

**MEMORIA JUSTIFICATIVA**

**PROGRAMA DE MEJORA DE LA CALIDAD  
PLAN ESTRATEGICO GENERAL 2013-2018  
Planes de formación e innovación**



**Proyecto de innovación y mejora docente 2017/2018**

**TÍTULO DEL PROYECTO: PUESTA A PUNTO DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO BILINGÜES (INGLÉS/ESPAÑOL) PARA ALUMNOS DE POSGRADO EN FISIOPATOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA**

**Coordinadora: Marta Rodríguez Romero**

**CÓDIGO DEL PROYECTO: ID2017/177**

## OBJETIVO

Este proyecto de innovación docente se solicitó tras constatar los profesores participantes que un aspecto importante del plan educativo del Espacio Europeo de Educación Superior (EEES) en el que se encuentra incluida la Universidad de Salamanca, es impulsar la movilidad de estudiantes, titulados y trabajadores con formación superior entre todos los países miembros. Para promover este plan en el nivel formativo del Posgrado en Ciencias de la Salud es imperativo la formación y perfeccionamiento del alumnado en competencias transversales que faciliten el conocimiento del inglés médico y científico, ya que es el idioma utilizado para la comunicación internacionalizada en el ámbito laboral biosanitario y de investigación científica. Por lo tanto, el **objetivo principal** de este proyecto de innovación fue la puesta a punto y desarrollo de prácticas de laboratorio bilingües (inglés/español) con contenidos relacionados con las áreas de Bioquímica, Fisiopatología y Farmacología en asignaturas de Posgrado de los Másteres Universitarios (MU) de Fisiopatología y Farmacología Celular y Molecular y MU en Evaluación y Desarrollo de Medicamentos de la Facultad de Farmacia.

## DESCRIPCIÓN DE LA EXPERIENCIA

En coordinación con los profesores implicados en la propuesta se había llevado a cabo un proceso de selección de prácticas para su desarrollo en el laboratorio de experimentación *in vitro* y para llevar a cabo análisis *in silico* en el aula de informática, para que el alumno tuviera acceso a los contenidos más relevantes de las asignaturas en un formato interactivo. Más en concreto, dentro de las asignaturas “Estrategias farmacológicas para superar la resistencia a la quimioterapia antitumoral”, “Mecanismos de resistencia a la quimioterapia antitumoral” y “Farmacogenómica”, pertenecientes a los MU antes mencionados, se han realizado tres prácticas con los siguientes títulos y contenidos:

i) *Allelic Discrimination using RT-qPCR*. Práctica de laboratorio sobre la detección de cambios en el DNA relacionados con la aparición de enfermedades. Esta práctica se impartió en inglés y en español. El objetivo era iniciar al alumno en el estudio de las bases moleculares de enfermedades genéticas debidas a la mutación de un único polimorfismo mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real para discriminación alélica.

ii) *Primers design and sequence analysis*. Práctica en el aula de informática donde a través de la enseñanza en inglés se dieron a conocer las herramientas necesarias disponibles online para estudiar, diseñar y analizar secuencias de nucleótidos destinadas a diversas aplicaciones en el laboratorio de investigación y diagnóstico genético de patologías.

iii) *DNA cloning using Gateway Technology and in vitro transfection of mammalian cells.* Práctica de laboratorio impartida en inglés y en español sobre técnicas de clonación utilizando la tecnología Gateway desarrollada por InvitroGen para el diseño y generación de construcciones conteniendo DNA de interés y su posterior introducción en diversos modelos *in vitro* utilizados en investigación Biomédica.

### **JUSTIFICACIÓN ECONÓMICA**

Para la implantación de esta práctica se requería material de papelería, reactivos y sustratos para RT-qPCR y material de plástico desechable de laboratorio y se solicitaron 550 € para su adquisición. Con la financiación concedida para este proyecto de innovación docente (202,4 €) se compró material de papelería cuya factura de justificación de gastos ya ha sido remitida al Vicerrectorado de Docencia. Este material de papelería se ha utilizado para la elaboración de los protocolos y ejercicios prácticos bilingües que se entregaron a cada uno de los alumnos en formato impreso antes de empezar cada una de las prácticas de laboratorio. Para ilustrar la inversión de la financiación adjudicada, se adjunta como anexo a esta memoria el cuaderno bilingüe de protocolos de la asignatura de Farmacogenómica del MU en Evaluación y Desarrollo de Medicamentos de la Facultad de Farmacia. El material a su vez, también estaba disponible para los alumnos de las tres asignaturas que se han indicado con anterioridad, de forma total o dividido por prácticas, a criterio de los profesores, en la plataforma Studium.

### **RESULTADOS Y CONCLUSIONES**

El desarrollo de este proyecto ha permitido la puesta en marcha de prácticas bilingües con contenidos relacionados con Biomedicina para tres asignaturas de dos MU de la Facultad de Farmacia que se han impartido en el mes de mayo de 2018 y que se podrán adaptar para ser impartidos en sucesivos cursos académicos. Además, gracias al desarrollo de esta experiencia se ha conseguido que el alumno de Posgrado adquiera la terminología técnica médico-científica, tanto en español como en inglés, necesaria para el trabajo en los laboratorios de diagnóstico clínico e investigación, más en concreto sobre las bases moleculares y celulares de la enfermedad, a través de la práctica experimental en el laboratorio y de ordenador con los simuladores adecuados.



Fdo: Marta Rodríguez Romero

Profesora Contratada Doctora del Depto. De Bioquímica y Biología Molecular  
Universidad de Salamanca

# **Anexo**

## **CUADERNO DE PROTOCOLOS** **BILINGÜES DE LA ASIGNATURA DE** **FARMACOGENÓMICA**

**MU en Evaluación y Desarrollo de  
Medicamentos de la Facultad de  
Farmacia**



# Allelic discrimination

## Master in Drug Evaluation and Development

Specialization in Design,  
Preparation and Evaluation of  
Drugs

Pharmacogenomic



**ALLELIC DISCRIMINATION USING RT-QPCR: A HOMOZYGOUS NONSENSE MUTATION (C.214C/A) IN THE BILIVERDIN REDUCTASE ALPHA GENE (BLVRA) RESULTS IN ACCUMULATION OF BILIVERDIN DURING EPISODES OF CHOLESTASIS**

**BACKGROUND**

Biliverdin is generated, together with Fe and CO, in haem catabolism, in a reaction catalysed by haemoxygenase HO. The main product is biliverdin IXa, Biliverdin IXa is converted into bilirubin IXa by biliverdin reductase alpha (BVRa), which is expressed in many organs, mainly liver, brain, lung, pancreas, kidney, spleen and placenta. A sequence variation in a single nucleotide (SNP= 214 nt exon 3) of the gene *BVRA* is related to green jaundice associated with biliary obstruction.

**AIM**

Identify and characterize allelic variants in patients with hyperbiliverdinemia.

**METHODS**

Real-time PCR detection and quantification system based on the use of Taqman (TQ) probes MGB (Minor Groove Binder). Multiplex assay: detection of more than one target DNA sequence in the same reaction tube, using different reporters at the 5' end of the TQ probes.

TQ probe	Sequence 5'-3'
BLVRA F2	CCT TCC TCA GCG TTC CTG AA
BLVRA R3	GGG CTT TCC ATG AAT TAT GAA GCA CA
TQ-Wt	<b>6FAM</b> -CTT CGT GT <b>C</b> GAG GTG-MGB
TQ-C214-A	<b>VIC</b> -GCT TCG TGT <b>A</b> GA GGT-MGB

**MULTIPLEX ASSAY**

1- Prepare a mix with the following reagents in an eppendorf tube:

	Stock	Final concentration	Volumen (1 reaction)	<b>Volumen</b> <b>(__ reactions)</b>
Taqman Universal PCR Master Mix	2X	1X	<b>12.5 µl</b>	
DNAs obtained from volunteers	25 ng/µl	50 ng	<b>2 µl</b>	
BLVRA F2	50 µM	900 nM	<b>0.45 µl</b>	
BLVRA R3	50 µM	900 nM	<b>0.45 µl</b>	
TQ-Wt	10 µM	200 nM	<b>0.5 µl</b>	
TQ-C214-A	10 µM	200 nM	<b>0.5 µl</b>	
H <sub>2</sub> O	-----	-----	To reach 25 µl <b>(8.6 µl)</b>	

2- Pipette 23 µl of the mix inside QPCR tube and add 2 µl of the sample following this scheme:

	1	2	3	4
A	BL	C110.1	F110.1	CO
B	BL	C110.1	F110.1	CO
C	BL	C110.5	F110.1	
D	BL	C110.5	F110.5	
E	C110.01	C110.5	F110.5	
F	C110.01	F110.01	F110.5	
G	C110.01	F110.01	CO	
H	C110.1	F110.01	CO	

**DNA:** the samples correspond to DNA from individuals included in a study that is being conducted between the laboratories of the Experimental Hepatology and Drug Targeting Group from University of Salamanca(HEVERFARM) and the Dronning Ingrid's Hospital, Nuuk, Groelandia.

Sample code:

- Volunteer 1: C110.01
- Volunteer 2: C110.1
- Volunteer 3: C110.5
- Volunteer 4: F110.01
- Volunteer 5: F110.1
- Volunteer 5: F110.5
- Volunteer 6: CO

In each PCR tube 50 ng of DNA from each individual are placed in triplicate except in the blanks (BL) (quadrupled) in which water is added.

3- Set ABIPrism® 7300 (Applied Biosystems) equipment under the following conditions:

1 cyclo	95 °C	10 min
60 cyclos	92 °C	15 seg
	64 °C	1 min

4- Analysis of results and repetition of the PCR for positive or doubtful results for the mutation.



## QPCR PARA DISCRIMINACIÓN ALÉLICA: CASO CLÍNICO DE HIPERBILIVERDINEMIA ASOCIADA A UNA MUTACIÓN INACTIVANTE DEL GEN BLVRA.

### INTRODUCCIÓN

La degradación del grupo hemo en mamíferos conduce a la producción de biliverdina y posteriormente ésta se transforma a bilirrubina por la acción de la enzima biliverdina reductasa. Mutaciones en el gen que codifica para esta enzima se relacionan con condiciones patológicas como pueden ser la hiperbiliverdinemia asociada al polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 214 del exón 3 del gen que codifica para la isoforma alfa (*BLVRA*). La aparición de esta patología y de las complicaciones ocasionadas por la misma se relacionan con la homocigotidad de la mutación.

### OBJETIVO

Identificar y caracterizar las variantes alélicas en pacientes con hiperbiliverdinemia.

### METODOLOGÍA

Sistema de detección y cuantificación por PCR a tiempo real basado en el uso de sondas Taqman (TQ) MGB (sondas fluorescentes de hidrólisis “Minor Groove Binder”). Ensayo multiplex: detección de más de una secuencia diana de DNA en el mismo tubo de reacción, utilizando diferentes “reporters” en el extremo 5’ de las sondas.

Primer o sonda TQ	Secuencia 5'-3'
BLVRA F2	CCT TCC TCA GCG TTC CTG AA
BLVRA R3	GGG CTT TCC ATG AAT TAT GAA GCA CA
TQ-Wt	6FAM-CTT CGT GT <b>C</b> GAG GTG-MGB
TQ-C214-A	VIC-GCT TCG TGT <b>A</b> GA GGT-MGB

### CONDICIONES EXPERIMENTALES

1- En un tubo eppendorf preparar un mix con los siguientes reactivos

	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (1 reacción)	Volumen (___ reacciones)
Taqman Universal PCR Master Mix	2X	1X	<b>12.5 µl</b>	
DNAs obtenidos de sujetos de estudio	50 ng/µl	50 ng	<b>2 µl</b>	
BLVRA F2	50 µM	900 nM	<b>0.45 µl</b>	
BLVRA R3	50 µM	900 nM	<b>0.45 µl</b>	
TQ-Wt	10 µM	200 nM	<b>0.5 µl</b>	
TQ-C214-A	10 µM	200 nM	<b>0.5 µl</b>	
H <sub>2</sub> O	-----	-----	<b>Hasta 25 µl (8.6)</b>	



Las muestras se corresponden con DNA de individuos incluidos en un estudio que se está realizando entre los laboratorios del Grupo de Hepatología Experimental y Vectorización de Fármacos (HEVERFARM) y el Dronning Ingrid's Hospital, Nuuk, Groelandia.

Nomenclatura de las muestras:

Sujeto 1: C110.01

Sujeto 2: C110.1

Sujeto 3: C110.5

Sujeto 4: F110.01

Sujeto 5: F110.1

Sujeto 6: F110.5

Sujeto 7: CO

En cada tubo de PCR se ponen 50 ng de DNA de cada individuo por triplicado salvo en los blancos (BL) (cuadruplicado) en los que se añade agua.

2- Pipetear 23 µl del mix en los tubos de PCR según este esquema, añadir 2 µl de muestra según este esquema:

	1	2	3	4
A	BL	C110.1	F110.1	CO
B	BL	C110.1	F110.1	CO
C	BL	C110.5	F110.1	
D	BL	C110.5	F110.5	
E	C110.01	C110.5	F110.5	
F	C110.01	F110.01	F110.5	
G	C110.01	F110.01	CO	
H	C110.1	F110.01	CO	

3- Programar el equipo ABIPrism® 7300 de Applied Biosystems en las siguientes condiciones:

1 ciclo	95 °C	10 min
60 ciclos	92 °C	15 seg
	64 °C	1 min

4- Analisis de resultados y repetición de la PCR para los resultados positivos o dudosos para la mutación.

### OBTENCIÓN DE MUESTRAS A PARTIR DE RASPADO BUCAL

Recogida de células epiteliales bucales utilizando hisopos "Omni Swabs" estériles:

Recomendaciones: no ingerir comida o bebida en los 30 minutos previos al muestreo.

Conservar a -20°C hasta procesado.

- Introducir el bastoncillo en la boca y hacer un raspado en la parte interna de la mejilla
- Repetir 5-6 veces en 10 segundos (3 veces en cada lado)
- Soltar la escobilla dentro de un tubo eppendorff de 2 ml
- Dejar secar al aire (1h mínimo). Si no se extrae el DNA inmediatamente conservar a -20°C.
- Seguir las indicaciones del protocolo "QIAamp DNA Mini Kit" (DNA Purification from Blood or Body Fluids, Spin Protocol QIAGEN) para la obtención del DNA a partir de las muestras obtenidas
- Valorar el DNA en el Nanodrop (1 µl de muestra).

# QIAGEN Supplementary Protocol

---

## Whole genome amplification from buccal cells using the REPLI-g® Single Cell Kit

This protocol is optimized for whole genome amplification from buccal cells using the REPLI-g Single Cell Kit (cat. nos. 150343 and 150345). The procedure is optimized for air-dried buccal swabs obtained using cotton or Dacron® tips, and brushes or swabs with an ejectable head (e.g., Whatman® Omni Swab). Other swab types may also be used. Note that the whole genome may not be amplified with complete genome coverage, depending on the quality of swab. Freshly obtained swabs are recommended so that intact cells will be used for whole genome amplification.

**Note:** In rare cases, potential inhibitors present in the starting material may have inhibitory effects on amplification. In these cases, we recommend upstream genomic DNA purification (e.g., using a QIAamp® Kit) if sufficient starting material is available prior to whole genome amplification using the protocol “Amplification of Purified Genomic DNA”, page 15, of the *REPLI-g Single Cell Handbook*, which is for use with 1–10 ng of eukaryotic DNA.

**IMPORTANT:** Please read the *REPLI-g Single Cell Handbook*, paying careful attention to the “Safety Information” and “Important Notes” sections, before beginning this procedure. The REPLI-g Single Cell Kit is intended for molecular biology applications. This product is not intended for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.

## Equipment and reagents

When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate safety data sheets (SDSs), available from the product supplier.

- Water bath, thermal cycler, or heating block
- Vortexer
- Microcentrifuge tubes
- Microcentrifuge
- Ice
- Pipets and pipet tips
- Nuclease-free water
- TE buffer (10 mM Tris-Cl; 1 mM EDTA, pH 8.0)
- Swabs, such as sterile Omni Swabs (available from Whatman) or Puritan applicators with plastic shafts and cotton or Dacron tips (available from Hardwood Products)\*

\* This is not a complete list of suppliers and does not include many important vendors of biological supplies.



---

Sample & Assay Technologies

## Important points before starting

- To collect a sample, scrape a fresh swab firmly against the inside of each cheek 6 times. Ensure that the person providing the sample has not consumed any food or drink in the 30 minutes prior to sample collection.
- Do not store the swab due to bacterial growth and human DNA degradation.
- DNA yields of approximately 40 µg will be present in negative (no template) controls because DNA is generated during the REPLI-g Single Cell reaction by primer-multimer formation, generating high-molecular weight DNA. This DNA will not affect the quality of the actual sample and will not give a positive result in downstream assays.

## Things to do before starting

- Prepare Buffer DLB by adding 500 µl H<sub>2</sub>O sc to the tube provided. Mix thoroughly and centrifuge briefly.  
**Note:** Reconstituted Buffer DLB can be stored for 6 months at –20°C. Buffer DLB is pH-labile.
- REPLI-g sc DNA Polymerase should be thawed on ice (see step 5). All other components can be thawed at room temperature (15–25°C).
- All buffers and reagents should be vortexed before use to ensure thorough mixing.
- Set a water bath or heating block to 30°C.

## Procedure

1. **Prepare sufficient Buffer D2 (denaturation buffer) for the total number of whole genome amplification reactions (Table 1).**

**Note:** The total volume of Buffer D2 given in Table 1 is suitable for up to 12 reactions.

**Table 1. Preparation of Buffer D2**

Component	Volume*
DTT, 1M	3 µl
Reconstituted Buffer DLB <sup>†</sup>	33 µl
<b>Total volume</b>	<b>36 µl</b>

\* Volumes given are suitable for up to 12 reactions. Excess Buffer D2 can be stored at –20°C for up to 3 months.

<sup>†</sup> Reconstitution of Buffer DLB is described in “Things to do before starting”.

2. **Place the swab in a 1.5 ml microcentrifuge tube. Add 1 ml TE buffer and vortex for 10 s.**

**Note:** If using an Omni Swab, eject the swab head by pressing the end of the inner shaft towards the swab head. If using a cotton or Dacron swab, separate the swab head from its shaft by hand or with scissors.

3. **Remove the swab from the microcentrifuge tube using forceps. Squeeze as much liquid as possible out of the swab by pushing the swab against the side of the microcentrifuge tube.**

**IMPORTANT:** The swab must be removed from the microcentrifuge tube prior to cell lysis (step 5).

4. Centrifuge the microcentrifuge tube containing buccal cells at maximum speed for 10 s. Discard the supernatant and wash the buccal cells by resuspending the pellet in 1 ml TE buffer and vortexing for 1 min.
5. Centrifuge the microcentrifuge tube containing buccal cells at maximum speed for 10 s. Discard the supernatant and resuspend the buccal cell pellet in 30  $\mu$ l TE buffer.
6. Transfer 3  $\mu$ l of resuspended buccal cells into a new microcentrifuge tube.
7. Add 3.5  $\mu$ l Buffer D2 to the resuspended buccal cells and mix by pipetting up and down 3 times. Place the microcentrifuge tube on ice for 10 min.
8. Add 3.5  $\mu$ l Stop Solution to each microcentrifuge tube containing lysed buccal cells and mix briefly by pipetting up and down 3 times.
9. Thaw REPLI-g sc DNA Polymerase on ice. Thaw all other components at room temperature, vortex, and centrifuge briefly.

The REPLI-g sc Reaction Buffer may form a precipitate after thawing. The precipitate will dissolve by vortexing for 10 s.

10. Prepare a master mix on ice according to Table 2. Mix and centrifuge briefly.

**IMPORTANT:** Add the master mix components in the order listed in Table 2. After addition of water and REPLI-g sc Reaction Buffer, briefly vortex and centrifuge the mixture before the addition of REPLI-g sc DNA Polymerase. The master mix should be kept on ice and used immediately upon addition of the REPLI-g sc DNA Polymerase.

**Table 2. Preparation of master mix**

Component	Volume*
H <sub>2</sub> O sc	9 $\mu$ l
REPLI-g sc Reaction Buffer	29 $\mu$ l
REPLI-g sc DNA Polymerase	2 $\mu$ l
<b>Total volume</b>	<b>40 <math>\mu</math>l</b>

11. Add 40  $\mu$ l master mix to 10  $\mu$ l lysed and neutralized buccal cells (step 8).
12. Incubate at 30°C for 8 h.  
After incubation, heat the water bath or heating block to 65°C if the same water bath or heating block will be used in step 13.
13. Inactivate REPLI-g sc DNA Polymerase by heating the sample at 65°C for 3 min.
14. If not being used directly, store amplified DNA at 4°C for short-term storage or -20°C for long-term storage.

15. DNA amplified using the REPLI-g Single Cell Kit should be treated as genomic DNA with minimal freeze-thaw cycles. We therefore recommend storage of nucleic acids at a concentration of at least 100 ng/µl.

16. Amplified DNA can be used in a variety of downstream applications, including next-generation sequencing, array CGH, and quantitative PCR.

**Note:** Typical DNA yields are approximately 40 µg per 50 µl reaction and should be diluted appropriately. Optical density (OD) measurements overestimate REPLI-g amplified DNA. Refer to Appendix B of the *REPLI-g Single Cell Kit Handbook*, page 22, for an accurate method of quantifying REPLI-g amplified DNA.

**Note:** Purification of REPLI-g SC amplified DNA is only necessary when performing labeling reactions, for example, array comparative genomic hybridization (CGH). To purify REPLI-g SC amplified DNA follow the Supplementary Protocol "Purification of DNA amplified using REPLI-g Kits" (RG21).

17. Use the correct amount of REPLI-g amplified DNA diluted in water or TE buffer according to the manufacturer's instructions. If performing PCR analysis, dilute an aliquot of amplified DNA 1:100 and use 2 µl of diluted DNA for each PCR reaction.

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual. QIAGEN kit handbooks and user manuals are available at [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) or can be requested from QIAGEN Technical Services or your local distributor.

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, REPLI-g® (QIAGEN Group); Dacron® (E. I. du Pont de Nemours and Company); Puritan® (Hardwood Products Company); Whatman® (Whatman International Ltd.).  
RG28 Feb-13 © 2013 QIAGEN, all rights reserved.

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

Australia ■ 1-800-243-800

Austria ■ 0800/281010

Belgium ■ 0800-79612

Canada ■ 800-572-9613

China ■ 021-51345678

Denmark ■ 80-885945

Finland ■ 0800-914416

France ■ 01-60-920-930

Germany ■ 02103-29-12000

Hong Kong ■ 800 933 965

Ireland ■ 1800 555 049

Italy ■ 800 787980

Japan ■ 03-5547-0811

Korea (South) ■ 1544 7145

Luxembourg ■ 8002 2076

The Netherlands ■ 0800 0229592

Norway ■ 800-18859

Singapore ■ 65-67775366

Spain ■ 91-630-7050

Sweden ■ 020-790282

Switzerland ■ 055-254-22-11

UK ■ 01293-422-911

USA ■ 800-426-8157



Sample & Assay Technologies

# Primers design and sequence analysis

**Master in Drug Evaluation and  
Development**

Specialization in Design,  
Preparation and Evaluation of  
Drugs

**Pharmacogenomic**





## PRIMERS DESIGN AND SEQUENCE ANALYSIS

### Amplicon Characteristics

- Size: the shorter the better. To seek 70 bp (Taqman) and 130 bp (SYBR-Green I)  $\approx$ 100 bp work well in both techniques. SYBR-Green I, up 400 bp work fine.
- Melting temperature (MT): 92-95°C to polymerize in short times
- Located near 3' (sequences more completed)
- Located near 5' (sequences more abundant)
- Between exon-intron-exon junction (avoid genomic DNA contamination)

### Primer Desing

- Software: PrimerExpress.
- On-line: (IDT, <http://eu.idtdna.com/Scitools>)
- Sequence: 20-24 n (18-30 n), GC 20-80% (40-60%). No more than 2G and/or 2C in the sequence of the last 5 nucleotides at 3'.
- Primer specificity: Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
- MT: 58-60°C ( $\pm$ 1 or 2°C between primers). Formula to calculate MT (17-25 bp oligomers)  $MT (^{\circ}C) = 4 \times (\text{number of GC}) + 2 \times (\text{number of AT})$
- Reaction concentration: 50-200 nM. Higher concentrations could produce nonspecific amplifications. Lower concentrations would give weaker signals but without other nonspecific problems.

### Taqman Probes Design

- Lenght  $\approx$ 30 n
- MT= 10°C more than MT of the primers to annealing before them. Design close to 3' extreme of F (<30-40 pb, optimal distance to be hydrolyze by polymerase).
- Avoid a G at 5' due to quenching problems
- No more than 3 equal followed bases
- GC  $\approx$  50%. If GC>50% and G>C then choose the complementary strand
- Avoid the formation of loops (complementary ends)
- Reaction concentration: 250 nM (primers at 900 nM)

### Links to evaluate your oligos online

Primer Analyzer

<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>

Blast

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Nucleotides

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM\\_021977.3](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_021977.3)



## DISEÑO DE PRIMERS Y ANALISIS DE SECUENCIAS

### RECOMENDACIONES PARA EL DISEÑO DE PRIMERS Y SONDAS

#### Elección del amplicón

Longitud: Mejor más cortos

- Asegura desnaturalización completa a 92-95°C
- Tiempos cortos de polimerización
- Mayor tolerancia a variables de la reacción
- Se buscan de 70 bp (para Taqman) y 130 (SYBR-Green I)
- ≈100 bp funcionan bien para ambas técnicas
- Con SYBR-Green I, funcionan bien hasta 400 bp

Situación:

- Cerca de 3' (secuencias más completas)
- Cerca de 5' (secuencias más abundantes)
- Uniones exón-intrón-exón (descarta contaminación con DNA genómico)

#### Diseño de los primers

Diseño:

- Software de diseño (PrimerExpress)
- Diseño on-line (IDT, <http://eu.idtdna.com/Scitools>)

Secuencia:

- 20-24 n (18-30 n)
- GC 20-80% (40-60%)
- Los últimos 5 nucleótidos del extremo 3' no debería tener más de 2G y/o 2C
- Procurar que no haya G o C en el extremo 3'

Especificidad:

- Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

TM:

- 58-60°C ( ±1 o 2°C uno de otro)
- Para oligómeros de 17-25 pares de bases
- $T_m (^{\circ}C) = 4 \times (\text{Número de GC}) + 2 \times (\text{Número de AT})$

Concentración en la reacción:

- 50-200 nM
- Más altas pueden causar amplificaciones inespecíficas
- Más bajas se obtiene menos señal pero no suelen ser problemáticas, ya que lo cálculos se hacen antes de que se agoten los primers

#### Diseño de Sondas Taqman

Longitud ≈30 n

- $T_m = 10^{\circ}C$  más de la  $T_m$  de los primers. Asegura la hibridación antes que ellos
- Lo más cerca posible del 3' del primer F (<30-40 pb). Asegura que se hidroliza antes de liberarse el enzima
- NO poner una G en 5' pues se "quenchea" al reporter incluso una vez hidrolizado
- No más de tres bases seguidas iguales
- GC ≈ 50%. Si GC>50% y G>C; mejor elegir la complementaria
- Evitar la formación de bucles (extremos complementarios)

Concentración en la reacción:

- 250 nM (los primers a 900 nM)

#### Links para evaluación online

Primer Analyzer

<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>

Blast

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Nucleotidos

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM\\_021977.3](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_021977.3)



1 GGGTCACTCC GAGGCGCGGG CTGCGGGCGG CGGGCGGCGG GCGCACC ATG CCC TCC TTC GAC GAG GCG CTG CAG CGG GTG GGC GAG  
87 TTC GGG CGC TTC CAG AGG CGC GTG TTT TTG CTG CTG TGC CTG ACG GGC GTC ACC TTC GCC TTC CTC TTC GTC GGC GTG  
14▶ F G R F Q R R V F L L L C L T G V T F A F L F V G V  
165 GTC TTC CTG GGC ACG CAG CCC GAC CAC TAC TGG TGC CGC GGG CCA AGT GCC GCG GCG CTG GCC GAG CGC TGC GGC TGG  
40▶ V F L G T Q P D H Y W C R G P S A A A A L A E R C G W  
243 AGC CCG GAG GAG GAG TGG AAC CGC ACG GCG CCC GCC TCC CGC GGC CCA GAG CCC CCC GAG CGC GGC CGC TGC CAG  
66▶ S P E E E W N R T A P A S R G P E P P E R R G R C Q  
321 CGC TAC CTC CTG GAG GCG GCC AAC GAC AGC GCC TCC GCC ACT AGC GCT CTC AGC TGC GCG GAC CCA CTC GCC GCC TTC  
92▶ R Y L L E A A N D S A S A T S A L S C A D P L A A F  
399 CCC AAC CGC TCG GCT CCC CTT GTG CCG TGC CGC GGC GGC TGG CGC TAC GCC CAG GCC CAC TCC ACC ATC GTC AGC GAG  
118▶ P N R S A P L V P C R G G W R Y A Q A H S T I V S E  
477 TTT GAC CTT GTC TGT GTC AAT GCG TGG ATG CTG GAC CTC ACC CAA GCC ATC CTG AAC CTC GGC TTC CTG ACT GGA GCA  
144▶ F D L V C V N A W M L D L T Q A I L N L G F L T G A  
555 TTC ACC TTA GGC TAT GCA GCA GAC AGG TAT GGC AGG ATC GTC ATT TAC TTG CTA TCC TGC CTT GGT GTT GGC GTC ACT  
170▶ F T L G Y A A D R Y G R I V I Y L L S C L G V G V T  
633 GGG GTT GTG GTG GCC TTT GCA CCA AAC TTC CCT GTG TTT GTG ATC TTC CGC TTC CTG CAA GGT GTA TTT GGA AAG GGG  
196▶ G V F V A F A P N F P V F V I F R F L Q G V F G K G  
711 ACG TGG ATG ACT TGC TAC GTG ATT GTG ACA GAA ATA GTA GGT TCG AAA CAA AGG AGG ATT GTG GGA ATC GTG ATT CAA  
222▶ T W M T C Y V I V T E I V G S K Q R R I V G I V I Q  
789 ATG TTC TTT ACC CTT GGA ATC ATA ATT CTC CCT GGA ATT GCC TAC TTC ATC CCC AAC TGG CAA GGA ATC CAG TTA GCC  
248▶ M F F T L G I I I L P G I A Y F I P N W Q G I Q L A  
867 ATC ACG CTG CCC AGC TTT CTC TTC CTC CTT TAT TAC TGG GTG GTC CCT GAG TCT CCC CGT TGG CTG ATT ACT CGG AAG  
274▶ I T L P S F L F L L Y Y W V V P E S P R W L I T R K  
945 AAA GGA GAT AAA GCA TTA CAG ATC CTG AGA CGC ATT GCT AAG TGC AAT GGG AAA TAC CTC TCA TCA AAT TAC TCA GAG  
300▶ K G D K A L Q I L R R I A K C N G K Y L S S N Y S E  
1023 ATC ACT GTT ACA GAT GAG GAA GTT AGT AAT CCA TCC TTT TTA GAT CTG GTG AGA ACT CCC CAA ATG AGG AAA TGG ACA  
326▶ I T V T D E E V S N P S F L D L V R T P Q M R K C T  
1101 CTT ATT CTT ATG TTT GCT TGG TTC ACA AGC GCA GTG GTG TAT CAA GGA CTT GTC ATG CGC CTG GGA ATT ATA GGG GGC  
352▶ L I L M F A W F T S A V V Y Q G L V M R L G I I G G  
1179 AAC CTC TAT ATA GAC TTT TTC ATC TCG GGC GTG GTG GAA CTG CCA GGA GCT CTC TTG ATC TTA CTA ACC ATT GAG CGC  
378▶ N L Y I D F F I S G V V E L P G A L L I L L T I E R  
1257 CTT GGA CGA CGC CTC CCC TTT GCG GCA AGC AAT ATA GTG GCA GGG GTG GCA TGC CTT GTC ACT GCG TTC TTA CCA GAA  
404▶ L G R R L P F A A S N I V A G V A C L V T A F L P E  
1335 GGA ATA GCA TGG TTG AGG ACC ACA GTG GCT ACA TTG GGA AGA CTA GGG ATA ACC ATG GCC TTT GAA ATT GTT TAT TTG  
430▶ G I A W L R T T V A T L G R L G I C T M A F E I V Y L  
1413 GTA AAT TCA GAA TTG TAC CCA ACA ACA TTA CGA AAT TTC GGA GTT TCG CTG TGT TCA GGT CTG GTG GAT TTT GGG GGA  
456▶ V N S E L Y P T T L R N F G V S L C S G L C D F G G  
1491 ATC ATA GCC CCA TTT CTG CTC TTT CGG CTA GCA GCC GTG TGG CTA GAA CTA CCT CTG ATC ATC TTT GGT ATC CTG GCA  
482▶ I I A P F L L F R L A A V W L E L P L I I F G I L A  
1569 TCC ATC TGT GGT GGC CTT GTG ATG CTT TTG CCT GAA ACC AAG GGT ATT GCC TTG CCA GAG ACA GTG GAT GAT GTA GAA  
508▶ S I C G G L V M L L P E T K G I A L P E T V D D V E  
1647 AAA CTT GGC AGT CCA CAT TCC TGT AAA TGT GGC AGG AAT AAG AAA ACC CCA GTT TCC CGC TCT CAC CTT TGA  
534▶ K L G S P H S C K C G R N K K T P V S R S H L  
1719 GGCCCCGAC AAAGACAGAA AGAAGGAGCT ATCCAGGAGC TGATCCTCCT TGCAAAGCTG TGCCTTGACG AGATGCACGT GTGCATTTCA  
1809 GCTACATCAT GCCGCGCTGT TGTAATACTG TATAAAGACC TCAATCTATC CAGAGTATTT TTATATAATG TTGGATGAGT TAGGATTTGT  
1899 AATGCTGTTG AAGTTTCTGG GAACACATAA TATGTAGCCA GTTTAACAAA GAAGCTGTCA GGTGCACAGC CCTTCTGGG TTTTTTCTT  
1989 GTGTTCCCTG TGGTCTCTGA CCCATTAGGC TAAAGAGAGA CAAGAGAAGC CCCAACCTG ATTCTCATGA CAGCTCCATC AAGAATGTGG  
2079 GATGTGCCGA CCAAGGATTT GAGAAAGTTG TACAGAAATG TGTTTCATCAA ATCTGTGTC AA GGGACTAAGC TCCTAGCTGA CCATTCATTC  
2169 TGAAGATTGC ATGGAGGATG AACATCTGGG AATCCTGTTA ATGAGAAGGC TGAATCACAG GCACCTGGGC CAAAGGGTGT GAGCATTATC  
2259 GTTCTCTGCT CACCTTGTT TCCGCACACC TTCGCAATGT GAACAGGTCA GGAGTCCCTC CCGTCCACCT CCTCTGTAAC AGCTGGGGTT  
2349 CCAGGCATGG TTTAGGCCCT GTTCCAGCAA TAAGAACCAA TCTGCTGTAC AATCTGAGGA CTTGGCTCTG TTATTTACAA AATGATGCTG  
2439 TGGTTCTGAG ATTATTTGGG ACATTTTTGG CTCTCCTTTA GTGACACCT AGAGCCACAG ATTCCTTCT TFACTAAACA AATCCCATGG  
2529 ATTCTGATTT CTGGGTCTTA GGATTTTAAA AGTGAAGGGA TATTTTTCTT ATATTTGTGA GTTCAGTTCC GATGTGTCCT GTGGTCAAAA  
2619 GCGAAAAACA TGGACAATTC CTATTCATTC TTAGCACTTT GACATGTCTT GGGGAAAAGC TTACATTTTA ATTTAAAAGA AAGATCAATT  
2709 ATATCCATGC TTAACAGGAT CAGCAGGAGC TTTATAAATG ACTTTACAGA GACTAATAAG GGATTTGATC TTTCTTTTTT TGTTATCGAG  
2799 GCTTTTGA AA TGTGAACTT GTGTGTTCTG CTTTATATGT TATATTCAAT ATCTTTTCAG ATGCAGTCTA TATTTTATGC TGAGTTTTAA  
2889 AAATGAAATA CTTTATGCAA ACAGGCAAAA TTGGTACCAA AGGGAAACAT TAACCATGAG GAAGAGCATT TTTCTAAGGA GAACAGGTGA  
2979 CAATATACAC ATGTGCGCTA ATCGTAAAAT GAGCATCTTA GTCTTTAAAA CACATCAGAA TTGAATACGA ATAATCTATT TGTCGATGAA  
3069 ATAAACACAA CTCTTTGAGG ATTTGAGACT ACATTCACCC TTTATTACA GTCACCTGCA GTTTTGCTTT TCTCTGCATT TCTCTGCTGT  
3159 AAGATGACTG TTGCAATTGTT GAATTGTATT TTGAGTGGAT ATTTTTGTTT GGTAACAATT AAAATTTTAA ATCGTAAAAA ATGAAAA



# **DNA cloning using Gateway Technology and in vitro transfection of mammalian cells**

**Master in Drug Evaluation and  
Development**

Specialization in Design,  
Preparation and Evaluation of  
Drugs

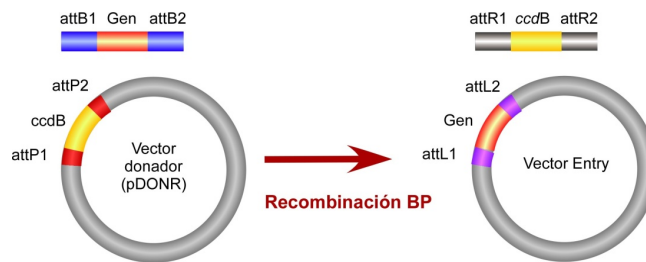
**Pharmacogenomic**



## GATEWAY CLONING TECHNOLOGY

The GATEWAY Cloning Technology is based on the site-specific recombination system used by phage lambda to integrate its DNA in the E. coli chromosome. Both organisms have specific recombination sites called attP in phage lambda site and attB in E. coli. The integration process is catalyzed by 2 enzymes and upon integration, the recombination between attB (25 nt) and attP (243 nt) sites generate attL (100 nt) and attR (168 nt) sites that flank the integrated phage lambda DNA

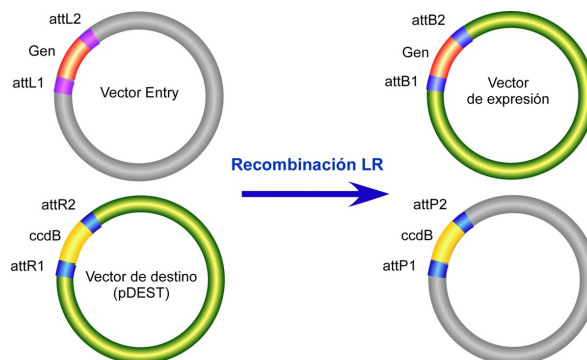
The GATEWAY reactions are in vitro versions of the integration and excision reactions. To make the reactions directional two slightly different and specific site were developed, att1 and att2 for each recombination site. These sites react very specifically with each other. For instance in the BP Reaction attB1 only reacts with attP1 resulting in attL1 and attR1, and attB2 only with attP2 giving attL2 and attR2. The reverse reaction (LR Reaction) shows the same specificity. The process is reversible.



The ultimate goal of the GATEWAY reactions is to make an expression clone. This is often a two step process:

Step 1 Cloning the gene of interest into an Entry Vector using the BP Reaction and a Donor Vector (pDONR)

Step 2 Subcloning the gene of interest from the Entry Clone (Step 1) into a Destination Vector p(DEST) using the LR Reaction producing the Expression Clone.

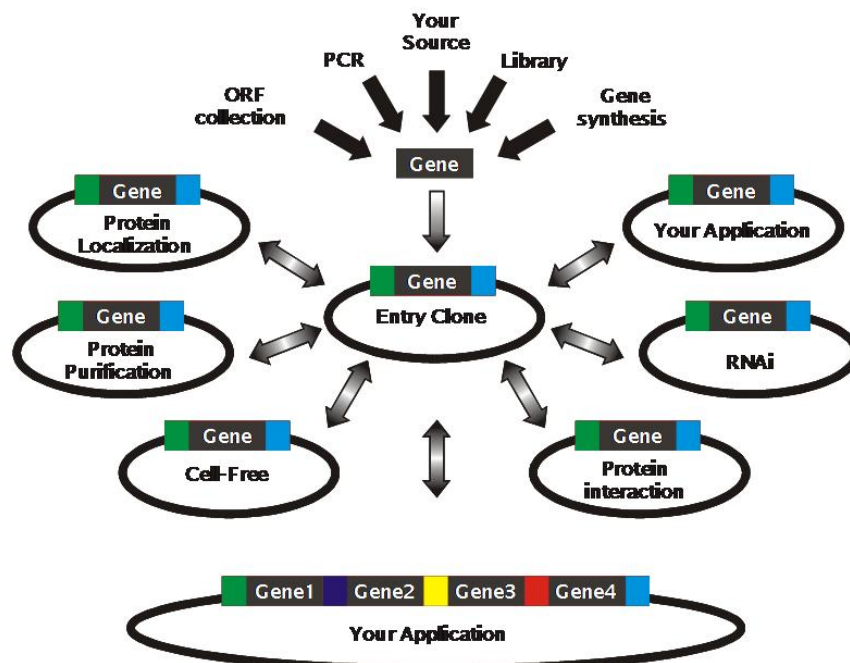


The gene of interest is cloned into an Entry Vector and flanked by the attL1 and attL2 recombination sites. The Entry Vector is transcriptionally silent and contains the gene for kanamycin resistance (Kmr). To produce the Expression Clone the gene has to be subcloned into a Destination Vector that contains all the sequence information necessary for expression, the gene for ampicillin resistance (Apr), and two recombination sites (attR1 and attR2) that flank a gene for negative selection, ccdB (the encoded protein is toxic for the standard E. coli strains).

### GATEWAY CLONING ADVANTAGES VS CLASSIC CLONING

Gateway recombination cloning uses a one hour reversible recombination reaction, without using restriction enzymes, ligase, subcloning steps, or screening of countless colonies, thereby saving you time, money, and effort. Benefits include:

- 95% cloning efficiency delivers the clone you need
- Maintain orientation and reading frame throughout cloning process
- Efficient cloning of single fragments into multiple vectors simultaneously
- Flexibility to clone multiple gene fragments into a single construct
- Enter the Gateway platform via TOPO™ cloning vectors containing Gateway att-sites or purchase an Ultimate™ ORF Clone already inserted into a Gateway vector
- New advancements such as MultiSite Gateway Technology make Gateway cloning the ideal cloning method for protein expression and functional analysis.





### **GATEWAY CLONING: LR reaction**

Reaction 1 – pEntry-OATP1B1 + Destination Vector (pDEST) with the *reporter gene* GFP = Expression Vector OATP1B1-GFP

Reaction 2 – pEntry-FXR + Destination Vector pDEST-Tomato = Expression Vector FXR-Tomato

	<b>Reacción 1</b>	<b>Reacción 2</b>
Plasmid pEntry-OATP1B1	20 fmol =                      μl	
Plasmid pEntry-FXR		20 fmol =                      μl
Destination Vector pDEST-GFP	20 fmol =                      μl	20 fmol =                      μl
Clonase enzyme LR	4 μl	4 μl
Buffer TE pH 8	To reach 20 μl =              μl	To reach 20 μl =              μl

25°C during 30 min

Enzyme inactivation 10 min at 60°C.

### **Bacterial Transformation Using Heat Shock and Competent Cells**

Material: *E. coli* DH5α

Ice and thermal block 42°C

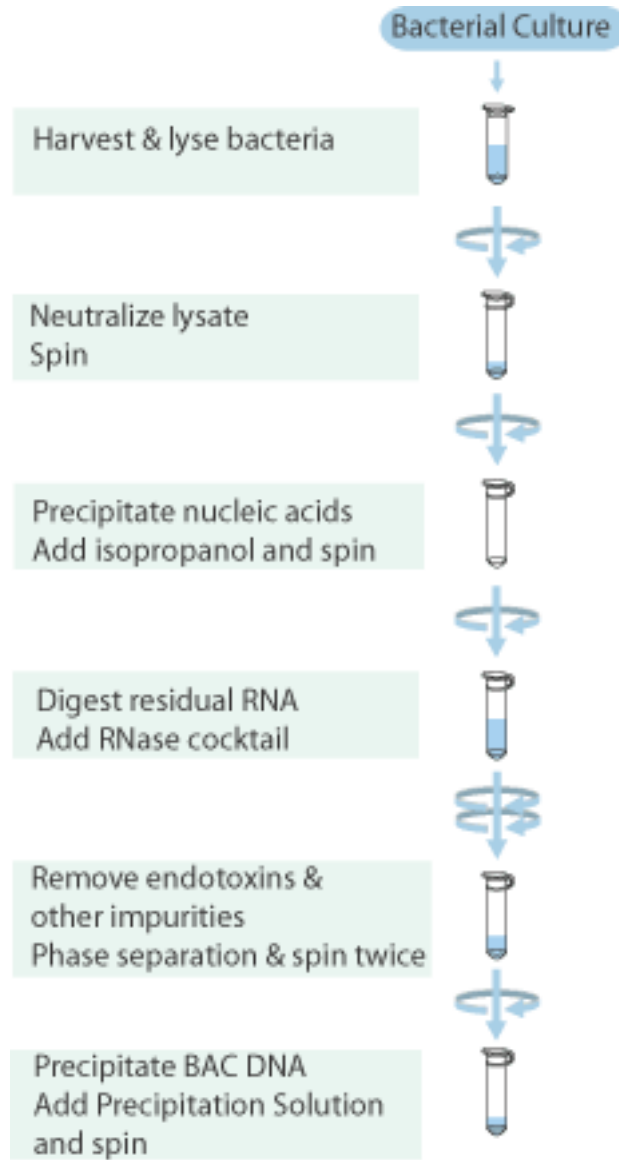
SOC medium at room temperature

LB-agar plates with ampicilin

#### Protocol

1. Take competent *E. coli* cells from –80°C freezer.
2. Put competent cells in a 1.5 ml tube (eppendorf or similar) on ice. For transforming a DNA construct, use 50 μl of competent cells and 5 μl of plasmid.
3. Keep tubes on ice.
4. Put tube with DNA and DH5α into water bath at 42°C for 2 min.
5. Put tubes back on ice for 2 minutes to reduce damage to the *E. coli* cells.
6. Add 500 μl of SOC medium and incubate tubes at 37°C
7. Spread about 100 μl of the resulting culture on LB plates (with appropriate antibiotic added – usually Ampicillin or Kanamycin.).
8. Grow overnight.
9. Pick colonies about 12-16 hours later

### GenElute™ Plasmid Miniprep Kit

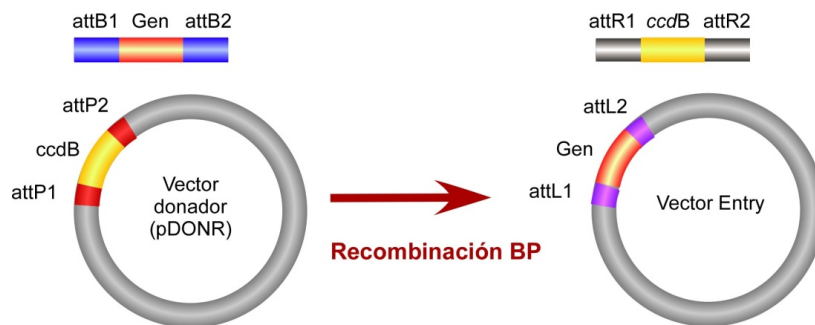




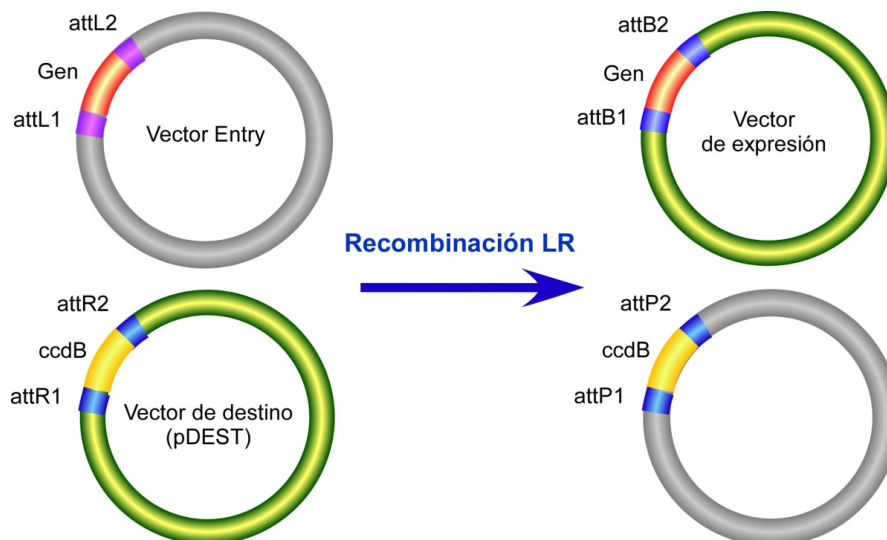
## TÉCNICAS DE CLONACIÓN: RECOMBINACIÓN GATEWAY

Es una tecnología de clonación altamente eficaz para clonar de manera direccional fragmentos de ADN. Está basada en el sistema de recombinación del fago lambda y permite la transferencia de fragmentos de ADN entre diferentes vectores manteniendo la orientación y la secuencia de lectura con respecto a los tripletes. Las reacciones de recombinación Gateway son versiones “in vitro” de las reacciones de integración y escisión del fago lambda.

La reacción BP es aquella en la que un vector donador (pDONR), con sitios attP, reacciona con un fragmento de ADN flanqueado por sitios attB, para dar lugar a un vector denominado “Entry”, con sitios attL, y un producto secundario con sitios attR. Los sitios att confieren direccionalidad y especificidad a la reacción.



La reacción LR es aquella en la que un vector “Entry”, con el ADN de interés flanqueado por sitios attL, reacciona con un vector de destino, con sitios attR, para dar lugar a un vector útil para ser empleado en el sistema de expresión correspondiente.

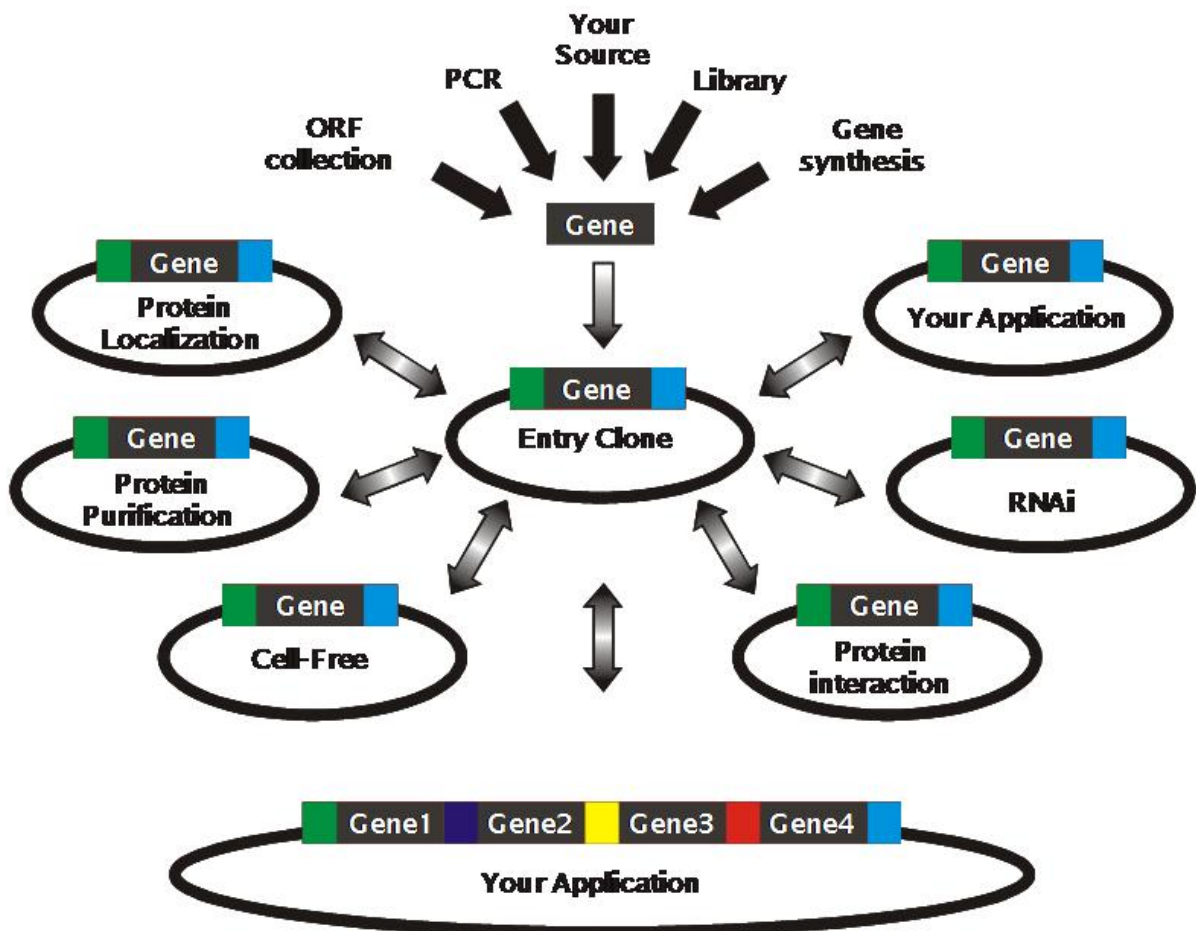






## VENTAJAS DE LA CLONACIÓN GATEWAY FRENTE A CLONACIÓN CLÁSICA

- Mayor rapidez y eficacia que los procedimientos tradicionales que requieren reacciones de ligación o tratamiento con enzimas de restricción
- Transferencia de uno o más genes en uno o más vectores en un solo ensayo
- Cualquier vector puede convertirse en Gateway-compatible
- Sin enzimas de restricción
- Sin purificación por gel
- Sin reacciones de ligación





## **CLONACIÓN GATEWAY: Reacción LR**

Reacción 1 – pEntry-OATP1B1 + Vector de destino (pDEST) con el gen *reporter* GFP = Vector de expresión OATP1B1-GFP

Reacción 2 – pEntry-FXR + Vector de destino pDEST-Tomato = Vector de expresión FXR-Tomato

	<b>Reacción 1</b>	<b>Reacción 2</b>
Plásmido pEntry-OATP1B1	20 fmol =                      μl	
Plásmido pEntry-FXR		20 fmol =                      μl
Vector de destino pDEST-GFP	20 fmol =                      μl	20 fmol =                      μl
Enzima clonasa LR	4 μl	4 μl
Buffer TE de pH 8	hasta 20 μl =                      μl	hasta 20 μl =                      μl

Reacción a 25°C durante 30 min

Inactivación enzimática 10 min a 60°C.

## **TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS POR CHOQUE TÉRMICO**

Material necesario: Un vial de bacterias *E. coli* DH5α

Hielo y bloque térmico a 42°C

Medio SOC a temperatura ambiente

Placas de LB-agar con ampicilina

### Protocolo experimental

1. Descongelar lentamente las bacterias sobre hielo
2. En un tubo de 1,5 ml añadir 50 μl de bacterias y 5 μl de plásmido
3. Incubar la mezcla sobre hielo
4. Para facilitar la internalización del plásmido, se somete a las bacterias a un choque térmico que consiste en elevar la temperatura y bajarla rápidamente. Se incuban a 42°C durante 2 min y se enfrían en hielo durante 2 min
5. Añadir 500 μl de medio SOC
6. Incubar en la estufa en agitación a 37°C
7. Sembrar las bacterias en placas de LB+ampicilina, incubación *overnight* 37°C.



## **CRECIMIENTO DE CLONES DE BACTERIAS EN MEDIO LÍQUIDO**

Se parte de placas de bacterias que han crecido durante la noche anterior.

Picar una colonia individual (sin colonias satélites) con una punta estéril e introducirla en un tubo ventilado que contenga 6 ml de LB+ampicilina (100 µg/ml).

Incubación overnight en agitación a 37°C.

## **EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO A PARTIR DE UN CULTIVO BACTERIANO**

- Se utiliza un kit comercial, que se basa en aplicar el lisado de bacterias obtenido en condiciones alcalinas sobre una membrana de gel de sílice.
- El precipitado de bacterias se resuspende en un tampón que contiene RNasa A, para eliminar el ARN bacteriano.
- A continuación, las bacterias se lisan con una solución detergente alcalina.
- El ADN cromosómico, las proteínas y los restos celulares se precipitan con una solución ácida, que contiene sales caotrópicas y ácido acético. También se neutraliza el pH del lisado y se ajustan las condiciones de alta salinidad adecuadas para la adsorción del ADN.
- Después de centrifugar el lisado, se añade el sobrenadante a la columna y tras lavar la membrana, el ADN plasmídico se eluye en condiciones de baja salinidad, en tampón TE de pH 8,0.



## TRANSFECTION TECHNIQUES

### INTRODUCTION

A stably-transfected cell will continuously express a transgene of interest, which usually integrates into cell genome, and pass it on to daughter cells, while a transiently-transfected cell will express transfected extrachromosomal DNA for a short amount of time and not pass it on to daughter cells. There are various methods of introducing foreign DNA into a eukaryotic cell: some rely on physical treatment (electroporation); chemical materials (Lipofectamine, polyethylenimine or PEI) or biological particles (viruses) that are used as carriers.

### AIMS

- To perform a transiently transfection on mammalian cells (HEK293 or CHO-K1) with plasmids containing ORF of the human farnesoid X receptor FXR and of the human drug transport protein OATP1B1.
- To analyse the protein expression of the genes of interest using fluorescence microscopy. Reporter genes: tdTomato (orange fluorescence) and eGFP (green fluorescence).

### METHODS

#### MATERIAL

- CHO-K1: cell line from hamster ovary
- Culture medium DMEM with glutamine, proline, antibiotics (1% vol/vol) and inactivate FCS 10%
- Polyethylenimine (PEI): 1 mg/ml PEI
- Sterile saline solution
- DNA to use in transfection

DNA (ng/ $\mu$ l)	Plasmid
100	pEXP-FXR-Tomato
100	pEXP-OATP1B1-eGFP

#### PROCEDURE

- 1- 24 h before transfection, cells were seed at 50.000 cells/well. Before perform transfection it should be checked culture density (about 50-80% confluence is recommended).
- 2- For each transfection reaction pipette in a sterile 1.5 ml tube:

Reagent	x 1
Sterile saline solution	60 $\mu$ l
Plasmid DNA	500 ng (5 $\mu$ l)
PEI	2 $\mu$ l
Incubation at room temperature 20 minutes	

- 3- During the 20 min incubation, add fresh medium to the culture (500  $\mu$ l/well).
- 4- Add transfection mixture to each well
- 5- 24 hours later remove transfection complexes and add fresh medium
- 6- 48 hours after transfection observe the fluorescence and determine the transfection efficacy



## TÉCNICAS DE TRANSFECCIÓN

### INTRODUCCIÓN

La adquisición de un transgén de interés por parte de una célula puede ser transitoria o estable. En el primer caso, el plásmido recombinante es extracromosómico y se pierde durante la división, mientras que en el segundo caso se integra en el genoma de la célula y se replica en cada división celular. Los métodos de transfección para introducir DNA en células eucariotas pueden ser físicos (ej. electroporación), químicos (ej. Lipofectamina, polietilenimina o PEI) o biológicos (ej. virus).

### OBJETIVO

- Transfectar de forma transitoria células de mamífero (células HEK293 o CHO-K1) con plásmidos que contienen la secuencia codificante de un receptor nuclear (FXR) o de una proteína de captación de fármacos (OATP1B1).
- Determinar la expresión de las proteínas mediante la visualización de la fluorescencia debida a la expresión de genes *reporter* fluorescentes (tdTomato, de fluorescencia naranja, y eGFP, de fluorescencia verde).

### METODOLOGÍA

#### MATERIAL

- Línea celular de ovario de hámster chino (CHO-K1)
- Medio de cultivo DMEM suplementado con glutamina, prolina, mezcla de antibióticos (1% vol/vol) y FCS inactivado 10%
- Polietilenimina (PEI): 1 mg/ml PEI
- Solución salina estéril
- DNA para la transfección

DNA (ng/ $\mu$ l)	Construcción
100	pEXP-FXR-Tomato
100	pEXP-OATP1B1-GFP

#### PROCEDIMIENTO

- 1- Las placas de 24 pocillos se han sembrado 24 horas antes a una densidad de 50.000 células/pocillo. Comprobar que la confluencia del cultivo está entre 50-80%
- 2- Para cada transfección pipetear:

Reactivo	x 1
Solución salina estéril	60 $\mu$ l
DNA plasmídico	500 ng (5 $\mu$ l)
PEI	2 $\mu$ l
Incubar 20 minutos	

- 3- Añadir la mezcla final a los pocillos correspondientes, sobre los cuales se habían añadido previamente 500  $\mu$ l de medio de cultivo.
- 4- 24 horas después de la transfección retirar los complejos y añadir 500  $\mu$ l de medio de cultivo fresco
- 5- Observar en el microscopio de fluorescencia si se ha producido la transfección (48 h después)

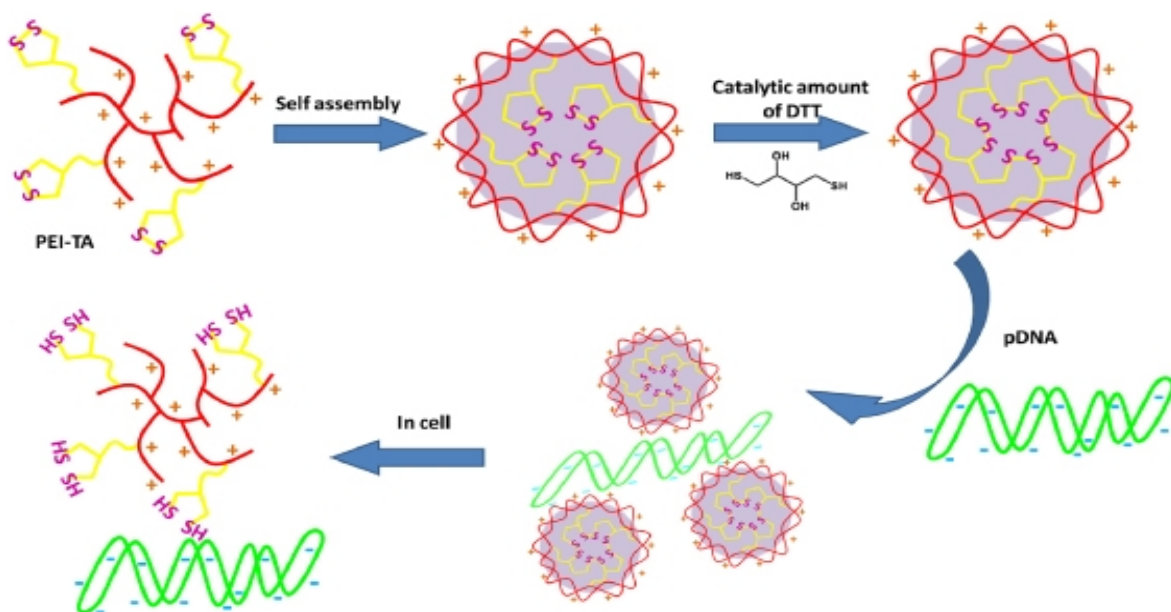


Figure 1 from Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems  
 U. Lungwitz, et al European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 60 (2005) 247–266

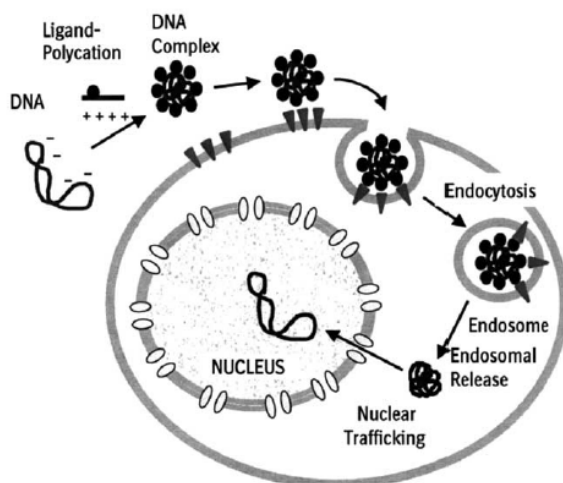
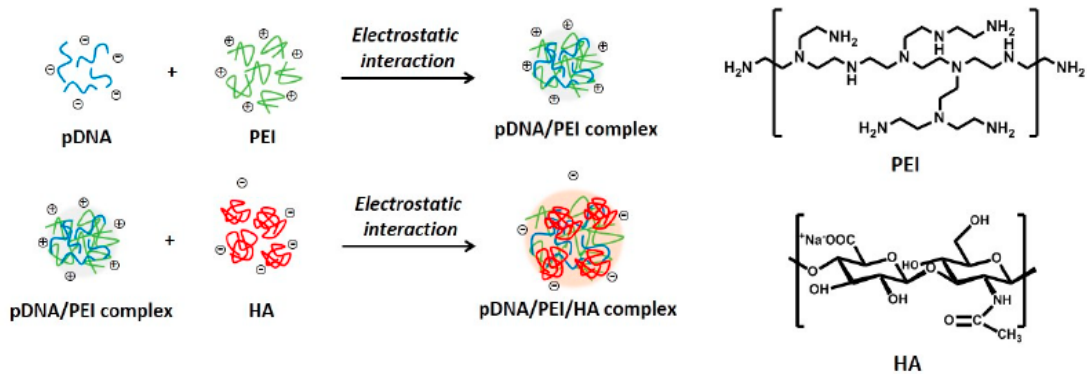


Fig. 1. General scheme of gene transfer using ligand-decorated non-viral vectors: DNA is condensed using the ligand-PEI conjugate to form ligand-decorated complexes. After their cellular uptake via receptor-mediated endocytosis, the polyplexes are entrapped in endosomes. The receptor-ligand complex dissociates from the PEI/DNA complex and the receptor is recycled to the cell surface. The polyplexes escape from endosomes into the cytoplasm and DNA crosses the nuclear envelope to accumulate in the nucleus. [Reprinted from J. Controll. Rel., 72 (2001), R. Kircheis, T. Blessing, S. Brunner, L. Wightman, E. Wagner, Tumor targeting with surface-shielded ligand-polycation DNA complexes, pp. 165–170, Copyright (2004) with permission from Elsevier].

Figure 1 from An Electrostatically Self-Assembled Ternary Nanocomplex as a Non-Viral Vector for the Delivery of Plasmid DNA into Human Adipose-Derived Stem Cells  
 Sun-Hee Cho †, Young-Woock Noh †, Mi Young Cho and Yong Taik Lim \*  
 Molecules 2016, 21, 572; doi:10.3390/molecules21050572



**Figure 1.** Schematic illustrations for the synthesis of electrostatically self-assembled pDNA/PEI/HA ternary nanocomplexes (pDNA (blue line): plasmid DNA, PEI (green line): polyethylenimine, HA (red line): hyaluronic acid).