

INGENIARITZA GENETIKOA ETA
ANALISI GENETIKO MOLEKULARRA

1.-DNA errekonbinantea

1.1-DNA errekonbinantea: Definizioa eta helburuak

Ingeniaritza genetikoan (IG) oso ohikoa da DNA errekonbinantearen (DNAr) teknologia erabiltzea. Zer da? In vitro sortutako DNA molekula artifiziala, bi organismo edo espezie ezberdinetatik eratorritako DNA sekuentziak batuz.

DNAr hori organismo batean sartzean modifikazio genetiko gertatzen da, organismoari ezaugarri berriak emanez edota lehengoetan aldaketak gauzatu.

Ingeniaritza genetiko

Azido nukleikoak manipulatzeko aukera ematen duen teknika multzo bat. Helburuak:

Genomen eta geneen funtzioa ezagutu, funtzio zelularra ezagutzeko eta hala organismoen genomak eraldatu (geneak gehitzen edo kentzen). Teknika honen bidez, hurrengoak burutu daitezke:

- Aldaketa genetikoak detektatu
- Produktu baterako mikroorganismo ekoizleak lortu
- Mutazioak zuzendu
- Intereseko animaliak eta landareak lortu

Ingeniaritza genetikoaren bidez geneak gehitu edo kentzen dira, *in vitro*, DNA prestaketaren bidez. Prestatutako DNA zelula ostalarietan barneratzen da bektore genomikoak erabiliz, edo zuzenean eta honi **gene transferentzia** deritzo. Ostalarian, DNA erreplikatu da (klonak sortuz) eta batzuetan adierazi egiten da.

1.2-Geneen maneirako erabili ohi diren tekniken analisi orokorra

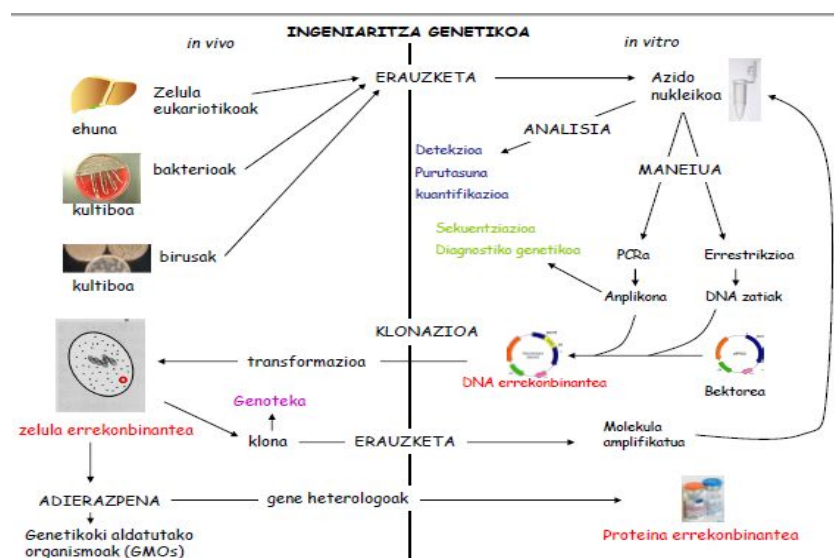
DNA errekonbinanteak bi DNA zati batzean sortzen da:

·Bektorea: Geneen transferentzia ahalbidetzen duten eragile edo organismoak dira. Gehien erabiltzen direnak plasmidoak eta birusak dira eta hauek erreplikazioa hasteko puntu espeziako eta ezagunak dituzte, oriC.

·Gene interesgarriak: Transferitu eta klonatu nahi ditugun geneak. Normalean ekoiztea interesatzen zaigun proteina kodetzen duen RNAm-a isolatu eta erretotranskriptasa entzimaren bidez DNA osagarria DNAc sintetizatzen da.

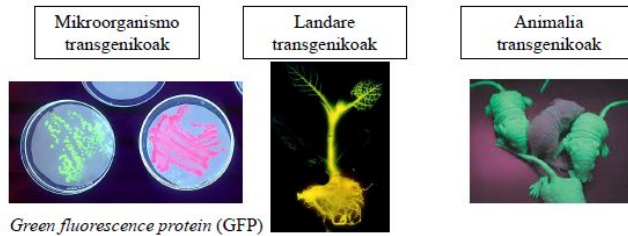
Lehenengo eta behin plasmidoa eta errekonbinatu nahi dugun DNA zatia **errestrikzio entzima** berarekin tratatzen dira bakoitzabere aldetik. Gero, lortutako DNA zatiak plasmidoarekin kontaktuan jarri eta **ligasak** erabiliz lotuko dira, hala DNAr molekula lortuz.

Lortutako DNA errekonbinanteak guk nahi dugun genea daramala ziurtatzeko, antibiotiko baten genea txertatu ohi zaio interesekoa dugun DNA zatiarekin batera, identifikaziorako eta bakterio errekonbinantea antibiotikodun medioan haziz gero, biziraun beharko luke.



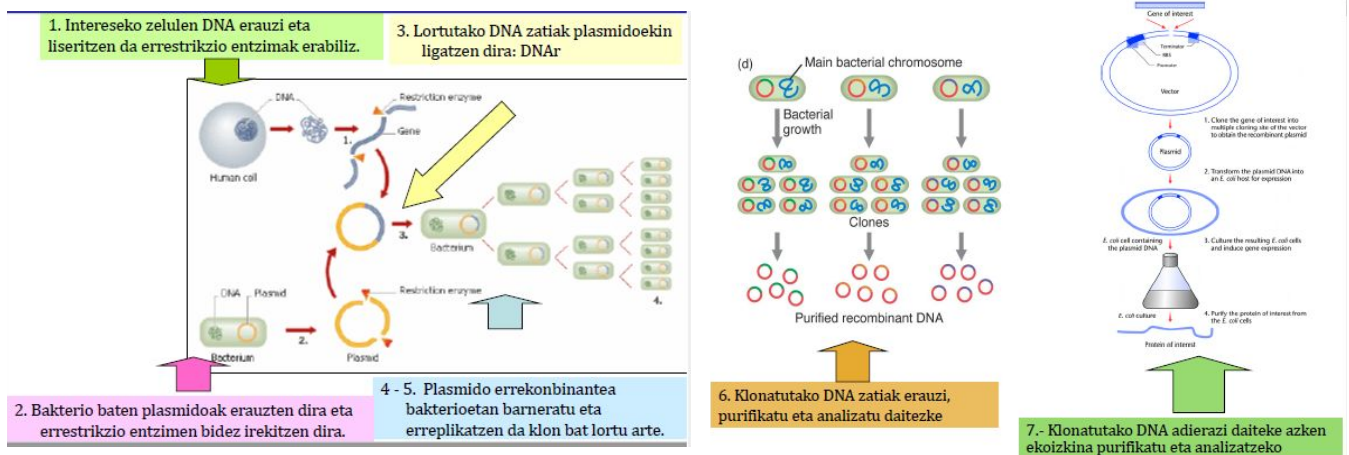
Genetikoki Aldatutako Organismoak (GMOs)

Kanpoko DNA organismo baten zeluletan barneratzen denean, GMO (organismo transgenikoa) bat lortzen da.



DNA errekonbinantearen teknologia

1. Errestrikzio entzimak erabiliz sortutako DNA zatiak lortzen dira
2. Bakterioetatik lortutako plasmidoak (bektoreak) "irekitzen dira" errestrikzio entzimak erabiliz
3. Lortutako DNA zatiak irekitako bektoretan sartzen dira, ligazioaren bidez DNAr
4. Bektore errekonbinantea (bektorea+DNA zatia) zelula ostalarietan transferitzen da. Ostalarietan bertan DNAr erreplikatu eta kopia anitz sortzen
5. DNAr daukaten zelula ostalarietatik zelula kume guztiei transmititzen diete → klonak.
6. Klonatutako DNA zatiak erauzi, purifikatu eta analizatu daitezke
7. Klonatutako DNA transkribatu daiteke eta ekoiztutako RNAm itzuli daiteke, azken ekoizkina purifikatu eta analizatzeko



1.3-Ingeniaritza genetikoaren testu-inguru historikoa

Zenbait gertakari garrantzitsu egon ziren historian zehar DNArren teknologia hobetzeko:

·1973an Herbert Boyer eta Stanley N. Cohen elkartu eta Stanford Unibertsitateari lotuta DNArren patentea eskatu zuten 1974an. Beraien esperimentuan *Xenopus laevis* igelaren geneak E coli bakterioetan sartu zituzten eta hurrengo belaunaldietan geneak aktibo zeudela demostratu zuten

·Paul Berg-ek 1974an bakterio baten lambda birusaren DNA eta tximinoen SV40 birusa batu zituen → EcoRI errestrikzio entzima

Asimolar konferentzia (1975)

Paul Berg ek 140 ikertzaile, mediku eta legegile Asilomar State Beach konferentzia zentroan deitu zituen ingeniariak genetikokoaren **inplikazio etikoak** eztabaidatzeko. Estatu Batuetako Osasun Nazio Institutuak (NIH-ak) zenbait arau gomendio eta arrisku maila finkatu arte, DNAr aren erabilpenerako luzamendua ezarri zen.



Biosegurtasun arau ezberdinak ezarri ziren gizakiei edo animaliei eragiten zieten organismo errekonbinanteen ustekabeko ihesa saihesteko. Neurri gisa, erabilitako bakterioek ez lukete laborategitik kanpo bizi beharko. Jarraibideak Science Nature and PNAS aldizkarietan argitaratu ziren

Konferentziako gomendioak:

Arrisku maila desberdinak → Kontentzio neurri desberdinak

- Minimoa: Arrisku biologiko minimo eta erraz identifikagarria
- Baxua: rDNA duten biotipo berriak sor daitezke baina txostenak behar dira non azaltzen den ostalari espezieen portaera ekologikoan eragin handia ez dutela, ez dutela patogenotasuna areagotzen eta ez dutela infekzioen aurkako tratamendu eraginkorrekiko erresistentziarik erakusten.
- Moderatua: Badira esperimenduak potentzial patogeno edo eragin ekologikoa duen agente bat sor dezaketenak.
- Altua: Eragin ekologiko edo patogeno potentziala larria da, laborategiko langileentzat edo, oro har, gizartearentzako arrisku biologiko larria izanik.

Debekatutako esperimenduak:

Espresuki debekatuta dago oso patogenoak diren edo toxinak adierazten dituzten organismoetatik lortutako DNAr klonazioa osatzen duten esperimenduak egitea, edo gizakientzat, animalientzat edo landareentzat potentzialki arriskutsuak diren produktuak erabiltzea edo sortzea.

Gertakari nabarmenak IG-an

- 1976: Lehen jaio aurreko diagnostiko genetikoa egin zen DNAr enlaguntzaz
- 1977: Walter Gilbert ek eta Frederick Sanger rek DNAr en baseensekuentziazio metodoa landu zuten.
- 1979: Herbert Boyer Intsularen lehen produkzioa ingeniariak genetikokoaren bidez
- 1983:
 - Kary Mullisek PCR teknologia lortu zuen (Nobel Saria 1993 an)
 - Lehen landare transgenikoa (tabako landarea) lortu zen antibiotikoekiko erresistentzia ematen zuena.
 - Richard Palmiterrek and Ralph Brinsterrek Lehen sagu transgenikoa giza hazkundearen hormonarekin) Tamainaz bikoitza zen.
- 1984: *Fingerprinting* teknika (hartz marka genetikoa)
- 1985:
 - Lehen etxabere transgenikoa (txerria)
 - Lehen landare transgenikoa, intsektu jakin bati erresistentea
- 1987
 - Sagu transgenikoa bere esnetan proteina exogenoekin (ardiren betalaktoglobulina eta gizakien alfa anti tripsina)

- Giza geneak daramatzaten sagu transgenikoen multzoa
- Landare transgenikoa, herbizida jakin bati erresistentea
- 1988
 - Sendagai bat ekoizten duen lehenengo landare transgenikoa
 - Arto transgenikoa
 - Lehenengo animalia patentatua: “ Oncomouse ”, minbizia ikertzeko
- 1990
 - Ardi transgenikoak (Tracy) alfa-anti-tripsina ekoizten zuen enfisema tratatzeko
 - James Watson eta beste ikertzaileak Giza Genoma Proiektua hasi ziren
 - Gene Pharming enpresak lehen zezen transgenikoa *Herman* sortu zuen Holandan (laktoferrinarekin)
- 1991
 - Terapia genikoaren lehen saikaera
 - Gene Pharming enpresak esnetan gizakien laktoferrina ekoizten zuten behi transgenikoak sortu zituen septizemia tratatzeko
- 1994
 - Flavr Savr* giza kontsumorako lehen tomate transgenikoa. Berandu heltze tomatea
- 1997
 - Ian Wilmut eta kol. (Roslin Institute,Scotland). *Dolly* ardia jaio zen transferentzia nuklearraren bidez klonatuta
 - Tabako landare transgenikoa, giza hemoglobinarekin ekoizlea
 - Klonatutako lehen ardi transgenikoa jaiotza *Polly*. Zelula fetalak Poll Dorset arkumeetatik hartu zituzten eta zelula horietan IX odolaren faktorea genea barneratu zuten
- 1998
 - “Terminator” teknologia, patentatua. Berrero landatzen denean haziak ernetzeko gaitasuna kentzeko teknika da
 - Erresuma Batuko supermerkatu kateak GMO ak beren produktuetan erabiltzea debekatzen du
 - Lee Bo yonek (Kyunghee University South Korea) transferentzia nuklearraren bidez gizakien klonazioa egiten lehenengoa izan zela aldarrikatu zuen (4 zelula izatera iritsi zen)
- 1999
 - Lehen paziente hil zen terapia genikoaren ondorioz
- 2000
 - Giza Genomaren Proiektu Publikoen liderrek (HFP) eta Craig Venter-ek (Celera Genomics enpresakoa) giza genomaren lehen zirriborroa argitaratu zuten.
 - Terapia genikoaren lehenengo arrakastak sortzetiko immunoeskasiaren sindromea tratatzeko (Frantzia), bihotzeko gaixotasunen tratamendua VEGF genea erabiliz (Estatu Batuetan)
 - Erresuma Batuko kolza hazien kutsadura Kanadatik inportatutako koltza transgenikoarekin
 - Adam Nash en jaiotza, gaizki salatuta prentsan munduko lehen haurtxo diseinatu gisa, ez zituelako eramaten geneak Fanconi-ren anemiarako haren zelula umbilikoak erabili ziren bere ahizpa gaixoari transplantarekin tratamenduak egiteko.
- 2001
 - Erresuma Batuk gaixotasun larriak ikertzeko giza enbrioak klonatzea ahalbidetzen zuen araudi bat onartu zuen ernalketaren ondorengo 14 egun arte

- Giza genomaren lehen zirriborroa *Nature* eta *Science* aldizkarietan argitaratu zen (26.000-40.000 gene)
- Munduko lehen Genetikoki Aldatutako Gizakiak 3 guraso zituzten haurrak (bi emakume eta gizon bat, mitokondrien transplantea)
- Lehen gizakiaren "enbrioia" klonatu zen. "Advanced Cell Technologies" enpresak "Dolly metodoa" erabili zuen klona sortzeko (6 zelula etapa)
- 2002
 - Lehenengo katu transgenikoa (carbon copy)
 - HapMap Proiektua hasi zen populazio desberdinetan dauden aldaera genetikoak identifikatzeko
- 2003
 - Europako Transgenikorik gabeko Eskualdeen Sarea sortu zen (10 eskualde)
 - Dolly hil zen 6 urterekin biriketako (gaixotasuna eta artritis)
- 2004
 - Gizakientzako eta abeltzaintzarako elikagai transgenikoen Europako erregulazioa (1829/2003 CE) eta GMOen Trazabilitateari eta Etiketatzeari buruzko erregulazioa (1830/2003 CE).
 - Lehen giza enbrioia Hauek klonatu ziren 16 emakumeetatik, GEZURRA (Seoul National University South Korea, Hwang Woo suk)
- 2005
 - Txinpantzearen genoma osatu zen, eta gizakiaren genomarekin erkatu zen desberdintasunak aurkitzeko
 - Network's 3 rd Conference* ."Charter of Florence" dokumentua sortu zuten non transgenikorik gabeko eskualdeetan jarraitzeko jarraibideak ezartzen diren
 - South Korean txakur bat klonatu zen, " Snuppy"
- 2006
 - Txerri transgenikoa omega 3 gantz azidoa ekoizteko nematodoaren gene bat txertatuz
 - Shinya Yamanakak zelula pluripotenteen teknika garatu zuen. Berak ikusi zuen zelula helduetan 4 gene espezifiko barneratzen zituenean zelula ama pluripotenteak lortzen zituela
- 2008
 - 1000 Genomes Proiektua hasi zen, nazioarteko lankidetzak. Helburua mundu osoko etnia desberdinetako pertsonen genomak sekuentziatu nahi zituzten
 - Europako Batzordeak arto transgenikoari, GA21 baimena eman zion pentsu eta elikagaien erabilerarako eta inportaziorako
- 2010
 - J Craig Venter Institutuko zientzialariek lehenengo bakterioaren genoma sintetikoa sortu zuten, eta DNArak ez zuen zelula batea barneratu zuten. Horren ondorioz, Synthia bakterioa sortu zen, munduko lehenengo bizitza forma sintetikoa
 - "Amflora" patata transgenikoa onartu zen European, bi hamarkadako ikerketaren ondorioz Amflora patatak oso ona zen paper fabrikazioan
 - University of Texas MD Anderson Cancer Center* Institutuan sagu transgenikoa sortu zuten bi aitaren DNA nuklearra eta iPS teknologia erabiliz
- 2012
 - Next Generation Sequencing*, NGS . Life Technologies Corporation-ek Ion Proton TM Sekuentziadorea iragarri zuen, gizakiaren genoma osoa sekuentziatzeko egun batean eta \$ 1,000 ordainduz
 - 1000 Genomes " Proiektua amaitu zen

-Shinya Yamanakari Nobel saria eman zioten John Gurdonekin batera zelula amaren garapena (iPS teknologia) lortzeagatik

- 2013: Serranoren laborategian (CNIO) saguaren zelula helduak erreprogramatu zituzten (pluripotente bihurtzeko) in vivo
- 2014: Edizio genomikoa . Crispr-Cas9 teknologia
- 2018: He Jiankui (Shenzhen, China) Crispr teknologia erabili zuen bi nesken genoma editatzeko, Lulu eta Nana 2019: Kartzelan

IG gaur egun

- 5000 giza gaixotasunen kausa genetikoak ezagutzen dira
- Crispr /Cas 9 teknologia aldatutako saguak sortzeko edo gaixotasunen mutazioak zuzentzeko erabiltzen da laborategietan.
- Animalien klonazioari, zelula amaren buruzko ikerketari, terapia genikoari edizio genomikoari buruzko eztabaidak oraindik badirau.

1.4-Oinarrizko kontzeptuak

1) Azido nukleikoak → Nukleotidoz osatutako polimeroa (nukleosidoa+fosfatoa). Nukleosidoa= Azukrea+ base nitrogenatua. Nukleosidoak fosfato bat edo gehiagorekin elkar daitezke (mono,di tri). Monofosfatoak nukleotidoak dira, difosfatoek energia funtzioa dute eta trifosfatoek energia emaile eta azido nukleikoen sintesirako molekula prekursore dira.

- Purinak: A eta G
- Pirimidinak: C, T eta U.

Hidrolisiaren bidez nucleotidoak zati ezberdinetan bana daitezke.

Tipo	Nucleósidos purínicos		Nucleósidos pirimidínicos		
	ribonucleósidos (se encuentran en el RNA) y desoxirribonucleósidos (se encuentran en el DNA)		ribonucleósido (en RNA) y desoxirribonucleósido (en DNA)	desoxirribonucleósido (en DNA)	ribonucleósido (en RNA)
Estructura					
Nombre	sufijo -osina		sufijo -idina		
	adenosina 9-(1'-β-D-ribofuranosil) adenina	guanosina 9-(1'-β-D-ribofuranosil) guanina	citidina 1-(1'-β-D-ribofuranosil) citosina	ribositimidina (o ribotimidina) (no existe en RNA, excepcionalmente en tRNA)	uridina 1-(1'-β-D-ribofuranosil) uracilo
	2'-desoxiadenosina 9-(2'-desoxi-1'-β-D-ribofuranosil) adenina	2'-desoxiguanosina 9-(2'-desoxi-1'-β-D-ribofuranosil) guanina	2'-desoxicitidina 1-(2'-desoxi-1'-β-D-ribofuranosil) citosina	2'-desoxitimidina (o timidina) 1-(2'-desoxi-1'-β-D-ribofuranosil) timina	2'-desoxiuridina (no existe en DNA)

Azido nukleikoek egitura desberdinak dituzte:

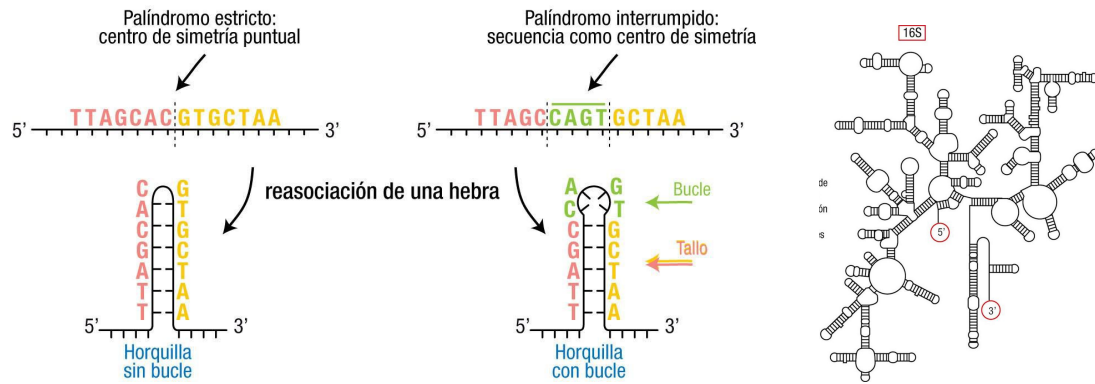
·Primarioa: Kate bat osatzen dute, nukleotidoak fosfodiester loturekin elkartzen dira, 5' muturretik 3' muturrera.

·Sekundarioa:

-DNA bikatenario edo duplexoa. Kate bikoitz antiparalelo bat osatzen dute. A-T (lotura bikoitza) eta C-G (lotura hirukoitza)

Chargaffen legea: AT/CG=1

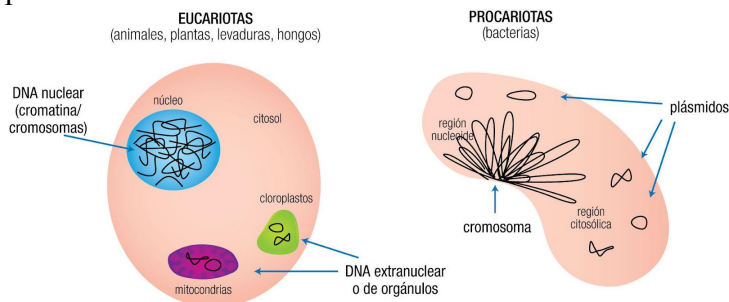
-DNA edo RNA monokatenarioa edo monoplexoa. Begiztak ager daitezke simetriaren arabera,



2) Prokariotoen eta eukariotoen genomak

·Eukariotoetan DNA nukleoaren barnean ageri da kromatina forman, eta erreplikazioa ematean konpaktatu egiten da kromosomak osatuz. Horretaz gain, mitokondria eta kloroplastoetan ere DNA simple zirkular bat ageri da.

·Prokariotoetan DNA zirkular bakarra dago eta zitoplasman kokatzen da. Horretaz gain, plasmidoak ere badituzte.



3) DNA tertziarioaren egitura:DNA plasmidikoa (pDNA)

Plasmidoak DNA zati txikiago dira eta bira bat kenduz superkiribilkatu egin daitezke, egitura konpaktuagoak eratzen.

4) Birusen genomak

Mota guztietako genomak topa ditzakegu, harizpi bakarrekoak (ss) edo harizpi bikoitzekoak (ds) izan daitezke eta baita RNA eta DNA.

5)Genetika molekularren oinarria

Dogma zentralaren bidez informazio genetikoaren norabidea azaltzen da.



6)Erreplikazioa

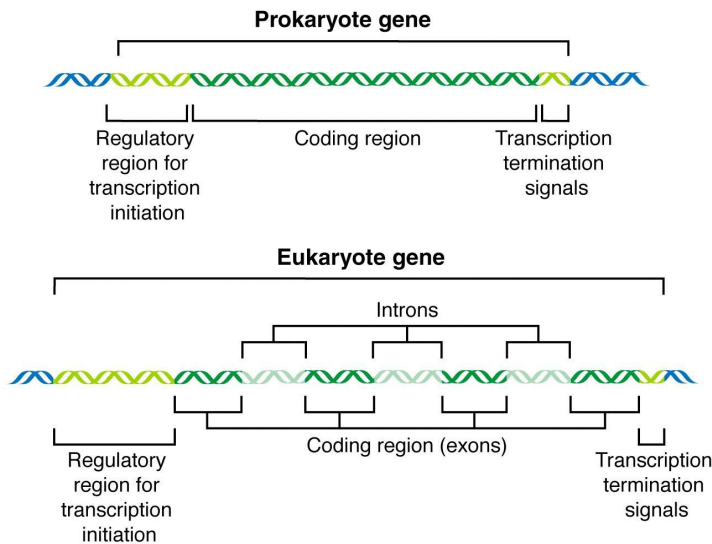
Kate bakoitzak molde moduan jokatzen du kate osagarria sintetizatzeko eta DNA molekula batetik (2 kateduna) 2 molekula (bakoitza bi kateetakoa) sortzen dira. Sintesian harizpi batean erreplikazio jarraia egiten da eta bestean zatika. DNA polimerasak 5' 3' norabidean nukleotidoak gehitzen ditu eta gainera, gai da erroreak 3' → 5' norabidean zuzentzeko.

Fosfodiester loturak eratzen dira nukleotidoen artean kate berriak lortzeko eta erreplikazio prozesuan **erreplisoma** konplexua aritzen da lanean (proteina konplexua). Gainera erreplikazioa hasteko ezinbestekoa da **RNA primer** bat izatea, DNA sintesia hasi ahal izateko.

7) Geneen adierazpena: Prokarioto eta eukariotoetan

Prokariotoetan transkripzio eta itzulpena zitoplasman gertatzen dira. Eukariotoetan ordea, transkripzioa nukleoan ematen da eta itzulpena berriz zitoplasman

8) Geneen egitura

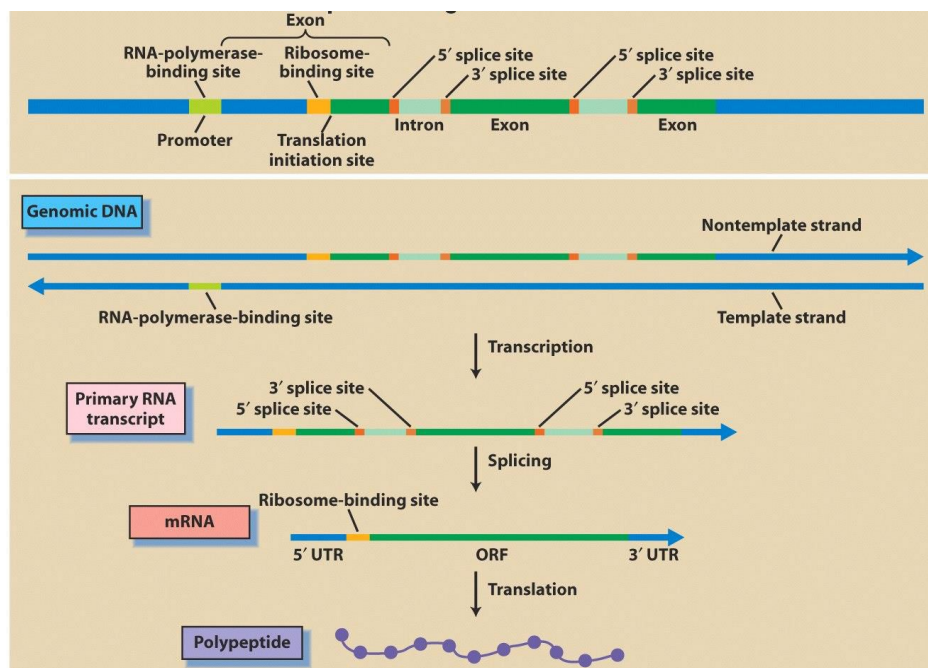


·Promotoreak: Transkripzioa sustatzen duten sekuentziak dira, bertan DNA polimerasa eta transkripzio faktore batzuk lotzen dira.

·Enhancer: Transkripzio tasa areagotzen da.

9) Transkripzioa

Transkripzioan DNAtik RNA lortzen dugu, eta honetan harizpi moldea eta kodetzaila ditugu. Kodetzaila eta RNA berdinak izango dira. RNA polimerasak sortzen du harizpi berria eta 5' → 3' norabidean egiten du.



Transkripzioaren ondoren premRNA sortzen da eta horrek heltze prozesu bat jasan behar du, non introiak ezabatu egiten diren.

10) Itzulpena

Itzulpenean mRNAtik proteina lortzen dugu. Horretarako kodoiak eta irakurtarau jakin bat dago eta unibertsala den kode genetiko bat. Gainera, hasieran eta amaiera zehazten duten kodoiak daude. Prozesuan rRNA eta tRNA aritzen dira. tRNA-ren antikodon sekuentzia mRNA-ren kodoi sekuentziaren osagarria da.

· Monozistroiak: Itzulpena leku bakarrean hasten da.

· Polizistroiak: Itzulpena leku gehiagotan hasten da.

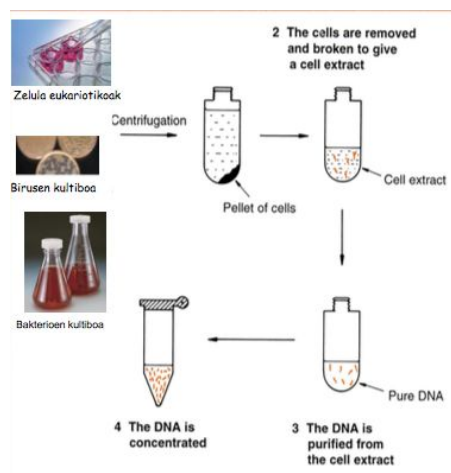
2.-DNA maneirako oinarritzko teknika esperimentalak

1. Azido nukleikoen erauzketa

1. Azido nukleikoen erauzketa

Organismo ezberdinetatik erauzi dezakegu DNA (zelula eukariotikoak, bakterioen kultiboa edo birusen kultiboa); eta horren arabera erauzketa aldatu daiteke. Oro har pausu hauek ditu:

- Zentrifugazioa: zelulak bereizteko (pellet-a zelulek osatuko dute eta gainjalkina kenduko dugu).
- Zelulen mintza apurtuko dugu extraktu zelularra lortzeko. Azido nukleikoak aske geratuko dira, baina honekin batera baita ere behar ez ditugun osagai gehiago.
- Purifikazioa: Soilik DNA purua eskuratzeko zelula estraktutik.
- Diluzioa: Erauzitako DNA oso kontzentrazio altutan izango dugu, beharrezkoa da uretan diluitzea.



DNA-ren jatorria anitza izan daiteke:

- Birusak eta bakteriofagoak

- Bakterioak (genoma bakterianoa, plasmidoa). Erauzketa askozaz ere errazagoa da.
- Zelula eukariotikoak
 - ❖ Kultibo zelularrak
 - ❖ Ehun solidoak (tumoreak, biopziak, larruazala, ilearen erroak, hezurak). Beharrezkoa izango da aldez aurretik ehuna disgregatzea.
 - ❖ Fluido organikoak: ahoaren laginak, esperma, odola, hezur-muina, gorozkiak...
 - ❖ Enbrioi-zelulak (blastozistoa, likido amniotikoa, fetoaren ehunak edo odola)

Azido nukleikoak erauzteko lehenik laginen prestaketa burutu behar da; hainbat pausuren bidez:

1. Laginaren disoziazio eta banaketa: Ehunak disoziatu eta tipo zelularrak banatu.
2. Zelulen karakterizazioa (intereseko zelulen identifikazioa) eta biderakortasuna (zelulak bizirik dauden determinatzea)
3. Lisi zelularra
4. Zelulen osagaien frakzionamendua; tratamendu osagarriekin konbinatu daiteke intereseko zelulen propietateak identifikatzeko.
5. Azido nukleikoen erauzketa eta purifikazioa

2. Laginaren disoziazioa eta banaketa

Ehunaren disoziazioa

- Fragmentazio mekanikoa: ebakidura (mozketa edo morteroa), sonikazio edo urradura bidez. Beirazko bolatxoak irabiatzean urradura ematen da, bolatxoek burutzen duten presioaren ondorioz ehuna apurtzen da. Sonikadore batekin ere burutu daiteke; ultrasoinuen bidez ehuna apurtu daiteke. Prozesuan tenperatura asko igotzen da eta horregatik izotza beharrezkoa da DNA egitura mantentzeko.
- Liseriketa kimikoa: zelulen kanpoko matrizearen eta zelula-zelula loturen liseriketa eman behar da (detergenteak, kaltzio kelanteak (EDTA ohikoena) erabiltzen dira)
- Liseriketa entzimatikoa: Mintza apurtzen duten proteasen bidez

3. Zelulen banaketa: zentrifugazioa

Indar errotatiboa erabiliz molekula desberdinak banatzen dira. 3 zentrifugazio mota nagusi daude:

- Zentrifugazio diferentziala: Partikula handienak hondoan geratzen dira abiadura handienarekin migratzen baitute, eta txikienak goran geratzen dira. Banaketa tamainaren arabera ematen da batez ere. Tipo zelularrak, organuluak eta makromolekulak banatzeko erabiltzen da.
- Abiadurako sedimentazioa edo zonala: sedimentazio koefizientearen araberako banaketa da; eta hau masa eta formaren baitakoa da. Bandak argiago bereizten dira. Lagina medioaren gainean jartzen da; barreiatu gabe. Ez da oreka ematen zentrifugazioa bukatzerako; luginaren osagaien dentsitatea gradientearen dentsitate maximoa baino handiagoa delako. Makromolekula eta organuluak banatzeko erabiltzen da.
- Isopiknikoa: guk erabiliko dugun teknika izango da. Banaketa dentsitatearen araberakoa da; eta banden bereizketa argia da. Dentsitate gradiente bat eratzen da; hau da medio bat zeinetan tuboan zenbat eta hondorago joan, dentsitatea handitzen den. Zentrifugazio denbora nahikoa da orekara heltzeko; gradientearen dentsitate maximoa; luginarena baino handiagoa da. Azido nukleikoak banatzeko, purifikazioan...erabiltzen da.

4. Zelulen karakterizazioa eta banaketa:

Partikula magnetikoak

Zelula bakoitzaren antígenoekiko espezifikoa diren antigorputzak erabiliko ditugu zelula hauek bereizteko.

- Markaketa zuzena: Antigorputz zehatz bati metalezko mikroesferak lotu, hau dagokion zelularen antigenora lotuko da.
- Ez-zuzena: anti-gorputz primario eta sekundarioak bereizten dira. Antigorputz primarioa espezifikoa izango da detektatu nahi dugun zelularen antígenoekiko. Antigorputz sekundarioa aldiz, primarioarekiko espezifikoa izango da eta metalezko mikroesfera eramango du.

Ondoren iman bat erabiliko da mikroesferadun zelulak bereizteko (gure interesekoak).

Fluxuzko zitometria

Normalean karakterizaziorako soilik erabiltzen da, baina azkenengo belaunaldiko aparatuekin banaketa eta karakterizazioa batera egin daitezke.

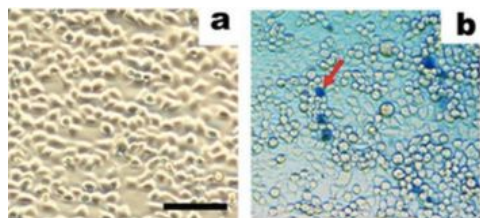
Zelula motaren arabera argiaren dispersio eta islapena ezberdinak izango dira zitometroan; ezaugarri hauek ordenagailuak monitorizatzen ditu. Ezaugarrien arabera zelula mota bakoitzak karga bat jasotzen du eta dagokion hodietara pasatzen da.

Emitza: DIFF kolore bakoitza zelula mota bat izango da. Zitometroan molekula fluoreszenteak edo antigorputzak konbina daitezke.

5. Zelulen biderakortasuna

Fase-kontrasteko mikroskopia bidez

Zelulen kontaketa, biderakortasuna eta funtzio metabolikoa bereizteko balio du. Zelule bideragarritasuna ikusteko (mintz plasmaticoa puskatua duen ala ez; koloratzaileak erabiltzen dira, ohikoena tripan urdina edo fluorkoiak). Koloratzailea hartzen duten zelulek mintza apurtuta izango dute eta gure interesekoak izango dira. Laginean koloratzailearen presentzaren arabera zelulen biderakortasuna kalkulatu daitezke.



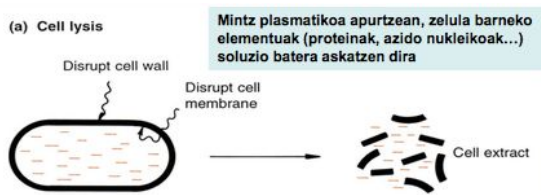
Bularreko adenokartzinoma baten lagin histologikoa; tripsinaz tratatu aurretik eta ondoren. Tripan urdinez tindatu da; zelula urdinak hildakoak izango direlarik.

6. Lisi zelularra

Zelulen mintz plasmaticoaren apurketa da. Batzuetan laginaren prestaketarekin (homogeneizazioarekin) batera burutzen da.

Medio hipotonikoak edo detergenteak erabiltzen dira, erabiliena SDS da; honek zelularen mintza apurtzen du baina DNA-ren osotasuna mantentzeko inhibitzaileak ere beharrezko ditu (EDTA kelantea edo DEPC (RNAsa inhibitzailea)). RNA erauzterakoan, hau oso sentikorra da; erribonukleasen bidez oso azkar degradatzen baita. Hortaz, beharrezkoa da DEPC ura gehitzea (RNAsak desnaturalizatzen dira).

Eskularruak eta material esterilizatua erabilko ditugu prozesu osoan zehar.



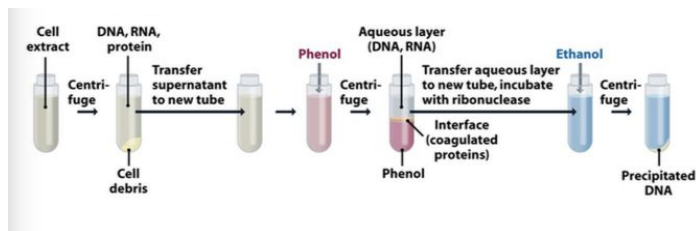
7. Zelulen osagaien frakzionamendua

Behin lisi zelularra eginda, zelulen osagai espezifikoaren material genetikoaren lortzeko; zentrifugazioaren denbora eta abiadura modulatu ditugu. Abiadura gutxi zentrifugazio bidez DNA, RNA eta proteinak lortzen ditugu. Zentrifugazio ziklo batzuk jarraian egin, abiadura eta denbora handitzean; gainontzeko molekulak banatu daitezke.

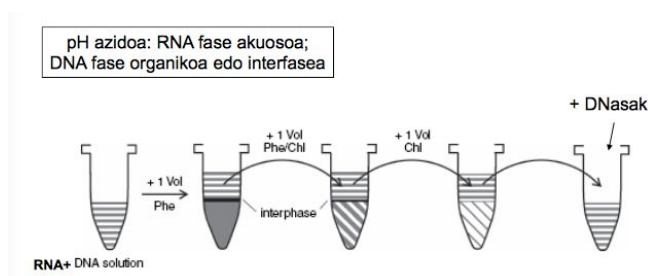
2. Purifikazioa

Disolbatzaile organikoak (prezipitazioa)

Fenola gehitzeak proteinak desnaturizatzen ditu. Gainera fase banaketa bat sortzen du; beheko partean fenola, lipido eta hondakinak izango ditugu, erdian proteinak eta goiko fasean DNA eta RNA (disolbatzenak fenolean). Faseak ondo bereizteko normalean subs. konbinazioa (fenola, kloroformoa, alkohol isoamilikoa) burutzen da.



pH neutroa mantentzea oso garrantzitsua da DNA osotasuna mantentzeko. Trizol konposatua erabiltzen da RNA erauzteko. Prozesu honetan pH azidoa beharrezkoa da, DNA fase organikora pasatzea eragiten dugu eta kanporatu dezakegu; hala ere, RNA soilik purifikatzeko, bada ez bada ere DNAsak ere gehitzen ditugu.



Erretxinaren bidez DNA purifikatu daiteke; ioien trukea erregulatzen da zutabeen karga positiboa gehituz gatzen bidez (DNAk karga negatiboa du eta migratu egingo du).



3. Kuantifikazioa

Espektrofotometria

Ultramoreen espektrofotometria bidez, absorbantzia neurketa 260nm-ko uhin luzeran burutzen da. Egun nanoDrop-a erabiltzen da 1mm erauzkina kontzentrazioa eta purutasuna neurtzeko.

DNaren eta RNaren espektroak Lambert-Beer legearen bidez kalkulatu dira. Harizpi bakarreko RNaren eta harizpi bikoitzeko DNaren xurgapen maximoa 260nm-tan da; proteinena aldiz 280nm-tan. Hortaz $A(260)/A(280)$ ratioa kalkulatu gure laginaren azido nukleiko edo proteina purutasuna determina dezakegu.

dsDNA: 1 D.O. = 50 μ g DNA/ml

ssRNA: 1 D.O. = 40 μ g RNA/ml

Fenolarekin erauzketa egitean kutsadura eman daiteke. Fenolaren xurgapena 260nm-ra delako, DNAn berdina. Absorbantzia neurtzean kontzentrazioa gainestimatu dezakegu, horregatik ondo kendu beharra dago fenolaren fasea.

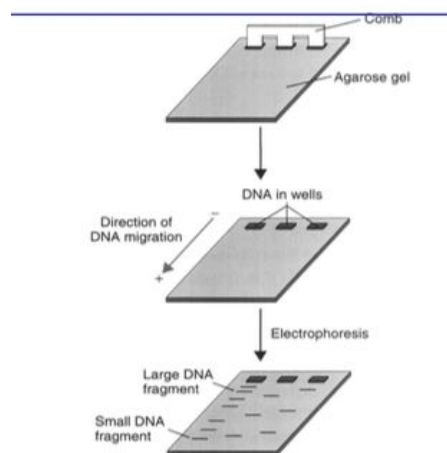
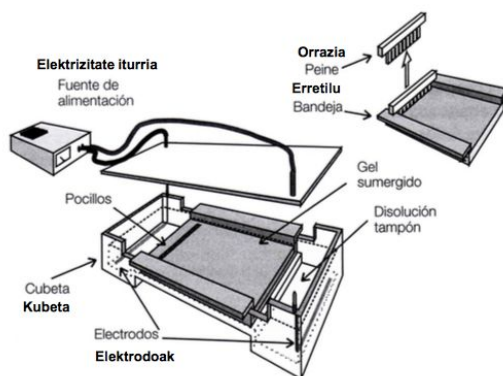
Nucleic Acid Type	Approximate A_{260}/A_{280} Ratio
Pure DNA	1.8
Pure RNA	2.0
Pure Protein	0.57

4. Elektroforesia

Molekulak tamiana eta karga elektrikoaren arabera banatzen dituen metodoa da, hauek eremu elektriko batean jartzen direlarik gel porotsu bat zeharkatzeko. Molekula polarrak direla eta, azido nukleikoek karga negatiboa dute, eta eremu elektrikoan polo positiborantza joko dute.

Mugitzeko abiadura kargarekiko proportzionala da eta tamainarekiko alderantziz proportzionala. Karga guk zehazten dugu, konstantea da, ondorioz molekulak tamainaren arabera migratuko dute.

Korrontea jarri aurretik buffer-a gehitu beharra dugu agarosa ez erretzeko. EtBr agente tartekatzailea (DNA harizpi bikoitzarekin bakarrik balio digu) edo antzeko konposatuak erabiltzen dira bere fluoreszentzia UV izpian ikusi ahal izateko. Agente tartekatzailea gelean bertan botatzen dugu.



DNAr dentsitatea gehitu beharko diogu koloratzaile bidez, hau zuzenean laginean gehitzen dugu. (koloratzaile hau beharrezko dugu, agarosa gelean migratzen ari dela ziurtatzeko ze EtBr fluoreszentzia UV izpian soilik identifikatu ahal izango dugu).

Molekulen migrazioan eragiten duten faktoreak

- DNA konformazioa (sekuentziak ez du eraginik); forma zirkularrak motelago migratzen dute. Molekularen tamainak ere eragina du.
- Eremu elektrikoa: korronteak (elektrodoen arteko potentzial diferentziak), gel eta buffer-aren erresistentziak migrazioan eragiten dute.

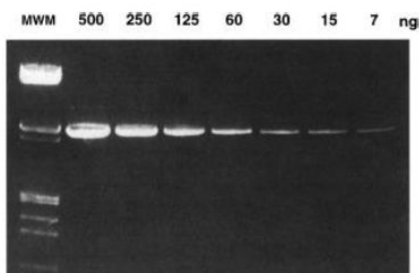
- Matrizearen gogortasunak migrazioan eragiten du. Agarosa/akrilamidazko gela zenbat eta kontzentratuagoa izan monomeroak eratzen dituen poroak txikiagoak izango dira eta motelago migratuko dute.
- Temperatura: Temperatura altuegiek banaketa desegokia eragiten dute. Temperatura optimoa korrontearen intentsitate eta erresistentziaren arabera da. Tanpoiak, plaka metalikoek edo kanpo-errefrigerazio teknikek prozesuan temperatura gehiegi ez igotzea ahalbidetzen dute.
- Buffer-a: pH konstantea mantentzen du eta korronteari ioiak ematen dizkio.

Agarosa eta akrilamidazko gelak

Gelak bertikalak dira, migrazioa modu bertikalean gertatzen da bi kasuetan. Akrilamidazko gelak oso-oso finak dira eta erresoluzio altuko emaitzak lortzeko erabiltzen dira. Oso antzekoak diren bi banda bereizteko akrilamidazko gela erabiliko dugu beti.

Composición del gel:		Intervalo de resolución conseguido: tamaño de DNA (kb)
% de acrilamida	% de agarosa	
20		0,006 - 0,1
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	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

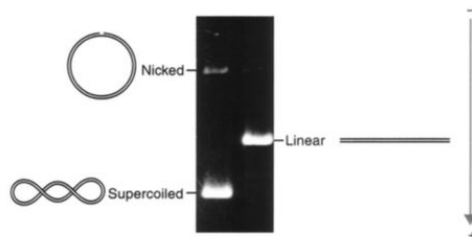
Elektroforesiko emaitzen interpretazioa: Molekula txikienak kontzentrazio altutan argiago ikusten dira, agarosa kontzentrazioa igo ahala banden banaketa argiagoa da. Banden intentsitatea DNA kantitate/gel-kontzentrazio eta molekula tamainaren arabera izango da. Molekula handienek EtBr gehiago izango dute tartekatuta eta argiago ikusiko dira. Pisu molekularreko markatzaile bat gehituko dugu beti; gure DNA zatiaren tamaina estimatu ahal izateko.



Agarosa gel bidezko DNA kuantifikazioa ez da guztiz zehatza. Egokiagoa da espektrofotometria bidez kontzentrazioa kalkulatu eta gel-eko emaitzekin konparatzea.

Konformazioaren eragina

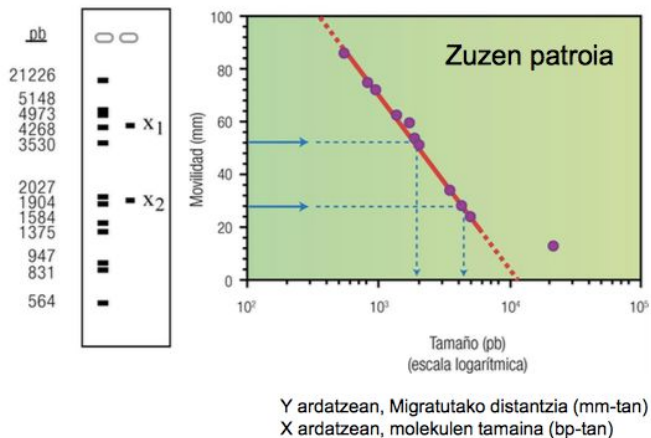
Forma zirkularrek gutxiago migratzen dute, baina superkiribilkatu daitezke, ondorioz konpaktatu eta forma horretan gehiago migratze dute. Forma linearra tartean geratuko da.



Pisu molekularra ebaztea

Intereseko bandaren tamaina estimazio bat da, markatzailearen bandak eredu hartuta. (a) irudian DNA zatien migrazioa ikus dezakegu eta (b) taulan tamaina ezaguneko DNA zatien migrazioa (mm). Tamainaren logaritmoa eta migrazio-distantzia alderantziz proportzionalak dira. Hortaz, zuzen-patroi logaritmikoa eraikitzen da gure intereseko bandaren luzera zehatza kalkulatzeko.

Adibidean, zuzen-patroia eraikitzeko markatzaileak errestrikzio endonukleasak (*Eco RI* eta *Hin dIII*) erabiliz eraiki dira.



Purifikaturiko DNA ez-liseritua eta liseritua

DNA liseritu gabea (lagin bakoititak) banda argiz bereizten da elektroforesian; liseritua (lagin bikoitiak) EZ.

Tamaina eta intentsitate desberdinak

Tamaina handiko DNA zatiek EtBr gehiago tartekatzen dute eta intentsitate handiagoz ikusten dira. DNA zati txiki bat oso intentso ikusten badugu, esan nahi du kontzentrazio altutan aurkitzen dela, zati bakoitzak berez EtBr gutxi hartzeko gaitasuna baitu.

5. Lanabes entzimatiakoen erabilera

DNA nukleasak

DNA molekulak moztu eta degradatu dituzten entzimak dira, fosfodiester lotura apurtzen dutelarik. Endonukleasak barneko fosfodiester loturak apurtzen dituzte eta exonukleasak muturreko fosfodiester loturak.

Adb TAULAN. DNA nukleasen substratoa DNA da beti, baina harizpi bakarrekoa edo bikoitzekoa izan daiteke. Aktibitatea endonukleikoa edo exonukleikoa izan daiteke. *romo* (mutur kamutsak) adierazten ditu, *pr* (mutur itsaskorrak) eta *muescas* (fosfodiester loturak ez dituzten) zatiak.

Enzima	Sustrato		Actividad				Extremo o sitio de actuación			
	DNA	RNA	endo	exo 3'	exo 5'	pol 5'-3'	romo	pr 3'	pr 5'	muescas
<u>DNasas</u>										
Exo de λ	ds (ss)	-	-	-	+	-	+	+	-	-
Exo VII	ss	-	-	+	+	-	-	+(ds)	+(ds)	-
Exo III	ds	-	-	+	-	-	+	-	+	+
Nasa Bal31	ds	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Nasa Bal31	(ss)	-	+	-	-	-	-	+	+	-
Nasa S1	ss	-	+	-	-	-	-	+	+	+
Nasa soja	ss	-	+	-	-	-	-	+	+	-
DNasa I	ss / ds	-	+	-	-	-	-	-	-	-

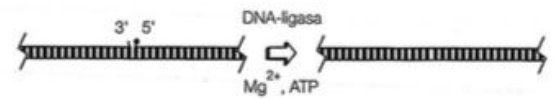
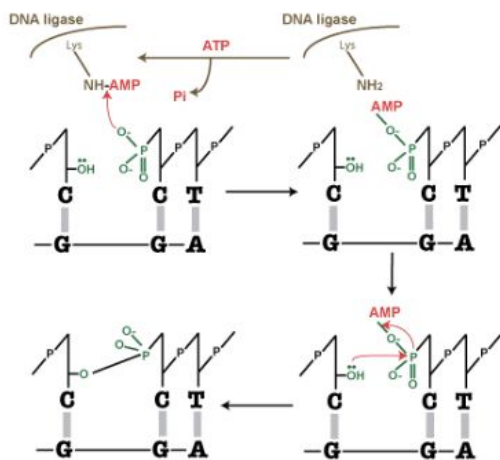
RNA nukleasak

RNA molekulak espezifikoki degradatu dituzten entzimak. RNA oso hauskorra da eta entzima hauek espezifitate handiz jarduten dute.

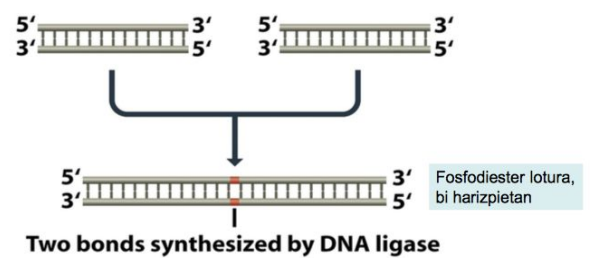
Enzima	Sustrato		Actividad			
	DNA	RNA	endo	exo 3'	exo 5'	pol 5'-3'
<u>RNasas</u>						
RNasa A	-	ss	+	-	-	-
RNasa T1	-	ss	+	-	-	-
RNasa H	-	hibr	+	+	+	-

Ligasak

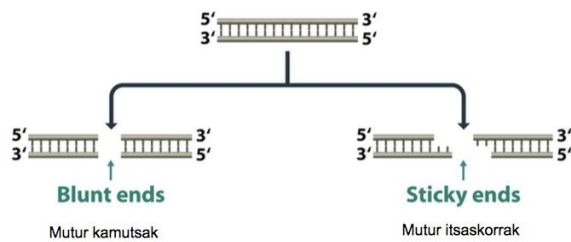
Azido nukleikoen molekulak lotzen dituzte. ATP, Mg menpekoak dira eta temperatura baxuan jarduten dute. In vivo DNA ligasek erreparazio sistema barnean daude; hau da, DNAREN erreplikazioan zehar gertatzen diren hausturak zuzentzen dituzte. In vivo dituzten ezaugarriak (T4 DNA ligasa...), laborategian in-vitro aplikatzen dira, gure intereserako. DNA harizpi bietan jarduteko gaitasuna dute.



Ligation in vitro



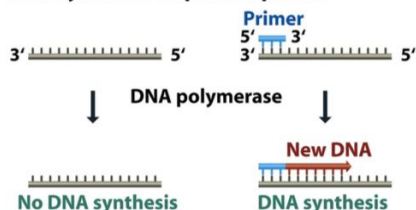
Mutur kamutsak zein itsaskorrek lotu ditzakete, baina azken hauetan eraginkortasun handiagoa dute. Horregatik interesatzen zaigu mutur itsaskorrek lortzea.



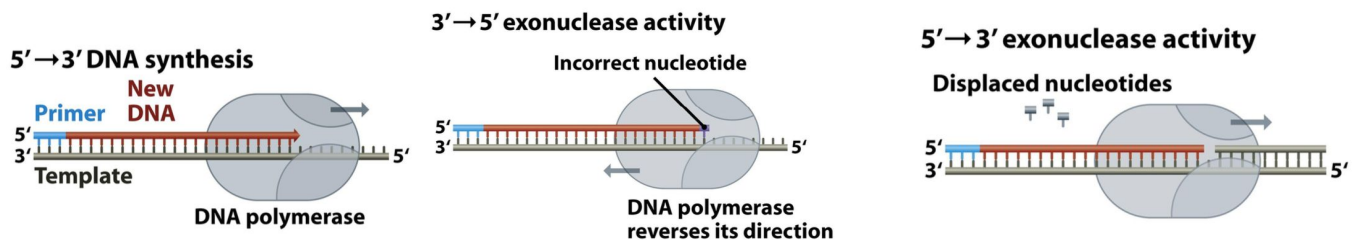
Polimerasak

DNA edo RNA harizpi molde batetik abiatuta, DNA harizpi osagarri bat sintetizatzen dute. Harizpi osagarria sintetizatzen hasteko polimerasa gehienek harizpi bikoizdun zati bat behar dute (haslea edo primer-a).

DNA synthesis requires a primer



DNA sintesi aktibitateaz gain exonukleasa aktibitatea (bi norabideetan, hau da 5'-->3' eta 3'-> 5') dute. Exonukleasa aktibitateaz muturrak kendu eta gero polimerasa aktibitatearekin interesekok sartu (oso erabilia zundak markatzeko) ditzakete.



Polimerasa motak

- DNA pol I: E.coli-tik purifikatua. DNA kate bikoitz baten harizpi bat molde hartuta, bere harizpi osagarria sintetizatzen du. 3'-->5' eta 5'-->3' exonukleasa aktibitatea du. Prokariotoek DNA erreplikatzeko erabiltzen dute.
- Klenow polimerasa: eraldatutako entzima; polimerasa aktibitatea mantentzen du baina ez dauka exonukleasa aktibitaterik. Zunden markaketarako eta sekuentziaziorako erabiltzen da.
- Taq polimerasa: Thermus aquaticus-etik purifikatua. Polimerasa termoegonkorra da; PCR-an erabiltzen da.
- Alderantzizko transkriptasa: Erretrobirusen RNA molekula bat molde bezela erabilia harizpi bakarreko DNA molekula osagarri bat sintetizatzen du. cDNAk lortzeko erabiltzen da.

Enzima	Sustrato		Actividad				Extremo o sitio de actuación			
	DNA	RNA	endo	exo 3'	exo 5'	pol 5'-3'	romo	pr 3'	pr 5'	muecas
<u>Polimerasas</u>										
Pol I <i>E. coli</i>	+	-	-	+	+	+	-	+(exo)	+(pol)	+
Pol Klenow	+	-	-	+	-	+	-	+(exo)	+(pol)	-
Pol de T4	+	-	-	+	-	+	-	+(exo)	+(pol)	-
Pol de T7	+	-	-	+	-	+	-	+(exo)	+(pol)	-
Sequenasa	+	-	-	-	-	+	-	-	+(pol)	-
Pol Taq	+(hibr)	-	-	-	+	+	-	-	+(pol)	-
RT	-	-	+(H)	+(H)	+(H)	+	-	-	+(pol)	-
RNA-Pol T7	-	+(hibr)	-	-	-	+	-	-	+	-
RNA-Pol <i>E. coli</i>	-	+(hibr)	-	-	-	+	-	-	+	-
RNA-Pol II	-	+(hibr)	-	-	-	+	-	-	+	-
	ss / ds									
dNTT	-	-	-	-	-	+	(+)	+	(+)	-
Poli(A)-Pol	-	+(ss)	-	-	-	+	-	+	-	-

DNA aldatzeko gai diren entzimak

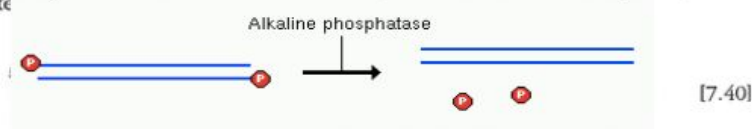
DNAr talde kimiko espezifikoak gehitzen edo kentzen dizkiote.

- Fosfatasa alkalinoa: *Escherichia coli*-tik purifikatua. DNAREN 5' muturreko fosfato taldea eliminatzen du. Kendutako fosfatoak gero markatzaileekin ordezkatu daitezke.

Adb: BAP eta CIP

Propiedades:

- Esta actividad cataliza la eliminación de los restos de fosfato que esterifican grupos OH en posición 5' de NTPs, de dNTPs y de moléculas de DNA y RNA, mono o bicate



Aplicaciones:

- Eliminación de fosfatos en 5', para su sustitución por fosfatos marcados con ^{32}P mediante reacción con quinasa (ver a continuación).
- Eliminación de restos fosfato de los terminales 5' de fragmentos de dsDNA, para impedir su dimerización, polimerización o circularización (capítulos 11 y 12).

- Polinucleotido kinasa: T4-ekin zoldutako *Escherichia coli*-tik purifikatua. 5' mutur askean fosfato taldeak gehitu ditzakete.
- Muturreko transferasa: Txahalaren timotik purifikatua. DNA molekula baten 3' muturrean desoxirribo-nucleotido bat edo gehiago gehitu ditzake.

Azido nukleikoen liseriketa

Azido nukleikoak molekula luze eta hauskorak dira (ohikoak dira pipeteoaren bidezko hausturak). Pipeteoan kontrolik gabeko haustura ematen da, baina badaude liseriketa espezifikorako metodoak:

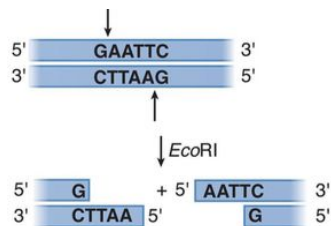
- Fisikoak (mekanikoak, ultrasoinuak)
- Kimikoak (hidrolisi azidoa eta basikoa)
- Entzimatikoak (endonukleasa inespezifikoak eta errestrikzio-endonukleasak)

Errestrikzio-entzimak

Ingenieritza genetikoaren garapenerako oso garrantzitsuak. Endonukleasak dira, sekuentzia espezifikoak detektatzeko eta mozteko gai direnak. Propietate horri esker, DNA errekonbinantearen teknologiako muin bihurtu dira. Errestrikzio-endonukleasek ezagutzen dituzten sekuentzia espezifikoari errestrikzio-gune esaten zaie.

Lehena 1978an identifikatu zen (EcoRI) eta nobel saria jaso zuen hargatik Paul Verger-ek; egun 300 entzima ezberdin ezagutzen dira.

- I motako entzimak: DNAREN bi kateak aleatorioki mozten dituzte errestrikzio guneetik distantzia jakin batera. Entzima hauek, normalean, ez dira DNA errekonbinantearen ikerketan erabiltzen, mozketa gunea ez baita zehatza.
- II motako entzimak: Sekuentzia espezifiko bat ezagutu eta DNAREN bi kateak zehaztasun osoz mozten dituzte errestrikzio-gunean. Mota honetako entzimak dira DNA errekonbinantearen ikerketan erabiltzen direnak, oso zehatzak baitira. Ezagutzen dituzten sekuentziak simetrikoak dira, bi norantzatan berdin irakurtzen dute (palindromoak dira). Batzuek Mg^{+2} erabiltzen dute kofaktore gisa. Sekuentzia palindromikoak 4-8 baseetako sekuentziak izaten dira.



Errestrikzio entzimen izendapena

Generoaren lehenengo letra eta espeziearen lehenengo biak idazten dira. Ondoren, zepa espezifikoa eta zenbakia.

<i>AclI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	AGICT TC1GA	0.3
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	G1GATC C C CTAG1G	7.0
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli R factor</i>	G1AATT C C TTAA1G	3.1
<i>HaeIII</i>	<i>Hemophilus aegyptus</i>	GG1CC CC1GG	0.6
<i>HindIII</i>	<i>Hemophilus influenzae Rd</i>	A1AGCT T T TCGA1A	3.1
<i>NotI</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	GC1GGCC GC CG CCGG1CG	< 9700
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>	C TGCA1G G1ACGT C	7.0
<i>TaqI</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	T11CG A A GCT1	1.4

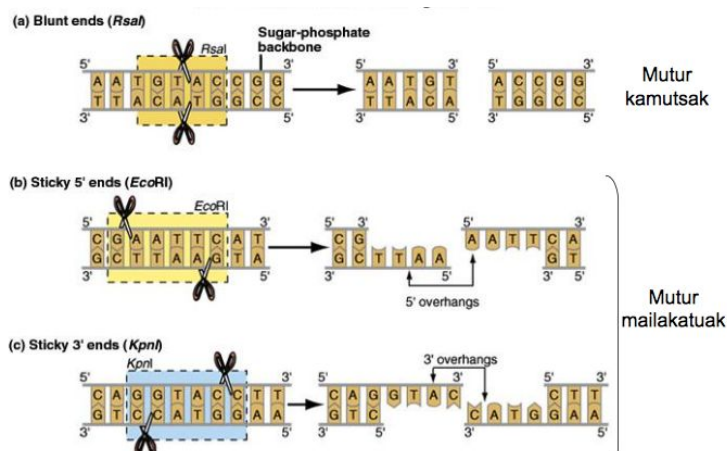
Errestrikzio-entzimen muturrak

- Mutur-kamutsa: DNAREN bi muturrek base osagrietan bukatzen dute entzimak base bikote beretan moztzen baitu. DNA ligasen efizientzia asko jeisten da; horregatik zati ez-itsaskorrek ere deitzen dira.
- Mutur-itsaskorra: entzima batzuek kateak era mailakatuan ebakitzen dituzte errestrikzio gunearen barruan, mutur itsaskorrek sortuz. Nukleotido sekuentzia berdinak dituzten mutur hauek itsaskorrek dira, hidrogeno zubi bidez beste mutur osagarriekin elkartu baitaitezke.

Zure intereseko sekuentzia eta bektorea entzima berarekin liseritzean mutur itsaskor osagarriak lortuko ditugu (klonazioaren oinarria) eta DNA errekonbinantea sortzea posible izango da. Gerta daiteke entzima ezberdinek antzeko sekuentziak ezagutzea.

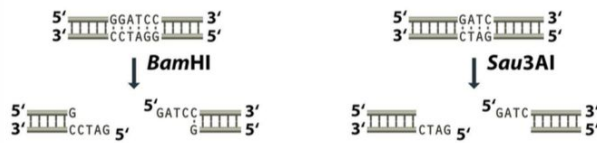
5'overhans (5' muturra kanporantza geratzen denean)

3'overhans (3' muturra kanporantza geratzen denean)



Zure intereseko sekuentzia eta bektorea entzima berarekin liseritzean mutur itsaskor osagarriak lortuko ditugu eta DNA errekonbinantea sortzea posible izango da. Gerta daiteke entzima ezberdinek antzeko sekuentziak ezagutzea.

The same sticky end produced by different enzymes



Mutur mailakatu desberdinak:
osagarritasuna

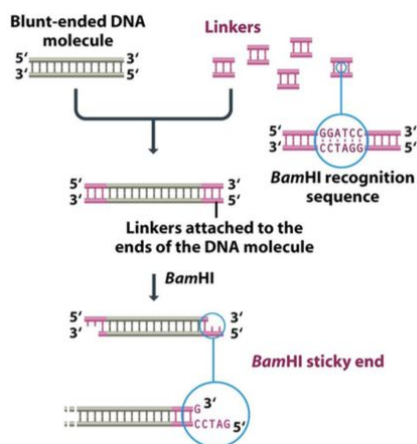
Mutur kamutsek mutur itsaskorrik ez duten arren, molekula errekonbinatuak lortzeko lotu daitezke. Posible da muturreko desoxinukleotidil transferasa entzimaren bidez nukleotido buztanak gehitzea sortu berri diren zatiei. DNA segmentu bati poliA isatsak geituta eta besteari poli-dT hauek osagarriak izango dira eta elkartzea posible izango dugu.

Software ezberdinak daude intereseko sekuentzia mozteko errestrikzio entzimekin (bioLabs) Ensembl (sekuentzia hartu, ta bioLabs-en sartu; zein entzimek mozten duten ikus dezakegu eta nahi izanez gero erosi ditzakegu).

Errestrikzio-guneak sortzea

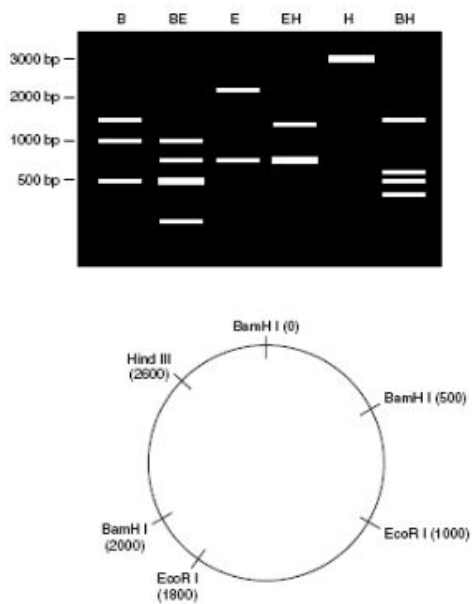
Linker-ak errestrikzio-guneko sekuentzia duten DNA zatiak dira (guk aurrez errestrikzio guneko sekuentzia ezagutzen dugu) eta DNA molekulen muturretan txertatzen dira. Gerora, errestrikzio entzimak gehituta, mutur itsaskorrek sortzen ditugu.

PCR bidez gainera, gure intereseko sekuentzia anplifikatu dezakegu, eta ondoren linker-ak gehitu, oraindik eta mutur-itsaskor gehiago lortzeko.



Errestrikzio analisiak

Mapa genetikoa egiteko erabiltzen dira. Errestrikzio greak identifikatzeko plasmido batean, plasmidoa entzima espezifiko batekin liseritzen dugu eta honek ematen dituen DNA banden luzera aztertuz, mutazioak identifikatu daitezke adibidez. Izan ere, sekuentzia espezifiko bakoitzak errestrrikzio-gune zehatzak sortuko ditu eta banden profil ezberdinak eratuko dira.

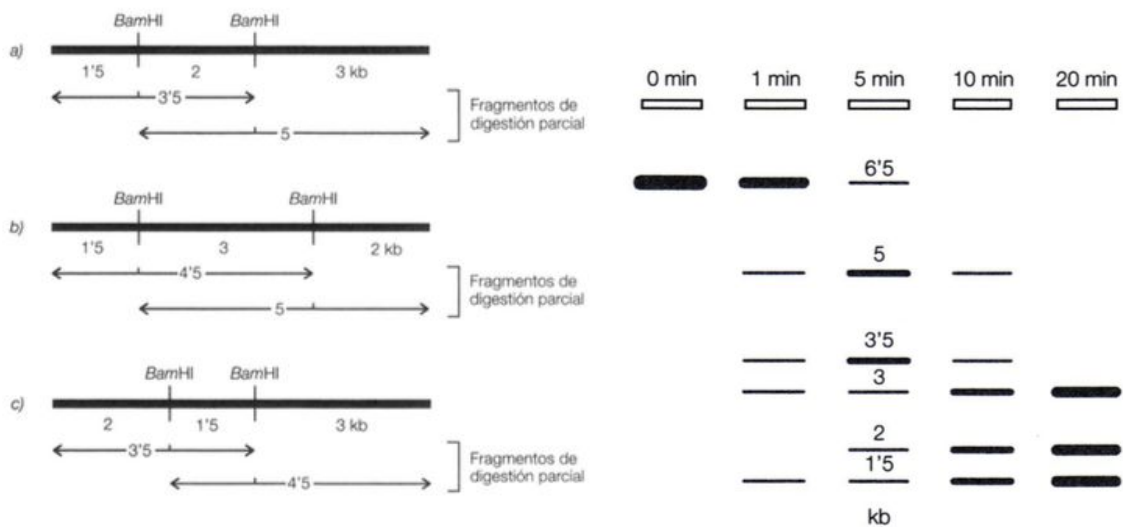


Irudiko adibidean BamHI, EcoRI eta Hind III bidezko liseriketa egin da, eta errestrrikzio-analisia burutu. Banden luzera determinatu behar da lehenengo, ondoren entzima bakoitzaren errestrrikzio-guneak (banda batzuk errestrrikzio-entzima baten baino gehiagoren jardunaren konbinazioz eratzen dira), eta hauen konbinazio posiblea aurkitu beharra dago.

Liseriketa partzialak

Batzuetan entzimak ez du sekuentzia modu berean moztzen leku guztietan.

Nola ekidin? Entzima kontzentrazioa gehituz liseriketan edo liseriketa denbora luzatuz. Irudian ikusten dugu nola zenbat eta denbora gehiago itxaron elektroforesiko banden markaketa hobe dela (normalean aldeztu aurretik finkatuta dator liseriketa denbora baina bestela zuk probak egindazehazten joan beharra dago).



6. Hibridazioa

Azido nukleikoen bi harizpi lotzen direneko prozesua da. Azido nukleikoen DNA zein RNA harizpiak antiparaleloak eta osagarriak direnez, kate bikoitzeko molekula batean elkartzeko gaitauna izango dute hidrogeno zubien bitartez.

Hibridaziorako euskarri batzuk daude, nitrozelulosazko mintzak dira erabilienak. Southern-ean honelako mintzak erabiltzen dira, sekuentzia zehatzakak daude eta hauek zunda bidez markatzen dira. Markatutako zunda osagarria bada gure intereseko sekuentziarekin elkartuko da eta identifikatuko dugu.

Hibridazioaren pausuak:

- Desnaturalizazioa
- DNA monokatenarioa euskarri edo mintz batera itsatsiko da, lotura kobalentez (“crosslink”).
- Zunda markatuaren hibridazioa
- Ez hibridatutako zunda garbitzen da
- Emaitzak aztertzen dira

Desnaturalizaziorako metodoak:

- Tenperaturaren igoera
- Muturreko pHa
- Agente kimikoak (urea, formaldehidoa, formamida...)

Zundak

Hibridazioan, itu-sekuentzia ezaguna da. Hala, zunda molekularra gehitzen da (sekuentzia ezaguneko oligonukleotido markatua; erreaktibitatez, fluorkoiaz edo erreakzio entzimatikoz). Zunda edo “probe”-aren sekuentzia, itu-sekuentziarekiko osagarria da. Hortaz, zundaren markak, hibridazioaren eskualdea detektatzea ahalbidetzen du. Zunda eta itu sekuentziaren artean hibridazio osoa eman daiteke, edo partziala.

Zunden luzera: 14-40 nt

Zehaztasuna: zehastasun (stringency) osoa izan daiteke (zundaren eta sekuentzia ituaren arteko osagarritasun osoa) edo partziala (hibridazio inespezifiko baimenduz). Baldintza esperimentalek zehastasun honetan daukate eragina: tenperatura, hibridaziorako denbora, zundaren kontzentrazioa eta luzera, ingurune kimikoa (pH, urea, formamida,...), e.a.

Zunden jatorria:

- a) Klonatutako DNA
- b) DNA molde batetik abiatuak sintetizaturiko DNA (PCR)
- c) Oligonukleotido sintetikoak (sintesi kimikoa)
(egun gehienak erosi egiten dira)

Zunden markaketa:

Markadorea eta zundaren arteko lotura kimikoa burutzen da, hibridazioaren emaitza behatu ahal izateko. Markaketa mota bat baino gehiago daude:

Markadorearen arabera:

- Erradiaktiboak (32P): P taldeak markatzen dira 5' muturrean

- Fluorkoia: molekula fluoreszenteak gehitzen dira muturretan (taulan adb.). Normalean antigorputzak molekula fluoreszenteak izaten dira, aldez aurretik fluorkoiarekin tratatuak. Detekzioa zuzena da; kasu honetan ez da entzima bidezko erreakziorik indusitzen.

- Kimioluminisizenteak: Gure sekuentzia biotinarekin markatzen dugu, eta honek afinitate handia dauka estreptavidina molekularekin. Peroxidasaren entzima gehitzean gai da bioluminiszentzia erreakzioa katalizatzen substratuaren presentzian. Markaketa ez zuzena da (biotina ez dugulako ikusten).

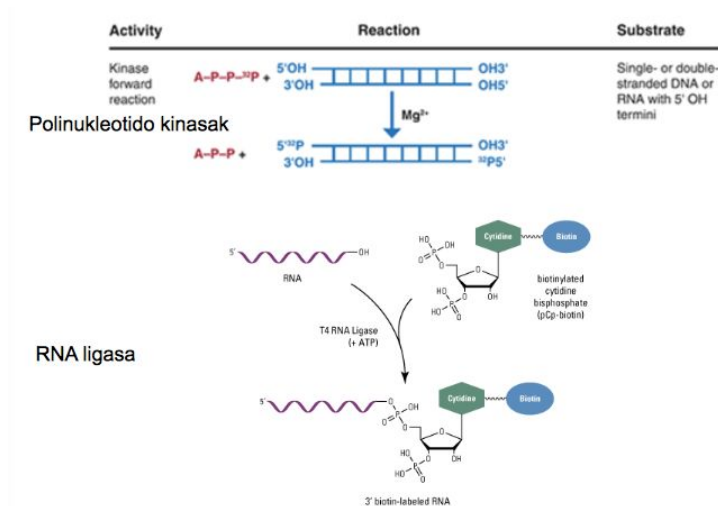
Detekzioaren arabera:

- Zuzena: Marka zuzenean barneratzen da zundan eta hibridazioaren emaitza berehala behatu daiteke.
- Ez zuzena: Bigarren molekula “reporter” behar da zundaren markaketa detektatzeko. Bigarren molekula sistema jakin batekin konjugatzen da, seinale detektagarria lortu ahal izateko.

Markaketa egiteko metodoaren arabera:

- Markaketa muturrean

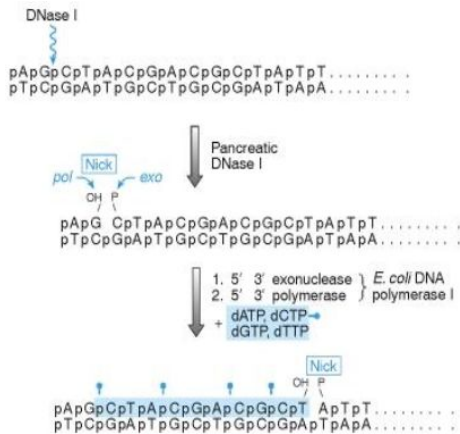
Fosfatasa bidez muturreko P-ak kendu eta kinasak bidez markatutakoak gehitzen dira (polinukleotido kinasak).



- Markaketa zundaren sekuentzian zehar

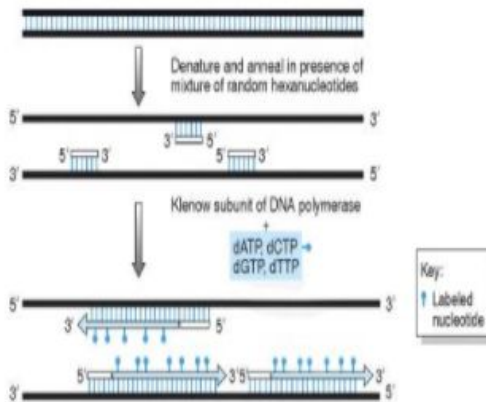
Nick translation

2 entzima erabiltzen dira DNAsa eta DNA polimerasa I (pol eta exo). DNAsak harizpi bateko apurketak eragiten ditu DNAn (zuloak edo nicks), 3'OH eta 5'P taldeak aske utziz. Zulo horrek abiapuntu gisa balio du nukleotido berriak sartzeko 3'OH-n DNA polimerasa I erabiliz. Ondorioz, nick edo zuloa mugitzen da progresiboki DNAn zehar 5'-3' norabidean (DNApolI). Sintesi-erreakzioak markatutako nukleotidoak gehitzea baimentzen du (dCTP) lehenago zeuden nukleotidoen ordez nukleotidoen arteko lotura apurtu eta “nick-ak” eratzen ditu.



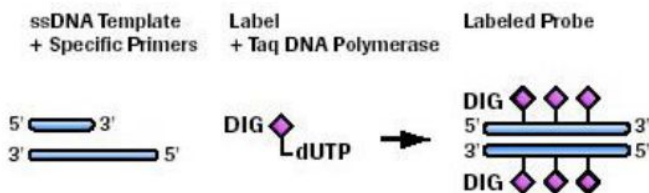
Random primer labeling

Hexanukleotido posible guztien nahastearen hibridazioan oinarrituta. Hasierako DNA desnaturalizaten da eta gero apurka hozten da. Horrela, hexanukleotido bakoitza bere sekuentzia osagarriarekin DNAn lotzen da. Klenow polimerasak DNA sintetizatzen du lau dNTP-en aurrean, non dNTP bat gutxienez markatua dagoen.



PCR edo haslearen hedapenaren bidezko markaketa

PCR-a lau dNTP-en aurrean gertatzen da, non dNTP bat gutxienez markatua dagoen.



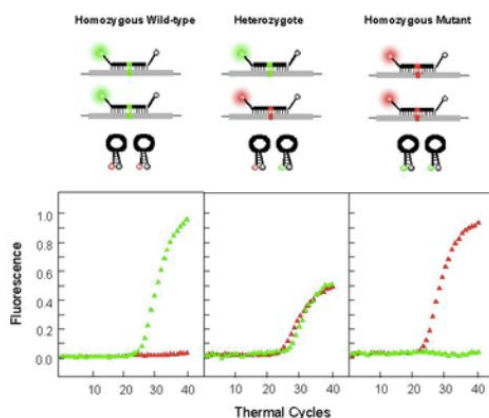
*Markadore kimioluminiszente garrantzitsuenak Biotina-estreptabidina eta Digoxigenina-antiDIG dira. Azken hau alkalina fosfatasa batekin lotzen da, erreakzioa katalizatzean substratuaren presentzian, kimioluminiszentzia lortzen dugu biotinarekin bezala.

Hibridazioaren aplikazioak

- Q-PCR TaqMan teknologiaren zundek, mutazioen detekzioarako balio dute.

Kuantifikatzeko balioa du, momenturo zenbat kopia dauden neurtzen duzu. Fluoreszentzia beharrezkoa da; hau da, DNA sekuentzia bakoitzari fluoreszentzia kolore bat esleitzen zaio eta amplifikazioa behatzen da.

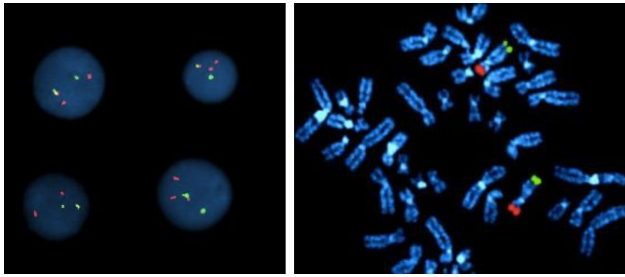
*Quencher-ak reporter-a isiltzen du (hau erregulatu gabe fluoreszentzia denbora guztian emango litzateke).



- FISH

DNA eskualde bat markatzen dugu fluorkoi batean, ondoren zelulak porta batean fixatzen dira. Zunda gehitu eta hibridazioa ematen bada markaketa ikusiko dugu fluoreszentzian. Ospitaleetan amplifikazioak ikusteko edo translokazioak detektatzeko egiten da. Kliniketan oso erabilia da, kariotipoa finkatu gabe detekzioa burutu daitekeelako.

Irudian minbizi bati loturiko, gene baten amplifikazioa ikusi nahi dugu eta gorri markatu da. Berdea kontrol moduan dugu; eta bi markaketa ikusten ditugu; kromatida ahizpa bakoitzeko bat. Gorrian aldiz hiru markaketa ikusten ditugu; amplifikazioa eman da. FISH interfasean zein kariotipoan burutu daiteke, bigarren irudiko kariotipoan genotipo biak identifikatu dira. Zentromeroak ere markatuta ageri dira.



- SKY

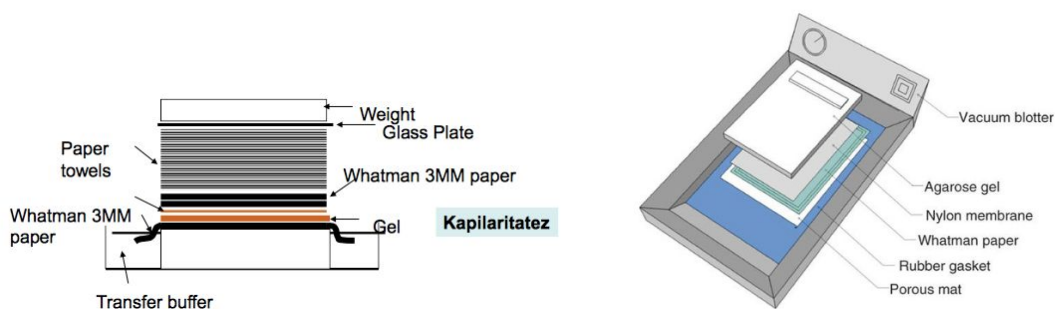
Kromosoma bakoitza detektatzeko fluorokromo konbinazioak erabiltzen dira. Polisomiak ikusteko; minbiziaren azterketan, amplifikazio asko daudenean oso erabilgarria da.

7. Southern Blot

(egun ez da erabiltzen baina oinarria da sekuentzia ezaguneko DNA zatiak detektatzeko)

Edwin Southern-ek 1975an sekuentzia ezaguneko DNA zatiak detektatzeko metodoa asmatu zuen, zunda espezifikoaren hibridazioan oinarrituz.

- DNA genomikoaren erauzketa eta errestrikzioa: Lehendabizi DNA liseritu beharra dago (DNA zatiak lortu) errestrikzio-entzimekin eta emaitza gel batean migratu.
- Pisu molekularren arabeko zatien banaketa (elektroforesia agarosazko gelean) burutu behar da eta zatien in situ desnaturalketa. Desnaturalizatorako tenperatura altuak edo konposatuak gehitzen dira (alkali edo formaldehidoa; pH-a aldatzen dute).
- DNA zatien transferentzia euskarri batean: nylon edo nitrozulosa mintza jartzen da gel gainean eta transferentzia ematen da. Transferentziarako paper xurgatzaileak sartzen dira eta gainean pisua jartzen da.
- Hibridazioa zundarekin: Transferentziarekin gelaren erreplika lortzen dugu baina emaitzak ikusteko zunda bat gehitu beharra dugu (hibridazioz). Zunda eta lagina inkubatu beharra dago eta gero garbitu zaborra kentzeko.
- Zundarekiko osagarria den DNA eskualdearen detekzioa
- Emaitzen analisia: banden tamaina eta kopurua estimatzen da, zundaren itua errestrikzio guneen artean kokatzen da.



Markaketa erradiaktiboaz tratatutako Southern Blotaren interpretazioa:

Ezkerrean elektroforesia, 9 plasmidoren DNArekin eta endonukleasa berarekin liserituak. DNA barreiatua ageri da, sekuentziak ez baitira errepikatzen kopia ezberdinetan. L karrilean pisu molekularren markatzailea kokatu da. DNA zati klonatua (400bp) kokatu da 10. laginean.

Eskubian, Southern Blot-a. 2,3,8 laginek dute gure intereseko genea, besteetan ez baitago gure intereseko sekuentzia barneratuta. Lagin batzuetako bandak beste batzuetakoak baino nabariagoak dira, honek erakusten du klonazioaren metodoa ez dela perfektua izan. 6 laginean errestrikzio-gune berri bat eratu da, bi banda ageri baitira.

Adibideak:

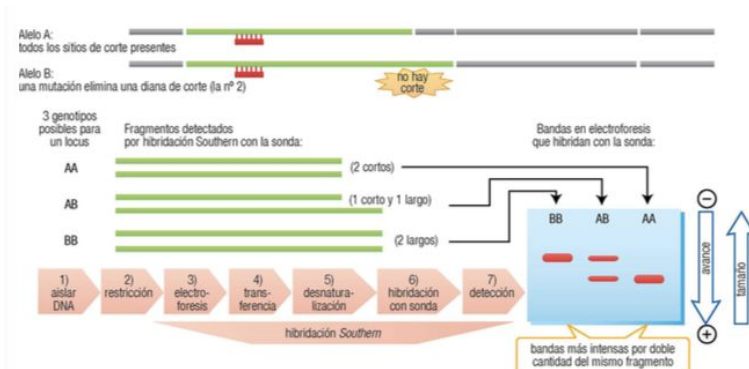
Dot-Blot hibridazioa burutu da biotiniz markatutako laginarekin. Markaketa zehatzagoa da DNA gel-ean bertan gehitu delako. Digoxigeninarekin markatutakoan blot-ak beste bi aldiz hibridatu dira markaketa egin aurretik.

Aplikazioak

RFLP detekzioak burutu daitezke locus bakarrarekiko osagarria den zunda baten bidez. Errestrikzio entzimen bitartez liseriketa (polimorfismoak aldatzen duen errestrikzio gunea detektatzen duen entzimarekin) + Southern blot-az zunda espezifikoa gehitu daiteke.

RFLP-ak *Restriction fragment length polymorphism* (errestrikzioaren zatiaren tamainan aldakortasuna erakusten duten sekuentziak) dira. Aldakortasuna errestrikzio gune batean dago eta errestrikzio gunea agertzen edo desagertzen da genotipoaren arabera.

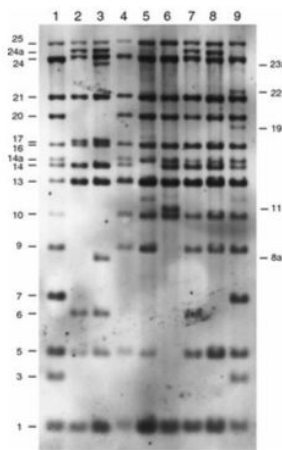
Mutazioen detekzioak RFLP-en bidez burutzen dira (gogoratu beti locus bakarrarekiko osagarria den zunda erabili behar dugula). Egun RFLP Southern bidez egin beharrean PCR bidez egiten da. Intereseko sekuentzia anplifikatu eta errestrikzio entzimak gehituta mutazioen detekzioa azkarragoa da.



Multilokus zunda bat erabiliz mikroorganismo andui ezberdinak identifikatu daitezke adibidez.

Aldakortasun eskualde asko aldi berean identifikatzeko erabiltzen diren zundak izaten dira; 10-15 nukleotidotako zundak eta bakoitza eskualde polimorfiko batekiko osagarria izango da. Lortzen den banda profila pertsona bakoitzeko espezifikoa izango da (DNA fingerprint edo hatz genetikoa).

Prozesua beti berdina da: Liseriketa → Zunden hibridazioa → Analisia

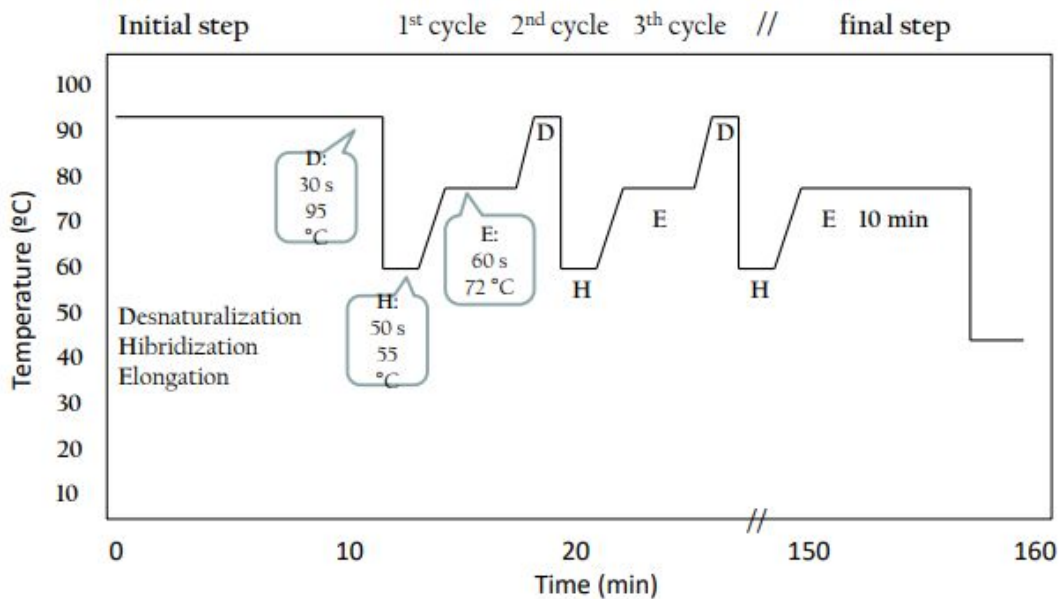


3.GAIA: DNAREN *IN VITRO* ANPLIFIKAZIORAKO TEKNIKAK

PCR teknikaren deskripzioa

PCR teknika 1985an sortu zen Kary Mullis-en eskutik (1993an kimikako Noble saria irabazi zuen). PCR (polymerase chain reaction) gen edo DNA zati baten anplifikazioa da.

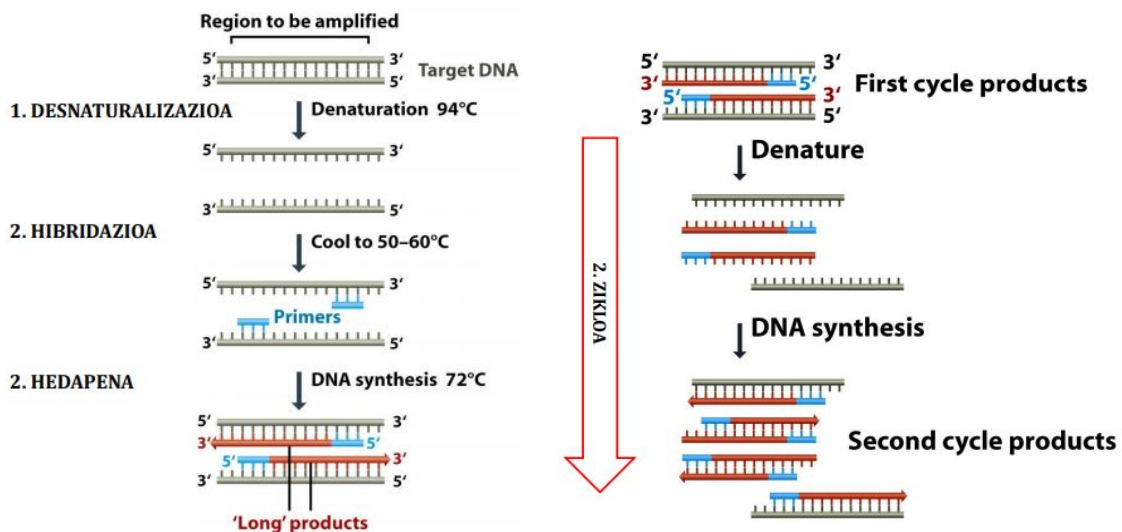
Erreakzioa gauzatzeko hainbat pausu jarraitu behar dira, hauek temperaturarekin erregulatzen dira denboran zehar.

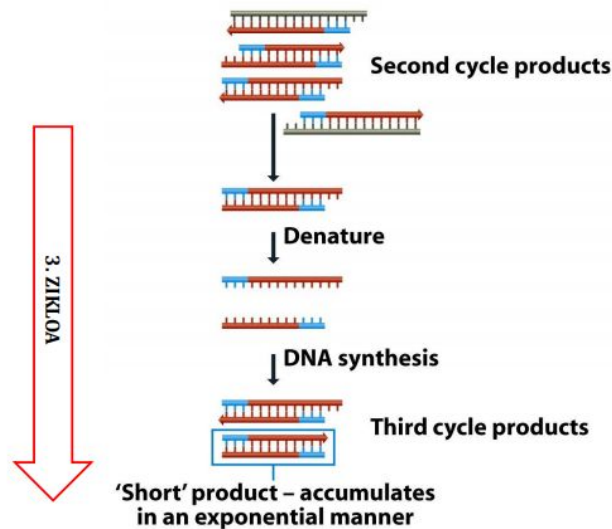


3 fasetan banatzen dira zikloak. Lehenengoa, DNAREN desnaturalizazioa da bi harizpiak banatzeko. Desnaturaizazioa 30s eta 95 °C-tara ematen da. Harizpiak banatezean urrengo pausua hasiko da, hibridazioa. Hibridazioan, primerrak txertatuko dira bi harizpietan; hasleen sekuentziaren arabera tenperatura aldatzen da. Hala ere, normalean 50s eta 55°C-tara jartzen da. Zikloa bukatzeko, hedapena gertatzen da. Polimerasak lan egiten du eta DNA kate berriaren luzapena gauzatzen du nukleotidoak gehituz, beti tenperatura berdinean 72°C eta 60 segunduz.

Hau guztia hasteko lehendabizi entzimak aktibatu behar dira 10 minutuz 95°C-tara. PCRA amaitzeko 72°C-tan mantentzen da. Normalean 35 ziklo egiten dira PCR bakoitzeko.

Azpiko irudietan ikusten den moduan, 3. zikloan hasiko dira produktu laburrak agertzen. Hau gertatzen da azkenean muga bat dagoelako. Hasieran, polimerasak jatorriko DNAREN kopia egiten du eta ez dauzka mugarik. 2. zikloan, kopia berrien helongazioak egiterakoan hasleen sekuentziatik primer-era arte egingu dute helongazioa. 3. zikloan, primerrak izango dira mugak DNA kate berriak sortzerakoan. Produktu laburrak exponentzialki akumulatuko dira.





PCRa perfektua bada, hazkuntza esponentziala gertatuko da ziklo bakoitzean bikoizten direlako dauzkagun kopiak. Hasieran 2 kopia edukita, 1 zikloaren ostean 4 kopia edukiko ditugu Loading.... Hau 35 aldiz egiten badugu: Loading...bilioi kopiak.

Erabiltzen den polimerasa Taq polimerasa da, *Thermus aquaticus*-en polimerasa. Honen erabilpena tenperaturarekin zerikusia dauka. *T.aquaticus* tenperatura handietan bizi da, beraz bere polimerasak tenperatura altuetan erresistentea da. Arrazoi honengatik erabiltzen da Taq polimerasa.

Erreakzioaren osagaiak eta baldintza orokorrak

Erreakzioan honako osagaiak erabiliko ditugu:

- dNTPak → A,G,C eta T
- Hasleak (oligo edd primer)
- Mg²⁺ (polimerasaren kofaktorea baita)
- Tanpoia (erreakzioaren pH-a mantentzeko)
- Taq polimerasa
- DNA moldea (anplifikatu nahi duguna)
- Termozikladorea

Hasleen diseinua

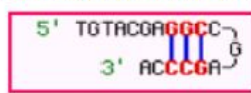
Intereseko DNAREN sekuentzia ezagutu behar dugu (behintzat muturreko sekuentzia) eta hasleak DNA harizpiekiko osagarriak izan behar dira. Ez dira guztiz osagarriak izan behar, itxasten badira nahiko izango da.

Haslea laburregia bada leku askotan hibridatu daiteke eta luzeegia bada hibridazioa ez da izango behar besteko sendoa izango. Luzeera egokia 18-24bp inguru izango da (espezifikotasuna ziurtatzeko).

Anplikoia 3kb baino gutxiago izan behar ditu, eta ahal izatekotan 1kb baino gutxiago (PCR-aren efizentzia egokia izateko).

Hasleen arteko osagarritasuna zein auto-osagarritasuna ekidin behar da:

- Auto-osagarritasuna (gutxienez 3 base): tolesdurak, begiztak (kate bikoitzduneko egiturak). Honek, hasle eta DNA moldearen arteko hibridazioaren efizentzia txikitzen du.



- Bi hasleen arteko osagarritasuna: hasleen dimerok murrizten dute anplifikazioaren eraginkortasuna. lehiakideak direlako (eragina bereziki kaltegarria 3' muturretan gertatzen bada, DNA polimerasa han bertan lotu behar delako).



Hasleen Tm-a (T melting) haslearen baseen erdia DNA ituarekin hibridatuta dagoeneko tenperatura da.

$$T_m = 4*(G+C) + 2*(A+T) \quad (\text{ez da beharrezkoa ikastea})$$

Hasleen Tm-a kalkulatzeko tresna bioinformatikoak eskuragarri daude. Hasle bikotekideak Tm antzekoa eduki behar dute ($\pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) eta 50-65°C artean, termozikladorean bakarrik tenperatura bat jarri ahal delako. Horrek esan nahi du G:C-kopurua antzekoa dela eta %50-%60 artean dagoela.

Hasleen sekuentziari dagokionez, hurrengo datuak kontuan hartzen dira:

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

Hasleen degenerazioa erabilgarria da adibidez, organismo ezberdinen gene bera anplifikatzeko. Hau lortzeko hasle berdinak sortzen dira, baina 2 edo 3 baseetan desberdintasunak eduki ditzazkegu.

ADIBIDEZ: 5'-TCG AAT TCA CCY AAY TGR CCN T-3'

Y = pirimidinak = C / T

R = purinak = A / G

N = nukleotido = C / G / A / T

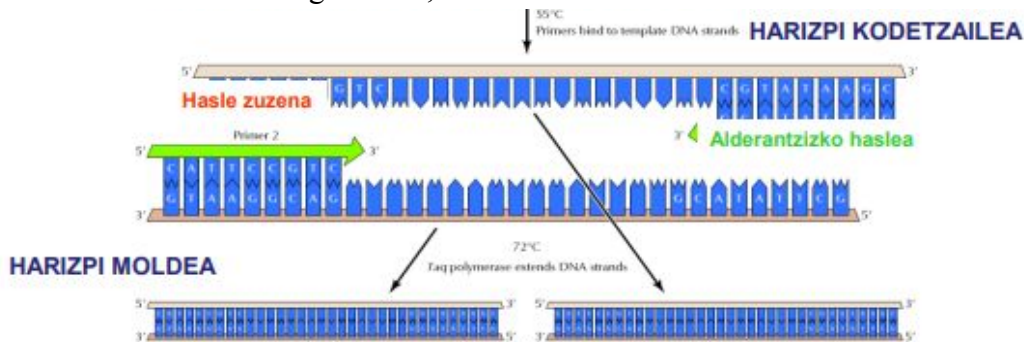
Aplikazioa: Adibidez, organ ezberdinen gene anplifikatzeko
--

Adibidean ikusi dezakegu haslean Y R eta N baseak dauzkagula. Base hauek nukleotido desberdinak edukiko dituzte. Beraz, hasle batean R basean A edo G eduki genezake. Hauen

konbinazioak hasle desberdinak sortuko ditu. Azkenean hasle desberdinek DNA zati desberdinekin lotuko dira.

Kontuan hartzeko beste baldintza bat hibridaziorako T da (T annealing), hasleen Tm-ren arabera izango da: gutxienez 50°C-takoa izan behar du.

Hasleen nomenklaturari dagokionez, hasle zuzena eta alderantzizko haslea edukiko ditugu:



Hasleak idazterakoan, alderantzizko haslea aldrebes idatzi beharko dugu, hau da, 5'-tik 3'-ra.

Hasleen diseinua pausuz pausu, online lanabesen bitartez

Genea bilatzeko NCBI edo Ensembl web orriak erabiliko ditugu. Lortzen dugun genea beti sekuentzia kodeztailea izango da 5'→3'. Behin genea eskuragarri daukagula FASTA formatoan deskargatuko dugu. Hau eginda, Primer3 programan sartuko dugu informazioa eta hasleak bilatuko ditu (programan parametro desberdinak bilatu ahal ditugu ere: hasleen luzeera, Tm-a...).

```

No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
Hasle zuzena (FW) OLIGO          start  len    tm      gc%    any    3' seg
LEFT PRIMER        6349   20     59.99   55.00   5.00   0.00  CAACGACTCCTTCCTGCTTC
Alderantzizkoa (RV) RIGHT PRIMER    7334   19     61.02   57.89   4.00   3.00  TCACCAGGAGCATGTCAGC
SEQUENCE SIZE: 10099
INCLUDED REGION SIZE: 10099

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

```

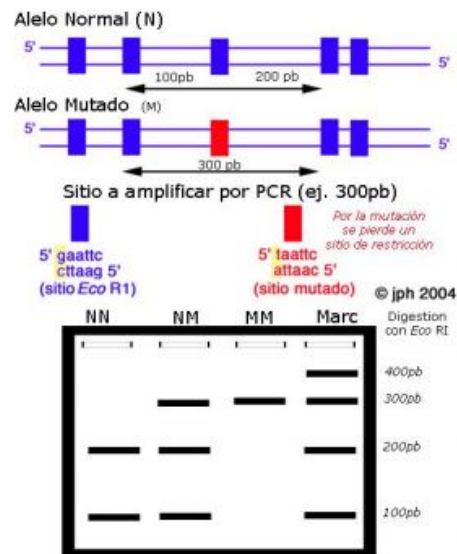
```

1  GCCCCACGCTCTGCAGGAAGAGATCATGGGGCGGGGAGTTGGTGCTGCGGCCTCGTTCC
61  TCTCTGCAGTGAGTGAACGATGTTTGTGGTCAGCAGGAGCCTGTGGGGAGCACAGGCTGG
121 TCCTCCTGGTGTCCCACCCACCCCTTTTTCCATGGGGATCTGCACCTCATCTCCAGGGAA
181 GATGGTTGGGAGATAACCCACGCTCTAGGTCCCCACCCCTCCACAGCCAGGGTGGTC
241 CGTGGTGAGCTTCAGCCATCGAGATGCGGGAGTCTGCTAGAGTCTTCAGGGTCTTTTCTC
301 TGAAATGACAGGCTAGCAAGGAGACCTGGGTCCCTGCCTCTTCCATTCCAGATGCCTT
361 GAGTCCACCCAAATAGGGGATGTGATGTTTGGAGCTGCAGCAGCCGCCCTACGGTTGGGA
421 GTCAGAGAAGAGCCGGTGTTCACGGGACAATGCAGCAGAGGCTGAGCCAGGCTGCTGT
481 CCTGAGAGGTGGCTGGATCACTGACACTTTGGCAGTGGTGCTGGGGTTTATGTCATGACC

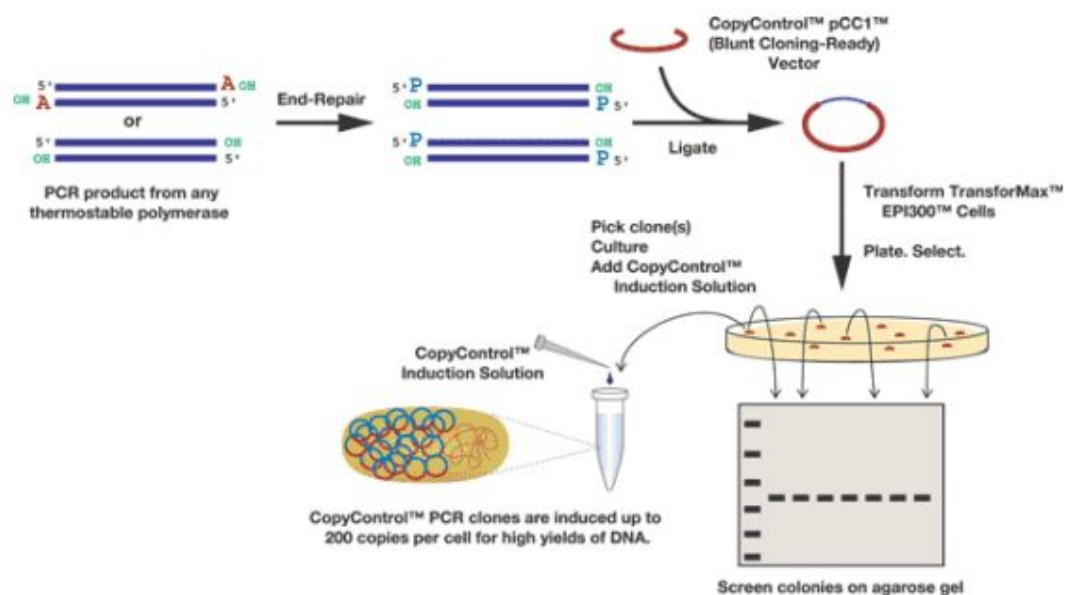
```

PCR-aren aplikazioak

- Genotipoen detekzioa RFLP-en bidez:
Anplifikatuak izango diren gene desberdinetako batek itu-gune polimorfikoa barneratuta izan behar du bereizketa egiteko. Beraz, primerrako itu-gune polimorfikoaren bi aldetara diseinatu behar dira. Behin PCR-a eginda, itu-gune polimorfikoaren liseriketa gauzatu da, bi gen desberdinak bereiztuz.



- PCR anplifikatuaren klonazio zuzena:
Plasmidoak erabiltzen dira aplikazio honetan. PCRaren produktuak plasmidoarekin lotuko da mutur kamutsak direla medio. Hau egiterakoan, plasmidoak kultibatuko ditugu zelula berezietan eta gero ikusi ea nahi dugun genotipoa daukan. Bukatzeko, guri interesatzen zaigun genea daukan kultiboa hartuko dugu eta beste zelula berezietan sartuko ditugu klonazioak egiteko.



- PCR anplifikatuaren klonazio zuzena, TOPO bektorea:

Kasu honetan TOPO bektorea erabiliko dugu, zein bere 3' mutrean topoisomerasa bat daukan. Beraz, PCR produktua gehitzerakoan bektoreari lotuko da topoisomerasaren laguntzaz eta azkenean topoisomerasa banatuko da bektorea eta PCR produktua bakarrik utziz.

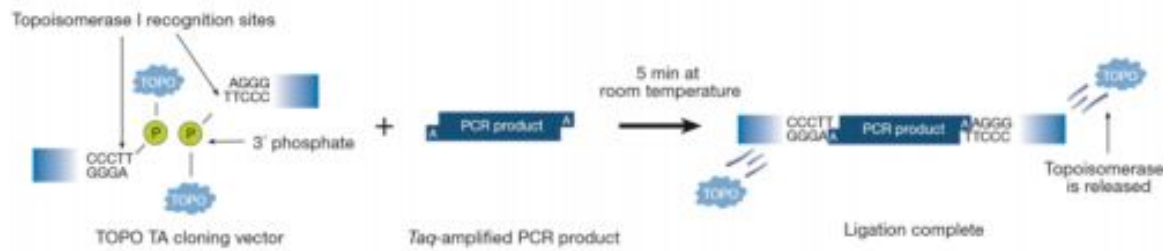
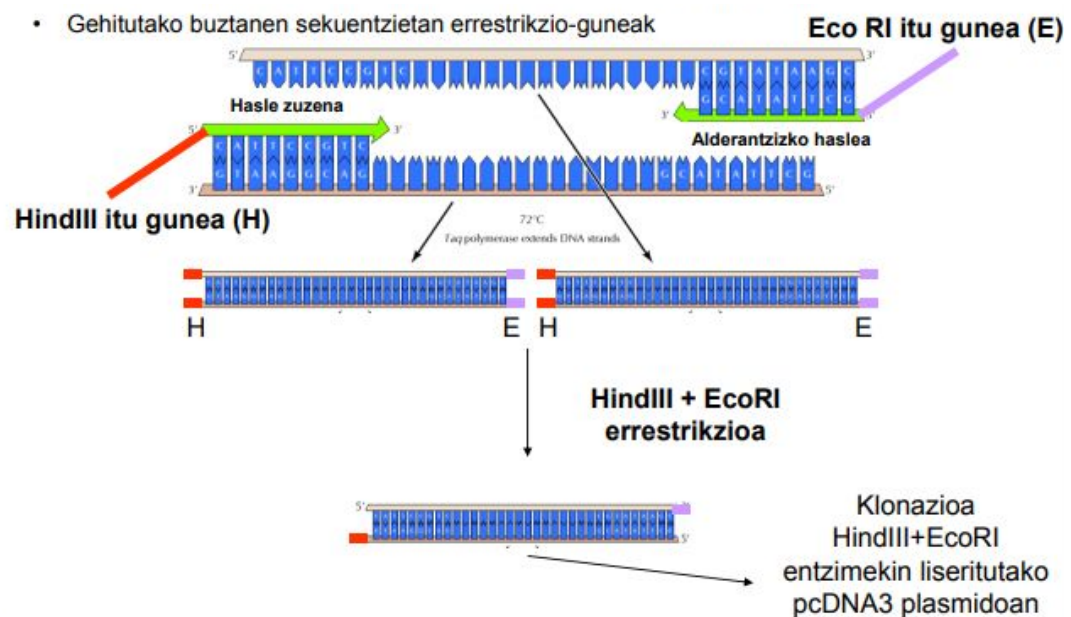
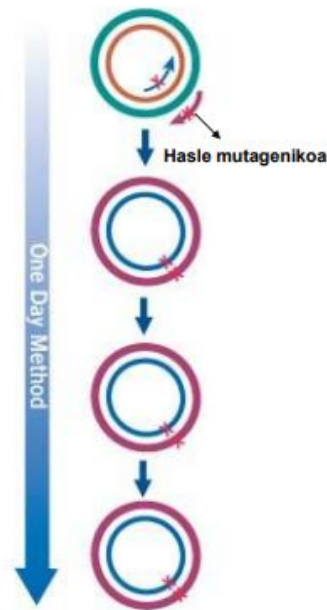


Figure 2. TOPO TA cloning of Taq-amplified DNA.

- PCR produktuen klonazioa errestrikzio-guneak gehituz
Hasleen sekuentziari ito DNArekiko osagarriak ez diren buztanak gehituko dira. Gehitutako buztanen sekuentzietan errestrikzio-guneak edukiko ditugu.



- PCRaren bidezko zuzenduriko mutagenesia
PCR egiterakoan diseinatzen diren hasletan interesatzen zaigun mutazioa sartzen dugu. Honela errestrikzio gune berriak sortuko ditugu



DNA bakterianoaren detekzioa

Baliagarria da ausentzia/absentzia detektatzeko. Hala ere, karga bakterianoa jakiteko ezin dezakegu erabili.

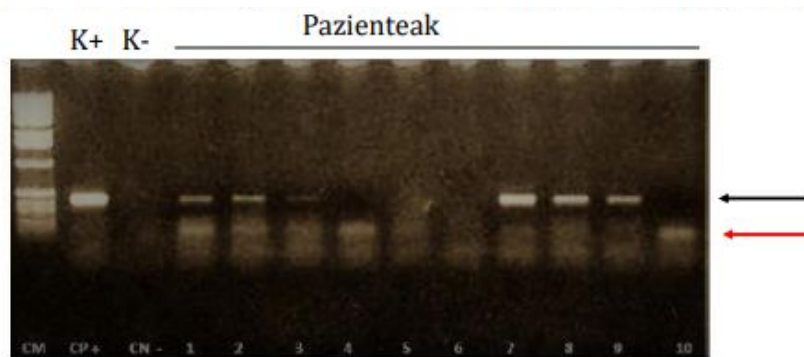


Figura 1. Perfil electroforético de amplicones PCR especie específica de Porphyromonas gingivalis en agarosa (1%) con Bromuro de Etidio. CM: marcador de peso molecular CP: Control positivo cepa de referencia Porphyromonas gingivalis ATCC® 33277™ CN: Control negativo. Calles 1,2,3,7,8,9 muestras clínicas Porphyromonas gingivalis detectable. Calles 4,5,6 muestras clínicas Porphyromonas gingivalis no detectable (REVISTA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA 26. ISSN N° 1668-7280 - Vol. X N° 1 - 2017)

Irudian ikusi dezakegunez, arro beltzak DNA bakterianoa dagoela azaltzen du; gorria, ordea, adierazten du ez dagoela DNA bakterianoa.

PCR: DNAREN kuantifikazioa

Zergatik PCR estandarra ez da kuantitatiboa? Zehaztasun, sentikortasun eta erresoluzio baxua daukalako; automatikoa ez delako; pisu molekularren araberako desberdintasuna, ez sekuentziaren araberakoa da; etidio bromuroarekin egindako kuantifikazioa ez da oso fidagarria; amaipuntarako analisia, erreazioaren saturazioa dakar.

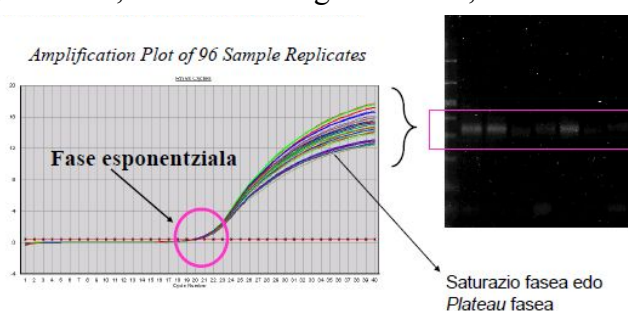
PCRAREN zinetika

3 fase daude:

- Fase esponentziala: 2^n kopia sintetizatuko dira ziklo bakoitzean,
- Fase lineala: Erreaktibioak agortzen doaz, amplifikazioa ez da kontstata.
- Saturazio fasea: Ez da amplifikaziorik emango, nahiz eta PCRaren zikloek aurrera egin.

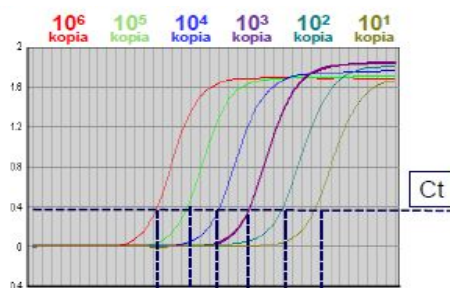
PCR estandar batean amaierako puntua ikusten dugu emaitzetan, saturazio. Fase horretan, sintesia oso aldakorra izan daiteke. DNA kopurua neurtu behar badugu eta QPCR erabilgarriagoa da.

Fase esponentziala berdina da gene guztietan. Saturazio fasea oso aldakorra da, entzimaren efizientzia aldatzen delako. Gene kopurua berdina da hasieran eta amaieran abaniko bat irekitzen da, PCR produktua ezberdina. Ziklo kopurua aldakorra da (entzimaren efizientzia jaisten da, erreaktiboak agortzen dira, desnaturalizazioaren efizientzia jaisten da, ...)



5.- Real Time PCR edo qPCR

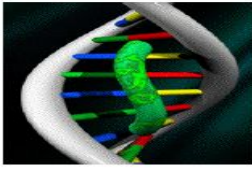
PCR bariantea, DNAREN amplifikazioa ikus daitezke PCR kuantitatiboa batean ekoizten den heinean. Itu sekuentziari fluoroforoak (zundetan edo askeak) itsatsiko zaizkio eta amplifikazioa gertatzen den heinean fluoreszentzia askatuko da. Termozikladoreak laser bat du fluoreszentziaren emisioa neurtzeko. PCR arruntarekin ezberdina da produktuak txikiagoak (100bp) direlako eta prozesu azkarragoa (1h) delako.



qPCR-aren efizientzia %100 bada, esponentziala izango da, hau da, produktua ziklo bakoitzean bikoizten da. Zenbat eta DNA molde gehiago egon hasieran, DNA produktu gehiago sortuko dira. Zenbat eta DNA molde gehiago, lehenago neurtuko fluoreszentzia. Oro har programa antzekoa da: 30'' 95°C, 30'' 60°C, 30'' 72°C (> 30-40 zikloak)

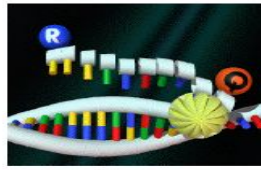
Kuantifikaziorako erabiltzen diren molekulak

SYBR® Green



- Inespezifikoa
- Harizpi bikoitzeko DNA molekulari itsasten da

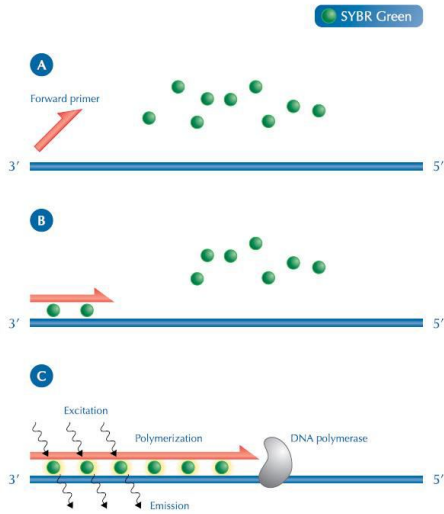
TaqMan® zundak



- Espezifikoak
- Diseinatzen dira DNA itusekuentzia espezifikoki lotzeko

a) SYBR green

PCRan hasleekin batera gehitzen dira SYBR green molekula fluoroforoak. Molekula hauek aske daudenean ez dute ia fluoreszentiarik emititzen eta hauek harizpi bikoitzeko DNAr lotzen dira. Hasleek DNA itusekin hibridatzen dutenean eta polimerasak DNA molekula berria sintetizatzen duen heinean, SYBR Green molekulak DNAr lotuko dira.

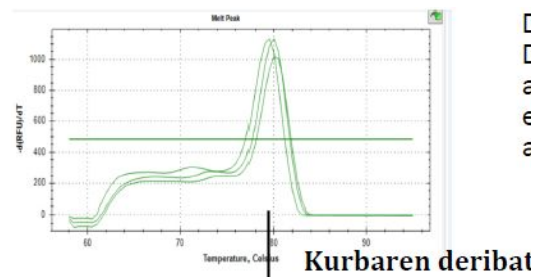
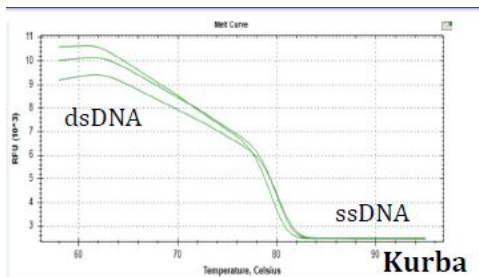


Termozikladorean dagoen sensoreak 498 nm ra kitzikatuko du SYBR Green molekulak eta 522 nm tara irakurriko du emititutako argia → Askatutako fluorezentzia anplifikatu den DNA kopuruarekiko proportzionala izango da. (DNA ++, fluoreszentzia ++)

Abantailak: Oso merkea da → PCR estandararen erreaktibo berdinak erabiltzen dira + SYBR Green molekulak

Desabantailak: Oso inespezifikoa da, edozein kate bikoitzeko DNAr lotzen da, beraz erreakzioan primer dimeroak sortzen badira, SYBR Green hauei itsatsiko litzateke seinale ez-espezifikoa sortuz. Kuantifikazioa gainestimatu.

Nola identifikatu daitezke primer dimeroak SYBR Green erabiltzerakoan? **Disoziazio kurba** T asko igotzen da, DNAREN desnaturalzioa eman arte. Anpliko bakoitzak T_m ezberdina izango du eta desnaturalizazioa ezberdina izango da kasu bakoitzean. Desnaturalizazioarekin batera, fluoreszentzia murrizten da. Hala kurba bat lortuko dugu:



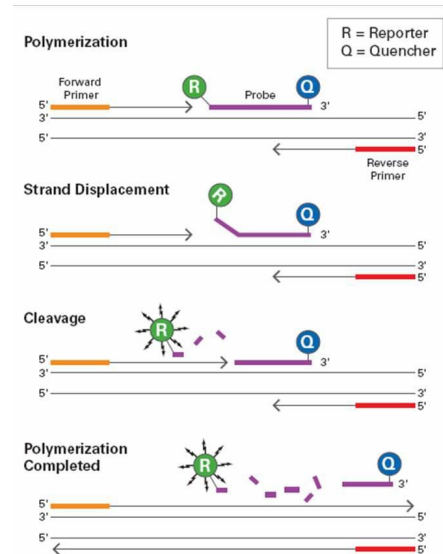
Primerrak behatzeko kurbaren deribatua kalkulatzen da. Bertan pikoak ikusiko ditugu, anpliko bat piko bat izango da eta bi badaude anpliko ezberdinak daude. Pikoak melting T adierazten du. PCR egin eta gero egingo dugu hau, behin anplikoia lortuta. Beste ziklo bat egiten da hau ikusteko. Bi piko badaude, errepikatu egin behar da, izan ere SYBR erabiltzerakoan beti eskatutko da T_m → ziurtatzeko arazorik ez dagoela.

SNPak identifikatzeko erabili daiteke, SNP badago bi aplikoi ezberdinak izango ditugu Tm ezberdinarekin kasu bakoitzean .

b) TaqMan zundak

Oso espezifikoak dira, **osagarriak** izateko diseinatzen dira. TaqMan zunda fluorokloro batekin dago markatuta (R) . Beste muturrean quencher-a dagoen eta kolorea ixilitzen du fluoroklorotik gertu dagoenean. *Quencher* eta Fluoroforoa banatzean, kolorea azalduko da.

Zunda aplikoian hibridatzen da eta baita hasleak. DNA polimerasa sintetizatzen hastean, zundarekin topatzen da eta zunda degradatzen du (fluoreszentzairen muturrean) eta hori askatzean kolorea emango du. Fluoreszentzia proportzionala da DNA kopuruarekiko.



Abantailak:

- Espezifikotasuna
- PCR multiplex egin daiteke → *Pozillo* batean bi gene ezberdinekiko osagarriak diren bi zunda erabilia (fluoroforo bakoitzak gene bat markatu)
- SNP-en analisisia egin daiteke: “*Allelic discrimination assay*” (?)

Desabantailak:

- Zundak garestiak dira
- Aztertu nahi den sekuentzia bakoitzarentzat zunda bat diseinatu behar da.

Definizioak

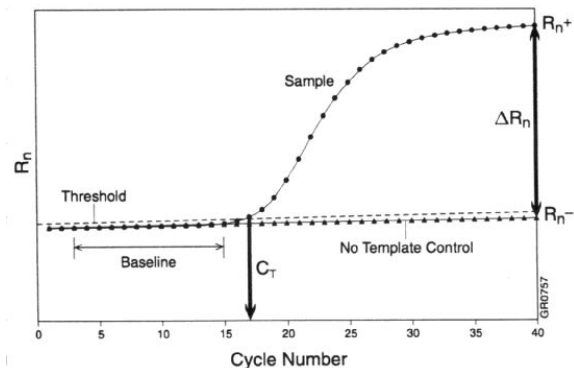
X ardatzean ziklo zenbakia eta Y ardatzean fluoreszentzia

- Baseline: Oinarrizko fluoreszentzia. PCRaren lehenengo zikloetan gertatzen da. (Residual)
- Threshold: Fluoreszentzia-ataria, fluoreszentzia neurtzeko maila minimoa.

→ Bi hauek aparatua neurtzen ditu ←

·Rn: Fluoreszentzia seinalea normalizatuta. Zundaren seinalea/erreferentzia seinalea.

·Ct: *Threshold Cycle*. Beharrezko den ziklo kopurua (muga zikloa) amplifikazio-kurba bakoitzak fluoreszentzia-ataria lortzeko. Laginaren fluoreszentziak une batean threshold zeharrikatu du. Lagin bakoitzak Ct ezberdina du, zenbat eta DNA gehiago, Ct txikiagoa.

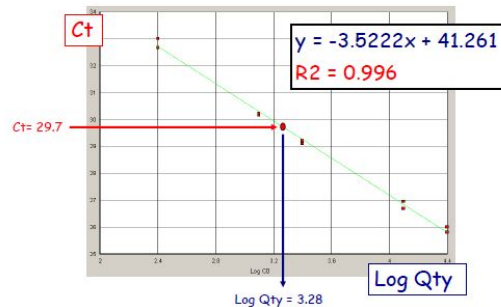
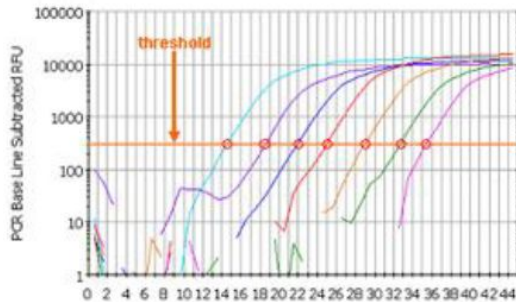


Normalean qPCR egiterakoan 3 erreplika egiten dira, Plateau fasea oso aldakorra.

Fase esponenziala, kurba bat da, eta eskala logaritmikora pasatzen da zuzen patroia lortzeko.

Kuantifikazio absolutu edo erlatibo izan daiteke baina, DNArekin **absolutua** egin ohi da, molekulen zenbakia determinatu nahi delako. Horretarako kurba estandarra behar dugu. Nola lortu?

Hartu lagin bat ng ezagunekin, eta diluzio seriatuak egiten dira, Ct desberdinak lortuz. Datu horiekin zuzen patroia eratu → CT vs. DNA kantitatea, eskala logaritmikoan. Ondoren, kantitatea estimatu.



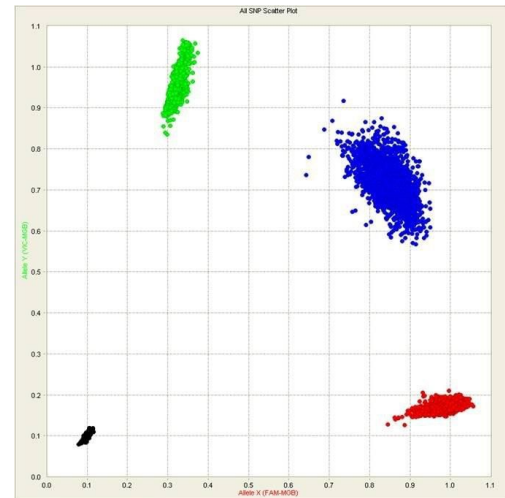
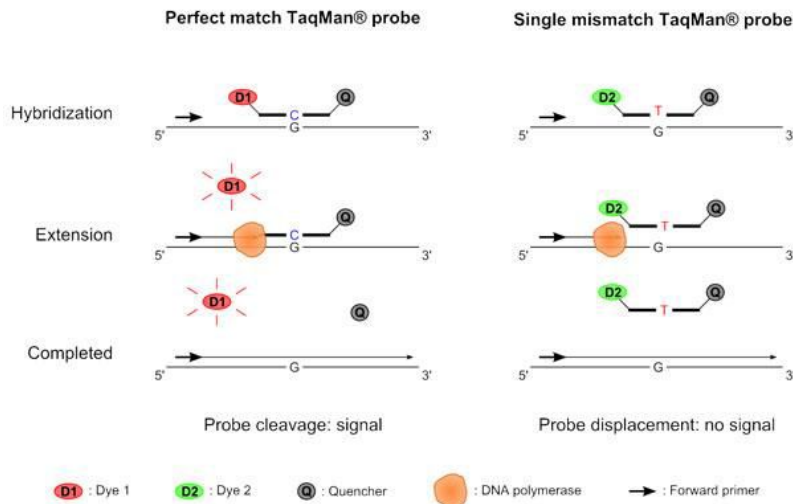
qPCRaren Abantailak:

- PCR programa azkarra (1 ordu)
- Lagin anitz (~200 lagin/egun)
- Kontaminazio arrisku baxua → Behin erreakzioa eginda , erreakzioa egin deneko plaka zigilatuta geratzen da
- Oso sentikorra (DNAREN 3pg)
- Detektatu daitezke muturreko DNA kantitateak (10-10¹⁰ kopia)
- Errepikagarria (CV < %2.0) (CV= aldakortasun koefizientea)
- Emitza kuantifikagarriak
- Software bat datuak tratatzeko
- Ez da PCR arrunta baino garestiagoa (\$15/test)

Desabantiala → PCRbakoitzean estandarrak satu behar dituzu egiten duzun bakoitzean. Efizientzia ezberdin izan daitekeelako PCRen artean.

SNP detekzioa qPCR bidez

Alelo bakoitzak zunda bat izango du, fluoroforo desberdin batekin, TaqMan zunda. Eskala handiko genotipaketak ere egin daitezke eta hauetan SNP bakoitzeko irudi bat.



6.-Sekuentziazioa

DNA zein RNA molekula baten sekuentzia ezagutzeko. Metodo erabilienak:

-Didesoxi metodoa edo Sanger en metodoa → Gaur egun ez da erabiltzen.

Hasieran sekuentziatu nahi zen sekuentzia ez zenez ezagutzen, bektore batean klonatzen zen eta bektorearen sekuentzien osagarriak hartzen ziren hasle gisa.

-Metodo automatikoa (Sanger metodoan oinarrituta)

-Pirosekuntziazioa

-Next Generation Sequencing

Sanger sekuentziazioa

-**DNA molde**a (sekuentziatu nahi duguna) **harizpi bakarrekoa**: kantitate handia behar dugu beraz bektore egokia behar da berau klonatzeko

-**DNA erreplikatzeko entzima**: normalean T 4 fagoaren DNA polimerasa I DNAPol I)

- **Erradiaktiboki markaturiko haslea**: 20 nukleotido inguruko oligo laburra DNA moldearen osagarria izan behar du baina hau ezezaguna de novo sekuentziazioa den bezala bektorearen sekuentziaren osagarria den hasle bat erabiltzen da

- **4 nukleotidoak (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)**: batzutan haslea markatu ordez nukleotido bat markatzen da

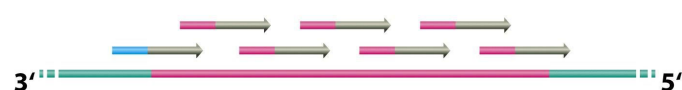
- **Didesoxi nukleotidoak (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)**: desoxierribosaren 3 muturreko hidroxilo taldea galdu duten nukleotidoak dira Sintetizatzen ari den kate berrian txertatu daitezke baina haien ondoren ezin da nukleotido gehiagorik gehitu sintesia amaitzen delarik

Hasleak:

(A) A universal primer



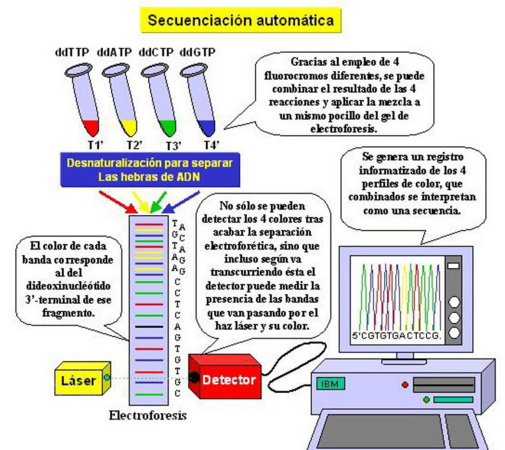
(B) Internal primers



Sekuentziazioa hasteko gure DNA moldeak, primerrak, dNTPak, ddNTPak eta DNA erreplikatzeko entzima gehitzen dira. Sekuentziazioan tamaina ezberdinetako zatiak sekuentziatzen dira, denak ddNTP an amaituta. Gero gel batean migratzen ziren eta txikienetik (behetik) handienera sekuentzia bat lortzen zen $5' \rightarrow 3'$. Kontuan izan behar da lortuko dugun hori harizpiarekiko osagarria izango dela.

Sekuentziazio automatikoa

Sanger metodoan oinarrituta dago baina fluoreszentzia erabiltzen da erradiaktibitatearen ordez. dNTP bakoitza fluoroforo desberdin batez markatzen da eta zatiak kapilar estuan migratzen dira. Kapilarean laser bat dago eta fluoroforoa detektatzen du eta elektroforesi gel batean txikienetik handienera migratuko dute. Migrazioaren datuak ordenagailuan agertuko dira.



Bandak elektroforesia martxan dagoen bitartean irakurtzen ditu detektoreak irakurritako bandak kapilaretik irteten utzi daitezke analizatu ahal den nukleotido kopurua handitzen delarik. 300 2000 nukleotido inguruko molekulak sekuentziatu daitezke. Kromatograma da lortzen den irudia.

Kromatograman mutazio bat azaltzen bada, 2 koloretako pikoak agertuko dira gune berean, bain bat oso txikia. SNP bat badago, tamaina bereko bi tontor egongo dira.

Genomen sekuentziazioa

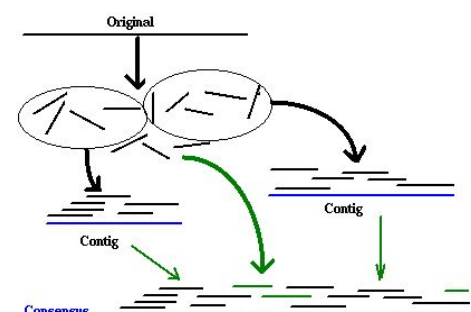
Giza genomaren sekuentziazioan 2 talde zeuden: publikoa eta pribatua. Publikoak irabazi zuen eta horregatik interneten dago patenterik gabe. Sekuentziazioa 1993 hasi zen eta 2002 urtean amaitu.

- Human genome project: Publikoa zen eta sekuentziazio hierarkikoa erabili zuten.
- Celera: Pribatua, Genoma osoko sekuentziazioa (shotgun) erabili zuten.

a) Sekuentziazio hierarkikoa

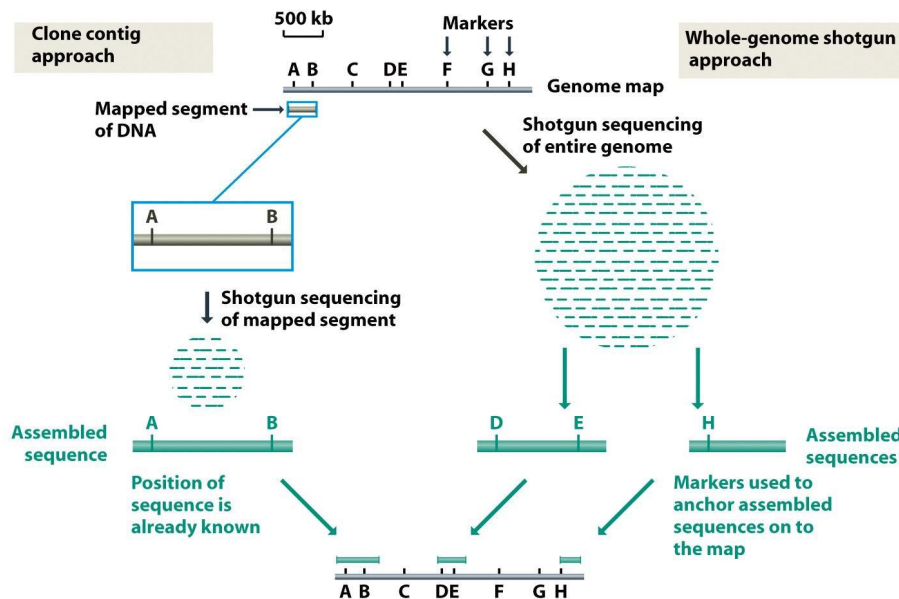
Lehenengo genomaren mapa eraikitzen zen kromosometan zehar milaka erreferentzia puntu hartuz markatzaile gisa. Markatzaile hauekin zehazten da ati bakoitza zein kromosomatan dagoen → Mapa genetikoa

Gero, genomaren kopia asko zatitu egiten dira errestrizio entzimen edo sonikazioaren bitartez (50 200 kb). DNA zati luze horiek bektoretan txertatu egiten dira (BAC, PAC ...) klonak lortzeko → liburutegia. Bektoren horiek erabiltze dira, klonatu nahi diren sekuentziak handiak direlako.



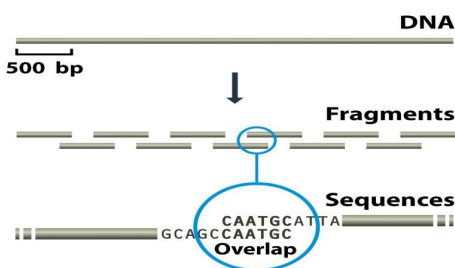
Klon horiek zatikatu egiten dira zoriz eta zati bakoitza sekuentziatu egiten da (Sanger). Zati desberdinetan gainjartzen diren sekuentziak identifikatu eta BACaren sekuentzia osoa osatzen da. Aldi berean BACak ere gainjarri egiten dira bata bestearekin. Irakurketaz irakurketa, BACez BAC eta kromosomaz kromosoma genoma osoa irakurtzen da. Azken pausu hau ordenadorez egiten da.

Gainjartzen diren zatien mihizkaketa egiten da Contig-ak eratuz eta gero Contig-en arteko mihiztaketa egiten da *consensus sequence* lortuz.



b) Shotgun sekuentziazioa.

Genoma osoa zoriz zatitu egiten da mekanikoki kopia ugari lortuz. Hiru tamaina desberdineko zati liburutegiak sortzen dira 2 kb, 10 kb eta 50 kb ko zatiak eta hauek plasmidoetan sartu daitezke. Liburutegi bakoitzeko klonak zoriz aukeratuta sekuentziatzen dira. Zati bakoitzaren muturrak deskodetzen dira (500 bp) eta hainbat algoritmoren bitartez zatiak mihiztatu egiten dira kromosoma guztiak irakurri arte.



6.-Pirosekuentziazioa

Sekuentziazio proiektu handien agerpenak bultzatu zuen sekuentziazio teknika azkarragoak eta merkeagoak garatzea. 90.hamarkadaren erdialdean. Teknikaren oinarria erreakzio kimioluminiszenteetan dago. Izan ere argia askatzen da eta argi hori sekuentzia berriari gehitzen zaizkion nukleotido kopuruekiko proportzionala da.

Osagaiak

- DNA **harizpi bakarra** behar dugu beraz desnaturalizatu egin behar da.
- Primer/Hasle espezifikoa behar dugu, polimerasak funtzionatzeko.
- Bufferra
- dNTPak, baina kontuz! banan-banan sartzen dira.

·Entzima ezberdinak

- DNA polimerasa → Kate berria sintetizatu eta pirofosfatoak (PPi) askatu
- ATP sulfurilasa → APS + PPi → ATP bihurtu.
- Luziferasa → ATP+ luziferasa → Argia (oxiluziferasa)
- Apirasa

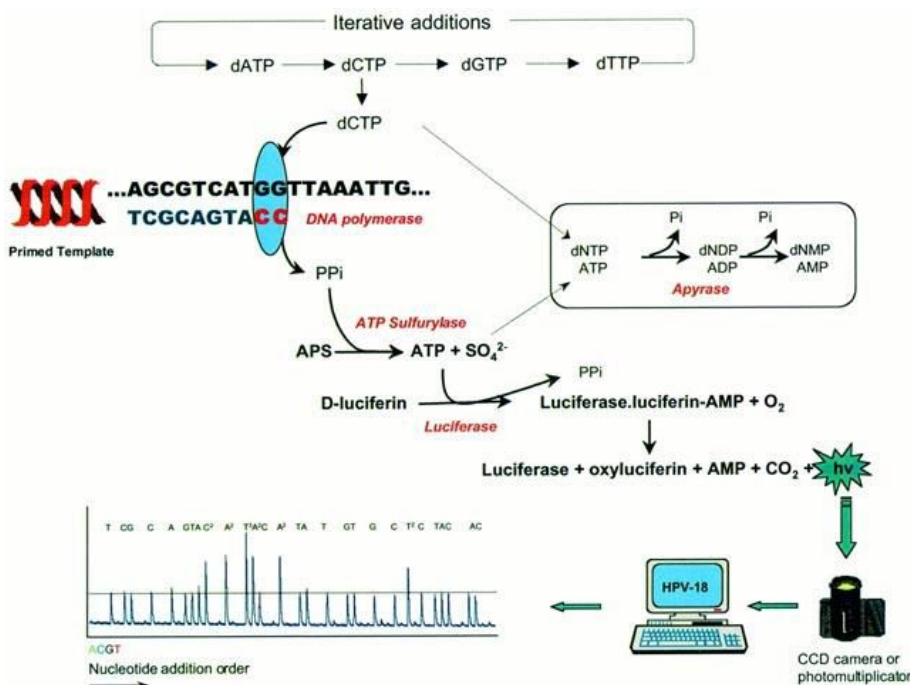
·2 Sustrato

- APS
- Luziferina

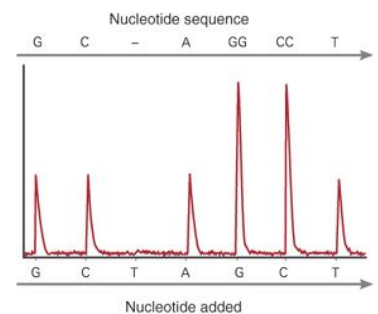
Prozesua

Ziklo ugari ematen dira eta bakoitzean mota bateko nukleotidoak gehituko dira. Nukleotido jakin hori katera gehitzen bada PPi bat askatuko da. APSaren presentzian, ATP sulfurilaskak ATP bilakatuko du. Sortutako ATP hori sustrato gisa erabilita, luziferasak liziferina oxiluziferin bilaketzen du: Argia. Argi hori kamarak detektatuko du eta grafikoan adieraziko da. Apirasak gehitu ez diren nukleotidoak degradatuko ditu ziklo berria asteko.

Nukleotidoak orden zehatz batean joango dira gehitzen behin eta berriro. Gehitzen badira eta ez bada katean lotzen ez da pikorik egongo. Ordea katean jarraian 2 dCTP sartzen badira pikoa bikoitza izango da. (Kontuan hartu sortzen dena, originalarekiko osagarria dela)



Pirograma



Metilazio detektatzeko sekuentziazioa (bisulfito tratamendua)

Pirosekuentziazioa metilazioa detektatzeko erabilgarria da.

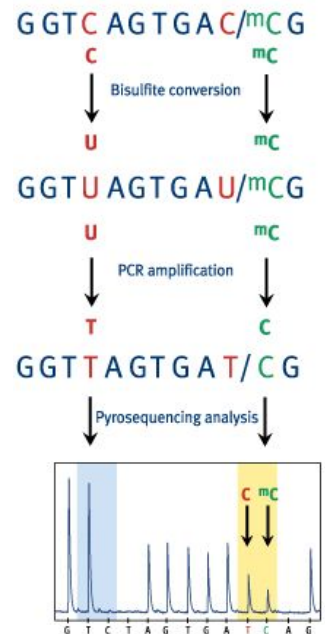
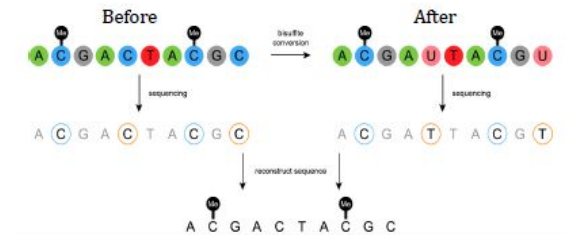
Metilazioek gene isilpena eragiten dute eta C nukleotidoetan gertatzen dira, CpG irletan.

Prozesu honetan sodio-bisulfatoarekin tratatzen dira sekuentziak:

- Zitosina urazilo bihurtzen da, C → U. Sekuentziazioan ordea osagarri agertu: T
- Metilzitosina (mC) zitosina bezala adierazten da. C → C

Tratamendua eman ondoren PCR egiten da kopia asko lortzeko, gero desnaturalizatzen da eta ondoren sekuentziatu. Sanger sekuentziazioa esan genuen kualitatiboa zela baina prosekuentziazioa kuantifikatiboa da, metilazio kopurua behatu daitekeelako.

Hortaz sekuentziak lehenengo sodio-bisulfito gabe tratatzen dira eta XC agertzen dira. Produktuarekin tratatzean, ageriko diren C bakarrak metilatutakoak izango dira.



Berez, metilazioen identifikazioa egiteko, ordenagailua erabiltzen da. Bertan sekuentzia ezaguna jartzen duzu eta adierazten diozu gune batean C edo T agertuko dela. Bi pikoak agertzen badiira esan nahi du zelula ezberdinak daudela.

De novo sekuentziazioa bada, lehenengo nukleotido bat gehiuta eta ez bada argirik lortzen hurrengoan lortuko da.

Sekuentziazioa egin aurretik, PCR eta desnaturalizazioa gertatutakoan gure sekuentziak pote batean ditugu baina bertatik harizpi bakarra nahi dugu. Nola lortu?

Primerra biotinarekin markatuta hartzen da. Mandoan estreptamidina dago eta hala intereseko harizpia hartzen duzu. Haslea markatuta erosten duzu. Kartutxo bat erabiltzen da 4 entzimak eta dNTPak (aparte) aparatuan sartzeko.

7.-Next Generation Sequencing (NGS)

Edozein azido nukleikoko sekuentziazio masiboa eskala handian egiten duten teknologia guztiak. Milaka edo milioika reads batera sekuentziatzeko kapaza kostuak txikiagotuz. Plasmidoak ez dira erabiltzen liburutegia sortzeko. Sekuentziatzeko zatietako bi aldeetara barra kode bat (ezaguna den sekuentzia txiki bat), primerrak eta egokigailuak jartzen dira.

Beste izen batzuk ere baditu: *High throughput sequencing*, *Ultra Deep sequencing* eta *Massively parallel sequencing*

4 plataforma ezberdina daude baina pausuak berdinak dira beti, teknologiak aldatu arren.

- 454 (Roche)
- SOLiD Applied Biosystems
- Solexa Illumina
- Ion Torrent PGM (Life Technologies)

Pausuak

1.-**Liburutegia prestatu** behar da. DNAREN liseriketa egiten da sonikazio bidez, zati txikiagoak lortzeko. Sekuentzia ezagun batzuk lotuko zaizkie momentu horretan:

- Primerrak → Anplifikaziorako, berdinak izan daieke.ç
- Egokigailuak → Euskarrira lortzeko
- Barra kodeak → Desnerdinak dira sekuentzia bakoitzerako, identifikazioa.

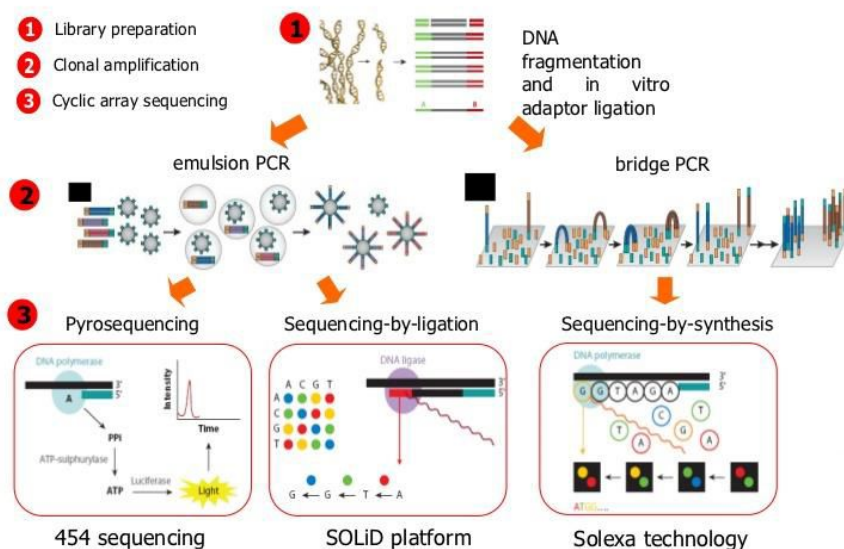
2.-**Anplifikazio klonala.** PCR bi modutan egiten da klon asko lortzeko: Emultsio PCR eta PCR zubia. Plataformaren arabera metodoa ezberdina da.

3.-Sekuentziazioa

3 mota desberdin daude:

- Pirosekuentziazioa *454 sequencing*
- Ligazioaren bidezko sekuentziazioa *SOLiD platform*
- Sintesiaren bidezko sekeuntziazioa *Solexa technology*
- Neurketa elektrikoa *Ion torrent PGM*

Next-generation DNA sequencing



·454 (Roche): Pirosekuentziazioa → Nukleotidoak detektatzen dira argi emisioari esker erreakzio kimioluminiszente baten ondorioz

·SOLiD (Applied Biosystems): Ligazioaren bidezko sekuentziazioa → polimerasa ordeztu ligasa erabiltzen duen metodo entzimatikoa

·Solexa (Illumina): Sintesiaren bidezko sekuentziazioa → fluoreszentiaren bitartez gehitutako nukleotidoak detektatzen dira. Erabiliena

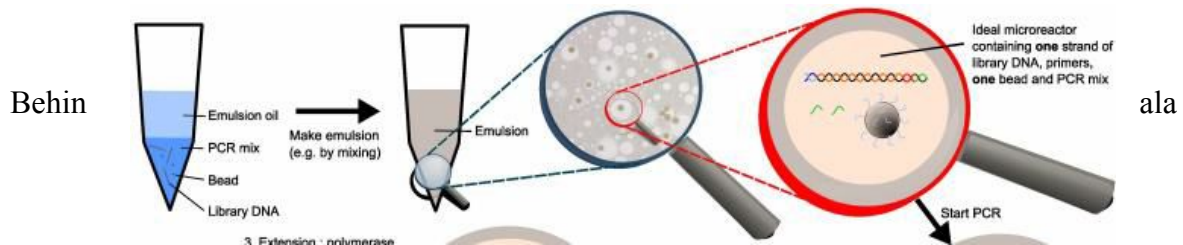
·Ion Torrent PGM (Thermofisher): Neurketa elektrikoa → DNAREN polimerizazioan zehar sortzen diren hidrogeno ioiak detektatzen dira. Ospitaletan asko erabiltzen da, lagin gutxi daudenean.

Emultsio PCR

Erreakzio-nahastea olio-ura emulsioa da. Nanoesferak eraten dira eta bakoitzak egokigailu asko ditu. DNA desnaturalizatu, egokigailuekiko osagarriak diren primerrak eta PCRaren beste osagaiak nanoesferekin kapsulatuak geratzen dira

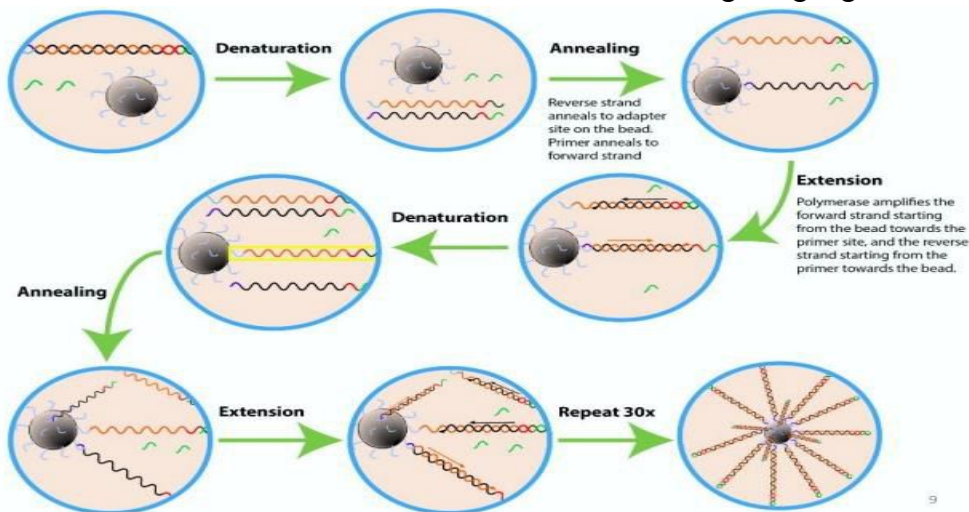
Emulsioaren ondoren anplifikazioa gertatzen da nanoesfera bakoitzak hasierako DNAREN milaka kopia ditu poloniak sortuz.

Hodien liburutegia DNA zatituta daukagu eta sekuentzia bakoitzak bere adaptadorea du. Hodia nahasten da eta tanta bakoitzean nanoesfera (bead) bat, adaptadoreak, PCRrako osagaiak eta DNA zatiak daude.



edukita, desnaturalizazioa emango da harizpiak bananduz. Harizpi bat nanosferaren adaptadore batera lotuko da. Gero harizpi osagarriaren sintesia egingo da. Ondoren berriro ere desnaturalizazioa egingo da.

Ziklo asko egingo dira eta hauetan zehar gero eta harizpi bakarreko DNA gehiago lotuko dira nanosferara. Azken momentuan honi itsatsita sekuentzia ugari egongo dira.

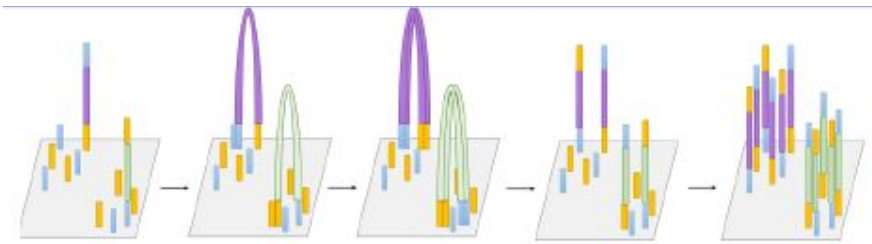


Roche 454 plataformaren kasuan, lehenengo emulsio PCRa egiten da eta gero pirosekuentziak. Honetarako, nanoesfera bakoitza “potillo” batean sartuko da eta bertan irakurri.

PCR zubia (Illuminakoa)

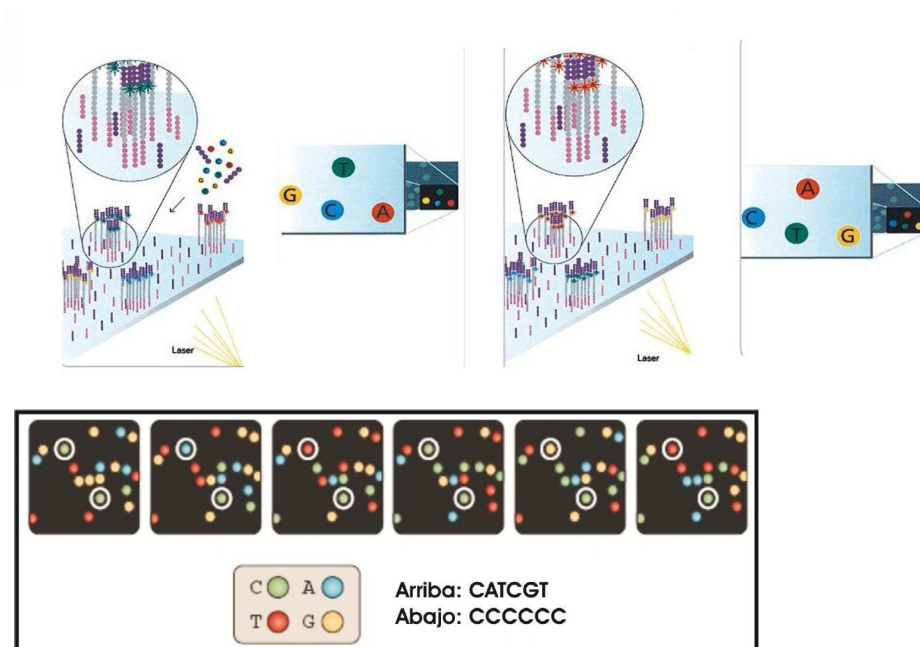
Beirazko plaka batean intereseko DNAREN adaptadoreekiko osagarriak diren sekuentziak lotuta daude. Polimerasak egokigailu horiek hasle gisa erabiltzen ditu eta kate osagarria sintetizatzen du intereseko DNA lotuta geratzen. Desnaturalizazio ziklo berri bat gertatuko da segidan. Horren ondorioz kate desnaturalizatuak muturrak beste lotutako egokigailu batzuekin elkartuko dira zubiak sortuz.

Prozesu hau errepikatzen da *clusters* sortuz.



Iluminaren kasuan amplifikaziorako PCR zubia erabiltzen da eta gero sekuentziazioa sintesi bidez. Nola egiten da hori?

Fluorkoiekin markatutako nukleotidoak gehitu beirazko plakara eta markatutako nukleotidoa DNARA gehitzen den bakoitzean argia azalduko da. Nukleotido horrek sintesia blokeatzen du eta garbitu egiten da beira. Ondoren beste nukleotido bat gehituko da. Blokeo hori momentuan bertan gertatzen da baina itzulgarria da.



Nahi izatekotan teknika guzti hauen bideoak daude egelan hobeto ulertzeko. Science fiction.

4. Geneen adierazpenaren analisirako oinarrizko teknikak

Zelula guztiek DNA bera dute, gene kopuru bera. Baina zelula batetik bestera adierazpena aldatzen da, eta honek eragiten du zelulen desberdintzapena.

Zertarako ikertzen ditugu geneak?

DNA zein RNA mailan ematen diren geneen adierazpena aztertzeko erabiltzen diren teknikak hainbat erabilera ezberdin dituzte:

- Garapen estadio desberdinetan edo aldaketa fisiologiko/esperimental baten aurrean gain-adierazten edo azpi-adierazten diren geneak identifikatu.

- Antzeko joera duen gene multzoak (gain- adierazpena/azpi-adierazpena), funtzioa berbera edukitzeko probabilitate altua dauka.
- Gene baten edo gene multzo baten adierazpen genikoaren profila zelularen erregulazio anormalaren markatzailea izan daiteke.

Geneen adierazpen maila konparazio bidez burutzen da beti.

Adierazpenaren analisirako metodoak

mRNA-ren analisisia:

- Northern blot
- RT-PCR/RT-Q-PCR
- *In situ* hibridazioa
- Adierazpen-mikroarraiak, RNAseq

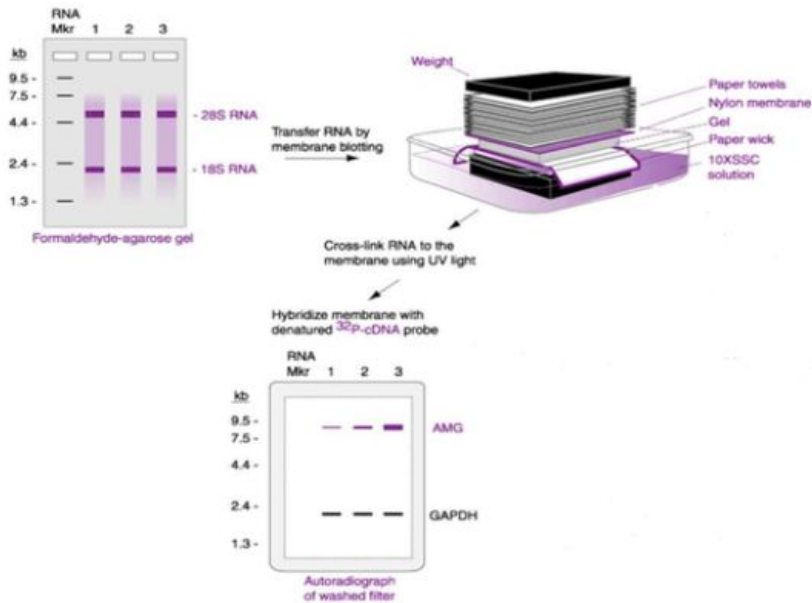
Proteinen analisisia:

- ELISA
- Western blot
- Immunohistokimika
- Proteomika

Northern Blot teknika

Teknika hau RNA mezularia ikertzeko erabiltzen da.

- RNA erauzi gure laginetik
- Erauzitako lagina migratu gel-ean (agarosa + formaldehido). Gel-ean formaldehidoa gehitzeak RNA desnaturalizatzen laguntzen du eta egitura sekundarioak galarazten dira.
- Bandak nitrozulosa zuntz batera pasa behar dira, molekulak kapilaritate ionikoz igarotzeko (southern-ean bezala).
- Argi ultramorea erabiltzen da RNA mintzean inmovilizatu eta lotura kobalenteak eratzeko (RNA eta mintzaren artean).
- Intereseko genearekiko eta endogeno batekiko osagarriak diren zunda erradioaktiboak erabiltzen dira. Gene endogenoarekin emaitzak normalizatzen dira, gainera, gene hori bera erabiltzen da kontrol modura eta kantitate bera jarri dugula ziurtatzeko.
- Zuzenean migratzean bi banda soilik ikusiko ditugu, RNAr-ren bi azpiunitateei dagozkienak. RNAm portzentaia oso txikia da RNA totalarekin alderatuz. RNAr banda hauen azterketak RNA kalitatearen berri emango digute.



2 banda ezberdin ikusiko ditugu, erribosomen azpiunitateak hain zuzen. mRNA egon arren ez dugu ikusiko honen kontzentrazioa oso txikia delako. Behar bada kortina moduan ikusiko da.

Zunda hauek konparatuz, gure intereseko genean tratamendu ezberdinen aurrean eman den adierazpen aldaketa ikus daiteke. Kasu honetan gene endogenoa egokia dela ondorioztatzen dugu gene endogenoaren banda guztiek intentsitate berdina dutelako.

GAPDH: kontrol endogenoa, gene honen adierazpena konstante izan behar da. Kantitate bera sartu dugula adierazten baitigu. Kasu honetan, gene endogenoa egokia dela ondoriozta dezakegu banda guztien intentsitatea berdina delako.

Goiko iruditik ondorengoa ondoriozta dezakegu, gene endogenoa konstante mantendu denez, ziurtatu dugu hiru tratamenduetarako mRNA kantitate bera erabili dugula, beraz AMG generako lortutako emaitzak fidagarriak dira, hau da 3. AMG genearen adierazpena handiagoa izan da 1 eta 2 laginetan baino.

“Housekeeping” geneak edo gene endogenoak

Bi baldintza bete behar dituzte:

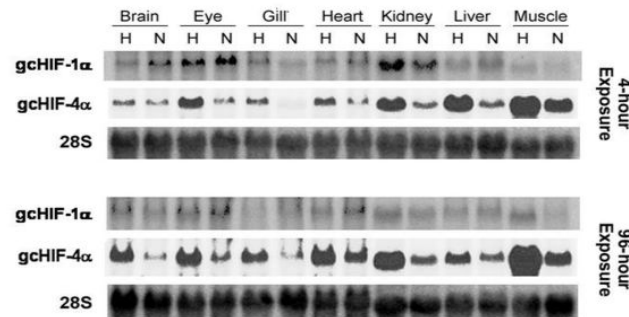
- Adierazpena beti berdina izan behar da egoera desberdinetan. Gene endogenoaren adierazpena konstantea ez bada ezin dugu beste genearen adierazpena handitu dela esan konparaziorako genea faltako genuke, eta anplifikazioa ezingo genuke normalizatu.
- Gene endogenoaren eta intereseko genearen adierazpen maila antzekoak izan behar dira.

Adibideak:

- Glizeraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH): Glikolisian
- Beta-aktina: zitoeskeletoaren osagaia
- RNA erribosomikoa: 28S, 18S

Adibidea: Bi generen adierazpen ezberdintasuna konparatu da hipoxia eta normoxia egoeren artean. 28S erabili da gene endogeno gisa; zeinaren adierazpen konstantea agertzen du tratamendu eta ehun guztietan. Lehenego genearen emaitzetatik ezin dugu ondorio argirik atera, bigarrenaren adierazpena nabarmen handiagoa da hipoxia egoeran.

Halaber, ondoriozta daiteke inkubazio gehiagorekin emaitza hobeak lortzen direla (argiagoak).



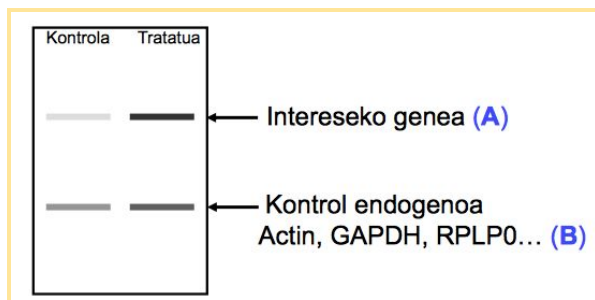
*Kontrol endogenoaren adierazpena ez da aldatzen tratamenduekin, beraz berdina izan behar du lagin desberdinetan. Horrenbestez, aldatzen bada, migratu dugun RNA kantitatea ezberdina izan delako da. Adierazpena konstante mantentzen denean, intereseko genearen adierazpen ratioa kalkula dezakegu.

mRNA kuantifikatzen

Tratamenduak intereseko genearen adierazpenean aldaketarik eragiten du?

Kontrol endogenoaren adierazpena ez da aldatzen tratamenduarekin, beraz berdina izan behar da lagin desberdinetan. Horrek esan nahi du, aldatzen bada, migratu dugun RNA totalaren kantitatea desberdina izan dela.

Kasu honetan ez dugu mRNAren kopuru berdina erabili, kontrol eta tratamenduaren artean intentsitate ezberdintasunak lortu ditugulako. Ondorioz ezin ditugu intereseko genean ortutako kontrol eta tratamenduak konparatu, formula erabili beharko dugu.

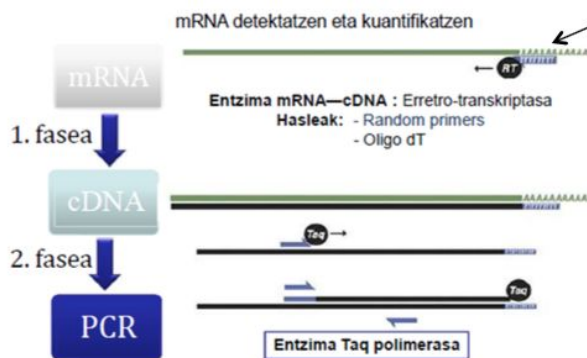


$$\text{Intereseko genearen adierazpen ratioa tratatu/kontrol} = \frac{A/B \text{ tratatua}}{A/B \text{ kontrola}}$$

RT-PCR (erretrotranskripzioa)

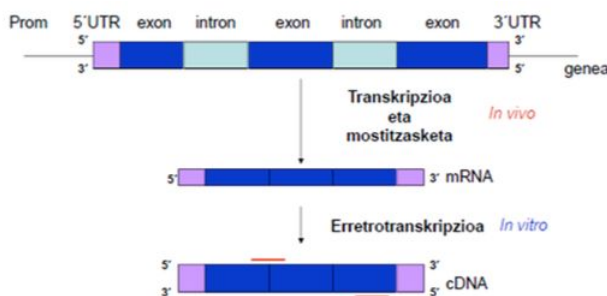
PCR-a egitko DNA erabiltzen denez, beharrezkoa da aldez aurretik, RNAm cDNara pasatzea. Horretarako entzima erretro-transkriptasa da.

*cDNA (complementary DNA edo DNA osagarria) erretrotranskriptasa entzimaren bitartez in vitro lortzen den DNA osagarria da, molde gisa mRNA heldua erabiltzen denez cDNAk ez du introirik izango.



Prozedura

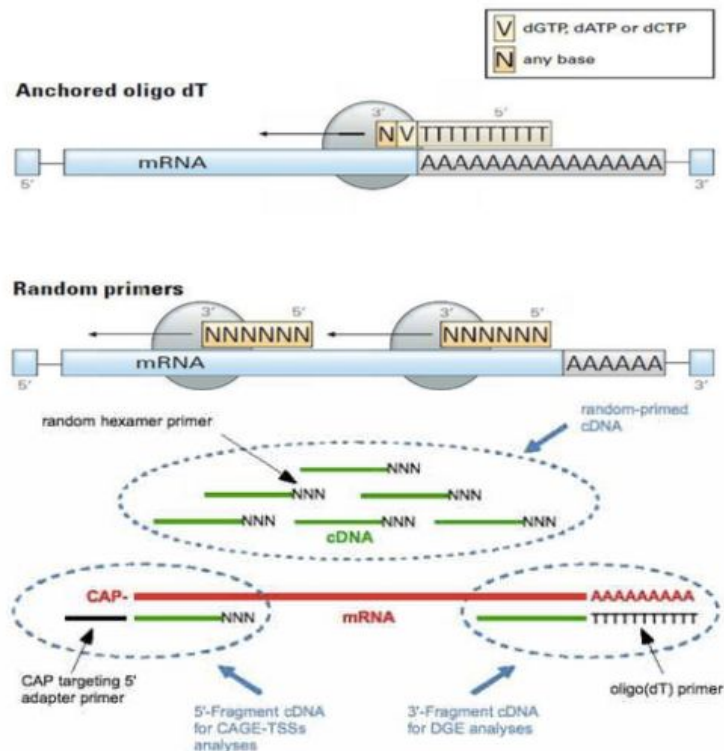
- Intereseko RNA gure laginetik erauzi. mRNA guztiek poliA isatsa izango dute. Haslea, poliA isatsean jarri cDNA lortzeko.
- Erretrotranskripzioa: mRNAtik cDNA lortzea du. Erretrotranskriptasa (birus batetik aterata) cDNA transkribatuko du. Horretarako erretrotranskriptasa entzimak parte hartuko du. Genearen adierazpen analisia cDNA horretan egiten da eta ez DNAn, beraz, hasleek cDNA aplikatu behar dute, ez DNA.



Bi hasle mota erabili daitezke:

- Random primer-a: zoriz hibridatzen diren hexonukleotidoak, cDNA sintetizatzeke. RNAn zehar lotzen dira, eta produktu bat baino gehiago lotzen da.
 - Hasleak zorizko hexonukleotido multzo bat dirao RNAn zehar lotzen dira
 - Ez da begiztekiko sentikorra
 - Ez da mRNAren degradazioarekiko hain sentikorra
 - cDNA kantitate gehiago
 - Edozein RNA-ra lotzen dira: mRNA, tRNA eta rRNA

- OligodT haslea erabiltzea (poliA isatsera lotuko da). Produktu gisa molekula bakarra lortuko dugu RNAm amplifikatua.
 - mRNAren espezifikoa
 - RNA totala (%80 Rna • %15 Trna • %5 Mrna)
 - mRNAren begiztekiko sentikorra. Hau da, oligo dT-ak ez du funtzionatuko RNAn egitura sekundarioak badaude, beraz mRNA degradatu egingo da.
 - mRNAren degradazioarekiko sentikorra



cDNA amplifikatzeko hasleen diseinua

Hasleek cDNA amplifikatu behar dute, ez DNA. PCR-a egiteko ziurtatu behar dugu erabiltzen ditugun haseak cDNARA lotuko direla, ez DNA arruntera. (cDNAk genearen sekuentzia edukiko du, eskualde erregulatzailak eta introiak kenduta). RNA erauztean beti izango dugu (nahikoa DNAsa ez aplikatzeagatik...) DNA pixka bat eta estrategiak garatu behar dira hau ez amplifikatzeko. Diseinurako bi aukera daude:

A) Hasle batek exoien arteko muga batean hibridatuko du. Horrela, lagina DNAREkin kutsatuta egongo balitz, hasleak DNAn hibridatzea ekiditzen da (DNAn exoien artean introiak egongo direlako).



B) Hasle bakoitzak exoi batean hibridatuko du. Horrela, cDNA hibridatzen bada esperotako tamainuko aplikona edukiko dugu eta DNA genomikoan hibridatzen bada, esperotako baina askoz ere handiagoa, introien tamainaren arabera. Gehiegi bada, PCRa ez da aterako, handiegia izango delako aplikatu behar den sekuentzia. Izan ere, PCR bidez ezin dira 1000 nt baino handiagoak diren sekuentziak aplikatu; hortaz, haslea exoi bakarrean jarrita ere gehienetan ez da posible izango DNA genomikoa aplikatzea, normalean introiak oso handiak izaten direlako.



Hasleen diseinua

- Genearen sekuentzia NCBI edo ENSEMBL programan bilatu.
- Exoiak lokalizatu eta exoiaren mugak kontuan hartuta hasle zuzena guk determinatu behar dugu. Normalean programek exoiak desberdintzeko koloreak erabiltzen dituzte; "nucleotide sequence" barruko sekuentzia dena exoiek osatzen dute.
- Exoi guztiak Primer-en kopiatu. Primer3 programak reverse-a emango digu. Primer3-ak hasleak non hibridatuko diren eta produktuen tamaina (gogoratu cDNA baino ez dela aplikatuko) zein izango den aztertzen du. Programak normalean aukera honena ematen digu baina baliteke, gero gure esperimenterako baldintzetara moldatu behar izatea.

Egun enpresa batzuek hasleak diseinatzeko beraien programak dituzte, zuzenean ematen dizkigute bi hasleak eta ondoren kuantifikazioa burutzeko zunda.

RT-qPCR edo kuantifikazio erlatiboa

- Geneen adierazpena neurtzeko erabiltzen da.
- Ez da kantitate ezaguneko estandarrik behar. DNArekin batera kurba estandarra erabiltzen gure balio estandarra lortzeko.
- Intereseko gene baten adierazpenean ematen diren aldaketak neurtu daitezke (tratatuak vs kontrolak), horretarako adierazpenean aldaketarik ez duen gen kontrol bat erabiliko da, hau da "KONTROL ENDOGENOA" egiten da.
- Intereseko genearen adierazpena endogenoarekiko normalizatzen da.

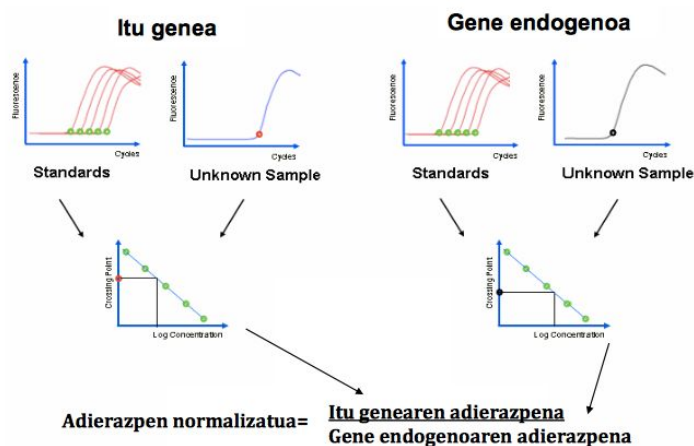
Gogoratu. Adierazpenaren kasuan kuantifikazioa normalizazioz burutzen da kontrol endogenoaren bidez. Kuantifikazioa BETI da erlatiboa. Horretarako bi metodoak:

- Kurba estandar erlatiboaren metodoa: intereseko genearen eta endogenoaren aplikazio efizientzia antzekoak ez direnean.
- Ct-aren konparaketan oinarritutako metodoa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): intereseko genearen eta estandarren aplikazio efizientzia antzekoa denean. cDNA kantitatea beharrezan Ct balioak kalkulatu dira, kantitatearen alderantziz proportzionalak.

1. Kuantifikazio erlatiboa, KURBA ESTANDARRA

Pausuak

- Lagin bakoitzaren adierazpen normalizatua kalkulatu. Disoluzio seriatu ezberdinak egiten dira. Kurba estandar bi eratu behar dira itu generako eta endogenorako. Puntuak amplifikazio puntutik hartzen dira. Puntu ezberdinekin zuzen patroia eraiki daiteke; X ardatzean kantitate logaritmikoa jartzen da eta Y ardatzean Ct balioak.



- Lagin bakoitzean itu-genearen adierazpen normalizatua vs gene kalibratzailearen adierazpena konparatuko ditugu. Kalibratutako zelulak, gure kontrola izango dira, zeinean itu genea eta gene endogenoa erabiliz ere adierazpena normalizatu dugun. Modu honetan tratatutako zelulak eta tratatu gabeak konparatzean ratio bat lortuko dugu, zeinak tratatutako zelularen adierazpena zenbat aldiz handiagoa edo txikiagoa den adieraziko duen.

$$\text{ratio} = \frac{\text{itu genearen adierazpena normalizatua (tratatu)}}{\text{itu genearen adierazpena normalizatua (tratatu ez)}} \quad \begin{array}{l} \text{lagina} \\ \text{kalibratzailea} \end{array}$$

Zuzen patroia bakoitzaren interpolazio emaitzak		
	Tratatu	Tratatu ez (kalibratzailea)
Itu genea	14 ng	2 ng
Gene endogenoa	3,5 ng	5 ng

- $$\text{Adierazpen normalizatua tratatua} = \frac{\text{Itua}}{\text{Endogenoa}} = \frac{14 \text{ ng}}{3,5 \text{ ng}} = 4$$

$$\text{Adierazpen normalizatua kalibratzailean} = \frac{\text{Itua}}{\text{Endogenoa}} = \frac{2 \text{ ng}}{5 \text{ ng}} = 0,4$$
- $$\text{Ratio} = \frac{\text{Itu genearen adierazpen normalizatua tratatua}}{\text{Itu genearen adierazpen normalizatua kalibratzailean}} = \frac{4}{0,4} = 10$$

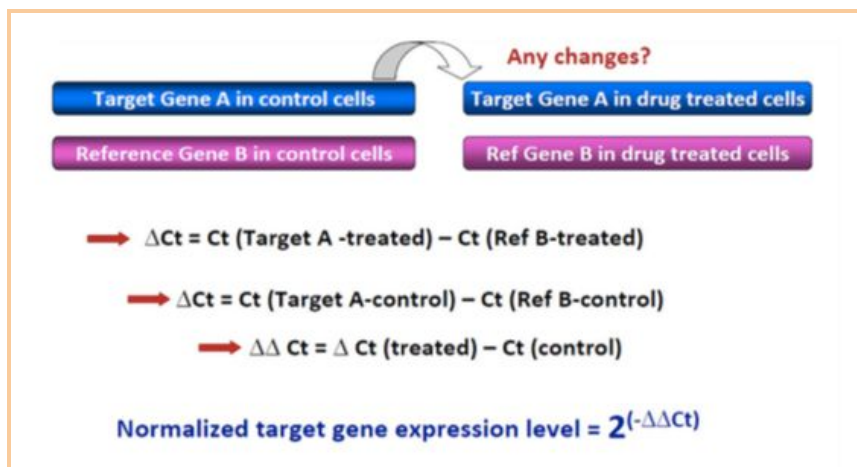
Kuantifikazio erlatiboa: Loading...

Ct-ren konparaketan oinarritutako metodoa da, BERAZ Ct balioak erabiliko dira eta ez aurrekoa bezala zeina kantitateetan oinarritzen zen.

Intereseko gene baten adierazpen-mailan aldaketak neurtzeko erabiltzen da, horretarako adierazpen konstantea duen gene baten (gene endogenoa edo kontrola) adierazpenarekin normalizatuko delarik.

Teknika honekin Ct balioak konparatzen dira, metodoa azkarragoa da. Kuantifikazioa konparatzen da bi egoera ezberdinetan, alde batetik tratamenduko zelulak eta bestetik kontrolak eta bakoitzaren Loading...burutzen da (itu genearen Ct balioa - gene endogenoaren Ct balioa) emaitzak normalizatuz.

Ondoren, $\Delta\Delta Ct$ balioa lortzeko, bi ΔCt ren arteko kenketa egiten da, **tratamendua – kontrola** hain zuzen ere.



Kurba estandarrean ratioa zatiketarekin kalkulatzen zen, kasu honetan KENKETA egiten dugu.

$$\text{ratio} = \frac{\text{itu genearen adierazpena (tratatu)} - \text{gene endogenoaren adierazpena (tratatu)}}{\text{itu genearen adierazpena (tratatu ez)} - \text{gene endogenoaren adierazpena (tratatu ez)}}$$

lagina
Kalibratzailea

$$\Delta\text{Ct}(\text{lagina}) = \text{Ct}(\text{itu genea}) - \text{Ct}(\text{gene endogenoa})$$

$$\Delta\text{Ct}(\text{kalibratzailea}) = \text{Ct}(\text{itu genea}) - \text{Ct}(\text{gen endogenoa})$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{lagina}) - \Delta\text{Ct}(\text{kalibratzailea})$$

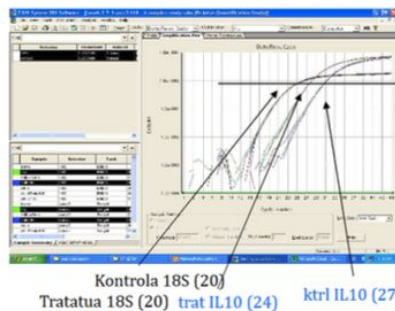
$$\Delta \text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

1.adibidean gene endogeno gisa 18S erribosomikoa, kontrolean eta tratatuan endogenoaren Ct balioa 20 da; honek bi laginetarako kantita bera hartu dugula esan nahi du (Bi kasuetan gogoratu Ct balioa RNAm adierazpenaren bidez burutzen dela). Hortaz, hasierako cDNAren kantitatea berdina zen hasieran. Itu genearen Ct balioa 24 zen tratamenduan eta 27 kontrolean; beraz ondoriozta daiteke gene honen adierazpena handiagoa izango dela tratatutan.

Loading... balioetik ratioa kalkula dezakegu; gene tratatua kontrolarekin konparatuz zenbat aldiz gehiago adierazten den jakiteko. Hortaz, IL10 adierazpena lagina tratatuan kontrol laginean baino 8 aldiz handiagoa da.

Bigarren adibidean, nahiz hasierako cDNAk berdinak ez izan normalizatzerakoan (kenketa) erreferentzia balioak eskuratzen ditugu ratioa kalkulatzeko (aurreko adibidean berdinak izanik, kenketarik gabe ere balio bera lortuko genuke).

bi ΔCt -ak berdina eman digute, beraz $\Delta\Delta\text{Ct}$ 0 izango da eta ratioa 1. Horrek zera esan nahi du, **IL10-ren adierazpena** lagin tratatuan eta kontrolean **berdina** dela.



$$\Delta\text{CT}(\text{lagina}) = \text{CT}(\text{IL10}) - \text{CT}(\text{18S})$$

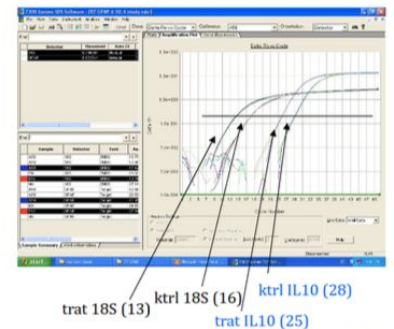
$$\Delta\text{Ct}(\text{trat}) = 24 - 20 = 4$$

$$\Delta\text{Ct}(\text{ktrl}) = 27 - 20 = 7$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}(\text{tratatu}) - \Delta\text{CT}(\text{kontrola})$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = 4 - 7 = -3$$

$$\Delta \text{Ratio} = 2^{-(-3)} = 8$$



$$\Delta\text{CT}(\text{lagina}) = \text{CT}(\text{IL10}) - \text{CT}(\text{18S})$$

$$\Delta\text{Ct}(\text{trat}) = 25 - 13 = 12$$

$$\Delta\text{Ct}(\text{ktrl}) = 28 - 16 = 12$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}(\text{tratatu}) - \Delta\text{CT}(\text{kontrola})$$

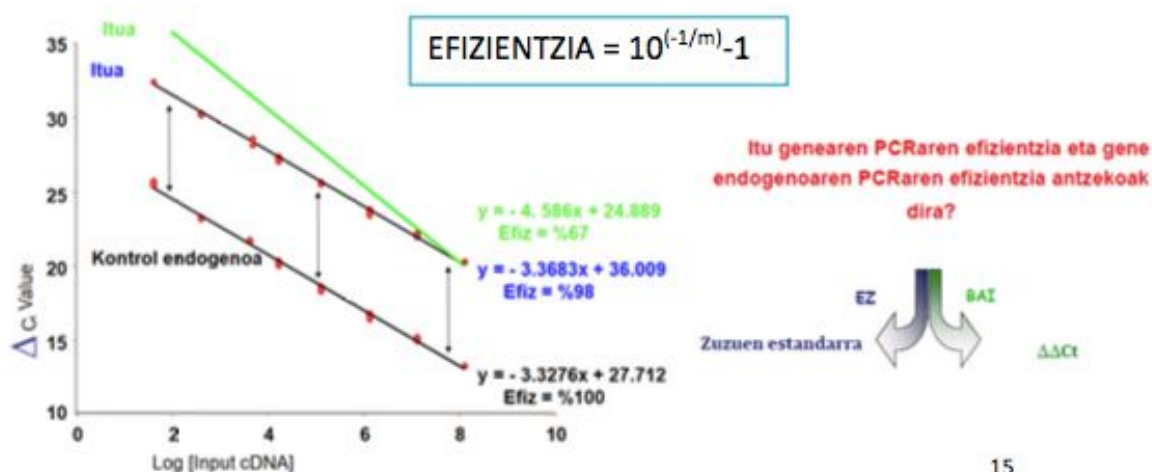
$$\Delta\Delta\text{Ct} = 12 - 12 = 0$$

$$\Delta \text{Ratio} = 2^0 = 1$$

Anplifikazio efizientzia

Ct balioen konparaketa bidez ez da beharrezkoa lagin bakoitzerako zuzen estandarra eraikitzea eta Dna gutxiago gastatzen da. Metodo azkarragoa da, diluzio gutxiago egin bear direlako baina baldintza bat eskatzen du: itu genearen eta gene endogenoaren PCR efizientzia antzekoa izatea.

Anplifikazio efizientzia ikertzeko ere patroia bat eraikitzen da, diluzioekin. Itu genearen zuzen estandarrak eta gene endogenoarenak efizientzia berdina (malda berdina) eduki behar dute. Hurrengo malda onartzen da 3.2 - 3.8 (Efizientzia %83 – %105) egoera horretan $\Delta \Delta Ct$ burutuko da Bestela kurba estandarraren metodoa erabili beharko dugu (cDNA gehiago gastatuko dugu eta motelagoa izango da prozedura). Maldak oso desberdinak badira, seguruenik akatsa efizientziaren kalibrazioan bertan egongo da eta prozedura errepikatu beharko da.



Eskala handiko adierazpenaren analisia: Microarray-ak

Aurreko teknikan gene bakarra aztertu egiten da baina ezin dira eskala handiko geneen adierazpena aztertu, horretarako beste teknika batzuk erabiltzen dira aurrekoa oinarri dutela.

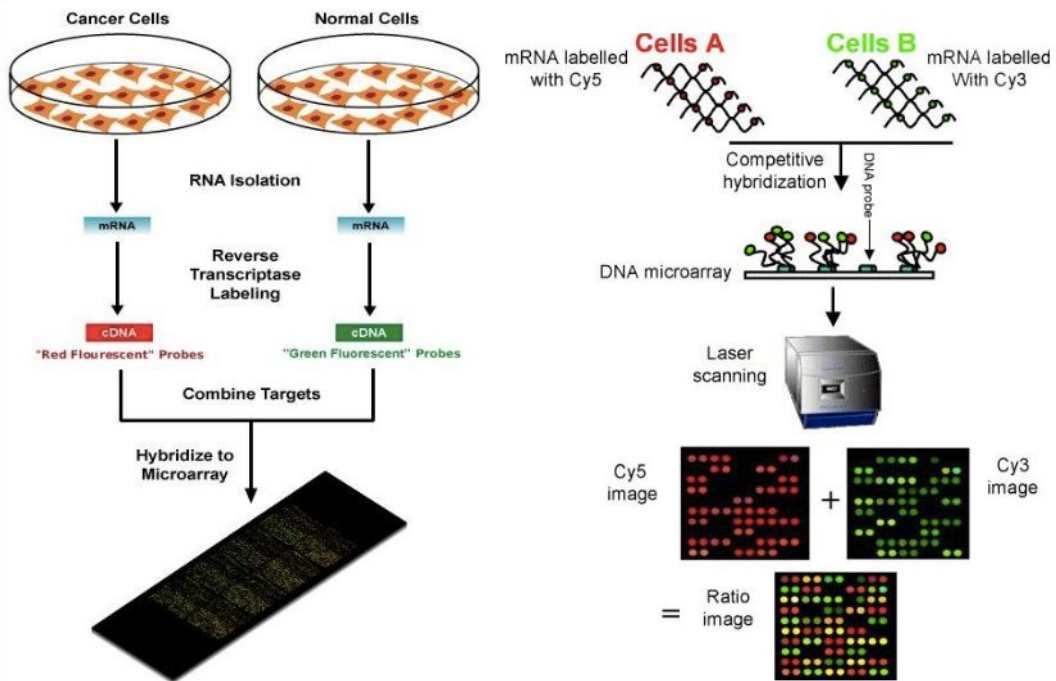
Microarray-ean hutsune edo putzu bakoitzean gene baten sekuentzia sartu egiten da, hau da hutsune bakoitzean gene bat aztertu egiten da, hori adierazteko primerrak egongo dira. Hutsune edo poro bakoitzerako zunda ezberdinak botatzen dira. Geneak zunda horietara lotuko dira osagarriak direnean. Neurketa erlatiboa da (adierazpena) eta beraz konparaketan oinarritzen da.

Prozedura:

- RNAm erazten da zelulatik (2.gaia) eta cDNA lortzen dugu (cDNA izango da markatuko duguna inoiz ez RNA).
- cDNA fluorokromo zundekin markatzen da, lagin bakoitzerako fluorokoi bat izanik.
- Lorturiko cDNA zatiak, kantitate beretan nahastu eta zundekin hibridatzen dira, fluoreszentsia ezberdina eskuratuz.
- Ondoren euskarrira lotuko dira zelula bakoitzaren (kontrola eta tratatua) cDNAk eta osgarriekin hibridatu eta gero ordenagailu batek sekuentziak irakurriko ditu.

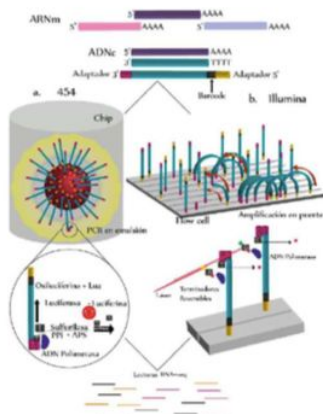
Ematen den hibridazioa kompetitiboa da, hau da, gene baterako bere adierazpena handiagoa bada kontroletan esate baterako, zunda gehiago lotuko dira bertara beraz adibidean kolore berdea handiagoa da. Kolore intentsitateak laser bidez neurtu daitezke, adierazpena jakiteko.

Kontrolan, BERDEZ markatutako nukleotidoak gehitzen dira eta esperimentalean aldiz GORRIA. Bi adierazpenak agertzen badira kolore HORIA ikusiko dugu. Adierazpen mailaren arabera, kolorearen intentsitate ezberdinak agertuko dira eta horiek aztertzekeo lagin bakoitza 3 aldiz analizatu behar da.



RNAseq: RNaren sekuentziaioa (DNaseq bezela)*

DNA bezala egiten da, bi metodoren bidez; emultsio PCR-a eta PCR zubia (3.gaia); mekanismoa berdina da.



In situ hibridazioa (ISH)

In situ hibridazioan intereseko sekuentziarekiko osagarria den zunda markatu bat erabiltzen da eta zuzenean hibridatzen da fixatutako laginetan. Genea adierazpena ematen ari den momentuan bertan adierazten da.

Teknika honen bitartez kromosometan DNA sekuentziak detektatu daitezke edo RNA sekuentziak fixatutako zeluletan, adibidez.

Prozesuaren pausuak

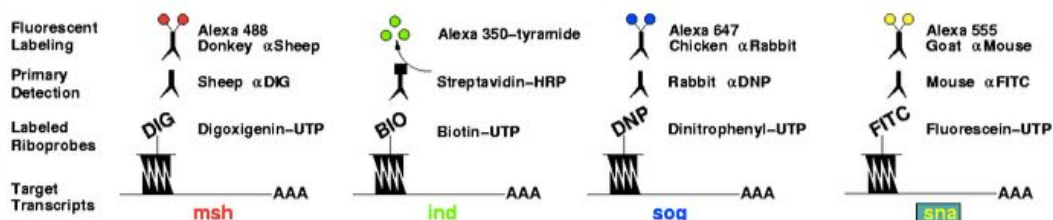
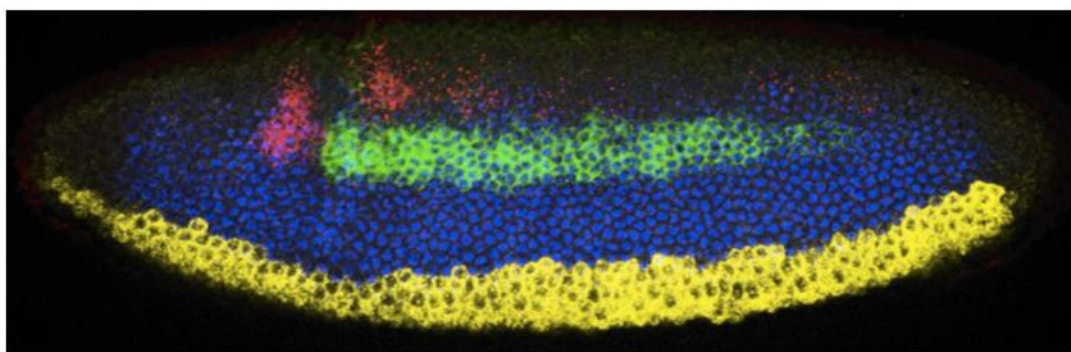
1. Hibridazioa egin aurretik:
 - Zelularen iragazkortasuna emendatu behar da, mintzean poroak sortuz. Honetarako detergenteak edo tratamendu entzimatoak erabil daitezke (triton, SDS, proteinasa K), modu honetan zunda sartu daiteke barrura.
 - **Entzimen neutralizazioa.** Adibidez ur oxigenatua erabiltzen da peroxidasak inaktibatzen edo levamisol fosfatasa alkalina inaktibatzen. Neutralizatorik ezean gerta daiteke zunda entzima batekin markatuta egotea eta, beraz, ondoren lortuko ditugun emaitzak ez dira egokiak izango.
2. Hibridazioa: markatutako zundak (digoxigeninlabelled, fluorescent,...) laginari gehitu. Gau osoan (ON-over night) zehar inkubatuko da 55C-tan.
3. Hibridazioaren ondoren:
 - **Rnasarekin tratatu**, geratzen den RNA ezabatzen dugu eta ez dela degradatuko ziurtatzeko.
 - **Detekzioa.** Laginean erabilitako zunda markatzailearen arabera izango da. Adibidez: anti-Dig-AP, anti-Dig-HRP, fluorescence,...

ADIBIDEA: saguen garapena aztertzeko hibridazioa.

Enbrioien zatiketa egin ondoren portetan fixatzen dira. Hiru proteinekiko (E-caderin, Snail eta Slug) osagarriak diren zundak erabiltzen dira. Horrela azter daiteke proteina hauek enbrioien zein zonatan adierazten diren. Teknika hau bakarrik erabili daiteke kokatzeko gene baten adierazpena leku konkretuetan. Urdinez proteina non dagoen adierazten da.

Multiplex mRNAren detekzioa

Teknika honek mRNA ezberdinak aldi berean aztertzea baimentzen du, izan ere, bakoitza kolore ezberdin batekin markatuta agertzen da (zunda ezberdina erabiltzen da). Transkripzioa non gertatzen ari den aztertu egiten da, ze zeluletan hain zuzen ere.



TEKNIKA	ABANTAILA	DESABANTAILA
Northern Blot	Tamiana eta kantitatea aztertu daitezke	RNA kantitate handia (10-20 µg) Geneak banaka aztertzen dira
RT-PCR kuantitatiboa	Kuantifikatzeko metodo zehatzena	Geneak banaka aztertzen dira Primer espezifikoak behar dira (disenua oso ongi eginda egon behar da)
Adierazpen microarray-ak	Milaka gene aztertu daitezke aldi berean	100-1000 zelula behar dira (hauen RNA) Emaitzak balidatu behar dira (normalean RT-PCR kuantitatibo batekin egiten da metodo errazena delako, baina beste batzuk badaude)
RNA-seq	RNA osoa analizatzen da	100-1000 zelula behar dira (hauen RNA) Emaitzak balidatu behar dira
In situ hibridazioa	Zelula bakarreko analisiak Aztertu nahi den sekuentziaren in situ kokapena	Teknika luzea Geneak banaka aztertzen dira (multiplexa erabiltzen bada EZ).

PROTEINEN ANALISIA

Proteinen erauzketa eta kuantifikazioa

1. **Proteinen erauzketa laginetik.** Proteinak ez desnaturalizatzeko proteasen inhibitzaileak gehitu (intereseko proteina ez degradatzeko) eta prozesu dena izotzetan edo tenperatura baxuan egin behar da, proteinak desnaturalizatu ez daitezten.

Erauzketa egiteko bi modu bereizten dira:

a. Detergente ez ionikoak (lisi suabea, Triton X-100): Mintza apurtzeko. Lipido-lipido eta lipido-proteina elkarrekintzak apurtzen ditu. Modu honetan, ehuna apurtu eta interesatzen zaizkigun proteinak erauziko ditugu.

b. Detergente anionikoak (desnaturalizataileagoa): fuerteagoa den erauzketa modua (sendoagoa da). Proteinak desnaturalizatzeko. Proteina-proteina elkarrekintzak apurtzen dituzte (zelula puskatu eta proteinak erauzi ditzazkegu), karga negatiboa gehitzen baita. SDS eta Sodio dexosikolatoa adibidez.

2. Apurtutako zeluletatik proteinak lortu
3. **Poteinen kuantifikazioa**; metodo ezberdinen bidez:

Detekzio fotometrikoa: proteina totalaren kantitatea estimatzen da (proteina guztiak). Inespezifikoa. Bakarrik proteina kantitatea jakiteko erabili.

ELISA: proteina konkretu baten kuantifikazioa. Adibidez, ubikuitina konkretu baten kantitatearen neurketa.

Erreakzio entzimatikoa: proteina baten (entzima) aktibitatea neurtzeko erabiltzen da.

FACS: zelula batean dagoen proteinen kuantifikazio erlatiboa (fluxuzko zitometria).

Western blot: Proteina konkretu baten kuantifikazio erlatiboa.

Inmunohistokimika (IHC): Proteina konkretu baten kuantifikazioa. Ez da horren zehatza.

2D elektroforesia: Proteinak identifikatzeko (geletik hartu eta masa espektrofotometroan detektatu ditzazkegu).

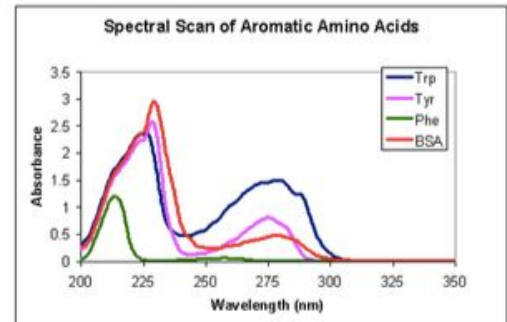
DETEKZIO FOTOMETRIKOA

1. UV 280 absorbantzia: azido nukleikoekin erabiltzen den metodoa. Metodo honen bitartez proteinak kuantifikatu daitezke espektrofotometro batean, izan ere, hauek argia xurgatzen dute 280nm-tara. Absorbantzia eta proteina-kantitatea erlazionatuta egongo dira. Dentsitate optikoa mg/ml da.

2. Metodo kolorimetrikoak (Bradford metodoa): metodo honetan Coomassie Urdina erabiltzen da. Hau proteinekin elkarrekintzak sortzen dituen kolorantea inespezifikoa da eta 595nm-ko argia xurgatzen du. Kolore intentsitate, absorbantzia eta proteinen kantitatea erlazionatuta egongo dira.

Proteina kantitatearen arabera intentsitatea ezberdina izango da; proteina gehiago izanik kolorea ilunagoa izango da eta proteina gutxiagorekin argiagoa. Ondoren, espektrofotometroa erabiliz,

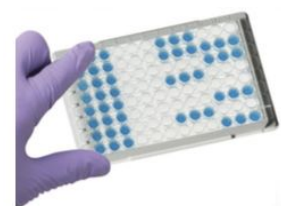
proteina totalaren kantitatea estimatuko da. Seroalbuminarekin zuzen patroi bat eraikitzen da, 5 diluzio seriatua eginez. Grafika eratu egiten da eta ondoren lagina grafikaren bitartez aztertzen da. Lagina diluitua egon behar da. Oso kontzentratua badago emaitzak ez dira zehatzak izango.

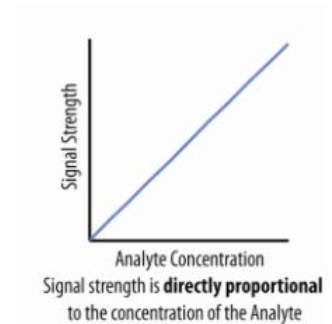
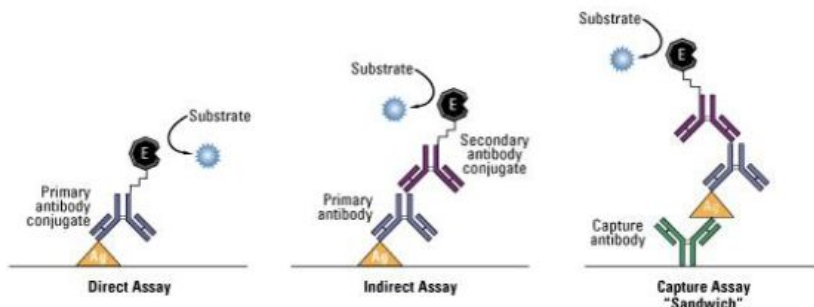
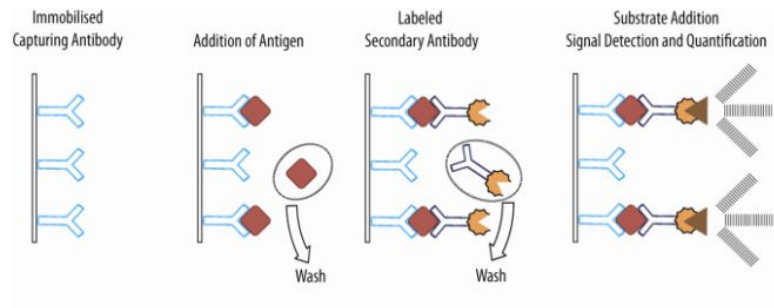


ELISA

1. Portilo bakoitzean gure interesekoa den proteinaren osagarria den antigorputza itsatsita egongo da (inmobilizatuak daude beraz). Behin lagina botata, interesatzen zaigun proteina antigorputzarekin lotuko da. Lagin gehiago dagoen tokian antigorputzekin askoz gehiago asoziatuko da.
2. Ondoren garbiketa egingo da soberan dagoen proteina kantitatea kentzeko, hau da, antigorputzekin lotu ez diren proteinak kenduko dira.
3. Gure proteina ezagutuko duen beste antigorputza gehituko da, bigarren antigorputza, azken hau markatuta egongo da. Antigorputz primarioak gure lagina zuzenean ezagutzen dutenak dira.
4. Berrero ere garbiketa egin antigorputz soberakina kentzeko eta seinalerik ez bidaltzeko.
5. Detekzioa. Ikusten dugun seinalea proteina kantitatearekiko proportzionala izango da. Beraz, zenbat eta proteina gehiago izan, seinalea orduan eta handiagoa izango da. Modu honetan, gai izango gara proteina kantitatea estimatzeko.
6. Azkenik, amplifikaziorako 3. antigorputz bat gehitzen da. Metodo honi "sandwich" esaten zaio. Erreakzioa substratua jartzerakoan ematen da, kimioluminiszentzia mota bat da.

Antigorputz primarioa zuzenean markatuta badago markaketa zuzena da, bigarrena gehitzen bada markaketarekin ez-zuzena.





Esan dezakegu 3 sandwich metodo daudela:

- Metodo zuzena: Guri interesatzen zaigun proteinarekiko espezifikoa den antigorputz primario markatua jarriko da.
- Metodo ez zuzena: Gure proteina ezagutuko duen antigorputz primarioa gehituko da eta ondoren hau ezagutuko duen antigorputz sekundarioa gehitzen da, azkenengoa izango da markatua dagoena
- Sandwich metodoa: Gure proteinarekiko espezifikoa den antigorputza plakan immobilizatua dago. Proteina antigorputzera lotuko da bi aukera posibleren bidez:
 - Modu zuzenean lotuko den antigorputz sekundario markatua bota.
 - Antigorputz primarioa gehitu eta ondoren hau ezagutuko duen antigorputz sekundario markatua gehitu.

Gogoratu: antigorputz sekundarioak seinalea anplifikatzeko balio dute, antigorputz primario batera baino gehiagotara lotzeko gaitasuna dute eta seinale handiagoa lortzen dute.

WESTERN BLOT

Proteina konkretu baten kontzentrazioa ezagutzeko.

Prozedura

1. Gure laginetatik proteinak erauzi.
2. Akrilamidazko gel batean migratu (kapilaritatez), tarte txikiak direlako eta modu

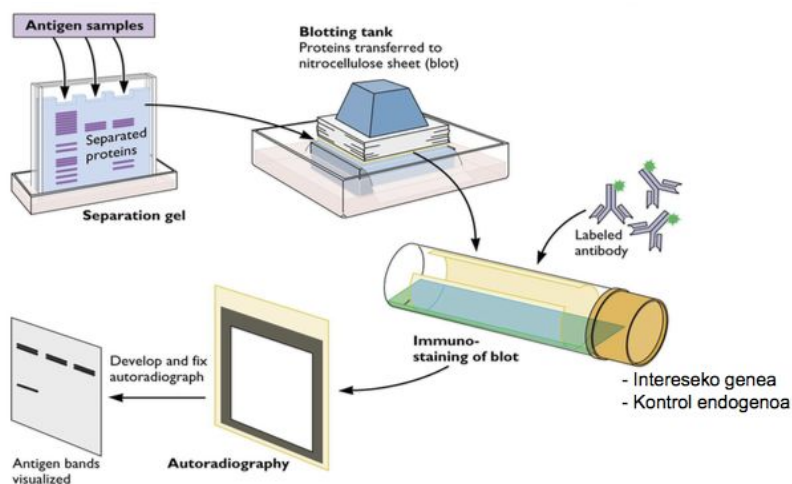
honetan proteinak hobeto banatuko direlako (erresoluzio hobea lortzen da). Proteina guztiak pisu molekularren arabera sailkatuko dira, karga berbera dutelako. (SDS Poliakrilamida= nitrozelulosazko zuntza).

3. Migratutako proteinak nitrozelulosazko mintzera pasa. Buffer bat izango dugu indar ioniko bat eragingo duena. Indar honen ondorioz proteinak akrilamidazko geletik mintzera pasako dira kapilaritatez. Proteinen kasuan, molekula handiak direnez, kanpo elektriko bat eta pisua ere jartzen dira.

4. Behin migratuta antigorputz markatuak gehitu: Gure intereseko proteinarekiko osagarria den antigorputza gehituko da. Horrelakoetan normalean bi pausutan egiten da markaketa. Lehenengo, proteinarekiko osagarria den antigorputz primarioa gehitzen da (markatu gabe egongo dena) eta ondoren antigorputz horrekiko osagarria den antigorputz sekundario bat. Azken hau markatuta egongo da. Gainera, kontrol endogenoarekiko antigorputzak ere gehituko ditugu; normalizaziorako. Prozesu hau ere modu zuzenean egin daiteke (bakarrik antigorputz primarioa erabilita).

*Antigorputz sekundarioa erabiltzeak malgutasuna ematen du, garestia da proteina bakoitzarentzako antigorputz markatua erostea.

5. Proteinen identifikazio eta kuantifikazioa: pausu honetarako aurreko pausuko markaketaz baliatuko gara.



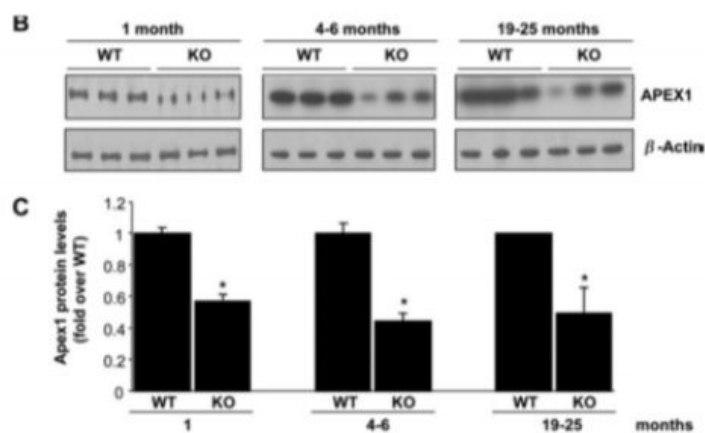
ADIBIDEA: proteina espresioaren konparaketa xagu ezberdinetan.

Kuantifikazioa egin ondoren, grafikatu, emaitzak aztertzeko. HRP= peroxidasa. Zergatik grafiko hau horrela egin? APEX 1 mutatu basatiarekiko normalizatu dugu. Hemen azpimarratu nahi izan dena da APEX1 mutatu (KO) gutxiago adierazten dela basatian (WTà wild tipe) baino. Baina basatiaren tendentzia galdu dugu.

Grafiko honetan ikus daitekeenez, knockout xaguetan (KO) proteina kantitatea txikia da, 3 kasuetan, asteak pasa ahala adierazpena emendatu egiten da. Genean bertan, proteina kopurua txikia dela ikusten da. Gainera, ondoriozta dezakegu knockout-a ez dela osoa izan, proteinaren adierazpena nahiz eta oso txikia izan besterikiko eman delako, perfektua izateko ez genukeelako proteina adierazpenik izango.

Kontrol endogenoa (β -Actina) ere ezarri dugu, kargatzen dugun proteina kantitatea antzeko dela jakiteko eta horrela izan ezean hurrengo formularen bitartez normalizatuko da:

$$\text{Proteina kantitatearen ratioa } \left(\frac{KO}{WT}\right) = \frac{\frac{APEX}{ACTIN}(KO)}{\frac{APEX}{ACTIN}(WT)}$$



Inmunohistokimika

Metodo honen bitartez proteinak bi eratan azter ditzakegu:

1. EHUN PARAFINATUAN: parafinetan fixaturiko ehunen laginetan proteina jakin baten detekzioa egiten da. Gure intereseko proteinarekiko osagarria den antigorputzekin inkubatuko da lagina. Ondoren antigorputz primarioa ezagutzen duen antigorputz sekundario bat gehitzen da. Azken hau peroxidasarekin tratatuta dago, beraz, bere substratua gehituta, peroxidoa, erreakzionatu egingo du antigorputzarekin eta erreakzioaren ondorioz luminiszentzia askatuko da, proteina dagoen tokian marroia ikusiko da. Honek proteinaren presentzi edo ausentziaz gain, kuantifikazio erlatiboa egitea ahalbidetuko digu. Kuantifikazioa erlatiboa izango da, ez absolutua, markaketak egitean ezberdintasun batzuk egon baitaitezke ehun batetik bestera.

Zelulak fixatuta ditugu proteinetan. Antigorputzak gehitzen ditugu eta emaitzak konparatu. Ezberdintasuna ehun parafinatueta egiten dela da, antigorputz primarioekin egiten da normalean (peroxidasa), kimioluminiszentzia bidez. Hospitaletan, anatomia patologikoa ikertzerakoan metodo hau erabiltzen da intereseko proteina ezberdinekin. Adierazpen aldaketa mikroskopio bidez kuantifika daiteke, eta aldi berean proteinen adierazpena non eman den identifikatu dezakegu.

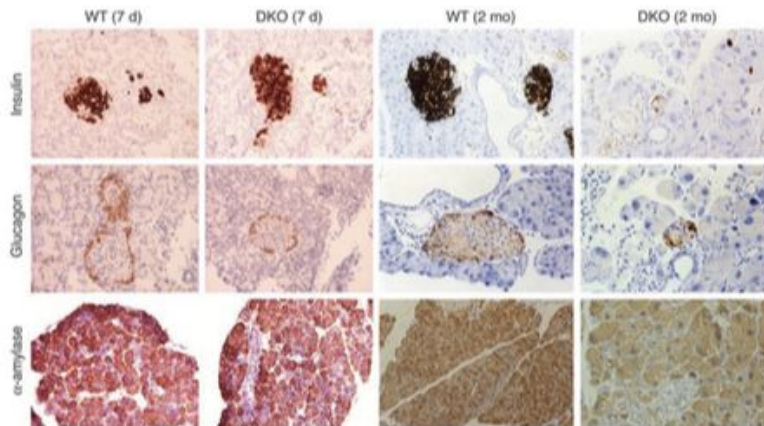
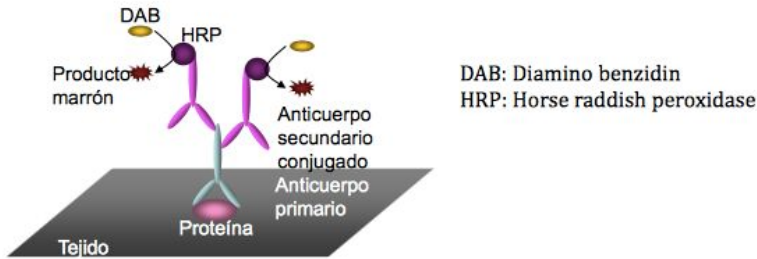


Figure 4
Immunohistochemical analysis of expression of pancreas-specific protein markers. Shown are representative pancreas sections of 7-day-old and 2-month-old WT and DKO male mice immunostained with Ab's to insulin, glucagon, and α -amylase. A light hematoxylin counterstaining was performed in all sections (insulin and glucagon, $\times 400$; α -amylase, $\times 200$). Similar results were obtained when DKO female mice were analyzed (data not shown).

J. Clin. Invest. 113:1398-1407 (2004)

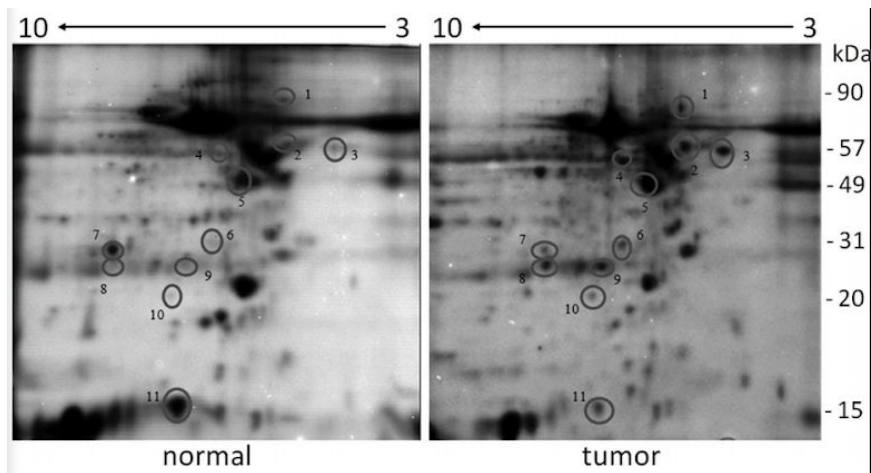
2. ZELULA KULTIBOAN: kasu honetan apoptosiarekin erlazioaturiko proteina baten detekzioa egin nahi da. Intereseko proteinarekiko antigorputz primarioa jarri eta ondoren hau ezagutzen duen sekundarioa. Kasu honetan antigorputz sekundarioa FITC fluorokromoarekin markatuta dago eta kitzikatzean kolore berdea askatzen du. Kasu honetan ere intentsitatearen arabeko kuantifikazio erlatiboa egin daiteke.

2D Elektroforesia

Kasu honetan bi dimentsio edukiko ditugu, dimentsio bakoitzak proteinak parametro desberdin baten arebera banatuko ditu.

- Lehenengo dimentsioa: proteinak puntu isoelektrikoaren arabera banatzen dira (puntu isoelektrikoa da proteina batek duen pH-a zeinean proteina horren karga netoa zero den)
- Bigarren dimentsioa: proteinak tamaina molekularren arabera banatzen dira.

Azkenean guri interesatzen zaigun proteina hartzen dugu eta liseritu peptidoak eskuratzeko. Peptido hauekin berain masa espektrometroan analizatzen da. Teknika hau oso erabilgarria da diferentzialki erregulatzen diren proteinak bereizteko.



5.GAIA: DNA ERREKONBINANTEAREN KLONAZIOA BAKTERIOETAN

Zer da klonazioa? Genetikoki igualak diren indibiduoak lortzeari esaten zaio klonazioa.

- KLON-a: indibiduo edo zelula bakar batetik, ugalketan asexualez sortutako ondorengo multzoa da. Ugalketa-motaren ondorioz, genetikoki berdinak dira
- DNA errekonbinantea: hianbat jatorritako DNA-ren konbinazioaren bidez osatutako DNA hibridoak. *In vitro* prozesuaren bidez lortzen da, zelula batean DNA-bektore + intereseko DNA sekuentzia sartuko dugu eta DNA sekuentzia hori adieraziko da

DNA errekonbinantearen klonazioa: DNA errekonbinante molekula berdina duten zelula multzoaren isolaketa da. (DNA errekonbinantearen teknologia = Ingeniaritza genetikoa)

Huak dira DNA errekonbinantearen klonazioa burutzeko eman behar diren pausoak:

1. DNA errekonbinantea sortu
2. Zelula ostalariaren barneratu
3. Klon transformatuaren hautespena
4. Klonatutako genearen kantitate handian ekoiztu

Klonazioa burutzeko 2 tresna nagusi erabiliko ditugu: bakterio ostalariak (fagoak, animaliak eta landareak izan ahal dira ere) eta bektorearen molekulak

1. Klonaziorako bakterio ostalaria: *Escherichia coli*

Hauek dira *E.coli*-ren ezaugarriak:

Gram – , genoma: 4.639.221 bp eta 4000 gene, 1921.ean isolatuta (Malaria zeukan gaixo batengandik), medio sinplean hazten da: glukosa, peptidoak, fosfatoa eta gatzak: Na⁺ , K⁺ , Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺.

Klonazioak egiterakoan andui desberdinak erabilten dira, hau da, ez dira basatiak atenuatutako anduiak baizik. Hau lortzen da birulentzia zuekatzen geneak “kenduz”. Honela,

gizakion hesteetan ez da bideragarria, biziraupen murriztuak dauka naturan eta arriskurik gabe erabili daiteke. Gainera, ez ditu infektatzen beste mikroorganismoak edo landareak.

Atenuatutako anduiak *E.coli* K-12 dira, lehen esan bezala andui hauek ez dauzka gene birulentorik. IS5 deituriko sekuentzia baten txertaketa lipopolisakaridoaren bidezidorrean parte hartzen duten zenbait gene inaktibatzen dira hau lortzeko.

Honez aparte, beste mutazio batzuk erabiltzen dira erabilitako K12 anduietan:

- Errekonbinazio homologoaren funtzioa inaktibo (*recA*-), berrantolaketak ekiditeko
- Endonukleasa I aktibitatea mutaturik (*endA*-), plasmidoaren ekoizpena sustatzeko
- *LacZ* genea mutaturik (*DH5 α* anduia: *lacZ Δ M15*, alfa konplementazioa) honela laktosaren metabolismoa erabili ahalko dugu markatzaile bezala

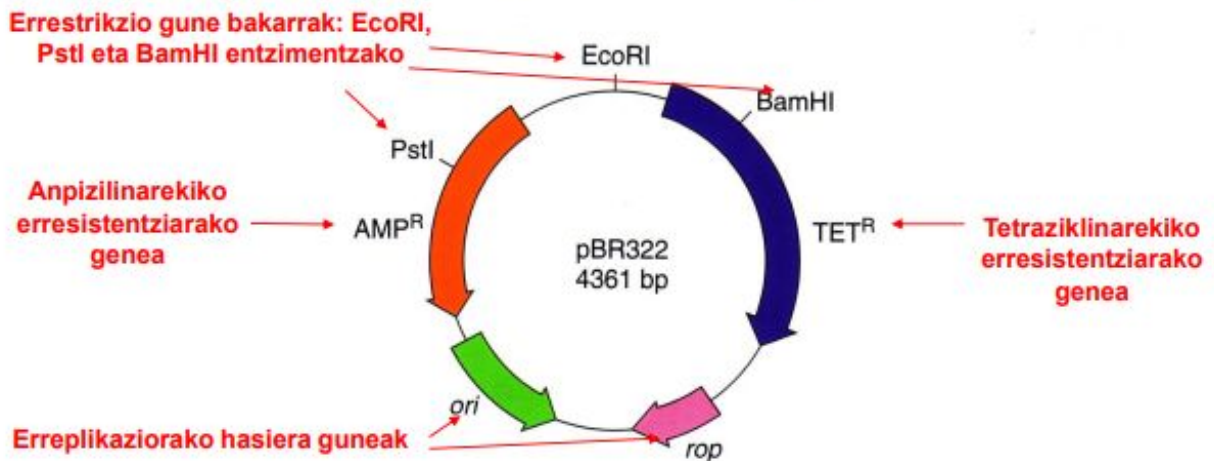
2. Klonazio-bektoreak

Bektoreak: elementu genetiko autorreplikakorrak dira, hua da, beren DNA bikoiztu dezakete ostalariaren DNA genomikoaz baliatu gabe. Bektoreek txertatutako geneen/sekuentzien adierazpena bermatzeko beharrezkoak diren elementuak dituzte.

Hauk dira bektoreek eduki behar dituzten ezaugarri minimoak:

- Erreplikazio autonomoa (*ori* C)
- Errestrikzio gune bakarrak
- Hautespenerako markatzaile genetikoak
- Informazio genetiko ez premiazkoa

Adibidez, pBR322 plasmidoa daukagu



Kasu honetan *EcoRI* ezin denez bereiztu DNA plasmidikoa erazuziko da eta migratu. Bi xingol ikusten badira errekonbinatua dela esan nahi du.

Gainera, esan beharra dago antibiotikoekiko erresistentziarako gene desberdinak daudela: ampizilina, tetratziklina, kanamizina... Bakoitza bere aplikazioarekin eta bereizteko modu bakarrekin.

Honen guztiz aparte, bektoreak ezaugarri gehiago eduki ahal dituzte konplementazio moduan.

Bektoreen ezaugarri osagarriak:

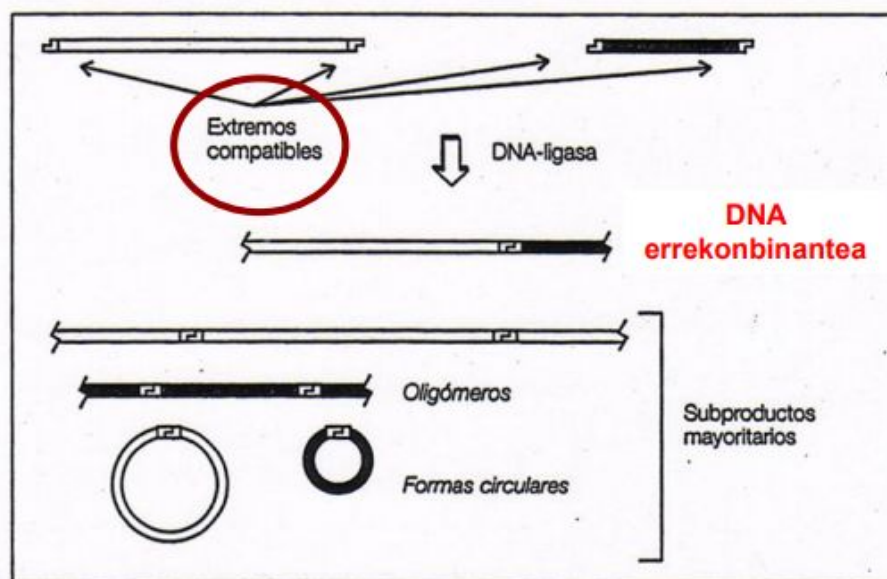
- **Polilinkerra** (“poli-lynker”): sekuentzia labur bat non errestrikzio-gune ugari dauden, DNA zatien txertatzea errazten delarik.
- **β -galactosidasa N-bukaerarako sekuentzia kodetzailea**: kolonia transformatuak eta errekonbinatuak bereizteko X-Gal eta IPTG erabiliz.
- Txertakune alboetako bakteriofagoaren promotoreak, txertatutako DNA in vitro transkribatzeko.
- **M13 fagoaren erreplikaziorako hasiera-gunea**: kate bakuneko DNA zirkularra ekoizteko fago laguntzaile (“helper”) jakin batekin zoldutako E. coli bakterioan

Hauk dira klonatuko diren molekulak:

- DNA purifikatua
- DNA liseritua (DNA zatiak)
- Hobeto mutur mailakatuak dituen DNA zatiak (edo gehitu linkerrak errestrikzio guneekin, mutur kamutxak badaude)
- RNA klonatzeko, lehenengo cDNA lortu behar da in vitro

Klonazioa lortzeko honako metodoa erabiliko dugu.

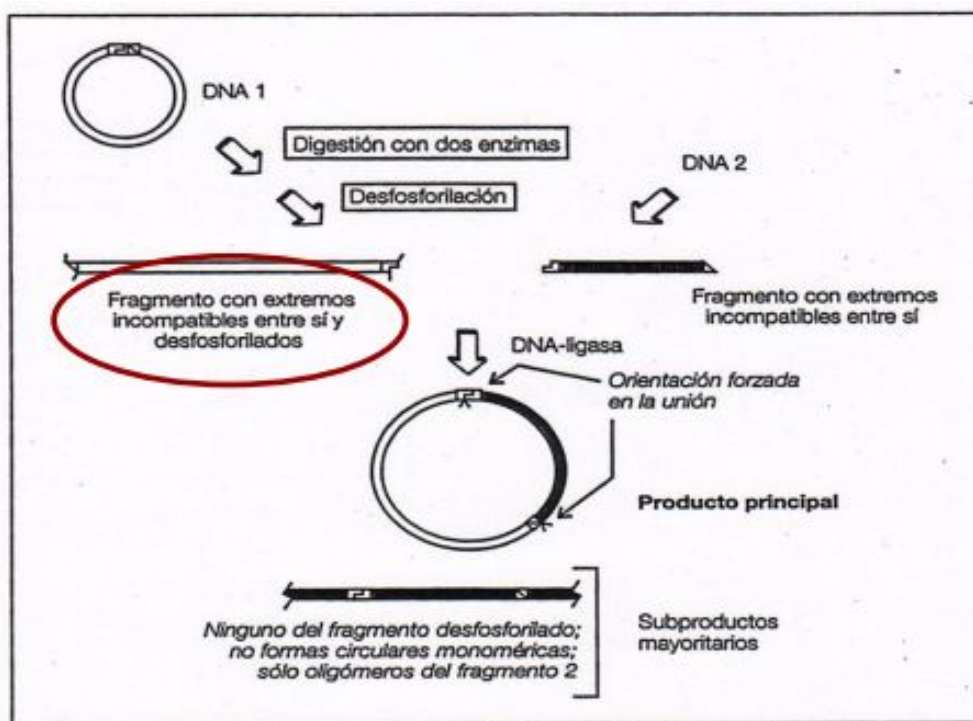
1. Klonaziorako DNA-ren prestaketa: DNA genomiko osoa, liseritutako DNA, purifikatutako DNA,...
2. Errestrikzioa: elkartu nahi dugun bi DNA molekulen muturrak osagarriak izan behar dira.
3. Ligazioa: ligasa erabiliko dugu bi DNA kateak bateratzeko. Ligazioan beste produktuak agertu ahal dira (adibidez bektorea bere buruarekin lotzea), hau gertatzen bada efizentzia ez da %100 izango.



Efizentzia igotzeko hainbat metodo daude:

- A. Elkartu nahi ditugun DNA zatietako batean (bektore edo intereseko DNA sekuentzia) 5' muturren desfosforilazioa egin. Hau lortzeko fosfatasarekin kultibatuko dira ligazioa ekiditzeko

B. Liseriketa bikoitza egin bi entzima bateraezinekin

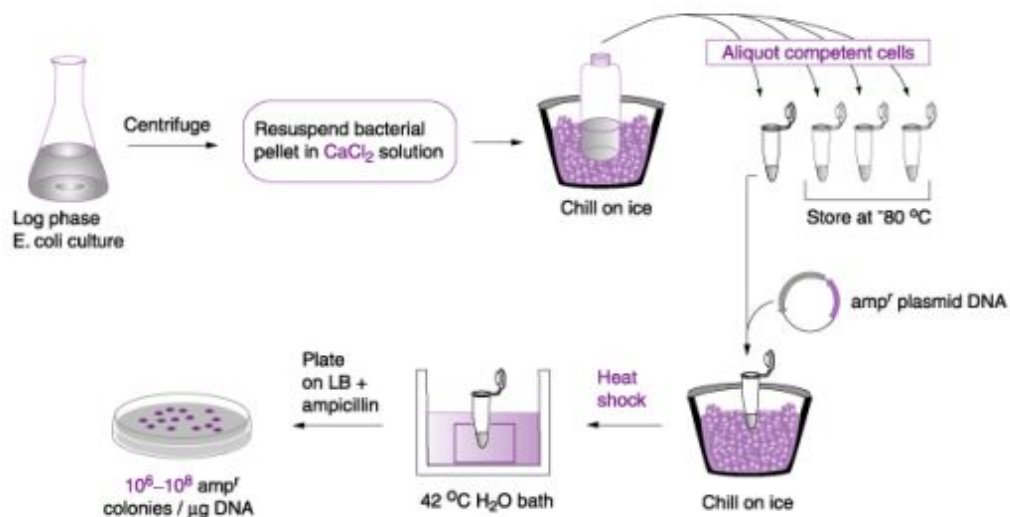


Promotoreak direla eta jakin behar dugu zein harizpian dagoen intereseko genea.

4. Transformazioa bakterioetan

Bi metodo nagusi daude transformazio bakterioetan burutzeko

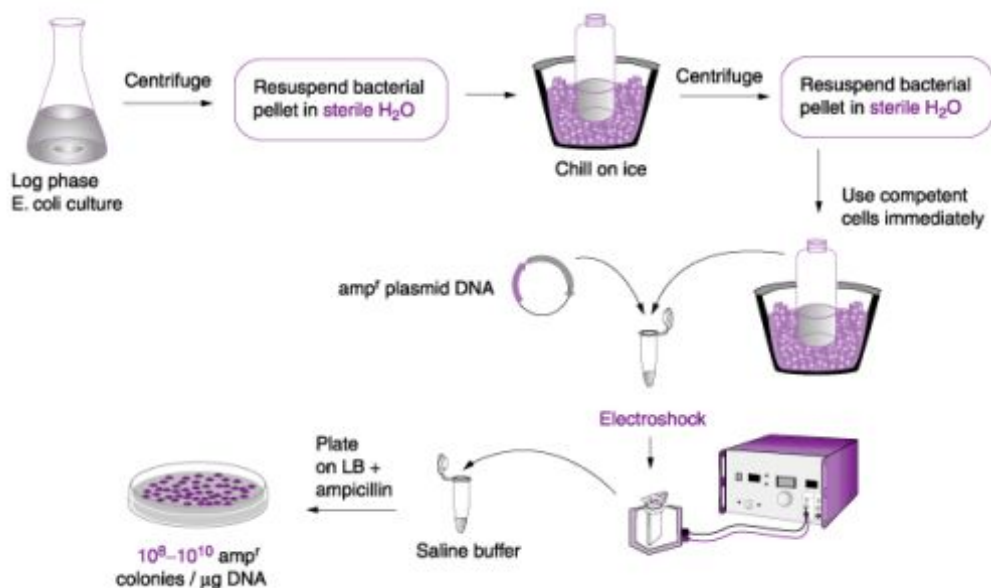
4.1 CaCl₂ eta talka termikoa:



- Katioi dibalenteen (Ca²⁺, Rb⁺, Co²⁺) bitartez mintza ezegonkortzen da.
- Hotzetan inkubatu ondoren talka termikoaren (42°C) bitartez DNA plasmidikoa zelulan barneratzen da.

Metodo honek poroak sortzen ditu mintzean, bertatik plasmidoa sartuko da bakterioan.

4.2 Elektroporazioa:



- Talka elektriko bitartez mintz plasmatikoa poroak sortzen dira.
- DNA barneratu ondoren zelulak mintzeko poroak konpontzen ditu.

5. Hazkuntza medio hautatzailean agar plaketan

Markatzailea behar da bakterio transformatuen hautespena egiteko.

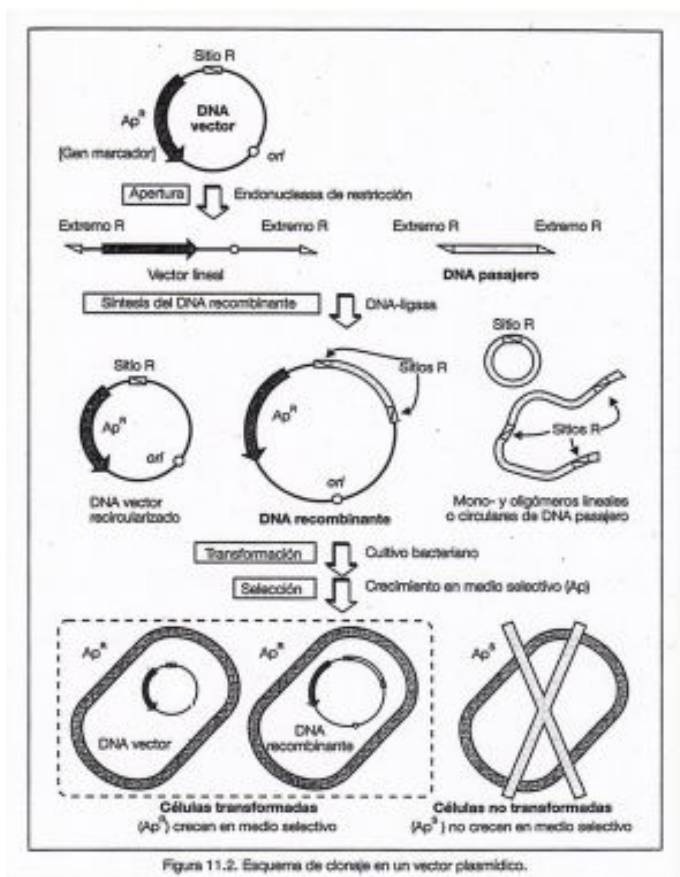


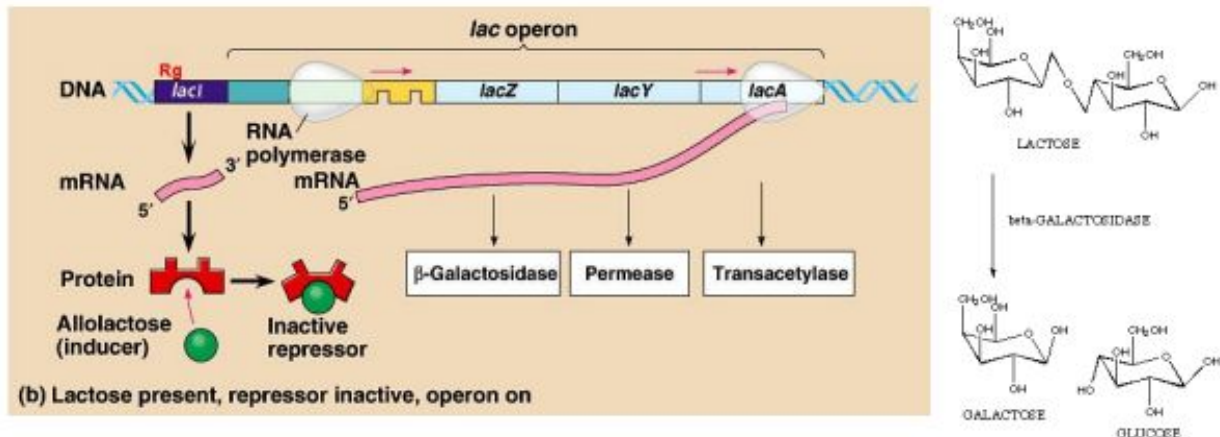
Figura 11.2. Esquema de clonaje en un vector plasmídico.

Irudian ikusten den bezala 3 kasu edukiko ditugu. Hirugarren kasuan, bakterioak ez du plasmidorik edukiko. Kasu honetan bakterioak ezin izango du plakan hazi, antibiotikoekiko erresistentzia ez daukalako. Plasmidorik ez daukanez ezin izango du antibiotikoaren aurkako mekanismoa garatu eta ez da agertuko agar plakan. Agar plakan agertzen diren bakterioak transformatuak izango dira (plasmidoa edukiko dute). Geratzen den azken pausua bi bakterio motak bereiztea da, errekonbinatuak eta gabeak. Nola egiten dugu zelula errekonbinanteen hautespena?

Argi eduki behar dugu errekonbinanteen hautespena bektorearen arabera izango dela. Lehen esan dugun bezala, bektoreak desberdinak beraien artean eta metodo desberdinez bereiziko ditugu

kasu bakoitzean. Gure kasuan lacZ' genea erabiliko dugu praktikan bereizketa egiteko.

E.coli bakterioak LAC operona daukate. Promotore bat eta 3 gene kodetzaile dauzka. Gainera erregulazio sistema dauka. Errepresorea da, beraz laktosa ez dagoenean proteina errepresorea aktibo egongo da. Aldiz, laktosa dagoenean ez-aktibo moduan egongo da eta 3 geneen transkripzioa emango da.



LAC operona egiten duena laktosa-> galaktosan eta glukosan banatzea da.

Plasmidoan daukagun lacZ' genea α -peptidoa kodetzen du eta polilinkerra bertan kokatzen da. Polilinkerrak ez dauka eraginik lacZ' genean, hala ere oso garrantzitsua da. Koloniak lacZ' genea adierazten badu horrek esan nahi du ez dela errekonbinantea. Aldiz, lacZ' genea ez baldin bada adierazten, horrek esan nahi du bektorea errekonbinatua dela eta gure intereseko genea bertan txertatuta dagoela.

Hau guztia kolonien hautespenean egiten da:

- LAC OPERONA IPTG-ren erabilera:
IPTG: laktosaren analogoa da. Lac operona induzitu dezake, baina b-galaktosidasak ezin du IPTG-a metabolizatu.
- LAC OPERONA X-Gal-aren erabilera:
 β -galactosidasaren aktibitatea X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galaktosido) sustrato kromogenikoa erabiliz neurtu daiteke: X-Gal-en metabolizazioak produktu urdina sortzen du.

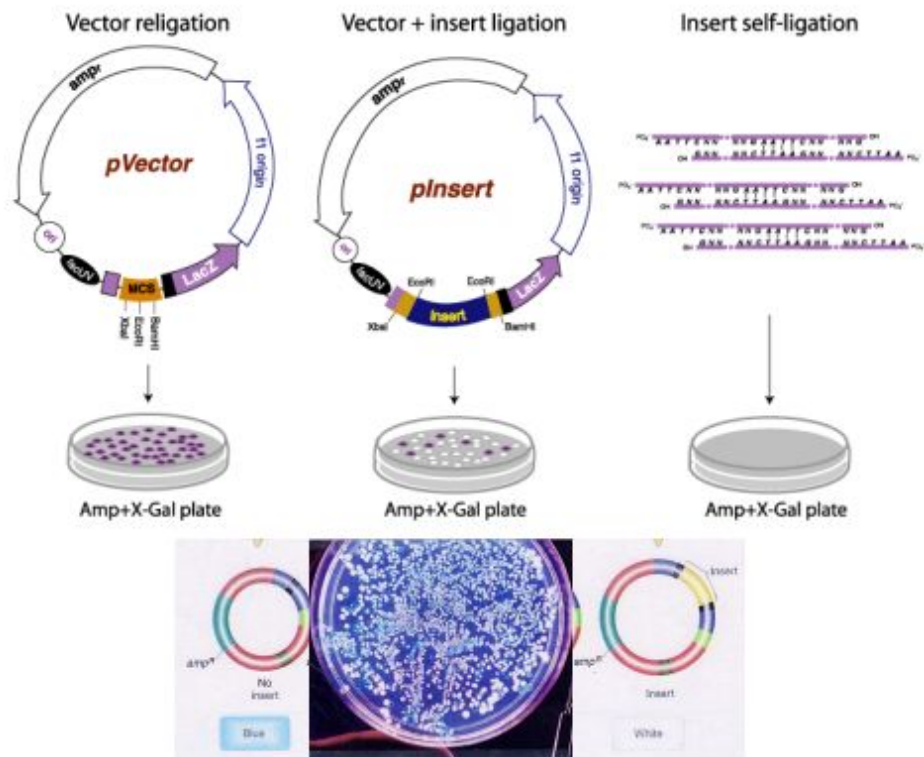
Hau guztia aurrera eramateko andui berezi bat erabiltzen da, K12 anduia. Andui honetan bakterioen lacZ genean mutazioa dago, entzima inaktiboa da α -peptidoa falta zaiolako.

pUC plasmidoarekin transformazioa egitean α -peptidoa ekoizten da, entzima konplementatuz eta β -galactosidasa aktibo bihurtuz.

Laburbilduz, hauek dira aterako diren emaitza posibleak aurreko material guztiak erabiltzerakoan (gogoratu beste plasmidoak erabiltzerakoan hautespena desberdina izango dela):

- Ez dira agertzen plakan: bakterioak ez daukate plasmidoak eta ezin dira hazi antibiotikoekiko erresistentzia ez daukatelako.

- Kolore urdina: bakterioak plasmidoa dauka, baina plasmidoa ez da errekonbinatu guri interesatzen zaigun genearekin. Honengatik lacZ' genearen transkripzioa ematen da eta X-Gal-aren liseriketa, kolore urdina emanez
- Kolore zuria: bakterioak plasmidoa dauka, gainera plasmidoa errekonbinatua da, guri interesatzen zaigun genea txertatuta dauka. Honengatik lacZ' genea ez da ondo adierazten eta ez da X-Gal-aren liseriketa ematen.



Egindako **transformazioaren efizientzia** (TE) kalkulatu dezakegu ekuazio honekin

TE= cfu/μg bektore

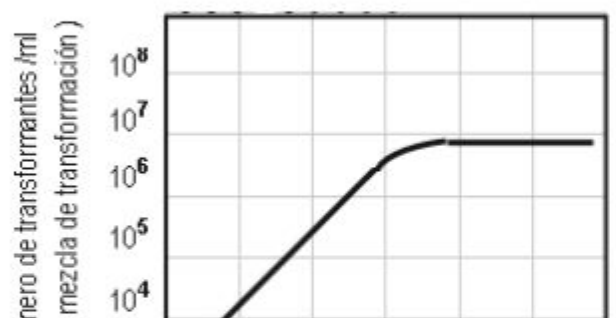
Loading...

Cfu (colony forming unit) = KUS (kolonia unitate sortaile)

Kultibo bakterianoak log fasean (Loading...bakteria/ml)

Efizientzaren kurba:

DNA kantitate txikiakin, transformatuen kopurua DNA kantitatearekiko proportzionala da. Kontzentrazioa batetik gora (nanogramoak),



transformatuen kopurua ez da igotzen. Saturazioa gertatzen da, DNA exogenoa hartu dezaketen zelulen kopuru maximora heldu gara (normalean bakterio gehienak 50ng-tan saturatzen dira).

Errekonbinazioaren efizientzia (EE)

EE (kolonia errekonbinatuak/ug bektore)

Loading...

Kultibo bakterianoak log fasean (Loading... bakterio/ml)

Transformazioaren maiztasuna (TM)

Loading...Loading...

Beste klonazio bektoreak: Lambda fagoa

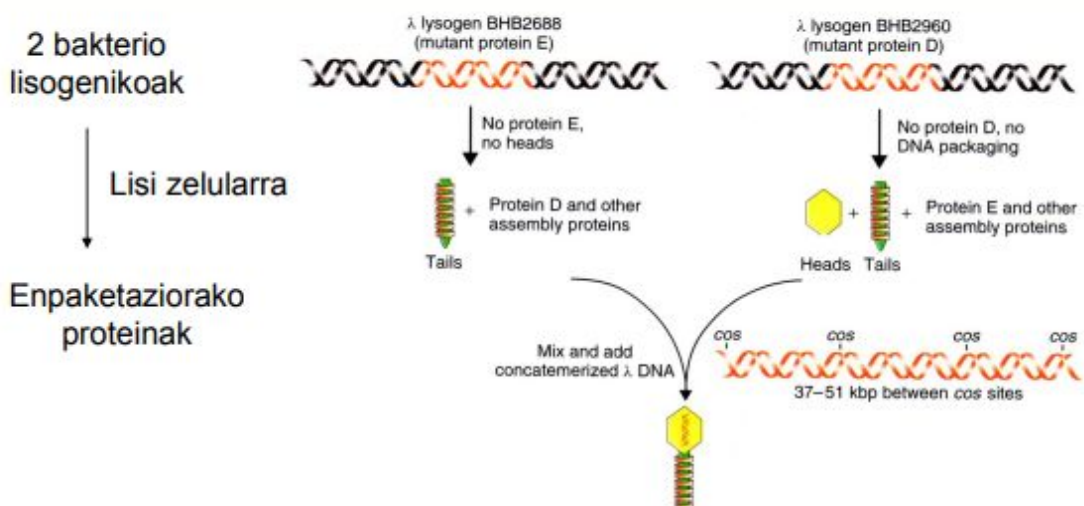
Fago basatiak bi ziklo dauzka: litikoa eta lisogenikoa. Guri interesatzen zaigun zikloa litikoa da, aktibo moduan egongo delako.

Klonak lortzeko fagoak eta *E.coli* bakterioak inkubatzen dira 50°C-tan uran eta gero eroin agar plaka batean.

Fagoaren gene batzuk ez dira beharrezkoak ziklo litikorako. Ziklo lisogenikoaren geneak kentzen dira eta bertan klonatu nahi dugun DNA zatia txertatzen da. Genomaren 18Kb gehienez ez dira beharrezkoak ziklo litikorako. Errestrikzio entzimen bidez egiten da hau.

In vitro enpaketaioa

Fagoaren enpaketaioa gertatzeko andui desberdinak beharrezkoak izango dira, enpaketaioa behar diren proteina desberdinak banaduta daudelako andui desberdinen artean.



Lambda fagoaren genomaren oinarritutako bektore hobetuak: sailkapena

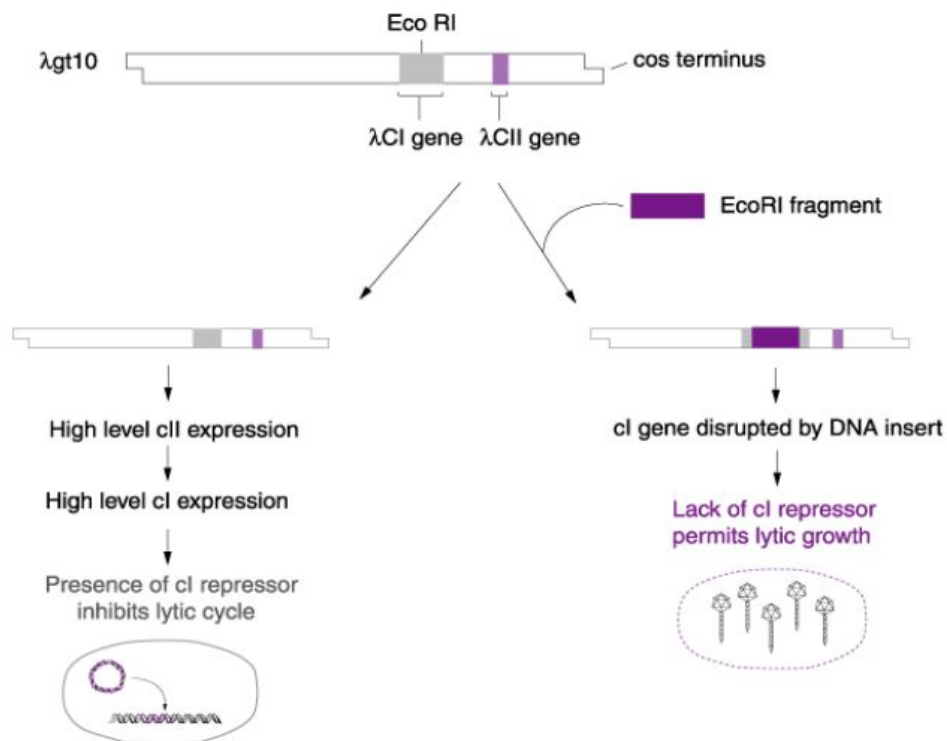
1. Txertaketa-bektorea

Lambda fagoaren genomaren zati handia kendu egiten da (lisogenian parte hartzen duten geneak, adibidez). Gune bakarra daukate DNA zatiak txertatzeko, hau da errestrizio-gune bakarra.

Enpaketatua izan daiteke intsertoarekin edo intserto barik. Gehienez 10kb-ko DNA zatiak klonatu daitezke: DNA zati txikiak edo cDNA (introi gabeko DNA sekuentzia)

Adibideak: λ gt10, λ gt11, λ ZAP

Laburbilduz, ziklo lisogenikoa burutzen badu fagoa ez dagoela errekonbinatua esango dugu. Aldiz, ziklo litikoa burutzen badu fagoa errekonbinatu dela esan dezakegu.



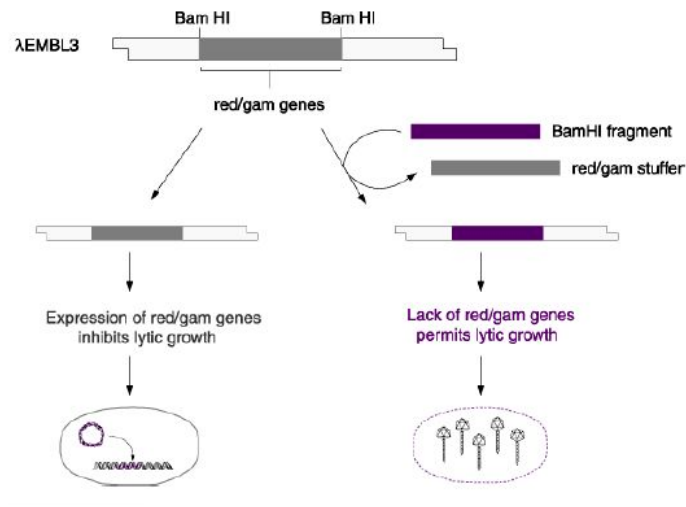
Irudian ikusten dugunez, CI geneak ziklo litikoa ekiditen dute. Eco RI gunean DNA zati exogeno bat txertatzen bada, ziklo litikoa baimentzen da. Honela jakingo dugu errekonbinatua den edo ez.

2.- Ordezkapen bektoreak

Lambda fagoaren funtsezkoa ez den DNA osoa kentzen da eta bertan intereseko DNA sekuentzia sartzen da (ordezkapena). Tamaina handiagoko DNA sekuentziak sartu daitezke → 2-6 kb tako DNA zatiak klonatu daitezke (DNA liburutegiak klonatzeko egokia da)

Bektore hauetan ordezkaturko den DNA zatiaren bi alboetara errestrikzio guneak daude (aurrekoan E.gune bakarra). Adibideak: Charon4a, EMBL3, lambda DASH.

Adibidea: Bi genek (red eta gam geneek) lisogenia sustatzen dute bektore basatian. Baina eskualde hau ordezkatzeko BamHI liseriketa eginez eta DNA exogenoa txertatzen, ziklo litikoa sustatzen da.

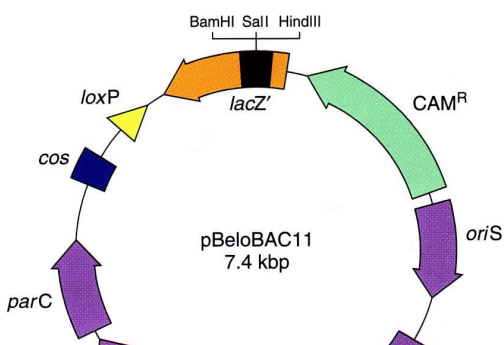
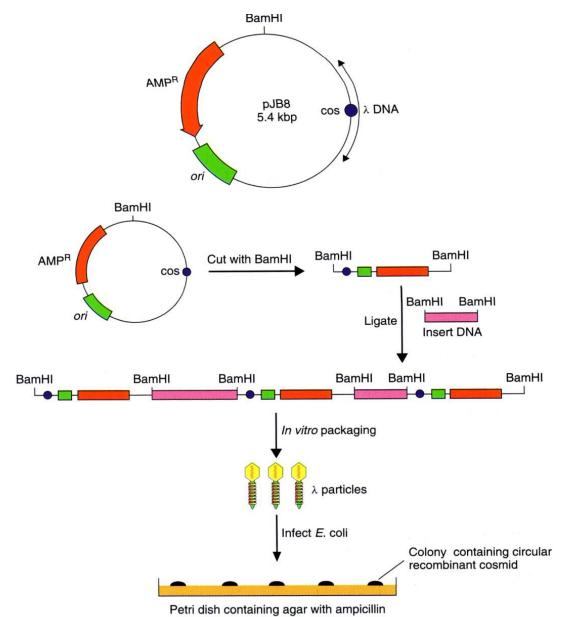


3.-Kosmidoak

Plasmidoaren ezaugarriak (erreplikaziorako hasiera gunea, amp^r) eta lambda-ren ezaugarriak (cos sekuentziak) bateratzen dituen bektorea. Enpaketazioa in vitro egiten da eta 45Kb-ko DNA exogenoa klonatu daiteke. Fago horiek *E.coli* zoldu dezakete eta behin barruan, plasmido bat balira bezala mantendu daiteke.

Cos sekuentziak fagoen genomari ageri dira eta paketatuia emateko erabiltzen da. Kosmidoek ez dute ziklo litikoa arduratzen diren lambda fagoaren geneak. Baina ez dute behar, bakterioaren barruan plasmido egoeran geratzen dira (ez da lisirik gertatuko). Hortaz, hautespena antibiotikoko erresistentzia oinarritzen da.

Bektorea liseritu egiten da BamHIekin eta DNA berdina. Inertzioa gertatzen da eta linealizatuko da konkatemeroak eratuz. Konkatemeroetatik abiatuta fagoak sortuko dira (enpaketazioa). Hauek *E.coli* infektatu eta hautespena anplazinarekin egin.



BAC (Bakterioaren kromosoma artifizia)

Giza genomaren sekuentziazioan erabili ziren. Moduluei erreparatu badiegu:

- Zelula kumei transferentziarako-erreplikaziorako hasiera gunea (oriS)
- Plasmidoaren erreplikazioa (repE)
- Plasmidoaren kopia kopurua kontrolatzen duten geneak → parA, B eta C
- Hautespena: Kloranfenikolarekiko erresistenteak eta urdin-zuri screening.

50-300 Kb ko sekuentziak klonatzeko erabiltzen dira. Metodoak plasmidoekin erabiltzen diren antzekoak.

YAC (Legamien kromosoma artifiziala)

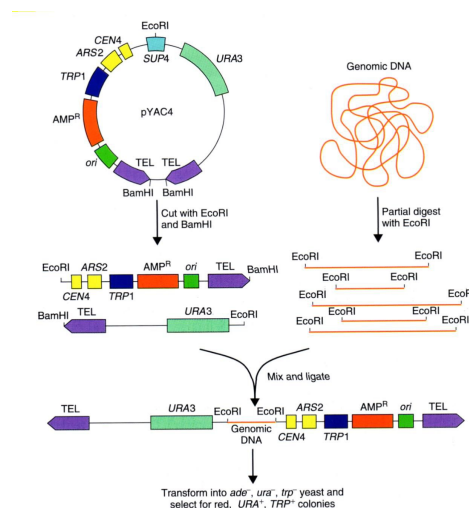
Modulu asko daude:

- Legamiaren erreplikaziorako hasiera gunea (ARS1)
- Segregazio kromosomiko legamiaren zentromeroa (CEN4)
- Sekuentzia telomerikoak (TEL)
- Hautespenerako markatzailea (URA3). Uraziloaren metabolismoan inplikaturako genea da, urazilo gabe hazten bada adieraziko dira.

Legamian erreplikatu daiteke *E.coli* bakterioan ere erreplikatu daiteke eta horretarako (oriC) eta amp^r eskualdea behar ditu.

Hautespenarko SUP4 genea erabiltzen dute. Gene honek zelula ostalariak duen mutazio bat konpentsatzen du (gorria izatea).

- Zelula ostalariak berez gorriak izango dira eta inserturik gabeko YAC bektorearekin transformatzean koloniak zuriak dira.
- Intereseko DNA YAC bektorean txertatzean SUP 4 genearen inaktibazioa gertatzen da eta ondorioz YAC+insertoarekin transformaturako koloniak gorriak izango dira.



Hautespenerako beste markatzaile batzuk daude:

- URA3 → Uraziloaren metabolismoan inplikaturako genea.
- TRP1 → Triptofanoaren metabolismoan inplikaturako genea

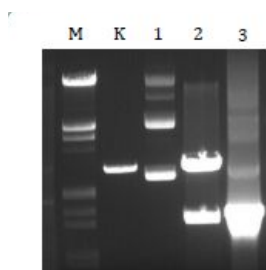
Plasmidoen berreskurapena

Behin bakterioetan transformatu eta klonaturakoan DNA hori bakterioetatik erazi behar da. CsCl zentrifugazioa lehen erabiltzen zen. Gaur egun, zutabeak erabiltzen dira. Metodo honetan, bakterioak

tratzen dira mintza apurtuz, gero DNAg proteinekin prezipitatzen da eta plasmidoak medioan geratzen dira. Soluzio hori zutabetik pasatzen dugu eta pDNA lortuko da.

Klonak analizatzea

Metodo ezberdinen bidez analizatu dezakegu: Errestrikzio entzimen bidezko liseriketa eginez+ elektroforesi, PCR bidez edo sekuentziazioa.



- Kontrola plasmido liseritua da, xingol bakar lineala.

- 1: Konformazio ezberdinak hartuko ditu, superbiribilketak azkarrago migratuko du eta borobilak geldoago.
- 2: 2 banda daude → plasmidoa eta intereseko DNA
- 3: PCR bidez, primerrak intereseko DNA ondoan jarrita daude, beraz soilik hori anplifikatuko.

6.GAIA: Gene heterologoaren adierazpena bakterioetan

1.-Sarrera

Gene heterologoa → Organismo batean adierazten den gene bat zeina beste organismo batetik eratorria den. Adb: Gizakiaren intsulinaren genea klonatzen dugu E coli bakterioetan eta bertan adierazten da. Intsulinaren gene hau heterologoa dela esango da (Giza intsulina errekonbinantea 1978 urtean ekoiztu eta 1982 urtean komertzializatu)

Helburua: Intereseko genearen adierazpena bultzatu kodetzen duen proteinaren proteina errekonbinantea kantitate handia lortzeko. Zertarako? Aplikazio ezberdinak proteinaren karakterizazioa egiteko, aplikazio bioteknologikorako (antibiotikoen ekoizpena, adibidez) ...

Prozesu honek zenbait abantaila eta desabantaila ditu:

ABANTAILAK	DESABANTAILAK
Genetikoki sinplea eta ondo karakterizatuak daude bakterioak (<i>E.coli</i> , adb)	Itzulpen ondoko eraldaketak ezinezkoak dira. Gizakietan metilazio, fosforilazioak... pairatu porteina aktibo izateko.
Hazkuntza zelular azkarra (bikoizketa 20-30 min)	Bakterioen lisiak PR purifikazioan arazoak dakartza. Bakterioen proteinak ere lortuko dira, batzuetan toxinak.
Medio merkean hazteko errazak	Inklusio gorputzen eraketa, proteina barruan geratzen dira eta solubilizazioa (<i>in vitro</i>) eta ber-tolesdura beharrezkoak dira.
Eskala handiko ekoizpena posiblea da	Endotoxinekin eta zelula ostalarien beste proteinekin ostalarien kontaminazioa
Adierazpena maila altua	(PR= Proteina errekonbinantea)

Gene eukaritoikoa adierazpena zaila da bakterioetan baina arazoei irtenbidea eman zaie:

- 1) Bakterioek introiak ezin dituztenez kendu, mRNA behar dute klonatzeko, beraz **cDNA** klonatzen da.
- 2) Ostalariak ez ditu promotore eukariotikoak ezagutzen eta hortaz ez litzake adierazpena emango. Hau konpontzeko, **promotore bakterianoak** erabiltzen dira.
- 3) PR toxikoak izan daitezke eta ostalaria hil, horregatik, **promotore induzigarriak** erabiltzen dira. Hau da, guk aukeratu noiz adieraziko den.

- 4) Itzulpen-ondoko **eraldaketak eta tolesdura *in vitro*** egiten dira.
- 5) PRak degradatu daitezke ostalari barruan eta hori ekiditeko **fusio-proteinak** daude, hauek PRari lotzen zaie bakterioek ezagun gisa hartu eta ez degradatzeko.

Zer pausu egin behar dira gene eukariotikoak bakterioetan adierazteko?

- 1.-cDNA klonatu bektore egokian
- 2.-Genearen adierazpena → Proteina ekoiztu
- 3.-Proteina errekonbinantearen purifikazioa
- 4.-Beharrezkoa balitz, *in vitro* itzulpen-ondoko eraldaketak egin.

KONTUAN IZAN!

Bektoreak

- Transkripzioa emateko seinale egokiak behar dira: Promotoreak, transkripzio bukaerako seinaleak...
- Itzulpenerako seinale egokiak: Shine Dalgarno, kodoien erabilera (bakterio eta eukariotoetan maiztasun ezberdinak), mRNA-ren egitura eta egonkortasuna mantentzeko fusio-proteinak ...
- Klonatutako genearen kopia kopurua (gehienez 40 kopia/zelula, bestela saturatu).

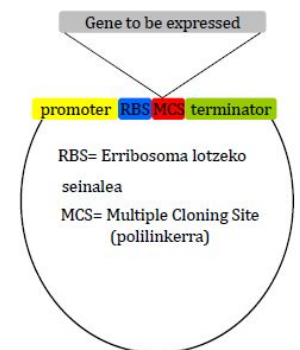
Proteina

- Toxizitatea, purifikatzeko ahalmena
- Tolesdura eta egonkortasuna

2.-Adierazpen bektoreak

Nolakoak izan behar dira erabiliko ditugun bakterioak adierazpen minimoa lortzeko?

- Erreplikazioarako hasiera gunea (ColE1 ori)
- Hautespenerako genea (antibiotiko batetiko erresistentzia genea)
- Polilinkerra (genea intsertatu nahi dugun lekua)
- Promotore prokariotikoa (adierazpena gertatzea eragiten duena)
- Trankripzioa bukatzeko seinalea
- Erribosoma lotzeko seinalea



Proteina errekonbinantearen adierazpenean eragina izango duten faktore ezberdinak daude, bektorearekin erlazionatuta

- Adierazpen bektorearen kopia kopurua (1-2000 kopia zelula bakoitzeko). Proteinaren sintesia linealki hazi 600 kopietaraino. Hala ere Kopuru handia arazoak ekar ditzake (mutazioak, bektorearen egonkortasuna...), kolaps metabolikoa.

- Transkripzioko promotoreak (bakterianoak)
 - Promotorearen indarra
 - Promotorearen erregulazioa (beste eskualde erregulatzaileak)

·Itzulpena

- Erribosoma lotzeko gunearen indarra
- Efizientzia

3.-Promotore motak

- 1.-Promotore konstitutiboak → Genearen adierazpena etengabekoa da.

- Proteinaren kopuru handia bermatu nahi dugunean. Bakterioaren proteina kopuru osoaren %10 dira
- Arazoak ekar ditzake proteina kopuru altuegia zelulan (adb: toxikoa izan daiteke)

2.-Promotore erregulatua haien aktibitatea erregulatu daiteke (inhibitu/ aktibatu).

Promotoreak prokariotoetan

Prokariotoen geneen promotoreek RNA polimerasa lotuko deneko bi sekuentzia dituzte: **-10 eta -35 eskualdetan** (genearen transkripzioarako hasiera gunearen ur-gora). Sekuentzia hauek oso kontserbatuta daude gene ezberdinetan eta akordio sekuentzia deitzen zaie. Hortik ur-behera operadorea da eta bertan errepresorea lotuko da. Operadoreak promotorearen aktibitatea erregulatuko du .

	-50	-33	-10	+1	+20
<i>P_{lac}</i> · <i>P_{lacL8}</i>	ATTAGGCACCCAGGC	TTTACA	CTTTATGCTTCCGGCTCG	TATGTT	GTGTGG AATTGTGAGCGGATAACAATTTCCACACAG
<i>P_{lacUV5}</i> · <i>P_{lacL8.UV5}</i>	ATTAGGCACCCAGGC	TTTACA	CTTTATGCTTCCGGCTCG	TATAAT	GTGTGG AATTGTGAGCGGATAACAATTTCCACACAG
<i>P_{tac}</i>	ATTCTGAAATGAGCTG	TTGACA	ATTAATCATCGGCTCG	TATAAT	GTGTGG AATTGTGAGCGGATAACAATTTCCACACAG
<i>P_{con/03}</i>	TCGAGCACCGTCGTTG	TTGACA	TTTTTAAGCTTGGCGGT	TATAAT	GGATTC AATTGTGAGCGGATAACAATTTCCACACAG
<i>P_{A1/03}</i>	TTTATCAAAAAGAGTG	TTGACT	TAAAGTCTAACCTATAG	GATACT	TAGATTCAATTGTGAGCGGATAACAATTTCCACACAG
<i>P_{A1con/03}</i>	TTTATCAAAAAGAGTA	TTGACT	TAAAGTCTAACCTATAG	TATAAT	TAGATTCAATTGTGAGCGGATAACAATTTCCACACAG
<i>P_{N25/03}</i>	ATCATAAAAAATTTAT	TTGCTT	TCAGGAAAAATTTTCTG	TATAAT	AGATTC AATTGTGAGCGGATAACAATTTCCACACAG

Promotore baten indarrak transkripzioaren abiadura markatuko du eta promotorearen indarra akordio sekuentziarekiko promotore horrek duen antzekotasunak zehaztuko du. 2 promotore mota bereizten dira:

- Promotore indartsua: Akordio sekuentziaren oso antzekoa (adb: *recA*)

TTGATA -- 16 -- TATAAT
TTGACA -- 17 -- TATAAT

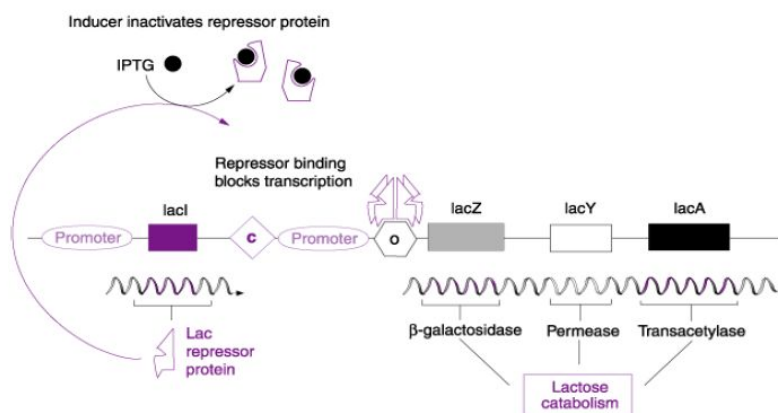
- Promotore ahulak: Akordio sekuentziarekin konparatuta ezberdintaun gehiago (adb: *araBAD*)

CTGACG -- 18 -- TACTGT
TTGACA -- 17 -- TATAAT

Promotore induzigarri erabilienak: *Plac* (edo *lacUV5*), *P_{trp}*, *P_{trc}*, *P_{tac}*, *P_{I7}* (T7 fagoaren gene 10), *PL*.

Plac

Lac operonaren promotorea da, erregulazio negatiboa du LacI erregulatzailaren bidez (Laktosa ausentzian proteina errepresorea operonari lotuta eta transkripzioerik ez). Sistema induzigarria da IPTG bidez (laktosaren analogoa), hau proteina errepresoreari lotu eta sistema libre geratuko da..



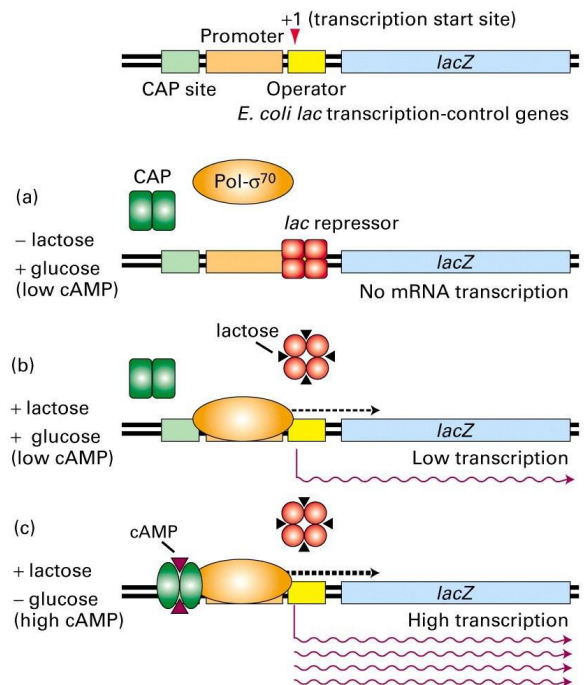
LacI gene konstitutiboaz gain beste eskualde erregulatzailerik bat dago: **CAP eskualdea**. © Bakterioek berez glukosa nahiago dute laktosa baino, beraz glukosaren presentzian ez dute Lac operona erabiliko eta operadorea inhibitu beharko da.

-Glukosa + eta laktosa - dagoenean, AMP zikliko gutxi egongo da (gosearen seinalea), izan ere medioan glukosa(=janari) asko egongo da. Honen eraginez CAP eskualdea aske geratuko da, LacI geneak p. errepresorea sortuko du eta hau operadoreari lotuko zaio, beraz Lac operonaren transkripzioa ez da emango.

-Laktosa + eta glukosa - dagoenean, cAMP altua izango da (gose seinale altua) eta CAP proteinarekin lotuko dira, hauen konformazioa aldatuz eta CAP eskualdearekin elkartuz. Laktosa p.errepressoarekin lotuko da, operadorea aske utziz eta transkripzioa emanez. Izan ere CAP proteina + AMPc CAP eskualdera lotzea ezinbestekoa RNA polimerasa lac operonaren promotorerara lotzeko.

-Glukosa + eta Laktosa + dagoenean, cAMP oso baxua izango da, beraz, ez da CAP proteinarekin lotuko eta eskualde bera aske geratuko da. Ordea, laktosa badagoenez, p.errepressoarekin lotuko da eta transkripzioa emango da baina maila oso baxua.

Plac wild-type: **TTGATA -- 18 - TATAAT**
P consensus: **TTGACA -- 17 - TATAAT**



Plac indartsua izango da eta beraz adierazpena igotzea lortuko dugu. Normalean placUV5 erabiliko da, mutantea da eta CAP proteinaren lotura gunean du mutazioa. Mutazio horrek promotorearen aktibitatea cAMP rekiko independentea izatea eragiten du. Beraz, berdina zaigu glukosa dagoen ala ez, glukosa presentzian promotorea aktibo egongo da, transkripzioan emanez. Promotore basatia (baino potenteagoa da)

Erregulazioa: -Inhibitu: LacI proteinaren bidez
-Induzitu: IPTG bidez

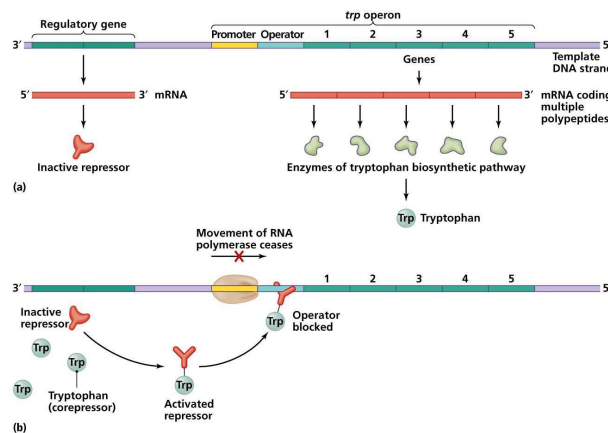
P_{trp}

E.coli ren triptofanoren operona erregulatzeko duen promotorea da. 5 gene daude promotore beraren kontrolpean. Kasu honetan erregulazioa negatiboa da, gene erregulatzailerik errepresso inaktiboa sortzen du eta egoera honetan transkripzioa eman eta triptofanoa sortuko da.

Trp asko dagoenean, p.errepressoari lotuko zaio, konformazioa aldatu eta operadorea lotuko dira transkripzioa inhibituz.

Erregulazioa: -Inhibizioa: Triptofanoa
-Indukzioa: Triptofanoa kendu eta azido indolazetikoa gehitu

Promotore hau ez erabili triptofano-eduki altuko proteinek, promotorea inaktibatuko baita.



Ptac

PlacUV5 eta Pptrp
 da: Pptrp-ren -35
 PlacUV5-ren -10
 Promotore

promotoreen hibridoa
 kutxa eta
 kutxa.

indartsuagoa da:

- Plac baino 10 aldiz indartsuagoa
- Pptrp baino 5 aldiz indartsuagoa

Ptac: TTGACA - 16 -- TATAAT
 P consensus: TTGACA -- 17 -- TATAAT

Erregulazioa: -Inhibizioa: LacI
 -Indukzioa: IPTG

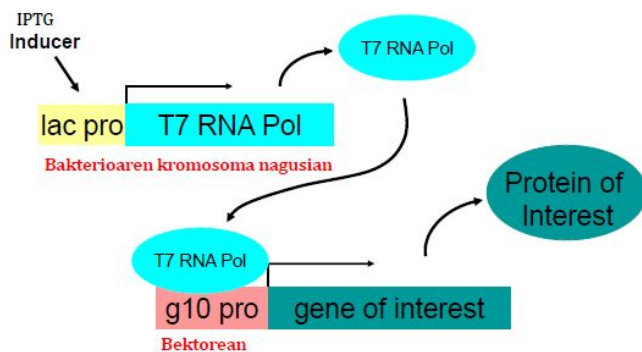
Adierazpen errendimendu altuko bektoretan erabiltzen da → PR-ren adierazpena adierazten den proteina osoaren %30-a izatera hel daiteke.

T17 (T7 fagoaren 10. genearen promotorea)

AZTERKETAN* boletoko

T7 fagoaren promotore guztiek (10. geneak barne) T7 RNA Polimerasa behar dute adierazteko eta bakterioen RNA polimerasak ez ditu promotore hauek ezagutzen. ezagutzen. Oso promotore indartsuak dira. Nola lortzen da beraz erregulazioa?

- T7 RNA polimerasa kodetzen duen genea lac promotorearen kontrolpean *E.coli* bakterioetan. Kromosoma nagusian, genomak.
- Intereseko genea 10. genearen promotorearen menpean egon daiteke.



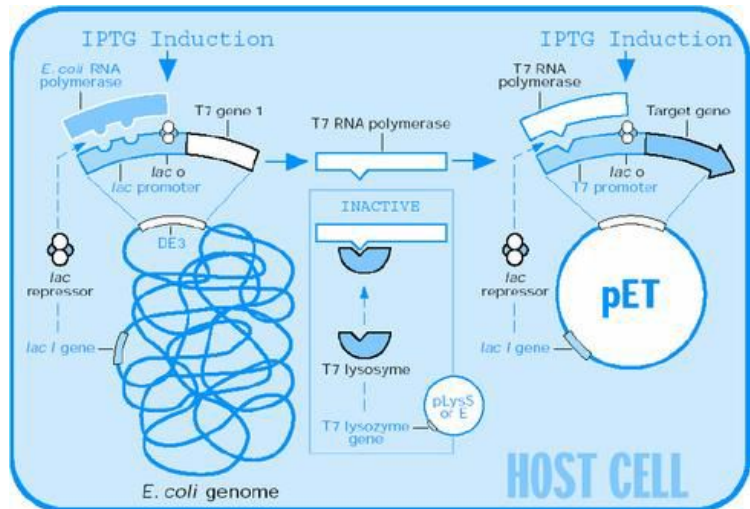
Sistema hauek asko hobetu dira → **pET**

Bakterioaren genomak T7 genea barne hartzen duten DE3 profagoa dute. Honek T7 RNA polimerasa kodetzen duen darama LacUV5 promotorearen kontrolpean. Kromosoman bertan ere LacI genea ere badugu.

Kasu honetan, bektorean ere LacI genea ere sartzen da. Beraz, IPTG ez dagoenean, ez da adierazpena emango, p.erreprestore aktibatuta egongo delako eta 2 LacI daude erreprestore lana egiten. IPTG dagoenean, erreprestore biek lotuko da, eta T7 genea adieraziko da, T7

polimerasa sortuz eta T7 polimerasa promotorearekin lotuko da intereseko genea transkribatuz.

PR-ren adierazpena adierazten den proteina osoaren >%50a izan daiteke ordu gutxitara.

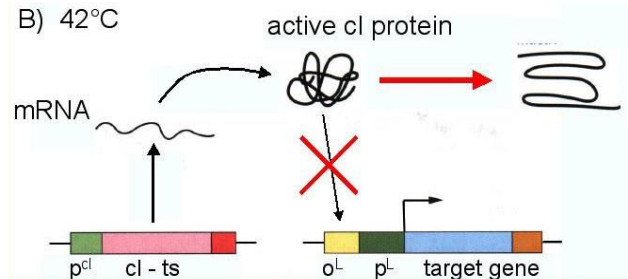
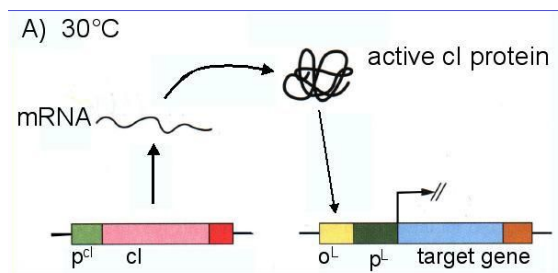


PL

Lambda fagoaren gene goiztiarren ezkeraldeko promotorea da eta tenperaturaren menpean erreprimigarria da.

·Inguru tenperatura, Ci proteina errepresorea sortuko da eta aktibo dago, beraz operadoreari lotuko da eta genea ez da adieraziko.

·T igotzean, Ci proteina hori termosentikorra denez, konformazioa aldatuko zaio, inaktibatuz eta genea adieraziko da.



4.-Itzulpena

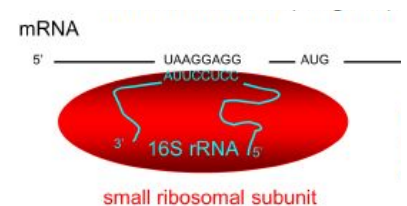
Behin transkripzioa eman dela, itzulpena areagotu egin behar dugu. Zergatik?

·Promotore indartsuek mRNA kopuru handia ekoiztuko dute.

·Itzulpen eraginkorra eta indartsua behar da proteina kantitate handia ekoizteko.

a) Itzulpeneko seinalea RBS (=Ribosome binding site) → Shine-Dalgarno sekuentzia

6-8 nukleotidoz osatutako sekuentzia da eta bektorean barneratu behar dugu itzulpenaren hasiera gunetik (AUG) tik 10 nt urgora. Sekuentzia erribosomaren subunitate txikiaren 16S rRNA sekuentziarekiko osagarria izango da eta lotura indartsuago bihurtuko du.



b) Kodoien erabilera

Izaki desberdinetan kodoien erabilera desberdina izan daiteke: Kodoi ezberdinen erabilera maiztasuna desberdina da. Esaterako: Gly kodetzen duten kodoietatik GGA *E.coli*n gutxi

erabiltzen da eta gizakietan asko (*E.colin* kodoi hori ezagutuko dituzten tRNA gutxi → efizientzia txikitu)

Nola hobetu daiteke kodoien erabiera?

- Kimikoki gene berria sintetizatu → Intereseko genearen sekuentzia aldatu, izaki ostalariaren maiztasun handiz erabiltzen diren kodoiak hautatu.
- Ostalari egokia erabili → Kodoien erabilera berdina daukan ostalaria hautatu
- Ostalaria genetikoki eraldatu → Kopuru txikian agertzen diren tRNAk gain adierazteko

c) Egitura sekundarioak ekidin

Egitura sekundarioak ekidin behar ditugu, erribosomaren mugimendua oztopatzen dutelako eta efizientzia murriztu, beraz derrigorrez mRNA lineala izan behar da.

A
C G
G-C
U-A
A-U
U-G
A A
A-U
A-U
A-U
G A
G-U
G-U
G-U

5' GAACCG-3' GAACAC 3'

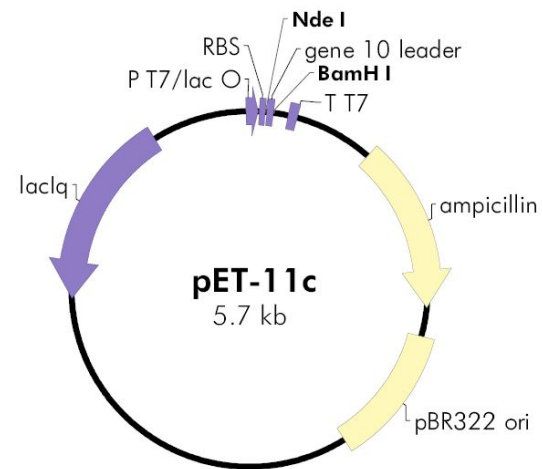
pET bektorea *

Zer modulu ditu?

- ori, erreplikazio hasiera
- Antibiotikoekiko erresistentzia (gene hautakorrak)
- LacI genea, sistema kontrolatzeko.
- Lac operonaren operadorea → proteina errepresorea lotzeko
- T7 RNA polimerasaren promotorea
- T7 RNA polimerasa kodetzen duen genea ostalariaren genomaren.
- RBS erribosoma lotzeko gunea,
- Polinkerra barruan intereseko genea barneratzeko.

Erregulazioa: -Inhibizioa: LacI operonak sortutako proteina errepresorea

-Indukzioa: IPTG, T7 RNA polimerasa adieraztea eragin.



Proteinen maila, proteina errekonbinantea toxikoa izan daiteke ostalariarentzat, nola eragin?

- Proteina errekonbinantearen adierazpenak zelularen metabolismo eta hazkuntzarekin interferitzen du → Zelula ostalariaren heriotza eragin dezake
- Proteinen gain-adierazpenak karga metabolikoa handitzen du eta ondorioz ostalaria agortze metabolikoa gerta daiteke (hau ez legoke toxikotasunarekin lotuta)

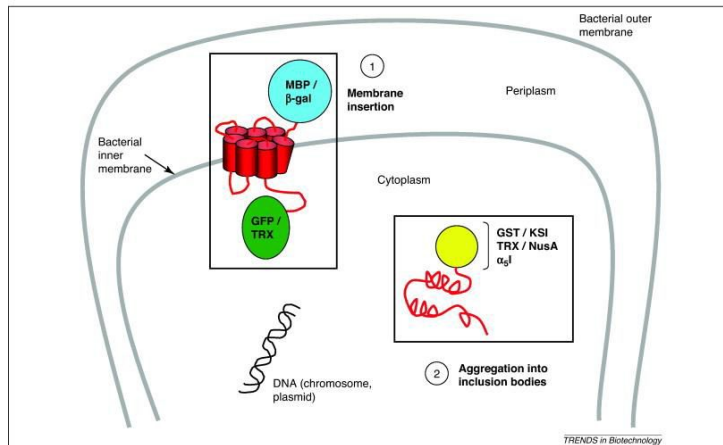
Proteina disolbagarrien %80-ak toxizitate maila esanguratsua dauka ostalariarentzat eta proteina guztien %10a oso toxikoa da. Hala ere, funtzio gabeko proteina disolbaezinak ez dira toxikoak izango ostalariarentzat, inklusio gorputzetan metatuta geratuko direlako zitoplasman. Beraz hau interesgarria izan daiteke.

Proteina errekonbinantearen ekoizpenaren errendimendua handitzeko 3 estrategia daude:

a) Proteina errekonbinantearen helbideratzea

Bakterioetan 2 mintz daude eta haien artean periplasma kokatzen da eta proteina bakoitzak seinale bat izango du, adieraziko diona bakterioari nora bidali behar den proteina, adb: Periplasmara, medio extrazelularra...

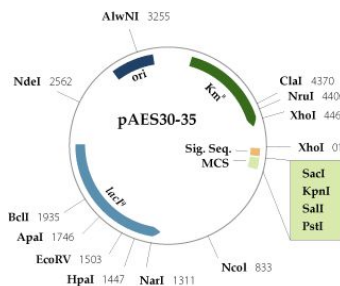
Guri interesatzen zaiguna bakterioaren barne mintzean txertatzea interesatzen zaigu PR-aren purifikazioa errazagoa izango delako bertan. Hori egiteko Tag proteina gehitzen zaio PR-ri eta honek seinale bat izango du proteina barne mintzean txertatzeko. Tag proteinek → MBP, β-gal, GFP edo TRX.



Barne mintzean proteinaren purifikazioa errazagoa izango da eta gainera leku egokia izango da ber-tolesdura gertatzeko eta beste proteinen kutsadura ekiditeko.

Seinale ezberdinak daude eta hauek bakterioari informazioa emango diote, identifikaziorako eta nora bidali jakiteko et ez

degradatzeko, mota ezberdinak. Seinale horiek bektorean txertatu daitezke. Esaterako pAES bektorean.



Zer bektore agertzen dira?

- OriC erreplikazio hasiera gunea
 - Kanamizinarekiko erresistentzia
 - LacI errepresorea
 - Errestrikzio gune ezberdinak
 - MCS → Polilinkerra
 - Seinale sekuentzia → Bakterioan nora bidali jakitzeko
- Kasu honeta ez da promotorerik ageri baina egon behar da.

b) Proteinen jariapenatarako bidezidorrak

Proteina errekonbinantea zuzenean mediora jariatu daiteke, eta horretarako *E.coli* ren bidezidorrak erabiltzen dira. Bidezidor ezberdinak daude baina gehien erabiltzen dutena *SEC pathway* da, Honen bidez behin proteina kanpoan izanda errazagoa izango da proteina purifikatzea.

c) Proteinaren metaketa inklusioa gorputzetan

Bakterioek proteina batekin ez dakitenean zer egin **inklusio-gorputzetan** sartzen dituzte. Bertan proteina disolbaezinak, puruak (>90%) metatzen dituzte. Proteina desnaturalizatuak zitoplasman metatzen dira.



E.coli-n proteina errekonbinanteen adierazpena oso altua denean, proteinak ez dira behar bezlaa tolesten eta inklusio gorputzetan dira. Bertatik berreskuratu daitezke eta purifikatu, bertolesketa *in-vitro* eginez. Hala bakterioek ez dituzte PR-ak degradatzen.

Hala ere oraindik arazo bat daukagu, izan ere, bakterioek sortzen dituzten proteinek PR-ak degradatzen dituztelako. Hori ekiditeko **fusio proteinak** erabiltzen dira → PR-a bakterioaren proteina batekin lotzen da eta hala, bakterioak ezagutzen du.

Proteina errekoninantea lortzeko 2 arazo nagusi ditugu:

- 1) Degradazioa: intereseko proteina degradatzen da (ostalariaren proteasen aktibitateagatik) eta ondorioz intereseko proteinaren kantitate gutxi lortzen dugu. Konponbidea → Intereseko proteina ostalariaren proteina egonkor bati kobalentez lotzea. Ostalariaren proteina horrek gure intereseko proteina proteasen efektutik babestuko du
- 2) Purifikazioa: Proteina errekonbinantearen purifikazioa zaila da eta ondorioz intereseko proteinaren kantitate gutxi lortzen dugu. Konponbidea → Intereseko proteina erraz purifikatu daitekeen proteina bati lotzea.

FUSIO-PROTEINAK

Intereseko proteina eta gero “Tag” edo “Carrier” proteina horri lotuta. Hala ere ordena alderantzizkoa izan daiteke baina guk gure bektorean ezin dugu proteina barneratu, genea baizik, beraz **fusio genea** txertatzen da → Fusio-proteina ekoizten duten gene biren konstrukzioa. Fusio-geneak intereseko proteina adieraziko duen geneaz gain, “carrier” edo “tag” proteina adieraziko duen geneari fusionatuta dago, biek irakurtarau bera mantenduz.

Fusio genea (Intereseko genea + “carrier” edo “tag” kodetzen duen genea) transkribatu eta itzultzen denean → Fusio proteina sortu.

Hasierako kodoiak intereseko genean egongo da eta STOP kodoa “Tag” genean, beraz intereseko genean STOP kodoia kendu behar da, irakurtaraua mantentzeko.

Kontuan hartu fusio proteinak eratzeko:

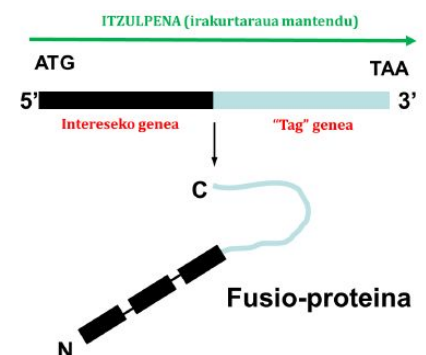
- Kendu lehenengo genearen STOP kodoia
- Irakurtaraua mantendu behar da gene bietan
- PR-ren tolesdura ez aproposa balitz, modulu bat “spacer” sartu beharko genuke tolesdura egokia sustatzeko.
- Behin purifikatuta, PR eta tag banantzeko liseriketa proteikoa egiten da. Honetarako, proteasen itua dituzten moduluak sartu daitezke bi **geneen** artean.

Gene egonkorra (tag) Intereseko genea

```
MET ... LEU |ARG THR MET VAL ILE ... End
ATG ... GTG CGA ACC ATG GTG ATC ... TAG
```

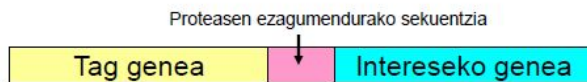
Adibide honetan lehenengo Tag genea dugu eta gero intereseko genea. Lehenengo Tag genearen STOP kodoia kendu behar da irakurtaraua jarraia izan dadin. Tag genea egonkorra izateko, intereseko proteinaren -NH₂ edo -COOH muturretan marka bat itsatsi daiteke. Tag proteina hau mota ezberdinetakoa izan daiteke:

- Domeinu katalitiko
- Domeinu antigenikoa



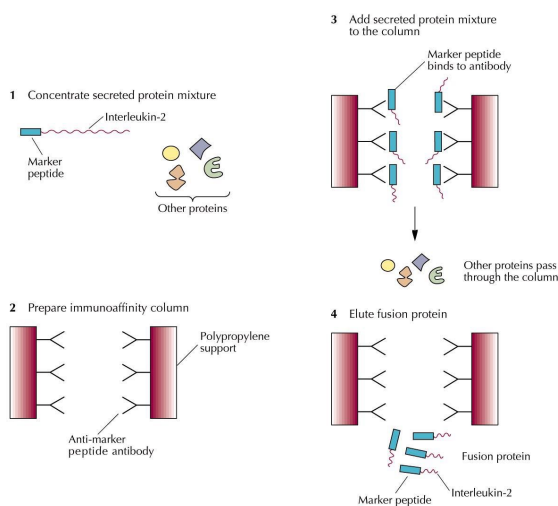
-Seinale peptidikoa.

PR eta *Tag* proteina banatzeko proteasaren bidezko liseriketa ahalbidetuko duen modulu bat txertatu behar da eta proteasaren itu gune hori intereseko genearen eta *tag* genearen artean egongo da. Sekuentzia hauek txikiak dira eta aminoazido sekuentzia hori ezaguna izango da proteasarentzat.



Tag proteina erabiltzearen abantailak:

- Intereseko proteina babesten dut, PRren proteolisia ekidinez.
- Proteinaren solubilitatea hobetzen du
- Intereseko proteina egonkortzen du
- Purifikazioa errazten du



Fusio proteinen purifikazioa

Tag proteinari antigorputzak (Ab) edo molekula txikiak lotzen zaizkio osagarritasunez, esaterako: Zutabe batera. Molekula txiki edo Ab -ak euskarri inerte bati lotuta egon daitezke. Fusio proteinak zutabetik pasatzerakoan zutabeari itsatsita geratuko dira *Tag* proteinak, zutabearen bertan berarekiko osagarriak diren Ab egongo baitira. Ondoren euskarriari lotutako proteina eluitu daiteke.

Irudian purifikazioa zutabe kromatografikoan ikus dezakegu, behin purifikazioa eginda, lisia egiten da, PR soilik lortzeko.

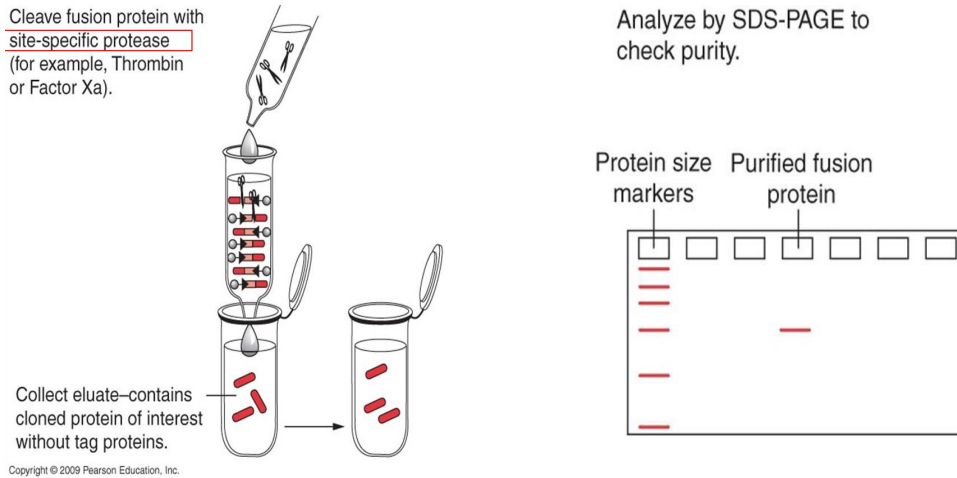
Hemen zenbait *Tag* proteina ageri dira eta baita afinitatea izateko zer gehitu behar zaion erretsinari eta eluitzeko zer konposatu erabili behar den.

fused partner	affinity resin	Eluent
β-galactosidase	APTG	sodium borate (pH 10)
ProteinA	IgG	0.5 M acetic acid
★ Glutathione-S-transferase	glutathione	5 mM GSH
★ Maltose-binding protein	crosslinked amylose	10 mM maltose
Chloramphenicol	Chloramphenicol-	chloramphenicol
Acetyltransferase	Sepharose	
Carbonic anhydrase	sulfonamide-affinity resin	Tris-sulfate
Cellulose-binding protein	cellulose	water
★ Poly(histidine)	immobilized Ni	imidazole
★ FLAG	anti-FLAG	EDTA
Poly(arginine)	S-sepharose	NaCl gradient
Poly(cysteine)	thiopropyl-sepharose	mercaptoethanol or DTT
Poly(phenylalanine)	phenyl-sepharose	ethylene glycol

PR eta *Tag* banaketa

Banaketa egiteko estrategia desberdinak erabiltzen dira. Posible da zutabearen bertan liseriketa egitea, hau da, eluzioa egin baino lehen proteasekin tratatuko bagenu, *Tag* eta PR askatuko liriteke eta soilik PR purifikatua lortuko genuke, *Tag* proteina zutabearen geratuko

litzatekeelako. Hau egin ondoren baieztatu behar dugu, lortutako zatiak PR direla bakarrik eta horretarako Western blota egingo litzateke. Purifikazioa ondo badago soilik banda bakarra agertuko zaigu eta banda horrek gure proteinaren tamaina bera izan behar du. Handiago balitz *Tag* proteina ere pegatuta legoke eta purifikazioa gaizki eginda. Txikiagoa balitz, ez da proteina osoa lortu.

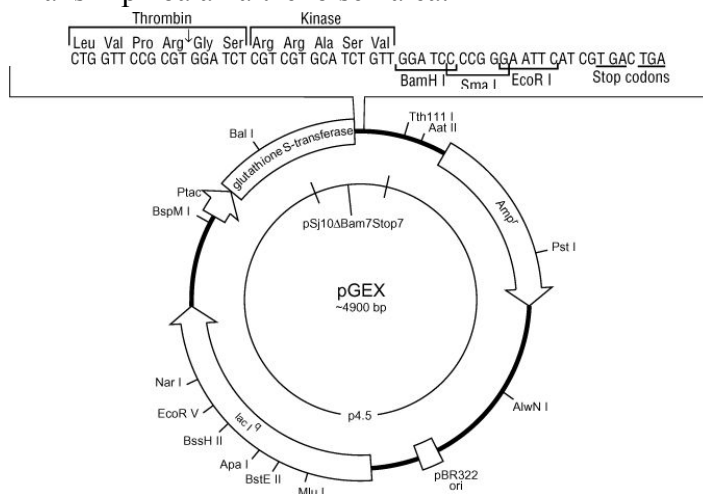


KONTUAN IZAN! Erabiltzen dugun *Tag* mtaren arabera, purifikazioa eta erabilitako bektoreak ezberdinak izango dira! Orain *Tag* proteina mota ezberdinak ikusiko ditugu:

a) GST Tag: Adierazpen bektorea pGEX

Kasu honetan *Tag proteina* glutationa-S-transferasa da eta honen afinitate marka GST-Glutationa. Eskeman modulu ezberdinen ordena ikus dezakegu:

- pTac promotorea → paUV5 eta pTrpren hibridoa dena.
- GST genea (marka)
- Polilinkerra, non gure intereseko DNA sartzen dugun
- Transkripzioa amaitzeko seinalea.



Marka eta gene errekonbinantearen artean proteasaren ezagumendurako sekuentzia egongo da (trona) eta honen ondoren domeinu katalitikoak ageri da (kinasa) egonkortasuna emateko. Jarraian 3 E.gune eta gero STOP kodoia. Hauetaz gain beste modulu batzuk ere ikus ditzakegu:

- Anpliziniarekiko erresistentzia genea
- OriC erreplikazio eskualdea

·LacI genea

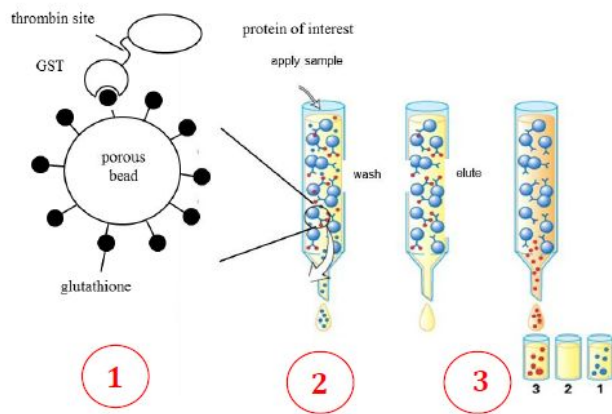
Beraz, sistemaren induzitzailea IPTG izango da eta inhibitzailea LacI.

Zer da GST marka? Eukariotoetan zein prokariotoetan adierazten den entzima metabolikoa da, eta honek Glutathione era erreduzitzailearen konjugazioa katalizatzen du. Purifikazioa horrela egiten da:

1-Fusio proteina (GST + PR) glutathionari lotzen da, bertan egongo baita zutabeetako bolatxoetan.

2-Lotu ez diren porteinak garbiketa bidez kentzen dira

3-PR eluitzen da eta hala Glutathione-GST-PR konplexua daukagu. PR soilik lortzeko proteasa gehitzen da eta honek tronbinarekin erreakzionatuko du.



b) Maltosa

pETM-44

Bektore honen

operadorea (T7/LacO) da. Beraz, T7 kodetzen duen genea bakterioaren genomaren egon behar da. Honetaz gain beste modulu batzuk daude:

·His-tag: Histidina buztana (marka)

·MBP (marka)

·3C proteasaren itua

·Polilinkerra

·Transkripzioa amaitzeko seinalea.

·OriC

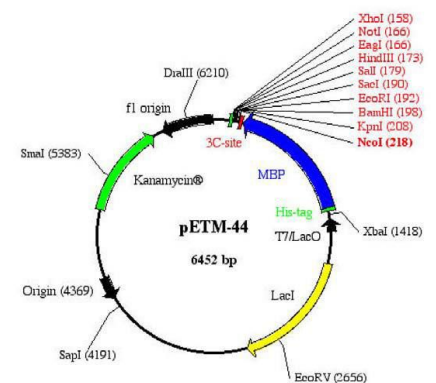
·Kananizinarekiko erresistentzia genea

·LacI genea

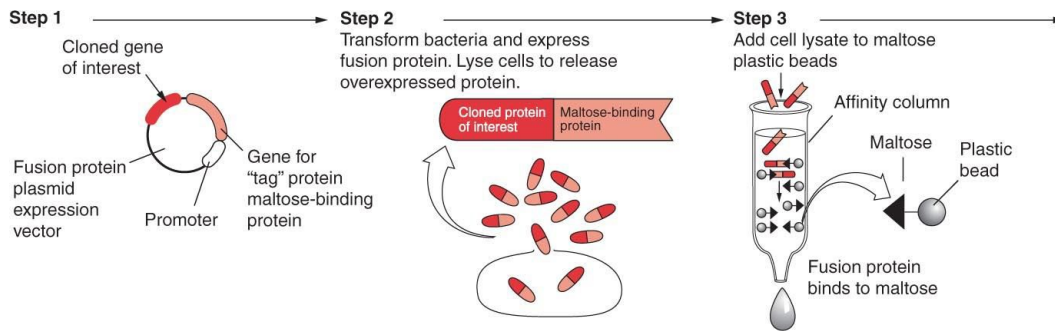
·F1 eskualdea, M13 fagoaren erreplikaziorako hasiera gunea da eta DNA monokatenarioa ekoizteko gaitasuna ematen du. Erreplikazioa bertatik hasten bada plasmidoaren bertsio sinpleago bat sortuko dugu → kate bakuneko plasmidoa.

Binding Protein (MBP)-tag:
Adierazpen bektorea

promotorea T7 + lac



Demagun gure intereseko genea bektore honetan klonatu dugula eta purifikazioa MBP markaren bidez markatzen dugula. Behin bi moduluak bakterioan txertatzen ditugunean, bakterioak transformatu eta fusio proteina adierazten da. Bakterioak liseritzen ditugu eta proteina mediotik jasotzen dugu. Proteina horiek maltosa zutabe batetik pasatzen ditugu, fusio proteinak bertan itsatsita geratzeko. Ondoren proteasa gehituz, MBP eta PR banatzen ditugu, PR lortuz.

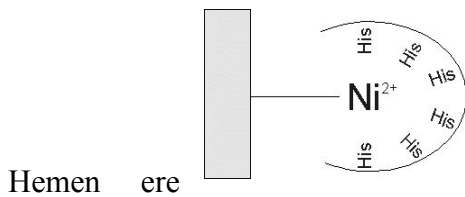
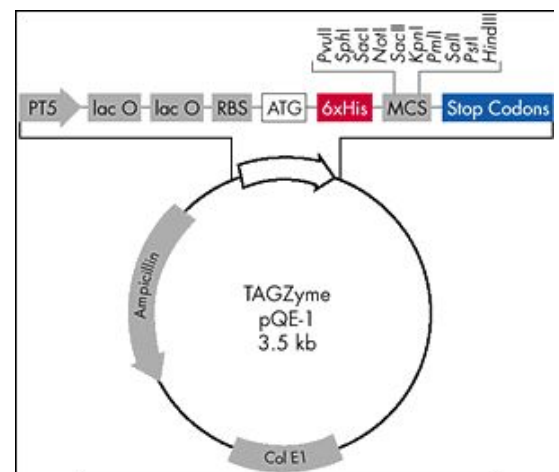


c) Hist tag: Adierazpen bektorea pQE

Bektore honetan T7 promotorea beharrean PT5 baina modu berean aritzen da. Ondoren lacO (2), erribosomak lotzeko gunea, histidinaren marka, polilinkerra eta transkripzioa amaitzeko kodoiak agertzen dira. Horretaz gain, erreplikazio hasiera (Col E1) eta aplizininarekiko erresistentzia genea dago.

Behin genea bektore honetan txertatuta eta bakterioan transformatuta, nola egingo genuke purifikazioa? Nikel zutabea erabili behar da.

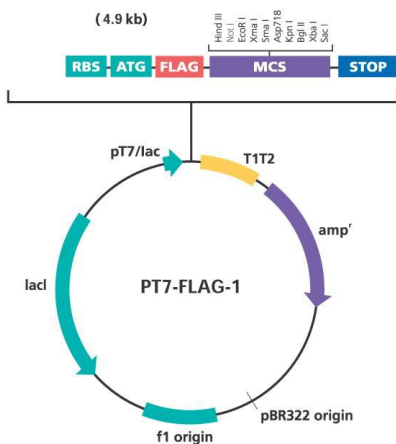
Polis-Hist tag-a kelatutako nikelaz osatutako erretxinarekin lotuko da eta fusio proteina bertan geratuko da itsatsita. Azkenik eluzio bufferra gehituko zaio (imidazole 1M)



d) FLAG tag: PT7 adierazpen bektorea

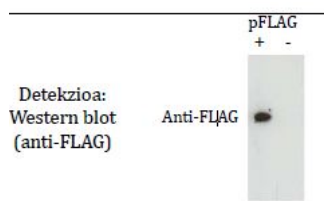
PT7 bektorea erabiltzen da. Hemen promotorea T7/lacO da beraz, T7 kodetzen duen genea bakterioaren genomatik egon behar da. Promotorearen ondoren erribosomak lotzeko gunea (RBS), hasierako kodoia, FLAG marka, polilinkerra eta STOP kodoia ageri dira.

Hauetaz gain → Ori, aplizininarekiko erresistentzia, lacI eta f1 origin (m13 fagorako). T1T2 terminadoreak ere badaude transkripzioa amaitzeko.



FLAG marka epitopo bat da, hortaz antigorputz batekin detektatu daiteke, antiFlag esaterako.

Fusio proteinaren purifikazioa ondo egin den behatzeko Western blota egin daiteke eta fusio proteina detektatzeko anti-FLAG antigorputza erabiltzen da. Kontuan izan behar dugu oraindik ez ditugula FLAG eta PR banatu. Banatzeko jakin behar da bien tartean "spacer"-a dagoela eta hori enterokinasaren apurketa gunea izango da, beraz enterokinas erabili.

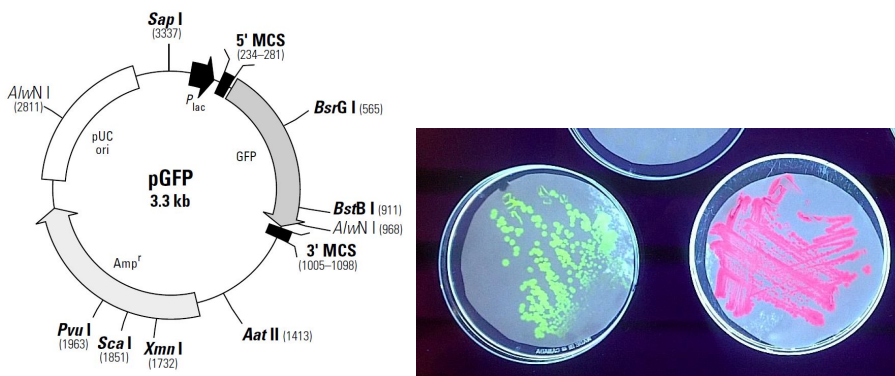


Gene markatzaileak (reporter genes) gure proteinen kokapena ezagutzeko balioko dute. Purifikazioan lagunduko ez dute arren, detekzio erraza ahalbidetzen dute, erraz detektagarria den fenotipo bat emango duten geneak dituztelako. Erabilgarriak:

- Gure intereseko proteinen kokapena identifikatzeko
- Gure intereseko genearen adierazpena kokatzeko eta jarraipena egiteko

GFP (Green Fluorescent Protein) litzateke horietako bat. Hau *Aequorea victoria* medusatik purifikatu zen. Ultramore izpiekin kitzikatuz gero, fluoreszentea izango da eta gainera ez du inolako sustratuedo kofaktorerik behar.

Aktibitate egonkorra du, hau da, beroak, denaturatzaileek, detergentek eta proteasek ez dute aktibitatea inhibituko. GFParen abantaila bat da detektagarria dela zelula bizietan eta beraz ez da lisirik behar (*in vivo*).



Halakoak dira GFP duten adierazpen-bektoreak:

- 2 polilinker dituzte (MCS) intsertoa beraz hasieran edo amaiera sar daiteke Horrek malgutasuna eskeintzen digu.
- Plac promotorea dago → IPTG bidez induzitu.
- LacI genea ez dago, beraz genomak egongo da.
- Teknika honen bidez ez dugu liseriketa edo purifikazioa egin behar.
- GFP genea, marka.

X.-Bakterioen eraldakuntza genetikoaren aplikazioak

1-Biomedikuntza

Bakterioetan sartzen diren geneen bidez proteina errekonbinanteen ekoizpena salmentarako egiten da. PR gehienak antibiotikoak dira baina badira beste batzuk → Intsulina, gaur egun ordea ekoizpena ez da bakterio bidez egiten, animalien bidez baizik.

Commercial Production** (*E. coli*)

Name/Product	Market	Replaced
Humulin® (Human r-Insulin)	Type I diabetes	Animal insulin
Somatropin (Human growth hormone)	Dwarfism	Pituitary
Actimmune (interferon gamma-1b)	Immunomodulator	New
Pulmozyme (DNase)	Cystic Fibrosis	New
Retavase(tissue plasminogen activator)	Heart attack	New

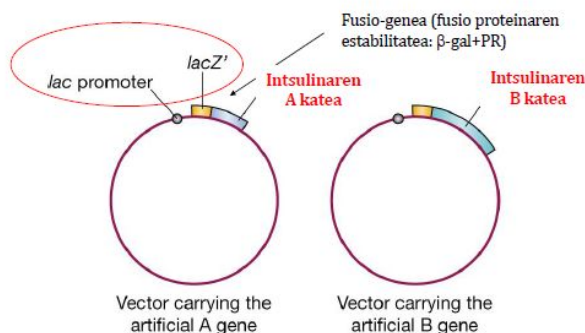
INTSULINA

Behin PR lortuta eta purifikatuta, itzulpen ondorengo eraldaketa batzuk jasan behar ditu aktibo izateko. Eraldaketa hauek *in vitro* egiten dira, eta intsulinaren kasuan ekoizpen prozesu konplexua da, dituen 2 azpiuntateengatik (α eta β kate polipeptidikoak).

Proinsulina sintentizatzen da eta golgi aparatuan eraldaketak jasango ditu \rightarrow proteasa bidezko ebakidurak, disulfuro zubien gehikuntzak ...

Ekoizpena eta jariapena erabat independenteak dira, ekoiztutako intsulina pankreaseko beta zeluletan zain geratzen baita jariatua izateko.

Arazoa da eraldaketa guzti hauek ez direla bakterioetan ematen, 2 kateak plasmidoen bidez sintentizatzen dira aparte. Behin bi kateak lortuta eraldaketak *in vitro* egiten dira intsulina aktiboa lortzeko. Prozesuan beraz 2 bektore erabiltzen dira, lac promotorearekin eta hautespenerako lacZ' genearekin.



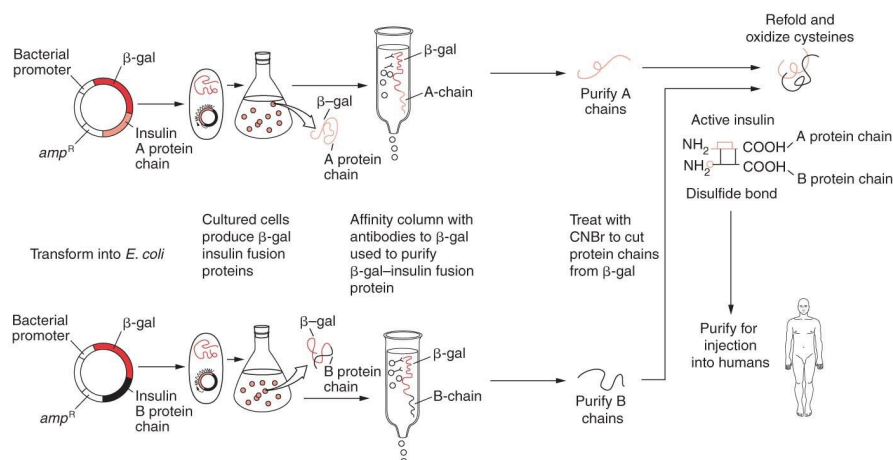
·Lehenengo plasmidoan lacZ' geneari lotuta α katea sintetizatzen duen genea dugu eta gainera Tag genea izango dugu \rightarrow β galaktosidasa genea. Garrantzitsua iznao da estabilitate lortzeko eta purifikazioa errazteko (fusio proteina)

·Bigarren bektorea β katea kodetzen duen genea izango dugu.

Sistemari IPTG gehitzen badiogu induzituko dugu. Proteina purifikatzeko zutabeaz zehar pasatzen da, bertan bolatxoak egongo dira antigorputzekin eta horra lotuko da gure fusio-proteina. Azkenik PR β galaktosidasatik banatzeko proteasekin tratatzen da.

Intsulina aktiboa lortzeko *in vitro* zenbait eraldaketa pairatzen ditugu \rightarrow Birtolesdura eta itzulpen ondoko eraldaketak.

Hasieran prozesu hau *E.coli* rekin egiten zen eta komertzializatu. Gero, legamiekin lortu zuten eta hauek 2 kateak iada lotuta sintentizatzen zituzten.



2-Bioerremediazioa

Kutsatutako lurrak eta urak bere onera ekartzeko kutsatzaileak degradatzeko gai diren bizidunak erabiltzean datza. MO batzuk sustantzia toxiko batzuk (hidrokarburoak detergenteak etab) elikagai moduan erabiltzen dituzte eta ingurugiroarentzat kaltegarriak ez diren sustantzietan eraldatzen dituzte.

Degradatzeko zailak diren sustantziak eliminatzeko → MO transgenikoak erabiltzen dira sustantzia kutsatzaile horiek degradatzeko beharrezkoak diren proteinak dituztenak.

Esaterako: Itsasoan olio isurketak daudenean, olio degradatzeko gai diren bakterioak erabiltzen dira.



3-Biofula ekoizten duten bakterioak

Animali askotan dagoen bakterio florak hesteetako bakterioak bio fuela ekoizteko gaitasuna dutela ikusi da. Adibidez *Clostridium* bakterioaren TU 103 anduia (zebraren gorotzetan) → Edozein zelulosa mota butanol bilakatu dezake

Bakterio hauen eraldaketa genetikoak eginez → Berezko gaitasun hauek indartzen dira bio fuelaren ekoizpena eskala handian egiteko.

GARRANTZITSUA

·Moduluak eta sekuentzia identifikatzea eta bakoitzaren funtzioa jakitea.

·Nola purifikatzen den fusio proteina bakoitza, erabiltzen dugun markaren arabera ezberdina.

8. GAIA. GENOTEKAK

- Genoteka genomikoak edo cDNA genotekak
- Klonazio genotekak eta adierazpen genotekak
- Klonatutako geneen identifikazioa (markaturiko zunden hibridazioa, proteinaren bilaketa, aktibitate biologikoaren bilaketa)

Genoteka: Organismo baten genoma biltzen duten klon multzoa, hau da, gene biltegia da. Irudian, prozesua ageri da:

1. Genomaren liseriketa errestrikzio entzimen bidez (liseriketa partzialak) sekuentzia ezberdinak lortuz.
2. Sekuentziak bektoretan (bakterioetan) txertatzen dira
3. Molekula errekonbinanteak lortzen dira, klon ezberdinak lortzeko eta horietatik gene biltegia.

1. GENOTEKAK, ZERTARAKO?

1.- Gene zehatzen edo sekuentzien isolaketarako.

2.-Leinu, espezie edo indibiduo jakin baten DNA kontserbatzeko.

3.-Eskualde genomiko luzeen edo genoma osoen azterketarako (sekuentziazioa).

Sekuentziazioaren arazoa:

Luzera konkretua sekuentziatu daiteke bakarrik. Normalean PCR bat egiten da eta hortik zatiak lortu egiten dira. Sekuentzia oso luzeak badira, PCRak ez du ongi fuzionatuko. Azken hori konpontzeko, errestrikzio entzimak erabili behar dira, tamaina txikiagoak lortzeko eta horien amplifikazioa egiteko. Ondoren zati horiekin genotekak eraikiko dira.

2. GENOTEKA MOTAK

1) Klonatzen den materialaren arabera:

- **Genoteka genomikoa:** Organismo baten genoma biltzen duten klon multzoa.
- **Genoteka partziala, mini genoteka:** Genomaren zati bat edo cDNA molekula batzuk besterik ez dituzte. (Goiko irudia genoteka partzialaren adibidea izango litzakete).
- **cDNA genoteka:** hartutako laginean adierazten diren geneen genoteka (RNA erauzten da eta hortik cDNA sintetizatu). RNA guztiak erabili daitezke: mRNA, rRNA, tRNA. rRNA eta tRNA-aik abiatutako cDNA genotekak egin nahi badira, ezingo dira oligoDT primerrak erabili (mRNA-rekiko espezifikoak dira eta) baizik eta random primer-ak.

2) Erabiltzen den bektorearen arabera...

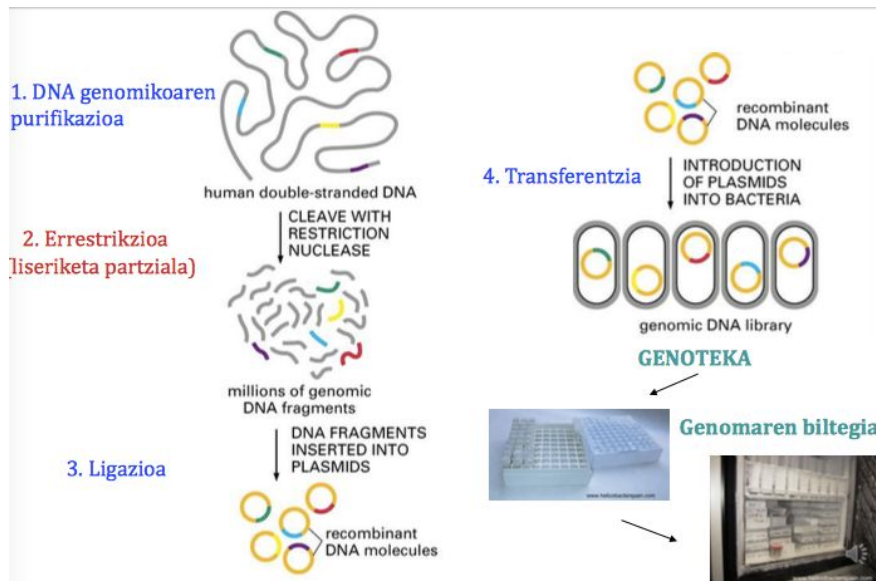
- **Klonazio-genoteka:** klonazio bektoreak, sekuentziak gordetzeko erabiltzen dira
- **Adierazpen-genoteka:** adierazpen bektoreak, sekuentziak adierazteko.

3. GENOTEKAREN ERAKETA

Irudian, prozesua ageri da:

1. DNA genomikoaren purifikazioa: Intereseko zelularen genoma osoa isolatu, DNA genomikoa erauzi eta purifikatu
2. Errestrikzioa: Genomaren liseriketa errestrikzio entzimen bidez (liseriketa partzialak) sekuentzia ezberdinak lortuz, miloika zati lortzen dira.
3. Ligazioa: Sekuentziak bektoreetan txertatzen dira. DNA zati bakoitza bektore-molekula batean txertatuko da.
4. Transferentzia: Barneratu bektore errekonbinante bakoitza zelula ostalari batean. Ostalaria bakterioa, fagoa nahiz legamia izan daiteke, helburuaren arabera. Hala ere, bakterioak eta fagoak dira erabilienak.
5. Erein transformatutako zelulak medio solidoan, zelula bakoitzak klon bat sortaraziko du, bakoitzak intereseko zatiarekin. Klon guztiek gure genoteka osatuko dute,

*Bakterioak -80 gradutan kongelatu egiten dira. LB medioari, glizerola gehitzen zaio ahalik eta erosoan egon daitezten. Hau gehituta, izoztean ez dira kristalak eratuko eta urtean ere bakterioek ez dute sufrituko.



4. GENOMAK GORDETZEKO, ZEIN BEKTORE?

Genomaren tamainaren arabera bektore ezberdinak erabiliko dira.

- Giza genomaren tamaina: 3,6 Gb (3,6x10⁶Kb)
- Plasmidoetan: 15-20 Kb-ko DNA zatiak klonatu daitezke.
- Genoma osoa gordetzeko behar dugu $\sim 2 \times 10^5$ klon (klon gehiegi dira)
- Genotekak egiteko, beste bektoreak erabiltzen dira. **BEKTORE BIRALAK** (Fagoenak)
Bektore biralak, genomaren sekuentziak egiteko erabili ziren eta *Next Generation Sequencing* teknikan ere BAC eta YAC-k moduko bektore bilarak erabiltzen dira.

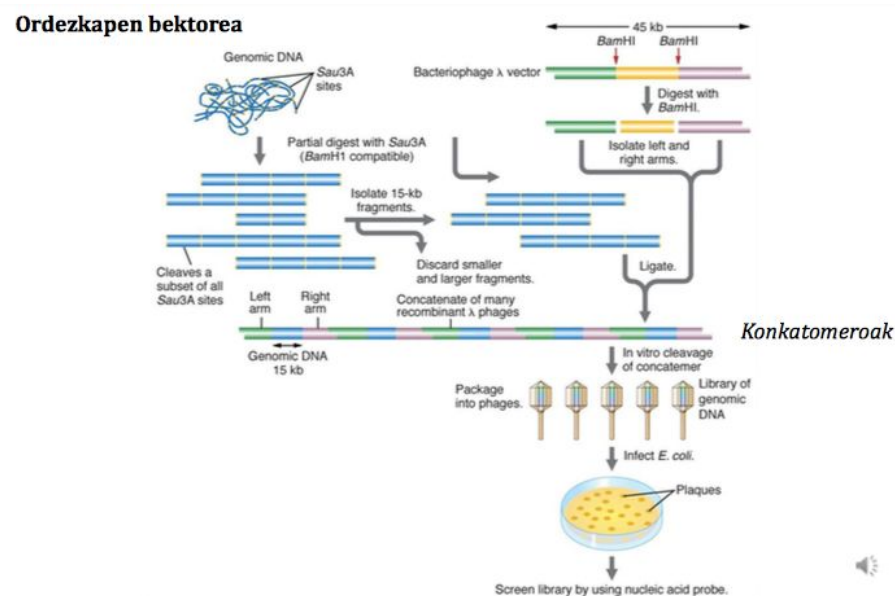
YAC: Yeast Artificial Chromosome. 600 kb-ko zatiak klonatzeko erabili daiteke. Zirkularra da baina BamHI eta SnaBI errestrizio entzimekin liseritzen da eta lineala den 2 DNA zati lortzen dira, horien artean, DNA insertio gunea geratzen delarik.

BAC: Bacterial artificial chromosome. 300 kb-ko zatiak klonatu ditzake. Zirkularra da.

Genoteka fagoetan (Ordezkapen bektoreetan)

1. Bakterioaren DNA genomikoa SAU3A errestrizio-entzimekin liseritu dugu. Errestrikzio gunea BamH1-ekin bateragarriak dira, hau da, muturrak osagarriak izango dira.
2. Lambda fagoaren genoma BamH1-ekin liseritzen da eta gene lisogenikoak kentzen dira (ziklo litikoa bakarrik emango dela ziurtatzeko).

3. Tamaina egokiko DNA zatiak (15kb) baino ez dira lotuko DNA genomikora. Zati hauek aldeztu aurretik isolatzen dira eta hauek elkartzen dira bektoreekin ligazioa emateko. Gene zatien tamaina filtro bidez lotzen da, bi filtro izango ditugu bata zati handiak kentzeko eta bestea txikiak ez.
4. Lambda fagoaren DNAREN muturretan **cos*** sekuentziak daudenez, gene batzuk **konkateatu (konkatomeroak sortu)** egin daitezke. Hau da genomak elkartu egin daitezke eta modu horretan intereseko DNA asko duen molekula sortu egin daiteke.
5. In-vitro enpaketazioa partikula birikoak sortzeko
6. Partikula birikoek E.coli bakterioak infektatuko dituzte, eta petri kutzako medioan agertzen den hutsune bakoitza klon bat izango da.
7. intereseko zati guztiak polibakterioetan sartuta edukiko genituzke. Modu horretan genoteka modu askoz efizienteagoan egiten da.



* Cos sekuentziak: lambda fagoaren muturrak dira, bektorearen berzirkulazioa baimentzen dutenak.

5. GENOTEKA BATEN TAMAINA

Beharrezko den klon kopuru minimoa (N) genoteka osatzen duten klonetan gen/sekuentzia jakin bat probabilitate konkretu batekin (P) aurkitzeko.

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln\left(1-\frac{a}{b}\right)}$$

a = Txertatutako DNAREN batazbesteko tamaina (Kb)

b = Genoma osoaren tamaina (Kb)

P = sekuentzia bat probabilitate konkretu batekin klonatzeko

Adibidea: Giza genomaren genoteka batean:

- Genoma haploidea = $2,8 \times 10^6$ kb

- Tartekatuen batzbesteko tamaina 20 kb izanda

- Edozein gen/sekuentzia aurkitzeko probabilitatea %95a izateko $4,2 \times 10^5$ klon behar dira.

- Probabilitatea %99a izateko $6,5 \times 10^5$ klon behar dira.

Zenbat eta probabilitate handiagoa nahi izan, behar dugun genotekaren tamaina handiagoa izango da.

6. GIZA GENOMAREN GENOTEKAK

Bektore mota desberdinak daude eta bakoitzak jasaten duen intsertoaren tamaina ere desberdina da. Honela, erabiltzen dugun bektorearen arabera, intsertoaren tamaina ezberdina izango da eta klon gehiago edo gutxiago izango ditugu. Zenbat eta intserto handiagoa klonatu, klon gutxiago beharko ditugu eta errazagoa izango da sekuentzia bat aurkitzea.

Ondorengo taulan, *Beharrezko den klon kopuru minimoa (N)* kalkulatu da hainbat bektoreekin eta %95 eta %99-ko probabilitatearekin. Ondorioa: YAC eta BAC dira bektore egokienak genotekak osatzeko, insertuen tamaina handiagoa izan daitekeenez, klon gutxiago behar baitira.

Type of vector	Insert size (kb)	Number of clones*	
		P = 95%	P = 99%
λ replacement	18	532,500	820,000
Cosmid, fosmid	40	240,000	370,000
P1	125	77,000	118,000
BAC, PAC	300	32,000	50,000
YAC	600	16,000	24,500
Mega-YAC	1400	6850	10,500

Genoteka genomikoa

Laborategi desberdinek genoteka desberdin asko egin dituzte eta denak daude publikatuta. Biltegia ncbi-n. www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview. Eskuinaldean erabili diren bektoreak ageri dira. Genotekan klon ezberdinen ezaugarriak daude eta bertan klon-ak ere erosi daitezke. www.ncbi.nlm.nih.gov/clone/library/genomic.

Genoteka bat aukeratzeko orduan kontuan hartu beharrekoak:

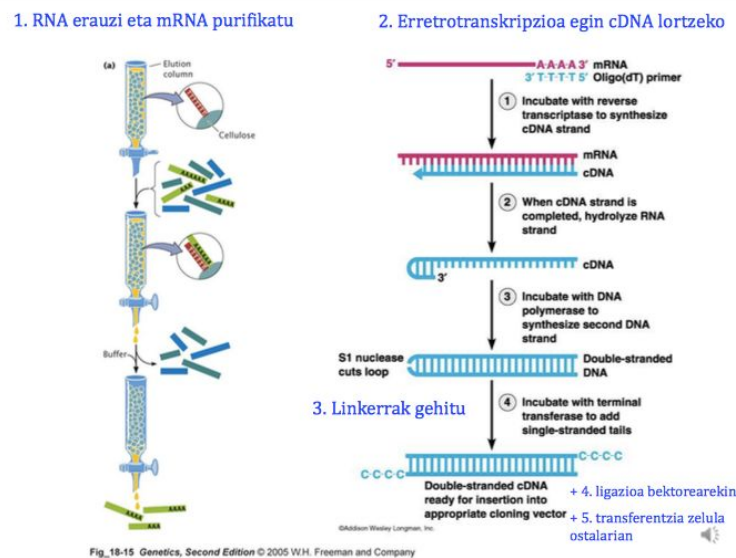
1. **Adierazgarria** den genoteka izatea, genomaren sekuentzia guztiak barneratzen dituena.
2. Behar diren **klon kopuru txikiena duena**, guk manipulatzeko eta bertan intereseko gene eta sekuentziak lortzeko.

3. **Tartekatuen batatzesteko tamaina handia** izatea, behar diren klon kopurua murrizteko eta ziurtatzeko **gene osoak** isolatzen ditugula, batez ere eukariotoetan geneen tamaina handia delako.

7. cDNA GENOTEKAK

Lagin, ehun edo zelula konkretuan adierazten diren geneen genoteka izango dugu. Prozesua:

1. RNA erauzi eta purifikatu DNA genomikoa erauzi beharrean mRNA, tRNA edo rRNA erauziko genuke. Behin RNA erauzia purifikatuta zutabeaz zehar pasatzen da, bertan poli-T isatsa egongo da eta RNAm hodian itsatsita geratuko da. Horrela RNAm purifikatua lortuko dugula.
2. Erretrotranskripzioa egin eta cDNA lortu intereseko geneen klonatuko duguna. Oligo-dT primer metodoaren bidez (irudikoa) edo random primer hasleekin sintetizatuko da cDNA. Behin cDNA sintetizatutako poimerasa gehitzen da kate bikoitza lortzeko.
3. cDNA denez, **linkerrak** gehituko dira muturretan linker horiek mutur itsaskorrek sortuko dituzte, ligazio prozesuaren efizientzia hobetzeko (LISERIKETA BIKOITZA BURUTU DUGU ETA). adb: poli-C isatsak gehitu daitezke bi muturrak berdinak izateko eta gero bektorearen gune egokia aukeratzen da, poli-dT gunea.
4. Klonatu cDNA bakoitza bektore molekula batean (ligazioa).
5. Ligazioa egin dugula, bakterioetan (zelula ostalarian) transformatu eta bakterioak gorde (barneratu bektore errekonbinante bakoitza).



cDNA genotekak zertarako erabiltzen dira?

1. Ehun batean, garapenaren momentu edota egoera jakin batean (tratramendu baten ondoren adibidez) organismo baten **adierazten ari diren geneak aztertu** nahi baditugu.

2. cDNA genotekak ez dira genoteka genomikoak bezain konplexuak, **gene kopuru txikiak eta introirik gabeko geneak** dira, beraz, klonatzen diren sekuentzien tamaina txikia da.
3. Bektore egokiak erabilia bakterioetan adierazi daitezke. Beraz antigorputzak erabiliz, **intereseko genea adierazten duten klonak erraz identifikatu** daitezke.

cDNA genotekaren adierazgarritasuna

Geneen adierazgarritasun mailak desberdinak dira:

- Asko adierazten diren geneetan RNAm kopuru handia 10^5 molekula/zelulako
 - Beste gene batzuen adierazpena ertaina izango da RNAm kopuru ertaina $100-1000$ molekula/zelulako
 - Beste gene batzuk gutxi adierazten dira RNAm kopuru oso txikia
- Beraz genotekan sekuentzia batzuk maiz agertuko dira eta beste batzuk ez. **Erabili behar den klon kopurua intereseko RNAm-ren kantitatearen arabera izango da.**

Hala ere, badira gutxi adierazten diren geneen **adierazgarritasun maila handitzeko estrategiak:**

A) estrategia: erauzitako RNAm elektroforesian migratu eta isolatu esperotako **tamaina** daukaten mRNAk. Elektroforesi geletik, RNAm barrido gisa erauztea eta kuantifikatzea posible da baina teknika zaila da, gehien ikusiko dugun RNAr baita.

B) estrategia: alderantzizko transkripzioa egiteko, **hasle espezifikoak** erabili intereseko cDNAren populazioa lortzeko.

Hasle unibertsalak erabili beharrean, sekuentziekiko osagarriak diren geneak erabili daitezke. Ugaztunen gene bildumarako plataforma bat dago (mammalian gene clonation) bertan cDNA klon guztiak ageri dira, eta enpresei eskatzea dago.

Bestelako proiektuak: *Full-Legth cDNA Projects*

Mammalian Gene Collection



ORF sekuentzia kodetzaile

MAMMALIAN GENE COLLECTION

17-Dec-12	Human	Mouse	Rat	Bovine
Total MGC full ORF clones	29,818	27,265	6,763	9,104
Non-redundant genes	17,592	17,701	6,486	8,724

Sekuentzia edo gene zehatzen isolaketa:

Gure genotekak 80°Ctan daude eta intereseko sekuentzia bat nahi badugu, lehenik genoteka deskongelatu behar da. Milaka bakterio ditugunean nola aurkitzen dugu gure intereseko gene edo sekuentzia? 3 metodo erabili daitezke.

1. HIBRIDAZIOA markaturiko zundekin hibridazioa
2. ANTIGORPUTZAK erabilera: cDNA genotekan kodetzailea den genea eta proteina ekoiztu eta horrela antigorputzak erabilita intereseko sekuentzia daukan klon aurkituko dugu.
3. AKTIBITATE BIOLOGIKOAREN bilaketa

*Azken biak “Adierazpen genotekak” dira, proteina adierazi behar da.

1. MARKATURIKO ZUNDEKIN HIBRIDAZIOA:

1. Gure genoteka osatzen duten bakterioak petri plaka batean daude. Bektorea fago bat da, eta plakan hutsuneak (kalbak) agertuko dira. Petri plakaren gainean nitrozelulosazko mintz bat jarri eta petriko “kopia” bat egiten da.

2. Mintza alkalirekin tratatzen da (fagoak lisatu eta DNA desnaturalizatzeko)

3. Nitrozelulosa mintza inkubatzen dugu intereseko sekuentziarekiko osagarria den zunda makartu batekin (fluoroforo, erradioaktibitate).

4. Gai izango gara autoerradiografia bidez nitrozelulosako zundan klon identifikatzeko. Kokapena filtroan eta plakan berdina da. Gai izango gara klon konkretua hartzeko eta beste medio batean hazi eta beratik intereseko sekuentzia purifikatzeko.

2. PROTEINAREN BILAKETA ANTIGORPUTZEN BIDEZ (immunoscreening): Zunda egoki bat lortzea ezinezkoa denean eta bilatzen dugun genea adierazten denean, antigorputz bidez itzulitako proteina bilatuko dugu (genea → proteina).

Intereseko proteinaren bilaketa egiteko:

1. Kalbak edo koloniak nitrozelulosa mintzean itsasten dira eta bakterioen lisia egingo da.
2. Inkubazioa antigorputz primarioekin
3. Inkubazioa antigorputz sekundarioekin (hauek markatuta egongo dira, primarioak ez).

Detekzioa in-situ egiten da, klon positiboek intereseko genea edukiko dute.

3. PROTEINAREN AKTIBITATE BIOLOGIKOAREN BILAKETA:

Ostalariak guk bilatzen dugun generaren produktuaren aktibitatea ez duenean erabiliko dugu.

- Entzima jakin bati dagokion genea bilatzeko: *E. coli* ez du alfa amilasa eta beta glukosidasarik sintetizatzen. Guk entzima horiek ekoizten dituzten geneak topatu nahi ditugu. Aktibitate entzimatikoa aurkezten duten bakterioak errekonbinanteak izango dira, gure intereseko genea izango dutenak.

- Aminoazidoen bisintesiarekin erlazionatutako geneak: Ostalari auxotrofoak (Ura-) erabili (erreaktibo edo substantzia konkretu bat behar dute hazteko) eta medio minimoan (behar duten sustantzia ez dagoen medioa) ereiten baditugu, hazten diren bakterioak izango dira ostalariari falta zaio genea dutenak (**Osagarritasun funtzionala** lortzen da, hau da, ostalariari falta zaion ahalmena, klon positiboari dagokio). Genetika molekularreko praktikan erabili genuen, mutazioen detekziorako.

Osagarritasun funtzionala erabiltzea klon espezifikoak aurkitzeko → **Neurosporaren trp3 genea**.

Hodi batean genotekaren kosmido guztiak ditugu. Kosmidoen artean neurosporaren trp3 genea daukan klona bilatu nahi dugu. Zelula ostalaria trp (-) da. Hortaz, kosmido taldeekin transformazioa egiten badugu eta ereintza trp medio hautatzailean jarri, kosmido talde positiboa (hazitakoa) neurosporaren trp3 genea eskuratu duena izango da.

Nola dakigu genotekan informazio genetikoaren %100 jaso dugula? Oso zaila da, guztizko informazioa lortzea, zati bakoitzarekin lortzen den klonazio efizientzia ezberdina baita.

9.GAIA: DNA-REN KLONAZIOAREN OROKORTASUNAK EUKARIOTOETAN

1. Sistema ostalari eukariotikoak

Zertarako erabili sistema ostalari eukariotikoak? DNA errekonbinantearen adierazpena hobetzeko. Bakterioak rDNA-ren ostalari erabilienak dira, transferentzia oso erraza delako eta azkar hazten direlako, baina zenbait **desabantaila** dituzte:

- Ez dago moztitsasketarako mekanismorik, ezin dituzte introiak kendu.
- Ekoizten diren proteina errekonbinanteak ez-egonkorak dira. Egonkortasuna lortzeko estrategiak bilatu behar dira.
- Aktibitate gabeko proteinak lortzen dira eta eraldaketak in-vitro egin behar dira.
- Proteina errekonbinanteak purifikatzean bakterioaren osagai toxikoak ere purifika daitezke. Zelula eukariotikoek ez dute toxinarik.
- Itzulpen ondoko eraldaketen falta (fosforilazioa, azetilazioa, glikosilazioa...) proteina aktiboa izan dadin.
- Ezin da egitura sekundario edo tertziario egokia sortu bertolespenik ez baitago (S-S lotura eza...). Ondoren *in-vitro* egin behar dira aldaketa horiek eta lan gehiago suposatzen du.
- Proteina errekonbinantea prekursore moduan ekoizten bada, ezin da proteina aktiboa lortu, ezin baita prekursorearen mozketa egin.

AdB: Intsulina Sistema ostalari eukariotikoak PR adierazpen efizientzia hobetzeko

<i>Expression System</i>	Escherichia coli	Legamiak	Ugaztun zelulak
Proteolisia	+/-	+/-	+
Glikolisazioa	-	+	+
Jariaketa	+/-	+	+
Bertolesketa	+/-	+/-	+
Fosforilazioa	-	+	+
Azetilazioa	-	+	+
Amidazioa	-	-	+
Lortutako PR-ren kantitatea	1-5%	>1%	<1%

Ugaztun zeluletan itzulpen osteko eraldaketa guztiak ematen dira, baina legamietan ere asko. Bakterioetan, aldiz, oso gutxi. Itzulpen ondoko aldaketak kontuan hartuz, ugaztunak dira adierazpen sistema honenak, ondoren legamiak eta azkenik bakterioak. Klon kantitatea kontuan hartuta, bakterio eta legamiak dira onenak.

Sistema ostalari eukariotiko arruntenak:

- **Legamiak.** *Saccharomyces cerevisiae* (Ez ditugu ikusiko).
- **Landare zelulak.**
- **Animali zelulak:** Ugaztun zelulen kultiboak.

2. Geneen transferentziarako metodo orokorrak eukariotoetan

1. Elektroporazioa: Transferentzia zuzena

DNA errekonbinantea zuzenean ostalarian sartzen da. Talka elektrikoarekin mintza desegonkortzen da, poroak sortuz, boltaje labur eta intentsitate altukoak. Talka elektrikoa intentsitate altukoa baina iraupen laburrekoa izango da. Zelulak diluituta dauden medioa gatz gutxikoa izan behar da, talka elektrikoa nahi baino indartsuagoa izan ez dadin (bestela zelulak hilko dira).

Abantailak: teknika erreza, efizientea, azkarra eta errepikakorra.

Desabantailak: zelula asko hiltzen dira eta parametroak doitu behar dira zelulen arabera (mintzaren arabera boltajearen intentsitatea desberdina izan behar da).

96 laginekin aldi berean egin daiteke metodo hau (kubeten ordeaz 96 "pozillotako" plakak erabiltzen dira).



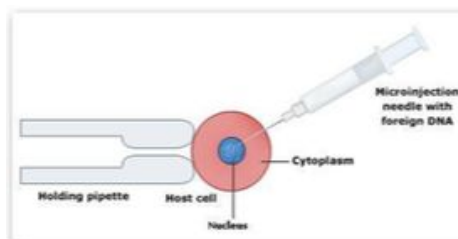
2. Mikroinjekzioa: carrier-en bitarteko DNAREN transferentzia

DNA errekonbinantea nukleoan txertatzen da xiringa baten bitartez eta pipeta baten laguntzaz (zelula eusteko). Mikroskopia beharrezkoa da honetarako. Gaur egun sistema robotikoek modu automatizatuan egiten dute, parametroak ordenagailuan sartuta. Injekzioa non egiten dugun kontrolatzen dugunez, bektorea zuzenean sartu daiteke.

Abantailak: efizientea, oso zehatza, DNA nahi dugun gunean sartu dezakegu.

Desabantailak: Zelulak banaka manipulatu beharra. Kontuz ibili behar da zelulak bizirik mantentzeko.

Aplikazioak: *knock out* saguak eta oozitoen mikroinjekzioak.

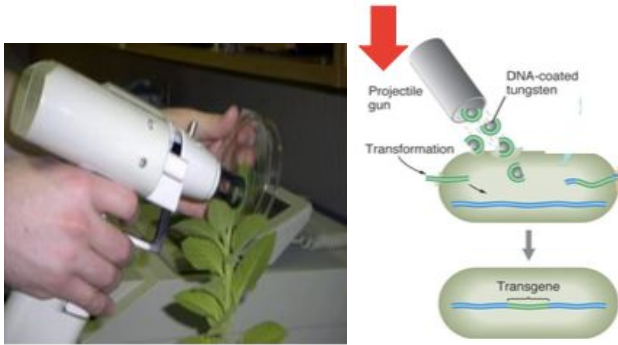


3. Biolistika: carrier-en bitarteko DNAREN transferentzia

Landare zeluletan bakarrik erabiltzen da, mintzaz aparte pareta ere baitute. Metalezko partikulak (urre edo tungstenoa) intereseko DNA errekonbinanteari itsasten zaie. Helioz konprimitutako pistola batek partikulak abiadura handiz jaurtiko ditu, zeintzuk pareta, mintza eta nukleoa zeharkatuko duten. DNA nukleoan geratuko da. (Partikula metalikoak printzipioz ez dira kaltegarriak zelularentzat). Metalezko partikulak ez dira kaltegarriak landarearentzat.

Abantailak: metodo erraza eta azkarra da.

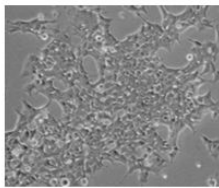
Desabantailak: Ezin da kontrolatu DNA exogenoa non sartzen den (Mikroinjekzioarekin bai). Gainera, zelula asko hiltzen dira.



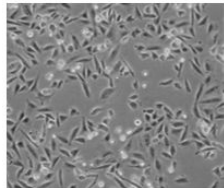
Animali zelulen berezitasunak

Transformazioa DNA exogeno jakin baten transferentzia bakterioetan eta legamietan: DNA eukariotoetan (ugaztun zeluletan) sartzen bada **transfekzioa** esaten zaio. Prozesu hau birus baten bidez egiten bada (birusa bada bektorea) **transdukzioa** deritzo. Kasu guztietan helburua bera da.

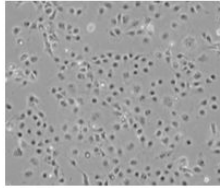
Irudian animalia zelula ezberdinak ageri dira, lerro zelular komertzialak dira. Erosten, hazteko medioa eta DNA exogenoa sartzeko metodo egokiena zein den zehaztuta agertzen da.



HEK 293:
Human embryonic kidney cells



CHO:
Chinese Hamster Ovary cells



COS:
Simian fibroblasts

Ehunen kultiboak

- Ugaztun zelula gehienak **itsaskorrek** dira, hau da, botilaren edo plakaren azpialdean itsatsiko dira **geruza bat** sortuz, azalari itsatsita haziko dira. (Salbuespena: Odol-zelulak suspentsioan hazten dira).
- Normalean zelulen mantenturako **botilak** erabiliko dira eta **plakak** esperimentuetarako.
- Ugaztun zelulei **FBS (Behien fetu serum-a)** %5-10 inguru gehitu behar zaie medioan.
- Gure zelulek kultibo hauek kutsatu ditzakete, horregatik beti **kanpaietan** egin behar da lan.
- Zelulak %5 CO₂ (pH konstante mantentzeko) eta 37°C-tan inkubatzen dira (oxigenoa ere gehitu behar zaie).

Ugaztun zelulen kultiboak

- Oso **hauskorrek** direnez kontu handiz ibili behar da inongo kolperik ez emateko, mintza errez lisatu daitekeelako. Erraz kutsatu daitezke, manei u gutzia fluxuzko ganbaran egingo da.
- Botilak eta plakek azalera konkretua dute, horregatik **suspentsioan** haziko dira **eskala handiko hazkuntzak** egin nahi direnean. Oso geldo hazten dira, 24 ordu bikoizten dira gutxi gora-behera (ez beti, zelula tumoralak oso azkar ugaltzen dira).

- **Geldo hazten** direnez probabilitate gehiago dago **kutsatzeko**. Birusak erabiliko bagenitu (bektore moduan) DNA sartzeko, birusak kendu beharko genituzke edo gutxienez hauek inaktibatu prozedurarekin jarraitu baino lehen.
- Eskala handitan hazteko lehendabizi kultibo txikitan eta gero kultibo handiagoetara pasa, bioerreaktoretan, 10.000-25.000 litro (komertzializatzeko: **bioerreaktoreak...**).

Zelula kultiboen sailkapena

1. **Primarioak:** Ehun batetik isolaturiko zelulen kultiboa. Epe laburrez erreplikatzeko aukera izango dute. Adib.: linfuzitoak.
2. **Sekundarioak:** Kultibo primarioko zeluletatik eratorritako zelulak (*in vitro* zatitu direnak). Azpiereinketa. Adib.: gibealeko zelulak.

Azpiereinketa kopurua murriztua da. Kultiboko zelulak zenbait aldiz zatitu ostean apoptosian sartuko dira ez badira transformatzen hilezkoak bihurtzeko. Minbizi zelulak hilezkoak dira. Hauen kasuan, azpiereinketa asko egin daitezke arazorik gabe.



Lerro zelularrak

- Etengabe zatitzeko ahalmena dute, tumoralak dira. Normalean p53 genea galdu dutelako.
- Ez dira apoptosian sartzen hainbat azpiereinketa egin arren (ez dira inoiz hiltzen).
- Zenbait mutazio dituztenez etengabe zatitzeko aukera dute, hilezkoak dira. Komertziala dira.

3 motakoak:

1. Transformatutako lerro zelularrak: Zelulak transformatu egiten dira ezaugarri tumoralak izateko, eta hilezkoak bihurtuz, adb minbizi zelulak.

Tumoreak sortzen dituen birus batekin infektatu behar dira: osagai kimiko mutagenoak erabiltzen dira (mutageno fisikoak ere erabili daitezke, adibidez argi ultramorea) edo onkogeneen klonazioz (myc (linfomen translokazioan inplikaturik), RAS... geneak).

Zelula hauek animalia batetan sartzean tumore bat sortu dezakete animaliak babes immunologiko indartsurik ez badu.

2. Ama zelula lerroak (stem cell lines): Germinalak (kresta germinaletatik isolatuta) nahiz enbrionarioak (enbrioi zelulia batetik isolatuta) izan daitezke. Tumoraletatik desberdindu daitezke zenbait konposatu erabilita. Ama zelulen ezaugarriak dituzte, eta zein mediotan dauden arabera, zelula batean edo bestean desberdindu daitezke (**desberdintzapen zelularra**).

3. Lerro zelular hibridoa (hybridoma): Mota ezberdineko bi zelulen fusioak sortarazitako lerro zelularra. Jatorrizko bi zelulen ezaugarriak azalduko ditu lerroak. **“Crash” prozesua** jasango dute batzuetan, hazkuntza ematean behar ez dituen kromosomak galtzeari deritzo.

Adb: Antigorputz monoklonalen sintesia. Antigorputz espezifiko bat interesatzen zaigu, eta linfozito batek ekoitzen du. Intereseko linfozittoa minbizidun zelula batekin elkartzen dugu, lerro zelularra lortzen da eta intereseko antigorputza sintetizatu ahalko da.

Taulan adibide batzuk; HeLa, A-549 edo FM3 ehun tumoraletik datoz. 293-T-k jatorri enbrionikoa du proteinen adierazpenean eta erretrobirus errekonbinatuak sortzeko erabiltzen da.

Cell line	Organism	Origin Tissue
HeLa	Human	Cervical cancer
293-T	Human	Kidney (embryonic)
A-549	Human	Lung carcinoma
ALC	Murine	Bone marrow
CHO	Hamster	Ovary
HB54	Hybridoma	Hybridoma
FM3	Human	Metastatic lymph node

Transfekzioen erabilerak:

1. Proteina errekonbinanteen ekoizpen industrialia.
2. Proteina baten funtzio zelularra ezagutu, aldaki basati eta mutatuaren fenotipoen arteko konparaketa eginez.
3. Proteina baten kokapen zelularra aztertu.
4. Promotoreen eta eskualde erregulatuaren azterketa.
5. Proteinen arteko elkarrekintza fisikoa aztertzea.
6. Gene endogeno jakin baten adierazpena galaraztea (Transkripzioa edo itzulpena inhibititu).
7. Terapia genikoa.
8. Klonazioa.

Transfekzio motak

Egonkorra:

Abantailak: DNA errekonbinantea modu egonkorrean ostalariaren genomatik txertatuko da eta honen genomarekin batera erreplikatu da, han gelditzen da. Transgenea daukan lerro zelular berria sortuko da.

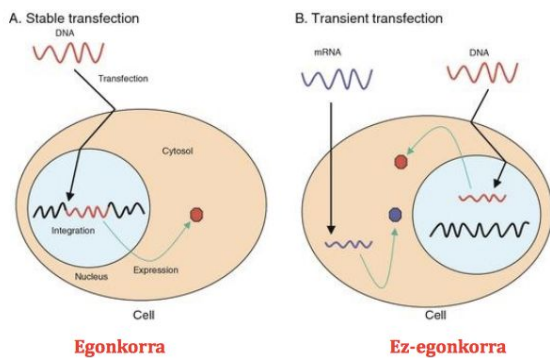
DNA errekonbinantea zelulan sartzeko probabilitatea 1/1000ekoa da, horregatik markatzaileez hautespenak egin behar dira transfekzioa zeintzuk pairatu duten jakiteko. Ez da rDNA-ren kokapena kontrolatzen. Hazkuntza selektiboaren sustapena (2 hilabetez) garrantzitsua da, DNA-ren integrazioa konfirmatzeko.

2. Ez-egonkorra:

pDNA (plasmid DNA)(nukleoan) edo mRNA-ren (zitoplasman) txerta daiteke. rDNA nukleoan mantentzen da epe murriztuan, baina epe hori pasatuta DNA errekonbinantea degradatuko da, ez da genomatik txertatuko, ez da genomarekin batera erreplikatu eta beraz, ez da ondorengoetara pasako.

Abantaila: Ez da hautespenik behar, zelula gehienak transfektatu dira. DNA errekonbinantearen azterketa egiteko denbora epea 24-78 ordu da.

Gene baten adierazpena aztertzeko erabiltzen dira, ez lerro zelular bat sortzeko.



3. Episomala:

Tarteko egoera bat da. Nukleoan mantenduko da DNA errekonbinantea modu egonkorrean baina (genomatik) kromosometatik kanpo. Gene sekuentziatik eskala handiko proteinen ekoizpena 4 bat aste pasa behar dira. Bektore episomalak erabili behar dira transfekzioarako. Bektore hauen atalak dira:

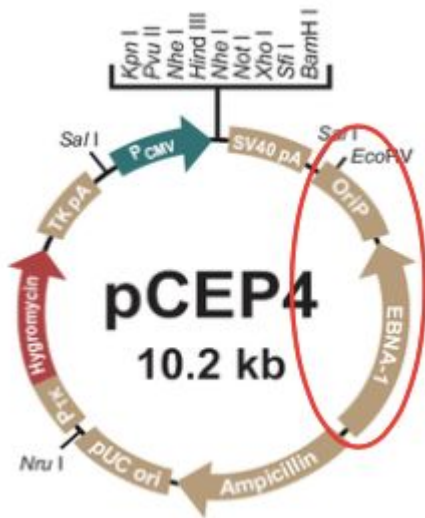
- 1- OriP: Epstein-Barr ugaztun zelulen birusaren erreplikazio hasiera gunea.
- 2- EBNA-1: EBV birusaren antigeno nuklearra.

Bi hauek plasmidoa egoera episomalean mantenduko dute, egonkor eta modu efizientean erreplikatu.

3-Antibiotikoekiko erresistentziarako genea (ampizilina bakterioentzat eta hidromizina eukariotoentzat-bere promotorea eta terminator-a izango ditu).

4- TKPa transkripzioa bukatzeko seinalea

- 5- Pcmv: promotorea. Induzigarria. Oso potentea.
- 6- Polilynkerra: hemen gure intereseko genea
- 7- SV40 pA: poliadenilazioaren seinalea. Amaiera seinalea
- 8- pUC ori: erreplikaziorako gunea (pUC = plasmidoa)



9. gaia: Genetikoki eraldaturiko landareak

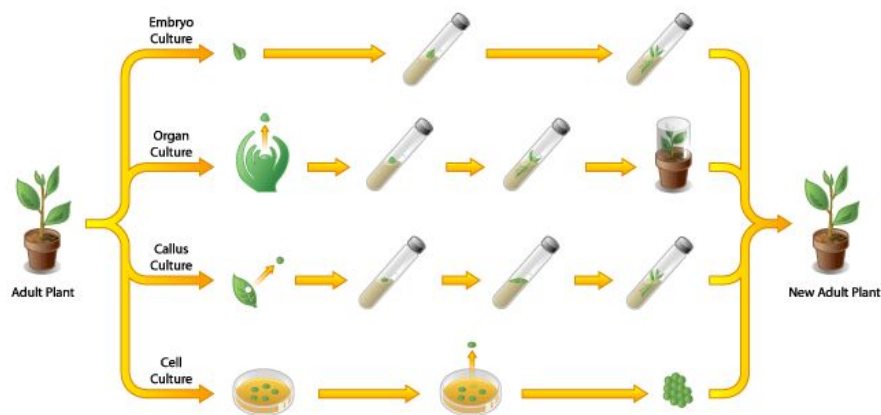
Zergatik erabiltzen dira landareak proteina heterologoak adierazteko?

Abantailak	Desabantailak
Ugaztun zelulak baino azkarrago eta errazago hazten dira.	Urtaroaren menpeko hazkuntzaren ondorioz ez daude beti eskuragarri.
DNA errekonbinantea landarearen genomatik txertatzea erraza da. Gainera, landareek ondo toleratzen dituzte genomaren modifikazioak. Adb: Ploidia	Glikosiazio ereduak ez dira ugaztunetan ematen direnak eta ondorioz, proteinak ugaztunetan injektatzean ez ditu ezagutuko eta eraso egingo die.
Adierazpena eta proteinen tolespena animalia zeluln modukoa da.	Proteinak maiz desnaturalizatzen dira purifikazioan
	Transformazioaren efizientzia baxua da, horma zelularra daukatelako. Transferentzia egiteko metodo bereziak daude.

Normalean landareak ez dira bioerreaktore moduan erabiltzen, bakterio eta legamiak merkeago eta komenigarriagoak dira. Zertarako adierazten dira orduan proteinak landareetan? Batik bat landare transgenikoak sortzeko erabiltzen da metodologia hau, landareak genetikoki erabiltzeko. Zertarako behar ditugu landare transgenikoak?

- Laboreen ekoizpena hobetzeko, landareen erresistentzia handitu izurritekiko, gaixotasunekiko, herbizidekiko, lehorteekiko, lurzoru desegokiekiko ...
- Produktuaren "ustezko kalitatea" handitzeko, beraien itxura edo eduki nutrizionala hobetuz edo haien heltzea atzeratuz, biltegiatze denbora luzatuz.
- Ohikoa ez den arren bioerreaktore bizi gisa ere erabili daitezke → Proteina edo metabolito interesgarrien ekoizleak izan daitezke.
- Metal astunen presentzia hazteko gai diren landareak sortzeko, kutsatutako lurzoruak onera ekarriz.
- Geneek eta bere produktuek garapenean daukaten funtzio biologikoa ikasteko.

Landarearen edozein ataletik abiatuta zelulen kultiboa egin daiteke, zelulak totipotenteak baitira. Erabiltzen dugun zatiaren arabera kultibo ezberdinak izango ditugu baina kasu guztietan landare heldu lortuko da.



Lehen ez zekiten geneak klonatzen eta beraz, landare transgenikoen teknologia sortu aurretik, hobekuntza genetikoak beste modu batera egiten ziren. Adibidea:

Koltza lehen eskualde epeletan ekoizten zen, baina gaur egun eskualde hotzetan ere garatu daiteke. Horretarako, protoplastoak (parea zelula gabeko zelulak) izpi ultramorekin tratatu ziren DNA genomikoan mutazioak eragiteko. Mutazio horiek zorizkoak ziren.

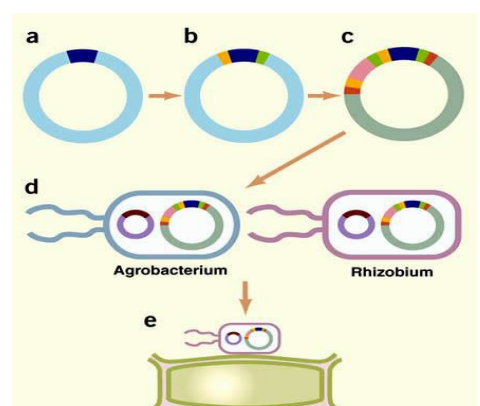
Ondoren protoplastoak bikoiztu eta enbrioiak bereizi ziren. 329 enbrioi mutanteak testatu ziren eskualde izoztuetan eta 74 hotzarekiko erresistente hautatu ziren. Horiek erabili zituzten hurrengo urtetarako. Landare hauetan hotzarekiko erresistentziarako bidezidorrak areagotuta zeuden (salicylic acid, jasmonic acid) mutazioen bidez.

Hala ere prozesu hau oso neketsua zen eta gene exogenoak sartzeko estrategia desberdinak garatu ziren.

Landare transgenikoak sortzeko 3 pausu garrantzitsu izan behar ditugu kontuan.

- 1-DNA transferentziarako metodo egokia
- 2-Hautespenerako gene markatzaileak
- 3-Zeluletatik abiatuta landare heldua sortzea.

·Onuragarria den proteina bat identifikatu eta bera kodetzen duen genea adierazpen-bektore batean txertatzen da.



- Bektorea, bektore-garraiatazaille batekin elkartzen da. Honek intereseko landarean erabilgarri izango den gene markatzaile bat izango du.
- Bektore garraitatzailea bakterioetan sartzen da: *Agrobacterium* eta *Rhizobium*. Bakterio hauek landare zeluletan sartzeko gai dira.
- Bakterioa eta intereseko landarea elkarrekin kultibatzen dira: Ko-kultiboa.
- Bektore garraitatzailea duten landare zelulak aukeratu egiten dira markatzailearen bidez.
- Landaren zelula trnagenikoak landare heldu bilakatzen dira (ugalketarako ahalmena duena).

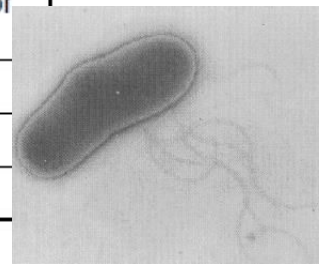
Antibiotiko 2: Bat bakterioen klonazioa egiteko plakan eta bestea behin plasmidoa landare zelulan egonda, plaka hazi ahal izateko.

1.-Geneen transferentzia landareetan

Ti

Metodoa	Azalpena
Ti plasmidoa-ren bitarteko geneen transferentzia (<i>Agrobacterium</i>)*	Eraginkorra, baina soilik dikot landareetan
Biolistika *	Erraza eta eraginkorra, landare mota desberdinekin
Bektore biralak	Ez da oso eraginkorra
Protoplastoen transferentzia	Bakarrik protoplasto batzuek sor ditzakete landare helduak
Mikroinjekzioa	Zaila eta motela
Elektroporazioa *	Bakarrik protoplastoetan
Liposomak	Bakarrik protoplastoetan

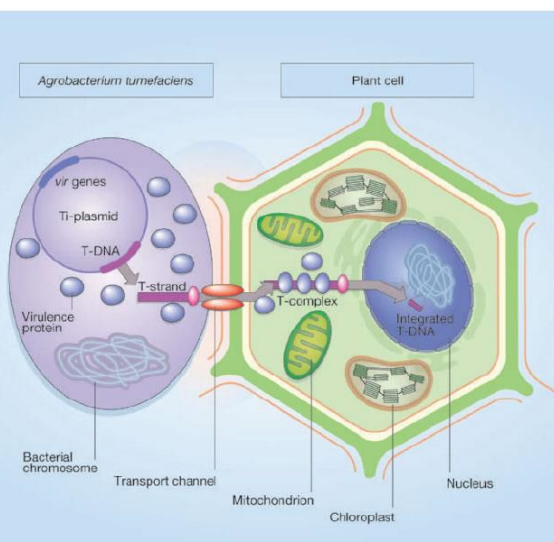
* Erabilienak



plasmidoaren bitarteko geneen transferentzia

Agrobacterium tumefaciens bakterioa erabiltzen da, gram - dira eta lurzoruan bizi dira. Landareak zauri bat jasatean, bakterioa sar daiteke eta patogenikoa da, tumoreak eratu. Bakterio honek soilik dikotiledoneoak diren landare gazteak infektatzen ditu.

Bakterioen DNA, Ti plasmidoa barne, landare zeluletan sartzen da, histonekin lotzen da eta landarearen genomari txertatzen da errekonbinazio bitartez, hau da, transferentziarako makinaria guztia bakterioak jartzen du.



Agrobacterium-ek tumoreak induzitzeko gaitasuna duen plasmidoa du → TI. Plasmido honek, birulentzia geneak (VIR) eta DNA transferitzeko eskualdea du (T-DNA). T DNA tumoreak areagotzeko proteinak sortzeko geneak ditu eta gure intereseko DNA bertan txerta daiteke.

Ingeniaritza genetikoan plasmido hori erabiltzen da bektore gisa, T-DNA kendu eta bertan interesko

sekuentzia txertatzen da. Beraz T-plasmido eraldatua erabiltzen da.

Egoera normalean, VIR proteinek, T-DNA eskualdea prozesatzen duten T-strand deitutako egitura sortuz. Bakterioak landarea infektatzen duenean, T-strand eta VIR proteina garraio kanal baten bidez zelulara sartuko dira.

Gure kasuan, T strand horrek interesko DNA eramango.

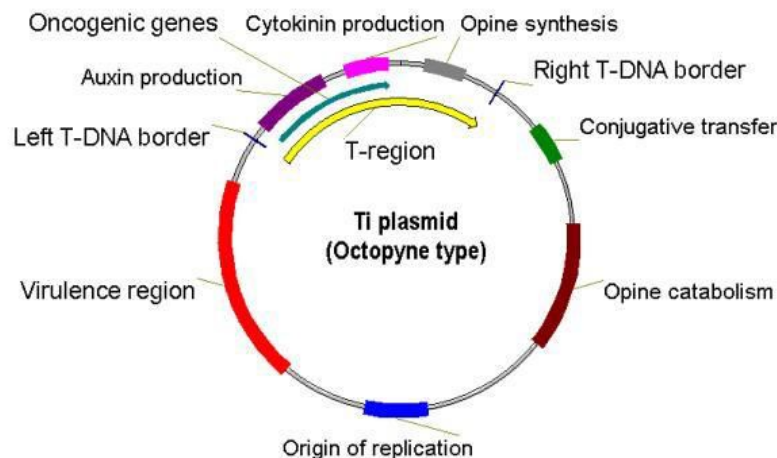
Zelularen barruan, T-strand eta VIR proteinek, bat egite dute eta T-konplexua sortzen dute. Hau landarearen nukleoan sartuko da, genomari txertatu eta genea adieraziko da.

2.-Klonazio bektore motak eta beren ezaugarriak

1) Ti plasmidoa

Hauek dira Ti plasmidoaren oinarriko eskualdeak:

- 2 muturreko sekuentzia ditu (Left and Right T-DNA border) eta hauen artean gene ezberdinak bakterioentzat beharrezkoak direnak.
- VIR eskualdea: Birulentzia geneak
- Ori eskualdea
- Transferentzia konjugarua gertatzeko eskualdea
- Opinak (landare nutrienteak) metabolizatzeko eskualdea.



Hauetatik zeintzuk dira beharrezkoak transferentzia emateko?

- Gure interesko sekuentzia T eskualdean txertatzen da eta horretarako gutxienez eskuineko muga behar da, bertan hasten baita txertaketa.
- VIR eskualdea behar da, VIR proteinek ezinebsteak direlako T-strand sortzeko.

T-DNA eskualdea eraldatu daiteke errestrikzio entzimak erabiliz, tumoreak sortzen dituzten geneak kendu eta intereseko geneak sartu.

- VIR geneak
 - 35 gene inguru
 - T DNAREN mozketak, transferentzia eta landarearen genomari integrazioa baimentzen dute → T-DNAREN TRANSFERENTZIA
- T-DNA muturreko sekuentziak

- 25 bp tako sekuentzia errepikakorrak T-DNAREN alboetara
- Beharrezkoak T-DNAREN transferentziarako (behintzat eskubikoa)
- Endonukleasantzako itu gunea → Endonukleasek bertan mozketa egiterakoan, transferentziarako hasiera gunea sortzen dute.

- Cis eskualde erregulatzaileak

- Promotoreak eta terminadoreak, adierazpena kontrolatzeko
- Erabilienak: *nopaline synthesis gene* (NOS) eta *Cauliflower Mosaic Virus* (*CaMV35S*)

- Hautaketarako gene markatzaileak

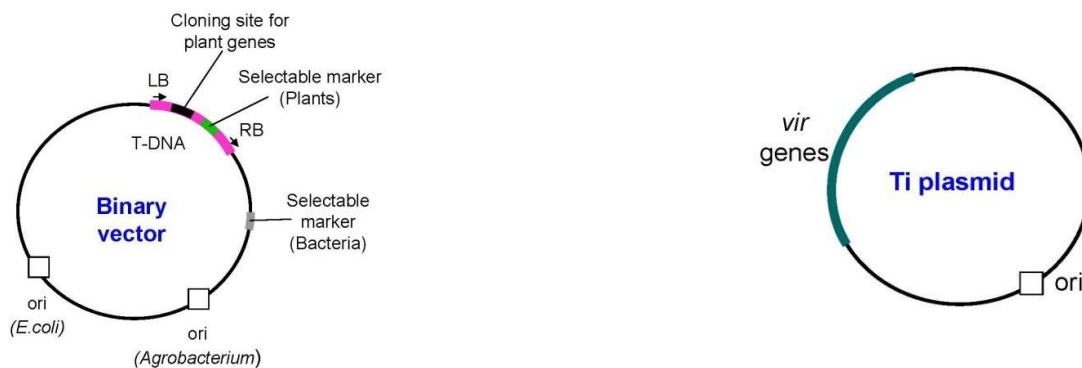
- Adibidez, higromizina fosfotransferasa (higromizinarekiko erresistentzia ematen duen genea)

2) Bektore binarioak

Ti-plasmidoan oinarrituta sortu dira. Kasu honetan 2 bektore egongo dira: Binarioa eta laguntzailea.

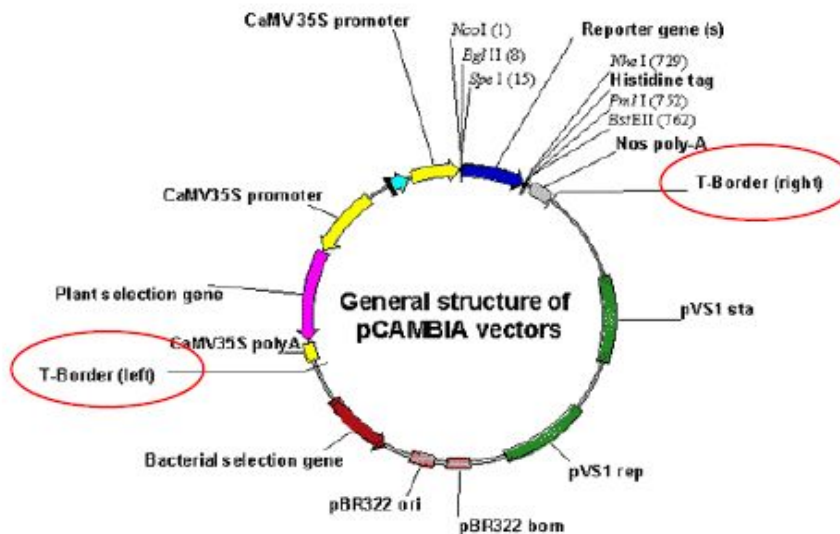
·T-DNA eskualdea, interesko genearekin batera bektore binarioan dago.

·VIR geneak bektore laguntzailean, T-DNA gabeko Ti plasmidoan.



pCAMBIA bektorea esaterako binarioa da. Muturreko sekuentziak ikusten dira baina VIR geneak ez. T-DNAREN barruan honako moudulu hauek ditu:

- Landareko antibiotikoaren erresistentzia eta promotorea (CaMV 35S)
- Promotorea eta intereseko DNA sartzeko gunea
- Reporter gene: Behin landare barnean egonda T-DNA barneratu dela adierazten du.
- PoliA isatsa, terminator
- Bi mugako sekuentziak



Hala ere Ti plasmido hau soilik dikotiledoneoetan erabili daitezke, baina monokot landareetan ez. Beraz, hauetan gehien erabiliko den prozesua biolistika da, zelula asko hiltzen dituen arren.

3.-Gene heterologoen adierazpenaren kontrol sistemak. Promotoreak

Landareetan ere promotoreak konstitutiboak edo induzigarriak izan daitezke, baina konstitutiboak erabiltzen dira gehien. 2 mota daude:

·Dikot landareen promotoreak:

- CaMV 35S promotorea (Azalorearen mosaiko birusaren promotorea)
- Opine promotorea

·Monokot landareen promotoreak

- Plant ubiquitin* promotorea (Ubi)
- Rice actin 1* promotorea (Act-1)
- Maize alcohol deshidrogenase 1* promotorea (Adh-1)

1) CaMV 35S promotorea

Azalorearen mosaiko birusaren (CaMV) genoma osoaren transkripzioaren arduraduran da. Dikot landareetan oso promotore efizientea da, baina monokotiledoneoetan ez hainbeste. Gehien erabiltzen den promotore konstitutiboetako bat da eta bere patentea Monsanto eta Rockefeller-ek dute.

Nucleotide sequence of the CaMV 35S promoter (-343 to +1)

```

-343                                     -300
5' tgagactttt caacaaaggg taatatccgg aaacctctctc ggattccatt
   gccagctat ctgtcacttt attgtgaaga tagtggaaaaa ggaaggtggc
   tctacaaat gccatcattg cgataaagga aaggccatcg tgaagatgc
   ctctgccgac agtgggtccca aagatggacc cccaccccccac gaggagcatc
   gtggaaaaaag aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg
   tgatatctcc actgacgtaa gggatgacgc acaatcccac tacccttcgc
   aagacccttc ctctatataa ggaagttcat ttcatttggga gagga 3'
                                     +1
TATA box [ ]
CAAT sequences

```

2) Opine promotorea

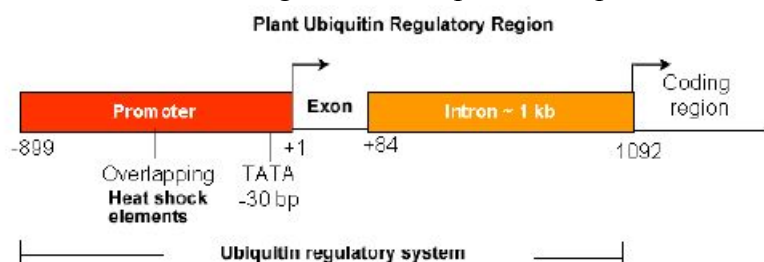
Agrobacterium tumefaciens-aren *mas* eta *ocs* geneen promotoreak eta eskualde erregulatzailak (UAS: upstream regulatory sequences) ditu. UAS sekuentziak ezinbestekoak dira eta gainera promotorearen aktibitatea handitzen dute, berezko promotoreak ahulak direlako. Konstitutiboki aktibo egotea ere eragiten dute.

Moduluen artean, konbinaketa posible ezberdin ugari daude. Patentea konpainia askoren esku da, Monsanto barne.

3) Plant ubiquitin promotorea (Ubi)

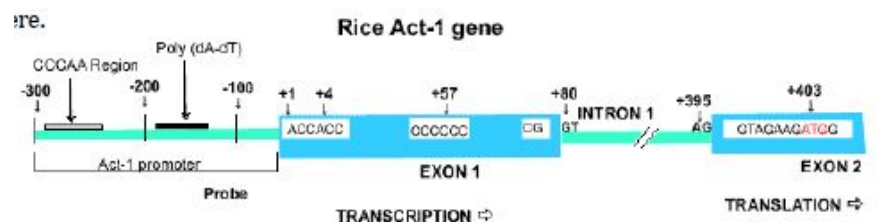
Landareen ubiquitin promotorea oso kontserbatuta dago espezieen artean. Ubikitina zelula eukariotikoek duten proteina bat da eta proteinen berriztapen prozesuan, kromatinaren egituraketan, ziklo zelularrean, DNAREN konponketan eta estresaren kontrako erantzunetan parte hartzen du.

Mycogen Plant Science eta Monsanto PLC dituzte promotore honen patenteak eta landareen ubiquitinaren sistema erregulatzaileren aplikazioen patentea.



4) Rice actin promoter (Act-1)

Aktina ehun guztien zelulen zitoeskelotoko osagaia da eta zenbait prozesutan parte hartzen du: zelularen formaren determinazioan, zelularen erreplikazioan, organuluaren garraioan eta zelularen hazkuntzan. Arrozaren Act 1 geneak 5' muturrean exon ez kodetzaile labur bat dauka, gero 447bp tako intron bat eta gero lehenengo exon kodetzailea. Adierazpen konstitutiboa dute.



Mycogen Plant Sciences, Monsanto UK Ltd and Prodigene Inc. daukate promotore honen patentea eta promotore hau erabilia lor daitekeen edozein aplikazioaren ere.

5) Maize alcohol dehydrogenase I promoter (Adh-1)

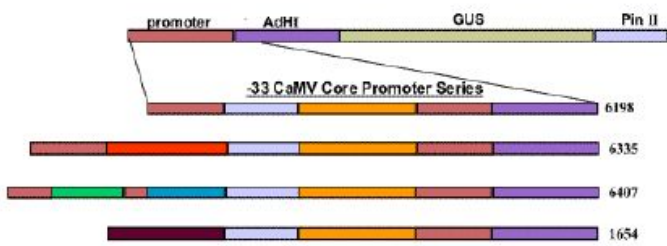
Landare batzuk (arrozaren landarea, adibidez) gai dira egoera anaerobikoan bizitzeko horretarako gaitasuna ematen dien zenbait proteina ekoiztuz → Alkohola deshidrogenasa entzima (etanolaren hartziduran parte hartzen du)

Artoan, entzima hau oso karakterizatuta dago eta gaitasun hau duten bi entzima identifikatu dira: alkohola deshidrogenasa I (Adh I) eta II (Adh II) → Garrantzitsua Adh I → Bere promotorea ongi karakterizatuta dago eta gene heterologoaren adierazpenerako oso erabilia izan da.

Adh-I genearen promotoreaz gain, 2 eskualde erabiltzen dira gene heterologoaren adierazpen sustatzeko landare zeluletan (batez ere monokot landareetan).

- Elementu erregulatzaille anaerobikoak (ARE: anaerobic regulatory elements)
- Lehenengo introia

Synthetic promoters



6) Promotore sintetikoak

Promotore hauek ez dira naturan ezagutzen. Promotore basatien eskualdez eta artifizialki erantsitako eskualde erregulatzaillez osatuta daude. Oso indartsuak dira eta adierazi nahi den genearen 5' muturraren aurrean kokatzen dira.

Monokot eta dikot landareetan erabili daitezke.

PROMOTORE INDUZIGARRIAK

Bi mota daude:

- Kimikoki erregulatutako promotoreak: Alkohol, tetraziklina, esteroide, metal edo beste konposatu batzuen absentsia edo presentziaren arabera erregulatu direnak.
- Fisikoki erregulatutako promotoreak: Argia eta tenperaturaren absentsia edo presentziaren arabera erregulatu daudenak. Ehun espezifikotan soilik daude: Sustrai, fruitua, hazia ...

Gene markatzaileak: Antibiotikoekiko erresistentzia

Landareetan hautespena egiteko antibiotikoekiko erresistentzia duten geneak erabiltzen dira batik bat. Hurrengoak dira erabilienak:

- Hygromycin phosphotransferase* (HPT) genea (hyg_r)
- Neomycin phosphotransferase* (NPTII) genea (neo_r)

Monsanto enpresak landare transgenikoen garapenerako edozein antibiotikoekiko erresistentzia ematen duten geneen patenteak dauzka. Estatu Batuetan soilik aplikagarria. Patenteak edozein konstrukzio kimeriko barneratzen du:

- Landareetan adierazi daitekeen edozein promotore
- Antibiotikoekiko erresistentzia ematen duen edozein generen sekuentzia
- Poli-A isatsa.

Adb: 35S CaMV promotorea + neomizin fosfotransferasaren genea

Danimarkako ikertzaile talde batek lurzoruko konposatu toxikoak detektatzeko modu bat diseinatu zuen. Lurzoruan zeuden konposatu espezifikoen arabera, landaren kolorea aldatzen zen. BIODETEKZIO deritzo.



Horretarako GFP genea (molekula floreszenteak) txertatu zuten landarearen genomari eta haue kontrolatzen duen promotorea pertsonen kontrako minek lurzorura askatutako konposatu batek induzitzen du. Lurrean osagai toxikoak zeudenean (TNT ...) promotorea aktibatzen da.

10.GAIA: UGAZTUN ZELULEN ERALDAKUNTZA GENETIKOA

Gai honetan geneen transferentzia ugaztun zeluletan, klonazio-bektore motak, adierazpen kontrol sistemak eta aplikazioak landuko ditugu.

Ugaztun zelulak erabiltzea intereseko genea adierazteko abantailak eta desabantailak ditu

Abantailak:

- Proteinen sintesia, eraldaketa eta aktibitatea antzekoa izango da, hau da, prozesu hauek oso antzekoak izango dira gizakietan berez ematen direnekin
- Adierazpen bektoreak eskuragarriak dira, saltzen baitira.
- Eskala handiko kultiboak egin daitezke (batez ere suspentsioan)

Desabantailak:

- Kultibatzeke zaila/garestia
- Kultiboek hazkuntza motela dute (ez dira bakterioak bezala)
- Genetikoki desegonkor dira, ugaztun zelulak *in vitro* medioan hazten direnean kultiboaren eraginez gene babesleak galdu ditzakete, p45 adibidez
- Proteina errekonbinatuen ekoizpen baxua da, honengatik eskala handiko kultiboak egiten dira.
- Kontaminatzeko erraza da. Kultiboak manipulatzeko bitartean ikertzaileen bidezko kutsadura gerta daiteke

Ugaztun zelulak batez ere ikerkuntzan erabiltzen dira, baina antigorputz monoklonalak, txertoak, interferoiak, e.a ekoizteko ere erabiltzen dira.

Gene transferentzia egiteko bi modu daude:

- Metodo birikoak

Gehien erabiltzen direnak dira. Honetarako birusen bitarteko DNAREN transferentzia zeluletara egiten da. Erretrovirusak edo adenovirusak erabiltzen dira adibidez.

- Metodo ez-birikoa

- Transfekzioa: Zelulek medioan dagoen DNA hartzen dute (elektroporazioa, liposomak)
- Transferentzia zuzena: Mitoinjekzioa nukleoan edo bonbardaketa “gene gun”

Bektore biralak

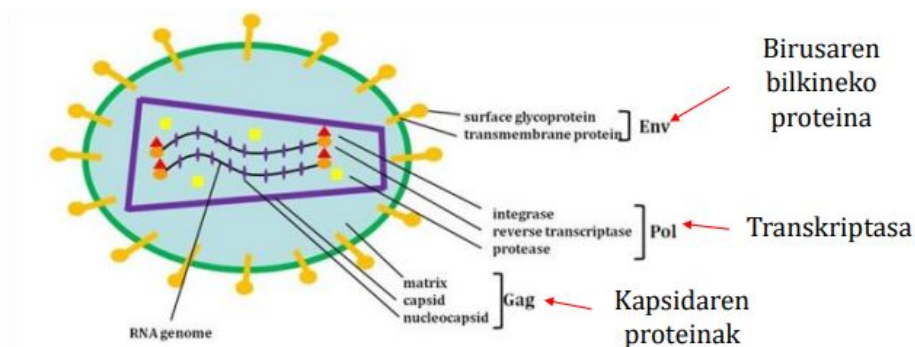
Abantailak:

- Transferentziarako efizientzia altua dauka, izan ere birusaren makinaria erabiltzen da eta hau oso ona denez transferentziaren efizientzia ere oso altua izango da.
- Zelula mota desberdinak infektatzeko gai dira
- Egonkorak dira (endosometatik babestuta mantentzeko mekanismoak)
- Birusa kultiboa infektatzerakoan infekzioa belaunaldietan zehar mantenduko da. Lerro zelular egonkorra lortuko delarik
- Birusek DNA nukleora garraiatzeko mekanismo naturalak dituzte, batzuk gainera kapaz izango dira material genetikoa kromosometan txertatzeko

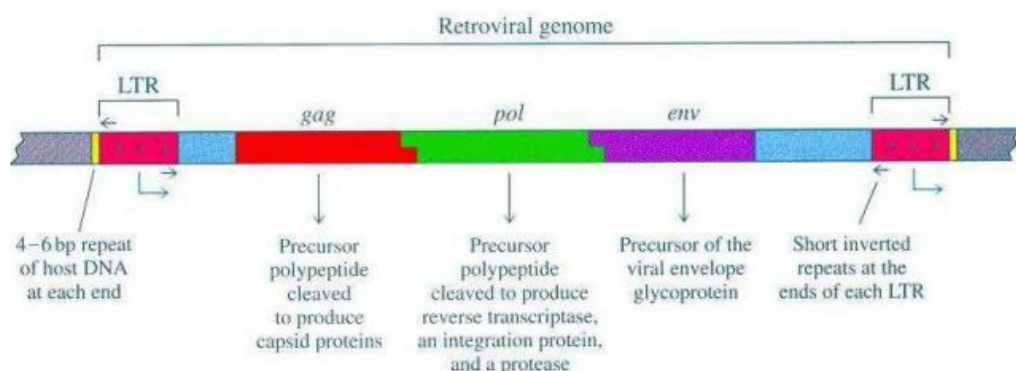
Desabantailak:

- Proteina birikoek erantzun immunologikoa sustatzen dute
- Kromosometan gaizki txerta daitezke (proto-onkogeneen aktibazioa edo/eta tumoreen aurkako geneen isilpena)
- Sintesirako prozedura konplexua da DNA errekonbinantea ekoizteaz gain birusaren kapsidea osatzen duten proteinak ekoizten dira eta DNAREN enpaketazioak kapsidearen barruan egin behar da.
- Genearen tamaina murriztuta, ezin dira gene handiak txertatu.
- Toxizitatea, birus bizen kontaminazioa. Kontu handiz manipulatu behar dira kultiboak.

Erretrobirusak



Kate bakarreko RNA dauka, RNA hori alderantzizko transkriptasari esker erreplikatzeko da. Hau harizpi bikoitzeko DNA molekula forman kopiatzen da. Bere erreplikazio zikloa oso konplexua da, partikula birikoak bi RNA molekula daramatza. RNA molekula hori eta RNAmezularia antzekoak izango dira Cap egitura edukiko du 5' muturrean eta poli-a isatsa 3' muturrean. Gainera partikula birikoak proteina biriko esentzialak edukiko ditu: integrasak, retrotranskriptasa eta proteasak. Honez gain, partikula birikoak birusaren bilkineko proteienak transfekzioa eman ahal izateko eta kapsidearen proteinak eramango ditu (Gag eta Env). Orokorrean zatitzen ari diren zelulak infektatzeko gai dira. Baina badago erretrobirus mota bat, lentibirusa (VIH) zelula kieszenteak zatitzen ez direnak infektatzeko gai dena (ehunetan, eta kultibo primarioetan erabili daiteke). Erretrobirusak genoma nagusian txertatzen dira, beraz geneak belaunaldi batetik bestera mantentzen dira. Beraz, guk sartzen dugun DNA konstrukzioa ere barneratuko da genoma nagusian. Birusa mantentzeko partikula infektiboen kultiboa egin behar da.



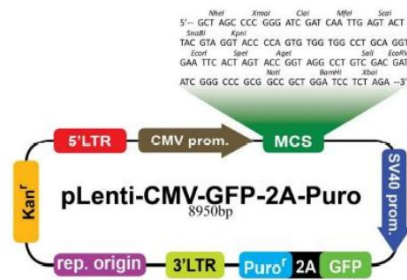
Hemen erretrobirusen genoma ikusi dezakegu. Bi LTR sekuentzia ditu eta beraien artean birusaren infekzioa emateko behar diren sekuentziak.

Bektore erretrobiralak

Erabilienak ez dute erreplikaziorako informazioarik, helburua ez baita zelula infektatzea eta lisia sustatzea. Honengatik erreplikaziorako eta paketatzeke geneak (gap, pol, env) mutatuta daude.

Infektatzeko gai dira, gene heterologoa garraiatuz eta adieraziz, baina ez dituzte lisatzen infektatutako zelulak. Orokorrean txertatuaren tamaina 8-10kB da.

Bektore lentibirala



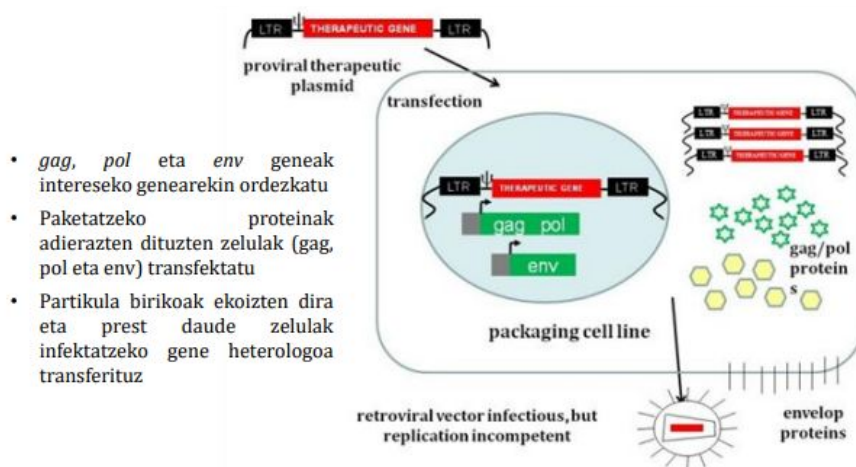
Tximinoaren immunoeskasiaren birusaren (SIV), felina immunoeskasiaren birusaren (FIV) edo zaldi-anemiaren birus infekzioaren jatorrizko egitura

LTR sekuentzia transferentzia emateko/ Promotore konstitutibo (CMV prom.)/ Polilinkerra (MCS)/ Ori eskualdea/ Kanamizinarekiko erresistentzia (Kan)/ SV40 promotorea bultzatuko du GFP, 2A eta Puro r (erresistentziarako genea) adierazpena bultzatu.

Irudian poli-a isatsa falta da transkripzioa bukatzeko.

Erretrobirus errekonbinanteak sortzea zelula paketatzaileak erabiliz

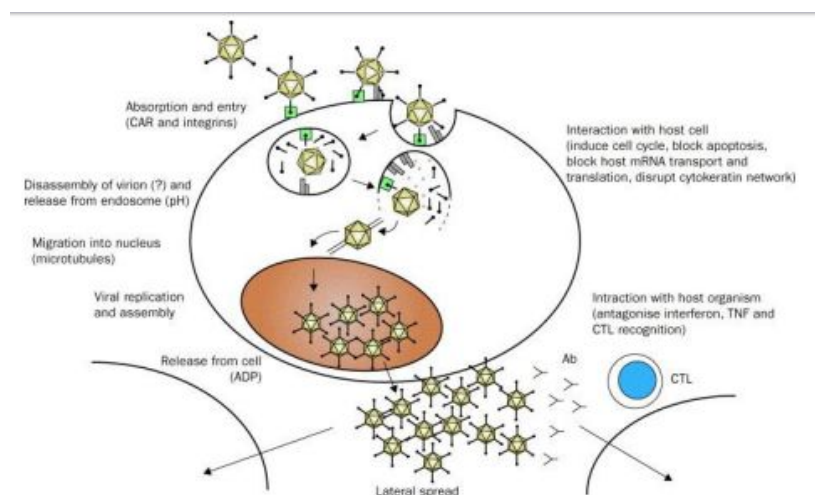
Lehendabizi genoma birikoa eraldatzen da intereseko DNA txertatzeko. LTR sekuentziak beharrezkoak dira infekzioa gertatzeko eta mantendu behar ditugu bektorean. Hala ere, gag, pol eta env geneak kentzen dira eta intereseko genea txertatzen da bere lekuan, baina proteina horiek gabe partikula birikoak ezingo dira sortu. Hauek sortzeko, paketatzeke proteinak adierazten dituzten zelulak transfektatu behar dira, honela partikula birikoak ekoiztuko dira eta zelulak infektatzeko prest egongo dira intereseko genea transferituz



Adenobirusak

Harizpi bikoitzeko eta 36kB DNA dute, animaliak infektatzen dute (gizakietan adibidez konjuntibitisa, arnas infekzioak, gastroenteritisa eta ziszitisa)

Kapsidea ikosaedroa da, zelularen nukleoan garatzen da eta bertan erreplikatzen da. Bertan partukula birikoak sortzen dira eta beste zelulak kutsatuko dira. Zatitzen direneko zelulak eta zelula kieszenteak infektatzeko gai dira. DNAREN erreplikazioa nukleoan ematen da eta polimerasa birikoak zuzentzen du. Ez da genomatik txertatzen beraz ez da belaunaldietan zehar transferituko.



Bektore adenobiralak

Erretrovirusetan erabiltzen den mekanismo antzekoa erabiltzen da bektorea sortzeko. Erreplikazioareko eta enpaketatzeko garrantzitsuak diren proteinak kentzen dira eta paketatzeko proteinak adierazten dituzten zelulak transfektatzen dira.

Terapia genikoan erabili dira, adibidez fibrosis kistikoa. Biriketako zelulak infektatzen dituzte arnas sistema infektatzeko makinarria berezia dutelako.

Metodo ez-birikoak: Transfekzioa

Liposoma kationikoak

Karga positiboko lipidoek DNArekin elkarrekiten dute lipido-DNA konplexua sortuz. Konplexu honek mintza zelularra zeharkatzen du

Abantailak:

- Transfekzio efizientzia altua dauka
- Kultiboetan erabiltzeaz gain ehunetan erabili daitezke.
- Lipido fusogeniko anitz ekoiztu daitezke

Desabantailak:

- Efizientzia baxua, erretrobirusekin konparatuta
- Transfekzio ez-egonkorra, intereseko DNA ez da barneratuko genoma nagusian eta galduko da
- Toxizitate altua

Ugaztun zelulen adierazpen bektoreak: ezaugarriak

- Polilinkerra (MCS)
- Hautespenerako markatzailea: antibiotikoekiko erresistentziarako gena, lerro zelular egonkorraren hautespena bideratzeko
- Erreplikaziorako hasiera gune eukariotikoa, adibidez, SV40 birusaren sekuentzia (hautazkoa) Honek modu autonomoan erreplikatzeko gaitasuna emango dio bektoreari.
- Promotore eukariotiko (konstitutibo edo erregulatua). Gehienetan animalia birusenak (SV40, *cytomegalovirus* (CMV), *herpes simplex virus* (HSV),...)
- Poliadenilazio-seinalea, RNAREN egonkortasuna sustatzeko
- Kozak sekuentzia eta ATG kodona (itzulpenaren hasiera gunea)
- Fusio-proteinak ekoizteko *Tag*-ak (hautazkoa).
- Peptido seinalea, kokapen zelularra zehazteko (hautazkoa). Intereseko organora eramateko.
- Errekonbinazio homologoa bideratzeko moduluak (hautazkoa). Hau erabiltzen da lerro zelular egonkorak lortzeko; modulo honekin, intereseko DNA errekonbinazio homologoaren bidez, intereseko DNA zelularen genomatik txertatzea lortuko da belaunaldiz pasata.

Hautespenerako markatzaileak

Selective Antibiotics Products	
Blasticidin	Selection antibiotic for the <i>bsr</i> or <i>BSD</i> genes
Zeocin™	Selection antibiotic for the <i>Sh ble</i> gene
Puromycin	Selection antibiotic for the <i>pac</i> gene
G418	Selection antibiotic for the <i>neo</i> gene
HygroGold™	Hygromycin B High purity - Selection antibiotic for the <i>hph</i> gene
Hygromycin B	Selection antibiotic for the <i>hph</i> gene
Phleomycin	Selection antibiotic for the <i>Sh ble</i> gene

Guztiak antibiotikoekiko erresistenteak diren geneak dira. Hala ere markatzaile gehiago daude:

- Metotexatoa: gaur egun ia ez da erabiltzen markatzaile bezala. Dihidrofolatu erreduktasa (DHFR) ez daukaten zelulak hiltzen ditu. Ostalaria DHFR- izan behar da. Bektoreak DHFR genea dauka. Metotexatoa minbiziaren tratamenduan erabiltzen da.
- G418 (Genetizina): Itzulpena ekiditen du proteinen sintesia eragotziz. Erresistentziarako genea: *neomizina fosfotransferasa* (Neo-r). Ugaztunetan, landareetan eta legamietan erabili daiteke.
- CAT (chloramphenicol acetyl transferase) genea: Kloranfelikolarekiko erresistentziarako genea dauka
- *Herpes Simplex* birusaren Timidin kinasa (HSV-TK) genea: hautespen negatiboa egiten da. HSV-TK daukaten zelulak hiltzen dira Ganziklobir antibirala gehitzen dugunean.

Promotore eukariotikoak

Konstitutiboen artean: SV40, CMV edo hEF-1.

Induzigarrien artean: Olac (induktorea: IPTG), Hormonekiko erantzuteko promotoreak edo Sintetikoak: TetO (induktorea: tetraziklina)

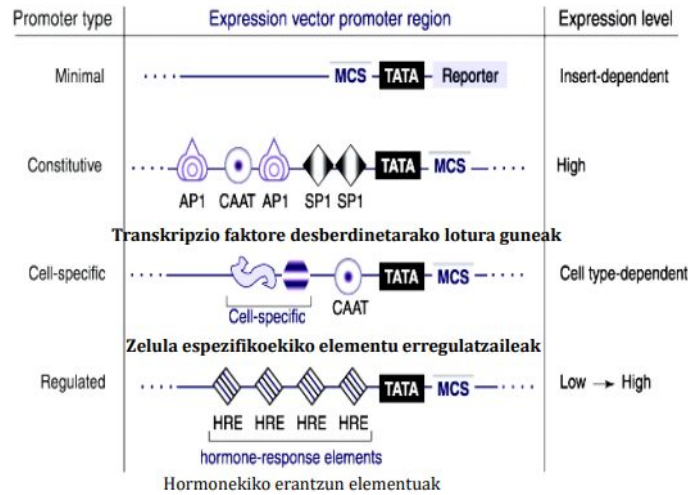
Animali promotoreen ohiko elementuak:

Transkripzio faktoreen itu-guneak: CAAT kutxa (non transkripzio faktorea lotuko den) edo AP1 eta SP1 lotura guneak (transkripzio faktoreak dira).

HRE-ak (hormonekiko erantzun elementuak) eta promotore zelula/ehun-espezifikoak

Transkripzio faktorea itu-gune espezifikoari lotzen zaio eta areagotzen du transkripzioa RNA polimerasarekin elkarreginez.

TRANSKRIPZIO FAKTOREEN ITU GUNEAK ANIMALI BEKTOREETAN



Hemen promotore desberdinak ikus ditzazkegu, simple zein konplexuak. Sinpleak promotore minimoa edukiko du, polilinkerra TATA kutxa eta gene reporteroa. Azkeneko honek lacZ edo luziferasa izan daiteke. Promotore hau erabiliko dugu adibidez jakin nahi dugunean ea transkripzio faktore baten funtzioa beharrezkoa den adierazpena sustatzeko. Nola egiten da hau? Alde batetik promotorea transkripzio faktorearen itu-gunea mutatuarekin klonatzen dugu eta beste aldetik mutatu gabe. Jarraian gene reporteroaren seinalea konparatzen dugu.

Beste aldetik, promotore konplexuak daude. Hauek TATA kutxa izateaz gain ur-gora eskualdean transkripzio faktore desberdinetarako lotura guneaak edukiko dituzte promotorearen aktibitatea kontrolatuz. Ondorioz genearen transkripzioaren erregulazioan eragina edukitzen.

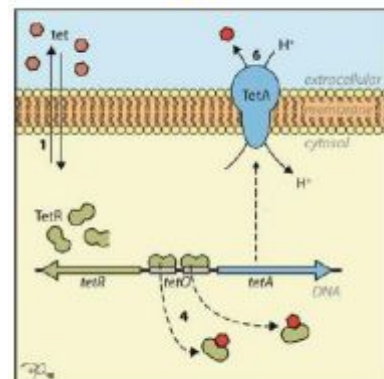
Konstitutiboak TATA kutxatik ur-gora eskualdean elementu erregulatzailak desberdinak daude klonatu dugun sekuentziaren adierazpena haunditzeko

Induzigarriek zelula espezifikoeikiko elementu erregulatzailak diren guneaak dituzte, hormonekiko erantzun elementuak adibidez.

TET-OFF, TET-ON, sistema induzigarriak

Sistema sintetikoa *E.coli* bakterioaren Tn10 transposonaren tetraziklinarekiko erresistentziarako operonan (tet) oinarritzen dira.

Bi sistema hauetan transkripzioa erregulatzeko Tetraziklina antibiotikoa erabiltzen da, honen birtartez, transkripzioa ekiditen edo pizten da tetraziklinarekin (edo doxiziklina analogoarekin)



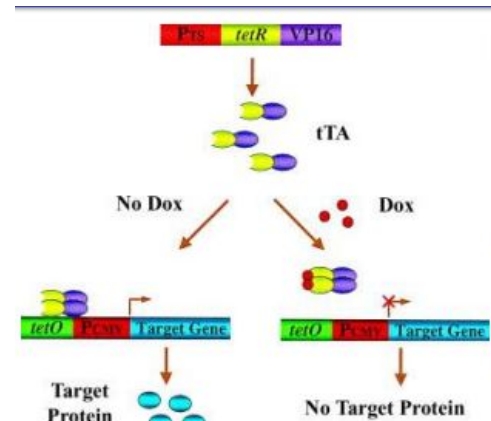
Tetraziklina medioan badago sistema aktibatzen da, TET errepresoreari lotuko zaio operadorea libre utziz eta beraz transkripzioa emango da

TET-off sisteman, tetraziklinak ekiditen du transkripzioa

TET-on sisteman, tetraziklinak pizten du transkripzioa

TET-off

1. Pts promotoreak tTA proteinaren adierazpena sustatzen du (konstitutiboki). VP16 (transkripzioaren aktibaziorako domeinua) promotore berberaren menpe dago. Fusio proteina ekoizten da (tetR-VP16)
2. Doxiziklinaren (DOX) absentsian: tTA proteina tetO operadoreari lotzen zaio, intereseko genearen adierazpena bultzatuz
3. Doxiziklinaren (DOX) presentzian: tTA proteinak tetO operadoretik askatzen da, DOX-ekin lotzen da eta ondorioz, intereseko genearen adierazpena inhibitzen da.

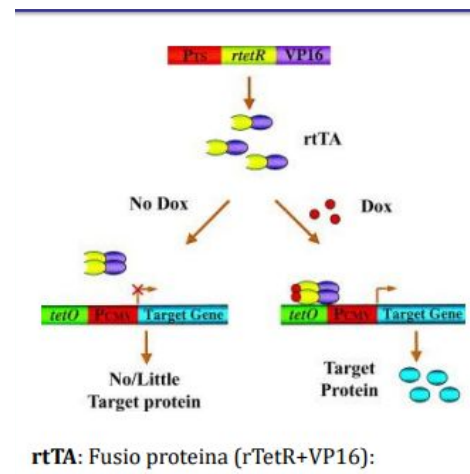


P_{Ts}: promotore zelula/ehun-espezifikoa
tTA: Fusio proteina (TetR+VP16):
TetR: tetO operadoreari lotzen den errepresorea
VP16: proteina birikoaren domeinu transaktibadorea
tetO: tet operonaren operadorea

Tet-Off sistemetan normalean TetO operadorearen errepika ugari CMV promotorearen ur-gora kokatzen dira eta promotore honen aktibazioa erregulatzen dute.

TET-on

1. Tet-on Pts promotoreak rtTA fusio proteinaren adierazpena konstitutiboki sustatzen du (rtTA= rtetR+VP16)
2. DOX-en absentsian, rtTA ez zaio tetO operadoreari lotzen eta ez dago intereseko genearen adierazpenik
3. DOX-en presentzia, rtTA tetO operadoreari lotzen da eta intereseko genearen adierazpena ematen da.



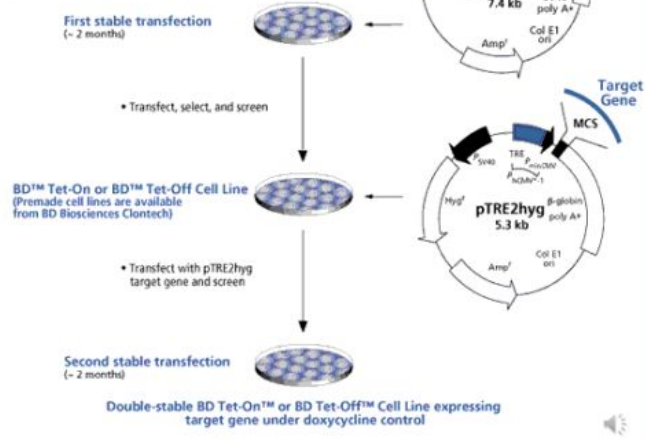
rtTA: Fusio proteina (rTetR+VP16):

Laburbilduz: TET-OFF tetraziklina edo doxiziklinaren presentzian adierazpenik ez, TET-ON tetraziklina edo doxiziklinaren presentzia adierazpenik bai

Nola erabiltzen da sistema hau klonazioan

2 transfekzio egin behar dira:

1. tTA/rtTA ekoiztuko duen plasmidoa (transfekzio egonkorra)
2. Intereseko genea+promotorea+tetO dituen plasmidoa



Kasu honetan fusio proteinak ere ekoiztea interesatzen zaigu. Ekoizteko marka hauek eta ikusitakoak antzekoak dira, merkatuan badaude marka hauek ezagutzen dituzten molekular edo antigorputzak: Glutation-S-transferasa, His, V5, Hemoaglutinina (HA), Myc, Flag, Gfp.

Aplikazioak

Biomedikuntzan proteina ugari erabiltzen dira gaixotasun desberdinetan erabiltzeko:

Proteina	Gaixotasuna
• Factor IX & VIIIc	hemophiliacs
• CD4 receptor	AIDS
• erythropoetin	cancer
• b & g interferons	cancer
• Interleukin-2	cancer
• growth hormone	dwarfism
• tissue plasminogen activator	heart attack/stroke
• Hepatitis B surface antigen	vaccine
• monoclonal antibodies	various

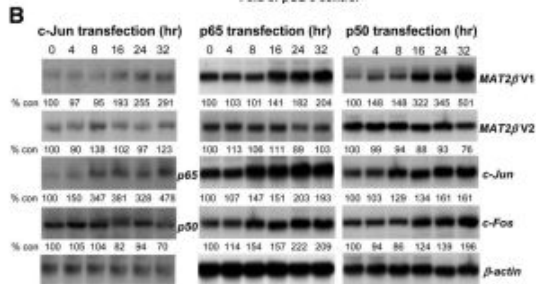
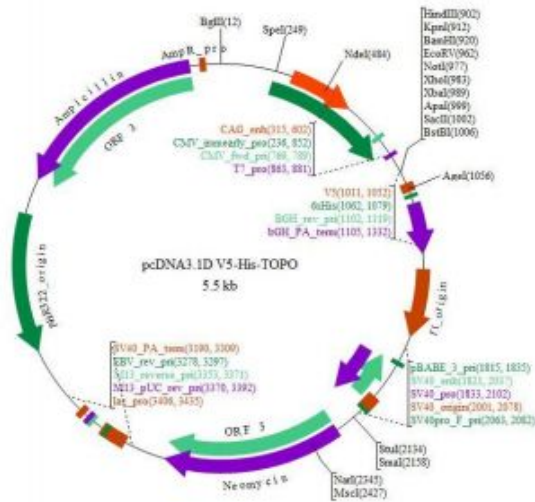
Ikerketa biomedikoan ugaztun zeluletan geneak klonatzen dira adibidez:

- Geneen gainadierazpena ikertzeko
- Erregulazio transkripzionala aztertzeke
- Proteinen elkarrekintzaren azterketa: hibrido bikoitza ugaztun zeluletan
- Gene-etenketa
- Genetikoki eraldaturiko animaliak
- Terapia genikoa

1. Geneen gainadierazpena

Geneen gainadierazpena sustatzeko adierazpen bektoreak erabiltzen dira, normalean promotore konstitutiboa izaten dituztenak. Baina adierazpen bektore induzigarriak ere erabiltzen dira. Intereseko genea polilinkerrean barneratuko da eta gene horren aurrean

jarriko da promotorea. Normalean birusaren promotoreak erabiltzen dira. Hala ere, modula desberdinak sartu daitezke adierazpena sustatzeko.



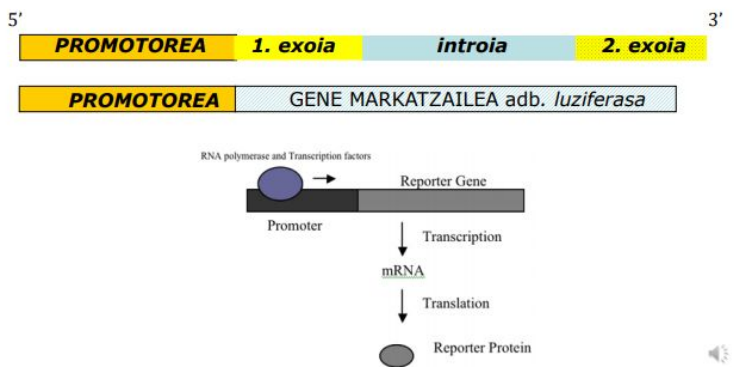
(B) Effect of c-Jun, p65, or p50 overexpression on mRNA levels of MAT2 variants AP-1 and NF-B determined by Northern blot analysis. Numbers below the blots are densitometric measurements as percent of time 0 control after normalization to β -actin.

Yang et al., Gastroenterology. 2008. 134:281-291

Adibide honetan *citomelagovirus* promotorea eta CAG enhancer aurki ditzakegu. Polilinkerraren ur-beheran, fusio proteinak sortzeko aukera ezberdinak daude istidineisatsa edo V5 epitopoa. Zertarako erabiltzen dugu bektorea? Adibidez proteina baten adierazpenak beste gene baten adierazpena sustatzen edo inhibitzen duen jakiteko. Irudian ikertu da nola 3 proteinen gainadierazpenak beste gene baten RNA mezularian eragiten duen. Proteinak hauek dira: c-Jun, p65 eta p50 eta klonatu dira bektore hauen bidez. Sartu direnean, bektorea sartu da lerro zelular batean. Azkenik lortutako emaitzak eztabaidatzen dira. Adibidez p65 c-fos adierazpenean eragina dauka kantitate asko sortu baita.

2. Erregulazio transkripzionalaren azterketa: (“reporter genes”)

Hau egiteko gene erreporteroak erabiltzen dira. Intereseko gene baten eskualde erregulatuileari (promotoreari adibidez) gene markatzaile bat lotzen zaio. Honek intereseko adierazpena kokatzeko eta jarraitzeko balioko digu. Adibidez, hau erabiltzen da gene zehatz baten adierazpenean ze elementu diren gakoak jakiteko. Gehien erabiltzen dena luziferasa da, gene markatzailearen aurrean aztertu nahi den promotorea klonatzen da. Demagun promotorea estres baten aurrean aktibatzen den ikusi nahi dugula. Kasu horretan promotorea eta gene markatzailea dituen konstruktoa zelulan sartzen da eta zelula hori inkubatzen da intereseko toxikoarekin. Toxikoak promotorearen aktibitatea



handitzen badu gene markatzailearen adierazpena handiagoa izango da, luziferasa luziferina degradatzen du honela fotoiak askatuz. Luminometro batekin neurtuko da.

Gene erreporteroen zerrenda:

CAT (kloramfenikol azetiltransferasa)

Kloramfenikolari ¹⁴C edo ³H isotopoekin markatutako azetilo taldeak gehitzen dizkio.

Detekzioa: kromatografia+autoradiografia+kuantifikazioa

GAL (β-galactosidasa)

ONPG substratu kromogenikoa hidrolizatzen du eta ekoizkin horia sortarazten du (ekoizkina kuantifikatzen da)

LUC (luziferasa)

Luziferina oxidatzen du eta fotoiak sortarazten ditu. Fotoiak luminometro batean kuantifikatzen dira

GFP (green fluorescent protein)

Ultramore izpiak induzituta, fluorkoia da. Fluoreszentzia mikroskopioan kuantifikatzen da

Adibidez: Luziferasa

Bektore honetan luziferasa genea barneratu dugu eta honen aurrean intereseko eskualde erregulatzaila gehitu da. Bektore hau transferitzen da zelula batera. Adibidez promotorea antibiotiko baten bidez erregulatzen den ala ez ikusteko erabili daiteke. Promotorea aktibatzen bada zelula antibiotiko hori dagoen medioan sartzean luziferasaren adierazpena emango da eta argia eman. Fotoirik askatzen ez bada antibiotikoak ez du promotorea erregulatzen

3. Proteinen arteko elkarrekintza: hibrido bikoitza ugaztun zeluletan

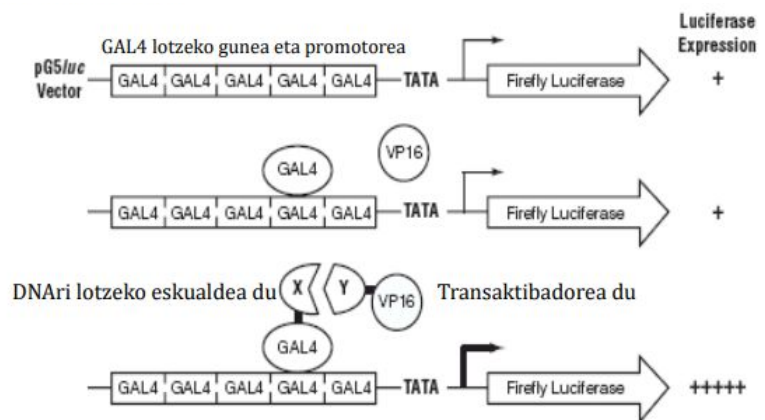
Teknika hau erabiltzen da jakiteko ea proteina desberdinak elkarrekiten duten haien funtzioa betetzeko. Kasu honetan X eta Y dira proteinak. Horretarako bi fusio proteina ekoiztu dira. X-k DNArri lotzeko eskualdea du GAL4 eta Y transaktibadorea dauka VP16. Hauek lortzeko bi bektore erabiliko dira. 3. konstruktoa egin behar da GAL4 lotzeko gunea eta genea bera izango dituen. Bi fusio proteinen X eta Y domeinuen arteko elkarrekintza ematean promotorearen aktibitatea askoz gehiago izango da eta ondorioz luziferasaren aktibitatea (ur-behera dagoena) asko

handituko da. Horrela intereseko bi proteina horiek elkarrekiten duten ala ez jakin daiteke.

Irudiko 2. kasuan

transaktibadorea ez dela lotu eta beraz ia ez dela luziferasaren

seinalik egongo. Aldiz, 3. kasuan X eta Y elkarrekiten dute eta ondorioz seinale nabarmena ikus daiteke.



11.GAIA: GENE ETENKETA (“Gene targeting)

Gene jakin baten galera osoa eta egonkorra lortu edo genearen funtzioa eraldatzea (gene basatia alelo mutatu batekin ordezkatzuz) ikusiko dugu. Orokorra edo ehun-espezifikoa izan ahal da

Errekonbinazio homologoa

Errekonbinazio homologoaren bidez genearen ordezkapena edo eraldaketa lortu daiteke. Demagun gene baten mutazioaren eragina ikertu nahi dugula. Horretarako bektore batean intereseko genea mutazioarekin klonatu dugu gero bektore hori ostalarietan barneratzea lortu dugu. Zelularen barruan gene mutatua errekonbinazioaren bidez ostalariaren genomatik txertatu da gene basatia ordezkatzuz. Honela, ostalariaren genomatik intereseko sekuentzia barneratzea lortu dugu. Horrela, mutazioak zelulari nola eragiten dion aztertu dezakegu.

Errekonbinazioa emateko, intereseko sekuentziaren bi alboetara bi eskuelade egon behar dira zelularen kromosomaren osagarri. Sekuentzia horeik homologia blokeak deitzen zaie eta derrigorrez sekuentzia ezagunak izan behar dira bestela errekonbinazioa ez da posible. Irudian intereseko sekuentzia berde argiz eta homologia blokeak berde ilunez aztertzen dira. Teknologia honetan haxe hartu behar dugu kontuan, bektorea ez da txertatuko ostalari guztien genomatik, hau da efizientzia ez da izango %100. Homologia blokeak zenbat eta luzeagok izan errekonbinazioa orduan eta eraginkorragoa izango da.

Nola jakiten dugu intereseko sekuentzia benetan txertatu dela ostalariaren genomatik?

Horretarako bi hautespene mota egin behar dira: positiboa eta negatiboa. Demagun ostalariaren genomaren 2. eta 3. sekuentziak kendu nahi ditugula. Horretarako, bektorean bi homologia blokeak sartu behar ditugu baina aurreko adibidean ez bezala kasu honetan ez dugu sekuentziarik sartu behar biblokeen artean. Hala ere, beste modulo batzuk sartu behar ditugu bektorean genomatik nagusian txertatu den ala ez jakiteko; hau da, hautespene egiteko. Kasu hauetan egiten dena haxe da:

- Hautespene positiboa egiteko: markatzailea (Neo-r) homologia blokeen artean sartzen da horrela errekonbinazio homologoa gertatuz gero gene hori izango da genomatik

nagusian txertatuko dena. Ondorioz, DNA exogenoa hartu ez duten zelulak hilko dira antibiotikoarekiko erresistenteak ez direlako.

Baina hau ez da nahikoa. Izan ere errekonbinazioa txarto gerta daiteke eta horren ondorioz eskualde homologoaz gain beste sekuentzia tarte bat ere barnera daiteke genoma nagusian. Beraz beste hautespen bat egiten da:

- Hautespen negatiboa: markatzailea (HSV-TK) homologia bloke batetik kanpo sartu. Zelulak genoma nagusian gene hori integratuta badauka hilko da *gancyclovir* antibirala gehituz gero

Azpiko irudian labur dago azalduta jarraitzen diren pausuak hautespena egiteko.

Zer da Gancyclovir? Antibirala da, nukleosidoen analogoa (9-(1,3-Dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine). Birusek ekoizten dituzten HSV-TK entzima birikoak Gancyclovir-a fosforilatzen dute. Behin fosforilatua, analogo aktiboa DNAn sartzen da eta erreplikazioa ekiditen du. Ondorioz, infektatutako zelularen apoptosia gertatzen da.

Eskema honetan berriro errekonbinazio homologoa pairatu duten zelulen hautespenerako esrstrategia azaltzen da:

Ikusi dugun bezala 3 posibilitate daude:

1. Intereseko sekuentzia, bi homologia blokeen artean dagoen sekuentzia errekonbinazioaren bidez ondo txertatzea
2. Txertaketa inespezifikoa gertatzea
3. Txertaketarik ez

Errekonbinazio leku-espezifikoa

Hau posible izateko sistema desberdinak erabili daitezke: Cre/loxP sistema edo FLP/frt sistema.

Sistema hauek genearen etenketa baldintzatua egiteko erabiltzen dira (zelula espezifikoa edo estimulu konkretu baten ondorioz)

Nola funtzionatzen dute? Cre/loxP sistemari dagokionez intereseko sekuentzia barneratzen da loxP guneen artean. Errekonbinasa aktibatzerakoan, entzimak loxP gune horiek ezagutzen

ditu eta dagoen sekuentzia kentzen du. Jarraian muturrak itsasten ditu. Beraz guk erabakitzen dugu noiz kendu sekuentzia hori eta noiz aktibatu entzima.

Adibidez, demagun gene espezifikoko bat kendu nahi dugula. Lehendabizi intereseko genea loxP guneen artean jarri behar da, genea floxeatuta dagoela esaten da. Bigarrenik, Cre errekonbinasa aktibatzen da loxP guneak ezagutzen ditu eta beraien artean dagoena kentzen du. Jarraian muturrak itsasten ditu, beraz genoma gene hori gabe geldituko da.

Beste adibide bat, demagun bigarren exona kendu nahi dugula. Bektore batean loxP guneen artean 2. exona sartuko genuke eta antibiotikoarekiko erresistentziarako genea f_{rt} guneen artean sartuko genuke. Honetarako bektore sintetikoak erabiltzen dira eta loxP edo f_{rt} guneen artean polilinkerra egon behar da. Horrela bigarren exona floxeatuta dagoela esaten da. Errekonbinazioaren bidez bi homologia blokeen artean dagoen eskualdea txertatzen da genoma nagusian. Puntu horretan hautespen positiboa eta negatiboa egin behar dira. Behin eginda neomizinarekiko erresistentzia ez zaigu interesatzen eta kentzen da. Nola? Flipasa aktibatzen da eta honela gene hori kentzea posible da. Jarraian errekonbinasa aktibatzen da bigarren exona kentzeko. Genoma nagusia 2. exon gabe geldituko da.

Metodo hau oso ona da gene baten delezioa lortzeko egoera espezifiko batean. Nola egiten den prozesu osoa ikusiko dugu:

- A. Cre errekonbinasaren adierazpena ehun-espezifikoa: Promotore ehun espezifikoa Cre genearen ur-gora jartzen da. Ondorioz, promotore hori soilik aktibatuko da ehun espezifiko batean. Jarraian bektori hori barnera daiteke sagu transgeniko batean. Cre bakarrik adieraziko da ehun espezifiko konkretu batean. Ondorioz, gene eraldaketa edo etenaketa soilik gertatuko da ehun horretan. Badaude merkatuan sagu transgenikoak Cre errekonbinasa soilik ehun espezifikoetan adierazten dutenak. Adibidez:

Demagun X genea kendu nahi dugula *in-vivo* bere funtzioa ikertzeko. Alde batetik sagu transgeniko bat sortzen dugu zeinek Cre errekonbinasa genea albumina promotorearen menpe dauka. Albumina promotorea ehun espezifikoa da eta soilik gubelean aktibatuko da. Beste aldetik, beste sagu andui batean X genea floxatzen dugu 2 loxP guneen artean geratuz. Baina homozigotoa lortu behar da. Gurutzemendua egiten badugu bi andui hauekin sagu heterozigotoa lortuko dugu, gibelean X genearren kopia bat baino ez da adieraziko

(homozigotoa nola lortzen den urrengo gaien ikusiko dugu).

B. Cre errekonbinasaren adierazpena TET-on sistema erabiliz: Metodo honetan lehenengo sisteman rtTA genea promotore espezifiko baten menpe daukagu. Bigarren sisteman Cre genea tetO operadorearen menpe jartzen dugu eta intereseko genea loxP guneen artean barneratzen dugu. Doxoziklina gehituzkoan ehun espezifiko batean rtTA bere konformazioa aldatuko da operadoreari lotuko zaio eta Cre genearen adierazpena emango da. Cre entzimak loxP guneak ezagutu moztu eta tartean dagoena kenduko da.

C. Cre errekonbinasaren nukleorako garraio erregulatua: Cre-ER fusio proteina. Kasu honetarako, glukokortikoideak (estrogenoak) erabili daitezke. Egoera normalean, estrogenoak zelularen mintza arazo gabe zeharkatzen dute, zitoplasman hartzailea dago eta lotzean HSP90tik askatzen da. Estrogenoa hartzailearekin batera nukleora joateko gai da gene itua aktibatzen. Nola erabiltzen dugu sistema hua? Fusio proteina sortzen dugu Cre geneari esteroide hartzailea lotzen zaio eta fusio proteinaren ur-gora promotorea jartzen dugu. Zitosolean fusio proteina adieraziko da, estrogenoak gehitzen baditugu, fusio proteina estrogenorekin batera nukleora joango da han adieraziz eta honela floxeatutako genearen etenketan lortuko da.

Mekanismo honetan Cre genea soilik ehun espezifiko batean adieraztea interesatzen bazaigu, fusio proteina promotore ehun espezifikoaren menpe jarri beharko genuke.

RNAREN interferentzia (iRNA): zentzu kontrako oligonukleotidoak, siRNAk eta mikroRNAk

Gene isiltzea (“Gene knockdown”): genea ez da kentzen baizik eta bere adierazpena murrizten da RNA mailan interferentziazko RNAk erabiliz. Hauek, harizpi bikoitzeko edo bakarreko RNAk izan daitezke eta gene espezifiko baten adierazpena ekiditea lortzen dute. Zentzu kontrako RNA RNAmezulari osagarriari lotuko zaio genearen itzulpena saiestuz. Interferentziazko RNA txikiak harizpi bikoitzekoak dira. Harizpi horietako bat RNA mezulari osagarriari lotuko zaio eta RNA mezulari hori degradatuko du.

Zentzu kontrako oligonukleotidoak (“Antisense oligoak”) harizpi bakarreko RNAk dira. mRNA iturekiko osagarria den sekuentzia da. Mekanismoa: zentzu kontrako oligonukleotidoak mRNA ituari lotzen zaio kate bikoitza eratuz eta itzulpenaren hasiera edo edapenaren blokeoa eragiten du/ mRNAren heltze prozesaren blokeoa eragiten du, kasu honetan itua exon-intron muga da/ mRNAren desegonkortasuna sustatzen du, egonkortasuna alda dezake edo mRNAren erdibizitza (kasu honetan itua mRNAren 3' UTR-a da)

Beraz helburua gene ituairen adierazpen blokeatzea edo murriztea da. Bi aukera daude. Lehenengoa, *antisense oligoa* mRNA ituari era perfektuan lotzen zaio eta ondorioz gene ituairen sintesia inhibituta gelditzen da. Bigarrena, antisense oligoa ez da lotzen era perfektuan mRNA ituarekin eta ondorioz sintesia ez da geldituko blokeatuta murriztuta baino. Ixilarazpena espezifikoa dela baieztatzeko metodologia desberdinak erabili daitezke.

Beste aldetik, interferentziazko RNA txikiak daude, taktika hau birusen adierazpena ixiltzeko erabiltzen da naturan. Guk informazio hori erabiltzen dugu gure sekuentzia itua ixilarazteko. RNA bikoitzduna zelula batean sartzen denean makinaria aktibatzen da. Lehenik eta behin, Dicer endonukleasak harizpi bikoitzeko RNA liseritzen du molekula txikiagoak sortuz, siRNAk. Jarraian, RISC konplexuak, hau da RNAk eragindako ixiltze konplexua, bi kateak banatzen ditu. Harizpi gidaria degradatzen du eta harizpi atzeratuarekin geratzen da. Horrela, RISC konplexua aktibatuta dago eta mRNA ituarekin lotuko da eta liserituko du gene horren adierazpena oztopatuz. Berez tsRNA molekulek siRNAk, hau da interferentziazko RNA txikiak, sintesirako makinaria pizten dute eta siRNA hauek mRNA ituak liseritzen dituzte RNAsen bitartez. Praktika, hau da laborategian, lerro zelular batean zuzenean siRNA molekulak sartuko genituzke eta hauek RISC konplexuarekin elkarrengingoko lukete. Hau da, ez genuke Dicer entzimaren biezko mRNA molekula handien mozketa egingo.

Zeluletan badaude beste RNA molekula txikiak geneen adierazpena erregulatzen dutenak mikro RNA deritzenak miRNA. Desberdintasun nagusiena beraien artean da siRNAk

exogenoak direla miRNA ordeak endogenoak. Baina biek RNAREN interferentzia zuzen dezakete.

Bien prozesamendua zelularen barnean Dicer endonukleasa egiten du eta biak RISC konplexuan sartzen dira. Animalietan siRNA RNARI guztiz lotzen zaio eta miRNA mRNA sekuentzia desberdinei lotzen zaie itzulpena ekiditeko.

Nola erabiltzen dira siRNA ing genetikoan? Metodo errezena lehenengo izango litzateke. Lendabizi RNA bikoitzduna *in vitro* sintetizatzen da eta horrela sartzen dugu zelulan. Metodo hau ez-egonkorra izango litzateke. Praktikan, gure intereseko mRNArekiko osagarria den siRNA erosiko genuke eta zelulan zuzenean barnerrituko genuke. Normalean transfekzioa liposomen bidez egiten da baina mota desberdinak ere erabili daitezke. Ez da derrigorrezkoa zelulako nukleoan sartzea RNA txikiagoek zitoplasman geratu daitezkelako. Bigarren eta hirugarren metodoak egonkorrak izango dira, hau da, ixilarazpena egonkorra izango da. Bi metodotan adierazpen bektore bat sartuko genuke gure intereseko RNA txikia adieraziko duena modu egonkor batean.

Bigarren metodoan, bektorean promotorearen ondoren genea bi norantzatan jartzen da eta erdian sekuentzia txiki bat uzten da. Horrela transkripzioa gertatu eta gero sortutako RNA bere buruarekin hibridatuko shRNA egitura sortuz. Egitura horretan begizta bat egongo da.

Hirugarren metodoan genea norantza bakarrean txertatzen da baina bi promotore kontrako norabidetan egongo dira. Beraz, adierazpena bi norantzatan bultzatuko da bi molekulak sortuz eta hauek osagarriak direnez elkartuko dira. Kasu bietan adierazpen bektore egokia behar dugu.

Jarraian bektore batzuk ikusiko ditugu ea nola funtzionatzen duten ikusteko. Adibide honetan, shRNA bektorea ikusiko dugu. Lehenengo pausua shRNA sortzea izango litzateke. Adibide honetan gorritz markatuta dagoena izango da gure interferentziatzeko RNA. Sekuentzia bi norantzatan jarrita dagoenez eta erdian sekuentzia txiki bat dagoenez, adierazten denean shRNA sortuko dugu. Baina pENTRU6 bektorean sartzeko sekuentzia irudian agertzen den bezala sartu beharko genuke. Begiratu muturretan linkerrak gehitu ditugula mutur itsasakorrak

sortzeko eta konformazio horrekin bektorean sartuko genuke errestrikzio etnzima gunean. U6 promotorearen menpe geratuko da eta transkripzioa bukatzeko seinalea pol3 izango da. Taulan plasmidoaren modulu guztiak agertzen dira.

- Bektore plasmidikoak: sinpleenak dira. Mota honetako bektoreetan beti polilinker bat egongo da non intereseko siRNA sartuko genukeen, gero promotera ere badauka siRNAren adierazpena bultzatzeko. Kasu hauetan agertzen diren promotoreak konstitutiboak dira. Horrez gain, antibiotikoarekiko erresistentziarako genea eta erreplikatzeko hasiera-gunea baditu

- Bektore adenobiralak: adierazpen ezegonkorra lortuka da, baina oso altua. Gure intereseko interferentziarazko RNA epe labur batez ekoizteko erabiltzen da. Efektua denborarekin galtzen doa. Bektore hauekin zatitzen ari diren zelulak eta baita zatitzen ez diren zelulak ere transfektatu daitezke. Promotorea konstitutiboa edo induzigarria

izan daitezke. Irudian agertzen den bektorea CMV promotorea agertzen da. Praktikan zelula mota ezberdinetan emaitza errepikakorrak lortu daitezke.

- Bektore lentibiralak: siRNA txertatuko da modu egonkorrean ostalariaren genomak. Bertan mantenduko da eta adieraziko da. Bektore hauekin zatitzen zein ez zatitzen diren zelulak transfekta daitezke. Promotoreak bai induzigarriak edo konstitutiboak izan daitezke. Irudian agertzen den bektorea H1 promotorea da, konstitutiboa. Kasu honetan emaitzak ere errepikakorrak izango dira

Azkenik, nola lortu siRNAren adierazpena Cre/loxP sistema erabiliz? Bektore lentibiralean loxP guneen artean bukatzaile sekuentzia eta stop kodoia jarriko genituzke. Horrela transkripzioa ezin da eman, baina CRE errekonbinasa aktibatzen badugu sekuentzia horiek kentzen dira eta shRNA adieraziko da.

CRISPR/Cas9 edizio genomikoa

Duela 7 urte sortu zen, dagoeneko mundu osoko laborategietan erabiltzen da. Izan ere, teknologia hau ia edozein laborategiari aukera ematen dio genoma editatzeko bisturi molekular bat bezala. Hau da, sistema hau sekuentzia bat ezagutzeko, mozteko, aldatzeko eta berriro itsasteko kapaza da, gainera teknika honek aplikazio ugari ditu.

2015ean zientzia eta teknologiako Asturiasko printzesa saria lortu zuten bi zientzialariek teknika berritzaile hori garatzeagatik. Nolalortu zen? Ikertzaile batek Santa Polako arkeak ikertzen sekuentzia hori deskribatu zituen lehen aldiz eta oso garrantzitsuak zirela arkeentzat ohartu zen, zeren eta kentzerakoan hiltzen zire. CRISPR izena jarri zien. Gero beste prokarioto batzuk ere sekuentzia horiek izan zituztela ohartu zen. CRISPR sekuentziak, sekuentzia errepikakorrak dira eta prokariotoen genomak agertzen dira. Sekuentzia horiek bakterioak infektatu dituzten birusen sekuentziak ere dituzte tartekatua eta sekuentzia horiei esker bakterioek beste antzeko birusak ezagutu ditzakete eta birusaren DNA apurtu. Horrela sekuentzia horiek inmunitatea ematen diete bakterioei. Teknikoki sekuentzia hori DNA zati errepikakorrak eta txikiak dira. Errepikapen bakoitzaren jarraian birusen sekuentzia dago, hori deitzen zaio DNA espaziadorea. Normalean Cas geneekin asoziatuta daude gene horiek nukleasak kodetzen dituzte. Beraz CRISPR/Cas9 prokariotoen inmunitate sistema da birusen infekzioen aurkako erresistentzia lortuz.

Nola funtzionatzen du? Prokariotoek 3 pausutan lortzen dute inmunitatea birusekiko eta beraien infekzioekiko jasangarriak bihurtzeko. Lehenik eta behin, birusak zelula bat infektatzen duenean bere genoma txertatzen du zelula infektatuan. CRISPR sistemak birusaren genomaren zati bat ostalariaren genomatan txertatzea eragiten du, errekonbinazio homologo edo errekonbinazio inespezifikoaren bitartez. Ondorioz, lehenengo infekzioan prokariotoek inmunitatea lortzen dute eta birus berdinen bigarren infekzioarekiko babesa lortzen dute. Irudian nolaka den prokariotoaren genoma ikus daiteke. Lehendabizi *cas* genea agertzen dira eta jarraian CRISPR sekuentziak. CRISPR sekuentzien artean birus baten sekuentzia txiki bat agertzen da. Bigarren infekzioan CRISPR sistemako konstruktoa adierazten da eta pre-crRNA sortzen da. CRISPR sekuentziak errepikakorrak direnez osagarritasunez haien buruarekin hibridatuko dute loop moduko egitura sekundarioak garatuz. mRNA molekula hauek Cas9 proteinarekin elkartzen dira eta Cas-prRNA sistemak birusaren PAM sekuentzia bilatzen du. Zer da PAM sekuentzia? Birusek DNAREN bukaeran duten sekuentzia txiki bat da 3 edo 5 bp. PAM sekuentzia seinale gorri bat bezala da zeinek Cas entzimari esaten dion non moztu sekuentzia. Gainera, Cas-crRNA birusaren bigarren infekzioan sartzen den RNAREKIN osagarria izango denez hibridatuko da berarekin. Cas9 proteinak sortutako egituren mozketak egingo ditu, RNAN DAUDE GENEAK INAKTIBATUZ ETA INMUNITATEA LORTUZ.

Nola erabiltzen da laborategian? Cas proteinak gai dira mozketak egiteko edozein lekutan RNA gidari bat erabiliz. RNA gidari hori Cas9 nukleasari lotzen zaio eta konplexuak DNAn zehar garraiatzen du PAM sekuentzia eta sekuentzia osagarria aurkitu arte. Teorian PAM sekuentzia batekin amaitzen den 20bp dituen edozein sekuentzia genoma editatzeko erabili daiteke. 20bp dituen sekuentzia horrek Cas9 entzima gidatuko non moztu duen jakiteko. Cas9 nukleasa aktibatzen da eta DNAn bi harizpiak moztu ditu. Orduan, zelulak bere erreparatzeko sistema erabiltzen du DNA erreparatzeko. Gehienetan, NHJ sistema aktibatzen da holako mutazioak zuzentzeko, hau da, homologao ez den erreparazio sistema. Sistema honek 2 muturrak itsatsi egiten ditu mikrodelekzioak edo mikrointserzioak sortuz eta ondorioz genea inaktibatuta gelditzen da.

Hala ere, zelulan CRISPR/Cas9 sistema sartzeaz gain genomak dagoenagatik aldatu nahi dugun sekuentzia barneratzen badugu HDR sistema aktibatu daiteke, hau da, homologoa den erreparazio sistema. Genoman dagoen sekuentzia aldatu egingo du guk sartu dugun sekuentziaren truke. Arazorrik handiena, ez esperotako ondorioak, hau da, gure gidak amaieran PAM bera duen genomaren edozein sekuentzia moztu dezake eta genearen exonan badago bere inaktibazioa gerta daiteke. Honexegatik, orain entzima efizienteagoak bilatzen ari dira sistema hobetzeko.

Adibide honetan, bi bektore beharko ditugu eta kontraestrakzioa egingo da. Lehenengo bektorea, pCas Guide Vector bektore honetan RNA gidaria lortuko da. Bektoreak Cas9 proteina kodetzen duen genea dauka, mRNA Scaffold (=Helper) garraiatzaiela eta eten nahi dugun genearekiko osagarria den eskualdea.

Bigarren bektorea pUC plasmidoa da. Bektorean 2 homologia blokeen artean (LHA eta RHA) puromizinarekiko erresistentzia emango duen gene floxeatua, PGK promotorea eta GFP lospeguneak. 2 homologia blokeak errekonbinazio homologo bidezko konponketa egiteko beharrezkoak dira. Bestetik, hautespenerako GFP fluoreszentsia eta puromizinarekiko erresistentzia emango duen genea floxeatuta, behin hautespena eginda erresistentzia kentzeko. Beraz, Cas entzima guk nahi dugun lekura joango da RNA gidariaren laguntzaz eta han moztuko du sekuentzia. Han pUC plasmidoan sartzen ditugun sekuentziak barneratuko genituzke errekonbinazioaren bidez. Pre errekonbinasa aktibatzerakoan erresistentzia kenduko da eta GFP seinalea ikusiko dugu. LoxP guneen artean gu nahi dugun sekuentzia barneratu ahal dugu.

12.GAIA: GENETIKOKI ERALDATURIKO ANIMALIAK

Transgenikoak, KO (knock-out), KI (knock in)

Zelulen eraldakuntza genetikoaren beste aplikazio bat, genetikoki eraldatutako animaliak sortzea da. Transgenikoak, KO (knock-out), KI (knock in) saguak lor daitezke medikuntzan aplikagarriak direnak.

Eraldaketa genetikoak saguetan enbrioietan ematen dira. Ausaz, gene bat sartzen bada sagu horri transgeniko (orokorrean) estaen zaio. Knock-out xagua, ingeniaritza genetikoaren bitartez eraldatutako xagu bat da, zeina gene bat edo gehiago gene blokeo teknikaren bitartez inaktibatzea lortzen da. Knock in saguetan gene bat mutatuaren ordeztzatzen da, ez da gene bat inaktibatzen baizik eta beste baten ordeztzatzen da. Azken bi kasuetan aldaketa espezifikoa da.

Sagu transgenikoen ekoizpena

1. DNAr eralduta dagoen obozitoaren pronukleo maskulinoan txertatzen da zuzenean mikroinjekzioaren bidez. Normalean, ez da obozito bakarria erabiltzen. Izan ere, DNA errekonbinantea batzuetan barneratzen ez denez, efizientzia ez da ona eta obozitoa asko erabiltzen dira. Kopia asko sartzen dira eta ausaz barneratzen dira genomatik.
2. Eraldatutako obozitoa sagu enbrioia bihurtzen da
3. Eraldatutako enbrioia sagu pseudo-haurdun baten umetokian txertatzen da. Sagu bakoitzean 25 obozito inguru txertatzen dira. Hala ere, 1/4 haziko dira eta guztiek ez dute genea barneratuko.
 - Sagu pseudo-haurdun-a: xagua haurdunaldia emateko prest dago (inseminatua, enbrioia umetokian txertatua) baina ar antzu batekin estaltzen da enbrioia umetokian emateko mekanismo fisiologikoak garatu ditzan.
4. Kumaldi heterogeneoa da, sagu batzuk transgenikoak izango dira eta beste batzuk basatiak. Transgenikoa den ala ez jakiteko PCR bat egiten da, transgenikoa bada heterozigotoa izango da gene horrekiko. Honenbestez, homozigotoa lortzeko bi heterozigoto gurutzatu beharko dira. 1/4 aukera izango ditugu homozigoto errekonbinante bat lortzeko.

Knock out eta knock in saguen ekoizpena

1. DNA txertaketa genoma nagusian espezifikoa da, bektore batean intereseko sekuentzia sartzen da eta errekonbinazio homologo bidez ama zeluletan txertatzen da.

* Bektorean bi homologia bloke egon behar dira, hauen artean intereseko genea sartuko dugu eta etenketara egin nahi bada ez dugu ezer sartuko. Markatzaile positibo eta negatibak ere gehitu behar dira.

1. Ama zelula errekonbinatuak, zelula ez errekonbinatuetaik bereizi behar dira, hautespen teknikak (orain arte ikusitakoak) erabiliz.
2. Ama zelulak bektorearekin (hautatuak) sagu enbrioi batean injektatu.
3. Enbrioia garatzen uzti eta sagu pseudo-haurdun baten umetokian txertatu.
4. Sagu kimera bat jaioko da. Bi genoma ezberdin izango dituzte (ama zelulen genoma + blastozistoko genoma). Homozigoto errekonbinantea lortzeko sagu kimera eta sagu basati bat gurutzatzen dira, hortik heterozigotoak lortzen ditugu. Heterozigoto hauek gurutzatu eta 1/4 aukera izango dugu homozigoto errekonbinanteak lortzeko. PCR bidez testatzen da heterozigotoa edo homozigotoa den.

Sagu transgenikoa zertarako erabiltzen dira? Gene baten gainadierazpena in-vivo aztertzeko. Gainadierazpenak beste geneetan izan dezakeen eragina neurtzen da. Knock out eta knock in saguen bidez, aldiz, gene baten funtzioa detektatu daiteke.

Gene baten funtzioa ikertzea in-vivo

Hautespen bikoitza

2. exona kendu dugu, genea inaktibatu eta saguan izan dezakeen eragina ikusteko. Bektore bat aukeratu dugu, zeinak bi Hom blokeen artean Neo (R) genea dagoen. Sagu marroiaren ama zelulak transfektatu dira eta errekonbinazio homologoa gertatuz gero genoma nagusian Neo(R) integratuta geratuko da, eta bigarren exona kenduta. Zelula hauek neomizina medioan ereiten badira, zelula errekonbinanteek bakarrik biziraungo dute. Errekonbinazioa oker gertatzen bada (nahi ez genuen insertzio bat) Hsv-tK genea integratuta geratu da genoman, baina Ganciclovir antibiotikoa gehituz insertzio hau duten zelulak hilko dira, soilik zuzen errekonbinatuek biziraungo dute.

Zelula errekonbinatuen txertatzea saguan

Enbrioia sagu beltzetik dator, bere balstozistoak izango ditu hurrengo sagubelaunaldiak. Zelulak aldiz, sagu marroitik datoz, gogoratu eraldaketa kromosoma bakarrean eman dela! bestea kromosoma basatia izango da ($M/m \rightarrow m =$ kromosoma errekonbinatua). Enbrioia kimera izango da bi genoma izango dituelako. Ondoren sagu subrogatu batean txertatzen da, jaiotako saguak kimerak izango dira (bi genoma izango dituzte).

Sagu errekonbinatu homozigotoa lortzea

Sagu kimera heldu bat eta sagu beltz bat gurutzatzen dira, hortik heterozigotoak hautatuko dira ($1/2$). Ondoren bi heterozigoto gurutzatuko dira eta homozigotoa lortuko da ($1/4$). Saguen genotipoa ikertzeko PCR-a erabiliko da. Lortutako sagu homozigotoak ez du aztergai dugun genea izango.

Irudian, ar kimeriko baten lerro germinala ikusten dugu.

KO baldintzatuak \rightarrow Cre-errekonbinasaren bidez sortzen dira. Cre entzima albuminaren promotorearen kontrolpean sartzen dugu, eta cre giblean bakarrik

adieraztea lortzen dugu (gibel espezifikoa den cre transgenea). Gurutzamendu hauen bitartez gure intereseko genea floxeatzen dugu, heterozigotoa lortuz KO-rako, eta ehunean bere adierazpena kontrolatzea lortzen dugu. Genearen etenketak letala den kasuetan, TET-on sistema erabili daiteke.

Lortzen dugun sagua intereseko genearekiko Knockout baldintzatua da

Animalien klonazioa - Transferentzia nuklearra

Orain arte animalien enbrioietan genomak nola eraldatu ikasi dugu, ama zelulak erabiliz. Ingenieritza genetikoan oso garrantzitsua izan zen ordea, Dolly ardiaren klonazioa. Ordurarte klonazioa espezializatutako zeluletan soilik eman zitekeela uste zuten (ama-zeluletan). Dolly ordea zelula desberdintzatuetatik lortu zen.

Nola sortu zen Dolly?

Transferentzia nuklearra egin zen, nukelarik gabeko eta ernaldutako obozito batean ugatz zelula diferentziatu bat sartu zen. Sortutako enbrioaren morula ardi subrogatu (pseudo-haurdun) batean sartu zen eta ernaldutako Dolly jaio zen. Obozitoen transferentziarako zelulak Go fasean egon behar zuten, fasea indusitzen zen zelulen hazkuntza inhibituz. Noren ezaugarriak zituen? Ugatz zelula erauzi zioten amarenak.

Dolly lortzeko 227 nukleo gabeko obozito erabili ziren, horietatik 29 fusionatu ziren ugatz zelula helduekin eta bakarrak izan zuen deszendentzia. Dollyz geroztik hainbat animalia eta maskota klonatu dira zelula ezberdintzatuetatik. Maskotak klonatzeaz gain beste aplikazio batzuk:

- Ardiaren ugatzak bioerreaktore gisa erabili daitezke intereseko proteinak kantitate handitan ekoizteko. Intereseko genea bektore batean sartu beharko genuke promotore baten menpe, gero DNAr sartuko litzateke ardiaren obozitoan, hau ama subrogatuan txertatu eta jaiotakoetatik soilik transgenikoak aukeratzen dira. Intereseko proteina ardiaren esnetik erauzten da.
- Esnearen kaseina igotzeko
- Laktasa adierazteko eta laktosa metabolizatu ahal izateko.
- Txerri transgenikoak P kontzentrazioak murrizteko erabili daitezke. P toxikoa da ingurunean.

Animalia transgenikoen ugatzetan adierazten diren proteinak (antigorputzak, farmakoak...) → Eritropoietina (EPO), fibrinogenoa, hazkuntza hormonak, intsulina, antigorputz monoklonalak, Ehun plasminogenoaren aktibatzailea (TPA), antitrombina III (animali transgeniko batek ekoizturiko lehenengo sendagaia izan zen, eta FDA-k 2009-an onartu zuen).

Enviropigs

Txerri transgeniko hauek fitasa adierazten duten listu guruinetan, gizakiok eta animaliek fitasa maila oso baxuak ditugu nutrienteen fitatoak (osagai fosforikoen metaketa) metabolizatzeko, baina hegazti eta txerrien bazkak P ez organiko aberastuak izaten dira beraien P eskakizuna asetzeko. P kantitate hau abereek eta txerri basatiek ezin dute liseritu, eta ingurunera iraitzen dute. Ingurunera P asko kanporatzen dute (kutsakorra). Hau ekiditeko enviropigs-ak sortu zituzten, fitasa genea barneratu zuten txerrien genomak, parotidako proteina jariatzailearen promotorearen menpe.

Arrain transgenikoak

Batez ere interes komertziala duten arrainetan. Geneak ernaldutako arrautzetara transferitzen dira zuzenean (mikroinjekzio edo elektroporazio bidez). Erabilerak:

- Hazkuntza azkarra izaten dute, hazkuntza faktorearen genea geitzen zaiolako.
- Gaixotasunekiko erresistentzia lortzeko.
- Bio-sensore bezela jarduten duten arrainak diseinatu dira, ur kutsadura detektatzeko.
- Maskota berriak → glofish

“AquaAdvantage” izokine transgenikoak sortzen dira izokinen hazkuntza estimulatzeko (FDA-k onartua 2015ean). OP5a hazkuntza faktorearen cDNA AFP (ocean pout antifreze protein gene promoter) promotorearen menpe. Izokin hau basatia baino askozaz ere azkarrago hazten da.

Biosentsore gisa erabili daiteke inguruneko kutsadura detektatzeko (adb: estrogenoak detektatzeko). GFP genea promotore induzigarri baten menpe jartzen da (bitelogeninaren promotorea), medioan estrogenoak badaude arrainak kolore fluoreszentea izango du.

13.GAIA: Terapia genikoa

Terapia genikoa 90.hamarkadan sortu zen ingeniartz genetikoaren eskutik.

1.-Helburua

- Delezioa daukaten pazienteengan genea osorik barneratu
- Geneak zuzendu mutazioak kenduz
- Gene baten adierazpena sustatu

2.-Terapia motak

Bi terapia mota daude:

- Terapia geniko germinala: geneak gametoetan barneratu.
- Terapia geniko somatikoa: geneak zelula somatikoetan barneratu.

a) Terapia geniko germinala

Terapia germinalaren bidez hurrengo belaunaldietara ez lirateke gene akatsdunik igaroko, hipotetikoki. Etika eta ziurtasun aldetik ordea, teknika hau debekatuta dago gizakiengan. Soilik animalia transgenikoak ekoizteko erabiltzen da.

b) Terapia geniko somatikoa

-*Ex vivo*: Lehenengo amterial genetikoa *ex vivo* kultibatutako zeluletan transferitzen da, hau da, transformazio edo aldaketa ez da pazientearengan egiten. Eraldatako zelulak hautatzen dira eta kultibatu daitezke. Azkenik pazientean sartzen dira. Desabantailetakoa bat da zelula

guztiak ezin direla *ex vivo* kultibatu, normalean zelula hematopoietikoen . Manipulazio gehiago dakar baina baita kontrol gehiago. Transfekzioa liposomekin egin daiteke.

-*In vivo*: Eraldaketa genetikoa zuzenean ehun batean egingo da, normalean baktoreak gizakiarentzat patogenoak ez diren birusak erabiltzen dira. Baktoreek (liposomak, birusak, biolisitika) zelula espezifikoak infektatutako dituzte, baina hau arazo izan daiteke, ezin delako kontrolatu zehazki non sartuko duen genea, zorizkoa da. *In vitro* kultibatu ezinak diren ehunetan aplikatzen da.

3.-Baktoreak

Funtsean baktore erabiliena adenobirus eta erretrobirusak dira. Hala ere, plamsidoak eta lentibirusak ere erabili daitezke.

4.-Lehenengo saiakerak

Lehenengo saiakera immunodefizientzia kongenitua zuten umeetan egin zen eta “ume burbuila” bezala ezagutzen ziren. Gaixotasun errezesibo oso arraroa da eta paizenteek sistema immunea gaizki daukate Adenosin DeAminasa (ADA) genea mutaturik dutelako. Mutazio honen ondorioz toxikoak metatzen dira zeluletan eta horregatik ume hauek leku esterilizatuetan bizi behar dute.

Kasu honetan, umearen T linfozito periferikoak isoltu ziren. Beste aldetik cDNA ADA genea duen bekotrea bakterioetan barneratu zen eta transferentzia eretrovirusarekin egin zuten (deskargatuak, gene litikorik ez). Eretrovirus hauek T linfozito zelulak infektatu zituzten eta ADA genea bertan txertatu. Azkenik T-linfozito hauek pazientea barneratzen dira.

Arazoa da linfozitoak ez direla ama zelulak, hau da, iada desberdintzatuta daude, hortaz, hilabetero transferentzia egin behar da. Arrakasta izan zuten lehen kasuek.

Hala ere, beste kasu batzuetan ez da arrakasta lortu. Immunodefizientzia seberaren kasuan, pazientearen hezur muineko zleulak isolatu ziren eta eretrovirusaren bidez gene basatia txertatu. Ume batzuetan eretrovirusaren sarrerak leuzemia ekarri zuen eta horrek dudak sortu zituen.

HSC: Hiperplasia suprarenal kongenitua. *Ex vivo* terapia

Gaixotasun honetan 21-alfa-hidroksilasa genea mutatuta dago eta beraz ez dituzten hormonarik sortzen. Terapikoa honetan, lehenengo eta behin pazientearen hezur muineko zelulak isolatzen dira eta *ex vivo* kultibatzen dira. Jarraian, eretrovirus baten bidez, transdukzioa egingo da eta zelulak berriro pazientean sartu. Terapiaren eraginez T-linfozitoak, B-linfozitoak eta NK zelulak sortzen dira.

Terapia genikoak *in vivo* (1993)

Fibrosi kistikoa sendatzeko erabili zuten. Honetan zelula ituak birikietako epitelioko zelulak zire eta bertan CFTR genea mutatuta daukatu, arnas sisteman arazoak eraginez. Arnas sistemarekin erlazionatuta dagoenez adenobirusa eraibiltzen da bektore moduan, bere zelula ituak biriketako zelulak direlako. Adenobirusek CFTR gene basatia eramango dute eta nukleoa sartuko duten ez-egonkorki.

5.-FDAk onarturiko tratamenduak

·Glybera: Mendebaldeko munduan onartutako lehenengo terapia izan zen, sendagai injektagarria zen eta paziente bakoitzeko 1,1 milioi € balio zuen. 2017 merkataratzeari utzi zitzaion.

·Zalmoxis: 2016an onartu zen eta transplante hematopoietikoa behar duten pazienteengan erabiltzen da, sistema immunitaterioa sortzeko.

·Zolgesma: Bizkarrezurreko atropi muskularra tratatzeko erabiltzen da. Novartisek aterako du eta 1,9 milioi € balio du.

Zalmoxis

Ama zelulen transplante hematopoietikoa pairatzen duten pazienteengan erabiltzen da immunitate sistema berriro sortzeko

Alde batetik, paziente hauek emailearen zelula ama hematopoietikoak jasotzen ditu, horretarako haploidentiko edo bateragarriak dira. Beste aldetik, emailearen T-zelulak, immunitate zelula mota bat, isolatu egiten dira eta *ex vivo* HDV-TK genea barneratzen zaie. 21 egun pasata, eraldatutako T-zelulak pazientean barneratzen dira eta hala infekzioekiko eta birgaixotzearekiko babesa lortzen du. Hala ere, gerta daiteke errefusa pairatzea, erantzun immune toxikoa adierazi.

Une honetan pazienteari ganziklovir ematen zaio eta T zelulak apoptosira bideratuko dira.

CAR-T terapia

Leuzemiaren aurkako borrokan teknika honek iraultza suposatu zuen. Pazientearen T zelulak hartzen dira aferesi teknikaren bidez eta odola itzultzen zaio. T-linfozitoak eradatu egiten

dira→ CAR genea gehitze zaie eta honen adierazpena antigenoen hartzaile kimerikoak sortzen ditu (CAR). Hauen bidez, T-linfozitoa gai da minbizi zelulekin lotu eta suntsitzeko. Laborategian CAR duten milioika T zelula erreproduzitzen dira eta pazienteari infusio bidez pasa. CAR duten T-zelulak minbizi zelulen antigenoei lotzen zaizkie eta suntsitu.

Honen sesio periodikoak egiten zaizkie pazienteei eta terapiak 300.000€ balio du. Efektu sekundario batzuk daude: Zitokina gehiegi ekoizten da eta horren ondorioz, sukar altuak eta presio arterial baxuak sortzen dira.

6.-Etika ingeniari-tza genetikoan

Orain dela 2 urte, Lulu eta Nana neska bikiak, munduko lehenengo genetikoki editatutako umeak. Genoma editatu zuten Giza Immunoeskasiaren Birusari erresistente egiteko. Hau prebentzio neurria izan zen inolak ohelburu terapeutikorik gabe.

Teknikak ordea *off-target* ondorio asko izan ditzake eta mozaismoarekin ez dakigu zer gerta daitekeen. Ez dago argi biki horiei zer gertatuko zaie etorkizunean, agian garapenean garrantzitsua den generen bat isildu delako.

7.-Etorkizuna

Seguraski CRISPR-Cas teknika hobetzen saiatuko da eta terapia genikoan erabiltzen. Posible da, Immunoterapiekin bat egitea metodo efektiboagoak lortzeko.