

# M02. Tècniques complementàries als Cultius Cel·lulars

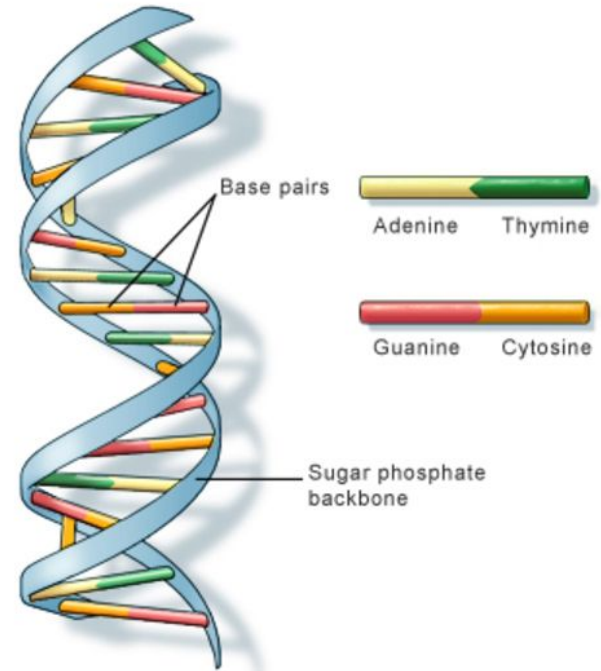
1. Extracció àcids nucleics
2. Extracció i anàlisi proteïnes
3. Edició DNA - Proteïnes recombinants
4. Tècniques de recompte i viabilitat cel·lular
5. Citometria de flux
6. Transfecció i transducció
7. Diferenciació i reprogramació cel·lular



# Àcids Nucleics: DNA i RNA

**M02. Tècniques complementàries als Cultius Cel·lulars**

# DNA



U.S. National Library of Medicine

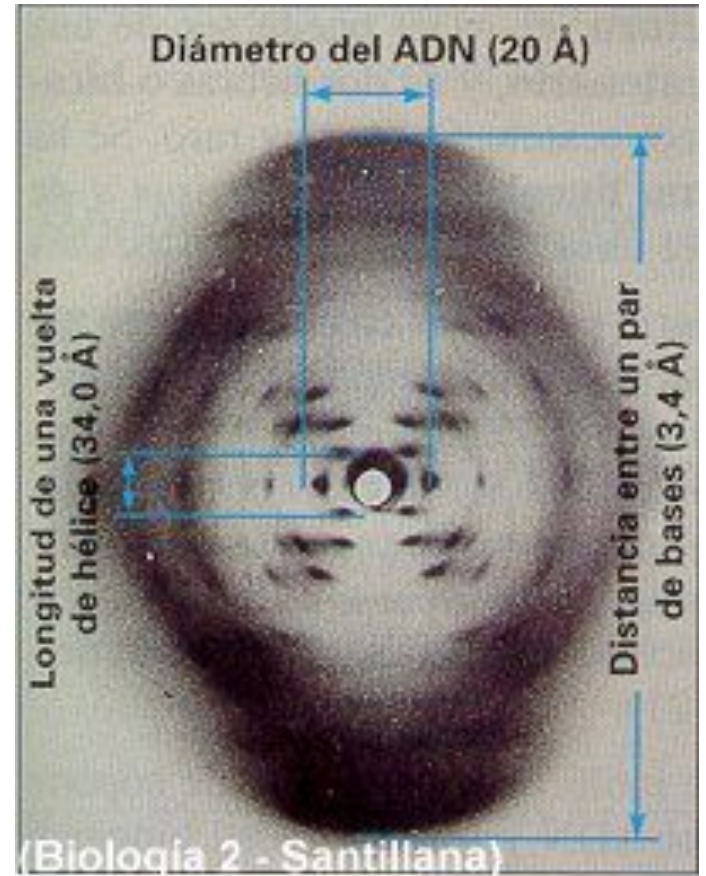
---

# CONTEXT HISTÒRIC

-----  
**1869** Friedrich Miescher, va aïllar un material ric en fosfats. També va trobar aquest material en diferents tipus cel·lulars

**1953** Watson & Crick (+Franklin) - Estructura secundària

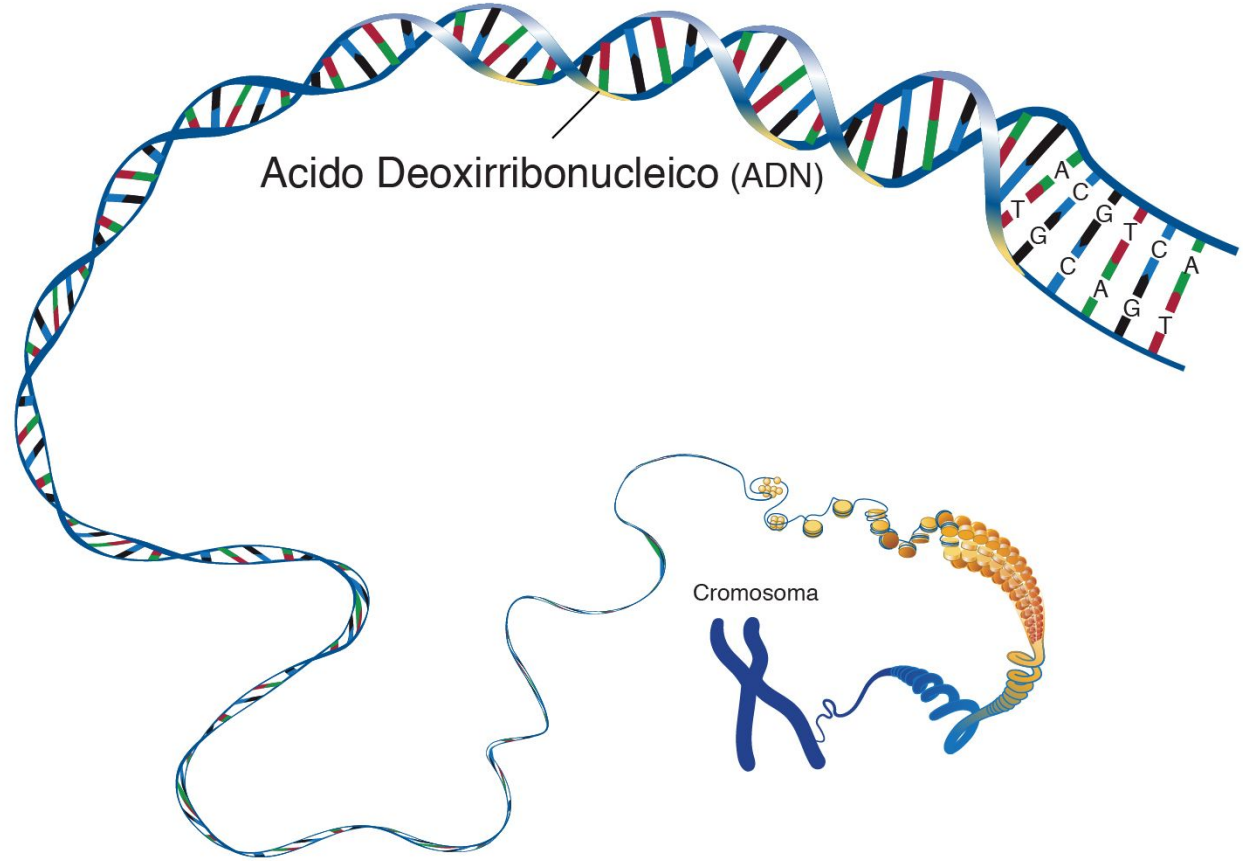
**2001** Projecte Genoma humà



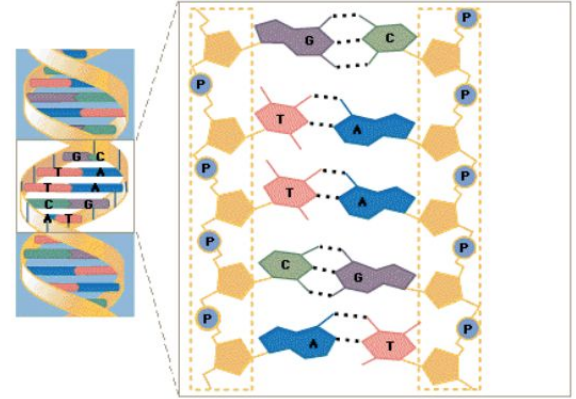
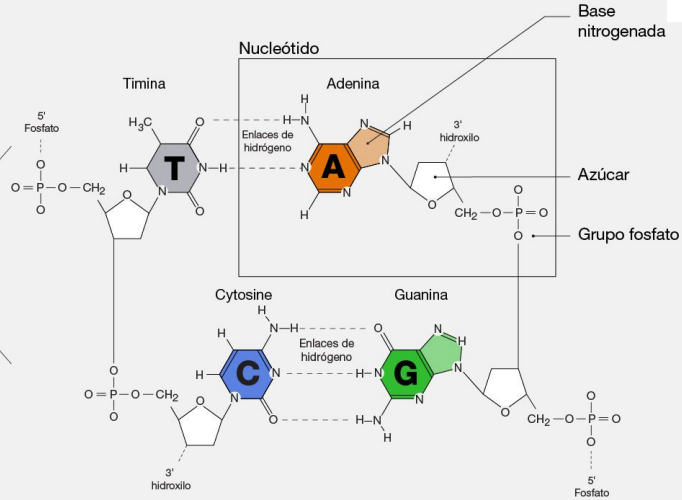
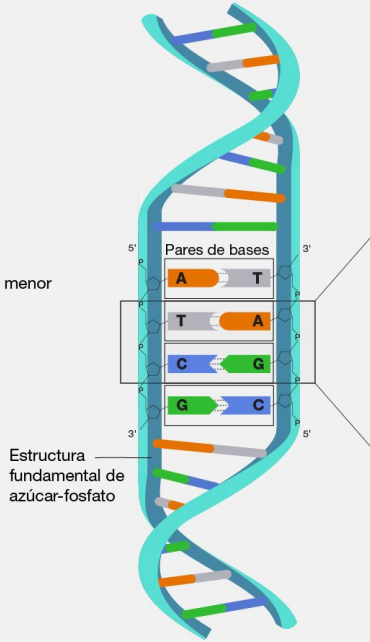
Difracción de rayos X de ADN extraído del timo de ternera.

-----

Acido Deoxirribonucleico (ADN)



# Ácido desoxirribonucleico (ADN)

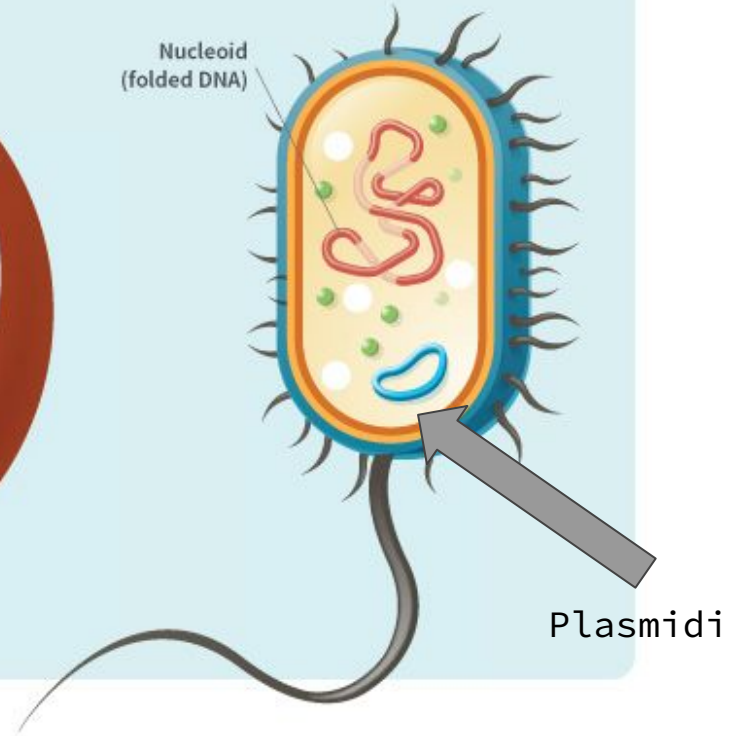
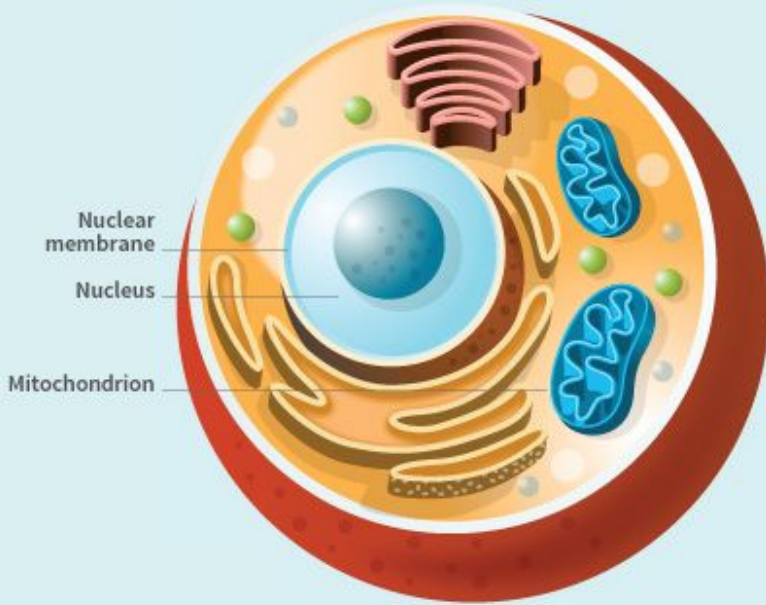
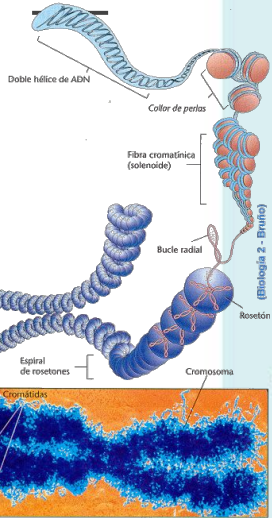


L'ADN té certa càrrega negativa.

Equivalència de Chargaff

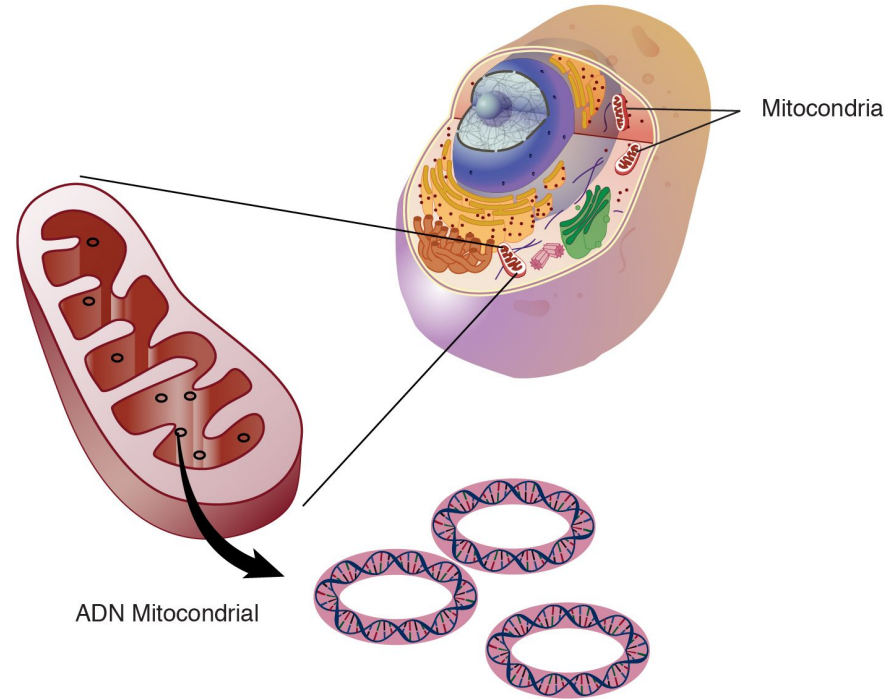
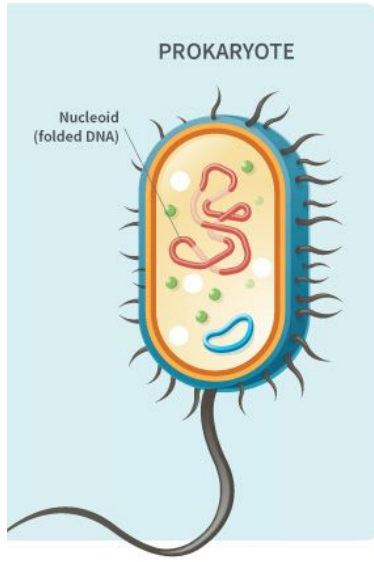
## EUKARYOTE

## PROKARYOTE

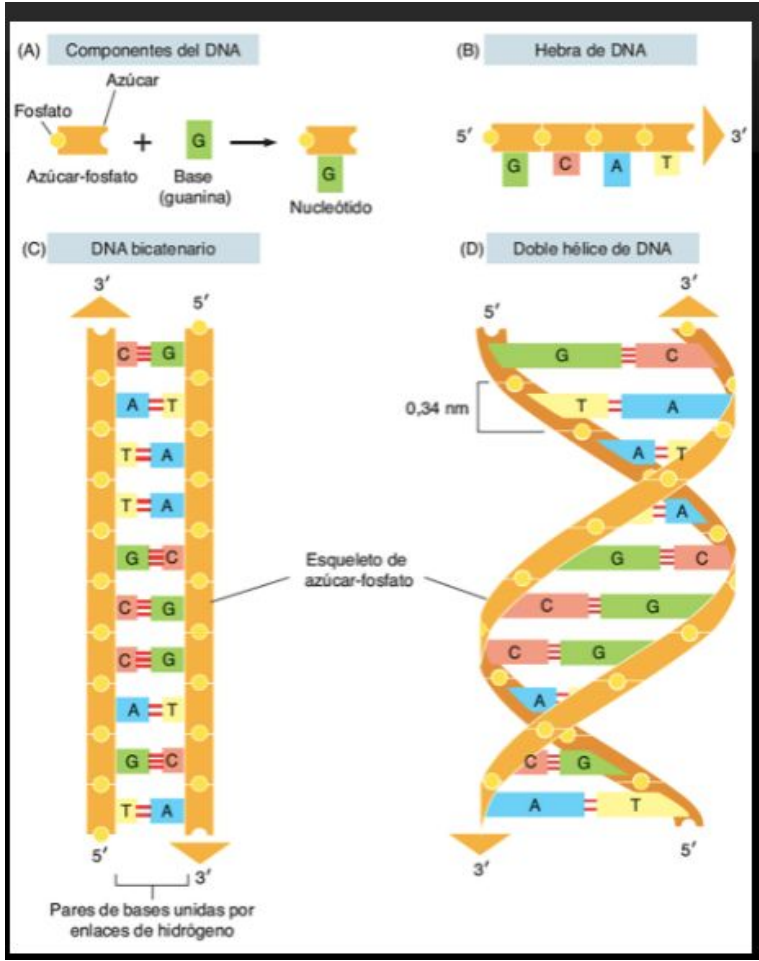


# ADN mitochondrial

---







---

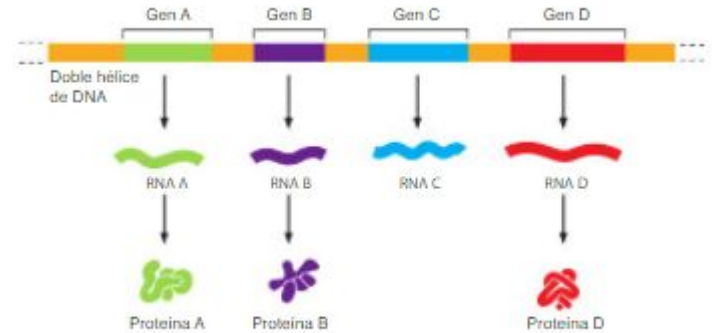
Quina és la seqüència complementària de la següent cadena de DNA:

5' -GGATTTTTGTCCACAATCA-3'

# Gens

---

La majoria de gens acabaran donant lloc a una proteïna, però no sempre és així, i en alguns casos la molècula de RNA és el producte final.



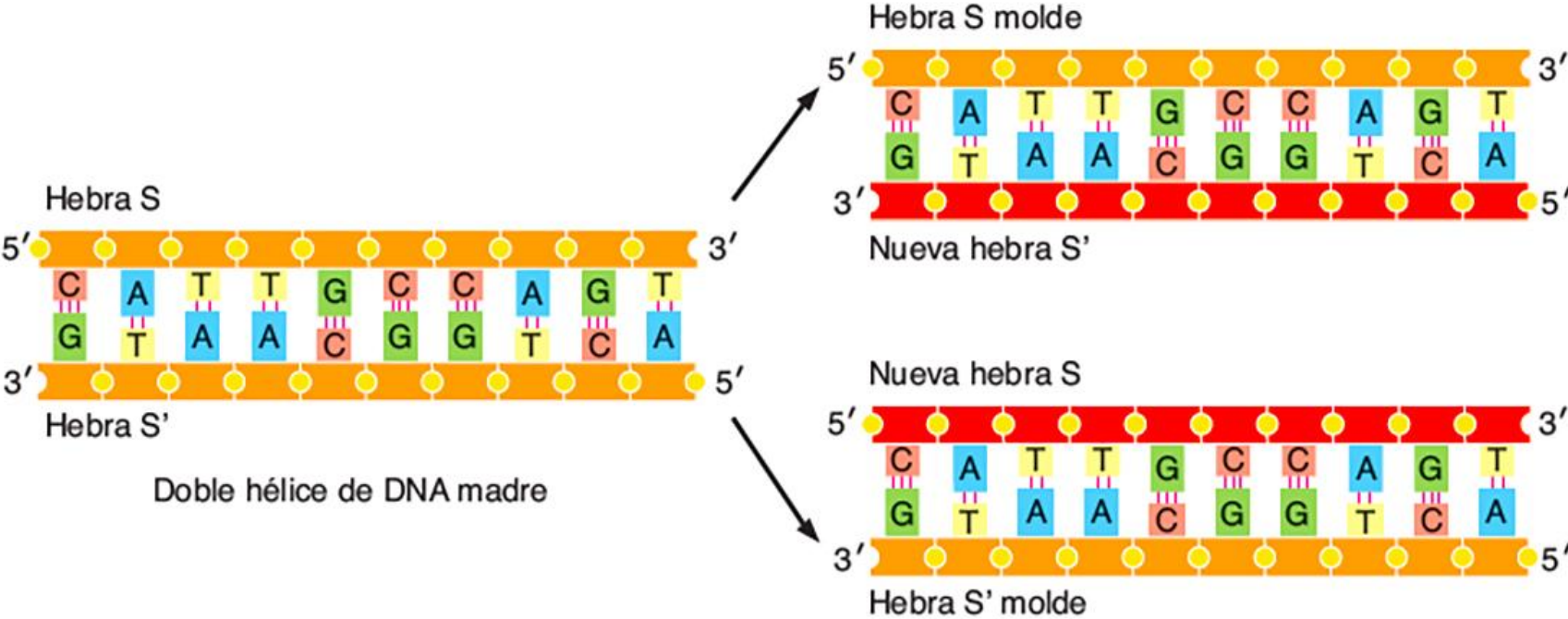
# Processos relacionats amb l'ADN

---

- Replicació
- Transcripció
- Traducció

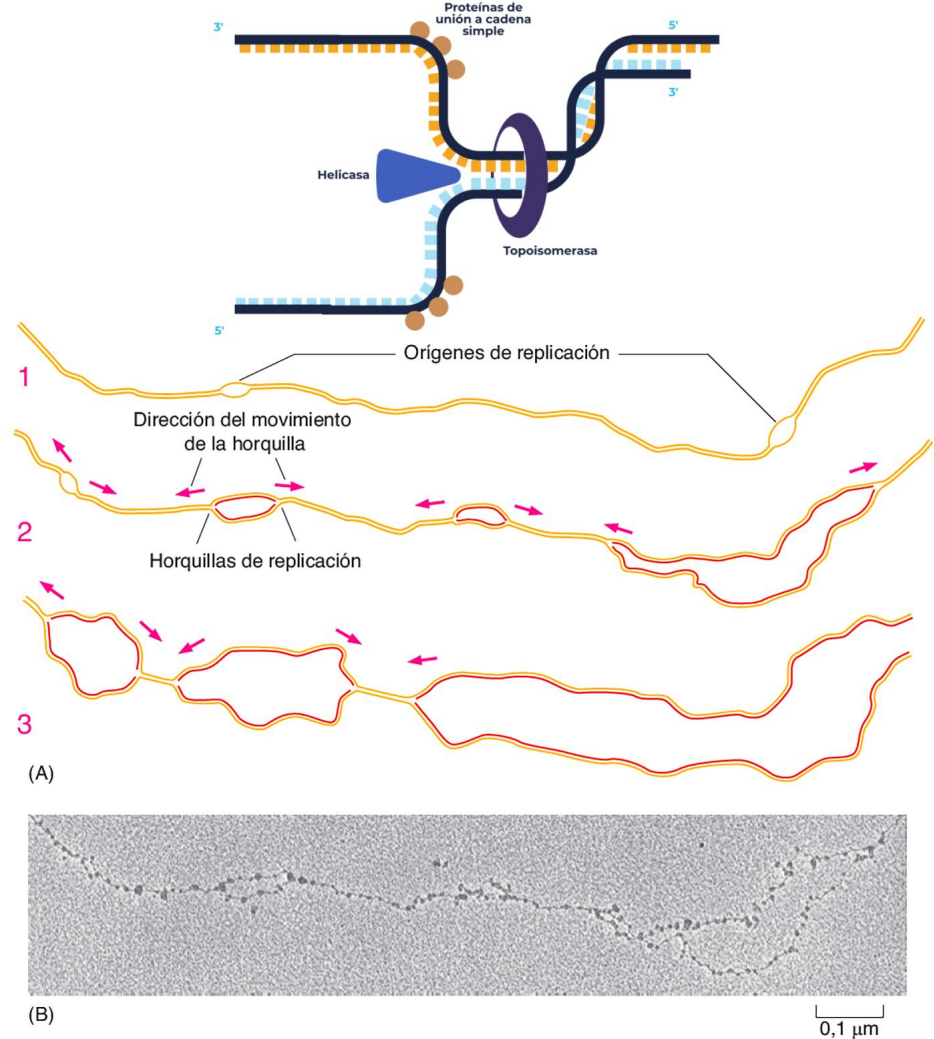
# Replicació DNA

---

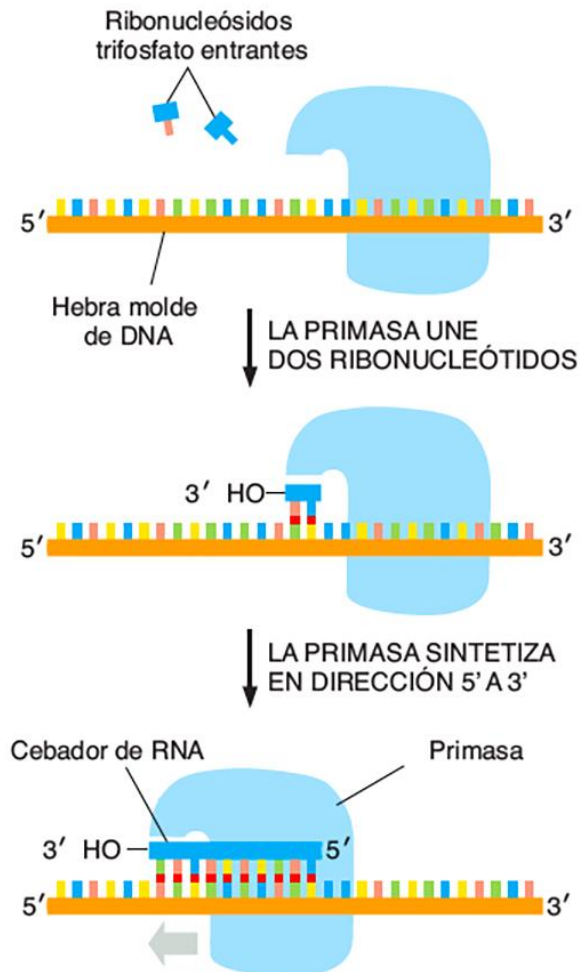
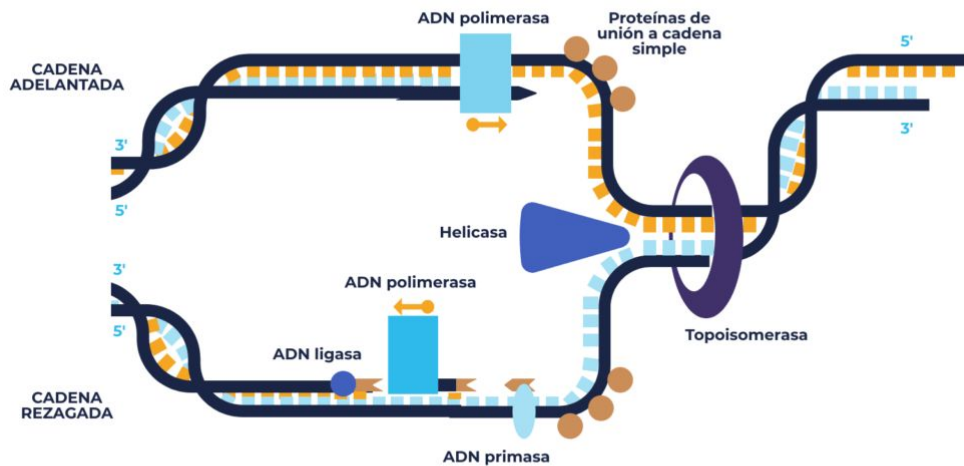


# Replicació DNA

- DNA polimerasa
  - Necessita unir-se a una doble cadena
  - Capacitat correctora
  - **Taxa d'error:** 1 error cada  $10^7$  parells de bases
- dNTP
- DNA helicasa
- DNA lligasa
  
- RNA Primasa } Primer
- rNTP }

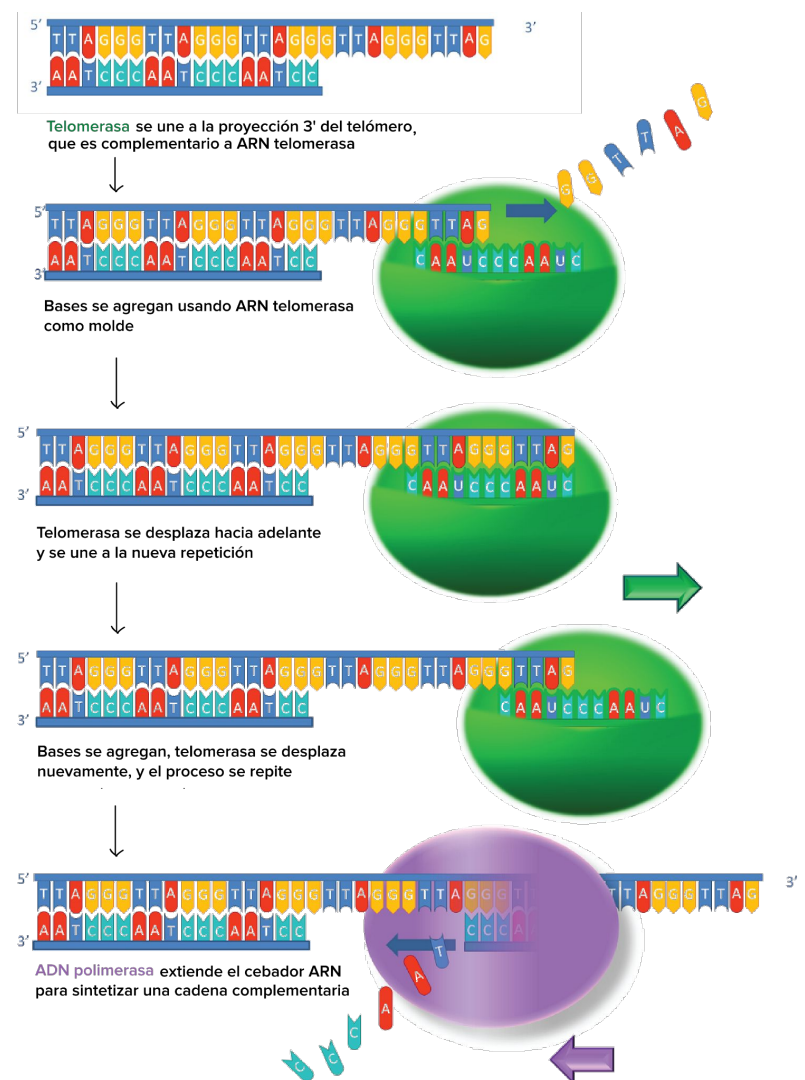
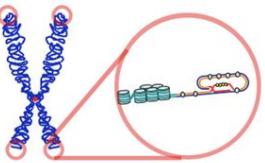


# Replicació DNA



# Replicació, ageing i càncer (cèl. eucariotes)

- **Telòmers:** seq. repetitives als extrems dels cromosomes, que permeten la seva replicació (via **telomerasa**) i marquen el final d'aquests.
  - Eviten que els cromosomes siguin més curts després de cada divisió cel·lular





— — —

## Quant gran/llarg és el DNA?

Aproximadament cada cèl·lula té  $3 \times 10^9$  de bases nitrogenades, això correspon a uns 20000 gens en el genoma humà, 37 dels quals es troben en el material genètic mitocondrial.

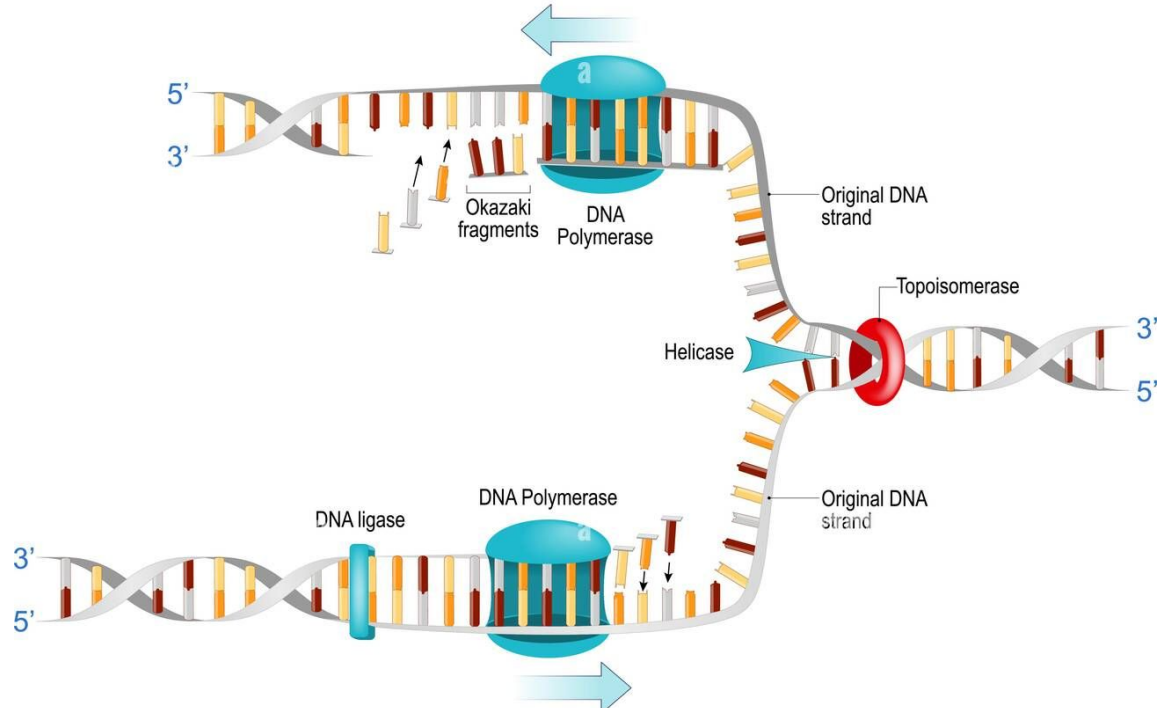
Si estiressim tota aquesta seqüència es correspondria a 2-3 metres en humans.

## Quant tarda el DNA en replicar-se?

In *E. coli* the entire genome is replicated in just 40 minutes, at a pace of approximately 1,000 nucleotides per second. In eukaryotes, the pace is much slower: about 40 nucleotides per second.

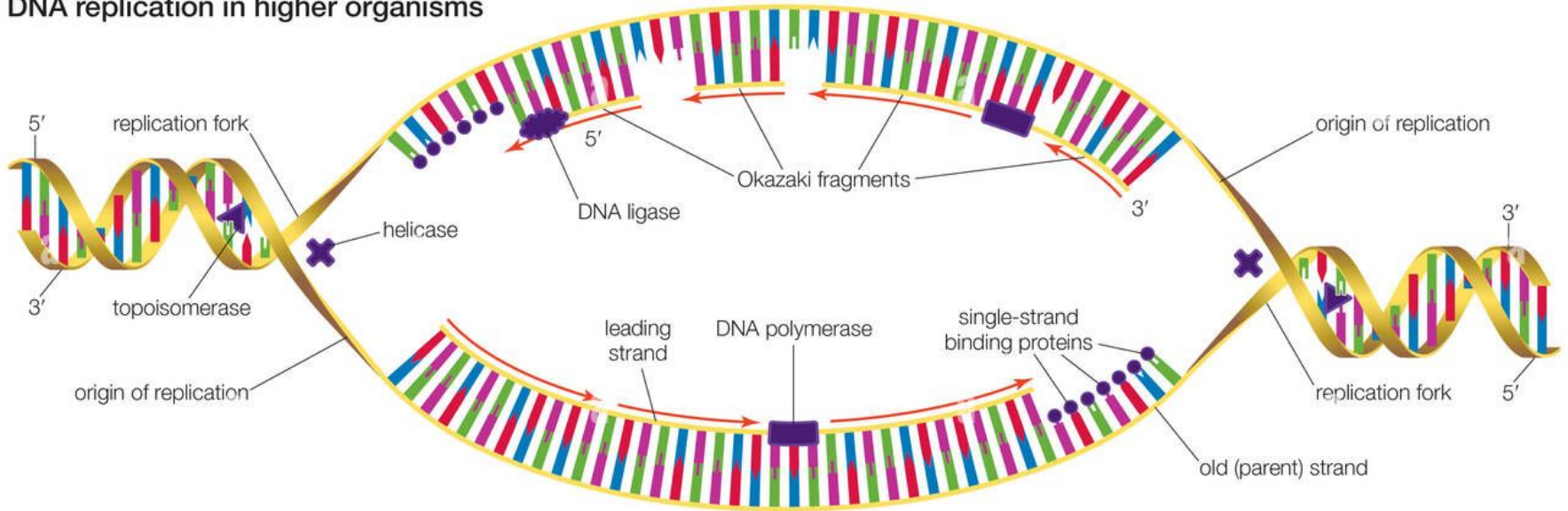
# Fragments d'Okazaki

---



— — —

## DNA replication in higher organisms



# Epigenètica

Estudi dels canvis que activen o inactiven els gens **sense canviar la seqüència de l'ADN**, a causa de l'edat i l'exposició a factors ambientals (alimentació, exercici, medicaments i substàncies químiques). Aquests canvis modifiquen el risc de malalties i a vegades passen de pares a fills.

---

# Epigenetics

DNA methylation

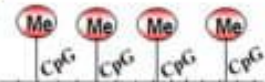
Histone modifications

Micro-RNAs

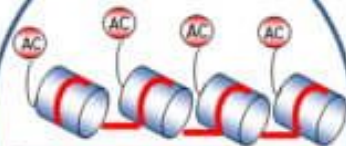
DNMTs

HAT HDAC

mi-RNAs



DNA Methylation



Histone Acetylation



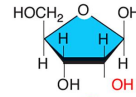
micro-RNA

Gene Expression



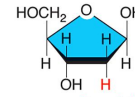
# RNA

## (A) DIFERENCIAS DE AZÚCARES



Ribosa

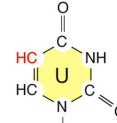
Usada en el RNA



Desoxirribosa

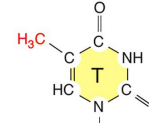
Usada en el DNA

## (B) DIFERENCIAS DE BASES



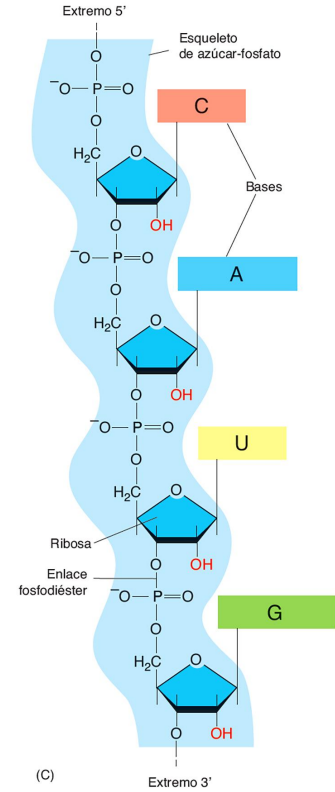
Uracilo

Usado en el RNA



Timina

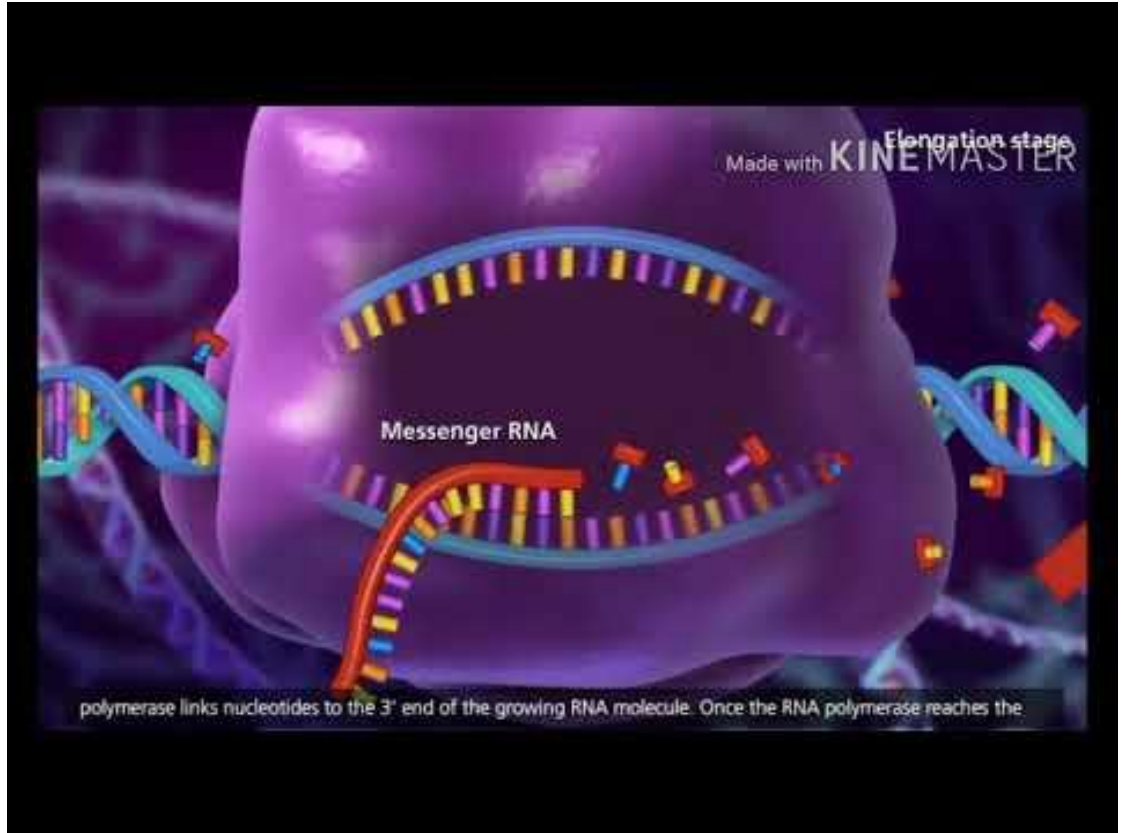
Usada en el DNA

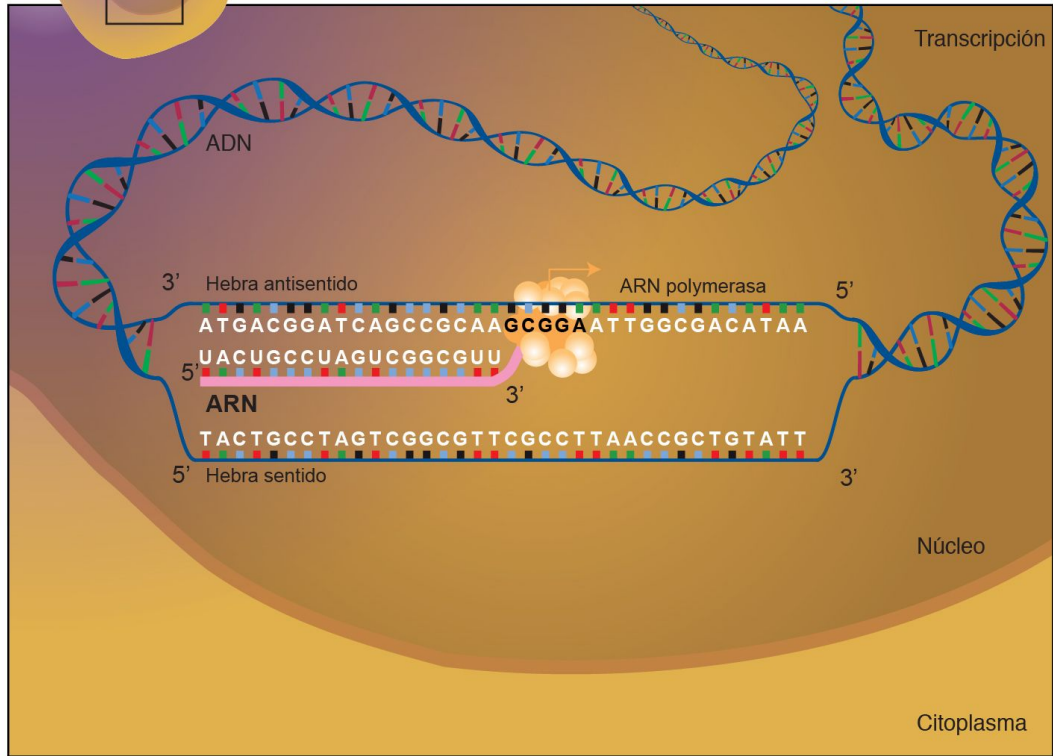
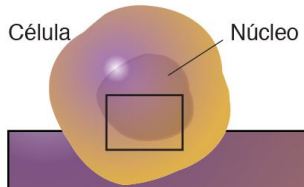


# Transcripció (DNA → RNA)

---

On es duu a terme?







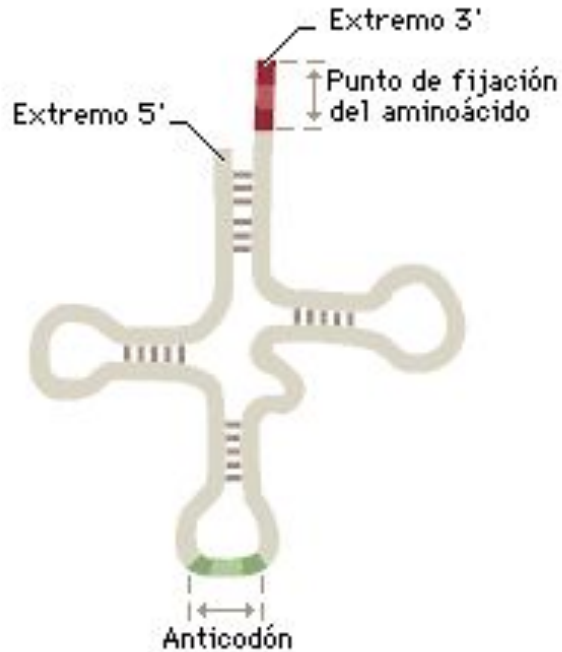
# ARNm

---



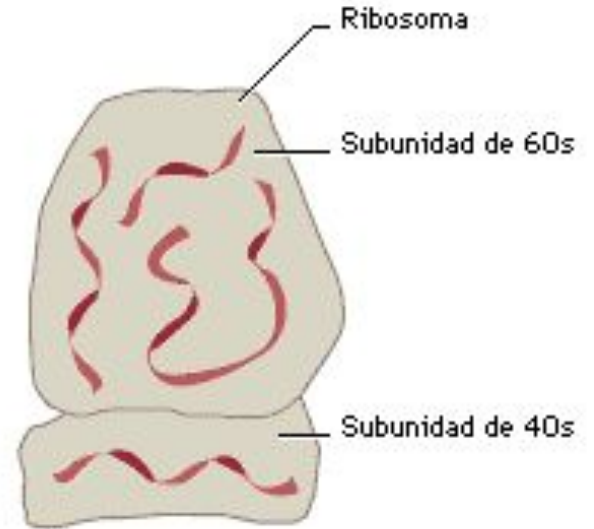
**ARN mensajero**

# ARNt



**ARN de transferencia**

# ARNr



**ARN ribosómico**

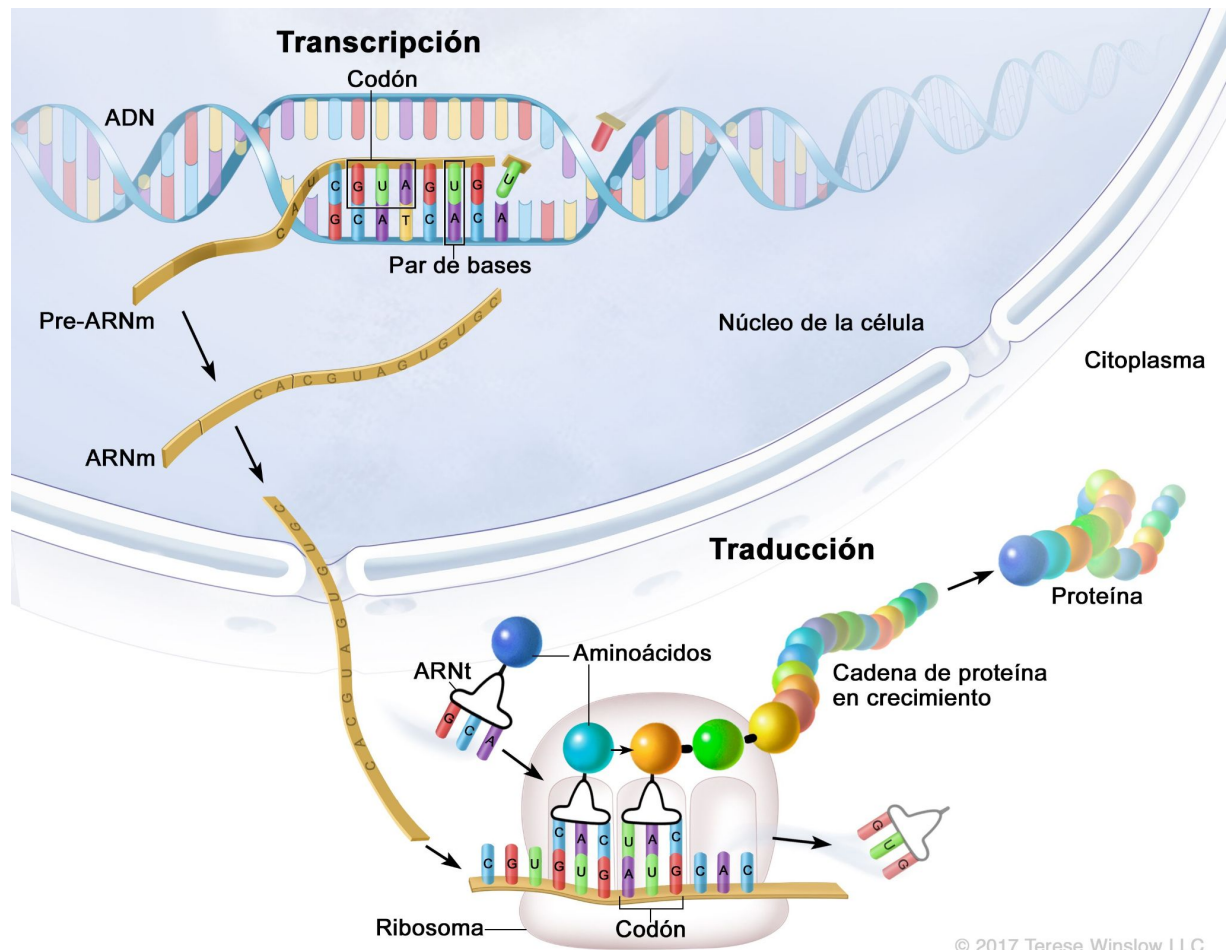
# Classes RNA

— — —

- **mRNA** → conté la informació per produir una proteïna
- **tRNA** → s'uneix de manera específica a im AA i el transporta al ribosoma on es produeix la traducció.
- **rRNA** → formen el centre de l'estructura del ribosoma i catalitzen la síntesi proteica.
- **miRNA/siRNA/snRNA** → regulen l'expressió gènica

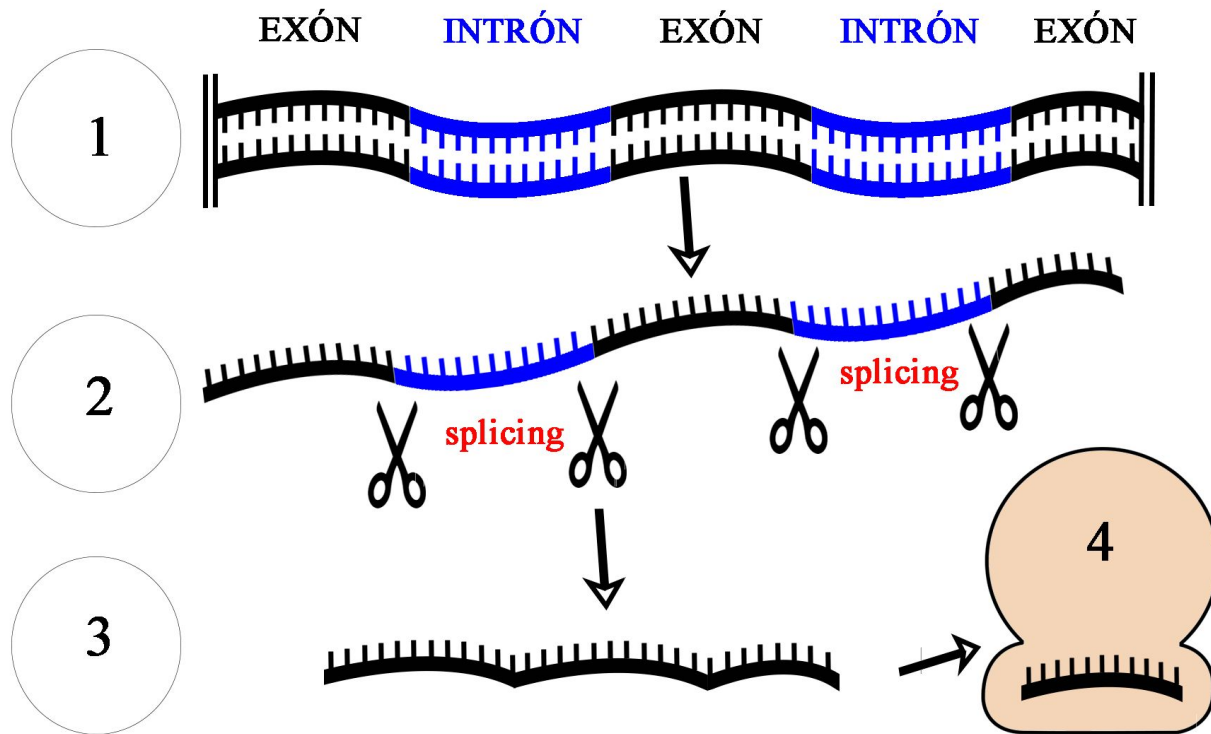
# ARNm

-----



# Splicing

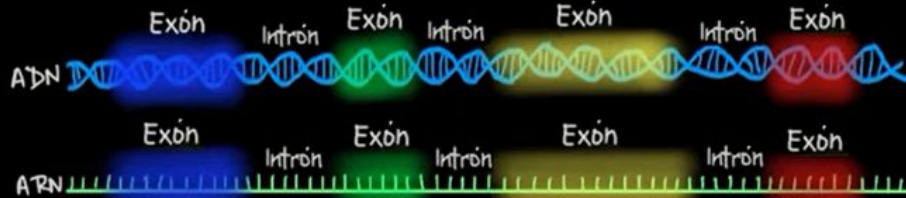
---



# ARNm - Regulació postranscripcional

---  
VIDEO:

Regulació postranscripcional



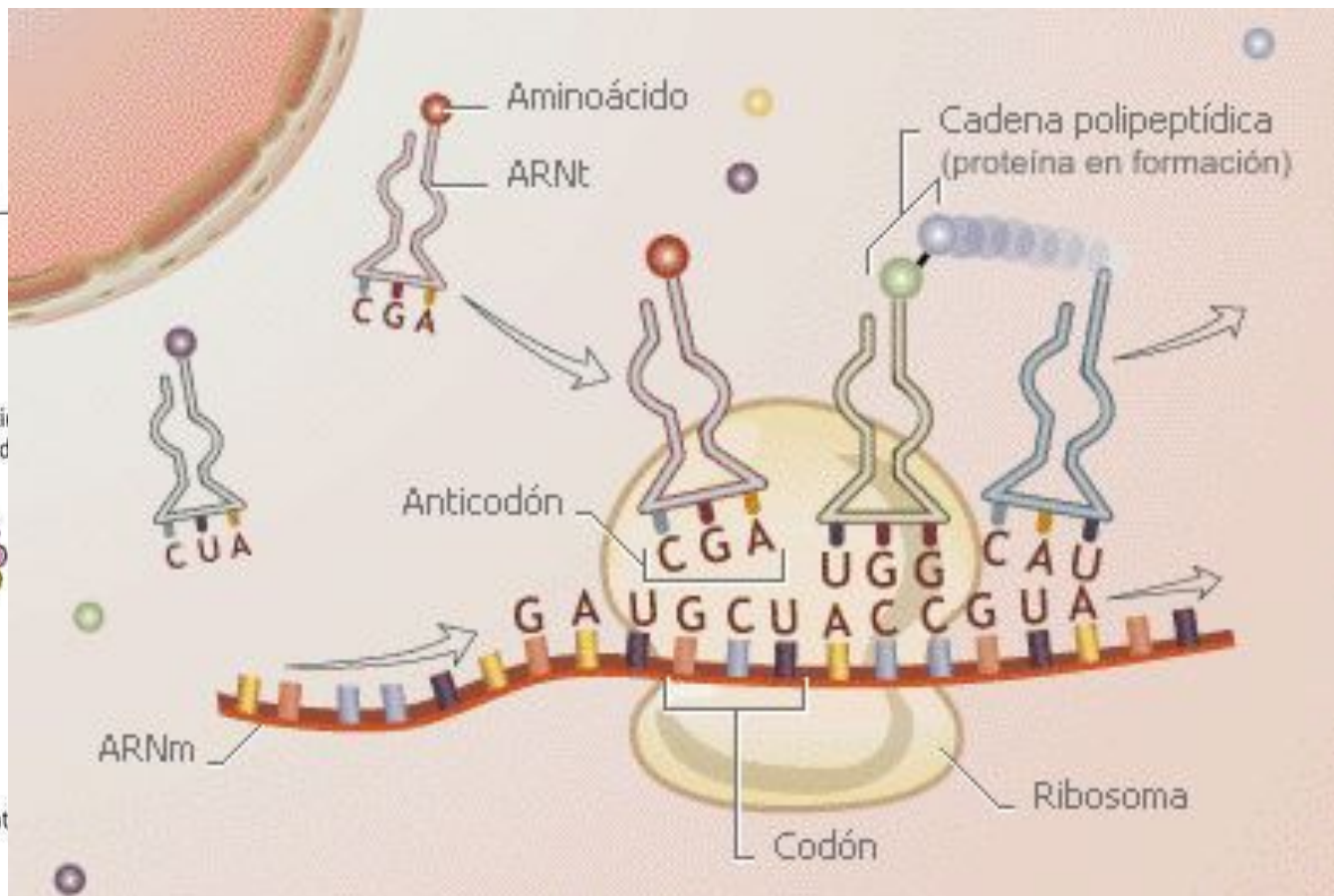
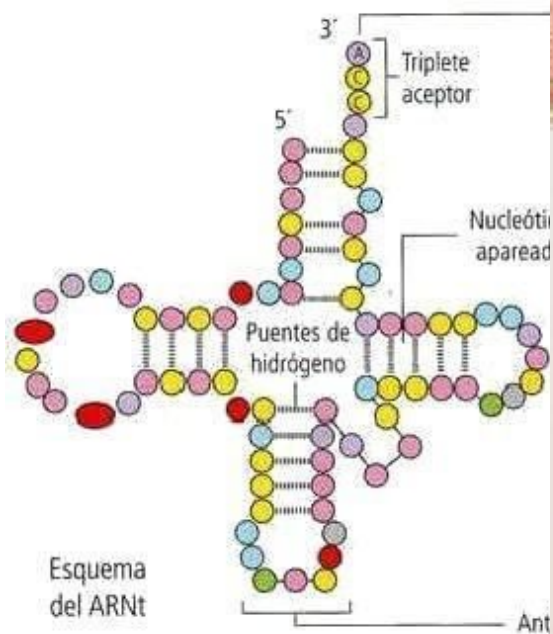
ARNm cap 5' ————— m cola poli-A 3'

- protege al ARNm de las exonucleasas (degrad)
- promueve la unión a ribosomas
- regulación de la exportación nuclear

¡Estabilizar!

- proteger
- promover
- regular
- terminación de la transcrip.  
~250

# tRNA



# Codi Genètic

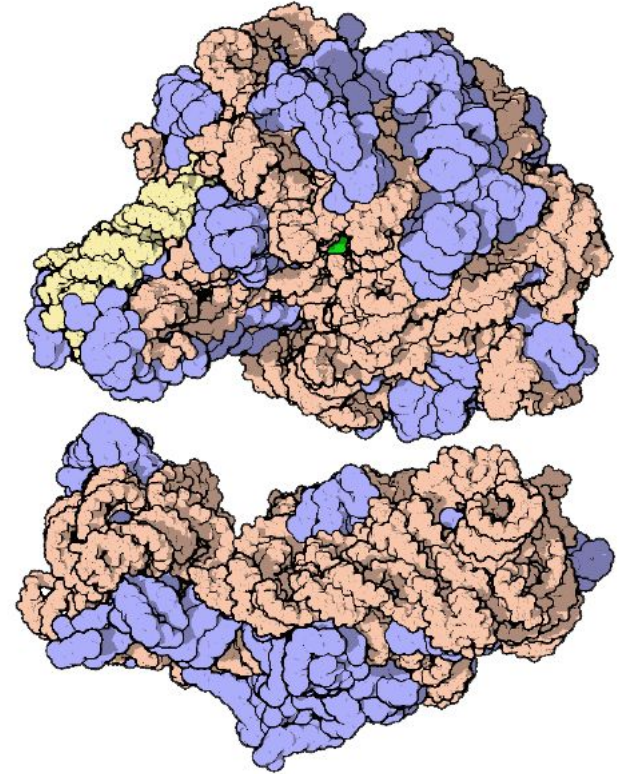
Codones		AGA								UUA						AGC							
		AGG								UUG						AGU							
		GCA	CGA					GGA		CUA					CCA	UCA	ACA						GUA
		GCC	CGC					GGC		CUC					CCC	UCC	ACC						GUC
	GCG	CGG	GAC	AAC	UGC	GAA	CAA	GGG	CAC	AUC	CUG	AAA		UUC	CCG	UCG	ACG				UAC	GUG	UAA
	GCU	CGU	GAU	AAU	UGU	GAG	CAG	GGU	CAU	AUU	CUU	AAG	AUG	UUU	CCU	UCU	ACU	UGG	UAU	GUU		UGA	
Aminoàcids		Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	Finalización	
		A	R	D	N	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V		

		Segunda letra				
		U	C	A	G	
Primera letra	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } Ser UCC } UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Alto UAG } Alto	UGU } Cys UGC } UGA } Alto UGG } Trp	U C A G
	C	CUU } Leu CUC } CUA } CUG }	CCU } Pro CCC } CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } Arg CGC } CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } Ile AUC } AUA } AUG } Met	ACU } Thr ACC } ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } Val GUC } GUA } GUG }	GCU } Ala GCC } GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } Gly GGC } GGA } GGG }	U C A G



# rRNA

- És l'ARN més abundant (80% del total)
- Presenta segments lineals i segments de doble hèlix
- Formen part dels **ribosomes**, sent els principals responsables de la major part de l'estructura i funció del ribosoma

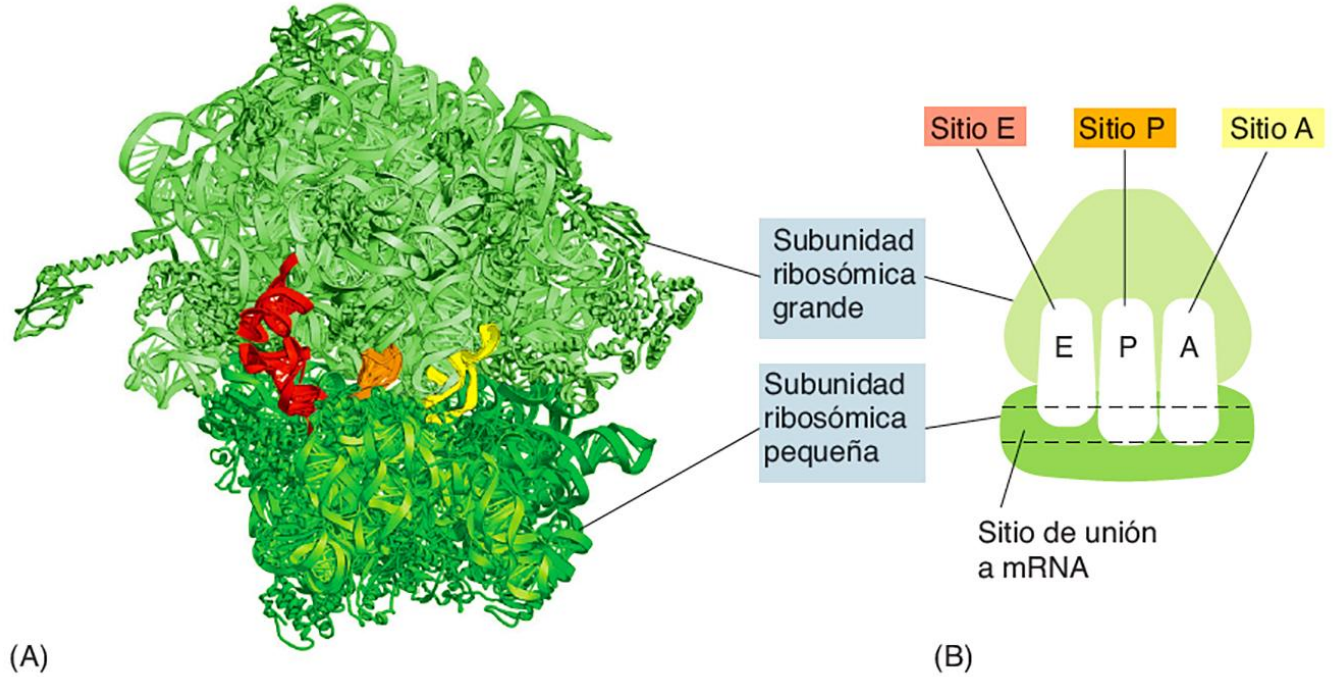




---

Dues  
subunitats:

- 60 S
- 40 S



# iRNA

---

Eina per estudiar la biologia bàsica de les cèl·lules, ja que permet l'inactivació (knockdown) de l'expressió gènica → estudi de la funció proteica i la funció gènica en molts tipus cel·lulars.

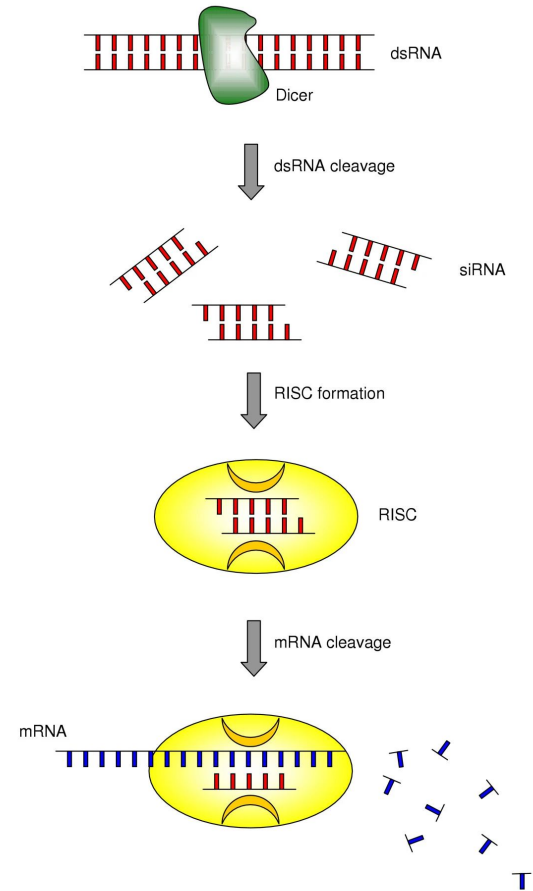
S'utilitza en:

- knockdown studies
- phenotype analysis
- function recovery
- pathway analysis
- in vivo knockdown
- **drug target discovery**

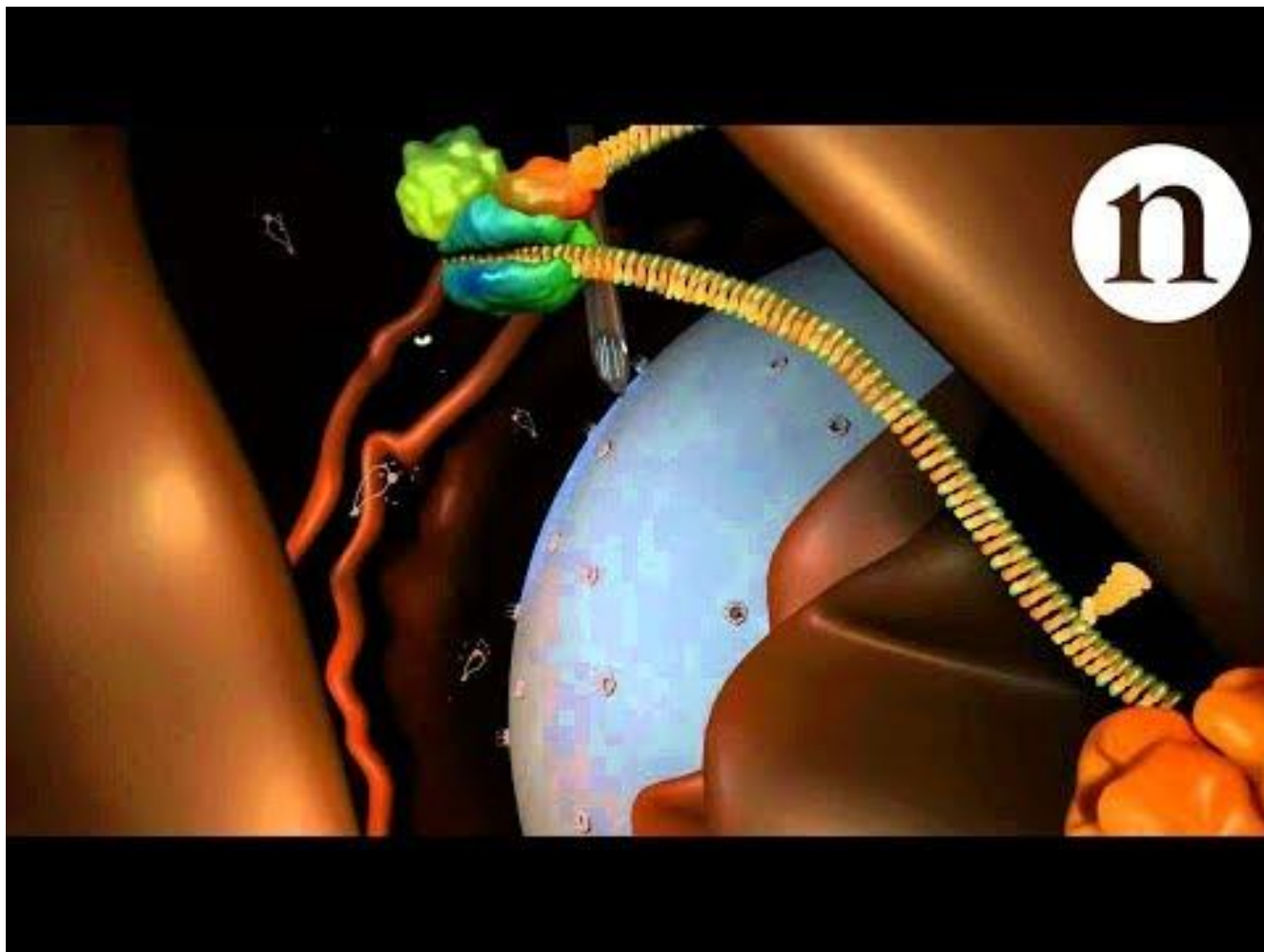
# RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology

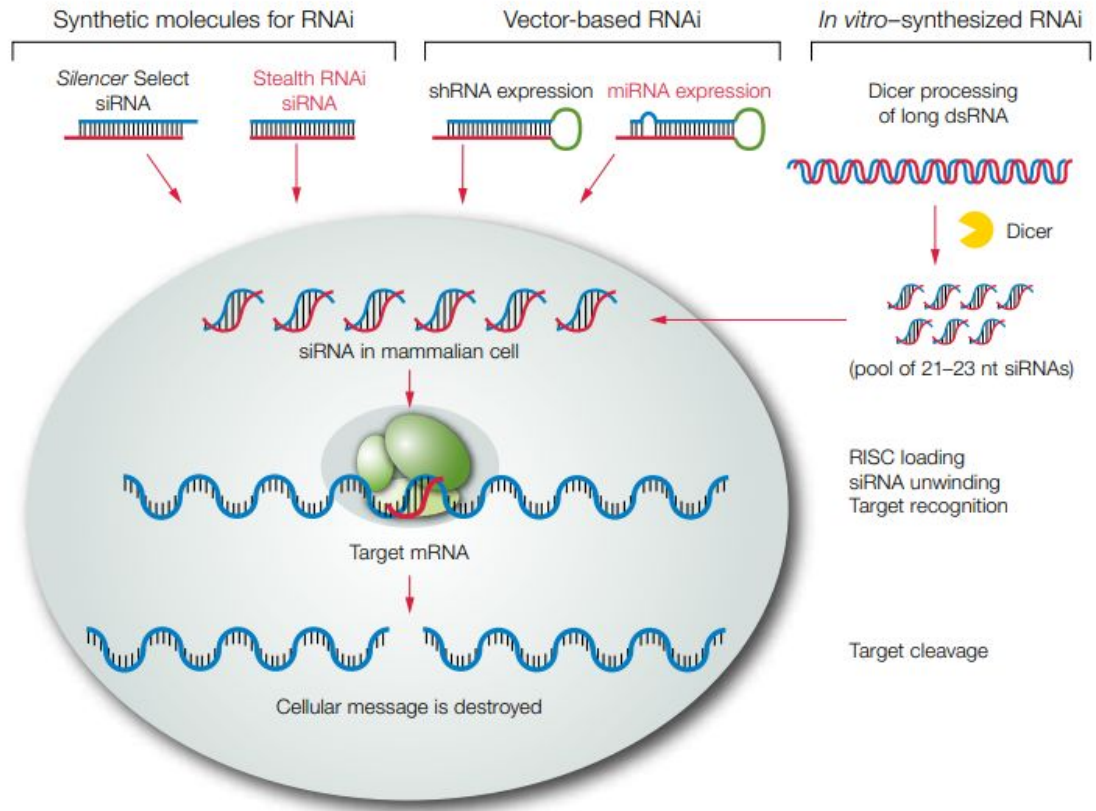
— — —

*Mechanism of RNA interference (RNAi). The appearance of double stranded (ds) RNA within a cell (e.g. as a consequence of viral infection) triggers a complex response, which includes among other phenomena (e.g. interferon production and its consequences) a cascade of molecular events known as RNAi. During RNAi, the cellular enzyme Dicer binds to the dsRNA and cleaves it into short pieces of ~ 20 nucleotide pairs in length known as small interfering RNA (siRNA). These RNA pairs bind to the cellular enzyme called RNA-induced silencing complex (RISC) that uses one strand of the siRNA to bind to single stranded RNA molecules (i.e. mRNA) of complementary sequence. The nuclease activity of RISC then degrades the mRNA, thus silencing expression of the viral gene. Similarly, the genetic machinery of cells is believed to utilize RNAi to control the expression of endogenous mRNA, thus adding a new layer of post-transcriptional regulation. RNAi can be exploited in the experimental settings to knock down target genes of interest with a high specific and relatively easy technology (see text for more details).*



---





**Figure 5.8. Methods of RNAi knockdown in mammalian cells.**

# miRNA i siRNA

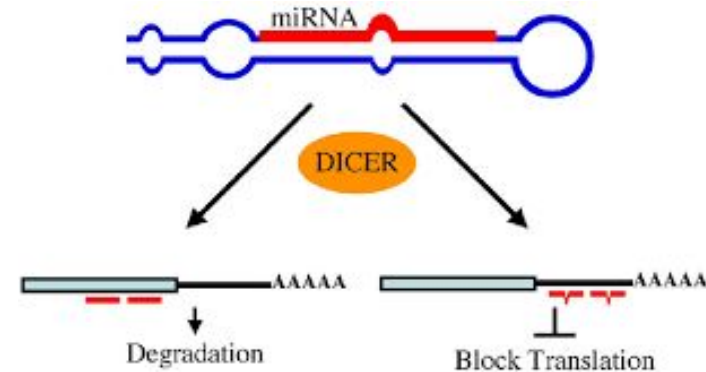
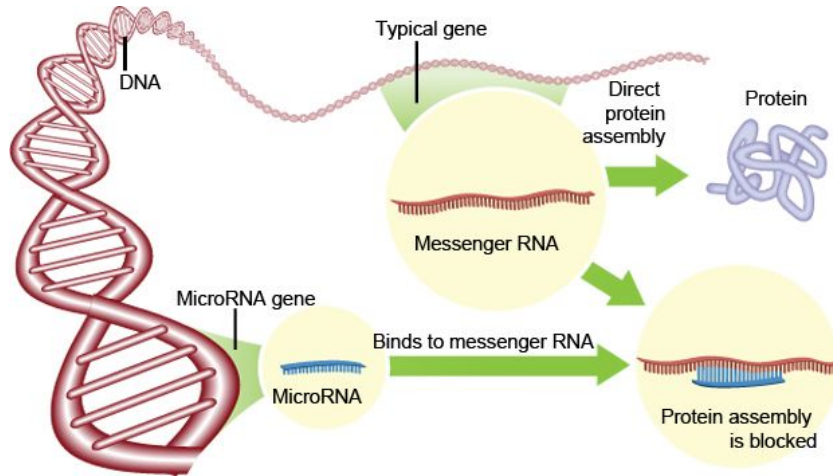
---  
Two types of small RNA molecules function in RNAi.

- MicroRNA (**miRNA**) molecules, on the other hand, are naturally occurring single-stranded RNAs 19–22 nucleotides long, which regulate gene expression by binding to the 3' untranslated regions (UTRs) of target mRNAs and inhibiting their translation (Ambros, 2004)
- Short interfering RNA (**siRNA**) molecules that target mRNA cleavage, effectively knocking down the expression of a gene of interest.

# miRNA

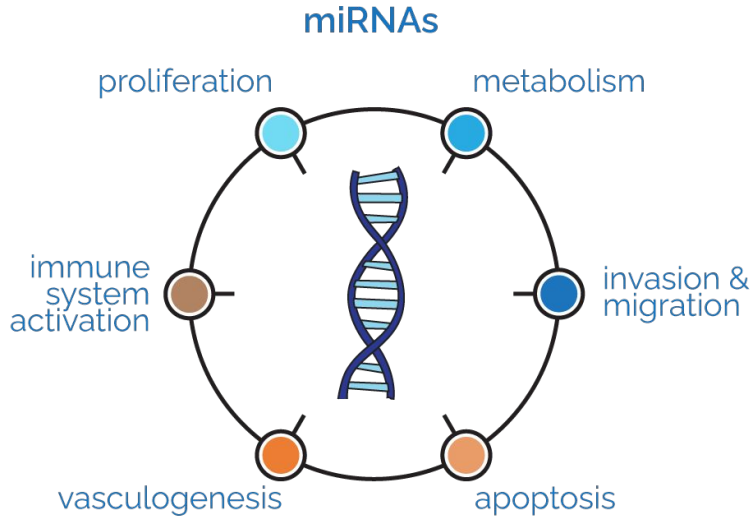
---  
Quan s'uneixen a un mRNA específic, en redueixen l'estabilitat i poden evitar la seva traducció a proteïna.

- Hi ha uns 500miRNA codificats en el genoma humà i poden regular un terç dels nostres gens



# A clinical-stage biotech company

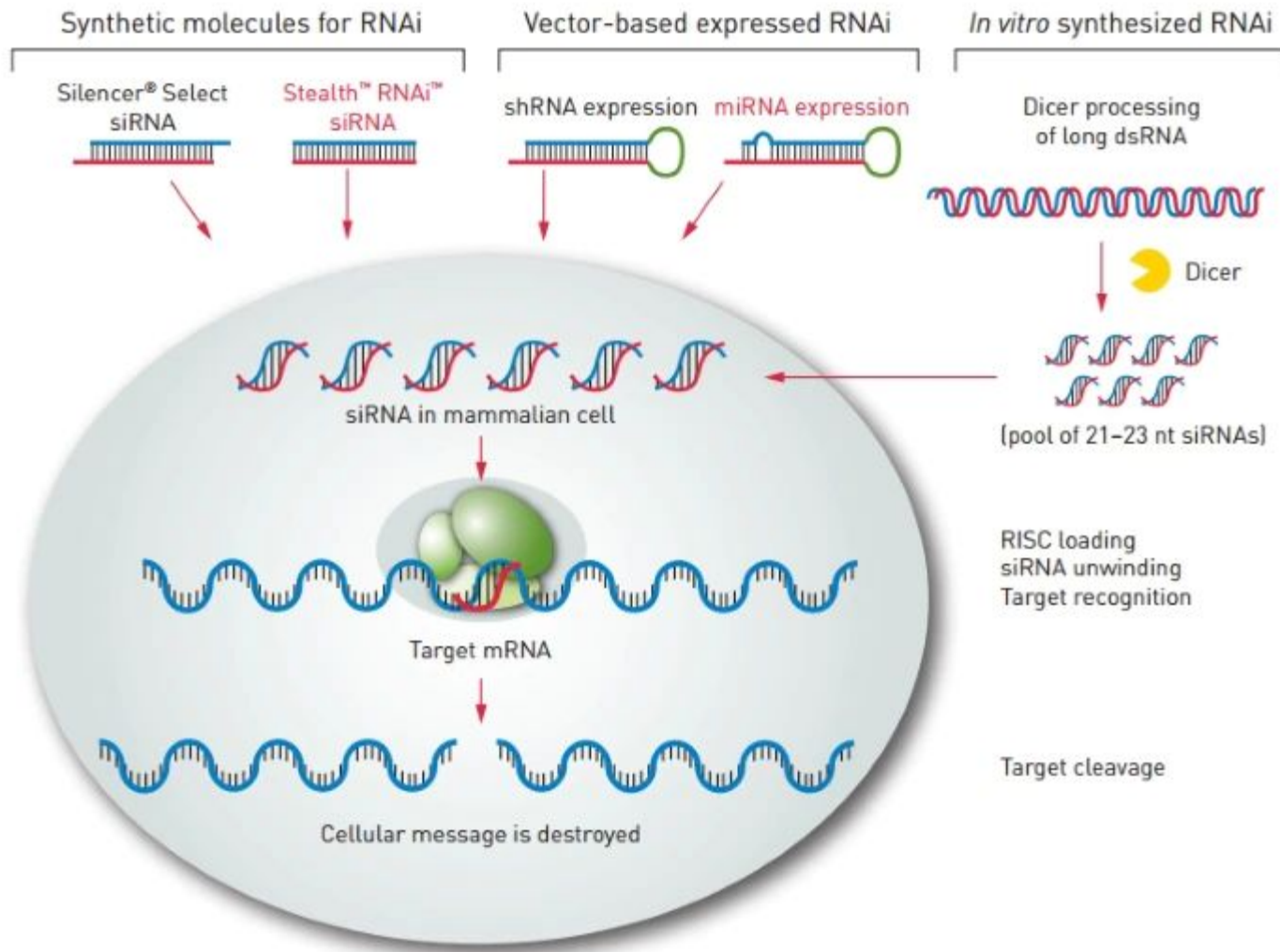
---



InterRNA Technologies is a clinical-stage biotech company developing a pipeline of proprietary RNA therapeutics targeting key processes in initiation and progression of human diseases, with a focus on cancer. Selected through its leading microRNA (miRNA) discovery and functional validation technology platform and enabled with a 3rd-generation drug delivery formulation, these miRNA compounds can mount a coordinated anti-cancer attack by engaging with multiple signal transduction targets simultaneously. With this approach, we address the high unmet medical need for novel therapeutics with improved efficacy and less prone to drug-acquired resistance that will benefit cancer patients.



# siRNA



**PROTOCOL**

	siRNA	miRNA
<b>Occurrence</b>	Occurs naturally in plants and lower animals. Whether or not they occur naturally in mammals is an unsettled question.	Occurs naturally in plants and animals.
<b>Configuration</b>	Double stranded	Single stranded
<b>Length</b>	21–22 nt	19–25 nt
<b>Complementarity to target mRNA</b>	100% perfect match; therefore, siRNAs knock down specific genes, with minor off-target exceptions.	Not exact; therefore, a single miRNA may target up to hundreds of mRNAs.
<b>Biogenesis</b>	Regulate the same genes that express them.	Expressed by genes whose purpose is to make miRNAs, but they regulate genes (mRNAs) other than the ones that expressed them.
<b>Action</b>	Cleave mRNA	Inhibit translation of mRNA
<b>Function</b>	Act as gene silencing guardians in plants and animals that do not have antibody- or cell-mediated immunity.	Regulators (inhibitors) of genes (mRNAs)
<b>Uses</b>	siRNAs are valuable laboratory tools used in nearly every molecular biology laboratory to knock down genes. Several siRNAs are in clinical trials as possible therapeutic agents.	Possible therapeutic uses either as drug targets or as drug agents themselves. Expression levels of miRNAs can be used as potential diagnostic and biomarker tools.

\* Table adapted from Mack, 2007.

# ARN vs ADN

- On es troben a les cèl·lules?
- Funcions?
- Quins proces/transformacions poden passar?



# Retrotranscripció (RT)

---

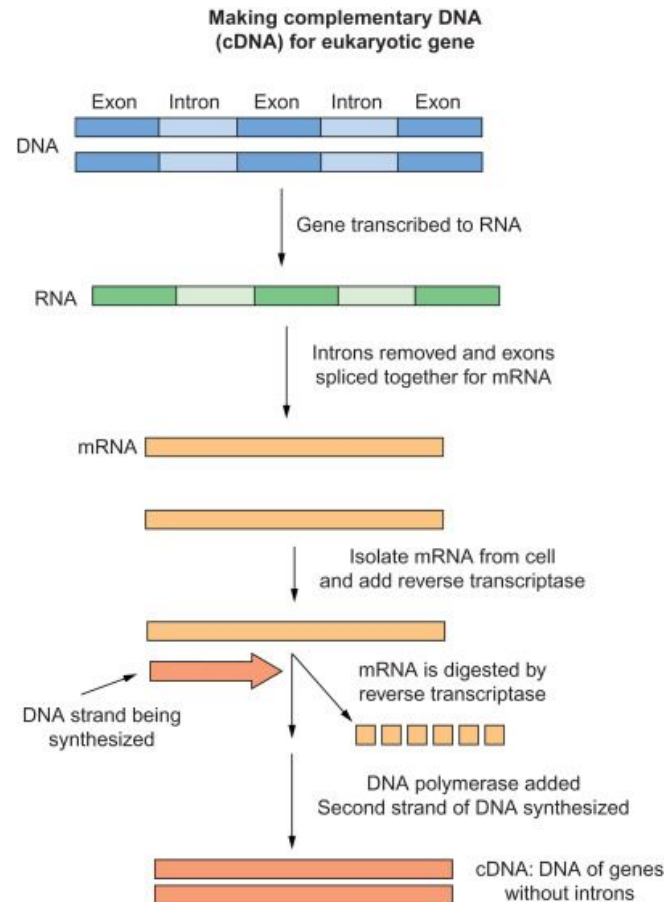
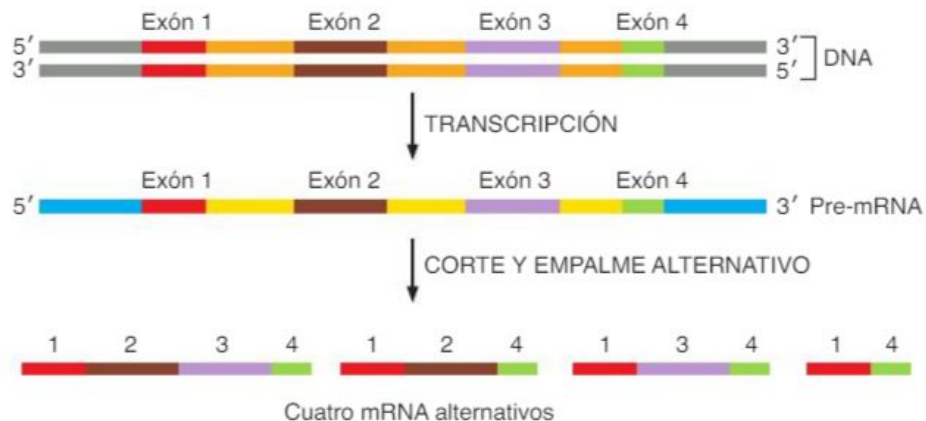
Procés on obtenim una còpia d'ADN a partir d'ARN.

L'enzim que catalitza aquesta reacció és la **transcriptasa inversa (RT)** i és pròpia dels retrovirus (VIH entre d'altres).

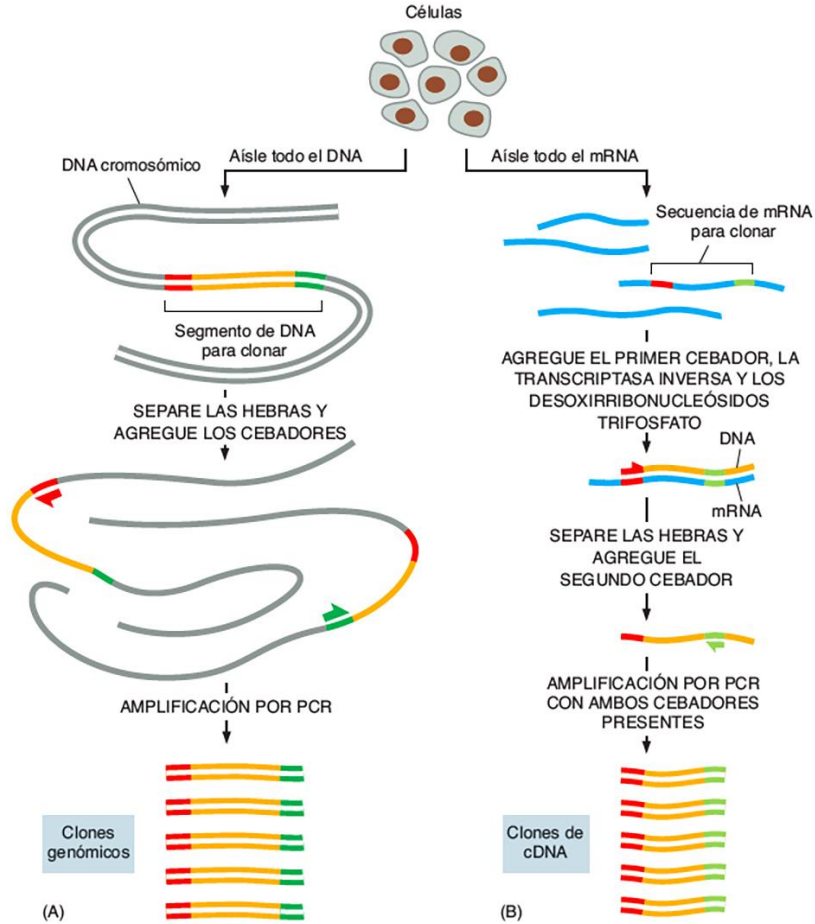
Amb els anys també podem fer la retrotranscripció al laboratori.



# dsDNA vs cDNA



-----



# Tècniques associades

Extracció

Purificació

Anàlisi

Seqüenciació

PCR

Microarrays



# Extracció DNA



— — —

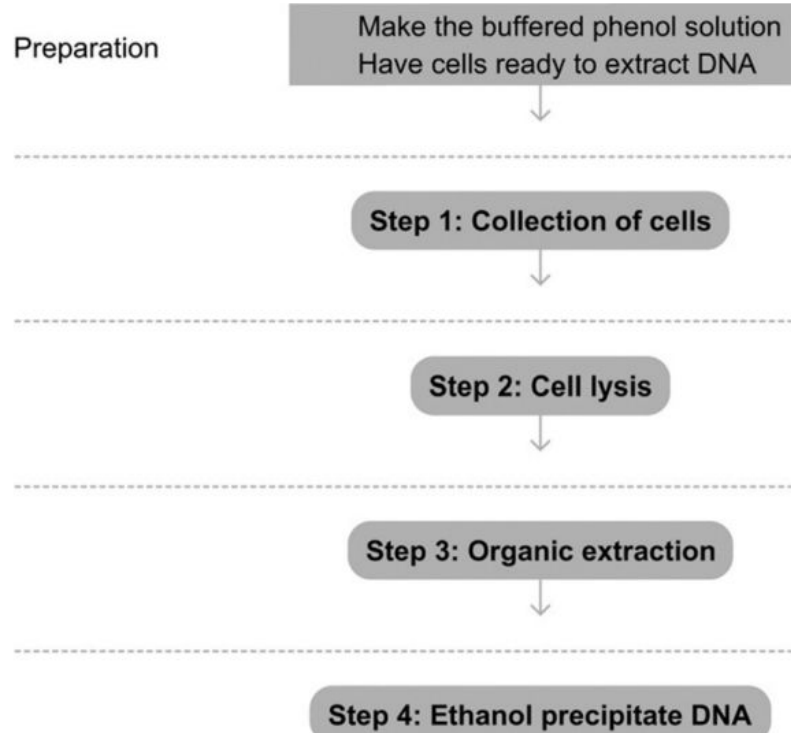
En l'actualitat, es disposa de múltiples metodologies d'extracció, la qual cosa permet que els biòlegs moleculars puguin seleccionar la tècnica que més s'ajusti a les seves necessitats. L'elecció del mètode d'extracció sol realitzar-se en funció dels següents criteris:

- Tipus d'àcid nucleic que s'extraurà: ADN de cadena senzilla (ADNss), DNAds, ARN total, ARN missatger (ARNm) o ARN ribosomal (ARNr).
- Organisme origen de l'àcid nucleic: mamífers, plantes, procariotes o virus.
- Font de l'àcid nucleic: cultiu cel·lular, teixit (generalment biòpsia), sang (leucòcits), expectoració, sèrum, orina, líquid cefalorraquidi, etcètera.
- Tècnica en què s'utilitzarà l'àcid nucleic extret: segons l'ús que vagi a tenir l'àcid nucleic els requeriments de rendiment, puresa i temps d'extracció variaran concorde a la metodologia que es vagi a aplicar, com a retrotranscripció, PCR, clonació, NorthernBlot, SouthernBlot, etc.

# Extracció DNA

---

1. Lisar cèl·lules per extreure el DNA
  - a. Acció mecànica (nitrogen líquid, turmix)
  - b. Degradació enzimàtica de la paret o membranes cel·lulars.
2. Degradar les proteïnes unides al DNA i proteïnes del citoplasma
3. Separar els components inorgànics amb dissolvents orgànics
  - a. Processos físics
  - b. Processos químics
4. Purificació per precipitació amb etanol - MiniPrep
5. Quantificació (espectofotometre)
6. Rentat, rehidratació i emmagatzemament



**Figure 13.1** Flowchart of the complete protocol, including preparation.

# Lisi citoplasmàtica - Buffer de Lisis

---

La presència de detergents, agents quelants de metalls divalents, i proteases estables com ara la **proteïnasa K** durant el procés d'aïllament, prevé qualsevol hidròlisi del DNA per nucleases cel·lulars i assegura l'aïllament de DNA intacte.

## **Proteïnasa K:**

Proteïnasa que té l'objectiu de purificar el DNA de possibles contaminants o inhibidors

---

La inactivació de nucleases intracel·lulars prevé la digestió enzimàtica dels àcids nucleics, permetent obtenir fragments llargs d'ADN i ARN.

La lisi cel·lular i aquesta inactivació es duu a terme, normalment al mateix temps, ja que la solució de lisi està composta de sals captròpiques (EDTA), que segresta els cations divalents, i per tant inactiva les ADNases.

# Buffers - Reactius

---

**Nuclei Lysis Buffer:** utilitzat per desestabilitzar la membrana nuclear, i per tant poder accedir al contingut del nucli.

**TE buffer:** té l'objectiu de solubilitzar el DNA mentre el protegim de ser degradat.

**TAE Buffer (Tris - acètic- EDTA):** utilitzat com a buffer pel gel d'agarosa. Permet mantenir les molècules de DNA amb una càrrega negativa uniforme i constant. És, per això, component del gel i del tampó d'electroforesi, o tampó de cubeta.

---

**Tris- HCl:** tampó per solucions

**Na<sub>2</sub>EDTA:** agent quelant que inhibeix les nucleases que degraden el DNA

**SDS:** detergent anionic utilitzat per desnaturalitzar proteïnes en hibridació, purificació d'àcids nucleics i sistemes de buffer d'electroforesi.

**Proteïnasa k:** degrada les proteïnes

**NaCl:** provoca la precipitació de DNA

# Salting Out

---

La principal característica d'aquesta metodologia és l'ús d'una solució concentrada de sals per a la lisis cel·lular i l'extracció de proteïnes, a diferència d'altres mètodes que utilitzen solvents orgànics.

L'addició d'una solució saturada de sals provoca l'agregació de proteïnes i **debris cel·lular**, la qual cosa permet la seva separació dels àcids nucleics.

Generalment, aquestes solucions es preparen a saturació amb NaCl. Una centrifugació posterior a l'addició de la solució concentrada de sals precipita el debris i les proteïnes, i deixa lliure l'ADN en el líquid del sobrenadant, que es traspasa a un nou tub per a la seva rentada i precipitat.



# Altres mètodes → Mètode Chomczynski

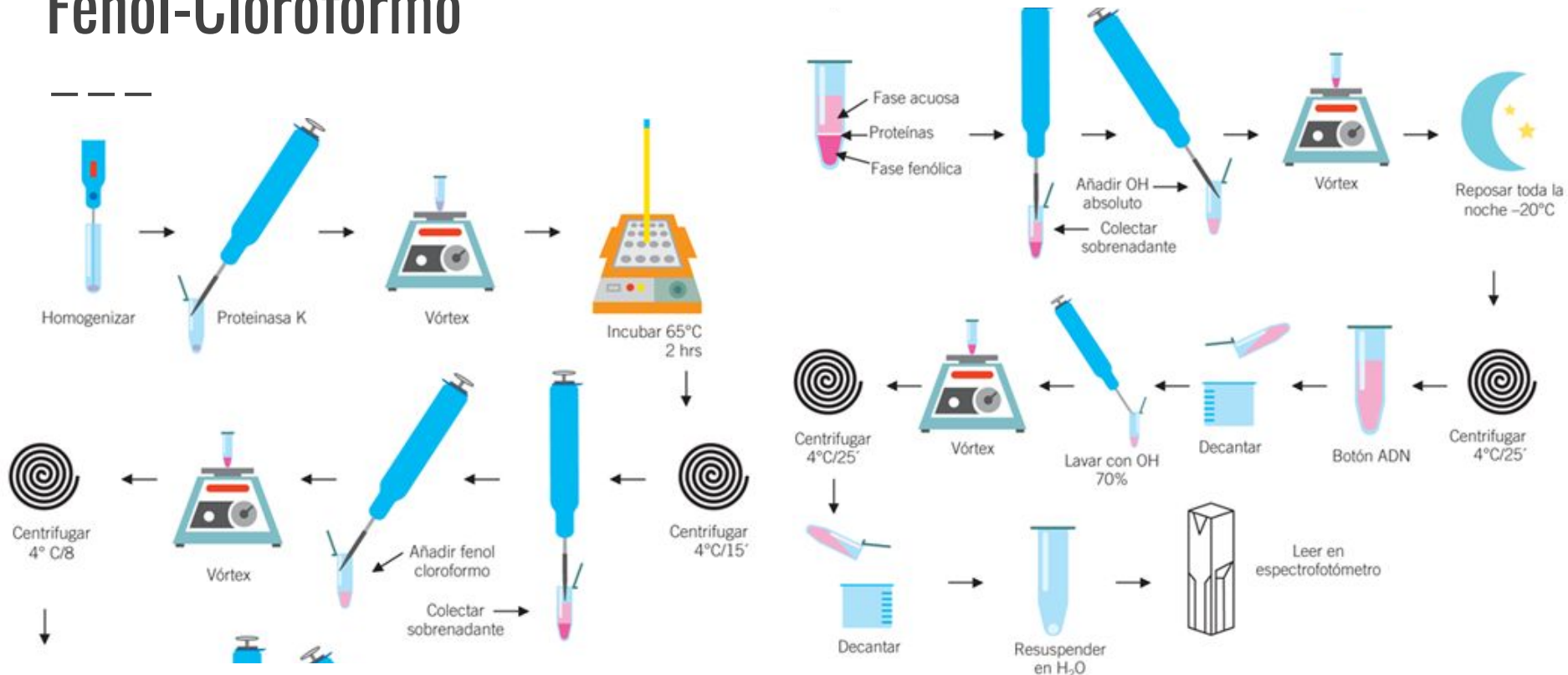
---

→ Extracció AN total

Fenol-cloroform (1:1), desproteïnitza i inhibeix les nucleases

Mètode ràpid, té menys etapes de manipulació. Per tant menor possibilitat de degradació del DNA.

# Fenol-Cloroformo



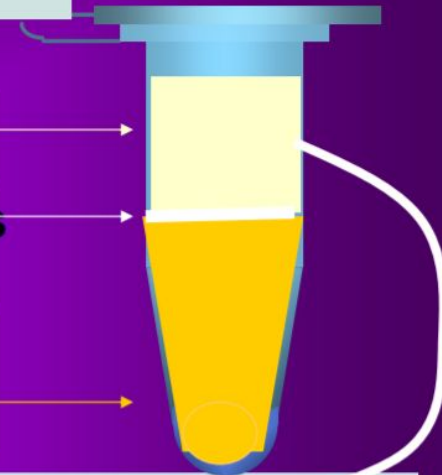
# Extracción Fenol-Cloroformo: ADN y/o ARN

MUESTRA + Fenol equilibrado:Cloroformo (1:1)  
desproteiniza e inhibe nucleasas

FASE ACUOSA: ácidos nucleicos

INTERFASE: proteínas desnaturalizadas  
carbohidratos contaminantes

FASE ORGANICA: lípidos de  
Membrana, inhibidores, contaminantes



CLOROFORMO-ALCOHOL ISOAMILICO (24:1)

(Clor.: elimina trazas de fenol y desnaturaliza nucleasas; Alcoh.Isoa.: reduce formación de espuma, facilita fases)

PRECIPITACION O.N. 2 o 3 vol ETANOL Y ALTA CONC. SALES

(NaOAc 3-1M, NaCl 5M, LiCl 2M) Opcional: ARNt o glicogeno o BSA

LAVAR CON ETANOL 70% para eliminar sales residuales y liofilizar

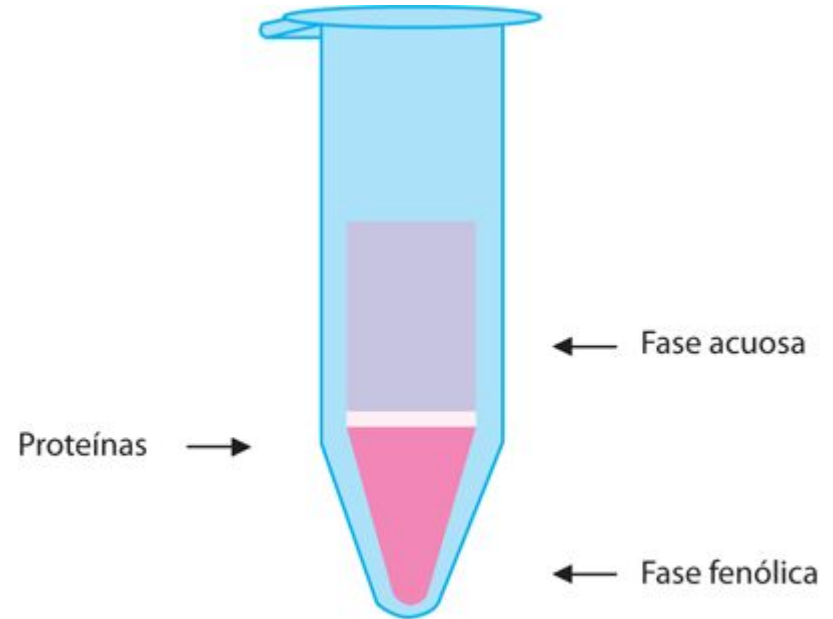
# Quines fases s'observen?

En l'extracció d'àcids nucleics que involucra solvents orgànics, una vegada que aquests últims són afegits es formen dues fases:

- La fase fenòlica, situada en la part inferior de tub, la qual conté proteïnes i lípids.
- La fase superior és l'aquosa, on se situa l'ADN o ARN, segons sigui el cas.

En la interfase es localitza un cúmul sòlid de proteïnes.

→ La separació de la fase aquosa sense tocar la fase fenòlica o la capa de proteïnes és un pas crític en el procés d'extracció de l'àcid nucleic que determina la puresa amb què s'aïlla, i per tant és determinant de l'índex 260/280 que s'obtingui.



Fuente: Adriana María Salazar Montes, Ana Soledad Sandoval Rodríguez, Juan Socorro Armendáriz Borunda: *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*, [www.accessmedicina.com](http://www.accessmedicina.com)  
Derechos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.

# Purificació DNA

# Purificació DNA

---

Separació lípids i proteïnes

Columnes purificació -

Sample



Cell lysis



Capture and cleaning  
of DNA



Elution of DNA



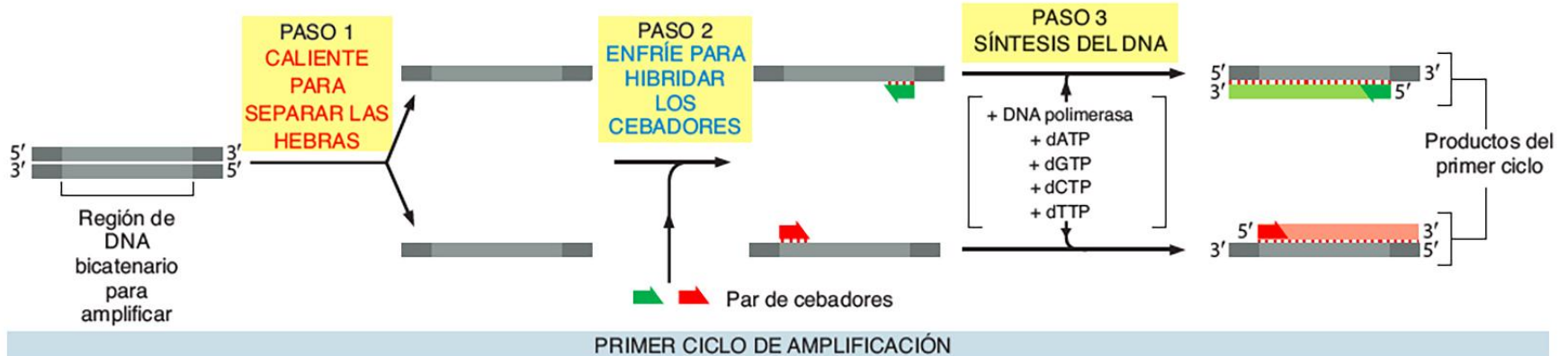
PCR

# PCR (Poly Chain Reaction)

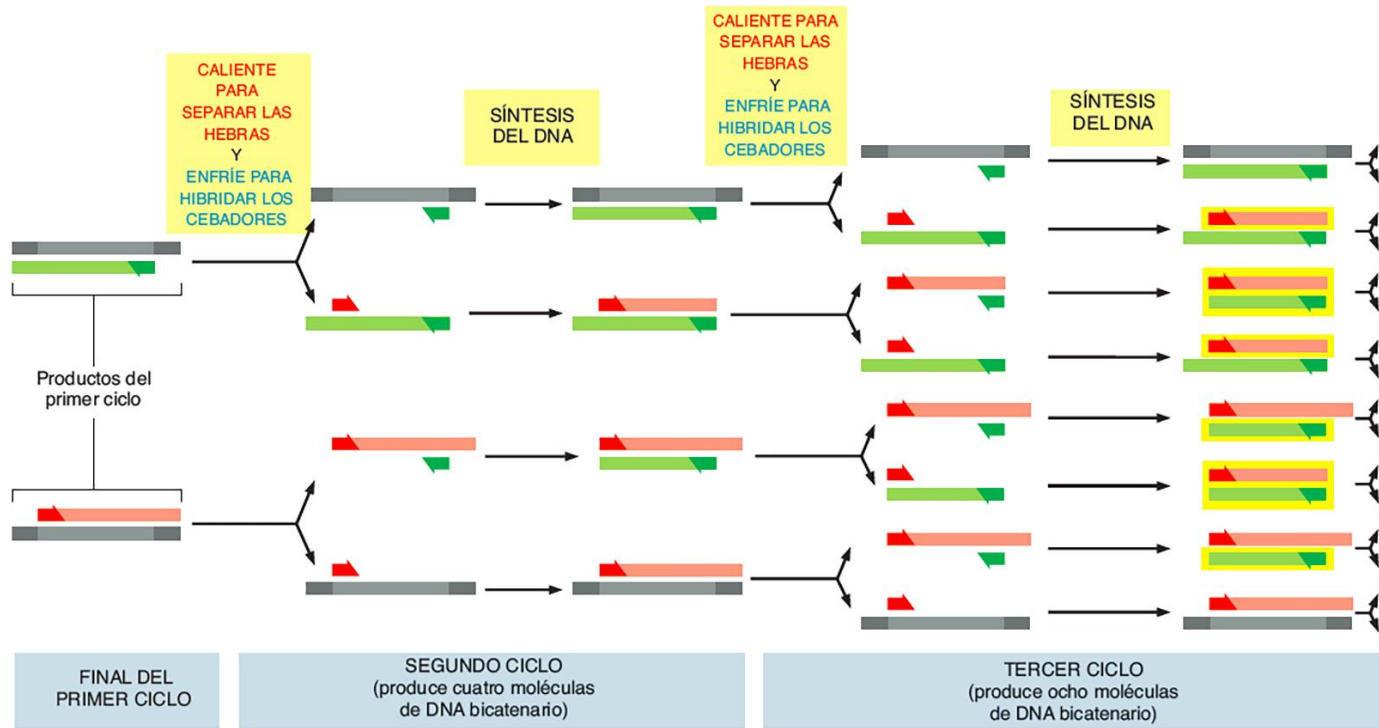
[Simulador PCR](#)

Fases:

- Desnaturalització
- Aliniament
- Extensió







# Tipus PCR

---

- RT-PCR
- qPCR
- *in situ*: S'utilitza per a poder detectar seqüències d'ADN a l'interior de les cèl·lules que no són detectables mitjançant altres tècniques.

# qPCR (o Real Time)

---

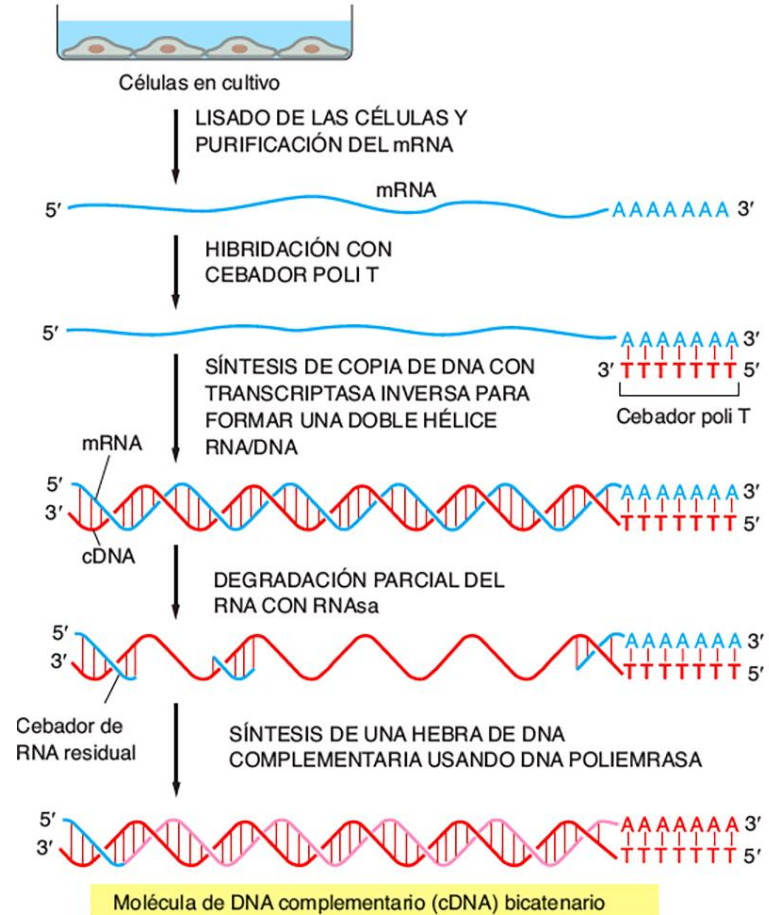
→ **Quantitativa:** ens permet amplificar i simultàniament quantificar de forma absoluta el producte de l'amplificació de l'ADN.

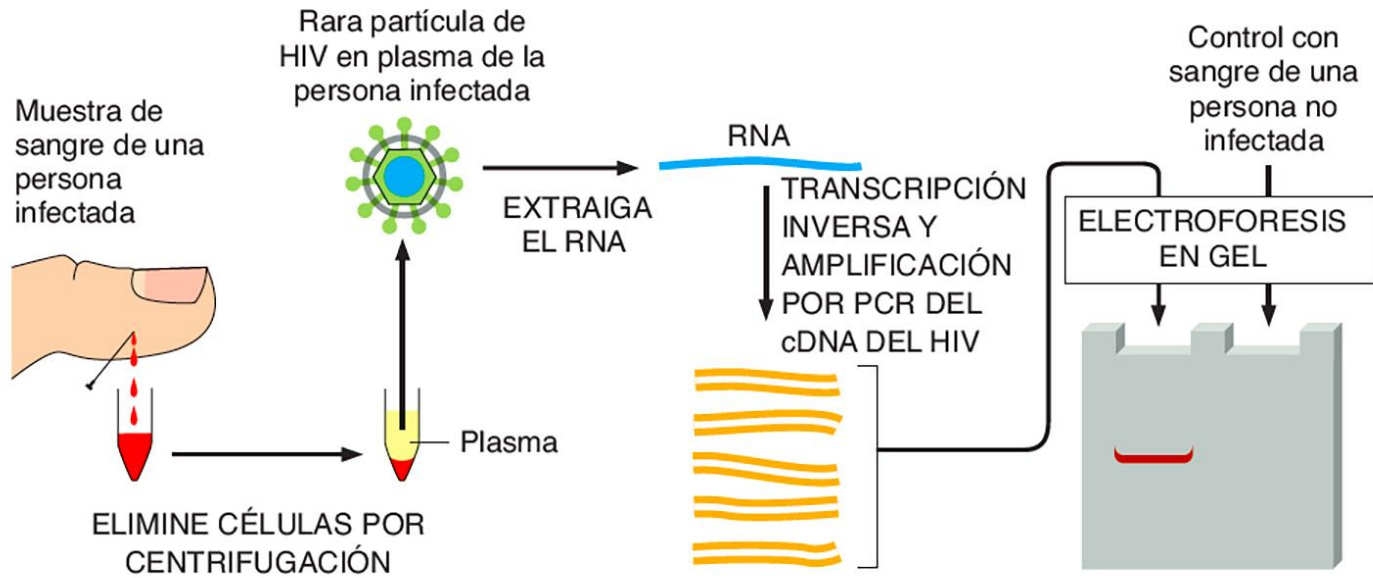
→ S'afegeix a la PCRmix una substància marcada amb un fluorofor que ens permet medir la taxa de generació d'un nou producte. → Termociclador amb sensors de fluorescència

Aplicacions: expressió gènica, identificació biomarcadors càncer, identificació SNP, anàlisi de variació de número de còpies

# RT-PCR

- — —
- Retrotranscriptasa
- Podem seqüenciar o analitzar el **cDNA**





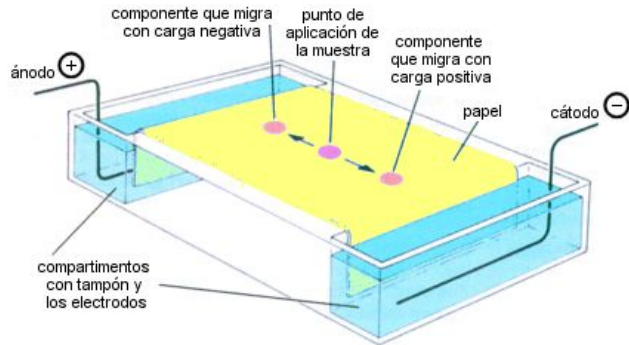
# Anàlisi

# Anàlisi DNA

---

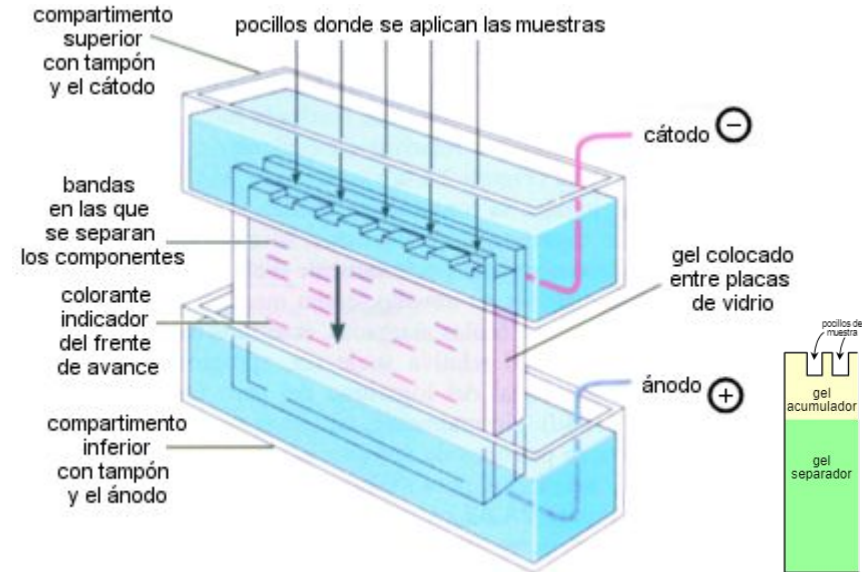
## Gels d'agarosa

- Proteïnes i àc. nucleics



## Gels de poliacrilamida

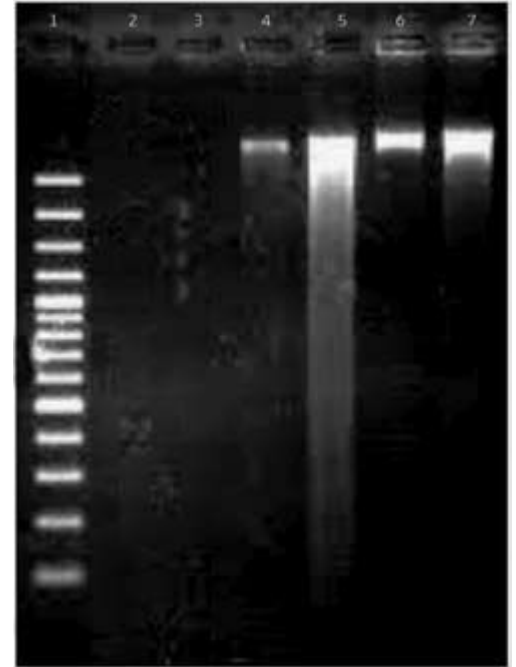
- Proteïnes i àc. nucleics de mida reduïda



-----

composición del gel		resolución conseguida: tamaño de DNA (kb)
% de acrilamida	% de agarosa	
20		0,006 - 0,10
15		0,025 - 0,15
12		0,04 - 0,2
8		0,06 - 0,4
5		0,08 - 0,5
3,5		1 - 2
	2	0,1 - 2
	1,5	0,2 - 3
	1,2	0,4 - 6
	0,9	0,5 - 7
	0,7	0,8 - 10
	0,6	1 - 20
	0,3	5 - 60

## Video E-Gel





# Electroforesi DNA

---

com van els cables?

Per què les hebres es mouen?

## Loading Buffer

**Glicerol** per a aportar densitat a la mostra i facilitar la seva aplicació als pouets.

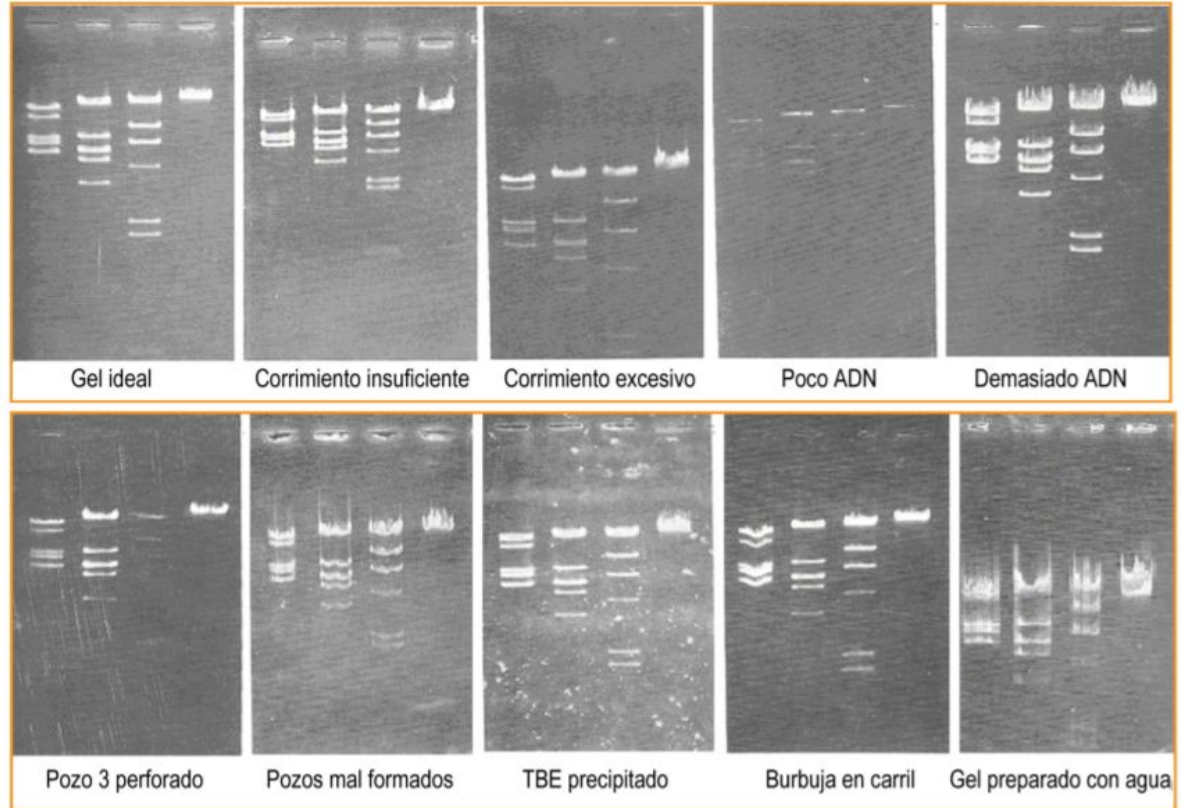
**Blau de bromofenol** (o un altre colorant com el xilencianol) com a marcador del front d'avanç de l'electroforesi. Així mateix, el seu color és una ajuda visual durant la càrrega de mostra en els pouets.

Tampó per a estabilitzar el pH i, per tant, la càrrega de les molècules.

# ELECTROFORESIS

---

Possible errors →



# Identificació amb sondes (probes)

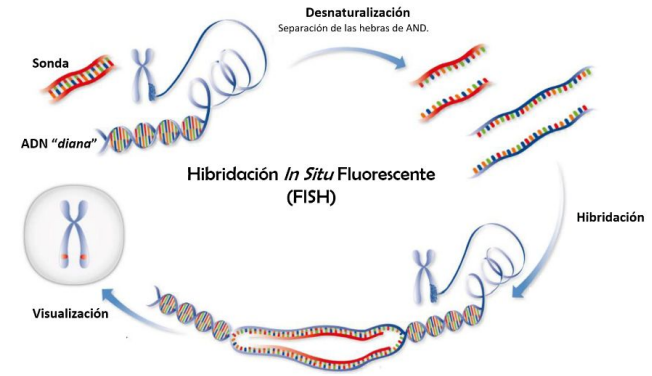
→ El nostre objectiu és identificar homologia entre seqüències.

Poden ser de:

- DNA (clon de llibreria o producte de PCR) - 1-100kb
- RNA (clonació amb vectors) - 1000 nt
- Oligonucleòtids (síntesi química) - 15-50 nt

Tipus:

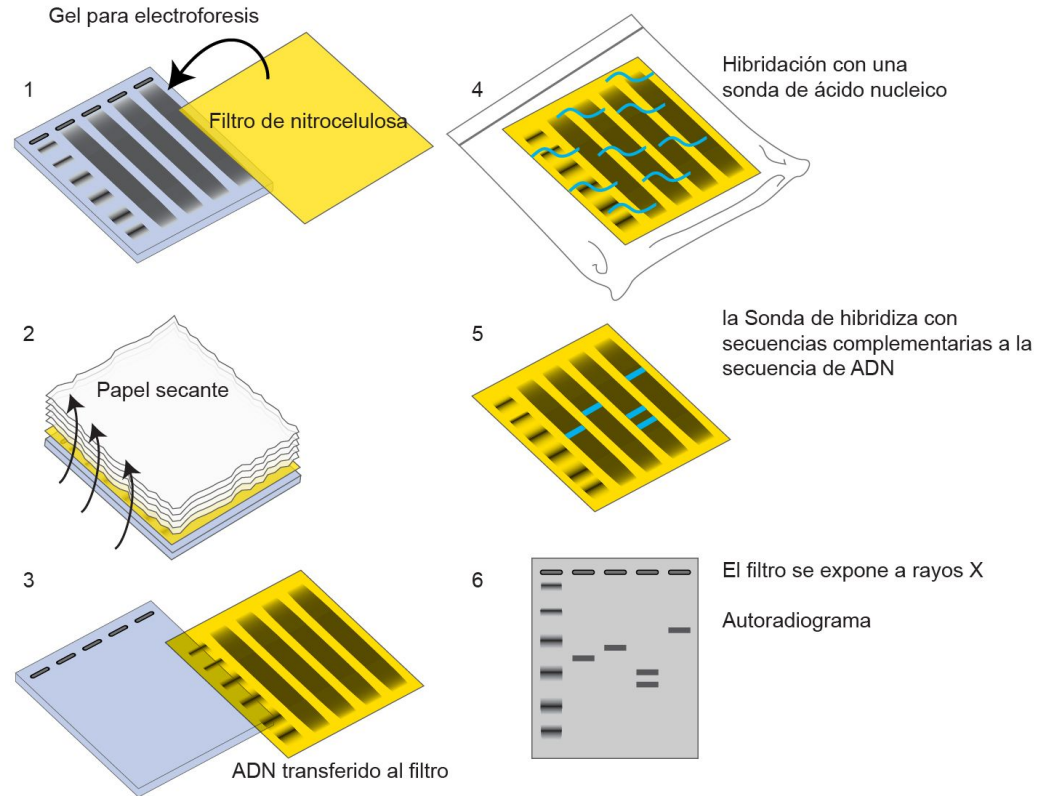
- a) Homòlogues
- b) Parcialment semblant: buscar gen homòleg en espècies semblants
- c) Sintètiques: té l'objectiu de trobar el cDNA d'una seqüència peptídica



# Southern Blot

→ Anàlisi molècules d'ADN, mitjançant sondes marcades

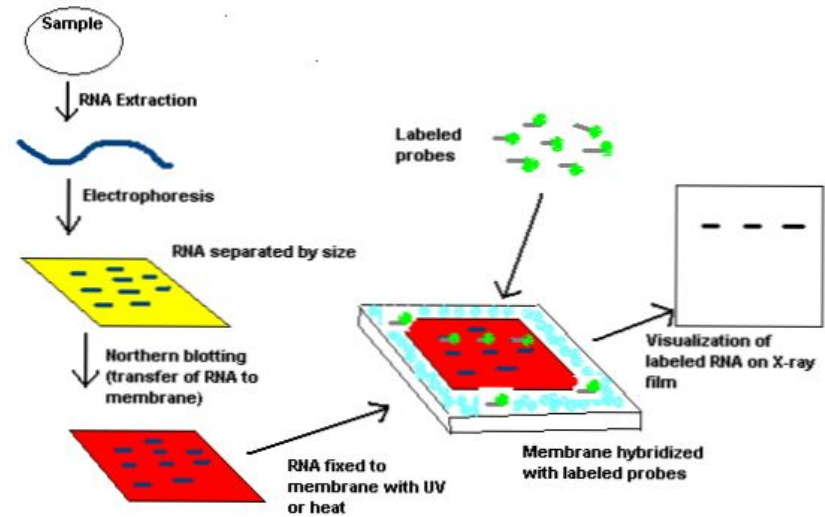
Detectar seq DNA en una mostra de sang o teixit



# Northern Blot

---

→ Detecció seq d'ARN, utilitzant una sonda marcada



Exercicis electroforesi

# ESPECTROFOTOMETRÍA

Tècnica que serveix per quantificar la concentració d'àcids nucleics (ADN o ARN)

Mesura la absorbància de la llum a una longitud d'ona específica

Permet calcular la concentració

Permet valorar la qualitat del ADN



# Càlculs quantitat

---

Màxim d'absorció DNA a 260nm → ens permet calcular la quantitat de DNA

$$[\text{DNA}] = \text{Ce} \times A \times b \times \text{FD}$$

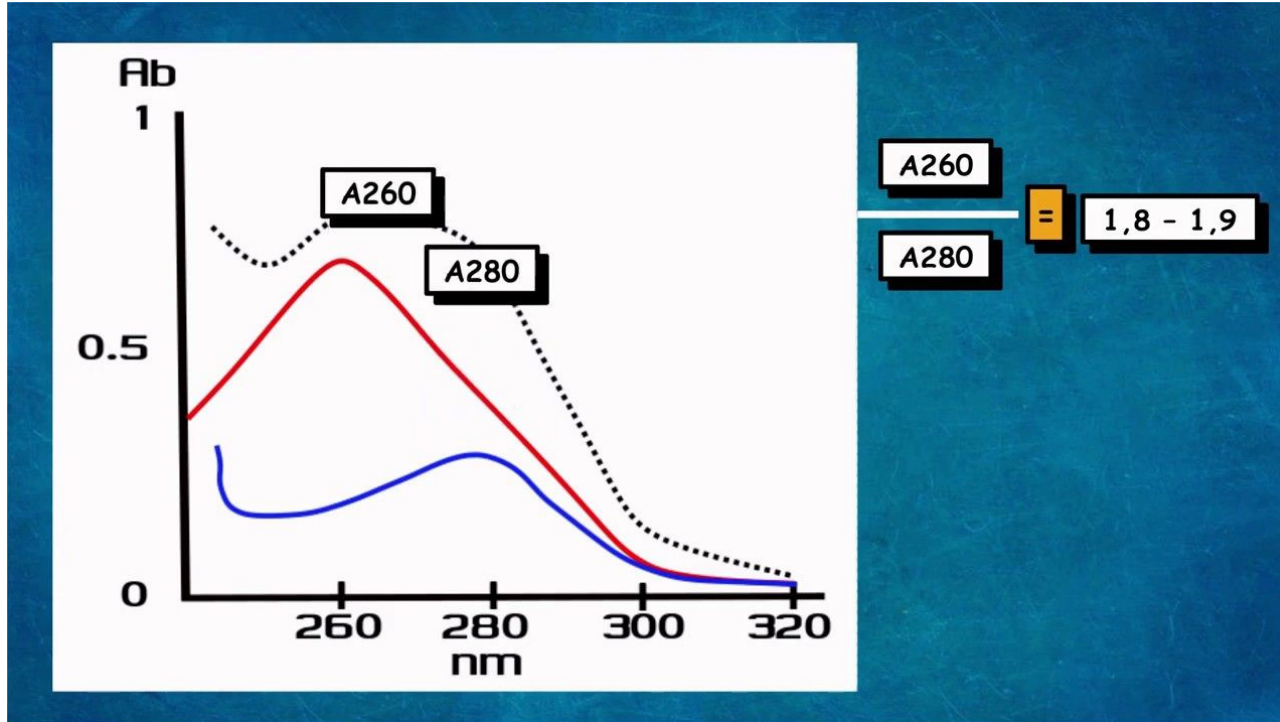
**Ce (coeficient extinció)=**

- DNA =  $50\mu\text{g}/\text{mL} \times \text{cm}^{-1}$
- RNA =  $40\mu\text{g}/\text{mL} \times \text{cm}^{-1}$

**A (absorbància de la mostra)=** (A mostra - Ablanc)

**b (longitud del pas òptic)=** 1cm

# Estabilitat DNA i qualitat DNA



Per a ser una molècula molt gran, l'ADN és molt estable i pot durar molt de temps si es manté en condicions fredes, seques i fosques.

L'estructura en doble hèlix és la que fa que les molècules d'ADN no es desnaturalitzi. Guardarem el DNA dissolt en aigua a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Aquesta propietat ha permès extreure i analitzar ADN recollit d'espècies que es van extingir fa milers d'anys.

## EXERCICIS 1

Leer "Cuantificación de ácidos nucleicos mediante diferentes técnicas"



# Pràctica anàlisi DNA extret

---

0. Encendre espectrofotòmetre (20min abans)
1. Preparar dilució microcuveta **quarz (UV)**
2. Calibrar BLANC
3. Lectura espectrofotòmetre
  - a. Barrido 260-280
  - b. obtenció resultats
4. Anàlisi

# Resultats anàlisi DNA

	Qualitat				Quantitat			
	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
Pollastre	0,97	1,07	1,37	1,08	350ug/mL	350 ug/mL 100ug/mL	240ug/mL	135ug/mL
Pebrot		1,03	<b>1,8</b>	0,93		4125 ug/mL	9ug/mL	280ug/mL
Saliva	1		1,16	5	50ug/mL		175ug/mL	6,25 ug/mL

Què observem?  
 - Quantitat?  
 - Qualitat?

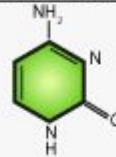
$260/280 =$  {

- <1,8 - proteïnes
- 1,8-1,9 - DNA pur
- 1,9 - 2 - RNA
- >2 - nucleotids lliures (cont.)

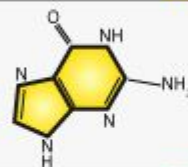
Anàlisi

# Extracció RNA

**CYTOSINE** **C**



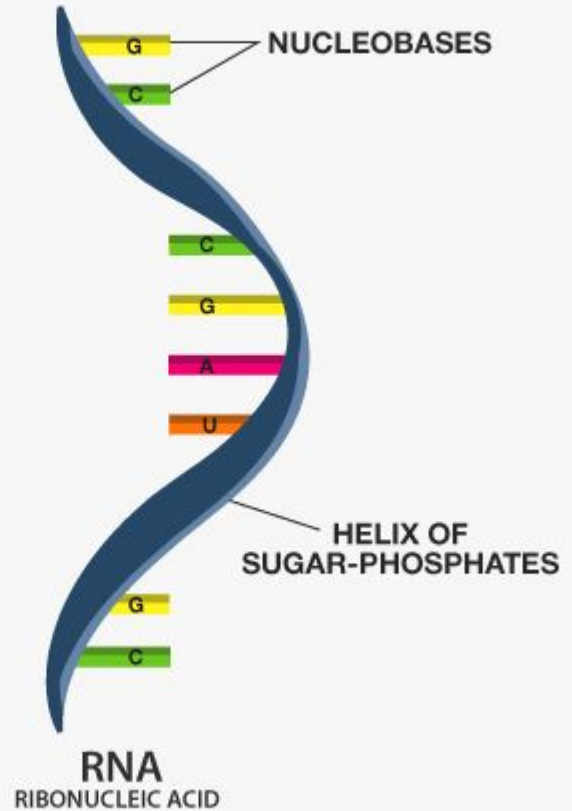
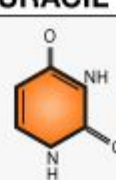
**GUANINE** **G**



**ADENINE** **A**



**URACIL** **U**



# Objectius

---

- Estudis d'expressió gènica (anàlisi dels nivells de ARNm)
- RT-PCR
- Diagnòstic de malalties ocasionades per virus d'ARN
- Anàlisis d'expressió de gens o validar la clonació de l'ADN complementari (ADNc) en un vector.

En realitzar l'extracció d'ARN de cèl·lules eucariotes existeixen dues possibilitats: extracció d'**ARN total** (ARNm, ARNr i ARNt) i extracció exclusiva de ARNm. Es pot utilitzar el mètode d'aïllament per metol-cloroform o utilitzant columnes de cromatografia.

# Extracció mitjançant columnes

---

1. Les cèl·lules o teixits es disgreguen en una solució per a lissar les cèl·lules i inactivar les ribonucleasas endògenes.
2. El lisat cel·lular es dilueix amb una solució alcohòlica i es col·loca en una columna de resines d'intercanvi aniònic. La resina són de naturalesa sílica amb superfície hidrofílica amb grandària de partícula reduït, fetes amb quantitats elevades de grups dietil-amino-etil (DEAE).
3. La purificació es basa en la interacció d'aquests grups DEAE carregats positivament amb els grups fosfats (carregats negativament) de l'ARN.
4. Les proteïnes i altres contaminants són retirats amb rentades. El pH i la concentració de sals de les solucions amortidores usades en cada pas controlen la unió de l'ARN a la columna i l'elució de l'àcid nucleic.
5. L'ARN unit a la columna s'elueix amb solucions iòniques aquoses.

El procés és ràpid, encara que la quantitat d'ARN sol ser limitada, però la qualitat és major que amb el mètode fenol-cloroform.

# Què hem de tenir en compte?

---

El RNA és molt **làbil**, i per tant en el moment de l'extracció hem d'evitar la seva degradació per les ribonucleases de la pròpia cèl·lula.

També s'ha vigilar la presència d'ARNases exògenes, presents en reactius utilitzats per l'extracció de DNA. Es recomana utilitzar pipetes i puntes exclusives per aquest procediment.

## Etales generals:

- 1) Disrupció de les cèl·lules o del teixit
- 2) Inactivació de l'activitat de la ribonucleasa (RNasa) endògena
- 3) Desnaturalització dels complexos nucleoproteics
- 4) Eliminació d'ADN i proteïnes contaminants.

<b>Diferències</b>	<b>ARN</b>	<b>ADN</b>
Temperatura de solució fenol/cloroform	Estrictamente 4°C	Preferentment a 4°C
pH	5-6	8,2
Us d'inhibidors d'ARNses	Tiocianat de guanidina	N/A
Aigua lliure de ARNsas	DEPC 0.1%	N/A
Proteinasa K	N/A	N/A
Homogeneizador	Eléctric	Manual





---

Consisteix en ser capaços d'escriure la seqüència de nt que formen l'ADN. Ens permet obtenir informació sobre:

- mutacions puntuals (SNPs)
- Aberracions cromosòmiques
- diagnòstic
- ADNc

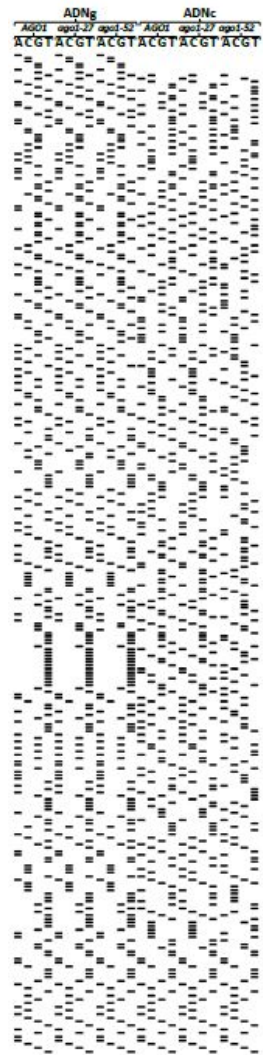
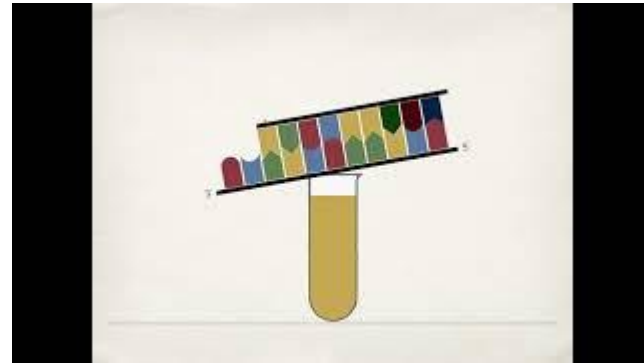
Existeixen diferents tècniques algunes de les quals han anat desapareixent, gràcies a les noves tecnologies.

# Seqüenciació de Sanger

---

El DNA es copia moltes vegades i es talla en fragments de diferents mides. Es realitza una PCR amb nt fluorescents definal de cadena que permet la determinació de la seqüència.

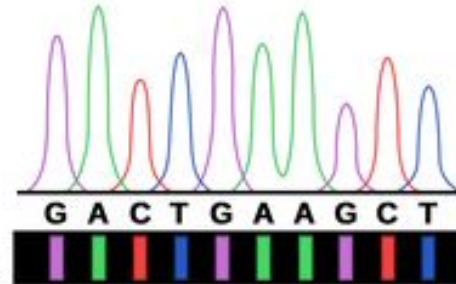
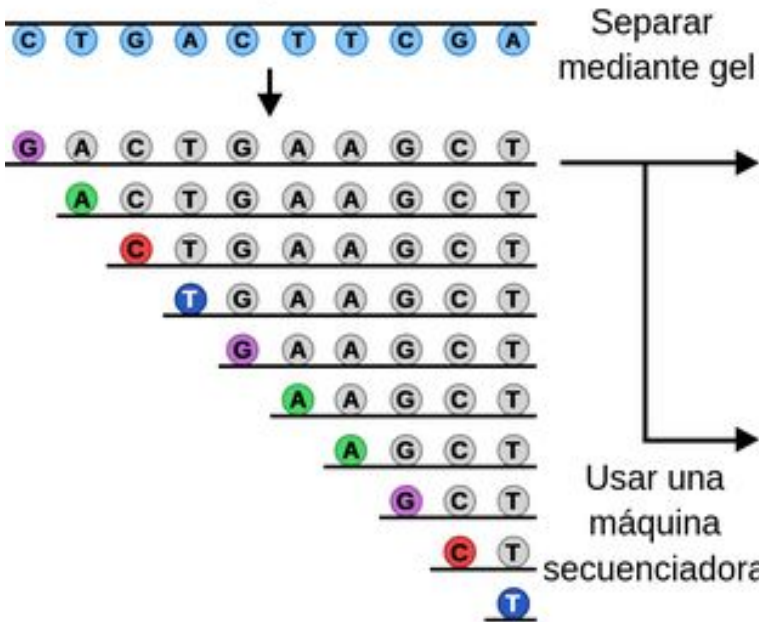
Aquesta és la metodologia que es va seguir al Projecte Genoma Humà (2003). Acctualment i ha mètodes que permeten la seqüenciació de manera més ràpida, però aquesta tècnica es segueix utilitzant per fragments petits.



## ddNTP marcados con fluorescencia

**T**      **A**      **G**      **C**  
ddTTP   ddATP   ddGTP   ddCTP

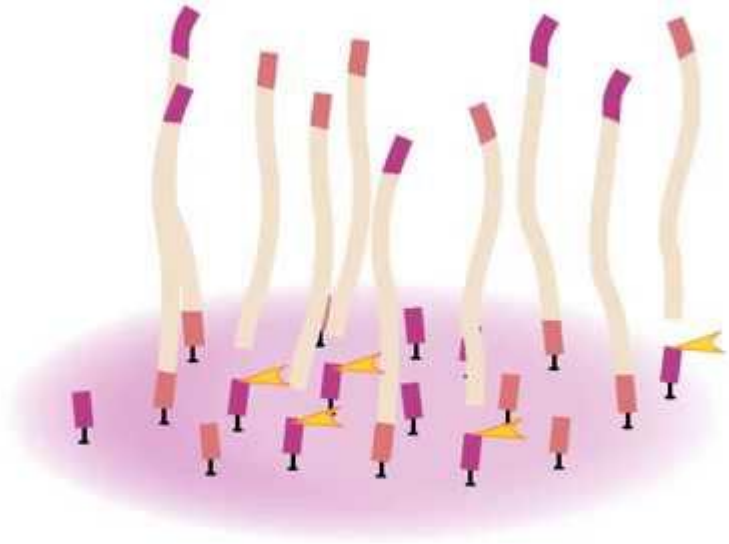
↓ ADN molde



Inicialment s'utilitzaven gels d'agarosa, després es va passar a capillars i la detecció amb laser.

# NGS (Next Generation Sequencing)

---

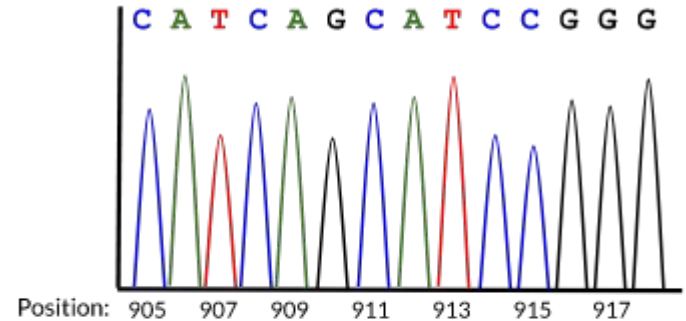


Seqüenciació paral·lela de diverses cadenes al mateix temps.

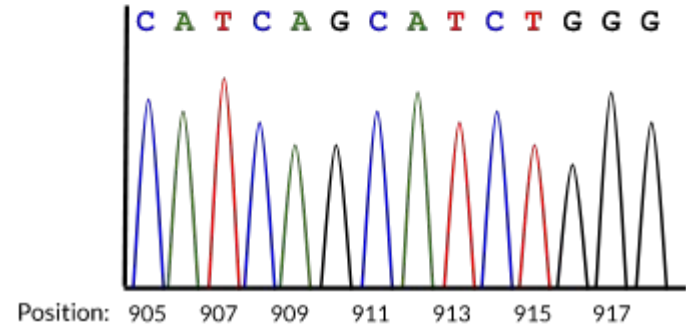
Es desenvolupen en un xip, són ràpides i té baix cost.

---  
Quina informació podem extreure  
d'aquesta imatge respecte al gen *OCA2*?

Human 1:



Human 2:



# Visita al PCB

Centro Nacional de Análisis  
Genómico (CNAG-CRG)