

Iniciación a la experimentación en el ámbito de la Biología Celular, Molecular, Genética y Evolutiva

Tema 4. Técnicas de Genética Molecular que permiten el análisis de la función de una proteína



OCW
OpenCourseWare



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea

erman ta zabal zazu
NAZIOARTEKO BIKAINASUN CAMPUSA
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

- Existen diversas técnicas de Genética Molecular que permiten el análisis funcional de secuencias de DNA que codifican proteínas.
- En este tema vamos a presentar algunas de las que permitirían expresar una proteína recombinante (por ejemplo, una versión de la proteína MC1R) y, posteriormente, analizar el efecto fenotípico que se produciría a nivel de expresión génica.
- El Esquema de Trabajo en el que se incluyen varias técnicas moleculares sobre las que se tratará en este tema, aparece en la siguiente diapositiva.



Esquema de Trabajo

Imagen de Nadine90 (autor) (publicada en commons.wikimedia (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2ml_eppen_dorf_tubes.jpg?uselang=es) bajo Licencia Creative Commons BY-NC-SA)



Células humanas que expresan la proteína P

EXTRACCIÓN de DNA

DNA



MANEJO

ANÁLISIS

Detección

Pureza

Cuantificación

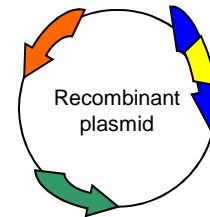
PCR del gen P para clonación

Amplicón con dianas de restricción

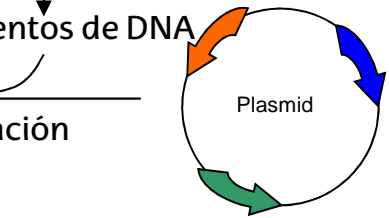
Restricción enzimática

Fragmentos de DNA

Ligación



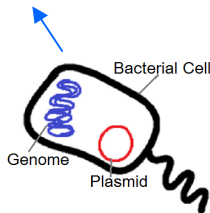
DNA recombinante (cantidad baja, pg)



plásmido de expresión en mamíferos

CLONACIÓN MOLECULAR

Transformación (bacterias)



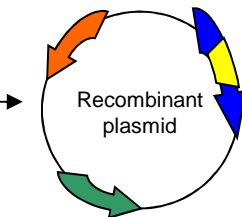
Bacteria recombinante

Clon



Crecimiento de bacterias recombinantes

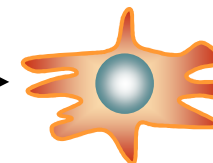
EXTRACCIÓN de DNA plasmídico



DNA recombinante (cantidad alta, mg)

Secuenciación

Transfección (células de mamífero)



FENOTIPO?

Línea celular de mamífero que sobreexpresa la proteína P



En este tema, presentaremos sucintamente las técnicas que pueden utilizarse para los apartados que aparecen marcados en rojo en el Esquema de Trabajo anterior, y que son los siguientes:

- 1.Extracción y análisis de DNA
- 2.Amplificación de secuencias mediante PCR
- 3.Transfección de plásmidos de expresión en células de mamífero
- 4.Análisis del fenotipo: cuantificación de la expresión de un gen



1.- Extracción y análisis de ácidos nucleicos

- Dependiendo del tejido a partir del cual quiera realizarse la extracción de ácidos nucleicos, es posible que deba aplicarse alguna metodología previa que permita disociar el tejido y analizar la viabilidad celular
- A continuación se presentan algunas metodologías aplicables para:
 - A. Disociación de tejidos
 - B. Separación de células
 - C. Análisis de viabilidad
 - D. Lisis celular
 - E. Extracción, purificación y cuantificación de ácidos nucleicos
 - F. Separación y análisis de fragmentos



A.- Disociación de una muestra tisular

- Fragmentación mecánica: corte, triturado, sonicación, abrasión en mortero (con arena, albúmina, bolas,...)
- Disgregación química: rotura de matriz extracelular e uniones intercelulares (solución isotónica, detergentes, quelantes de Ca^{++} como EDTA,...)
- Digestión enzimática: proteasas (como colagenasa, proteinasa K, tripsina,...)



B.- Separación celular

La separación celular puede realizarse mediante diferentes métodos. Los más habituales son:

1.- Por centrifugación diferencial, zonal o isopícnica (Mark Frei. Centrifugation Separations. [Internet]. MO, USA: Sigma-Aldrich. BioFiles Volume 6, Number 5 [citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde:

<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/centrifugation-separations.html>)

2.- Por citometría de flujo (Derek Davies. Cell Sorting by Flow Cytometry. [Internet] New Jersey, USA: M.G. Macey Humana Press [citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: <http://www.facs.ethz.ch/docs/lit>) (Davies 2007)

3.- Por afinidad con partículas magnéticas (MACS Technology [Internet]. Miltenyi Biotec [citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: http://www.dartmouth.edu/~dartlab/uploads/MACS_Technology_Flyer.pdf)



C.- Caracterización y análisis de viabilidad celular

La caracterización y análisis de viabilidad suele realizarse mediante diferentes técnicas (Schwab, 2014). La más habitual es mediante microscopía de contraste de fases, que permite

- Contar las células, determinar su integridad y viabilidad, función metabólica,...
- Para el análisis celular se suelen utilizar colorantes (como el azul tripan) o fluorocromos
- Más información en: Nexcelom Bioscience [Internet]. Massachusetts, USA: Nexcelom [citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde:
<http://www.nexcelom.com/Applications/measure-cell-viability-using-trypan-blue-or-AOPI.php#feature1a>



D.- Lisis celular

- A veces, se realiza la lisis celular de forma simultánea a la preparación de la muestra (homogenización)
- Para ello, se usan medios hipotónicos, detergentes,...
- En el proceso se debe garantizar la integridad del DNA, por lo que es habitual el uso de inhibidores de nucleasas (EDTA, DEPC,...), guantes,...
- Si se quiere trabajar con RNA: deben adoptarse medidas adicionales que eliminen las RNasas (temperaturas elevadas, uso de productos químicos específicos como DEPC, etc) ya que el RNA es especialmente degradable por ribonucleasas (Brown & Audet, 2008)



E.- Extracción de ácidos nucleicos

Pueden utilizarse diferentes metodologías, dependiendo de los objetivos (Nicholl, 2008, Wink, 2011):

- Disolventes orgánicos: es la técnica más común para extraer y precipitar cualquier tipo de ácido nucleico (Sambrook J. and Russell DV. Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform. Protocols [Internet]. USA: Cold Spring Harbor Press [citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.prot4455.full>)
- CsCl: se suele utilizar para obtener grandes cantidades de DNA plasmídico purificado (Noles SR. Traditional Methods for CsCl Isolation of Plasmid DNA by Ultracentrifugation. [Internet]. USA: Thermo Fisher Scientific [citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/D17309~.pdf>)
- Columnas con material adsorbente: se suelen utilizar para cualquier tipo de ácidos nucleicos y son la base de los kits comerciales para extracción y purificación (Kennedy S. How DNA extraction kits works in the lab [28 jun. De 2010; citado el 25 oct. de 2016] In: The missing manual for bioscientists. USA: BitesizeBio [Internet]. Disponible desde: <http://bitesizebio.com/13516/how-dna-extraction-rna-miniprep-kits-work/>)



Cuantificación de ácidos nucleicos

Habitualmente, la cuantificación se realiza por espectrometría de luz u.v a 260 nm: se mide la densidad óptica (OD) de una muestra acuosa que contiene el ácido nucleico de interés. La absorbancia u OD es dependiente del tipo de ácido nucleico y proporcional a la concentración existente en la solución acuosa (Nicholl, 2008; Wink, 2011):

- 1 mg/ml de DNA duplexo tiene una A260 de 20, por lo que 1 OD de dsDNA corresponde a una concentración de 50ug DNA/mL
- 1 mg/ml de RNA simplexo tiene una A260 de 25, por lo que 1 OD de ssRNA corresponde a una concentración de 40 ug RNA/mL



Pureza de una muestra de ácidos nucleicos

- Las muestras de ácidos nucleicos suelen estar asociadas a proteínas, las cuales tienen una absorción máxima a 280 nm.
- Para estimar el grado de pureza de una solución de ácidos nucleicos, se estima la relación A_{260}/A_{280} .
- Para DNA, si esta relación es $\geq 1,8$ se considera que la solución es pura
- Para RNA, si esta relación es $\geq 2,0$ se considera que la solución es pura



F.- Separación y análisis de fragmentos

- Existen diferentes métodos para separar moléculas de ácidos nucleicos
- Para diferenciar fragmentos de diferente tamaño, el método habitualmente utilizado es la electroforesis en gel de agarosa
- Información adicional sobre métodos de separación:

Separation[Internet]. Vermont, USA: University of Vermont. [citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde:

http://www.uvm.edu/~biology/Classes/296D/12_Separation.pdf

(Lee *et al.* 2012)



Electroforesis en gel de agarosa

- Se genera un gel con un entramado molecular que ayudará a separar fragmentos de diferente tamaño en una mezcla de fragmentos de DNA o RNA, tras la aplicación de una corriente eléctrica
- Para generar el gel se prepara una solución de agarosa al 1-2% en un tampón (normalmente TAE) a un pH 8.2-8.4
- La solución se hierve para homogenizar la agarosa
- Se deja enfriar ligeramente y se añade EtBr, un agente que se intercala en moléculas de ácidos nucleicos duplexas y que es fluorescente a la luz ultravioleta
- La solución se vierte en un molde en el que se marcan pocillos en los que luego se introducirán soluciones de DNA o RNA y se deja enfriar hasta su solidificación
- Tutorial sobre electroforesis en agarosa: Agarose Gel Electrophoresis [Internet] BioRad [11 oct. De 2012; citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: <https://www.youtube.com/watch?v=vq759wKCCUQ>



2.- Amplificación de secuencias mediante PCR

- La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es un método que permite amplificar de un modo eficiente y rápido fragmentos de DNA mediante el uso de un enzima denominada Taq DNA polimerasa, que tiene capacidad de síntesis de moléculas de DNA a partir de una hebra molde, a temperaturas óptimas elevadas (entre 75-80°C)



PCR

- La técnica consiste en realizar *in vitro* múltiples copias de un fragmento de DNA específico (amplificar una región genómica concreta), utilizando para ello el DNA duplexo original como molde.
- La especificidad en la región genómica a amplificar se consigue utilizando pequeñas secuencias de nucleótidos (oligos) complementarios a las secuencias que flanquean la región genómica que se quiere amplificar (cebadores). Estos cebadores hibridan con el DNA molde en las secuencias que flanquean la región genómica de interés.
- El DNA molde se replica *in vitro* mediante un enzima termo-resistente (enzima Taq polimerasa) tras su desnaturalización e hibridación de los cebadores.
- La reacción de replicación se repite cíclicamente.



Elementos necesarios para realizar una reacción de PCR

- dNTP
- Cebadores (oligo o primers)
- Mg^{2+} (co-factor de la polimerasa)
- Tampón (para mantener el pH de la reacción)
- Taq polimerasa
- DNA molde (el genoma que se quiere amplificar)



Imagen de Database Center for Life Science (DBCLS) (autor publicada en commons.wikimedia (https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Thermocyclers#/media/File:Thermal_cycler_2.png) bajo Licencia Creative Commons BY-NC-SA)

Equipo para realizar las reacciones cíclicas de PCR de forma automática:
Termociclador



Etapas de una PCR

Cada ciclo contiene 3 etapas:

- **Desnaturalización:** el DNA duplexo molde se calienta a 92-95°C para que las dos hebras se separen
- **Hibridación:** cuando la temperatura baja (a unos 50-55°C) los cebadores que están en la reacción hibridan con las secuencias complementarias del DNA molde
- **Elongación:** a partir del extremo 3' del cebador hibridado, el enzima Taq polimerasa añade nucleótidos por complementariedad con la hebra molde. Esta reacción se realiza a 72-75°C

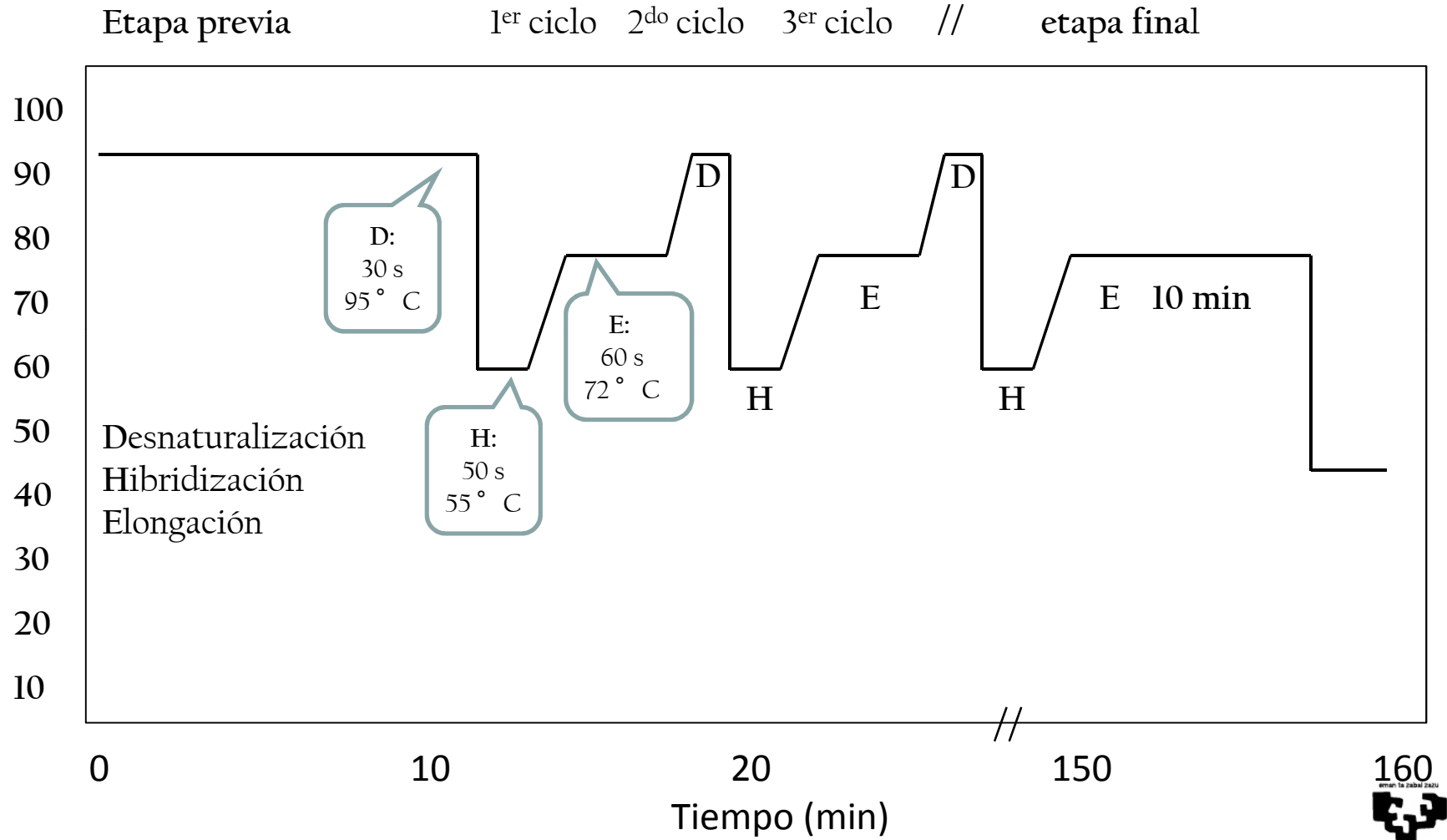


Ciclos de una PCR

- Puesto que se trata de generar múltiples copias de una región genómica concreta, el proceso que sucede en cada etapa se repite durante múltiples ciclos.
- Cuantos más ciclos se realicen, mayor será el número de copias que contendrá el producto final (hasta la saturación del sistema o el agotamiento de los productos necesarios para la síntesis). Un número de ciclos habitual es 30.
- Como el proceso de amplificación es exponencial, en una reacción con 30 ciclos se obtendrán 2^{30} copias por cada doble hebra de DNA original.



Reacción de PCR: diagrama de ciclos



Información adicional sobre PCR

En la web, existen numerosos vídeos que se pueden consultar para obtener más detalles sobre la técnica de PCR. Aquí recogemos un vídeo explicativo y un tutorial:

- PCR-Polymerase Chain Reaction- Simple Animated Tutorial [Internet]. Thermo Fisher Scientific [1 jun. de 2012; citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde:

<https://www.youtube.com/watch?v=DkT6XHWne6E>

- How to Set up the PCR Reaction[Internet]. Thermo Fisher Scientific [28 feb. de 2013; citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: <https://www.youtube.com/watch?v=NYIT3f-MZ5o&nohtml5=False>



Diseño de cebadores (o *primers*)

- Para realizar una reacción de PCR que amplifique específicamente una región genómica, resulta fundamental diseñar correctamente los cebadores (Diffenbach et al 1993)
- Para ello, la secuencia del DNA molde debe ser **conocida**
- Cada primer individual debe contar con una longitud de **18-24 bases**.
- La distancia entre los cebadores (tamaño del fragmento a amplificar) no debe ser superior a **1 kb**



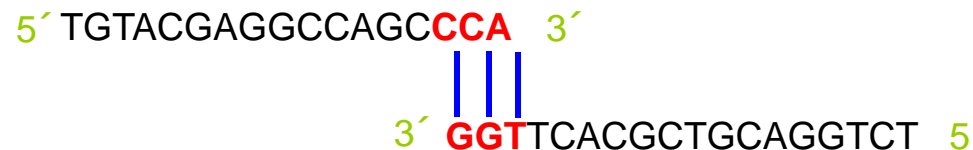
Complementariedad en cebadores

Para una correcta amplificación, no debe existir complementariedad intra- o inter- primers.

Complementariedad intra – primer (si es de más de 3 bases), facilita que los primers se plieguen y formen estructuras de doble cadena, lo cual interfiere en su alineamiento al DNA molde



Complementariedad inter – primer: los dímeros entre los cebadores, producen una disminución en la formación de producto, por competencia (tiene más efecto negativo si ocurre en extremos 3', donde se une la DNA polimerasa).



Tm de los cebadores

- Tm (T melting) es la temperatura a la cual la mitad de las bases del primer están apareadas con el ADN molde.
- Es importante considerar el valor de Tm porque una pareja de cebadores debe tener Tm parecidas ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) y su valor debe estar entre $50\text{-}65^{\circ}\text{C}$. Esto significa que el contenido GC debe ser similar entre ambos cebadores y que debe estar entre 50% y 60%
- El valor de Tm se puede calcular utilizando las fórmulas de abajo, dependiendo de si el tamaño del cebador es menor o mayor de 13 nucleótidos (nt)

$$Tm = 4 \times GC + 2 \times AT \quad <13 \text{ nt}$$

$$Tm = 64.9 + 41 \times (yG + zC - 16.4) / (wA + xT + yG + zC) \quad >13 \text{ nt}$$

Existen programas para calcular automáticamente el Tm de cebadores

http://www.biophp.org/minitools/melting_temperature/demo.php?formula=basic

<http://www.promega.com/a/apps/biomath/index.html?calc=tm>



Secuencia de los cebadores

- La secuencia de los primers individuales debe iniciarse y terminarse con 1 ó 2 bases púricas
- Deben evitarse regiones con potencialidad para formar estructuras secundarias internas
- Pueden agregarse secuencias adicionales en el extremo 5' del primer (no incluirlas cuando se estima la T_m del primer)
- Se pueden agregar degeneraciones en algunas posiciones del primer
- Debe evitarse una T en la última base del extremo 3'
- Deben evitarse *mismatches* en el extremo 3'



Otras variables a considerar en el diseño de cebadores

- La Temperatura de hibridización ($T_{\text{annealing}}$) de la reacción de PCR depende de la T_m de los primers
- $T_{\text{annealing}}$ debe ser 5°C menos que la T_m más baja del par de primers elegidos
- $T_{\text{annealing}}$ debe ser de, al menos, 50°C .



Diseño de cebadores

Para diseñar cebadores específicos para un gen determinado, se proponen los siguientes pasos:

1.- Buscar la secuencia del gen en la web NCBI
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Por ejemplo, buscar la secuencia del gen *MC1R* o *Melanocortin 1 receptor*, de *Homo sapiens*)

2.- Diseñar los cebadores empleando herramientas bioinformáticas, como la página del NCBI y el software libre *Primer3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)



1.- Buscar la secuencia del gen *MC1R* o *Melanocortin 1 receptor* humano

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide Search Limits Advanced Help

Display Settings: GenBank Send: Change region shown Customize view

Homo sapiens melanocortin 1 receptor (alpha melanocyte stimulating hormone receptor) (MC1R), RefSeqGene on chromosome 16

NCBI Reference Sequence: NG_012026.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS NG_012026 10099 bp DNA linear PRI 05-NOV-2012
 DEFINITION Homo sapiens melanocortin 1 receptor (alpha melanocyte stimulating hormone receptor) (MC1R), RefSeqGene on chromosome 16.
 ACCESSION NG_012026
 VERSION NG_012026.1 GI:237681094
 KEYWORDS RefSeqGene.
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM [Homo sapiens](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.
 COMMENT REVIEWED [REFSEQ](#): This record has been curated by NCBI staff. The reference sequence was derived from [AC092143.4](#). This sequence is a reference standard in the [RefSeqGene](#) project.

Summary: This intronless gene encodes the receptor protein for melanocyte-stimulating hormone (MSH). The encoded protein, a seven pass transmembrane G protein coupled receptor, controls melanogenesis. Two types of melanin exist: red pheomelanin and black eumelanin. Gene mutations that lead to a loss in function are associated with increased pheomelanin production, which leads to lighter skin and hair color. Eumelanin is photoprotective but pheomelanin may contribute to UV-induced skin damage by generating free radicals upon UV radiation. Binding of MSH to its receptor

Analyze this sequence
 Run BLAST
 Pick Primers
 Highlight Sequence Features
 Find in this Sequence

Articles about the MC1R gene
 Alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses oxidative stre [Mol Cancer Res. 2012]
 Germline melanocortin-1-receptor genotype is associated with severity [J Invest Dermatol. 2012]
 Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for genei [Nat Genet. 2012]
 See all...

Variation viewer
 See a summary of MC1R variations, including those of clinical significance.

Reference sequence information
 RefSeqGene

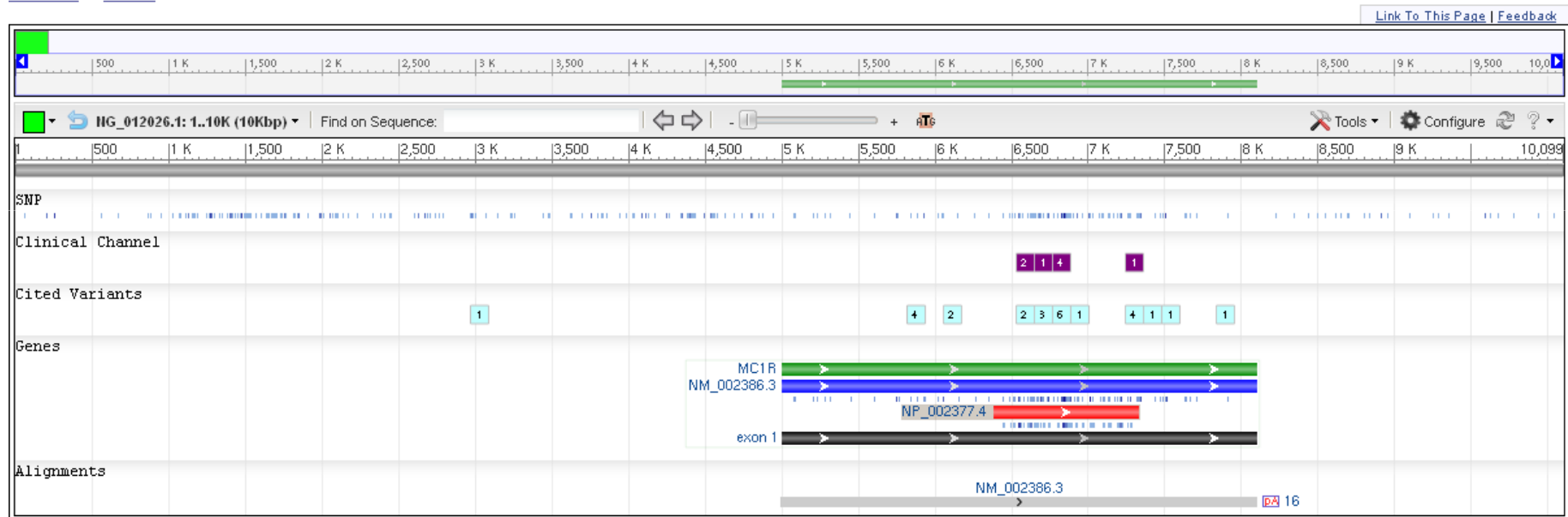


Interfaz gráfico obtenido

Homo sapiens melanocortin 1 receptor (alpha melanocyte stimulating hormone receptor) (MC1R), RefSeqGene on chromosome 16

NCBI Reference Sequence: NG_012026.1

[GenBank](#) [FASTA](#)



La secuencia corresponde siempre a la hebra codificante: 5' → 3'



Interfaz parcial en formato *Genebank*

Para diseñar los
cebadores, seleccionar
la secuencia codificante
(CDS): 6381-7334
(~ 1 kb)

```

/db_xref="HGNC:6929"
/db_xref="MIM:155555"
exon
5001..8099
/gene="MC1R"
/gene_synonym="CMM5; MSH-R; SHEP2"
/inference="alignment:Splign:1.39.8"
/number=1
6381..7334
CDS
/gene="MC1R"
/gene_synonym="CMM5; MSH-R; SHEP2"
/inference="similar to AA sequence (same
species):RefSeq:NP_002377.4"
/exception="annotated by transcript or proteomic data"
/note="melanotropin receptor; MC1-R"
/codon_start=1
/product="melanocyte-stimulating hormone receptor"
/protein_id="NP_002377.4"
/db_xref="GI:193083134"
/db_xref="CCDS:CCDS56011.1"
/db_xref="GeneID:4157"
/db_xref="HGNC:6929"
/db_xref="MIM:155555"
/translation="MAVQGSQRRLGSLNSTPTAIPQLGLAANQTGARCLEVISIDGL
FLSLGLVSLVENALVVATIARNRNLHSPMYCFICCLALSDLVSGSNVLETAVILLE
AGALVARAAVLQQLDNVIDVITCSSMLSSLCFLGAIADVDRYSISIFYALRYHSIVTLPR
ARRAVAAIIVVASVVFSTLFIAYYDHVAVLLCLVVFFLAMLVLMVLYVHMLARACQHA
QCIARLHKRQRPVHQGFGLKGAVTLTILGIFFLCWGPFLLHLTLIVLCPEHPTCCGI
FKNFNLFALIIICNAIIDPLIYAFHSQELRRTLKEVLTCSW"
STS
6482..6781
/gene="MC1R"
/gene_synonym="CMM5; MSH-R; SHEP2"
/standard_name="M73K"
/db_xref="UniSTS:254151"
STS
7312..7451
/gene="MC1R"
/gene_synonym="CMM5; MSH-R; SHEP2"
/standard_name="SHGC-61142"
/db_xref="UniSTS:15695"
STS
7945..8069
/gene="MC1R"
/gene_synonym="CMM5; MSH-R; SHEP2"
/standard_name="RH92296"
/db_xref="UniSTS:84616"
ORIGIN
1 gccccacgct ctgcaggaag agatcatggg ggcggggagt tgggtgctgcg gcctcgttcc
61 tctctgcagt gagtgaacga tgtttggtgt cagcaggagc ctgtggggag cacaggctgg
121 tctctcgtgt gtccccacca ccccttttcc catgggggat ctgcactcat ctccaggga

```



2.- Obtener la secuencia del gen en formato FASTA

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide Search Limits Advanced Help

Display Settings: GenBank Send:

Homo sapiens melanocortin 1 receptor (alpha melanocyte stimulating hormone receptor) (MC1R), RefSeqGene on chromosome 16

NCBI Reference Sequence: NG_012026.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS NG_012026 10099 bp DNA linear PRI 05-NOV-2012

DEFINITION Homo sapiens melanocortin 1 receptor (alpha melanocyte stimulating hormone receptor) (MC1R), RefSeqGene on chromosome 16.

ACCESSION NG_012026

VERSION NG_012026.1 GI:237681094

KEYWORDS RefSeqGene.

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM [Homo sapiens](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

COMMENT REVIEWED [REFSEQ](#): This record has been curated by NCBI staff. The reference sequence was derived from [AC092143.4](#). This sequence is a reference standard in the [RefSeqGene](#) project.

Summary: This intronless gene encodes the receptor protein for melanocyte-stimulating hormone (MSH). The encoded protein, a seven pass transmembrane G protein coupled receptor, controls melanogenesis. Two types of melanin exist: red pheomelanin and black eumelanin. Gene mutations that lead to a loss in function are associated with increased pheomelanin production, which leads to lighter skin and hair color. Eumelanin is photoprotective but pheomelanin may contribute to UV-induced skin damage by generating free radicals upon UV radiation. Binding of MSH to its receptor

Change region shown

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Articles about the MC1R gene

Alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses oxidative stre [Mol Cancer Res. 2012]

Germline melanocortin-1-receptor genotype is associated with severity [J Invest Dermatol. 2012]

Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for genei [Nat Genet. 2012]

See all...

Variation viewer

See a summary of MC1R variations, including those of clinical significance.

Reference sequence information



3.- Introducir la secuencia en formato FASTA en el programa Primer3

4.- Proponer un cebador, el tamaño de amplicón que se quiere obtener y pedir análisis de cebadores

Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence. [Checks for mispriming in template.](#)
[Primer3plus interface](#)

Paste source sequence below (5'→3', string of ACGTNaacgn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, L1)

```

GCCCCACGCTCTGCAGGAAGAGATCATGGGGGCGGGGAGTTGGTGTGCGGCCTCGTTCTCTCTGCAGT
GAGTGAACGATGTTTGGTTCAGCAGGAGCCTGTGGGAGCAGGCTGGTCTCTCTGGTGTCCACCCCA
CCCTTTTCCATGGGGATCTGCACCTCATCTCCAGGGAAGATGGTTGGGAGATAACCCCAAGTCTGCTCT
AGGTCCCCACCCTCCACAGCCAGGGTGGTCCGTGGTGAGCTTCAGCCATCGAGATCGGGGAGTCTGCTAG
AGTCTTCAGGGTCTTTTCTGTGAAAATGACAGGCTAGCAAGGAGACCTGGGTCCCTGCCTCTCCATTTC
CAGATGCCTTGAGTCCACCCAAATAGGGGATGTGATGTTGGAGCTGCAGCAGCCGCCCTACGGTTGGGA
GTCAGAGAAGAGCCGGTTCAGGGACAATGCAGCAGAGGCTGAGCCCAGGCCCTGCTGTCTGAGAGGT
    
```

Secuencia del gen en formato FASTA

Pick left primer, or use left primer below: Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below: Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand):

Analizará el cebador propuesto y propondrá el cebador reverso

Secuencia de cebador directo

Sequence Id: A string to identify your output.

Targets: E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the [source sequence](#) with [and]: e.g. ...ATCT[CCCC]TCAT. me

Excluded Regions: E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the [source sequence](#) with < and >: e.g. ...AT

Product Size Ranges: **Tamaño de amplicón (~ 1 kb)**

Number To Return: Max 3' Stability:

Max Repeat Mispriming: Pair Max Repeat Mispriming:

Max Template Mispriming: Pair Max Template Mispriming:

General Primer Picking Conditions

Primer Size: Min: Opt: Max:

Primer Tm: Min: Opt: Max: Max Tm Difference: Table of thermodynamic parameters:

Product Tm: Min: Opt: Max:

Primer GC%: Min: Opt: Max:



Interfaz parcial de la respuesta de Primer 3: características de cebadores

Primer3 Output

No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
Cebador directo LEFT PRIMER	6349	20	59.99	55.00	5.00	0.00	CAACGACTCCTTCCTGCTTC
Cebador reverso RIGHT PRIMER	7334	19	61.02	57.89	4.00	3.00	TCACCAGGAGCATGTCAGC

SEQUENCE SIZE: 10099
INCLUDED REGION SIZE: 10099

Tamaño de amplicón → PRODUCT SIZE: 986, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 2.00

5' → 3'

```

1  GCCCCACGCTCTGCAGGAAGAGATCATGGGGGCGGGGAGTTGGTGTGCGGCCCTCGTTCC
61  TCTCTGCAGTGAGTGAACGATGTTTGTGGTCAGCAGGAGCCTGTGGGGAGCACAGGCTGG
121 TCCTCCTGGTGTCCCACCCACCCCTTTTTCCATGGGGGATCTGCACTCATCTCCAGGGAA
181 GATGGTTGGGAGATAACCCCACTGCTCTAGGTCCCCACCCTCCACAGCCAGGGTGGTC
241 CGTGGTGAGCTTCAGCCATCGAGATGCGGGGAGTCTGCTAGAGTCTTCAGGGTCTTTTCTC
301 TGAAAATGACAGGCTAGCAAGGAGACCTGGGTCCCCTGCCTCTTCCATTCCAGATGCCTT
361 GAGTCCACCCAAATAGGGGATGTGATGTTTGGAGCTGCAGCAGCCGCCCTACGGTTGGGA

```



Interfaz parcial de la respuesta de Primer 3: lugar de hibridación de cebadores

5'

Forward
o Directo

6241 TGCCCAGATGGAAGGAGGCAGGCATGGGGGACACCCAAGGCCCCCTGGCAGCACCATGAA

6301 CTAAGCAGGACACCTGGAGGGGAAGAACTGTGGGGACCTGGAGGCCCTCCAACGACTCCTT
>>>>>>>>>>

6341 CCTGCTTCCTGGACAGGACTATGGCTGTGCAGGGATCCCAGAGAAGACTTCTGGGCTCCC
>>>>>>>

6421 TCAACTCCACCCCCACAGCCATCCCCCAGCTGGGGCTGGCTGCCAACCAAGACAGGAGCCCC

6481 GGTGCCTGGAGGTGCCATCTCTGACGGGCTCTTCTCAGCCTGGGGCTGGTGAAGCTTGG

6541 TGGAGAACGGCTGGTGGTGGCCACCATCGCCAAAGAACCAGAACCTGCACCTCACCCTATGT

6601 ACTGCTTCATCTGCTGCCTGGCCTTGTGCGACCTGTGTGAGCGGGAGCAACGTGCTGG

6661 AGACGGCCGTCATCCTCTGCTGGAGGGCCGGTGCACGTGTGGCCGGGGCTGCGGTGCTGC

6721 AGCAGCTGGACAATGTCAATTGACGTGATCACCTGCAGCTCCATGCTGTCCAGCCTCTGCT

6781 TCCTGGGCGCCATCGCCGTGGACCGCTACATCTCCATCTTCTACGCACTGGGCTACCACA

6841 GCATCGTGACCCCTGCCCGGGGCGGGGAGCCGTTGCGGCCATCTGGGTGGCCAGTGTCG

6901 TCTTCAGCACGCTCTTCATCGCCTACTACGACCAGTGGCCGCTCCTGCTGTGCCTCGTGG

6961 TCTTCTCTGGCTATGCTGGTGTCTCATGGCCGTGCTGTACGTCCACATGCTGGCCCGGG

7021 CCTGCCAGCACGCCAGGGCATCGCCCGGCTCCACAAGAGGCAGCCCCGGTCCACCAGG

7081 GCITTTGGCCTTAAAGGGCGTGTCACCCTCACCATCCTGCTGGGCATTTTCTTCCTCTGCT

7141 GGGGCCCCCTTCTTCCTGCATCTCACACTCATCGTCCTTGCCCCGAGCACCCACGTGCG

7201 GCTGCATCTTCAAGAACTTCAACCTCTTTCTCGCCCTCATCATCTGCAATGCCATCATCG

7261 ACCCCCTCATCTACGCCCTTCCACAGCCAGGAGCTCCGCAGGACGCTCAAGGAGGTGCTGA
<<<<<<

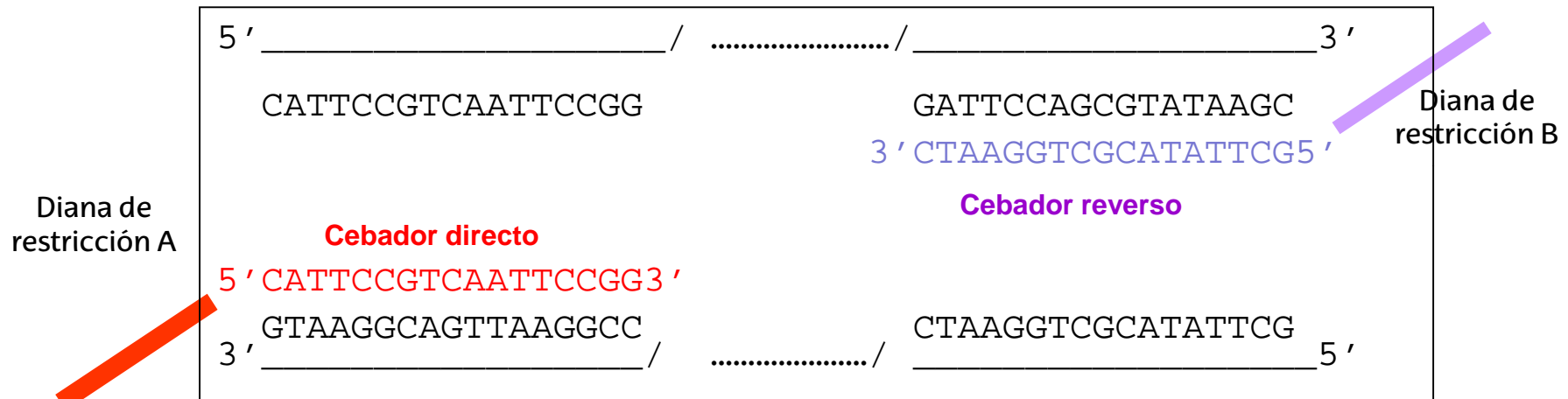
7321 CATGCTCCTGGTGAGCGGGTGCACGCGCCTTTAAGTGTGCTGGGCAGAGGGAGTGGTG
<<<<<<<<<<<<<<

3'

Reverse o Reverso



PCR para realizar una clonación molecular: cebadores con colas portando dianas de restricción

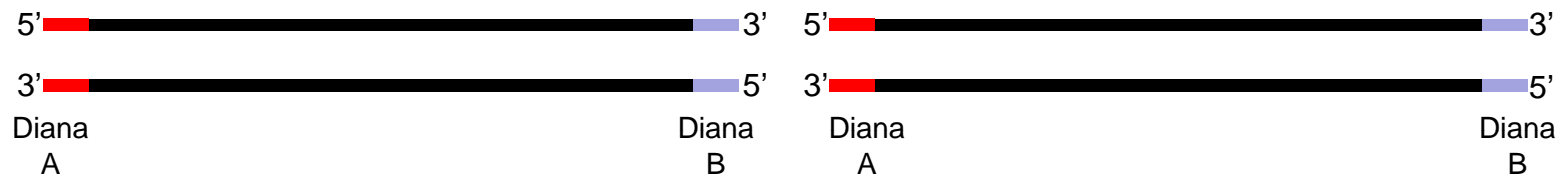


A los cebadores diseñados, se les puede añadir una corta secuencia en el extremo 5' que incluya una secuencia diana de un enzima de restricción concreto



PCR para realizar una clonación molecular: cebadores con colas portando dianas de restricción

Tras la amplificación, cada fragmento obtenido por PCR estará flanqueado en cada extremo por una diana para un enzima



Si digerimos con ambas enzimas, se obtienen fragmentos con extremos diferentes que pueden ser clonados en un vector de expresión digerido con A+B



3. Transfección de células de mamífero

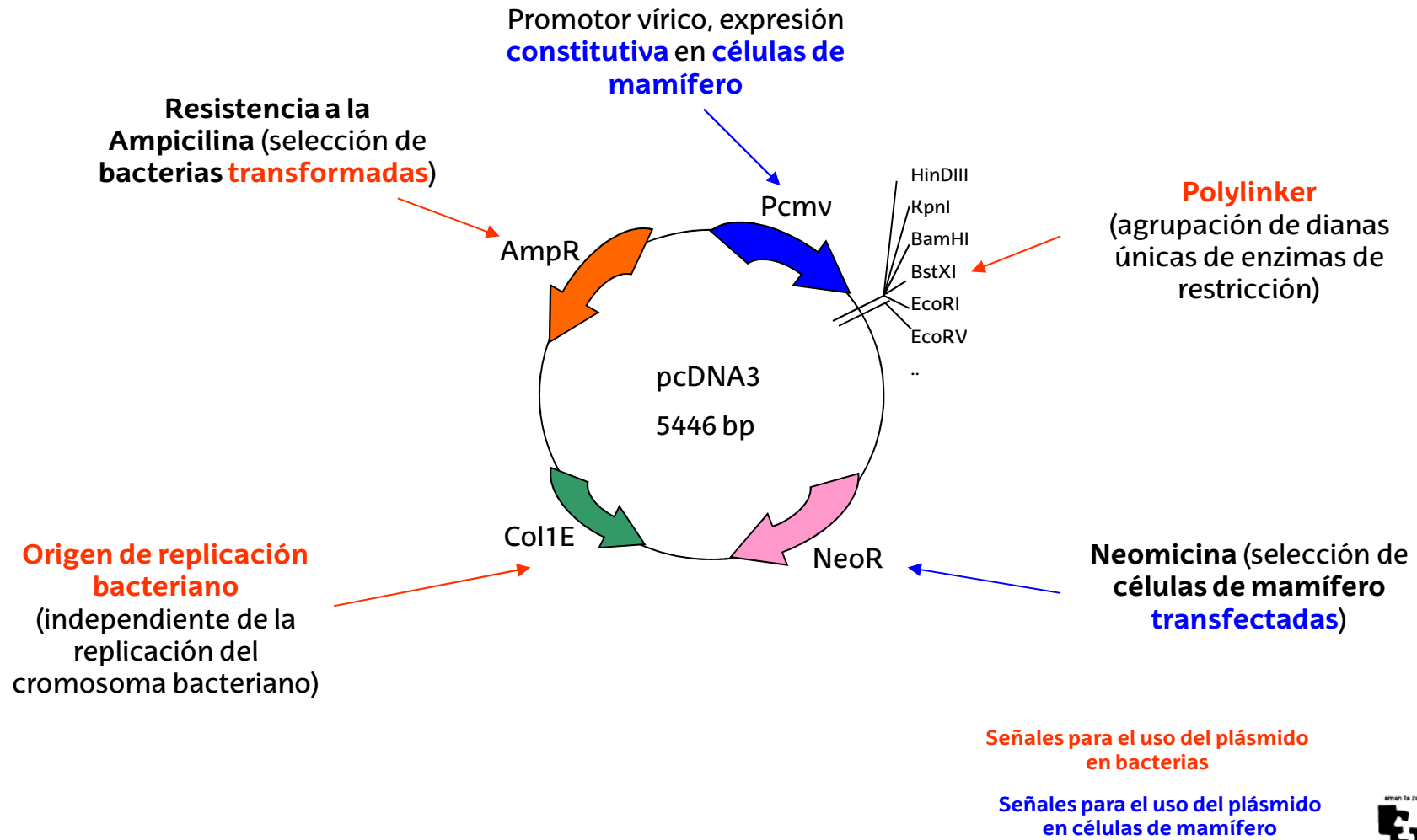
- La transfección es la introducción de genes en células eucariotas mediante el empleo de constructos de DNA, utilizando para la transferencia plásmidos recombinantes (u otras herramientas) y alguna metodología que facilite la introducción de estas construcciones en el núcleo celular.
- Los plásmidos muestran una baja toxicidad y, en general, son de bajo coste y fácil manejo, por lo que suelen ser frecuentemente utilizados.

Los plásmidos de expresión permiten obtener gran cantidad de la proteína obtenida a partir de la secuencia nucleotídica clonada e investigar el **fenotipo** que se produce por esa expresión.

- Algunos plásmidos de expresión permiten regular los niveles y las condiciones en las que expresar la proteína de interés.



Ejemplo de un plásmido de expresión en mamíferos



Métodos de transfección en células de mamíferos

La transfección con plásmidos se puede realizar utilizando métodos químicos (como la utilización de liposomas) o físicos (como la electroporación, el bombardeo de partículas, la micro-inyección directa de DNA, etc.)

METODOS	COMENTARIOS
Liposomas	eficaz, no tóxico, sencillo
Fosfato cálcico	baja eficiencia
Electroporación	eficaz, supervivencia comprometida
Microinyección	cara, difícil, eficaz
Biobalística	células vegetales
Retrovirus	muy eficaz, trabajoso, requiere habilidad

(Kim & Eberwine, 2010)



Transfección mediante liposomas

- La transfección mediante liposomas tiene una alta eficiencia y una reducida toxicidad por lo que suele ser un procedimiento de elección.
- Se trata de polímeros de poliamidoaminas y lipopoliaminas con cargas positivas que se unen a las cargas negativas del DNA formando vesículas multilaminales.
- Las vesículas portadoras de DNA interactúan con los lípidos de la membrana celular, facilitando la transferencia de su carga (los ácidos nucleicos) al interior de los núcleos de las células eucariotas.
- Ejemplo: One focus. Transfection [Internet]. USA: Mirus Bio LLC [citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: <https://www.mirusbio.com/transfectopedia/methods>
- Tutorial de transfección:
DNA transfection using jetPRIME reagent [Internet]. USA: Chain de Polyplus Transfection . Polyplus [15 mar. de 2011; citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: http://www.youtube.com/watch?v=G39wNXaZPX4&feature=em-share_video_user



Expresión de genes transfectados

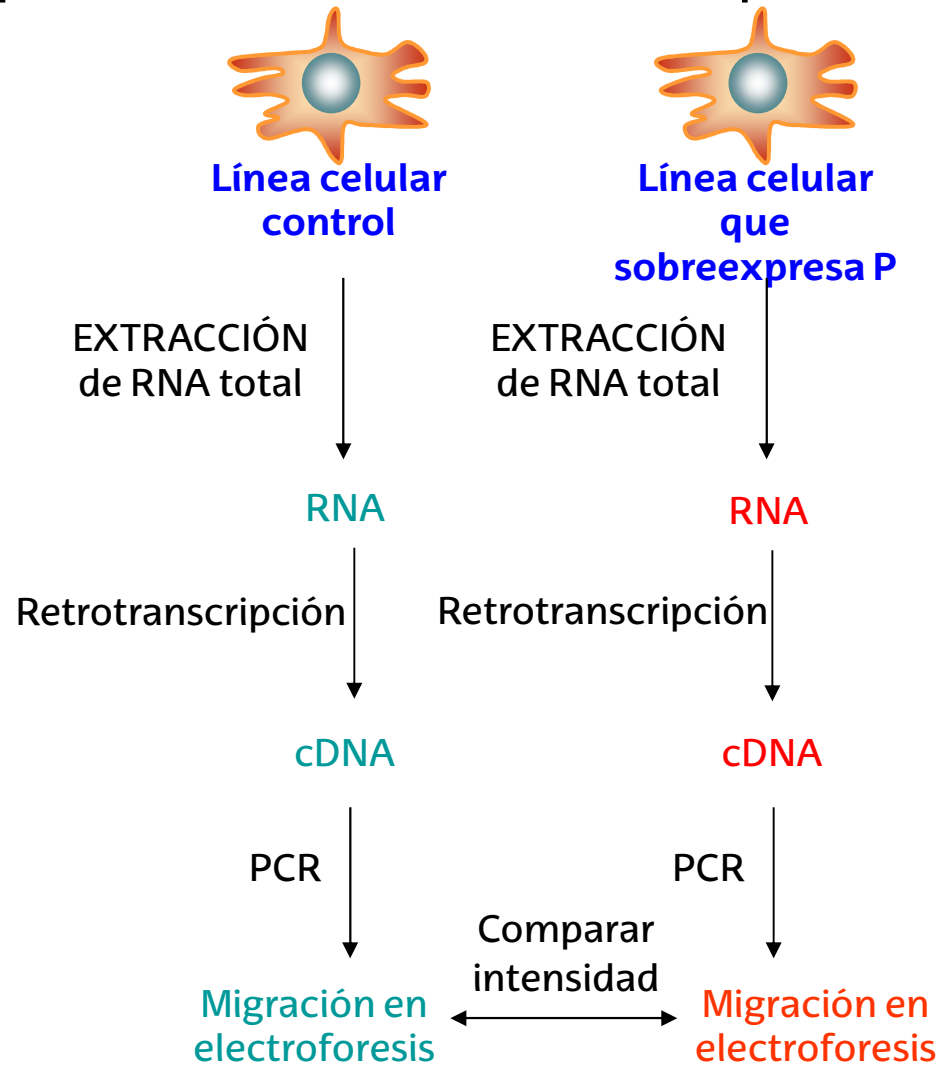
Los plásmidos recombinantes transfectados llevan secuencias que permiten:

- 1.- la selección de las células que portan los plásmidos de interés
- 2.- la sobre-expresión del gen clonado

Información adicional: Patrick M. Plasmids 101: Mammalian Vectors [25 mar. de 2014; citado el 25 oct. de 2016]. In: Addgene´s Blog [Internet] Addgene. Disponible desde: <http://blog.addgene.org/plasmids-101-mammalian-vectors>



4. Análisis del fenotipo tras sobreexpresar una proteína: método sencillo para evaluar cambios en la expresión génica



Extracción de RNA con el reactivo TRIzol®

- El TRIzol® es un reactivo comercial (Life Technologies Inc., Gibco BRL), consistente en una solución de fenol y tiocianato de guanidina que permite aislar RNA total intacto a partir de células y tejidos mediante un solo paso de extracción.
- Durante el proceso, el TRIzol permite separar el RNA del DNA, las proteínas y demás componentes celulares. El reactivo TRIzol contiene los siguientes componentes:
 - a) Fenol saturado: provoca la separación y estabilización de lípidos y permite la separación de las proteínas, DNA y RNA en diferentes fases (ver después)
 - b) Tiocianato de guanidina: provoca la desnaturalización de las proteínas (incluidas RNasas), la ruptura de membrana plasmática y la separación del RNA de los ribosomas.



Extracción de RNA con el reactivo TRIzol®

La extracción de RNA se realiza en varios pasos:

1. **HOMOGENIZADO** de la muestra: la resuspensión de las células en trizol permite su lisado y la estabilización de sus componentes celulares. Cuando se incuba en trizol la muestra homogenizada, se consigue la disociación completa de los complejos de nucleoproteína.
- 2.- **SEPARACIÓN EN FASES**: si al trizol se le añade cloroformo, tras centrifugación aparecen dos fases: una roja en la parte inferior (fase de fenol-cloroformo) y otra superior (fase acuosa) y transparente. Los lípidos quedan en la fase orgánica, las proteínas y el DNA en la interfase y el RNA en la fase acuosa (la fase acuosa suele representar el 60% del volumen de trizol utilizado en la homogenización).



Extracción de RNA con el reactivo TRIzol®

3.- PRECIPITACIÓN DEL RNA: el RNA de la fase acuosa puede precipitarse con isopropanol, un alcohol miscible en agua que provoca la deshidratación del RNA, de forma que se puede precipitar mediante centrifugación. El RNA precipitado forma un ligero pellet en el fondo del tubo

4.- LAVADO DEL RNA: El RNA precipitado suele estar acompañado de sales. Para la eliminación de las sales el RNA se lava con etanol 75%. El lavado reduce las sales porque éstas son solubles en el 25% de agua, mientras el 75% de etanol mantiene el RNA precipitado.

5.- RESUSPENSIÓN DEL RNA: se emplea agua libre de RNasas, para evitar la degradación del RNA, que a diferencia del DNA es muy inestable.

Información adicional:

Benson C. RNA extraction Tutorial [Internet] [3 ene. de 2015; citado el 25 oct. de 2016].

Disponible desde:

<https://www.youtube.com/watch?v=MgNicWbANkA&nohtml5=False>



Análisis de la expresión génica

- La expresión génica puede analizarse mediante diversos métodos.
- Los métodos tradicionales se centran en analizar la expresión de un gen cada vez en un momento
- No obstante, existen diversos métodos para analizar la expresión de múltiples genes simultáneamente

Información adicional:

Robertson S. Gene Expression Techniques. News Medical Life Sciences [Internet] USA: AZO NETwork [actualizado 2 dic. de 2014; citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: <http://www.news-medical.net/life-sciences/Gene-Expression-Techniques.aspx>



Análisis de expresión génica mediante RT-PCR: Retrotranscripción y PCR

- Uno de los métodos habituales para analizar la expresión de un gen es la RT-PCR, que consiste en amplificar mediante PCR el mRNA obtenido tras la expresión de un determinado gen (Pfaffl, 2004).
- El enzima Taq polimerasa empleado en la reacción de PCR sólo es capaz de sintetizar DNA a partir de un molde de DNA, por lo que para poder utilizar esta técnica para amplificar moléculas de RNA es necesario generar previamente una cadena de DNA complementario (cDNA) a partir de cada molécula de mRNA, mediante una DNA polimerasa dependiente de RNA, un enzima conocida como transcriptasa inversa o RT (Reverse Transcriptase).

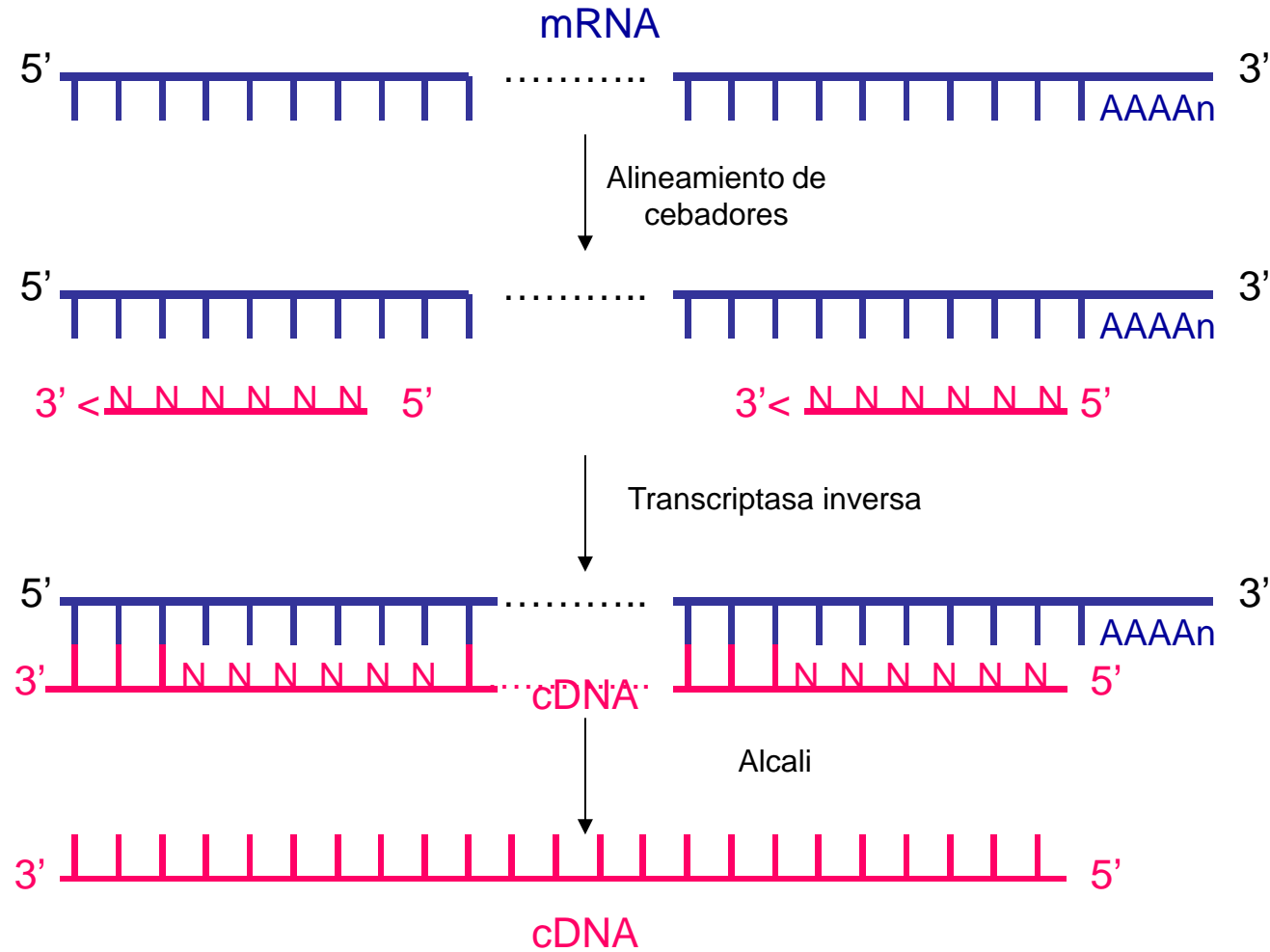


Análisis de expresión génica mediante RT-PCR: Retrotranscripción y PCR

- Mediante la reacción de RT se consigue una muestra de moléculas de cDNA que será representativa de los tipos de mensajeros expresados en la muestra de estudio.
- Los cebadores o primers habitualmente utilizados para esta reacción de RT suelen ser *random primers* (hexanucleótidos de secuencias aleatorias) que permiten la síntesis representativa de regiones 5' y 3' de la práctica totalidad de los RNAs.
- Información adicional:
Simplified RT- Reverse Transcription Animation [Internet]. Thermo Fisher Scientific [6 dic. de 2012; citado el 25 oct. de 2016].
Disponible desde:
<https://www.youtube.com/watch?v=0MJlbrS4fbQ&nohtml5=False>



Retrotranscripción



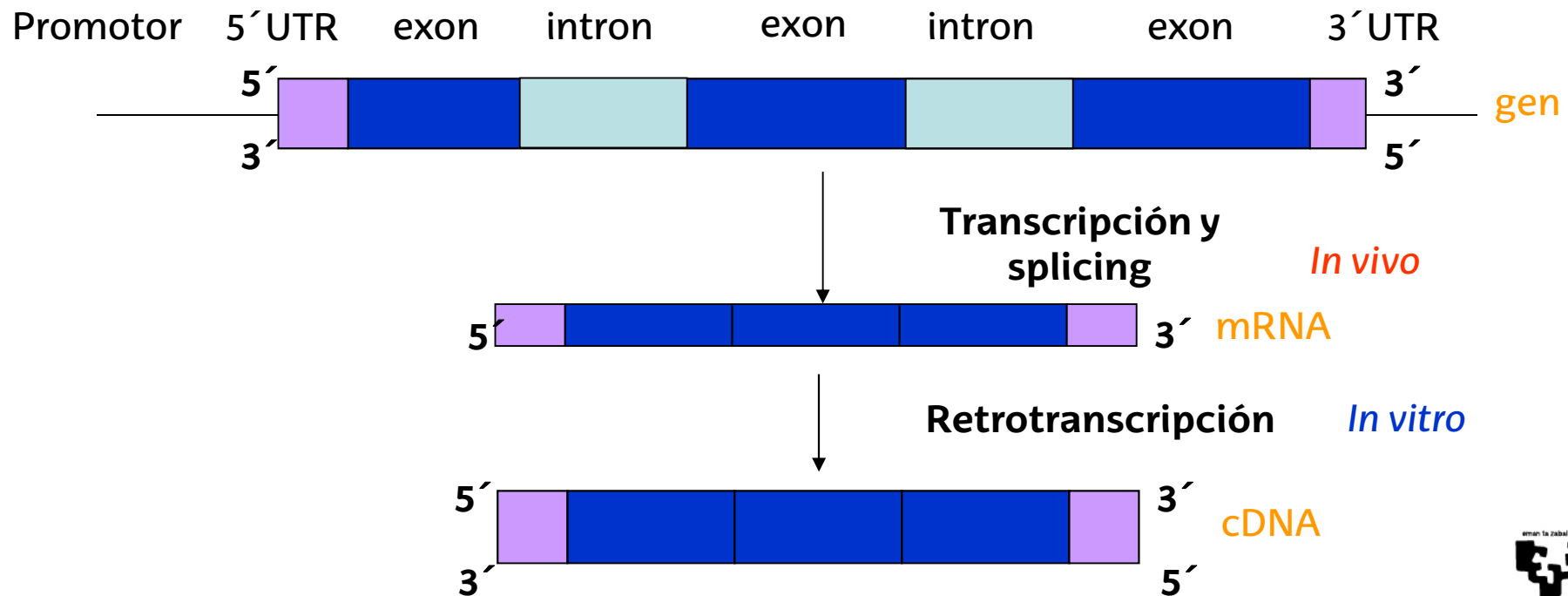
Análisis de expresión génica mediante RT-PCR: Retrotranscripción y PCR

- Una vez sintetizados los cDNAs mediante RT, se toman alícuotas de esa reacción para estudiar transcritos concretos mediante PCR, eligiendo una pareja de primers específicos para cada mensajero que se quiera amplificar. Amplificando un cDNA (específico del mRNA en estudio) se consigue obtener una señal apreciable incluso partiendo de cantidades de RNA muy pequeñas.
- La posibilidad de detectar con gran sensibilidad un mRNA mediante la estrategia RT-PCR representa la mayor aportación de esta técnica al estudio de la expresión génica. Prácticamente no existe límite para su poder de detección.



PCR para amplificar cDNA: el diseño de cebadores específicos es clave

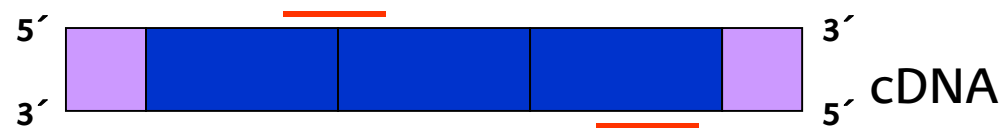
- Los cebadores deben amplificar **cDNA**, y no el **DNA genómico** que pudiera estar contaminando la muestra
- El **cDNA** tiene la misma secuencia que el DNA genómico, excepto porque no contiene **zonas reguladoras e intrones**



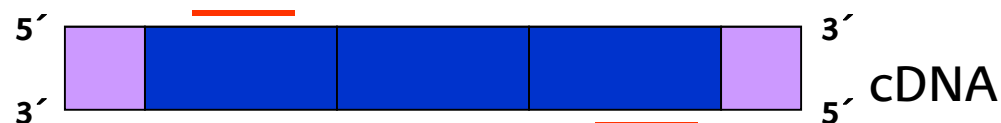
PCR para amplificar cDNA: el diseño de cebadores específicos es clave

Dos posible estrategias para diseñar cebadores que amplifiquen cDNA, pero no DNA

A) **Diseñar un cebador** que hibride con una zona **"a caballo"** entre dos exones. En este caso, es imposible que hibride en el DNA genómico y sólo hibridará con el cDNA

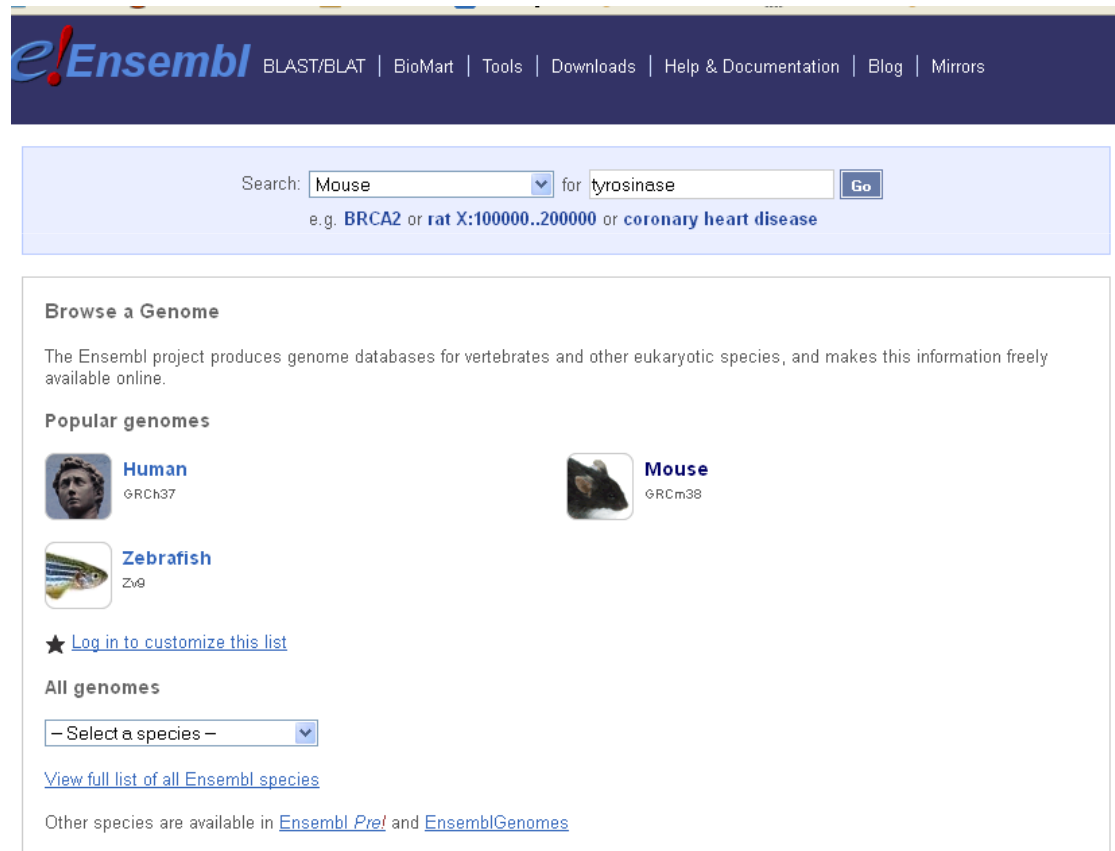


B) Diseñar **cebadores** de los que cada uno hibride con **un exón**. Si hibrida en el cDNA obtendremos un amplicón del tamaño esperado, pero si hibrida en el DNA genómico, el tamaño del amplificado será mucho mayor que el esperado y dependiente del **tamaño de los intrones**. Si el intrón tiene más de 1Kb, la PCR no funcionará, porque la secuencia a amplificar será demasiado grande.



Diseño de cebadores para amplificar el cDNA de Tirosinasa: *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>) y *Primer 3*

1.- Buscar la secuencia del gen Tirosinasa en Ensembl




e!Ensembl BLAST/BLAT | BioMart | Tools | Downloads | Help & Documentation | Blog | Mirrors


Search: for
e.g. BRCA2 or rat X:100000..200000 or coronary heart disease


Browse a Genome

The Ensembl project produces genome databases for vertebrates and other eukaryotic species, and makes this information freely available online.

Popular genomes

 **Human**
GRCh37

 **Zebrafish**
Zv9

 **Mouse**
GRCm38

★ [Log in to customize this list](#)

All genomes

[View full list of all Ensembl species](#)

Other species are available in [Ensembl Pre!](#) and [EnsemblGenomes](#)



2.- Localizar los exones

Ensembl Genes interface for Transcript: Tyr-201 (ENSMUST00000004770).

Description: tyrosinase [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98880]
Location: [Chromosome 7: 87,427,405-87,493,411](#) reverse strand.
Gene: This transcript is a product of gene [ENSMUSG00000004651](#) - This gene has 1 transcript

Name	Transcript ID	Length (bp)	Protein ID	Length (aa)	Biotype	CCDS
Tyr-201	ENSMUST00000004770	3307	ENSMUSP00000004770	533	Protein coding	CCDS52304

Transcript and Gene level displays

Views in Ensembl are separated into gene based views and transcript based views according to which level the information is more appropriately associated with. This view is a transcript level view. To flip between the two sets of views you can click on the Gene and Transcript tabs in the menu bar at the top of the page.

Transcript summary

Reverse strand | 66.01 Kb

Statistics
Exons: 5 **Coding exons:** 5 **Transcript length:** 3,307 bps **Translation length:** 533 residues

CCDS: This transcript is a member of the Mouse CCDS set: [CCDS52304](#)

Ensembl version: ENSMUST00000004770.5

Type: Known protein coding

Prediction Method: Annotation produced by the Ensembl [genebuild](#).

Exones



3.- Localizar los límites entre exones

CCDS Sequence Data

Blue highlighting indicates alternate exons.

Red highlighting indicates amino acids encoded across a splice junction.

Mouse over the nucleotide or protein sequence below and click on the highlighted codon or residue to select the pair.

Nucleotide Sequence (1602 nt):

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5

```

ATGTTCTTGGCTGTTTTGTATTGCCTTCTGTGGAGTTTCCAGATCTCTGATGGCCATTTTCCTCGAGCCT
GTGCCTCCTCTAAGAACTTGTGGCAAAAAGAAATGCTGCCACCATGGATGGGTGATGGGAGTCCCTGCGG
CCAGCTTTCAGGCAGAGGTTCCCTGCCAGGATATCCTTCTGTCCAGTGCACCATCTGGACCTCAGTTCCCC
TTCAAAAGGGGTGGATGACCGTGAGTCTGGCCCTCTGTGTTTTATAATAGGACCTGCCAGTGCACAGGCA
ACTTTCATGGGTTTCAACTGCGGAAACTGTAAGTTGGATTGGGGGCCAAAATTGTACAGAGAAGCGAGT
CTTGATTAGAAGAAACATTTTTGATTGAGTGTCTCCGAAAAGAATAAGTTCTTTTCTTACCTCACTTTA
GCAAAACATACTATCAGCTCAGTCTATGTATCCCCACAGGCACCTATGGCCAAAATGAACAATGGGTCAA
CACCCATGTTTAAATGATATCAACATCTACGACCTCTTTGTATGGATGCATTAATGTGTCAAGGGACAC
ACTGCTTGGGGCTCTGAAAATATGGAGGACATGATTTTGGCCATGAAGCACCAGGTTTCTGCCTTGG
CACAGACTTTTCTGTTATTGTGGGAACAAGAAATTTCGAGAACTAACTGGGGATGAGAACTTCACTGTTT
CATACTGGGATTGGAGAGATGCAGAAAACGTGACATTTGCACAGATGAGTACTTGGGAGGTCGTCACCC
TGAAAATCCTAACTTACTCAGCCACGATCCTTCTTCTCCTCCTGGCAGATCATTGTAGCAGATCAGAA
GAGTATAATAGCCATCAGGTTTTATGGCATGGAACACCTGAGGGACCCTATTACGTAATCCTGGAAACC
ATGACAAAAGCCAAAACCCCGAGCTCCCATCTTCAGCAGATGTGGAATTTTGTCTGAGTTTGACCCAGTA
TGAATCTGGATCAATGGATAGAACTGCCAATTTTCAGCTTTAGAAAACACACTGGAAGGATTTGCCAGTCCA
CTCACAGGGATAGCAGATCCTTCTCAAAGTAGCATGCACAATGCCTTACATATCTTTATGAATGGAACAA
TGTCCCAAGTACAGGGATCGGCCAACGATCCCATTTTTCTTCCACCATGCTTTTGTGGACAGTATTTT
TGAAACAATGGCTGCGAAGGCCACCGCCCTCTTTTGGAAAGTTTACCAGAAAGCCAATGCACCTATCGGCCAT
AACAGAGACTCTTACATGGTTCCTTTCATACCGCTCTATAGAAAATGGTGATTTCTTTCATAACATCCAAGG
ATCTGGGATATGACTACAGCTACCTCCAAGAGTCAGATCCAGGCTTTTACAGAAATATATTGAGCCTTA
CTTGGAACAAGCCAGTCGATCTGGCCATGGCTTCTTGGGGCAGCACTGGTGGGAGCTGTTATTGCTGCA
GCTCTCTTGGGCTTAGCAGTAGGCTATGCCTTCAGAAAGAAGAAGAAGAAGCAACCCAGGAGGAAA
GGCAGCCACTCCTCATGGACAAGAAGCAGACTACCACAGCTTGCTGTATCAGAGCCATCTGTGA
    
```

CDS

Exones

Translation (533 aa):

```

MFLAVLYCLLWSFQISDGHFPRACASSKNLLAKECPPWMDGSPCGQLSGRGSQCQDILLSSAPSGPQFP
FKGVDDRESWPSVFNRTCQCSGNFMGFNCGNCKFGFGPNCTEKRVLIRRNIFDLSVSEKNKFFSYLTL
AKHTISSVYVIPGTYGQMNNGSTPMFNDINIYDLFVMMHYVSRDILLGGSEIWRDIDFAHEAPGLPW
HRLFLLLWEQEIRELTGDNFTVPYWDWRDAENCDICTEYLGGRHPENPNLLSPASFFSSWQIICSRSE
EYNSHQVLCDGTPGPELLRNPNHDKAKTLPRLPSSADVEFCLSLTQYESGSMDRATANFSFRNTLEGFASP
LTGIADPSQSSMHNALHIFMNGTMSQVQGSANDPIFLHHAFFVDSIFEQWLRHRPLLEVYPEANAPIGH
NRDSYMPVFIPLYRNGDFFITSKDLGDYDYSYLQESDPGFYRNYIEPYLEQASRIWPLLGAALVGAVIAA
ALSGLSSRLCLQKKKKKQPEERQPLLMDKDDYHSLLYQSHL
    
```

Proteín
a



4.- Buscar el tamaño de los intrones e identificar las secuencias donde termina un exón y comienza otro

Exons ⓘ

No.	Exon / Intron	Start	End	Start Phase	End Phase	Length	Sequence
1	5' upstream sequence ENSMUSE00000894739	87,493,411	87,492,532	-	0	880tatataggtcttagccaaaacatgtgatagtcactccagggggtgtctgga AAAGAAGCTCTGTGACACTCATTAACTATTGGTGACAGATTTTGTATGATCTAAAGGAGAA AATGTTCTTGGCTGTTTTGTATTGCCCTTCTGTGGAGTTTCCAGATCTCTGTATGGCCATTT TCCTCGAGCCTGTGCCTCCTCTAAGAAGTTTGGCAAAAAGATGCTGCCACCATTGGAT GGGTGATGGGAGTCCCTGGCGCCAGCTTTCAGGCAAGAGTTCCCTGCCAGGATATCCTTCT GTCCAGTGCACCATCTGGACCTCAGTTCCCCTTCAAAGGGGTGGATGACCGTGAGTCCCTG GCCCTCTGTGTTTTATAATAGGACCTGCCAGTGCCTCAGGCAACTTCAATGGGTTTCAACTG CGAAACTGTAAGTTTGGATTGGGGGCCAAAATTTGTACAGAGAAGCGAGCTTGTATTAG AAGAAAATTTTTGATTGAGTGTCTCCGAAAAGAATAAGTTCTTTTACCTCACTTT AGCAAAACATACTATCAGCTCAGTCTATGTCATCCCCACAGGCCACTATGGCCAAATGAA CAATGGGTCACACCCATGTTTAAATGATATCAACATCTACGACCTCTTTGTATGGATGCA TTACTATGTGTCAGGGACACACTGCTTGGGGCTCTGAAAATGGAGGGACATTGATTT TGCCCATGAAGCACCAGGGTTTCTGCCTGGCACAGACTTTTCTTTATTGTGGGAACA AGAAAATTCGAGAACTAACCTGGGATGAGAACCTCACTGTTCCATACTGGGATGGAGAGA TGCAGAAAACGTGACATTTGCACAGATGAGTACTTGGGAGGTCTGTCACCTGAAAATTC TAACTTACTCAGCCAGCATCCTTCTCTCCCTCTGGCAG
	Intron 1-2	87,492,531	87,484,038			8,494	gtaagatgcactatatagagagagt.....atttaacataaattgttttttcacag
2	ENSMUSE00000200412	87,484,037	87,483,821	0	1	217	ATCATTGTAGCAGATCAGAAGAGTATAATAGCCATCAGGTTTTATGCGATGGAAACACCT GAGGGACCACTATTACGTAATCCTGAAAACCATGACAAAAGCCAAAACCCAGGCCTCCCA TCTTCAGCAGATGTGGAATTTGTCTGAGTTTGACCCAGTATGAAATCTGGATCAATGGAT AGAATGCCAATTCAGCTTTAGAAAACACACTGGAAG
	Intron 2-3	87,483,820	87,472,547			11,274	gtaatatccctgtgttcattaattt.....tttaaatttccctttatatttcacag
3	ENSMUSE00000200414	87,472,546	87,472,399	1	2	148	GATTTGCCAGTCCACTCACAGGGATAGCAGATCCTTCTCAAAGTAGCATGCACAATGCCT TACATATCTTTATGAATGGAAACAATGTCCCAAGTACAGGGATCGGCCAACGATCCCATTT TTCTTCTCCACATGCTTTTGTGGACAG
	Intron 3-4	87,472,398	87,438,119			34,280	gttggttgacatttctccataaattt.....ctctgagtaacccttccctctgtgag
4	ENSMUSE00000200410	87,438,118	87,437,937	2	1	182	TATTTTTGAACAATGGCTGCGAAGGCACCGCCTCTTTTGGAAAGTTTACCAGAAAGCCAA TGCACCTATCGGCCATAACAGAGACTCTTACATGGTTCCCTTTCATACCGCTCTATAGAAA TGTGATTTCTTCCATAACATCCAAAGGATCTGGGATATGACTACAGCTACCTCCAAGAGTC AG
	Intron 4-5	87,437,936	87,429,285			8,652	gtaaagctcagttgccttcagatga.....acagettgatctctttctatttcag
5	ENSMUSE00000200411	87,429,284	87,427,405	1	-	1,880	ATCCAGGCTTTTACAGAAATTTATATTGAGCCTTACTTGGAAACAAGCCAGTCGTATCTGGC CATGGCTCTTGGGGCAGCACTGGTGGGAGCTGTTATTGCTGCAGCTCTCTCTGGGCTTA



5.- Emplear Primer 3 para obtener la pareja de cebadores

Primer3 Output

No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3'	Seq
Cebador directo Cebador Reverso LEFT PRIMER	565	20	59.52	50.00	4.00	2.00	CTTGGGGGCTCTGAAATATG
RIGHT PRIMER	891	20	57.55	55.00	5.00	1.00	TAGTGGTCCCTCAGGTGTT

SEQUENCE SIZE: 1602
INCLUDED REGION SIZE: 1602

→ PRODUCT SIZE: 327, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 2.00

5' → 3'

```

1 ATGTTCTTGGCTGTTTTGTATTGCCTTCTGTGGAGTTTCCAGATCTCTGATGGCCATTTT
61 CCTCGAGCCTGTGCCTCCTCTAAGAACTTGTTGGCAAAAAGAATGCTGCCACCATGGATG
121 GGTGATGGGAGTCCCTGCGGCCAGCTTTCAGGCAGAGGTTCTGCCAGGATATCCTTCTG
181 TCCAGTGCACCATCTGGACCTCAGTTCCTTCAAAGGGGTGGATGACCGTGAGTCCTGG
  
```



Control endógeno “Housekeeping gene”

Para el análisis de expresión génica debe utilizarse un buen control endógeno (control de carga). Estos controles cumplen 2 requisitos:

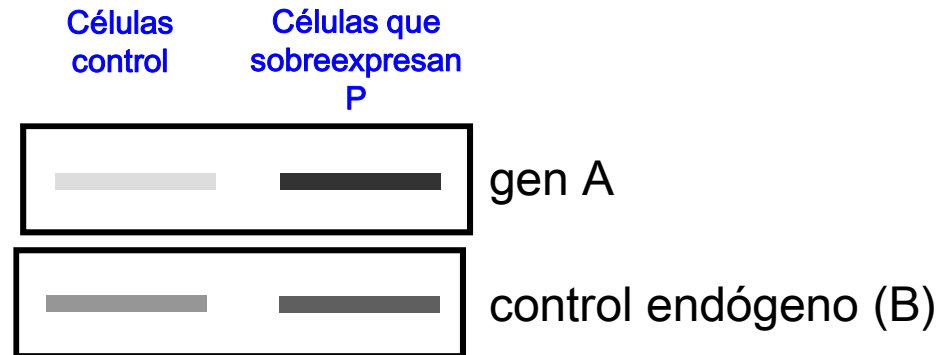
- Son genes constitutivos, cuya expresión no varía al modificar las condiciones celulares (tratamiento)
- Deben tener un nivel de expresión similar a la del gen en estudio

Ejemplos

- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (**GAPDH**) → Enzima componente de la ruta de glicolisis
- **-actin** → Componente del citoesqueleto
- Ribosomal RNA (rRNA): **28S, 18S** → RNA ribosómico



Tratamiento de los datos obtenidos mediante RT-PCR



Para medir la expresión relativa de un gen A en las células que sobreexpresan la proteína P con respecto a las células control:

1.- Se obtienen los valores de densidad óptica de las bandas que aparecen tras la migración electroforética

2.- Se calcula la expresión normalizada del gen A en ambos casos (A/B)

3.- Se calcula el ratio entre células tratadas y control $\left[\frac{A/B \text{ tratamiento}}{A/B \text{ control}} \right]$



BIBLIOGRAFÍA

- Agarose Gel Electroforesis [Internet] BioRad [11 oct. De 2012; citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: <https://www.youtube.com/watch?v=vq759wKCCUQ>
- Benson C. RNA extraction Tutorial [Internet] [3 ene. de 2015; citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: <https://www.youtube.com/watch?v=MgNicWbANkA&nohtml5=False>
- Brown R and Audet J. Current techniques for single-cell lysis. *J R Soc Interface*. 2008; 5(Suppl 2): S131–S138
- Derek Davies. Cell Sorting by Flow Cytometry. [Internet] New Jersey, USA: M.G. Macey Humana Press [citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: <http://www.facs.ethz.ch/docs/lit>
- Diffenbach CW, Lowe T M and Dveksles G S. General Concepts of Primer Design. *Genome Res*.1993; 3: S30-S37
- DNA transfection using jetPRIME reagent [Internet]. USA: Chain de Polyplus Transfection . Polyplus [15 mar. de 2011; citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: http://www.youtube.com/watch?v=G39wNXaZPX4&feature=em-share_video_user



BIBLIOGRAFÍA

- How to Set up the PCR Reaction[Internet]. Thermo Fisher Scientific [28 feb. de 2013; citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: <https://www.youtube.com/watch?v=NYIT3f-MZ5o&nohtml5=False>
- Kennedy S. How DNA extraction kits works in the lab [28 jun. De 2010; citado el 25 oct. de 2016] In: The missing manual for bioscientists. USA: BitesizeBio [Internet]. Disponible desde: <http://bitesizebio.com/13516/how-dna-extraction-rna-miniprep-kits-work/>
- Kim TE and Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*, 2010; 397(8): 3173–3178
- Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*. 2012; (62).
- MACS Technology [Internet]. Miltenyi Biotec [citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: http://www.dartmouth.edu/~dartlab/uploads/MACS_Technology_Flyer.pdf
- Mark Frei. Centrifugation Separations. [Internet]. MO, USA: Sigma-Aldrich. BioFiles Volume 6, Number 5 [citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/centrifugation-separations.html>



BIBLIOGRAFÍA

- Nexcelom Bioscience [Internet]. Massachusetts, USA: Nexcelom [citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: <http://www.nexcelom.com/Applications/measure-cell-viability-using-trypan-blue-or-AOPl.php#feature1a>
- Noles SR. Traditional Methods for CsCl Isolation of Plasmid DNA by Ultracentrifugation. [Internet]. USA: Thermo Fisher Scientific [citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/D17309~.pdf>
- One focus. Transfection [Internet]. USA: Mirus Bio LLC [citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: <https://www.mirusbio.com/transfectopedia/methods>
- Patrick M. Plasmids 101: Mammalian Vectors [25 mar. de 2014; citado el 25 oct. de 2016]. In: Addgene's Blog [Internet] Addgene. Disponible desde: <http://blog.addgene.org/plasmids-101-mammalian-vectors>
- Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. In: A-Z of quantitative PCR. 2004 (Editor: S.A. Bustin): 87 - 112
- PCR-Polymerase Chain Reaction- Simple Animated Tutorial [Internet]. Thermo Fisher Scientific [1 jun. de 2012; citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: <https://www.youtube.com/watch?v=DkT6XHWne6E>



BIBLIOGRAFÍA

- Robertson S. Gene Expression Techniques. News Medical Life Sciences [Internet] USA: AZO NEtwork [actualizado 2 dic. de 2014; citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: <http://www.news-medical.net/life-sciences/Gene-Expression-Techniques.aspx>
- Sambrook J. and Russell DV. Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform. Protocols [Internet]. USA: Cold Spring Harbor Press [citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.prot4455.full>
- Schwab S. in Animal Cell Culture. Edited by: Mohamed Al-Rubeai, Springer, 2014.
- Separation[Internet]. Vermont, USA: University of Vermont. [citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: http://www.uvm.edu/~biology/Classes/296D/12_Separation.pdf
- Simplified RT- Reverse Transcription Animation [Internet]. Thermo Fisher Scientific [6 dic. de 2012; citado el 25 oct. de 2016]. Disponible desde: <https://www.youtube.com/watch?v=0MJlbrS4fbQ&nohtml5=False>



LECTURAS RECOMENDADAS

- Huggett J, Dheda K, Bustin S and Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity* (2005) **6**, 279–284
- Kim TK and Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 397(8): 3173–3178.
- Klug, William S; Cummings, Michael R.; Spencer, Charlotte; Palladino Michael A. Concepts of Genetics (2008) 9ª edición. Pearson Higher Education. <http://www.aw-bc.com/klug/>
- Nicholl D.S.T. An introduction to Genetic Engineering. Cambridge University Press (2008) (3ª edición) ISBN-10: 0521615216.
- Pierce B.A. Genetics. A conceptual approach. (2008) 3rd Edition. Freeman and Co.
- Wink M. (redactor) An introduction to Molecular Biotechnology: Fundamentals, Methods and Applications (2011) Ed. Wiley ISBN-10: 3527326375

