habilitat de fer al bacteri resistent als antibiòtics. Cada plàsmid conté almenys una seqüència d'ADN que serveix com origen de replicació (un punt inicial per a la replicació de l'ADN), la qual cosa habilita a l'ADN per a ser duplicat independentment de l'ADN cromosòmic.

Aplicacions :

Els plàsmids serveixen com una important eina en laboratoris de genètica i enginyeria bioquímica, on són habitualment usats per a multiplicar un gen que es vol expressar . El plàsmid que conté el gen desitjat s'insereix dins d'una bacteria mitjançant un procés anomenat transformació. Aquest plàsmid fa que la bactèria es torni resistent al antibiòtic. Per seleccionar les bacteries que contenen el plàsmid s'exposen a l'antibiòtic, solament el bacteri que tenen còpies del plàsmid sobreviu a l'antibiòtic degut al fet que el plàsmid el fa resistent. D'aquesta forma, els antibiòtics actuen com un filtre que seleccionen únicament el bacteri modificat. Aquests bacteris poden ser cultivats en grans quantitats i el plàsmid d'interès pot ser aïllat.

Un altre ús important dels plàsmids és fabricar grans quantitats de proteïnes. En aquest cas es deixa créixer el bacteri que conté el plàsmid amb el gen d'interès, i aquest s'expressa fins a obtenir grans quantitats de proteïna en la mateixa bactèria. Aquesta és una forma barata i fàcil de produir gens o proteïnes que aquest codifica de forma massiva, com per exemple insulina o antibiòtics.

2.3.2. Elements i procediments

Durant el procés de PCR la taq polimerasa amplifica el gen d'interès afegint als seus extrems una cadena de poli-A (A:adenina). Així després es pot unir a un plàsmid especial anomenat pGEMT, que serveix per unir productes de la PCR i a més és un plàsmid obert que té als extrems poly-T (T:timina).

L'A i la T juntament amb la guanina i la citosina són bases nitrogenades que formen una part dels nucleòtids. L'A sempre s'uneix a la T, i la G sempre s'uneix amb la C.

Per tant els extrems del gen s'uneixen als extrems del pGEMT formant un plàsmid circular. Aquest procés s'anomena lligació

Per a poder fer la lligació necessitem :

- El gen que hem separat (GFP)
- 1µl de pGEMT (el vector, és a dir, el plàsmid obert que té en els extrems la seqüència de poly-T).
- 5µl de buffer
- 1µl de ligasa (uneix els dos extrems)
- control negatiu

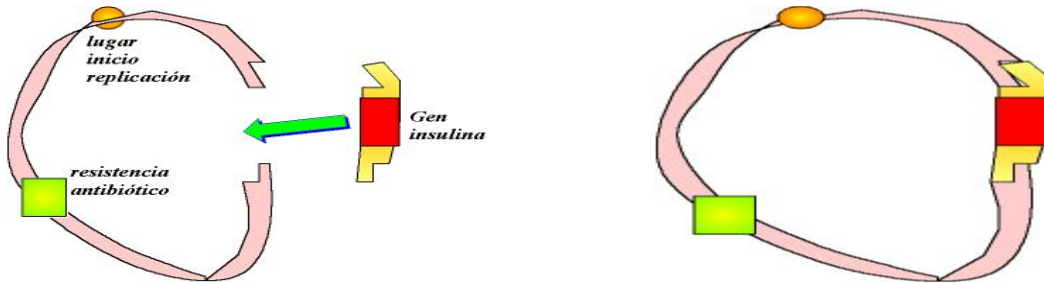


Fig. 10 En aquest dibuix es pot veure un exemple d'esquema de com un gen es lliga a un plàsmid.

Amb aquests elements intentem lligar el gen amb el plàsmid i tot aquest procés el deixem durant 16 hores a 14°C.

Una vegada tenim el plàsmid complet amb el gen (pGEMT+gen GFP) el posem en bacteris (transformació) mitjançant un xoc tèrmic, per tal de fer moltes replications d'aquest. Un xoc tèrmic és el trencament del material de la paret de la bactèria provocat per un canvi bruscat de temperatura, permetent així que entri el plàsmid.

Al cultiu de bacteris li posem els següents components:

- **L'X-Gal** (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido): és un substrat de la β-galactosidasa que, al ser hidrolitzat, produeix el indoxil que en contacte amb l'aire es transforma en índigo insoluble, el qual presenta un intens color blau. És utilitzat com indicador d'expressió de la β-galactosidasa en colònies bacterianes creixent en plaques de petri. Aquelles colònies que estiguin expressant l'enzim es tornaran d'un color blau més o menys intens en funció de la quantitat d'enzim que estan expressant.

- La **Isopropílico β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)**: és un promotor que s'utilitza per a induir la expressió de gens.

En afegir-li aquests dos productes al cultiu es produiran colònies blaves. Això vol dir que el plàsmid està sense el nostre gen. En canvi quan les colònies són blanques, vol dir, que el plàsmid conté el nostre gen.

Quan ja tenim el plàsmid dintre del bacteri fem el següent procés :

Posem 2ml de l'antibiòtic en uns tubs. Agafem una pipeta i amb la punta toquem una colònia de bacteries que sigui blanca i la deixem créixer en el tub on tenim els 2ml de l'antibiòtic. Aquests tubs els duem a un laboratori on hi ha una màquina anomenada agitador orbital. En aquesta màquina fem que els tubs i els deixem tota la nit a 37°C amb la finalitat de tenir moltes bacteries amb el plàsmid (gen GFP+pGEMT) . Quan s'acaba aquest procés, agafem el líquid que havia en els tubs i els posem en eppendorfs, després aquests eppendorfs es posen en la centrifugadora perquè els bacteris baixin al fons del eppendorf. Després tirem el líquid que queda a dalt dels bacteris i així les deixem soles.

Seguidament amb un KIT separem el plàsmid dels bacteris utilitzant tres buffers:

- El primer serveix per a barrejar-lo amb els bacteris perquè es quedi en estat líquid.
- El segon serveix per trencar les bacteries, deixant anar així els plàsmids.
- El tercer serveix per a separar el plàsmid que ens interessa de les restes bacterians.

Un cop tenim moltes còpies del pGEMT+gen de la GFP hem de passar el gen (GFP) a un altre plàsmid anomenat pCMV (Promotor del citomegalovirus humà), ja que volem que aquest nou plàsmid pugui expressar la proteïna GFP en cèl·lules de mamífer. La característica principal d'aquest plàsmid és que té un promotor eucariota.

2.4. Com passar de pGEMT-GFP a pCMV-GFP?

Ho podem fer mitjançant la digestió amb **enzims de restricció**. Un enzim de restricció (o Endonucleasa de Restricció) és un enzim que pot reconèixer una seqüència característica de nucleòtids dintre d'una molècula d'ADN i tallar l'ADN en aquell punt en concret anomenat lloc o diana de restricció o en un lloc no molt llunyà d'aquest, depenent de l'enzim. Els llocs de restricció contenen quatre o dotze parells de bases ,més o menys, amb les que són reconeguts.

El mecanisme del tall d'ADN és realitza a través del trencament de dos enllaços fosfodiester (el que uneix la ribosa amb el fosfat) en la doble cadena, donant lloc a dos extrems d'ADN, que pot ser roms (quan els enllaços trencats coincideixen) o escalonats. Aquests últims tenen tendència a tornar a unir-se de manera espontània ja que els extrems es poden unir a altres extrems que poden haver a prop .

Els fragments d'ADN obtinguts d'aquesta manera poden unir-se per altres enzims anomenats lligases.

El pGEMT-GFP el tallem amb un enzim anomenat Bgl II. Per tal d'aconseguir això es posa:

- L'ADN que es vol tallar (pGEMT-GFP)
- L'enzim (Bgl II)
- Buffer

Tots aquests components es posen junts i es deixen una hora a 37°C.

Mitjançant l'electroforesi veurem si s'ha tallat. També cal purificar el gen sense el plàsmid (pGEMT).En aquest cas el gen no tindrà la seqüència de poli-A, ara tindrà als extrems la seqüència que ha sigut tallada per l'enzim Bgl II.

Després s'haurà de fer una altra vegada la lligació però ara es el gen de la GFP amb el plàsmid (pCMV) tallat amb l'enzim Bgl II i així pot unir-se al gen, ja que tan el plàsmid com el gen tenen als extrems les seqüències complementaries.

Per a poder fer la lligació necessitem :

- El gen que hem separat (GFP)
- 1µl de pCMV (el vector, és a dir, el plàsmid obert que té en els extrems la seqüència complementaria Bgl II).
- 5µl de buffer
- 1µl de lligasa
- control negatiu

Una vegada tenim el plàsmid complet amb el gen lligat ho posem en bacteris (transformació) mitjançant un xoc tèrmic.

En aquest cas totes les colònies són blanques i per saber si la colònia té el gen o no el té s'ha de fer una digestió enzimàtica. Per tant agafo una colònia que té el gen i la deixo créixer.

Finalment s'utilitza el mateix KIT d'extracció que el d'abans.

Així doncs, després de tot aquest procés tenim el plàsmid pCMV-GFP, capaç d'expressar el nostre gen en cèl·lules eucariotes.

2.5. Expressió en cèl·lules de mamífer

Un cop obtingut el plàsmid final (pCMV-GFP) ja podem posar-lo en cèl·lules eucariotes per veure si la proteïna s'expressa. Per veure la fluorescència que emet la proteïna posem el plàsmid en cèl·lules Vero (de ronyó de mico) cultivades in vitro.

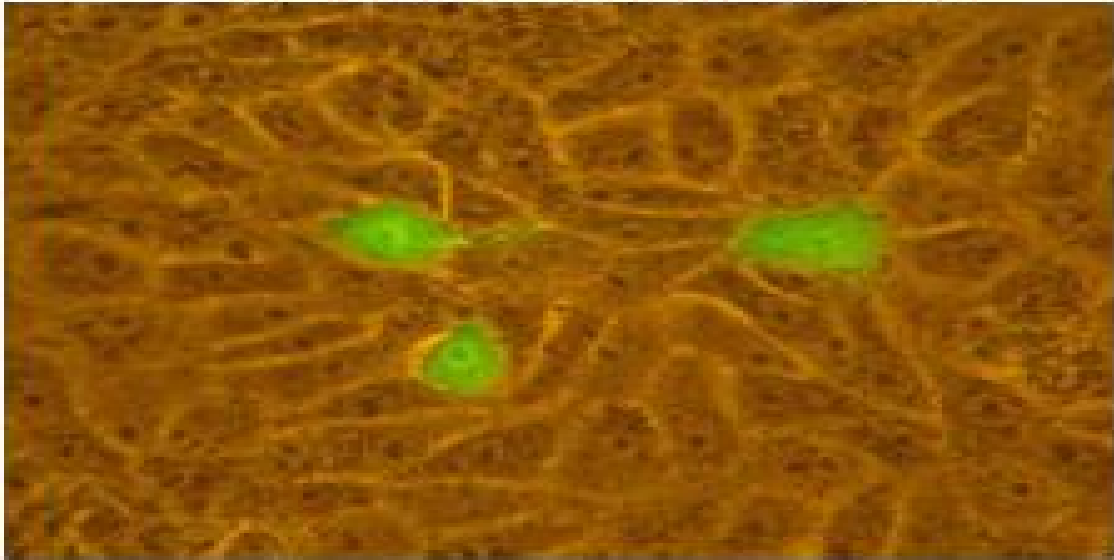
Per aconseguir que el plasmid entri a la cèl·lula utilitzem un producte (Lipofectamina) que s'uneix al plàsmid i la cèl·lula l'internalitza. Aquest procés s'anomena transfecció.

Una vegada el plàsmid pCMV-GFP entra a la cèl·lula viatja al nucli, l'ARN polimerasa reconeix el promotor eucariota del pCMV, es transcriu l'ARN que va cap al citoplasma de la cèl·lula i els ribosomes s'uneixen l'ARN i el tradueixen a proteïna, és a dir, que expressa la proteïna.

Després de 24 hores de la transfecció ho portem al microscopi de fluorescència.

I com a resultat obtenim les següents imatges:

Luz normal+fluorescencia



Sólo fluorescencia

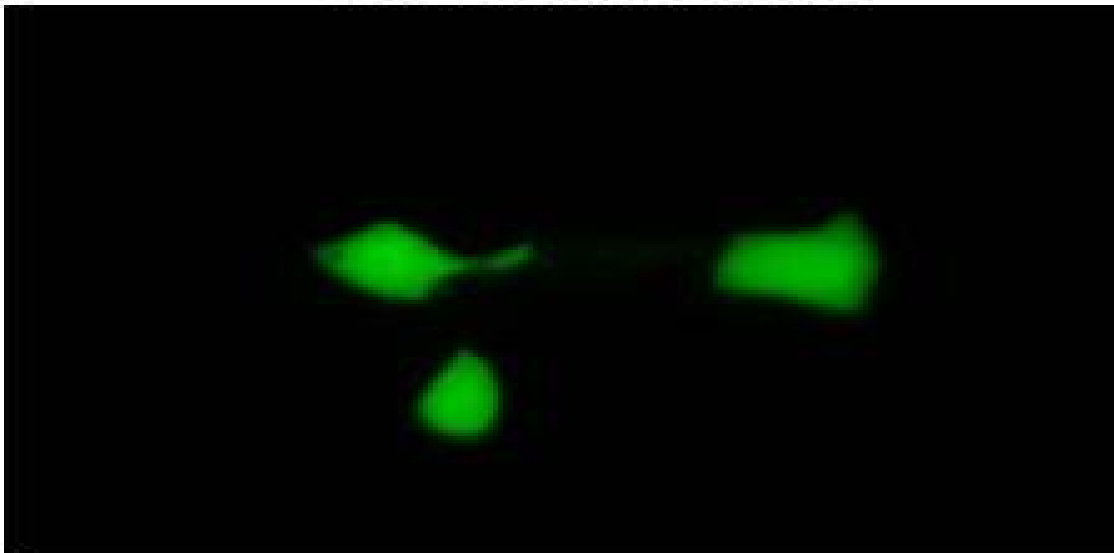


Fig. 11 La GFP dintre de les cèl·lules de mamífer. Amb llum normal i fluorescència (a dalt) i amb fluorescència solament (a baix).

En aquestes imatges veiem tres cèl·lules verdes que han internalitzat el plàsmid i totes les del costat que no es veuen volen dir que no han internalitzat el plàsmid. Per tant això demostra que el gen s'està expressant i la proteïna es igual que la que té la medusa. I també la proteïna està en tota la cèl·lula (dins del nucli i el citoplasma).

3. CONCLUSIONS

La conclusió més destacada que es pot treure d'aquest treball és la manera de jugar amb l'ADN fent que una proteïna qualsevol es pugui expressar a qualsevol tipus de cèl·lula.

En aquest experiment hem aconseguit expressar la proteïna verda fluorescent en cèl·lules de mamífer, concretament en cèl·lules de mico. Tot i que no l'hem utilitzat per altres finalitats, la GFP s'usa amb molts objectius.

Els laboratoris l'utilitzen per estudiar altres proteïnes. El que fan es "enganxarla" a una altra proteïna de manera que posen dos gens junts (el de la GFP i la proteïna que volen estudiar), així s'expressa el que s'anomena una proteïna de fusió, és a dir, dues proteïnes juntes. Per exemple, si el que estudien és una proteïna que és diu PQ, el que fan és agafar el gen d'aquesta proteïna i el gen de la GFP i els posen tots dos junts en el pCMV: tenim doncs el pCMV-PQGFP. El PQGFP s'expressa com una proteïna (encara que són dues proteïnes juntes), així podem veure on va o que fa la proteïna PQ ja que la veiem de color verd al tenir la fluorescència de la GFP enganxada. Per exemple, si veus la fluorescència només al nucli, vol dir que la proteïna PQ és una proteïna que es dirigeix al nucli. El mateix es pot fer "in vivo". Això vol dir treballant amb animals (i no només amb cèl·lules al laboratori, que és "in vitro"). Si punxem el pCMV-PQGFP a un ratolí, el plàsmid entra en cèl·lules de l'animal i la proteïna s'expressa (igual que al laboratori). Si matem al pobre ratolí i mirem els teixits, podrem veure on a anat la proteïna. Si veiem per exemple cèl·lules verdes a les neurones, sabrem que la proteïna PQ va a les neurones.

També pots fer que un virus amb el que treballis expressi la proteïna GFP i infectar un animal amb el virus. Després mires on ha anat el virus, igual que abans. Si veus neurones fluorescents, vol dir que el virus infecta neurones.

A més de tot això també serveix per la producció d'insulina o altres proteïnes que puguin ser d'interès per a curar altres malalties i d'una manera molt més

barata ja que molta gent no te diners per pagar els medicaments per tal de curar-se de les seves malalties.

4. LLISTA DE REFERÈNCIES

LLIBRES:

DE MANUEL, Jordi; GRAU, Ramon; MOLINA, Joaquim. *Biologia 2. Ciències de la naturalesa i de la salut*. Editorial Teide SA - Viladomat, 291 -08029 Barcelona

PÀGINES D'INTERNET:

- <http://fai.unne.edu.ar/biologia/macromoleculas/adn.htm>
- http://latam.msnusers.com/BIOLOGOSMOLECULARES/general.msnw?action=get_message&mview=0&ID_Message=735
- <http://www.unilibrebaq.edu.co/ubaq/Mis%20Webs/electroforesis.htm>
- http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/137/html/sec_11.html
- <http://www.icampus.ucl.ac.be/courses/SBIM2520/document/genemol/bio molespa/plasmidos/plasmidos-01.html#ancre119155>
- <http://fai.unne.edu.ar/biologia/macromoleculas/adn.htm>