Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca

UNIÓ EUROPEA
Fons Social Europeu

Memòria justificativa de recerca de les beques predoctorals per a la formació de personal investigador (FI)

La memòria justificativa consta de les dues parts que venen a continuació:
1.- Dades bàsiques i resums
2.- Memòria del treball (informe científic)

Tots els camps són obligatoris

1.- Dades bàsiques i resums

Títol del projecte ha de sintetitzar la temàtica científica del vostre document.
Efectes no intencionats de transgens i optimització de la producció de pèptids antimicrobians d'ús fitosanitari en plantes-biofactoria

Dades de l'investigador (benficiari de l'ajut)

Nom
Núria

Cognoms
Company Casadevall

Correu electrònic
nuricompi@hotmail.com

Dades del director del projecte

Nom
Maria

Cognoms
Pla de Solà Morales

Correu electrònic
maria.pla@udg.edu

Dades de la universitat / centre al que s'està vinculat
Universitat de Girona - Escola Politècnica Superior - Departament d'EQATA

Número d'expedient
2010FI_B 00057

Paraules clau: cal que esmenteu cinc conceptes que defineixin el contingut de la vostra memòria.
pèptids anitmicrobians, clonació, transformació, regeneració, expressió

Data de presentació de la justificació
22-10-2010

Generalitat de Catalunya
Departament d'Innovació, Universitats i Empresa

Resum en la llengua del projecte (màxim 300 paraules)

Actualment s'està duent a terme el projecte de tesi consistent en estudiar la producció de pèptids antimicrobians d'ús fitosanitari en plantes-biofactoria. Durant aquest període de la tesi doctoral he realitzat la transformació (mitjançant Agrobacterium tumefaciens) de plantes d'arròs per a la síntesi massiva d'una sèrie de pèptids antimicrobians, BP188, BP183, BP183TAG, BP215, BP173 i BP178. Es tracta d'una sèrie de derivats de BP100 que presenta unes propietats fitosanitàries molt interessants: elevada activitat contra bacteris d'interès fitosanitari, toxicitat reduïda i estabilitat moderada. El treball que he realitzat per dur a terme aquesta tasca ha requerit inicialment realitzar els clonatges necessaris per a les transformacions; per a continuació realitzar les transformacions de calls d'arròs varietat Sènia, seleccionar les cèl•lules transformades, regenerar plantes transgèniques i analitzar-ne la presència del transgén.

1. Clonació de les seqüències que codifiquen aquestes 6 quimeres basades en BP100, en un plasmidi pCAMBIA1300, que incorpora el gen marcador de resistència a la higromicina i els right i left border per a transformació amb A. tumefaciens. Les quimeres de BP100 s'han clonat sota la regulació del promotor constitutiu del gen de la ubiquitina de blat de moro i el terminador t-NOS d'Agrobacterium (ambdós elements amb activitat comprovada en arròs); i amb els elements necessaris per a la seva acumulació en reticle endoplasmàtic (ER): el pèptid senyal Pr1a, i la seqüència de retenció a ER, KDEL. Aquesta estratègia hauria de permetre una acumulació el més gran possible de pèptid antimicrobià en planta.
El sistema de clonatge utilitzat ha permès construir tots els vectors de transformació amb els gens dels pèptids sintètics d'interès, que s'han comprovat per seqüenciació.
2. Transformació de calls embriogènics d'arròs varietat Sènia amb les 6 construccions preparades, mitjançant A. tumefaciens.
3. Regeneració de plantes d'arròs transgèniques a partir dels calls obtinguts en l'apartat anterior.
4. Actualment s'està duen a terme l'anàlisi del transgèn integrat i la quantificació de número de còpies del transgèn.

Resum en anglès(màxim 300 paraules)

At this time I am carrying out a thesis project in which we are studying the production of antimicrobial peptides in plants with phytosanitary use in plant biofactoria. During this period of the thesis I have made the transformation (using Agrobacterium tumefaciens) of rice plants for the bulk synthesis of a series of antimicrobial peptides, BP188, BP183, BP183TAG, BP215, BP173 and BP178. This is a series of derivatives of BP100 that have very interesting phytosanitary properties: high activity against bacteria of phytosanitary interest, reduced toxicity and moderate stability.
The work I have done to accomplish this task has initially required to perform the necessary transformations clonatges; afterwards we have performed the transformations in rice (Senia variety) and we have selected the transformed cells. Finally, we have regenerated the transgenic plants and analyzed the presence of the transgene.

1. Cloning of the sequences that encode these six chimeras based on BP100, in a plasmid pCAMBIA1300, which includes the gene of resistance to hygromicin and right and left border for transformation with A. tumefaciens. The chimeras of BP100 have been cloned under the regulation of the constitutive promoter of the ubiquitin gene from maize and t-NOS terminator of Agrobacterium (both items with proven activity in rice) and the elements necessary for their accumulation in endoplasmic reticulum (ER): Pr1a signal peptide and ER retention sequence, KDEL. This strategy should allow the greatest possible accumulation of antimicrobial peptides in plants.
The system used has allowed to clone all the transformation vectors with the genes of synthetic peptides of interest, which have been verified by sequencing.
2. Transformation of embryogenic callus of rice (Senia variety) with six building blocks prepared by A. tumefaciens.
3. Regeneration of transgenic rice plants from callus obtained in the previous section.
4. Currently, it is being carried out the analysis of the integrated transgene and the quantification of the number of copies of the transgene.

2.- Memòria del treball (informe científic sense limitació de paraules). Pot incloure altres fitxers de qualsevol mena, no més grans de 10 MB cadascun d'ells.

I. INTRODUCCIÓ:

Els microorganismes són les formes de vida més abundants en el planeta, essent molts d'ells potencialment patògens per molts éssers vius. Tant plantes com animals han evolucionat per tal de desenvolupar mecanismes de defensa contra microorganismes patògens. Aquests mecanismes de defensa varien en funció del grau evolutiu de l'organisme en concret. En tots els éssers vius fins ara estudiats, ja siguin vegetals o animals, s'ha descrit un mecanisme de defensa conegut com *immunitat innata,* la qual és una resposta no específica i immediata que s'activa mitjançant el contacte amb éssers estranys (Boman, 2003; Hoffman *et al.,* 1999; Nissen-Meyer i Nes, 1997). En aquest mecanisme actuen molècules que mostren especificitat cap a components de la paret cel·lular microbiana com lipopolisacàrids (LPS) de bacteris gram-negatius, glicolípids de microbacteris, beta-glucans de llevat així com dobles cadenes de ARN viral (Boman, 2000; Hoffman *et al.,* 2004). En els darrers anys s'han descrit diverses molècules resultants d'aquesta resposta innata entre les que s'hi troben proteïnes de baix pes molecular, ***pèptids antimicrobians (PAM).***

Fins al moment s'han detectat fins a 500 PAM provinents d'una gran varietat d'organismes, incloent-t'hi l'espècie humana, plantes, invertebrats marins, amfibis peixos i microorganismes (Zasloff, 2002). Tot i la gran varietat d'organismes que els produeixen, els PAM s'han classificat en funció de la semblança funcional i estructural.

Degut al seu mètode d'acció els PAM poden combatre una gran varietat de microorganismes. Actualment s'estan portant a terme molts estudis per aplicar-los com agents antimicrobians en el camp alimentari, en la medicina així com en l'agricultura.

II. ANTECEDENTS I OBJECTIUS:

El grup d' E. Montesinos (INTEA, UdG) en col·laboració amb el grup d' E. Bardají (LIPPSO, UdG), va dissenyar i sintetitzar, una sèrie de pèptids, en base a la seqüència del pèptid d'activitat antimicrobiana, Pep3. Se'ls va determinar l'activitat, la concentració mínima inhibitòria (MIC), la dosi letal efectiva (ED_{50}) l'activitat hemolítica i es van comparar amb els valors corresponents a Pep3. El pèptid amb una major activitat antibacteriana resultant i menor activitat hemolítica d'aquest estudi va ser BP100. Pel seu interès fitosanitari s'ha optat per la síntesi en planta a gran escala de BP100 concretament en arròs transgènic.

L'expressió d'aquest tipus de pèptids en plantes presenta una sèrie de reptes interessants degut a que d'una banda, poden ser tòxics per a la planta, i per l'altra, poden ser altament inestables *in planta*. Per això és imprescindible dissenyar un esquema adequat de síntesi i acumulació de pèptids transgènics que inclou, per exemple, la localització subcel·lular.

Actualment s'està duent a terme el projecte de tesi consistent en estudiar **la producció de pèptids antimicrobians d'ús fitosanitari en plantes-biofactoria**. Durant aquest període de la tesi doctoral he realitzat la transformació (mitjançant *Agrobacterium tumefaciens*) de plantes d'arròs per a la síntesi massiva d'una sèrie de pèptids antimicrobians, BP188, BP183, BP183TAG, BP215, BP173 i BP178. Es tracta d'una sèrie de derivats de BP100. Aquests derivats s'han dissenyat amb l'objectiu d'allargar la mida de BP100 (11 aminoàcids) per tal de ser expressable en planta.

El treball que he realitzat per dur a terme aquesta tasca ha requerit inicialment realitzar els clonatges necessaris per a les transformacions; per a continuació realitzar les transformacions de calls d'arròs varietat Sènia, seleccionar les cèl·lules transformades, regenerar plantes transgèniques i analitzar-ne la presència del transgén.

Els objectius d'aquest treball són:

1. Clonació de les seqüències que codifiquen aquestes 6 quimeres basades en BP100.
2. Transformació de calls embriogènics d'arròs varietat Sènia amb les 6 construccions preparades, mitjançant *A. tumefaciens*.
3. Regeneració de plantes d'arròs transgèniques
4. L'anàlisi del transgèn integrat i la quantificació de número de còpies del transgèn

III. MATERIAL I MÈTODES:

III.1 Materials i reactius

III.1.1 Plasmidis

Per a la construcció de tots els vectors de clonatge descrits en aquest treball es va partir dels vectors resumits a la taula III.1. Els vectors *Puc57* i *pAHC17* es van utilitzar com a vectors intermediaris. Els vector *pCAMBIA1300* es va utilitzar com a vector final de clonatge.

Taula III. 1: Vectors utilitzats per a la construcció dels vectors intermediaris i finals

Vector	Grandària [pb]	Resistència
Puc57	2710	*Amp*
pAHC17	5312	*Amp*
pCAMBIA1300	8958	*Kan*

III.1.2 Reactius, tampons i medis

Solució de Bromur d'Etidi

Bromur d'etidi (10 mg/mL)	50 μL
Tampó TAE 1x	enrasar a 500 mL

Tampó de càrrega per AGE

Glicerol

Blau de Bromfenol (migra aprox. a 100pb en gel d'agarosa 1%)

o Xilencianol (migra aprox. a 700pb en gel d'agarosa 1%)

Medi de Cultiu i plaques LB

Triptona		10 g
Extracte de Llevat		5 g
NaCl		10 g
Agar (per plaques)		15 g
Aigua	enrasar a	1000 ml

Autoclavar 20 min. a 121 ºC.

Medi de cultiu SOC

Triptona	5 g
Extracte de Llevat	1,25g
NaCl	0,125 g
KCl 250mM	2,5 mL
Aigua enrasar a	250 mL

Autoclavar 20 min. a 121 ºC i afegir glucosa 1M (5 mL) i $MgCl_2$ 2M (1,25 mL)

Tampó TAE 50X

Tris Base	121 g
Àcid acètic glacial	28,55 mL
EDTA 0.5 M pH8.0	50 mL

Dissoldre en 350 mL aigua Milli.Q.

Ajustar el pH a 7,5-7., amb HCl conc.

Enrasar a 500 mL

Tampó TB

PIPES 0,1 M pH 6,7	50 mL
MnC_{l2} 1M	27,5 mL
$CaCl_2$ 1 M	7,5 mL
KCl 1M	125 mL
Aigua	290 mL

Autoclavar a 121 ºC durant 20 min.

Tampó TE 1X

Tris-Cl pH 7.5 (1M)	10 μL
EDTA pH 8 (0.5 M)	2 μL
Aigua enrasar a	1000 μL

III.2 Mètodes generals de manipulació d'àcids nuclèics

III.2.1 Amplificacions de fragments d'ADN mitjançant la Reacció en Cadena de la Polimerasa.

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) és una tècnica que permet una amplificació exponencial (fins a 10^7) de seqüències específiques d'ADN *in vitro.*

Consisteix en cicles repetits de tres processos successius: desnaturalització, hibridació o anellament i elongació on cada procés té lloc a una temperatura diferent. Per a la PCR són necessaris dos encebadors, un que hibridi a l'extrem 5' d'una cadena i l'altre a l'extrem 5' de l'altre la cadena. La temperatura del procés d'hibridació és un paràmetre important ja que dependrà de la temperatura de *melting* (Tm) dels encebadors. Després de la hibridació procedeix la síntesi dirigida per una ADN polimerasa resistent a temperatures elevades, la temperatura d'elongació dependrà de l'enzim utilitzat per a l'amplificació (normalment de 68 a 72 ºC). Durant aquest treball s'han utilitzat dos tipus d'enzims, la *Taq*-ADN-Polimerasa (Invitrogen) i l'*Expand High Fidely*-Polimerasa (Roche).

III.2.1.1 Reaccions amb Taq-ADN-Polimerasa

La *Taq*-ADN-polimerasa de *Thermus aquaticus* és un enzim resistent a temperatures elevades amb una temperatura òptima de treball de 72 ºC. A aquesta temperatura i condicions òptimes de reacció es poden reduir reaccions inespecífiques així com errors en la síntesi de la cadena d'ADN. Així doncs depenent del fragment a amplificar variarà el nombre de cicles, el temps d'elongació o fins i tot la concentració de magnesi, factors que s'hauran d'establir i optimitzar en cada cas.
La composició d'una reacció de PCR típica va ser la següent:

Taula III.4: Reactius per una PCR amb *Taq*-ADN-polimerasa

Reactiu	*Conc. Mare*	*Conc. Final*	*V[μL/reacció]*
Tampó Invitrogen	10 x	1x	5
Mg2+	50 mM	1.5 mM	1,5
dNTPs	2,5 mM	200 μM	4,0
Encebador sentit	10 μM	200 nM	1
Encebador antisentit	10 μM	200 Nm	1
Taq-ADN-Polimerasa	5 U/μL	1 U	0,2
ADN Motlle (~10 ng/μL)			1
Aigua			fins a 50

El programa utilitzat per les amplificacions ha estat el següent:

Taula III.5: Condicions del termociclador per a la reacció d'amplificació amb *Taq* ADN Polimerasa

Cicles	*T [ºC]*	*temps*	*Objectiu*
1	94	3 min	Desnaturalització
0-10	94	30 seg.	Desnaturalització
	50-60[a]	30 seg	Hibridació
	72	1 min /Kb	Elongació
30-40	94	30 seg.	Desnaturalització
	50-60[b]	30 seg	Hibridació
	72	1 min /Kb	Elongació
1	72	10 min	Elongació

a) i b): T-hibridació = Tm – 5ºC. a) Per encebadors que hibriden parcialment la matriu, es programa una T-hibridació en funció de la part que hibrida. b) La T-hibridació es programa en funció de Tm de la seqüència completa de l'encebador.

III.2.1.2 Reaccions amb "Expand High Fidelity PCR System"

El sistema de PCR *Expand High Fidelity* és un sistema optimitzat per amplificar fragments d'ADN de fins a 5 kb amb una eficiència i un rendiment molt elevat. La síntesi d'ADN està dirigida per dos enzims, *Taq*-ADN-Polimerasa i *Tgo*-ADN-

Polimerasa, aquesta última també resistent a temperatures elevades i amb capacitat de correcció.

Durant aquest treball es va utilitzar aquest sistema, per a l'amplificació dels fragments per a posteriors subclonatges i per la construcció de gens mitjançant la PCR Recursiva (Apartat III.2.2.).

La composició per a la amplificació de fragments va ser la següent:

Taula III.6: Reactius per reaccions de PCR amb *Expand High Fidelity*

Reactiu	*Conc. Mare*	*Conc. Final*	*V[uL/reacció]*
Tampó +	10 x	1x	5
$MgCl_2$	15 mM	1.5 mM	-
dNTPs	2,5 mM (de cada)	200 μM	4,0
Encebador sentit	10 μM	200 nM	1
Encebador antisentit	10 μM	200 Nm	1
Ex. High Fid. Polimerasa	3.5 U/μL	2.6 U	0,75
Motlle (~10 ng/uL)			1
Aigua			fins a 50

El programa utilitzat habitualment per les amplificacions de fragments per posterior subclonatge ha estat el següent:

Taula III.7: Condicions de termociclador per reaccions de PCR amb *Expand High Fidelity*

Cicles	*T [ºC]*	*temps*	*Objectiu*
1	94	2 min	Desnaturalització
10	94	15ses.	Desnaturalització
	45 -55 [a]	30 seg	Hibridació
	72 o 68	1 min / 1,5 Kb	Elongació
20	94	30 ses.	Desnaturalització
	50- 65	30 seg	Hibridació
	72 o 68 [b]	1 min + 5s[c]./ 1,5 Kb	Elongació
1	72	7 min	Elongació

a) la T-hibridació òptima dependrà de la Tm del encebadors. b) Per productes de PCR fins a 3kb T-elongació=72ºC i per fragments superiors a 3 kb T-elongació=68ºC. c) Per cada cicle s'augmenta el temps d'elongació 5 segons.

III.2.2 Purificació de productes de PCR

La purificació dels productes de PCR es va dur a terme utilitzant un "kit" comercial basat en columnes d'afinitat (QIAquick kit de QIAGEN). Amb aquest mètode s'aconsegueixen purificar fragments entre 100 pb i 10 kb i eliminar així encebadors, nucleòtids, polimerases i sals presents en la solució. Els tampons utilitzats així com les minicolumnes vénen incloses en el "kit" de la casa comercial.

El protocol seguit va ser el següent:

1. Afegir 5 volums de tampó PB per 1 volum de reacció de PCR i vortexar.
2. Aplicar la mescla dins la columna (volum màxim 650 μL).
3. Centrifugar a 4000 rpm durant 3 minuts. En el cas de no haver baixat tota la mostra, repetir la centrifugació.
4. Centrifugar a 13000 rpm durant 30 segons i descartar l'eluat.
5. Rentar la mostra afegint 700 μL de tampó PE .
6. Centrifugar a 4000 rpm durant 3 minuts. En el cas de no haver baixat tota la mostra, repetir al centrifugació.
7. Descartar l'eluat.
8. Centrifugar a 13000 rpm durant 1 minut per tal d'eliminar completament les restes d'etanol presents en la columna. En cas contrari l'ADN el rendiment i la qualitat de l'eluat disminuirà. Restes d'etanol poden inhibir reaccions enzimàtiques.
9. Posar la columna en un tub siliconitzat de 1.7 mL.
10. Afegir 50 μL d'aigua o tampó d'elució EB al centre de la columna.
11. Incubar durant 15 minuts a temperatura ambient.
12. Eluir l'ADN centrifugant a 5000 rpm durant 5 minuts. Finalment centrifugar a 13000 rpm durant 15 segons.
13. Quantificar 2 μL de mostra a l'espectrofotòmetre NanoDrop, per tal de saber la concentració d'ADN total.

III.2.3 Electroforesis en gel d'agarosa (AGE)

L'electroforesi en gel d'agarosa és un mètode simple i efectiu per a separar, analitzar i purificar fragments d'ADN. Es va utilitzar aquest mètode per comprovar les reaccions de PCR, purificar fragments d'ADN d'interès i comprovar les digestions amb enzims de restricció. La concentració de la solució d'agarosa depèn de les mides dels fragment d'ADN que es volen separar. La següent taula representa una correlació entre la concentració del gel i les mides dels fragments que mostres resolució adequada.

Taula III.9: Concentracions recomanades per la resolució d'ADN de doble cadena

Agarosa (% p/v)	mida dels fragments a separar (Kb)
0,5	1 - 30
0,7	0,8 - 12
1,0	0,5 – 10
1,2	0,4 – 7
1,5	0,2 – 3
2,0	0,05 – 2

El protocol seguit va ser el següent:

1. Dissoldre la quantitat necessària d'agarosa en tampó TAE 1x.
2. Escalfar la solució en el microones, fins que l'agarosa estigui completament dissolta.
3. Deixar refredar la solució fins que arribi a 50 ºC.
4. Omplir el motlle per formar el gel i deixar polimeritzar durant un mínim de 30 minuts.
5. Preparar les mostres amb el tampó de càrrega i dipositar-les en els pous del gel.
6. Córrer el gel a 100 mA (per gels petits) o 150 mA (per gels grossos) fins que el front de Blau de Bromfenol arribi al final.
7. Tenyir el gel en 300 mL d'una solució de Bromur d'etidi (10 mg/mL) durant 20-30 min.
8. Fotografiar el gel segons les instruccions de la càmera.

III.2.4 Extracció de fragments d'ADN de gels d'agarosa

La separació de fragments d'ADN mitjançant el mètode electroforètic amb gels d'agarosa es va dur terme segons el protocol descrit a l'apartat III.2.4. Després de la tinció amb Bromur d'etidi, es va seguir el següent protocol.

1. Retallar la banda desitjada amb un escalpel net sota llum UV.
2. Posar la banda dins d'un tub de plàstic de 25 mL que conté de 1 mL de tampó TE 1x.
3. Incubar a 27 ºC amb agitació (120 rpm) durant 5 – 6 hores.
4. Es procedeix amb la precipitació amb etanol descrita a l'apartat III.2.6.

III.2.5 Purificació fenòlica i precipitació amb etanol de solucions d'ADN.

La purificació fenòlica es va realitzar després de digestions enzimàtiques de fragments d'ADN per tal d'eliminar les restes d'enzims. La precipitació amb etanol es va realitzar després de la purificació fenòlica i de l'extracció de fragments d'ADN de gels d'agarosa per tal de concentrar les solucions d'ADN.

El protocol seguit va ser el següent:

1. Afegir 1 volum de Fenol/Cloroform/Isoamilalcohol (25:24:1) a 1 volum de solució d'ADN a purificar.

2. Vortexar 1 minut i centrifugar a 13000 rpm durant 3 minuts.
3. Agafar amb compte el 90% del sobrenedant i posar-lo en un tub de 1,7 mL.
4. Afegir el 90 % v/v d'aigua respecte el volum inicial de la solució d'ADN sobre la fase orgànica i repetir els passos 2 i 3.
5. Mesurar amb la pipeta el volum total de la solució aquosa.
6. Afegir el 10 % del volum d'acetat sòdic i vortexar.
7. Afegir 2,5 volums d'etanol 100% i vortexar.
8. Precipitar l'ADN a -20 ºC un mínim de 2 hores.
9. Centrifugar durant 30 minuts a 13000 rpm.
10. Retirar ràpidament i amb compte el sobrenedant.
11. Netejar el pèl·let afegint 500 μL d'etanol 70% i colpejar amb el dit el tub varies vegades.
12. Centrifugar durant 10 minuts a 13000 rpm.
13. Retirar ràpidament el sobrenedant amb una pipeta Pasteur de punta estirada.
14. Assecar el pèl·let invertint el tub i amb el tap obert per tal d'eliminar completament les restes d'etanol.
15. Resuspendre l'ADN amb 30 – 50 μL d'aigua.

III.2.6 Subclonatges

III 2.6.1 Digestió enzimàtica de seqüències d'ADN

La digestió de fragments d'ADN per a posterior clonatges es va dur a terme mitjançant enzims de restricció. Tots els enzims utilitzats durant aquest treball es van obtenir de la casa comercial Roche, la finalitat dels quals està indicada a la taula III.2. Amb aquest mètode es van digerir tant plasmidis com fragments d'ADN amplificats per PCR i purificats. Les condicions de reacció es van establir per cada enzim segons les recomanacions de la casa comercial. El volum del fragment a digerir ha d'estar comprès entre un 10 % i un 50 % del volum total de la reacció. Així mateix el volum d'enzim no pot superar el 10 % de la reacció total. Les digestions es van dur a terme a 37 ºC i entre 1 i 3 hores. Finalment per tal d'eliminar les sals i els enzims de la solució es va procedir segons l'apartat III.2.6.

III.2.6.2 Desfosforilació

La desfosforilació dels plasmidis digerits es va dur a terme mitjançant l'enzim fostatasa alcalina de Roche. Les condicions de la reacció es van establir segons les instruccions de la casa comercial.

Per determinar la quantitat d'enzim necessari per la desfosforilació, cal calcular el nombre de pmols d'extrems 5'. Per molècules de doble cadena s'aplica la fórmula següent:

$$pmol5' = \frac{X}{Y \times 660 g / mol / pb} \times 10^{12} pmols / mol \times 2 extrems / molècules$$

X = quantitat de ADN (gr.)
Y = grandària del fragment (pb)

Finalitzada la desfosforilació es purifica l'ADN segons l'apartat III.2.6.

III.2.6.3 Lligació

La lligació entre l'insert i el plasmidi es va dur a terme mitjançant l'enzim T4 ADN Lligasa. En aquest treball es van utilitzar únicament enzims de restricció que generen extrems cohesius. Les condicions de la reacció es van establir segons les recomanacions de la casa comercial. La relació molar de les lligacions va variar en funció de la grandària de l'insert i del plasmidi. Per grandàries diferents es va tendir a una relació molar insert:vector de 3:1 i per grandàries semblants a una relació molar insert:vector de 10:1. El temps d'incubació va ser de tota la nit, essent la temperatura inicial de 4 i la final de 16 ºC.

III.2.6.4 Transformació

La transformació de plasmidis en *E. coli* permet l'amplificació d'aquests i obtenir-ne així grans quantitats. Totes les transformacions realitzades en aquest projecte es van fer amb cèl·lules *E. coli* XL1 Blue químicament competents per $CaCl_2$.

III.2.6.4a Preparació de cèl·lules *E. coli* competents.

El mètode utilitzat per a l'obtenció de cèl·lules competents és per incubació amb $CaCl_2$ el qual ha estat descrit per Seidman (1977). La soca d'*E. coli* XL1 Blue utilitzada en aquest treball té resistència a la tetraciclina (Tc) i és útil per tal d'evitar contaminacions durant la preparació d'aquestes.

El protocol seguit va ser el següent:

1. Estriar una placa LB que contingui Tc amb un cultiu XL1Blue i incubar durant 16-20 h a 37ºC.
2. Preparar un precultiu de 5 mL en LB + Tc a partir d'una colònia aïllada de la placa i incubar tota la nit a 37ºC.

3. Inocular de 0.83 –1 mL del precultiu en 250 mL de medi SOB sense antibiòtic. Incubar a 28 ºC amb agitació a 175 rpm fins arribar a una OD_{600} = 0,6. El nombre de cèl·lules viables no ha de superar 10^8 cèl·lules/ml ($1OD_{600}$= $8x10^8$ cèl/ml).
4. Passar el cultiu cel·lular a tubs de centrífuga estèrils freds.
5. Mantenir en gel durant 10 min.
6. Centrifugar entre 4000-5000 rpm durant 10 min a 4ºC.
7. Eliminar el sobrenedant i mantenir els tubs invertits 1 minut.
8. Resuspendre les cèl·lules en 80 mL de TB fred en gel pipetejant i agitant en gel suaument. Deixar en gel 10 min.
9. Centrifugar entre 4000-5000 rpm durant 10 min a 4ºC.
10. Decantar el sobrenedant.
11. Resuspendre les cèl·lules en 18,6 mL de TB fred en gel.
12. Afegir DMSO en repòs i temperatura ambient a una concentració final del 7 %
13. Deixar en gel 10 minuts.
14. Aliquotar la suspensió en 200 mL, congelar amb nitrogen líquid i conservar a -80 ºC.

III.2.6.4b Transformació per xoc tèrmic

El protocol seguit va ser el següent:

1. Afegir a una alíquota de cèl·lules competents una part o tota la lligació i barrejar suaument.
2. Mantenir sobre gel durant 30 minuts per tal que l'ADN s'adhereixi a la paret cel·lular.
3. Incubar 90 s a 42ºC per tal de produir el xoc tèrmic i permetre així l'entrada de l'ADN al interior de les cèl·lules.
4. Posar el tubs en gel durant 1-2 minuts.
5. Afegir 500 μL de medi SOC.
6. Incubar 1h a 37ºC per tal de que les cèl·lules desenvolupin la resistència a l'antibiòtic que els confereix el plasmidi.
7. Sembrar en superfície 100-300 μL sobre plaques LB que continguin l'antibiòtic de selecció.

Els antibiòtics de selecció utilitzat en aquest treball estan detallats a la taula III.10.

Taula III.10: Antibiòtics utilitzats

Antibiòtic	*Concentració Final*
Tetraciclina	15 μg/ml
Ampicil·lina (Sal de Na)	100 μg/ml
Kanamicina	50 μg/mL

III.2.7 Minipreparacions d'ADN plasmídic

Les extraccions de plasmidis de les cèl·lules d' E.coli transformades es van dur a terme mitjançant el *kit* NucleoSpin de la casa Macherey-Nagel. Tots els reactius necessaris així com les minicolumnes de silica estan incloses en el *kit*. Amb aquest mètode es poden purificar plasmidis < 15 kb amb un rendiment màxim del 80 % obtenint quantitats fins a 25 μg.

El protocol seguit va ser el següent:

1. Inocular en 5 mL de medi LB amb l'antibiòtic de selecció una colònia aïllada que contingui el plasmidi a purificar.
2. Centrifugar les cèl·lules 30 segons a 13000 rpm i descartar el sobrenedant.
3. Resuspendre el pèl·let en 250 μL tampó A1 que conté RNAsa A.
4. Per tal de produir la lisi alcalina afegir 250 μL de tampó A2 (conté SDS) i invertir el tub de 6 a 8 vegades. No vortexar.
5. Incubar durant un màxim de 5 minuts.
6. Afegir 300 μL de tampó A3 (conté hidroclorur de guanidina) per tal de neutralitzar la solució i permetre que l'ADN s'adhereixi bé a l'interior de la columna.
7. Invertir el tub de 6 a 8 vegades.
8. Centrifugar 15 minuts a 13000 rpm per tal de precipitar l'SDS i les restes cel·lulars.
9. Aplicar el sobrenedant a la columna de sílica per tal de lligar l'ADN.
10. Centrifugar a 4000 rpm durant 3 minuts i finalment 30 segons a 13000rpm.
11. Descartar l'eluat.
12. Es recomana rentar l'ADN amb 500 μL tampó AW (conté hidroclorur de guanidina) centrifugant 1 min. a 13000 rpm. Aquest pas és important per la optimització de posteriors reaccions enzimàtiques o de seqüenciació, ja que s'eliminaran les restes de nucleases.

13. Per tal d'eliminar contaminants com sals, metabòlits o altres components cel·lulars solubles, rentar la columna aplicant 600 µL de tampó A4 (conté etanol).
14. Centrifugar 3 min a 4000 rpm i descartar l'eluat.
15. Centrifugar 1 min. a 13000 rpm per tal d'eliminar totalment les restes d'etanol.
16. Aplicar la columna en un tub de 1.7 mL.
17. Aplicar sobre la columna 50 µL de tampó d'elució AE (5 mM Tris-cl, pH 8.,5).
18. Incubar durant 15 min a RT.
19. Centrifugar 5 min a 4000 rpm i finalment 15 seg. a 13000 rpm.
20. Quantificar la concentració d'ADN amb el NanoDrop.

III.2.8 Seqüenciació de fragments d'ADN

El mètode utilitzat en aquest treball permet seqüenciar tant productes de PCR com fragments inclosos en plasmidis. Per això s'utilitza el *kit* BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems).

Es preparen les reaccions afegint els següents reactius (per ordre) en tubs de propilè de 200 µl.:

Taula III.11: Reactius per la reacció de seqüenciació

Reactiu	*Volum (µL)*
BigDye buffer [a]	1
Encebador (10 uM)	1
BigDye terminator [a]	3
ADN [b]	1-5
Aigua	fins a 10 µL

a) Applied Biosystems. b) Plasmidis: 100 ng d'ADN; Productes de PCR: 10 ng d'ADN

Les condicions del termociclador van ser les indicades a la taula III.12.

Taula III.12: Reactius per la reacció de seqüenciació

Cicles	*T [ºC]*	*temps*
1	94	3 min
25	96	10 seg
	50	5 seg
	60	4 min
1	4	-

El protocol seguit després de la reacció de seqüenciació va ser el següent:

1. Si s'escau conservar el productes de seqüenciació a 4 ºC fins que s'utilitzin.
2. Vortexar breument i afegir per ordre: 1 µL EDTA 125 mM; 1 µL acetat sòdic 3M pH 5,2 i 25 µL Etanol 100 %. (v/v)
3. Tapar el tub i protegir de la llum amb paper d'alumini i invertir aprox. 4 vegades.
4. Incubar a RT durant 15 min.
5. Passar les solucions a tubs Eppendorf de 1,5 mL i centrifugar a 13000 rpm durant 30 min.
6. Ràpidament, aspirar el sobrenedant amb una pipeta Pasteur estirada.
7. Netejar el pèl·let afegint 30 µL d'etanol 70% (v/v) colpejant el tub varies vegades.
8. Centrifugar durant 15 minuts a 13000 rpm.
9. Ràpidament, aspirar el sobrenedant amb una pipeta Pasteur de punta estirada.
10. Assecar les mostres deixant el tubs oberts protegits amb paper d'alumini (30 ºC durant 15 min).
11. Resuspendre els pèl·lets en 30 µL de *Template Suppression Reagent* (Applied Biosystems, MA, USA) i deixar-los rehidratar durant 20 min. a RT.
12. Vortexar i desnaturalitzar en un bany a 94 ºC durant 3 min.
13. Refradar-los immediatament sobre gel.
14. Transferir tots 30 µL a microtubs ABI 310 (PE Applied Biosystems) i carregar les reaccions de seqüència a l'ABI PRISM TM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems).

IIII. RESULTATS:

1. **Clonació de les seqüències que codifiquen aquestes 6 quimeres basades en BP100**, en un plasmidi pCAMBIA1300, que incorpora el gen marcador de resistència a la higromicina i els right i left border per a transformació amb A. tumefaciens. Les quimeres de BP100 s'han clonat sota la regulació del promotor constitutiu del gen de la ubiquitina de blat de moro i el terminador t-NOS d'Agrobacterium (ambdós elements amb activitat comprovada en arròs); i amb els elements necessaris per a la seva acumulació en reticle endoplasmàtic (ER): el pèptid senyal Pr1a, i la seqüència de retenció a ER, KDEL. Aquesta estratègia hauria de permetre una acumulació el més gran possible de pèptid antimicrobià en planta.

Tot i ser més llargues que BP100, les seqüències dels derivats BP188, BP183, BP183TAG, BP215, BP173 i BP178 no sobrepassen els 50 aminoàcids i són, per tant,

relativament curtes. Per tal de fer possible la introducció de seqüències d'interès molt petites (codificants dels pèptids) entre el promotor i el terminador t-NOS, es va issenyar un plasmidi intermediari (petit, d'uns 4 Kpb), que permetés posteriorment la introducció del cassette complert (gen d'interès amb els elements reguladors) en el vector final de transformació (pCAMBIA1300) (amb el gen de selecció i de mida molt grossa, d'uns 9 Kpb). D'aquesta manera, el subclonatge final ha estat d'un insert de mida prou gran per aconseguir bons rendiments de lligació.
El sistema de clonatge utilitzat ha permès construir tots els vectors de transformació amb els gens dels pèptids sintètics d'interès, que s'han comprovat per seqüenciació.

2. **Transformació de calls embriogènics d'arròs varietat Sènia amb les 6 construccions preparades**, mitjançant *A. tumefaciens*. S'han obtingut i es segueixen un mínim de 3 events de transformació per cadascuna de les 6 construccions. Es tracta de calls resistents a la higromicina (caràcter de selecció).

3. **Regeneració de plantes d'arròs transgèniques** a partir dels calls obtinguts en l'apartat anterior. Al llarg d'aquest i el proper any, es preveu obtenir línies homozigotes estabilitzades pels events de transformació més interessants (autopol·linització durant 3 generacions).

4. Actualment s'està duen a terme **l'anàlisi del transgèn integrat i la quantificació de número de còpies del transgèn**, considerant tant el gen de selecció (resistència a higromicina) com els gens que codifiquen els 6 derivats de BP100, en les plantes d'arròs transgèniques (de moment, plantes hemizigotes). Es realitza una primera aproximació mitjançant PCR a temps real (qPCR). Per l'anàlisi s'utilitza la química SybrGreen i els encebadors específics per cada seqüència a la concentració prèviament optimitzada. Per comparació amb un gen propi d'arròs (gen de referència) i mitjançant una recta patró, es realitza una estimació del nombre de còpies del transgèn dins el genoma de l'arròs, en cada event analitzat. Es prossegueix amb l'estudi d'un mínim de 3 events amb un nombre de còpies proper a 1. Donat que la química SybrGreen és inespecífica de seqüència, es realitza sistemàticament la temperatura de dissociació de cada amplicó, que permet comprovar que l'amplicó obtingut correspon efectivament a l'esperat.