

Humans i ratolins, els mateixos gens?



Alumna: Tania Hidalgo Reyes

Tutora: Mercè Lajara i Garcia

Departament de Ciències Naturals

Data: 11/12/2015

IES Ribera Baixa

Índex

Introducció.....	4
I. CONTEXT TEÒRIC.....	6
1. EL DNA.....	7
1.1. Què és el DNA.....	7
1.1.1. Estructura química.....	7
1.1.2. Doble hèlix.....	8
1.1.3. Replicació del DNA.....	10
2. ELS GENS.....	11
2.1. Definició.....	11
2.2. Gen NBS 1.....	12
3. AMPLIFICAR UN GEN.....	14
3.1. Concepte.....	14
3.2. Finalitat.....	14
3.3. Mètodes d'amplificació.....	14
4. MÈTODE D'AMPLIFICACIÓ: LA PCR.....	19
5. COMPARACIÓ DE GENS DE DIFERENTS ESPÈCIES.....	21
II. RECERCA EXPERIMENTAL.....	22
1. OBJECTIUS I HIPÒTESI.....	23
2. TREBALL BIOINFORMÀTIC.....	23
2.1. Programa elaborat per comparar seqüències de gens.....	24
3. TREBALL DE LABORATORI.....	31
3.1. Material.....	32
3.2. Metodologia.....	33
3.2.1. Observació.....	34
3.2.2. Cultius:.....	35

3.2.3.	LISI I EXTRACCIÓ DEL DNA GENÒMIC	37
3.2.4.	PCR	38
3.2.5.	GEL ELECTROFORESI.....	39
4.	RESULTATS	42
4.1.	Resultats bioinformàtics.....	42
4.2.	Resultats electroforesi.....	43
5.	ANÀLISI DE RESULTATS.....	44
III.	CONCLUSIONS	45
IV.	AGRAÏMENTS I BIBLIOGRAFIA	48
1.	AGRAÏMENTS	49
2.	BIBLIOGRAFIA.....	50
3.	WEBGRAFIA	50

Introducció

El treball de recerca, com tots sabem, és un treball molt important en el qual ens juguem molt. Tots els qui el fem, li agafem afecte ja que és fruit de molts mesos i moltes hores de treball.

El primer que cal fer és triar el tema que volem estudiar. Aquesta ha estat, potser, una de les parts més complexes del treball. Al principi és difícil pensar en algun tema concret, encara que més tard van sorgint les idees. Algunes de les que ens vàrem plantejar, eren bones, però no tenien futur a l'institut per la limitació del material d'un laboratori escolar.

Gràcies a un programa impulsat pel PCB (Parc Científic de Barcelona) he tingut l'oportunitat de fer el meu treball de genètica als seus laboratoris. La Núria Gallisa va ser la meva tutora del treball en l'àmbit pràctic. Amb ella vaig estar treballant durant unes setmanes per dur a terme l'experimentació.

La part pràctica vaig poder ampliar-la gràcies a un altre projecte de la Universitat Autònoma de Barcelona en el qual vaig poder estar dues setmanes treballant la bioinformàtica amb especialistes. La Marta Coronado Zamora fou la persona que ens va ensenyar tot el necessari per fer un programa per comparar seqüències de DNA.

Aquest contacte amb centres de recerca reals, va ser fruit de la meua insistència en quant a projectes per fer fora de l'institut. Des de 4t d'ESO m'he anat inscrivint en moltes d'aquestes d'activitats. En algunes vaig obtenir de resposta un no, però en aquesta ocasió no va ser així i vaig poder gaudir-ne d'ambdues experiències.

L'objectiu general d'aquest treball era introduir-me en la recerca biogenètica i bioinformàtica, i s'ha assolit plenament.

Concretament, he treballat amb la comparació de gens entre humans i ratolins. Es tractava de veure si fent servir *primers* de ratolí, que és una espècie model amb un genoma molt semblant a l'humà, podem amplificar una seqüència de DNA en humans i ratolins o només en ratolins.

El treball, per tant, constarà de dues parts. D'una banda començaré amb un context teòric en el que explicaré conceptes bàsics per entendre els posteriors experiments. A partir d'aquesta informació, he pogut entendre i també fer entendre la segona part d'aquest estudi, la recerca experimental. Aquesta, també estarà dividida. En la primera part faré referència a la bioinformàtica, on compararé seqüències d'un gen en diferents espècies. Per complementar aquesta recerca, explicaré la meva experiència als laboratoris del PCB, on he pogut aprendre a fer cultius, aplicar la PCR i per últim realitzar una electroforesi per veure el resultat de la PCR. Finalment hi ha un recull de les dades i l'anàlisi d'aquestes.

Espero que tothom que llegeixi el treball aprengui encara que sigui una mica, i que gaudeixi de la lectura del que explico, d'aquesta part de la ciència tan meravellosa.

I. CONTEXT TEÒRIC

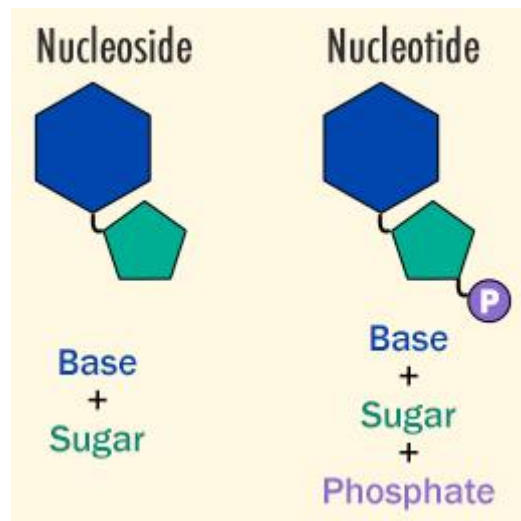
1. EL DNA

1.1. Què és el DNA

1.1.1. Estructura química

Els àcids nucleics són polímers de nucleòtids, els quals són la unió d'un nucleòsid (una ribosa o desoxiribosa unida a una base nitrogenada mitjançant un enllaç N-glicosídic) i un àcid ortofosfòric mitjançant un enllaç fosfodièster.

Per tant el DNA, és el conjunt de molts nucleòtids amb la condició de que sigui una desoxiribosa el que s'uneix amb una base nitrogenada la qual ha de ser una Adenina, una Timina, una Guanina o una Citosina. El DNA mai portarà un Uracil, en canvi l'ARN el portarà en intercanvi de la Timina.



Imatge 1: Estructura i composició de nucleòsids i nucleòtid. ¹

En aquesta imatge pot observar-se l'estructura d'un **nucleòsid**, constituït per un sucre ja sigui desoxiribosa $C_5H_{10}O_4$, o una ribosa $C_5H_{10}O_5$. Unides mitjançant un enllaç N-glicosídic (enllaç que uneix monosacàrids) amb una base nitrogenada (Adenina, Guanina, Citosina i Timina en el cas del DNA). En canvi, els **nucleòtids** són la unió d'un nucleòsid amb un grup fosfat H_3PO_4 mitjançant un enllaç fosfodièster.

¹ Imatge extreta de: <http://www.buzzle.com/articles/nucleoside-vs-nucleotide.html>

1.1.2. Doble hèlix

El DNA està format per polinucleòtids que donen lloc a dues cadenes unides mitjançant enllaços d'hidrogen. Les bases, es troben cap a l'interior de la doble espiral, i l'esquelet de sucre, és a la part exterior. Va deduir-se a partir de dades experimentals;

- La densitat i viscositat de dispersions aquoses del DNA eren superiors a les calculades. Això va permetre deduir que les dues cadenes s'unien mitjançant ponts d'hidrogen.
- El número de bases nitrogenades era igual de timina i adenina, i de citosina i guanina. Complien:

$$\frac{n^{\circ} \text{ molècules adenina}}{n^{\circ} \text{ molècules timina}} = 1$$

$$\frac{n^{\circ} \text{ molècules citosina}}{n^{\circ} \text{ molècules guanina}} = 1$$

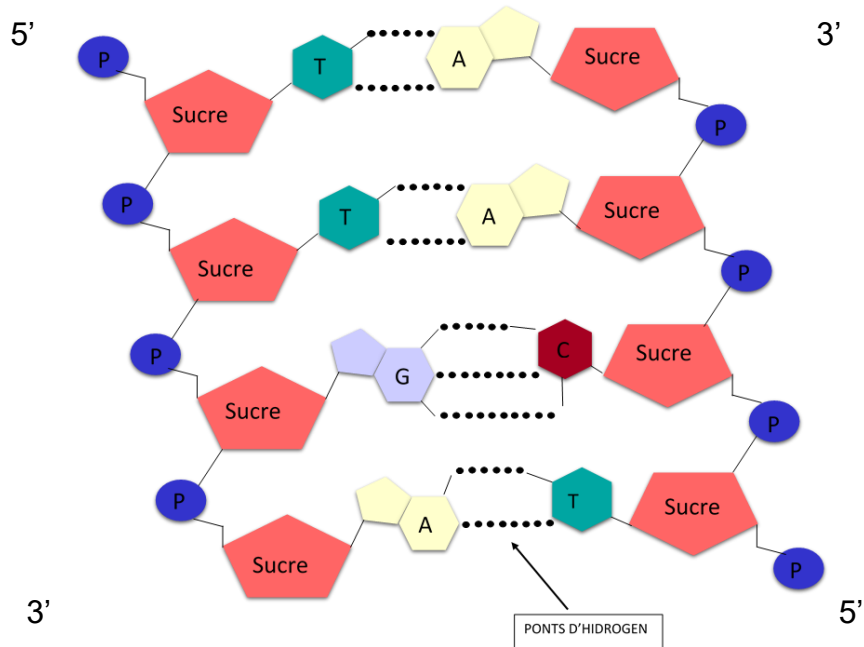
Implica que els enllaços per pont d'hidrogen es troben entre adenina i timina i per altra banda entre citosina i guanina.

A partir de les dades anteriors va elaborar-se un model de DNA, on es reflectia que estava format per dues cadenes, antiparal·leles, complementàries i enrotllades formant una doble hèlix.



Imatge2: Doble hèlix del DNA²

² Imatge extreta de: <http://www.genteknik.se/Bazment/17.aspx>



Imatge 3: Estructura de doble hèlix.³

En la imatge anterior, s'observa l'estructura química del DNA en forma de doble hèlix. A les bandes, es troben els sucres. En el cas del DNA la desoxiribosa, aquestes s'uneixen mitjançant enllaços fosfodièsters amb un grup fosfat. Cada desoxiribosa s'uneix amb una base, ja sigui púrica (adenina i guanina) o pirimidínica (timina i citosina). Com s'ha esmentat prèviament, les bases timina i adenina són suplementàries; per tant, una d'aquestes de la cadena 5'→3' s'unirà amb la de l'altra cadena 3'→5' per dos enllaços per pont d'hidrogen. En el cas de la guanina i citosina s'uneixen amb tres enllaços d'hidrogen.

³ Imatge feta per l'autora del treball.

1.1.3. Replicació del DNA

Replicació del DNA és necessària per quan un individu es reproduïx, donar-li còpies del seu material genètic al nou organisme.

Enzims necessaris per la duplicació del DNA.

Helicasa: El procés s'inicia amb ella, ja que s'encarrega de trencar els ponts d'hidrogen i per tant separa els dos filaments.

SSB o Proteïnes estabilitzadores: La seva funció és mantenir separats els dos filaments. Així es crea una forqueta de replicació.

Topoisomerases: enzims que desfan les tensions creades pel desenrotllament.

Primesa o *primer*: és un RNA-polimerasa que actua com encebador. Sintetitza un fragment curt de DNA que permet que la DNA-polimerasa actuï.

DNA-polimerasa: enzim que sintetitza DNA a en direcció 5'→3'.

Ligasa: enzim que uneix els fragments de nou DNA.

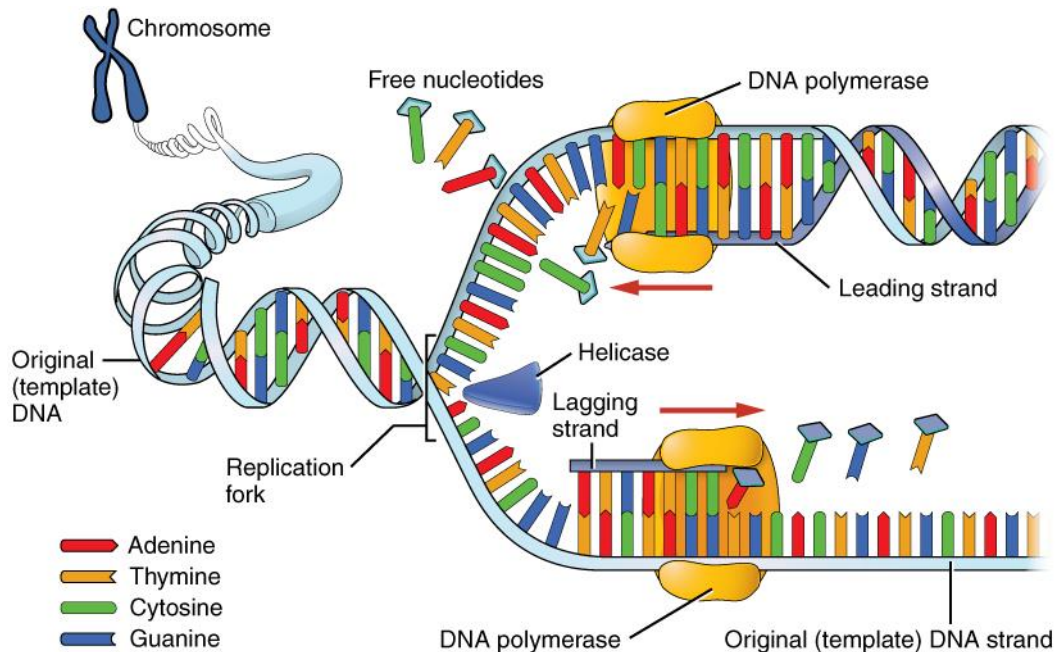
Mecanisme en eucariotes

Contempla 3 passos:

Iniciació: La replicació del DNA comença amb l'activació de l'helicasa. Aquest enzim, separa les dues cadenes del DNA. Crea una forca de replicació entre les dues cadenes. Les topoisomerases alhora que l'helicasa escindeixen les dues cadenes, eliminen les tensions que es creen pels girs que produeix l'helicasa. Les SSB s'associen a les noves cadenes i les mantenen separades.

Elongació: en aquest pas, s'uneixen els primers a les velles cadenes i creen un petit fragment complementari de RNA, d'aquesta manera la DNA-polimerasa pot començar a sintetitzar el DNA. La DNA-polimerasa tan sols pot sintetitzar en direcció 5'→3', per tant hi ha una cadena que podrà sintetitzar-se de manera continua, però l'altra serà fragmentada. S'anomenen cadena continua i cadena retardada respectivament, l'última creada per petits fragments anomenats fragments d'Okazaki.

Terminació: Les dues cadenes han estat replicades totalment i per tant s'obtenen dues noves molècules de DNA idèntiques.



Imatge 2 Enzims per a la duplicació del DNA⁴

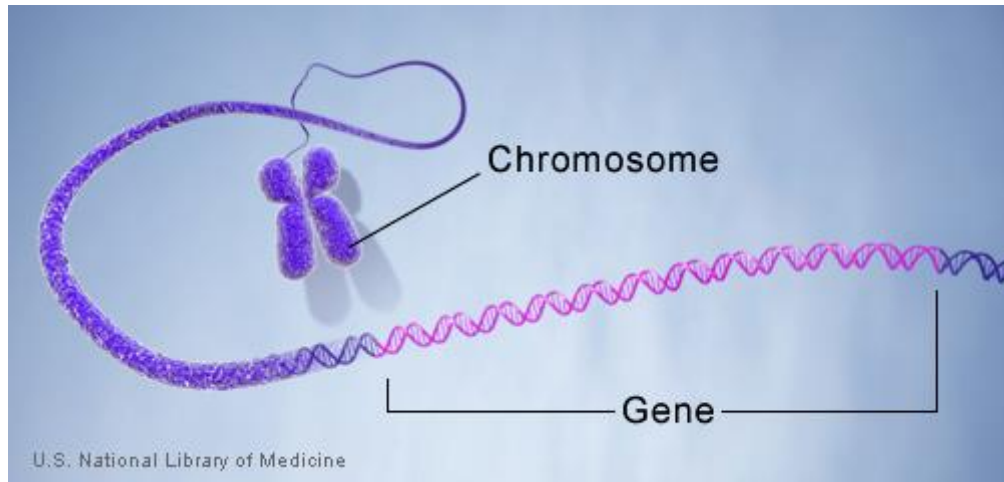
2. ELS GENS

2.1. Definició

Gregor J. Mendel (1822-1884) va estudiar la herència dels caràcters. Ell en tot moment va parlar de caràcter i mai va fer menció als gens.

Els caràcters, més tard, s'observà que necessitaven una codificació i va veure's que el DNA tenia segments on es codificaven diferents proteïnes, diferents per cada caràcter. Aquests segments són els gens.

⁴ Imatge extreta de: <http://philschatz.com/anatomy-book/contents/m46073.html>



Imatge 3: Gens del DNA⁵

Cada persona té dos gens de cada caràcter, un heretat del pare i altre de la mare. El canvi de tan sols una base en un gen pot crear grans deficiències en l'organisme perquè la proteïna no podrà codificar-se correctament.

2.2. Gen NBS 1

En aquesta recerca es treballarà amb el gen NBS1 i per això es fa una descripció en aquest apartat.

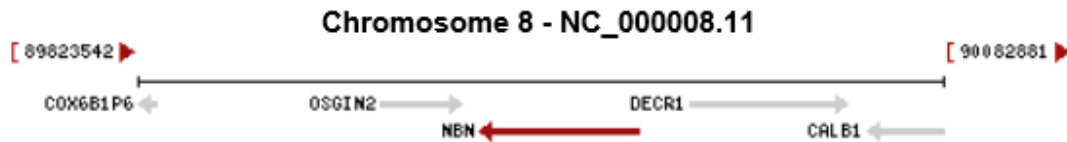
Homo sapiens

NBS1 és una part de la seqüència del gen NBN de la proteïna anomenada Nibrin.⁶ El NBS1 forma part del complex MRN que té un paper de gran importància davant les reparacions del DNA.

Es troba al cromosoma 8 (8q21) a l'exó 19.

⁵ Imatge extreta de: <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/basics/gene>

⁶ Nibrin: proteïna encarregada de la reparació de la doble cadena del DNA d'un genoma.



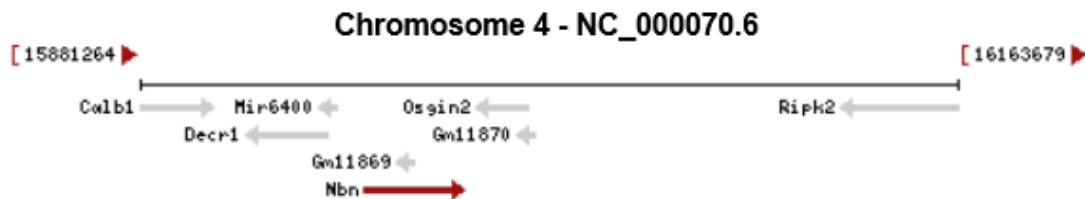
Imatge 4 Localització del gen NBS1 en humans⁷

En aquesta imatge pot observar-se la localització del gen al seu cromosoma i quins són els seus gens anteriors i posteriors.

Mus musculus

El seu símbol oficial és NBN procedent de la proteïna Nibrin, amb la mateixa funció que en els humans.

Es troba en el cromosoma 4 a l'exó 16.



Imatge 5 Localització del gen NBS1 en ratolins

A la imatge s'observa que el cromosoma al qual pertany el gen NBS1 en ratolins és el 4 i poden diferenciar-se els gens contigus.

⁷ Imatge extreta de la web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4683>

3. AMPLIFICAR UN GEN

3.1. Concepte

Amplificació: és l'increment de còpies d'un fragment del DNA que ja teníem, ja sigui delimitat o no.

Hi ha ds tipus:

- I) Amplificació gènica, que és l'augment de còpies d'un fragment de DNA. No sol produir-se en mamífers. Provocaria inestabilitat genètica.
- II) Amplificació genètica: basada en la PCR, tècnica amb la qual s'obtenen moltes còpies d'un fragment delimitat de DNA.

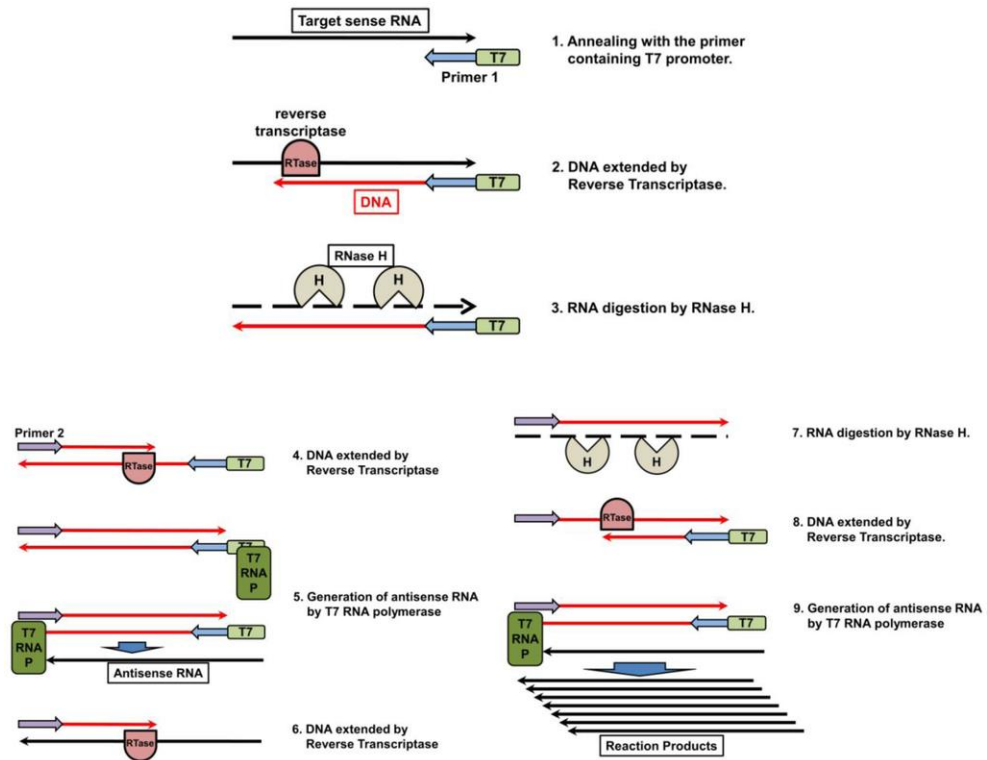
3.2. Finalitat

Les tècniques per amplificar el DNA, facilita el descobriment del virus o bacteri que causa una malaltia, facilita l'anàlisi forense com per identificar cadàvers o també per seguir la investigació genètica.

3.3. Mètodes d'amplificació

Avui dia hi ha moltes tècniques per l'amplificació genètica, tot i així la més popular i més antiga és la PCR (Polymerase Chain Reaction). Hi ha d'altres com:

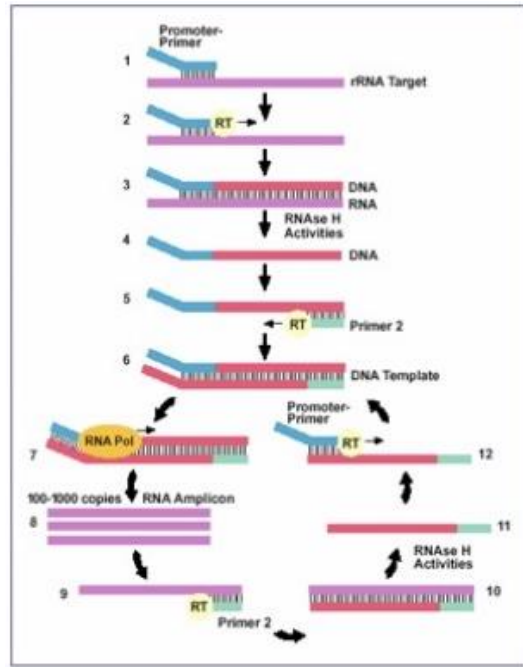
- NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based): És una tècnica isotèrmica. Utilitza tres enzims: transcriptasa inversa RNasa H i una ARN-polimerasa. No produeix DNA sinó que RNA a partir de DNA.



Imatge 6 Mètode d'amplificació NASBA⁸

⁸ Imatge extreta de <http://www.mdpi.com/1999-4915/4/8/1235/htm>

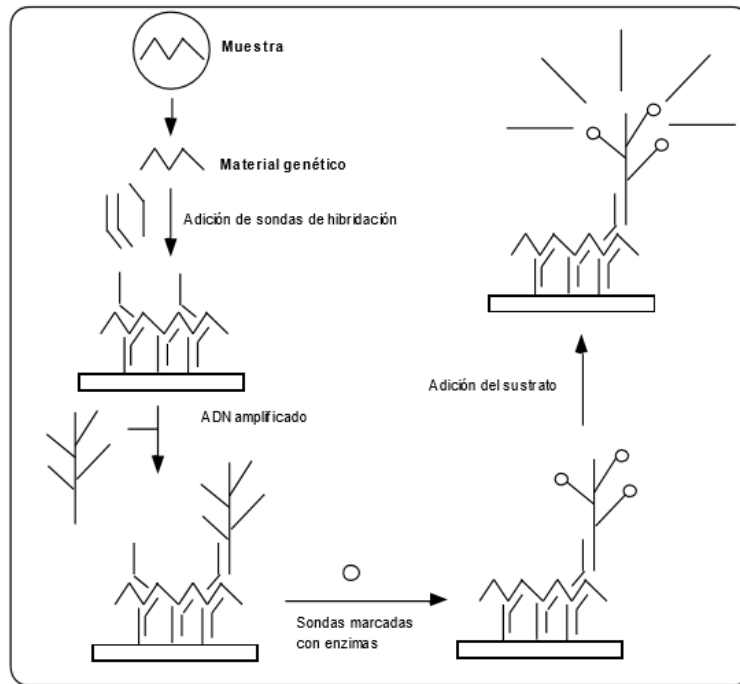
- TMA (Transcription Mediated Amplification) : És una tècnica isotèrmica que utilitza la transcripció del RNA i la síntesi del DNA per produir l'amplificació del RNA i/o DNA.



Imatge 7 Mètode d'amplificació TMA⁹

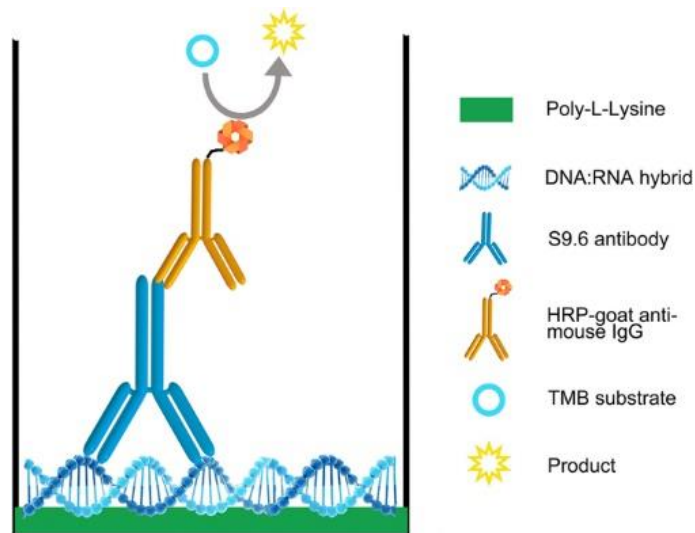
- bDNA (Branched DNA probes): Aquesta tècnica es basa en l'amplificació d'una senyal que es lliga al RNA viral, AND ramificat. Es realitza a partir de l'extracció de l'àcid nucleic en partícules virals. Cal un gran volum de mostra.

⁹ Imatge extreta de <http://www.slideshare.net/pmerel/2011-course-on-molecular-diagnostic-automation-part-2-amplification>



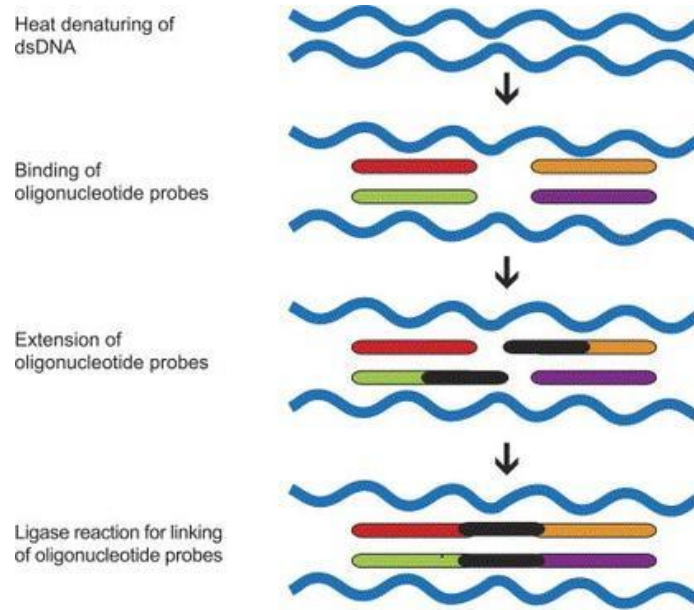
Imatge 8 Mètode d'amplificació bDNA

- Hybrid Capture- Anti-DNA-RNA hybrid antibody: tècnica basada en la formació d'un híbrid mixta i la posterior captació per anticossos anti-híbrids DNA-ARN.



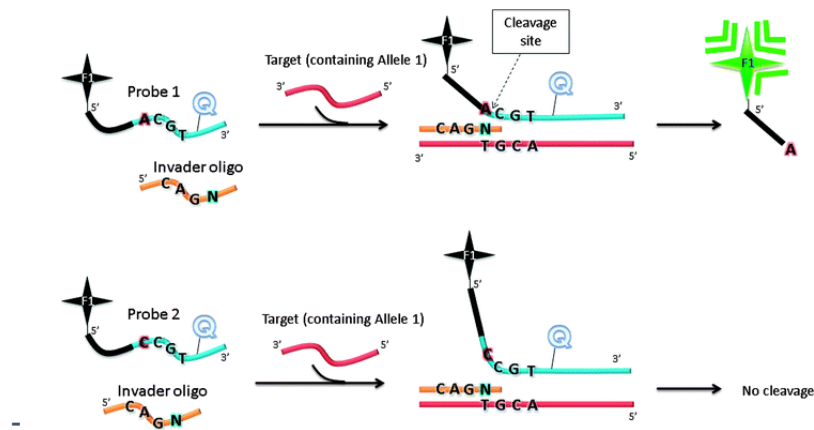
Imatge 9 Mètode d'amplificació Hybrid Capture

- LCR (Ligase Chain Reaction): Mètode d'amplificació de DNA similar a la PCR. S'utilitzen dues sondes per cada cadena de DNA i s'uneixen per formar una única sonda. Utilitza l'enzim DNA-polimerasa i la ligasa.



Imatge 10 Mètode d'amplificació LCR¹⁰

- Cleavase Invader (FEN-1 DNA polymerase cleavease): tècnica que utilitza una estructura específica endonucleasa (FEN), per escindir un complex tridimensional format per la hibridació d'oligonucleòtids específics d'al·lel amb el DNA diana.



Imatge 11 Mètode d'amplificació Cleavase Invader¹¹

¹⁰ Imatge extreta de <http://udapbio.wikispaces.com/Alan+Y>

¹¹ Imatge extreta de: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/mb/c3mb70304e>

4. MÈTODE D'AMPLIFICACIÓ: LA PCR

La PCR¹² (polymerase chain reaction) és un conjunt de reaccions químiques en cadena en les qual s'amplifica una seqüència determinada del DNA; és a dir, s'obtenen moltes repeticions de la seqüència.

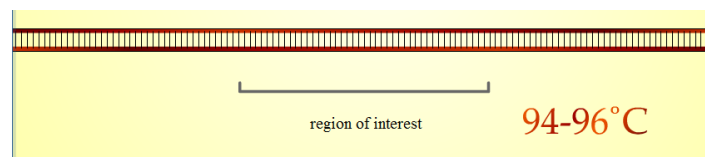
Per dur-la a terme necessitem el DNA amb una seqüència diana, la DNA-polimerasa resistent a la calor, els quatre tipus de nucleòtids i dos segments de DNA que actuen com a encebadors, els *primers*.

Per tal d'obtenir una seqüència amplificada del DNA s'ha de tractar en diferents cicles en els quals s'ha de pujar i baixar la temperatura.

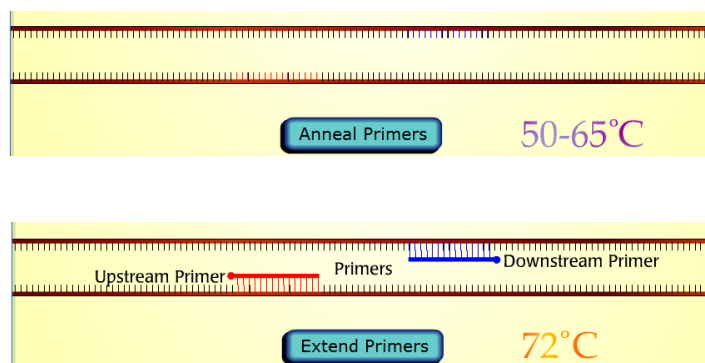
Procediment:

1. Primer cicle

Es puja la temperatura fins arribar als 95°C. Així, la polimerasa s'activa i el DNA es desnaturalitza.¹³



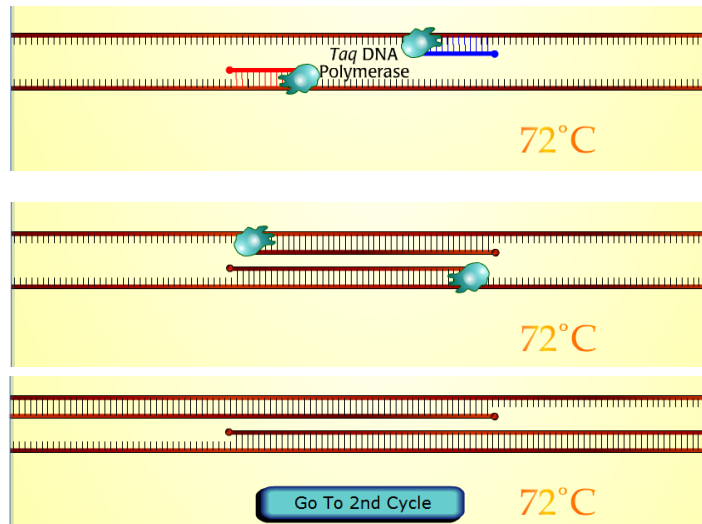
Es baixa la temperatura fins als 50-56°C per permetre als *primers* anellar-se a la complementaria. Pugem fins a 72°C on comença la síntesi del DNA.



¹² Veure annex 7 per l'explicació del cicle.

¹³ Imatges proporcionades per la tutora del treball en el PCB.

2. Segon cycle.



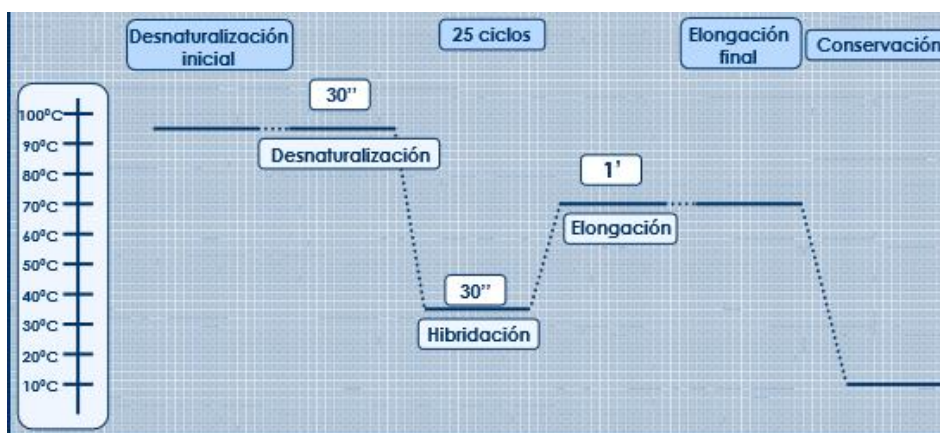
Es repeteixen els mateixos passos que al primer cycle i queden 4 cadenes.

3. Tercer cycle

El primer cycle es repeteix en cada cadena i s'adquireixen el doble.

Així successivament fins a arribar a tenir moltes vegades la mateixa seqüència.

Per últim es té lloc l'elongació del DNA.



Imatge 12 Gràfic del procés de la PCR¹⁴

¹⁴ Imatge extreta de:

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>

En la imatge veiem pels processos que passa el DNA mentre es produeix l'amplificació mitjançant la PCR. El temps i temperatura poden variar segons la mostra que s'estudia.

5. COMPARACIÓ DE GENS DE DIFERENTS ESPÈCIES

Treballar amb altres espècies, gens equivalents als humans és molt important per a la recerca al laboratori. Treballar amb cèl·lules que no siguin humanes és més fàcil que no pas feinejar amb cèl·lules humanes, per tant treballar amb gens d'altres espècies ens facilitaran l'estudi. A més, hi ha espècies que tenen una taxa de reproducció més elevada que la dels humans i això permetrà veure els canvis produïts en el genoma en un menor temps.

Hi ha moltes espècies que tenen un genoma quasi bé igual que el nostre i això ens permet obtenir resultats força fiables.

La comparació de les seqüències genètiques és molt important per a diferents àmbits científics:

- Evolució: gràcies a la comparació de les seqüències es pot observar els parentescs entre diferents espècies; per tant, pot observar-se l'evolució d'aquestes.
- Medicina: s'han fet molts avenços mèdics, sobretot de malalties genètiques, gràcies a la seqüenciació dels genomes i amb la seva posterior comparació.
- Biologia: l'estudi de les seqüències pot permetre conèixer mecanismes biològics com el de la síntesi de proteïnes.

II. RECERCA

EXPERIMENTAL

1. OBJECTIUS I HIPÒTESI

La meua recerca ha consistit en comparar la seqüència d'un mateix gen en dues espècies diferents: *Homo sapiens* i *Mus musculus*.

Aquesta finalitat l'he dut a terme en dues parts. Una primera en la que he elaborat un programa informàtic per comparar les seqüències del gen en les dues espècies i una altra que ha consistit en aïllar aquest gen en els dos tipus de cèl·lules.

Per tant, els objectius concrets de la recerca són els següents:

1. Caracteritzar un gen concret en ratolí i en humans.
2. Comprovar si el *primer* d'un gen en ratolins es pot fer servir per amplificar el mateix gen en humans.
3. Comparar les seqüències dels gens en humans i ratolins

Les hipòtesis del treball són:

1. Pot ser que el gen NBS1 de les cèl·lules HEK293 no s'amplifiqui si es fa servir un *primer* de ratolí del mateix gen.

2. TREBALL BIOINFORMÀTIC

La bioinformàtica és la ciència que, amb la tecnologia, organitza i analitza la informació biològica per resoldre preguntes que es planteja aquesta ciència.

La bioinformàtica crea programes per tal de solucionar problemes biològics.

En aquest cas s'ha estudiat la bioinformàtica des del punt de vista genètic.

Per tal de crear un programa informàtic són necessàries nocions bàsiques de programació. La creació de programes aplicats a la recerca biològica és una tasca de la bioinformàtica que ha esdevingut imprescindible actualment. En aquest treball s'ha fet servir el llenguatge *Perl*.

Perl (*Practical Extraction and Report Language*) és un llenguatge utilitzat en la programació que pot cercar, extreure i manipular cadenes de text (DNA).

2.1. Programa elaborat per comparar seqüències de gens ¹⁵

A continuació es mostra el programa elaborat escrit en llenguatge *Perl*, el qual ens donarà la informació que li demanem per cada seqüència.

El programa està creat per tal que ens doni una informació determinada per cada seqüència que se li obre.

La primera informació que demanem al programa és la seqüència del gen que s'estudia, el gen NBS1. La longitud de la cadena pot variar segons l'espècie per tant, també ens proporcionarà la longitud de la cadena. I d'aquesta, la complementària revers i la complementària, on la complementària revers és la complementària de la cadena però des de 3' → 5' en canvi la complementària és la complementària de la mateixa cadena però en sentit 5' → 3'. A més a més el programa també ens permet conèixer la cadena de l'ARN resultant, el nombre d'unitats de cada base – adenina, timina, citosina i guanina- i, finalment, la proteïna.

¹⁵ Pot veure's video realitzat durant les Estades Argó amb informació sobre el programa:
<https://www.youtube.com/watch?v=OKGvIFL1IB4>


```

*C:\Users\tania_000\Desktop\UAB\Programa final\final.pl - Notepad++
Archivo  Editar  Buscar  Vista  Codificaci3n  Lenguaje  Configuraci3n  Macro  Ejecutar  Plugins  Ventana  ?
final.pl x
1  #COS DEL PROGRAMA
2
3  print "Please type the filename of the DNA sequence data: ";
4  $filename = <STDIN>;
5  chomp $filename;
6
7  #SUBROUTINA 1 get_file_data
8  (@fasta_file_data)= get_file_data ($filename);
9  open (FILE, "> resultats.txt");
10 $string = <FILE>;
11 print FILE "@fasta_file_data\n\n";
12
13 #SUBROUTINE 2 treure la seqüència de DNA
14 ($sequence)= extract_sequence_from_fasta_data (@fasta_file_data);
15 $longitud= length $sequence; #fem sense cap subrutina el càlcul de la longitud de la nostra seqüència
16 print "Longitud=$longitud\n";
17 $string =< FILE>;
18 print FILE "La longitud és: $longitud\n\n";
19
20 #SUBROUTINE 3 fem la complementària reversa
21 $revcom= revcom ($sequence);
22 print "\n La complementària reversa és: $revcom";
23
24 $string =< FILE>;
25 print FILE "La cadena complementària reversa és: $revcom\n\n";
26
27 #SUBROUTINA 4 fem la complementària
28 $com= complement ($sequence);
29 print "\n La cadena complementària és: $com";
30
31 $string =< FILE>;
32 print FILE "La cadena complementària és: $com\n\n";
33
34 #SUBROUTINA 5 passem el DNA a RNA
35 $RNA = RNA ($sequence);
36 print "\n L'ARN resultant de la seqüència de DNA és: $RNA";
37
38 $string =< FILE>;
39 print FILE "L'ARN resultant és: $RNA\n\n";
40
41 #SUBROUTINA 6 fem el càlcul de A, C, G, T, els errors i de CG per tal de calcular el %
42 ($count_of_A,$count_of_C, $count_of_G, $count_of_T, $errors, $GC) = nucleotides ($sequence);
43 print "\n Hi ha $count_of_A A";
44 $string =< FILE>;
45 print FILE "El número d'A és: $count_of_A\n\n";
46
47 print "\n Hi ha $count_of_C C";
48 $string =< FILE>;
49 print FILE "El número de C és: $count_of_C\n\n";
50
51 print "\n Hi ha $count_of_G G";

```

```

52  $string =< FILE>;
53  print FILE "El número de G és: $count_of_G\n\n";
54
55  print "\n Hi ha $count_of_T T";
56  $string =< FILE>;
57  print FILE "El número de T és: $count_of_T\n\n";
58
59  print "\n Hi ha $errors errors";
60  $string =< FILE>;
61  print FILE "El número d'errors és: $errors\n\n";
62
63  print "\n Hi ha $GC GC";
64  $string =< FILE>;
65  print FILE "El número de GC és: $GC\n\n";
66
67  #SUBROUTINA 7 passem el RNA a proteïna i contem els codons
68  ($protein, $count_codon) = translate ($sequence);
69  print "\n. La proteïna resultant és: $protein";
70
71  $string =< FILE>;
72  print FILE "\n\nLa proteïna resultant és: $protein\n\n";
73
74  print "\nEn aquesta proteïna hi ha $count_codon codons";
75
76  $string =< FILE>;
77  print FILE "\n El número de codons és: $count_codons\n\n";
78
79  # SUBROUTINE 8 fasta de la proteïna final
80  print "\n>id \n";
81  open (FILE, ">fasta.txt");
82  $string =< FILE>;
83  print FILE "\n>id\n";
84
85  print_protein ($protein, 20);
86  #-----SUBROUTINES-----
87
88  #1
89
90  # get_file_data
91  # A subroutine to get data from a file given its filename
92
93  sub get_file_data {
94    my($filename) = @_;
95    my @fasta_file_data = ( );
96    unless( open(FILEDATA, $filename) ) {
97      print "Cannot open file \"$filename\"\n\n";
98      exit;
99    }
100    @fasta_file_data = <FILEDATA>;
101    close FILEDATA;
102    return @fasta file data;

```

```

103  }
104
105
106  #2
107  # extract_sequence_from_fasta_data
108  # A subroutine to extract FASTA sequence data from an array
109
110  sub extract_sequence_from_fasta_data {
111      my(@fasta_file_data) = @_ ;
112      # Declare and initialize variables
113      my $sequence = "";
114      foreach my $line (@fasta_file_data) {
115          if($line =~ /^>/) {
116              next;
117          } else {
118              $sequence .= $line;
119          }
120      }
121      $sequence =~ s/\s//g;
122      return $sequence;
123  }
124
125  #3
126  sub revcom {
127      my ($DNA) = @_;
128      $revcom= reverse $DNA;
129      $revcom=~ tr/ACGTacgt/TGCAtgca/;
130      return ($revcom);
131  }
132  #4
133  sub complement {
134      my ($DNA) = @_;
135      $DNA=~ tr/ACGTacgt/TGCAtgca/;
136      return ($DNA);
137  }
138  #5
139  sub RNA {
140      my ($DNA) = @_;
141      $DNA=~ tr/Tt/Uu/;
142      return ($DNA);}
143
144  #6
145  sub nucleotides {
146      my ($DNA) = @_;
147      $DNA =~ uc $DNA;
148      @DNA = split(' ', $DNA);
149      $count_of_A = 0;
150          $count_of_C = 0;
151          $count_of_G = 0;
152          $count_of_I = 0;
153          $errors      = 0;

```

```

154 foreach $base (@DNA) {
155     if ( $base eq 'A' ) {
156         ++$count_of_A;
157     } elsif ( $base eq 'C' ) {
158         ++$count_of_C;
159     } elsif ( $base eq 'G' ) {
160         ++$count_of_G;
161     } elsif ( $base eq 'T' ) {
162         ++$count_of_T;
163     } else {
164         print "!!!!!!! Error - I don't recognize this base: $base\n";
165         ++$errors;
166     }
167 }
168 $GC = ($count_of_C + $count_of_G)/($count_of_A+ $count_of_C+ $count_of_G+ $count_of_T);
169 return ($count_of_A,$count_of_C, $count_of_G, $count_of_T, $errors, $GC);
170 }
171 #7
172 sub translate{
173     my ($DNA) = @_;
174     $DNA= uc $DNA;
175     my $protein = "";
176     my (%codi_genetic)=(
177     'TCA' => 'S',      # Serine
178     'TCC' => 'S',      # Serine
179     'TCG' => 'S',      # Serine
180     'TCT' => 'S',      # Serine
181     'TTC' => 'F',      # Phenylalanine
182     'TTT' => 'F',      # Phenylalanine
183     'TTA' => 'L',      # Leucine
184     'TTG' => 'L',      # Leucine
185     'TAC' => 'Y',      # Tyrosine
186     'TAT' => 'Y',      # Tyrosine
187     'TAA' => '!',      # Stop
188     'TAG' => '!',      # Stop
189     'TGC' => 'C',      # Cysteine
190     'TGT' => 'C',      # Cysteine
191     'TGA' => '!',      # Stop
192     'TGG' => 'W',      # Tryptophan
193     'CTA' => 'L',      # Leucine
194     'CTC' => 'L',      # Leucine
195     'CTG' => 'L',      # Leucine
196     'CTT' => 'L',      # Leucine
197     'CCA' => 'P',      # Proline
198     'CCC' => 'P',      # Proline
199     'CCG' => 'P',      # Proline
200     'CCT' => 'P',      # Proline
201     'CAC' => 'H',      # Histidine
202     'CAT' => 'H',      # Histidine
203     'CAA' => 'Q',      # Glutamine
204     'CAG' => 'Q',      # Glutamine

```

```

205     'CGA' => 'R',    # Arginine
206     'CGC' => 'R',    # Arginine
207     'CGG' => 'R',    # Arginine
208     'CGT' => 'R',    # Arginine
209     'ATA' => 'I',    # Isoleucine
210     'ATC' => 'I',    # Isoleucine
211     'ATT' => 'I',    # Isoleucine
212     'ATG' => 'M',    # Methionine
213     'ACA' => 'T',    # Threonine
214     'ACC' => 'T',    # Threonine
215     'ACG' => 'T',    # Threonine
216     'ACT' => 'T',    # Threonine
217     'AAC' => 'N',    # Asparagine
218     'AAT' => 'N',    # Asparagine
219     'AAA' => 'K',    # Lysine
220     'AAG' => 'K',    # Lysine
221     'AGC' => 'S',    # Serine
222     'AGT' => 'S',    # Serine
223     'AGA' => 'R',    # Arginine
224     'AGG' => 'R',    # Arginine
225     'GTA' => 'V',    # Valine
226     'GTC' => 'V',    # Valine
227     'GTG' => 'V',    # Valine
228     'GTT' => 'V',    # Valine
229     'GCA' => 'A',    # Alanine
230     'GCC' => 'A',    # Alanine
231     'GCG' => 'A',    # Alanine
232     'GCT' => 'A',    # Alanine
233     'GAC' => 'D',    # Aspartic Acid
234     'GAT' => 'D',    # Aspartic Acid
235     'GAA' => 'E',    # Glutamic Acid
236     'GAG' => 'E',    # Glutamic Acid
237     'GGA' => 'G',    # Glycine
238     'GGC' => 'G',    # Glycine
239     'GGG' => 'G',    # Glycine
240     'GGT' => 'G',    # Glycine
241     );
242     for (my $i=0; $i<( length($DNA) - 2) ; $i+= 3)
243     {
244         $codon = substr($DNA, $i,3);
245         if(exists $codi_genetic{$codon})
246         {
247             $aminoacid = $codi_genetic {$codon};
248             $protein .= $aminoacid;
249             $count_codon++;
250         }
251         else
252         {
253             print "Bad codon \"\$codon\"!!\n";
254             exit;
255         }

```

```

256     }
257     return ($protein, $count_codon);
258 }
259 #8
260 sub print_protein {
261     my($sequence, $X) = @_ ;
262     my $line;
263     for ( my $pos = 0 ; $pos < length($sequence) ; $pos += $X ) {
264         $line = substr($sequence, $pos, $X);
265         print $line . "\n";
266         print FILE " $line";
267     }
268 }
269 }
270

```

FUNCIONAMENT DEL PROGRAMA

Amb el programa escrit i guardat en format *perl*, s'ha d'obrir una finestra de comandaments (CMD- command line) on s'ha de posar l'itinerari per obrir el programa i la seqüència. És a dir, el programa en aquest cas està guardat en una carpeta de l'escriptori; per tant, hem de canviar la direcció de la finestra de comandaments començant la frase per *cd* (change directory) i el directori.

Exemple: `cd C:\Users\tania_000\Desktop\tr\sequences`

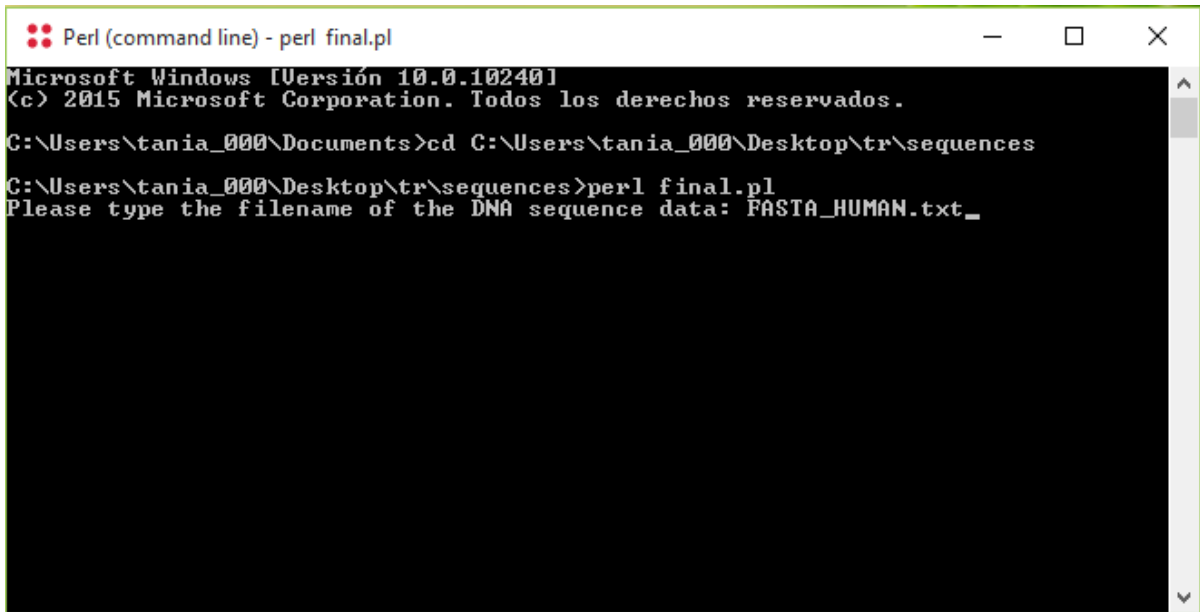
D'aquesta manera hem canviat el directori i el programa buscarà arxius només en la carpeta que li hem indicat.

Per començar amb el programa hem de escriure el llenguatge en que està escrit i el nom de l'arxiu.

Exemple: `perl final.pl`

Després d'haver posat el nom del programa, ja el tenim obert. Hem establert que el primer que faci el programa sigui preguntar-nos el fitxer que s'ha d'obrir, que és on està guardada la seqüència corresponent. Ordenem al programa obrir aquest arxiu, i la última ordre que li hem donat és que els resultats els guardi en un altre arxiu de text.

Així, es guarda un nou document el qual ofereix tota la informació del programa per cada seqüència.



```
Perl (command line) - perl final.pl
Microsoft Windows [Versión 10.0.10240]
(c) 2015 Microsoft Corporation. Todos los derechos reservados.
C:\Users\tania_000\Documents>cd C:\Users\tania_000\Desktop\tr\sequences
C:\Users\tania_000\Desktop\tr\sequences>perl final.pl
Please type the filename of the DNA sequence data: FASTA_HUMAN.txt_
```

Imatge 13 Exemple de finestra de comandaments que permet obrir el programa¹⁶

3. TREBALL DE LABORATORI

En aquesta part del treball el que s'ha fet és aïllar el gen que volem estudiar tant en els ratolins com en els humans. Per això cal un treball previ al laboratori per cultivar les cèl·lules d'on extraurem el DNA del que, posteriorment aïllarem el gen.

¹⁶ Imatge feta per l'autora del treball.

3.1. Material

El material utilitzat és el que pot trobar-se habitualment en un laboratori de recerca biomèdica a més dels gens concrets en els que es centra la recerca.

S'adjunta una relació del material.

- **Cultiu cel·lular.**

- **Microscopi òptic.** Amb ell observarem les cèl·lules.

- **Cèl·lules Hek293.**¹⁷

- **Cèl·lules MEFs.** ¹⁸

- **Campana de flux laminar.** S'utilitza per mantenir un ambient de treball estèril. És una campana de bioseguretat de nivell 2.¹⁹

- **Pipetes i puntes estèrils.** Es fan servir per cultivar les cèl·lules. S'utilitzen per mesurar volum de líquids. Per al cultiu cel·lular s'utilitzen puntes estèrils.

- **Bomba de buit i pipetes Pasteur.** Es fa servir per extreure el medi sobrant en cultius.

- **Tripsina.** És un enzim que desfà les unions extracel·lulars. S'utilitza per desenganxar les cèl·lules de la placa de cultiu.

- **PBS.** (Phosphate buffered saline). És un tampó que s'utilitza com a solució de rentat.



Imatge 14 Campana de flux laminar

¹⁷ Les cèl·lules HEK293 són cèl·lules humanes procedents dels ronyons d'embrions avortats.

Encara que no són bons models de cèl·lules renals, si que poden ser favorables a la transfecció de vectors i investigacions de retrovirus. Les línies cel·lulars 293 són molt utilitzades per a la recerca bàsica ja que creixen fàcilment, són fàcilment transfectables i molt útils per obtenir recombinant. Veure més informació a l'annex 3

¹⁸ Les cèl·lules MEFs (Mouse Embryo Fibroblast) són fibroblasts de ratolí embrionari, és a dir cèl·lules del teixit conjuntiu. Sintetitzen i manté la matriu extracel·lular produint: col·lagen, substància amorfa i proteïnes fibroses. Veure més informació a l'annex 4

¹⁹ Imatge feta per l'autora del treball

- **Medi.** DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) és un medi de cultius de *Life Technologies invitrogen* en el quals s'han d'afegir un 10% de FBS (Fetal Bovine Serum) perquè el requereix, i un 1% de PS (Penicillin-Streptomycin) que és un antibiòtic que pot posar-se però no és obligatori.
- **Incubadora.** Aparell que mantindrà constant la temperatura a 37°C, amb una humitat determinada i amb el 5% de CO₂ de manera que el pH sigui més estable, es diu que està en una atmosfera enriquida amb 5-7% de CO₂.
 $H_2 + CO_2 = H_2CO_3$
- **Rasqueta.** Rasqueta esterilitzada que permet desadherir les cèl·lules i obtenir-les en un eppendorf.
- **Eppendorfs.** Tubs d'assaig per a volums petits.
- **Micropipetes.** Pipetes amb més precisió per a microvolums
- **Centrifugadora.** Centrifuga les mostres.
- **Isopropanol.** C₃H₈O
- **Etanol.** C₂H₅OH
- **Buffer.** S'ha de fer. (ANNEX)
- **Guants.** Per no contaminar les mostres
- **Barret, bata, peücs.** Per mantenir l'ambient estèril de la sala de cultius.
- **Gel d'Agarosa.** Gel pel qual correran les mostres depenent les seves carregues.

3.2. Metodologia

La finalitat de la recerca, com s'ha dit, és arribar a amplificar el gen NBS1. Per això s'han seguit diferents passes: observar les cèl·lules per a conèixer-les, obtenir les cèl·lules vives, realitzar la lisi de les cèl·lules i extreure'n el DNA. A partir d'aquí, ja es pot amplificar el DNA amb la tècnica de la PCR i practicar l'electroforesi per comprovar si s'ha amplificat.

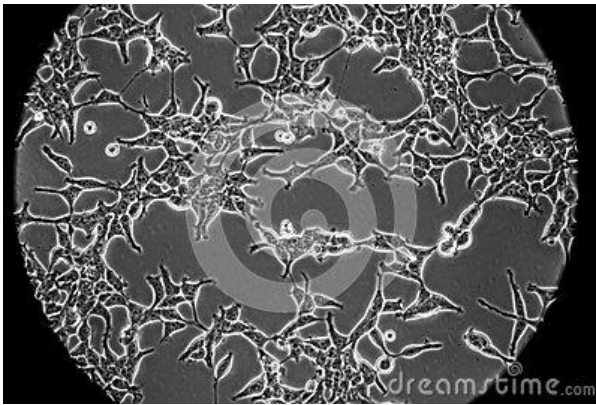
3.2.1. Observació

Abans de començar a estudiar i treballar amb unes cèl·lules, hem de conèixer-les i saber identificar-les.

Les cèl·lules estaven a una incubadora, i hi havia cèl·lules que estaven mortes per la superfície que més tard s'havia d'extreure.

Procediment:

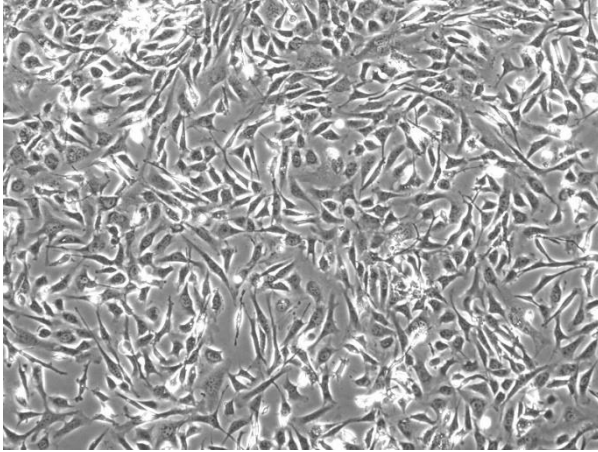
A partir dels cultius previs s'observen les cèl·lules al microscopi òptic; es posa especial atenció a la seva geometria, grandària...



Les cèl·lules HEK293 tenen una forma allargada i més triangular

Imatge 15 Cèl·lules HEK293 a 400x²⁰

²⁰ Imatge extreta de: <http://es.dreamstime.com/imagen-de-archivo-libre-de-regal%3%ADas-c%3%A9lulas-embriónicas-humanas-del-ri%3%B1%3%B3n-293-hek293-image26920616>



Les cèl·lules MEFs tenen una forma allargada i aplanada

Imatge 16 Cèl·lules MEFs a 100x²¹

3.2.2. Cultius:

Les cèl·lules HEK293 van arribar al laboratori ja a punt per el *scrap*²²

Per obtenir les cèl·lules de ratolí, les MEFs, s'ha hagut de treballar en una sala de cultius i seguir el següent procediment.

Procediment:

- I) Treure el medi de la placa, amb compte de no emportar-se totes les cèl·lules. El medi s'ha de treure amb una punta connectada a la bomba de buit.
- II) Rentar la placa amb la solució tampó PBS, de manera que les cèl·lules mortes tornen a quedar a la superfície. És a dir, amb una pipeta afegeixo el PBS a la placa.
- III) Moure la placa per tal que el PBS arribi a tota ella.
- IV) Treure el PBS que havia afegit, amb una pipeta connectada a la bomba de buit tenint cura de no emportar-me totes les cèl·lules i només agafar el PBS i les cèl·lules mortes.
- V) Afegir la tripsina a la placa amb una pipeta, sempre esterilitzada.
- VI) Deixar que la tripsina s'activi a la incubadora durant 5 minuts a 37°C.
- VII) Després d'esperar els 5 minuts la tripsina ja s'ha activat i afegeixo 7ml de medi amb una pipeta.

²¹ Imatge extreta de:

<http://www.sciencellonline.com/OLDSITE/site/productInformation.php?keyword=M7540-mt>

²² Scrap: Significa separar les cèl·lules que están unides a la placa de petri

- VIII) Les cèl·lules que tinc ara he de deixar-les a la incubadora a 37°C ON (*over night* / durant tota la nit). D'aquesta manera les cèl·lules s'adhereixen a la placa.



Imatge 17 Incubadora²³

SCRAP THE CELLS.

Amb les cèl·lules adherides a la placa, volem obtenir-les, però en un eppendorf²⁴ ja que ens serà més fàcil treballar-les des de l'eppendorf.

Procediment:

- l) Per tal d'obtenir les cèl·lules en un eppendorf, s'ha de separar les cèl·lules de la superfície de la placa amb una rasqueta.²⁵



Imatge 18 Rasquetes per desadherir les cèl·lules

²³ Imatge extreta de: <http://www.medicalexpo.es/prod/eppendorf-ag/product-68382-445698.html>

²⁴ Eppendorf se li diu a un tub d'assaig petit

²⁵ Imatge extreta de: <http://www.biologixgroup.com/Products/Tissue/Lifter/>

Amb una micropipeta, s'ha d'agafar les cèl·lules de les plaques, i deixar anar el contingut en un eppendorf.

- II) S'incuben les cèl·lules tota la nit a 56°C.

3.2.3. LISI I EXTRACCIÓ DEL DNA GENÒMIC

Es duu a terme la lisis de les cèl·lules amb la qual es trenquen les membranes i surt el material intracel·lular al medi. Això ens permetrà aïllar el DNA genòmic.

Protocol:

- I) Es centrifuguen les mostres de l'eppendorf 15 minuts per obtenir el *pellet*²⁶ en la part inferior de l'eppendorf.
- II) Amb una micropipeta, s'ha de treure la part superior, perquè el DNA genòmic queda al *pellet*.
- III) S'ha de posar 0,5 ml d'isopropanol (2-propanol). Alcohol, per la dissolució del DNA. D'aquesta manera es neteja i s'obté altre *pellet* per purificar la mostra. Així obtenim el DNA i agitant l'eppendorf es pot veure. Es diu medusa²⁷ al DNA que s'obté en aquest moment.
- IV) S'ha de centrifugar altra vegada. El DNA queda com a *pellet*. Ja teníem el DNA, però l'hem de continuar purificat.
- V) S'ha de treure la part superior, sense treure el *pellet*.
- VI) S'ha d'afegir 0,5 ml d'etanol que neteja el DNA, i agitar l'eppendorf.
- VII) Es centrifuga 3 minuts.
- VIII) S'obté el DNA genòmic com a *pellet* net i es descarta la part que no sigui *pellet*.



Imatge 19 DNA medusa

²⁶ S'anomena *pellet* a la solució obtinguda del DNA.

²⁷ Imatge feta per l'autora del treball.

- IX) Per tal de no obtenir resultats erronis, s'ha de treure tot l'etanol i es posen a assecar els eppendorfs perquè l'etanol s'evapori (ho deixem a una cabina). El temps que es deixa els eppendorfs no està establert, s'ha de deixar uns minuts, els suficients per a l'evaporació total de l'etanol.
- X) Amb l'etanol ja evaporat, afegim 50 µl de TE²⁸.
- XI) Suspendre novament el DNA genòmic 10 minuts a 60°C amb un termociclador.

3.2.4. PCR

La PCR²⁹ és una tècnica que s'utilitza per tal d'aconseguir moltes còpies d'un fragment de DNA. Per dur-la a terme s'ha de preparar un *Master Mix*³⁰.

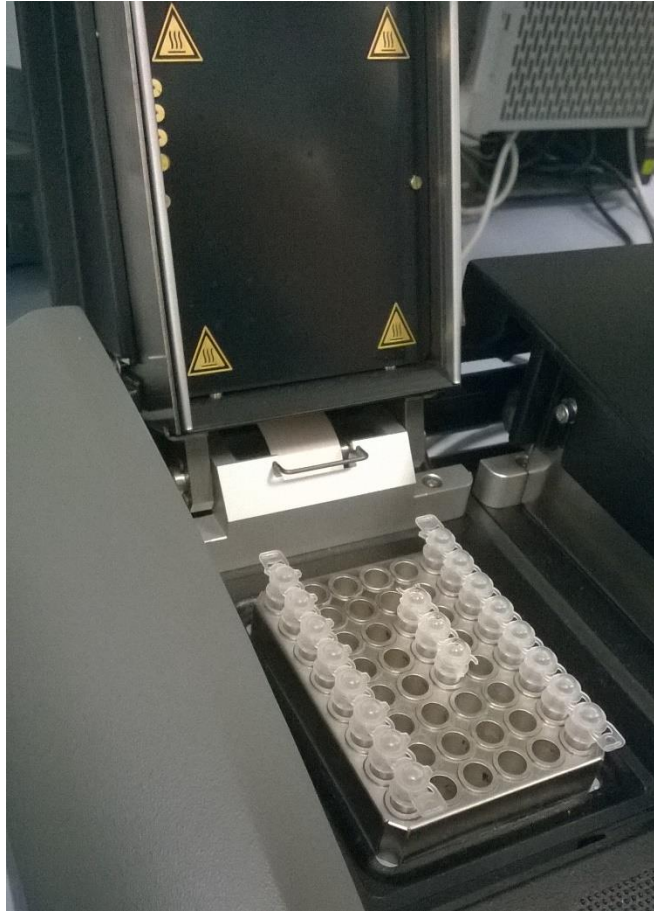
- Preparem 3 eppendorfs; un per les cèl·lules MEFs, un altre per cèl·lules HEK293 i un altre per aigua, com a control. Les mostres han de estar en gel.
- A cada eppendorf afegim 25 µl de *master mix* i la seva mostra .

²⁸ TE és el nom del buffer que s'utilitza.

²⁹ Explicació de la tècnica en el context teòric. Veure pàgina 19

³⁰ S'anomena *Master mix* a la solució necessària per fer la PCR. Veure annex 6

- Es fiquen els eppendorfs en el termociclador, que fa les pujades i baixades de temperatura calculant el temps de cada cicle.



Imatge 20 Termociclador³¹

3.2.5. GEL ELECTROFORESI.

L'electroforesi es una tècnica que separa les molècules depenent de les reaccions d'aquestes en un camp elèctric.

Per fer-la necessitem un gel d'agarosa, les mostres , un marcador i un camp elèctric.

Aquest gel s'ha de fer amb:

- 0,8% d'Agarosa en 50 ml de TAE³²

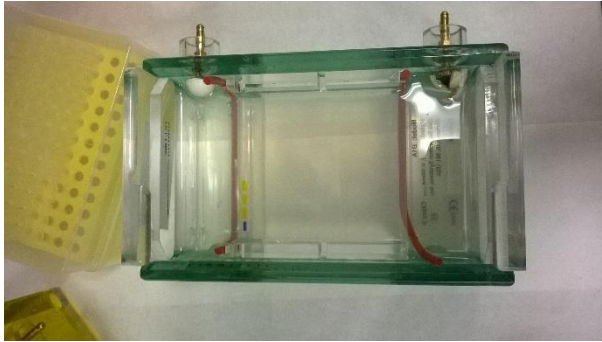
³¹ Imatge realitzada per l'autora del treball.

³² TAE és el nom d'un buffer per fer l'electroforesi.

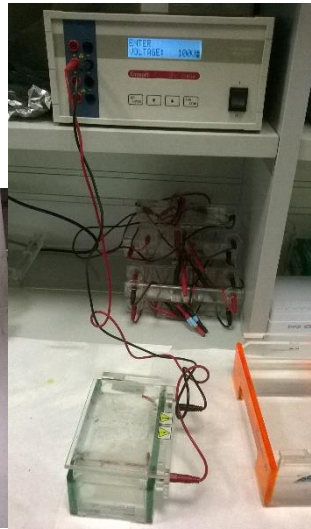
El gel es diposita en un suport. Aquesta base té un lloc central en el qual s'ha de posar la nostra solució i als extrems, 2 pous amb aigua i un cable, de manera que generem un pol positiu i altre negatiu.

Abans de dipositar la solució s'enganxa una guia que provocarà que quan el gel s'assequi quedin diferents pous.

Quan la PCR acaba s'han de dipositar les mostres en els pous que s'han fet en el gel. Aquest es un procés molt delicat perquè s'ha de fer amb molta cura per tal que la mostra quedi al pou i no caigui fora.



Imatge 21 Aparell per realitzar l'electroforesi³³



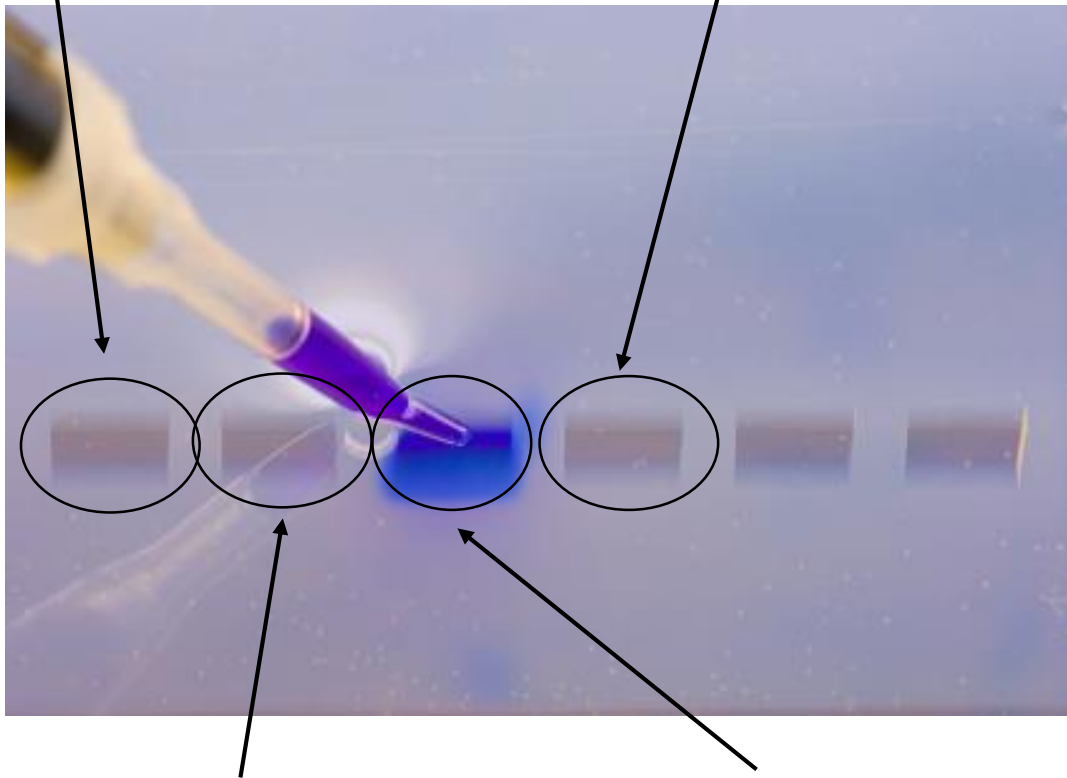
Imatge 22 Cubeta per fer l'electroforesi³⁴

³³ Imatge realitzada per l'autora del treball.

³⁴ Imatge realitzada per l'autora del treball.

Posem al primer pou el patró

Es posa el DNA amplificat de les cèl·lules d'humà

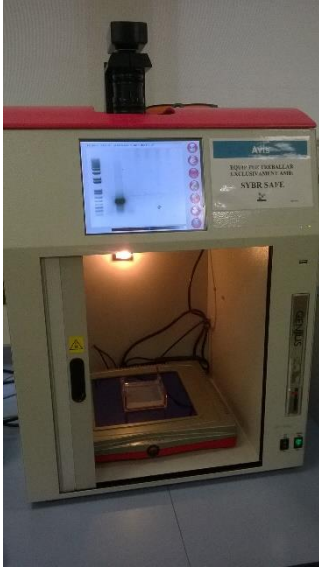


Es posa aigua al segon pou

Es posa el DNA amplificat de les cèl·lules de ratolí

En el primer pou es posa la mostra patró de la qual es coneix la disposició en bandes.

Es posa aigua al segon pou perquè és el nostre grup control. És a dir, l'aigua no pot replicar-se per tant si l'experiment està ben fet, no s'apreciarà cap tipus de desplaçament pel gel d'Agarosa des d'aquest pou.



El DNA és incolor, però per això s'utilitza un agent anomenat *sybersafe*, que el que fa és intercalar-se entre les bases del DNA i que, una vegada il·luminat amb llum UV, es pot detectar.

Imatge 23 Aparell per veure els resultats de l'electroforesi³⁵

4. RESULTATS

4.1. Resultats bioinformàtics

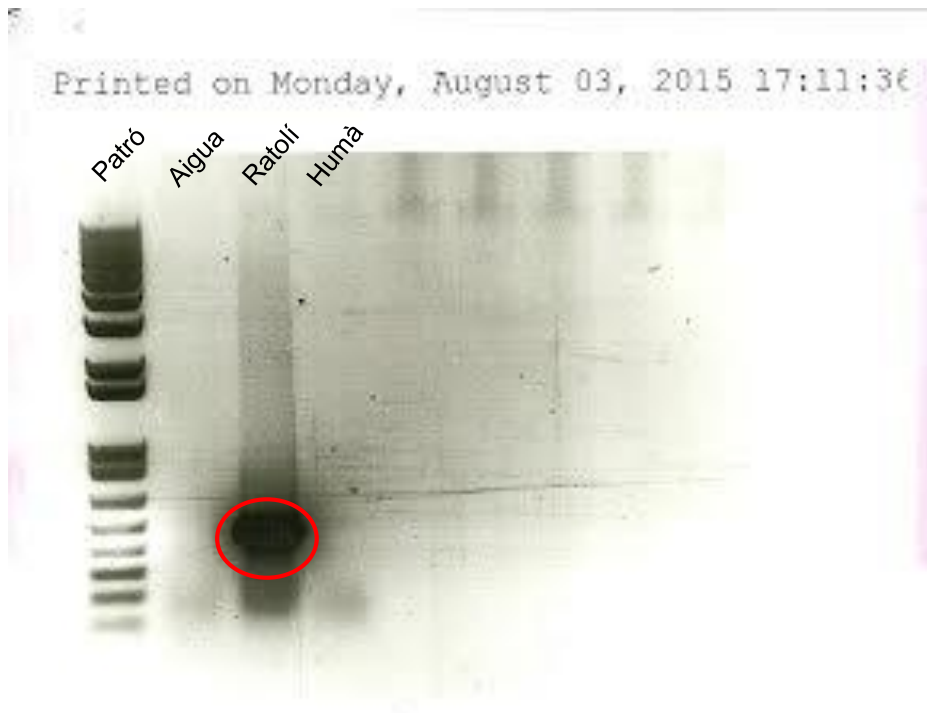
La longitud de la cadena en humans per al gen NBS1 és de 51.389 i en ratolins 34.623.

El número de bases és més elevat en humans que en ratolins. El nombre de timines als humans és de 17.419 i al ratolins és de 10.917. L'adenina també té un nombre major en els humans, hi ha 15.342 i als ratolins tan sols 9.535. En comparació amb aquestes dues bases, hi ha menys quantitat de citosina i guanina. De citosina en humans hi ha 8.983 i en ratolins 6.900. La guanina, per últim, hi ha 9.645 en humans i 7.271 en ratolins.

Això per tant provoca que la proteïna en humans sigui també més llarga.

³⁵ Imatge feta per l'autora del treball.

4.2. Resultats electroforesi



Imatge 24 Resultats de l'electroforesi

En l'electroforesi realitzada s'observa la primera franja, que és el patró.

Fàcilment es veu que en la segona franja (on s'havia posat l'aigua) no hi ha cap banda.

A la tercera columna es veu una banda de color negre, això passa perquè el fragment s'ha amplificat, en les cèl·lules MEFs, de ratolí.

A la columna on s'havia posat les cèl·lules HEK 293, no hi ha cap franja en negre, per tant indica que no s'ha amplificat aquestes cèl·lules.

5. ANÀLISI DE RESULTATS

TREBALL BIOINFORMÀTIC

Mitjançant el programa elaborat, podem observar diferències entre el gen NBS1 de cada espècie com per exemple la longitud la cadena en humans i ratolins, els diferents nombres de bases, etc.

La longitud de la cadena en humans per al gen NBS1 és major que no pas la de ratolins; per tant la cadena d'*Homo sapiens* és molt més llarga que no pas la de ratolins.

El nombre d'errors de les cadenes és 0, i al igual que en longitud de la cadena el número de bases és més elevat en humans que en ratolins sigui quina sigui la base.

Això provoca que la proteïna d'humans sigui més extensa que la de ratolins.

Aquesta diferent longitud entre ambdues cadenes, podria ser la causa de la diferència observada en els *primers* de les dues espècies.

TREBALL DE LABORATORI

A les cèl·lules de ratolí s'ha observat que el gen NBS1 s'ha amplificat perquè a l'electroforesi es veu que hi ha una banda, això vol dir que el DNA ha migrat pel gel.

Per tant el gen NBS1 de ratolins es pot amplificar amb els *primers* de ratolí.

En canvi, se sap que el DNA de les cèl·lules humanes no s'ha amplificat perquè en l'electroforesi no hi ha hagut cap migració de partícules atès que no apareix cap banda.

Per tant això indica que el gen NBS1 a les cèl·lules humanes no pot amplificar-se mitjançant *primers* de ratolins.

En no haver-se amplificat la seqüència en totes dues espècies amb el mateix *primer* indica que les seves seqüències, per tant, són diferents.

III. CONCLUSIONS

En acabar el treball, hem de comprovar si, finalment, la nostra hipòtesi es confirma o, contràriament, cal rebutjar-la. El treball pretenia demostrar la següent hipòtesi:

Pot ser que el gen NBS1 de les cèl·lules HEK293 no s'amplifiqui si es fa servir un *primer* de ratolí del mateix gen.

Amb les dades obtingudes es pot dir que no pot amplificar-se el gen NBS1 en les cèl·lules humanes, ja que s'utilitzen *primers* de ratolí. Per tant queda confirmada la hipòtesi plantejada.

Es obvi que el mateix gen s'hagi amplificat en les cèl·lules de ratolí perquè el *primer*, pertanyia a la seva seqüència.

Per millorar la recerca, hauria calgut més temps, ja que s'ha de combinar amb els exàmens i classes encara que a l'estiu avancis. Per millorar l'estudi, caldria haver comparat el mateix gen en més espècies. D'aquesta manera podríem haver observat els parentescs entre totes les espècies que es podrien treballar i si el *primer* de ratolí que hem fet servir era capaç d'amplificar alguna altra espècie més propera.

L'objectiu general del treball era poder experimentar en un laboratori on es fa investigació i endinsar-me en el camp de la bioinformàtica. Aquest objectiu s'ha assolit completament. Gràcies al PCB, he pogut fer la meva recerca experimental a uns laboratoris reals, i gràcies a la UAB he pogut desenvolupar un programa bioinformàtic.

Aquesta experiència m'ha proporcionat la possibilitat d'aprendre moltíssimes coses. Treballar en un laboratori no és fàcil, ja que has de tenir molta cura en tots els teus moviments i saber bé el procediment. A més a més, en un laboratori has de tenir molta paciència perquè investigar, com ja he dit no és un treball fàcil i s'ha d'aprendre a esperar amb paciència els resultats i, fins i tot, moltes vegades cal repetir els experiments.

L'altra aspecte de l'experimentació del treball ha estat la bioinformàtica. Aquesta ciència junta la tecnologia i la biologia per resoldre problemes en la investigació. D'aquesta ciència, tan actual, no sabia res. La possibilitat de treballar en un laboratori bioinformàtic, ha estat una experiència molt satisfactòria perquè els coneixements començaven des de zero i els veia augmentar. He après el llenguatge *Perl* i a utilitzar-lo. Gràcies a saber aquest llenguatge he pogut programar i comparar les seqüències estudiades.

En un àmbit general el treball ens ajuda als alumnes a aprendre a buscar informació, a contrastar-la i tenim un ajut per a l'entrada a la universitat. També ens fa créixer personalment, per les experiències i tota la responsabilitat que tenim al fer-lo.

Per tot el que he pogut fer, aprendre i viure, estic molt satisfeta amb el Treball de Recerca. Encara que hi ha moments els quals em desaminava, en fer balanç de tot, i la part positiva supera la negativa.

IV. AGRAÏMENTS I BIBLIOGRAFIA

1. AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat un producte no només de mi, sinó que han estat implicades moltes persones. En primer lloc he d'agrair al programa BATX2LAB impulsat pel Parc Científic de Barcelona l'oportunitat que m'heu ofert, ja que m'han donat suport en tota la part pràctica de laboratori. A la Núria Gallisa, la meva tutora allà amb qui he pogut gaudir la meva experimentació i m'ha ensenyat molt. També he de donar les gràcies al Programa Argó de la Universitat Autònoma de Barcelona, on vaig poder aprendre moltíssim sobre la bioinformàtica, i a la Marta Coronado Zamora la meva professora allà.

A més, vull donar les gràcies als amics i família pel suport davant les davallades que provoca el treball. En especial al meu pare, qui m'ha aconsellat i ajudat.

I finalment, donar moltes gràcies a la meva tutora, la Mercè Lajara perquè ha estat per a les dues un treball d'aprofundiment i aprenentatge en la recerca genètica i bioinformàtica. I sobretot gràcies a la seva paciència i per ajudar-me en tot moment.

2. BIBLIOGRAFIA

- S.Sent, Gunther; Calendar, Richard. *Genetica molecular*. 2a edició. Barcelona: Omega S.A, 1981.
- Alberts, Bruce; (et al.). *Biología molecular de la célula*. 5a edició. Barcelona: Omega, 2010.
- Alberts, Bruce; (et al.). *Introducción a la biología celular*. 3a edició. Madrid, Médica Panamericana, 2011.
- Jimeno, Antonio; Ugedo, Luis. *Biología 1 batxillerat*. Barcelona: Grupo Promotor Santillana, 2008.

3. WEBGRAFIA

Informació consultada a pàgines web:

- HEK293: *Genome Dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in the response to cell biology manipulations* [Consultat 21/07/2015]
<http://www.hek293genome.org/v2/about.php>
- (2012): *HEK293 – Huma embryonic kidney 293 cells* [Consultat 21/07/2015]
<http://12160.info/profiles/blogs/hek-293-human-embryonic-kidney-293-cells>
- Abcam [Consultat 21/07/2015]
<http://www.abcam.com/HEK293-Human-embryonic-kidney-cell-line-Whole-Cell-Lysate-ab7902.html>
- SIGMA.ALDRICH: *293 cell line human* [Consultat 21/07/2015]
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/85120602?lang=es®ion=ES>
- *VECTORES ADENOVIRALES* [Consultat 21/07/2015]
<http://www.angelfire.com/tx2/neptuno/dgl6.html>
- NCBI [Consultat 04/08/2015]
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11876473>
- <http://www2.brc.riken.jp/cache/cell/RCB1637>
- Youtube (2011): *Inactivated Feeder Cells (MEF) Thawing* [Consultat 16/09/2015]

<https://www.youtube.com/watch?v=aeitNUa-hxl>

- Komal B. Patil (2015): *Nucleoside vs. Nucleotide* [Consultat 16/11/2015]
<http://www.buzzle.com/articles/nucleoside-vs-nucleotide.html>
- Twisteddnas (2014): *Nucleotides and nucleic acids* [Consultat 16/11/2015]
<https://twisteddnas.wordpress.com/2014/04/05/nucleotides-and-nucleic-acids/>
- *DNA nucleotide structure* [Consultat 16/11/2015]
http://ibbiologyhelp.com/DNA/Structure_and_Replication/dnastructure.html
- Jennine Solomon (2015): *DNA Structure and Discovery* [Consultat 16/11/2015]
<http://www.ck12.org/user:anJzb2xvbW9uQG1ldnNkLnVz/book/STEM-Biology/section/5.1/>
- *The Nucleus and DNA Replication* [Consultat 16/11/2015]
<http://philschatz.com/anatomy-book/contents/m46073.html>
- (2012): Amplificación [Consultat 17/11/2015]
<https://genetica2012.wikispaces.com/Amplificacion>
- (2015): *Descriptor- Amplificación de Genes* [Consultat 17/11/2015]
<http://decs.es/ciencias-biologicas/amplificacion-de-genes/>
- The free dictionary (2009): *amplification* [Consultat 17/11/2015]
<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/DNA+amplification>
- *DNA Replication* [Consultat 23/11/2015]
http://www.wiley.com/college/pratt/0471393878/student/animations/dna_replication/index.html
- Pdf: *Técnicas genómicas* [Consultat 23/11/2015]
http://campus.usal.es/~micromed/Practicas_odontologia/unidades/labv/imagenes_4/T%C3%89CNICAS%20GEN%C3%93MICAS.pdf
- Cultek: *Amplificación de ácidos nucleicos in vitro.* [Consultat 23/11/2015]
<http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/PCR/Aplicaciones-PCR-Amplificacion%20de%20acidos%20nucleicos%20in%20vitro.pdf>
- New england biolabs: *DNA Amplification & PCR.* [Consultat 23/11/2015]
<https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr>

- Comité de Formación Continuada Asociación Española de Biopatología Médica (2001): *Procedimientos de biología molecular para el estudio de la infección por el VIH* [Consultat 23/11/2015]
<http://www.aebm.org/formacion%20distancia/distancia%202011-2012/Actualizaciones/monografias%202011/6.-%20SIDA.pdf>
- Holmgren Lab (2004): *Transcription Mediated Amplification (TMA)* [Consultat 23/11/2015]
<http://groups.molbiosci.northwestern.edu/holmgren/Glossary/Definitions/Def-T/TMA.html>
- Slideshare (2011): *PCR Automation in Molecular Diagnostic part 2* [Consultat 23/11/2015]
<http://www.slideshare.net/pmerel/2011-course-on-molecular-diagnostic-automation-part-2-amplification>
- Chiron (2004): *La tecnología TMA simplifica el análisis de ácidos nucleicos* [Consultat 23/11/2015]
<http://www.pacemaker.com.ar/chiron.htm>
- Nature publishing group (2015): *Establishment of immunoassay for detectin HPV16 E6 and E7 RNA* [Consultat 24/11/2015]
<http://www.nature.com/articles/srep13686>
- Slideshare (2012): *Ligase chain reaction* [Consultat 24/11/2015]
<http://www.slideshare.net/SHBZaidi/ligase-chain-reactionlcr>
- UDAPBio (2008): *alternatives to PCR* [Consultat 24/11/2015]
<http://udapbio.wikispaces.com/Alan+Y>
- YourArticleLibrary: *Disease Diagnosis: Recent Approaches Towards Disease Diagnosis* [Consultat 24/11/2015]
<http://www.yourarticlelibrary.com/disease/disease-diagnosis-recent-approaches-towards-disease-diagnosis/33532/>
- Microbial (2009): *La extracción y purificación del ADN para el análisis por PCR. Mitos y realidades.* [Consultat 24/11/2015]
http://www.microbial-systems.com/web/docs/Newsletter_Microbial_03.pdf