

Genetika, zelulen, molekulen eta eboluzioaren biologiaren esparru barneko esperimentazioaren hastapena

4. GAIA: Proteina baten funtzioaren analisia baimentzen duten teknika Genetiko Molekularrak



OCW
OpenCourseWare



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

eman ta zabal zazu

Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

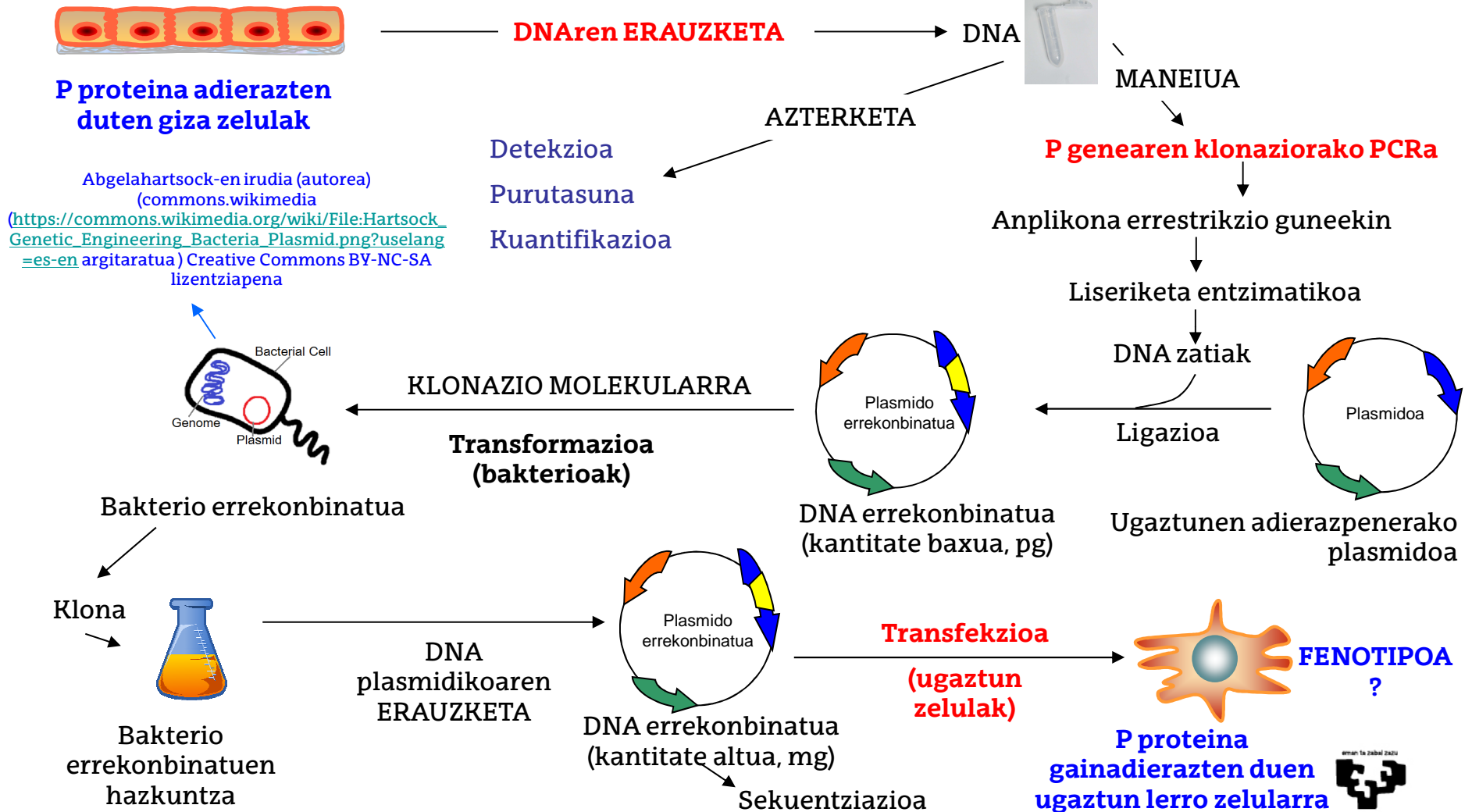
NAZIOARTEKO
BIKAINASUN
CAMPUSA
CAMPUS DE
EXCELENCIA
INTERNACIONAL

- Proteinak kodetzen dituzten DNA sekuentzien azterketa funtzionala burutzeko, Genetika molekularreko hainbat teknika daude.
- Gai honetan, proteina errekonbinatu baten (adibidez, MC1R proteinaren aldaki batena) adierazpena baimentzen duten teknika batzuk aurkeztuko ditugu. Era berean, gainadierazpenak adierazpen geniko mailean daukan ondorio fenotipikoa aztertzea baimentzen duten teknikak ere azalduko dira.
- Hurrengo diapositiban teknika molekular batzuk agertzen direneko lanaren eskema agertzen da.



Lanaren eskema

Nadine90-en irudia (autorea) (commons.wikimedia.org/wiki/File:2ml_eppendorf_tubes.jpg?uselang=es)-en argitaratua Creative Commons BY-NC-SA lizentziapen)



Gai honetan Lanaren Eskeman gorriz agertzen diren teknikak labur aurkeztuko ditugu. Teknikak hurrengoak dira:

- 1.DNAren erauzketa eta analisisia
- 2.PCR-aren bitartezko sekuentzien anplifikazioa
- 3.Ugaztun zelulen transfekzioa adierazpen plasmidoekin
- 4.Fenotipoaren azterketa: adierazpen genikoaren kuantifikazioa



1.- Azido nukleikoen erauzketa eta analisisia

- Azido nukleikoen erauzketa egiteko erabiltzen den ehunaren arabera, aldez aurretik ehunak disoziatzeko eta zelulen biderakortasuna neurtzeko teknikak erabiltzea komenigarria liteke.
- Metodologia batzuk azaltzen dira hurrengoak lortzeko:
 - A. Ehunen disoziazioa
 - B. Zelulen banaketa
 - C. Zelulen biderakortasunaren analisisia
 - D. Lisi zelularra
 - E. Azido nukleikoen erauzketa, purifikazioa eta kuantifikazioa
 - F. Zatien banaketa eta analisisia



A.- Ehunen disoziazioa

- Fragmentazio mekanikoa: ebakidura, urradura, sonikazioa, abrasioa (harea, albumina, beirazko bolatxoak,...)
- Liseriketa kimikoa: zelulen kanpoko matrizen eta zelula-zelula loturen liseriketa (detergenteak, Ca⁺⁺ kelanteak-EDTA,...)
- Liseriketa entzimatikoa: proteasak (kolagenasa, proteinasa K, tripsina,...)



B.- Zelulen banaketa

Banaketa zelularra egiteko metodo batzuk daude. Erabilgarrienak hurrengoak dira:

1.- Zentrifugazio diferentziala, sedimentazio-abiadurarena edo isopiknikoa (Mark Frei. Centrifugation Separations. [Internet]. MO, USA: Sigma-Aldrich. BioFiles Volume 6, Number 5 [citado el 25 oct. de 2016].

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

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

3.- Partikula magnetikoekiko afinatatez (MACS Technology [Internet]. Miltenyi Biotec [citado el 25 oct. de 2016]. http://www.dartmouth.edu/~dartlab/uploads/MACS_Technology_Flyer.pdf -tik eskuragarri)



C.- Zelulen bideragarritasunaren analisisia

Hainbat teknika daude zelulen bideragarritasuna neurtzeko (Schwab, 2014). Ohikoena fase-kontrasteko mikroskopia da, hurrengoak baimentzen dituena:

- Zelulen kontaketa, zelulen bideragarritasuna neurtzea, funtzio metabolikoa aztertzea,...
- Zelulen analisirako molekula koloreztatuak (Tripan urdina) zein fluorkoiak erabiltzen dira
- Informzio gehigarria: Nexcelom Bioscience [Internet]. Massachusetts, USA: Nexcelom [citado el 25 oct. de 2016]. <http://www.nexcelom.com/Applications/measure-cell-viability-using-trypan-blue-or-AOPI.php#feature1a-tik> eskuragarri



D.- Lisi zelularra

- Batzutan lisi zelularra laginaren prestaketarekin batera egiten da (homogenizazioa)
- Honetarako, medio hipotonikoak, detergenteak,... erabiltzen dira
- Prozesuan DNAREN egonkortasuna mantendu behar da, beraz nukleasen inhibitzaileak erabili ohi dira (EDTA, DEPC,...), eskularrak,...
- RNAREKIN lan eginez gero: RNAsen aktibitatea ekiditen dituzten jarrera gehigarriak bete behar dira (tenperatura altuak, DEPC, e.a.), RNA oso sentikorra baita eta erraz degradatzen baita erribonukleasen aktibitatez es (Brown & Audet, 2008)



E.- Azido nukleikoen erauzketa

Helburuen arabera, metodologia desberdinak erabili daitezke (Nicholl, 2008, Wink, 2011):

- Disolbatzaile organikoak: edozein azido nukleiko mota erauzi eta prezipitatzeko teknikarik ohikoena da (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]. <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.prot4455.full-etik> eskuragarri)
- CsCl: DNA plasmidiko puruko kantitate handiak lortzeko erabili ohi da (Noles SR. Traditional Methods for CsCl Isolation of Plasmid DNA by Ultracentrifugation. [Internet]. USA: Thermo Fisher Scientific [citado el 25 oct. de 2016]. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/D17309~.pdf-tik> eskuragarri)
- Materiala adsorbatzaileko zutabeak: edozein azido nukleiko motarako erabiltzen dira eta erauzi eta purifikaziorako kit komertzialen oinarriak dira (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]. <http://bitesizebio.com/13516/how-dna-extraction-rna-miniprep-kits-work/-tik> eskuragarri)



Azido nukleikoen kuantifikazioa

Normalean, kuantifikazioa 260 nm uhin luzerako ultramoreen espektrofotometriaz burutzen da: intereseko azido nukleikoa daukan lagin akuoso baten dentsitate optikoa (OD) neurtzen da. Absorbantzia edo OD azido nukleiko motaren arabera da eta soluzio akuosoaren kontzentrazioarekiko zuzenki proportzionala (Nicholl, 2008; Wink, 2011):

- DNA kate bikoizdun 1 mg/ml-k 20-ko A260 maila dauka, beraz, 1 OD dsDNA= 50ug DNA/mL
- RNA kate bakuneko 1 mg/ml-k 25-ko A260 maila dauka, beraz, 1 OD de ssRNA= 40 ug RNA/mL



Azido nukleiko laginaren purutasuna

- Laginean azido nukleikoak proteinekin batera ohi daude eta hauen absobantzia pikoa 280 nm-ko uhin luzeran dago.
- Azido nukleiko lagin baten purutasunaren neurria estimatzeko, A_{260}/A_{280} erlazioa kalkulaten da.
- DNA: erlazioa $\geq 1,8$ bada, soluzioa purutzat hartzen da
- RNA: erlazioa $\geq 2,0$ bada, soluzioa purutzat hartzen da



F.- Zatien banaketa eta analisisia

- Azido nukleiko molekulak banatzeko hainbat metodo daude
- Tamaina desberdineko zatiak elkarbanatzeko, agarosazko gelen bidezko elektroforesia erabili ohi da
- Banaketarako metodoen gaineko informazio gehigarria :

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

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

(Lee *et al.* 2012)



Elektroforesia agarosazko geletan

- Sare molekularren gela egiten da, zeinak tamaina desberdineko DNA edo RNA zatiak banatuko dituen, betiere korrante elektrikoa aplikatuta
- Gela prestatzeko, agarosazko %1-2-ko kontzentraziodun tanpoia (TAE) egiten da, pH 8.2-8.4 artean dagoelarik.
- Agarosa disolbatzeko soluzioa irakiten jartzen da
- Arinki hozten utzi ondoren, EtBr gehitzen da, azido nukleikoen agente tartekatzailea dena eta fluorkoia dela ultramore argiaz.
- Soluzioa eukarri batean isuritzen da, putzuak markatzen dira orrazi batekin geroago laginak kargatu ahal izateko, eta gogortu arte hozten uzten da.
- Agarosazko gelen elektroforesiaren gaineko tutoriala: Agarose Gel Electroforesis [Internet] BioRad [11 oct. De 2012; citado el 25 oct. de 2016]. <https://www.youtube.com/watch?v=vq759wKCCUQ-tik> eskuragarri.



2.- PCR-aren bidezko sekuentzien anplifikazioa

- PCRa (polimerasaren erreakzio kateatua) DNA zatien anplifikaziorako metodo eraginkor eta azkarra da. Honetarako Taq DNA polimerasa erabiltzen da, zeina polimerasa gehieneko aktibitatea tenperatura altuetan (75-80°C) daukan.



PCR

- *In vitro* berebiziko DNA zatiaren kopia anitz egiten dira (eskualde genomiko konkretu baten anplifikazioa), molde gisa DNA kate bikoizduna erabiliz.
- Anplifikatuko den eskualde genomikoaren berekotasuna sekuentzia nukleotidiko motzak (oligoak) erabiliz lortzen da. Oligoak anplifikatuko den eskualde genomikoaren muturreko sekuentziarik osagarriak dira (hasleak). Hasleak DNA moldearekin hibridatzen dira eskualde osagarrietan, hau da, anplifikatuko den eskualde genomikoaren albo bietan.
- DNA moldea *in vitro* erreplikatzeko da entzima termogonkor baten eraginez (Taq polimerasa entzima), desnaturalketa eta hasleen hibridazioa burutu ondoren.
- Erreplikazioa ziklikoki errepikatzen da.



PCR erreakzioarako nahiaezko osagaiak

- dNTP
- Hasleak (oligoak edo *primer*-rak)
- Mg^{2+} (polimerasaren kofaktorea)
- Tanpoia (erreakzioaren pH-a mantentzeko)
- Taq polimerasa
- DNA moldeak (anplifikatu nahi den genoma)



Database Center for Life Science-en irudia (DBCLS)
(autorea) commons.wikimedia
(https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Thermocyclers#/media/File:Thermal_cycler_2.png-en
argitaratua Creative Commons BY-NC-SA lizentziapean)

**Automatikoki PCRaren
erreakzio ziklikoak
egiteko makina:
Termozikladorea**



PCRaren etapak

Ziklo bakoitza 3 etapa dauka:

- Desnaturalketa: kate bikoizduneko DNA berotzen da 92-95°C-tan harizpi biak banatzeko
- Hibridazioa: tenperatura jaisten denean (50-55°C-tara) hasleak DNA moldearen sekuentzia osagarriekin hibridatzen dira
- Hedapena: hibridaturiko haslearen 3' muturretik Taq polimerasa entzimak nukleotidoak gehitzen ditu, moldearekiko osagarritasuna jarraituz. Erreakzioa 72-75°C-tan burutzen da.

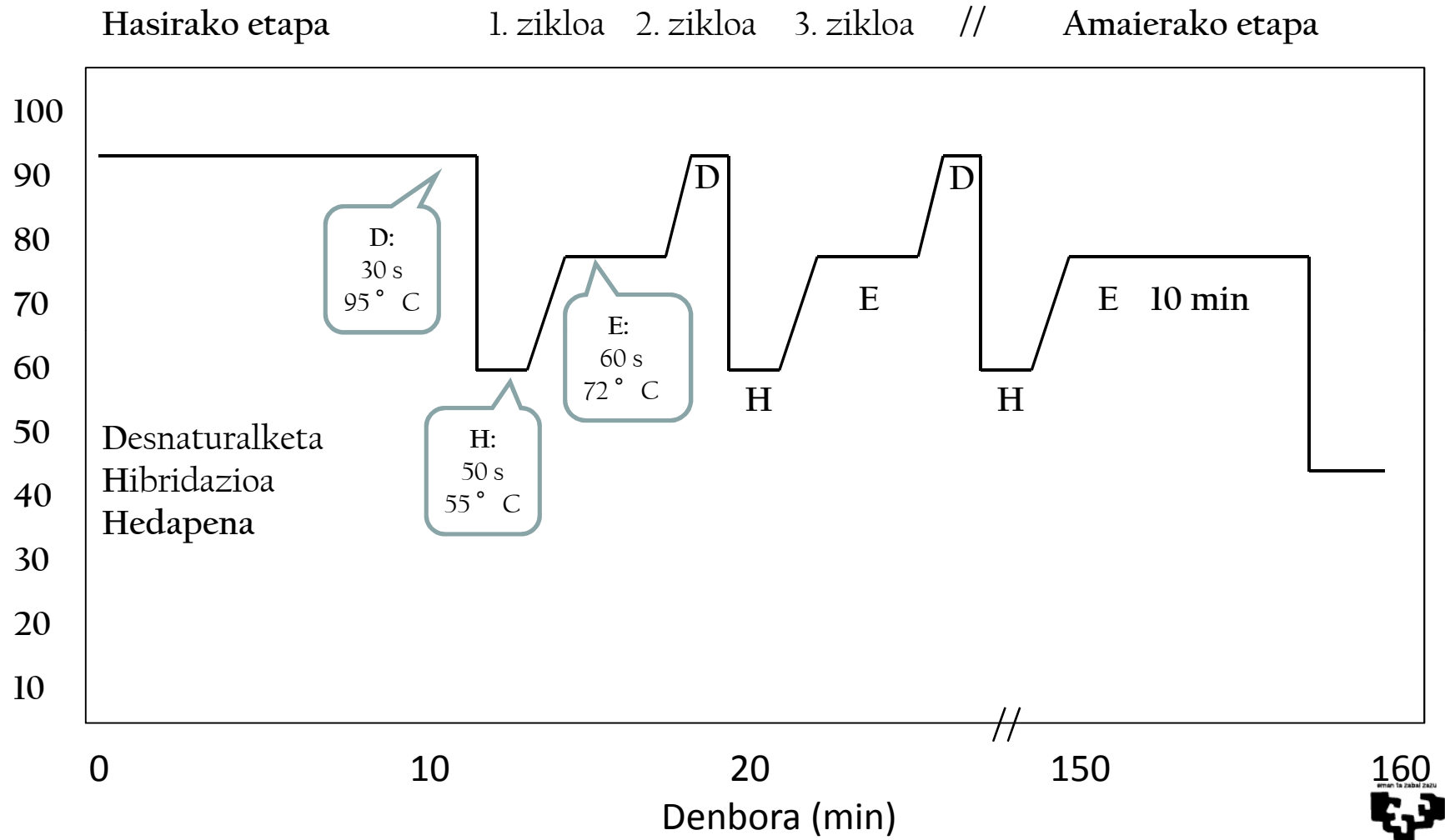


PCRaren zikloak

- Eskualde genomiko baten kopia anitz egin nahi direnez, etapa bakoitzeko prozesua ziklo anitzetan errepikatzen da.
- Zenbat eta ziklo gehiago egin, orduan eta DNA kopia gehiago lortuko dira (sistema saturatu arte edo osagaiak agortu arte). Ziklo kopurua normalean 30 da.
- Anplifikazio prozesua esponentziala denez, 30 ziklotako erreakzio batean jatorrizko DNA harizpi bikoitz bakoitzetik 2^{30} kopia eskuratuko dira.



PCR erreakzioa: zikloen eskema



PCR-aren inguruko informazio gehigarria

Interneten, PCR teknikaren gaineko detaile gehiago erakusten duten tutorial anitz daude. Hurrengo, azalpenak ematen duen bideoa eta tutorial bat agertzen dira:

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

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

- How to Set up the PCR Reaction[Internet]. Thermo Fisher Scientific [28 feb. de 2013; citado el 25 oct. de 2016].

<https://www.youtube.com/watch?v=NYIT3f-MZ5o&nohtml5=False-tik>
eskuragarri



Hasleen (edo *primer-ren*) diseinua

- Berebiziko DNA genomikoa anplifikatzen duen PCR erreakzioa burutzeko, hasleak modu egokian diseinatzea ezinbestekoa da (Diffenbach et al 1993)
- Horretarako, DNA moldearen sekuentzia **ezaguna** izan behar da
- Hasle bakoitzaren luzera **18-24 basekoa** izan behar da.
- Hasleen arteko distantzia (anplifikatuko den eskualdearen tamaina) gehienez **1 kb-koa** izango da.



Hasleen diseinurako beste baldintza batzuk

- Hibridaziorako T_a (T annealing) hasleen T_m -ren araberakoa da:
- Hasle bikotekidearen T_m baxuena baino 5°C gutxiagokoa izan behar da.
- Gutxienez 50°C -takoa izan behar da



Hasleen T_m-a

- T_m (T melting) haslearen baseen erdia DNA ituarekin hibridatuta dagoeneko tenperatura da.
- Hasle bikotekideak T_m antzekoa eduki behar dute ($\pm 5^\circ \text{C}$) eta 50-65°C artean.
- Honek esaten digu G:C edukina antzekoa dela eta %50-%60 artean dagoela.
- T_m balioa hurrengo ekuazioekin kalkulatu daiteke. Lehenengoa edo bigarrena erabiliko da hasleen nukleotido kopuruaren arabera

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

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

Hasleen T_m-a automatikoki kalkulatzeko tresna bioinformatikoak eskuragarri:

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

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

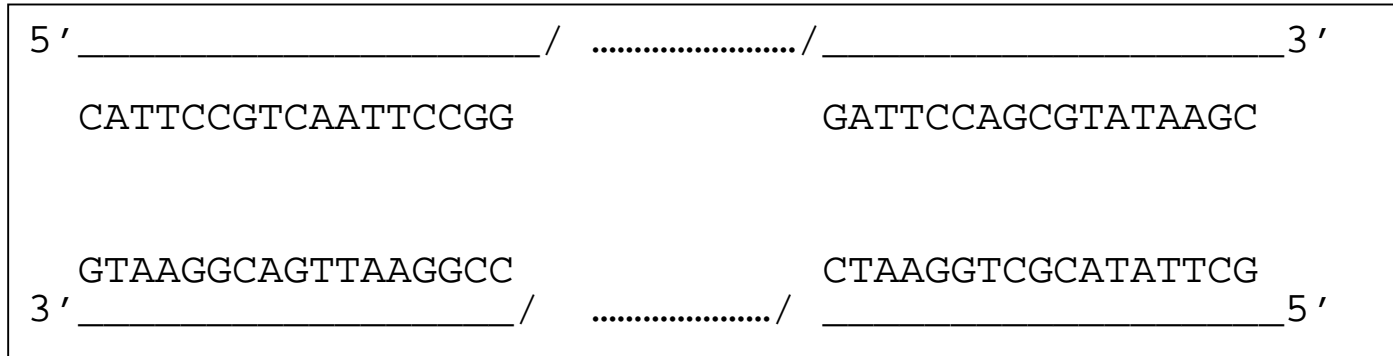


Hasleen sekuentziak

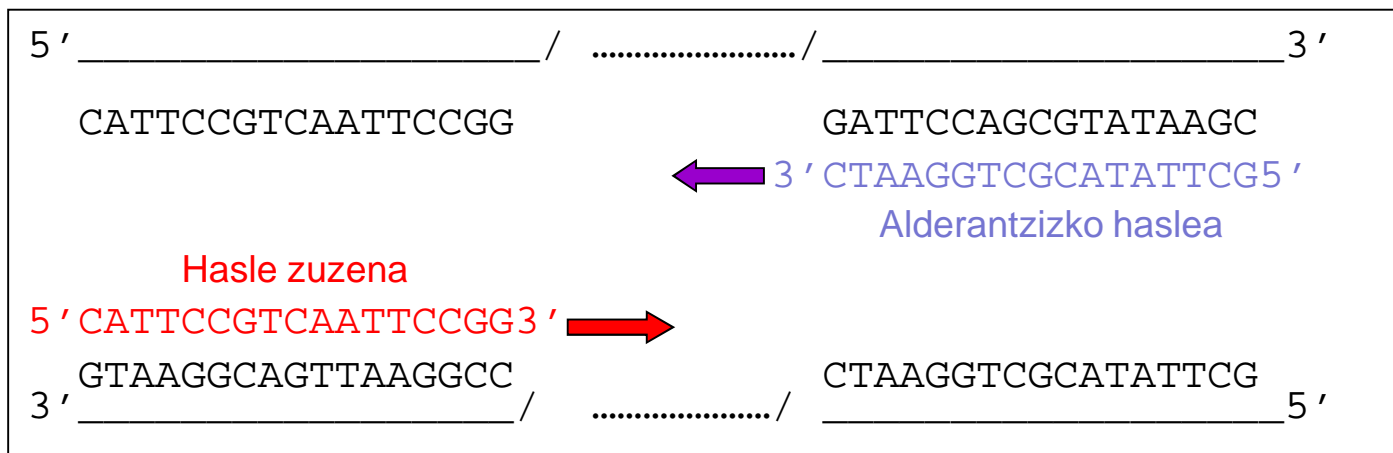
- Haslearen sekuentziaren hasieran eta amaieran 1-2 base puriniko egotea (adenina edo guanina)
- Auto-osagarritasuna ekidin
- 5' muturrean sekuentzia gehigarriak (DNA moldearekiko osagarriak ez direnak) gehitu daitezke (Tm kalkulatzeko kontuan ez hartu)- "BUZTANAK-errestrikzio guneak dituztenak"
- Hasleen posizio batzuetan degenerazioak (*mismatch*) gehitu daitezke
- Ekidin 3' muturraren azken posizioan
- Ekidin *mismatch*-ak 3' muturrean



Hasleen diseinua: Nomenklatura



DNA MOLDE KATE
BIKOIZDUNA,
DESNATURALIZATUA



HASLE BAKOITZAK
HARIZPI MOLDE
BATEKIN
HIBRIDATZEN DA.
HASLE BIEK
INGURATZEN DUTE
ANPLIFIKATUKO
DEN ESQUALDEA



Hasleen diseinua

Gene bat anplifikatzeko hasleak diseinatzeko, hurrengo pausuak proposatzen dira:

1.- Genearen sekuentzia NCBI web orrian bilatu
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Adibidez, *MC1R* edo *Melanocortin 1 receptor (Homo sapiens)* genearen sekuentzia bilatu

2.- Lanabesa bioinformatikoen bitarteko hasleak diseinatu, NCBI eta *Primer3* programa askea
(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)



1.- MC1R edo Melanocortin 1 receptor giza genearen sekuentzia bilatu

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 partziala *Genebank* formatoan

**Hasleak diseinatzeko
hautatu sekuentzia
kodetzailea (CDS):
6381-7334
(~ 1 kb)**

```

exon
/db_xref="HGNC:6929"
/db_xref="MIM:155555"
5001..8099
/gene="MC1R"
/gene_synonym="CMM5; MSH-R; SHEP2"
/inference="alignment:Splign:1.39.8"
/number=1
CDS
6381..7334
/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
AGALVARAAVLQQLDNVIDVITCSSMLSLCFLGAIADVDRYSISIFYALRYHSIVTLPR
ARRAVAAIIVVASVVFSTLFIAYYDHVAVLLCLVVFFLAMLVLMVLYVHMLARACQHA
QCIA RLHQRQRPVHQGFGLKGAVTLTILGIFFLCWGPFLLHLTLIVLCPEHPTCCGI
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 tgtttgggt cagcaggagc ctgtggggag cacaggctgg
121 tctctcgtgt gtccccacca ccccttttcc catgggggat ctgcactcat ctccaggga

```



2.- Genearen sekuentzia FASTA formatoan lortu

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

NCBI Reference Sequence: NG_012026.1



3.- Primer 3 programan sekuentzia FASTA formatoan sartu

4.- Sartu hasle baten sekuentzia eta aplikonaren tamaina. Eskatu hasleen azterketa

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 ACGTnacgtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, L1)

```
GCCCCACGCTCTGCAGGAAGAGATCATGGGGGGGGGAGTTGGTGTGCGGGCCTCGTTCTCTCTGCAGT
GAGTGAACGATGTTTGGTTCAGCAGGAGCCTGTGGGAGCAGGCTGGTCTCTCTGGTGTCCACCCCA
CCCTTTTTCCATGGGGGATCTGCACCTCATCTCCAGGGAAGATGGTTGGGAGATAACCCCAAGTCTGCTCT
AGGTCCCCACCCTCCACAGCCAGGGTGGTCCGTGGTGAGCTTCAGCCATCGAGATCGGGGAGTCTGCTAG
AGTCTTCAGGGTCTTTTCTGTGAAAATGACAGGCTAGCAAGGAGACCTGGGTCCCTGCCTCTTCCATTTC
CAGATGCCTTGAGTCCACCCAAATAGGGGATGTGATGTTGGAGCTGCAGCAGCCGCCCTACGGTTGGGA
GTCAGAGAAGAGCCGGTTCAGGGACAATGCAGCAGAGGCTGAGCCCAGGCCCTGCTGCTCAGAGAGT
```

Genearen sekuentzia FASTA formatoan

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):

Proposatutako haslea aztertuko du eta alderantzikoa proposatuko du

Hasle zuzenaren sekuentzia

[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:](#)
[Number To Return:](#) [Max 3' Stability:](#)
[Max Repeat Mispriming:](#) [Pair Max Repeat Mispriming:](#)
[Max Template Mispriming:](#) [Pair Max Template Mispriming:](#)

Anplikonaren tamaina (~ 1 kb)

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:



Primer 3 programaren emaitzaren interfaz partziala: hasleen ezaugarriak

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'

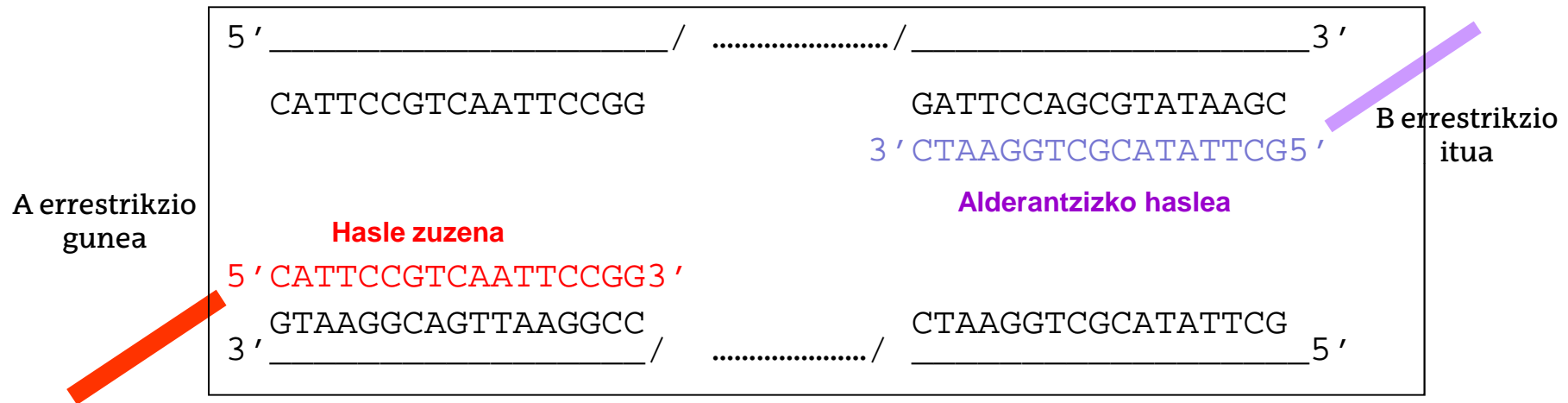
```

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

```



Klonazio molekularra egiteko PCRa : errestrikzio ituak barneratzen dituzten hasleak

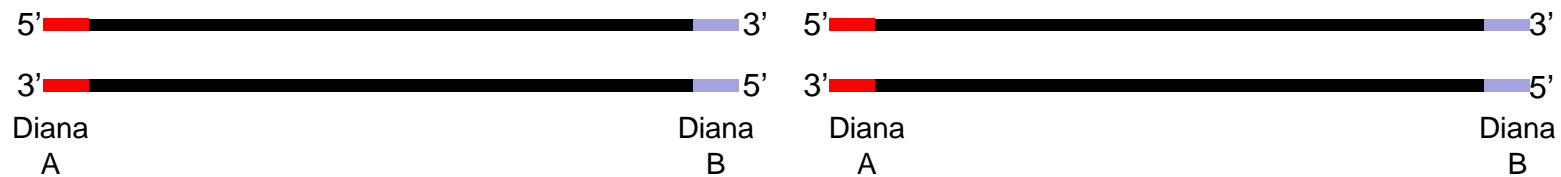


Diseinaturiko hasleei sekuentzia motz bat gehitzen zaie 5' muturrean, sekuentzia motza honek errestrikzio entzima baterako itu gunea daukalarik



Klonazio molekularra egiteko PCRa : errestrikzio ituak barneratzen dituzten hasleak

Anplifikazioaren ondoren, PCRaren aplikonaren muturrek errestrikzio gune bana edukiko dute



Entzima biek in liseritzen badugu, mutur desberdineko DNA zatiak lortzen dira, A+B entzimekin liserituriko adierazpen bektore batean sartu daitezkenak.



3. Ugaztun zelulen transfekzioa

- Tranfekzioa: DNAREN konstruktoen bidezko geneen transferentzia zelula eukariotikoetan. Transferentziarako plasmido errekonbinanteak edo beste tresna molekular batzuk erabil daitezke eta euren nukleorako garraioa baimentzen duten teknologiak ere bai.

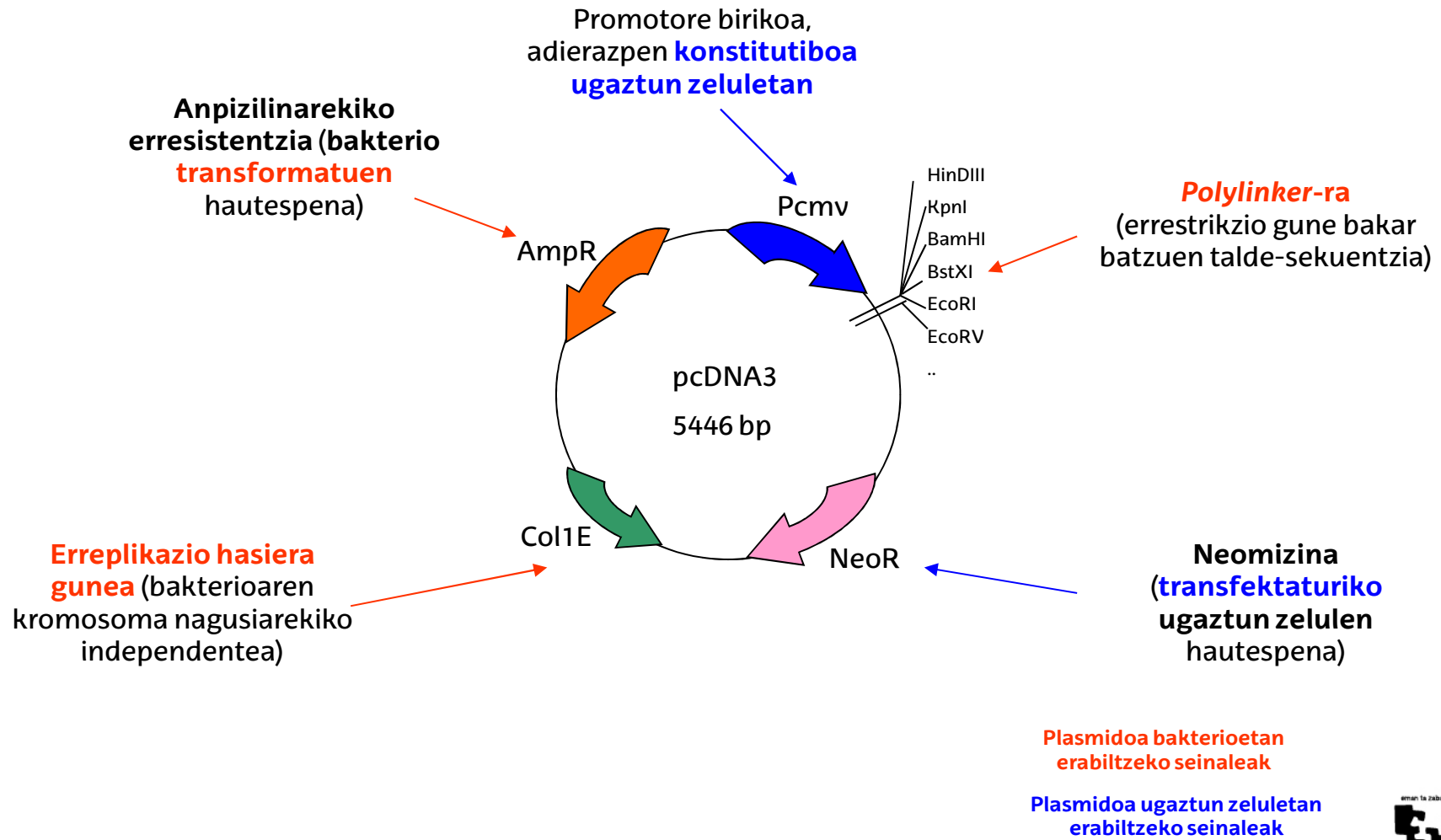
- Plasmidoak erabiltzeko errazak, merkeak eta toxikotasun baxukoak dira, beraz, transfekziorako plasmidoak erabiltzen dira gehien

Adierazpen plasmidoek klonaturiko sekuentziaren adierazpena proteina mailan kantitate altuan lortzea baimentzen dute, beraz, modu erraz batean gainadierazpenak sortzen duen **fenotipoa** aztertu daiteke.

- Adierazpen plasmido batzuek proteina mailak eta baldintzak erregulatzea baimentzen dute.



Ugatzun sisteman adierazpen plasmido baten adibidea



Ugaztun zelulen transfekzio metodoak

Ugaztuen zelulen tranfkzio plasmidoekin burutu daiteke metodo kimikoen bidez (liposomak erabiliz) edo fisikoen bidez (elektroporazioa, bonbardeaketa, DNAREN mikroinjekzio zuzena, e. a.)

METODOAK	OHARRAK
Liposomak	Eraginkorra, ez-toxikoa, erraza
Kalzio fosfatoa	eraginkortasun baxua
Elektroporazioa	eraginkorra, biziraupena murriztuta
Mikroinjekzioa	garestia, zaila, eraginkorra
Biobalistika	landare zeluletan
Erretrobirusak	oso eraginkorra, lana eta trabetasuna eskatzen du

(Kim & Eberwine, 2010)



Liposomen bidezko transfekzioa

- Liposomen bidezko transfekzioa eraginkortasun altukoa eta toxikotasun baxukoa da, hortaz, maiz erabiltzen da.
- Karga positiboko poliamidoaminen eta lipopoliaminen polimeroak dira, beraz, karga negatiboko DNAr lotzen dira geruza anitzeko besikulak eratzeko.
- Besikulek, DNA barruan daukatela, mintza zelularren lipidoekin elkarrekiten dute eta horrela DNAREN tranferentzia baimentzen dute.
- Adibidea: One focus. Transfection [Internet]. USA: Mirus Bio LLC [citado el 25 oct. de 2016]. <https://www.mirusbio.com/transfectopedia/methods-etik> eskuragarri
- Transfekziorako tutoriala:
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-tik eskuragarri



Tranferituriko geneen adierazpena

Tranfektaturiko plasmido errekoninatuek sekuentzia bereziak barneratzen dituzte, hurrengoak baimentzen dituztenak:

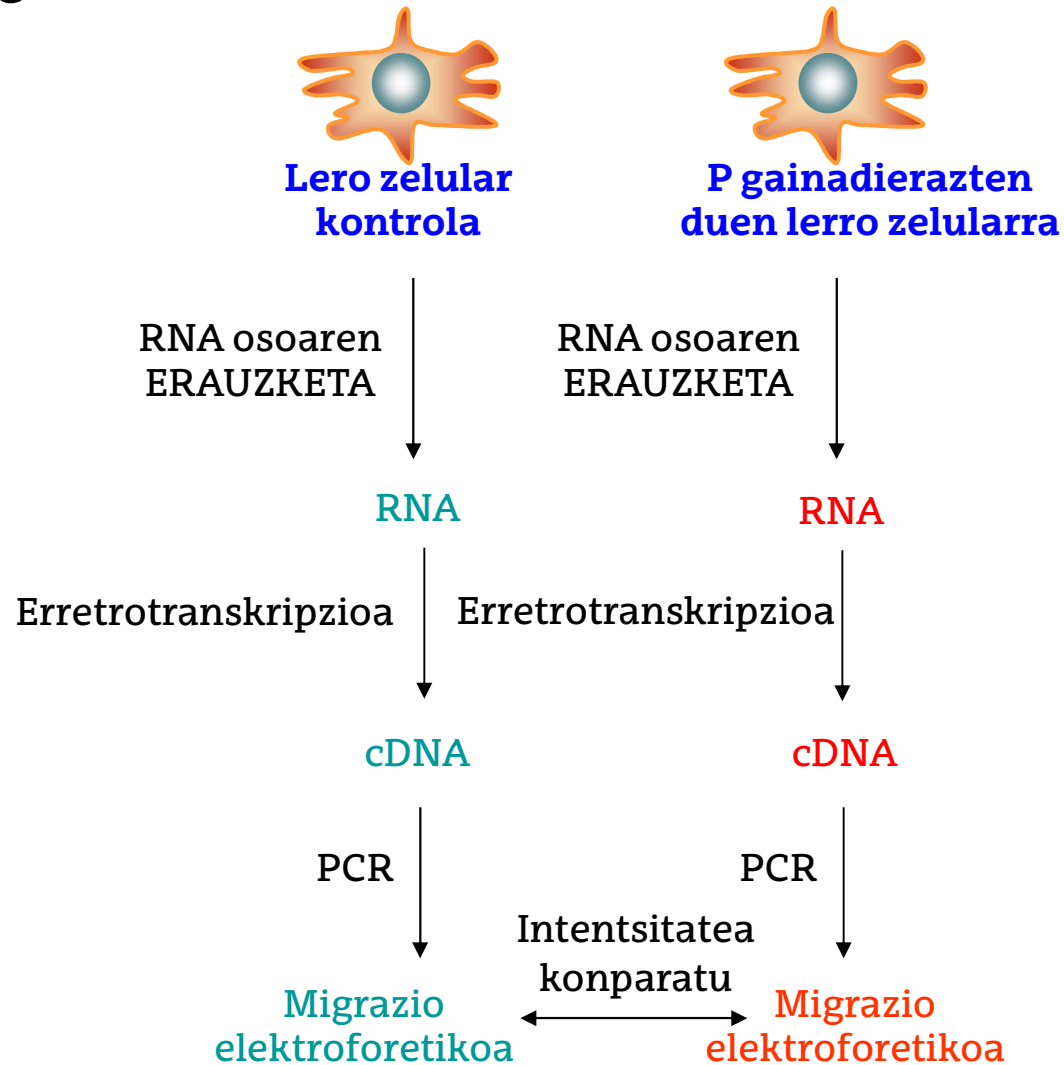
- 1.- intereseko plasmidoa lortu duten zelulen hautaketa
- 2.- klonaturiko genearen gainadierazpena

Informazio gehigarria: Patrick M. Plasmids 101: Mammalian Vectors [25 mar. de 2014; citado el 25 oct. de 2016]. In: Addgene´s Blog [Internet] Addgene.

<http://blog.addgene.org/plasmids-101-mammalian-vectors-etik> eskuragarri



4. Proteina gainadierazi osteko fenotipoaren analisia: adierazpen genikoaren aldaketak neurtzeko metodo erraza



RNA erauzketa TRIzol® erreaktiboa erabiliz

- TRIzol® erreaktibo komertziala da (Life Technologies Inc., Gibco BRL). TRIzol-ak daukan fenolaren eta guanidina tiozianatoaren bidez RNA osorik erauzi daiteke pausu batean zeluletatik edo ehunetik abiatuta.
- Prozesuan zehar, TRIzol-ak RNA banatzen du DNA-tik, proteinetatik eta beste osagai zelularretatik. TRIzol-aren osagaiak hurrengo azaltzen dira:
 - a) Fenol asea: lipidoen banaketa eta egonkortasuna lortzen du eta fase desberdinetan banatzen ditu proteinak, DNA eta RNA (ikusi gero).
 - b) Guanidina tiozianatoa: proteinak (RNAsak barne) desnaturalizatzen ditu, mintza zelularra desegiten du eta erribosomak eta RNA banatzen ditu.



RNA erauzketa TRIzol® erreaktiboa erabiliz

RNA-ren erauzketa hurrengo pausuetan egiten da:

1. Laginaren HOMOGENIZAZIOA: zelulak TRIzol-ean bersuspenditzen, zelulen lisia eta zelulen osagaien egonkortasuna bermatzen da. Inkubazioaren bidez, azido nukleiko-proteina konplexuak desagiten dira.
- 2.- BANAKETA FASETAN: TRIzol-ari kloroformoa gehitzen zaio eta zentrifugazioa egin ondoren polaritate desberdineko bi fase agertzen dira: fase organiko gorria behean (fenola-kloroformoa) eta fase gardena goian (urtsua). Lipidoak fase organikoan, proteinak eta DNA interfasean eta RNA fase urtsuan banatzen dira (normalean, fase urtsua erabili den TRIzolaren %60a da).



RNA erauzketa TRIzol® errektiboa erabiliz

3.- RNAREN PREZIPITAZIOA: fase urtsuaren RNA isopropanola gehituz prezipitatu da. Isopropanola uretan erraz nahasten da eta RNA deshidratatzen du. Hurrengo, zentrifugazioaren bidez, RNA prezipitatu da. Prezipitatuak "pellet"-a osatuko du hodiaren hondoan.

4.- RNA-AREN GARBIKETA

Prezipitatutako RNA gatzekin nahastuta egon ohi da. Gatzak kentzeko, RNA garbitzen da etanol %75 erabiliz. Gatzak disolbatzen dira ura %25-ean eta RNA prezipitatu mantentzen da etanol %75-ean.

5.- RNA-REN BERSUSPENSIOA: RNAsik gabeko ura erabiltzen da RNA-ren degradazioa ekiditeko. RNA, DNA ez bezala, oso desegonkorra da.

Informazio gehigarria:

Benson C. RNA extraction Tutorial [Internet] [3 ene. de 2015; citado el 25 oct. de 2016]. <https://www.youtube.com/watch?v=MgNicWbANkA&nohtml5=False>-tik eskuragarri



Adierazpen genikoaren analisia

- Adierazpen genikoa metodo batzuen bidez aztertu daiteke.
- Metodo ohikoen bidez, geneen adierazpena banan banan aztertzen da.
- Beste metodo batzuen bidez, aldiz, gene anitzen adierazpenak aldiberean aztertu daitezke.

Informazio gehigarria:

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>-etik eskuragarri



Adierazpen genikoaren azterketa RT-PCRaren bidez: Erretrotranskripzioa eta PCRa

- Genearen adierazpena aztertzeko metodorik ohikoena RT-PCRa da, non PCRaren bidez gene baten adierazpena eman osteko mRNA anplifikatzen den (Pfaffl, 2004).
- Taq-polimerasak DNA sintetizatu dezake moldea DNA baino ez denean. Beraz, lehenengoz, DNA osagarria (cDNA) ekoiztu behar da mRNA-tik abiatuz. Pausu hau lortu ahal izateko alderantzizko transkriptasa edo RT (Reverse Transcriptase) erabiltzen da, zeinak RNA mode gisa erabiliz DNA ekoizten duen.

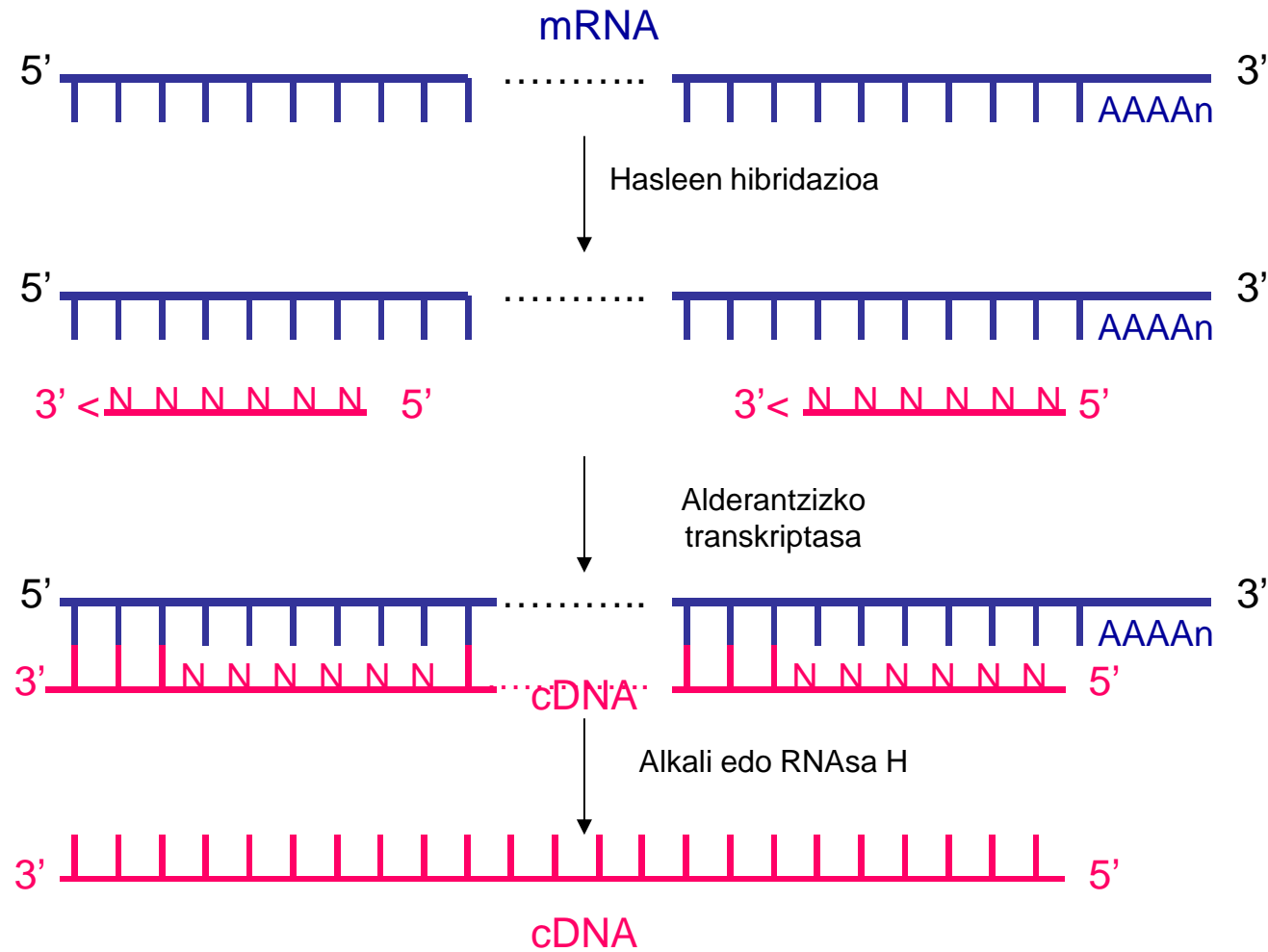


Adierazpen genikoaren azterketa RT-PCRaren bidez: Erretrotranskripzioa eta PCRa

- RT erreakzioaren bidez cDNA molekulen lagina lortuko da, non transkribatu diren mRNA-en adierazgarria izango den.
- Normalean "random primers"-ak (zorizko sekuentzia daukaten hexanukleotidoak) erabiltzen dira. Izan ere, hasle hauek ea RNA molekula guztien 5' zein 3' eskualdeen sintesi adierazgarria baimentzen dute.
- Informazio gehigarria :
Simplified RT- Reverse Transcription Animation [Internet].
Thermo Fisher Scientific [6 dic. de 2012; citado el 25 oct. de 2016].
<https://www.youtube.com/watch?v=0MJibrS4fbQ&nohtml5=False>-tik eskuragarri



Erretrotranskripzioa



Adierazpen genikoaren azterketa RT-PCRaren bidez: Erretrotranskripzioa eta PCRa

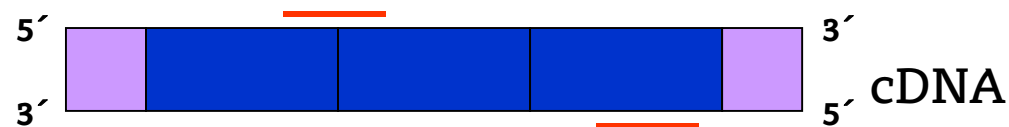
- Behin cDNA-ak ekoizirik, RT soluziotik alikuotak hartzen dira transkrito desberdinak aztertzeko; mRNA bakoitzarekiko PCR-rako hasle espezifikoak diseinatuta. PCRaren bidez berariazko cDNA bat anplifikatu daiteke (aztertu nahi dugun mRNAaren adierazgarria), RNA kantitatea oso baxua izan den arren.
- RT-PCRa oso teknika sentikorra denez, maiz erabiltzen da adierazpen genikoaren azterketa egiteko. RT-PCRa ren bidez, mRNA-ak detektatzeko ahalmenak ea mugarik ez dauka.



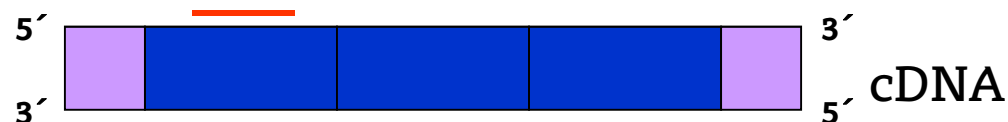
cDNA anplifikatzeko PCRa: berariazko hasleen diseinua gakoa da

DNA barik, cDNA anplifikatzen duten hasleak diseinatzeko 2 aukera:

A) Hasle baten hibridazio gunea **bi exoien harteko lotura** ematen deneko sekuentzian egotea. Kasu honetan, haslea ezin da hibridatu DNA genomikoarekin.

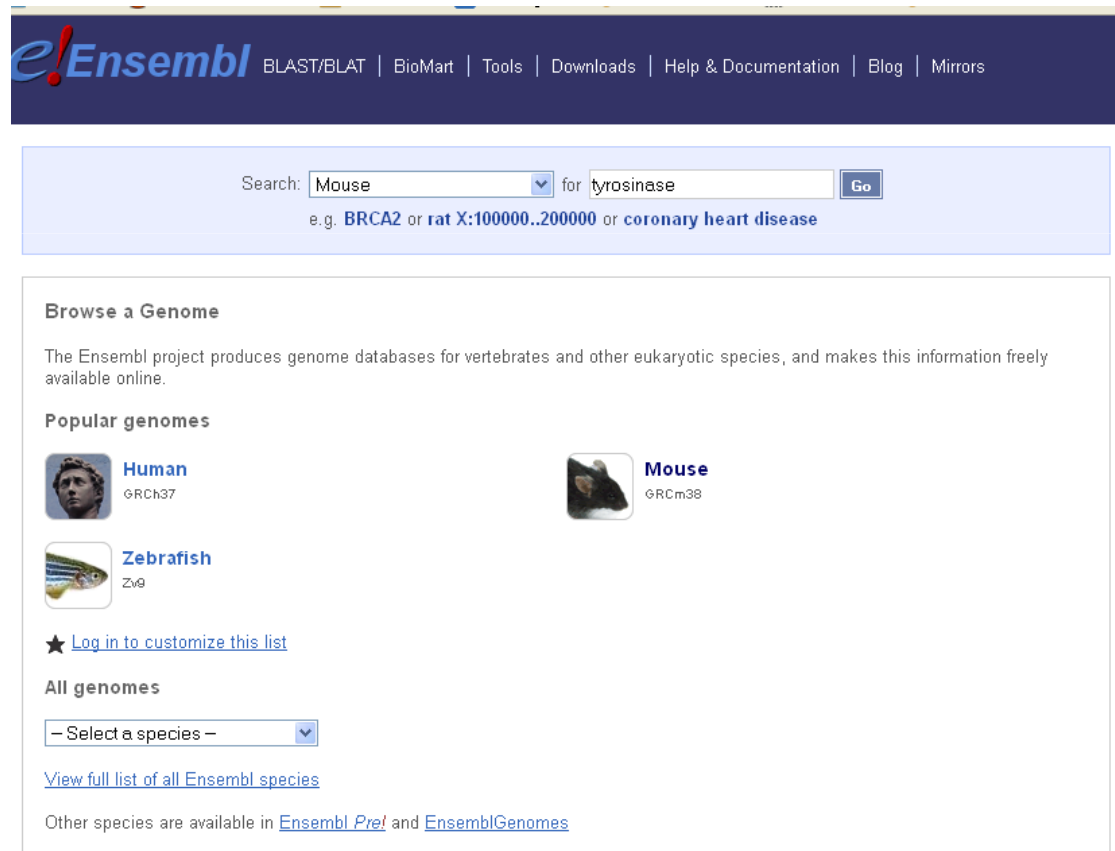


B) **Hasleak exoi banarekin** hibridatzea. cDNArekin hibridatzen badira, esperotako tamaina duen aplikona lortu dugu, baina DNA genomikoarekin hibridatzen badira, aplikona esperotakoa baino askoz ere luzeagoa izango da, **introien tamainaren** menpekoa. Introia 1 Kb baino luzeagoa bada, PCRa ez da aterako, anplifikatu beharko den sekuentzia handiegia izango baita.



Tirosinasa cDNA anplifikatzeko hasleen diseinua: *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>) eta *Primer 3*

1.- Bilatu Tirosinasa genearen sekuentzia Ensembl-en




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.- Aurkitu exoiak

Ensembl Genes interface showing details 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

Statistics
 CCDS
 Ensembl version
 Type
 Prediction Method

Exons: 5 Coding exons: 5 Transcript length: 3,307 bps Translation length: 533 residues
 This transcript is a member of the Mouse CCDS set: [CCDS52304](#)
 ENSMUST00000004770.5
 Known protein coding
 Annotation produced by the Ensembl [genebuild](#).

Exoiak



3.- Aurkitu exoien arteko lotura gunekak

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
CCAGCTTTCAGGCAGAGGTTTCCAGGATATCCTTCTGTCCAGTGCACCATCTGGACCTCAGTTCCCC
TTCAAAAGGGGTGGATGACCGTGAGTCTGGCCCTCTGTGTTTTATAATAGGACCTGCCAGTGCACAGGCA
ACTTTCATGGGTTTCAACTGCGGAAACTGTAAGTTGGATTGGGGGCCAAAATTGTACAGAGAAGCGAGT
CTTGATTAGAAGAAACATTTTTGATTGAGTGTCTCCGAAAAGAATAAGTTCTTTTCTTACCTCACTTTA
GCAAAACATACTATCAGCTCAGTCTATGTCATCCCCACAGGCACCTATGGCCAAAATGAACAATGGGTCAA
CACCCATGTTTAAATGATATCAACATCTACGACCTCTTTGTATGGATGCATTAATGTGTCAAGGGACAC
ACTGCTTGGGGCTCTGAAAATATGGAGGACATGATTTTGGCCATGAAGCACCAGGTTTCTGCCTTGG
CACAGACTTTTCTGTTATTGTTGGGAACAAGAAATTCGAGAACTAACTGGGGATGAGAACTTCACTGTTT
CATACTGGGATTGGAGAGATGCAGAAAACGTGACATTTGCACAGATGAGTACTTGGGAGGTCGTCACCC
TGAAAATCCTAACTTACTCAGCCACGATCCTTCTTCTCCTCCTGGCAGATCATTGTAGCAGATCAGAA
GAGTATAATAGCCATCAGGTTTTATGGCATGGAACACCTGAGGGACCCTATTACGTAATCCTGGAAACC
ATGACAAAAGCCAAAACCCCGAGCTCCCATCTTCAGCAGATGTGGAATTTTGTCTGAGTTTGACCCAGTA
TGAATCTGGATCAATGGATAGAACTGCCAATTTTCAGCTTTAGAAAACACACTGGAAGGATTTGCCAGTCCA
CTCACAGGGATAGCAGATCCTTCTCAAAGTAGCATGCACAATGCCTTACATATCTTTATGAATGGAACAA
TGTCCCAAGTACAGGGATCGGCCAACGATCCCATTTTTCTTCCACCATGCTTTTGTGGACAGTATTTT
TGAAACAATGGCTGCGAAGGCCACCGCCCTCTTTTGGAAAGTTTACCAGAAAGCCAATGCACCTATCGGCCAT
AACAGAGACTCTTACATGGTTCCTTTCATACCGCTCTATAGAAAATGGTGATTTCTTTCATAACATCCAAGG
ATCTGGGATATGACTACAGCTACCTCCAAGAGTCAGATCCAGGCTTTTACAGAAAATATATTGAGCCTTA
CTTGGAACAAGCCAGTCGATCTGGCCATGGCTTCTTGGGGCAGCACTGGTGGGAGCTGTTATTGCTGCA
GCTCTCTTGGGCTTAGCAGTAGGCTATGCCTTCAGAAAGAAGAAGAAGAAGCAACCCAGGAGGAAA
GGCAGCCACTCCTCATGGACAAGACGACTACCACAGCTTGCTGTATCAGAGCCATCTGTGA
    
```

CDS-a

Exoiak

Translation (533 aa):

```

MFLAVLYCLLWSFQISDGHFPRACASSKNLLAKECCPPWMDGSPCGQLSGRGSCQDILLSSAPSGPQFP
FKGVDDRESWPSVFNRTCQCSGNFMGFNCGNCKFGFGPNCTEKRVLIRRNIFDLSVSEKNKFFSYLTL
AKHTISSVYVIPGTGQMNNGSTPMFNDINIYDLFVMMHYVSRDILLGGSEIWRDIDFAHEAPGLFPW
HRLFLLLWEQEIRELTGENFTVPYWDWRDAENCDICTEYLGGRHPENPNLLSPAFFSSWQIICSRSE
EYNSHQVLCDGTPGPELLRNPNHDKAKTLPRLPSSADVEFCLSLTQYESGSMDRNTANFSFRNTLEGFASP
LTGIADPSQSSMHNALHIFMNGTMSQVQGSANDPIFLLHHAFFVDSIFEQWLRHRPRLLEVYPEANAPIGH
NRDSYMPVFIPLYRNGDFFITSKDLGYDYSYLQESDPGFYRNYIEPYLEQASRIWPLLGAALVGAVIAA
ALSGLSSRLCLOKQKKKKQPEERQPLLMDKDDYHSLLYQSHL
    
```

Proteina



5.- Primer 3 programa erabili hasleak lortzeko

Primer3 Output

Cebador directo
Cebador Reverso

```

No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO          start  len  tm    gc%   any   3'  Seq
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 TAGTGGTCCCTCAGGTGTC
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

```



Barne kontrola "Housekeeping gene"

Adierazpen genikoa aztertzeko barne kontrol aproposak (karga kontrolak) erabili behar dira. Kontrol hauek hurrengo 2 irizpideak betetzen dituzte:

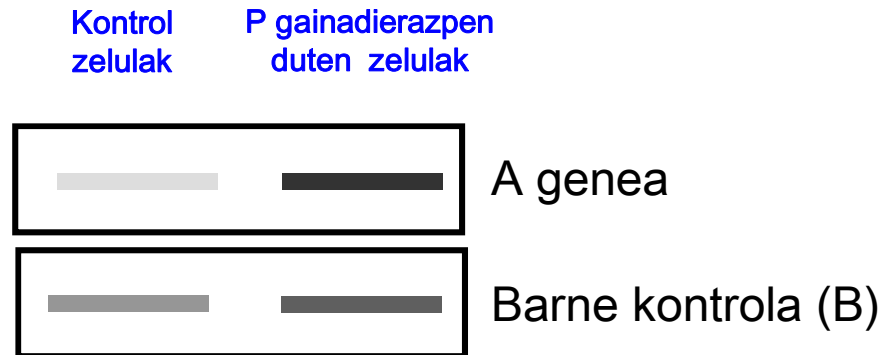
- Gene konstitutiboak dira, beraz, euren adierazpena ez da aldatzen baldintza zelularrak aldatzen diren neurrian (tratamendua)
- Euren adierazpen maila aztertzen dugun genearenaren parekoa izan behar da

Adibideak

- Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (**GAPDH**) → Glikolisian parte hartzen duen entzima
- **β -actin** → Zitoeskeletoaren osagaia
- Ribosomal RNA (rRNA): **28S, 18S** → RNA erribosomikoa



RT-PCRaren datuen tratamendua



P proteina gainaderazten duten zeluletan ematen den A genearen adierazpen erlatiboa kontrol zelulekiko kalkulatzeko:

- 1.- Elektroforesi burutu ondorengo banden dentsitate optikoaren balioak ateratzen dira
- 2.- A genearen adierazpen normalizatua lortzen da bi baldintzetan (A/B)
- 3.- Trataturiko zelulen balio normalizatua zatitzen da kontrol zelulen balio normalizatuarekin

A/B tratamendua

A/B kontrola



BIBLIOGRAFIA

- Agarose Gel Electrophoresis [Internet] BioRad [2012-ko Urriak 11; 2016-ko Urriak 25-ean zitatua]. <https://www.youtube.com/watch?v=vq759wKCCUQ>-tik eskuragarri
- Benson C. RNA extraction Tutorial [Internet] [2015-eko Urtarrilak 3 ; 2016-ko Urriak 25-ean zitatua]. <https://www.youtube.com/watch?v=MgNicWbANkA&nohtml5=False>-tik eskuragarri.
- 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 [2016-ko Urriak 25-ean zitatua]. <http://www.facs.ethz.ch/docs/lit>-etik eskuragarri.
- 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 [2011-ko Martxoak 15; 2016-ko Urriak 25-ean zitatua]. http://www.youtube.com/watch?v=G39wNXaZPX4&feature=em-share_video_user-tik eskuragarri.



BIBLIOGRAFIA

- How to Set up the PCR Reaction[Internet]. Thermo Fisher Scientific [2013-ko Otsailak 28; 2016-ko Urriak 25-ean zitatua]. <https://www.youtube.com/watch?v=NYIT3f-MZ5o&nohtml5=False>-tik eskuragarri.
- Kennedy S. How DNA extraction kits works in the lab [2010-ko Ekainak 28; 2016-ko Urriak 25-ean zitatua] In: The missing manual for bioscientists. USA: BitesizeBio [Internet]. <http://bitesizebio.com/13516/how-dna-extraction-rna-miniprep-kits-work/>-etik eskuragarri.
- 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 [2016-ko Urriak 25-ean zitatua]. http://www.dartmouth.edu/~dartlab/uploads/MACS_Technology_Flyer.pdf-tik eskuragarri
- Mark Frei. Centrifugation Separations. [Internet]. MO, USA: Sigma-Aldrich. BioFiles Volume 6, Number 5 [2016-ko Urriak 25-ean zitatua]. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/centrifugation-separations.html>-tik eskuragarri



BIBLIOGRAFIA

- Nexcelom Bioscience [Internet]. Massachusetts, USA: Nexcelom [2016-ko Urriak 25-ean zitatua]. <http://www.nexcelom.com/Applications/measure-cell-viability-using-trypan-blue-or-AOPI.php#feature1a>-tik eskuragarri
- Noles SR. Traditional Methods for CsCl Isolation of Plasmid DNA by Ultracentrifugation. [Internet]. USA: Thermo Fisher Scientific [2016-ko Urriak 25-ean zitatua]. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/D17309~.pdf>-tik eskuragarri
- One focus. Transfection [Internet]. USA: Mirus Bio LLC [2016-ko Urriak 25-ean zitatua]. <https://www.mirusbio.com/transfectopedia/methods>-etik eskuragarri
- Patrick M. Plasmids 101: Mammalian Vectors [2014-ko Martxoak 25; 2016-ko Urriak 25-ean zitatua]. In: Addgene's Blog [Internet] Addgene. <http://blog.addgene.org/plasmids-101-mammalian-vectors>-etik eskuragarri
- 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 [2012-ko Ekainak 1; 2016-ko Urriak 25-ean zitatua]. <https://www.youtube.com/watch?v=DkT6XHWne6E>-tik eskuragarri



BIBLIOGRAFIA

- Robertson S. Gene Expression Techniques. News Medical Life Sciences [Internet] USA: AZO NETwork [2014-ko Abenduak 2; 2016-ko Urriak 25-ean zitatua]. <http://www.news-medical.net/life-sciences/Gene-Expression-Techniques.aspx>-etik eskuragarri
- Sambrook J. and Russell DV. Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform. Protocols [Internet]. USA: Cold Spring Harbor Press [2016-ko Urriak 25-ean zitatua]. <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.prot4455.full>-etik eskuragarri
- Schwab S. in Animal Cell Culture. Edited by: Mohamed Al-Rubeai, Springer, 2014.
- Separation[Internet]. Vermont, USA: University of Vermont. [2016-ko Urriak 25-ean zitatua]. http://www.uvm.edu/~biology/Classes/296D/12_Separation.pdf-tik eskuragarri
- Simplified RT- Reverse Transcription Animation [Internet]. Thermo Fisher Scientific [2012-ko Abenduak 6; 2016-ko Urriak 25-ean zitatua]. <https://www.youtube.com/watch?v=0MJibrS4fbQ&nohtml5=False>-tik eskuragarri



GOMENDUTAKO IRAKURGAIAK

- 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) 9^a edición. Pearson Higher Education. <http://www.aw-bc.com/klug/>
- Nicholl D.S.T. An introduction to Genetic Engineering. Cambridge University Press (2008) (3^a 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

