

**DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I ANATOMIA PATOLÒGICA  
FACULTAT DE MEDICINA  
UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**PROGRAMA DE DOCTORAT  
BIOLOGIA I PATOLOGIA CEL·LULARS  
Bienni 2002-2004**



**ANÀLISI DELS MECANISMES MOLECULARS IMPLICATS EN  
EL DESENVOLUPAMENT I PROGRESSIÓ  
DELS LIMFOMES DE CÈL·LULA B PETITA**

**Tesi presentada per Verònica Fernández Pascual  
per optar al grau de Doctora en Biologia**

**Director de tesi: Dr. Elías Campo Güerri  
Tutor: Dr. Carles Enrich Bastús  
Barcelona 2008**

Any sufficiently advanced technology is indistinguishable from magic. (*Arthur C. Clarke*)

## **MATERIAL I MÈTODES**

---



# 1. TÈCNiques D'ANÀLISI DEL DESENVOLUPAMENT I PROGRESSIÓ TUMORALS

La seqüenciació sencera del genoma humà ha permès el desenvolupament d'eines moleculars que obren nous camps i possibilitats en l'estudi dels tumors humans. En el present treball s'han utilitzat principalment tres tipus de tècniques diferents:

1. Estudi de les alteracions cromosòmiques adquirides durant l'evolució tumoral: aplicació de la **hibridació genòmica comparada (CGH)**.
2. Determinació de l'adquisició d'alteracions en el material genètic (DNA): ús de la  **cromatografia líquida desnaturalitzant (DHPLC)**.
3. Anàlisi dels perfils d'expressió gènica (mRNA) durant el desenvolupament i transformació de la neoplàsia limfoide: aplicació de la **reacció en cadena de la polimerasa quantitativa a temps real (qPCR)** i realització de **microarrays d'oligonucleòtids d'alta densitat**.

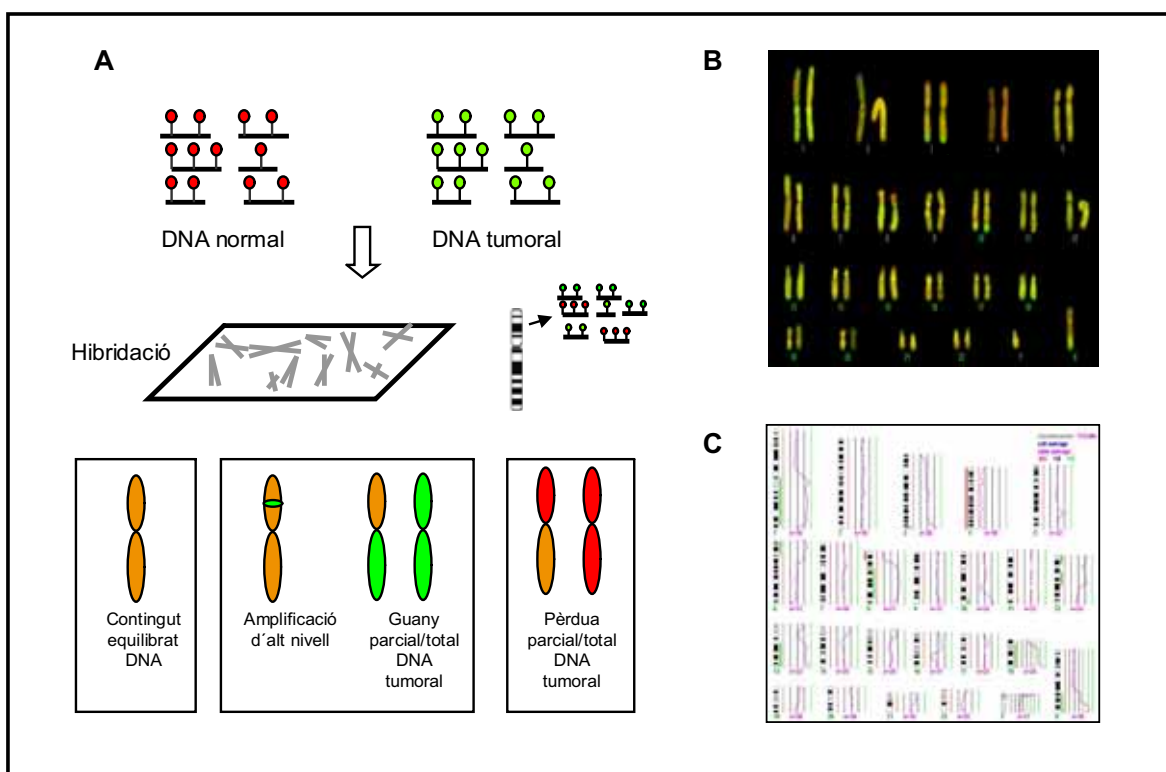
## Estudi citogenètic de les alteracions cromosòmiques

### **Hibridació genòmica comparada (CGH)**

Les alteracions cromosòmiques que es van acumulant al genoma de les cèl·lules tumorals es poden estudiar per diferents tècniques. Aquestes eines es diferencien en tres grans grups: la **citogenètica convencional**, la **hibridació *in situ* fluorescent** (FISH, de l'anglès *Fluorescence In Situ Hybridization*) i la **hibridació genòmica comparada** (CGH, de l'anglès *Comparative Genomic Hybridization*); essent aquesta última la que s'ha emprat en el present treball.

La CGH va sorgir l'any 1993, esdevenint ràpidament una eina molt important per l'anàlisi citogenètica i molecular d'alteracions cromosòmiques en diferents tipus de càncers humans<sup>164</sup>. El seu principi bàsic és una hibridació competitiva *in situ* entre DNA normal i DNA tumoral, els quals estan marcats amb dos fluorocroms diferents. Aquests dos tipus de mostres es barregen en quantitats iguals, i s'hibriden sobre extensions de metafases de cèl·lules normals. Les variacions del número de còpies de

les seqüències del DNA tumoral es detecten mesurant la relació d'intensitats de fluorescència dels senyals del DNA normal i del DNA tumoral hibridats sobre els cromosomes diana de les metafases normals, mitjançant una anàlisi quantitativa de les imatges digitals obtingudes a través d'un programa informàtic especialitzat. D'aquesta manera es poden detectar diferents tipus d'alteracions numèriques del genoma d'un tumor, tant guanys i amplificacions de material genètic com pèrdues (**Figura 14**).



**Figura 14:** Esquema de realització d'una CGH.

A. Protocol de la CGH. B. Imatge d'una metafase cariotipada.

C. Perfil de les alteracions cromosòmiques d'un cas (integració de 10-12 metafases).

La CGH necessita un mínim d'un 35% de cèl·lules tumorals a la mostra per detectar les alteracions amb prou sensibilitat, la qual varia entre 3 i 12 Mb<sup>164,165</sup>. És una tècnica molt útil per identificar oncogenes potencialment interessants en regions cromosòmiques amplificades, així com gens supressors de tumors en regions perdudes. A més es pot detectar el patró global d'alteracions del tumor en un únic experiment sense necessitat de conèixer la seqüència exacta de les regions alterades, com succeeix en la tècnica de FISH; i sense haver d'obtenir cèl·lules en divisió del pacient, imprescindibles en els experiments de citogenètica convencional.

Tot i això aquesta tècnica també compta amb certs desavantatges, com ara el fet que no permet distingir reorganitzacions cromosòmiques petites, inversions ni translocacions equilibrades. S'ha d'anar amb compte amb la interpretació de les regions telomèriques dels cromosomes, la intensitat de fluorescència de les quals disminueix. Així mateix, les zones pericentromèriques i les grans regions d'heterocromatina dels cromosomes 1, 9, 16, 19 i 22 no són valorables degut a la gran variabilitat existent en el nombre de còpies dels diferents individus. Per l'altra banda, tampoc es pot detectar el grau de ploidia del tumor, perquè la relació de la intensitat de fluorescència del DNA tumoral respecte el DNA normal no varia.

Recentment s'ha desenvolupat la tecnologia dels **arrays de CGH**, en els quals la hibridació del DNA normal i tumoral no es fa sobre cromosomes metafàsics normals, sinó en arrays que poden contenir uns 30.000 cDNAs de gens coneguts o bé ESTs clonats en cromosomes artificials de bacteris (BAC, de l'anglès *Bacterial Artificial Chromosome*) o de llevats (YAC, de l'anglès *Yeast Artificial Chromosome*). D'aquesta manera s'aconsegueix augmentar el grau de resolució de la tècnica (40-130 kb), i l'anàlisi de les alteracions genètiques s'automatitza. A més, els arrays de CGH també permeten crear xips amb gens específics d'interès associats al desenvolupament i progressió de determinats tumors <sup>165</sup>. Paral·lelament als arrays de CGH han sorgit el que es coneix com a **SNP arrays** (*Affymetrix*<sup>®</sup>), que permeten genotipar el genoma sencer d'un organisme aprofitant la presència dels polimorfismes d'un únic nucleòtid o SNPs (de l'anglès *Single Nucleotide Polymorphism*); i milloren la resolució de detecció d'alteracions cromosòmiques en comparació amb altres tècniques de genotipat. Els SNPs constitueixen la font de variació més freqüent en la seqüència del genoma humà, i actualment se n'han identificat més de 15 milions. La tècnica dels SNP Arrays es basa en la hibridació del DNA tumoral sobre una plataforma que conté oligonucleòtids de DNA de 25 parells de bases, també anomenats sondes. Aquests oligonucleòtids són específics pels al·lels dels gens estudiats i complementaris a les regions d'SNPs presents en el genoma del cas d'interès <sup>166,167</sup>. La realització dels SNP arrays comença amb la digestió del DNA genòmic de la mostra amb un enzim de restricció. Es lliguen unes molècules adaptadores als extrems dels fragments resultants, els quals s'amplifiquen mitjançant PCR (reacció en cadena de la polimerasa, de l'anglès *Polymerase Chain Reaction*) fent servir una de les cadenes de l'adaptador com a *primer*, reduint-se en aquest punt la complexitat inicial del genoma. Llavors els productes resultants d'aquesta PCR es fragmenten i es marquen amb el sistema de la biotina-estreptavidina, per posteriorment hibridar-los damunt d'un array. Es llegeix la intensitat de fluorescència de les diferents sondes mitjançant un programa informàtic

especialitzat, i es fan les anàlisis estadístiques necessàries per determinar el genotip del cas estudiat.

## Determinació de la presència d'alteracions genètiques al DNA

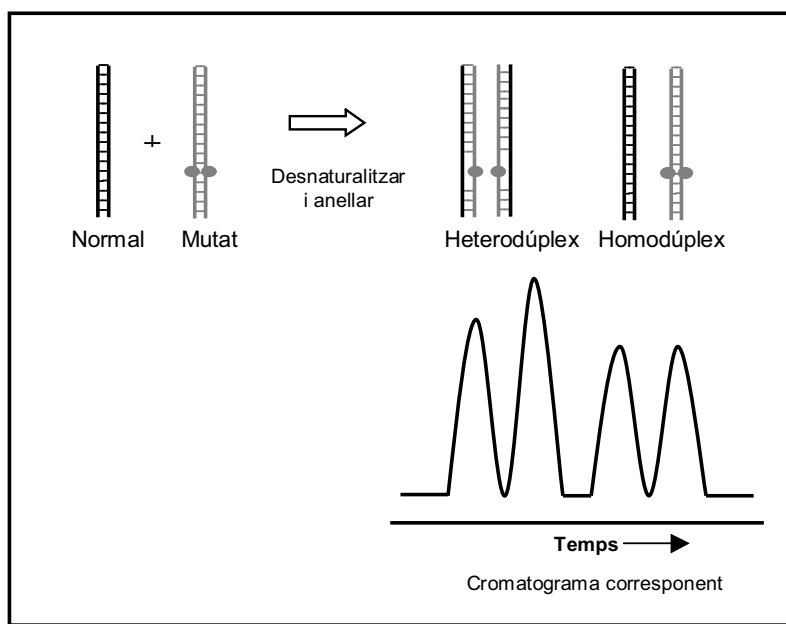
### **Cromatografia de líquids desnaturalitzant d'alt rendiment (DHPLC)**

La cromatografia de líquids desnaturalitzant d'alt rendiment (DHPLC, de l'anglès *Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) és un sistema que permet detectar de forma automatitzada canvis nucleotídics en una seqüència de DNA prèviament amplificada per PCR. Aquest mètode és més senzill i reproduïble que altres tècniques ja existents d'anàlisi de fragments de DNA, basades en l'electroforesi en gels d'agarosa i poliacrilamida <sup>168-170</sup>.

La DHPLC ha evolucionat molt en els últims 15 anys, esdevenint una tècnica molt utilitzada en l'estudi molecular de diversos organismes i malalties <sup>171-173</sup>. D'acord amb els principis bàsics de la cromatografia de líquids, els fragments de DNA a analitzar es troben dissolts en tot un seguit de solucions tampó específiques, constituïnt la **fase líquida** del sistema. Aquesta fase líquida passa per una **fase estacionària**, que es tracta d'una matriu polimèrica no porosa i hidrofòbica que permet l'adsorció de les molècules de DNA dissoltes a la fase líquida. Gràcies a la fase estacionària se separen els diversos tipus de fragments de DNA, que tenen diferents temps de retenció dins la matriu polimèrica en base a la seva mida i estabilitat. Aquests fragments es detecten gràcies a un sistema de llum ultraviolada, on el senyal es converteix en un valor, presentant-se així els resultats del procés en forma de **cromatogrames** amb diversos pics corresponents als diferents fragments de DNA que han anat passant per la fase estacionària <sup>174</sup>.

El DNA dels casos d'interès s'ha de comparar amb DNA de mostres normals de referència per detectar correctament els canvis en la seqüència del segment del gen que es vol estudiar. El primer pas del procés és l'amplificació per PCR dels fragments de DNA corresponents (mida entre 200 i 600 pb). Un cop fet això, aquests fragments de DNA normal i DNA tumoral es barregen, i se sotmeten a un tractament de desnaturalització que permeti l'obertura de l'estructura de doble hèlix de DNA i l'obtenció de dues cadenes senzilles. Tot seguit aquests fragments de cadena senzilla es reanellen, permetent la formació d'homodúplexs i heterodúplexs. En el cas dels

**homodúplex** les dues cadenes senzilles de DNA que formen la doble hèlix es complementen perfectament; mentre que en els **heterodúplex**, les dues cadenes no poden complementar-se totalment degut a l'existència de variacions en la seqüència del DNA de la mostra problema (**Figura 15**). Els heterodúplexs són menys estables que els homodúplexs, característica que els confereix menor capacitat de retenció a la matriu de la fase estacionària del sistema de DHPLC. Com a conseqüència apareixen diversos pics al cromatograma, tants com diferents mutacions existeixin en la mostra estudiada. Un cop finalitzat el procés de la cromatografia, el DNA dels casos que presenten cromatogrames anormals se seqüència per confirmar i determinar la natura del canvi nucleotídic detectat.



**Figura 15:** Formació d'homodúplexs i heterodúplexs i la seva detecció mitjançant DHPLC

El paràmetre més crític a tenir en compte durant l'ús de la DHPLC és la temperatura del sistema, que afecta la sensibilitat de detecció dels canvis nucleotídics. Per aquesta raó la cromatografia es duu a terme sota tres temperatures diferents per identificar tots els heterodúplexs possibles que es poden formar a partir d'una determinada seqüència de DNA. Aquestes temperatures varien entre els 50 i 70 °C, i depenen de la proporció de GC que conté el fragment de DNA en qüestió. També és important disposar de casos control positius de canvis nucleotídics en el fragment d'estudi per controlar la sensibilitat de la tècnica <sup>175</sup>.



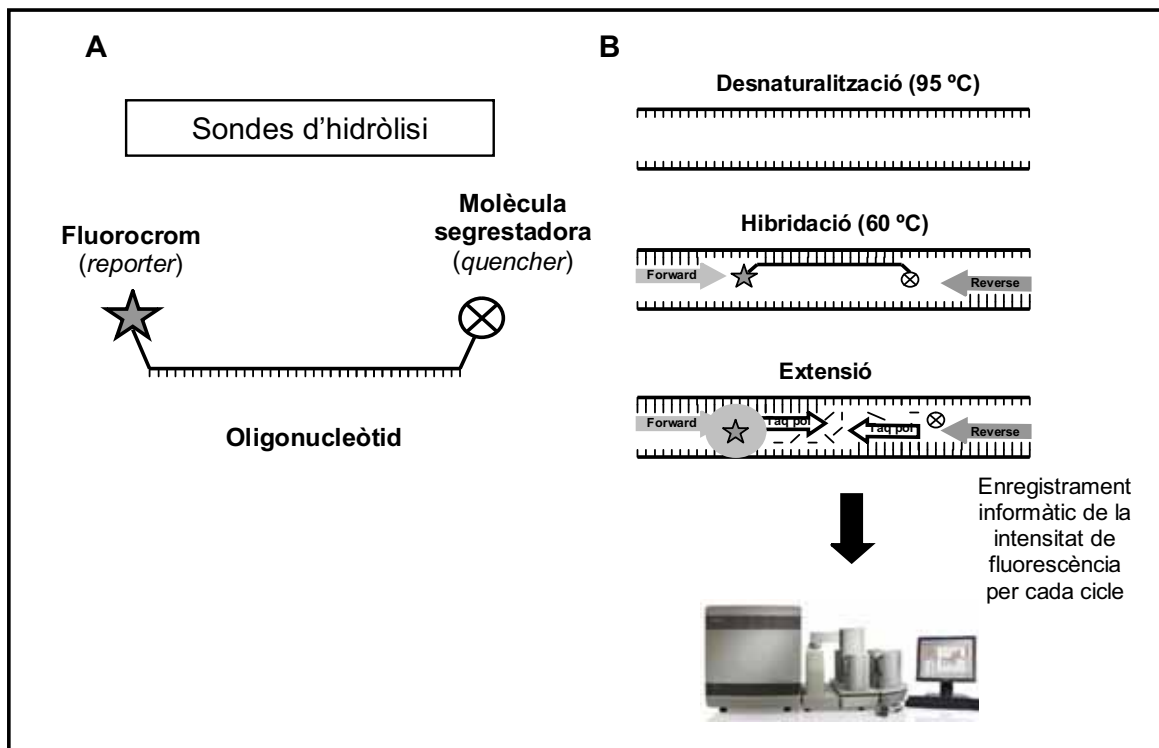
## Anàlisi dels perfils d'expressió gènica (mRNA)

### PCR quantitativa a temps real (qPCR)

L'estudi de l'expressió dels gens ha experimentat grans canvis durant els últims anys, passant de l'ús majoritari de tècniques com la PCR de transcripció reversa semiquantitativa, el *Northern Blot*, la hibridació *in situ* i assaigs de protecció a la RNasa<sup>176-178</sup>, al domini dels sistemes de **PCR quantitativa a temps real** (qPCR)<sup>179-181</sup>. La qPCR és un dels mètodes més sensibles que existeixen actualment per quantificar l'expressió (mRNA) d'un o més gens d'interès. També es pot emprar per determinar-ne la **dosi gènica** (DNA genòmic), mitjançant l'aplicació dels mateixos principis bàsics. Aquesta tècnica presenta certs avantatges respecte les eines tradicionals d'anàlisi de la dosi gènica i expressió, com ara el fet que es necessita menor quantitat de material de partida, s'obtenen els resultats de forma ràpida i quantitativa (~ en 2 hores); i que el mètode de detecció és amb fluorescència i no contamina, com passa en altres sistemes que fan servir la radioactivitat.

El desenvolupament de la qPCR ha estat possible gràcies a dues troballes moleculars: per una banda, el descobriment de l'activitat exonucleasa 5'→3' de l'enzim *Taq* polimerasa<sup>182</sup>. Per l'altra, la possibilitat de sintetitzar sondes d'oligonucleòtids marcades doblement que emeten un senyal de fluorescència quan es degraden, basades en el principi de la transferència d'energia de ressonància per fluorescència (FRET, de l'anglès *Fluorescence Resonance Energy Transfer*)<sup>183</sup>. Segons aquests conceptes s'han desenvolupat diferents sistemes de qPCR, com són l'ús de SYBR Green i diversos tipus de sondes moleculars<sup>179</sup>. En el present treball s'han fet servir les sondes TaqMan<sup>®</sup>, també anomenades sondes d'hidròlisi (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>). Aquestes sondes s'han utilitzat àmpliament en investigació i diagnòstic, com ara en el camp dels NHL<sup>88,96,181,184</sup>.

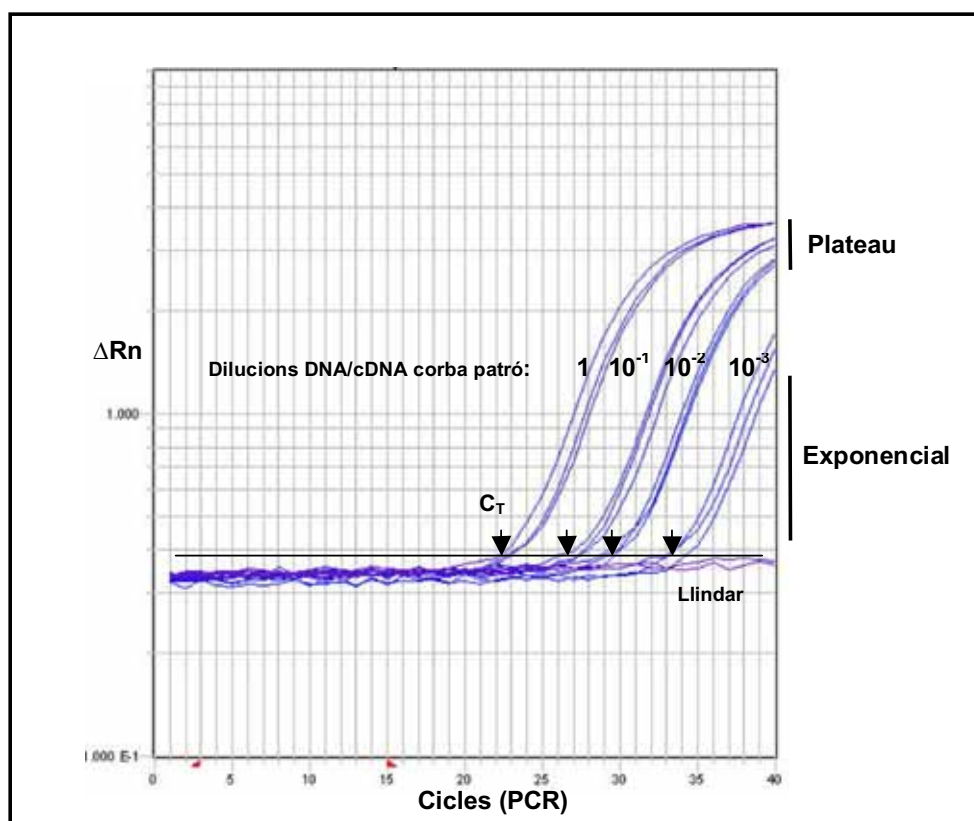
Per estudiar la dosi gènica d'un o més gens, es parteix directament del DNA de la mostra; mentre que per analitzar-ne l'expressió, el mRNA del cas se sotmet a un procés previ de PCR de transcripció reversa (RT-PCR) per sintetitzar cDNA. Amb el DNA/cDNA obtingut es procedeix a fer la qPCR, la qual necessita dos oligonucleòtids o *primers* per amplificar la regió diana que es vol estudiar i una **sonda** específica per aquest fragment, la qual hibrida al mig de l'amplicó. La sonda és un oligonucleòtid amb un fluorocrom a l'extrem 5' que s'anomena "informador" o *reporter*; i una molècula que segresta la fluorescència que emet el *reporter*, situada a l'extrem 3' i que es coneix com a "apagador" o *quencher*. Quan la sonda està intacta, el *quencher* absorbeix la fluorescència del *reporter* degut a la proximitat que existeix entre ambdues molècules i pels fenòmens de FRET. Durant la reacció de PCR, els primers i la sonda s'uneixen a la seva diana específica si aquesta és present en la reacció. A mesura que es van succeïnt els cicles de PCR l'enzim *Taq* polimerasa va sintetitzant les noves còpies de la seqüència, mentre que per l'altra banda la seva activitat 5' exonucleasa hidrolitza la sonda. D'aquesta manera el marcador *reporter* se separa del *quencher*, donant lloc a un augment de la intensitat de fluorescència. Aquest increment de fluorescència es mesura a cada cicle i s'enregistra en un programa informàtic connectat al termociclador on es realitza el procés (**Figura 16**).



**Figura 16:** Procés de la PCR quantitativa a temps real.

A. Esquema d'una sonda d'hidròlisi de qPCR. B. Passos del cicle.

Tot seguit es construeixen corbes d'amplificació amb els valors d'increment de fluorescència ( $\Delta Rn$ ) per cada cicle de PCR, les quals tenen un perfil exponencial per la pròpia dinàmica de la reacció (**Figura 17**). En els primers cicles d'amplificació, els valors de  $\Delta Rn$  no assoleixen el **llindar** de detecció de la tècnica, el qual és variable i es determina calculant la desviació estàndard del valor de  $\Delta Rn$  base entre els cicles 3 i 15. El **cicle llindar de fluorescència** per cada cas ( $C_T$ , de l'anglès *Threshold cycle*) es calcula determinant el punt en què la fluorescència excedeix el valor llindar triat, i els valors de  $C_T$  corresponen al nombre de cicles que la PCR ja havia efectuat en arribar a aquest punt. Així els valors de  $C_T$  són inversament proporcionals a la quantitat de DNA/cDNA de partida que hi ha a la mostra, ja que com més quantitat de seqüència diana hi hagi, més producte s'amplificarà a la reacció de PCR, més fluorescència s'alliberarà i abans s'assolirà el valor llindar triat, en un menor nombre de cicles.



**Figura 17:** Perfil de les corbes d'amplificació de qPCR

A més d'estudiar els gens d'interès, per poder determinar i normalitzar correctament la quantitat de DNA/cDNA dels casos d'estudi s'ha de fer servir un **gen control endogen** adequat. Aquest gen de referència depèn del tipus de mostres que s'han d'analitzar i ha de complir tot un seguit de condicions, com ara no tenir pseudogens,

que la seva localització cromosòmica sigui autosòmica i estable; i que s'amplifiqui en uns nivells similars al del gen problema. Alguns dels gens control més utilitzats són la  $\beta$ -glucuronidasa, la  $\beta$ -actina, la GAPDH, l'albumina o la B2M.

El següent pas és analitzar els resultats obtinguts, podent-se utilitzar dos tipus de mètodes de quantificació: per corba estàndard o pel mètode de  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ .

**1. Quantificació per corba estàndard:** es construeix una corba patró amb un banc de dilucions d'una mostra de concentració coneguda, a partir de la qual s'extrapola la quantitat de DNA/cDNA de la mostra problema. Si es relaciona el valor de  $C_T$  amb la quantitat de DNA/cDNA (en base logarítmica) de les diferents dilucions de la mostra de concentració coneguda, s'obté una recta amb un pendent que reflexa l'eficiència de la reacció. Si aquesta eficiència és bona i el producte de partida es duplica perfectament a cada cicle, llavors el pendent de la corba s'ha d'aproximar al valor **-3.32** (pendent= $-1/\log 2$ ). El mètode de quantificació per corba estàndard es pot aplicar en tots els casos, especialment quan els pendents de les corbes del gen problema i del gen control són molt diferents.

**2. Quantificació pel mètode de  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ :** en aquest tipus d'anàlisi es considera que l'eficiència d'amplificació de la reacció és perfecta, duplicant-se la quantitat de producte a cada cicle de qPCR. Així la dosi gènica o el canvi d'expressió del gen d'interès es calcula a través de la fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , on  $\Delta C_T$  és la diferència de la  $C_T$  del gen diana i la  $C_T$  del gen de referència per cada cas; i  $\Delta\Delta C_T$  és la diferència entre el  $\Delta C_T$  de la mostra problema i el  $\Delta C_T$  d'una mostra calibradora que es farà servir en tots els experiments del projecte <sup>180</sup>. Com que normalment les mostres d'estudi estan contaminades amb cèl·lules normals que no formen part del tumor, i a més aquest pot contenir certa heterogeneïtat cel·lular, és necessari definir uns rangs dels valors relatius que es poden obtenir amb l'anàlisi de dades. Els rangs es determinen a partir dels valors de qPCR d'un conjunt de mostres normals, tot calculant-se'n la desviació estàndard. El mètode de quantificació per  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  es pot aplicar quan els pendents de les corbes del gen problema i del gen control són molt semblants.

Últimament s'ha simplificat el disseny, procediment i anàlisi de les qPCR que analitzen l'expressió gènica mitjançant el desenvolupament dels **assaigs predissenyats** i les **targetes microfluídiques**. En el cas dels assaigs predissenyats, la pròpia casa comercial determina la seqüència dels oligonucleòtids i sonda més específics per cada

gen d'interès, evitant la necessitat d'optimitzar les condicions de qPCR i comprovar les seves corbes d'eficiència. Les targetes microfluídiques permeten l'anàlisi simultània d'un conjunt de gens i mostres en un mateix experiment, fent servir la tecnologia dels assaigs predissenyats optimitzats. Cada targeta microfluídica consta de 384 pouets repartits en 8 files, podent-se configurar en funció del nombre de gens (12, 16, 24, 32, 64, 96 o 384) i de mostres que s'hagin d'analitzar <sup>185</sup>.

## Microarrays d'expressió gènica

Conjuntament amb la qPCR, els **microarrays** han esdevingut la tècnica més utilitzada actualment per avaluar l'expressió gènica dels tumors humans, ja que permeten l'estudi de milers de gens d'una mostra en un únic experiment <sup>186,187</sup>. Es basen en el mateix principi del *Northern blot* i processos afins, essent el primer pas l'obtenció de cDNA a partir del mRNA de la mostra d'estudi per RT-PCR. Tot seguit, el cDNA es marca amb un fluoròfor determinat i s'hibrida sobre una superfície o matriu sòlida (1-2 cm<sup>2</sup>). Aquesta matriu conté immobilitzades milers de **sondes**, que són petites seqüències de cDNA o d'oligonucleòtids representatives de determinats gens interessants per a l'estudi <sup>187</sup>. El desenvolupament d'una matriu tan petita que pugui contenir milers de gens d'interès només ha estat possible gràcies a l'important avanç i complexa interacció d'un gran nombre de recursos diferents, com ara la biologia molecular i el coneixement del genoma, la química de síntesi dels àcids nucleics, la robòtica i les tècniques de fabricació automatitzades. Aquest alt grau d'automatització és molt important, ja que permet una major reproductibilitat de la tècnica i una menor dependència de les condicions ambientals i de manipulació de l'experiment.

## Tipus de microarrays d'expressió i procediments

Per estudiar l'expressió gènica es poden utilitzar bàsicament dos tipus de microarrays: de **cDNA** i d'**oligonucleòtids**.

**1. Microarrays de cDNA:** les matrius contenen petits fragments de cDNA de doble cadena, obtinguts per amplificació per PCR de DNA clonat prèviament en una llibreria genòmica. Els productes de PCR en solució s'imprimen mecànicament damunt de matrius de vidre mitjançant robots. També es coneixen amb el nom de *custom microarrays*, ja que és el mateix investigador qui sintetitza l'array i decideix els gens

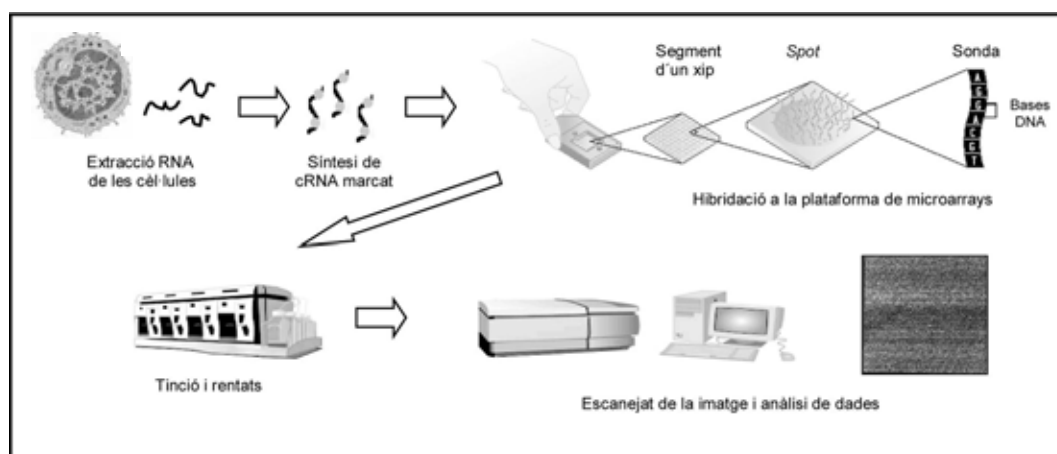
que inclourà en l'estudi. Per aquesta raó els microarrays de cDNA són més específics que els d'oligonucleòtids. El principal desavantatge és que s'han de sintetitzar els arrays i s'ha de disposar de la tecnologia robòtica necessària, cosa que dificulta la realització global del procés, així com la seva estandarització. Pel que fa a la hibridació, aquesta es basa en un sistema de "dos colors": damunt dels microarrays s'hibrida simultàniament una barreja de cDNA de la mostra problema, marcada amb un fluorocrom (típicament Cy5, vermell), i un cDNA de referència, marcat amb fluorocrom diferent (Cy3, verd). Aquest cDNA de referència ha de ser el mateix en tots els experiments inclosos dins d'un projecte, i competeix amb el cDNA de la mostra problema per hibridar-se damunt de les sondes que conté el microarray. Tot seguit es mesura la proporció d'intensitat de fluorescència entre el cDNA de la mostra problema i el cDNA de referència mitjançant un programa informàtic especialitzat, per tal de detectar canvis en l'expressió gènica de la mostra problema <sup>188</sup>.

**2. Microarrays d'oligonucleòtids:** les matrius contenen oligonucleòtids de DNA de cadena senzilla (25-80 pb) sintetitzats químicament. Aquests oligonucleòtids poden sintetitzar-se i posteriorment imprimir-se damunt la superfície sòlida mitjançant un robot o la tecnologia ink-Jet (oligonucleòtids llargs, entre 50 i 80 pb) <sup>189</sup>; o bé sintetitzar-se directament damunt de la matriu a través de tècniques de fotolitografia (oligonucleòtids curts, menors de 30 pb) <sup>189-191</sup>. Els microarrays d'oligonucleòtids estan disponibles a través de diferents cases comercials, en diversos formats i plataformes que poden contenir fins a desenes de milers de sondes. Són més cars i no tan especialitzats com els arrays de cDNA, tot i que poden generar potencialment una major quantitat de dades. El seu procés d'hibridació es basa en un "únic color": només s'hibrida el cDNA de la mostra problema, el qual es marca amb un fluorocrom; i es mesura la intensitat de senyal absoluta per determinar l'expressió de cada sonda.

En el present treball s'han utilitzat microarrays d'oligonucleòtids de la casa comercial *Affymetrix*<sup>®</sup>. Aquesta tecnologia va començar a desenvolupar-se al principi de la dècada dels 90, fent servir les estratègies de fotolitografia ja utilitzades en la indústria de la microelectrònica per produir xips d'ordinadors <sup>192</sup>. D'aquesta manera s'han pogut fabricar arrays de forma automatitzada amb centenars de milers de sondes d'oligonucleòtids damunt de petits portaobjectes de vidre, així que aquest tipus de microarrays també s'anomenen d'**alta densitat**. El procés s'inicia amb la modificació del portaobjectes de vidre que fa de substrat, a damunt del qual s'uneix una molècula que proveeix de llocs d'unió. Aquests llocs d'unió es recobreixen, al seu torn, per grups protectors fotolàbils, és a dir, sensibles a la llum. Quan regions específiques del

portaobjectes s'exposen a la llum a través de l'aplicació de determinades plantilles, els grups protectors fotolàbils s'eliminen selectivament. Llavors s'afegeixen nucleòtids que s'uniran únicament als llocs d'unió desprotegits. Aquests nucleòtids també tenen el seu extrem protegit per un grup fotolàbil, de manera que es van repetint tot un seguit de cicles de fotodesprotecció selectiva i addició de nucleòtids per produir les seqüències d'oligonucleòtids necessàries, les quals tenen una longitud de 25 bp. Per a cada gen se sintetitzen 11 parelles d'oligonucleòtids que es distribueixen per la superfície del microarray, cadascuna de les quals té un únic nucleòtid canviat respecte la seqüència original. Aquest procediment permet determinar la taxa d'hibridació específica i inespecífica per a cada gen present al microarray.

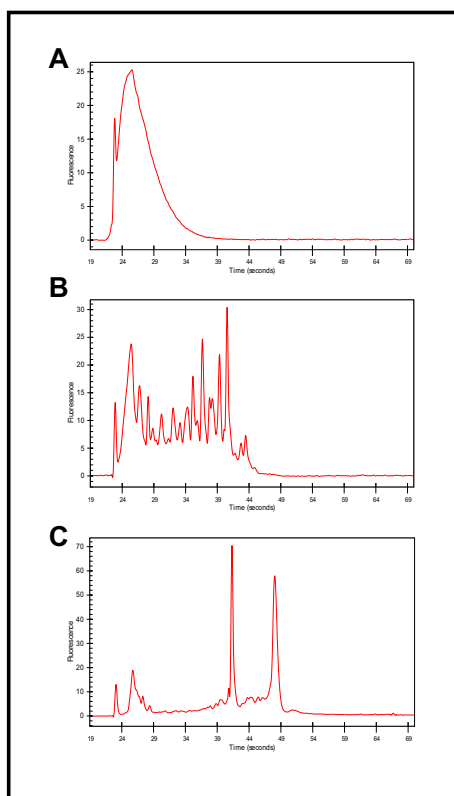
Pel que fa al procés de la hibridació dels microarrays d'oligonucleòtids, es parteix del RNA total de la mostra a estudiar, amb el qual se sintetitza cDNA de doble cadena. Aquest cDNA es transcriu posteriorment a cRNA i es marca amb la molècula biotina. El transcrit marcat es fragmenta i s'inclou en la solució d'hibridació, que també conté controls i substàncies bloquejants (com albúmina sèrica bovina o esperma de salmó). La solució d'hibridació s'introdueix llavors dins del microarray, que s'incuba durant un temps determinat (~16 hores). Tot seguit la plataforma es "tenyeix" amb estreptavidina, molècula altament afí a la biotina ja unida al cRNA fragmentat. Aquesta estreptavidina duu conjugada una molècula de ficoeritrina, que és un fluorocrom. El pas final del protocol consisteix en l'escanejat del microarray i l'obtenció d'una imatge de la seva intensitat de fluorescència. En aquest punt és imprescindible fer un primer reconeixement global d'aquesta imatge digital per comprovar que no hi hagi zones específiques en què no s'hagi hibridat la mostra, ja sigui per problemes en la manipulació de l'experiment o per l'existència d'errors en la fabricació de l'array. Així mateix és molt important observar que els controls d'hibridació afegits s'hagin unit perfectament, així com que els valors de les relacions de senyals entre les sondes dirigides a 3' i les dirigides a 5' d'aquests gens control siguin els adequats. Per finalitzar, s'analitzen les dades amb programes d'ordinador especialitzats i es realitzen els contrastos estadístics apropiats (**Figura 18**).



**Figura 18:** Procés d'hibridació dels microarrays d'oligonucleòtids

Un dels paràmetres més crítics a l'hora de realitzar experiments de microarrays d'expressió gènica és la **qualitat i quantitat del RNA** de la mostra d'estudi. La qualitat del RNA ha de ser molt bona, ja que una mínima degradació pot repercutir en l'eficiència de les posteriors reaccions de transcripció i hibridació (**Figura 19**). L'obtenció d'una qualitat de RNA òptima pot esdevenir problemàtica en certs teixits en què l'activitat RNAàsica és més alta per la pròpia fisiologia cel·lular, de manera que s'ha d'intentar realitzar el conjunt d'experiments amb qualitats de RNA homogènies i el millor possibles. Pel que fa a la quantitat, es calcula que es necessiten entre 5 i 10  $\mu\text{g}$  de RNA total per realitzar un array, tot i que si aquest és de molt bona qualitat l'experiment es pot dur a terme a partir d'un mínim de 2  $\mu\text{g}$ . En molts casos no és possible obtenir suficient quantitat de RNA per la pròpia natura del teixit d'interès, així que s'han desenvolupat protocols alternatius per amplificar-la en un pas previ a la realització de l'array, encara que s'ha de tenir en compte que aquesta reacció pot comportar la introducció de fonts de variació dins de l'estudi <sup>193</sup>.





**Figura 19:** Gràfic de la qualitat del RNA (2100 Agilent Bioanalyzer®).

Aquest aparell efectua una electroforesi de cada mostra, en què se separen els diferents components de la solució en funció de la seva mida, concentració i puresa. A. RNA de molt mala qualitat. B. RNA de relativa mala qualitat. C. RNA de bona qualitat, apte per experiments de microarrays. Els dos pics que es detecten corresponen als fragments de RNA de 18S i 28S, que són els tipus de RNA més freqüents a la cèl·lula eucariota.

## Anàlisi de dades

Els experiments de microarrays impliquen l'obtenció d'un gran volum de dades, difícils de manejar i estudiar. Aquest fet ha propiciat el desenvolupament de diferents eines i mètodes adequats per a l'anàlisi estadística, impulsant la creació d'equips multidisciplinaris d'investigadors biomèdics, matemàtics i bioinformàtics. L'anàlisi de dades es duu a terme a partir de 3 passos bàsics: el preprocessament de la imatge escanejada, l'obtenció d'informació rellevant a partir de les dades de l'estudi, i la validació dels resultats trobats <sup>194</sup>.

- 1. Preprocessament.** El primer pas de l'anàlisi consisteix en l'extracció dels valors quantitius del senyal de fluorescència de cada sonda a partir de la imatge escanejada del microarray. També implica la posterior normalització de les dades, permetent la comparació consistent entre diferents experiments i evitant la possible variabilitat existent per causes tècniques i no biològiques. Aquests valors d'intensitat de fluorescència es poden obtenir a partir de diferents **algoritmes** informàtics, com ara el MAS5 (de l'anglès *MicroArray Suite 5, Affymetrix*<sup>®</sup>), dChip (de l'anglès *DNA-Chip analyzer software*), PLIER (de l'anglès *Probe Logarithmic Intensity Error, Affymetrix*<sup>®</sup>), RMA (de l'anglès *Robust Multi-Array Average, GNU project*) o GCRMA (modificació del RMA)<sup>195-198</sup>. Tots aquests algoritmes presenten diferències en el seu desenvolupament, existint certa controvèrsia pel que fa a la seva precisió. Tampoc està clar quin és el millor mètode d'anàlisi per un conjunt donat d'experiments, ja que l'ús d'un o altre algoritme amb els seus propis sistemes de normalització pot conduir a diverses interpretacions de les dades i l'obtenció de diferents llistes de gens significatius. A més de la determinació de la intensitat de senyal, altres passos de preprocessament dels microarrays inclouen la transformació de les dades (canvi de forma dels valors per facilitar l'anàlisi estadística, com ara la seva transformació matemàtica a  $\log_2$ ); i un primer filtrat dels gens inclosos a l'experiment.
- 2. Anàlisi estadística.** Un cop extretes les intensitats de senyal, s'analitzen estadísticament les dades per tal d'obtenir grups de gens diferencialment expressats que aportin informació biològica sobre els experiments que s'han dut a terme. La principal dificultat que presenten dites anàlisis de dades és el fet que s'examinen un gran nombre de gens per cada experiment, mentre que la mida mostral de l'estudi sol ser petita en comparació. Aquest fet ha propiciat la creació i desenvolupament d'eines matemàtiques adaptades especialment a la tècnica dels microarrays. L'anàlisi de dades es pot realitzar a partir de dues aproximacions que no tenen perquè ser excloents: mitjançant la **inferència** o contrast d'hipòtesi estadístic; i les tècniques de **classificació**, en les que es busquen gens que permetin la divisió de les mostres en classes sense tenir-ne informació prèvia (anàlisi no supervisada) o en classes predefinides (anàlisi supervisada).

La inferència estadística implica l'ús de diferents tècniques, especialment tests paramètrics i no paramètrics com ara el test-T, l'anàlisi de la variança (ANOVA,

de l'anglès *ANalysis of VAriance*); i l'anàlisi de significància dels microarrays (SAM, de l'anglès *Significance Analysis of Microarrays*)<sup>193,194</sup>. Per cada gen es construeix la hipòtesi de si està o no diferencialment expressat. Com que cada experiment inclou milers de gens, aquest mostreig d'hipòtesis múltiple ha de corregir-se per evitar la identificació de gens falsos positius i falsos negatius. Per aquesta raó s'han creat diversos procediments de control que permeten solucionar en part el problema, com ara el FWER (de l'anglès *Family-Wise Error Rate*) i el FDR (de l'anglès *False Discovery Rate*).

Per altra banda, les tècniques de classificació s'han fet servir molt freqüentment en estudis de biomedicina que impliquen l'anàlisi de dades clíniques. Aquestes es poden dividir en els mètodes d'anàlisi **no supervisada** i **supervisada**<sup>194,199</sup>.

- **Anàlisi no supervisada**: no se sap *a priori* a quin grup o categoria pertany cada mostra de l'estudi, de manera que s'apliquen mètodes d'anàlisi que permetin identificar agrupacions de mostres amb característiques definides, anomenades *clusters*. Existeixen diferents tipus d'algoritmes que permeten construir aquests clusters, com ara les tècniques de *clustering* jeràrquic, *clustering* de mitjanes K o l'anàlisi de components principals<sup>200</sup>.

- **Anàlisi supervisada**: cada mostra de l'estudi està perfectament identificada des del principi, sabent-se a quin grup o categoria pertany. Amb aquesta estratègia s'intenten descobrir nous criteris que ajudin a classificar correctament mostres addicionals de tipus desconegut a la categoria de malalties corresponent. Dins d'aquest mètode d'anàlisi es troba el que es coneix com algoritmes de predicció de classes i les màquines de vectors supervisats (de l'anglès, *supervised vector machine*)<sup>201,202</sup>.

El grup de gens diferencialment expressats obtinguts tant per mètodes d'inferència com de classificació s'estudien llavors en base a la seva **anotació gènica**, és a dir, la informació relativa al gen d'interès que inclou la seva localització cel·lular i funció específica, així com el procés biològic en què està implicat. Per aquesta finalitat s'han creat tot un conjunt d'eines informàtiques i bases de dades públiques d'accés via web que ajuden a la interpretació biològica dels resultats<sup>193</sup>.

- 3. Validació dels resultats.** Després de determinar un conjunt de gens d'interès a partir de les dades dels experiments de microarrays, les mesures s'han de validar per altres mitjans per tal de confirmar la veracitat de les conclusions obtingudes. Aquesta validació generalment es duu a terme en un conjunt de mostres independent i aplicant, per exemple, tècniques de *Northern Blot* o qPCR, a nivell de RNA; o bé d'immunohistoquímica o *Western Blot* a nivell de proteïna. Una altra estratègia que s'està utilitzant últimament consisteix en la divisió de la sèrie inicial de pacients de l'estudi en un grup de mostreig i un grup de validació. D'aquesta manera, es generen tot un seguit de conclusions en el grup de mostreig que s'examinaran posteriorment en el grup de validació.



## 2. RESUM DE PROTOCOLS

Cada protocol s'ha de dur a terme en les condicions esmentades, i en tots ells és imprescindible utilitzar guants (Hartmann®). El treball a temperatura ambient s'abreua TA, els minuts i segons *min* i *seg*, respectivament; i la velocitat de les centrifugacions en revolucions per minut, *rpm*. Les referències, casa comercial i país d'origen dels productes utilitzats es troben resumits a les **taules 7, 8 i 9** (pàgines 133-138).

### 1. MANIPULACIÓ DE MATERIAL BIOLÒGIC

#### **Aïllament de limfòcits de sang perifèrica per gradient de centrifugació amb Ficol-Hypaque**

##### **Material**

- Sang venosa en citrat de sodi
- *Ficoll-Hypaque* (Linfosep, Biomedics®)
- Tampó fosfat salí 1x (Roche®)
- Tubs de centrifugació cònics de 10 ml (BD Falcon™ Tubes)
- Pipetes Pasteur de plàstic (Deltalab® S.L.)
- Puntetes de pipeta de 5 i 10 ml
- Centrífuga de tubs de 15 ml (SIGMA laboratories®)
- Pipetejador (CLP®)

##### **Procediment**

\*Aquest protocol s'ha de realitzar en condicions estèrils i sota campana de flux laminar (EuroAire®).

- 1) Repartir 4 ml de *Ficoll-Hypaque* a cada tub, i afegir al damunt entre 4 i 8 ml de sang venosa amb una pipeta Pasteur, gota a gota perquè quedi flotant damunt del *Ficoll*.
- 2) Centrifugar 20 minuts a 2000 rpm i TA, desbloquejant l'opció de frenada de la centrífuga.
- 3) Fent servir una pipeta Pasteur, recollir amb molt de compte l'anell de cèl·lules mononuclears, localitzat a la interfase entre el plasma (capa superior groguenca) i la solució de *Ficoll* (capa inferior), i transferir a un nou tub.
- 4) Fer 2 rentats amb PBS 1x, 20 minuts a 2000 rpm i TA.
- 5) S'obté un pellet cel·lular amb la fracció limfocitària de la sang venosa, el qual es pot cultivar, congelar o bé processar per utilitzar-se en diverses tècniques moleculars.

#### **Congelació de cèl·lules**

##### **Material**

- Cèl·lules
- FCS (GibcoBRL®)
- Medi RPMI 1640 (BioWhittaker™)/Medi DMEM (GibcoBRL®)
- DMSO (Sigma®)
- Criotubs de 2ml (Nunc™)

- Pipetes Pasteur de plàstic (Deltalab<sup>®</sup>S.L.)

\*Descomplementació prèvia del FCS: 30 minuts a 56°C, filtrar, al·liquotar en tubs de 50 ml i guardar congelat a -20 °C

\*Preparació medi de congelació (50 ml): 30 ml medi RPMI 1640/DMEM (depèn del tipus cel·lular) + 10 ml FCS filtrat + 10 ml DMSO, filtrar, al·liquotar i guardar a 4°C.

### Procediment

\*Aquest protocol s'ha de realitzar en condicions estèrils i sota campana de flux laminar (EuroAire<sup>®</sup>).

1) Agafar al·liquotades d'entre 5-20 x 10<sup>6</sup> cèl·lules i fer-ne pellets en criotubs de 2 ml. Resuspendre'ls amb 1 ml de FCS filtrat.

2) Afegir 1 ml de medi de congelació gota a gota, amb pipetes Pasteur.

3) Tancar els criotubs i congelar a -80°C durant 24 hores.

4) Emmagatzemar els criotubs en nitrogen líquid.

### Descongelació de cèl·lules

#### Material

- FCS (GibcoBRL<sup>®</sup>)

- Medi RPMI 1640 (BioWhittaker<sup>™</sup>)/Medi DMEM (GibcoBRL

- *L-Glutamine 200 mM (100x)* (GibcoBRL<sup>®</sup>)

- *Penicillin-Streptomycin* (GibcoBRL<sup>®</sup>)

- Tubs de 15 ml (BD Falcon<sup>™</sup> Tubes)

- Puntetes de pipeta de 5 i 10 ml

- Bany humit a 37°C (JP Selecta<sup>®</sup>)

- Centrifuga de tubs de 15 ml (SIGMA laboratories<sup>®</sup>)

- Pipetejador (CLP<sup>®</sup>)

\*Preparació medi de cultiu (500 ml): 420 ml medi RPMI 1640/DMEM (depèn del tipus cel·lular) + 50 ml FCS filtrat + 5 ml L-Glutamine + 25 ml Penicillin-Streptomycin, filtrar i guardar a 4°C (opcional: afegir 1ml d'un agent antimicòtic, com ara *Normocin* d'Amara Biosystems<sup>®</sup>)

### Procediment

\*Aquest protocol s'ha de realitzar en condicions estèrils i sota campana de flux laminar (EuroAire<sup>®</sup>).

1) Descongelar els criotubs per immersió en el bany a 37°C.

2) Un cop descongelats, abocar a 8 ml de medi de cultiu, en un tub de 15 ml.

3) Centrifugar 10 minuts a 1500 rpm i TA. Eliminar el sobrenedant.

4) Dissoldre el pellet en medi de cultiu o bé processar per utilitzar-se en diverses tècniques moleculars.

## **Inclusió de material biològic en bloc congelat**

### **Material**

- Secció de teixit per estudiar
- *Tissue-Tek<sup>®</sup> OCT* (Sakura Finetek.)
- Etanol absolut (Panreac<sup>®</sup>)
  
- Motllos *Cryomold<sup>®</sup>* (Sakura Finetek.)
  
- Pincas
- Micròtom/criostat *Tissue-Tek<sup>®</sup> Cryo3<sup>®</sup>* (Sakura Finetek.)

### **Procediment**

- 1) Engegar i programar el criostat. Mentrestant i a TA, agafar els criomotlles i situar-hi la secció de teixit indicada en una superfície plana. Omplir el motlle amb el líquid d'OCT.
- 2) Agafar el motlle amb unes pincas i col·locar a dins del criostat. Esperar a què el motlle es congeli i guardar a congeladors de  $-80^{\circ}\text{C}$  o contenidors de nitrogen líquid.

## **Fixació de material biològic amb formol i inclusió en parafina (FFPE, *Formalin-fixed and Paraffin Embedded*)**

### **Material**

- Secció de teixit per estudiar
- Formaldèhid 10% neutralitzat (Panreac<sup>®</sup>)
- Etanol diluït 30%, 50%, 70%, 95% i 100% (Panreac<sup>®</sup>)
- Xilol (Panreac<sup>®</sup>)
- Cera de parafina (Panreac<sup>®</sup>)
  
- Motllos de parafina
  
- Processador de mostres histopatològiques *Tissue-Tek<sup>®</sup> Xpress<sup>®</sup>* (Sakura Finetek.)

### **Procediment**

- 1) Fixar del teixit d'interès en formaldèhid 10% neutralitzat fins a un màxim de 24 hores.
- 2) Situar el teixit dins del processador histopatològic i sotmetre'l a una deshidratació per etanol, 30 minuts a TA per cada dilució: 30%, 50%, 70%, 95% i 100%.
- 3) Efectuar 2 tractaments amb xilol, 30 minuts a TA.
- 4) Escalfar la cera de parafina a  $60^{\circ}\text{C}$  dins del processador i mantenir líquida.
- 5) Omplir els motllos de parafina amb el teixit processat i la parafina líquida, refredar.
- 6) Els blocs de parafina resultants s'emmagatzemen a TA per posterior ús en tècniques immunohistoquímiques i/o moleculars. S'ha de tenir en compte que la fixació amb formol i el manteniment dels blocs a TA poden afectar la qualitat dels àcids nucleics i els resultats dels estudis moleculars que se'n puguin derivar.



## Purificació de la població de cèl·lules tumorals mitjançant l'ús de boles magnètiques

### Material

- Població de cèl·lules tumorals
- Tampó fosfat salí 1x (Roche®)
- Albúmina bovina (Sigma®)
- EDTA (Sigma®)
- Boles magnètiques antiCD19 (Miltenyi Biotech®)
  
- Tubs de 15 ml (BD Falcon™ Tubes)
  
- Centrífuga de tubs de 15 ml (SIGMA laboratories®)
- Micropipetes i puntes amb filtre (Gilson®)
- Màquina *autoMACS™ Separator* (Miltenyi Biotech®)

\*Preparació del tampó de separació (1 L): 5g albúmina bovina (concentració final albúmina 0.5%) + 4 ml EDTA 0.5 M (concentració final EDTA: 2mM) + PBS 1x fins a 1 L, guardar a 4°C.

\*Aquest protocol és aplicable a la selecció positiva o negativa per altres tipus d'antígens que no siguin CD19, fent servir anticossos units a boles magnètiques de la mateixa casa comercial.

### Procediment

- 1) Obtenir un pellet de la població de cèl·lules tumorals. Resuspendre'l en 80 µl de tampó de separació (per 10<sup>7</sup> cèl·lules, per quantitats més grans de cèl·lules, augmentar el volum de reactiu proporcionalment, fins a un total de 10<sup>8</sup> cèl·lules).
- 2) Afegir 20 µl de solució de boles magnètiques antiCD19 (per 10<sup>7</sup> cèl·lules), vortejar bé i incubar 15 minuts a 6-12°C.
- 3) Afegir 800-1000 µl de tampó de separació, centrifugar 10 minuts a 1800 rpm, 6-12 °C.
- 4) Eliminar el sobrenedant completament i resuspendre el pellet en 500 µl de tampó de separació.
- 5) Procedir a la separació magnètica amb la màquina *autoMACS™ Separator*, programa *Possel\_s* (selecció positiva). Si no es disposa d'aquest aparell, també existeix la possibilitat d'efectuar la separació per columnes de forma manual.
- 6) Guardar la fracció positiva i negativa de cèl·lules per posteriors estudis. Es pot mesurar la puresa de la mostra tumoral obtinguda, per exemple, per citometria de flux.

## Detecció de l'expressió de ZAP-70 en cèl·lules B

### Material

- Població de cèl·lules de limfòcits B tumorals
- Kit *Fix & Perm* (Caltag Laboratories™)
- Anticòs primari anti-ZAP-70 (Upstate®)
- Anticòs secundari goat anti-mouse Ig fluorescein isothiocyanate (FITC) (DakoCytomation®)

- Anticossos anti-CD3-phycoerythrin (PE), CD56-PE, CD19-peridinin chlorophyl protein cychrome 5 5.5(Cy5.5), CD5-allophycocyanine (APC) (BD Biosciences®)
- Tampó fosfat salí 1x (Roche®)
- Tubs de 1.5 ml (Eppendorf®)
- Micropipetes i puntes amb filtre (Gilson®)
- Centrífuga de tubs de 15 ml (SIGMA laboratories®)
- Citòmetre de flux *FACS Callibur* (BD Biosciences®)

### Procediment

- 1) Les cèl·lules es fixen i permeabilitzen amb el Kit *Fix & Perm*, segons el protocol indicat:
  - 1.1) Per un volum de  $10^6$  cèl·lules, afegir 100  $\mu$ l de reactiu A (medi de fixació) i incubar 15 minuts a TA.
  - 1.2) Rentar un cop amb 3 ml de PBS 1x + 0.1%  $\text{NaN}_3$  + 5% FBS.
  - 1.3) Centrifugar 5 minuts a 1800 rpm, aspirar el sobrenedant i vortejar per resuspendre totalment el pellet cel·lular.
  - 1.4) Afegir 100  $\mu$ l de reactiu B (medi de permeabilització), vortejar 1-2 segons i incubar durant 20 minuts.
  - 1.5) Rentar un cop amb 3 ml de PBS 1x + 0.1%  $\text{NaN}_3$  + 5% FBS; centrifugar 5 minuts a 1800 rpm, aspirar el sobrenedant i resuspendre totalment el pellet cel·lular.
- 2) Incubar el pellet amb 1.5  $\mu$ g d'anticòs anti-ZAP-70 per  $0.5 \times 10^6$  cèl·lules, durant 20 minuts a TA.
- 3) Rentar 2 cops amb PBS 1x i incubar amb l'anticòs secundari-FITC durant 20 minuts i a les fosques.
- 4) Incubar les cèl·lules amb CD3-PE, CD56-PE, CD19-Cy5.5 i CD5-APC, 15 minuts.
- 5) Analitzar les cèl·lules per citometria de flux, seleccionant les cèl·lules CD3+ CD56+ (limfòcits T i cèl·lules *Natural Killer*) com a control positiu de l'expressió de ZAP-70. Es considera que les cèl·lules B (CD19+, CD5+) són ZAP-70 positives quan més del 20% n'expressa a la mateixa intensitat que les cèl·lules T de referència.

## 2. EXTRACCIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

### Obtenció d'àcid desoxiribonucleic (DNA)

#### Extracció de DNA pel mètode del fenol/cloroform

##### Material

- Mostra de cèl·lules o de teixit congelat
- Sarkosyl sòdic (Fluka®)
- EDTA (Sigma®)
- Proteïnasa K, preparar dilució de 10 mg/ml (Roche Applied Science®)
- RNAsa A, preparar dilució de 10 mg/ml (Roche Applied Science®)
- *Ultrapure™ Buffer-Saturated Phenol* (Invitrogen™)
- *Chloroform* (Sigma-Aldrich Chemie®)

- Clorur de Sodi (Ambion Inc<sup>®</sup>)
- Isopropanol (Fluka<sup>®</sup>)
- Dilució d'etanol al 70% (Panreac<sup>®</sup>)
- Trizma base<sup>®</sup> (Sigma<sup>®</sup>)
  
- Tubs de 1.5 ml (Eppendorf<sup>®</sup>)
- Tubs de 15 ml (BD Falcon<sup>™</sup> Tubes)
- Parafilm (LabX<sup>®</sup>)
- Puntetes de pipeta de 5 i 10 ml
- Torundes estèrils (Deltalab<sup>®</sup> S.L.)
  
- Pipetejador (CLP<sup>®</sup>)
- Estufa-incubador de 37°C (Mettler<sup>®</sup>)
- Centrífuga de tubs de 15 ml (SIGMA laboratories<sup>®</sup>)
- Micropipetes i puntetes amb filtre (Gilson<sup>®</sup>)
- Espectrofotòmetre *Smart Spec<sup>™</sup> 3000* (Bio-Rad<sup>®</sup>)

\*Preparació de la solució d'extracció (1L): 200 ml 0.5 M EDTA+ 10 g Sarkosyl sòdic + ajustar a 1 L amb aigua destil·lada, guardar a TA.

\*Preparació de tampó d'elució: preparar prèviament solució Tris-Cl 1M ph 8 (121.1 g de Trizma Base<sup>®</sup> en 1L d'aigua destil·lada). Agafar-ne 10 ml + 2 ml EDTA 0.5 M i enrasar a 1 L amb aigua destil·lada. Guardar a TA.

## Procediment

- 1) Fer pellets cel·lulars o fer talls de teixit congelat, posar en tubs de 15 ml i mantenir en gel fred.
- 2) Preparar solució d'extracció de DNA amb la proteïnasa K al moment (concentració final d'enzim de 0.2 mg/ml) i afegir 2 ml a cada tub. Pipetejar bé fins que no quedin grumolls de material, tapar bé els tacs amb Parafilm i deixar els tubs incubant tota la nit a 37°C en agitació.
- 3) Al dia següent, si la solució continua sense ser homogènia, afegir 50 µl de proteïnasa K i incubar 1-2 hores a 55°C. Si després encara queden grumolls, ignorar.
- 4) Afegir 15 µl de RNAsa i incubar 2-3 hores a 37°C.
- 5) Afegir 2 ml de fenol i agitar vigorosament durant 5 minuts dins d'un guant. Centrifugar 2 minuts a 2000 rpm i TA.
- 6) Pipetejar la fase aquosa superior i passar a un altre tub. Afegir-hi 1 ml de fenol i 1 ml de cloroform. Agitar vigorosament durant 5 minuts dins d'un guant. Centrifugar 2 minuts a 2000 rpm i TA.
- 7) Pipetejar la fase aquosa superior i passar a un altre tub. Afegir-hi 2 ml de cloroform, agitar vigorosament durant 5 minuts dins d'un guant. Centrifugar 2 minuts a 2000 rpm i TA.
- 8) Pipetejar la fase aquosa superior i passar a un altre tub. Afegir 100 µl de NaCl 5 M i 2 ml d'isopropanol fred, barrejar invertint fins que aparegui el DNA com un precipitat en forma de núvol (si hi ha poca quantitat de DNA no es veu). Es pot parar el protocol en aquest pas i deixar precipitar l'àcid nucleic tota la nit a -20°C.
- 9) Centrifugar a 2500 rpm durant 5 minuts a 4°C.
- 10) Descartar el sobrenedant, afegir 4 ml d'etanol 70% fred. Centrifugar a 3000 rpm durant 10 minuts a 4°C.
- 11) Descartar el sobrenedant, assecat les parets del tub amb una torunda, invertir els tubs i esperar a què s'assequi el pellet.
- 12) Afegir tampó d'elució depenent de la mida del pellet, i deixar en agitació suau a 37°C durant 12-24 hores perquè s'acabi de dissoldre.

13) Quantificar el DNA a l'espectrofotòmetre fent servir dilucions de 1 µl DNA + 99 µl tampó d'elució (blanc: 100 µl tampó d'elució). Mesurar l'absorbància òptica a les longituds d'ona 260 nm i 280 nm. Per saber la concentració de DNA, multiplicar l'absorbància òptica a 260 nm x 5 i tenir en compte el factor de dilució. Comprovar la puresa del DNA a partir de la ratio 260nm/280 nm (entre 1.65-2). Guardar a -80°C.

## Extracció de DNA per Kit comercial

### Material

- Mostra de cèl·lules o de teixit congelat
- *QIAmp<sup>®</sup> DNA Mini Kit* (Qiagen<sup>®</sup>)
- Etanol absolut (Panreac<sup>®</sup>)
- Tampó fosfat salí 1x (Roche<sup>®</sup>)
  
- Bany sec a 56°C (JP Selecta<sup>®</sup>)
- Micropipetes i puntes amb filtre (Gilson<sup>®</sup>)
- Microcentrifuga (Eppendorf<sup>®</sup>)
- Espectrofotòmetre *Smart Spec<sup>™</sup> 3000* (Bio-Rad<sup>®</sup>)

### Procediment

- 1) Resuspendre fins a  $5 \times 10^6$  cèl·lules en PBS 1x en un volum de 200 µl (si la mida de la mostra és més gran, s'ha d'augmentar, posteriorment i de forma proporcional, els volums de proteïnasa K i tampó AL).
- 2) Afegir 20 µl de proteïnasa K.
- 3) Afegir 200 µl de tampó AL a la mostra, i barrejar amb vòrtex durant 15 segons. Incubar 10 minuts a 56°C.
- 4) Centrifugar els tub i afegir 200 µl d'etanol absolut a la mostra. Vortejar durant 15 segons i centrifugar breument.
- 5) Afegir la mostra a la *QIAmp Spin Column* encabida dins d'un tub de 2 ml. Tancar el tap i centrifugar a 8000 rpm durant 1 min i TA. Descartar el líquid del tub recol·lector.
- 6) Obrir la columna i afegir 500 µl de tampó AW1. Tancar el tap i centrifugar a 8000 rpm durant 1 min i TA. Descartar el líquid del tub recol·lector.
- 7) Obrir la columna i afegir 500 µl de tampó AW2. Tancar el tap i centrifugar a màxima velocitat (~14.000 rpm) durant 3 min i TA. Descartar el líquid del tub recol·lector.
- 8) Posar la columna en un tub nou de 2 ml, centrifugar a màxima velocitat (~14.000 rpm) durant 1 min i TA; i descartar el líquid del tub recol·lector.
- 9) Posar la columna en un tub nou de 1.5 ml, obrir-la i afegir tampó AE, depenent de la quantitat de material de partida (25-100 µl). Incubar 5 min a TA i centrifugar a 8000 rpm durant 1 min.
- 10) Quantificar el DNA a l'espectrofotòmetre fent servir dilucions de 1 µl DNA + 99 µl tampó AE (blanc: 100 µl tampó AE). Mesurar l'absorbància òptica a les longituds d'ona 260 nm i 280 nm. Per saber la concentració de DNA, multiplicar l'absorbància òptica a 260 nm x 5 i tenir en compte el factor de dilució. Comprovar la puresa del DNA a partir de la ratio 260nm/280 nm (entre 1.65-2). Guardar a -80°C.

## Extracció de DNA per TRIzol i purificació

### Material

- Mostres obtingudes després del pas d'adició del cloroform, centrifugació i separació de la fase aquosa superior amb RNA (pas 4 extracció RNA) pel mètode del TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>)
- Etanol absolut i diluït al 10% i al 75% (Panreac<sup>®</sup>)
- Citrat de sodi (Sigma<sup>®</sup>)
- Solució d'hidròxid de sodi 8 mM (Merck<sup>®</sup>)
- Solució Hepes 0.1 M (Sigma<sup>®</sup>)
- EDTA (Sigma<sup>®</sup>)
- (opcional) - Acetat de sodi 3 M (Ambion Inc<sup>®</sup>)
- (opcional) - *UltraPure<sup>™</sup> Glycogen* (Invitrogen<sup>™</sup>)
- (opcional) - Trizma base<sup>®</sup> (Sigma<sup>®</sup>)
- (opcional) - *Micro Bio-Spin<sup>®</sup> 6 Column, Tris* (Bio-Rad<sup>®</sup>)
  
- Tubs de 1.5 ml (Eppendorf<sup>®</sup>)
- Torundes estèrils (Deltalab<sup>®</sup> S.L.)
  
- Estufa de 37°C (Mettler<sup>®</sup>)
- Micropipetes i puntes amb filtre (Gilson<sup>®</sup>)
- Microcentrífuga (Eppendorf<sup>®</sup>)
- Espectrofotòmetre *Smart Spec<sup>™</sup> 3000* (Bio-Rad<sup>®</sup>)

\*Preparació solució de rentat: 29.41 g citrat de sodi en 1 L de solució d'etanol diluït al 20%. Guardar a TA.

(opcional) \*Preparació de tampó d'elució: preparar prèviament solució Tris-Cl 1M ph 8 (121.1 g de Trizma Base<sup>®</sup> en 1L d'aigua destil·lada). Agafar-ne 10 ml + 2 ml EDTA 0.5 M i enrasar a 1 L amb aigua destil·lada. Guardar a TA.

### Procediment

- 1) Afegir 0.3 ml d'etanol absolut per cada ml inicial de TRIzol<sup>®</sup> utilitzat en la posterior separació del RNA, damunt de la fase orgànica. Agitar per inversió i incubar les mostres a TA durant 2-3 minuts.
- 2) Centrifugar a 4500 rpm durant 5 minuts a TA. Descartar el sobrenedant.
- 3) Fer 3 rentats amb la solució de rentat: afegir 1 ml per cada ml inicial de TRIzol<sup>®</sup> utilitzat, incubar durant 30 minuts a TA (agitar periòdicament) i centrifugar a 4500 rpm durant 5 minuts. Descartar el sobrenedant.
- 4) Resuspendre el pellet en 1.5-2 ml d'etanol 75%. Incubar 10-20 minuts a TA (agitar periòdicament) i centrifugar a 4500 rpm durant 5 minuts. Descartar el sobrenedant.
- 5) Assecat el pellet deixant el tub obert (5-20 minuts). Es poden usar torundes per assecat les parets del tub, sense tocar el pellet.
- 6) Resuspendre el DNA en hidròxid de sodi depenent de la mida del pellet. Ajustar el pH de la solució amb 10 µl de la solució d'Hepes per cada 100 µl d'hidròxid de sodi utilitzat; i suplementar amb EDTA fins arribar a una concentració final de 1 mM. Molts cops costa de dissoldre el pellet, que queda com un moc; i llavors es pot deixar dissolent en una estufa a 37°C tota una nit.
- 7) Quantificar el DNA a l'espectrofotòmetre fent servir dilucions de 1 µl DNA + 99 µl solució d'hidròxid de sodi 8mM+ Hepes 0.1 M + EDTA (blanc: 100 µl solució Hidròxid de sodi 8mM+ Hepes 0.1 M + EDTA). Mesurar l'absorbància òptica a les longituds d'ona 260 nm i 280 nm. Per saber la concentració de DNA, multiplicar l'absorbància

òptica a 260 nm x 5 i tenir en compte el factor de dilució. Comprovar la puresa del DNA a partir de la ratio 260nm/280 nm (entre 1.65-2). Guardar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

8 i 9) (Opcional) S'ha observat que, per a moltes tècniques moleculars, el DNA extret pel mètode del TRIzol<sup>®</sup> no és suficientment pur i interfereix en els resultats. Per aquesta raó, aquests DNAs han de passar un pas previ de purificació que pot realitzar-se principalment a partir de dues maneres:

#### ***Purificació mitjançant precipitació per sals i etanol***

- 8.1) Afegir 0.5 volums d'acetat de sodi, 2.5 volums d'etanol absolut fred i 1  $\mu\text{l}$  de glicogen (5 mg/ml). Vortejar i incubar a  $-20^{\circ}\text{C}$  durant 1 hora (també es pot deixar al congelador tota la nit).
- 8.2) Centrifugar durant 20 minuts a 11.000 rpm a TA. Descartar el sobrenedant.
- 8.3) Rentar 2 cops el pellet amb 0.5 ml d'etanol 75%, 5 minuts a 11.000rpm i a TA.
- 8.4) Resuspendre el pellet amb tampó d'elució. Si s'observa que el DNA costa de dissoldre's i presenta una consistència mucosa, incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  i pipetejar periòdicament fins que es dissolgui completament. Quantificar i guardar a  $-80^{\circ}\text{C}$  per posterior ús.

#### ***Purificació a partir de columnes cromatogràfiques Bio-Spin<sup>®</sup>***

- 9.1) Invertir les columnes repetidament per resuspendre el gel incorporat i eliminar les bombolles que hi puguin quedar. Tallar la punta i posar la columna en un dels tubs de 2 ml. Obrir el tap de la columna, i si no comença a gotejar-ne fluïd, tancar el tap i tornar a obrir. Deixar que l'excés de tampó goteji per gravetat (el procés dura uns 2 minuts). Descartar el tampó eliminat i posar la columna en un tub nou de 2 ml.
- 9.2) Centrifugar durant 2 minuts a 3.300 rpm i TA per eliminar el tampó que quedí.
- 9.3) Posar la columna en un tub nou de 1.5-2 ml i afegir la mostra a purificar (entre 20-75  $\mu\text{l}$ , un volum  $\leq 20 \mu\text{l}$  pot afectar l'eficiència del procés) directament al centre de la columna.
- 9.4) Centrifugar durant 4 minuts a 3.300 rpm i TA. Després de la centrifugació la mostra purificada està diluïda en tampó d'elució. Quantificar i guardar a  $-80^{\circ}\text{C}$  per posterior ús.

### **Extracció de DNA de FFPE**

#### **Material**

- Talls de teixit inclòs en parafina (depèn de la quantitat de teixit, 10-15 seccions 20  $\mu\text{m}$ )
- Xilol (Panreac<sup>®</sup>)
- Etanol absolut (Panreac<sup>®</sup>)
- GenElute<sup>™</sup> Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma<sup>®</sup>)
- Tubs de 1.5 ml (Eppendorf<sup>®</sup>)
- Estufa incubador a  $37^{\circ}\text{C}$  (Mettler<sup>®</sup>)

- Bany humit a 55°C/ 70°C (JP Selecta®)
- Micropipetes i puntes amb filtre (Gilson®)
- Microcentrifuga (Eppendorf®)
- Espectrofotòmetre *Smart Spec™ 3000* (Bio-Rad®)

### **Procediment**

- 1) Fer seccions del teixit inclòs en parafina i posar dins d'un tub de 1.5 ml.
- 2) Afegir 1.2 ml de xilol i vortejar durant 30 segons. Centrifugar a màxima velocitat durant 5 minuts a TA i descartar el sobrenedant.
- 3) Rentar dos cops amb etanol: afegir 1.2 ml d'etanol al pellet, vortejar i centrifugar a màxima velocitat durant 5 minuts a TA. Descartar el sobrenedant. Evaporar les restes d'etanol amb el tub obert a 37°C durant 10-15 minuts.
- 4) Començar el processament de la mostra amb el Kit *GenElute™*. Resupendre el pellet en 180 µl de solució de lisi T. Afegir 20 µl de proteïnasa K, vortejar. Incubar a 55°C tota la nit.
- 5) Afegir 20 µl de RNAsa A i incubar durant 2 minuts a TA.
- 6) Vortejar la mostra durant 15 segons. Afegir 200 µl de solució de lisis C, incubar durant 10 minuts a 70 °C.
- 7) Mentrestant, afegir 500 µl de solució de preparació de la columna dins de cada columna insertada en un tub recol·lector, centrifugar durant 1 minut a 11.000 rpm.
- 8) Afegir 200 µl d'etanol a la mostra i vortejar. Transferir-la a la columna i centrifugar a 8000 rpm durant 1 minut. Descartar el líquid del tub recol·lector.
- 9) Afegir 500 µl de solució de rentat i centrifugar a 8000 rpm durant 1 minut. Descartar el líquid el tub recol·lector i canviar el tub.
- 10) Afegir 500 µl de solució de rentat i centrifugar a la velocitat màxima (~14.000 rpm) durant 3 minuts. Repetir la centrifugació sense afegir solució de rentat per eliminar totalment les solucions.
- 11) Diluir el DNA retintut a la columna mitjançant el pipeteig de la solució d'elució (el volum depèn de la quantitat de material de partida: 25-100 µl). Incubar durant 5 minuts a TA i centrifugar a 8000 rpm durant 1 minut i a TA.
- 12) Quantificar el DNA a l'espectrofotòmetre fent servir dilucions de 1 µl DNA + 99 µl solució d'elució (blanc: 100 µl solució d'elució). Mesurar l'absorbància òptica a les longituds d'ona 260 nm i 280 nm. Per saber la concentració de DNA, multiplicar l'absorbància òptica a 260 nm x 5 i tenir en compte el factor de dilució. Comprovar la puresa del DNA a partir de la ratio 260nm/280 nm (entre 1.65-2). Guardar a -80°C.

### **Obtenció d'àcid ribonucleic (RNA)**

\* S'ha de tenir en compte que el RNA és molt sensible a la temperatura, així que s'ha de treballar en fred sempre que es pugui, essent la manipulació el més ràpida possible. A més aquest àcid nucleic és especialment sensible a la presència de RNases ambientals, així que s'aconsella desinfectar l'àrea de treball (incloent les pipetes) prèviament a la realització del treball, amb un producte com ara *RNase ZAP®* (Ambion Inc®). Totes les solucions aquoses han d'estar preparades amb *aigua DEPC* (Ambion Inc®), la qual es recomana al·lucinar per evitar contaminacions per RNases.

## Extracció de RNA per TRIzol

### Material

- Mostra de cèl·lules o de teixit congelat
- TRIzol® (Invitrogen™)
- *Chloroform: Isoamyl alcohol 24:1* (Sigma®)
- Isopropanol (Fluka®)
- (opcional) - *Pellet-Paint*® (Novagen®)
- Etanol diluït al 75% en aigua DEPC (Panreac®)
- Aigua DEPC (Ambion Inc®)
  
- Tubs de 1.5 ml (Eppendorf®)
- Xeringues de 1-2 ml (BD Plastipak™)
- Puntetes de xeringa de 20G (BD Microlance™)
- Torundes estèrils (Deltalab® S.L.)
  
- Micropipetes i puntetes amb filtre (Gilson®)
- Microcentrifuga amb capacitat de refrigeració (Eppendorf®)
- Espectrofotòmetre *Smart Spec™ 3000* (Bio-Rad®)

### Procediment

- 1) Afegir 1 ml de TRIzol® a dins del tub on hi ha el pellet cel·lular o els talls de teixit congelat. Passar aquesta solució uns 20 cops per una xeringa d'1-2 ml amb una agulla de 20G fins que es dissolgui la mostra.
- 2) Incubar durant 5 minuts a TA. En aquest pas podem deixar les mostres a -80°C tota la nit i continuar amb el protocol a l'endemà.
- 3) Afegir 200 µl de cloroform per cada ml de TRIzol® utilitzat. Agitar vigorosament durant 15 segons i incubar 5 minuts a TA.
- 4) Centrifugar a 11.400 rpm durant 15 minuts a 2-8 °C. Després d'aquest pas obtindrem dues fases: una fase superior (aquosa) en què hi ha el RNA, i una fase inferior (orgànica i de color rosat) en què hi ha el DNA i les proteïnes. Transferir amb molt de compte la fase superior a un nou tub.
- 5) Afegir 0.5 ml d'isopropanol per cada ml de TRIzol® utilitzat, barrejar per inversió i incubar les mostres durant 10 minuts a TA. Si no és urgent l'extracció, es recomana deixar les mostres a -20°C durant 2-3 hores o tota la nit per augmentar l'eficiència de l'extracció del RNA. Opcionalment, en aquest pas podem afegir *Pellet-Paint*® per ajudar a precipitar el RNA i visualitzar-lo millor.
- 6) Centrifugar a 11.400 rpm durant 10 minuts a 4°C. Descartar el sobrenedant amb molt de compte.
- 7) Fer 2 rentats amb etanol 75%, a 8900 rpm durant 5 minuts a 4°C.
- 8) Assecar les parets del tub amb torunda, amb compte de no tocar el pellet. Deixar assecar durant 10 minuts.
- 9) Resuspendre el pellet amb aigua DEPC, depenent de la seva mida. Deixar a la nevera a 4°C durant 30-60 minuts.
- 10) Quantificar el RNA a l'espectrofotòmetre fent servir dilucions de 1 µl RNA + 99 µl aigua DEPC (blanc: 100 µl aigua DEPC). Mesurar l'absorbància òptica a les longituds d'ona 260 nm i 280 nm. Per saber la concentració de RNA, multiplicar l'absorbància òptica a 260 nm x 4 i tenir en compte el factor de dilució. Comprovar la puresa del RNA a partir de la ratio 260nm/280 nm (entre 1.65-2). Guardar a -80°C. Opcionalment es pot mesurar la integritat del RNA, ja que la qualitat de l'àcid nucleic pot afectar la realització posterior de diverses tecnologies (com per exemple, en estudis de



microarrays). Això es pot dur a terme mitjançant electroforesi en gels d'agarosa al 2% o bé, per exemple, amb aparells com el *2100 Agilent Bioanalyzer* (Agilent Technologies®).

## Extracció de RNA de FFPE

### Material

- Talls de teixit inclòs en parafina (depèn de la quantitat de teixit, 10-15 seccions 20 µm)
- Xilol (Panreac®)
- Etanol absolut i diluït al 90% i 75% amb aigua DEPC (Panreac®)
- Aigua DEPC (Ambion Inc®)
- EDTA (Sigma®)
- Trizma base® (Sigma®)
- SDS (Sigma®)
  
- Proteïnasa K, preparar dilució de 20 mg/ml (Roche Applied Science®)
- *Acid Phenol:chloroform pH 4.5* (Ambion Inc®)
- Acetat de sodi 3 M (Ambion Inc®)
- *UltraPure™ Glycogen* (Invitrogen™)
- (opcional) - *Pellet-Paint®* (Novagen®)
- Isopropanol (Fluka®)
  
- Tubs de 1.5 ml (Eppendorf®)
  
- Micropipetes i puntes amb filtre (Gilson®)
- Bany sec a 40°C/55-60°C (JP Selecta®)
- Microcentrífuga amb capacitat de refrigeració (Eppendorf®)

\*Preparació de la solució de lisi: preparar prèviament solució Tris-Cl 1 M ph 8 (121.1 g de Trizma Base® en 1L d'aigua destil·lada). Agafar-ne 10 ml + 0.2 ml EDTA 0.5 M + 20 g SDS i enrasar a 1 L amb aigua destil·lada. Guardar a TA.

### Procediment

\*Aquest protocol està adaptat del procediment prèviament descrit en <sup>203</sup>

- 1) Posar els talls de parafina en un tub, afegir 1 ml de xilol i incubar 10 minuts a 40°C. Centrifugar a màxima velocitat durant 5 minuts a TA i descartar els sobrenedant.
- 2) Repetir el rentat amb xilol, aquest cop incubant prèviament 5 minuts a TA.
- 3) Fer tres rentats consecutius amb les solucions d'etanol 100%, 90% i 75%. Centrifugar 5 minuts a TA i descartar el sobrenedant.
- 4) Resuspendre el pellet en 200 µl solució de lisi, 5.4 µl de proteïnasa K, i incubar a 55-56°C tota la nit.
- 5) Centrifugar les mostres a 12.000 rpm durant 5 minuts a 4°C. Transferir la mostra a un nou tub.
- 6) Afegir 280 µl de fenol:cloroform i 20 µl acetat de sodi. Barrejar i incubar en gel durant 15 minuts.
- 7) Centrifugar durant 20 minuts, 12.000 rpm a 4°C; transferir la fase aquosa superior a un tub nou.
- 8) Afegir 1 µl glicogen, 1 µl *Pellet-Paint* (opcional) i 1 ml isopropanol. Deixar 1-2 hores a -20°C (o deixar tota la nit).

- 9) Centrifugar a 12.000 rpm durant 20 minuts a 4°C.
- 10) Rentar el pellet amb etanol 75%, centrifugar a 12.000 rpm durant 5 minuts a 4°C.
- 11) Quantificar el RNA a l'espectrofotòmetre fent servir dilucions de 1 µl RNA + 99 µl aigua DEPC (blanc: 100 µl aigua DEPC). Mesurar l'absorbància òptica a les longituds d'ona 260 nm i 280 nm. Per saber la concentració de RNA, multiplicar l'absorbància òptica a 260 nm x 4 i tenir en compte el factor de dilució. Comprovar la puresa del RNA a partir de la ratio 260nm/280 nm (entre 1.65-2). Guardar a -80°C. Opcionalment es pot mesurar la integritat del RNA, ja que la qualitat de l'àcid nucleic pot afectar la realització posterior de diverses tecnologies (com per exemple, en estudis de microarrays). Això es pot dur a terme mitjançant electroforesi en gels d'agarosa al 2% o bé, per exemple, amb aparells com el *2100 Agilent Bioanalyzer* (Agilent Technologies®).

### **3. MANIPULACIÓ DE L'ÀCID DESOXIRIBONUCLEIC (DNA)**

#### **Estudi citogenètic de les alteracions cromosòmiques: CGH**

La CGH és una tècnica que permet la detecció i estudi de les alteracions cromosòmiques que presenta un tumor. El seu principi bàsic és la hibridació competitiva entre DNA normal i DNA tumoral marcats amb dos fluorocroms diferents, que es barregen en quantitats iguals i s'hibriden sobre extensions de metafases de cèl·lules normals. Tot seguit es mesuren les intensitats de fluorescència dels senyals del DNA normal i del DNA tumoral hibridats sobre aquestes metafases i s'analitzen quantitativament a partir d'un microscopi i un sistema d'anàlisi d'imatge especialitzat (**Figura 14**).

#### **Material**

- 800 ng de DNA tumoral i de DNA normal (home o dona, depenent del sexe del tumor estudiat)
- Agarosa (Pronadisa)
- EDTA (Sigma®)
- Trizma base® (Sigma®)
- Àcid bòric (Merck®)
- Bromur d'Etidi (Bio-Rad®)
- *CGH Nick Translation Kit* (Vysis®)
- *Spectrum Green – dUTP* (Vysis®)
- *Spectrum Red – dUTP* (Vysis®)
- Formamida (Sigma®)
- SSC 20x (Roche®)
- *Blue Juice™ Gel Loading buffer* (Invitrogen™)
- *Human Cot-1 DNA* (Vysis®)
- Acetat de sodi 3 M (Ambion Inc®)
- Etanol absolut, preparar solucions al 70% i 90% i mantenir-les fredes a -20°C (Panreac®)
- Dextrà sulfat (Sigma®)
- Tween-20 (Sigma®)
- DAPI II (Vysis®)

- Tubs de 1.5 ml (Eppendorf<sup>®</sup>)
- Portaobjectes amb metafases normals *CGH Metaphase Target Slides* (Vysis<sup>®</sup>)
- Cubreobjectes petit 24x24 (Marienfeld<sup>®</sup>)
- Cubreobjectes gran 24x60 (Marienfeld<sup>®</sup>)
  
- Micropipetes i puntes amb filtre (Gilson<sup>®</sup>)
- Bany sec a 16°C (JP Selecta<sup>®</sup>)
- Bany humit a 72°C (JP Selecta<sup>®</sup>)
- Estufa 37°C (Mettler<sup>®</sup>)
- Recipients de vidre (Pyrex<sup>®</sup>)
- Cubeta d'electroforesi horitzontal (GibcoBRL<sup>®</sup>)
- Font d'alimentació (Bio-Rad<sup>®</sup>)
- Motlle de la cubeta d'electroforesi (GibcoBRL<sup>®</sup>)
- Pintes per fer els pouets del gel (GibcoBRL<sup>®</sup>)
- Transil·luminador amb llum ultraviolada (Syngene<sup>®</sup>)
- Microones
- Microcentrífuga amb capacitat de refrigeració (Eppendorf<sup>®</sup>)
- Agitador (JP Selecta<sup>®</sup>)
- Pinces
- Llapis de diamant
- Recipients coplin de vidre (Wheaton Industries)
- Bloc refrigerat (Deltalab<sup>®</sup> S.L.)
- Pegament (Paniker<sup>®</sup>)
- Cambra fosca
- Microscopi de fluorescència connectat a un programa d'anàlisi d'imatges especialitzat: *Cytovision Ultra workstation* (Applied Imaging<sup>®</sup>)

\* Preparació del TBE 5x: afegir 54 g Trizma base, 137.5 g d'àcid bòric i 100 ml d'EDTA 0.5 M. Enrasar fins a 5 L amb aigua destil·lada. Guardar a TA.

\* Preparació de solució desnaturalitzant (només es pot reutilitzar un cop), pH:7: 45 ml formamida + 5ml 20x SSC. Guardar a TA.

\* Preparació de solució A: 50% formamida desionitzada + 50% *mastermix* (*mastermix*: 2 g dextrà sulfat + 1 ml 20xSSC + 9 ml aigua milliQ). Guardar a -20°C.

\* Preparació de solució 0.4x SSC/0.3% Tween-20: barregem 10 ml 20x SSC + 475 ml aigua + 1.5 ml Tween-20. Enrasar a 500 ml amb aigua destil·lada i ajustar el pH a 7. Guardar a TA.

\* Preparació de solució 2x SSC/0.1% Tween-20: barregem 50 ml 20x SSC + 425 ml aigua + 0.5 ml Tween-20. Enrasar a 500 ml amb aigua destil·lada i ajustar el pH a 7. Guardar a TA.

## Procediment

1) Abans de res, obrir el bany sec a 16°C i preparar el bany humit a 70 °C. Preparar un gel d'agarosa al 1%. Per fer el gel, primer s'han de precintat els extrems del motlle d'electroforesi amb cinta d'autoclau perquè la solució no vessi. El volum de la solució del gel a preparar depèn de la mida del motlle: en aquest cas s'han fet servir 0.8 g d'agarosa per 80 ml TBE 1x. Escalfar la solució preparada al microones i quan arribi al punt d'ebullició, afegir 7 µl de bromur d'etidi. Barrejar suaument i tirar al motlle. Afegir les pintes per formar els pouets on més tard es carregarà la mostra i deixar que el gel se solidifiqui.

*Reacció de nick-translation*

- 2) En un tub de 1.5 ml, afegir per cada cas (reactius *CGH Nick Translation Kit*):  
 (20.5 -x) µl aigua lliure de nucleases  
 x µl DNA (800 ng)  
 5 µl 0.1 mM dTTP (10 µl 0.3 mM dTTP + 20 µl aigua lliure de nucleases)  
 10 µl 0.1 mM dNTP mix (10 µl de cada 0.3 mM dATP, dCTP i dGTP)  
 2.5 µl 0.2 mM *SpectrumGreen* (si és DNA tumoral) o ½ *Red-dUTP* (si és DNA normal)  
 (10 µl 1 mM dUTP + 40 µl aigua lliure de nucleases)  
 5 µl 10X *nick translation buffer*  
 7 µl *nick translation enzyme* (últim i mantenint en gel)

Vortejar els tubs i fer un pols amb la microcentrifuga. Incubar la reacció durant 1h-1h 15 min al bany sec a 16°C.

- 3) Mentre es duu a terme la reacció, preparar la sol·lució desnaturalitzant i deixar-la al bany a 70°C.  
 4) Parar la reacció de nick translation posant els tubs 10 minuts al bany a 70°C.  
 5) Córrer els productes obtinguts de la reacció en el gel d'agarosa, fent servir 5 µl de cada tub + 5 µl d'aigua + 3 µl de blue juice 5x. Un cop fet això, visualitzem el gel al dispositiu transil·luminador de llum ultraviolada, i veurem el DNA en forma de bandes. Si la reacció de *nick-translation* s'ha dut a terme correctament, al gel s'ha de veure un bandeig o *smear* entre 300 i 3000 pb.  
 6) Si tot és correcte, deixar els tubs en gel una estona. Mentrestant, treure els portaobjectes del congelador i deixar a la nevera durant 1-2 h.

*Precipitació de les sondes*

- 7) Barrejar el DNA control i el DNA tumoral en el mateix tub.  
 8) Afegir al tub 10 µl *DNA Cot-1 humà* (10 ng).  
 9) Afegir al tub 0.1 volums d'acetat sòdic 3M.  
 10) Afegir al tub 2.5 volums d'etanol absolut fred i invertir.  
 11) Centrifugar 30 min a 12000 rpm i 4°C.  
 12) Descartar el sobrenedant, assecar les parets dels tubs amb paper i deixar evaporar l'etanol del tub a l'estufa de 37°C, cap per avall (~ 15 min).  
 13) Ressuspendre el pellet amb 12 µl solució A i en agitació. Mentrestant, preparar els portaobjectes per la hibridació. La manipulació dels portaobjectes dins de les solucions que es descriuran a continuació s'efectuarà en recipients coplin de vidre.

*Preparació de les metafases*

- 14) Fer ratlla al mig del portaobjectes amb un llapis de diamant.  
 15) Desnaturalitzar en sol·lució desnaturalitzant durant 6 min a 72°C.  
 16) Deshidratar durant 1-2 min en etanol 70% fred  
 17) Deshidratar durant 1-2 min en etanol 90% fred  
 18) Deshidratar durant 1-2 min en etanol 100% fred  
 19) Deixar assecar els portaobjectes a TA.

*Hibridació*

- 20) Desnaturalitzar les sondes que estaven agitant-se, 6-8 min a 72°C.  
 21) Vortejar els tubs i fer un pols de microcentrifuga. Mantenir els tubs freds en un bloc refrigerat.  
 22) A cada meitat del portaobjectes tirar-hi una gota de sonda (la solució preparada per cada cas tumoral) i cobrir amb un cubreobjectes petit. Segellar al voltant del cubreobjectes amb pegament perquè la solució no s'evapori durant la hibridació.  
 23) Deixar els portaobjectes en una cambra fosca i humida a l'estufa de 37°C, durant 36-72h.

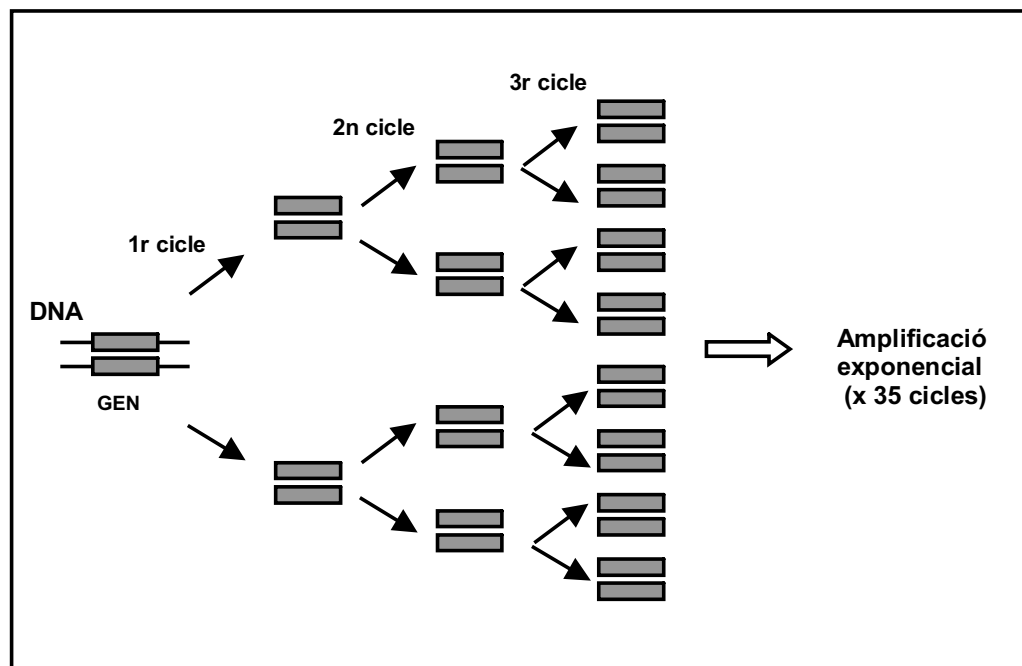
*Rentats post-hibridació*

- 24) Posar la solució 0.4x SSC/0.3% Tween-20 al bany a 72°C.
- 25) Treure el pegament del voltant del cubreobjectes i el cubreobjectes.
- 26) Agitar el portaobjectes uns segons en la solució 0.4x SSC/0.3% Tween-20 calenta i deixar 2 min.
- 27) Agitar el portaobjectes uns segons i deixar en la solució 2x SSC/0.1% Tween-20 freda.
- 28) Deixar assecar els portaobjectes a les fosques.
- 29) Posar 12 µl de DAPI II a cada meitat del portaobjectes i cobrir amb un cubreobjectes gran.
- 30) Les metafases hibridades passen a estudiar-se per microscopia de fluorescència i mitjançant un sistema d'anàlisi d'imatge quantitatiu especialitzat (*Cytovision Ultra workstation*).

**Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacció en cadena de la polimerasa o PCR és una eina que permet obtenir múltiples còpies d'una seqüència de DNA que es vulgui estudiar, sempre i quan es conegui una part de la seqüència nucleotídica (**Figura 20**). La reacció es duu a terme en tres passos que es van repetint durant tot un seguit de cicles:

1. **Desnaturalització:** se sotmet al DNA a temperatures entre 90-95 °C perquè es trenquin els ponts d'hidrogen de la doble hèlix i les dues cadenes se separin.
2. **Hibridació:** es dona en temperatures d'entre 40-60 °C per permetre que els oligonucleòtids s'uneixin al DNA.
3. **Extensió:** a uns 72 °C l'enzim *Taq* polimerasa crea i elonga una còpia del DNA de partida afegint nucleòtids a l'extrem 3' de l'oligonucleòtid anteriorment hibridat, fent servir el DNA desnaturalitzat de cadena senzilla com a motlle.



**Figura 20:** Esquema del procés d'amplificació exponencial durant la PCR

## Material

- DNA tumoral a estudiar a una concentració de 100 ng/μl
- Aigua estèril (Fresenius Kabi España SA)
- Tampó de PCR, amb i sense MgCl<sub>2</sub> i enzim Taq polimerasa: *Expand™ High Fidelity PCR System* (Roche Applied Science®)
- *AmpliTaq Gold®* (Applied Biosystems®)
- dNTPs 1 o 10 mM diluït a partir de *100 mM dNTP Set* (Invitrogen™)
- Oligonucleòtids especialment dissenyats per la seqüència a estudiar (Sigma®)
- Agarosa (Pronadisa)
- EDTA (Sigma®)
- Trizma base® (Sigma®)
- Àcid bòric (Merck®)
- Bromur d'etidi (Bio-Rad®)
- Marcador del pes molecular del DNA amplificat: *1 kb DNA step ladder* (Promega®)
- *Blue Juice™ Gel Loading buffer* (Invitrogen™)
  
- Tubs de 0.2 ml (MJ Research)
- Tubs de 1.5 ml (Eppendorf®)
  
- Micropipetes i puntes amb filtre (Gilson®)
- Bloc refrigerat (Deltalab® S.L.)
- Termociclador (Peltier Thermal Cycler, MJ Research)
- Recipients de vidre (Pyrex®)
- Cubeta d'electroforesi horitzontal (GibcoBRL®)
- Font d'alimentació (Bio-Rad®)
- Motlle de la cubeta d'electroforesi (GibcoBRL®)
- Pintes per fer els pouets del gel (GibcoBRL®)
- Transil·luminador amb llum ultraviolada (Syngene®)
- Microones

\* Preparació del TBE 5x: afegir 54 g Trizma base, 137.5 g d'àcid bòric i 100 ml d'EDTA 0.5 M. Enrasar fins a 5 L amb aigua destil·lada. Guardar a TA.

## Procediment

\*És preferible realitzar aquesta tècnica en condicions estèrils (sota campana de flux, EuroAire®) per garantir que no es contaminin els tubs amb DNA que fluctui a l'ambient. Tot el procés de preparació de la reacció de PCR s'ha de dur a terme en fred (gel).

1) Dissenyar i demanar les parelles d'oligonucleòtids per cada seqüència a estudiar. Han de tenir entre 18-20 parells de bases, i la seva temperatura de fusió ha de ser similar (amb un màxim de 5°C de diferència). Aquesta es pot calcular a partir de la fórmula  $4(G+C)+2(A+T)$ . El contingut en GC dels oligonucleòtids ha de ser d'un 40-60%, i s'ha d'evitar la presència d'estructures secundàries internes. Aquest disseny es pot dur a terme amb diferents programes informàtics especialitzats.

2) Preparar la reacció i posar a cada tub. Les condicions i quantitats de reactius per preparar la reacció de PCR depenen de la seqüència a analitzar i dels oligonucleòtids dissenyats. A cada tub s'afegeix primer la barreja de reactius, i tot seguit, el DNA a estudiar. És important deixar un tub en què, enlloc d'afegir DNA, s'afegeixi aigua estèril, per fer-lo servir com a control negatiu i identificar possibles contaminacions dels reactius durant el transcurs de la tècnica. Les condicions estàndard de la reacció són les següents:

Aigua estèril: volum final 25-100  $\mu$ l  
 Buffer: 1x  
 DNTPs: 200  $\mu$ M.  
 Oligonucleòtids: 0.2 a 1 mM  
 Enzim *Taq* Polimerasa: 2.5 unitats/100  $\mu$ l

DNA a estudiar: 100-200 ng

3) Posar els tubs al termociclador. El perfil estàndard dels canvis de temperatura és el següent:

95 °C 5 min ----- *Desnaturalització*

---

95 °C 45 seg  
 56 °C 45 seg ----- 35 cicles (*Hibridació*)  
 72 °C 1 min ----- *Extensió*

---

72 °C 7 min  
 4 °C  $\infty$

4) Amb el producte de PCR resultant es fa una electroforesi en gel d'agarosa per veure si l'amplificació s'ha dut a terme correctament. Preparar un gel d'agarosa al 2%. Per fer el gel, primer s'han de precintat els extrems del motlle d'electroforesi amb cinta d'autoclau perquè la solució no vessi. El volum de la solució del gel a preparar depèn de la mida del motlle: en aquest cas s'han fet servir 1.6 g d'agarosa per 80 ml TBE 1x. Escalfar la solució preparada al microones i quan arribi al punt d'ebullició, afegir 7  $\mu$ l de bromur d'etidi. Barrejar suaument i tirar al motlle. Afegir les pintes per formar els pouets on més tard es carregarà la mostra i deixar que el gel se solidifiqui. Córrer els productes obtinguts a la reacció en el gel d'agarosa, fent servir 5  $\mu$ l de cada tub + 5  $\mu$ l d'aigua + 3  $\mu$ l de *Blue Juice*<sup>TM</sup>. Pipetejar cada mostra dins d'un pouet. Deixar un pouet lliure per afegir el marcador de pes molecular del DNA (*1 kb DNA step ladder*) i saber si el DNA que s'ha amplificat en la present PCR correspon al fragment adequat. Un cop fet això, visualitzem el gel al dispositiu transil·luminador de llum ultraviolada, i veurem els fragments de DNA amplificat en forma de bandes.

5) Els productes de PCR es poden guardar a 4°C o -20°C per a futures aplicacions, com ara la seva purificació i seqüenciació per detectar canvis nucleotídics en una regió gènica determinada, etc.

### **Condicions de PCR**

Ara es descriuran breument les diferents condicions de PCR utilitzades en el present treball. La seqüència dels oligonucleòtids que s'hi esmenten apareix a la **Taula 4**.

#### *TNFRSF10A i TNFRSF10B*

\*Per ambdós gens fer la PCR dels fragments exó 9A, exó 9B, exó 3 i exó 4

Aigua estèril: 32  $\mu$ l  
 Buffer Roche amb MgCl<sub>2</sub>: 5  $\mu$ l  
 DNTPs 1 mM: 10  $\mu$ l  
 Oligonucleòtid sentit (o *forward: F*), 100  $\mu$ M: 0.122  $\mu$ l  
 Oligonucleòtid antisentit (o *reverse: R*), 100  $\mu$ M: 0.122  $\mu$ l

Enzim Taq Polimerasa Roche: 0.7  $\mu$ l

---

Volum final barreja reactius: 48 $\mu$ l

+

DNA a concentració 100 ng/ $\mu$ l: 2  $\mu$ l

*Gens de la cadena pesada de les immunoglobulines (IgV<sub>H</sub>)*

\*S'ha d'estudiar la regió FR1, la qual té 6 fragments diferents: VH1, VH2, VH3, VH4, VH5 i VH6. Per cada fragment s'ha de fer la PCR corresponent.

Aigua estèril: 37.4  $\mu$ l

Buffer II Applied (Kit *AmpliTaq Gold*): 5  $\mu$ l

MgCl<sub>2</sub> Applied (Kit *AmpliTaq Gold*): 3  $\mu$ l

DNTPs 10 mM: 1  $\mu$ l

Oligonucleòtids VH1 a 6, 25  $\mu$ M: 0.4  $\mu$ l

Oligonucleòtid JHc, 25  $\mu$ M: 0.4  $\mu$ l

Enzim Applied (Kit *AmpliTaq Gold*): 0.4  $\mu$ l

---

Volum final barreja reactius: 48 $\mu$ l

+

DNA a concentració 100 ng/ $\mu$ l: 2  $\mu$ l

*P53*

\*PCR exó 4:

Aigua estèril: 30.5  $\mu$ l

Buffer amb MgCl<sub>2</sub> Roche: 6.5  $\mu$ l

DNTPs 1 mM: 10  $\mu$ l

Oligonucleòtid sentit (o *forward: F*), 100  $\mu$ M: 0.25  $\mu$ l

Oligonucleòtid antisentit (o *reverse: R*), 100  $\mu$ M: 0.25  $\mu$ l

Enzim Taq Polimerasa Roche: 0.5  $\mu$ l

---

Volum final barreja reactius: 48 $\mu$ l

+

DNA a concentració 100 ng/ $\mu$ l: 2  $\mu$ l

\*PCR exó 5, 6, 7 i 8:

Aigua estèril: 16  $\mu$ l

Buffer amb MgCl<sub>2</sub> Roche: 2.5  $\mu$ l

DNTPs 1 mM: 3  $\mu$ l

Oligonucleòtid sentit (o *forward: F*), 100  $\mu$ M: 0.5  $\mu$ l

Oligonucleòtid antisentit (o *reverse: R*), 100  $\mu$ M: 0.5  $\mu$ l

Enzim Taq Polimerasa Roche: 0.5  $\mu$ l

---

Volum final barreja reactius: 23 $\mu$ l

+

DNA a concentració 100 ng/ $\mu$ l: 2  $\mu$ l



**Programes de temperatures**

Ara es descriuran breument els diferents programes de temperatura utilitzats al termociclador en el present treball.

*TNFRSF10A i TNFRSF10B*

\*L'amplificació s'ha dut a terme amb un protocol modificat anomenat *touch down* o *step down* PCR.

95 °C 5 min

---

95 °C 30 seg  
63 °C 30 seg      ----- 3 cicles  
72 °C 1 min

---

95 °C 30 seg  
61 °C 30 seg      ----- 3 cicles  
72 °C 1 min

---

95 °C 30 seg  
59 °C 30 seg      ----- 3 cicles  
72 °C 1 min

---

95 °C 30 seg  
58 °C 30 seg      ----- 25 cicles  
72 °C 1 min

---

72 °C 7 min  
4 °C ∞

*Gens de la cadena pesada de les immunoglobulines (IgV<sub>H</sub>)*

94 °C 10 min

---

94 °C 1 min  
55 °C 2 min      ----- 40 cicles  
72 °C 1 min

---

72 °C 10 min  
10 °C ∞

*P53*

\*PCR exó 4:

95 °C 5 min

---

94 °C 30 seg  
55 °C 30 seg      ----- 35 cicles  
72 °C 1 min

---

72 °C 10 min  
4 °C ∞

\*PCR exó 5, 6, 7 i 8:

95 °C 5 min

---

94 °C 1 min  
60 °C 1 min      ----- 25 cicles  
72 °C 1 min 30 seg

---

72 °C 10 min  
4 °C ∞

**Taula 4:** Resum dels oligonucleòtids de PCR utilitzats en el present treball

Oligonucleòtid*	Seqüència
<b>TNFRSF10A</b>	
exó 9-A F	5'-CCCAACTCATCTGGCTGTCT-3'
exó 9-A R	5-TGCATGTCTCTCTTCCATCC-3'
exó 9-B F	5'-ATGAAATGGGTCAACAAAACCTG-3'
exó 9-B R	5'-ACACCTAAGAGGAAACCTCTGG-3'
exó 3 F	5'-TTGGCTTTTCTCTCCCTTCC-3'
exó 3 R	5'-GCCCTCACTCCACCTCT-3'
exó 4 F	5'-AGGTCAAGGGACACGTCAGG-3'
exó 4 R	5'-GCTTCTGTGGTTTCTTTGAGG-3'
<b>TNFRSF10B</b>	
exó 9-A F	5'-CCAACCTCACCTGGCTGTCTC-3'
exó 9-A R	5'-AGCGTCTCCAAGGCATCC-3'
exó 9-B F	5'-CACGATGCTGATAAAGTGGG-3'
exó 9-B R	5'-GGTCTGACTTCCTGAAGAGA-3'
exó 3 F	5'-TTCTGGGAATCCTGTGGCAT-3'
exó 3 R	5'-CCCCGCATTCCACCTTTA-3'
exó 4 F	5'-TTCCCAAACCTTATGCTCTG-3'
exó 4 R	5'-GGGGTTCCATGGAGCTACTG-3'
<b>IgV<sub>H</sub>-FR1</b>	
VH1	5'-GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG-3'
VH2	5'-GTCTGGTCCTACGCTGGTCAAACCC-3'
VH3	5'-CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG-3'
VH4	5'-CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG-3'
VH5	5'-CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT-3'
VH6	5'-TCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG-3'
JHc	5'-CTTACCTGAGGAGACGGTGACC-3'
<b>P53</b>	
exó 4 F	5'-TTTTACCCATCTACAGTCCC-3'
exó 4 R	5'-GTCTCATGGAAGCCAGCCCCT-3'
exó 5 F	5'-TCTGTCTCCTTCTTCTCCT-3'
exó 5 R	5'-TCTCCAGCCCCAGCTGCT-3'
exó 6 F	5'-TGATTCTCACTGATTGCTCT-3'

Oligonucleòtid*	Seqüència
<b>P53</b>	
exó 6 R	5'-GAGACCCCAGTTGCAAACC-3'
exó 7 F	5'-TCTTGGGCCTGTGTTAATCTC-3'
exó 7 R	5'-AGGGTGGCAAGTGGCTCC-3'
exó 8 F	5'-GCTTCTCTTTTCCTATCCTGA-3'
exó 8 R	5'-CGCTTCTTGTCTGCTTGC-3'

\* F: forward o sentit, R: reverse o antisentit

### Tècniques de detecció de canvis nucleotídics

#### **Creació per PCR de seqüències amb canvis de nucleòtid com a control positiu**

Quan s'han d'aplicar eines de detecció dels canvis nucleotídics d'una determinada seqüència a estudiar, és molt útil tenir un control positiu per provar la sensibilitat de la tècnica. El protocol que tot seguit s'explicarà està adaptat del procediment descrit en <sup>175</sup>, mitjançant el qual s'introdueixen mutacions puntuals a la meitat de la seqüència diana.

#### **Material**

- DNA normal a una concentració de 100 ng/μl
- Aigua estèril (Fresenius Kabi España SA)
- Tampó de PCR, amb o sense MgCl<sub>2</sub> i enzim Taq polimerasa: *Expand™ High Fidelity PCR System* (Roche Applied Science®)
- dNTPs 1 o 10 mM diluït a partir de *100 mM dNTP Set* (Invitrogen™)
- Oligonucleòtids especialment dissenyats per a la seqüència a estudiar (Sigma®)
- Agarosa (Pronadisa)
- EDTA (Sigma®)
- Trizma base® (Sigma®)
- Àcid bòric (Merck®)
- Bromur d'Etidi (Bio-Rad®)
- Marcador del pes molecular del DNA amplificat: *1 kb DNA step ladder* (Promega®)
- *Blue Juice™ Gel Loading buffer* (Invitrogen™)
- *GenElute™ PCR Clean-Up Kit* (Sigma®)
- Tubs de 0.2 ml (MJ Research)
- Tubs de 1.5 ml (Eppendorf®)
- Micropipetes i puntes amb filtre (Gilson®)
- Termociclador (Peltier Thermal Cycler, MJ Research)
- Recipients de vidre (Pyrex®)
- Cubeta d'electroforesi horitzontal (GibcoBRL®)
- Font d'alimentació (Bio-Rad®)

- Motlle de la cubeta d'electroforesi (GibcoBRL<sup>®</sup>)
- Pintes per fer els pouets del gel (GibcoBRL<sup>®</sup>)
- Transil·luminador amb llum ultraviolada (Syngene<sup>®</sup>)
- Microones

\* Preparació del TBE 5x: afegir 54 g Trizma base, 137.5 g d'àcid bòric i 100 ml d'EDTA 0.5 M. Enrasar fins a 5 L amb aigua destil·lada. Guardar a TA.

### Procediment

1) Per la seqüència gènica que volem estudiar, dissenyar dos conjunts d'oligonucleòtids que amplifiquin dos fragments parcialment solapats de la mateixa seqüència diana, un més curt (A) i un de més llarg (B). El fragment B cobrirà gairebé tota la seqüència diana excepte un petit tros a 5'. El fragment A cobrirà el tros 5' que no cobreix el fragment B i arribarà fins a la meitat de la seqüència diana. L'oligonucleòtid antisentit del fragment A (**Figura 21**, A<sup>\*</sup>) duu una única substitució en la seva seqüència, introduïda a l'hora d'efectuar el disseny i comanda dels oligonucleòtids.

2) Fer les PCR per obtenir el fragment A i el fragment B segons les condicions i perfils de temperatura adequats, i en funció del disseny dels oligonucleòtids i la seqüència a estudiar. Córrer un gel d'agarosa al 2% per veure els resultats de la PCR.

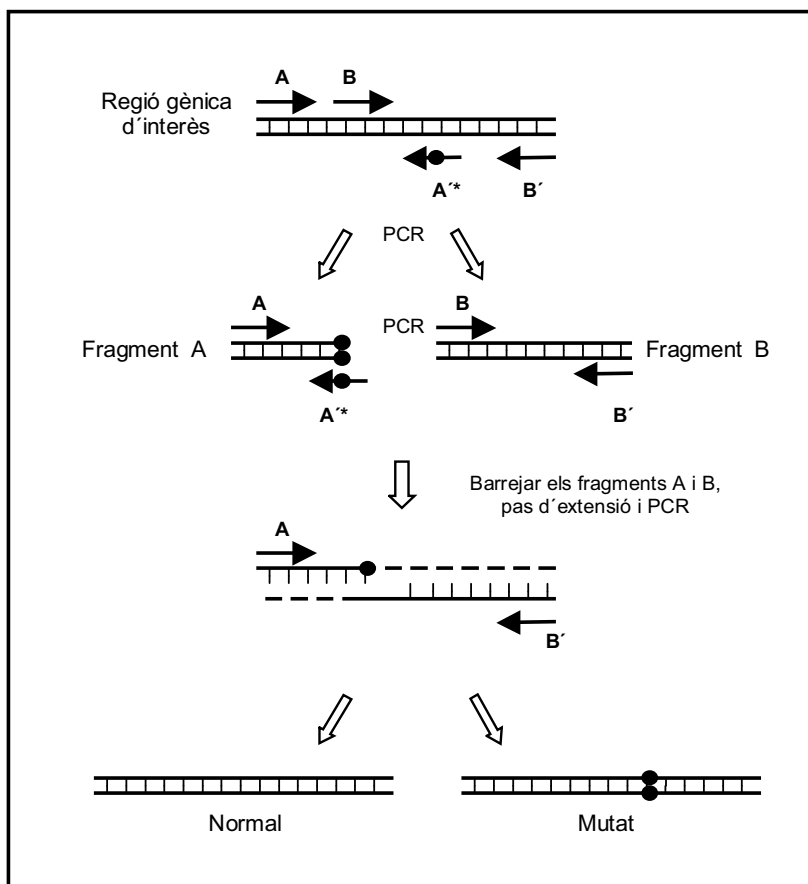
3) Els productes d'aquestes PCR han de ser bandes discretes. El DNA amplificat d'aquesta reacció es purifica i quantifica.

4) Els fragments A i B purificats es barregen en una proporció 1:1. Aquesta barreja de DNA s'amplificarà de nou per PCR, per tal d'obtenir el fragment sencer de la seqüència diana inicial però amb el canvi nucleotídic introduït. Per aquesta PCR es faran servir els oligonucleòtids situats més a 5' d'ambdós sentits de la seqüència diana, que ja s'havien fet servir per amplificar els fragments A i B (**Figura 21**, A i B'). Primer es mesclen els reactius de la reacció inclòs el DNA, però SENSE afegir els oligonucleòtids. Els tubs se sotmeten al següent pas inicial d'extensió pre-PCR durant 1 cicle:

95 °C 5 min  
94 °C 30 seg  
50 °C 30 seg  
72 °C 5 min

Després d'aquest pas, s'afegeixen els oligonucleòtids corresponents i es continua amb el programa normal de PCR.

5) Es corre un gel d'agarosa al 2% per veure els resultats de la PCR. Els fragments amplificats han d'aparèixer com a bandes discretes al gel. Els productes es purifiquen i seqüencien per confirmar els canvis nucleotítics introduïts a la seqüència.



**Figura 21:** Esquema de la generació de seqüències amb canvis de nucleòtid com a control positiu

### Purificació de productes amplificats per PCR

Existeixen dos mètodes de purificació del DNA amplificat per PCR, segons si el producte resultant és una banda discreta (*Purificació directa de productes de PCR*) o bé hi ha múltiples bandes (*Purificació per retall de bandes*).

#### Material

- Productes de PCR d'interès
- *GenElute™ PCR Clean-Up Kit* (Sigma®)
- *GenElute™ Gel Extraction Kit* (Sigma®)
- Etanol absolut (Panreac®)
- Agarosa (Pronadisa)
- EDTA (Sigma®)
- Trizma base® (Sigma®)
- Àcid bòric (Merck®)
- Bromur d'Etidi (Bio-Rad®)
- Marcador del pes molecular del DNA amplificat: *1 kb DNA step ladder* (Promega®)
- *Blue Juice™ Gel Loading buffer* (Invitrogen™)
- Acetat de sodi 3 M (Ambion Inc®)

- Isopropanol (Fluka<sup>®</sup>)
- Tubs de 1.5 ml (Eppendorf<sup>®</sup>)
- Bisturí (Aesculap<sup>®</sup>)
  
- Micropipetes i puntes amb filtre (Gilson<sup>®</sup>)
- Microcentrífuga (Eppendorf<sup>®</sup>)
- Recipients de vidre (Pyrex<sup>®</sup>)
- Cubeta d'electroforesi horitzontal (GibcoBRL<sup>®</sup>)
- Font d'alimentació (Bio-Rad<sup>®</sup>)
- Motlle de la cubeta d'electroforesi (GibcoBRL<sup>®</sup>)
- Pintes per fer els pouets del gel (GibcoBRL<sup>®</sup>)
- Transil·luminador amb llum ultraviolada (Syngene<sup>®</sup>)
- Microones
- Bany sec a 40-60 °C (JP Selecta<sup>®</sup>)

\* Preparació del TBE 5x: afegir 54 g Trizma base, 137.5 g d'àcid bòric i 100 ml d'EDTA 0.5 M. Enrasar fins a 5 L amb aigua destil·lada. Guardar a TA.

## Procediment

### ***Purificació directa de productes de PCR (GenElute™ PCR Clean-Up Kit)***

- 1) Insertar la columna dins del tub col·lector. Afegir 0.5 ml de la *Column Preparation Solution* i centrifugar a 11.400 rpm durant 1 min. Descartar el líquid del tub col·lector.
- 2) Afegir 5 volums de *Binding Solution* a 1 volum del producte de PCR, i afegir a la columna. Centrifugar a velocitat màxima (~14.000 rpm) durant 1 min. Descartar el líquid del tub col·lector.
- 3) Afegir 0.5 ml de *Wash Solution* (diluída en 48 ml d'etanol absolut el primer cop que es fa servir el kit) i centrifugar a velocitat màxima durant 1 min. Descartar el líquid del tub col·lector.
- 4) Centrifugar la columna sense afegir res, a velocitat màxima durant 1 min. Canviar el tub col·lector per un de nou.
- 5) Afegir solució d'elució al centre de la columna, depenent de la quantitat de material de partida (25-100 µl). Incubar 5 min a TA i centrifugar a velocitat màxima durant 1 min.
- 6) Quantificar el DNA a l'espectrofotòmetre fent servir dilucions de 1 µl DNA + 99 µl solució d'elució (blanc: 100 µl solució d'elució). Mesurar l'absorbància òptica a les longituds d'ona 260 nm i 280 nm. Per saber la concentració de DNA, multiplicar l'absorbància òptica a 260 nm x 5 i tenir en compte el factor de dilució. Comprovar la puresa del DNA a partir de la ratio 260nm/280 nm (entre 1.65-2). Guardar a -80°C.

### ***Purificació per retall de bandes (GenElute™ Gel Extraction Kit)***

- 7) Fer un gel d'agarosa al 2% i córrer els productes de la PCR. Retallar el fragment de DNA del gel amb un bisturí i pesar-lo dins d'un tub de 1.5 ml.
- 8) Afegir 3 volums de *Gel Solubilization Solution* al tub. Incubar a 50-60 °C durant 10 min o fins que el gel s'hagi dissolt completament. Vortejar cada 2-3 min durant el temps d'incubació.
- 9) Mentre s'acompleix el pas 8, introduir la columna en un tub col·lector. Afegir 0.5 ml de *Column Preparation Solution* i centrifugar durant 1 min a velocitat màxima (~14.000 rpm). Descartar el líquid del tub col·lector.

10) Un cop s'ha dissolt el gel completament, veure el color de la barreja dins del tub, que ha de ser de groc. Si és vermell, afegir increments de 10 µl d'acetat de sodi 3 M fins que el color viri a groc.

11) Afegir 1 volum d'isopropanol 100% i barrejar fins que la solució sigui homogènia.

12) Afegir la barreja anterior a la columna en porcions de 700 µl. Centrifugar durant 1 min i descartar el líquid del tub col·lector.

13) Afegir 700 µl de *Wash Solution* (diluida en 48 ml d'etanol absolut el primer cop que es fa servir el kit) i centrifugar durant 1 min. Descartar el líquid del tub col·lector i centrifugar de nou durant 1 min.

14) Afegir solució d'elució al centre de la columna, depenent de la quantitat de material de partida (25-100 µl). Incubar 1 min a 65 °C i centrifugar a velocitat màxima durant 1 min.

6) Quantificar el DNA a l'espectrofotòmetre fent servir dilucions de 1 µl DNA + 99 µl solució d'elució (blanc: 100 µl solució d'elució). Mesurar l'absorbància òptica a les longituds d'ona 260 nm i 280 nm. Per saber la concentració de DNA, multiplicar l'absorbància òptica a 260 nm x 5 i tenir en compte el factor de dilució. Comprovar la puresa del DNA a partir de la ratio 260nm/280 nm (entre 1.65-2). Guardar a -80°C.

## Seqüenciació directa

### Material

- Producte de PCR purificat
- Aigua estèril (Fresenius Kabi España SA)
- *BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems<sup>®</sup>)
- Oligonucleòtids especialment dissenyats per a la seqüència a estudiar (Sigma<sup>®</sup>)
- EDTA (Sigma<sup>®</sup>)
- Etanol absolut i diluït al 70% i al 95% (Panreac<sup>®</sup>)
  
- Tubs de 0.2 ml (MJ Research)
- Tubs de 1.5 ml (Eppendorf<sup>®</sup>)
- Paper d'alumini (Cotalsa<sup>®</sup>)
  
- Micropipetes i puntes amb filtre (Gilson<sup>®</sup>)
- Termociclador (Peltier Thermal Cycler, MJ Research)
- Microcentrifuga amb capacitat de refrigeració (Eppendorf<sup>®</sup>) (opcional) – Bany sec a 95 °C (JP Selecta<sup>®</sup>)
- *Abi Prism<sup>®</sup> ABI-3100* (Applied Biosystems<sup>®</sup>)

### Procediment

#### *Reacció de seqüenciació*

1) Preparar la reacció de PCR i posar a cada tub. La quantitat de producte de PCR purificat depèn de la seva concentració i del número de parells de bases del fragment, típicament s'hi afegeixen entre 2 i 12 ng/µl de producte (fragments 100-200 parells de bases: 2-4 ng/µl, fragments 300-600 parells de bases: 6-12 ng/µl). A cada tub s'afegeix primer la barreja de reactius, i tot seguit, el DNA d'estudi. Les condicions estàndard de la reacció són les següents:

Aigua estèril: fins a 10 µl

*BigDye<sup>®</sup> v3.1*: 3 µl

Oligonucleòtids amb què s'ha amplificat el fragment inicialment, 10 mM: 0.35 µl

DNA purificat: fins a 6-12 ng/ $\mu$ l

2) Posar els tubs al termociclador. El perfil estàndard dels canvis de temperatura és el següent:

95 °C 10 seg  
 50 °C 5 seg      ----- 25 cicles  
 60 °C 4 min  
 -----  
 4 °C  $\infty$

Després d'aquesta PCR, la reacció de seqüenciació passa a precipitar-se directament o bé els tubs es poden guardar a les fosques (embolicats amb paper d'alumini) a 4°C o -20°C fins que puguin processar-se.

#### *Precipitació amb EDTA i etanol*

3) Afegir a un tub de 1.5 ml el volum de la reacció de seqüenciació i ajustar a 20  $\mu$ l amb aigua estèril.

4) Afegir 5 $\mu$ l EDTA 125 mM.

5) Afegir 60  $\mu$ l d'etanol absolut o 63  $\mu$ l d'etanol al 95%. Barrejar els tubs i incubar a TA i a les fosques (embolicats amb paper d'alumini) durant un màxim de 15 min. Centrifugar a 14.000 rpm durant 20 min i 4°C. Eliminar el sobrenedant amb compte de no tocar el pellet (normalment no es veu).

6) Fer tres rentats amb 200  $\mu$ l d'etanol 70%. Centrifugar a 14.000 rpm durant 2 min.

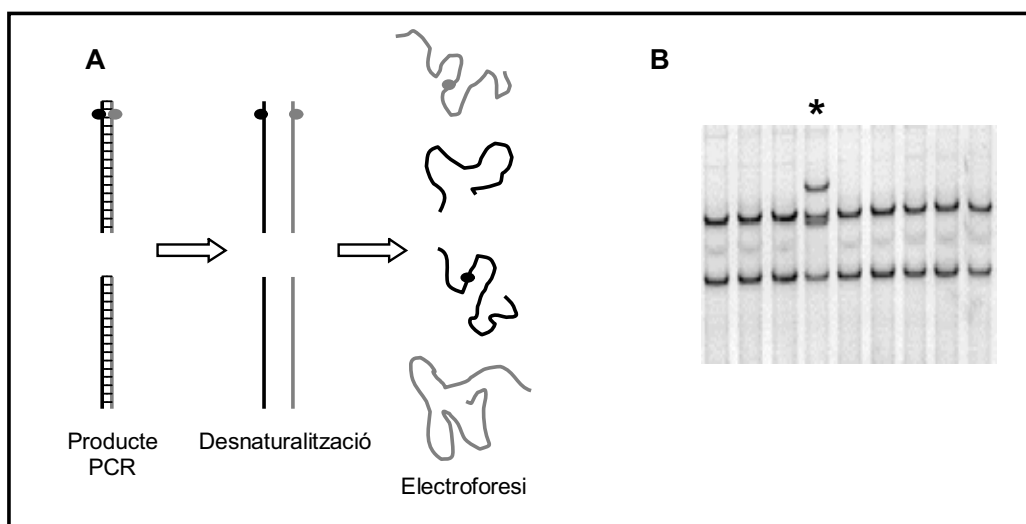
7) Eliminar completament el sobrenedant i assecar el pellet (deixant el tub obert o bé 1 min a 95 °C). Els tubs es poden guardar a les fosques (embolicats amb paper d'alumini) a -20°C durant un màxim d'1 any.

8) Dur a terme la seqüenciació amb aparells especialitzats (*Abi Prism® ABI-3100*) i anàlisi dels cromatogrames obtinguts.

### **Detecció de polimorfismes conformacionals de cadena única (SSCP)**

La tècnica de detecció dels polimorfismes conformacionals de cadena única (SSCP, de l'anglès *Single-Strand Conformational Polymorphism*) permet l'anàlisi de la presència de canvis nucleotídics en una determinada seqüència gènica. Es basa en la separació electroforètica d'àcids nucleics de cadena senzilla mitjançant un gel de poliacrilamida en condicions no desnaturalitzants. D'aquesta manera el DNA de cadena senzilla, que és relativament inestable, es plega adoptant certes conformacions tridimensionals que migren pel gel en funció de la seva forma. Si aquestes cadenes tenen una alteració petita en la seva seqüència, es formen estructures particulars que tenen una mobilitat diferent. L'anàlisi de la SSCP permet detectar polimorfismes i mutacions en diversos llocs dels fragments del DNA. Tot i que en el present treball s'ha utilitzat per estudiar productes de PCR, aquesta tècnica també es pot aplicar per analitzar altres tipus de fragments d'àcids nucleics<sup>204</sup> (**Figura 22**).





**Figura 22:** La tècnica de SSCP.

A. Principi bàsic del procés. B. Visualització en gel d'un cas alterat (\*)

### Material

- Productes de PCR d'interès i control positiu (opcional)
- Etanol absolut i diluït al 10% (Panreac<sup>®</sup>)
- Acrilamida 29:1 (Bio-Rad<sup>®</sup>)
- EDTA (Sigma<sup>®</sup>)
- Trizma base<sup>®</sup> (Sigma<sup>®</sup>)
- Àcid bòric (Merck<sup>®</sup>)
- Aigua destil·lada i aigua filtrada milliQ (Millipore<sup>®</sup>)
- APS, diluït al 10% (Bio-Rad<sup>®</sup>)
- TEMED (Bio-Rad<sup>®</sup>)
- Glicerol (Merck<sup>®</sup>)
- *Formamide loading dye buffer, DLB* (USB Corp<sup>®</sup>)
- Marcador del pes molecular del DNA amplificat: *1 kb DNA step ladder* (Promega<sup>®</sup>)
- *Blue Juice™ Gel Loading buffer* (Invitrogen™)
- Àcid nítric, diluït al 1% (Panreac<sup>®</sup>)
- Nitrat de plata en solució (Merck<sup>®</sup>)
- Carbonat de sodi anhidre (Merck<sup>®</sup>)
- Formaldehid al 37% (Merck<sup>®</sup>)
- Àcid Acètic diluït al 10% (Panreac<sup>®</sup>)
  
- Tubs de 1.5 ml (Eppendorf<sup>®</sup>)
- Tubs de 50 ml (BD Falcon™ Tubes)
- Puntetes de 5 i 10 ml
- Xeringues i filtres (BD Plastipak™)
- Pipetes Pasteur de plàstic (Deltalab<sup>®</sup> S.L.)
- Fulls d'assecar *Cellophane Support* (Bio-Rad<sup>®</sup>)
  
- Micropipetes i puntetes amb filtre (Gilson<sup>®</sup>)
- Pipetejador (CLP<sup>®</sup>)
- Vidres, separadors i pintes per gels verticals (GibcoBRL<sup>®</sup>)

- Cubeta d'electroforesi vertical (GibcoBRL<sup>®</sup>)
- Font d'alimentació (Bio-Rad<sup>®</sup>)
- Bany sec a 95 °C (JP Selecta<sup>®</sup>)
- Microcentrifuga (Eppendorf<sup>®</sup>)
- Cubetes de plàstic
- Agitador (JP Selecta<sup>®</sup>)
- Marc d'assecar gels i pinces de suport (Bio-Rad<sup>®</sup>)
- Assecador *Gel Air Dryer* (Bio-Rad<sup>®</sup>)

\* Preparació del TBE 5x: afegir 54 g Trizma base, 137.5 g d'àcid bòric i 100 ml d'EDTA 0.5 M. Enrasar fins a 5 L amb aigua destil·lada. Guardar a TA.

\* Preparació de solució de revelat: afegir 29.6 g/l de carbonat de sodi anhidre i 540 µl de formaldehid al 37% a 1 L d'aigua milliQ. Guardar a TA.

## Procediment

### *Electroforesi vertical del gel d'acrilamida*

1) Abans de tot, netejar els vidres, separadors i pintes dels gels verticals amb etanol absolut per eliminar les restes d'acrilamida de gels anteriors.

2) Muntar els vidres i els separadors damunt d'un suport i preparar els gels d'acrilamida corresponents, afegint els reactius en l'ordre indicat a un tub de 50 ml. A vegades les proporcions de reactius poden variar, depenent de la seqüència gènica a estudiar. Les seqüències s'han d'estudiar sota dos tipus de condicions: gels d'acrilamida sense glicerol i amb glicerol.

Reactiu	Gel sense glicerol (volum)	Gel amb glicerol (volum)
Acrilamida 29:1	9 ml	9 ml
TBE 5x filtrat	6 ml	6 ml
Aigua destil·lada	15 ml	10.6 ml
APS 10%	1 ml	1 ml
TEMED	9 µl	9 µl
Glicerol	X	3.4 ml

3) Barrejar els reactius ràpidament amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur de plàstic i tirar dins dels vidres del gel. Posar-hi la pinta per fer els pouets del gel, a on posteriorment es carregaran les mostres.

4) Mentre el gel se solidifica, preparar les mostres a estudiar. Afegir en tubs de 1.5 ml 5 µl de cada producte de PCR i 15 µl de DLB. En un tub, posar 5 µl de *1 kb DNA step ladder* i 15 µl de *Blue Juice*<sup>TM</sup>.

5) Un cop solidificat el gel, introduir dins la cubeta vertical. Posar-hi TBE 1x com a tampó i precórrer durant 10 min a 230 V. Mentrestant, sotmetre les mostres durant 5 min a 95 °C (excepte el tub amb la *DNA ladder*), deixar 1 min en gel i fer un pols a la microcentrifuga. Mantenir en les mostres en gel fins al moment de la càrrega.

6) Carregar les mostres al gel, seguint l'ordre *DNA ladder-DLB-mostra-mostra-etç*. Els pouets sense mostra es carreguen amb *DLB*.

7) Córrer els gels d'acrilamida. Els temps varien depenent de la seqüència gènica a estudiar i de si el gel duu glicerol o no. També s'ha de tenir en compte que, per determinades condicions, el gel es corre a TA o bé a 4°C. Els perfils estàndards són els següents:

10 min 230 V  
12 - 16 h 130 V

En el present treball, la SSCP s'ha efectuat per determinar la presència de mutacions en els exons 4, 5, 6, 7 i 8 de p53; essent les condicions d'electroforesi les següents:

*P53 exó 4*

Sense glicerol: TA, 10 min 230 V, 15 h 135 V  
Amb glicerol: 4 °C, 10 min 230 V, 20 h 150 V

*P53 exó 5, 6, 7, 8*

Sense glicerol: TA, 10 min 230 V, 12 h 130 V  
Amb glicerol: TA, 10 min 230 V, 16 h 130 V

*Revelat del gel*

8) Treure el gel del suport amb molt de compte i transferir a una cubeta de plàstic. Col·locar la cubeta a l'agitador i incubar 10 min amb etanol al 10% (el volum afegit ha de ser el suficient per cobrir el gel).

9) Decantar l'etanol i afegir àcid nítric 1% durant 3 min.

10) Decantar i fer dos rentats amb aigua milliQ.

11) Incubar el gel amb nitrat de plata durant 30 min.

12) Decantar o reciclar (el nitrat de plata es pot reutilitzar 1 cop més) i fer dos rentats amb aigua milliQ.

13) Incubar amb solució de revelat fins que apareguin les bandes del gel.

14) Parar el revelat decantant la solució i incubant amb àcid acètic al 10% durant 10 min.

15) Rentar el gel amb aigua milliQ.

16) Col·locar el gel al marc d'assecat, muntant-ho entre dos fulls d'assecat. Deixar a l'assegador fins que s'eixugui completament i guardar. Les seqüències gèniques amb alteracions es visualitzen com a canvis en la mobilitat de les bandes del gel. Aquests productes de PCR poden purificar-se i seqüenciar-se posteriorment per verificar els canvis a la seqüència.

## **Cromatografia de líquids desnaturalitzant d'alt rendiment (DHPLC)**

El sistema de cromatografia de líquids desnaturalitzant d'alt rendiment o DHPLC permet la detecció automatitzada de canvis nucleotídics en una determinada seqüència de DNA prèviament amplificada per PCR, aplicant els principis bàsics de la tècnica de separació de molècules per cromatografia de líquids. El DNA problema i un DNA de referència es barregen i pateixen un procés de desnaturalització. D'aquesta manera s'obre la doble hèlix de DNA i es permet la formació d'homodúplexs (si la seqüència de DNA no presenta cap canvi) o d'heterodúplexs (si hi ha variacions en la seqüència d'estudi). Ambdós tipus de molècules migraran de forma diferent dins del sistema de cromatografia, fet que es reflecteix en la presència de diversos pics al cromatograma resultant (**Figura 15**).

### **Material**

- Productes de PCR d'interès, dels casos problema i d'un cas normal de referència per la seqüència a estudiar, així com un control positiu (opcional)

- Tampó de PCR, amb i sense MgCl<sub>2</sub> i enzim Taq polimerasa: *Expand™ High Fidelity PCR System* (Roche Applied Science®)
- *WAVE Optimized® TEAA Buffers* (Transgenomic® Inc)
- *WAVE Optimized® Solution D* (Transgenomic® Inc)
- *WAVE Optimized® Syringe Wash Solution* (Transgenomic® Inc)
  
- Placa de 96 pouets (Costar®)
- Tapes d'alumini (Costar®)
  
- Micropipetes i puntes amb filtre (Gilson®)
- Centrifuga de plaques de 96 pouets (SIGMA laboratories®)
- Termociclador (Peltier Thermal Cycler, MJ Research)
- Sistema de cromatografia *WAVE® 3500* (Transgenomic® Inc)

### Procediment

- 1) En cada pouet d'una placa de 96 pouets, barrejar el DNA amplificat de cada cas conjuntament amb el DNA amplificat del cas de referència, en proporció 3:2. Omplir el primer pouet amb tampó de reacció de PCR, per fer el blanc. Segellar bé amb una tapa d'alumini i fer un pols amb la centrifuga de plaques.
- 2) Posar la placa al termociclador i sotmetre a un programa de desnaturalització: 94 °C durant 5 min, seguit d'una rampa de disminució de temperatura fins als 24 °C (30 min, 0.1 °C/seg).
- 3) Posar la seqüència d'interès al programa *WAVEMaker* i calcular les 3 temperatures de fusió necessàries per dur a terme la cromatografia. Programar l'aparell segons aquestes 3 temperatures de fusió.
- 4) Vigilar els nivells dels tamps del sistema; i situar-hi la placa. Córrer les mostres i analitzar: els casos amb cromatogrames anormals es purificaran i seqüenciaran directament per determinar la natura del canvi nucleotídic.

### PCR quantitativa a temps real per determinar la dosi gènica

La PCR quantitativa a temps real o qPCR és una tècnica que modifica els principis bàsics de la PCR per permetre la determinació quantitativa de la dosi gènica o l'expressió d'un o més gens d'una mostra. Per la seqüència gènica a estudiar, es dissenyen dos oligonucleòtids per amplificar el DNA i una sonda específica. Aquesta sonda és un tipus d'oligonucleòtid especial que porta una molècula a l'extrem 5' que emet fluorescència (o fluorocrom) i que s'anomena "informador" o *reporter* (com ara FAM o VIC); i una molècula que segresta aquesta fluorescència a l'extrem 3' i que es coneix com a "apagador" o *quencher* (com ara TAMRA). Si la sonda no s'ha fet servir, no emet fluorescència degut a la proximitat de la molècula *quencher* al *reporter*. Durant el procés de PCR, els oligonucleòtids i la sonda s'uneixen a la seva seqüència diana específica. En aquest punt, l'enzim *Taq* polimerasa és capaç d'amplificar el DNA de partida, per una banda, i d'hidrolitzar la sonda unida a la seqüència mitjançant la seva activitat 5' exonucleasa, per l'altra. La fragmentació de la sonda fa que el *reporter* i el *quencher* se separin, augmentant la intensitat de fluorescència de la reacció. Aquesta fluorescència es mesura a cada cicle de la PCR mitjançant programes especialitzats. Com més quantitat de DNA de partida hi hagi, més sonda i més oligonucleòtids s'uniran a la seqüència diana, més producte s'amplificarà i més fluorescència s'alliberarà en un menor nombre de cicles del procés de PCR. Així es pot mesurar la quantitat de seqüència diana que hi havia a la mostra problema (**Figura 16 i 17**). En l'actualitat han sorgit diversos sistemes de qPCR, i en el present treball s'han utilitzat les sondes TaqMan® (*Applied Biosystems*®).

## Material

- DNA tumoral a estudiar a una concentració de 10 ng/ $\mu$ l
- Aigua estèril (Fresenius Kabi España SA)
- *TaqMan*<sup>®</sup> *Universal PCR MasterMix* amb o sense activitat *AmpErase*<sup>®</sup> *UNG* (Applied Biosystems<sup>®</sup>)
- Oligonucleòtids especialment dissenyats per a la seqüència a estudiar (Sigma<sup>®</sup>)
- Sonda especialment dissenyada per a la seqüència a estudiar (Applied Biosystems<sup>®</sup>)
  
- Placa de 96 pouets per qPCR, *MicroAmp*<sup>™</sup> *Optical 96-Wells Reaction Plate with BarCode* (Applied Biosystems<sup>®</sup>)
- Tires per tapar els pouets, *Optical Caps* (Applied Biosystems<sup>®</sup>)
- Paper d'alumini (Cotalsa<sup>®</sup>)
  
- Micropipetes i puntes amb filtre (Gilson<sup>®</sup>)
- Suport opac per placa de 96 pouets (Applied Biosystems<sup>®</sup>)
- Pinces
- Eina per tapar els pouets (Applied Biosystems<sup>®</sup>)
- Centrífuga de plaques de 96 pouets (SIGMA laboratories<sup>®</sup>)
- Nevera o refrigerador a 4 °C (Liebherr<sup>®</sup>)
- *ABI Prism*<sup>®</sup> *7900 HT Sequence detection System* (Applied Biosystems<sup>®</sup>)

## Procediment

\*És preferible realitzar aquesta tècnica en condicions estèrils (sota campana de flux, EuroAire<sup>®</sup>) per garantir que no es contaminin els tubs amb DNA que fluctua a l'ambient.

1) Dissenyar la sonda i les parelles d'oligonucleòtids per cada gen a estudiar, mitjançant el programa *Primer Express*<sup>®</sup> (Applied Biosystems<sup>®</sup>). A grans trets, aquests oligonucleòtids han de tenir una temperatura de fusió similar, òptimament entre 58 i 60°C. El contingut en GC ha de ser del 30-80% i s'ha d'intentar evitar la presència de més de 3 G consecutives, que poden donar peu a la formació d'estructures secundàries internes. L'amplicó ha de tenir una mida d'entre 80-100 pb, i s'ha de comparar la seva seqüència mitjançant un BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>) per evitar homologies amb regions d'altres gens. Si es vol aprofitar el disseny dels oligonucleòtids i la sonda tant per estudiar el DNA com el mRNA del mateix gen, llavors l'amplicó s'ha de dissenyar dins d'un mateix exó (en el cas de la qPCR de mRNA, la mostra s'haurà de tractar prèviament amb DNAsa per evitar contaminacions que interfereixin en els resultats). També existeix en l'actualitat el que es coneix com *assajos predissenyats*, en què la pròpia casa comercial dissenya i subministra directament la sonda i els oligonucleòtids ja barrejats per la seqüència d'amplificació més òptima del gen d'estudi.

2) Posar una placa de 96 pouets al suport opac, preparar la reacció i repartir, en un ambient estèril. Les condicions i quantitats de reactius per preparar la reacció de PCR depenen de la seqüència a analitzar, la sonda i els oligonucleòtids dissenyats. Aquestes condicions s'han de determinar prèviament mitjançant la construcció de corbes patró amb una mostra de concentració coneguda, de la qual se'n fa un banc de dilucions (**Figura 17**) Aquestes corbes han de tenir un pendent  $\sim 3.32$ . Si no és així, s'ha de canviar la quantitat de sonda i/o d'oligonucleòtids de la reacció per ajustar-ho al pendent indicat. La dosi gènica del gen a estudiar es mesura en referència a un gen control endogen, així que els pendents de les corbes pels diferents gens analitzats han de ser similars.

3) Es fan triplicats experimentals per cada cas i gen d'interès, i en referència a un gen control endogen. A cada placa sempre han d'incorporar-se un o més casos de referència, que han de ser els mateixos en totes les plaques de l'estudi i que són

imprescindibles per dur a terme l'anàlisi de dades final. A més, gràcies al cas de referència es pot determinar si hi ha hagut problemes puntuals del sistema en una placa determinada. També és important deixar a cada placa d'un a tres pouets en què, enlloc d'afegir DNA, s'afegirà aigua estèril, per fer-los servir com a control negatiu i identificar possibles contaminacions durant el transcurs de la tècnica.

A cada pouet de la placa s'afegeix primer la barreja de reactius, i tot seguit, el DNA a estudiar. Les condicions estàndard de la reacció són les següents:

Aigua estèril: volum final 25  $\mu$ l  
 TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR MasterMix: 12.5  $\mu$ l  
 Sonda: 200-300 nmols/l  
 Oligonucleòtids: 200-300 nmols/l

DNA a estudiar: 5  $\mu$ l (a 10 ng/ $\mu$ l)

En el cas de fer servir un assaig predissenyat, llavors les condicions se simplifiquen:

Aigua estèril: 9.25  $\mu$ l  
 TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR MasterMix: 12.5  $\mu$ l  
 Assaig predeterminat: 1.25  $\mu$ l

DNA a estudiar: 2  $\mu$ l (a 10 ng/ $\mu$ l)

4) Tapar els pouets amb tires òptiques. Vigilar de no ratllar-ne la superfície, ja que es podria interferir en la lectura de la intensitat de fluorescència de la reacció. Fer un pols a la centrifuga de plaques. Mantenir la placa tapada (embolicada amb paper d'alumini) i a 4 °C fins que s'introdueixi al termociclador.

5) Programar el termociclador i posar-hi la placa (*ABI Prism<sup>®</sup>7900 HT Sequence detection System*, Applied Biosystems<sup>®</sup>). El perfil estàndard dels canvis de temperatura és el següent:

50 °C 2 min  
 95 °C 10 min

-----  
 95 °C 15 seg  
 60 °C 1 min ----- 40 cicles

-----  
 25 °C  $\infty$

6) Obtenir les dades dels cicles lliandar o *Threshold cycle* ( $C_T$ ) per cada pouet. Calcular el valor mitjà de cada condició experimental a partir dels triplicats: eliminar els valors que difereixin de més de 1  $C_T$  per al mateix cas. Per cada mostra a estudiar, analitzar els valors de dosi gènica pel gen d'interès a partir de les dades del gen control endogen. Aquesta anàlisi es pot realitzar a partir de mètodes de quantificació absoluta o bé mètodes de quantificació relativa. Els valors relatius del gen d'interès en les mostres problema s'estudien en comparació amb els casos de referència, que són present a totes les plaques de l'estudi. Els valors lliandars de pèrdua i guany genòmic es defineixen a partir de la desviació estàndard determinada pels valors d'un conjunt de mostres normals (5-10 casos). Típicament, els rangs de valors de tall de pèrdua i guany es defineixen com la  $C_T$  mitjana del cas estudiat  $\pm$  3 cops la desviació estàndard definida anteriorment pel conjunt de mostres normals. Aquesta determinació de rangs

de valors és necessària ja que la mostra pot estar contaminada per cèl·lules normals; i a més, existeix certa heterogeneïtat cel·lular dins d'un mateix tumor.

A més, si és considera necessari, es pot guardar la placa de qPCR i posteriorment córrer un gel d'agarosa amb els productes de la reacció per confirmar els canvis de la dosi gènica observats.

**Taula 5:** Resum de les sondes i oligonucleòtids de qPCR per determinar la dosi gènica utilitzats en el present treball

Gen	Sonda	Oligonucleòtids*
<b>INK4/ARF</b>	6-FAM-5'-CCCCACCCTGGCTCTGACCA-3'-TAMRA	F:5'-GGCTCTACACAAGCTTCCTTTCC-3' R:5'-TCATGACCTGCCAGAGAGAACA-3'
<b>MDM2</b>	6-FAM-5'-AGAAGATGTGAAAGAGTTTG-3'-MGB	F:5'-CTCAGCCATCAACTTCTAGTAGCAT-3' R:5'-TCTTTGTCTTGGGTTTCTTCCCTTT-3'
<b><math>\beta_2</math>-microglobulina</b>	6-FAM-5'-AGTGTGACTGGGCAGATCATCCACCTTC-3'-TAMRA	F:5'-GGAATTGATTTGGGAGAGCATC-3' R:5'-CAGGTCCTGGCTCTACAATTTACTAA-3'
<b><math>\beta</math>-actina</b>	6-FAM-5'-ATTTCCCGCTCGGCCGTGGT-3'-TAMRA	F:5'-AGCGCGGCTACAGCTTCA-3' R:5'-CGTAGCACAGCTTCTCCTTAATGTC-3'

\* F: forward o sentit, R: reverse o antisentit

#### **4. MANIPULACIÓ DE L'ÀCID RIBONUCLEIC (mRNA)**

##### **PCR quantitativa a temps real per estudiar l'expressió gènica**

Segons els principis explicats anteriorment, la qPCR a temps real també es pot aplicar per estudiar l'expressió d'un gen determinat. D'aquesta manera, enlloc de dur a terme la reacció de PCR amb DNA, es fa a partir de DNA complementari o cDNA, el qual es transcriu a partir del RNA de la mostra de partida. Aquest procediment es coneix amb el nom de retrotranscripció o transcripció reversa.

Els reactius, material de laboratori i condicions de PCR són iguals a les ja esmentades a l'apartat anterior. L'anàlisi estadística també segueix un procediment similar, diferint en el fet que els valors de llindar de pèrdua i guany d'expressió es defineixen com la  $C_T$  mitjana del cas estudiat  $\pm 2$  cops la desviació estàndard definida anteriorment pel conjunt de mostres normals.

En el cas de fer servir la tecnologia de les targetes microfluídiques enlloc d'assaigs individuals, el procediment experimental se simplifica. Cada targeta microfluídica consta de 384 pouets repartits en 8 files, a cadascuna de les quals es carregarà el cDNA de les mostres de forma ràpida i senzilla. Les condicions de reacció de PCR per fila de les targetes microfluídiques són les següents:

Aigua estèril: 45 µl

TaqMan® Universal PCR MasterMix: 50 µl

DNA a estudiar: 5 µl (a 10 ng/µl)

Després d'un breu pas de centrifugació, la targeta se segella i es duu a terme la reacció de qPCR de forma estàndard.

## Creació de cDNA (Retrotranscripció o transcripció reversa)

### Material

- RNA de les mostres a estudiar (~1000 ng)
- Aigua DEPC (Ambion Inc®)
- *SuperScript™ III First Strand Kit* (Invitrogen™)
- dNTPs 10 mM diluït a partir de *100 mM dNTP Set* (Invitrogen™)
- *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems®)
- *RNAse inhibitor* (Applied Biosystems®)
  
- Tubs de 0.2 ml (MJ Research)
- Tubs de 1.5 ml (Eppendorf®)
  
- Micropipetes i puntes amb filtre (Gilson®)
- Bloc refrigerat (Deltalab® S.L.)
- Termociclador (Peltier Thermal Cycler, MJ Research)
- Microcentrífuga (Eppendorf®)

### Procediment

Existeixen diferents mètodes de síntesi de cDNA, i en el present treball s'han utilitzat el *SuperScript™ III First Strand Kit* (Invitrogen®) i el *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems®).

### *SuperScript™ III First Strand Kit*

El present Kit comercial s'ha utilitzat per sintetitzar cDNA mitjançant l'ús de *Random hexamers*. Si es desitja es pot dur a terme alternativament amb *OligodT*, reactiu també disponible al Kit.

- 1) Diluir a partir de 1000 ng (fins a 10.000 ng) del RNA de la mostra en 8 µl d'aigua DEPC i distribuir als tubs. Afegir 1 µl dNTPs 10 mM i 1 µl de *Random hexamers* (volum final: 10 µl).
- 2) Posar els tubs al termociclador i sotmetre a 65 °C durant 5 min. En acabar, posar-los en gel o al bloc refrigerat fins passar al següent pas de la reacció.
- 3) Afegir a cada tub la barreja dels següents reactius:

*Buffer 5x*: 2 µl

25 mM MgCl<sub>2</sub>: 4 µl

0.1 M DTT: 2 µl

*RNAse OUT*: 1 µl

Enzim *SuperScript™ III*: 1 µl

- 4) Posar els tubs al termociclador i dur a terme el següent programa de temperatures:



25 °C 25 min  
50 °C 50 min  
85 °C 5 min

5) Posar els tubs en gel o al bloc refrigerat, fer un pols de centrifuga i afegir 1 µl *RNAse H*. Incubar a 37 °C durant 20 min.

6) Aliquotar el cDNA resultant i guardar al congelador a –80°C. S'ha de tenir en compte que el cDNA és molt inestable i que és recomanable no sotmetre'l a cicles repetits de congelació-descongelació. S'estima que es pot mantenir en condicions òptimes durant unes 6 setmanes al congelador.

### ***High Capacity cDNA Archive Kit***

7) Diluir a partir de 1000 ng (fins a 10.000 ng) del RNA de la mostra en 50 µl d'aigua DEPC i distribuir als tubs.

8) Preparar la barreja de reactius de la reacció i repartir als tubs. Les condicions de PCR són les següents (volum final: 50 µl):

*10x RT buffer*: 10 µl  
*dNTPs*: 4 µl  
*10x random primers*: 10 µl  
*RT enzyme 50 U/µL*: 5 µl  
*RNAse inhibitor*: 1.5 µl  
Aigua DEPC- 19.5 µl

9) Posar els tubs al termociclador segons el següent programa de temperatures:

25 °C 10 min  
37 °C 2 h  
4 °C ∞

10) Aliquotar el cDNA resultant i guardar al congelador a –80 °C. S'ha de tenir en compte que el cDNA és molt inestable i que és recomanable no sotmetre'l a cicles repetits de congelació-descongelació. S'estima que es pot mantenir en condicions òptimes durant unes 6 setmanes al congelador.

**Taula 6:** Resum de les sondes i oligonucleòtids de qPCR per estudiar l'expressió gènica utilitzats en el present treball

Gen	Amplicó/ Assaig predissenyat**	Mida de l'amplicó (bp)
18S	4342379	-
Human $\beta$ -Glucuronidase**	Ref: 4326320E	-
ACTL6A	Hs00188792_m1	105
ASPM	Hs00411505_m1	77
B2M	Hs00187842_m1	64
BCL2L11	Hs00708019_s1	92
BMI1	Hs00180411_m1	105
CCND1	Hs00277039_m1	94
CDC2	Hs00176469_m1	101
CDC20	Hs00415851_g1	108
CDK4	Hs00175935_m1	65
CDKN2A	Hs00233365_m1	117
CDKN3	Hs00193192_m1	83
CEBPB	Hs00270923_s1	75
CENPF	Hs00193201_m1	99
DBF4	Hs00272696_m1	77
GSTP1	Hs00168310_m1	54
GTF2B	Hs00155321_m1	66
HMGB2	Hs00357789_g1	99
HPRT1	Hs99999909_m1	100
MCL1	Hs00172036_m1	124
MCM2	Hs00170472_m1	82
MDM2	Hs00234753_m1	82
MKI67	Hs00606991_m1	137
MYC	Hs00153408_m1	107
NEIL13	Hs00157387_m1	82
OGG1	Hs00213454_m1	82
PCNA	Hs00427214_g1	138
PIF1	Hs00228104_m1	104
PLCB2	Hs00190117_m1	69
POLE2	Hs00160277_m1	70
RAN	Hs00741099_g1	146
RAPGEF1	Hs00178409_m1	53
SLC29A1	Hs00191940_m1	77

Gen	Amplificó/ Assaig predissenyat <sup>*#</sup>	Mida de l'amplicó (bp)
<b>SLC29A2</b>	Hs00155426_m1	110
<b>TNFRSF10A</b>	Hs00269491_m1	83
<b>TNFRSF10B</b>	Hs00187196_m1	114
<b>TOP2A</b>	Hs00172214_m1	125
<b>TUBA1B</b>	Hs00744842_sH	110
<b>UHRF1</b>	Hs00273589_m1	105
<b>SLC29A2 per FFPE</b>	Hs01546959_g1	53
<b>TNFRSF10B per FFPE</b>	Hs01043164_m1	67
<b>MYC per FFPE</b>	6-FAM-5'-AGGAGGAACAAGAAGAT-3'-MGB F:5'-CACCACCAGCAGCGACTCT-3' R:5'-ACAGAAACAACATCGATTTCTTCCT-3'	63
<b>RAN per FFPE</b>	6-FAM-5'-CTTAGAGGTTGCTCAGACAA-3'-MGB F:5'-GGCAGCACAGTATGAGCACG-3' R:5'-ACAGAAACAACATCGATTTCTTCCT-3'	61

\* El codi dels assaigs predeterminats correspon a la referència de la casa comercial (Applied Biosystems®). Tots estan marcats amb FAM-MGB.

# F: forward o sentit, R: reverse o antisentit

\*\**Human β-Glucuronidase*: marcat amb VIC-MGB

### Microarrays d'expressió gènica

El recent desenvolupament de la tècnica dels microarrays ha permès l'estudi de l'expressió de milers de gens en un mateix experiment. Per dur-la a terme, es parteix del mRNA de la mostra a estudiar, del qual se sintetitza cDNA de doble cadena. Aquest cDNA es transcriu a cRNA de doble cadena, que es fragmenta i es marca amb una molècula fluoròfora. Tot seguit la mostra s'hibrida sobre els microarrays, que consten de fragments curts de cDNA o d'oligonucleòtids que es troben immobilitzats en una superfície sòlida i que constitueixen seqüències representatives dels gens d'interès per l'estudi. Els fluorocroms se sotmeten a una determinada longitud d'ona i s'exciten, emetent llum que serà enregistrada digitalment mitjançant un escàner i programes informàtics especialitzats. A partir d'aquesta imatge digital s'efectuarà l'anàlisi de dades, el qual variarà en funció de la hipòtesi de treball que s'ha plantejat inicialment (**Figura 18**).

En el present treball s'han utilitzat microarrays d'oligonucleòtids comercials, i el procediment experimental s'ha dut a terme segons els protocols i recomanacions dels fabricants:

*Human Genome U133 Plus 2.0 Array,*  
(<http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/hgu133plus.affx>)

**Taula 7: Reactius emprats a les tècniques experimentals**

<b>Material</b>	<b>Casa Comercial</b>	<b>País</b>	<b>Referència</b>
Albúmina bovina	Sigma <sup>®</sup>	St Louis MO, USA	A4503
Acetat de sodi 3 M	Ambion Inc <sup>®</sup>	Austin TX, USA	9740
Àcid acètic	Panreac <sup>®</sup>	Bcn, Spain	211008.1211
Àcid bòric	Merck <sup>®</sup>	Darmstadt, Germany	1.00165.0500
Àcid nítric	Panreac <sup>®</sup>	Bcn, Spain	133255
<i>Acid Phenol:chloroform pH 4.5</i>	Ambion Inc <sup>®</sup>	Austin TX, USA	9720
Acrilamida 29:1	Bio-Rad <sup>®</sup>	Hercules CA, USA	161-0156
Agarosa	Pronadisa	Madrid, Spain	8014
Aigua DEPC	Ambion Inc <sup>®</sup>	Austin TX, USA	9922
Aigua estèril	Fresenius Kabi España SA	Bcn, Spain	640581
Aigua filtrada milliQ	Millipore <sup>®</sup>	Billerica MA, USA	-
<i>AmpliTaq Gold<sup>®</sup></i>	Applied Biosystems <sup>®</sup>	Foster City CA, USA	N808-0241
APS	Bio-Rad <sup>®</sup>	Hercules CA, USA	161-0700
Anticòs CD3-PE	BD Biosciences <sup>®</sup>	Erembodegem, Germany	335836
Anticòs CD56-PE	BD Biosciences <sup>®</sup>	Erembodegem, Germany	345812
Anticòs CD19-Cy5.5	BD Biosciences <sup>®</sup>	Erembodegem, Germany	331355
Anticòs CD5-APC	BD Biosciences <sup>®</sup>	Erembodegem, Germany	555355
Anticòs anti-ZAP-70	Upstate <sup>®</sup>	Lake Placid NY, USA	05-253MG
Anticòs 2ari <i>goat anti-mouse Ig (FITC)</i>	DakoCytomation <sup>®</sup>	Glostrup, Denmark	F0479
<i>BigDye<sup>®</sup></i>	Applied Biosystems <sup>®</sup>	Foster City CA, USA	4337456
<i>Blue Juice<sup>™</sup></i>	Invitrogen <sup>™</sup>	Carlsbad CA, USA	10816-015
Boles magnètiques antiCD19	Miltenyi Biotec <sup>®</sup>	Bergisch Gladbach, Germany	130-050-201
Bromur d'etidi	Bio-Rad <sup>®</sup>	Hercules CA, USA	161-0433
Carbonat de sodi	Merck <sup>®</sup>	Darmstadt, Germany	1.06392.1000
Cera de parafina	Panreac <sup>®</sup>	Bcn, Spain	253211
<i>CGH Nick Translation Kit</i>	Vysis <sup>®</sup>	Downers Grove IL, USA	32-801024
Citrat de sodi	Sigma <sup>®</sup>	St Louis MA, USA	S1804
Cloroform	Sigma <sup>®</sup>	St Louis MA, USA	C2432

<b>Material</b>	<b>Casa Comercial</b>	<b>País</b>	<b>Referència</b>
<i>Chloroform: Isoamyl alcohol 24:1</i>	Sigma®	St Louis MA, USA	C0549
Clorur de sodi	Ambion Inc®	Austin TX, USA	9759
DAPI II	Vysis®	Downers Grove IL, USA	32-804831
Dextrà sulfat	Sigma®	ST Louis MA, USA	D8906
DLB	USB Corp®	Cleveland Ohio, USA	79269
DMSO	Sigma®	St Louis MA, USA	D2650
<i>DNA step ladder 1 kb</i>	Promega®	Madison WI, USA	G6941
EDTA	Sigma®	St Louis MA, USA	E7889
Etanol absolut	Panreac®	Bcn, Spain	141086
<i>Expand™ High Fidelity PCR System</i>	Roche Applied Science®	Mannheim, Germany	1733818
FCS	GibcoBRL®	Grand Island NY, USA	16170-078
<i>Ficoll-Hypaque</i>	Biomedics®	Madrid, Spain	35382
Formaldèhid 10% neutralitzat	Panreac®	Bcn, Spain	143091
Formaldèhid al 37%	Merck®	Darmstadt, Germany	1.40031.1000
Formamida	Sigma®	St Louis MO, USA	F7503
<i>GenElute™ Gel Extraction Kit</i>	Sigma®	St Louis MO, USA	NA1111
<i>GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit</i>	Sigma®	St Louis MO, USA	G1N70
<i>GenElute™ PCR Clean-Up Kit</i>	Sigma®	St Louis MO, USA	NA1020
Glicerol	Merck®	Darmstadt, Germany	1.04094.1000
Hepes	Sigma®	St Louis MO, USA	H3375
Hidròxid de sodi	Merck®	Darmstadt, Germany	1.06498.1000
<i>High Capacity cDNA Archive Kit</i>	Applied Biosystems®	Foster City CA, USA	4322171
<i>Human Cot-1 DNA</i>	Vysis®	Downers Grove IL, USA	32-800028
Isopropanol	Fluka®	Buchs SG, Switzerland	59300
<i>Kit Fix &amp; Perm</i>	Caltag Laboratories™	Carlsbad CA, USA	CAS-004
<i>L-Glutamine 200 mM (100x)</i>	GibcoBRL®	Grand Island NY, USA	-
Medi DMEM	GibcoBRL®	Grand Island NY, USA	41965-039
Medi RPMI 1640	BioWhittaker™	Verviers, Belgium	BE12-702F
<i>Micro Bio-Spin® 6 Column, Tris</i>	Rio-Rad®	Hercules CA, USA	732-6221
Nitrat de plata en solució	Merck®	Darmstadt, Germany	1.09081.1000
<i>Normocin</i>	Amaxa Biosystems®	Cologne, Germany	VZA-1001
<i>100 mM dNTP Set</i>	Invitrogen™	Carlsbad CA, USA	10297-117
Oligonucleòtids	Sigma®	St Louis MO, USA	-
<i>Pellet-Paint®</i>	Novagen®	Darmstadt, Germany	69049-3
<i>Penicillin-Streptomycin</i>	GibcoBRL®	Grand Island NY, USA	15140-122

<b>Material</b>	<b>Casa Comercial</b>	<b>País</b>	<b>Referència</b>
Proteinasa K	Roche Applied Science®	Mannheim, Germany	03115879001
<i>QIAmp® DNA Mini Kit</i>	Qiagen®	Hilden, Germany	51304
RNAse A	Roche Applied Science®	Mannheim, Germany	10109169001
<i>RNAse inhibitor</i>	Applied Biosystems®	Foster City CA, USA	N8080119
<i>RNAse ZAP®</i>	Ambion Inc®	Austin TX, USA	9780
Sarkosyl sòdic	Fluka®	Buchs SG, Switzerland	61745
SDS	Sigma®	St Louis MO, USA	L4390
Sonda <i>TaqMan®</i>	Applied Biosystems®	Foster City CA, USA	-
<i>Spectrum Green – dUTP</i>	Vysis®	Downers Grove IL, USA	32-803200
<i>Spectrum Red – dUTP</i>	Vysis®	Downers Grove IL, USA	32-803400
SSC 20x	Roche Applied Science®	Mannheim, Germany	1666681
<i>SuperScript™ III First Strand Kit</i>	Invitrogen™	Carlsbad CA, USA	18080-051
Tampó fosfat salí	Roche Applied Science®	Mannheim, Germany	1666789
<i>TaqMan® Universal PCR MasterMix</i>	Applied Biosystems®	Foster City CA, USA	4304437 4324018
TEMED	Bio-Rad®	Hercules CA, USA	161-0801
<i>Tissue-Tek® OCT</i>	Sakura Finetek	Zoeterwoude, The Netherlands	4583
Trizma base®	Sigma®	St Louis MO, USA	T1503
TRIzol®	Invitrogen™	Carlsbad CA, USA	15596-018
Tween-20	Sigma®	St Louis MO, USA	P1379
<i>Ultrapure™ Buffer-Saturated Phenol</i>	Invitrogen™	Carlsbad CA, USA	15513-047
<i>UltraPure™ Glycogen</i>	Invitrogen™	Carlsbad CA, USA	10814-010
<i>WAVE Optimized® Solution D</i>	Transgenomic® Inc	Omaha NE, USA	553412
<i>WAVE Optimized® Syringe Wash Solution</i>	Transgenomic® Inc	Omaha NE, USA	553411
<i>WAVE Optimized® TEAA Buffers</i>	Transgenomic® Inc	Omaha NE, USA	SP2025
Xilol	Panreac®	Bcn, Spain	211765

**Taula 8:** Material fungible emprat a les tècniques experimentals

<b>Material</b>	<b>Casa Comercial</b>	<b>País</b>	<b>Referència</b>
Bisturí (fulla)	Aesculap®	Tutthingen, Germany	BB524
Criotubs de 2ml	Nunc™	Rochester NY, USA	363401
Cubreobjectes petit (24x24)	Marienfeld®	Lauda-Königshofen, Germany	01-020-62
Cubreobjectes gran (24x60)	Marienfeld®	Lauda-Königshofen, Germany	01-022-42
Filtradors Stericup™ 500 ml	Millipore®	Billerica MA, USA	SCGP U05 RE
Fulls d'assecar gels	Bio-Rad®	Hercules CA, USA	1651779
Guants	Hartmann®	Mataró, Spain	604667
Motllos Cryomold®	Sakura Finetek	Zoeterwoude, The Netherlands	4728
Motllos de parafina	-	-	-
Paper d'alumini	Cotalsa®	Aoiz, Spain	Izar-16 m
Parafilm	LabX®	Midland ON, Canada	296953
Pegament	Paniker®	Bcn, Spain	Cola Universal Contacto Avión
Pipetes Pasteur de plàstic	Deltalab®, S.L.	Rubí, Spain	20006C
Placa de 96 pouets	Costar®	Corning NY, USA	6511
Placa de 96 pouets per qPCR	Applied Biosystems®	Foster City CA, USA	4306737
Portaobjectes amb metafases normals	Vysis®	Downers Grove IL, USA	30-806010
Puntes de micropipeta	Gilson®	Middleton WI, USA	-
Puntes de pipeta de 5 i 10 ml	-	-	-
Puntes de xeringa de 20G	BD Microlance™	San José CA, USA	301700
Tapes d'alumini	Costar®	Corning NY, USA	6570
Tires per tapar els pouets	Applied Biosystems®	Foster City CA, USA	4323032
Torundes estèrils	Deltalab®, S.L.	Rubí, Spain	300200
Tubs de 0.2 ml	MJ Research	Waltham MA, USA	TFI-0201
Tubs de 1.5 ml	Eppendorf®	Hamburg, Germany	0030 102.002
Tubs de centrifugació cònics 10 ml	BD Falcon™ Tubes	San José CA, USA	352027
Tubs de 15 ml	BD Falcon™ Tubes	San José CA, USA	352096
Tubs de 50 ml	BD Falcon™ Tubes	San José CA, USA	352098
Xeringues de 1-2 ml	BD Plastipak™	San José CA, USA	-

**Taula 9:** Maquinària de laboratori emprada a les tècniques experimentals

<b>Material</b>	<b>Casa Comercial</b>	<b>País</b>	<b>Referència</b>
<i>ABI Prism<sup>®</sup></i>	Applied Biosystems <sup>®</sup>	Foster City CA, USA	ABI-3100
<i>ABI Prism<sup>®</sup> Sequence detection System</i>	Applied Biosystems <sup>®</sup>	Foster City CA, USA	7900 HT
<i>Agilent Bioanalyzer</i>	Agilent Technologies <sup>®</sup>	Palo Alto CA, USA	2100
Agitador	JP-Selecta <sup>®</sup>	Abrera, Spain	Rodabit
Assecador de gels	Bio-Rad <sup>®</sup>	Hercules CA, Spain	Gel Air Dryer
Bany humit	JP-Selecta <sup>®</sup>	Abrera, Spain	PrecisDig
Bany sec	JP-Selecta <sup>®</sup>	Abrera, Spain	Multiplaces
Bany sec fred	JP-Selecta <sup>®</sup>	Abrera, Spain	BioCold
Bloc refrigerat	Deltalab <sup>®</sup> S.L.	Rubí, Spain	IsoFreeze
Cambra fosca	-	-	-
Campana de flux laminar	EuroAire <sup>®</sup>	Madrid, Spain	Classe 100
Centrífuga de plaques de 96 pouets	SIGMA laboratories <sup>®</sup>	Osterode Am Harz, Germany	4-15C
Centrífuga de tubs de 15-50 ml	SIGMA laboratories <sup>®</sup>	Osterode Am Harz, Germany	4K15
Citòmetre de flux	BD Biosciences <sup>®</sup>	Erembodegem, Belgium	<i>FACS Callibur</i>
<i>Cytovision Ultra workstation</i>	Applied Imaging <sup>®</sup>	San José CA, USA	-
Congelador a -20 °C	Liebherr <sup>®</sup>	Bulle, Switzerland	Comfort
Congelador a -80 °C	Revco <sup>®</sup>	Asheville NC, USA	Ultime II
Cubeta d'electroforesi horitzontal	GibcoBRL <sup>®</sup>	Grand Island NY, USA	V11-4
Cubeta d'electroforesi vertical	GibcoBRL <sup>®</sup>	Grand Island NY, USA	V15-17
Cubetes de plàstic	-	-	-
Eina per tapar els pouets	Applied Biosystems <sup>®</sup>	Foster City CA, USA	-
Espectrofotòmetre	Bio-Rad <sup>®</sup>	Hercules CA, USA	Smart Spec <sup>™</sup> 3000
Estufa-incubador de 37°C	Memmert <sup>®</sup>	Schwabach, Germany	-
Font d'alimentació	Bio-Rad <sup>®</sup>	Hercules CA, USA	-
Llapis de diamant	-	-	-
Màquina <i>autoMACS<sup>™</sup> Separator</i>	Miltenyi Biotech <sup>®</sup>	Bergisch Gladbach, Germany	-
Marc d'assecar gels	Bio-Rad <sup>®</sup>	Hercules CA, USA	-
Microcentrífuga	Eppendorf <sup>®</sup>	Hamburg, Germany	5415D



<b>Material</b>	<b>Casa Comercial</b>	<b>País</b>	<b>Referència</b>
Microcentrífuga refrigerada	Eppendorf®	Hamburg, Germany	5402
Microones	-	-	-
Micropipetes	Gilson®	Middleton WI, USA	-
Micròtom/criostat	Sakura Finetek	Zoeterwoude, The Netherlands	<i>Tissue-Tek® Cryo3®</i>
Motlle de la cubeta d'electroforesi	GibcoBRL®	Grand Island NY, USA	-
Nevera	Liebherr®	Bulle, Switzerland	Comfort
Pinces	-	-	-
Pintes per fer els pouets del gel horitzontal	GibcoBRL®	Grand Island NY, USA	-
Pintes per fer els pouets del gel vertical	GibcoBRL®	Grand Island NY, USA	-
Pipetejador	CLP®	San Diego CA, USA	Poseidon
Processador de mostres histopatològiques	Sakura Finetek	Zoeterwoude, The Netherlands	<i>Tissue-Tek® Xpress®</i>
Recipients de vidre	Pyrex®	Corning NY, USA	-
Recipients coplin de vidre	Wheaton Industries	Millville NJ, USA	WHEA00001509
Separadors de gel vertical	GibcoBRL®	Grand Island NY, USA	-
Suport opac per placa de 96 pouets	Applied Biosystems®	Foster City CA, USA	-
Termociclador	MJ Research	Waltham MA, USA	PTC-200/225
Transil·luminador amb llum ultraviolada	Syngene®	Frederick MD, USA	-
Vidres de gel vertical	-	-	-
Vòrtex	Heidolph	Schwabach, Germany	REAX top
<i>WAVE®</i>	Transgenomic® Inc	Omaha NE, USA	3500