

Treball Final de Grau

*Estudio de la expresión de Stxbp3, Stxbp6
y Claudin F en la formación del lumen en el
oído interno del Pez Cebra, Danio rerio*

Eider Bergareche Barbeito

Grau en Biotecnologia
Tutor Univesitat: Jordi Villà
Tutora Laboratori: Berta Alsina
Vic, Junio del 2013

ÍNDICE

1. RESUMEN DEL TRABAJO FIN DE GRADO	3
1.1. Resumen	3
1.2. Abstract.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1. La morfogénesis	5
2.2. El pez cebra como modelo biológico para la investigación.	5
2.3. Desarrollo del oído interno en embriones de pez cebra (Danio rerio)	7
2.4 Moléculas que estudiamos en el proyecto	11
3. OBJETIVOS	11
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
4.1. Diseño de sondas	12
4.2 Animales.....	19
4.3 Hibridación In situ	20
4.4 Fotografiado de los resultados.....	21
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
5.1. PCR del cDNA obtenido en la transcripción reversa	21
5.2. Transformación de células competentes con el plásmido	22
5.3. Digestión del plásmido con EcoRI	23
5.4. Secuenciación del inserto.....	24
5.5. Linearización del plásmido transfectado	27
5.6 Trascricpción del cDNA de la secuencia.	27
5.7. Hibridación in situ	28
6. CONCLUSIONES.....	31
7. REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA	32
8. ANEXOS	34

1. RESUMEN DEL TRABAJO FIN DE GRADO

1.1. Resumen

Durante los últimos años se ha fomentado la investigación mediante el pez cebra como modelo biológico gracias a las considerables ventajas que ofrece respecto a modelos utilizados habitualmente. Una de las aplicaciones más destacadas de este modelo es en el estudio de las células sensoriales en el oído interno, ya que tienen un gran parecido con las células sensoriales de los humanos. Gracias a la facilidad de visualización y estudio de estas células en el pez cebra, se han podido llevar a cabo numerosas investigaciones sobre enfermedades que afectan a este órgano sensorial, así como la sordera.

No obstante, para poder analizar todas las estructuras y células que forman parte del oído interno, es importante entender la morfogénesis de este órgano. Este proyecto se basa en el estudio de la morfogénesis del oído interno, concretamente, en la formación de lumen, una estructura que se forma en el oído interno en estadios tempranos del embrión, y que a partir de la cual se forman las demás estructuras que constituirán el oído interno.

Para poder entender la formación del lumen en estadios tempranos del embrión, es necesario la caracterización de proteínas que participen en este proceso. Por lo que el objetivo principal de este proyecto es el estudio de la expresión de los genes *Stxbp3*, *Stxbp6* y *Claudin F* en la apertura del lumen en el oído interno del pez cebra.

1.2. Abstract

During last years research has been encouraged by the zebrafish as a biological model due to the significant advantages over commonly used models. One of the most important applications of this model is in the study of the sensory cells in the inner ear because of the strong resemblance to the sensory cells in humans. Due to the facility of viewing and studying these cells in zebrafish, researches have been able to carry out numerous studies on diseases affecting this sensory organ as deafness.

However, in order to analyze all the structures and cells that are part of the inner ear, it is important to understand the morphogenesis of this organ. This project is based on the study of the morphogenesis of the inner ear, specifically, in the lumen formation. The lumen is a structure which is formed in the inner ear at an early stage of the embryo, and from which the other structures that will constitute the inner ear are formed.

To understand the formation of the lumen in the early stages of the embryo, it is necessary to characterize proteins involved in this process. Therefore the aim of this project is the study the expression of the genes *Stxbp3*, *Stxbp6* and *Claudin F* at the opening of the lumen in the inner ear of the zebrafish.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. La morfogénesis

La morfogénesis es uno de los principales problemas pendientes en las ciencias biológicas. Se refiere al proceso biológico que lleva a que un organismo desarrolle su forma, controle la distribución espacial organizada de las células durante el desarrollo embrionario y cómo así forma las estructuras biológicas (Jacob M.Sawyer *et al.*,2009)

Es uno de los aspectos fundamentales del desarrollo biológico junto con el control del crecimiento celular y la diferenciación celular.

La morfogénesis abarca una amplia gama de procesos biológicos. Trata de estudiar tejidos tanto de organismos adultos como de embriones, e incluye una comprensión del mantenimiento, la degeneración, y regeneración de tejidos y órganos, así como su formación.

Respecto en relación con el campo de la biología del desarrollo hace énfasis en la investigación de cómo la regulación génica determina un destino específico para la célula, y cómo esto contribuye a la forma y estructura del organismo y sus partes componentes.

2.2. El pez cebra como modelo biológico para la investigación.

El pez cebra, *Danio rerio*, (Hamilton-Buchanan, 1822) es un pequeño pez tropical que habita en los ríos del norte de India, norte de Paquistán, Nepal y el sur de Asia. Posee unas características que lo han convertido en el modelo ideal para estudios del desarrollo embrionario, así como de otros campos de la biomedicina.



Fig.1: Imagen de un pez cebra adulto. Sus rayas características en el cuerpo y las aletas le dan el nombre a esta especie. Un individuo adulto mide sobre los 4-5 cm de largo.(Obtenido de <http://www.biobasque.org/aBBW/web/es/noticias/darenet.jsp>).

Homología genómica

Es un vertebrado, y por lo tanto, presenta una alta homología genómica (su genoma totalmente secuenciado) (Javier Salas, 2013) y proteómica con el resto de vertebrados y gran correlación con los modelos de mamíferos; con los humanos comparten el 70% de la información genética y más del 80% de los genes responsables de enfermedades (Javier Salas, 2013).

Desarrollo embrionario

El desarrollo del pez cebra es muy parecido al de la embriogénesis de otros vertebrados, incluyendo a los humanos. Pero a diferencia de los mamíferos, se desarrolla a partir de un óvulo fecundado fuera de la hembra lo que facilita su manipulación.



Un desarrollo rápido

El desarrollo embrionario del pez cebra es muy rápido; en las primeras 24 horas después de la fertilización los órganos principales ya se han formado.

Al cabo de 3 - 4 meses los peces cebra son sexualmente maduros y pueden generar nuevas crías. Una sola hembra puede poner hasta 200 huevos por semana, lo que permite estadísticamente usar números más significativos de especímenes en cada test.

Tamaño

Los peces cebra adultos tienen un pequeño tamaño (4-5 cm) lo que posibilita tener varios ejemplares en una sola pecera, reduciendo los costes de mantenimiento.

Transparencia

Los embriones son semitransparentes durante los primeros pocos días de su vida. Esto permite a los investigadores estudiar las etapas de la organogénesis y hacer observaciones microscópicas en vivo y a tiempo real.

Además la transparencia del embrión ha permitido desarrollar técnicas no invasivas basadas en proteínas fluorescentes, permitiendo además observar la dinámica de la expresión génica in vivo (cell live imaging).

Otras características

Este modelo animal presenta menos restricciones éticas respecto a otros modelos biológicos vertebrados, y además en los últimos años se han divulgado un gran número de publicaciones en PubMed lo que facilita y fomenta la investigación a partir del pez cebra.

2.3. Desarrollo del oído interno en embriones de pez cebra (*Danio rerio*)

El desarrollo del oído en el pez cebra es muy rápido y comienza muy temprano en el embrión. En el estadio aproximado de 16 hpf, aparece la placoda ótica, a través de la cual se desarrollará la vesícula ótica. A partir del estadio de 20 hpf pueden visualizarse dos otolitos en el interior de cada vesícula. Posteriormente se expanden las cámaras y se diferenciará el epitelio sensorial.

Gracias a que el embrión es transparente, el desarrollo del oído interno se puede observar con una gran resolución en vivo y en montajes completos. Además el cibaje mutagénico ha generado muchos mutantes cuyos defectos fenotípicos se observan con facilidad en el oído.

Descripción del oído del pez cebra

La estructura del oído interno está altamente conservada evolutivamente. Primeramente se desarrolla la placoda ótica en ambos lados de la cabeza. Está cavita y forma la vesícula ótica, a partir de la cual se desarrollan todas las estructuras del oído interno (Kate F. Barald *et al.*, 2004).

En adulto, el oído interno forma un órgano epitelial cerrado, con unas constricciones que definen tres cámaras comunicantes (Catherine Haddon *et al.*, 1996) ; el sáculo y la lagena en la parte inferior, y el utrículo en la parte superior, donde se abren tres canales semicirculares. Las cámaras y canales del oído interno protegen los parches del epitelio sensorial, de los cuales depende la función del oído. En el embrión del pez cebra se desarrollan cinco parches sensoriales: tres crestas (cada uno asociado con un canal semicircular) y dos máculas (cada uno asociado con un otolito).

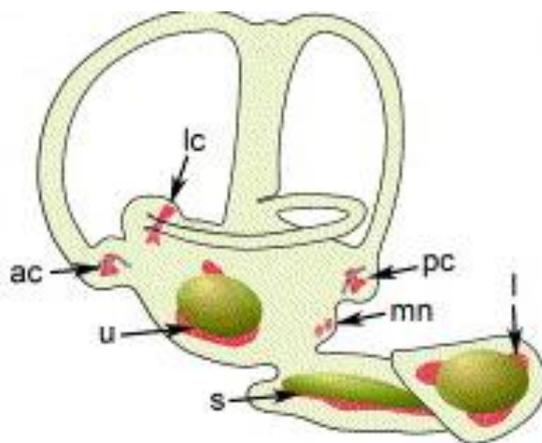


Fig.3 Organización del oído interno en pez cebra adulto que muestra todos los epitelios sensoriales (en rojo). Las cuatro máculas son la utrícula (u), la sacula (s), la lagena (l) y la neglecta (mn); las tres crestas de los canales semicirculares son la cresta anterior (ac), la cresta lateral (lc), y la cresta posterior (pc). (Ernesto *et al.*, 2007, ZFIN).

Cada parche contiene células ciliadas y células de soporte, y está asociado con neuronas sensoriales conectadas con el epitelio. Las células ciliadas son traductores mecanosensoriales; las neuronas interactúan con ellas y la señal es enviada al cerebro (Catherine Haddon *et al.*, 1996).

Los primeros parches sensoriales en desarrollar son las máculas, que responden a la aceleración lineal, a la gravedad y al sonido. Cada una está cubierta por un otolito, un depósito cristalino de carbonato de calcio y proteínas. Una de las máculas ocupa el utrículo del oído y se cree que tiene un papel principalmente vestibular. La otra mácula se encuentra en una posición caudomedial, ocupa el sáculo, y tiene un papel principalmente auditivo. Una vez el pez es adulto se desarrollan dos máculas más, la mácula neglecta y la lagena.

Por otro lado están las tres crestas; que son los parches de células ciliadas asociados a los canales semicirculares, y que actúan como sensores de la aceleración rotacional (Catherine Haddon *et al.*, 1996).

Mecanismos descritos hasta ahora de formación de un lumen

Se han observado dos mecanismos predominantes de formación del lumen: vaciado y cavitación (Fernando Martín-Belmonte *et al.*, 2008).

En el mecanismo mediante vaciado, las células forman uniones célula-célula y adquieren polaridad apical-basal, formando un pequeño lumen que se expande posteriormente por la generación de la membrana apical adicional y exocitosis.

Mientras que en la cavitación, la formación del lumen se produce por la polarización de las células en la periferia, seguido por la apoptosis selectiva de las células en el centro de la estructura.

Para establecer la polaridad celular, los tejidos epiteliales requieren señales externas mediadas por la interacción de las células con el medio circundante, con otras células y / o con la matriz extracelular. En la morfogénesis se requieren dos eventos principales: una señal inicial que orienta el eje de la polaridad, mediada por la interacción de las células con la membrana de las células epiteliales, y a continuación, la formación de un lumen, regulada por la generación, transporte, y la exocitosis de componentes de la superficie apical.

Formación del lumen en el oído interno en pez cebra

El primer signo visible de desarrollo del oído interno es la aparición de la placoda ótica, a partir de un engrosamiento ectodérmico de la parte posterior del cerebro, situado adyacente a los rombómeros 4, 5 y 6.

La placoda ótica puede ser reconocida como una agrupación ovalada de células dentro del ectodermo (visible alrededor de las 16 horas post-fertilización, hpf).

Esta se condensa en una bola sólida de células. En el centro de la masa, sin embargo, parece haber una concentración de actina, lo que puede indicar que las células ya están polarizadas, con ápices ricos en actina en los puntos donde el lumen está a punto de abrirse. En ese punto se forma una cavidad en forma de ranura, y a medida que la masa de células se ahueca y adquiere una disposición epitelial, se va separando de la epidermis suprayacente.

La polarización pronto se vuelve más clara; los núcleos celulares se mueven hacia los extremos basales de las células. Esta polarización tiende a organizar las células en una lámina en la que se unen a una a la otra por la membrana basolateral, pero permanecen separadas apicalmente.

A causa de las cargas negativas de algunos compuestos (ácido siálico...) de la membrana celular y de la repulsión electrostática de las células endoteliales, las interacciones célula-célula en el centro comienzan a perderse. Gracias a la pérdida de estas interacciones se abre un pequeño espacio en forma de hendidura esbozado por actina en las caras apicales de las células; esta es la primera señal del lumen del oído (visible alrededor de las 18 hpf).



Fig.4 Formación de las placodas (en azul) del oído interno a partir de los rombómeros 4, 5 y 6. *Sophie Léger et al., 2002,*

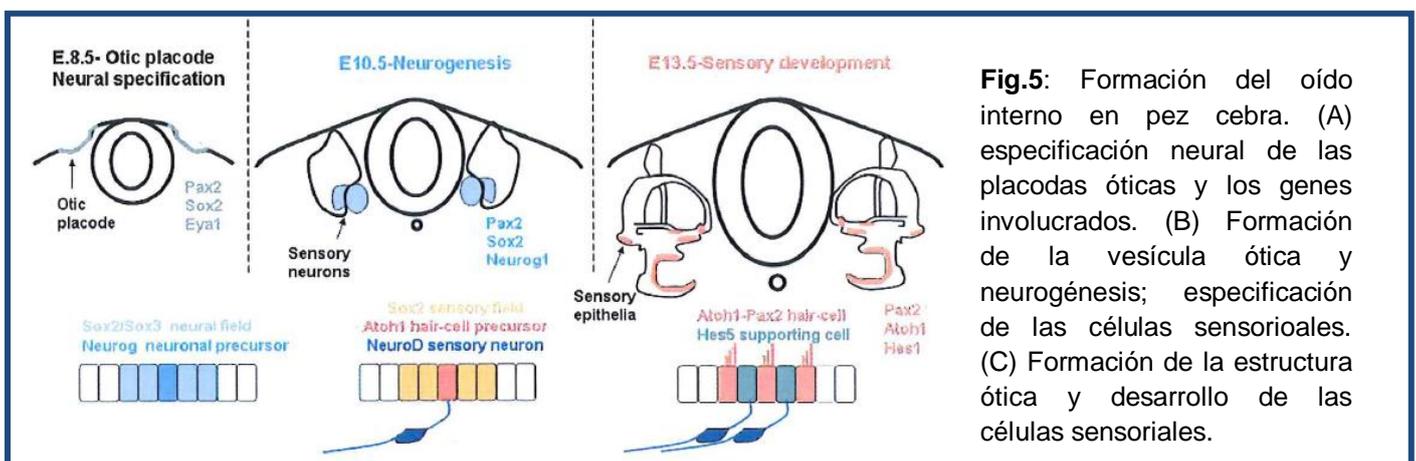


Fig.5: Formación del oído interno en pez cebra. (A) especificación neural de las placodas óticas y los genes involucrados. (B) Formación de la vesícula ótica y neurogénesis; especificación de las células sensoriales. (C) Formación de la estructura ótica y desarrollo de las células sensoriales.

2.4 Moléculas que estudiamos en el proyecto

Como se ha mencionado en el apartado anterior, la exocitosis es un mecanismo importante para polaridad. Por lo que en este proyecto queremos estudiar algunos genes implicados en este mecanismo; el gen *Stxbp3* y el *Stxbp6*. Estos dos genes expresan proteínas que regulan la expresión de la syntaxina, una molécula que participa en la formación de vesículas.

Por otro lado, se ha estudiado la expresión del gen *Claudin F* que regula el flujo iónico entre células una vez que están polarizadas y establecen uniones adherentes en la membrana apicolateral.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es estudiar el patrón de expresión de los genes *Stxbp3*, *Stxbp6* y *Claudin F*, tanto en el espacio como en el tiempo, para contribuir a entender la morfogénesis del oído interno.

Mediante la regulación génica se ha comprobado que al bloquear la expresión de estos genes el lumen parece presentar fenotipos anormales y una reducción de tamaño de la vesícula. Hemos podido comprobar que hasta ahora solo se conoce el patrón de expresión de *Claudin F* en la base de datos de ZFIN. Por lo que se ha querido estudiar la importancia de estos tres genes y la expresión de las proteínas que codifican en los estadios embrionarios más tempranos, ya que podrían ser genes pioneros en el proceso de apertura del lumen.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Diseño de sondas

Este proyecto se basa en la creación de sondas para estudiar la expresión en detalle de las proteínas Stxbp3, Stxbp6 y Claudin F.

4.1.1 Transcripción reversa.

Este primer paso es un proceso que implica la retro-transcripción de la cadena de RNA. Es decir, se generan cadenas de ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena a partir de un ácido ribonucleico (ARN) de cadena simple.

En este caso se realizó la transcripción de RNA aislado de embriones de pez cebra (48hpf) mediante la polimerasa “ SuperScrip III Reverse Trascriptase”.

(Ver anexo 1)

4.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa ,PCR, del cDNA

La finalidad de esta técnica ha sido amplificar el cDNA. Es decir, obtener un gran número de copias del cDNA obtenido a partir de la RT realizada previamente.

En este proyecto el objetivo es crear sondas que reconozcan distintas proteínas, por lo que se han realizado varias amplificaciones con distintos cebadores (*primers*) para la obtención de cada secuencia. Los cebadores empleados son los siguientes:

- Stxbp3_F/R
- Stxbp6_F/R
- ClaudinF_F/R

Las PCRs se han realizado al mismo tiempo y en el mismo termociclador, por lo que se han tenido en cuenta las condiciones de hibridación y amplificación de los cebadores, ya que no son las mismas para los tres. Inicialmente se fijó la temperatura de hibridación más baja y un número de ciclos intermedio.

Para obtener la el producto deseado se han realizado PCRs en distintas condiciones, teniendo en cuenta que:

- Si la temperatura es más alta de la necesaria los cebadores no se unen, y si la temperatura es más baja, se pueden unir en puntos inespecíficos y no obtendríamos el producto de PCR deseado.
- Número de ciclos: cuantos más ciclos se realizan se obtiene más producto, pero si el número de ciclos es demasiado alto al requerido, se obtienen productos inespecíficos.

Para comprobar que el cDNA se ha amplificado correctamente se ha realizado una electroforesis donde hemos corrido una pequeña muestra en un gel de agarosa 1%.

(Ver anexo 2)

4.1.3 Purificación cDNA

Antes de clonar el cDNA en el vector se ha realizado una purificación del producto obtenido para eliminar los cebadores, dNTPs y productos inespecíficos formados en la PCR. La purificación consiste en hacer una serie de lavados con soluciones detergentes y centrifugaciones para precipitar el cDNA.

4.1.4 Ligación del cDNA al vector.

En este paso se ha ligado el cDNA purificado en un vector de clonación mediante la ligasa (ver anexo 3).

En este experimento se ha utilizado el vector pGEM-T (fig.6) . Este vector fue creado linearizando el vector pGEM®-5Zf(+) con la enzima EcorRV en la base 51 y añadiendo una timidina (T) en los dos extremos 3'. De esta manera aumenta la eficiencia de ligación de productos de PCR en el plásmido ya que la Taq polimerasa que se emplea en la PCR, a menudo añade una adenina (A) al final de la cadena del cDNA y esto facilita la clonación en el vector.

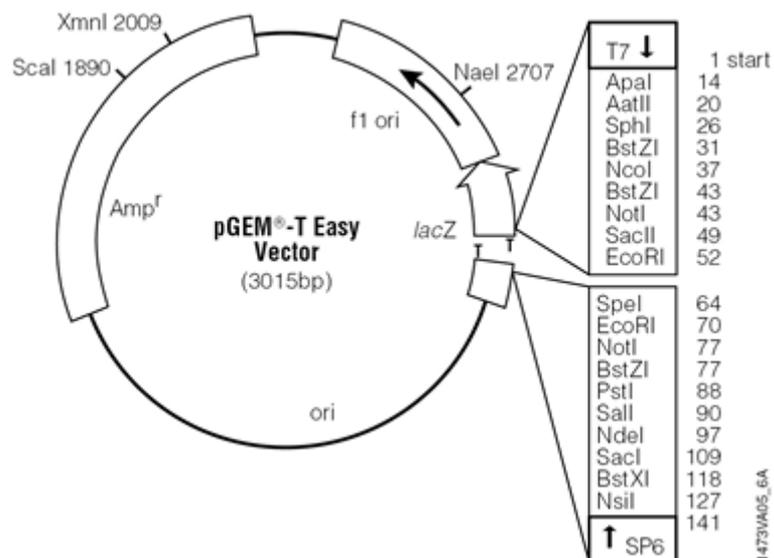


Figura 6: Vector pGEM-T Easy

4.1.5 Transformación de células competentes

Para la transformación se han utilizado placas de cultivo con medio de LB y ampicilina. Se les ha añadido X-gal (compuesto orgánico) e IPTG (inductor de x-gal) para más adelante facilitar la selección de colonias transformadas.

Se ha utilizado como célula huésped la bacteria E.Coli manipulada previamente para que sea más competente. Para realizar la transformación se ha utilizado el método por choque térmico; que consiste en realizar cambios de temperatura para que la membrana sea permeable y los plásmidos atraviesen los poros.

Se han realizado varios cultivos celulares en las placas preparadas previamente para los diferentes plásmidos con diferentes concentraciones de bacteria, y como control se han sembrado bacterias sin transformar. Las placas se han dejado incubar toda la noche.

(Ver anexo 4)

4.1.6 Selección y cultivo de bacterias transformadas

Como método de selección de las células que han integrado el plásmido y las que no, se ha utilizado la resistencia a la ampicilina. El vector pGEM-T contiene el gen de resistencia a la ampicilina, y como se ha mencionado en el apartado anterior, las bacterias se han cultivado en un medio en presencia de esta sustancia. Por lo que las células que no han insertado el plásmido no deberían formar colonias.

Por otro lado, para diferenciar entre las colonias resistentes a ampicilina y que se han transformado correctamente se utiliza la expresión del gen lacZ que contiene el vector. En ausencia de inserto, las bacterias en medio con el inductor IPTG y del sustrato X-gal que han sido añadidos en las placas de cultivo, son capaces de expresar el gen lacZ y producir β -galactosidasa. La β -galactosidasa convierte el sustrato X-gal en una sustancia azul, por lo que las colonias aparecen de este color. Si hay un inserto interrumpiendo el gen lacZ, las bacterias no producen β -galactosidasa, y las colonias aparecen blancas.

Las colonias que se han transformado correctamente han sido seleccionadas y se han cultivado en medio LB durante toda la noche para aumentar su reproducción, y así tener más plásmidos que contienen las secuencias de interés.

4.1.7 Purificación plásmido

El siguiente paso ha sido la purificación del plásmido de las células. Para ello se ha utilizado una “miniprep” que consta de dos fases: el lisado de las células bacterianas para liberar el plásmido, y el aislamiento y purificación de este. Los dos pasos consisten en hacer lavados mediante buffers (soluciones reguladoras) e ir centrifugando hasta obtener el plásmido en el pellet y eliminar los productos que pueden obstaculizar la secuenciación.

(Ver anexo 5)

4.1.8 Digestión plásmido

La digestión del plásmido purificado se ha realizado mediante la enzima de restricción EcoRI, que posee la siguiente diana de restricción de cadena doble:

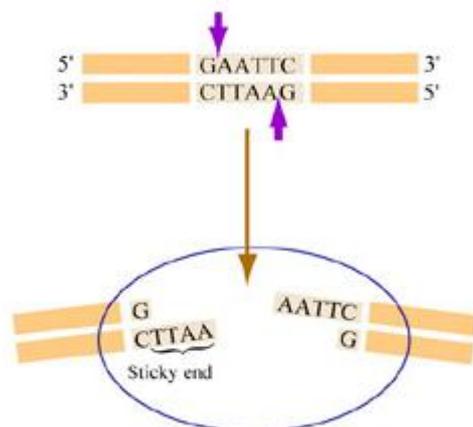


Figura 7: Punto de restricción de la enzima EcoRI en una cadena doble de DNA.

Una vez digerido el plásmido con la enzima, los fragmentos son separados por su tamaño usando un gel de electroforesis.

4.1.9 Secuenciación inserto

Los insertos obtenidos a partir de la digestión han sido secuenciados mediante los primers T7 y SP6, para poder determinar la orientación del inserto dentro del plásmido.

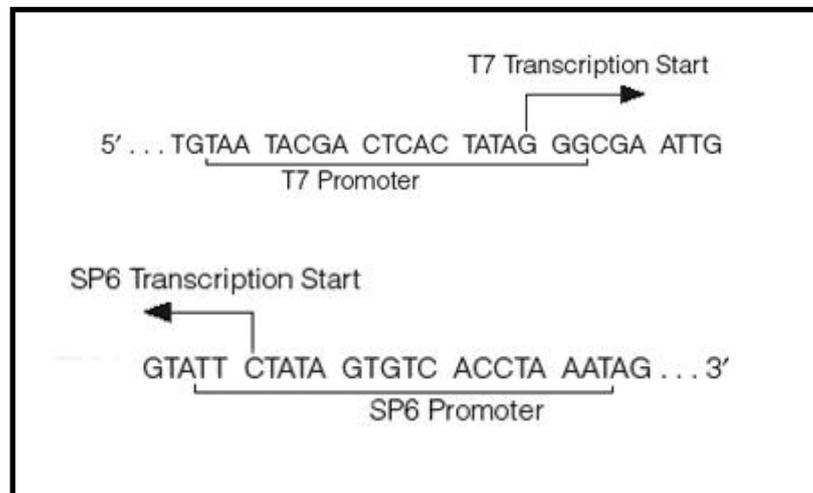


Figura 8: Secuencia de unión de los cebadores T7 y SP6.

Una vez realizada la PCR con ambos cebadores, se ha realizado una precipitación del inserto y se ha llevado a secuenciar.

Las secuencias obtenidas se llevaron al formato de archivo FASTA, y mediante el programa BLAST se realizó un alineamiento para cada una de las secuencias, Claudin F, Stxbp3 y Stxbp6, y se ha determinado el primer con el que se ha realizado la amplificación (T7 o SP6), es decir, la dirección del inserto.

(Ver anexos 6 y 7)

4.1.10 Linearización

En este paso se ha realizado la linearización del plásmido transfectado mediante enzimas de restricción. Para escoger la enzima correcta para realizar la linearización se ha mirado la secuencia del vector pGEM-T y de la secuencia del inserto para asegurarnos de cortar el plásmido correctamente sin dañar el inserto. También se ha tenido en cuenta qué cebador transcribe la secuencia (T7 o SP6) y la dirección del inserto.

Teniendo todos estos puntos en cuenta, para llevar a cabo la linearización se han utilizado las siguientes enzimas (tabla 1):

Tabla 1:

Inserto	Cebador transcripción	Enzima Linearización
Claudin F	SP6	Apal
Stxbp3	T7	SpeI
Stxbp6	T7	SpeI

Una vez linearizado se han corrido las muestras en un gel para comprobar que los plásmidos se han linearizado correctamente.

(Ver anexo 8)

4.1.11 Transcripción y precipitación

Mediante los cebadores correspondientes para cada inserto (T7 o SP6), se ha realizado una transcripción para obtener la secuencia de RNA complementaria a la secuencia deseada.

Seguidamente se ha realizado una serie de lavados con etanol, para precipitar las secuencias de RNA obtenidas en la transcripción y se ha corrido una pequeña muestra en un gel de agarosa.

(Ver anexos 9 y 10)

4.2 Animales

El animal de experimentación utilizado para la realización de este trabajo fue el pez cebra *Danio rerio*. Su ciclo de vida se esquematiza en la figura 9. Los ejemplares adultos utilizados como individuos reproductores pertenecían Departamento de Biología del desarrollo.

Los animales fueron manipulados siguiendo las directivas de la Comunidad Europea (86/609/EEC y 2003/65/EC) y la legislación española (RD 1201/2005, BOE 252/34367-91, 2005).

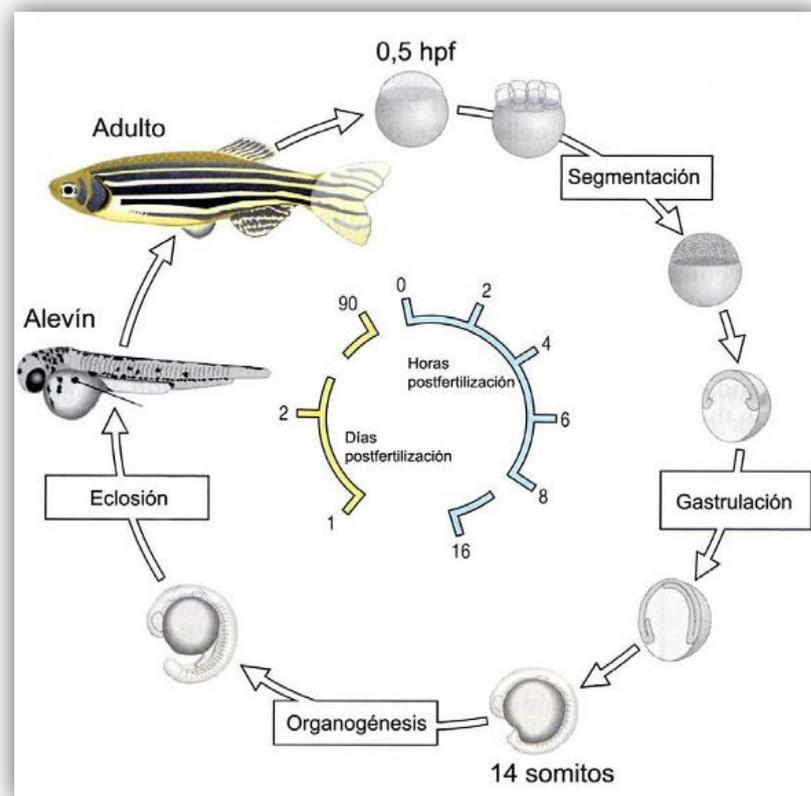


Figura9: Ciclo de vida del pez cebra. Imagen modificada de Principles of Development (Wolpert et al ., 1998).

4.2.1 Obtención de embriones

La tarde anterior al día de la puesta, los ejemplares reproductores han sido trasladados a la pecera de cría.

Los huevos que se colectaban a la mañana siguiente se repartían en placas de petri con agua del sistema, al que se le había añadido previamente azul de metileno fenicado para evitar el crecimiento fúngico.

Durante las primeras horas las placas se mantienen en una estufa a 28°C para que se desarrollen correctamente durante los primeros estadios, y luego se han traspasado las placas la estufa de 23°C donde se han dejado incubar durante toda la noche para que llegasen al estadio de 13-14hpf. Una vez que los embriones se encontraban en este estadio, se han ido colectando (20 embriones aproximadamente) y fijando con paraformaldehido 4% cada hora, para así tener muestras de cada estadio de desarrollo (ver anexo 11).

4.3 Hibridación In situ

Una vez generadas las sondas, se ha realizado una hibridación in situ con tal de detectar la expresión de los genes Claudin F, Stxbp3 y Stxbp6 en el oído interno del pez cebra.

La hibridación in situ es una técnica que permite estudiar la distribución in situ de una determinada secuencia de interés mediante la utilización de una sonda complementaria (formada por una secuencia de ADN previamente conocida) marcada con digoxigenina.

Como control negativo se han utilizado sondas sentido, sondas que tienen la misma secuencia de nucleótidos que los genes diana, por lo que no puede hibridarse con ella y no debería de haber señal de expresión.

(Ver anexo 11)

4.4 Fotografiado de los resultados

Previamente a la observación con microscopio, a los embriones se le ha quitado el yolk para facilitar la observación del lumen. Una vez limpios se han montado dorsalmente (flat-mount) en portaobjetos de cristal, para lo cual se emplea glicerol 100%, que por su viscosidad facilita la orientación. Para observar los resultados de la hibridación in situ se ha utilizado un microscopio de alta resolución de campo claro.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. PCR del cDNA obtenido en la transcripción reversa

PCR 1 (Fig.10):

Muestras:

1. Marcador de peso molecular
2. HAPLN2
3. Claudin F
4. Stxbp3
5. Stxbp6

La PCR correspondiente a esta imagen (figura 10) se ha realizado en las condiciones principales; temperatura de hibridación 55°C y 30 ciclos de amplificación. Como podemos observar solo se ha amplificado el cDNA de Stxbp6.

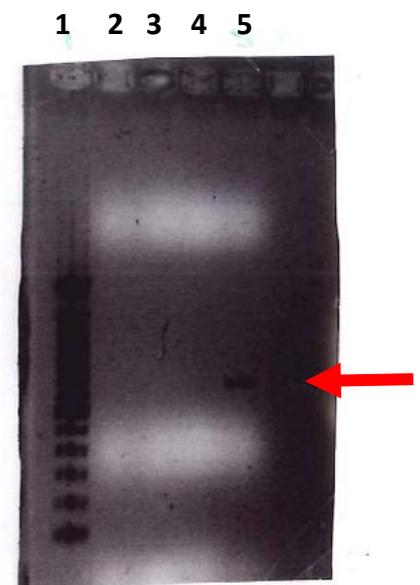
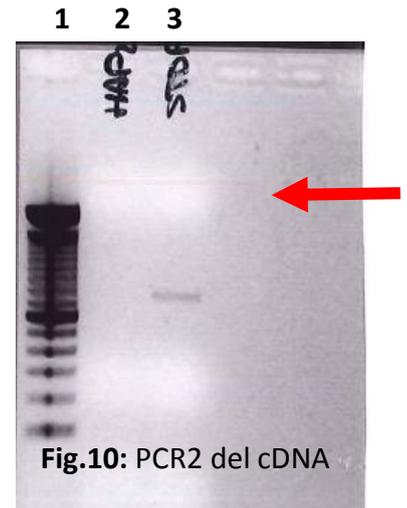


Fig.10: PCR1 del cDNA

PCR 2 (Fig.11):**Muestras:**

1. Marcador de peso molecular
3. Claudin F
4. Stxbp3

La PCR correspondiente a esta imagen (figura 11) se ha realizado en las siguientes condiciones: temperatura de hibridación de 50°C y 35 ciclos de amplificación. Como se observa en la imagen solo se ha amplificado el cDNA de Stxbp3.

**PCR 3 :**

Como en las condiciones de las anteriores PCRs no hemos conseguido amplificar el cDNA de Claudin F, se ha tenido que realizar otra PCR con una cantidad de cDNA mayor en el mix. La amplificación se ha realizado en las condiciones en las que la temperatura de hibridación era de 50 °C y los ciclos de amplificación han sido 30.

5.2. Transformación de células competentes con el plásmido

Hemos podido comprobar la efectividad de la transformación de las células a partir de las colonias obtenidas en los cultivos en placa. Se han obtenido colonias transformadas (blancas) en todos los cultivos realizados para los tres plásmidos diferentes, y la placa que se ha utilizado como control no presentaba colonias. Por lo que la transformación se ha realizado de forma correcta.

5.3. Digestión del plásmido con EcoRI

Mediante la electroforesis hemos podido separar los fragmentos obtenidos en la digestión por su tamaño.

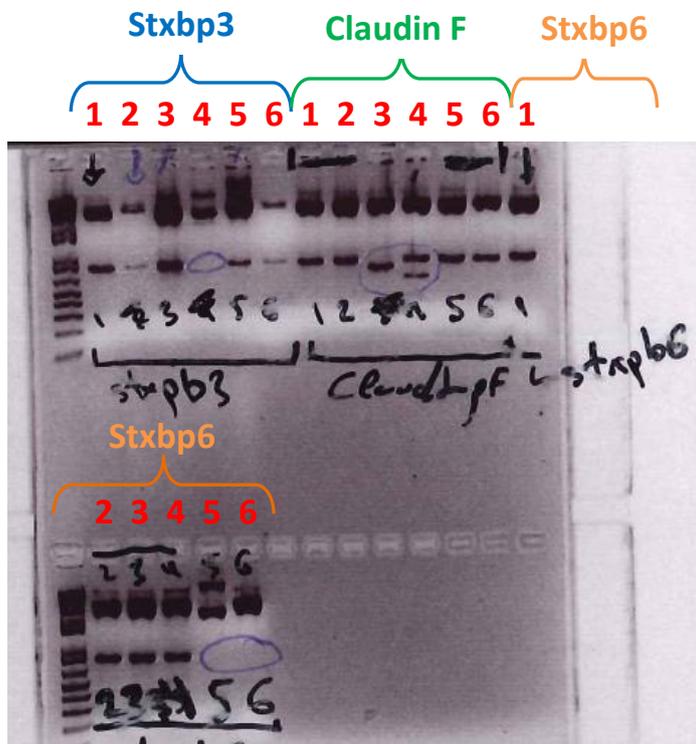


Fig. 12: digestión del plásmido con EcoRI

En la imagen (fig.12) podemos observar que la digestión se ha realizado correctamente para la mayoría de cultivos, ya que hemos obtenido los fragmentos del tamaño deseado.

Para el gen Stxbp3 hemos seleccionado las muestras 1 y 2 para seguir con el experimento, ya que son las que tienen las bandas más

específicas. En el caso del gen Claudin F la mayoría de las muestras tienen unas bandas bien definidas, por lo que hemos seleccionado la 1,2,5 y 6 para continuar con el proyecto. Y por último, para el gen Stxbp6 hemos seleccionado las muestras 1,2,3 y 4, ya que son las muestras que contienen las bandas de tamaño esperado.

5.4. Secuenciación del inserto

Los resultados de la secuenciación del inserto después de realizar una PCR con los cebadores T7 y SP6, son los siguientes:

Claudin F:

AGACATGCTTCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATT
 CACTAGTGATT--TCCACACTAATCCTTCATGTGCTAACACAAATCAATTAAGTTAACTTAAATG
 TCTTTACAAATTAAGTAGATTGAGCTTAAAACAATCAAGTTGTCCCCAAAAGCATAAGAAT
 TGTGTTGATTCAGCTCATTTTATACATGTAGTTTGAACAAACAACAACATCTTTTTTGGAGTC
 TTTTCTTCCATTTCAGGAGCAGTTTAGAAGATGTCAGTCCTTTGAGTTAAAGATATTGACAG
 AGCAGATGAGTAAGCAACAGATATTGCCTTATATTGTTCTCCTTGAGAAATATGTTGGAGT
 AAAGAGTTTTTGAAGTAAAAGTCTTTGTGATCTTGATTTTGGTCAGATTAATGGCATTAGA
 GCATTTATTTAGAGCGTCAGTCAAGAAATATCCTTTATAGTACCTTCAAATATGACCATGTTGA
 AACAAACATCACTCATTAGCACTGCGAAAATCTCAAAAACAAGACCAACAAGTTTTAGCTTTT
 CCAGATCATCTTCGTTTAAAGCTTGGCGGAGTACAAGACCTCAATAAAATTGCTTTTAAATAC
 ATTCATTCAGCCAAACTGAATTAAGGGACAGTTCACACAAAAATCTACATTTACCGCCT
 TATTTATTCTCCCTCAAGTGTTCCAAACCTTTACCAGTTTCTGTTGAACACAAAAGAAGATAT
 TTTGAAGAATGCTGACTGACTGAAACCATTGAGTAAAACAATACAATGGAAGTCAATGGTT
 AATCGAATTCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCAATTCGCC
 CTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACC
 CTGCGTTACCCAATTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGA
 AGAGGCCCGCACCGATCGCCCTCCACAGTTGCGCAGCCTGAATGCGAATGACGCGCCCTG
 TAGCGGGCGCATAGCGCGCGGGTGTGGTGTACGCGCAGCGTGACGCTACACTGCAGCGCTA
 GCGCCGCTTTTCGCTCTCCTCTTCTCGCCGTCGCGCTTCGTCAGCTTTATCGGGCTCCTTA
 GGATCGAATAAGCTTACGGAACCTGAACCAAACTGGATAGGGGTGATGTACGTAAGGCAAT
 CTGCCCTGTTATTA

-- secuencia antisentido con SP6

Hemos podido confirmar que la secuencia del gen Claudin F en nuestro inserto se ha amplificado mediante el cebador SP6.

Stxbp3:

TTTGGCGAGTCGCATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTACTCGTAGATGT
TGTTATTTATAGGTATGAGGTCATAAGCCATGGCTTGGTAAGTGAGCTCGTGAAGAATGGGA
CTAACAGGGTCCATTGCACGGTCAACAATCAGCAGCTGCGCCGGTGTTTTCCCTTTTGTGCG
TAATTTTCATCCAATCATAATGCCGGGCCAGTTTATTATCAACAAGTTCAGCCAACATCTTTCC
ATATCCAGGAGTCGATTCTCTTTTGTATCGGACTCCAGGATACTCGTCCAGCGTAGCACAGAG
AGTTACAATCTGATCTGCAATTTTATCCAGCGTCTTCTCTCTGTCTGACTGAACCCACTGTAG
ATCTTCTTAAAGGCCTCTGGGTTCTCGCAGGTGAACACTTGTGCTCCTGTGGCAGAAAGGA
GATGTTGATCTCTTTACACTTTTAAATGTGCTTGGCGCAGTTCTTCTTCATTTTGTGCGAAGAGC
TCATCAGGACAGTAGTCCGTGAAGAAGACATACGCAGCTTTGTATTTGGGCTTGGGTTTGAA
GTCATTAATAAATGCATCAATACACTCAACAGTGGGAGCCATGAAGTAGATGGCCTTCATATC
TGGAACCGGCTCTCTGTTTTTGAACAGGTTCTCCAAAAGTGAAGTGCCTCGGACATGAGATC
AGACATCTTGCAGCACGAGGACAGTAGGCGTGTGGTGAATCGTCTAGTATGAGGATGTTCC
ACTTTTTGCAGTCTGCAATGATGGTGTCCCTGATCCTTTGCCATACTATTAACTACTAGTGAAT
TCGCGGCCGCTGCAGGTGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGA
GTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAAT
TGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAGTGTAAGCCTGGGGT
GCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTTCAGTCGGGAAA
CTGTGCGTCCAGCTGCATATGATCGCACGCGGAGAGCGATTGCGTATGGGCGCTCTTCGC
TCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCCCGTCTGCTGCGGCGAGGCGTTCAGCTCACTCAGGC
GGTAATACGTATCCCAGATTCGTTAGCTGGAGAGAACTGGGGACCAGCTCATCCAAAGGCA
GACCGTTAAAAGGCCGCGCGGTCT

■ secuencia antisentido con T7 (falta un nucleótido con respecto al endógeno)

La secuencia correspondiente al gen de Stxbp3, se ha amplificado mediante el cebador T7, pero hemos podido comprobar que falta un nucleótido respecto al endógeno. Esto puede ser un error de secuenciación.

Stxbp6:

AAGCGAGTCGCATGCTCCGGCCGCCATGGCGCCGCGGAATTCGATTAAATGTTAGCAGG
AAATGGACGTTTTCAAATATCATTATCAACTGGTACCGAACTCCAGTATCCCAACAACCCTA
ACAGATACTGAATAGTAAAACCACATACTGGTAATACCTACAATAAGTAACACATTTAGCTT
CTTTAAGTCAGCGGTGTCCAACTCGATCCTGGAGGGTCGGTGTCTGCGTATTTTAGCTCC
AACCTTAACCAGCAAATCAAGCTCTTCTAGATTTACTAGAAACGTCCAGGCAGGTGTGCTGA
AGAAAGTTAGAGCTAAACTATGCAGGACACCGGCCCTCCAGGAGTTTGGACACCCCTGTTGT
AAGTGATTTTAGATTGAAATATGCGACTTGTCCCAACTCTGCTTGTAAATATTATAATAATGAT
CGGTGCGATGTATAAGGCTTTAAGTTTGAATGATCAACAATTCTGTGGTTAAAAAAGACATG
ATTTTTTCAAGATACTGCCATGATGATACACAATGTCCTCGATTCTTGATGTGATGCTTCAT
GTGCGTCCCGTCACAGTCTGTGATAGCAGGGCTGATGAAGCAGATTCTCCGAAAAATACAGC
AAAGGCTCAACACTTGTGCTTCATGGCCAGCTTGTGTGCGGTGTCAGCGAAGTGCTGTGCGC
TGTTTCATCATGTCGCTGGTCTTCTCTCCGCGCGGCCAGTCTCTCTCCACGCTCATTAGAGC
CTGACTGGCCTTCTGTACCGCACTGCTCACACTGTCAGCCGCACCGTGGAGGAGACTGCTATT
ACCTCCCAGTAGTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGC
TCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGCGTAATC
ATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCC
GGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGCGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAGTGCGTGCG
CTCACTGCCGCTTTCAGTCGGGAAACTGTCTGCAGCTGCATATGATCGGCACGCGCGGGGAG
AGGCGTTGCGTATGGCGCTCTCCGCTTCTCCGCTCCTGACCGTGGCTCGTCGGTCGCTCGG
CGAGCGGATAGCCACTCAAGGCGGCTACGTACCAGATCGAAAGCCGGAGAAGTGTGGACAA
GGGCGCAAGCCCGAACGCTTAAA

--- secuencia antisentido de stxbp6 con T7

Hemos determinado que la secuencia que codifica Stxbp6, en nuestro plásmido se ha amplificado mediante el cebador T7.

5.5. Linearización del plásmido transfectado

Muestras (fig.13):

1. Marcador de peso molecular.
2. Claudin F no linearizado.
3. Claudin F linearizado.
4. Stxbp3 no linearizado.
5. Stxbp3 linearizado.
6. Stxbp6 no linearizado.
7. Stxbp7 linearizado.

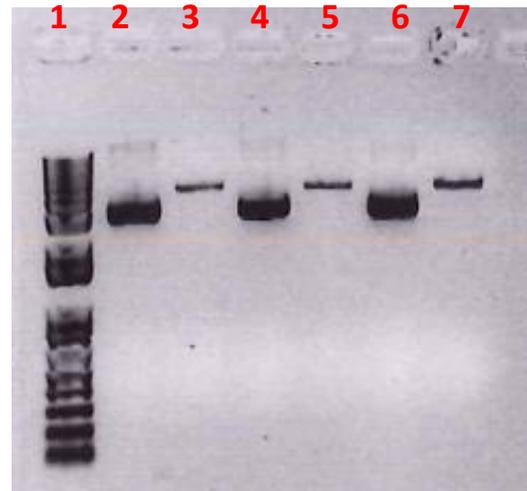


Fig.13: digestión enzimática

Como podemos observar en la imagen las muestras linearizadas y no linearizadas tienen diferente peso molecular y corren a diferentes velocidades. Por lo que podemos decir que la linearización se ha realizado correctamente.

5.6 Transcripción del cDNA de la secuencia.

Muestras (fig.14):

1. Marcador
2. Claudin F
3. Stxbp3
4. Stxbp6

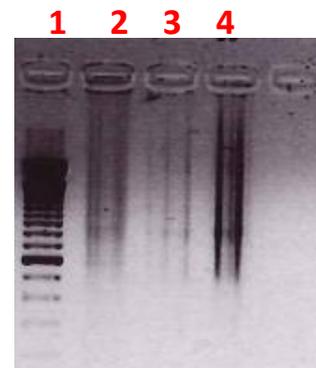


Fig.14: transcripción del cDNA

Se ha utilizado un gel de agarosa para realizar la electroforesis aún sabiendo que no es el adecuado para analizar las muestras de RNA. En este caso se ha querido realizar un análisis cualitativo de la transcripción, por lo que no esperábamos observar unas bandas definidas en un peso molecular específico. Así bien, mediante esta imagen podemos decir que la transcripción se ha realizado correctamente ya que las muestras no presentan bandas específicas.

5.7. Hibridación in situ

Se ha realizado una hibridación in situ con cada sonda en embriones de entre 13 hpf y 24 hpf con tal de detectar la expresión de los genes *Stxbp3*, *Stxbp6* y *Claudin F* en el oído interno del embrión. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Claudin F: (fig.15)

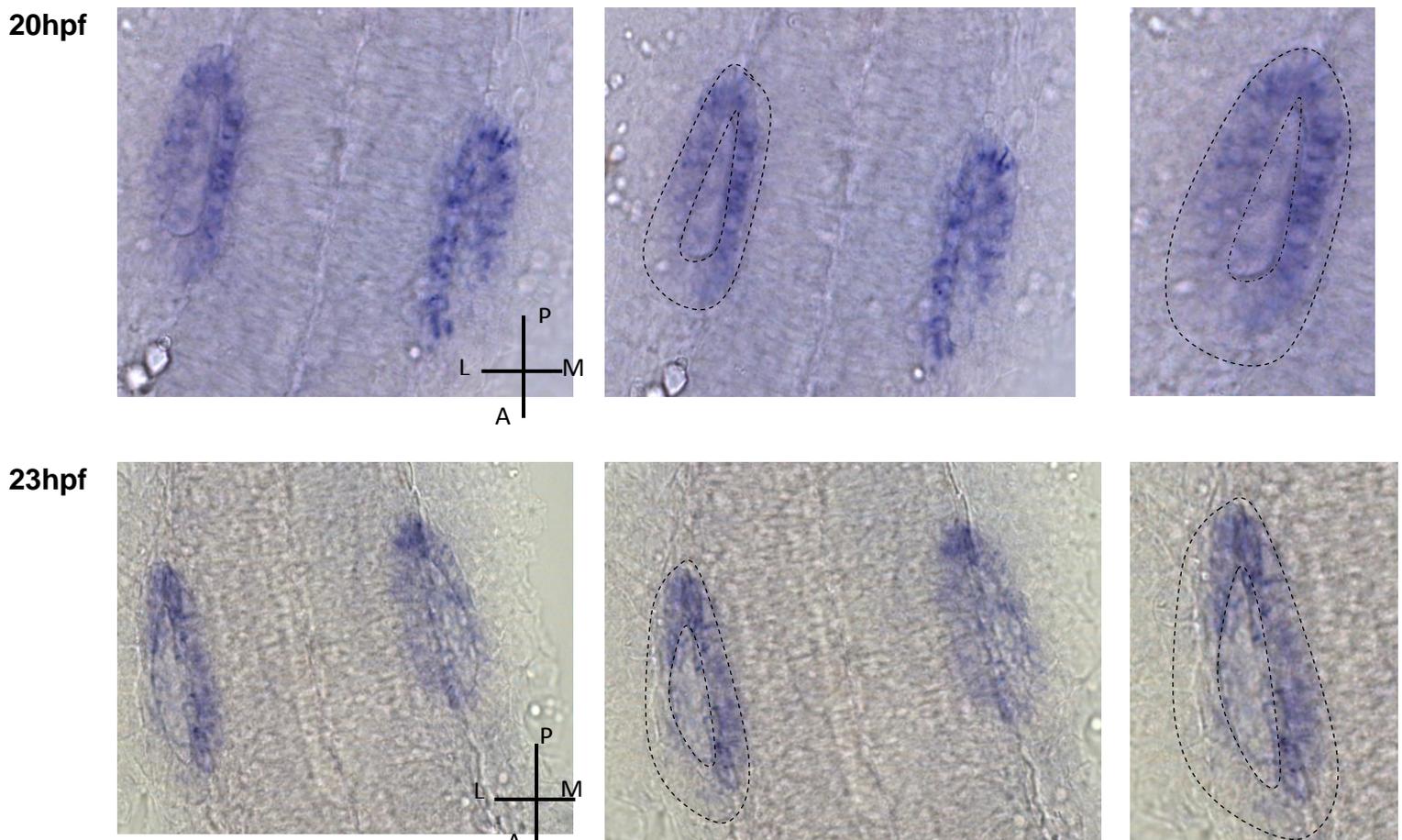


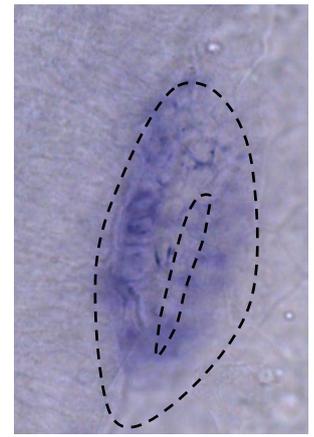
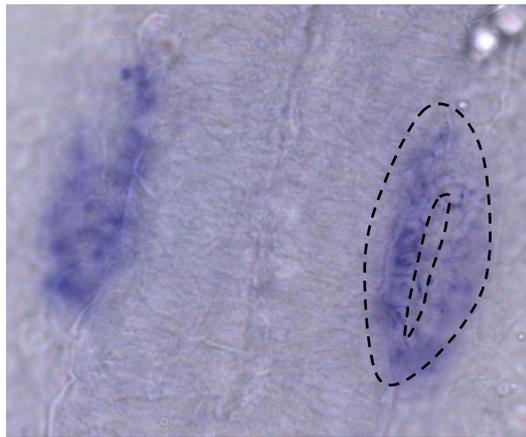
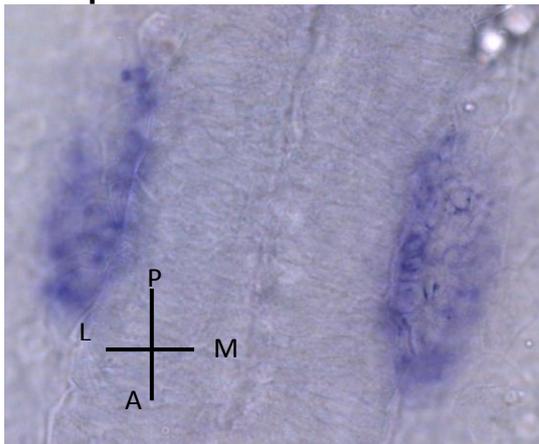
Figura 15: Expresión del gen *Claudin F* en el oído interno del pez cebra en los estadios 20hpf y 23 hpf.

La señal de expresión de la proteína en el oído es intensa y muy definida, ya que solo se ha detectado su expresión en el oído. En las imágenes se puede observar que la proteína se expresa en toda la placoda menos en el dominio anteriolateral.

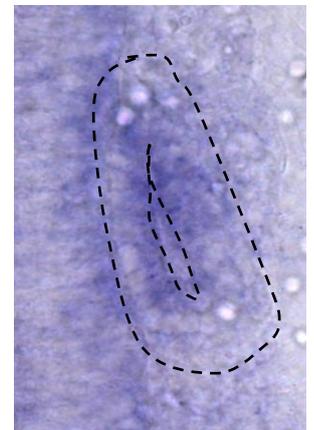
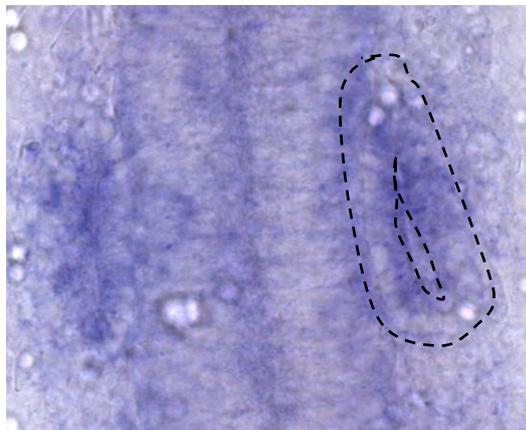
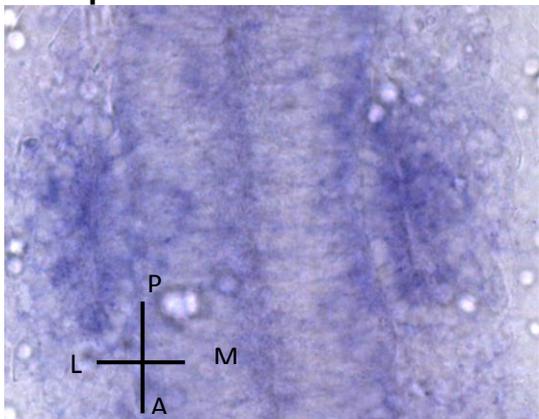
Por otro lado, hemos podido determinar que la proteína Claudin F se expresa en el oído en estadios más tardíos (19 hpf), por lo que podemos decir que no participa en la formación del lumen del oído interno en estadios tempranos del embrión, y no sería un gen candidato en la participación de la formación del lumen.

Stxbp3: (fig.16)

17 hpf



20 hpf



22 hpf

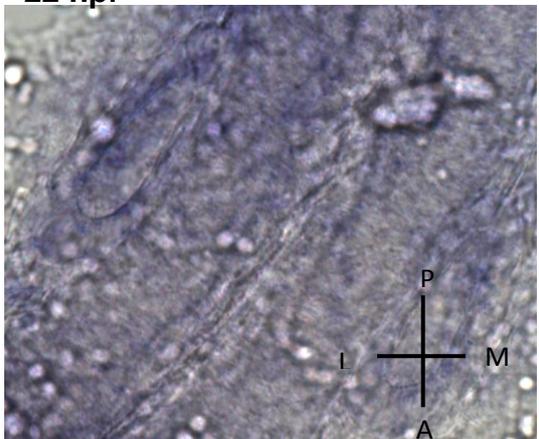


Figura 16: Expresión del gen *Stxbp3* en el oído interno del pez cebra en los estadios 17hpf, 20hpf y 22 hpf.

En las imágenes podemos observar que la expresión de la proteína Stxbp3 en el oído no es específica, es decir, no sigue un patrón de expresión. Podemos decir que tiene una expresión homogénea en toda la placoda en los diferentes estadios del embrión (entre 16hpf y 24 hpf).

Como se ha podido comprobar, esta proteína se expresa desde los estadios más tempranos del desarrollo del oído hasta los más tardíos. Esto lo convierte en un gen candidato para estudiar la formación del lumen en el oído interno del pez cebra.

Se puede observar que la señal es un poco más intensa en la pared de la placoda, en la parte nominal. Esto tendría sentido ya que como se ha mencionado anteriormente esta proteína participa en la fusión de vesículas, que es una de las posibles formas de la formación del lumen. Para poder verificar esta localización necesitaríamos una señal más intensa de la que hemos obtenido.

Stxbp6: (fig.17)

21 hpf

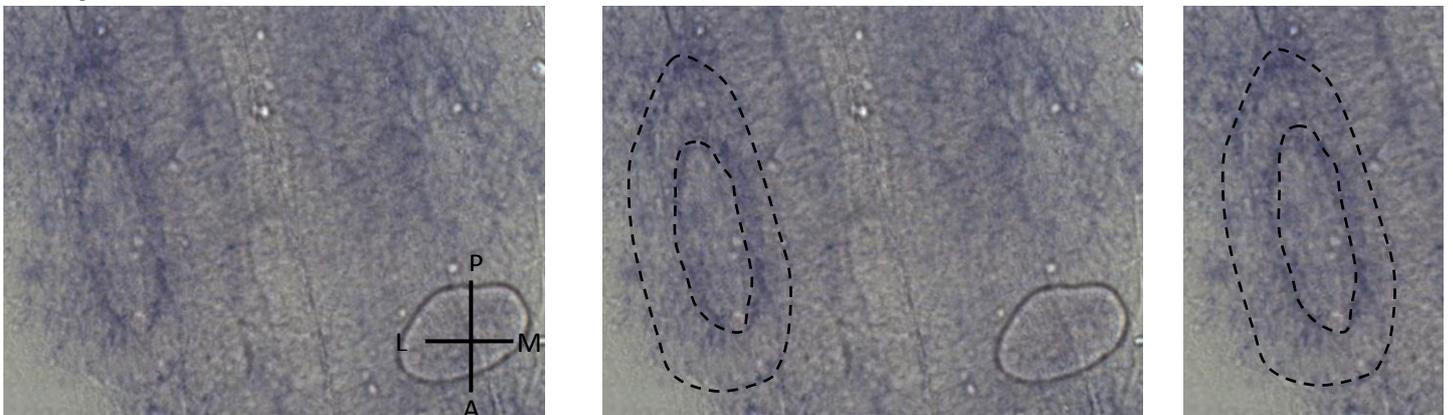


Figura 17: Expresión del gen Stxbp6 en el oído interno del pez cebra en el estadio 21 hpf.

En el caso de la proteína Stxbp6 podemos observar que la expresión es positiva en el oído del embrión, y que se expresa de forma parecida que la proteína Stxbp3. Este resultado nos ha sorprendido del todo, ya que las dos proteínas pertenecen a la misma familia.

Al tener imágenes de un solo estadio, no podemos determinar si podría ser un gen candidato para estudiar la formación del lumen. La señal es positiva.

Respecto al control negativo, no se han fotografiado los resultados obtenidos. Pero se han obtenido los resultados esperados, la sonda sentido utilizada no ha hibridado con la secuencia diana de los genes, por lo que no se ha detectado señal de expresión.

6. CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, y de acuerdo a los objetivos planteados, podemos concluir que:

1. Las proteínas Stxbp3, Stxbp6 y Claudin F se expresan durante el desarrollo del oído interno en el pez cebra.
La proteína Claudin F tiene un patrón de expresión acentuado en la que se expresa en toda la placoda excepto en la parte anteriolateral. Las proteínas Stxbp3 y Stxbp6 en cambio, se expresan de forma homogénea en toda la placoda y no presentan ningún patrón de expresión.
2. La proteína Stxbp3 se expresa en desde estadios más tempranos (16hpf), por lo que puede ser un gen que participe en la formación del lumen, y puede que sea un buen candidato para estudios posteriores de este proceso.
3. Hemos podido comprobar que Claudin F se expresa a partir del estadio de 19 hpf, por lo que es muy improbable que esta proteína no participe en la formación del lumen. Es más probable que se expresa una vez que el lumen ya se ha formado, por lo que esta proteína no sería un gen candidato a la hora de estudiar este proceso.

7. REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

Ann C. Zovein, Alfonso Luque, Kirsten A. Turlo, Jennifer J. Hofmann, Kathleen M. Yee, Michael S. Becker, Reinhard, Fassler, Ira Mellman, Timothy F. Lane, M. Luisa Iruela-Arispe, 2010. β 1 Integrin Establishes Endothelial Cell Polarity and Ateriolar Lumen Formation via a Par3-Dependent Mechanism.

Boris Strilic, Jan Eglinger, Michael Krieg, Martin Zeeb, Jennifer Axnick, Pavel Babál, Daniel J. Müller, Eckhard Lammert, 2010. Electrostatic Cell-Surface Repulsion Initiates Lumen Formation in Developing Blood Vessels.

Catherine Haddon, Julian Lewis, 1996. Early ear development in the embryo of the zebrafish, *Danio rerio*.

Carly Willenborg, Jian Jing, Christine Wu, Hugo Matern, Jerome Schaack, Jemima Burden, Rytis Prekeris, 2011. Interaction between FIP5 and SNX18 regulates epithelial lumen formation.

Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona,
www.cmrb.eu/es_news/view.php?ID=45&CATEGORY2=64

Clare E Buckley, Xiaoyun Ren, Laura C Ward, Gemma C Girdler, Claudio Araya, Mary J Green, Brian S Clark, Brian A Link, Jonathan DW Clarke, 2012. Mirror – symmetric microtubule assembly and cell interactions drive lumen formation in the zebrafish neural rod.

David M. Bryant, Aniron Datta, Alejo E. Rodríguez-Fraticelli, Johan Peränen, Fernando Martín-Belmonte, Keith E. Mostov, 2010. A molecular network for de novo generation of the apical surface and lumen.

Fernando Martín-Belmonte, Wei Yu, Alejo E. Rodríguez-Fraticelli, Andrew Ewald, Zena Werb, Miguel A. Alonso, Keith Mostov, 2008. Cell-Polarity Dynamics Controls the Mechanism of Lumen Formation in Epithelial Morphogenesis.

Jacob M. Sawyer, Jessica R. Harrell, Gidi Shemer, Jessica Sullivan-Brown, Minna Ro-Johnson, Bob Goldstein, 2009. Dev. Bio. 341 5-19. Apical constriction: A cell shape change that can drive morphogenesis

Javier Salas, 2013. La 'transparencia' del pez cebra le convierte en el mejor ratón de laboratorio

Jennifer H. Gutzman¹ and Hazel Sive, 2010 Epithelial relaxation mediated by the myosin phosphatase regulator Mypt1 is required for brain ventricle lumen expansion and hindbrain morphogenesis.

Jingjing Zhang, Jörg Piontek, Hartwig Wolburg, Christian Piehl, Martin Liss, Cécile Otten, Annabel Christ, Thomas E. Willnow, Ingolf E. Blasig, and Salim Abdelilah-Seyfried, 2009. Establishment of a neuroepithelial barrier by Claudin5a is essential for zebrafish brain ventricular lumen expansion.

Kate F. Barald, Matthew W. Kelley, 2004, *Development* 131, 4119-4130. From placode to polarization: new tunes in inner ear development.

Michele Miller Bever, Donna M. Fekete, 2002. Atlas of the Developing Inner Ear in Zebrafish

Michel Bagnat, Isla D. Cheung, Keith E. Mostov, Didier Y. R. Stainier, 20. Genetic control of single lumen formation in the zebrafish gut.

Molly J. Harding, Alex V. Nechiporuk, 2012. Fgfr-Ras-MAPK signaling is required for apical constriction via apical positioning of Rho-associated kinase during mechanosensory organ formation.

Sitio para maestros sobre el desarrollo del Pez Cebra y su enseñanza en la escuela, <http://pezcebradesarrollo.wordpress.com/tag/zebrafish/>

Thomas Lecuit, Pierre-François Lenne, 2007. Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis.

ZFIN, http://zfin.org/zf_info/anatomy/dict/ear/ear.html

8. ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de la Transcripción Reversa

Reverse transcription protocol Superscript III

cDNA from isolated zebrafish embryos RNA is obtained using "Super Script III Reverse Transcriptase" kit from Invitrogen.

Notes:
Superscript enzyme must be kept on ice while in the bench
Use RNase free tips and be careful with RNase contamination of reagents

Random hexamer primers

For 20 µl of reaction

Mix1 **HIELO**

1 µl	200 ng/µl Random Primers
1 µl	10 mM dNTP (Qiagen kit)
x µl	RNA (5-50 ng. Normally 10 ng)
(11-x) µl	dH ₂ O (up to a final volume of 13 µl)

Incubate at 65°C for 5' and then 1' on ice.

Mix 2 **HIELO**

(Prepare premix by multiplying by the number of samples, plus 0,1/reaction)

4 µl	5x first strand buffer
1 µl	0.1M DTT
1 µl	RNAsine (from transcription box)
1 µl	SS III RT-enzyme (Reverse Transcriptase)

Volume : 7 µl/sample

- Mix by pipetting gently up and down
- Incubate 5' at 25°C (RT)
- Incubate 60' at 50°C
- Inactivate for 15' at 70°C
- Let it cool for 5' and store at -20°C

Anexo2: Protocolo de la PCR del cDNA obtenido en la transcripción reversa.

PCR on cDNA transcribed from RNA isolated from zebrafish embryos

Everything has to be done on ice

5 µl	10x PCR buffer Eurobio (final conc. 1x)	
2 µl	50 mM MgCl ₂ Eurobio (final conc. 2mM)	5 µl
1 µl	10 mM dNTPs (final conc. 0.2 mM)	
1 µl	cDNA template	
0.8 µl	10 µM 3' primer (50 µM → final conc. 0.8 µM)	
0.8 µl	10 µM 5' primer (50 µM → final conc. 0.8 µM)	
0.2 µl	6 U/µl Taq polimerase Eurobio (final conc. 1.20 U/50 µl)	
39.2 µl	ddH ₂ O (up to 50 µl)	

- Reaction mixture is prepared on ice in a laminar flow cabinet.
- Control reaction is done with ddH₂O instead of template DNA
- First, Master mix (PCR buffer, dNTPs, ddH₂O and Taq polimerase) is prepared. Then it is aliqueted and specific one pair of primers is added to each reaction. Finally, each reaction is transferred to PCR tubes with MgCl₂ and either cDNA template or ddH₂O.

PCR program:

	94°C	3'

Denaturation	94°C	1'
Annealing	58°C	1'
Extension	72°C	2'

	72°C	5'

	4°C	hold

35 cycles

PCR that I used for enhancers

1 µl	cDNA template
2 µl	10 µM Fw/Rv primer (final conc. 1 µM)
4 µl	5x Phire buffer
1.6 µl	10 mM dNTPs (final conc. 0.8 mM)
0.2 µl	Phire enzyme
11.2 µl	ddH ₂ O (up to 20 µl)

PCR program: PCR genomic (user Alex)

Anexo 3: Protocolo de ligación.

3. **Protocol for Ligations Using the pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vectors and the 2X Rapid Ligation Buffer**

3.A. **Ligation Protocol**

1. Briefly centrifuge the pGEM®-T or pGEM®-T Easy Vector and Control Insert DNA tubes to collect the contents at the bottom of the tubes.

2. Set up ligation reactions as described below.

Note: Use 0.5ml tubes known to have low DNA-binding capacity (e.g., VWR Cat.# 20170-310).

Vortex the 2X Rapid Ligation Buffer vigorously before each use.

3. Mix the reactions by pipetting. Incubate the reactions for 1 hour at room temperature.

Alternatively, if the maximum number of transformants is required, incubate the reactions overnight at 4°C.

Reaction Component	Standard Reaction	Positive Control	Background Control
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5µl	5µl	5µl
pGEM®-T or pGEM®-T Easy Vector (50ng)	1µl	1µl	1µl
PCR product	Xµl*	-	-
Control Insert DNA	-	2µl	-
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl)	1µl	1µl	1µl
nuclease-free water to a final volume of	10µl	10µl	10µl

*Molar ratio of PCR product:vector may require optimization.

Notes:

1. Use only the T4 DNA Ligase supplied with this system to perform pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector ligations. Other commercial preparations of T4 DNA ligase may contain exonuclease activities that may remove the terminal deoxythymidines from the vector.
2. 2X Rapid Ligation Buffer contains ATP, which degrades during temperature fluctuations. Avoid multiple freeze-thaw cycles and exposure to frequent temperature changes by making single-use aliquots of the buffer.
3. Longer incubation times will increase the number of transformants. Generally, incubation overnight at 4°C will produce the maximum number of transformants.

Anexo 4: Protocolo de transformación de células competentes

TRANSFORMATION OF DH5

1. Thaw competent cells on wet ice.
2. Add 100 μ l of competent cells to ^{2 μ l} of ligation reaction.
3. Incubate 30 minutes on ice.
4. Heat shock reaction for two minutes at 42°C.
5. Add 900 μ l L. Broth or S.O.C. media, without drug resistance.
6. Grow up at 37°C with shaking for 30-60 minutes.
7. Spread 100 μ l/plate onto L. Broth/agar plus Ampicillin (50 μ g/ml). \Rightarrow 150 μ l
8. Incubate over night at 37°C.

Anexo 5: Purificación del plásmido

Preparation of Cleared Lysate

1. Pellet cell by centrifugation for 5 min at 10,000xg \approx 11000 rcf
2. Resuspend thoroughly in 250ul of buffer S1 + vortex
3. Add 250ul of buffer S2 \rightarrow mix by inverting x4 (Do NOT vortex)
 * Incubate until the lysate become clear, but do not exceed 5min
4. Add 350ul of buffer S3 \rightarrow immediately mix by inverting x4~6
5. Centrifuge for 10 min \approx 10,000xg \approx 11000 rcf

Isolation and Purification of plasmid DNA

6. Transfer carefully the soup to spin column, centrifuge for 30 sec, discard the flow-thru
7. (Optional) Apply 500ul of buffer AW, centrifuge for 30 sec, discard the flow-thru
8. Apply 700ul of buffer PW, centrifuge for 30 sec, discard the flow-thru
9. Centrifuge for an additional 1~2min
 Transfer the spin column to a new 1.5ml tube
10. Add 50ul of buffer EB or ddH₂O, let stand for 1min, centrifuge for 1min

Anexo 6: Protocolo Secuenciación.

SECUENCIAR en un sólo tubo con Dideoxi Nucléotidos Marcados.

1º) PREPARACIÓN DE LA REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN

Reactivos	Protocolo Recomendado.
PREMIX	2 μ l
DMSO [conc. final 5 a 7%] *	1 - 1,4 μ l
DNA MOLDE	
DNA SS [conc min.] = 0.1 μ g/ μ l	0.5 - 1.0 μ l
<u>DNA DS</u> [conc min.] = 0.2 μ g/ μ l	1.5 - 2.5 μ l
Producto de PCR (10 - 30 ng/ μ l)	3.0 - 6.0 μ l
<u>PRIMER</u> (1 μ l)	3.2 pmol.
<u>ddH2O</u> (5 μ l)	Hasta 10 μ l Vol. Final

*.Se recomienda añadir de 5 a 7% de DMSO para favorecer la secuenciación de DNAs ricos en GC, con estructura $I\text{I}^{\text{aria}}$, o DNAs grandes aunque a veces es incluso necesario añadirlo para obtener mejores resultados con productos de PCR. También para ciertos cebadores universales tales como T7, T3 o SP6 un 5% favorece la obtención de un mejor resultado. Para DNAs ricos en GC también se puede considerar el añadir 5%DMSO-5%Glicerol (el glicerol puede dificultar la precipitación post-PCR).

NB: El pGEM control esta a 0.2 μ g/ μ l utilizar 2 μ l
 El Primer Control -21M13 a 0.8 pmol/ μ l utilizar 4 μ l

Anexo 7: Protocolo Precipitación

PCR

1 μ l DNA
 2 μ l PREMIX Big Dye 3.1
 6 μ l ddH₂O
 1 μ l Primer (1/3 10 μ M Primer)
 Programa al termociclador de BD. User: Fer; Prog: Seq.

PRECIPITACIO \rightarrow (20 μ l Analis)

+10 μ l ddH₂O

En un nou epp.
 20 μ l mostra
 5 μ l 125mM EDTA
 60 μ l EtOH 100%

Vortex
 Incubar 15' RT
 Centrifugar 30' a max vel. A 4º
 Descartar sobrenedant *
 Afegir 200 μ l EtOH 70%
 Centrifugar 5' a max vel. A 4º
 Descartar sobrenedant i assecar el pel·let 15-30' a RT
 Congelar mostres

Anexo 8: Protocolo Linearización

Linearización

4 μ l cDNA
2 μ l Buffer 10X (depende de la enzima de restricció a utilizar)
1 μ l Enzima de restricció
13 μ l H₂O

Volumen total = 20 μ l

Incubar 2 H a 37°C

Correr 1 μ l en gel de agarosa para verificar.

Si no se ha linearizado bien se deja un poco más incubando (1 hora por ejemplo).

Agregar 1 μ l de Proteinasa K (stock = 10 mg/ml) + 1 μ l SDS 10%
(vortex y spin)

Incubar 30 min a 37°C

Agregar 80 μ l de H₂O (de forma que se alcanza un volumen final de 100 μ l)

Anexo 9: Protocolo precipitación**Precipitación**

a. Fenol (igual volumen que sol. a pptar.)

Agregar: 100 μ l fenol
Agitar bien (vortex)
Centrifugar 10 min. a 13.000 rpm y 4°C.

~~Retirar~~ fase acuosa (superior) a otro epp.

Recuperar

b. Fenol:Clorofomo (igual volumen que sol. A pptar.)

Agregar: 100 μ l fenol:cloroformo (1:1) (puede agregarse 50 μ l de c/u)
Agitar bien (vortex)
Centrifugar 10 min. A 13.000 rpm y 4°C.

~~Retirar~~ fase acuosa (superior) a otro epp.

Recuperar

c. Etanol (2.5 vol del vol. a pptar.)

Agregar 278 μ l de Et-OH 100% frío (-20°C)
11 μ l de ~~100 mM~~ 3M NaAc
Agitar (vortex)

Incubar 30 min. a -20°C
Centrifugar 10 min. A 13.000 rpm y 4°C.

Descartar sobrenadante (el pellet es el DNA)

d. Lavado con etanol 70%

Agregar 500 μ l de Et-OH 70% frío (-20°C)

Centrifugar 10 min. A 13.000 rpm y 4°C.
Descartar sobrenadante (el pellet es el DNA)

Dejar evaporando el et-OH al menos 10 min. a 37°C

Agregar 10 μ l de H₂O -> Almacenar a -20°C

Anexo10: Protocolo Transcripción

Transcripción

4 µl de mezcla de Ribonucleótidos (Dig-UTP) (*Dig. Mix*)
 2 µl de Buffer de Transcripción 10 X.
 1 µl de RNAsine
 1 µl RNA pol
 4 µl de DNA linearizado
 8 µl de H₂O

Vol. Final = 20 µl

Vortex, spin

Incubar 2 H a 37°C

Confirmar transcripción corriendo 1 µl de muestra (mientras dejar a 37°C)

Dig-UTP MIX

UTP dil. 1:10 1 µl UTP
 9 µl H₂O

6,5 µl UTP (dil 1:10)
 3,5 µl Dig-UTP
 1 µl ATP
 1 µl CTP
 1 µl GTP
 7 µl de H₂O

Vol. Final MIX = 20 µl

Incubar ~~1h~~ min. A 37 °C

Precipitación

A. Etanol (2.5 vol del vol. a pptar.) y LiCl

Agregar 100 µl de H₂O
 300 µl de et-OH 100% -20°C (2,5 vol)
 10 µl de LiCl 4 M

Agitar bien e incubar 30 min. a -20°C

Centrifugar 10 min. A 13.000 rpm y 4°C.

Descartar sobrenadante

B. Lavado con etanol 70%

Agregar 500 µl de et-OH -20°C

Centrifugar 10 min. A 13.000 rpm y 4°C.

Descartar sobrenadante

Dejar evaporando el et-OH al menos 10 min. a 37°C

Agregar 20 µl de H₂O

(10 µl)
 Almacenar a -20°C

Anexo 11: Protocolo Hibridación In Situ

1. Fix the embryos at desired stages with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS overnight at 4°C.
2. Wash the embryos 2 x 5 min with PBS 0.1% Tween-20 solution (PBT).
3. Dehydrate embryos with MeOH gradually at room temperature.
4. Rehydrate embryos gradually by rinsing them at room temperature 10 min with 75%MeOH, 50%MeOH, 25%MeOH and 2 x 10 min PBT.
5. Dechoriate embryos in PBT
6. Incubate embryos with proteinase K (10mg/ml, 1/1000 in PBT) for 10 min if they are younger than 48 hpf, or for 20 min if they are 48 hpf or older.
7. Wash 5 min PBT
8. Postfix with 4% PFA for 40 min.

Hybridization

9. Prehybridize the embryos with the hybridization buffer, 1h at 70°C.

Hybridization buffer:

25 ml 100% formamide
250 µl 10mg/ml SSC ph 4.5
1ml 25mg/ml tRNA
500 µl 10% Tween-20
125 µl 1M citric acid ph 6.0
10.5 ml ddH₂O

10. Hybridize the embryos with probes diluted in hybridization buffer 1/2000, overnight at 70°C.

HYP- buffer:

32,5 ml 100% formamide
12,5 20x SSC ph 4.5
500 µl 10% Tween-20
4,5 ml ddH₂O

Washes

11. Incubate embryos with:

Wash 1, 10 min at 70°C

Wash 2, 10 min at 70°C

Wash 3, 10 min at 70°C

Wash 4, 10 min at 70°C

Wash 5, 2 x 30 min at 70°C

PBT at room temperature

Wash 1: 75% HYB- , 25% 2xSSC

Wash 2: 50% HYB- , 50% 2xSSC

Wash 3: 25% HYB- , 75% 2xSSC

Wash 4: 2 x SSC

Wash 5: 0,5 x SSC

12. Incubate embryos with 90 min at room temperature with blocking solution.

13. Incubate embryos overnight at 4°C with anti-DIG-AP diluted in blocking solution 1:4000.

14. Wash 10 x 10 min with PBT

15. Incubate the embryos 3 x 10 min with alkaline phosphatase buffer.

16. Develop the reaction by incubating embryos in the dark with the following solution:

45µl NBT

35 µl BCIP

10 ml alkaline phosphatase

17. STOP reaction with PBT

18. Wash with PBT and postfix with 4%PFA, 2h at room temperature.