

# Enginyeria Genètica

Participa en la recerca contra l'aterosclerosi



Taller d'experimentació  
PROTOCOL



**Xplore**  
Health

[www.xplorehealth.eu](http://www.xplorehealth.eu)



## Buscant una diana per al tractament de l'aterosclerosi

### Introducció

La recerca biomèdica engloba l'estudi dels processos físics i químics que tenen lloc dins dels éssers vius, així com d'aquells processos que desencadenen les malalties. Un dels principals objectius d'aquest camp de recerca és identificar dianes terapèutiques, és a dir, parts del cos on es poden adreçar nous tractaments que estimulin respostes i que ajudin a combatre les malalties.

Aquest protocol s'emmarca en una línia de recerca biomèdica que està centrada en l'estudi d'una possible diana terapèutica que podria ser reconeguda per un fàrmac contra l'aterosclerosi.

### Com es produeix l'aterosclerosi?

L'**aterosclerosi** és un trastorn vascular causat per l'acumulació de greixos a les parets dels vasos sanguinis, que pot donar lloc a manifestacions molt diverses i de gravetat variable segons quina sigui la localització dels vasos afectats i el grau d'evolució del trastorn. En la nostra societat, el consum d'aliments amb un alt contingut de greixos saturats ha incrementat considerablement els riscos de patir malalties cardiovasculars. Aquest excés de greix en el nostre organisme pot dipositar-se i acumular-se en certs punts de les parets de les artèries en forma de plaques, anomenades plaques d'ateroma, que obstrueixen el flux sanguini.



-----> **Artèria normal**



-----> **Aterosclerosi mitjana**

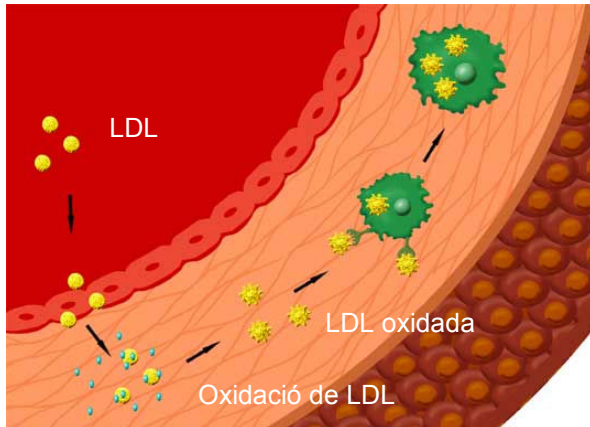


-----> **Aterosclerosi severa**



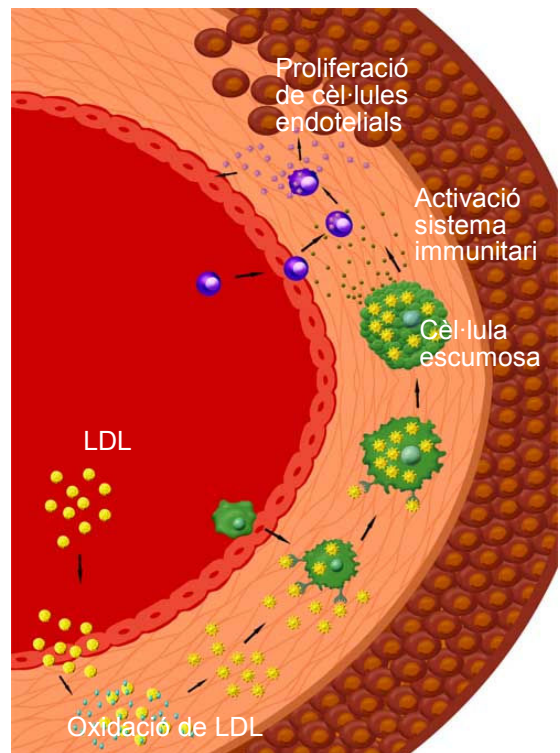
### El colesterol i els macròfags

Una de les substàncies lipídiques que conformen les plaques d'ateroma és el colesterol. Per evitar que el colesterol es dipositi a les parets, el nostre organisme té un sistema de "neteja", els **macròfags**, que són cèl·lules que circulen per la sang i que tenen la capacitat de recollir les molècules de colesterol nociu, conegudes com a LDL (*Low-density-lipoprotein*).



Els macròfags les reconeixen gràcies a un receptor que tenen a la membrana. Aquest sistema de neteja és eficient si l'excés de colesterol no és gaire gran.

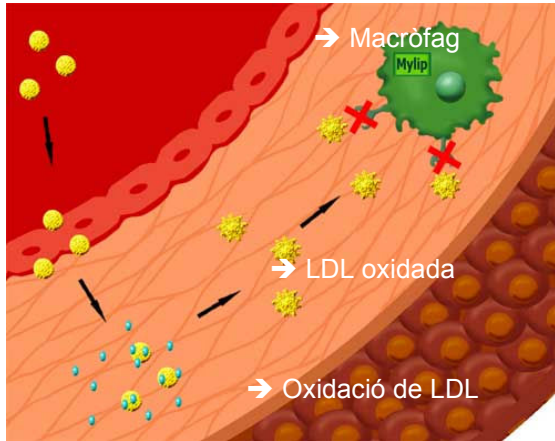
Si les quantitats de colesterol són molt abundants, els macròfags continuen recollint LDL, però, un cop n'han engolit grans quantitats, es transformen en unes cèl·lules anomenades "escumoses". Aquestes produeixen unes substàncies que indueixen la inflamació i la proliferació de cèl·lules de la paret arterial (endotelials), i que amb la formació de la placa d'ateroma acabaran bloquejant la circulació sanguínia.



Actualment, nombrosos grups de recerca d'arreu del món, entre els quals hi ha el Grup de Recerca de Receptors Nuclears de la Universitat de Barcelona, tenen com a objectiu entendre millor com els macròfags participen en la regulació dels nivells de colesterol i en el desenvolupament de l'aterosclerosi. Més específicament, els científics estan estudiant el paper d'una proteïna que tenen els macròfags anomenada MYLIP. És una proteïna que té com a funció principal degradar el receptor que els macròfags tenen a la membrana i que els permet reconèixer les LDL. Els científics han vist que si es produeix aquesta proteïna en una quantitat massa abundant, la ingestió de colesterol per part dels



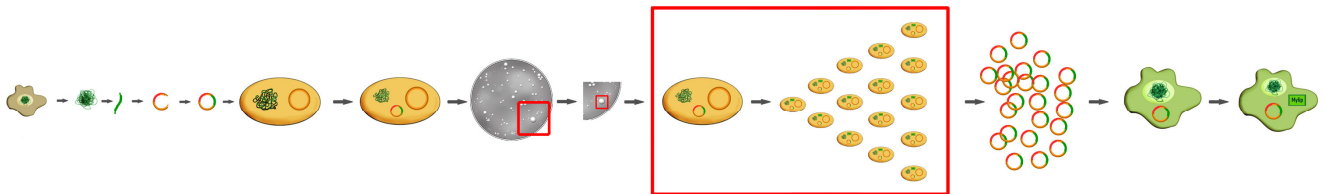
macròfags disminueix. No obstant això, encara es desconeix amb exactitud el paper que juguen en el context de l'aterosclerosi.



Atès que s'ha vist que la proteïna MYLIP està relacionada amb la regulació del colesterol nociu, els científics estimen que en aquest procés de regulació hi podria haver una nova diana per al tractament de l'aterosclerosi.

**Com podem estudiar la proteïna MYLIP involucrada en la regulació del colesterol?**

Per poder estudiar aquesta possible diana terapèutica, els investigadors necessiten produir-ne al laboratori en grans quantitats. Per fer-ho, utilitzen una tècnica d'enginyeria genètica anomenada transformació bacteriana, amb la qual transfereixen ADN d'un organisme a un bacteri, perquè aquest produeixi grans quantitats d'ADN que posteriorment introdueixen en altres tipus de cèl·lules perquè produeixin la diana terapèutica d'estudi.



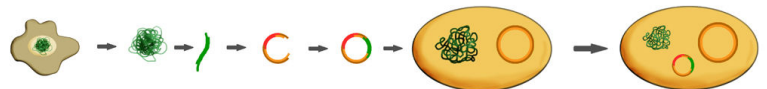
Per fer-ho parteixen d'una forma purificada del gen que produeix la proteïna MYLIP, la uneixen a un fragment d'ADN circular anomenat plasmidi, i la insereixen dins de bacteris perquè produeixin rèpliques del material genètic.

En aquest protocol us convidem a fer de biotecnòlegs i a dur a terme una transformació bacteriana!

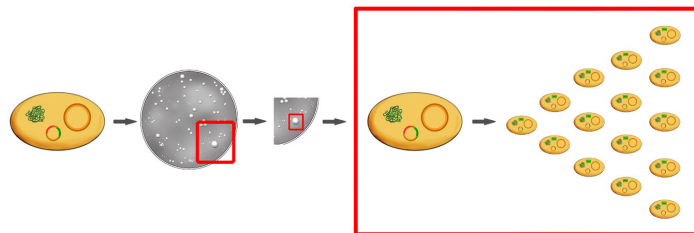


**Organització del taller:**

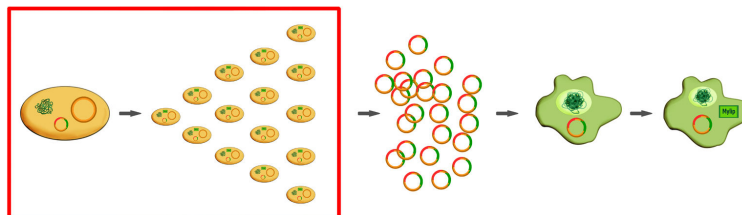
1. Durem a terme una transformació de bacteris perquè incorporin l'ADN responsable de produir la proteïna MYLIP, i perquè actuïn com a bioreactors i ens fabriquin el material genètic en grans quantitats.



2. Farem créixer el cultiu de bacteris en un medi adequat que ens permeti seleccionar aquells que hagin incorporat el gen.



3. Purificarem el material genètic que conté el gen responsable de produir la proteïna MYLIP perquè pugui ser introduït en altres tipus de cèl·lules que produiran la proteïna (\*).



(\* ) Atès que el creixement de bacteris requereix un dia i mig de temps, la purificació es durà a terme partint d'un cultiu de bacteris transformats que els monitors ja hauran preparat prèviament



**Equipament i materials necessaris per a cada grup/taula**

<p>2 tubets amb bacteris en gel retolats amb els núms. 1 i 2. (A) Caixa porexpan + gel</p>	<p>1 tub en gel amb l'ADN circular anomenat plasmidi pCR2.1-MYLIP. (B)</p>	<p>1 tub amb medi de creixement bacterià "LB" (C)</p>	<p>Micropipeta de 20 µl i de 200 µl</p>
<p>Puntes per a les micropipetes de 20 i 200 µl</p>	<p>Puntes per a les micropipetes de 20 i 200 µl</p>	<p>2 Plaques de petri amb agar i antibiòtic (D) Ampicil·lina</p>	<p>Nanses de plàstic</p>
<p>Bany líquid amb aigua destil·lada</p>	<p>Flotador per a tubets Cronòmetre</p>	<p>Recipient de residus sòlids</p>	<p>Recipients de residus líquids</p>
<p>Cinta adhesiva Retolador indeleble</p>	<p>1 tub amb 1 ml de cultiu bacterià (E)</p>	<p>1 tub amb "Solució 1" de miniprep (F)</p>	<p>1 tub amb "Solució 2" de miniprep (G)</p>
<p>1 tub amb "Solució 3" de miniprep (H)</p>	<p>1 tub amb "Cloropan" (I)</p>	<p>1 tub amb "Etanol"</p>	<p>1 tub amb aigua ultrapura (milliQ).</p>



#### CONTINGUTS DELS TUBS

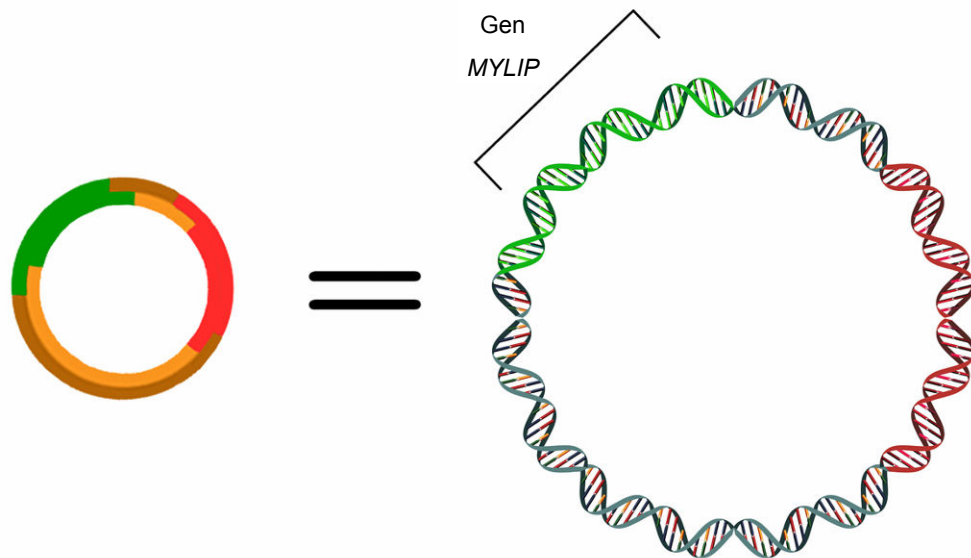
- (A) Bacteris que permeten l'entrada d'ADN (anomenats competents XL1-blue)
- (B) ADN circular anomenat plasmidi (pCR2.1)
- (C) Medi de cultiu LB (Luria-Bertani): Extracte de llevat 5 g/l, triptona 10 g/l, NaCl 5 g/l. Esterilitzeu en autoclau. Emmagatzemeu en fred.
- (D) Plaques LB/ampicil·lina: Medi de cultiu LB, Agar 1,6%, ampicil·lina 100 µg/ml.
- (E) Bacteris cultivats en medi 2XYT, O.N. (16 h)
- (F) Solució 1: 50 mM glucosa / 25 mM TrisHCl pH 8.0 / 10 mM EDTA / Diluir en H<sub>2</sub>O destil·lada.
- (G) Solució 2: 20 µl de detergent SDS (dodecilsulfat sòdic) 10% / 4 µl NaOH 10N / 176 µl d'H<sub>2</sub>O mQ/ per cada mostra. Prepareu per duplicat el dia de la pràctica.
- (H) Solució miniprep 3: 73,60 g d'acetat de potassi / 28,75 ml d'àcid acètic / Diluir en H<sub>2</sub>O mQ fins a un volum final de 250 ml.
- (I) Cloropan: 25 ml de fenol equilibrat / 24 ml de cloroform / 1 ml d'alcohol isoamfílic. Centrifugueu 10 min a 3.000 rpm.



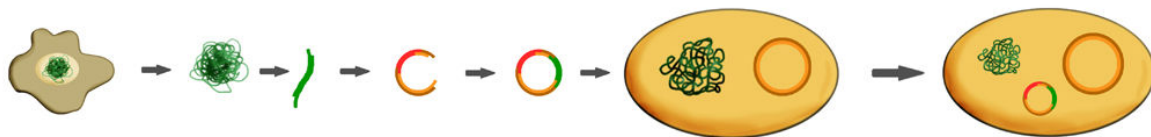
## Procediments

### 1- TRANSFORMACIÓ BACTERIANA

Una transformació bacteriana és un procés biotecnològic mitjançant el qual els científics introdueixen el material genètic responsable de produir una proteïna que estan investigant dins d'una cèl·lula bacteriana. Aquesta actuarà com a bioreactor i produirà còpies d'aquest material genètic, que es podrà introduir posteriorment a un altre tipus de cèl·lula perquè produeixi la proteïna d'interès.<sup>(\*)</sup> En aquest taller partim del gen purificat de la nostra proteïna "MYLIP", que ha estat introduït en un plasmidi o fragment d'ADN circular.



A partir d'aquest material genètic realitzarem una transformació bacteriana, és a dir, introduïrem el gen responsable de produir la nostra proteïna dins del bacteri mitjançant un xoc tèrmic, sotmetent la mostra a diferents temperatures.



*(\*) En casos en què la proteïna d'interès no sigui gaire complexa, els mateixos bacteris transformats poden actuar ja com a bioreactors per produir la proteïna.*



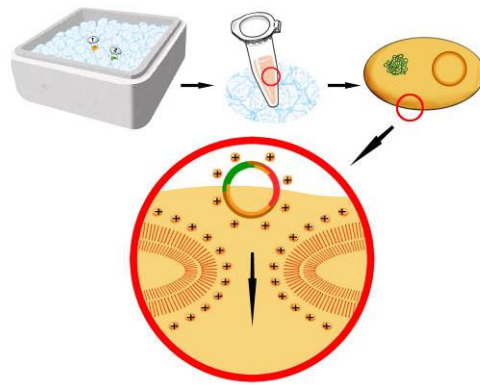


## Protocol per a la transformació bacteriana

1. Tenim dos tubs amb els bacteris en gel. Cada tub conté una solució tampó que facilitarà la transformació gràcies als cations  $\text{Ca}^{2+}$  de la sal  $\text{CaCl}_2$  que conté el tampó.

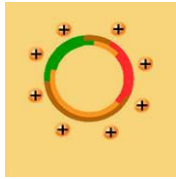


**Què passa?** Els cations  $\text{Ca}^{2+}$ , en fred, preparen les membranes cel·lulars perquè siguin permeables a l'ADN. Els ions  $\text{Ca}^{2+}$  s'uneixen als fosfolípids de la membrana cel·lular, protegint-ne les càrregues negatives i formant petits porus a la membrana del bacteri.



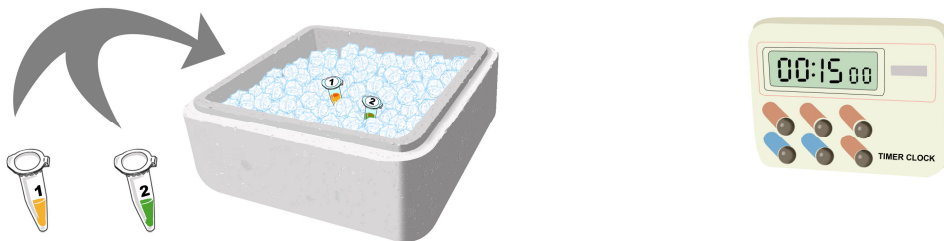
2. **Afegeix l'ADN en forma de plasmidi als bacteris:** utilitzant la micropipeta de 20  $\mu\text{l}$  pipetegeu **10  $\mu\text{l}$**  de plasmidi (tub P) i afegeix-los al tub 2 on hi teníeu els bacteris. Tapeu el tub i barregeu suaument donant-li copets amb el dit. El tub 1 serà el control on hi haurà els bacteris sense el plasmidi.





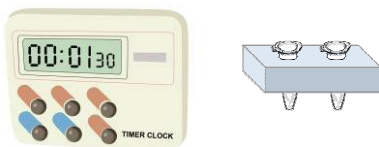
**Què passa?** Els ions  $\text{Ca}^{2+}$  també interactuen amb els grups fosfats amb càrrega negativa de l'ADN i això permet que es pugui apropar a la membrana dels bacteris, sense repulsions degudes a les càrregues elèctriques.

**3. Deixeu reposar els tubs 1 i 2 en gel durant 15 minuts**

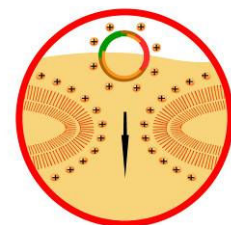


*\*Mentrestant, aprofita aquest temps per anar duent a terme el primer pas del protocol de "Creixement dels bacteris transformats" (pàg. 12).*

**4. Passats els 15 minuts, poseu els tubs 1 i 2 en el bany líquid a 42°C durant exactament 1 minut 30 segons.**

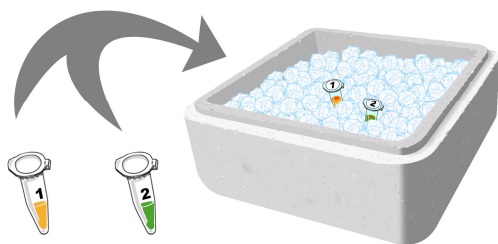


**Què passa?** L'ADN circular o plasmidi penetra a través de porus d'alguns dels bacteris. **Com?** A 42°C augmenta l'elasticitat de la membrana dels bacteris i això facilita l'entrada del plasmidi a través dels porus.

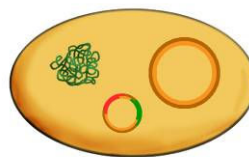




5. Torneu a posar els tubs 1 i 2 en gel durant 2 minuts.



**Què passa?** En baixar la temperatura s'estabilitzen les membranes i el plasmidi que ja havia travessat els porus restarà dins els bacteris.

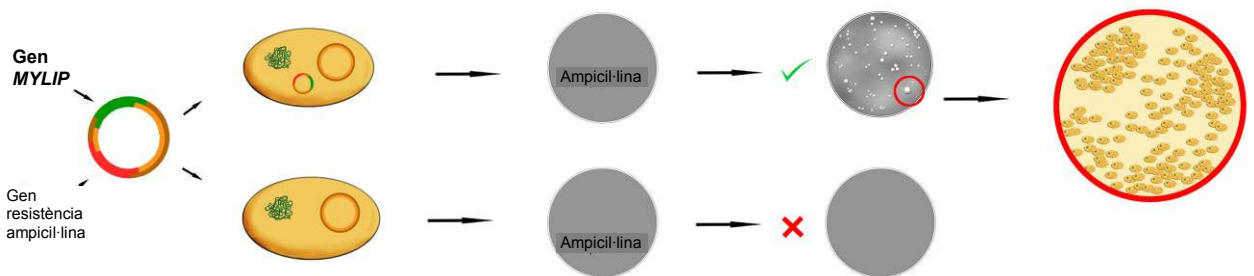




## 2- CREIXEMENT DELS BACTERIS TRANSFORMATS

Un cop els bacteris han incorporat el plasmidi, cal fer-los créixer en un medi adequat i a una temperatura adequada. Atès que la transformació bacteriana normalment produeix una mescla de poques transformacions i abundants cèl·lules no transformades, ens cal un mètode per identificar les cèl·lules que han incorporat el plasmidi.

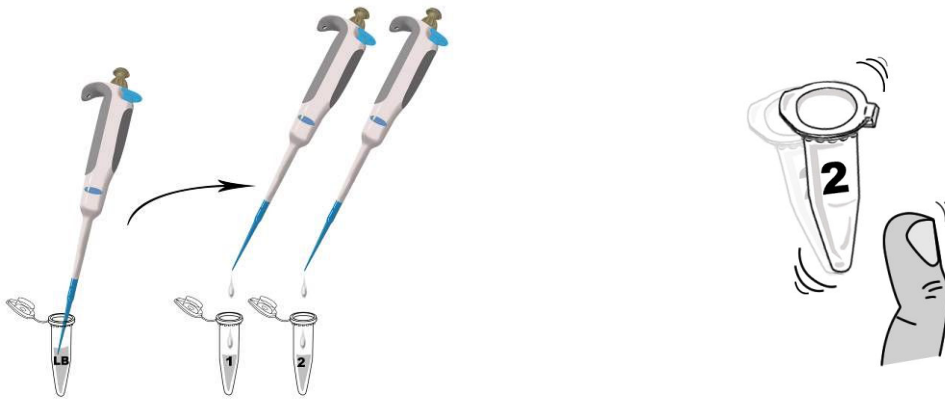
Assegurarem que només fem créixer els bacteris transformats, fent-los créixer en plaques de cultiu que contindran un antibiòtic. Gràcies al fet que el plasmidi conté un gen que fa que els bacteris siguin resistents a aquest fàrmac, només els bacteris transformats creixeran en forma de colònies. A partir d'aquestes colònies, podrem posteriorment continuar el creixement únicament dels bacteris que produeixin el gen d'interès.





## Protocol per al creixement dels bacteris transformats

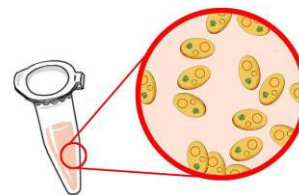
1. Retoleu les plaques on fareu créixer els bacteris. Una serà la placa control amb bacteris sense plasmidi, i l'altra serà on fareu créixer els bacteris amb plasmidi.
2. Utilitzant la micropipeta de 200  $\mu\text{l}$  afegiu **500  $\mu\text{l}$**  de medi de creixement bacterià "LB", que conté nutrients, als **tubs 1 i 2**. Tapeu els tubs i barregeu-los suaument donant-los copets amb el dit.



3. **Incubeu la barreja en el bany líquid a una temperatura de 37°C durant 30 minuts.**



**Què passa?** Aquest període dona temps perquè els bacteris es multipliquin, de manera que en duplicar el seu ADN també generen una còpia de l'ADN plasmídic que conté el gen d'interès.



*\*Mentre espereu que creixin els bacteris, podeu anar fent la tercera etapa d'aquest taller que consisteix en aïllar el material genètic dels bacteris (pàg.16).*





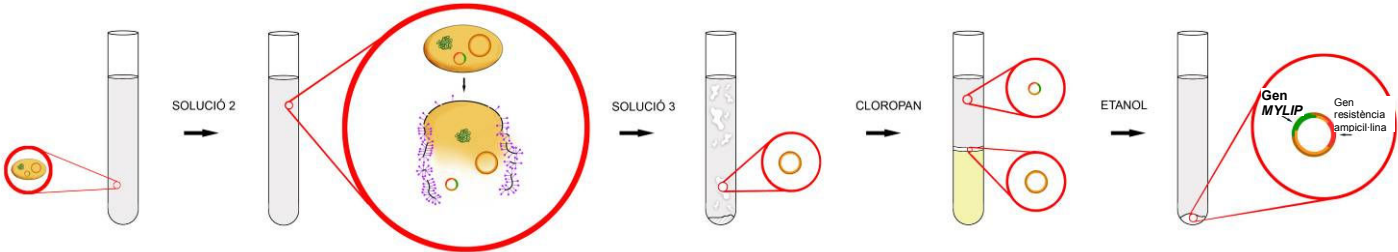


### 3- AÏLLEM EL MATERIAL GENÈTIC RESULTANT

A partir dels bacteris transformats que han crescut formant colònies, els científics n'agafen una mostra i la posen a créixer en un altre medi de cultiu amb nutrients per a obtenir-ne grans quantitats. Posteriorment, cal aïllar el material genètic que ens han produït els bacteris, és a dir, cal separar-lo de la resta de components bacterians, com ara ARN, ADN del bacteri o proteïnes. Per aïllar el plasmidi els científics segueixen un protocol conegut com a miniprep. Aquesta tècnica permet separar l'ADN en forma de plasmidi mitjançant diferents dissolvents i centrifugacions, que van descartant els diferents components cel·lulars.

L'ADN purificat serà de gran utilitat per als científics per dur a terme experiments posteriors per estudiar-ne la funció en la regulació del colesterol i en l'aterosclerosi i per cercar nous fàrmacs.

Com que el procés de creixement de grans quantitats de bacteris requereix més d'un dia i mig de temps, per al taller, utilitzareu un cultiu que ha estat preparat prèviament pels monitors.

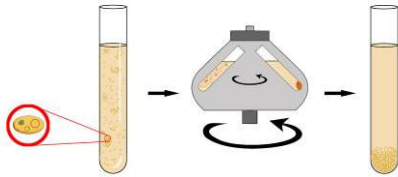






## Protocol per purificar l'ADN plasmídic del cultiu bacterià (Miniprep)

1. Centrifugueu el tub de cultiu bacterià a màxima velocitat durant 30 segons. A continuació elimineu el líquid sobrenedant.

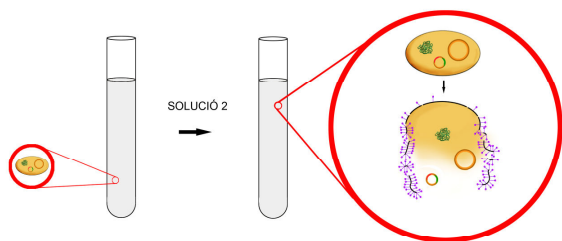


**Què passa?** Se separen les cèl·lules del medi de cultiu en què han crescut, que normalment conté restes de cèl·lules i altres molècules que volem descartar.

2. A continuació elimineu el líquid sobrenedant i poseu el precipitat en suspensió de nou amb **100 µl** de la **solució 1** fent ús de la micropipeta de 200 µl i barregueu amb la mateixa pipeta.

**Què passa?** Es resuspenen els bacteris de nou per continuar la purificació, però a més concentració, ja que els tindrem en un volum menor. La solució 1 és una solució tampó que previndrà la desnaturalització de l'ADN circular en forma de plasmidi, que té lloc si el pH puja per sobre 12,6.

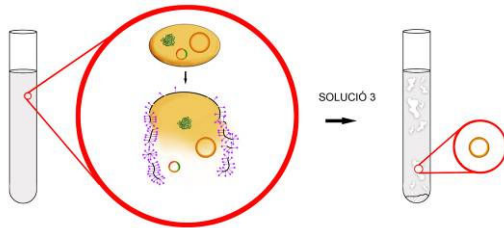
3. Afegiu **200 µl** de la **solució 2** i barregueu suaument per inversió.



**Què passa?** La solució 2, que conté un detergent, destrueix les membranes de fosfolípids dels bacteris, alliberant tot el contingut de dins de les cèl·lules al medi, mitjançant un procés anomenat lisi bacteriana. Aquesta solució també conté una base forta (hidròxid de sodi, NaOH) que desnaturalitza les proteïnes involucrades en mantenir l'estructura de la membrana cel·lular i l'ADN propi del bacteri. En canvi l'ADN plasmídic no es veu afectat gràcies al fet que el pH és inferior a 12,6.



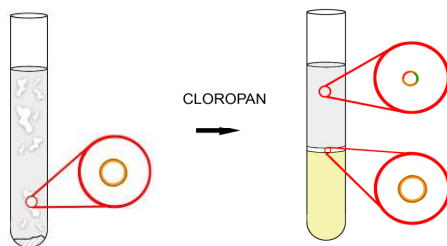
4. Afegiu **150 µl** de la **solució 3** i barregueu per inversió.



**Què passa?** La solució 3 és una solució àcida d'acetat de sodi, que permet neutralitzar el pH de la solució i aturar el procés de lisi. En aquest pas la majoria del contingut cel·lular, com ara les proteïnes i els fosfolípids de les membranes i l'ADN propi del bacteri, precipiten formant una mucosa blanca.

L'ADN propi del bacteri, ja desnaturalitzat, forma un complex insoluble que precipita, gràcies al fet que els ions  $K^+$  s'uneixen als grups fosfat de l'ADN i en neutralitzen així la càrrega negativa.

5. Afegiu **350 µl** de **cloropan**, barregueu bé per inversió i centrifugueu durant 3 minuts a màxima velocitat per separar el plasmidi que conté el gen de la MYLIP.



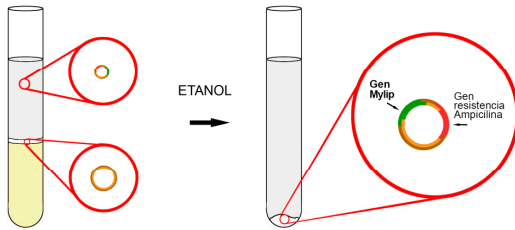
**Què passa?** En aquest pas se separa l'ADN plasmídic dels continguts cel·lulars restants, com ara proteïnes, lípids i altres àcids nucleics. El cloropan és una mescla de solvents orgànics que conté fenol i cloroform. Aquests solvents dissolen les molècules hidrofòbiques com ara els lípids de la membrana i desnaturalitzen les proteïnes fent-les insolubles en aigua. Amb la centrifugació separem la mescla en dues fases: els

fosfolípids i les proteïnes cel·lulars es queden en solució a la fase inferior de cloropan o atrapades a la interfase entre les dues fases en forma de precipitat blanc. L'ADN plasmídic quedarà a la fase aquosa superior, ja que les seves càrregues elèctriques no estan neutralitzades i, per tant, és soluble en aigua.

6. Passeu la fase aquosa **superior transparent** a un nou tub amb la pipeta de 200 µl.



- Afegiu **900 µl** d'**Etanol** 100% amb la pipeta de 200 µl i barregeu bé. L'etanol fa que precipiti l'ADN plasmídic de la solució aquosa .



- Centrifugueu **5 minuts** a màxima velocitat. Observareu el precipitat que és l'ADN en forma de plasmidi.
- Traieu **TOT** l'etanol amb la pipeta de 200 µl.
- Torneu a resuspendre el precipitat d'ADN **plasmídic** en 20 µl d'H<sub>2</sub>O purificada.





6. A partir de les colònies que s'han format, com s'obtenen múltiples còpies del gen d'interès?

7. Com es fan precipitar l'ADN bacterià i l'ADN d'interès? Complementeu l'explicació amb un esquema.

8. Amb la tècnica de separació anomenada miniprep, heu aconseguit aïllar múltiples còpies de l'ADN d'interès. Què fan els científics un cop obtenen aquest ADN?

**Investigadors que han contribuït amb continguts:** Theresa León, Jonathan Matalonga, Universitat de Barcelona

➔ AUTOR



➔ FINANÇAT PER:



➔ MEMBRES DEL CONSORCI:



Aquesta obra està sota una llicència Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported de Creative Commons . Per veure una còpia d'aquesta llicència, visiteu <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>