

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Aislamiento de genes concretos de una
genoteca**

Illamento de xenes concretos dunha xenoteca

**Isolation of specific genes from a genomic
library**

María Soledad Regueira Amara

A Coruña, 10 de setembro de 2021

Directora: M^a Ángeles Freire Picos

Departamento de Bioloxía



M^ª ANGELES FREIRE PICOS, PROFESORA TITULAR DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA EN LA UNIVERSIDADE DA CORUÑA

INFORMA

QUE EL PRESENTE TRABAJO FIN DE GRADO PRESENTADO POR LA ALUMNA M^ª Soledad
Regueira Amara TITULADO:

- Aislamiento de genes concretos de una genoteca
- llamento de xenes concretos dunha xenoteca
- Isolation of specific genes from a library

Ha sido realizado bajo mi dirección y autorizo su presentación para que pueda ser juzgado
por el tribunal correspondiente.

Y para que conste firmo la presente en A Coruña a 7 de septiembre de 2021

FREIRE PICOS
MARIA
ANGELES
32760558W

Docente Titular de Bioquímica y Biología Molecular
32760558W
Instituto de Investigación en Acuicultura (ITA)
UNIVERSIDADE DA CORUÑA
CALLE DE MARCA, 153 15105 CORUÑA
MARCA ANGELES FREIRE PICOS
32760558W
Fecha 2021.09.07 15:44:14 -02'00'

M^ª Angeles Freire Picos

ÍNDICE

Resumen/Resumo/Abstract

Palabras clave

1. Introducción	1
1.1 Clonación de genes específicos de una genoteca.....	1
1.1.1 Clonación por PCR.....	1
1.2 <i>LAS2</i> , <i>SSU72</i> y la genoteca doble híbrido.....	2
1.3 Utilización del <i>megaprimer</i>	3
2. Objetivos	3
3. Materiales y métodos	4
3.1 Cepas de <i>Escherichia coli</i>	4
3.2 Medios de cultivo	4
3.3 Genoteca doble híbrido.....	4
3.4 Diseño de los primers	5
3.5 Electroforesis en gel de agarosa.....	5
3.6 Purificación del megaprimer a partir del gel de agarosa	6
3.7 Mutagénesis dirigida	6
3.8 Extracción de plásmidos	7
3.9 Digestiones de DNA plasmídico con enzimas de restricción	7
4. Resultados y discusión	8
4.1 Obtención de un <i>megaprimer</i> gen-específico	9
4.1.1 Diseño de los <i>primers</i> que anillen con la región codificadora de <i>LAS2</i>	9
4.1.2 Optimización de las condiciones de PCR para obtener el <i>megaprimer</i>	9
4.1.3 Purificación y estimación de la concentración del <i>megaprimer</i>	11
4.2 Primer ensayo de condiciones para aislar el clon con <i>LAS2</i> (Experimento 1)	12
4.3 Optimización de las condiciones iniciales (Experimento 2).....	14
4.3.1 Efecto del tiempo de digestión con <i>DpnI</i>	17
4.4 Tercera modificación de las condiciones de amplificación (Experimento 3) ...	18
4.4.1 Comprobación de candidatos del experimento 3	20
5. Conclusiones/Conclusiones/Conclusions	22
6. Bibliografía	23

Resumen/Resumo/Abstract

Las librerías genómicas o genotecas contienen el genoma completo de un organismo determinado, digerido en fragmentos de distinta longitud e insertado en vectores de clonación, siendo un recurso continuo para el estudio de genes concretos. Existen distintas técnicas para aislar un gen específico a partir de una genoteca, en este trabajo se adaptó la estrategia del protocolo de mutagénesis dirigida con el objetivo de aislar un gen concreto, en este caso *LAS2* de una genoteca doble híbrido de *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello se obtuvo por PCR un fragmento de la región codificante del gen que fue empleado como *megaprimer* para aislar el clon que contiene *LAS2* (SMP3). Se describen las sucesivas modificaciones para optimizar el protocolo hasta conseguir potenciales candidatos. El análisis por digestión enzimática indica que se obtuvieron al menos dos clones que contenían el gen deseado.

As librerías xenómicas ou xenotecas conteñen o xenoma completo dun determinado organismo, dixerido en fragmentos de distinta lonxitude e inserido en vectores de clonación, sendo un recurso continuo para o estudo de xenes concretos. Existen diferentes técnicas para illar un xene específico dunha xenoteca, neste traballo adaptouse a estratexia do protocolo de mutaxénese dirixida co obxectivo de illar un xene concreto, neste caso *LAS2* (SMP3) dunha xenoteca dobre híbrido de *Saccharomyces cerevisiae*. Para iso conseguíuse mediante PCR un fragmento da rexión codificante do xene que empregouse como *megaprimer* para illar o clon que contén *LAS2*. Descríbense sucesivas modificacións para optimizar o protocolo ata obter posibles candidatos. A análise por dixestión enzimática indica que obtivéronse polo menos dous clons que contiñan o xene desexado.

Genomic libraries contain the complete genome of a particular organism, which has been digested into fragments of different lengths and inserted into cloning vectors, in order to be used as a continuous resource for the study of specific genes. There are different techniques to isolate an individual gene from a genomic library, in this work the strategy of the directed mutagenesis protocol has been adapted in order to isolate a specific gene, in this case *LAS2* from two-hybrid *Saccharomyces*

cerevisiae genomic library. With a view to achieving this, a fragment of the coding region of the gene was obtained by PCR, which had been used as a *megaprimer* to isolate the clone containing *LAS2* (SMP3). Successive modifications are described to optimize the protocol until potential candidates are obtained. Analysis by enzymatic digestion indicates that at least two clones containing the desired gene have been obtained.

Palabras clave: clonación, genoteca, PCR, mutagénesis, *megaprimer*.

1. Introducción

Desde que se desarrollaron las técnicas básicas para aislar genes e introducirlos en plásmidos u otros vectores de clonación (Sambrook *et al.*, 1989) se hizo posible la expresión de genes recombinantes y posteriormente la obtención de genomas completos clonados en plásmidos (genotecas) para su expresión en procariotas y eucariotas.

De modo clásico, las genotecas se obtienen fraccionando el genoma con enzimas de restricción y se incorpora a vectores digeridos con enzimas compatibles para el ligamiento (revisado por Bertero *et al.*, 2017). Los plásmidos recombinantes así obtenidos son utilizados para la transformación de células hospedadoras, normalmente bacterias, que una vez transformadas con el conjunto de plásmidos recombinantes, permiten amplificar el DNA de la genoteca y perpetuarla. Son por tanto un recurso continuo de genes para su estudio.

Actualmente existen genotecas de muchas especies y en el caso concreto de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* podemos encontrarlas en plásmidos con bajo y alto número de copias, o genotecas del doble híbrido (James *et al.*, 1996: Zhu and Hannon, 2000) entre otras, que permiten estudiar características *in vivo*.

1.1 Clonación de genes específicos de una genoteca

Encontrar clones específicos de una genoteca inicialmente resultaba laborioso con procedimientos como hibridación de colonias con sondas marcadas, o el método clásico de clonación por complementación de una mutación en un gen asociado a un fenotipo concreto (Griffins *et al.*, 1999), de modo que al transformar las células mutadas con la genoteca, el clon que contiene el gen silvestre complementará un fenotipo permitiendo aislarlo y caracterizarlo.

Tras la secuenciación de los genomas completos de levaduras o humanos (entre otras), es posible clonar genes amplificando la secuencia de interés por PCR. Este DNA concreto puede ser empleado con diferentes propósitos incluida la clonación en vectores de interés para su posterior expresión en células huésped.

1.1.1 Clonación por PCR

Se han desarrollado distintas técnicas de clonación por PCR, algunas se basan en amplificar por separado el vector y el DNA de interés, añadiendo a los *primers*

que amplifican el inserto, (en su extremo 5') secuencias homólogas al vector. Posteriormente, se mezclan los productos de las PCR y los extremos hibridan por complementariedad de bases, obteniendo un plásmido recombinante (Li *et al.*, 2011).

Otra técnica es la *Overlap Extension cloning* (Bryksin and Matsura, 2010) donde se añade a los *primers* del inserto extremos homólogos con el vector, se realiza una primera PCR del inserto, posteriormente se mezcla con el vector, se desnaturaliza, la secuencia homóloga del inserto hibrida con el vector, y se realiza una segunda PCR del recombinante.

También puede añadirse el inserto en los *primers*, en el extremo 5' para la extensión del vector, lo que reduce la técnica a un sola PCR, pero tiene limitaciones en la longitud del inserto (Li *et al.*, 2011). Esta técnica puede ser utilizada para la construcción de proteínas recombinantes.

1.2 LAS2, SSU72 y la genoteca doble híbrido

El sistema de doble híbrido fue desarrollado inicialmente en levaduras por Fields y colaboradores en 1989 para identificar interacciones proteína-proteína. Para ello se co-expresan en una misma célula dos plásmidos recombinantes, uno con el dominio de unión a DNA del activador *GAL4* de levaduras fusionado a la región codificadora del gen X, y el otro plásmido combinando las secuencias codificadoras del dominio de activación con el gen Y. Si X e Y interaccionan entre sí, se podrá detectar la interacción al activarse genes reporteros. Desde entonces se han desarrollado muchas variantes con diferentes tipos de genotecas desde levaduras a humanos.

Inicialmente el gen *LAS2* fue aislado en experimentos de doble híbrido por su interacción con el gen *SSU72* (Seoane, 2001). En estos experimentos se partió de la genoteca Y2HL-C2 (James *et al.*, 1996) clonada en un vector con el dominio de activación de *GAL4* (el vector pGAD-C2). En ese momento se desconocía que *SSU72* es una fosfatasa que puede actuar en diferentes procesos celulares desde la transcripción a la mitosis, se consideraba que sólo era un regulador del inicio de la transcripción (Sun and Hampsey 1989) y por ello el clon con *LAS2* que codifica para una manosil transferasa fue descartado.

En este estudio se busca aislar de nuevo el clon con la región codificadora del gen *LAS2* (SMP3) de *S. cerevisiae* fusionada al dominio de activación de *GAL4*. *LAS2* codifica para una proteína encargada de transferir una cuarta manosa durante la síntesis del glucosil-fosfatidil-inositol (GPI) en el retículo endoplasmático de levaduras (Grimme *et al.*, 2001).

Dado que actualmente en nuestro grupo conocemos la relación de *SSU72* con la regulación de la síntesis de quitina y la pared celular, consideramos que su interacción puede permitirnos conocer nuevas funciones y por ello nos decidimos a rescatar el plásmido con *LAS2* de la genoteca del doble híbrido buscando una estrategia sencilla para obtener el clon.

1.3 Utilización del *megaprimer*

Con la técnica de mutación dirigida (Carter, 1986) se pueden insertar mutaciones, producir deleciones o inserciones en un gen específico para el estudio de su funcionamiento. En nuestro caso no buscamos ninguno de estos efectos por lo que el oligonucleótido utilizado como *megaprimer* no incorporará mutaciones.

El *megaprimer* fue empleado por Sakar y Sommer en 1990. Este método utiliza 3 *primers* oligonucleótidos en dos rondas de PCR. La primera para amplificar un producto de DNA bicatenario de mayor tamaño que por eso recibe el nombre de *megaprimer* y se emplea como cebador para la segunda ronda.

2. Objetivos

Nuestro principal objetivo es aislar un plásmido que contenga el gen *LAS2* fusionado a la secuencia que codifica el dominio de activación transcripcional de Gal4 adaptando el protocolo de mutagénesis dirigida sin producir mutaciones y con la particularidad de emplear como molde una genoteca de doble híbrido de levaduras.

3. Materiales y métodos

3.1 Cepas de *Escherichia coli*

Para la transformación de bacterias se emplearon las cepas:

1- NZYStar (aportadas por el kit de mutagénesis de NZYTech) con genotipo *endA1 hsdR17*(*r_k*⁻, *m_k*⁺) *supE44 thi -1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F' *proA*⁺*B*⁺ *lacI*^q *ZΔM15 :Tn10*(Tc^R)]

2- ECOS- XI-1Blue con genotipo *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)]

3.2 Medios de cultivo

Para la transformación de las bacterias competentes se utilizó medio Luria-Bertani (LB) (tabla 1).

Bactotripton	5 g
NaCl	2,5 g
Yeast Extract	2,5 g
Dextrosa	0,5 g

Tabla 1: composición para 500ml de medio LB

El medio fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión.

Como medio de cultivo y selectivo para los transformantes se utilizó el medio Luria-Bertani con ampicilina (LBA). Para la preparación de 500ml se añadió 7,5g de agar a los componentes del medio LB y después de la esterilización se adicionó con ampicilina en una concentración de 70 µg / ml de medio.

3.3 Genoteca doble híbrido

Como molde para la obtención *LAS2* se utilizó la genoteca doble híbrido Y2HLC-2 de la que inicialmente se aisló el gen (Seoane, 2000) clonado en el vector pGAD-C2 (James *et al.*,1996) (figura 1). Este vector contiene un origen de replicación en bacterias y el gen de resistencia a la ampicilina.

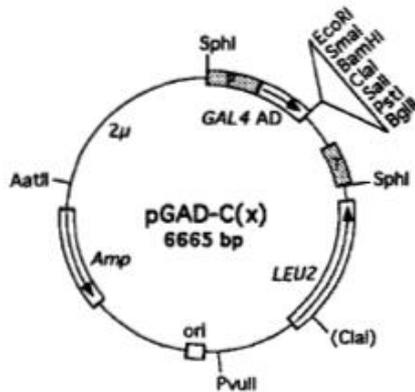


Figura 1: Estructura del vector pGAD-C2 con el gen de resistencia a la ampicilina, el sitio de clonación múltiple y el origen de replicación en bacterias (James *et al.*, 1996).

La concentración de DNA de la genoteca se calculó en función del valor de absorbancia a 260nm (A260) teniendo que cuenta que A260=1 equivale a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Para ello se empleó el espectrofotómetro *Eppendorf Biospectrometer*TM.

3.4 Diseño de los *primers*

Los *primers* para la amplificación de la región codificadora de *LAS2* se diseñaron con la aplicación para esta función dentro de la plataforma SGD (*Saccharomyces Genome Database*).

Los *primers* se sintetizaron en la empresa *Stabvida*. Una vez recibidos en el laboratorio se llevaron a una concentración stock de 100 pmol/ μl en agua estéril. Para la amplificación de *LAS2* se utilizó una concentración de 20 pmol/ μl .

3.5 Electroforesis en gel de agarosa

Para el análisis por electroforesis de los fragmentos de PCR y las digestiones enzimáticas se prepararon geles de agarosa al 0.8% con tampón TAE 1X (Tris 40 mM, EDTA 1 mM, acetato acético 30 mM, acetato sódico 20 mM, pH 8.0).

Como tampón de carga y para visualizar las muestras se utilizó el agente intercalante *Gel Green* (Biotum).

Como marcador de pesos moleculares se usó *GeneRuler*TM 1kb DNA Ladder.

Las muestras se dejaron migrar en el gel durante 45 min a 60 voltios.

Para observar y obtener imágenes con los resultados de las electroforesis se utilizó el transiluminador de UV *Gel Doc™ XR+* (Biorad) junto con el programa informático *Image Lab™*.

3.6 Purificación del *megaprimer* a partir del gel de agarosa

La extracción del DNA a partir del gel de agarosa se hizo utilizando el kit *Gel and PCR Clean-up Machery-Nagel™ NucleoSpin™*.

3.7 Mutagénesis dirigida

La técnica de mutagénesis dirigida ampliamente empleada para conseguir pequeñas mutaciones en genes concretos sigue la estrategia que se muestra en la figura 2. Como se puede apreciar, la técnica no requiere de reacciones de ligamiento ni recombinación posteriores.

Para obtener un clon de la genoteca que incluya el gen *LAS2*, y como fuente de las enzimas DNA-polimerasa y *DpnI* así como las células ultracompetentes utilizadas en los primeros experimentos empleamos el kit *NZYMutagenesis* (NZYTech, 2013). Este kit emplea un protocolo similar al de otras casas comerciales para el mismo propósito.

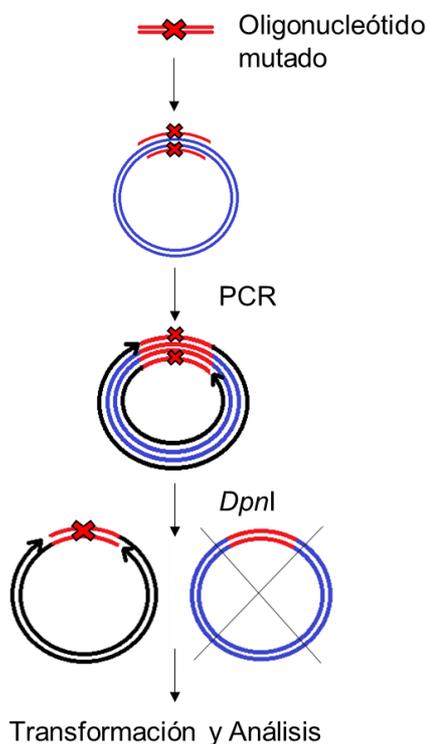


Figura 2: En la técnica de mutagénesis dirigida se diseña un oligonucleótido (rojo) que hibride con la secuencia del gen que se quiere mutar. Este oligonucleótido incorpora la mutación deseada y se usa como *primer* para clonar todo el plásmido. Posteriormente se digiere con la enzima *DpnI* el DNA original utilizado como molde (azul), obteniendo como resultado un plásmido (negro) con la mutación que se desea incorporar.

3.8 Extracción de plásmidos

Para la extracción plasmídica de los transformantes se utilizó el kit *nzytech*TM *NZYMiniprep*TM obteniendo un eluido final de 30µl.

3.9 Digestiones de DNA plasmídico con enzimas de restricción

Las digestiones de DNA plasmídico con endonucleasas de restricción se prepararon siguiendo la composición de la tabla en un volumen final de 20 µl (tabla 2)

DNA plasmídico	5 µl
Buffer de la enzima (10X)	2 µl
H ₂ O destilada	12 µl
Enzima	1 µl

Tabla 2: Composición de las reacciones con enzimas de restricción. En el caso de la doble restricción se usó 1 µl de cada enzima.

4. Resultados y discusión

Para conseguir nuestro objetivo de aislar de forma rápida y sencilla un gen o parte de él a partir de la genoteca doble híbrido, y teniendo en cuenta que no se buscaba introducir mutaciones, diseñamos una estrategia basada en la técnica de mutagénesis dirigida en la que la principal variación es el DNA molde, en este caso una genoteca de *S. cerevisiae* con aproximadamente 6000 genes representados (figura 3).

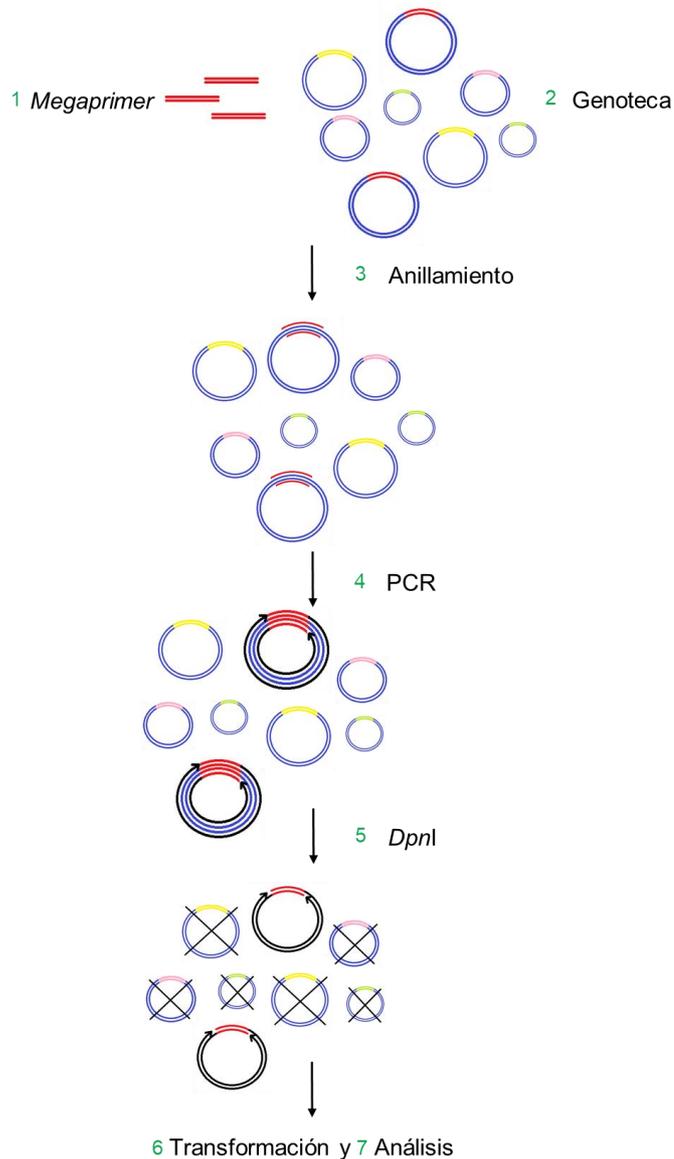


Figura 3: Esquema del diseño experimental. 1 y 2- Obtención del *megaprimer* que hibrida con el gen de interés contenido en la genoteca (Rojo: *megaprimer* y secuencia que queremos aislar. Azul: Vectores de la genoteca portando distintos insertos). 3- Anillamiento. 4- PCR del plásmido de interés (Negro: plásmido clonado que contiene *LAS2*). 5- Digestión con *DpnI* del DNA que no fue extendido a partir del *megaprimer*. 6- Transformación de bacterias. 7- Análisis de los resultados.

4.1 Obtención de un *megaprimer* gen-específico

El primer paso para poder aplicar el citado protocolo es obtener dos secuencias complementarias que anillen con nuestro gen de interés y que tengan un alto valor de T_m (de al menos 78°C), por lo que comenzamos diseñando *primers* para obtener por PCR un fragmento gen-específico de varios cientos de pares de bases que se utilizó como *megaprimer*.

4.1.1 Diseño de los *primers* que anillen con la región codificadora de *LAS2*

Para poder amplificar el fragmento interno de *LAS2* se diseñaron los *primers* a partir de la base de datos de SGD obteniendo una serie de candidatos de los que se seleccionaron los que se muestran en la tabla 3.

Primer	Inicio	Long.	Long. producto	T_m	GC%	Secuencia 5'→3'
Las2intU	60	20	953	57.99	55	GGCCCGTCGTATATTCATCC
Las2intR	1012	20		58.95	55	GTGGAACTCAGAGGTGTCCA

Tabla 3: Características de los *primers* obtenidos para la amplificación de un fragmento interno de *LAS2* a través de *Saccharomyces* Genome Database. (<https://www.yeastgenome.org>)

Como se muestra en la tabla el fragmento esperado con la utilización de estos *primers* tuvo una longitud de 953 pb.

4.1.2 Optimización de las condiciones de PCR para obtener el *megaprimer*

Comenzamos optimizando las condiciones de la PCR para la obtención de *LAS2* variando las temperaturas de anillado y la cantidad de DNA molde. Las primeras condiciones se muestran en la tabla 4. La concentración calculada para el DNA de la genoteca doble híbrido es de 3,9 ng/μl.

Se realizaron reacciones simultáneas en un termociclador en gradiente a tres temperaturas: 50°C, 54°C y 57°C.

Además de la genoteca, utilizamos como molde una muestra de DNA genómico de *S. cerevisiae* disponible en el laboratorio para comprobar la amplificación de *LAS2*.

	Genoteca 7,8 ng (x3)	Genoteca 15,6 ng (x3)	DNA genómico (x3)
DNA molde	2 µl	4 µl	2 µl
Buffer 10x	5 µl	5 µl	5 µl
MgCl ₂ 50mM	1 µl	1 µl	1 µl
dNTPs	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Primer R	2 µl	2 µl	2 µl
Primer F	2 µl	2 µl	2 µl
Enzima Taq	1 µl	1 µl	1 µl
H ₂ O estéril	34,5 µl	32,5 µl	34,5 µl
Vol. final	50 µl	50 µl	50 µl

Tabla 4: Variaciones en la cantidad de DNA molde. Cada reacción se hizo por triplicado variando las temperaturas empleando un termociclador en gradiente a 50°C, 54°C y 57°C.

En la figura 4 se observan los resultados. Como se puede apreciar al aumentar la temperatura de 50°C a 54°C se observa una importante pérdida de amplificación, a 57°C ya no hay rastro de banda específica en ninguna condición. Por otro lado, a 50°C la banda específica está más definida con 4 µl (16,5 ng) de genoteca. También se aprecia la banda específica con el DNA genómico como molde (figura 4, carril 3). Por tanto, se optó por las condiciones de 4 µl de DNA de la genoteca a 50°C (figura 4, carril 2).

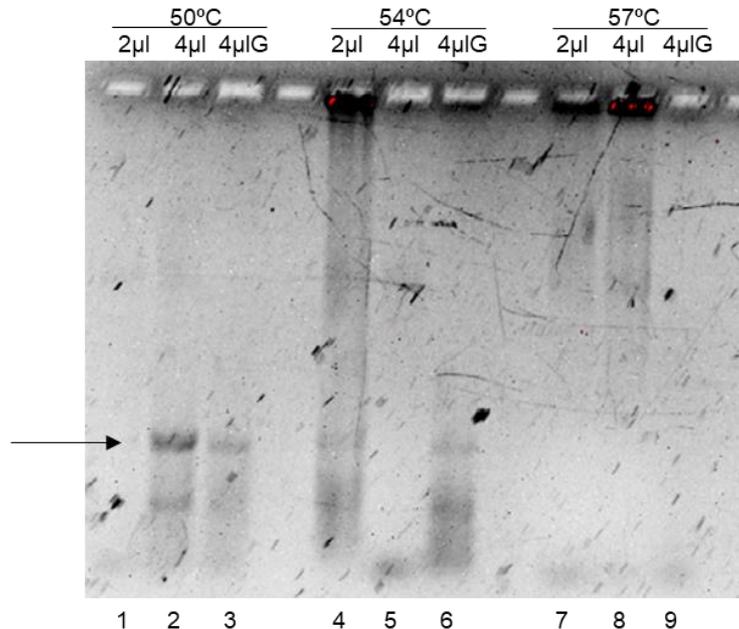


Figura 4: Resultados obtenidos en la primera optimización de las condiciones para la amplificación de LAS2. La flecha indica las condiciones elegidas: 4µl de DNA molde y 50°C.

4.1.3 Purificación y estimación de la concentración del *megaprimer*

Se realizó una nueva PCR para mejorar la señal y concentración del fragmento de LAS2 y poder rescatar el DNA que se utilizó como *megaprimer*. Para ello se emplearon las condiciones anteriormente optimizadas de temperatura y cantidad de DNA.

En este caso se emplearon dos DNA molde de distintos orígenes, en la condición A se utilizó el DNA obtenido de la amplificación anterior y en la condición B se empleó como DNA molde la genoteca de doble híbrido.

Como se puede apreciar en la figura 5 la amplificación fue más clara al utilizar la genoteca como molde (figura 5-B pocillos 3 y 4). Se rescataron las bandas correspondientes con la condición B (figura 5-C).

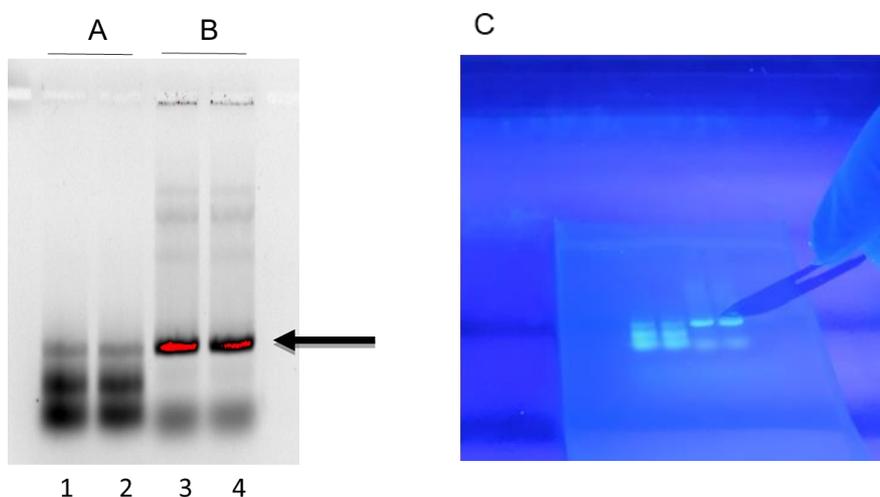


Figura 5: A y B-Amplificación del *megaprimer* para LAS2 con las condiciones óptimas estudiadas. La flecha indica la banda correcta para el *megaprimer*. C-Escisión de las bandas 3 y 4 para su posterior extracción y purificación del gel de agarosa.

Tras la extracción de DNA del gel de agarosa no fue posible obtener una lectura positiva en el espectrofotómetro para calcular la concentración en función de la absorbancia puesto que daba valores negativos. Esto es frecuente tras las purificaciones porque pueden quedar restos de sales y/o buffers que afectan negativamente a la absorbancia frente al blanco. Por ello, para estimar la concentración de DNA del *megaprimer* se realizó una electroforesis y se comparó con la intensidad de las bandas del marcador de concentración conocida (figura 6).

Para la electroforesis se cargaron 5 μ l del marcador y 5 μ l del resultado obtenido de la purificación a partir del gel de agarosa.

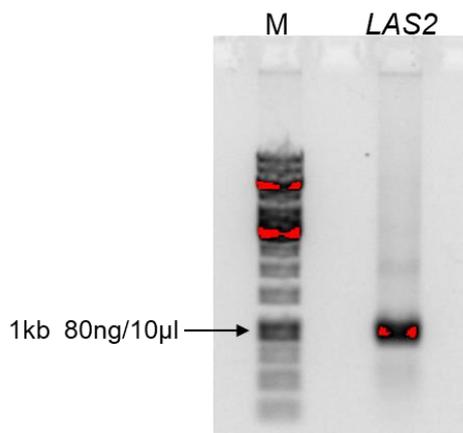


Figura 6: Electroforesis para la estimación de la concentración de DNA por comparación con marcador de concentración conocida.

Como resultado se estimó que la concentración del *megaprimer* era próxima a 8 ng / μ l.

4.2 Primer ensayo de condiciones para aislar el clon con *LAS2* (Experimento 1)

Como se comentó anteriormente, el *megaprimer* obtenido se utilizó para conseguir aislar de la genoteca un clon que contenga *LAS2* adaptando el protocolo de la técnica de mutagénesis dirigida.

Es recomendable que los *primers* (en este caso el *megaprimer*) en la reacción de amplificación estén en exceso respecto al molde. En nuestro caso, ya habíamos comprobado que se puede amplificar por PCR un fragmento del gen de la genoteca pero desconocemos el número de copias del clon con *LAS2* en el total de DNA de la genoteca. Considerando que *S. cerevisiae* contiene alrededor de 6000 genes y suponiendo que todos estuviesen igualmente representados, habría que dividir por este valor la concentración de la genoteca para tener una estimación aproximada de la concentración. En el resto de la memoria hablamos de DNA de la genoteca, y aunque el valor puede parecer similar al del *megaprimer*, en realidad el molde del gen de interés tiene una concentración de unos pocos (1-2) picogramos.

Comenzamos comprobando el efecto de variar la proporción genoteca/*megaprimer* variando las cantidades de DNA molde y *megaprimer*, además

de una tercera condición con los controles del kit. Los detalles se muestran en la tabla 5.

Genoteca/ <i>megaprimer</i>	R-1 (1/1)	R-2 (1/2)	Control
DNA molde	10 μ l (39 ng) genoteca	20 μ l (78 ng) genoteca	1 μ l plásmido control
<i>Megaprimer</i>	5 μ l (40 ng) megaprimer	21 μ l (168 ng) megaprimer	2 μ l <i>primer</i> control

Tabla 5: Variación en la cantidad de DNA molde/*megaprimer* entre las condiciones R-1 y R-2. Para el control de transformantes se utilizó plásmido control y *primer* control incluidos en el kit de mutagénesis. 1/1 y 1/2 son los ratios genoteca/*megaprimer*.

Las tres condiciones se sometieron a la PCR aplicando el número de ciclos recomendados en los protocolos de mutagénesis *NZYMutagenesis* (tabla 6).

Etapas	Ciclos	Temperatura °C	Tiempo
1	1	95	30 seg.
2	18	95	30 seg.
		55	1 min.
		68	16 min.
3	1	68	15 min.

Tabla 6: Temperatura y tiempo de los distintos ciclos durante la amplificación, el tiempo de extensión fue calculado considerando 2min/kb.

Las secuencias de DNA que se amplifican por PCR no contienen nucleótidos metilados, por ello, para eliminar el resto de los plásmidos de la genoteca, que no habían sido extendidos a partir del *megaprimer* (que sí estaban metilados) éste se sometió a digestión añadiendo 5 μ l de la enzima *DpnI* incubando las reacciones por espacio de 1 hora 30 minutos a 37°C.

Con el producto de la digestión anterior se transformaron células competentes de bacterias sembrando dos placas de medio LBA por cada una de las condiciones (R-1, R-2 y Control).

Después de incubar a 37°C durante 24 horas se obtuvo 264 y 218 colonias en cada una de las placas sembradas como control de transformantes (figura 7-A). En las placas sembradas derivadas de la condición 1 (R1) se obtuvieron 5 colonias, y en las sembradas derivadas de la condición 2 (R2) 21 colonias. De ambas

condiciones (R1 y R2) se hicieron resiembras para el posterior análisis de los plásmidos (figura 7-B).

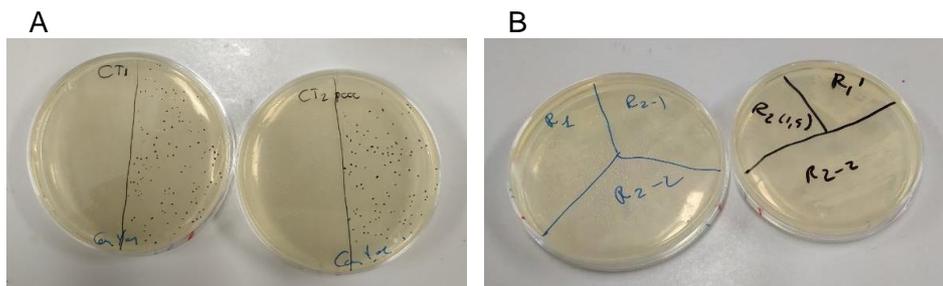


Figura 7: A- Placas control de transformantes. B-Resiembra de masa celular a partir de transformantes de las condiciones R1 y R2.

Para comprobar los transformantes se efectuó el lisado de los *pooles* tomando una pequeña cantidad de células con un palillo e incubándolas al microondas durante 30 segundos en el mismo *ependorf* donde posteriormente se efectuó una PCR con las condiciones óptimas para la amplificación de *LAS2*.

Como resultado no se observó ninguna banda que se pudiera corresponder con el fragmento de *LAS2*, si bien las placas control mostraron que las células competentes y los controles funcionaban correctamente.

Las diferencias entre las condiciones R1 y R2 indican que aumentar el DNA de la genoteca y *megaprimer* tiene un efecto negativo en el número de transformantes y adicionalmente no pudimos identificar el clon deseado.

4.3 Optimización de las condiciones iniciales (Experimento 2)

Considerando la posibilidad de estar trabajando con un exceso de DNA de la genoteca en las reacciones de síntesis, se realizó un nuevo experimento con las condiciones de la tabla 7 en las que se mantuvieron los ratios molde/*megaprimer* pero se redujo la cantidad de DNA total por si la digestión de *DpnI* no estaba siendo eficaz.

Genoteca/ <i>megaprimer</i>	C-1 (1/1)	C-2 (1/2)
DNA molde	4 μ l (15,6 ng) genoteca	4 μ l (15,6 ng) genoteca
<i>Megaprimer</i>	2 μ l (16 ng)	4 μ l (32 ng)

Tabla 7: Nuevas condiciones revisadas, donde se mantienen los ratios pero se reduce la cantidad de DNA total.

También se introdujeron cambios en los tiempos de duración de los ciclos de la PCR y se añadieron 2 ciclos en la etapa 2 (tabla 8).

Etapa	Ciclos	Temperatura °C	Tiempo
1	1	95	2 min.
2	20	95	1 min.
		55	1 min.
		68	13 min.
3	1	68	15 min.

Tabla 8: Cambios en los tiempos de duración de los ciclos de la técnica de PCR, se aumentó el tiempo de desnaturalización y se redujo el tiempo de extensión calculándolo en base a 1,5min/kb.

Se realizó una electroforesis con el resultado de la síntesis y antes de la digestión con *DpnI* (figura 8).

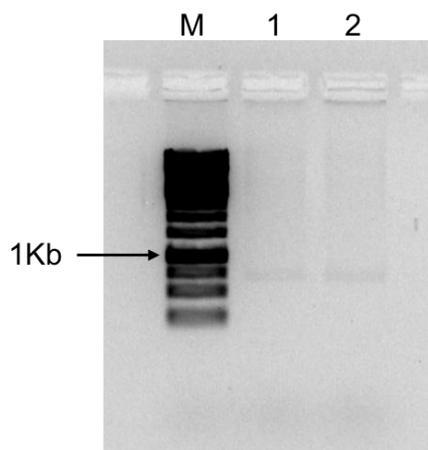


Figura 8: Electroforesis de las condiciones 1 y 2 de la tabla 8. M: marcador *GeneRuler 1kb*.

Tras la PCR se siguió la misma dinámica experimental comentada en el apartado anterior. Como resultado se obtuvieron 54 colonias en la placa R1', 68 colonias en la placa R2', en el control negativo no se observó crecimiento.

Por tanto, la disminución en la cantidad de DNA total y el incremento del número de ciclos aumentó el número de transformantes obtenidos.

Se sembraron 20 colonias de cada una de las reacciones (R1' y R2') y para agilizar su análisis se hicieron agrupaciones (*pooles*) con resiembras de cinco colonias cada uno (figura 9).

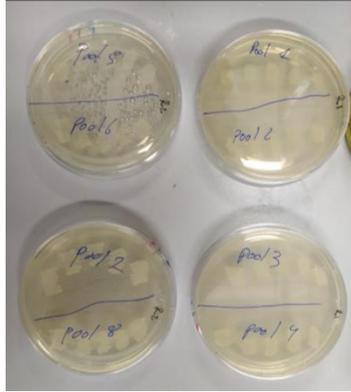


Figura 9: Resiembra de los transformantes obtenidos en las placas C1 y C2. La resiembra se dividió en 4 *pooles* para cada reacción, cada *pool* a partir de 5 transformantes.

Se extrajo DNA de los *pooles* y se analizaron por PCR con un microlitro de *miniprep* de cada uno como molde (figura 10).

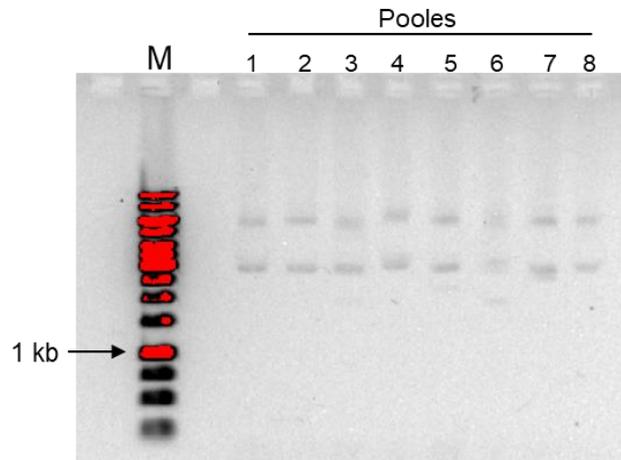


Figura 10: Electroforesis de la reacción de PCR control para la búsqueda del clon de *LAS2*.

Como se puede observar en la figura 10, el patrón de bandas de todos los *pooles* es similar, sin embargo en ninguno se observa una banda clara que se pudiese corresponder con *LAS2*. Por lo tanto, las variaciones que se introdujeron permitieron obtener más transformantes pero ninguno de ellos con el plásmido que se quería clonar, esto sugiere que podría no haber sido suficiente la digestión con *DpnI* realizada y que causase la obtención de otros clones de la genoteca.

4.3.1 Efecto del tiempo de digestión con *DpnI*

Considerando la posibilidad de que la digestión con *DpnI* no fuera suficiente en la estrategia anterior, se realizó una segunda digestión de la condición 2 durante 1 hora 30 minutos.

Se llevó a cabo una nueva transformación de bacterias y se incluyó una placa con 100 µl de medio LB como control negativo. Como resultado de la incubación durante 24hs a 37°C se observó en la placa control negativo el crecimiento de una colonia grande, que por su aspecto era una posible contaminación.

En la placa sembrada con la condición 2 se observó crecimiento de múltiples colonias. Estas se obtuvieron en 5 *pooles*, nombrados como *a*, *b*, *c*, *d* y *e* procediendo a su análisis.

Tras extraer DNA de los *pooles*, éstos se analizaron por PCR para comprobar la presencia del fragmento de *LAS2* que se quería rescatar (figura 11).

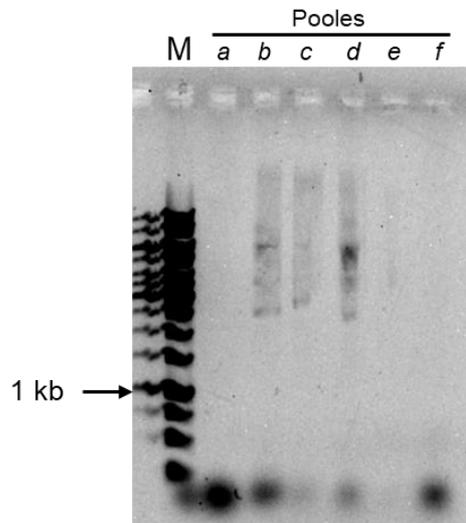


Figura 11: Electroforesis de los productos de PCR tras la segunda digestión con *DpnI*. Los *pooles* *b*, *c* y *d* presentaron un patrón similar.

Como se puede observar en la figura 11, los *pooles* *b*, *c* y *d* presentaron un patrón similar, pero ninguno se correspondió con el tamaño del fragmento buscado.

Se resembraron los *pooles* *b* y *c*, se prepararon *minipreps* y se hizo una nueva comprobación por PCR de los eluidos (figura 12).

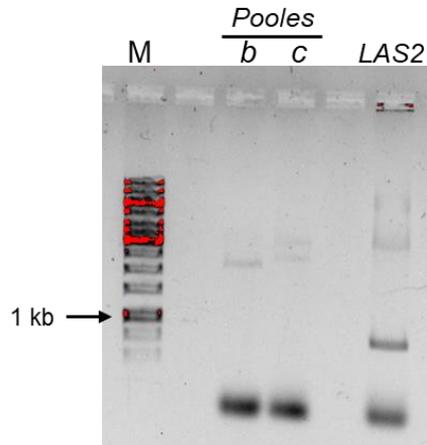


Figura 12: Electroforesis de la PCR de comprobación de los *pooles b* y *c* reseleccionados. Simultáneamente se realizó una PCR de *LAS2* a partir de la genoteca doble híbrido.

El control de amplificación de *LAS2* a partir de la genoteca doble híbrido fue clara, pero en los *pooles* que se reseleccionaron no se observó ninguna banda que se correspondiera con el gen.

4.4 Tercera modificación de las condiciones de amplificación (Experimento 3)

Para comprobar que se puede aislar el plásmido que contiene el clon de *LAS2* buscado se realizó una nueva PCR utilizando el ratio 1/1 (genoteca/*megaprimer*), con cantidades totales de DNA reducidas (tabla 9).

<i>Genoteca/megaprimer</i>	C-1 (1/1)
DNA molde	4 μ l (15,6 ng) genoteca
<i>Megaprimer</i>	2 μ l (16 ng)

Tabla 9: Cantidades de DNA utilizados en la comprobación, manteniendo el ratio genoteca/*megaprimer*.

Como variables se aumentó un ciclo en la etapa 2 de la PCR y también el tiempo de extensión se aumentó en 1 minuto (tabla 10).

Etapa	Ciclo	Temperatura °C	Tiempo
1	1	95	2 min.
2	21	95	1 min.
		55	1 min.
		68	14 min.
3	1	68	15 min.

Tabla 10: Se mantienen las temperaturas empleados en la estrategia anterior, pero se añade un ciclo en la etapa 2 y 1 minuto al tiempo de extensión.

Después de la PCR se realizó digestión de la muestra con 5µl de *DpnI* incubando 1 hora 30 minutos a 37°C.

Para comprobar que el producto amplificado con las nuevas condiciones contiene *LAS2*, se hizo una PCR de comprobación de la muestra en busca del gen y simultáneamente otra usando como molde la genoteca doble híbrido. En la figura 13 se observa el resultado.

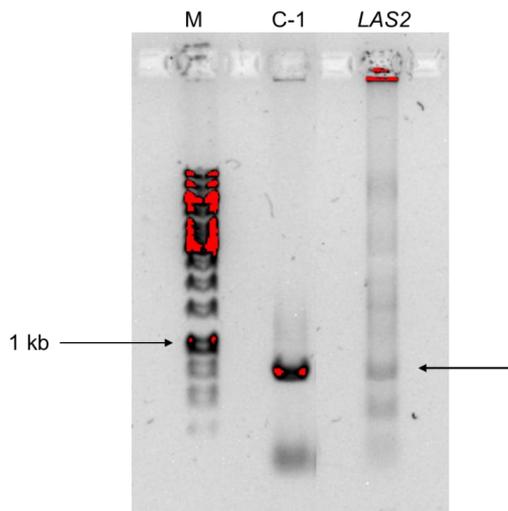


Figura 13: Resultado de la PCR donde se observa que el plásmido aislado contiene el fragmento de *LAS2*. Comparativa de las bandas de la muestra y de genoteca.C1 resultado de la amplificación con las nuevas condiciones.

Con esta comprobación podemos observar que las nuevas variaciones en el protocolo nos permiten amplificar *LAS2* lo que supone una gran mejora respecto a las condiciones anteriores. Por ello pasamos a buscar nuevos clones a partir de este experimento.

4.4.1 Comprobación de candidatos del experimento 3

Tras la transformación bacteriana obtuvimos 14 colonias como potenciales candidatos. Realizamos minipreps para extraer DNA de estos y analizamos una parte por digestión. Escogimos las enzimas *EcoRI* (que corta en el extremo 5' de Gal4 en el vector de pGAD-C2) y *KpnI* con un sitio de corte en la posición de *LAS2*. La doble digestión permitirá comprobar, por el tamaño esperado, la presencia del gen. En la figura 14 se muestra el resultado de la electroforesis.

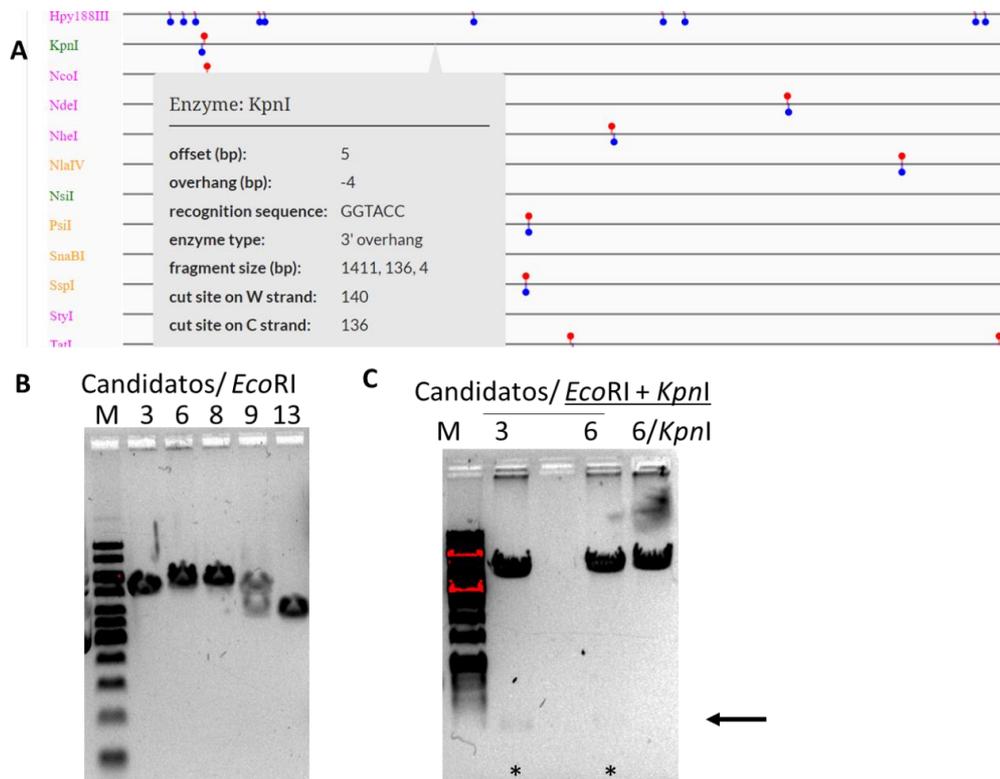


Figura 14: A-Enzimas que cortan en la región codificadora de *LAS2(SMP3)* con detalle del sitio único *KpnI* (<https://www.yeastgenome.org>). B-Electroforesis en gel de agarosa mostrando el resultado de las digestiones sólo con *EcoRI* y C-doble digestión *EcoRI*+ *KpnI*). M: marcador 1Kb; 3,6,8,9,13 candidatos analizados. La flecha indica la posición de la banda menor de 140 pb.

Como se puede apreciar ya en la digestión con *EcoRI* no todos los clones tienen el mismo tamaño indicando que obtuvimos clones diferentes. Este resultado es esperable porque en la genoteca puede haber plásmidos con insertos de *LAS2* de distinto tamaño.

La doble digestión con *EcoRI* y *KpnI* (figura 14-C) permitió comprobar que los dos clones analizados contenían el fragmento *EcoRI-KpnI* con el tamaño esperado (140 bp), por tanto, hemos obtenido al menos dos clones con plásmido de doble híbrido fusionado a *LAS2*. Estos y los restantes candidatos serán verificados posteriormente por secuenciación.

5. Conclusiones/Conclusións/Conclusions

Como resultado del presente trabajo podemos concluir que:

1-Hemos diseñado un sistema para aislar genes concretos de una genoteca (en nuestro caso *LAS2* de una genoteca de doble híbrido de *S. cerevisiae*).

2-La optimización de las condiciones llevó a emplear 15,6 ng de genoteca y 16 ng de *megaprimer* (ratio 1:1), junto con el aumento del número de ciclos, el tiempo de extensión y el tiempo de digestión con *DpnI* permitió aislar plásmidos con *LAS2* con los que se transformaron bacterias.

3-Estos resultados indican que es posible aislar genes concretos de genotecas sin tener que complementar mutaciones ni clonar los genes *de novo*.

Como resultado do presente traballo podemos concluir que:

1-Deseñamos un sistema para illar xenes concretos dunha xenoteca (no noso caso *LAS2* dunha xenoteca de dobre híbrido de *S. cerevisiae*).

2-A optimización das condicións levou o emprego de 15,6 ng de xenoteca e 16 ng de *megaprimer* (ratio 1:1), xunto co aumento do número de ciclos, o tempo de extensión e o tempo de dixestión con *DpnI* permitiu illar plásmidos con *LAS2* cos que se transformaron bacterias.

3-Estes resultados indican que é posible illar xenes concretos de xenotecas sen ter que complementar mutacións nin clonar os xenes *de novo*.

As a result of this work, we can conclude that:

1-We have designed a system to isolate specific genes from a genomic library (in this case *LAS2* from a *S. cerevisiae* two-hybrid genomic library).

2-The optimization of the conditions led us to use 15,6 ng of genomic library and 16 ng of *megaprimer* (ratio 1:1), with the increase in the number of cycles, the extension time and the digestion time with *DpnI* allowed to isolate *LAS2* plasmids with which bacteria were transformed.

3-These results indicate that it is possible to isolate specific genes from genomic libraries without having to complement mutations or clone genes *de novo*.

6. Bibliografía

- **Bertero, A., Brown, S. and Vallier, L.** (2017) *Chapter 2-Methods of Cloning. Basic Science Methods for Clinical Researchers*, 19–39. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00002-3>.
- **Bryksin, A. V. and Matsura, I.** (2010) *Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids*. *Biotechniques*, **48**: 463–465.
- **Carter, P.** (1986) *Site-directed mutagenesis*. *The Biochemical journal* **237** (1): 1-7.
- **Fields, S. and Song, O.** (1989) *A novel genetic system to detect protein–protein interactions*. *Nature* **340**: 245–246.
- **Griffiths, A. J. F., Gelbart, W. M., Miller, J. H. and Lewontin, R. C.** (1999) *Modern Genetic Analyses*. W. H. Freeman; N.Y. ISBN-10: 0-7167-3118-5.
- **Grimme, S. J., Westfall, B. A., Wiedman, J. M., Taron, C. H. and Orlean, P.** (2001) *The Essential Smp3 Protein Is Required for Addition of the Side-branching Fourth Mannose during Assembly of Yeast Glycosylphosphatidylinositols*. *Journal of Biological Chemistry by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, **276**: 27731–27739.
- **Hannon, G. J. and Zhu, L.** (2000). *Yeast hybrid technologies*. BioTechniques Books/Eaton Publishing Natic, MA. ISBN-10: 1-881299-15-5.
- **James, P., Halladay, I. and Craig, E. A.** (1996). *Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast*. *Genetics*. **144**: 1425-1436.

- **Li, C., Wen, A., Shen, B., Lu, J., Huang, Y. and Chang, Y.** (2011). *FastCloning: A highly simplified, purification-free, sequence- and ligation-independent PCR cloning method.* BMC Biotechnology. BioMed Central Ltd, **11**: 92.

- **Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual* 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- **Sarkar, G. and Sommer, S.S.** (1990) *The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis.* Biotechniques, 8: 404-407.

- **Seoane, S.** (2000). *Utilización del doble híbrido para la caracterización de factores transcripcionales que interaccionan con el producto del gen SSU72.* Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias.Universidade da Coruña.

- **Sun, Z.W. and Hampsey, M.** (1989) *Synthetic enhancement of a TFIIB defect by a mutation in SSU72, an essential yeast gene encoding a novel protein that affects transcription start site selection in vivo.* Molecular and Cellular Biology, **16(4)**: 1557–1566.