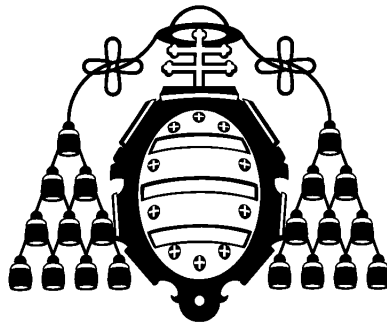


DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRÁCTICAS DE TECNOLOGÍA DEL ADN
RECOMBINANTE

Curso /

NOMBRE Y APELLIDOS:

CURSO Y GRUPO:

Taquilla n.º:

Estudio de los elementos reguladores de la transcripción de un gen de *Sacharomyces cerevisiae*

1. Introducción.

El inicio de la síntesis de RNA mensajero de un gen depende de factores que actúan sobre elementos específicos de su promotor, en respuesta a cambios fisiológicos. Es decir, se requieren dos componentes: elementos que actúan *en cis* y factores que actúan *en trans*. En esta práctica estudiaremos algunos de los elementos necesarios para la regulación transcripcional del gen codificador de la glucoquinasa de la levadura *Sacharomyces cerevisiae*.

En levaduras, los elementos (secuencias) que actúan *en cis*, si exceptuamos la caja TATA, pueden ser agrupados en dos tipos: elementos reguladores positivos y negativos. Los positivos se denominan UAS (upstream activating sequences) y los negativos URS (upstream repressing sequences)

Uno de los procedimientos más útiles para determinar la localización de elementos reguladores que actúan *en cis* es efectuar deleciones en el promotor del gen objeto de estudio y construir DNA recombinante que contenga dichas deleciones fusionadas en pauta con la región codificadora de un gen informador o testigo (chivato). El gen informador suele codificar un enzima del cual carece la célula huésped y que cataliza una reacción cuyo producto puede ser cuantificado fácilmente.

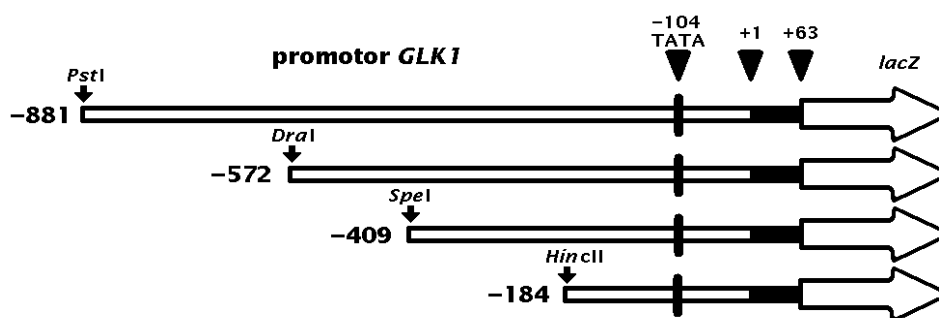


Figura 1: Promotor del gen GLK1.

En el caso que nos ocupa, se parte de dos cultivos de levaduras, cada uno de los cuales, mediante técnicas de DNA recombinante, contiene un fragmento distinto del

promotor del gen de la glucoquinasa de levaduras fusionado en pauta con el gen lacZ codificador de la β -galactosidasa de E. coli . Después de romper las levaduras para obtener extractos proteicos, se ensaya la actividad específica de ambas proteínas de fusión. La comparación de ambos resultados nos indicará si en alguno de los dos casos existe un elemento regulador de la expresión del gen GLK1.

2 . Procedimiento y resultados.

2.1. Ensayo de α -galactosidasa de las fusiones del gen GLK1 con la región codificadora del gen lacZ.

1. Encender los 3 bloques térmicos y ajustarlos a 30°C.
2. Se parte de dos tubos eppendorf rotulados 184 y 409 conteniendo levaduras crecidas en medio rico YPD hasta $A_{600nm} = 1$. Se centrifugan 3 min en la microcentrífuga, se decanta el sobrenadante y el sedimento se resuspende muy bien en 300 μ l de tampón Z (tampón fosfato 100 mM) de pH 7.
3. Se añade a cada tubo, un volumen, ya medido, de bolas de vidrio equivalente a 300 μ l. Se agitan a la vez ambos tubos en el agitador a velocidad máxima durante 14 periodos de 30 segundos con intervalos de 30 segundos en hielo.
4. Se centrifuga a velocidad máxima durante 5 minutos. Se pipetea los sobrenadantes a tubos eppendorf limpios. Dichos sobrenadantes son los extractos celulares o extractos proteicos .
5. Se ponen 100 μ l del sobrenadante 184 y 5 μ l del sobrenadante 409 en tubos Eppendorf limpios y rotulados convenientemente. Se lleva hasta 800 μ l con tampón Z de pH 7. En un tercer tubo, se pipetea 800 μ l de dicho tampón, el cual nos servirá como blanco de la reacción.
6. Guardar los extractos celulares sobrantes en la nevera hasta el día siguiente .
7. Introducir los tubos en un bloque a 30°C y no sacarlos hasta que hayamos detenido la reacción. Añadir 200 μ l de sustrato o-nitrofenil- β -D-galactósido de concentración 4 mg/ml. Empezar a contar el tiempo hasta la aparición del color amarillo debido al o-nitrofenol formado. Generalmente serán 5 minutos, pero dicho tiempo dependerá del número de células rotas. Se detiene la reacción con 500 μ l de Na_2CO_3 1 M.
8. Debido a que el colorímetro necesita un volumen mínimo de 4 ml para poder medir la absorbancia, se diluyen las 3 mezclas de reacción de la siguiente manera: pipetear 0,5 ml de cada mezcla de reacción en tres tubos grandes y añadirles 3,5 ml de Na_2CO_3 1 M.
9. Ajustar el colorímetro a cero con la mezcla que no contenía extracto proteico, denominada blanco. Medir la Absorbancia a 410 nm de las mezclas diluidas frente a este blanco.

2.2 . Resultados.

Calcular en la página 4 la actividad enzimática en unidades/ml de muestra (U/ml) utilizando el coeficiente de extinción molar (ϵ) del o-nitrofenol que es $4500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, tal como se explica a continuación:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l,$$

siendo $l = 1 \text{ cm}$ el paso de luz,

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot l} \text{ moles/l}$$

$$\frac{U}{\text{ml}} = \frac{\text{moles}}{\text{litro}} \times \text{factor dilución} \times \text{vol. final ensayo (litros)} \times$$

$$\frac{10^6 \mu\text{moles}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1}{\text{tiempo (min)}} \times \frac{1}{\text{vol. muestra (ml)}}$$

(Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar $1 \mu\text{mol}$ de sustrato en 1 minuto en condiciones óptimas de ensayo.)

2.3 . Ensayo de la concentración de proteína en los extractos celulares.

Para poder comparar los datos de actividad β -galactosidásica, es necesario que ambas muestras tengan el mismo número de células y que la rotura haya sido comparable en ambas muestras. Para corregir posibles variaciones se determina la concentración de proteína total en cada muestra y se comparan los datos de actividad específica (U/mg).

Utilizaremos el método de Lowry.

1. Diluir los extractos 1v a 3vol con agua destilada milliQ.
2. Rotular 4 tubos de plástico limpios de 12 ml escribiendo 409 y 184, es decir, haremos duplicados para cada construcción.
3. Pipetear 5 y 10 μl del extracto 409 diluido en sus dos tubos correspondientes, y 5 y 10 μl del extracto 184 diluido en cada uno de los otros dos tubos.
4. Llevar con agua destilada hasta 1 ml.
5. En cinco tubos de ensayo adicionales numerados se pipetea 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1,0 ml de la disolución de $200 \mu\text{g/ml}$, a continuación, se añaden a cada uno de los tubos 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, 0,0 ml de agua destilada, respectivamente, y se prepara el denominado tubo blanco con 1,0 ml de agua (éste servirá para restar la absorbancia intrínseca de los reactivos)

6. Añadir 2,5 ml de la solución C¹ a cada uno de los 10 tubos.(Incl. blanco)
7. Mezclar y dejar 10 min. a temperatura ambiente.
8. Añadir 0,5 ml de solución de Folin-Ciocalteu a cada tubo. Agitar y esperar 30 min.
9. Medir la absorbancia a 500 nm.

2.4. Resultados.

1. Construir la recta patrón representando los valores de absorbancia obtenidos frente a las respectivas cantidades, en mg, de BSA en cada tubo(del 5 al 9)
2. Calcular en la página 5 la actividad específica (U/mg) de la β -galactosidasa en cada extracto proteico.
3. Deducir si hay algún elemento regulador de la transcripción en alguna de las dos fusiones realizadas. Expresarlo en la conclusión de la página 5.

¹Preparar la solución C para todas las taquillas: mezclar 200 ml de Solución A (2% de carbonato sódico y 0,1 N de NaOH), con 2 ml de tartrato sódico-potásico al 2% y con 2 ml de CuSO₄·5H₂O al 1%.

2.5. Cálculos.

Muestra	Actividad U/ml	Proteína mg/ml	Actividad específica U/mg
184			
409			

2.6. Conclusión.