

III. MATERIAL I MÈTODES

III. MATERIAL I MÈTODES

A continuació es descriuen les metodologies usades en la realització d'aquest treball experimental, així com els materials emprats.

A. Materials

1. Material biològic

En la realització d'aquest treball s'ha utilitzat principalment material vegetal i diverses soques bacterianes:

1.1. Bactèries

S'han emprat 3 soques bacterianes d'*Escherichia coli*:

- *E. coli* BL21-DE3, per a l'expressió de proteïnes recombinants.
- *E. coli* DH5 α F', per al clonatge i obtenció de DNA plasmídic.
- *E. coli* TOP 10, per al clonatge i obtenció de DNA plasmídic.

1.2. Material vegetal

Si no s'especifica el contrari, tots els experiments s'han realitzat sobre mostres biològiques de *Zea mays* L. var W64 +/+ , cultivades a hivernacle durant les temporades d'estiu-tardor i hivern sota les condicions que es descriuen a la taula següent:

TEMPORADA	T ^a (°C)	Humitat (%)	Regs*	Il·luminació			
				7-11h	11-16h	16-21h	21-7h
Estiu	20-35	-	90', 3/setmana	natural	natural	Natural	fosc
Tardor	20-30	-	60', 3/setmana	natural	natural	SONT-Agro	fosc
Hivern	25-30	40-50	5', diari	natural	SONT-Agro si núvol	SONT-Agro	fosc

*Solució de fertirrigació Jonson i col. 1957

2. Plasmidis, oligonucleòtids i construccions

2.1. Plasmidis

- **pGEM-Teasy**: plasmidi utilitzat per al clonatge de productes de PCR (Promega, Amp^R).
- **pTZR-TA**: plasmidi utilitzat per al clonatge de productes de PCR (Fermentas, Amp^R).
- **pCRII-TOPO TA** i **pCR 2.1-TOPO TA**: plasmidis utilitzats per al clonatge de productes de PCR (Invitrogen, Amp^R).
- **pET28A, B i C**: plasmidis per a l'expressió de proteïnes recombinants amb fusió a una cua d'His (His-tag) i un T7 tag en N-terminal de la fusió (Novagen, Kan^R).
- **pGEX (2TK, 4T2 i 4T3)**: plasmidis per a l'expressió de proteïnes recombinants amb fusió a GST en N-terminal de la fusió (Pharmacia, Amp^R).
- **pUC18**: plasmidi bàsic usat en etapes intermèdies de clonatge (New England Biolabs, Amp^R).

2.2. Oligonucleòtids

A les taules següents es descriuen els oligonucleòtids utilitzats en la realització d'aquest treball experimental.

Taula I. Taula d'oligonucleòtids utilitzats en reaccions de PCR.

NOM	SEQÜÈNCIA (5'-3')	LONG.	TM (°C)	DIRECCIÓ
T7 universal	GTAATACGACTCACTATAGGG	21 bases	52	
SP6 universal	ATTTAGGTGACACTATAGAATACT	23 bases	62	
Clonatge PBF				
EG1	GGATCCATGAGCATCAACAAACATATG	27 bases	57	sentit
EG2	CTCGAGTCATTATTGTCCCTTGTGTT	27 bases	57	antisentit
PM 34	GCTCAATTGCTAGAGCTAGC	20 bases	52	antisentit
JVC1	CCCGGGATGGAGGAAGTGTTCGTC	26 bases	63	sentit
JVC2	GGATCCAGGGCGTTTGGGCTTGCG	24 bases	64	antisentit
RT1	AGCACTGCAGCAACATCAAC	20 bases	52	sentit
RT2	TTCCCTAATGTGCTCCCAAC	20 bases	52	sentit
RT3	ACAAGGCCATCATGAAGAGCA	21 bases	52	antisentit
Clonatge γ-zeïna				
o MT1	TCATGAGGGTGTGCTCGTTGCCCTC	26 bases	63	sentit
o MT3	CCATGGTCCGGGGCGTTGAGTAGGGTA	28 bases	67	antisentit
Clonatge GAMYB				
o myb 2	ATGTATCGGGTGAAGAGCGAG	21 bases	60	sentit
o myb 3	GCATCAGGCCTCAAGTTTTCAGG	23 bases	62	antisentit
o myb race 1	CCACTTGTTCCTCCATCTTGG	20 bases	59	antisentit
o myb race 2	CAGAAGAACACCGGGCTGTTC	21 bases	62	antisentit
o myb 3' end	TGCATGAAGATAAACCGG	18 bases	54	antisentit
o seq myb	GTATACTGTGGCTCCTGC	18 bases	56	sentit
Clonatge FUSCA3				
o fus for	ATGGCCGGCATTACCAAG	18 bases	53	sentit
o fus rev	CTCACATCTGAGGCCCGG	18 bases	53	antisentit
o fus for alt	TGCATGCATGACTTGCTAAA	20 bases	50	sentit
o fus rev alt	TCTGCCCGGATCTAACATCT	20 bases	51	antisentit
3' RACE				
Gene Racer 3'	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T) ₂₀	56 bases	68	
Gene Racer 3' nested	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T) ₂₀	43 bases	59	

Taula II. Taula d'oligonucleòtids utilitzats en assaigs de tipus EMSA.

NOM	SEQÜÈNCIA (5'-3')	LONG.	TM(°C)	DIRECCIÓ
EMSA				
AACA for	TGGCAATCAAACAAATCCTCTCTGTG	26 bases	60	sentit
AACA rev	TGGCACAGAGAGGATTTGTTTGATTG	26 bases	60	antisentit
gACA for	TGGCAATCAGACAAGTCCTCTCTGTG	26 bases	60	sentit
gACA rev	TGGCACAGAGAGGACTTGTCTGATTG	26 bases	60	antisentit
AACA wt for	TGGCAATCAAACAAATCCTCTCTGTGTGCAAAGAAACACGGTGAGTCATGCCGAGA	56 bases	85	sentit
AACA Pb for	TGGCAATCAAACAAATCCTCTCTGTGTTACAAGAAACACGGTGAGTCATGCCGAGA	56 bases	83	sentit
gACA wt for	TGGCAATCAGACAAGTCCTCTCTGTGTGCAAAGAAACACGGTGAGTCATGCCGAGA	56 bases	85	sentit
gACA Pb for	TGGCAATCAGACAAGTCCTCTCTGTGTTACAAGAAACACGGTGAGTCATGCCGAGA	56 bases	83	sentit
AACA wt rev	TGGTCTCGGCATGACTCACCGTGTTTCTTTGCACACAGAGAGGATTTGTTTGATTG	56 bases	84	antisentit
AACA Pb rev	TGGTCTCGGCATGACTCACCGTGTTTCTTGTAAACACAGAGAGGATTTGTTTGATTG	56 bases	82	antisentit
gACA wt rev	TGGTCTCGGCATGACTCACCGTGTTTCTTTGCACACAGAGAGGACTTGTCTGATTG	56 bases	84	antisentit
gACA Pb rev	TGGTCTCGGCATGACTCACCGTGTTTCTTGTAAACACAGAGAGGACTTGTCTGATTG	56 bases	82	antisentit
RY for	TGGACGGTGAGTCATGCCGAGATCA	25 bases	66	sentit
RY rev	TGGTGATCTCGGCATGACTCACCGT	25 bases	65	antisentit
RY mut for	TGGACGGTGAGTGTACCCGAGATCA	25 bases	63	sentit
RY mut rev	TGGTGATCTCGGGTACTCACCGT	25 bases	62	antisentit

2.3. Construccions

A continuació es representen els mapes de restricció de les construccions utilitzades en aquest treball, en els que s'han indicat els gens, promotors, terminadors, gens de resistència i tags de purificació. Així mateix, s'assenyalen les dianes de restricció corresponents als enzims més usuals i les etapes seguides en el procés de clonatge.

2.3.1. Vectors per a expressió transitòria en planta

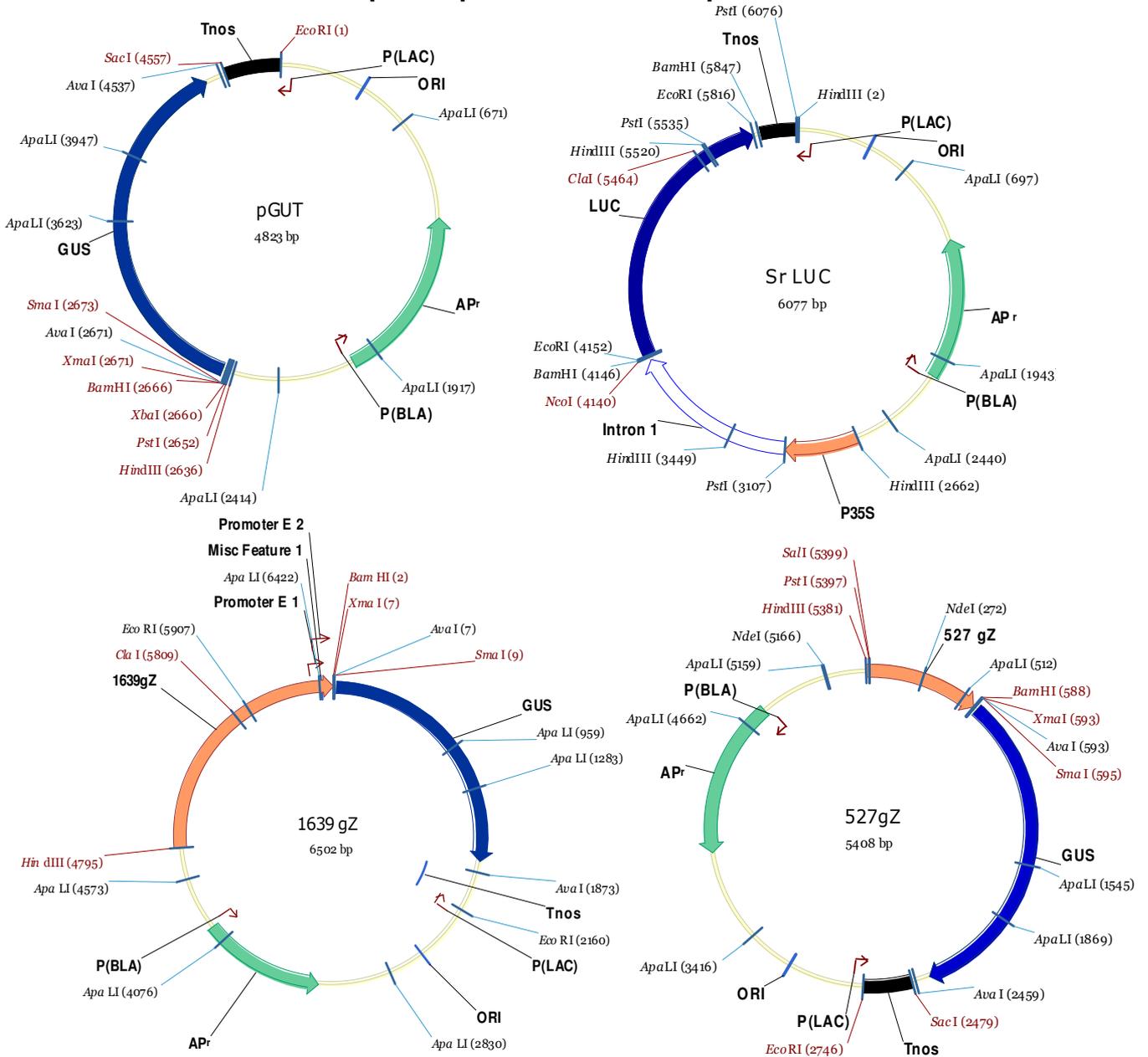


Figura 26:
SrLUC

Vector derivat del pUC18 en el que el gen de la luciferasa es troba clonat en un cassat d'expressió format pel promotor 35S del Virus del Mosaic de la Col-i-flor (CaMV), el primer intró del gen *Shrunken* de blat de moro i el terminador del gen de la nopalina sintasa (3' nos) (Torrent i col., 1997).

pGUT

Plasmidi derivat del pUC18 que conté el gen informador GUS i el terminador nos de la construcció pBI 101.1 (Jefferson i col., 1987) clonat en BamHI (Marzábal i col., 1998).

1639 gZ

Plasmidi que conté la regió compresa entre -1639/+61 del promotor γ Z (Torrent i col., 1997) clonada al plasmidi pGUT (Marzábal i col., 1998).

527 gZ

Plasmidi que conté la regió compresa entre -527/+61 del promotor γ Z clonada al plasmidi pGUT (Marzábal i col., 1998).

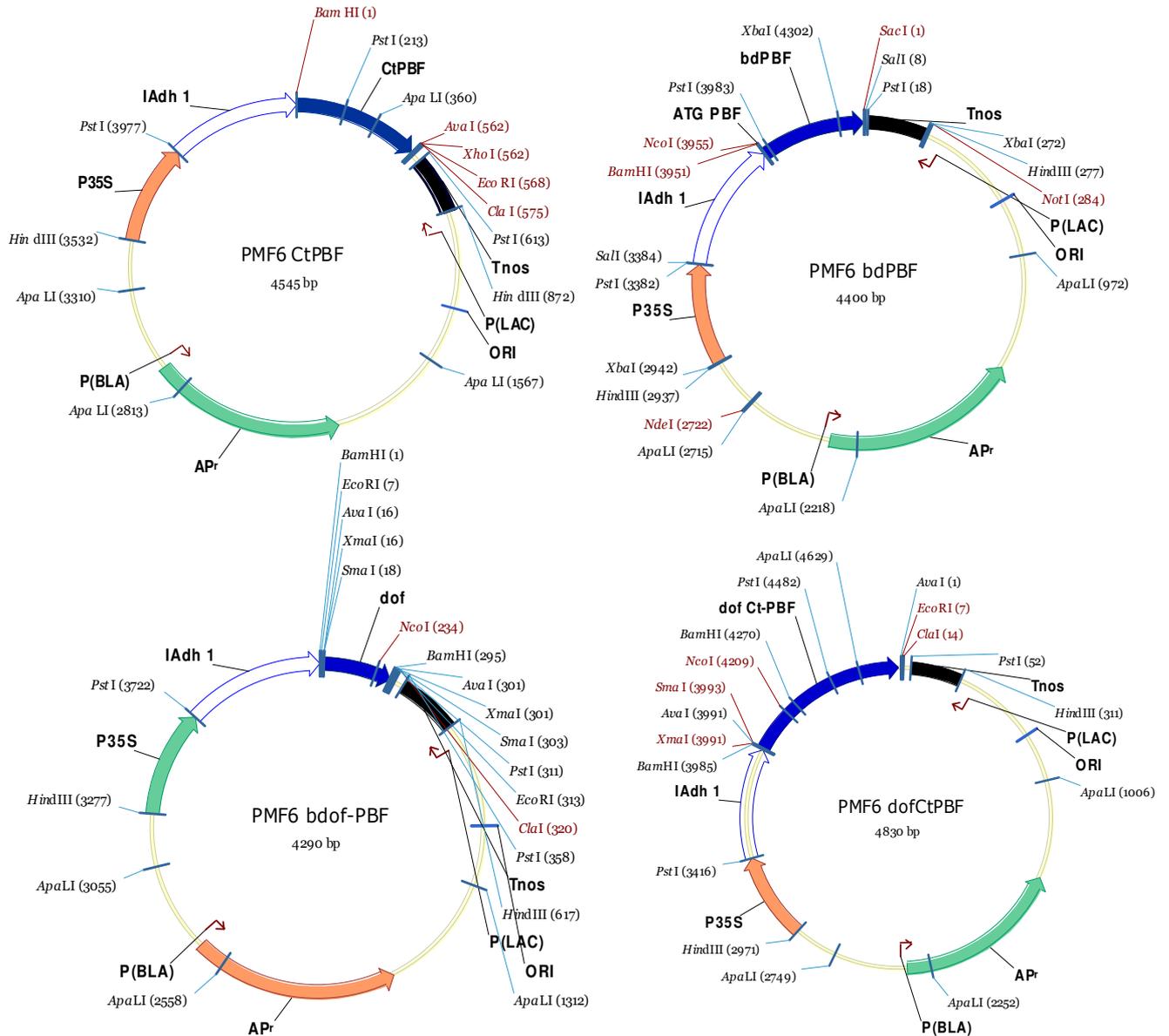


Figura 28:

PMF6-bdPBF

Plasmidi que conté el fragment N-terminal de mPBF, que es va obtenir per digestió BamHI-SacI a partir de pET28A bdPBF (veure figura 30) i es va clonar en el vector PMF6 per les mateixes dianes.

PMF6-CtPBF

Plasmidi que conté el fragment C-terminal de mPBF, que es va obtenir per digestió BamHI-XhoI a partir de pET28A CtPBF (veure figura 29) i es va clonar en el vector PMF6 per les mateixes dianes.

PMF6-dofCtPBF

Plasmidi que conté el gen quimèric dofCtPBF, que es va obtenir per digestió SmaI-XhoI a partir de pET28A dofCtPBF (veure figura 30) i es va clonar en el vector PMF6 digerit per les mateixes dianes.

PMF6-bdofPBF

Plasmidi que conté la regió N-terminal de la PBF d'ordi (bPBF), que es va obtenir per digestió BamHI a partir de de pET28A dofCtPBF (veure figura 30) i es va clonar en el vector PMF6 digerit per les mateixes dianes.

2.3.2. Vectors d'expressió a *E.coli*

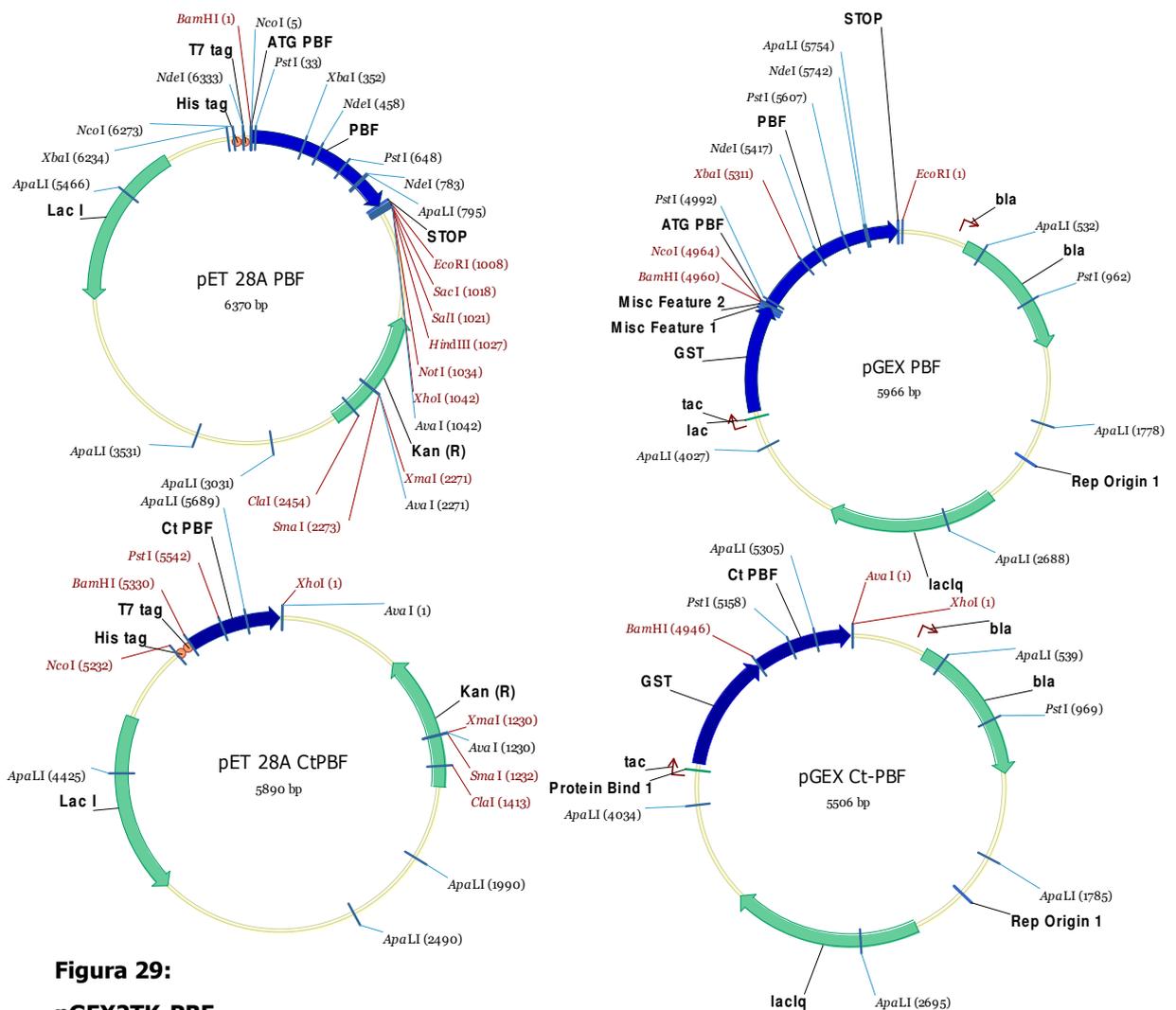


Figura 29:

pGEX2TK-PBF

Plasmidi que conté el gen *ZmPBF* (Vicente-Carbajosa i col., 1997) clonat per EcoRI-BamHI al vector pGEX2TK (Amp^R, Pharmacia), generosament subministrat pel Dr. Jesús Vicente-Carbajosa (Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biotecnología, ETS Ingenieros Agrónomos, UPM, Madrid). La mPBF es troba en la mateixa pauta de lectura que la GST.

pET28A-PBF

A partir del vector pGEX2TK-PBF es va obtenir la PBF per digestió amb BamHI i NcoI. Aquest fragment es va clonar al vector pET28A (Kan^R, Novagen), digerit amb els mateixos enzims de restricció. La mPBF es troba en pauta de lectura amb un His-tag i un T7-tag en N-terminal.

pET28A-CtPBF

A partir del vector pET28A-PBF es va amplificar per PCR la regió C-terminal de la proteïna de fusió (Histag-T7tag-PBF) utilitzant els oligonucleòtids EG1 i EG2. Aquest fragment va ser digerit per BamHI i XhoI i es va clonar al vector pET28A (Kan^R, Novagen), digerit pels mateixos enzims. El clon C-terminal de mPBF queda en pauta de lectura amb un His-tag i un T7-tag en N-terminal.

pGEX4T3-CtPBF

A partir del vector pET28A-PBF es va amplificar per PCR la regió C-terminal de la proteïna de fusió (Histag-T7tag-PBF) utilitzant els oligonucleòtids EG1 i EG2. Aquest fragment va ser digerit per BamHI i XhoI i es va clonar al vector pGEX4T3 (Amp^R, Pharmacia), digerit pels mateixos enzims. El clon C-terminal de PBF queda en pauta de lectura amb la GST.

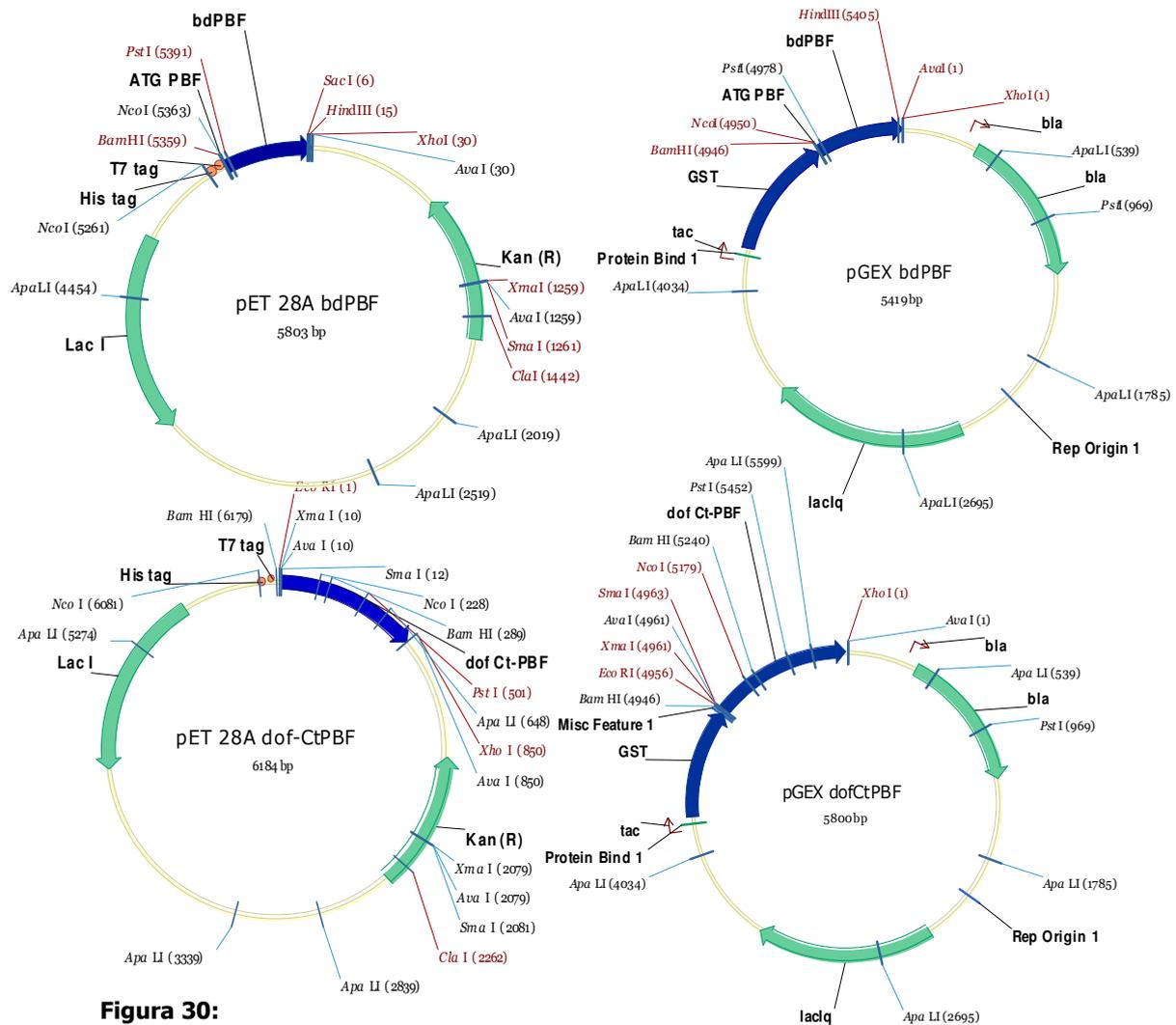


Figura 30:

pET28A-bdPBF

A partir del vector pET28A-PBF es va amplificar per PCR la regió N-terminal de la proteïna de fusió (Histag-T7tag-Domini DOF) utilitzant els oligonucleòtids T7 i PM34. Aquest fragment es va digerir per BamHI-SacI i es va clonar al vector pET28A (Kan^R, Novagen), digerit pels mateixos enzims. El clon N-terminal de mPBF queda en pauta de lectura amb un His-tag i un T7-tag en N-terminal.

pGEX4T3-bdPBF

A partir del vector pET28A-bdPBF es va obtenir bdPBF per digestió amb BamHI i XhoI. Aquest fragment es va clonar al vector pGEX4T3 (Amp^R, Pharmacia), digerit pels mateixos enzims. El clon N-terminal PBF queda en pauta de lectura amb la GST.

pET28A-dofCtPBF

Plasmidi que conté el gen quimèric dofCtPBF, que es va obtenir per fusió transcripcional de la regió N-terminal de la PBF d'ordi (bPBF) a la regió C-terminal de la PBF de blat de moro (mPBF) i es va clonar per SmaI-XhoI en el vector pET28A (Kan^R, Novagen), digerit per les mateixes dianes. El clon dofCt-PBF queda en pauta de lectura amb un His-tag i un T7-tag en N-terminal.

pGEX4T2-dofCtPBF

A partir del vector pET28A-dofCtPBF es va obtenir dofCtPBF per digestió amb SmaI i XhoI. Aquest fragment es va clonar al vector pGEX4T2 (Amp^R, Pharmacia), digerit pels mateixos enzims. El clon dofCtPBF queda en pauta de lectura amb la GST.

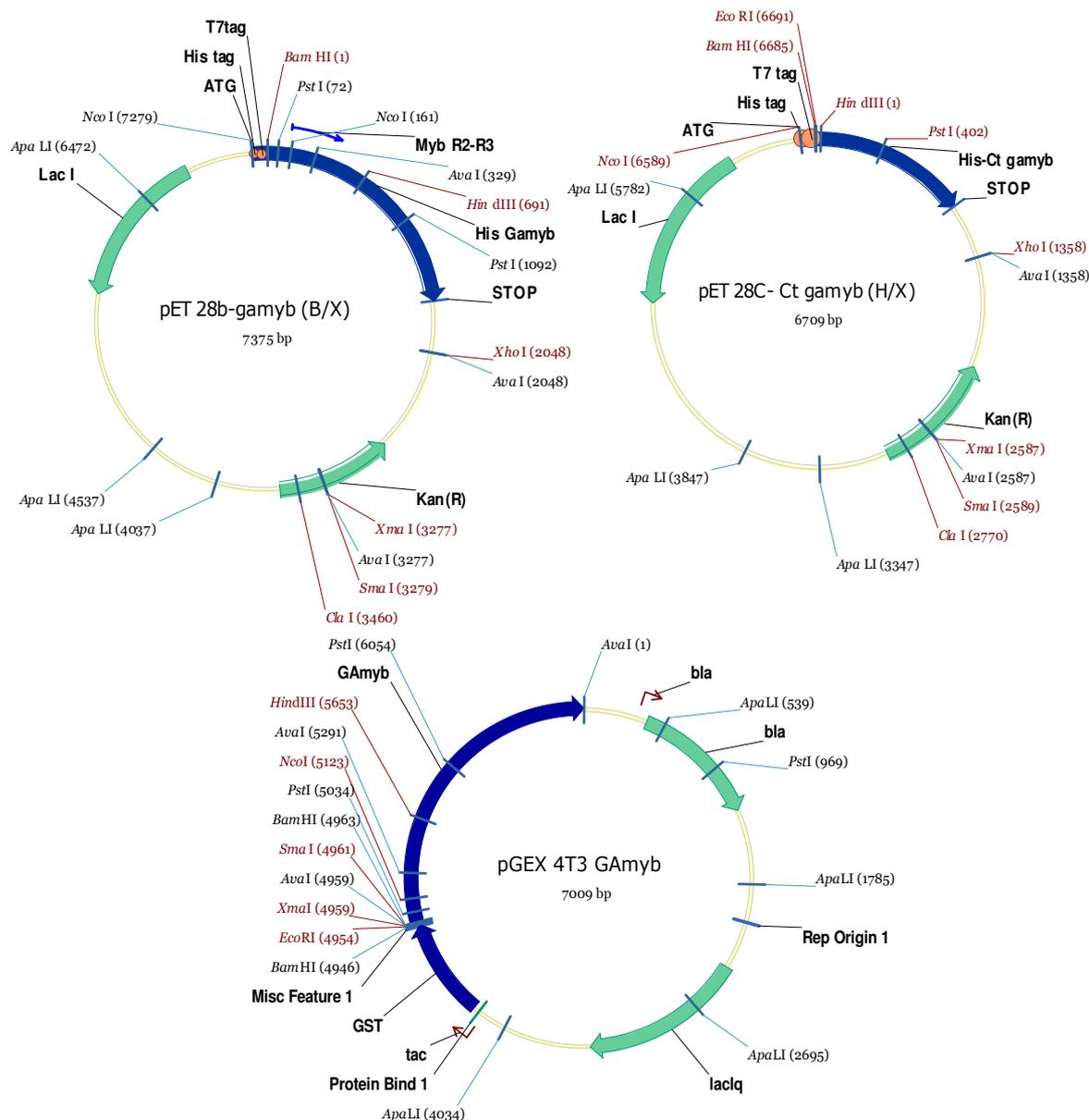


Figura 31:

pET28B-GAMYB

Plasmidi que conté el gen GAMYB de blat de moro (*ZmGAMYB*) clonat per BamHI-XhoI del vector pET28B (Kan^R, Novagen). mGAMYB queda en pauta amb un His-tag i un T7 tag en N-terminal.

pET28C-Ctmyb

La regió C-terminal de GAMYB es va obtenir per digestió HindIII-XhoI a partir de pET28B-GAMYB i es va clonar en el vector pET28C (Kan^R, Novagen) digerit per les mateixes dianes. El C-terminal de mGAMYB queda en pauta amb un His-tag i un T7 tag.

pGEX 4T3-GAMYB

Plasmidi que conté el gen GAMYB de blat de moro clonat per SmaI-HindIII del vector pGEX-4T3 (Amp^R, Pharmacia). mGAMYB queda en pauta de lectura amb la GST.

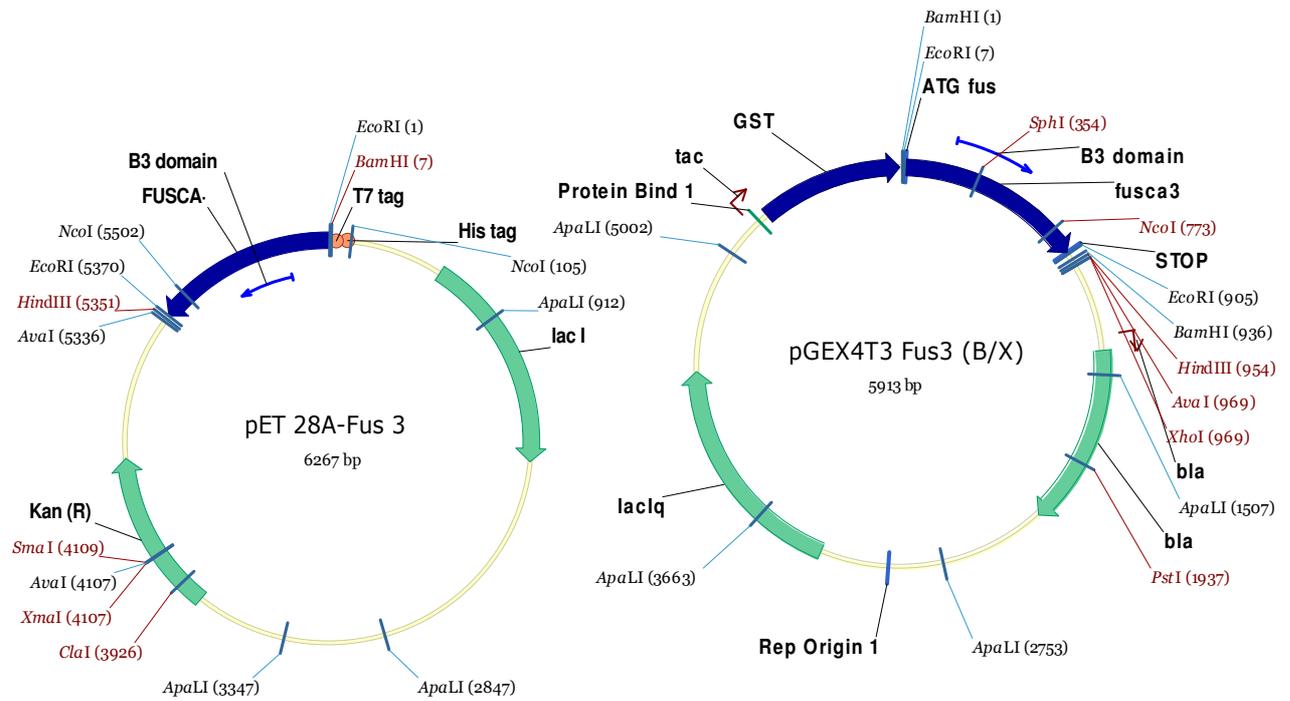


Figura 32:

pET28A-FUSCA3

Plasmidi que conté el gen FUSCA3 de blat de moro (*ZmFUSCA3*) clonat per EcoRI del vector pET28A (Kan^R, Novagen). *ZmFUSCA3* queda en pauta amb un His-tag i un T7 tag en N-terminal.

pGEX 4T3-FUSCA3

A partir del vector pET28A-FUSCA3 es va obtenir *ZmFUSCA3* per digestió amb BamHI i XhoI. Aquest fragment es va clonar al vector pGEX 4T3 (Amp^R, Pharmacia), digerit pels mateixos enzims. *ZmFUSCA3* queda en pauta de lectura amb la GST.

2.3.3. Altres vectors

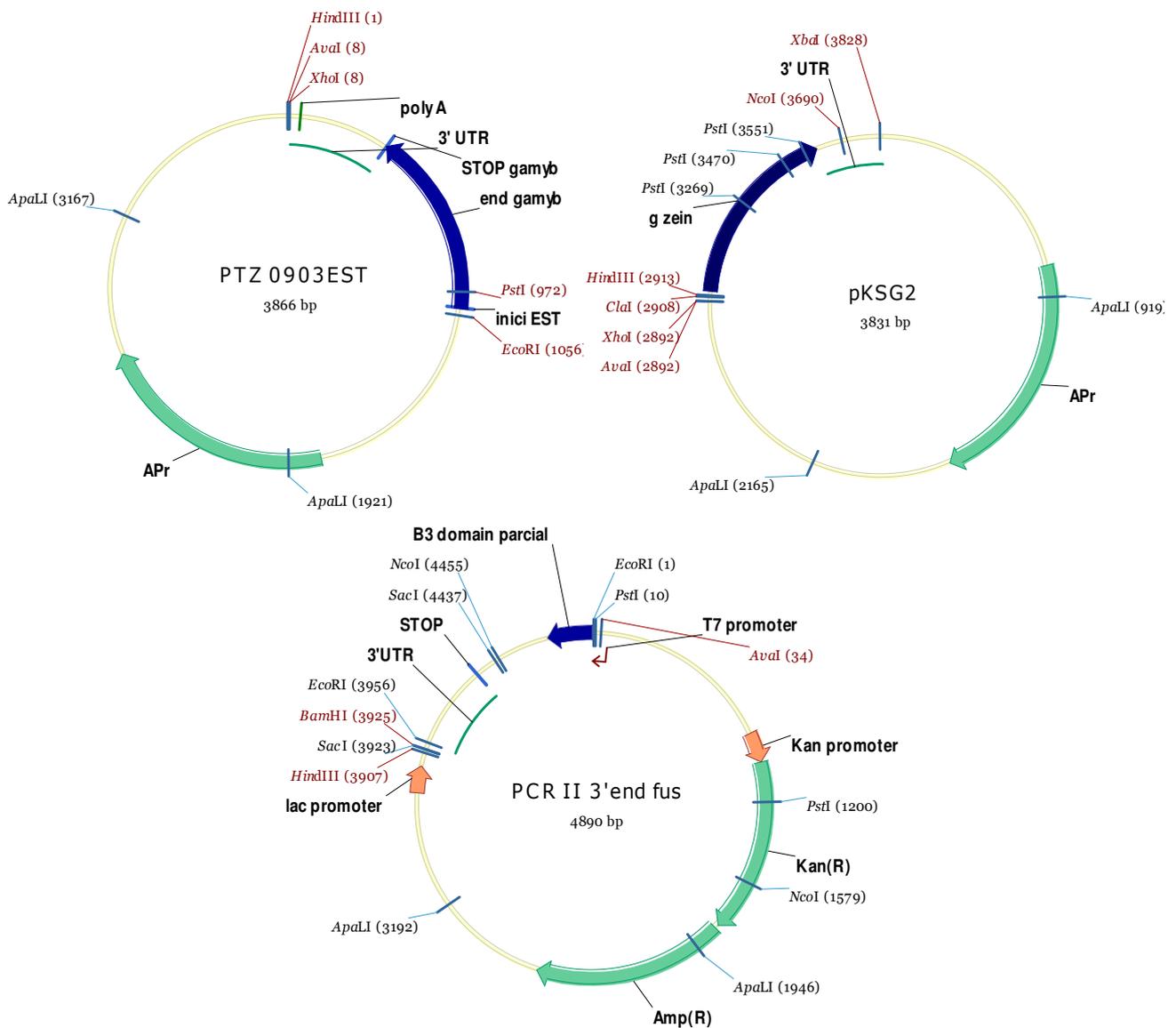


Figura 33:

pTZ 0903 EST

Plasmidi que conté la EST 0903 de GAMYB de blat de moro, generosament subministrada per la Dra. Sheila McCormick (Plant Gene Expression Center, Albany, Califòrnia, USA) clonada per EcoRI-XhoI en el vector pTZR.

pBS KSG2

Plasmidi que conté el gen de la γ -zeïna de blat de moro clonat en el vector pBS KS (Torrent i col., 1994).

pCRII 3'end fus

Plasmidi que conté l'extrem C-terminal de ZmFUSCA3 i la regió 3' no traduïda del gen *ZmFUSCA3*, obtingut per RT-PCR amb els oligos ofus for alt i Gene Racer 3' i clonat en el vector PCRII-TOPO.

3. Anticossos

En aquest treball s'han utilitzat els següents anticossos:

- α -bdPBF, anticòs policlonal produït en conill contra el domini d'unió al DNA de PBF (Marzábal, 2002).
- α -myb, anticòs policlonal produït en conill i obtingut al laboratori contra la proteïna recombinant His-Ctmyb.
- α -fus, anticòs policlonal produït en conill i obtingut al laboratori contra la proteïna recombinant His-FUSCA3.
- α -T7 tag, anticòs monoclonal contra T7 tag (Novagen).
- α -His tag, anticòs monoclonal contra His tag (Novagen).
- Goat anti-GST antibody, anticòs produït en cabra contra GST (Amersham).
- Donkey anti rabbit immunoglobulins, HRP- conjugated (Amersham).
- Donkey anti mouse immunoglobulins, HRP- conjugated (Amersham).
- Rabbit anti goat immunoglobulins, HRP- conjugated (DAKO).
- Ab Alexa Fluor[®]488 F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes).

4. Medis de cultiu

En aquest apartat es descriuen els medis de cultiu emprats en més d'un protocol. Els medis específics emprats en una sola tècnica es descriuen amb la metodologia corresponent.

4.1. Bacteris

Medi LB (Luria Bertani medium): 1% bacteriotripton (Pronadisa)
0,5% extracte de llevat (Pronadisa)
1% NaCl
pH 7,5 amb NaOH
Autoclavar.

Per preparar medi sòlid: addicionar 15 g d'agar (Pronadisa)/L medi LB, autoclavar i plaquejar.

4.2. Plantes

Medi MS (Murashige Skoog medium): 4,07 g / L medi MS (Duchefa)
pH 5,7 amb KOH 100 mM
Autoclavar i guardar a 4°C.

5. Tampons i solucions

En aquest apartat es detalla la composició dels tampons i solucions emprats en més d'un protocol.

5.1. Relacionats amb les proteïnes:

Inhibidors de proteases: 1 mM PMSF
10 μ g/mL Aprotinina
50 μ g/mL Leupeptina
1 μ g/mL Pepstatina A
10 μ g/mL E-64.

Tampó de càrrega 2X: 125 mM Tris·HCl, pH 6,8
20% glicerol
4% SDS
0,04% Blau de bromofenol
10% β -mercaptoetanol.

PBS 1X: 125 mM NaCl
16 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
8,4 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Filtrar.

5.2. Relacionats amb els àcids nucleics.

Tampó de càrrega 6X: 30% glicerol
(gels no desnaturalitzants) 0,25% xilencianol FF
0,25% blau de bromofenol, en TE 1x, pH 7,4.

SSC 20X: 3 M NaCl
0,3 M citrat trisòdic.

MEN 10X: 200 mM MOPS
50 mM acetat de sodi
10 mM EDTA, pH 7 amb HCl.

TBE 10X: 89 mM Tris
89 mM àcid bòric
20 mM EDTA, pH 8.

TE 1X: 25 mM Tris·HCl, pH 8
10 mM EDTA, pH 8.

Tampó fosfat: 1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7,2 amb NaOH 10N.

B. Mètodes

Les tècniques de manipulació i anàlisi d'àcids nucleics i proteïnes s'han realitzat seguint els manuals *Molecular Cloning: A laboratory manual* (Sambrook, 1989) i *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel i col., 1998). Els mètodes que es descriuen a continuació corresponen a tècniques que s'han posat a punt en el decurs d'aquest treball o bé a aquelles que resulten d'especial interès per a l'obtenció dels resultats que es presenten.

1. Assaigs d'activitat transcripcional. Transformació d'endospermes de blat de moro per biolística

1.1. Preparació de l'estoc de partícules d'or

- Pesar a la balança de precisió 60 mg de partícules d'or (1 µm, BioRad).
- Afegir 1 mL d'etanol absolut⁽¹⁾ i agitar al vòrtex durant 10 min. Deixar reposar i, a continuació, centrifugar a 10.000 rpm durant 1 minut i descartar el sobrenedant.
- Afegir 1 mL de H₂O estèril i agitar vigorosament al vòrtex durant 1 min. Deixar reposar i, a continuació, centrifugar a 10.000 rpm durant 1 minut i descartar el sobrenedant. Repetir aquest pas 3 cops més.
- Resuspendre les partícules en 1 mL de glicerol 50% estèril agitant vigorosament al vòrtex. Aquest estoc de partícules es pot guardar a 4°C aproximadament durant 1 mes, ja que a partir d'aquest període les partícules tendeixen a agregar-se.

⁽¹⁾ És important que l'etanol emprat durant tot el procés de preparació de les partícules d'or no estigui hidratat per evitar-ne l'agregació. Per aquest motiu s'ha d'emprar Etanol per HPLC (Scharlau®) al·lucotat en tubs de 15 mL, ben tancats i mantinguts en un dessecador.

1.2. Esterilització i dissecció de grans de blat de moro

En tots els experiments de transformació per biolística descrits en el present treball es van utilitzar grans de blat de moro (*Zea mays*) de la varietat W64A+/+. En tots els casos, prèviament a la dissecció dels teixits, es va procedir a l'esterilització de les panotxes de blat de moro:

- Submergir la panotxa en solució d'esterilització i mantenir-la en agitació durant 5 min.
- Eliminar la solució d'esterilització esbandint diverses vegades amb abundant H₂O estèril. Mantenir la base de la panotxa en contacte amb H₂O estèril per evitar que s'assequi.

A partir d'aquest moment i durant tot el procés de dissecció i transformació es treballa en les màximes condicions d'esterilitat possibles:

- Desgranar la panotxa i extreure el pericarp de cada gra amb l'ajuda de pinces i bisturí prèviament esterilitzats a la flama d'un encenedor *Bunsen*. És important que els grans mantinguin el peduncle per facilitar les posteriors etapes de la dissecció. A partir d'aquest moment cal mantenir els grans de blat de moro en contacte amb el medi MS.
- Sota la lupa i amb l'ajuda d'unes pinces eliminar la capa corresponent a l'aleurona i la nucel·la de forma que l'endosperma quedi exposat a l'exterior.
- Just abans de realitzar la transformació, practicar una secció tangencial de l'endosperma sobre la cara oposada a on es trobava l'embrió (casquet). Per no malmetre el teixit és preferible utilitzar

una fulla d'afaitar esterilitzada a la flama i no pas un bisturí. De 6 a 9 dels casquets així obtinguts es disposen en cercle en una placa de Petri sobre un paper de filtre estèril humitejat amb medi MS (veure figura 34).

- **Solució d'esterilització (per blat de moro):** 20% hipoclorit sòdic, 0,02% Triton X-100.

1.3. Precipitació del DNA sobre les partícules d'or

- Realitzar alíquotes de 15 μL de la suspensió de partícules d'or, mantenint l'estoc contínuament en agitació per evitar-ne la sedimentació. Posteriorment, per desfer els possibles agregats de partícules d'or, incubar durant 3 min. en un bany d'ultrasons.
- Dipositar les dilucions dels diferents DNA a la paret d'un tub de 1,5 mL de forma que no entrin en contacte amb les partícules d'or fins haver afegit tots els DNAs a transformar (control de transformació, informador, efector...). Totes les construccions a transformar han d'estar a una concentració de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ i la seva integritat verificada mitjançant un gel d'agarosa a l'1%. A la taula següent s'esquematisen les proporcions de cada construcció utilitzades segons el tipus d'assaig:

<i>DNA</i>	<i>$\mu\text{L}(\mu\text{g})$</i>
<i>Control de transformació*</i>	2(1)
<i>Informador**</i>	4(2)
<i>Efector**</i>	4(2)

* Si l'activitat transcripcional es determina per tinció histoquímica no és necessari incloure el control de transformació.

** Si es vol variar la quantitat d'alguna d'aquestes construccions (per ex. per realitzar una corba dosi-resposta), és important mantenir sempre la mateixa concentració total de DNA. Així, l'addició d'una quantitat de DNA inferior a la indicada s'haurà de compensar amb la corresponent quantitat d'un DNA inert.

- Mantenint l'agitació al vòrtex afegir en aquest ordre: 50 μL de CaCl_2 2,5 M i 20 μL d'espermidina 100 mM. Mantenir l'agitació al vòrtex durant 30 seg. més i després deixar reposar en gel durant 30 min.
- Fer un toc de centrífuga a 3000 rpm durant 8 seg. i descartar el sobrenedant.
- Resuspendre les partícules d'or amb 500 μL d'etanol absolut per HPLC fred. Agitar al vòrtex durant 30 seg. per desfer els possibles agregats que s'hagin format i deixar reposar en gel durant 15 min. A continuació, centrifugar a 3000 rpm durant 8 seg. i descartar el sobrenedant.
- Repetir el pas anterior afegint primer 200 i després 30 μL d'etanol absolut per HPLC fred.

1.4. Transformació d'endospermes de blat de moro

En la transformació per a l'expressió transitòria d'endospermes de blat de moro es va utilitzar la pistola de partícules PDS-1000/He (BioRad®).

- Eliminar 15 μL d'etanol de les partícules d'or sobre les que s'ha precipitat el DNA i incubar breument en un bany d'ultrasons fins que les partícules s'hagin resuspès. És important no excedir-se per evitar la fragmentació del DNA.
- Agitar al vòrtex i, a continuació, repartir el contingut de cada tub en dues membranes de DNA (*Macrocarriers*) de manera que les partícules difonguin de la manera més uniforme possible des

del centre de la membrana. Un cop evaporat completament l'etanol es passa a la transformació del material vegetal seguint les condicions indicades a la figura 34.

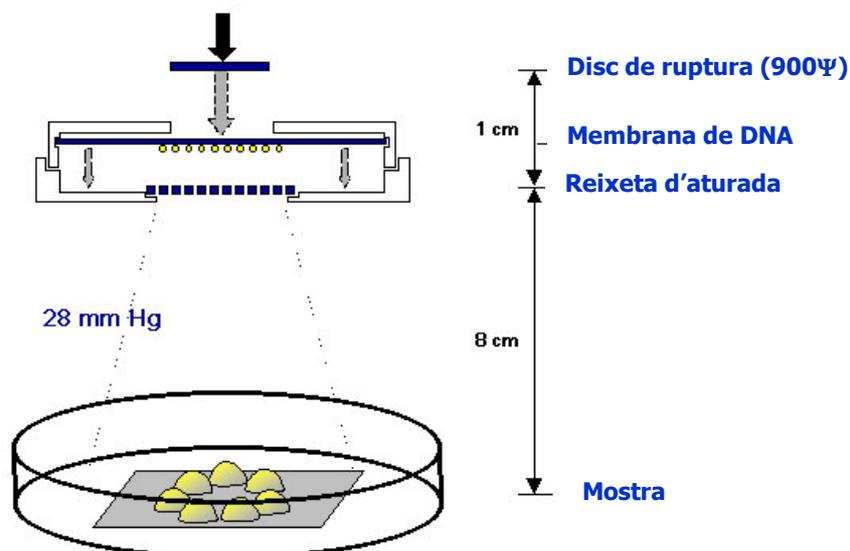


Figura 34. Transformació per a expressió transitòria per biolística. Esquema del dispositiu utilitzat en els assaigs de transformació d'endospermes de blat de moro per a expressió transitòria, en el que s'indiquen els paràmetres utilitzats. Les mostres van ser bombardejades de forma consecutiva amb dues membranes de DNA sota unes condicions de buit de 28 mm Hg.

Després de la transformació, afegir una o dues gotes de medi MS per preservar la humitat i incubar a la foscor a 26°C. Al cap de 24 hores processar les mostres segons el tipus d'anàlisi a realitzar:

- ❖ **QUANTIFICACIÓ DE L'ACTIVITAT LUCIFERASA (LUC) I GLUCURONIDASA (GUS) PER LUMINOMETRIA I FLUORIMETRIA:** Congelar en nitrogen líquid agrupant els endospermes de 2 en 2 i guardar a -80°C.
- ❖ **DETERMINACIÓ HISTOQUÍMICA DE L'ACTIVITAT GUS:** Per preservar al màxim la integritat dels diferents teixits que constitueixen el gra de blat de moro és necessari processar les mostres immediatament.

1.5. Quantificació de les activitats luciferasa i glucuronidasa per luminometria i fluorimetria

Les activitats luciferasa i glucuronidasa van ser determinades principalment per luminometria ja que és una metodologia més sensible que la fluorimetria, tot i que en el present treball experimental es va posar a punt també la detecció fluorimètrica. Ambdós tipus de mesura van ser realitzades sobre el mateix extracte. Dels dos assaigs enzimàtics a realitzar, és preferible començar per l'activitat luciferasa ja que és la més inestable. Es va comprovar que l'activitat de les mostres mantingudes en gel davallava a partir dels 30 min. des de la seva descongelació.

Les mesures van ser realitzades en un lector de plaques multicanal *Victor*³ per luminometria i fluorimetria (*Wallac 1420 multilabel counter*, Perkin Elmer).

Els resultats es van expressar en unitats arbitràries GUS/LUC, usant l'activitat luciferasa com a control intern de transformació.

Com ens interessava estudiar la capacitat efectora relativa dels factors de transcripció estudiats sobre el promotor del gen de la γ -zeïna, els valors GUS/LUC obtinguts es van processar com a valors relatius

d'activació (o repressió) front l'activitat basal del promotor γZ . D'aquesta manera no resulta imprescindible normalitzar la quantitat de proteïna present ens els extractes usats en els assaigs luciferasa i glucuronidasa.

1.5.1. Activitat luciferasa

L'activitat luciferasa es va determinar utilitzant el kit *Luciferase Assay System* de Promega.

- Atès que la reacció depèn de la temperatura, cal atemperar prèviament el *Luciferase Assay Reagent* reconstituït segons les instruccions del Kit. Una cop atemperat, afegim 100 μL d'aquest reactiu als pouets d'una placa de 96 pous blanca (NUNC) compatible amb el lector multicanal *Victor³* (*Wallac 1420 multilabel counter*, Perkin Elmer).
- Treure els tubs de 1,5 mL (que contenen 2 casquets d'endosperma cadascun d'ells) del congelador de -80°C i posar-los ràpidament en gel. Un a un, anar afegint tampó de lisi x1 (130 $\mu\text{L}/2$ endospermes) i macerar el teixit amb un homogeneïtzador (*Eurostar basic*, IKA Labortechnik). Les mostres s'han de mantenir en gel per no perdre l'activitat luciferasa.
- Un cop homogeneïtzades totes les mostres, centrifugar a 13.000 rpm durant 5 min. a 4°C . A continuació, recollir el sobrenedant (125 μL aproximadament), transvasar-lo a un nou tub. Repetir el procés (ara recollint 100 μL aproximadament) per evitar l'aspiració del sediment o dels lípids que floten a la superfície del tub, ja que poden interferir en la lectura.
- Per a cadascuna de les mostres afegir 10 μL de l'extracte a un pouet que contingui 100 μL del *Luciferase Assay Reagent* i mesclar.
- Determinar immediatament l'activitat luciferasa per luminometria, mesurant la quantitat de llum emesa per la reacció entre els 4 i els 14 segons.
- En acabar de mesurar totes les mostres, congelar a -80°C fins realitzar la quantificació de l'activitat glucuronidasa.
- **Tampó de lisi 5X:** 125 mM Tris, pH 7,8 (ajustat amb H_3PO_4)
 10 mM CDTA
 10 mM DTT
 5% Triton X-100
 50% glicerol
 Guardar a -20°C .

1.5.2. Activitat glucuronidasa per luminometria

L'activitat GUS va ser determinada per luminometria, utilitzant el kit *GUS-LightTM* (Tropix).

- Preparar el tampó de reacció GUS dissolent 1/100 el substrat de la reacció *GlucuronTM* en *GUS Reaction Buffer Diluent*. Abans de descongelar les mostres cal atemperar aquest tampó, així com el *GUS accelerator buffer*.
- Cada 30 seg. mesclar en tubs de 1,5 mL 20 μL d'extracte (veure activitat luciferasa) i 180 μL de tampó de reacció GUS.
- Al cap d'una hora afegir 300 μL de *GUS accelerator buffer* i mesclar lleugerament.
- Carregar 200 μL de la mescla als pouets d'una placa de 96 pous blanca (NUNC) compatible amb el lector multicanal *Victor³* i realitzar les lectures per luminometria.

1.5.3. Activitat glucuronidasa per fluorimetria

L'anàlisi de l'activitat GUS per fluorimetria es va realitzar seguint l'assaig fluorimètric descrit per Jefferson (1987b). L'assaig es basa en la detecció del producte fluorescent metilumbel·liferona (MU), generat a partir del substrat àcid metilumbel·liferil- β -glucurònid (MUG) per acció de la β -glucuronidasa (Jefferson, 1987a).

- Preparar el tampó d'assaig GUS i mesclar-ne 500 μ L amb 20 μ L d'extracte (veure activitat luciferasa).
- Ràpidament repartir 200 μ L de la mescla de reacció en 2 pouets d'una placa de 96 pous negra (NUNC) i iniciar les lectures al fluorímetre (*Wallac 1420 multilabel counter*, Perkin Elmer).
- Realitzar mesures cada mitja hora, durant 9 h.
- Calcular la velocitat d'aparició de MU (Δ fluorescència/ Δ temps) com a mesura de l'activitat GUS. Atès que els valors finals s'expressaran en unitats arbitràries GUS/LUC no és imprescindible realitzar una corba patró amb MU.
- **Tampó d'assaig GUS:** 10 mM MUG
75% (v/v) tampó de lisi 1X
25% (v/v) metanol.

1.6. Detecció de l'activitat glucuronidasa per tinció histoquímica

L'expressió de la β -glucuronidasa pot ser determinada per tinció histoquímica com es descriu a Jefferson (1987a).

- Sotmetre les mostres al buit en un dessecador durant 5 min.
- Mantenir els teixits vegetals (en el nostre cas, casquets d'endosperma de grans de blat de moro) de 2 a 24h a 37°C en incubació amb tampó X-Gluc.
- Per augmentar el contrast, s'extreu l'excés de tinció mitjançant rentats successius amb etanol 70%.
- Després de la tinció, transferir les mostres a una solució de glicerol 50% i guardar a 4°C.
- L'obtenció de les imatges es va dur a terme amb una càmera digital fixa model *Leica DC 200* adaptada a una lupa binocular *Leica MZFL III*.
- **Tampó X-Gluc:** 100 μ M ferricianur potàssic
100 μ M ferrocianur potàssic
10 mM EDTA, pH 8
0,1 % Triton X-100
0,5 mM β -mercaptoetanol
1 mg/ml X-Gluc
50 mM tampó fosfat
1% N,N-dimetilformamida
Guardar a -20 °C.

2. Expressió i purificació de proteïnes recombinants

2.1. Sobreexpressió dels diferents factors de transcripció a *E. coli*

Per a cadascuna de les proteïnes recombinants es van assajar diferents condicions de sobreexpressió com la temperatura, el temps d'inducció i/o la concentració d'IPTG per trobar aquelles en les que s'obtenia una major quantitat de proteïna a la fracció soluble. El mètode d'expressió va ser el mateix en tots els casos i és el que es descriu a continuació:

- Transformació de cèl·lules d'*E. coli* de la soca BL21 (DE3):
 - incubar en gel durant 15 min. 100 µL de cèl·lules competents amb 20-50 ng del vector d'expressió corresponent,
 - incubar durant 2 min a 42°C,
 - sembrar les cèl·lules sobre plaques de LB amb l'antibiòtic apropiat i incubar a 37°C durant tota la nit (o/n) en posició invertida.
- A partir d'una colònia aïllada de la placa, inocular un cultiu líquid de 4-5 mL de LB amb l'antibiòtic corresponent i deixar créixer els bacteris o/n en agitació (250 rpm) a 37°C.
- Al matí següent, inocular un cultiu de 500 mL a una dilució de 1/500 o 1/1000 i deixar créixer les bactèries en agitació (250 rpm) a 37°C.
- Quan la densitat òptica del cultiu (a 600 nm) arriba a 0,6-0,8, induir l'expressió de la proteïna de fusió com s'indica a les taules següents:

<i>PBF i subdominis</i>	<i>Temperatura d'inducció (°C)</i>	<i>Temps d'inducció</i>	<i>Concentració IPTG</i>
<i>pET28A-PBF</i>	37	3h	0,5 mM
<i>pET28A-bdPBF</i>	37	3h	1 mM
<i>pET28A-CtPBF</i>	32	3h	0,5 mM
<i>pET28A-dofCtPBF</i>	37	3h	1 mM
<i>PGEX2TK-PBF</i>	37	3h	1 mM
<i>PGEX4T3-bdPBF</i>	37	3h	1 mM
<i>PGEX4T3-CtPBF</i>	37	3h	1 mM
<i>PGEX4T3-dofCtPBF</i>	37	3h	1 mM

<i>GAMYB i subdominis</i>	<i>Temperatura d'inducció (°C)</i>	<i>Temps d'inducció</i>	<i>Concentració IPTG</i>
<i>pET28B-GAMYB</i>	37	3h	1 mM
<i>pET28C-Ctmyb</i>	37	3h	1 mM
<i>PGEX4T3-GAMYB</i>	37	3h	1 mM

<i>FUSCA3</i>	<i>Temperatura d'inducció (°C)</i>	<i>Temps d'inducció</i>	<i>Concentració IPTG</i>
<i>pET28A-Fus3</i>	37	3h	1 mM
<i>PGEX4T3-Fus3</i>	37	3h	1 mM

- Un cop acabada la inducció, centrifugar els bacteris a 4000 rpm durant 10 min. i descartar el sobrenedant. A partir d'aquest punt els sediments bacterians corresponents seran processats en funció del seu ús posterior.

Abans d'iniciar el procés de purificació és aconsellable verificar el procés d'inducció i la solubilitat de la proteïna sobreexpressada mitjançant el següent procediment:

1. Prendre 1 mL del cultiu just abans d'afegir l'IPTG (T_0) i al final de la inducció (T_F). Centrifugar a màxima velocitat durant 1 minut i descartar el sobrenedant.
2. Afegir 100 μ L de PBS i resuspendre el sediment. Sonicar breument (BRANSON Sonifier 250: 3 cops a potència 3-4 i freqüència 50%) per fragmentar el DNA present a la mostra i així reduir-ne la viscositat, que pot interferir en la posterior migració del gel SDS-PAGE de comprovació.
3. Centrifugar a màxima velocitat durant 1 minut, separar el sobrenedant (fracció soluble). Resuspendre el sediment en 100 μ L de H₂O (fracció insoluble).
4. Afegir 100 μ L de tampó de càrrega (x2) a cadascuna de les mostres i desnaturalitzar-les a 96°C durant 5 min.
5. Carregar 20 μ L en un gel SDS-PAGE a una concentració de poliacrilamida adequada a la mida de la proteïna de fusió a analitzar. La comparació del patró de proteïnes totals (T_0 vs. T_F) obtingut per tinció amb *Coomassie blue* permetrà verificar la inducció i valorar la solubilitat de la proteïna expressada.

2.2. Purificació dels factors de transcripció produïts a *E. coli*

2.2.1. Purificació de les proteïnes amb *His-tag* (sèrie pET28) per columnes d'afinitat de níquel

- Resuspendre el sediment amb 20 mL de tampó IMAC-5 amb liozima (1 mg/mL final). Incubar en gel durant una hora. Un cop transcorregut el temps d'incubació, la solució ha de presentar un aspecte viscos indicatiu de que la lisi bacteriana ha ocorregut.
- Sonicar per fragmentar el DNA 3 cops a potència 3-4 i freqüència 50% durant 15 seg. (BRANSON Sonifier 250), mantenint la mostra sempre en gel perquè no s'escalfi.
- Centrifugar a 13000 rpm, a 4°C durant 30 min. Recollir ràpidament el sobrenedant*, aplicar-lo sobre la columna d'afinitat de níquel prèviament equilibrada (*Chelating Sepharose™ Fast Flow*, Amersham Biosciences) i purificar la proteïna recombinant tal i com es descriu a continuació:

ETAPA	Volums	T ^a	Repeticions
<i>Càrrega i equilibrat</i>	600 μ L reïna	TA	x1
	2 mL H ₂ O	TA	x1
	4 mL Ni ₂ SO ₄ 50 mM	TA	x1
	2 mL IMAC-5	TA	x1
<i>Unió</i>	10 mL mostra*	4°C	x2

Rentats	10 mL IMAC-25	4°C	x2
	5 mL IMAC-50	4°C	x1
	5 mL IMAC-60	4°C	x1
	5 mL IMAC-80	4°C	x1
	4 mL IMAC-100	4°C	x2
Elució	2 mL IMAC-200	TA	x4
	2 mL IMAC-1000	TA	x2

- Per eliminar l'excés d'imidazole dels eluïts, dialitzar el sobrenedant a través d'una membrana Spectra/Por® Membrane MWCO: 6-8,000 (Spectrum®) front a 1L de tampó IMAC sense imidazole (20 mM Tris-HCl, pH 7,9, 100 mM NaCl, Glicerol 10%, 1 mM PMSF) durant 1h a 4°C.
- Eliminar els precipitats proteics que s'hagin format durant la diàlisi per centrifugació a 13.000 rpm, a 4°C durant 20 min.
- Finalment, per comprovar la puresa i la quantitat de proteïna que s'ha purificat preparar 2 gels SDS-PAGE amb 1-10 µL de cadascun dels eluïts. Analitzar-ne un d'ells per tinció amb plata i l'altre per *Western blot* utilitzant l'anticòs Anti-T7tag (Novagen) o anticossos específics contra cadascuna de les proteïnes expressades.

2.2.2. Purificació de les proteïnes fusionades a GST (sèrie pGEX) per columnes d'afinitat de glutatió

- Rentar el sediment amb 10 mL de tampó de lisi.
- Resuspendre el sediment amb 10 mL de tampó de lisi amb lisozima (1 mg/mL final). Incubar en gel durant una hora. Un cop transcorregut el temps d'incubació, la solució ha de presentar un aspecte viscos indicatiu de que la lisi bacteriana ha ocorregut.
- Sonicar per fragmentar el DNA 3 cops a potència 3-4 i freqüència 50% durant 15 seg. (BRANSON Sonifier 250), mantenint la mostra sempre en gel perquè no s'escalfi.
- Centrifugar a 13000 rpm, a 4°C durant 30 min. Recollir ràpidament el sobrenedant* i mesclar-lo amb 300 µL de reïna d'afinitat de glutatió prèviament equilibrada (*Glutathione Sepharose™ 4B*, Amersham Biosciences) i purificar la proteïna de fusió a GST seguint les etapes descrites a continuació:

ETAPA	Volums	Tª	Repeticions
Equilibrat	300 µL reïna	TA	x1
	1 mL tampó de lisi	TA	x3
Unió	10 mL mostra*	4°C	x1
Rentats	10 mL tampó de rentat	4°C	x3
Elució	200 µL GSH 10 mM en tampó de rentat	TA	x3

- Preparar 2 gels SDS-PAGE amb 1-10 µL de cadascun dels eluïts per comprovar la puresa i la quantitat de proteïna que s'ha purificat. Analitzar-ne un d'ells per tinció amb plata i l'altre per

Western blot utilitzant l'anticòs Anti-GST (Amersham Biosciences) o anticossos específics contra cadascuna de les proteïnes expressades.

- Com els eluïts que contenen glutatió no poden ser quantificats per sistemes clàssics de determinació de quantitat de proteïna (biuret, Bradford...), la proteïna purificada obtinguda va ser estimada per comparació en un gel SDS-PAGE tenyit amb blau de Coomassie amb 1-10 µL de cadascun dels eluïts front un patró de BSA.
- Quan la proteïna purificada hagi de ser usada en assaigs tipus EMSA, al·liquotar els eluïts en fraccions de 50 µL (aprox. 2,5 µg/µL) amb 10% de glicerol i 10mM de DTT i conservar-los a –80°C, evitant cicles de congelació i descongelació repetits, que afecten la interacció de la proteïna amb el DNA.

2.2.3. Tampons emprats en la purificació per columnes d'afinitat

Els tampons descrits a continuació, excepte el tampó de rentat, es van complementar amb la mescla d'inhibidors de proteases descrita a l'apartat A.5.1:

Tampó IMAC-X: X mM d'Imidazole
20 mM Tris·HCl, pH 7,9
500 mM NaCl
10% glicerol
inhibidors de proteases.

Tampó de lisi: 10 mM Tris·HCl, pH 8
400 mM NaCl
25 mM MgCl₂
500 mM EDTA
5% glicerol
inhibidors de proteases.

Tampó de rentat: 75 mM Hepes, pH 7,9
150 mM NaCl.

2.3. Transcripció i traducció *in vitro* de proteïnes recombinants.

La producció *in vitro* de PBF, GAMYB, FUSCA3 i els seus dominis per separat es va dur a terme a partir del promotor T7 present als vectors de la sèrie pET28. La transcripció i traducció d'aquestes proteïnes es va realitzar en una única reacció mitjançant el Kit TNT de Promega, en les condicions que s'especifiquen a continuació:

Reacció TNT (90 min/30°C)	
Reactiu	Volum
Llisat de reticulòcits de conill	25 µL
Tampó x25	2 µL
T7 polimerasa	1 µL
AA (-Met)	1 µL
AA (-Leu)	1 µL
RNAguard (40 U/µL)	2 µL
DNA (Construccions)	3 µg
VOLUM FINAL	50 µL

- Una cop acabada la reacció, afegir 12,5 µL de glicerol 50% i guardar a -80°C.
- Per verificar el nivell d'expressió de les proteïnes expressades es va analitzar per *Western blot* (veure apartat 5.3.3) una alíquota de 10 µL, utilitzant com anticossos: Anti-T7tag (Novagen) o anticossos específics contra cadascuna de les proteïnes expressades.

2.4. Electroforesi SDS-PAGE i tinció de proteïnes

Les electroforesis es van realitzar en un aparell Mini-protean-II (Biorad), seguint el mètode descrit per Laemmli (1970). Les migracions es van realitzar a 120V-140V durant 1-1,5 hores en gels desnaturalitzants d'acrilamida a una concentració adequada a la mida de la proteïna d'interès a analitzar (normalment 12 a 15%), preparats tal i com es descriu a la taula següent:

Taula III. Volums necessaris per preparar A) 2 ml de gel concentrador i B) 10 ml de gels separadors amb diferents % d'acrilamida/bisacrilamida.

A) Gel concentrador		B) Gel separador		15 %	12,5 %	10 %
Tampó gel concentrador (ml)	1	Tampó gel separador (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5
Acri:bisacrilam.(30:0.8) (ml)	0,5	Acri:bisacrilam.(30:0.8) (ml)	3,75	3,13	2,5	2,5
H ₂ O (ml)	2,25	H ₂ O (ml)	3,75	4,38	5	5
Temed (µl)	6	Temed (µl)	5	5	5	5
APS 15 % (p/v) (µl)	40	APS 15 % (p/v) (µl)	40	40	40	40

Tampó del gel concentrador 500 mM Tris·HCl, pH 6,8
0,4% SDS

Tampó del gel separador 1,5 M Tris·HCl, pH 8,8
0,4% SDS

Tampó de migració 10X 19,2 M glicina
2,5 M Tris·HCl, pH 8,3-8,7
10% SDS

Posteriorment, els gels es van processar segons l'anàlisi a realitzar.

2.4.1. Transferència de proteïnes (*Western-blot*)

La presència dels diferents factors de transcripció (PBF, GAMYB i FUSCA3), als diferents extractes proteics (extractes bacterians, nuclears crus, totals d'endosperma, TNT, o proteïna purificada) es va analitzar per *Western-blot* i posterior immunodetecció amb els anticossos α bdPBF, α myb i α fus produïts al laboratori.

- Les proteïnes del gel es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa de 0,45 µm de porus (Schleicher & Schuell) mitjançant el sistema humit de BioRad (100V durant 1 h a 4°C).

Composició del tampó de transferència: 48 mM Tris base, pH 9,2; 39 mM glicina.

- En acabar, tenyir la membrana amb el colorant Roig de Ponceau per verificar la transferència i marcar les bandes corresponents al marcador de pes molecular. Posteriorment, destenyir amb PBS-Tween 0,1%.

Composició de la solució Roig de Ponceau: 0,1% Roig de Ponceau, 1% àcid acètic i 150 mM NaCl.

- Procedir a les incubacions que es descriuen a l'apartat d'immunodetecció (apartat 5.3.3).

2.4.2. Tinció amb blau de Coomassie

Per analitzar el patró de proteïnes totals present en els diferents extractes proteics (extractes bacterians, nuclears crus, totals d'endosperma, TNT, o proteïna purificada), per a realitzar les comparacions front a patrons de BSA així com per comprovar l'eficiència del procés de transferència de proteïnes cap a membranes de nitrocel·lulosa, els gels es van tenyir amb una solució alcohòlica del colorant blau de Coomassie tal i com es descriu a continuació:

- En acabar l'electroforesi SDS-PAGE o en acabar la transferència, tenyir durant 15' amb solució per tinció amb Coomassie-blue a temperatura ambient.
Composició de la solució de tinció: 50% d'àcid tricloroacètic i 0,45% Coomassie blue.
- Destenyir amb rentats successius, fins que el fons del gel quedi transparent.
Composició de la solució de destinció: 30% metanol i 10% àcid acètic.
- Si cal quantificar les bandes de proteïna, escanejar el gel amb el *Personal FX* de Biorad i quantificar amb el software *Quantity One* de Biorad.

2.4.3. Tinció amb plata

Per analitzar el patró de proteïnes dels extractes d'endosperma (totals o nuclears) es va preferir la tinció de plata atès que les zeïnes es tenyeixen malament amb blau de Coomassie. El protocol seguit es descriu a continuació:

ETAPES	Volums	Temps	Repeticions
<i>Fixació</i>	100 mL solució de fixació	1h.	x1
<i>Rentats</i>	100 mL etanol 30%	15 min.	x3
<i>Pretractament</i>	100 mL solució de pretractament	1 min	x1
<i>Rentats</i>	100 mL H ₂ O-MQ	20 seg.	x3
<i>Impregnació</i>	100 mL solució d'impregnació	20 min.	x1
<i>Rentats</i>	100 mL H ₂ O-MQ	20 seg.	x2
<i>Revelat</i>	100 mL solució de revelat	5 min.	x1
<i>Aturada</i>	100 mL solució de fixació	15 min.	x1

- Si cal quantificar les bandes de proteïna, escanejar el gel amb el *Personal FX* de Biorad i quantificar amb el software *Quantity One* de Biorad.
- **Solucions emprades en la tinció amb plata:** totes les solucions descrites a continuació es preparen amb H₂O-MilliQ i les incubacions es realitzen en material de vidre:

Solució de fixació: 50% metanol
12% àcid acètic
0,05% formaldehid 37%.

Solució de pretractament: 0,02% Na₂S₂O₃.

Solució d'impregnació: 0,2% AgNO₃
0,075% formaldehid 37%.

Solució de revelat: 6% Na₂CO₃
0,05% formaldehid 37%
2% solució de pretractament.

3. Assaigs de retard en gel (*EMSA*)

3.1. Obtenció d'extractes nuclears

Per minimitzar la degradació de les proteïnes, el procés s'ha de realitzar sempre a 4°C i en el menor temps possible.

- Disseccionar el pericarp i l'embrió de grans de blat de moro de 15 dies després de la pol·linització (DAP). Seguidament, fer un tall tangencial sobre l'endosperma i descartar la regió central d'aquest teixit, ja que és on es troba emmagatzemada la major part del midó. En ser eliminat, es facilitarà l'extracció de les proteïnes nuclears. A més, la major part de l'activitat transcripcional d'aquest teixit es troba concentrada a la regió cortical. Així, a mida que es van obtenint, les seccions corticals es van col·locant en un morter situat sobre neu carbònica i al que es va afegint N₂ líquid periòdicament, per impedir que els còrtexs d'endosperma es descongelin.
- Homogeneïtzar amb N₂ líquid fins a obtenir una pols fina i, posteriorment, transvasar a un tub Falcon de 50 mL on s'afegirà tampó A segons la relació: 1g/20 mL (aproximadament 50 còrtexs d'endosperma equivalen a 1g de teixit). Dissoldre ràpidament desfent els possibles agregats que s'hagin format per agitació suau i manual. No utilitzar el vòrtex per evitar la ruptura dels nuclis.
- Filtrar l'homogenat amb *Miracloth* (Calbiochem®) en un tub de centrifuga de 50 mL i, a continuació, centrifugar a 3000 *g* a 4°C durant 15 min.
- Resuspendre el sediment corresponent als nuclis, midó i agregats proteics en 1/3 del volum de tampó A usat en el pas anterior i tornar a centrifugar, ara a 2000 *g* a 4°C durant 10 min.
- Descartar el sobrenedant, calcular de forma aproximada el VNS (Volum Nuclear del Sediment) i resuspendre en 1/2 o 1/3 de LSB (*Low Salt Buffer*) respecte al VNS estimat. Com més petit sigui el volum utilitzat, major serà la concentració de proteïnes en l'extracte nuclear final. Tanmateix, no és aconsellable que la solució sigui massa viscosa ja que això dificultaria l'extracció.
- Transvasar l'extracte a un tub de centrifuga de 2 mL i anar afegint HSB (*High Salt Buffer*) fins que la força iònica es trobi entre 0,35-0,4M. Per comprovar-ho s'utilitzarà un conductímetre (*CRISON Conductimeter 522*) tal i com s'indica a continuació:
 - ❑ Netejar bé la sonda del conductímetre amb H₂O-MilliQ fins comprovar que la conductivitat sigui pràcticament 0 µS. Aquest pas s'haurà de repetir entre cadascuna de les mesures a realitzar.
 - ❑ Usant l'escala de 20 µS, mesurar la conductivitat d'un patró de KCl que compregui un rang de concentracions entre 0,2 i 0,4M. Per a això, es prendran 1,5 µL de cadascun dels punts del patró i es diluiran en 5 mL de H₂O-MilliQ.
 - ❑ Un cop establerta la recta patró, anar afegint poc a poc HSB 1M a l'extracte de nuclis, agitant immediatament per evitar la formació de concentracions locals de KCl. Seguidament, mesurar la conductivitat de la mostra diluïda de la mateixa manera que el patró. Repetir aquest procés fins que la conductivitat arribi al valor corresponent a 0,35-0,4 M. No s'ha de superar la força iònica corresponent a 0,4M ja que l'alliberament de proteïnes de la família de les HMG pot interferir en els assaigs de retard en gel.
- Agitar durant 30 min. a 4°C en un agitador orbital i centrifugar a 13.000 rpm durant 15 min a 4°C per sedimentar els nuclis, el midó i els agregats proteics.
- Dialitzar el sobrenedant mitjançant una membrana Spectra/Por® Membrane MWCO: 6-8,000 (*Spectrum*®) front a 1L de tampó de diàlisi durant 1h a 4 °C. Per eliminar els precipitats proteics que s'hagin format durant la diàlisi, centrifugar novament a 13.000 rpm a 4 °C durant 20 min.

- Determinar la quantitat de proteïna mitjançant el reactiu Bradford (*BioRad Protein Assay System*) i guardar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ l'extracte nuclear cru en alíquotes de 50 a 100 μL ($2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ aprox.) prèviament congelades amb N_2 líquid.

- **Tampons i solucions emprats en l'obtenció dels extractes:**

Tots els tampons marcats amb un * es van complementar amb la mescla d'inhibidors de proteases descrita a l'apartat A.5.1:

Tampó A*:	10 mM Hepes, pH 7,8	Tampó de diàlisi:	20 mM Hepes, pH 7,8
	10 mM KCl		100 mM KCl
	10 mM MgCl_2		1,5 mM MgCl_2
	250 mM sacarosa		10% glicerol
	5 mM EDTA, pH 8		0,2 mM PMSF
	1 mM DTT		0,2 mM EDTA, pH 8
	0,5% Triton X-100		0,5 mM DTT
Low Salt Buffer*:	20 mM Hepes, pH 7,8	High Salt Buffer*:	20 mM Hepes, pH 7,8
(LSB)	20 mM KCl	(HSB)	1 M KCl
	1,5 mM MgCl_2		1,5 mM MgCl_2
	25% glicerol		25% glicerol
	0,2 mM EDTA, pH 8		0,2 mM EDTA, pH 8
	0,5 mM DTT		0,5 mM DTT

3.2. Preparació dels oligonucleòtids utilitzats en els assaigs de retard en gel

En el disseny dels oligonucleòtids a utilitzar en els assaigs de retard en gel s'han tingut en compte les consideracions següents:

1. Els oligonucleòtids han de contenir el motiu a estudiar, flanquejat a cada extrem per 2 nucleòtids, com a mínim, que coincideixin amb la seqüència original del promotor.
2. El marcatge dels oligonucleòtids es realitzarà per addició de dNTPs marcats radioactivament als extrems 5' protuberants presents en aquests oligonucleòtids (reacció Klenow). S'ha escollit aquesta estratègia, en comptes del marcatge per addició de grups fosfat mitjançant la T4 Polinucleòtid quinasa, ja que és mot més eficient i evita la possible pèrdua de marcatge degut a les fosfatases presents en els extractes nuclears. Els extrems protuberants escollits són 5'- TGG - 3', ja que permeten realitzar un doble marcatge amb $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP i $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP quan es requereixi una elevada activitat específica.
3. Tots els oligonucleòtids que es vulguin utilitzar en un mateix tipus d'estudi han de presentar les mateixes seqüències flanquejants (dianes de restricció i/o seqüència de marcatge) per poder comparar els resultats entre elles (figura 35).



Figura 35. Representació esquemàtica d'un oligonucleòtid model utilitzat en els assaigs EMSA.

El motiu en *cis* (representat amb un requadre) es troba sempre envoltat de com a mínim 2 nucleòtids de la seqüència del promotor (en gris). En negre, s'han representat els extrems 5' protuberants necessaris pel marcatge. Els diferents oligonucleòtids utilitzats en aquest tipus d'assaigs es descriuen a la taula **II**.

3.2.1. Purificació dels oligonucleòtids monocadena

La síntesi d'oligonucleòtids estàndard produeix un cert percentatge de productes incomplets i/o aberrants que poden produir artefactes en els assaigs de retard en gel. Per evitar aquestes interferències és preferible purificar els oligonucleòtids sintètics en gels desnaturalitzants d'urea seguint el procediment que es descriu a continuació:

3.2.1.1. Electroforesi en gel desnaturalitzant d'urea

- Afegir ¼ de volum de tampó de càrrega a 100 o 200 µg dels oligonucleòtids dissolts en H₂O o TE 1X.
- Després de desnaturalitzar els oligonucleòtids incubant a 95°C durant 3 min., carregar tot el volum en un pouet de 1,5 cm d'ample per 2 mm d'espessor d'un aparell d'electroforesi vertical d'aproximadament 20 cm d'alçada. La composició del gel desnaturalitzant d'urea s'indica en el quadre següent:

Gel d'acrilamida 15% (38:2) TBE 1X, Urea 8M	
Ac/Bis 30% (38:2)	40 mL
Urea	38,6 g
TBE X10	8 mL
AD	5 mL
APS 10%	320 µL
TEMED	40 µL
VOLUM FINAL	80 mL

- Realitzar l'electroforesi a 200V (aproximadament 20 mA) durant 3-4 hores en tampó TBE 1X. El blau de bromofenol ha d'haver recorregut 2/3 parts del gel.
- Desmuntar l'aparell d'electroforesi, embolicar el gel d'acrilamida en un plàstic transparent (*saran-wrap*) i col·locar-lo sobre una placa de silicagel.
- La visualització del DNA es realitza per il·luminació directa del gel amb una làmpada de llum UV (longitud d'ona 366 nm). L'absorció de la llum UV pel DNA produeix una ombra sobre la placa de silicagel que permet marcar sobre el plàstic que recobreix el gel la posició que ocupa el producte majoritari corresponent a l'oligonucleòtid complet.

3.2.1.2. Elució de l'oligonucleòtid

- Retallar la banda marcada amb un bisturí estèril (un diferent per a cadascun dels oligonucleòtids) i tallar-la en fragments el més petits possibles.
- Els fragments d'acrilamida es disposen en un tub de centrífuga de 1,5 mL al que se li ha eliminat la tapa i al que se li ha practicat un petit orifici a la base amb una agulla. Aquest tub es col·loca sobre

un altre tub de 1,5 mL i es centrifuga a màxima velocitat fins que tots els trossos d'acrilamida han passat per l'orifici.

- Afegir el mínim volum de tampó d'elució (TE 1X) perquè l'acrilamida s'agiti correctament a 37°C durant tota la nit.
- Per separar l'acrilamida del tampó d'elució, col·locar els fragments d'acrilamida i el tampó sobre filtres Micropure (Millipore) i centrifugar a 12.000 rpm fins que tot el tampó d'elució s'hagi recuperat al fons del tub.

3.2.1.3. Precipitació de l'oligonucleòtid

- Calcular la quantitat de tampó d'elució recuperat i ajustar a:
 - 2,5 M AcNH₄
 - 10 mM Cl₂Mg
 - 75% etanol
- Deixar precipitar durant 1 hora a -80°C (o tota la nit a -20°C) i centrifugar a 13000 rpm durant 30 min a 4°C.
- Descartar el sobrenedant i afegir 400 µL d'etanol 90% fred. Agitar al vòrtex fins que el sediment es desenganxi de la paret del tub i centrifugar novament a 13000 rpm durant 15 min. a 4°C.
- Descartar el sobrenedant i deixar assecar totalment el sediment.
- Resuspendre en 100 µL de H₂O i quantificar la concentració a l'espectrofotòmetre (*Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer*, Nucliber).

3.2.2. Hibridació i precipitació dels oligonucleòtids

- En un tub de 1,5 mL, mesclar equimolarment aproximadament 100 µg de cada oligonucleòtid (directe i complementari) amb 50 µL de Tampó M (x10) de Roche en un volum final de 500 µL.
- Reacció d'hibridació:
 - 1.- Desnaturalitzar els oligonucleòtids incubant a 95°C durant 15 min.
 - 2.- Deixar que la temperatura baixi lentament fins a temperatura ambient.
 - 3.- Incubar la reacció d'hibridació a 4°C durant uns minuts i conservar a -20°C.
- Precipitar tot el volum de la reacció d'hibridació ajustant a:
 - 2,5 M NaCl
 - 10 mM Cl₂Mg
 - 75% etanol

Nota: És preferible evitar la precipitació amb AcNH₄ en aquest pas, ja que aquesta sal pot inhibir l'activitat polimerasa de la Klenow en la reacció de marcatge que es realitzarà més endavant.

- Deixar precipitar durant 1 hora a -80°C (o tota la nit a -20°C) i centrifugar a 13000 rpm durant 30 min. a 4°C.
- Descartar el sobrenedant i afegir 400 µL d'etanol 90% fred. Agitar al vòrtex fins que el sediment es desenganxi de la paret del tub i tornar a centrifugar a 13.000 rpm durant 15 min. a 4°C.
- Descartar el sobrenedant i, un cop el sediment s'hagi assecat completament, resuspendre en 100 µL de H₂O. Posteriorment, quantificar la concentració a l'espectrofotòmetre.

3.2.3. Marcatge dels oligonucleòtids de doble cadena a utilitzar com a sonda

Tot i que és possible realitzar el doble marcatge utilitzant $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP juntament amb $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP per obtenir una major activitat específica, en general, és suficient amb utilitzar només $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP per obtenir un bon resultat.

- Afegir en un tub de 1,5 mL :
 - 0,5 µL ⇒ Oligonucleòtid doble cadena (100 ng / µL)
 - 0,4 µL ⇒ mescla de dATP, dGTP i dTTP 330 µM
 - 0,5 µL ⇒ H₂O estèril
 - 0,3 µL ⇒ Tampó M (x10, Roche)
 - 0,3 µL ⇒ Klenow (2U / µL; Labelling grade, Roche)
 - 1,0 µL ⇒ α³²P- dCTP (3000 Ci / mmol; Amersham).

Per obtenir una millor eficiència en el marcatge és preferible no mesclar la Klenow fins haver afegit l'α³²P-dCTP.

- Mesclar tots els components de la reacció mitjançant un pols de centrífuga i incubar durant 15 min. a TA. Com la quantitat molar de dCTP usada és petita, afegir 0,2 µL de dCTP 1 mM i incubar 5 min addicionals a TA per assegurar que s'han omplert tots els extrems de la sonda.
- Aturar la reacció afegint 97 µL de TE 1X. Per eliminar la Klenow afegir 50 µL fenol + 50 µL cloroform:isoamílic (96:4) i agitar al vòrtex. A continuació, centrifugar a màxima velocitat durant 2 min. i recuperar la fase superior (aquosa).
- Purificar l'oligonucleòtid marcat respecte a l'isòtop radioactiu no incorporat mitjançant les columnes NAP-5 (Pharmacia).

3.3. Assaig EMSA

La interacció *in vitro* d'una proteïna amb el DNA depèn de múltiples paràmetres: la força iònica, la presència de detergents, la temperatura, la concentració i tipus de DNA inespecífic... Per a cada proteïna en particular és necessari optimitzar tots aquests paràmetres per obtenir una bona unió. A continuació es descriuen les condicions en les que s'han realitzat la major part dels experiments de retard en gel.

- Com es mostra a la figura **36** (en negre), en un assaig bàsic de retard en gel, s'incuben 80 pg de l'oligonucleòtid marcat radioactivament (al voltant de 30.000-35.000 cpm) a temperatura ambient durant 10-30 min. amb 1-10 µL de l'extracte proteic que es vol analitzar: extracte nuclear (20-30 µg de proteïna total) o proteïna purificada (2,5-3 µg de proteïna purificada).
- **Composició del tampó d'unió:** 25 mM Hepes, pH 7,8; 75 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 10% glicerol; 200 µM PMSF; 500 µM EDTA, pH 8; 450 µM DTT; i 80 ng/µL Poly(dI·dC) (Sigma).

Determinació de l'especificitat de la interacció

L'especificitat de la interacció es pot determinar seguint dues aproximacions:

(A) Incubar l'extracte proteic amb un oligonucleòtid que contingui l'element en *cis* que es vol analitzar i, en paral·lel, realitzar la mateixa incubació amb un oligonucleòtid equivalent en el que l'element en *cis* estigui mutat. En aquest cas és molt important que el nivell de marcatge dels dos oligonucleòtids sigui el mateix.

(B) Abans d'afegir la sonda, preincubar a TA durant 30 min. l'extracte proteic amb el mateix oligonucleòtid utilitzat com a sonda però sense marcar (figura **36**, en gris). Habitualment, en els assaigs de competició és suficient l'addició d'uns 100 cops la concentració de la sonda (8 ng) per observar la completa desaparició del retard. Com a control negatiu s'ha de realitzar la mateixa reacció d'unió però utilitzant un DNA inespecífic com a competidor. Aquest DNA pot ser un vector linealitzat, o preferentment un oligonucleòtid equivalent a l'utilitzat com a sonda en el que l'element en *cis* estigui mutat.

Identificació dels complexos proteics que interaccionen amb la sonda mitjançant anticossos (*supershift*)

En aquest cas, la incubació de l'anticòs amb l'extracte proteic es pot realitzar abans o després d'haver afegit la sonda (figura 36, en gris). Per comprovar que l'anticòs no interacciona amb la sonda, és aconsellable realitzar una incubació en absència de l'extracte proteic, sobretot si es treballa amb anticossos no purificats (sèrum de conill o ratolí). En aquest cas, és necessari a més preincubar amb el sèrum pre-immune com a control negatiu.

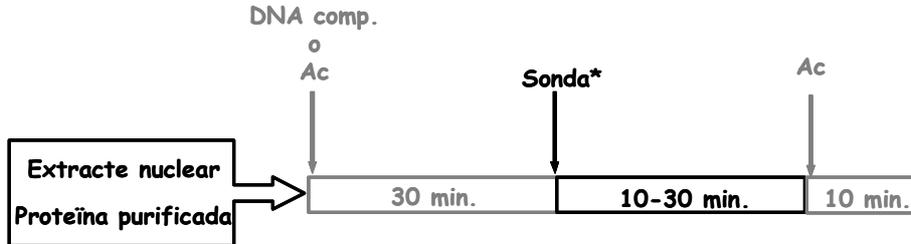


Figura 36. Representació esquemàtica de les diferents etapes de la reacció d'incubació en els assaigs EMSA. L'extracte que conté la proteïna a testar o la proteïna purificada s'incuben a temperatura ambient amb l'oligonucleòtid marcat (sonda*) que conté l'element *cis* al que s'ha d'unir. Prèviament es realitza, si s'escau, una preincubació amb l'oligonucleòtid competidor fred (DNA comp, assaig de competició) o amb un anticòs específic contra la proteïna a testar (Ac, assaig de *supershift*). La incubació amb l'anticòs es pot realitzar també després d'afegir la sonda radioactiva.

- Un cop acabada la incubació, carregar cada reacció en un pou d'un gel de poliacrilamida d'una electroforesi vertical de 16x18 cm Hoefer SE 400 (Amersham Biosciences). La composició del gel s'indica al següent quadre:

Gel d'acrilamida 4% (37,5:1) TBE 0.5X	
Ac/Bis 30% (37,5:1)	11 mL
TBE X10	4 mL
AD	65 mL
APS 10%	320 µL
TEMED	40 µL
VOLUM FINAL	80 mL

Nota: tot i que no és imprescindible, s'obtenen millors resultats si el gel s'ha mantingut prèviament a 4°C durant una hora com a mínim. I és també preferible realitzar una premigració de 20 min. a 4°C a 100 V abans de carregar les mostres.

- Realitzar la migració a 120V a 4°C durant 3 hores en TBE 0,5X pre-refredat a 4°C o/n. Seguir la migració per l'evolució d'unes gotes de tampó de càrrega de DNA.
- Passades les 3 hores, desmuntar el gel mantenint-hi un dels dos vidres unit i fixar les proteïnes submergint el gel en una solució d'àcid acètic al 10%.
- Posteriorment, col·locar el gel sobre un paper de filtre Wathman (3MM) i recobrir la cara lliure amb una capa de plàstic (*saran-wrap*).
- Assecar-lo i exposar el gel a una pantalla de *PhosphorImager* o/n. Visualitzar utilitzant el *Molecular Imager FX* (Biorad).

4. Anàlisi i manipulació d'àcids nucleics

4.1. Extracció d'RNA

4.1.1. Extracció d'RNA total (a mitjana escala)

Aquest mètode es basa en el descrit per Burr. i col. (1981) modificat per a endosperma de blat de moro (teixit amb elevat contingut de midó). Abans de treballar amb RNA cal tenir en compte que es degrada molt fàcilment, per tant, hem de prendre precaucions com: canviar-nos sovint els guants, utilitzar puntes i tubs autoclavats recentment, fornejar el material de vidre a 200°C com a mínim durant 4 h i tractar totes les solucions que sigui possible amb DEPC.

El protocol d'extracció utilitzat es descriu a continuació:

1. Homogeneïtzar aproximadament 1 g de teixit (uns 25 endospermes o uns 30 embrions) fins obtenir una pols fina en un morter refredat amb N₂ líquid, evitant que el teixit es descongeli.
2. Transvasar l'homogenat a un tub córex que contingui fenol/tampó T1 (5 mL/5 mL). Agitar 3 ó 4 cops a intervals de 1-5 min. a temperatura ambient.
3. Afegir 1 volum (5 mL) de cloroform:isoamílic (96:4), agitar i centrifugar a 12.000g durant 15 min. a TA.
4. Recuperar la fase aquosa. Rentar la fase orgànica amb 2 mL de tampó T1 i centrifugar com abans.
5. Ajuntar les fases aquoses, afegir 1 volum (5 mL) de cloroform:isoamílic (96:4), agitar i centrifugar a 12.000g durant 15 min. a TA.
6. Recuperar la fase aquosa i afegir 1 volum de LiCl 4M + Urea 8M. Agitar i deixar precipitar o/n a 4°C.
7. Centrifugar 20 min. a 12.000g a 4°C, descartar el sobrenedant i resuspendre el sediments en 200 + 100 µL H₂O. Transvasar a tubs *ependorf* de 1,5 mL.
8. Fer una extracció amb fenol:cloroform:isoamílic (50:48:2) i una altra amb cloroform:isoamílic (96:4).
9. Precipitar amb acetat de sodi 0.3 M i etanol al 70% durant 1 h a -80°C.
10. Centrifugar a 10.000 rpm durant 15 min. a 4°C, rentar el sediments amb etanol 70%.
11. Centrifugar a 5.000 rpm durant 5 min. a 4°C, assecat al buit i resuspendre en un volum apropiat de H₂O tractada amb DEPC.

Valorar qualitativament per electroforesi en gel d'agarosa al 1,5% i tinció amb bromur d'etidi. Valorar quantitativament a l'espectrofotòmetre (a 260 i 280 nm).

Composició del Tampó T1: 0,05 M Tris·HCl, pH 7,5-8; 0,1 M EDTA; 0,15 M NaCl; 1% SDS; i 1% àcid iodacètic.

4.1.2. Extracció d'RNA total (a petita escala)

Aquest mètode es basa en la utilització del reactiu *Trizol Reagent* (Invitrogen), seguint les instruccions del fabricant i adaptant el protocol a teixits rics en midó:

1. Partint d'uns 100 mg de pols de teixit (segons l'apartat 4.1.1), afegir 0,5 mL de tampó T1 i agitar vigorosament.
2. Centrifugar 5 min. a 5.000g a 4°C.
3. Recollir el sobrenedant i transvasar-lo a un tub *ependorf* de 2 mL.
4. Afegir 0,9 mL de *Trizol Reagent*, agitar i incubar 5 min. a TA.
5. Afegir 0,2 mL de cloroform, agitar i incubar 3 min. a TA.

6. Centrifugar 15 min. a 12.000g a 4°C.
7. Recollir el sobrenedant i tranvasar-lo a un tub *ependorf* de 1,5 mL.
8. Afegir 0,5 mL d'isopropanol, agitar i incubar 10 min. a TA.
9. Separar el sobrenedant i rentar el sediment amb etanol 75%.
11. Centrifugar a 5.000g durant 5 min. a 4°C, assecar al buit i resuspendre en un volum apropiat de H₂O tractada amb DEPC.

Valorar qualitativament per electroforesi en gel d'agarosa al 1,5% i tinció amb bromur d'etidi. Valorar quantitativament a l'espectrofotòmetre (a 260 i 280 nm).

4.1.3. Purificació d'mRNA-poli A⁺

Aquest sistema es basa en l'ús d'un oligo(dT) biotinitat, amb afinitat per la cua de Poli A que presenten la majoria dels mRNAs eucariotes madurs. Els híbrids són capturats per unió a partícules d'estreptavidina unides a partícules magnètiques sobre un suport magnètic (sistema *Poly A tract* de Promega). Es van seguir les instruccions del fabricant, partint de 1,1 mg de RNA total obtingut segons el punt 4.1.1. en 1,1 mL de H₂O-DEPC.

4.2. Obtenció de DNA plasmídic

4.2.1. A mitjana escala

Per a l'obtenció de DNA plasmídic a mitjana escala es va utilitzar el kit per midipreparacions (QIAGEN) seguint les instruccions del fabricant. El DNA obtingut per aquest mètode és de gran puresa i lliure de DNases i pot ser utilitzat en tot tipus de reaccions enzimàtiques.

4.2.2. Minipreparacions

El mètode utilitzat és el de la lisi alcalina descrit per Birnboim (1983). Es parteix de 2-4 mL de cultiu i el rendiment obtingut és de 15-20 µg de DNA, per a plasmidis d'elevat nombre de còpies.

4.3. Subclonatge de fragments de DNA en plasmidis

4.3.1. Reaccions de modificació del DNA

En la realització dels subclonatges s'han emprat les següents reaccions de modificació del DNA: digestió amb enzims de restricció, fosforilació i desfosforilació i lligació. Els protocols utilitzats són els descrits als manuals *Molecular Cloning: A laboratory manual* (Sambrook, 1989) i *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel i col., 1998), tenint en compte, a més, les recomanacions dels fabricants per a cadascun dels productes utilitzats.

4.3.2. Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa

El mètode emprat està basat en la utilització d'una reïna que uneix el DNA. S'ha purificat amb el kit *QIAquick[®] Gel Extraction Kit* (QIAGEN) seguint les instruccions del fabricant.

4.3.3. Preparació i transformació de cèl·lules competents d'*E.coli*

El mètode utilitzat es basa en una modificació del descrit per Ausubel (1998) el qual permet obtenir una eficàcia de transformació al voltant de 10⁵-10⁶ cfu/µg de DNA mitjançant el procés de xoc tèrmic.

Protocol de preparació de cèl·lules competents:

1. Inocular un minicultiu de 5 ml d'LB a partir d'un glicerinat de la soca de *E.coli* que ens interessi (en el nostre cas DH5αF' o BL21-DE3) i incubar o/n a 37°C en agitació.
2. Fer una dilució 1/100 en un cultiu de 250 ml d'LB. Incubar durant aproximadament 1 h i 30 min.
3. Quan la DO a 600 nm arribi a 0.3-0.4, transvasar el cultiu a un tub de centrífuga i mantenir-lo a 4°C durant 15 min.

4. Centrifugar 15 min. a 4°C a 1000 *g*.
5. Descartar el sobrenedant i resuspendre suaument el sediment amb 75 mL de TFB1.
6. Mantenir a 4°C durant 15 min.
7. Centrifugar 15 min. a 4°C a 1000 *g*.
8. Descartar el sobrenedant i resuspendre suaument el sediment amb 10 mL de TFB2.
9. Aliquotar en tubs de 1,5 mL a raó de 100 µL/tub i congelar immediatament en N₂ líquid.

Composició dels tampons emprats en la preparació de cèl·lules competents:

TFB1:	100 mM RbCl
	50 mM MnCl ₂ ·4H ₂ O
	30 mM acetat de potassi, pH 5,8 amb àcid acètic 200 mM
	10 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O
	15% (p/v) glicerol
	Filtrar per 0,22 µm i guardar a 4°C.
TFB2:	10 mM MOPS, pH 6,8 amb NaOH
	10 mM RbCl
	75 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O
	15 % (p/v) glicerol
	Filtrar per 0,22 µm i guardar a 4°C.

Transformació de cèl·lules competents:

1. Descongelar les cèl·lules en gel.
2. Afegir el producte d'una lligació (o 20-50 ng de DNA plasmídic) a cada tub de cèl·lules competents. Barrejar molt suaument amb compte, perquè no es trenquin les cèl·lules.
3. Incubar 5 min en gel.
4. Incubar no més de 5 min al bany a 37°C.
5. Incubar 5 min en gel.
6. Afegir a cada tub 500 µl de medi LB i deixar 1 h a 37 °C en agitació.
7. Plaquejar 1/3 i 2/3 de la transformació a plaques amb medi LB i l'antibiòtic adequat.
8. Incubar o/n a 37°C en posició invertida.

4.4. PCR

En aquest treball experimental es van seguir els protocols generals descrits a Ausubel (1998) per a la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis i col., 1986) adaptant-los a les nostres necessitats d'amplificació de fragments de DNA.

4.4.1. Condicions generals de PCR emprades en aquest treball

Les condicions generals de PCR emprades es descriuen a continuació:

DNA motllo	10 ng
Tampó PCR 10x	5 µL
MgCl ₂ 25 mM	5 µL
dNTPs 10 mM	4 µL
Encebadors 20 µM	0,5 µL de cada
DNA pol Taq (5 U/µL)	0,25 µL, en 50 µL (volum final de reacció)

Es van mesclar tots els components indicats a la taula anterior i es van mantenir a 4°C fins a programar l'aparell de PCR. Els cicles de PCR habituals va ser:

Desnaturalització inicial: 5' a 94°C	
Desnaturalització: 30" 94°C	25 cicles
Anellament: 30" a T_p °C	
Extensió: n" a 72°C	
Extensió final : 7 min a 72°C	

on T_p és la temperatura específica per a cada parella d'encebadors i n el temps d'extensió

4.4.2. Clonatge de fragments de DNA amplificats per PCR

Els fragments de DNA resultants de la PCR es van purificar retallant el producte d'interès després de la seva resolució en gels d'agarosa. El producte de PCR s'ha purificat amb el kit *QIAquick® Gel Extraction Kit* (QIAGEN) seguint les instruccions del fabricant. Els fragments d'interès es van clonar usant els kits *pGEM-T Easy Vector System* (Amp^R, Promega), *InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit* (Amp^R, Fermentas) i *TOPO TA Cloning Kit* (Amp^R, Invitrogen) i seguint les instruccions del fabricant.

4.4.3. RT-PCR

Aquesta tècnica s'ha utilitzat per tal d'amplificar els cDNAs del gens GAMYB i FUSCA3 de blat de moro, en base a la seqüència dels seus homòlegs en altres cereals, a partir de RNA total i/o mRNA-poli A⁺ de *Zea mays*. La síntesi del cDNA de primera cadena s'ha realitzat a partir d'oligo dT.

Obtenció de cDNA de primera cadena a partir d'RNA total.

- Mesclar 2,5 µg d'RNA total (obtingut segons l'apartat 4.1.2), 0,5 µl d'RNA *guard* (26 U/µL), 0,5 µl d'oligo dT (500 ng/µL) en 10 µL de H₂O estèril.
- Desnaturalitzar a 65 °C durant 5 min i seguidament posar-ho en gel.
- Afegir:

DTT 0,1 M	2 µL
Tampó de la transcriptasa reversa (5x)	4 µL
RNA <i>guard</i> (26 U/µl)	0.5 µL
dNTPs (10 mM)	1 µL
Enzim M-MuLV-RT (200 U/µl)	1 µL
- Incubar 1 h a 37°C.
- Afegir 80 µL de H₂O i conservar a -80°C.

Amplificació per PCR.

Per tal d'amplificar el producte de la transcripció inversa s'han utilitzat les condicions de PCR descrites en el punt 4.4.1. En aquest cas el motlle de la PCR han estat 3 µL del producte final de la transcripció inversa. Els oligonucleòtids utilitzats han estat el omyb2/omyb3 i ofus for/ofus rev (veure taula I) i la temperatura d'anellament de la PCR 65 i 55°C respectivament.

Nota: per a l'obtenció dels cDNAs complets dels gens GAMYB i FUSCA3 de blat de moro es va utilitzar el *GeneRacer™ Kit* (Invitrogen) seguint les instruccions del fabricant.

4.5. Transferència i hibridació d'àcids nucleics

4.5.1. Northern-blot

La resolució de l'RNA es realitza en gels d'agarosa-formaldehid a l'1,2% segons el mètode descrit per Lehrach (1977). Al realitzar l'electroforesi en presència de formaldehid es creen condicions desnaturalitzants que eviten la degradació dels RNAs.

El protocol utilitzat per gels de 18x15 cm es descriu a continuació:

1. Pesar 1,8 g d'agarosa i afegir-hi 111 mL de H₂O. Fondre i deixar atemperar a 60°C.
2. Afegir 15 mL MEN 10x i 24 mL formaldehid 37%. Barrejar bé, abocar sobre el motlle i deixar solidificar sota la campana.
3. Posar el gel a la cubeta amb tampó MEN 1x sense cobrir-lo totalment. Cobrir amb *saran-wrap* tot el gel excepte la zona dels pouets.
4. Preparar les mostres mesclant 10 µg d'RNA (volum màxim 20 µL) amb 25 µL de tampó de càrrega. Escalfar 15 min. a 65°C i guardar en gel.
5. Carregar les mostres i córrer el gel a 80-100 mV. Seguir l'evolució del gel carregant 1 gota de tampó de càrrega en un dels pous i deixar migrar fins que el blau arribi a $\frac{3}{4}$ parts del gel (2 h).
6. Transferir o/n a una membrana de niló per capil·laritat i en presència d'un tampó d'elevada força iònica (SSC 10X).
7. Comprovar a l'UV que la transferència ha estat correcta.
8. Fixar l'RNA a la membrana a 1200 µJ x 100 durant 1 min. mitjançant *UV-Stratalinker 2400* (Stratagene).

Tampó de càrrega (per 1 mL): 652 µL formamida desionitzada, 196 µL formaldehid 37%, 130 µL MEN 10x i 32 µL bromur d'etidi (0,7 mg/mL).

4.5.2. Hibridació de les membranes

1. Prehibridar les membranes entre 30 min. i 2 h en tampó *Church* a 65°C (Martinez-Garcia i col., 2002).
2. Marcar el DNA sonda (100-500 ng) radioactivament amb $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP 3000 Ci/nmol utilitzant el kit comercial *Random Primed DNA labeling kit* (Roche) i purificar-lo a través d'una columna Sephadex G-50 (*Probe-Quant 50*, Amersham Biosciences). Un cop purificada, la sonda es desnatura per xoc tèrmic (incubant 5 min. a 100°C) i s'afegeix al tampó d'hibridació, preescalfat a 65°C.
3. Hibridar les membranes o/n a 65°C.
4. Després de la hibridació, rentar les membranes amb tampó de rentat 3 vegades, durant ≥ 20 min. cadascuna, a 65°C.
5. Exposar les membranes segellades amb una pantalla de *PhosphorImager* i visualitzar-les amb el *Molecular Imager FX* (Biorad). Les intensitats de banda es quantifiquen utilitzant el software *Quantity One* (Biorad).

Els filtres, si es mantenen humits, poden ser reutilitzats seguint el següent protocol de deshibridació:

1. Incubar 15 min. amb SSC x 0,1 + 1% SDS a ebullició i deixar baixar la temperatura fins a 42°C.
2. Repetir 2 cops.
3. Comprovar la deshibridació amb el Geiger i/o per exposició amb film (segons la intensitat del marcatge anterior).

4.5.3. Tampons emprats en la hibridació de les membranes

Tampó *Church*: 125 mM tampó fosfat, pH 7,2
7% SDS
1 mM EDTA.

Tampó de rentat: 40 mM tampó fosfat, pH 7,2
2% SDS
2 mM EDTA.

5. Anticossos

5.1. Producció d'anticossos policlonals contra les proteïnes recombinants purificades

En el present treball experimental es van generar anticossos recombinants contra els factors de transcripció estudiats (GAMYB i FUSCA3).

5.1.1. Obtenció de les proteïnes recombinants purificades per a la immunització

5.1.1.1. Obtenció de GAMYB

Atesa la conservació a nivell aminoacídic de les repeticions R2R3 de les proteïnes tipus *myb* es va decidir obtenir anticossos contra la regió més variable de GAMYB. Així, els anticossos es van produir contra el domini C-terminal de la proteïna GAMYB.

Es va sobreexpressar His-Ctmyb a *E.coli* (veure apartat 2.1), que va resultar parcialment soluble. Així, la proteïna recombinant His-Ctmyb es va purificar per columnes d'afinitat de Níquel, forçant l'elució a 200 mM d'imidazole (veure apartat 2.2.1).

La quantitat de proteïna així purificada es va estimar per comparació front un patró de BSA amb el gel tenyit amb blau de Coomassie i es va utilitzar directament en la immunització.

5.1.1.2. Obtenció de FUSCA3

Es va sobreexpressar His-FUSCA3 en *E.coli*. (veure apartat 2.1), que va resultar parcialment soluble. Així, la proteïna recombinant His-FUSCA3 es va purificar per columnes d'afinitat de Níquel, forçant l'elució a 200 mM d'imidazole (veure apartat 2.2.1).

La quantitat de proteïna així purificada es va estimar per comparació front un patró de BSA amb el gel tenyit amb blau de Coomassie i es va utilitzar directament en la immunització.

5.1.2. Immunització de conills

L'animal seleccionat per a l'obtenció d'anticossos va ser el conill (*Oryctolagus cuniculus*) de la varietat *New zealand White* perquè aquests animals són fàcils de mantenir i manipular al laboratori i perquè toleren bé les injeccions i extraccions. A més, la quantitat de sèrum que s'obté és molt superior que quan s'immunitzen ratolins, rates ó hamsters (Harlow, 1988).

Per a l'obtenció de cada anticòs policlonal s'utilitzen 2 conills, als que després d'una aclimatació de 2 setmanes a l'estabulari, se'ls realitza una primera extracció de sang (sèrum pre-immune), que s'utilitzarà com a control negatiu. Les extraccions de sang es realitzen a la vena marginal de l'orella ja que és de fàcil accés i presenta poques terminacions nervioses.

Quatre dies després, els animals són sotmesos a la pauta d'immunització que es descriu a continuació:

1^a immunització:

- Preparar un tub que contingui una quantitat de proteïna purificada entre 100 i 200 µg i afegir PBS fins un volum final de 500 µL. A continuació, afegir 500 µl d'adjuvant de Freund complet (CFA) i agitar vigorosament al vòrtex fins que es forma una emulsió.
- Aspirar tota l'emulsió amb una xeringa i injectar subcutàniament (Harlow, 1988) en inòculs de 100 µl a diferents parts del conill.

2^a i 3^a immunització:

- Realitzar la segona i tercera immunització de la mateixa forma que la primera, al cap de 15 i 30 dies. L'única diferència entre elles és que l'adjuvant de Freund a utilitzar en aquestes subsegüents immunitzacions és l'incomplet (IFA). L'adjuvant complet de Freund només s'utilitza a la primera immunització ja que conté *M. tuberculosis* mortes per calor, capaces de

provocar una resposta immune forta i prolongada, però que pot produir granulomes al conill, entre altres efectes secundaris (Harlow, 1988).

- 8 dies després de la tercera immunització extreure 20 ml de sang de cada conill per testar la resposta immune (1^a sagnada). Segons el resultat d'aquesta resposta immune es planifica la 4^a immunització, que normalment es fa 15 dies després de la 1^a sagnada, amb el mateix procediment que les anteriors.

Obtenció de sèrums: Es van realitzar un total de 4 extraccions sanguínies i es van obtenir diferents mostres de sèrum com s'indica a continuació:

- Incubar la sang de conill, extreta i posada dins d'un tub amb gel separador, a 37°C durant 1 h per a que coaguli.
- Guardar tota la nit a 4°C perquè el coàgul es retregui.
- Centrifugar a 3000 g durant 10 min. a 4°C.
- Aliquotar el sobrenedant en tubs de 1,5 ml i congelar a -80°C.
- Un cop descongelades, es preferible guardar les alíquotes a 4°C amb 0,03% azida sòdica.

5.2. Purificació dels anticossos per columnes d'immunoafinitat

Com el sèrum de conill anti-Ctmyb i anti-FUSCA3 reconeixia bandes corresponents a altres proteïnes, a més de les corresponents a GAMYB i FUSCA3, en extractes d'endosperma es va decidir purificar els anticossos específics contra GAMYB i contra FUSCA3 mitjançant columnes d'afinitat *HiTrap NHS-activated* (Amersham Biosciences). Com a antigen es van utilitzar les corresponents proteïnes His-Ctmyb i His-fus prèviament purificades per columnes d'afinitat de níquel (veure apartat 2.2.1).

Procediment:

- Muntar la columna en un suport vertical, desprecintar la part inferior de la columna i tancar-la amb una peça de tancament. Posteriorment, obrir la columna per la part superior i col·locar un adaptador per a xeringues (2-5 mL). Realitzar els rentats, càrrega i elució de la columna utilitzant xeringues i la suau pressió de l'èmbol (no cal utilitzar bombes peristàltiques).
- En la següent figura s'han indicat les diferents etapes a seguir en la purificació, que es realitza a temperatura ambient:

ETAPES	Volúms	Repeticions
<i>Eliminació isopropanol</i>	2 mL HCl 1 mM	x3
<i>Acoblament</i>	2 mL coupling buffer	x1
	1 mL antigen	x2
	Incubar 30 min.	
	2 mL coupling buffer	x3
<i>Desactivació</i>	2 mL tampó A	x3
	2 mL tampó B	x3
	2 mL tampó A	x3
	Incubar 15 min.	
	2 mL tampó B	x3
	2 mL tampó A	x3
	2 mL tampó B	x3

Neutralització	2 mL PBS	x2
Equilibrat i unió	2 mL tampó elució	x2
	2 mL PBS	x5
	1 mL sèrum	x1
Elució	1 mL tampó elució	x4
	1 mL PBS	x1

- **Composició del tampons emprats:** tots els tampons s'han de filtrar a través de filtres de 0,45µm
Coupling buffer: 200 mM NaHCO₃, pH 7,5 i 500 mM NaCl.
Tampó A: 500 mM etanolamina, pH 8,3 i 500 mM NaCl.
Tampó B: 100 mM acetat de sodi, pH 4 i 500 mM NaCl.
Tampó de neutralització: 1 M Tris, pH 8.
Tampó d'elució: 200 mM glicina·HCl, pH 2,8.
- Un cop realitzada la purificació, titular les immunoglobulines de tipus G (IgG) dels 4 eluïts obtinguts per immuno-dot.

5.3. Immunodetecció per *Western-blot*

5.3.1. Obtenció d'extractes totals d'endospermes de blat de moro

Les zeïnes són les proteïnes majoritàries de l'endosperma, i d'entre totes elles, destaquen les α -zeïnes que poden arribar a representar fins un 60% (Kodrzycki i col., 1989). Per a enriquir els extractes totals en els factors de transcripció del nostre interès es van eliminar les α -zeïnes aprofitant la seva solubilitat en solucions alcohòliques (Kodrzycki i col., 1989). Així, l'extracció es va realitzar en dues etapes, tal i com es descriu a continuació:

EXTRACCIÓ ALCOHÒLICA: eliminació de les α -zeïnes

- Disseccionar grans de blat de moro per separar els endospermes del pericarp i l'embrió.
- Homogeneïtzar aproximadament 500 mg de teixit fins obtenir una pols fina en un morter refredat amb N₂ líquid, evitant que el teixit es descongeli.
- Mesclar aproximadament 100 mg de la pols amb 150 µL d'etanol 70% en un tub d'1,5 mL i homogeneïtzar a temperatura ambient mitjançant un homogeneïtzador de tubs (*IKA Vibrax VXR basic*, IKA labotechnik).
- Completar amb etanol 70% fins un volum de 700 µL i sonicar a potència 4-5 i freqüència 50%, durant 30 seg. (Branson sonifier 250) per afavorir l'extracció. Seguidament, incubar durant 30-60 min. a temperatura ambient en agitació.
- Centrifugar a 13.000 rpm durant 15 min. a temperatura ambient, descartar el sobrenedant i repetir l'extracció alcohòlica 3 cops més.

EXTRACCIÓ TOTAL de proteïnes d'endosperma

- Després de les 4 extraccions consecutives, assecar el sediment i resuspendre'l en 1 volum de TM 2X i tornar a sonicar a potència 3-4 i freqüència 50%, durant 15 seg.
- Seguidament, centrifugar a 13000 rpm durant 2 min. a TA. Mesclar 10 µL del sobrenedant amb 10 µL de TM 2X, desnaturalitzar la mostra escalfant 5 min. a 96°C i carregar en un gel SDS-PAGE al 12,5%.

- Com aquest sistema d'extracció no permet la quantificació per sistemes clàssics de determinació de quantitat de proteïna (biuret, Bradford...), cal ajustar les concentracions de proteïna amb un gel previ SDS-PAGE, basant-nos en el perfil de proteïnes marcadores que s'observa al tenyir per impregnació amb Ag (veure figura **60**, resultats).

5.3.2. Obtenció d'extractes nuclears crus d'endospermes de blat de moro

L'obtenció dels extractes nuclears crus d'endosperma per a l'anàlisi dels diferents factors de transcripció per *Western-blot* es va dur a terme a partir d'una adaptació del protocol utilitzat en els assaigs EMSA descrits a l'apartat 3.1:

- Un cop obtingut el sediment corresponent als nuclis, midó i agregats proteics, calcular de forma aproximada el VNS (Volum Nuclear del Sediment) i resuspendre en 2 volums de TM 1X (sense β -mercaptoetanol).
- Per facilitar l'extracció de les proteïnes, sonicar a potència 3-4 i freqüència 50%, durant 15 seg. (Branson sonifier 250).
- Seguidament, centrifugar a 13.000 rpm durant 2 min. a TA. Mesclar 10 μ L del sobrenedant amb 10 μ L de TM 2X, desnaturar la mostra escalfant 5 min. a 96°C i carregar-la en un gel SDS-PAGE al 12,5%.

5.3.3. Immunodetecció

La presència dels diferents factors de transcripció (PBF, GAMYB i FUSCA3), als diferents extractes proteics (extractes bacterians, nuclears crus, totals d'endosperma, TNT o proteïna purificada) es va analitzar per *Western-blot* (tal i com es descriu a l'apartat 2.4.1) i immunodetecció amb els anticossos α bdPBF, α myb i α fus produïts al laboratori. El protocol següent es descriu a la taula següent:

	ETAPA	SOLUCIÓ	TEMPS	TEMP	REP
1	Bloqueig	PBS-Tween 0,1%+ llet desnatada en pols 10%	1 h	TA	x1
2	Rentats	PBS-Tween 0,1%	10 min.	TA	x3
3	Incubació amb anticòs (Ac) 1ari (dissolt en PBS-Tween 0,1% + 5% llet desnatada en pols)	Sèrum de conill anti-PBF purificat (α PBF) (1/200)	o/n	4°C	x1
		Sèrum de conill anti-GAMYB purificat (α myb) (1/200)	o/n	4°C	x1
		Sèrum de conill anti-FUSCA3 purificat (α fus) (1/200)	o/n	4°C	x1
		Ac monoclonal anti-T7 (Novagen) (1/10.000)	1 h	TA	x1
4	Rentats	PBS-Tween 0,1%	10 min.	TA	x3
5	Incubació amb Ac 2ari (dissolt en PBS-Tween 0,1% + 5% llet desnatada en pols)	Ac anti-rabbit* (1/10.000)	1 h	TA	x1
		Ac anti-mouse* (1/5000)	1 h	TA	x1
6	Rentats	PBS-Tween 0,1%	10 min.	TA	x2
7	Rentat	PBS	10 min.	TA	x1

*anticossos conjugats a HRP

- Un cop realitzades aquestes incubacions revelar per luminescència segons el kit *ECL* de Amersham Biosciences.

5.4. Immunolocalització al microscopi òptic

5.4.1. Fixació de grans de blat de moro

Aquesta tècnica té per objectiu preservar el material biològic que es vol analitzar mitjançant l'aturada de l'activitat enzimàtica, la disminució de la difusió de pèptids i proteïnes i, finalment, l'enfortiment del teixit enfront dels efectes de les posteriors etapes d'aquest tractament (Langdale, 1994).

- Desgranar una panotxa de blat de moro de maduresa apropiada a l'anàlisi a realitzar (entre 10 i 20 DAP). Disseccionar la base del gra (peduncle) per facilitar la penetració de solució de fixació i rentar amb PBS.
- Col·locar entre 10 i 15 grans de blat de moro en un tub *Falcon* de 50 mL amb abundant solució de fixació durant 1 hora a temperatura ambient. Si el material biològic flota degut a l'aire atrapat als teixits, utilitzar una campana de buit perquè se submergeixin (màxim 1 h.). Tot aquell material que segueixi flotant haurà de ser descartat.
- Rentar amb PBS 3 cops en agitació suau durant 15 min. a TA. Guardar a 4°C.
- **Composició de la solució de fixació:** 2% paraformaldehid i 1% glutaraldehid en PBS

5.4.2. Inclusió en parafina

En aquesta etapa es substitueix l'aigua que contenen les mostres per una matriu inert, com per exemple la parafina (Langdale, 1994).

La inclusió en parafina es realitza en les tres etapes descrites a continuació:

ETAPA	SOLUCIÓ	TEMPS	TEMP	REP	
1	Deshidratació i tinció del teixit	Etanol 70%	15 min.	TA	x3
2		Etanol 80%	15 min.	TA	x2
3		Etanol 90%	15 min.	TA	x2
4		Etanol 90%+ Eosina*	2 h - o/n	TA	x2
5		Etanol absolut	1h	TA	x2
6	Substitució de l'etanol per HistoClear**	Etanol: HistoClear (3:1)	1h	TA	x1
7		Etanol: HistoClear (1:1)	1h	TA	x1
8		Etanol: HistoClear (1:3)	1h	TA	x1
9		HistoClear	1h	TA	x2
10	Substitució de l'HistoClear per Parafina***	HistoClear: Parafina (3:1)	o/n	60°C	x1
11		HistoClear: Parafina (1:1)	o/n	60°C	x1
12		HistoClear: Parafina (1:3)	o/n	60°C	x1
13		Parafina	3h - o/n	60°C	x3

* L'Eosina (Eosin Y 0,02%) s'utilitza per tenyir les mostres i facilitar-ne així la seva visualització en els blocs de parafina.

** HistoClear™-II (National diagnostics).

*** Paraplast Embedding Media (Sigma-Aldrich).

- Preparar els blocs de parafina, muntant les mostres amb l'orientació adequada a l'Histocentre (*Shandon Histocentre 3*, Thermo Electron Corporation) i deixar solidificar. Un cop solidificats i desemmotllats, els blocs es guarden a 4°C amb gel de sílice (com a dessecant).

5.4.3. Preparació dels blocs de parafina per a l'obtenció de seccions

- Piramidar el bloc que conté la mostra amb l'ajuda d'un bisturí escalfat a la flama d'un encenedor *Bunsen*, de manera que l'extrem més llarg sigui el primer que entrarà en contacte amb la ganiveta del micròtom.

5.4.4. Microtomia i preparació de les seccions

- En un micròtom (2050 Reichert-Jung) es realitzen les seccions dels grans de blat de moro de 6-8 µm de gruix i es van recollint amb l'ajuda d'un pinzell.
- Col·locar els portaobjectes pretractats amb poli-D-lisina (Langdale, 1994) sobre una placa termostàtica a 42°C i cobrir-los amb 1-2 mL de H₂O. Sobre les gotes de H₂O es van col·locant les tires de parafina amb les seccions dels grans de blat de moro mantenint l'orientació. Al entrar en contacte amb H₂O, les tires de parafina s'estiren espontàniament, tot i que, a vegades, cal ajudar-les amb una agulla emmanegada.
- Deixar assecar durant tota la nit i guardar les seccions en caixes tancades amb gel de sílice.

5.4.5. Incubació dels talls de blat de moro amb els anticossos: α2 bdPBF (anti-PBF), α2Ctmyb (anti-GAMYB) i α2fus (anti-FUSCA3)

Processar els talls semifins inclosos en parafina seguint el procés descrit a la taula següent:

ETAPA	SOLUCIÓ	TEMPS	TEMP	REP	
1	Dissolució de la parafina	Histoclear	15 min.	TA	x1
2	Rehidratació	Etanol absolut	5 min.	TA	x1
3		Etanol 90%	5 min.	TA	x1
4		Etanol 70%	5 min.	TA	x1
5	Rentat	PBS	5 min.	TA	x1
6	Permeabilització	Tampó PBST	5 min.	TA	x2
7	Bloqueig	Tampó PBSBN	30 min.	TA	x1
8	Rentat	PBS	5 min.	TA	x3

Una cop realitzades totes aquestes etapes, les seccions dels grans de blat de moro estan preparades per a la incubació amb els diferents anticossos, tal i com es descriu a continuació.

Com els sèrums immunes αmyb, αfus i αPBF reconeixien més d'una proteïna sobre extractes totals d'endosperma, la immunolocalització de GAMYB, FUSCA3 i PBF es va realitzar amb els corresponents anticossos purificats per columnes d'afinitat: α2myb, α2fus i α2bdPBF. Aquests anticossos reconeixen 1 banda única en experiments de *Western-blot* realitzats sobre extractes totals d'endosperma de mida compatible amb la de la proteïna corresponent (figures **62** i **82**, resultats).

Com a control negatiu es van realitzar incubacions amb el sèrum pre-immune a la mateixa dilució.

ETAPA		SOLUCIÓ	TEMPS	TEMP	REP	
9	Incubació amb Ac 1ari	α 2myb/ α 2fus/ α 2bdPBF	Tampó PBSBN + Ac (1/50)	o/n	4°C	x1
		sèrum preimmune	Tampó PBSBN + Ac (1/300)	o/n	4°C	x1
10	Rentat	PBS	5 min.	TA	x3	
11	Incubació amb Ac 2ari fluorescent*	Tampó PBSBN + Ac (1/2000)	1-2 h	TA	x1	
12op	Rentat	PBS	10 min.	TA	x2	
13op	Tinció nuclear (DAPI)**	PBS + DAPI (1/10.0000)	2 min.	TA	x1	
14	Rentat	PBS + Tween 0.1%	10 min.	TA	x1	
15	Rentat	PBS	10 min.	TA	x1	

* Ab Alexa Fluor[®]488 F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes).

** DAPI a 1 mg/mL en PBS (0,1µg/mL concentració final) (Sigma-Aldrich).

Op: Opcional.

Nota: com els fluorocroms utilitzats són molècules làbils, que perden fluorescència progressivament quan són exposats a la llum directa, a la taula anterior s'han marcat en gris les etapes en les que es recomana protegir les mostres de la llum durant les incubacions.

5.4.6. Observació al microscopi

- Un cop acabades les incubacions, aplicar una gota de Mowiol (Calbiochem) sobre la mostra, cobrir amb un cobreobjectes i procedir a l'observació al microscopi *Zeiss AxioPhot*. Les longituds d'ona d'excitació i d'emissió dels diferents fluorocroms utilitzats en aquest treball es descriuen a la següent taula:

FLOUROCROM	EXCITACIÓ	EMISSIÓ
Alexa Fluor[®] 488	495	519
DAPI	395-440	470

- En el cas de microscòpia confocal, les imatges s'han adquirit amb el Leica TCS SP *confocal laser scanning microscope* (Heidelberg, Alemanya), del servei de microscòpia de l'IBMB-CSIC de Barcelona, fixant la longitud d'ona d'emissió d'un làser d'argó a 488 nm. Durant l'escanejat, per visualitzar la fluorescència del fluorocrom Alexa Fluor[®] 488, es va utilitzar un filtre triple-dicroic (TD 488/543/633) i la finestra d'emissió es va fixar a 490-540 nm. Es van realitzar seccions òptiques seriadades de 1,5 µm i les imatges confocals es van combinar com projeccions x-y. La llum làser transmesa pel làser d'argó emetent a 488 nm es va recollir en un tub fotomultiplicador (PMTT), per generar les imatges de microscòpia de transmissió.
- En el cas de microscòpia confocal amb doble marcatge, les imatges s'han adquirit amb un microscopi Leica TCS 4D *confocal laser scanning microscope* (Heidelberg, Alemanya), Unitat de Microscòpia Confocal i Micromanipulació Cel·lular, serveis científicotècnics de la Universitat de Barcelona, fixant la longitud d'ona d'emissió d'un làser d'argó a 400 nm. Durant l'escanejat, per visualitzar la fluorescència del fluorocrom DAPI, es va utilitzar un filtre triple-dicroic (TD

488/543/633) i la finestra d'emissió es va fixar a 400-491 nm. Es van realitzar seccions òptiques seriadades de 1,5 µm i les imatges confocals es van combinar com projeccions x-y.

5.4.7. Tinció dels grànuls de midó

La tinció dels grànuls de midó es va dur a terme sobre el mateix tipus de seccions de grans de blat de moro que els utilitzats en els experiments d'immunolocalització descrits a l'apartat anterior.

- Un cop dissolta la parafina i rehidratades les seccions d'endosperma tal i com s'ha descrit a l'apartat anterior, afegir unes gotes de Lugol i incubar uns segons fins que el teixit adquireixi una lleugera tonalitat marró.
- Per aturar la reacció rentar amb PBS.
- Aplicar una gota de Mowiol sobre la mostra, cobrir-la amb un cobreobjectes i procedir a l'observació al microscopi *Zeiss AxioPhot*.

5.4.8. Tampons i solucions

Tots els tampons descrits a continuació han de filtrar-se a través de filtres de 0,22 µm.

Tampó de rentat (PBS): PBS 0,1 M, pH 7,4.

Tampó permeabilització (PBST): 0,5% Triton X-100 en PBS 0,1 M, pH 7,4.

Tampó d'incubació (PBSBN): 0,5% BSA i 5% Normal Goat Serum (NGS, Gibco) en PBS 0,1 M, pH 7,4.

- **Preparació del Mowiol:**
 - Pesar 2,4 g de Mowiol (Calbiochem), afegir 4,88 mL de glicerol 87% i incubar a TA o/n en agitació.
 - Afegir 12 mL Tris·HCl 0,2 M, pH 8,5 i agitar.
 - Escalfar 10 min. a 50°C.
 - Conservar a 4°C o a -20°C (per a períodes superiors a un mes).
- **Preparació del LUGOL:**
 - Pesar 2 g IK i dissoldre en 10 mL d'H₂O a 50°C.
 - Afegir 200 mg de I₂, agitar i afegir 30 mL d'H₂O.
 - Filtrar i portar a 100 mL amb H₂O.
 - Conservar a TA fotoprotegit.

