

Anexo: METODOLOGÍA GENERAL

Extracción de DNA plasmídico (Miniprep)

Se utilizó el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), que se trata de un sistema de extracción del DNA plasmídico rápido y sencillo cuyo protocolo sigue los siguientes pasos:

- Lisis celular: el precipitado celular se resuspendió en 250 μ l de la Solución de Resuspensión Celular y se transfirió la suspensión celular a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, donde se le añadieron 250 μ l de la Solución de Lisis Celular. La solución se mezcló invirtiendo el tubo 4 veces y se incubó 5 min a temperatura ambiente.
- Inactivación de endonucleasas: Se añadió 10 μ l de la Solución de Proteasa Alcalina a la mezcla, que se volvió a invertir 4 veces y se incubó 5 min a temperatura ambiente.
- Renaturalización de DNA y precipitación de impurezas: se le añadió 350 μ l de Solución de neutralización, se mezcló por inversión y se centrifugó a máxima velocidad durante 10 min a temperatura ambiente con la centrífuga Eppendor Centrifuge 5415.
- Unión de DNA plasmídico a la columna: las columnas se colocaron en tubos colectores de 2 ml y se decantó el lisado celular neutralizado para centrifugarlo 1 min a máxima velocidad a temperatura ambiente. Se descartó el eluido, pues el ADN plasmídico queda retenido en la columna.
- Lavado: se añadió 750 μ l de Solución de Lavado con etanol a las columnas y se centrifugó a máxima velocidad, 1 min a temperatura ambiente. Se realizó un segundo lavado con 250 μ l en las mismas condiciones, descartándose los eluidos y centrifugándose las columnas de nuevo 2 min a máxima velocidad a temperatura ambiente.
- Elución: finalmente el ADN plasmídico se eluyó por centrifugación, cambiando previamente el tubo Eppendorf donde se recogió el eluido, tras añadir 50 μ l de agua libre de proteasas y centrifugar 2 min a máxima velocidad.

El producto de la extracción se cuantificó midiendo la absorbancia del mismo a 260 nm con el Nanodrop 1000.

Electroforesis en gel de agarosa

Se realizaron electroforesis en geles de agarosa para separar ácidos nucleicos, sometidos a una corriente eléctrica, en función de su tamaño. Las moléculas de DNA más grandes migran menos en el gel y las moléculas de menor tamaño migran más rápido y por tanto avanza más en el gel. El tamaño de los poros que forman un gel de agarosa depende de la concentración de agarosa en el gel, y ésta es seleccionada de manera que sea adecuada para separar las moléculas de DNA de interés en la muestra. En este trabajo he utilizado geles de agarosa al 1%, que permiten separar ácidos nucleicos.

La agarosa para preparar estos geles se preparó disolviendo 1 g de agarosa (Condalab) en 100 ml de tampón TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA), calentando la disolución hasta el punto de ebullición para así permitir la obtención de una disolución homogénea. Tras dejar atemperar esta solución, se vertió en un soporte adecuado en presencia de un peine

que tras la solidificación del gel, dio lugar a la formación de los pocillos donde se cargan las muestras.

Las muestras se prepararon añadiendo 1 μ l de tampón de carga (30% glicerol, 0.25% azul Bromofenol, 0.25% xylene cyanole FF) por cada 5 μ l de muestra. Se utilizó como marcador de peso molecular O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). La electroforesis se llevó a cabo en TAE 1X, durante 25 minutos a 100 V. El gel se tiñó posteriormente 10 min en solución GelRed 3x (Biotium), una solución fluorescente para teñir ácidos nucleicos, y las bandas se visualizaron con el transluminador ULTima 16si-Plus (ISOGEN Life Science).

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las proteínas se separaron electroforéticamente en función de su masa molecular, usando geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). El SDS es un detergente aniónico que provoca la desnaturalización de las proteínas y les confiere una carga negativa casi uniforme, por tanto, cuanto más larga la cadena polipeptídica, más moléculas de SDS se unirán a ella, proporcionando una relación masa/carga uniforme para todas las proteínas. Por tanto, podemos asumir que la migración de las proteínas en el gel está directamente relacionada con el tamaño de la proteína desplegada. La concentración de poliacrilamida utilizada para realizar el gel depende del tamaño de la proteína que se desea separar. En mi caso, dado que he trabajado con la OTC humana, cuyo tamaño es de aproximadamente 37 kDa, he utilizado geles de poliacrilamida al 12%.

Los geles de poliacrilamida se prepararon incluyendo una fracción de apilamiento (*stacking*), en la que la muestra se concentra favoreciendo que las distintas proteínas entren a la vez en la segunda fracción, propiamente resolutive, en la que las proteínas se separan en función de su tamaño. Estas fracciones del gel, se prepararon tal y como se indica en la tabla A1:

Tabla A1. Preparación de las soluciones de poliacrilamida usadas en SDS-PAGE.

	Separador	Concentrador
Acrilamida/Bisacrilamida 37.5: 1 (40%)	1.5 ml	0.23 ml
H ₂ O	2.2 ml	1.5 ml
Separador 4%/ Concentrador 4%	1.25 ml	0.5 ml
APS 10%	56 μ l	14 μ l
TEMED	2.5 μ l	2.5 μ l

Las muestras se prepararon añadiendo 5 μ l de tampón de carga Laemmli 5x (312.5 mM Tris HCl pH 6.8, 2.2 M β -mercaptoetanol, 10% SDS, 43.8% glicerol y 0.02% azul de bromofenol) por cada 25 μ l de volumen final de muestra. Previamente a cargar las muestras en el gel, éstas se hirvieron durante 5 min, para desnaturalizar las proteínas y favorecer la unión del SDS. Se utilizó el marcador de masa molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder (3 μ l). La electroforesis se llevó a cabo a 200 V durante 50 min a 200 V utilizando el sistema mini-Protean de BioRad. Los geles se tiñeron con una solución Coomassie Blue (10 % v/v ácido acético; 35% v/v etanol; 0.1 g/100 mL Brilliant Blue R250) durante 10 min. El ácido acético de esta solución permite la fijación de las proteínas mientras que el Brilliant Blue que se une de

manera inespecífica a las mismas. Tras la tinción, el gel se destiñó en solución de desteñir (10% de ácido acético glacial ;10% de etanol) durante un tiempo variable. Tiempos cortos (unos 15 minutos) me permitieron identificar si OTC estaba en la fracción soluble o insoluble del sonicado centrifugado, o qué reacciones de la purificación contenían OTC, pero fueron necesarios tiempos más largos (de aproximadamente 2 horas), para poder desteñir suficientemente el gel como para determinar la pureza de OTC en las distintas muestras.

Cuantificación de la concentración de proteína por el método Bradford

El método Bradford (Bradford, 1976) es una técnica colorimétrica que permite la cuantificación de la concentración de proteínas por la reacción de los grupos aniónicos del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 con los grupos amino de las proteínas. Para llevar a cabo esta técnica, utilicé el reactivo Bradford de la casa comercial BioRad (Bio-Rad Bradford Protein Assays), que es adquirido como una solución 5x, que ha de ser diluida 5 veces en agua previamente a cada ensayo. En cada ensayo se realizó una recta patrón, utilizando Albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Se prepararon 7 tubos con cantidades variables de BSA (entre 0 y 7 µg). También se prepararon tantos tubos como fue necesario a partir de las muestras a cuantificar. A cada uno de los tubos se le añadió 1 ml de reactivo Bradford 1x. Los tubos se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente, tras los cuales se midió la absorbancia a 595 nm en cubetas de plástico de 1 ml, usando para ello un espectrofotómetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech). Los valores de Absorbancia respecto a µg de proteína obtenidos para los tubos de BSA, se utilizaron para interpolar las absorbancias obtenidas en los tubos muestra, cuantificando así los µg de proteína en los mismos, y la concentración de proteína en las muestras correspondientes.

Preparación de glicerizados

De todos los cultivos de células transformados a partir de las construcciones preparadas en este trabajo, se prepararon glicerizados, que fueron almacenados a -80 °C. Para ello, 1 mL de cultivo crecido hasta saturación se suplementó con glicerol a concentración final de 25%. El glicerol es un crioprotector que disminuye el impacto que tiene la formación de cristales sobre la integridad de las células a tan baja temperatura. Estos glicerizados se han utilizado como reservorio de las construcciones realizadas a lo largo de todo el trabajo, y para inocular los cultivos utilizados en los ensayos de expresión de OTC recombinante en sus distintas formas.