

6.CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

Les conclusions més rellevants extretes d'aquest treball són les següents:

- L'acumulació d'acetat és un dels factors que limita l'eficiència d'un procés de cultiu en bioreactor de cèl·lules d'*Escherichia coli*. La seva formació i secreció depèn tant de la composició del medi de cultiu, de la concentració inicial de glucosa, del mode d'operació i condicions de cultiu en bioreactor, com del genotip de la soca. Convé caracteritzar l'efecte de cadascun d'aquests factors sobre la fisiologia i metabolisme cel·lulars i adequar-los per tal de reduir la seva formació, ja que la seva acumulació al brou de fermentació inhibeix el creixement i redueix l'expressió de gens recombinants.
- Tot i que els diferents modes d'operació de cultiu en bioreactor i les estratègies d'alimentació en cultius en discontinu-alimentat i cultius en continu permeten reduir el rendiment de formació d'acetat, en soques d'*Escherichia coli* K12 la seva síntesi és constitutiva, i per tant, no es pot eliminar del tot la seva formació. No obstant, les estratègies d'alimentació de glucosa de manera que resulti limitant del creixement, minimitzen la seva formació i permeten augmentar el rendiment cel·lular.
- L'anàlisi de fluxos metabòlics intracel·lulars revela que existeix un desajust entre la capacitat de captació i degradació de la glucosa en la glucòlisi fins a piruvat i la incorporació d'acetil-CoA al cicle dels àcids tricarboxílics (CAT). L'entrada de glucosa a una velocitat que excedeix la capacitat de les vies centrals del metabolisme fa que el substrat principal del CAT, l'acetil-CoA, no pugui ser acomodat pel cicle. La formació d'acetat actua com a vàlvula de seguretat dels excedents d'intermediaris de les vies centrals del metabolisme que la cèl·lula no pot aprofitar en la generació de noves cèl·lules i CO_2 , alleugerint el col·lapse que es dona a nivell del CAT.

- La formació i secreció de subproductes en condicions de creixement aeròbic en medis amb glucosa no és un fet aïllat d'*Escherichia coli* K12. La soga d'*Escherichia coli* BL21, en les mateixes condicions, produeix lactat, a més a més d'acetat, com a subproducte majoritari. El llevat *Saccharomyces cerevisiae* produeix etanol com a subproducte majoritari del metabolisme aeròbic quan creix amb glucosa com a font de carboni. Les cèl·lules animals, com l'hibridoma KB26.5, produeixen lactat com a subproducte del metabolisme aeròbic de la glucosa. La causa de la formació d'aquests subproductes és l'elevada velocitat d'incorporació dels substrats, principalment la glucosa, fet que provoca un col·lapse metabòlic degut a un desajust entre les capacitats del catabolisme i l'anabolisme, tot i que a diferents nivells del metabolisme intermediari. Mentre que a *Escherichia coli* la formació d'acetat és deu fonamentalment a un mecanisme de compensació dels excedents de carboni que no poden ser oxidats al CAT fins a CO_2 i H_2O , en cèl·lules eucariotes com *Saccharomyces cerevisiae* o l'hibridoma KB 26.5 la formació d'etanol i lactat respectivament, es deu a la limitada capacitat dels mecanismes de transport entre el citosol i el mitocondri (on té lloc el CAT i la respiració) que permeten la regeneració dels cofactors reduïts. En tots els casos la formació de subproductes suposa una disminució de l'aprofitament dels recursos disponibles, i en segon terme un factor de limitació del creixement, i per tant, de l'eficiència del procés.
- La redistribució de fluxos metabòlics per tal de reduir la formació de subproductes, des de l'enfoc de l'Enginyeria Metabòlica, ha de tenir en compte en primer lloc la reducció de la velocitat específica de captació de glucosa, i en segon lloc la disminució de l'acumulació d'acetil-CoA per augment de la capacitat d'acomodar-lo a nivell del CAT

- És possible redistribuir els fluxos metabòlics intracel·lulars mitjançant modificacions genètiques senzilles de gens que codifiquen per enzims de les vies centrals del metabolisme. No obstant, la modificació en un sol gen pot ser inefectiva o tenir un efecte parcial respecte l'objectiu fixat, degut a la complexitat del metabolisme i la seva regulació. Per aquesta raó, l'obtenció d'una regulació més eficient passa per l'expressió de múltiples gens que actuin a diferents nivells del metabolisme cel·lular.

7.MATERIALS I MÈTODES

7. MATERIALS I MÈTODES

7.1. INSTRUMENTACIÓ GENERAL DE LABORATORI

L'equipament de laboratori usat per a la realització d'aquest treball es detalla a continuació:

Per a la preparació de medis de cultiu i reactius així com per a la determinació del pes sec de les mostres es va utilitzar una balança digital de tipus analític i granatari (AC100-Mettler; SBC22-Scaltec; PJ600-Mettler). Per a la realització de cultius de cèl·lules bacterianes i de llevats en medi sòlid (agar) es van utilitzar varies estufes d'incubació a temperatures entre 28°C i 37°C (varis models-Memmert). Els cultius de cèl·lules en suspensió en matràs agitat es van realitzar en incubadors d'aire o aigua amb agitació orbital (HT-Infors i arcó de Gallenckamp). Els cultius de cèl·lules animals es van realitzar en un incubador de CO₂ al 5% de saturació (3862 IR-Forma Scientific). Els cultius en bioreactor de cèl·lules en suspensió es van realitzar en diferents equips bioreactors de sobretaula d'entre 1 i 2 litres de volum útil (Biostat-L, Biostat-B i Biostat-MD-B.Braun Biotech). Tots els equips anaven equipats amb sondes de temperatura, pH, pO₂ i escuma i controladors d'aquests paràmetres. Com a equipament accessori pel desenvolupament dels diferents cultius en bioreactor es van utilitzar petites bombes peristàltiques (Eyela i MasterFlex) i una bomba de membrana amb capçals esterilitzables (FE-211-B.Braun Biotech). També es va disposar d'un programari de monitorització i control dels principals paràmetres de fermentació (MFCS v.3.2. B.Braun Biotech). Per mantenir les condicions d'esterilitat durant les manipulacions de material es van utilitzar cambres de flux laminar horitzontal (BH-10-Telstar) i de flux vertical (AV-100- Telstar). Ambdós eren irradiades amb llum U.V. durant 10-15 minuts abans de treballar-hi. Per a l'esterilització de tot el material de vidre, medis de cultiu i bioreactors es van utilitzar autoclaus elèctrics de laboratori (Autester-Selecta i 400-Varioklav). Per a l'esterilització de medis de cultiu o components sensibles al calor s'usaven filtres de 0.22 µm de diàmetre de porus (Millex-GS-Millipore). Les observacions de cèl·lules es realitzaven en un microscopi òptic (model BH-2-Olympus) des de 400 a 1000 augments. El recompte directe de

cèl·lules animals es realitzava en un microscopi invertit de contrast de fases (TMS-Nikon) mitjançant un hemacitòmetre (Improved Neubauer Chamber-Brand). El seguiment dels cultius bacterians per densitat òptica es va realitzar en un espectrofotòmetre (PU8620-Philips). Per a la determinació del pes sec cel·lular (PSC) s'utilitzava un forn a 105°C (Selecta). Per a centrifugar el material biològic s'utilitzaven microcentrífugues (112-Sigma), centrífugues de sobretaula (Megafuge 1.0-Heraeus Sepatech) i supercentrífugues refrigerades (J2-21M-Beckman). Per a la determinació analítica de D-glucosa i L-lactat es va utilitzar un analitzador automàtic (YSI 2700 Select-Yellow Spring Inst.). Per a la determinació analítica de sucres, àcids orgànics i aminoàcids es van utilitzar cromatògrafs líquids d'alta resolució (HP1050 i HP1090-Hewlet Packard). Es disposava també del programari Millenium (Waters) pel tractament dels resultats dels anàlisis per HPLC. Per a les tècniques de DNA recombinant es va utilitzar una sèrie d'equipament específic com cubetes d'electroforèsi per a gels de DNA (Pharmacia-LKB), fonts d'alimentació (PowerPack200-BioRad) i un equip termociclador per a l'amplificació de gens per PCR (Hybaid-Biorad). Per a la visualització del DNA tenyit amb bromur d'etidi es va utilitzar un equip transiluminador de raigs ultravioleta i, per a realitzar fotos de les bandes dels gels, una càmera (Polaroid amb carrets tipus #545).

7.2. LÍNIES CEL·LULARS i VECTORS PLASMÍDICS

En la realització d'aquest treball es van emprar fonamentalment cèl·lules bacterianes del gènere *Escherichia*. També es van emprar, quan es va generalitzar la problemàtica central en aquest treball (apartat 4.10), un llevat del gènere *Saccharomyces* i una cèl·lula animal, l'hibridoma KB-26.5.

El genotip d'aquestes soques s'especifica a continuació.

7.2.1 Línies cel·lulars

7.2.1.1. Soques bacterianes

- *Escherichia coli* **MC1061** (Meissner *et al.*, 1987): K12 *hsdR2*, *mcrB1*, *araD139*, $\Delta(\text{ara ABC-leu})_{7697}$, $\Delta(\text{lac})X74$, *galU*, *galk16*, *rpsL*, *thi*, *strA*.
- *Escherichia coli* **BL21**(Studier *et al.* 1986): B, F *dcm ompT hsdS*(r_B - m_B -)
- *Escherichia coli* **DH5- α** (Hanahan, 1983): F' *endA1 hsdR17*($r_K^- m_K^+$) *supE44 thi-1 recA1 gyrA* (NaI^r) *relA1* $\Delta(\text{lacZYA-argF})_{U169}$ (m80lacZ ∇^{-1} M15).
- *Escherichia coli* **K12 wt** (Bachmann i Reeves, 1994): K12 salvatge (Coli Genetic Stock Center: CGSC#5073) soca F⁺ *rfbB51*(del).
- *Escherichia coli* **PPA211**(Ruijter *et al.* 1992): K 12 *ptsG2 ptsM1 strA glk-7* (Tn10 linked to *pts*) *thi*, *rpsL*. Soca modificada defectiva pel gens necessaris pel transport de glucosa i manosa a través del sistema de transport de la fosfotransferasa (PTS). Cedida pel Dr. Pieter Postma de l'Institut de Recerca Bioquímica E.C. Slater de la Universitat d'Amsterdam
- *Escherichia coli* **F15** (Terada *et al.* 1995): K12 hospedadora del plasmídi pT3 cedida pel Dr. Katsura Izui del Departament d'Agricultura Biològica de la Facultat d'Agricultura de la Universitat de Kyoto.

7.2.1.2. Llevat

Com a cèl.lula de llevat es va utilitzar una espècie salvatge de *Saccharomyces cerevisiae*.

7.2.1.3. Cèl.lula animal

La línia cel·lular animal utilitzada en aquest treball fou l'hibridoma KB-26.5, que prové de la fusió entre cèl.lules de mieloma NS1 i limfòcits B de ratolins Balb C. L'hibridoma KB-26.5 produeix un anticòs monoclonal (IgG₃) específic contra l'antigen A₁ d'eritròcits. Aquest anticòs monoclonal és un dels que s'utilitzen en la determinació del grup sanguini del sistema ABO humà. La línia cel·lular que prové dels Laboratoris Knickerbocker SAE (Barcelona).

7.2.2. Vectors plasmídics

Els vectors d'expressió plasmídics emprats en aquest treball són els següents:

- **pJCO46**: plasmidi derivat de pJLA602 (Schauder *et al.* 1987) que expressa el gen *lacZ* d'*E. coli* sota el control dels promotors en tàndem p_L i p_R del bacteriòfag lambda i el repressor termosensible del gen *cI857^{ts}* que codifica per un repressor de la transcripció que s'inactiva per temperatura a partir de 28°C (Casadaban *et al.* 1980). A partir d'aquesta temperatura i fins a 42°C, el repressor inactivat permet l'inici de la transcripció i per tant la síntesi de la proteïna recombinant β -galactosidasa d'*Escherichia coli*. Aquest sistema d'inducció és molt apropiat per al canvi d'escala en la producció de proteïnes recombinants (Caulcott i Rhodes, 1986), ja que no requereix l'addició d'inductors químics com l'àcid nalidixic o la mitomicina C (Mott *et al.* 1985). Malgrat tot s'han descrit alguns problemes com la toxicitat per l'hoste del producte expressat, la formació de cossos d'inclusió o l'incorrecte plegament de la proteïna recombinant (Schein *et al.* 1991).

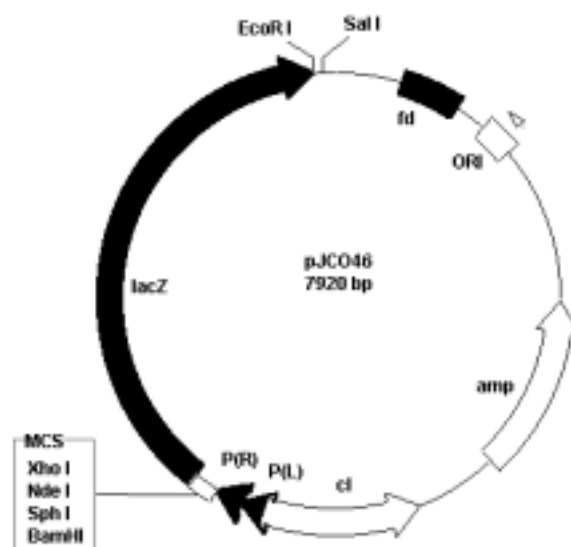


Figura 7.1: plasmidi d'expressió pJCO46.

El plasmidi porta a més a més un "Multi Cloning Site" o regió rica en dianes de restricció on es poden insertar gens forànis. El gen *lacZ* es va obtenir per PCR (Vent^R polymerase) de pAZe3 (Zaballos *et al.* 1987) amb els encebadors o "primers" BEG3 (5'-GGGGATCCCCTCGTTTTACA-3') i BEG2 (5'-

GGGAATTCTTTTTGACACCAGA-3') en els quals es van introduir les dianes *Bam* HI i *Eco* RI. Els fragments de DNA es van digerir amb aquests dos enzims i van ser lligats a continuació. El plasmidi pJCO46 expressa la β -galactosidasa a partir del vuitè codó. (Corchero i Vila, 1994). El plasmidi pJCO46 s'ha utilitzat com a plasmidi d'expressió de proteïnes recombinants model a *Escherichia coli*. També s'ha modificat convenientment per tal d'expressar altres gens diferents del *lacZ*, utilitzant el mateix sistema regulador termoinduïble d'expressió de gens recombinants.

- **pJLA603**: És un plasmidi idèntic al pJLA602 però amb una diana de restricció menys al MCS No conté la diana per *Nco*I.

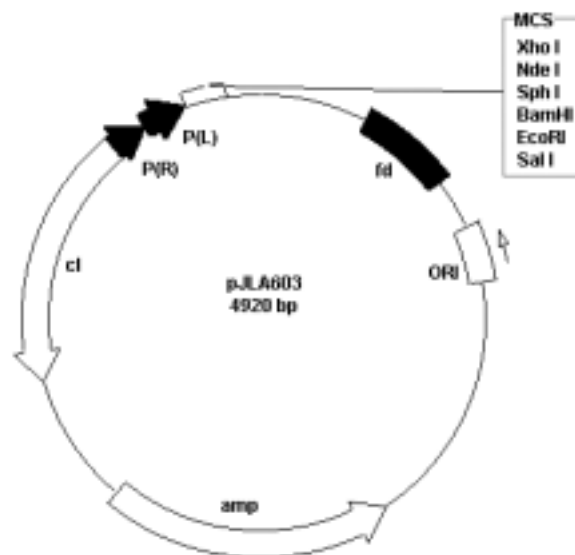


Figura 7.2: plasmidi d'expressió pJLA603.

- **pTSG11**: El plasmidi pTSG11 conté el gen estructural per l'EII^{Glc}, *ptsG*, sota el control del promotor *tac* (P_{tac}). Com a resultat de la presència del repressor *lac* (*lacI^r*), l'expressió del gen *ptsG* pot ser modulada segons la quantitat d' IPTG afegit al medi de cultiu. El vector d'expressió pTSG11 conté, a més a més, el gen de resistència a l'ampicil·lina (gen *bla*). La regió *rrnB* representa part de l'operó d'*E. coli* que conté el gen per el component

5S del rRNA i els seus dos senyals de finalització de la transcripció. Per evitar la recombinació del gen *ptsG* plasmídic amb el DNA del genòfor bacterià i que es pugui restituir el genotip PTS salvatge, la soca PPA211 és *RecA⁻*.

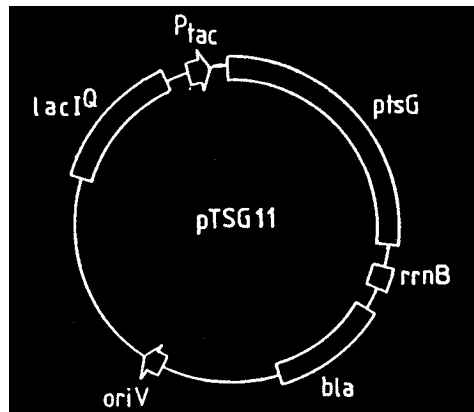


Figura 7.3: plasmidi d'expressió del gen *ptsG*, pTSG11.

- **pT3:** Aquest plasmidi, de 5.2 Kb de grandària, conté un fragment DNA de 3.2 Kb de longitud amb el gen *ppc* a partir del nucleòtid 230 després del lloc d'inici de la transcripció, i manté la regió promotora del gen salvatge. Per tant, s'expressa constitutivament com aquest, i està sotmès al control pels mateixos efectors al·lostèrics que el gen salvatge. El plasmidi pT3 conté, a més a més, el marcador de selecció de resistència a l'ampicil·lina. Permet obtenir concentracions de PEPC de fins el 30% de la proteïna total, en cèl·lules d'*Escherichia* recombinants creixent en glucosa (Terada *et al.* 1995).

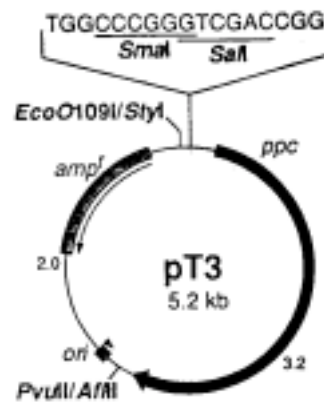


Figura 7.4: plasmidi d'expressió del gen *ppc*, pT3.

- **pTrc99A** (Amann *et al.* 1988): plasmidi que permet l'expressió regulada de gens a *E. coli* que porta el promotor fort d'expressió, híbrid *trp/lac*, el lloc d'unió a ribosomes (RBS) *lacZ*, el MCS de pUC18 que permet l'inserció en tres pautes de lectura i el finalitzador de transcripció *rmB*. La presència de l'alel *lacI^q* en el plasmidi assegura la repressió del promotor híbrid *trp/lac* durant la clonació i el creixement en qualsevol soca hoste.

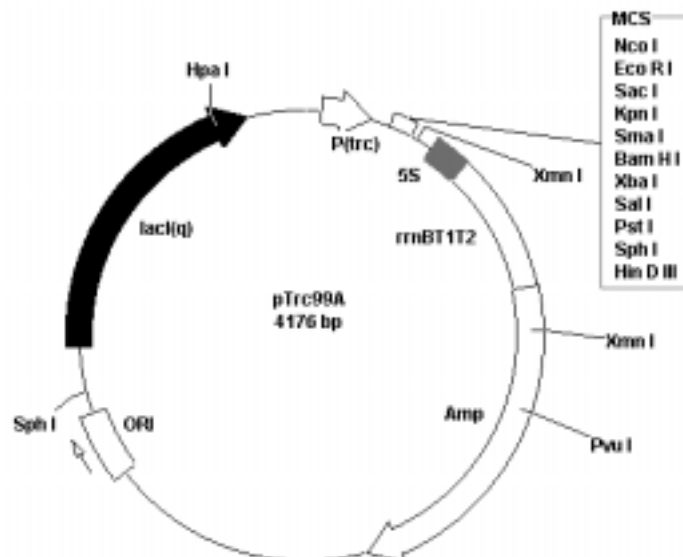


Figura 7.5: plasmidi d'expressió pTrc99A.

7.2.3. Manteniment de les línies cel·lulars

7.2.3.1. Manteniment de les soques bacterianes i de llevat

Es guardaven estocs glicerïnats de totes les soques en vials de 2 ml a -85°C . La concentració final de glicerol per *E. coli* és del 15 % p/v mentre que pels llevats és del 20%. Per a congelar les soques es preparen vials de 2 ml de volum amb 0.150 ml de glicerol estèril per *Escherichia coli* i 0.200 ml per *Saccharomyces cerevisiae* i, s'hi afegeixen 0.850 ml o 0.800 ml d'un cultiu saturat (crescut durant tota la nit: 12-16 hores de duració) de les cèl·lules bacterianes o de llevat respectivament. S'agita bé al vortex i es congelen seguidament amb neu carbònica i acetona. A continuació es guarden al congelador de -80°C .

Les soques es mantenen en càpsula de Petri amb 20 ml de medi LB-agar per *E. coli* i YEPG-agar per *Saccharomyces cerevisiae*, amb o sense els antibiòtics adequats en cada cas, a partir dels cultius glicerïnats de les soques que s'han d'utilitzar. Amb una nansa de sembra (nança de Köeller) s'agafa una alíquota d'un dels vials glicerïnats sense descongelar i es sembla en placa d'agar. També s'ha utilitzat un sistema comercial de glicerínació amb boletes imbuïdes de glicerol (Cryo-billes AEB400100-AES Laboratoires, FR), que permet retirar una perla congelada cada cop que s'ha d'iniciar un assaig i sembrar-la en agar per tal de revificar-la abans de preparar el cultiu inòcul en medi líquid.

Les plaques d'*Escherichia coli* s'incuben generalment a 37°C i, les de *Saccharomyces cerevisiae* a 30°C en una estufa durant 12-24 hores i posteriorment es conserven a 4°C durant un mes, com a màxim.

També es s'han efectuat comprovacions rutinàries de les soques per resistència a antibiòtics i pel sistema de reparació del DNA *RecA* (irradiació a la llum U.V des de 10 a 90 segons d'aliquotes d'un cultiu líquid en plaques d'agar no selectives i comprovació de la capacitat de reparar el DNA). Ocasionalment es s'han comprovat

també algunes característiques nutricionals (auxotrofies d'aminoàcids o vitamines) a alguna característica química.

7.2.3.2. Manteniment de la línia cel·lular KB-26.5

Es conserva un estoc de la línia cel·lular en criotubs en nitrogen líquid (-196°C). Per fer els experiments es procedeix a la descongelació d'un criotub i es manté l'hibridoma en cultiu en suspensió per un període no superior a dos mesos. El manteniment de l'esterilitat en tots aquests processos és de gran importància i es comprova regularment l'absència de contaminants. La majoria de procediments per aquesta línia cel·lular d'hibridoma s'han basat en treballs prèvis del grup (Memòria de Tesi Doctoral d' Anna Sanfeliu (1995) i d'Albert Tintó (1999)).

Congelació d'hibridomes

Per tal de preparar un estoc de 10 criotubs (Nunc 377267) de cèl·lules congelades es segueixen una sèrie de passos que s'expliquen a continuació:

1. Es cultiven entre 160 i 200 ml (4 flascons amb 50 ml) de cèl·lules fins que es trobin al mig de la fase exponencial (aproximadament a les 48 hores de cultiu), ja que la concentració final cel·lular en el criotub haurà de ser de 8×10^6 cèl·lules vives/ml i la concentració a la meitat de la fase exponencial és de l'ordre de 5×10^5 cèl·lules vives/ml.
2. Es preparen els medis de congelació:
Medi A: Medi base amb 10% FCS (45 ml medi base + 5 ml FCS); es manté a temperatura ambient.
Medi B: Medi base amb 10% FCS i 20% dimetilsulfòxid (DMSO)(Sigma D-2650)(7 ml medi base + 1 ml FCS + 2 ml DMSO); a 0-4°C .
3. Es transfereixen els cultius a congelar (160-200 ml) a tubs de centrífuga de 50 ml estèrils (Nunc, 339497) i es centrifuguen a 500 g durant 5min.
4. Es descarta el sobrenadant de cada tub, es resuspenen els sediments en un total de 40 ml de medi A i es determinen la concentració i la viabilitat cel·lulars. A partir de la concentració de cèl·lules vives, es calcula el volum amb què caldria

resuspendre les cèl·lules després de centrifugar-les per tal de tenir una concentració final de 8×10^6 cèl·lules vives/ml.

5. Es centrifuguen els 40 ml a 500 g durant 5 minuts. Es llença el sobrenadant i es resuspèn el sediment amb la meitat del volum calculat anteriorment de medi A. Es manté 10 minuts a 4°C .
6. S'afegeix l'altra meitat del volum, de medi B (que conté DMSO). El DMSO és un crioprotector que travessa la membrana cel·lular, però és altament tòxic per la cèl·lula. Per això és important que quan s'afegeixi el medi B les cèl·lules es trobin a $0-4^{\circ}\text{C}$ i que es faci lentament per tal d'evitar l'estrès osmòtic.
7. Es transfereix la suspensió de cèl·lules als criotubs, prèviament preparats en una gradeta sobre gel (1ml de la suspensió per criotub), i es posen ràpidament a -80°C .
8. A les 24 hores es transfereixen els criotubs al contenidor de N_2 líquid (CMR 8031 Cryomed, Forma Scientific)
Cada criotub conté: 0.5 ml de cèl·lules en medi base amb 10% FCS
 0.5 ml de medi base amb 10 % FCS i 20% DMSO

Descongelació d'hibridomes

Una descongelació ràpida de la suspensió cel·lular és essencial per a la seva recuperació òptima. El procés de descongelació consta dels següents passos:

Es preparen:

Medi C: 20 ml de medi base amb 20% de sèrum (16 ml medi base + 4 ml FCS). Es posen 10ml en 2 tubs de centrífuga estèrils (Nunc, 339497) i s'escalfen a 37°C .

Medi D: medi utilitzat normalment pel manteniment de la línia cel·lular (medi base amb 0.5-5% FCS, segons les cèl·lules en concret).

1. S'agafa el criotub del contenidor de N_2 líquid i es posa ràpidament en un bany a 37°C .
2. S'agita fins que el contingut estigui pràcticament del tot desglaçat. És important que no es deixi més temps del necessari en el bany donat que el medi de congelació porta DMSO que és tòxic per a les cèl·lules.

3. S'afegeixen lentament unes gotes dels 10 ml de medi C pre-escalfat a 37°C. A continuació es passa tot el contingut del criotub al tub de centrífuga que conté la resta dels 10 ml de medi C.
4. Es centrifuga a 500 g durant 5 minuts. Per tal d'eliminar el DMSO que porta el medi de congelació es realitza un altre rentat: es llença el sobrenadant i es resuspèn el pellet amb els 10 ml restants de medi C. Es treu una mostra i es fa el recompte cel·lular (cèl·lules vives i mortes). Es calcula el volum de medi que caldria afegir per tenir una concentració cel·lular de 5×10^5 cèl·lules vives/ml.
5. Es centrifuga a 500 g durant 5 minuts. Es llença el sobrenadant i es resuspèn el pellet amb el volum de medi D calculat a l'apartat anterior.
6. Es transfereix a un flascó de cultiu i s'incuba a 37°C a l'incubador de CO₂.

Normalment els dos primers dies s'observa una davallada de la viabilitat cel·lular; aquest fet fa imprescindible canviar el medi diàriament, durant els dos primers dies, per eliminar possibles restes de DMSO i sempre tenint present de no utilitzar un nivell d'inòcul inferior de 2×10^5 cèl·lules vives/ml.

Manteniment de la línia cel·lular en cultiu en suspensió

Una vegada es disposa de la línia descongelada, es manté cultivant-la en suspensió en flascons de 25 cm² durant un període no superior a dos mesos. Els cultius es realitzen en volums de 10 ml i es dilueixen cada 2-3 dies amb medi fresc per obtenir un inòcul inicial entre $1-1.5 \times 10^5$ cèl·lules vives/ml. D'aquesta manera sempre es disposa d'un estoc de cèl·lules a partir del qual es podien fer créixer i preparar els inòculs per portar a terme els diferents experiments.

El procediment seguit per fer el subcultiu (o resembra) de la línia cel·lular és el següent:

1. Es procedeix a l'observació del cultiu en flascó directament al microscopi òptic invertit de contrast de fase (Nikon TMS-F) per veure si es detecta contaminació i/o deterioració del cultiu. Quan un cultiu s'incuba per un

període superior a tres dies sense canviar-li el medi, s'observa una davallada de la viabilitat cel·lular així com una disminució del pH, que es fa aparent per un canvi de color de l'indicador de pH de vermell cap a taronja-groc, i la morfologia cel·lular es veu deteriorada. Per tal d'impedir aquesta deterioració del cultiu i disposar sempre d'un estoc de cèl·lules amb una alta viabilitat, es porta a terme un canvi del medi de cultiu per medi fresc acompanyat d'una dilució de les cèl·lules. Aquest procediment s'ha de portar a terme de forma sistemàtica i acurada.

Es treu una mostra del flascó de cultiu amb una pipeta Pasteur i es fa el recompte cel·lular. El volum necessari de cèl·lules que cal agafar per sembrar un flascó de cultiu nou es calcula segons l'expressió:

$$V \text{ (ml)} = \frac{\text{cèl.lules/ml de l'inòcul}}{\text{cèl.lules/ml en el flasc}} \times 10 \text{ ml}$$

1. L'inòcul que s'utilitza és de $0.4-1.5 \times 10^5$ cèl·lules vives/ml, tal com s'especifica als apartats de resultats i discussió corresponents.
2. S'afegeixen 10 ml de medi base fresc a un flascó de cultiu i s'incuba a 37°C amb una atmosfera amb un 5% de CO_2 per atemperar el medi de cultiu i per equilibrar el pH.
3. Es centrifuga el volum V de cultiu, calculat anteriorment, a 500 g durant 5 minuts.
4. Es llença el sobrenedant i es resuspen el sediment amb els 10 ml de medi fresc que estaven a 37°C . Aquesta operació es repeteix cada 2-3-dies durant els dos mesos següents.

7.3. MEDIS DE CULTIU

7.3.1. Medis pel cultiu bacterià

7.3.1.1. Medi complexe de Luria Bertani LB (Maniatis *et al.* 1982)

Medi de cultiu apte pel cultiu d'un gran nombre de bacteris sense requeriments especials. La seva composició es detalla a la següent taula:

Component	concentració
Peptona tríptica de caseïna	10 g/l
NaCl	10 g/l
Extracte de llevat	5 g/l

Taula 7.1: Composició del medi LB.

Un cop dissolts els components s'ajusta el pH a 7.4 amb NaOH al 30%. En cas d'usar-lo com a medi sòlid pel cultiu en placa, s'hi afegeixen 15 g/l d'agar. S'esterilitza la solució per calor al autoclau a 121°C durant 15 minuts per volums de fins a 1 litre i 20 minuts per volums de fins a 2 litres. Si cal s'hi afegeixen els antibiòtics adequats un cop la temperatura ha baixat per sota de 50°C.

7.3.1.2. Medi definit M9 (Maniatis *et al.* 1982).

Medi mineral salí glucosat de composició definida pel cultiu de bacteris sense requeriments especials. La seva composició es detalla a la taula 7.2.

Les sals de Ca^{2+} i Mg^{2+} es preparen concentrades i s'esterilitzen per calor, cadascuna per separat, i la glucosa també preparada a part s'esterilitza a l'autoclau a 121°C durant 15 minuts. Aquests components s'afegeixen a les sals d'amoni i fosfat prèviament esterilitzades a l'autoclau a 121°C durant 15 minuts.

Component	concentració
NH ₄ Cl	1.0 g/l
NaCl	0.5 "
KH ₂ PO ₄	3.0 "
Na ₂ HPO ₄	6.0 "
CaCl ₂ 0.1M	1 ml/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O 1M	1.5 ml/l
Glucosa	2-15 g/l

Taula 7.2: Composició del medi M9.

7.3.1.3. Medi definit M9E

Medi de cultiu de composició idèntica al medi M9 però enriquit amb sals d'amoni i oligoelements. Durant el desenvolupament d'aquest treball es va detectar que, en alguns cultius en bioreactor, hi havia limitació de la font d'amoni. Aquesta limitació es va atribuir a una pèrdua per evaporació de la font d'amoni. Aquest fet no permetia completar el creixement i esgotar la font de carboni, i per tant, completar els experiments. Un cop es va establir que la limitació del creixement era deguda a la manca d'aquest component (tècnica d'addició per polsos de diferents components) es va treballar sempre amb el medi suplementat amb 3 g/l de NH₄Cl (concentració màxima a partir de la qual es detecta inhibició del creixement a *E.coli* (Lee et al. 1987)), i d'aquesta manera assegurar la correcta provisió de la font de nitrogen pel creixement. Posteriorment, per tal de millorar la qualitat del medi de cultiu i afavorir el creixement bacterià es va enriquir aquest amb una solució d'oligoelements. Aquest medi redefinit s'anomenà M9 Enriquit (M9E) i fou el medi mínim comunament emprat pel cultiu d'*Escherichia*. La composició del suplement d'oligoelements és la següent:

Component	concentració
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	40 mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 "
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10 "
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4 "
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 "
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2 "
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 "
H_3BO_3	0,5 "

Taula 7.3: Composició del suplement d'oligoelements del medi M9E

La solució d'oligoelements es prepara concentrada 1000 vegades i s'utilitza en una proporció de 1 ml/l, prèviament esterilitzada a 121°C durant 15 minuts. La sal de ferro s'afegeix al medi de cultiu abans de la inoculació esterilitzant-lo directament per filtració (Filtres Millex-GS de 0.22 µm).

7.3.1.4. Medi semicomplexe CAM9/CAM9E

Medi de composició idèntica al M9/M9E al qual si afegeixen 2 g/l de casaminoàcids. El pH s'ajusta a 7.4 amb NaOH al 30%. El procediment de preparació és el mateix que ens anteriors medis de cultiu M9 i M9E. Els casaminoàcids s'esterilitzen conjuntament amb les sals majoritàries a 121°C duranr 15 minuts.

7.3.1.5. Suplements dels medis de cultiu

Antibiòtics: L'ampicil·lina (Britapen, amoxicilna 1 g) és un bactericida que impedeix la formació de components de la paret bacteriana (unió de molècules de peptidglicà), i per tant inhibeix el creixement. S'ha emprat a concentració final de 100 µg/ml. L'estreptomicina (CEPA, sulfat d'estreptomicina 1g) és també un bactericida que

impedeix la síntesi de proteïnes a nivell de traducció. S'ha emprat a concentració final de 25 µg/ml. Per a una més fàcil manipulació es preparen en dissolució concentrada 1000 vegades: 100 mg/ml per l'ampicil·lina i 25 mg/ml per l'estreptomicina. S'utilitzen en una proporció d'1 ml/l de medi a preparar. S'esterilitzen per filtració i es guarden en aliquotes d'1 ml a -20°C.

Vitamines: Les vitamines (Merck laboratories) s'esterilitzen per filtració i s'afegeixen al medi de cultiu en fred. Es preparen solucions concentrades en volums d'1 ml i es guarden a -20°C. La tiamina (tiamina-HCl·2H₂O) es prepara en solució a concentració 1M, s'esterilitza per filtració i s'usa en una proporció d'1 ml/litre.

Isopropil-β-D-tiogalactòsid (IPTG; P.M=238.3): (Roche Mol. Diagnostics 724 815) Inductor de l'expressió molt efectiu. Quan la cèl·lula creix en medi complex o en medi mínim amb glucosa la transcripció de l'operó *lac* d'*E.coli* (*lacZ*, *lacY* i *lacA*) està bloquejada pel repressor *lac*, producte del gen veí *lac I*^q. Quan la cèl·lula creix en presència de lactosa o del inductor no metabolitzable IPTG (anàleg químic de la galactosa), el repressor *lac* deixa de bloquejar la unió de la RNA polimerasa i per tant permet la transcripció dels gens *lacZ*, *lacY* i *lacA*. El producte del gen *lacZ*, l'enzim β-galactosidasa talla la lactosa en glucosa i galactosa (però no l'IPTG). Es prepara una solució amb 2 g d'IPTG en 10 ml d'aigua ultrapura i s'esterilitza per filtració (0.22 µm diàmetre de porus), es dispensa en volums d'1 ml i es guarda a -20°C. Per a cultius en bioreactor es prepara la concentració desitjada pel volum de medi de cultiu (2 litres) en 10 ml d'aigua ultrapura, i s'afegeix directament a aquest, un cop esterilitzat i refredat el medi, per filtració (0.22 µm diàmetre de porus).

Antiescumant: En els cultius en bioreactor s'afegeix 1 gota per litre de medi d'un antiescumant químic (MAZU DF 7960 de Dow-Chemical). Per mantenir el control de la formació d'escuma en els cultius en bioreactor es prepara una solució diluïda al 20% d'aquest antiescumant, esterilitzat a l'autoclau durant 15 minuts.

7.3.2. Medis de cultiu per Llevats

Saccharomyces cerevisiae és una de les cèl·lules eucariotes més estudiada i utilitzada amb fins tant de recerca com de producció de productes d'interès, i entre aquests, també proteïnes recombinants. Són cèl·lules relativament senzilles i fàcils de cultivar i s'han emprat com a model d'estudi per a comprendre millor la majoria de processos que es donen en les cèl·lules eucariotes. El cultiu de llevats és simple i més econòmic que el d'altres fongs i línies cel·lulars també eucariotes i, es disposa d'un gran nombre d'eines genètiques i moleculars per al seu estudi. Els llevats presenten un genoma, organitzat en cromosomes, molt més petit que el d'altres cèl·lules eucariotes com les cèl·lules animals, però la resta d'estructures cel·lulars i òrgànuls subcel·lulars són molt semblants que els dels eucariotes superiors.

Els sucres són la font de carboni i energia més comú per fongs i llevats i la D-glucosa, el carbohidrat més amplia i fàcilment utilitzat. Existeixen diferents transportadors per diferents sucres (permeases) i hi ha també diferències en quant als sistemes de transport per un mateix sucre d'un gènere de llevat a un altre gènere. A *Saccharomyces* el transport de glucosa es realitza per difusió facilitada: l'entrada es dona per diferència de gradient de concentració sense consum d'energia. S'han descrit dos tipus de permeases de transport d'hexoses (hexokinases) a *Saccharomyces*, unes d'alta afinitat (K_m : 1-5 mM) i unes altres de baixa afinitat ($K_m > 20$ mM). Segons la disponibilitat de glucosa, la cèl·lula presenta predomini d'unes o altres, modulant així la velocitat d'incorporació dels sucres al llarg del creixement. Els llevats poden ser aeròbics obligats o anaerobis facultatius segons metabolitzin els sucres en presència o absència d'oxigen. No obstant, la respiració és obligada quan el creixement es realitza a partir de fonts de carboni diferents als sucres, com per exemple els hidrolitzats de proteïnes. *Saccharomyces cerevisiae* és un llevat és anaerobi facultatiu.

7.3.2.1. Medi complex YEPG

Component	concentració
Bactopeptona	20 g/l
Extracte Llevat	10 g/l
Glucosa (dextrosa)	20 g/l

Taula 7.4: composició del medi YPEG

La glucosa s'esterilitza per filtració i s'afegeix a la resta de components esterilitzats a l'autoclau (121°C durant 20 min) un cop freds.

7.3.2.2. Medi Definit amb glucosa (Medi de Wickerham's):

Component	concentració
(NH ₄) ₂ SO ₄	4 g/l
KH ₂ PO ₄	1 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g/l
NaCl	0.5 g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.335 g/l
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.020 g/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.040 g/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.010 g/l
Cu SO ₄ ·5H ₂ O	0.004 g/l
H ₃ BO ₃	0.050 g/l
Glucosa	20 - 40 g/l
Mio-inositol	10 mg/l
Pantotenat calcic	2 mg/l

Àcid nicotínic	0.4 mg/l
Piridoxina-HCl	0.4 mg/l
Tiamina-HCl	0.4 mg/l
pABA	0.2 mg/l
Riboflavina	0.2 mg/l
Biotina	0.02 mg/l
Àcid fòlic	0.002 mg/l

Taula 7.5: composició del medi definit de Wickerhams.

Per a preparar aquest medi es preparen quatre solucions per separat concentrades 100 vegades (i s'utilitzen després en una proporció de 10 ml/l):

- les sals de K^+ , Mg^{2+} , i Na^+ ;
- el $CaCl_2$;
- els elements traça de bor, zenc, ferro, sodi i coure;
- les vitamines.

La glucosa es prepara en una solució concentrada 20 vegades.

Tots els components excepte les vitamines s'esterilitzen per calor $121^\circ C$ durant 15 minuts i es guarden a temperatura ambient. Les vitamines s'esterilitzen per filtració i es guarden a la nevera de $4^\circ C$. La sal d'amoni es pesa per separat en cada experiment i s'esterilitza per filtració.

7.3.3. Medis de cultiu d'hibridomes: DMEM

El cultiu de cèl·lules animals presenta un gran interès en l'obtenció de biomolècules complexes amb una correcta conformació i activitat biològica. Aquest procés presenta una sèrie de característiques diferenciades respecte el cultiu de microorganismes, que cal tenir en compte en desenvolupar el procés: velocitats de creixement i concentracions cel·lulars més baixes, medis de cultiu més complexes, resistència als metabolits tòxics limitada i alta sensibilitat als estímuls externs. Per

tant, és molt important tenir en compte una sèrie d'aspectes a l'hora de dur a terme el procés, entre els quals destaquen la selecció de la composició del medi de cultiu, el subministrament d'oxigen, el control sobre l'acumulació de productes tòxics, la disminució al màxim dels esforços tallants de l'agitació i la regulació d'altres factors com el pH, la temperatura o la pressió osmòtica (Freshney, 1994).

Els medis emprats en el cultiu de cèl·lules animals són de composició complexa i molt rics en nutrients. En general aquests medis han estat formulats per operar en sistemes en discontinu, en els que s'addicionen tots els nutrients al principi del cultiu de manera que la durada del procés s'estén fins al moment en que s'esgota un dels nutrients o s'acumula algun dels productes del metabolisme cel·lular a nivells inhibitoris. Bàsicament, els medis inclouen una font de carboni, habitualment glucosa, una mescla equilibrada de sals minerals que permeten mantenir un pH i una pressió osmòtica en els marges adients i un gran nombre d'aminoàcids i vitamines essencials que la cèl·lula no pot fabricar per sí mateixa i que, per tant, cal incloure en la formulació inicial del medi. Normalment cal també un suplement d'entre un 1 i un 20% v/v de sèrum fetal boví (FCS), producte que proporciona una sèrie d'elements traça, lípids, factors de creixement i hormones que són imprescindibles per garantir el creixement de molts tipus de cèl·lules animals (Freshney, 1989).

El subministrament d'oxigen al cultiu cel·lular i l'agitació del medi no es poden realitzar amb els sistemes convencionals o amb aeració per bombolleig. Cal tenir en compte que les cèl·lules animals no tenen paret cel·lular, per tant són enormement sensibles als esforços tallants que originen els mecanismes d'agitació i aeració. Per aquest motiu les cèl·lules animals es cultiven a velocitats d'agitació lentes (40-100 rpm), amb pales inclinades o hèlixs marines, i amb sistemes d'aeració sense bombolleig, com ara un tub de silicona permeable als gasos submergit en el medi de cultiu.

La temperatura òptima per la majoria de cèl·lules animals oscil·la entre els 35 i els 37°C. Tot i això poden tolerar baixades considerables de temperatura, en canvi un augment de la temperatura per sobre dels 39°C provoca una ràpida mort del cultiu. Pel que fa al pH del medi, el rang òptim per les cèl·lules animals varia entre les diferents espècies i línies cel·lulars, però es pot situar entre 7.0 i 7.4, uns valors molt propers als existents a la sang. Un pH del medi fora d'un rang de valors entre 6.6 i 7.8 fa que les cèl·lules comencin a perdre la viabilitat. Els valors òptims d'osmolaritat del medi són similars als existents en el plasma sanguini de la majoria de mamífers, entre els 290 i 310 mOsm/kg. L'interval acceptat per gran part de les cèl·lules animals però, és una mica més ampli, entre 260 i 320 mOsm/kg. En aquells processos on hi ha una addició continuada de nutrients concentrats és fàcil arribar a sobrepassar aquest rang, provocant la inhibició del creixement cel·lular.

7.3.3.1. Medi base

El medi base emprat pel cultiu d'hibridomes ha estat DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), que conté sals inorgàniques, aminoàcids i vitamines imprescindibles pel creixement de l'hibridoma.

La presència de NaHCO_3 al medi permet mantenir el pH d'aquest a un valor inicial de 7.1 que és l'òptim requerit pel cultiu d'hibridomes. El pH es controla amb el tampó $\text{CO}_2:\text{NaHCO}_3$ que requereix la presència d'una atmosfera de 5-10% de CO_2 al cultiu. Les reaccions d'equilibri que es donen són:



El roig de fenol és un indicador de pH usat, de manera que, el color del medi esdevé rosa quan el pH és superior a 7.6, vermell si el pH es troba entre 7.6 i 7.0, taronja quan varia entre 7.0 i 6.6, i groc quan es troba per sota de 6.6. Aquest medi DMEM base, amb unes concentracions inicials de glucosa 25 mM i glutamina 6 mM, és el que s'ha utilitzat per mantenir la línia cel·lular, fer créixer inòculs i realitzar

experiments de cèl·lules en suspensió. Per a la preparació del medi base cal realitzar una solució amb els següents components:

Component	concentració
DMEM (Biological Industries, 11-055-1K)	13.83 g
L-Glutamina (Sigma, G-5763)	0.292 g
NaHCO ₃ (Panreac)	3.7 g
Roig de fenol (Sigma, P-5530)	0.015 g
Glucosa (Panreac)	0.450-1.802 g
Aigua ultrapura mQ	1 litre

El medi s'esterilitza per filtració mitjançant membranes de 0.22 µm de diàmetre de porus (Millipore, Sterivex-GP) a l'interior d'una cambra de flux vertical (Telstar, AV-100). S'impulsa el medi amb una bomba peristàltica (Masterflex, 7521-45 amb un capçal Easy-Load 7518-00).

Posteriorment, és necessari suplementar el medi esterilitzat amb els següents components:

Component	Quantitat	
Sèrum fetal de vedella (FCS, Fetal calf serum)	20 ml	(2% v/v)
β-mercaptoetanol (Solució 0.1 M)	0.5 ml	(0.05 mM)
Insulina (Solució 4 UI/ml)	0.5 ml	(0.002 UI/ml)

El medi es manté a 4°C en absència de llum durant un període no superior a dos mesos.

7.3.3.2. Estocs de components per a suplementar els medis de cultiu

Els medis de cultiu emprats se suplementen amb unes solucions estoc estèrils de sèrum, β-mercaptoetanol, insulina i, en determinats casos, neomicina.

Sèrum fetal de vedella (FCS): el sèrum emprat als experiments és subministrat per Biological Industries (ref. 04-001, lot 651493) en ampolles de 500 ml i s'emmagatzema a -30°C . Prèviament al seu ús, cal inactivar el complement que hi pugui haver en el sèrum. Un cop inactivat el sèrum, es preparen alíquotes estèrils de 10, 20 i 50 ml, i es guarden a -30°C . Les cèl·lules de la línia d'hibridoma estudiada en aquest treball requereixen ser cultivades en medi amb 2% FCS.

β -mercaptoetanol: es prepara una solució de 70 μL de β -mercaptoetanol (Sigma, M-6250) en medi DMEM base per obtenir una concentració final de 0.1 M. S'esterilitza per filtració i es preparen alíquotes de 0.6 ml en tubs Eppendorf estèrils que es guarden a -30°C . D'aquests, s'afegeixen 0.5 ml per litre de medi.

Insulina: es prepara una solució de 0.5 ml d'insulina (Actrapid HM Novo, Insulina Humana Monocomponent, 40 UI/ml) estèril en 4.5 ml de medi DMEM base estèril per obtenir una concentració final de 4 UI/ml (0.16 mg/ml). La solució es guarda en una ampolla estèril a 4°C . La proporció d'aquesta solució que s'afegeix al medi de cultiu és de 0.5 ml/l de medi.

7.4. SISTEMES I ESTRATÈGIES DE CULTIU DE CÈL·LULES

En un primer apartat es consideren els sistemes de cultiu de bacteris i llevats, i en el següent apartat els sistemes de cultiu de cèl·lules animals.

7.4.1. Cultiu en matràs agitat

El cultiu de microorganismes (bacteris i llevats) en matràs agitat representa l'eina bàsica de treball per a l'estudi del comportament d'una soca, i és un pas previ obligat al cultiu en bioreactor, ja que permet realitzar el canvi d'escala necessari per a l'inoculació amb el volum i concentració de cèl·lules adequada. El seu ús inclou, des de l'estudi i caracterització inicial d'una soca, a la determinació de la cinètica de creixement de les cèl·lules i de producció tant de metabòlits com de proteïnes recombinants. També s'utilitza per a revificar soques congelades. S'han utilitzat

matrassos tipus Erlenmeyer amb deflectors, sempre mantenint una relació medi de cultiu:volum total del matràs de 1:5, per assegurar una òptima transferència d'oxigen al medi durant el creixement.

En tot cultiu en matràs l' inòcul es prepara a partir d'una colònia aïllada d'un cultiu en medi sòlid. Es sembra un matràs amb 10 ml de medi fresc i s'incuba durant tota la nit (O/N) en un agitador orbital a 250 rpm a la temperatura desitjada: 37°C pels bacteris i 30°C pels llevats. Ocasionalment s'han realitzat incubacions a 28°C i 42°C pels cultius bacterians de soques recombinants amb vectors d'expressió termoinduïble segons el nivell d'expressió desitjat. El cultiu inòcul desenvolupat durant la nit es transfeeix posteriorment (1:50) en matrassos de 250 ml o 500 ml de volum per a la realització de cada estudi i seguidament es posen a incubar a la temperatura apropiada.

En experiments de cultiu en bioreactor en que es vol comprovar el nivell d'expressió dels gens recombinants termoinduïbles sense afectar el cultiu per l'increment de temperatura, s'extreuen aliquotes d'aquest (5-10 ml) a diferents temps del cultiu i es posen a incubar en matrassos de 25-100 ml a la temperatura d'inducció: 28°C, 30°C, 37°C o 42°C. En els experiments amb soques recombinants amb vectors d'expressió induïbles per IPTG s'addiciona l'inductor químic al principi del cultiu mantenint-se les condicions d'incubació invariables durant tot l'experiment.

El volum de l'inòcul varia entre el 2 i com a màxim el 10% (v/v) i depen de la concentració de biomassa assolida per aquest. Es preten començar sempre els cultius amb una concentració de biomassa entre 0.1-0.3 g/l de PSC. D'aquesta manera els cultius començen sempre en les mateixes condicions.

7.4.2. Cultiu en bioreactor de tanc agitat

Descripció dels equips bioreactors utilitzats

Els bioreactors de laboratori usats en aquest estudi són tots bioreactors de tanc agitat de sobretaula, esterilitzables a l'autoclau i que permeten la mesura i control de les següents variables: temperatura entre 8°C per sobre la temperatura ambient de l'aigua i 60°C, velocitat d'agitació entre 0 i 1200 rpm, pH entre 2 i 12, pO_2 entre 0 i 100 % del valor de saturació amb aire. A més a més consten de controladors per l'addició d'antiescumant. Cada equip consta d'un vas de cultiu de 2 litres útils (3.2 l. total) amb camisa termostàtica i tapa d'acer inoxidable amb orificis d'entrada (o "ports") per a les sondes de temperatura (Pt-100), de pH (elèctrode d'electròlit gelificat InPro 3000 d'Ingold) i de pO_2 (sonda polarogràfica d'Ingold), a més de les sondes d'antiescuma i nivell (sondes de conductivitat). Disposen també de ports addicionals a la tapa per a l'addició de suplementes del medi i agents correctors del pH i escuma i d'un port d'inoculació. L'eix d'agitació té 3 discs amb 6 pales planes d'agitació cadascun (pales tipus Rushton) regulables en alçada. El vas disposa també d'uns deflectors per evitar la formació de vòrtex degut a l'agitació.

En els equips digitals (Biostat-B i Biostat-MD) la pressió parcial d'oxigen dissolt, pO_2 , pot ser controlada a través d'un llaç de control amb cascada amb la velocitat d'agitació i/o amb una unitat de mescla de gasos de manera que permet l'enriquiment del corrent d'entrada d'aire amb oxigen pur. D'aquesta manera es pot assegurar que la variable es mantingui durant tot el cultiu en el valor prefixat. En els equips analògics (Biostat-L) només es pot controlar la pO_2 per variació de la velocitat d'agitació. Quan convé s'enriqueix el corrent d'entrada d'aire amb oxigen pur, mantenint la pressió final a 1 bar d'una mescla d'aire i oxigen sintètic i el cabal a de gasos en 1 vvm. Aquest fet és d'especial rellevància si el microorganisme que es vol cultivar és de metabolisme anaeròbic facultatiu com *Escherichia coli* o *Saccharomyces cerevisiae*. En general en un cultiu discontinu d'*Escherichia coli* amb qualsevol font de carboni com a substrat i a velocitat de creixement entre 0.2 i 1.0 h⁻¹ el consum d'oxigen és quasi idèntic: 10-20 mmols /g PSC·h (Andersen i von Meyenburg, 1980), i superior al de qualsevol llevat. Aquest fet indica que arriba un moment en que la respiració funciona al límit i que la cèl·lula encara que tingui més recursos

no pot augmentar més la seva capacitat respiratòria i per tant anabòlica. El valor de consum màxim d'oxigen per *Escherichia coli* és de 20 mmols/g PSC·hora. El valor mínim que es considera per entrar en condicions anaeròbies és de menys de 1 mmol/g PSC· h. La transferència d'oxigen al medi depèn de la temperatura, composició del medi i condicions d'operació (cabal d'aire i velocitat d'agitació) però es pot considerar en sistemes com el descrit d'entre 50 i 100 mmol O₂ /l ·h.

Després d'esterilitzar el bioreactor a l'autoclau a 121°C durant 20 minuts, es deixa refredar i shi afegeixen els components del medi que s'esterilitzen per filtració. Si cal es compensa el volum d'aigua perduda per evaporació addicionant-ne la necessària estèrilment. És convenient tarar el vas de cultiu del bioreactor per tal de realitzar aquesta compensació de volum després de l'esterilització. A continuació es connecten totes les sondes amb els corresponents cables, s'enceben els agents correctors de pH, i s'omple el circuit de termostatització.

Un cop establerts els paràmetres de temperatura i agitació i assolits els valors programats de treball es calibra la sonda d'oxigen amb nitrogen pel valor zero de calibració i amb aire o amb aire i oxigen fins a la saturació del medi pel valor del 100%. La sonda d'oxigen convé polaritzar-la un mínim de 6 hores abans de l'esterilització o bé recalibrar-la després del test d'esterilitat. La sonda de pH es calibra a pH 4.0 i 7.0 amb tampons calibrats, prèviament a la esterilització del vas de cultiu. En tots els cultius es deixa el bioreactor en condicions d'operació durant 24-48 hores per tal de realitzar un test previ de la seva correcta esterilització, o bé en tot cas es retira una aliquota estèrilment i s'incuba en un matràs per tal d'assegurar l'esterilitat del medi.

La inoculació del reactor es realitza bé a través d'una xeringa hipodèrmica a través d'un port de la tapa del vas proveït d'un septum de silicona, o bé a través d'una ampolla preparada a tal fi, connectada amb el vas per un tub de silicona, i insuflant aire pel filtre d'aire del tap de l'ampolla.

En tots els casos l'aire es subministrat estèril per filtració amb un filtre esterilitzable de 0.22 µm de diàmetre de porus. La sortida de gasos es realitza a través d'un sistema condensador de gasos proveït d'una camisa per on circula aigua freda equipat amb un filtre de 0.22 µm de diàmetre de porus.

La presa de mostres es realitza manualment mitjançant un sistema de presa de mostres proveït amb l'equip que permet l'extracció de brou de fermentació per aspiració en un tub de 15 ml, la retirada del volum mort del circuit de nou cap al bioreactor per impulsió i després la retirada de la mostra també, de nou, per impulsió amb aire a través del filtre, per un altre conducte que permet la recollida en un tub apropiat. El sistema va proveït d'un filtre per a l'esterilització de l'aire que permet l'operació. L'operació de retirada final de la mostra es realitza al costat de la flama d'un metxer Bunsen, per evitar contaminacions.

L'addició d'agents correctors es realitza mitjançant tres bombes peristàltiques independents (Watson-Marlow) amb un rang de cabals entre 5-15 ml/minut. Cada solució, de sosa, àcid o antiescumant, està degudament preparada i estèril en una ampolla (Schott GL45) que disposa d'un tap amb dues sortides: una per la solució i una per l'entrada d'aire. La primera condueix els agents a través d'un tub de silicona connectat a una entrada a la tapa del vas de cultiu. La segona s'equipa amb un filtre d'aire per a mantenir les condicions d'esterilitat durant l'operació. Els agents correctors s'addicionen automàticament, per accionament de les bombes, mitjançant el llaç de control de pH i escuma.

7.4.3. Estratègies de cultiu de cèl·lules en bioreactor

7.4.3.1. Cultiu discontinu

El cultiu discontinu (o batch) és un mode d'operació en que s'afegeixen tots els components necessaris pel creixement de la població de cèl·lules abans de la seva inoculació i que durant el desenvolupament d'aquest només es suplementa amb aire i

agents correctors de pH i escuma si convé. El cultiu finalitza quan s'han esgotat els nutrients o nutrient principal del medi de fermentació o bé quan el creixement es veu inhibit per acumulació de productes del metabolisme tòxics per a les cèl·lules.

El mostreig periòdic del brou de fermentació permet determinar la concentració de biomassa i la concentració de metabòlits del brou de fermentació. Les mostres es prenen de forma asèptica, al costat d'una flama, i tot seguit es dispositen en gel per tal de reduir el metabolisme i poder avaluar l'estat del cultiu d'aquell moment. El volum de mostra és de 1 a 10 ml de brou sense superar en cap cas al final del cultiu el 10% del volum de treball total.

7.4.3.2. Cultiu discontinu-alimentat

L'operació en discontinu-alimentat és un cultiu discontinu alimentat amb medi fresc a partir d'un determinat moment del creixement. Per aquest motiu tots els cultius discontinu-alimentat comencen amb una fase de cultiu discontinu, i per tant el protocol és el mateix que en aquest (apartat anterior). No obstant al ser un cultiu alimentat es sol començar amb un volum més reduït, per exemple la meitat del volum de treball final, i s'acaba quan s'ha ocupat el volum útil total. Es requereix una bomba addicional per al subministrament del medi d'alimentació. La composició del medi d'alimentació pot ser la mateixa que la de la fase de cultiu discontinu, tot i que sovint per allargar al màxim el procés i evitar ocupar tot el volum útil del vas abans de que s'aturi el creixement es prepara concentrat. En altres casos l'aliment és un sol nutrient, usualment el substrat principal, que es pot esgotar abans que els altres. En altres casos és una o varies solucions de nutrients. En l'operació discontinu-alimentat no es retira cap corrent de medi processat del reactor durant la durada del procés, excepte el volum requerit de mostreig, que en cap cas excedeix el 10 % del volum total.

7.4.3.3. Cultiu en continu

El cultiu continu és una eina molt adient per estudiar l'efecte de variacions en la composició o concentració de nutrients sobre el creixement i per veure els efectes en el metabolisme, en especial sobre el consum de substrats i la formació de subproductes. El cultiu en continu es basa en l'addició continuada de medi fresc, i en l'extracció de brou de cultiu a la mateixa velocitat, de manera que el volum de treball es manté constant amb el temps. Si el cultiu està ben agitat, es pot treure una mostra representativa de la concentració de substrat i de la població de cèl·lules a la sortida junt amb el brou. Quan realitzem un cultiu continu i s'assoleix un estat estacionari, les concentracions de substrats i productes, i la velocitat de creixement es mantenen constants. Aquest fet no es pot aconseguir en cultiu discontinu o discontinu-alimentat, ja que les condicions van variant al llarg del procés.

Hi ha varies modalitats de cultiu en continu segons el paràmetre que es mantingui constant. El més utilitzat és el quimiostat. Aquesta modalitat consisteix en dissenyar un medi d'alimentació de tal manera que els nutrients que conté estiguin en excés excepte un que sigui limitant del creixement. Aquest nutrient limitant determinarà la velocitat de creixement que en últim terme quan s'assoleixi l'estat estacionari només permetrà que creixin les cèl·lules segons la velocitat d'alimentació. En l'estat estacionari la velocitat de dilució (D) és igual a la velocitat específica de creixement (μ) i per tant la concentració de biomassa roman constant.

El cultiu en continu consisteix en realitzar un cultiu discontinu i a partir d'un determinat moment arrencar el cultiu en continu aportant contínuament un corrent de medi fresc a mesura que s'elimina un corrent de medi residual que conté biomassa i productes del metabolisme. Es requereix de dues bombes addicionals, una per l'alimentació de medi fresc (bomba de membrana FE-211) i una altre per a l'extracció de medi processat (Watson-Marlow de l'equip bioreactor). Quan pel

corrent de sortida s'obtenen contínuament densitats cel·lulars d'igual concentració i concentracions de productes constants es diu que el cultiu ha assolit l'estat estacionari del creixement. Es considera que un cultiu està en estat estacionari quan durant 3-5 temps de residència (inversa de la velocitat de dilució quan el volum de cultiu és 1 litre). El principal avantatge d'aquest mode d'operació és que la producció de biomassa o del producte d'interès és constant un cop s'ha assolit l'estat estacionari. Tot i la utilitat del cultiu en continu també presenta algunes desavantatges. La complexitat del sistema de cultiu, del mode d'operació, el desgast dels components al llarg de la durada del procés i el risc de contaminació en són algunes.

Muntatge experimental: L'equip bioreactor utilitzat en aquest treball per a realitzar els cultius continus va ser un Biostat-L amb un vas de cultiu de 1.5 litres de volum. Els cultius en continu es van realitzar amb un volum de treball de 1 litre. El desenvolupament del cultiu inòcul i les condicions de cultiu foren similars a les del cultiu discontinu.

El manteniment del volum constant, s'assegura mitjançant una cànula d'extracció de medi de fermentació prèviament tarada a 1 litre de volum del vas, mitjançant una bomba peristàltica (Watson-Marlow) amb un cabal superior al d'alimentació de medi fresc. Les mostres s'obtenen d'aquest corrent amb un sistema de presa de mostres manual. La bomba d'addició és una bomba de membrana (FE211 de B.Braun Biotech) amb un capçal esterilitzable que permet l'addició de medi entre 1.2 ml/h i 6 l/h de forma molt acurada. El tanc de medi fresc i/o la solució concentrada de glucosa s'esterilitzen a l'autoclau junt amb el capçal, acoblats a través d'un tub de silicona provist d'un connector ràpid que permet la connexió a l'entrada del vas amb un mínim risc de contaminació. A nivell de la conducció de medi fresc d'entrada, just abans d'entrar al vas de cultiu es disposa d'un sistema addicional de presa de mostres que permet obtenir mostres del medi d'alimentació del reactor, per tal de mesurar correctament la concentració de glucosa del corrent d'entrada. El dos

tancs de medi, fresc i processat, així com la presa de mostres i el propi vas de cultiu, estan connectats amb l'atmosfera exterior amb un filtre de 0.22 μM de grandària de porus (Acrodisc CR PTFE, Gelman Sciences) per tal d'assegurar l'esterilitat de l'aire que entra en contacte amb el sistema. Aquestes condicions junt amb la utilització d'una bomba de membrana permeten mantenir la velocitat de dilució fixada.

7.4.3.4. Cultiu de cèl·lules animals

Per tal de preparar l'experiment de cultiu de cèl·lules d'hibridoma referenciat a l'apartat 4.10, s'han utilitzat els següents sistemes i mètodes de cultiu, prèviament posats a punt en un altre treball (Anna Sanfeliu, 1995. Memòria de Tesi Doctoral. Dept. Enginyeria Química. UAB).

Flascons de cultiu (T-flask)

El manteniment de la línia cel·lular es du a terme en flascons de poliestirè de 25 cm^2 per cultius de fins a 10 ml, i de 260 cm^2 per cultius de fins a 50 ml de medi (marca Nunc, T-flasks 136196 i 178891 respectivament) que es subministren estèrils. Els cultius es mantenen en volums de 10 ml, efectuant-se el seu recompte i dilució cada 2 o 3 dies amb medi fresc per a donar un recompte inicial de $1.0 \cdot 10^5$ cèl·lules viables $\cdot \text{ml}^{-1}$. Els flascons es mantenen dins un incubador (Forma Scientific CO_2 incubator) amb una atmòsfera que conté un 5% de CO_2 i un 95 % d'humitat relativa. En aquests flascons es realitza tant la ressebra de la línia cel·lular com els experiments de cèl·lules en suspensió.

Flascons agitats (Techne, Spinner flasks)

Són recipients de vidre de borosilicat amb un volum útil de 125, 250 o 500 ml que permeten l'agitació de les cèl·lules mitjançant una vareta-pèndol també de vidre unida a la base del tap i amb un imant al extrem oposat, que actua de mosca d'un agitador magnètic (Techne, MCS-104S per a 4 flascons). L'agitació emprada en tots els cultius és de 40 rpm. Els flascons disposen en la seva part superior de dues

obertures destinades a la presa de mostres i a l'intercanvi de gasos, que es realitza a través d'un filtre estèril de 0.22 µm de diàmetre de porus.

Els flascons i l'agitador es disposen dintre un incubador de CO₂ (Forma Scientific, IR amb filtre HEPA, model 3862), a 37°C i en una atmosfera saturada d'humitat (95%) per evitar l'evaporació del medi i amb un 5% de CO₂ per controlar el pH en medis tamponats amb tampó bicarbonat.

Cultiu en bioreactor

El bioreactor utilitzat ha sigut un Biostat-MD (B.Braun Biotech) adaptat per cultiu cel·lular amb un volum de 2 litres. La temperatura, el pH i la pO₂ es mantenen constants a 37°C, 7.1 i 60 % respectivament. La temperatura del cultiu es regula mitjançant una camisa externa per la que circula aigua termostatitzada.

El pH i la concentració d'oxigen dissolt es controlen, respectivament, mitjançant l'addició de CO₂ i l'entrada alternativa d'aire o nitrogen pel corrent d'aireació. El corrent d'aireació prové d'una estació de mescla de gasos controlada per la unitat de control digital de l'equip (DCU). L'aireació es realitza amb un sistema de tub de silicona permeable als gasos que permet la transferència al medi sense bombolles. L'agitació es du a terme amb un sistema de pales inclinades a una velocitat de 60 rpm. El control d'aquests paràmetres el realitza la DCU (Unitat de Control Digital) a partir de la lectura proporcionada per les sondes corresponents.

El bioreactor s'esterilitza a 121°C durant 30 minuts. Com que el medi de cultiu no es pot esterilitzar per calor, el reactor s'omple amb tampó fosfat 0.1 M a pH 7.4 (PBS NaCl 8 g; KH₂PO₄: 0.2 g; Na₂HPO₄·12H₂O 2.8 g; KCl 0.2 g; aigua ultrapura: 1 litre). Un cop esterilitzat el vas de cultiu es substitueix el seu contingut pel medi de forma asèptica. Posteriorment s'estableixen els valors de consigna i es calibra la sonda d'oxigen. Un cop inoculat es van prenen mostres mitjançant un dispositiu manual apropiat per a realitzar el seguiment del procés.

7.5. DETERMINACIÓ DELS PARÀMETRES DE SEGUIMENT D' UN CULTIU PER MÈTODES ANALÍTICS

7.5.1. Determinació de la biomassa

7.5.1.1 Mesura de l'absorbància del cultiu

L'estimació de la concentració de biomassa per mesura de la densitat òptica (OD) es realitza llegint l'absorbància del brou enfront un blanc (medi de cultiu sense cèl·lules) en un espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 550 nm. Es manté la lectura de densitat òptica dins el rang de lectura lineal 0.30-0.70 diluint el brou de cultiu amb el mateix medi. Els resultats s'expressen en unitats d'absorbància.

7.5.1.2. Determinació del Pes Sec Cel·lular (PSC)

Es basa en la presa de mostres d'aliquotes de 1.5 a 10 ml del cultiu en suspensió en tubs tarats en una balança analítica, i en la separació de les cèl·lules per centrifugació a 6000 rpm durant 10 minuts. Després de rentar dues vegades el sediment amb solució salina (Solució de Ringer: NaCl 9 g/l) s'asseca la mostra en un forn a 105°C fins a obtenir un pes constant. També es pot realitzar la determinació del Pes Sec mitjançant el filtrat d'un volum conegut a través d'un filtre prèviament tarat de 0.45 µm de diàmetre. El filtre s'asseca a 105°C durant 30 minuts i després a 65°C fins a obtenir-se un pes constant. Després es calcula el pes sec, restant el pes total del filtre del pes de la tara segons el volum filtrat. El resultat s'expressa en g PSC/l (Sonnleitner *et al.* 1991).

Es van realitzar calibratges per tal de relacionar aquestes mesures, obtenint-se els següents resultats:

Escherichia coli:

En medi LB/CAM9: $PSC (g/l) = 0.352 (DO_{550}) + 0.076$ ($r^2=0.998$)

En medi M9/M9E: $PSC (g/l) = 0.297 (DO_{550}) + 0.074$ ($r^2=0.999$)

Saccharomyces cerevisiae

En medi definit de Wickerham: $PSC (g/l) = 0.19 (DO_{550}) + 0.018$ ($r^2=0.99$)

7.5.1.3 Recompte de cèl·lules viables

El mètode es basa en el recompte d'unitats formadores de colònies (ufc/ml) d'una sèrie de dilucions del cultiu en suspensió en medi sòlid. El procediment, es fonamenta en un banc de dilucions a partir d'una al·liquota de 0.05 ml del cultiu en suspensió, diluït en 5ml de solució salina 0.9 %. Es realitzen dilucions en esglaons successius de 1 ó 2 ordres de magnitud fins a 10^{-9} o 10^{-10} . Posteriorment es sembra una al·liquota de 0.1 ml per extensió amb nansa de Drigalsky en medi complex no selectiu (LB o YEPG). S'incuben les plaques durant tota la nit a 30°C - 37°C segons els casos. Només es consideren com a bones les dilucions els recomptes de les quals estan entre 30 i 300 ufc per placa. El càlcul del nombre de colònies es realitza segons l'expressió següent:

$$n^{\circ} \text{ cèl·lules viables / ml} = \frac{n^{\circ} \text{ ufc}}{\text{volum mostra (ml)} * \text{factor dil.lució}}$$

Càlcul de la segregació plasmídica: La segregació, és un paràmetre que representa el percentatge de cèl·lules transformades que han perdut el plasmidi durant el seu creixement. La seva determinació es basa en el mateix banc de dilucions que el recompte de viables, però sembrant una al·liquota (0.1 ml) en medi selectiu (el mateix medi que per viables suplementat amb els antibiòtics adequats). L'expressió que permet calcular el valor de la segregació és la següent:

$$\text{Segregacio (\%)} = \frac{\text{ufc en medi no selectiu} - \text{ufc en medi selectiu}}{\text{ufc en medi no selectiu}} \times 100$$

7.5.1.4. Recompte de cèl·lules animals

Per tal de conèixer de manera directa el nombre de cèl·lules vives, mortes, totals i el percentatge de viabilitat que presenta el cultiu, es fa un recompte a 100 augments mitjançant un microscopi invertit de contrast de fase (Nikon, TMS) i un hemacitòmetre (Improved Neubauer Chamber, Brand): un portaobjectes amb quatre camps o cavitats quadrades on hi ha dibuixades unes xarxes de 4x4 quadrats microscòpics. A cada camp hi cap un volum de mostra conegut, i els setze quadres

dibuixats faciliten el recompte de les cèl·lules presents a cada camp. Per tal de diferenciar les cèl·lules vives i mortes s'utilitza una tinció amb blau de tripà (Sigma, T8154), colorant que només penetra a l'interior de cèl·lules mortes i els dóna un color blavós. Per contra, les cèl·lules vives es diferencien perfectament de les mortes pel seu color blanc brillant. La solució comercial es troba inicialment al 0.4%, per això cal diluir-la a la meitat amb una solució de NaCl 0.9% i filtrar la solució resultant amb un filtre de 0.22 µm de diàmetre de porus. Per a la seva observació, es dilueixen 75 µl de la mostra del cultiu a la meitat amb 75 µl de blau de tripà al 0.2% (v/v) en NaCl 0.9% (p/v). Una gota de la dilució es diposita a la zona de recompte de l'hemocitòmetre i es cobreix amb un cubreobjectes. A continuació es realitza el recompte de cèl·lules vives i mortes en cadascun dels quatre camps. Els dos valors superior i inferior obtinguts es rebutgen, mentre que els altres dos es promitgen. La relació entre el nombre de cèl·lules viables i mortes permet avaluar la viabilitat cel·lular

7.5.2. Determinació analítica de la concentració de metabòlits i productes cel·lulars

7.5.2.1. Anàlisi de glucosa i lactat

Després de centrifugar una mostra del brou de fermentació 5 minuts a 6000 rpm, es filtra el sobrenedant (Millex GS-0,22 µm. Millipore). La concentració de glucosa i lactat es mesura amb un analitzador automàtic de glucosa i lactat YSI 2700 Select (Yellow Springs Inst, OH, USA). Aquest aparell disposa de dos elèctrodes amb una fina membrana amb enzims immobilitzats que envolta un ànode de platí. Els enzims són la glucosa oxidasa i la lactat deshidrogenasa. Les mol·lecules difonen a través de la membrana i reaccionen amb l'enzim alliberant electrons que són detectats per l'elèctrode com a senyal elèctric. La intensitat de la senyal elèctrica és proporcional a la concentració de cadascun dels dos substrats. Aquesta mesura elèctrica no es veu afectada per la terbolesa, densitat o temperatura.

L'analtzador pren 550 µl de la mostra i dóna els valors de concentració de D-glucosa i L-lactat en g/l. L'error aproximat és de 0.1 g/l. Els rangs de mesura de l'aparell són de 0.05 a 20.0 g/l per la glucosa i de 0.05 a 2.00 g/l pel lactat. Quan les mostres estan excessivament concentrades és necessari diluir-les amb aigua ultrapura fins que la mesura està dins el rang de l'aparell. La determinació és quasi immediata. L'aparell requereix les següents solucions pel seu funcionament:

Solució patró:

K ₂ H ₂ EDTA	0.159 g
Àcid benzoic	0.263 g
Glucosa	0.45 g
L-Lactat	0.1125 g
Aigua ultrapura	250 ml

Solució tampó:

K ₂ H ₂ EDTA	0.572 g
Benzoat sòdic	0.948 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	2.028 g
NaCl	1 g
NaHPO ₄ ·12H ₂ O	16.2 g
Sulfat de gentamicina	0.0076 g
Aigua ultrapura	1 litre

Les dues solucions es filtren al buit amb una membrana d'acetat de cel·lulosa de 0.45 µm de diàmetre de porus i es renoven una vegada a la setmana.

7.5.2.2. Anàlisi de sucres i àcids orgànics per cromatografia líquida (HPLC)

L'anàlisi d'àcids orgànics es realitza per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) en un cromatògraf Hewlett-Packard 1050 equipat amb un detector d'IR 1047A també d'HP. Aquest mètode permet la quantificació de carbohidrats, àcids orgànics i alcohols en un temps d'anàlisi de 30 minuts. La separació dels diferents components de la mostra es fa mitjançant una columna Aminex HPX-87H de Bio-

Rad. La separació amb aquesta columna es basa en la cromatografia iònica de partició moderada (IMP), en la que intervenen mecanismes d'exclusió iònica, bescanvi iònic, partició en fase reversa, exclusió per grandària i bescanvi per lligands. Les condicions cromatogràfiques emprades van ser: cabal isocràtic de 0.6 ml/minut, a una temperatura de 65 °C i un volum d'injecció de 10 µl.

La quantificació es realitza a partir d'una corba patró obtinguda prèviament (patró extern) amb solucions de diferents concentracions en el rang de 50 a 0.1 g/l. Com a fase mòbil s'utilitza àcid sulfúric 0.015 M, que es prepara amb aigua ultrapura, tipus Milli-Q amb una resistència de 18.2 __, acidificant-la fins a pH 3.00 amb àcid sulfúric. Es filtra a través d'una membrana de nitrocel·lulosa de 0.45 µm amb ajut d'una trompa de succió per fer el buit i es desgasifica la solució. La preparació de les mostres a analitzar consta d'una centrifugació prèvia i la filtració amb una membrana de 0.45 µm. Aquestes han de quedar totalment transparents i sense cap mena de partícules en suspensió. L'injecció de la mostra es fa directament sense dilucions.

7.5.2.3. Anàlisi d'aminoàcids

L'anàlisi d'aminoàcids es realitza per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) mitjançant una tècnica de reacció pre-columna que en aquest cas consisteix en una derivatització dels aminoàcids. La separació es fa mitjançant una columna de fase reversa.

Els aminoàcids són molècules amb uns radicals de naturalesa molt diversa, i la majoria no són detectables fotomètricament. Cal doncs afegir als aminoàcids algun radical que permeti detectar-los amb suficient sensibilitat. Això s'aconsegueix amb la seva derivatització que permet l'addició d'un anell bencenic fàcilment detectable ja que absorbeix llum en la zona ultraviolada. Aquesta reacció es produeix en dos passos. Primer es derivatitzen els aminoàcids primaris amb el reactiu OPA (o-ftalaldehid) i en una segona etapa els aminoàcids secundaris (els quals no reaccionen amb l'OPA) es derivatitzen amb el reactiu FMOC (9-fluorenilmetilcloroformiat). La cisteïna i/o cistina però, com totes les espècies

que contenen grups sulfidril, competeixen amb l'OPA en la reacció de derivatització esdevenint part del producte. Per fer l'anàlisi de cisteïna i/o cistina cal prèviament bloquejar-la amb àcid 3,3'-ditiodipropiònic (Fluka, 43785) a 80°C durant 30 min, convertint-la així en Cys-MPA (s-2-carboxietiltiocisteïna), compost estable que reacciona de la mateixa forma que ho fan els altres aminoàcids amb l'OPA i que elueix després de la treonina. La derivatització dels aminoàcids es produeix millor en medi bàsic, a pH 10.4, per això es necessària l'addició d'un tampó (borat sòdic) per mantenir un pH constant.

L' instrumental que s'utilitza per a l'anàlisi d'aminoàcids és el següent: Cromatògraf 1090 sèrie II de Hewlett-Packard, columna de fase reversa per a l'anàlisi d'aminoàcids (Aminoquant 200 x 2.1 mm, de Hewlett-Packard). Pre-columna: 20 x 2.1 mm

Condicions cromatogràfiques: La detecció es realitza amb ultraviolat a 338 nm pels aminoàcids primaris i a 262 nm pels secundaris. La temperatura del forn és de 40°C. El cabal d'elució es el següent:

Temps (min)	Eluent B (%)	Cabal (ml/min)
0	0	0.45
17	60	0.45
18	100	0.45
18.5	100	0.8
23.9	100	0.8
24	100	0.45
25	0	0.45

La separació dels aminoàcids es realitza en 18 minuts donant el següent ordre d'elució: Asp - Glu - Asn - Ser - His - Gly - Thr - Ala - Arg - Cys/Cys - Val - Met - Phe - Ile - Leu - Lys - Pro.

Reactius i eluents: "Kit de mostra control" (5061-3353, Hewlett-Packard). Conté:

- . Reactiu OPA (10 mg/ml d'o-ftalaldehid i àcid 3-mercaptopropiònic en tampó borat 0.4 M)
- . Reactiu Fmoc (2.5 mg/ml de 9-fluorenilmetilcloroformiat en acetonitril).
- . Solució patró de tots els aminoàcids (excepte Gln, Asn i Trp, que es preparen apart) de 0.1 mM i 1 mM per efectuar els corresponents calibratges. Els patrons de Gln, Asn i Trp es preparen apart amb aigua ultrapura a les mateixes concentracions. Per la Gln també es prepara un patró de 5 mM.

Eluent A: Acetat sòdic 20 mM / 0.3 % tetrahidrofurà (THF) / 0.018 % trietilamina (TEA). Es prepara amb 1.641 g acetat sòdic, 0.18 ml de TEA i 1000 ml d'aigua ultrapura. Quan està tot ben dissolt s'ajusta el pH a 7.20 ± 0.05 amb àcid acètic. A continuació es microfiltra la solució amb un filtre de nitrocel.lulosa de 0.45 μ m de diàmetre de porus i es desgasifica. Per últim s'afegeixen 3 ml de THF.

Eluent B: Acetat sòdic 100 mM / Acetonitril / Metanol (20/40/40). Es prepara amb 1.641 g Acetat sòdic i 200 ml aigua ultrapura. Quan està tot dissolt s'ajusta el pH a 7.20 ± 0.05 amb àcid acètic. A continuació es microfiltra la solució de la mateixa manera que l'eluent A i es desgasifica. Per últim s'afegeixen 400 ml de Metanol i 400 ml d'Acetonitril.

7.5.3. Determinació de l'activitat β -galactosidasa: Test de Miller (Miller, 1972).

La quantificació de l'activitat de l'enzim β -galactosidasa, es realitza a partir de mostres del cultiu en suspensió induït per temperatura entre 28°C i 42°C. Les mostres consisteixen en aliquotes de 0.1 ml del cultiu a les quals s'hi afegeix 0.1 ml de cloroform per tal de permeabilitzar les cèl·lules, junt amb 0.9 ml de tampó Z [0,28 %

de β -mercaptoetanol en tampó fosfat (NaH_2PO_4 0,06 M, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,04 M, KCl 0,02 M, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM)]. Després d'una agitació vigorosa al vòrtex, es posa la mostra a incubar durant 5 minuts en un bany a 28°C. Posteriorment s'hi afegeixen 0,2 ml de ONPG (2-nitro-fenil- β -D-galactopiranosid), com a substrat del enzim, preparat a una concentració de 4 mg/ml en tampó fosfat (Na_2HPO_4 0,2 M, NaH_2PO_4 0,2 M, pH 7). La mostra s'incuba a 28°C i es deixa reaccionar fins a l'aparició de color groc, moment en el qual s'atura la reacció amb 0.5 ml de Na_2CO_3 1M. Es llegeixen les absorbàncies a 550 nm i 420 nm i es calcula l'activitat enzimàtica segons l'expressió:

$$\text{Unitats enzimàtiques / ml} = \frac{[\text{Abs. } 420\text{nm} - (1.75 \times \text{Abs. } 550\text{nm})]}{v \times t} \times 1000$$

on v , representa el volum de mostra processat, i t el temps d'incubació a 28°C que s'ha deixat reaccionar la mostra fins a l'aparició del color groc. El resultat, expressat en unitats d'activitat enzimàtica/ml es pot expressar en funció de la concentració de biomassa DO_{550} o PSC del cultiu en el moment de prendre la mostra, s'obté l'activitat específica que s'expressa en U/g PSC.

7.6. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR

En aquest treball s'han utilitzat algunes de les tècniques bàsiques de la tecnologia de l'ADN recombinant. Els protocols d'aquestes es troben molt ben descrits en manuals de laboratori com el *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, de Maniatis, T; Fritsch, E.F; Sambrook, J. (Cold Spring Harbor Laboratory; 1985), o el *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc.; 1995). No obstant, degut a la varietat de tècniques que es poden trobar, a continuació s'exposen els procediments i protocols emprats.

7.6.1. Extracció de DNA plasmídic

Tècnica de Miniprep

L'aïllament de petites quantitats d'ADN plasmídic (ADN_{pl}) és una tècnica essencial tant per a la construcció de nous clons, com per a l'anàlisi dels clons recombinants. Hi ha varis mètodes d'obtenció d'ADN plasmídic. La utilitzada en aquest treball és la

extracció per lisi alcalina (Birboim i Doly, 1979; Sambrook *et al.* 1989). L'ADN plasmídic es prepara a partir de petites quantitats de cultius de la soca bacteriana que el conté. Les bactèries són lisades mitjançant un tractament amb una solució que conté Sodi-dodecil-sulfat (SDS) i NaOH (el SDS desnatura les proteïnes bacterianes i el NaOH desnatura l'ADN cromosòmic i l'ADN plasmídic). La mescla és neutralitzada amb acetat de potassi causant el tancament covalent de l'ADN plasmídic, que es relliga ràpidament. La major part de l'ADN genòmic i les proteïnes bacterianes precipiten (junt amb l' SDS que forma un precipitat amb el potassi) i són extretes per centrifugació. L'ADN plasmídic relligat queda en el sobrenedant i és després concentrat per mitjà d'una extracció líquid-líquid amb etanol.

Materials

Medi LB amb els antibiòtics apropiats a cada soca

Solució I (100 ml): 5 ml glucosa 1M
 2 ml EDTA 0.5 M, pH 8.0
 2.5 ml TrisHCl 1M, pH 8.0
 90.5 ml d'H₂O mQ
 Guardar a 4°C.

Solució II (10 ml): 400 µl de NaOH 5M
 1000 µl de SDS 10%
 8.6 ml d'H₂O mQ
 Preparar en fresc i deixar a temp. amb.

Solució III (100 ml): 60 ml d'acetat potàsic 5M (KOAc)
 15 ml d'àcid acètic glacial (AcOH)
 25 ml d'H₂O mQ
 Ajustar a pH 4.8 amb acètic.
 Guardar a 4°C.

Etanol 70% i 95%

Solució fenol-cloroform-alcohol isoamílic (25:24:1)

Cloroform

Acetat de sodi 3M, pH 5.6

Mètode

1. Fer un cultiu durant tota la nit (créixer fins a saturació) a partir d'una sola colònia, en 5 ml de LB.
2. Centrifugar 1.5 ml de cultiu a 14.000 rpm (al màxim en una microcentrifuga) 1 minut a temperatura ambient. Més temps fa difícil després resuspendre les cèl·lules. Es descarta el sobrenedant amb una pipeta Pasteur i una bomba de buit.
3. Afegir 1.5 ml més de cultiu i repetir el pas 2.
4. Resuspendre el sediment en 100 µl de solució I a 4°C. Deixar reposar durant 5 minuts a temperatura ambient. Assegurar-se que les cèl·lules han quedat ben resupeses amb el vòrtex.
5. Afegir 200 µl de la solució II recent preparada. Barrejar per inversió. Deixar en gel 5 minuts. A partir d'aquest punt mantenir les mostres en gel.
6. Afegir 150 µl de solució III a 4°C. Barrejar amb el vòrtex 2 segons i deixar 5 minuts més en gel. Assegurar-se que està ben barrejat.
7. Centrifugar 5 minuts a 14.000 rpm per separar les restes cel·lulars i l'ADN cromosòmic, que queden en el sediment, del DNA plasmídic que queda en el sobrenedant. Recuperar-lo en un tub nou.
8. Fenolitzar: Afegir al tub 450 µl (aprox. 1 volum) de fenol-cloroform saturat. Vortejar bé.
9. Centrifugar 1 minut a 14.000 rpm i recollir la fase aquosa superior en un tub nou o bé retirar el fenol-cloroform (de la fase inferior) amb una pipeta Pasteur, deixant la fase aquosa superior amb l'ADN pl. en el mateix tub. Es pot afegir novament 1 volum de fenol-cloroform i repetir el procés. Cal realitzar aquesta operació en la campana de gasos. El fenol és tòxic.
10. Afegir 50 µl d'acetat de sodi 3M i vortejar.
11. Afegir 900 µl (aprox. 2 volums) d'etanol absolut fred (-20°C.). Barrejar suaument. Deixar de 20 minuts a 2 hores a -80°C.
12. Centrifugar 15-30 min. a 14.000 rpm i rebutjar el sobrenedant.
13. Resuspendre en 1 ml d'etanol 70 %.

14. Centrifugar 5 minuts més a temperatura ambient. En aquest moment acostuma a veure un sediment clar al fons del tub, corresponent a l'ADNpl. Rebutjar el sobrenedant i deixar assecar el tub cap per avall 15 minuts. Assecar-lo 15 minuts més a la campana de buit.
15. Redissoldre l'ADN en 50 µl d' H₂O mQ estèril, o tampó TE.

L'ADN_{pl} pot guardar-se en tampó TE o H₂O a 4°C per algunes setmanes, o ser preservat durant varis anys a -20 o -80°C.

Per a fer extraccions ràpides de DNA plasmídic s'han emprat també kits comercials d'extracció ràpida basats en la unió dels àcid nucleics en matrius de sílica. En aquest treball s'ha usat de manera no preparativa un kit de Boehringer Mannheim (High Pure Plasmid Isolation Kit; c/n: 1 754 777) per a realitzar comprovacions de clons per anàlisi amb endonucleases de restricció. En aquest cas s'utilitzen de 2 a 5 µl de l'ADNpl resuspès en tampó per a la digestió amb enzims de restricció. En cap pas les mostres s'han tractat amb RNAasa-A. Aquest procés es realitza quan l'ADN és posteriorment digerit amb endonucleases de restricció.

Tècnica de Mediprep

Quan es requeria de quantitats més importants de material genètic es procedeix a l'extracció de l'ADNpl per la tècnica de Mediprep. Es parteix d'un cultiu crescut fins a saturació de 25 ml.

Els principis de separació són els mateixos que en la tècnica de Miniprep, explotant les diferències estructurals entre les molècules d'ADN pl. i ADN genòmic. Quan es centrifuga el llistat cel.lular, l'ADN plasmídic queda en el sobrenedant, mentre que el genòmic i les restes cel.lulars en el sediment. El procediment que s'utilitza és el protocol establert per Sambrook (Sambrook *et al.* 1989).

Mètode.

1. Fer un cultiu durant tota la nit (créixer fins a saturació) a partir d'una sola colònia, en 25 ml de LB.
2. Centrifugar 10 ml de cultiu a 4.000 rpm durant 10 minuts a 4°C.
Descartar el sobrenedant amb un pipeta Pasteur i una bomba de buit
3. Afegir 10 ml més de cultiu i repetir el pas 2.
4. Resuspendre el pellet en 200 µl de solució I a 4°C. Passar aquest volum a un tub eppendorf. Deixar reposar durant 5 minuts a temperatura ambient. Assegurar-se que les cèl·lules han quedat ben resupeses amb el vòrtex.
5. Afegir 400 µl de la solució II recent preparada. Barrejar per inversió. Deixar en gel 5 minuts.
6. Afegir 300 µl de solució III a 4°C. Barrejar amb el vòrtex 2 segons i deixar 5 minuts més en gel. Assegurar-se que està ben barrejat.
7. Centrifugar a 14.000 rpm a 4°C durant 5 minuts, per separar les restes cel·lulars i l'ADN cromosòmic, que queden en el sediment, del plasmídic que queda en el sobrenedant. Recuperar-lo en un tub eppendorf nou.
8. Fenolitzar: Afegir al tub 600 µl (aprox. 1 volum) de fenol-cloroform saturat. Vortejar bé.
9. Centrifugar 1 minut a 14.000 rpm. i recollir la fase aquosa superior en un tub nou o bé retirar el fenol-cloroform (de la fase inferior) amb una pipeta Pasteur, deixant la fase aquosa superior amb l'ADN pl. en el mateix tub.
Es pot afegir novament 1 volum de fenol-cloroform i repetir el procés.
Cal realitzar aquesta operació en la campana de gasos. El fenol és tòxic
10. Afegir 50 µl d'acetat de sodi 3M i vortejar.
11. Afegir 900 µl d'etanol fred (-20°C.). Barrejar suaument. Deixar de 2 hores a tota la nit precipitant els àcids nucleics a -80°C.
12. Centrifugar 30 minuts a 4°C. a 14.000 rpm i rebutjar el sobrenedant.
13. Resuspendre en 1 ml d'etanol 70 %.
14. Centrifugar 5 minuts més a temperatura ambient. En aquest moment s'acostuma a veure un pellet clar al fons del tub, corresponent a l'ADNpl.

Rebutjar el sobrenedant i deixar assecar el tub cap per avall 15 minuts..

Assecar-lo 15 minuts més a la campana de buit.

15. Redissoldre l'ADN en 50 µl d' H₂O mQ estèril, o tampó TE. Guardar a -30°C.

7.6.2. Amplificació enzimàtica de DNA per reacció en cadena per la polimerasa (PCR)

La reacció en cadena per la polimerasa, o PCR, és una tècnica que utilitza l'activitat de les DNA polimerases per a replicar el DNA en l'obtenció de grans quantitats de DNA a partir de mostres que poden estar en l'ordre dels femtograms. En la reacció de PCR s'utilitzen polimerases termoestables provinents d'organismes termòfils. Les condicions òptimes de reacció (temps d'incubació, temperatures, concentracions de polimerasa, de DNA motlle i de ions Mg²⁺) són funció de les característiques del DNA motlle i dels encebadors, i s'han de determinar en cada cas. En general les concentracions òptimes de Mg²⁺ es troben en el marge de 0.5 a 10 mM i les d'enzim, entre 0.5 i 5 unitats de polimerasa.

La *T_m* és la temperatura a la qual l'encebador s'uneix al DNA motlle. Aquest valor depèn de la composició nucleotídica i de la longitud de cada oligonucleòtid utilitzat com a encebador. Pels encebadors dissenyats en aquest (i altres treballs del grup) treball s'ha procurat buscar una *T_m* propera als 60°C (així es podien realitzar varies reaccions d'amplificació de gens diferents simultàniament). Els valors de *T_m* dels oligonucleòtids emprats en aquest treball han estat calculats a partir de la fórmula següent:

$$T_m(^{\circ}C) = \frac{69.3 + 0.41 \cdot (\%GC) - 650}{L}$$

on *L* és la longitud de la seqüència (entre 10 i 40 nucleòtids).

Els reactius i la metodologia emprada són els indicats per l'enzim *Pwo DNA Polymerase* (Boehringer Mannheim, N° 1644 947). La polimerasa de DNA provinent de *Pyrococcus woesei* té un pes molecular aproximat de 90 kD. Presenta activitat

polimerasa 3'→5' i també exonucleasa 3'→5', coneguda com activitat correctora d'errors (proofreading activity). Els fragments de DNA amplificats per PCR amb aquest enzim presenten extrems roms, i poden ser utilitzar directament per una lligació d'extrems roms sense cap tipus de pretractament dels extrems.

Materials

Tampó amb *Pwo* DNA polimerasa: 100 μ de *Pwo* polimerasa en un volum de 40 μ l d'una solució de Tris-HCl 20 mM, KCl 100 mM, ditiotreitòl (DTT) 1 mM, EDTA 0.1 mM, Nonidet P40 0.5% (v/v), Tween 20 0.5% (v/v) i glicerol 50% (v/v) a un pH de 7.5 mesurat a 20°C.

Tampó de PCR amb MgSO₄ (10x): Tris-HCl 100 mM, KCl 250 mM, (NH₄)₂SO₄ 50 mM i MgSO₄ 20 mM a un pH de 8.85 mesurat a 20°C.

Solució dels quatre deoxinucleòtids trifosfat a una concentració de 2.5 mM (dNTPs de Boehringer Mannheim: dATP, dCTP, dGTP i dTTP).

Encebadors corresponents als extrems 3' i 5' de cadascun dels DNAs que es desitja amplificar. Aquests oligonucleòtids es troben a una concentració de 10 μ M.

Totes aquestes solucions es guarden a -20 o -30°C. Es treballa en una camera de flux laminar, amb tot el material (micropipetes, guants, tubs...) preparat i irradiat amb llum U.V durant 30 minuts. S'ha de preveure la realització de com a mínim un control negatiu, sense ADN motlle per tal de poder detectar contaminacions. La impuresa dels productes i reactius és un dels paràmetres clau per evitar contaminacions. Les impureses més freqüents són les nucleases que degraden l'ADN. En el moment de realitzar la PCR es descongelen i es conserven en fred. Tot seguit es prepara la següent mescla:

Component	Volum a afegir	Conc. final
-----------	----------------	-------------

dNTP (2.5 mM)	5	250 μ M
Tampó de PCR amb MgSO ₄ (10x)	5	
Encebador dret	1	0.2 μ M
Encebador esquerra	1	0.2 μ M
DNA motlle	x	0.1 - 0.75 μ g
Pwo DNA polimerasa (0.25 U/ μ l)	0.5	0.025 U
H ₂ O ultrapura estèril	Fins a 50 μ l	

La *Pwo* polimerasa s'afegeix en darrer terme per evitar l'activitat 3'-5' exonucleasa, que pot començar a degradar el DNA motlle. Es col·loquen els tubs en el termociclador a una temperatura inicial de 50 °C i es comença els cicles d'amplificació tal i com es mostra en el següent programa:

Cicles (n°)	Temp. (°C)	Durada (segons)	Funció
1	94	120-300	Desnaturalitzar el motlle
	94	15	Desnaturalització
25-30	T _m	30	Unió motlle-encebadors
	72	45 → 120	Allargament
1	72	Fins a 600 seg.	Allargament addicional

7.6.4. Separació de DNA per electroforèsi en gels d'agarosa

La tècnica de separació de molècules o fragments per electroforèsi en gels d'agarosa permet identificar els productes d'una reacció. La separació de fragments d'ADN depèn de varis paràmetres. La longitud de l'ADN, la seva conformació estructural, la grandària de porus del gel i la corrent aplicada són els determinants de la seva mobilitat. La càrrega neta negativa de l'ADN permet la seva migració en un camp elèctric cap al pol positiu. La velocitat de migració és inversament proporcional al logaritme del seu pes molecular. Així es troba que com més petita és una molècula d'ADN, més fàcilment migrarà a través del gel. La separació simultània d'un marcador de pes molecular conegut permet establir, per

comparació, el patró de bandes de la mostra. Una mateixa molècula d'ADN pot presentar-se en tres formes diferents: circular enrollada, circular relaxada i lineal. La forma relaxada és la més lenta en velocitat de migració i la superenrollada, la més ràpida. Normalment es vol identificar un dels fragments que es troba en una mescla complexa de fragments d'ADN de diferent grandària.

No obstant, sovint també s'usa l'electroforèsi com a tècnica preparativa, es a dir que a més de la separació i identificació d'un fragment d'ADN, es recupera aquest per a posteriors operacions.

L'electroforesis en gels d'agarosa es basa en la separació de fragments de DNA sotmesos a un camp elèctric en presència d'una malla (el polímer d'agarosa) que en dificulta la migració cap al pol positiu. Variant el percentatge d'agarosa varia el tamany de porus del polímer. Normalment s'ha utilitzat gels d'agarosa al 1.5% per electroforesis de fragments de DNA de 1Kb o menys i gels d'agarosa al 0.8% per electroforesis de fragments de DNA de més grandària.

Materials

Agarosa LE (Boheringer Mannheim: 1685660).

Tampó d'electroforèsi: TAE (40 mM Tris, 20 mM àcid acètic i 1 mM EDTA, pH 8.1). Es sol prepara concentrada 10 vegades i es guarda a temperatura ambient.

Bromur d'etidi (Bioprobe). Solució stock de 10 mg /ml a 4°C i a les fosques.

Marcadors de Pes Mol.lecular de l'ADN (de Boheringer Mannheim)

Tampó de càrrega: 50% (v/v) glicerol, 0.25% xilen cianol i 0.25% blau de bromofenol.

El bromur d'etidi és un agent mutàgen. Convé manipular els gels i les solucions que el continguin sempre amb guants, així com recollir els residus i tractar-los adequadament (amb hipoclorit sódic o en contenidors específics).

Mètode

Pesar la quantitat corresponent d'agarosa en pols (w/v) i afegir el volum corresponent de tampó TAE (1x). Per separar fragments de DNA de mida superior a 1 Kb s'utilitzen gels d'agarosa al 0.8% i per separar bandes de menor grandària s'augmenta la concentració fins el 1.5%.

Fondre l'agarosa en un forn microones. Agitar de tant en tant i torar a calentar fins que no quedin partícules en suspensió.

Deixar refredar la solució fins a 50-55 °C.

Afegir el bromur d'etidi a una concentració final de 0.5 µg/ml.

Preparar el motlle per al gel d'agarosa segellat amb cinta adhesiva. Disposar "la pinta" o espaiador de forma que quedi a 0.5-1 cm. de l'extrem del motlle i que no toqui el fons del motlle.

Dispensar la solució d'agarosa en el motlle.

Esperar de 30 a 45 minuts fins que l'agarosa hagi solidificat.

Retirar la pinta per deixar lliures els poues on es carregaran les mostres i treure la cinta adhesiva.

Submergir el gel amb un volum de TAE 1x suficient per a cobrir la seva superfície i afegir bromur d'etidi a una concentració final de 0.5 µg/ml.

Carregar les mostres i marcadors en els pouets del gel. Per preparar les mostres es barreja 1 µl d'aquesta amb 8 µl d'aigua ultrapura autoclavada i 1 µl de tampó de càrrega (volum final 10 µl). Es pot carregar més mostra si es manté el volum final i la proporció 1/10 del tampó de càrrega. Pels marcadors es procedeix de la mateixa manera que amb les mostres. Abans de carregar les mostres és convenient realitzar un pols (un segon) de centrifugació per tal que s'homogenitzin els components.

Un cop carregades les mostres s'aplica un voltatge constant (màxim 5V/cm²).

Es deixa córrer l'electroforesis fins que el colorant del tampó de càrrega (el taronja d'acridina) assoleixi les 2/3 parts del gel.

AS continuació es poden visualitzar les bandes de DNA mitjançant un transil·luminador d'UV (TFX-20M a 302 nm). Per mirar les bandes d'un gel cal protegir-se amb ulleres. Es pot fotografiar el gel d'agarosa amb una càmera Polaroid (DS43).

7.6.5. Extracció de bandes de DNA de gels d'agarosa

Sovint interessa recuperar un fragment de DNA separat electroforèticament per tal d'emperrar-los en successives lligacions. Els reactius i la metodologia emprades formen part del "Agarose Gel DNA Extraction Kit" (Boheringer Mannheim 1 696 505).

Material

Vial que conté una matriu d'esferes de sílica pretractades.

Tampó de solubilització d'agarosa.

Tampó de rentat. Abans del seu ús cal afegir 80 ml d'etanol absolut.

Mètode

S'aïlla la banda amb una fulla d'escalpel o una fulla d'afaitar. Es diposita en un tub eppendorf prèviament tarat i es determina el pes del fragment de gel. S'afegeixen 300 µl de tampó de solubilització per cada 100 mg de gel. Si la concentració d'agarosa és superior al 2% cal afegir 600 µl en comptes de 300 µl.

Es resuspenen les esferes de sílica fins a aconseguir una suspensió homogènia i s'afegeixen 10 µl d'aquesta suspensió al tub eppendorf que conté la banda de DNA.

S'incuba la barreja a 56-60°C durant 10 minuts, agitant cada 2-3 minuts amb el vòrtex.

Es centrifuga la solució 30 segons a 1 minut i es descarta el sobrenedant.

Es resuspen el sediment amb 500 µl de tampó d'unió d'àcids nucleics i s'homogenitza al vòrtex. Es centrifuga la solució durant 30 segons i es descarta el sobrenedant.

Es renta el sediment amb 500 µl de tampó de rentat i es torna a centrifugar 30 segons abans de descartar el sobrenedant. Es repeteix aquest darrer rentat.

Es retira tot el líquid amb una pipeta, s'inverteix el tub i es deixa assecar sobre paper absorbent a temperatura ambient durant 15 minuts. La matriu adquireix un color blanc brillant en assecar-se.

Per tal de recuperar el DNA s'utilitza 20-50 µl de tampó TE o aigua ultrapura. S'agita amb un vòrtex i s'incuba la solució durant 10 minuts a temperatura ambient o a 56-60°C. Per tal de mantenir l'homogenitat cal agitar de tant en tant al vòrtex.

A continuació es centrifuga durant 30 segons i es recupera el sobrenedant vigilant no arrossegar gens de sílice. L'eficàcia d'aquest pas pot incrementar-se fent servir un volum més gran de tampó TE o bé repetint el procés dues vegades amb 25 µl cada vegada.

7.6.6. Determinació de la concentració i puresa d'àcids nucleics.

Es pot determinar la concentració i grau de puresa del ADN mesurant l'absorbància a 260 nm (A_{260}) amb un espectrofotòmetre.

Els àcids nucleics tenen un màxim d'absorbància a 260 nm (bases nitrogenades, anells aromàtics...). A 230 absorbeixen els radicals carbonil dels grups amida (enllaç peptídic, urea...). A 280 nm els grups benzènics. El valor de l'absorció a 310 nm ens dóna la mesura de la turbolesa de la dissolució deguda a la presència d'impureses. Una preparació pura d'àcids nucleics ha de complir les següents relacions:

$DO_{260} / DO_{280} = 1,85$ ADN (2,0 si es tracta de DNA o RNA de cadena senzilla).

S'accepten valors entre 1.8 i 1.9; $DO_{260} / DO_{230} \geq 2,0$; $DO_{310} \cong 0$;

A partir de la densitat òptica a 260 nm també podem calcular la concentració de la mostra, ja que 1 unitat de DO equival a 50 µg de ADN de doble cadena, o 40 µg de ADN cadena simple o RNA (Maniatis et al. 1989).

Diluint inicialment 2 µl de la solució de DNA en 240 µl d'aigua ultrapura (MilliQ) i llegint l'absorbància en un espectrofotòmetre (Shimadzu UV-160A) s'obté el valor de concentració aplicant l'expressió següent:

$$[\text{DNA}] = A_{260} \cdot 50 \cdot \text{dilució}$$

La fiabilitat de l'absorbància és màxima per a lectures entre 0.1 i 0.6 UA, motiu pel qual cal diluir la solució convenientment per estar dins el rang òptim.

7.6.7. Modificacions enzimàtiques del DNA

7.6.7.1. Restricció enzimàtica

Les endonucleases de restricció són enzims que hidrolitzen el DNA bicatenari en posicions específiques de la seva seqüència. Els enzims de tipus II, els més utilitzats, reconeixen seqüències de 4-6 nucleòtids, normalment simètriques. Alguns tallen per l'eix de simetria donant lloc a molècules amb els extrems roms i altres deixen extrems 5' o 3' protuberants, també anomenats cohesius.

Les concentracions d'enzim, DNA, tampó, força iònica, temperatura i temps de reacció depenen en cada cas de l'enzim i de l'aplicació específica. La majoria dels enzims mostren una activitat òptima a 37°C, tot i que n'hi ha que requereixen temperatures diferents. L'eficiència d'una restricció enzimàtica depèn fonamentalment del grau de puresa del DNA. Els contaminants presents en algunes preparacions poden inhibir l'activitat de l'enzim. Això es pot compensar augmentant la quantitat d'enzim, el volum de la reacció per diluir els inhibidors potencials, o el temps d'incubació. De tota manera, és millor purificar prèviament el DNA precipitant-lo amb etanol.

El tampó d'incubació depèn també de cada enzim. Normalment, acostumen a contenir MgCl₂, NaCl o KCl, Tris-HCl, β-mercaptoetanol o DTT i BSA. La presència de cations divalents és imprescindible per a l'activitat enzimàtica. La concentració de cations monovalents és més crítica i depèn de cada enzim. Pel Na⁺, pot variar entre 0 i 150 mM. Els tampons es preparen concentrats 10x i es guarden a -20°C.

L'activitat dels enzims es mesura en unitats (u). Una unitat d'enzim de restricció es defineix com la quantitat necessària per digerir completament 1 µg de DNA en 60 minuts, en condicions òptimes. El volum d'enzim ha de ser inferior a 1/10 part del volum final de la barreja de reacció, ja que el glicerol present en el tampó pot arribar a interferir en la reacció si la seva concentració és superior al 5%.

Els enzims es conserven a -20°C i cal mantenir-los en gel durant la seva manipulació. No convé tenir-los fora del congelador més temps del necessari ja que l'activitat pot decréixer.

En aquest treball s'han utilitzat les endonucleases de restricció: EcoR I, Sma I, Sal I, Nco I, i també EcoR V, Nde I, Pst I, Pvu I, Pvu II, i BamH I (totes de Boehringer Mannheim) amb els tampons respectius subministrats pel fabricant.

Restricció simple

Es prepara la següent mescla de reacció:

Component	Volum a afegir (µl)
DNA	x
Tampó de restricció	1
Enzim de restricció	1 (1-5 u/µg DNA)
H ₂ O ultrapura estèril	Fins a 10 µl

S'incuba d'una a dues hores a la temperatura addient (normalment a 37°C). En digestions preparatives de DNA, l'addició d'enzim pot repetir-se seqüencialment 2 o 3 vegades i assegurar així una digestió completa. S'atura la reacció mitjançant l'addició d'EDTA 0.5 M a una concentració final de 20 mM per quelar els ions Mg²⁺. En el cas que el DNA digerit hagi de ser utilitzat en posteriors reaccions enzimàtiques, no és aconsellable l'addició d'EDTA. Es recomana inactivar l'enzim escalfant a 65°C durant 10 minuts i a continuació purificar el DNA digerit amb fenol i precipitar-lo amb etanol.

Restricció múltiple

En determinats casos, interessa digerir el DNA amb més d'un enzim de restricció. Quan les condicions de reacció dels enzims són iguals, poden afegir-se conjuntament, seguint el protocol de digestió per un sol enzim. Si només varia la temperatura de reacció, cal incubar primer amb l'enzim que hidrolitza a menor temperatura i seguidament augmentar la temperatura i afegir el segon enzim. Si les concentracions salines difereixen, cal digerir primer el DNA amb l'enzim actiu a la concentració més baixa de sal, i a continuació afegir NaCl per obtenir una concentració final adequada per a l'activitat del segon enzim i deixar seguir la reacció de digestió. En el cas que els enzims requereixin tampons de composició molt diferent, el millor és extreure el DNA amb fenol i precipitar-lo entre cada un dels passos de la sèrie de reaccions. Les reaccions s'aturen com en l'apartat anterior.

7.6.7.2. Reompliment d'extrems

En determinades circumstàncies és necessari transformar els extrems cohesius d'un fragment de DNA o d'un plasmidi linearitzat en extrems roms. En aquest cas s'utilitza l'enzim T4 DNA polimerasa (Boheringer-Mannheim c/n: 1004 786) que reomple els extrems 3' del DNA en presència de dNTPs. Es necessari que hi hagi un excés de nucleòtids ja que aquest mateix enzim pot tenir activitat exonucleasa 3' en absència de nucleòtids.

Materials

Barreja dels quatre dNTPs a concentració final 2.5 mM

Tampó d'incubació concentrat 5X: 250 mM Tris-HCl, 75 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 35 mM MgCl_2 , 0.5 mM EDTA, 50 mM β -mercaptoetanol, 0.1 mg/ml BSA, pH 8.8 (25°C).

T4 DNA polimerasa

Mètode

Inicialment es prepara la següent mescla de reacció:

Component	Volum a afegir (μl)
-----------	----------------------------------

DNA mostra	x
Tampó 5X	4
T4 DNA pol.	0.5
H ₂ O ultrapura estèril	Fins a 18.5 µl

Es deixa la mescla 2 minuts a 37°C i a continuació s'afegeixen 1.5 µl de la solució de dNTPs 2.5 mM. S'incuba a 37°C durant 30 minuts.

La reacció s'atura afegint 4 µl d'EDTA 0.5 M o bé escalfant a 65°C durant 10 minuts. Per a posteriors tractaments enzimàtics del DNA cal eliminar l'enzim de la mostra, això s'aconsegueix purificant el DNA digerit amb fenol i precipitant-lo amb etanol.

Addició de dTTP o dATP

Quan es desitja transformar els extrems roms d'un fragment de DNA o d'un plasmidi linearitzat en extrems cohesius s'utilitza l'enzim *rTaq* (Pharmacia- Biotech 27-0798-01) que reomple els extrems roms 3' del DNA en presència de dTTP o dATP.

Materials

Tampó de PCR 10X: 100 mM Tris-HCl, pH 9.0; 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl.

dTTP o dATP 10 mM

rTaq (Pharmacia)

Mètode

Inicialment, es prepara la següent mescla de reacció:

Component	Volum a afegir (µl)
DNA mostra	x
Tampó <i>rTaq</i> (10x)	2
DTTP o dATP (10 mM)	2
<i>rTaq</i>	1
H ₂ O ultrapura estèril	Fins a 20 µl

S'incuba a 72°C durant 2 hores. La reacció s'atura amb EDTA i es dilueix la mescla amb aigua ultrapura estèril fins a obtenir un volum final de 100 µl.

Per a posteriors tractaments enzimàtics del DNA cal eliminar l'enzim de la mostra, això s'aconsegueix purificant amb fenol el DNA digerit i precipitant-lo amb etanol.

7.6.7.3. Fosforilació dels extrems 5'

L'enzim polinucleòtid quinasa de T4, (T4 PNK:Roche Diagnost.: 174 645), catalitza la transferència del grup fosfat terminal de l'ATP al grup 5'-OH terminal del DNA. La reacció s'utilitza per fosforilar fragments de DNA desproveïts de fosfats terminals. La concentració d'enzim utilitzada és de 1-3 $\mu/\mu\text{g}$ de DNA desfosforilat. Aquest enzim requereix de la presència d'ATP a una concentració d'1 mM per poder portar a terme la reacció.

Materials

T4 PNK.; ATP 10 mM

Tampó T4 quinasa 10X: 500 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgSO_4 , 1 mM EDTA, 50 mM DTT.

Mètode

La mescla de reacció té la següent composició:

Component	Volum a afegir (μl)
DNA	x
Tampó (10x)	2
ATP (10 mM)	2
T4 PNK (9.5 U/ μl)	1
H_2O ultrapura estèril	Fins a 20 μl

S'incuba a 37°C durant 30 minuts. La reacció s'atura afegint 1 µl d'EDTA 0.2 M bé escalfant a 65°C durant 10 minuts. Per a posteriors tractaments enzimàtics del DNA cal eliminar l'enzim de la mostra, això s'aconsegueix purificant amb fenol/cloroform el DNA digerit i precipitant-lo amb etanol.

7.6.7.4. Defosforilació de DNA

La defosforilació dels extrems 5' del DNA es realitza per tal d'evitar el rrelligament dels plasmidis linearitzats amb enzims de restricció. L'enzim utilitzat per a catalitzar aquesta reacció és la fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim, N° 713 023). S'afegeix 1 μL de solució de fosfatasa alcalina (CIP) per cada 50 pmol de DNA a defosforilar.

Materials

Fosfatasa alcalina CIP: 1 μL en 25 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl_2 , 0.1 mM ZnCl_2 i 50% de glicerol (p/v) a un pH de 7.6 mesurat a 4°C.

Tampó de defosforilació 10X: 500 mM Tris-HCl i 1 mM EDTA pH 8.5(20°C).

Mètode

Inicialment, es prepara la següent mescla de reacció:

Component	Volum a afegir (μL)
DNA mostra	x
Tampó de defosforilació (10x)	5
CIP (1 U/ μL)	1
H_2O ultrapura estèril	Fins a 49 μL

S'incuba durant 30 minuts a 50°C si els extrems són roms o a 37°C si són protuberants. A continuació s'afegeix 1 μL més de CIP i es deixa incubant 30 minuts més a la mateixa temperatura. La reacció s'atura afegint 1 μL d'EDTA 0.5 M o bé escalfant a 65°C durant 10 minuts. Per a posteriors tractaments enzimàtics del DNA cal eliminar l'enzim de la mostra, això s'aconsegueix purificant el DNA digerit amb fenol/cloroform i precipitant-lo amb etanol.

7.6.7.5. Lligacions de DNA

La lligació de fragments de DNA és una tècnica utilitzada per unir inserts a plasmidis. L'enzim utilitzat per portar a terme aquesta reacció és la *llogasa* de T4

(T4 DNA Lligasa de Amersham Pharmacia Biotech: 70042X). L'enzim requereix de la presència d'ATP, que ja s'inclou en el tampó de lligació.

Materials

Tampó de lligació 10X: conté 660 mM de Tris-HCl, 50 mM de MgCl₂, 10 mM de ditioeritritol i 10 mM ATP a un pH de 7.5 mesurat a 20 °C.

Lligasa T4: $\mu/\mu\text{l}$ en 20 mM Tris-HCl, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT i 50% de glicerol (v/v) pH 7.5.

Mètode

Inicialment es prepara la següent mescla de reacció:

Component	Volum a afegir (μl)
Plasmidi	x (aprox. 100 ng)
Insert	x
Tampó de lligació (10x)	1
T4 Lligasa (1 $\mu/\mu\text{L}$)	2
H ₂ O ultrapura estèril	Fins a 10 μl

La quantitat de plasmidi i d'insert que cal afegir depèn de la proporció molar existent entre les dues mostres de partida. Per a lligacions d'extrems cohesius cal utilitzar proporcions molars plasmidi:insert de 1:1 o 1:2, mentre que per a lligacions d'extrems roms les proporcions òptimes són 1:1 o 2:1. S'incuba la mescla a 12°C durant 16 hores. La reacció s'atura escalfant a 70°C durant 5 minuts.

7.6.8. Transformació

El procés de la transformació es basa en la capacitat d'incorporar DNA plasmídic exogen que tenen les cèl·lules d' *E. coli* quan són sotmeses a baixes temperatures i en presència de cations divalents que alteren la seva membrana. Aquesta capacitat pot ser utilitzada per introduir plasmidis al bacteri i aprofitar l'elevada taxa de duplicació del bacteri per tal d'obtenir un major nombre de còpies del plasmidi.

Preparació de cèl·lules competents pel mètode del clorur càlcic

Materials

CaCl₂ 0.5 M

Tris 1 M (pH 8.0)

CaCl₂ 50 mM en Tris 10 mM (pH 8.0). La solució s'esterilitza per filtració.

Medi LB líquid

Mètode

S'inocula una colònia aïllada en un tub de vidre amb 3 ml de medi LB esteril.

Es deixa créixer 12 hores a 37°C amb agitació vigorosa (250 rpm).

D'aquest pre-cultiu es prenen 500 µl i s'inoculen en 25 ml de medi LB i es deixa créixer a 37°C durant 1-2 hores a 250 rpm fins que $A_{550} \approx 0.5$ UA. A continuació, es centrifuga a 3000 rpm durant 5 minuts a 4°C. S'elimina el sobrenedant per decantació i es resuspen el botó de cèl·lules amb 12.5 ml de CaCl₂ 50 mM en Tris 10 mM (pH 8.0) estèril i es deixa reposar 15 minuts a 0°C. A continuació, es centrifuga a 3000 rpm un altre cop durant 5 minuts a 4°C.

El botó es resuspen amb 2 ml de la solució CaCl₂ 50 mM en Tris 10 mM (pH 8.0) estèril. És recomanable deixar les cèl·lules competents de 12 a 24 hores a 4°C per tal de millorar el rendiment de la transformació.

Transformació

En un tub eppendorf s'inoculen 200 µl de cèl·lules competents i DNA (10-100 ng) en un volum inferior al 10% del volum total de la reacció i es deixa incubant 30 minuts en gel. Seguidament, s'incuba durant 90 segons a 42°C, per tal d'induir un xoc tèrmic a les cèl·lules. A continuació, s'afegeixen 0.5 ml de medi LB sense antibiòtic i s'incuba a 37°C durant 1 hora per propiciar que la resistència a l'antibiòtic comenci a expressar-se.

Es sembren diferents quantitats del cultiu en càpsules de Petri amb medi selectiu per al plasmidi en qüestió. Les plaques s'incuben a 37°C durant 12 a 18 hores en posició invertida. És important no deixar les plaques més de 18 hores a l'estufa, ja

que llavors apareixen petites colònies satèl·lits al voltant de les colònies transformades. Això és degut a que l'antibiòtic s'esgota i aquest fet permet el creixement de bacteris que no han incorporat la resistència a l'esmentat antibiòtic.