

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT de BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE DOCTORAT en BIOTECNOLOGIA
BIENNI 2001-2003

***Producció d'un inhibidor del VIH-1
en plantes de tabac i d'arròs***

Memòria presentada per Marc Castellet Llerena per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

el director de tesi

l'autor

el tutor

M^aDolors Ludevid Múgica

Marc Castellet Llerena

Albert Ferrer Prats

Barcelona, Juny de 2006

Objectius

Objectiu general

L'objectiu general d'aquesta tesi és:

Desenvolupar una estratègia per a l'expressió de proteïnes recombinants en plantes basada en el seu direccionament a un compartiment subcel·lular que permeti:

A) acumular la proteïna de forma estable

B) sense alterar el creixement ni el desenvolupament natural de la planta hoste.

Degut a que el reticle endoplasmàtic (RE) vegetal és ric en subdominis funcionalment especialitzats que permeten acumular proteïnes de forma estable, es pretén dissenyar una estratègia per a expressar i acumular la proteïna recombinant dins el RE. S'ha escollit com proteïna terapèutica el **T-20**, inhibidor de l'entrada del virus VIH-1. Es tracta d'un pèptid de gran interès en la indústria farmacèutica i difícil de sintetitzar per mètodes químics.

Com a espècies productores s'han utilitzat el tabac i l'arròs ja que ofereixen certs avantatges per a la producció de proteïnes recombinants. El **tabac** s'ha escollit com a planta model per a expressar el T-20 constitutivament en teixits vegetatius. Els seus principals avantatges són:

- Gran biomassa foliar.
- Creixement ràpid i producció prolífera de llavors.
- Facilitat de transformació i manipulació.
- Planta no comestible.

L'**arròs** s'ha escollit per a expressar i acumular el T-20 específicament en gra. Els seus principals avantatges són:

- Cereal de conreu estès arreu del món.
- Gran biomassa en forma de gra.
- Facilitat d'emmagatzematge de les llavors.
- Relativament fàcil de transformar i manipular.

Objectius concrets

Els objectius concrets s'han dividit en dos grups segons la planta hoste utilitzada per a l'expressió de T-20 i es basen en una estratègia experimental dissenyada prèviament, que es descriu en l'apartat següent .

Així doncs, utilitzant plantes de **tabac** com a sistema de producció de T-20 es volen assolir els següents objectius:

- **Expressió constitutiva i direccionament al RE de T-20 mitjançant fusió amb diferents dominis rics en prolina d'una proteïna de reserva de blat de moro (γ -zeïna) en plantes de tabac.**
- **Estudi de la localització subcel·lular de les proteïnes recombinants en fulles de tabac.**
- **Purificació de T-20 recombinant produït en tabac i determinació de la seva activitat com inhibidor de fusió del virus VIH-1.**

Dins l'estudi de l'expressió específica del T-20 en grans **d'arròs** s'han plantejat els següents objectius concrets:

- **Estudi de l'activitat del promotor de la γ -zeïna de blat de moro (γ Z) en plantes d'arròs i la seva possible aplicació per a expressar T-20 en les llavors d'arròs.**
- **Expressió específica de T-20 en l'endosperma d'arròs mitjançant fusió amb els dominis rics en prolina de γ -zeïna.**
- **Estudi de la localització subcel·lular de T-20 en gra d'arròs.**

Estratègia

1. Precedents

L'estratègia utilitzada en aquest treball per acumular T-20 en plantes deriva d'anteriors estudis sobre transport intracel·lular i formació de cossos proteics d'una proteïna de reserva de blat de moro: la γ -zeïna de 27 kD. Les peculiars característiques d'aquesta proteïna fan que sigui interessant per a possibles aplicacions biotecnològiques.

La γ -zeïna de 27 kD és una proteïna de reserva, de la família de les prolamines, que s'acumula durant el desenvolupament del gra de blat de moro i acaba constituint el 15 % del contingut proteic de l'endosperma. Després de ser sintetitzada en el reticle endoplasmàtic rugós (RE), és translocada al lumen gràcies a un pèptid senyal present en l'extrem N-terminal de la seva seqüència (Shewry i col., 1995). Posteriorment, mitjançant processos que encara es desconeixen, s'agrega junt amb les altres zeïnes i s'acumula en unes estructures vesiculars derivades del RE, que reben el nom de cossos proteics (CP)(Galili i col., 1993). Mitjançant estudis de microscòpia electrònica s'ha pogut observar que la γ -zeïna se situa a la perifèria d'aquests orgànuls envoltant el nucli central format majoritàriament per α -zeïnes (Ludevid i col., 1984; Lending i Larkins, 1989)(Fig.12). Aquesta distribució concorda amb les propietats fisico-químiques de la γ -zeïna, que presenta un marcat caràcter amfipàtic a diferència del caràcter hidrofòbic de les α -zeïnes.

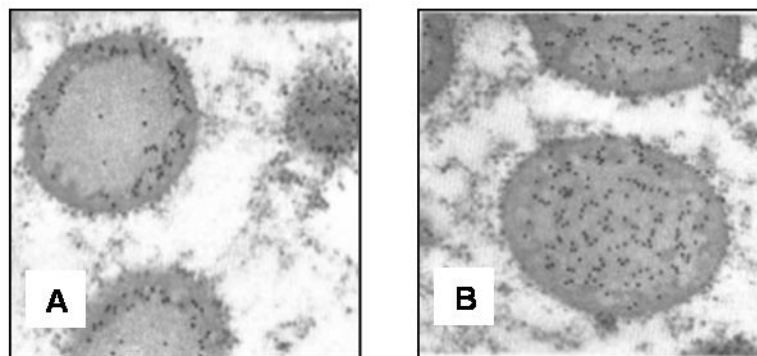


Figura 12. Distribució de γ - i α -zeïna en els cossos proteics de blat de moro. Micrografies electròniques de cèl·lules de l'endosperma on s'ha immunolocalitzat la γ -zeïna (A) i la α -zeïna (B) (Lending i Larkins, 1989).

La γ -zeïna presenta una estructura peculiar (Prat i col., 1995)(Fig.13). En el seu extrem N-terminal es poden diferenciar dos dominis rics en prolines característics: un domini repetitiu format per 8 repeticions de l'hexapèptid PPPVHL i el domini Pro-X, format per la alternança de prolina amb un altre aminoàcid. D'altra banda, en l'extrem C-terminal hi ha tres dominis estructurals (A, B i C) amb un alt contingut en cisteïnes que es troben altament conservats amb altres prolamines de cereals (Shewry i col., 2002).

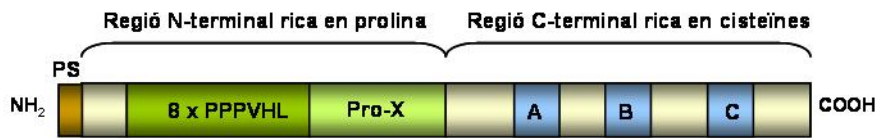


Figura 13. Esquema representatiu de l'estructura de la γ -zeïna de 27 kD. En colors s'han marcat: el pèptid senyal de direccióment a reticle (PS), els dominis repetitiu i Pro-X rics en prolina (verd) i els dominis rics en cisteïnes (A,B,C) de la regió C-terminal (blau).

Geli i col. (1994) van demostrar que els dominis N-terminals rics en prolina de la γ -zeïna eren responsables de la seva retenció en el RE; la delecció d'aquests dominis provocava la secreció de la proteïna (Fig.14). La importància de la regió N-terminal en la retenció al RE va quedar confirmada mitjançant l'expressió de dos formes truncades de la γ -zeïna en oòcits de *Xenopus* (Torrent i col., 1994). Per tant, amb aquests precedents es pot concloure que la informació necessària per a la retenció al RE es troba en la regió N-terminal rica en prolina de la γ -zeïna.

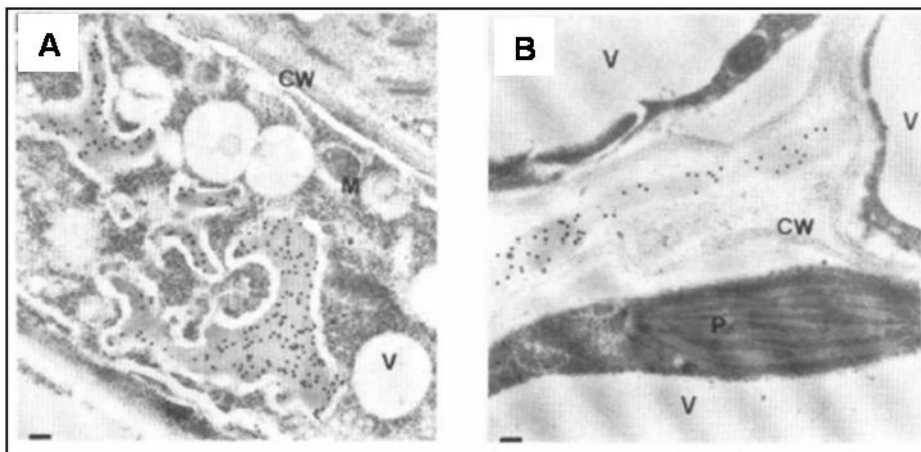


Figura 14. Localització subcel·lular de mutants de delecció de γ -zeïna en fulles d'*Arabidopsis*. Imatges de microscòpia electrònica de talls ultrafins de fulla, on s'ha detectat les proteïnes mutades amb un anticòs contra la γ -zeïna (α G2). A (A) es pot veure com la regió N-terminal de la zeïna és retinguda en el RE, mentre que la regió C-terminal és secretada a l'apoplast (B). (Geli i col., 1994)

2. Estratègia d'acumulació de T-20 en plantes transformades

En aquest treball, s'ha desenvolupat una estratègia d'acumulació de T-20 en plantes basada en el seu direccionament a un compartiment subcel·lular que permet acumular la proteïna recombinant de forma estable: el reticle endoplasmàtic (RE). El RE vegetal té una gran plasticitat i és capaç de formar subdominis especialitzats que permeten acumular gran quantitat de proteïna sense que s'interfereixi ni en el creixement ni en el desenvolupament de la planta. El baix contingut en proteases, la presència de xaperones i l'ambient redox són les característiques principals d'aquest compartiment que faciliten l'acumulació de proteïna recombinant de forma estable i amb el plegament adequat.

Per a aconseguir l'acumulació del T-20 dins el RE s'ha aprofitat la capacitat de retenció al RE de la regió N-terminal de la γ -zeïna. Així doncs, l'estratègia emprada en aquest treball consisteix en l'expressió del T-20 fusionat en C-terminal a dominis rics en prolina de γ -zeïna (Fig.15). D'aquesta manera es creu que aquests dominis poden conferir a la proteïna de fusió la capacitat de retenció al RE i consegüentment obtenir nivells alts d'acumulació de T-20 en plantes. Tanmateix, l'expressió del T-20 com a proteïna de fusió comporta la necessitat d'incloure una diana de tall per poder alliberar el fàrmac en el procés de purificació. Per aquest motiu s'ha introduït entre les dues parts de la fusió el tetrapèptid IEGR que permetrà tallar amb l'endoproteasa específica Factor Xa. S'ha escollit aquesta proteasa per dos motius: (1) la seva seqüència de tall no es troba present en el T-20 i (2) talla en l'extrem C-terminal de la diana que reconeix i, per tant, no s'afegeix cap aminoàcid a la seqüència del T-20,



Figura 15. Estratègia d'acumulació de T-20 en plantes. Esquema representatiu de la fusió del T-20 a dominis N-terminal rics en prolina de la γ -zeïna. La seqüència IEGR correspon a la diana de tall de la proteasa Factor Xa.

L'expressió del T-20 en fusió aporta diversos avantatges al sistema de producció. En primer lloc la retenció al RE no és dependent de la senyal de retenció K(H)DEL. Per tant, no és necessari incorporar cap seqüència a l'extrem C-terminal del T-20 que podria afectar la seva activitat. En segon lloc, degut a que el T-20 és un pèptid relativament curt (36 aa), els dominis rics en prolina actuen com a *tag* facilitant el procés de purificació a partir del material vegetal. Per últim, la capacitat d'agregació dels dominis de γ -zeïna dins el RE poden apartar el T-20 de la maquinària de control de qualitat del RE, impedit que sigui degradat pel sistema ERAD (Ahner i col., 2004).

Materials i Mètodes

A. Materials

1. Material biològic

1.1. Bacteris

- *Escherichia coli* soca DH5 α F': emprada en els clonatges.
- *Agrobacterium tumefaciens*:
 - Soca LBA4404: emprada en la transformació estable i transitòria de *Nicotiana tabacum*.
 - Soca EHA105: emprada en la transformació estable d'*Oryza sativa*.

1.2. Plantes

- Varietats de *Nicotiana tabacum* (tabac):
 - cv. Wisconsin 38: emprada en la transformació estable i agroinfiltració.
 - cv. Petite Habana SR1 i cv. Xanthy: emprades en alguns experiments d'agroinfiltració.
- Varietats d'*Oryza sativa* ssp. Japònica (arròs):
 - Var. Ariete: emprada en l'estudi de l'activitat del promotor gammaZ.
 - Var. Sènia: emprada en l'expressió específica a gra de T-20.

1.3. Animals

- Línia cel·lular humana MT-4: emprada en els assaigs d'activitat del T-20. MT-4 és una línia cel·lular de limfòcits T humans que conté gens del virus HTLV-1 i que permet el creixement en cultiu del virus VIH-1.
- *Oryctolagus cuniculus* var. *New Zealand White* (conill): emprats en la producció d'anticossos contra T-20.

1.4. Virus

- Virus de l'immunodeficiència humana tipus 1 (VIH-1) soca NL4-3 i NL4-3/T20r (resistent a la inhibició per T-20): emprats en els assaigs d'activitat del T-20.

2. Plasmidis i oligonucleòtids

2.1. Plasmidis

- **pGEM-Teasy**: plasmidi utilitzat en el clonatge de productes de PCR, Amp^R, (Promega).
- **pUC18/19**: plasmidi utilitzat en la construcció dels cassettes d'expressió, Amp^R, (Fermentas).
- **pBin19**: plasmidi per a l'expressió estable en plantes, Kn^R en bacteris i Kn^R en plantes, (Bevan, 1984)
- **pC5300**: plasmidi per a l'expressió estable en plantes, Kn^R en bacteris i Hyg^R en plantes, (Cambia).

- **pC1391Z**: plasmidi dissenyat per a l'estudi de promotors en plantes transgèniques, conté el gen GUS i el terminador nos després del lloc de clonació. Kn^R en bacteris i Hyg^R en plantes, (Cambia).

2.2. Oligonucleòtids

En la següent taula es resumeixen els oligonucleòtids utilitzats en reaccions de PCR d'aquest treball. Les parelles de encebadors V20R/V20L i RP5F/RP5R s'ha utilitzat per a l'obtenció de les seqüències del T-20 i del promotor RP5 respectivament. Els encebadors 35S i MT1 s'han utilitzat en la seqüenciació de clons.

Nom	Seqüència	Tm (°C)
V20R	CATGCCATGGGCATTGAAGGTAG	68
V20L	CGCGGATCCTTATCAGAACCAGTTCCACA	75
RP5F	CCCAAGCTTCTTTGAACGGGCAGAACCGG	71
RP5R	CGGGATCCGTCGACTTTTGTAGGATTCTACTACTATGCTTCAAC	73
35S	CTTCGCAAGACCCCTTCC	55
MT1	TCATGAGGGTGTGCTCGTTGCCCTC	68

Per a l'obtenció de la seqüència codificant del T-20 es va produir un gen sintètic produït per síntesi química d'oligonucleòtids (Ramon Eritge, IBMB-CSIC). La seva seqüència és:

5'- C ATG GGC ATT GAA GGT AGA TAT ACT TCC CTT ATT CAT TCA CTG ATC GAA GAG TCT CAG AAC CAA CAA GAG AAG AAT GAG CAA GAA CTC CTT GAG CTG GAC AAG TGG GCT TCT TTG TGG AAC TGG TTC TGA TAA G -3'

3. Anticossos

En aquest treball s'han utilitzat els següents anticossos policlonals produïts en conill:

- **αG2** , obtingut contra la γ -zeïna purificada de blat de moro (Ludevid, 1985), dilució 1/7000.
- **αT20** , obtingut en aquest treball contra el pèptid T-20 conjugat a KLH, dilució 1/500.
- **αR8** , obtingut contra un pèptid sintètic format per 8 repeticions de la seqüència aminoacídica PPPVHL (ERA-Biotech), dilució 1/7000.
- **αBiP** , obtingut contra la xaperona BiP del reticle endoplasmàtic rugós (Geli, 1994), dilució 1/5000.
- **αGFP** , obtingut contra la proteïna marcador GFP (IBMB-CSIC), dilució 1/1000.

Les dilucions detallades corresponen al seu ús per *Western Blot*.

4. Medis i solucions

En aquest apartat es descriuen les solucions i medis utilitzats habitualment en varis protocols. Les solucions específiques de cada tècnica es detallen en els diferents apartats de Mètodes.

4.1. Solucions generals

<i>MEN:</i>	MOPS	20 mM	<i>PBS:</i>	Na ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1,6 mM
	AcNa	5 mM		NaHPO ₄ ·2H ₂ O	8,4 mM
	EDTA	1 mM		NaCl	150 mM
	Ajustar a pH 7			Ajustar a pH 7,4	
<i>SSC:</i>	NaCl	150mM	<i>SSPE:</i>	NaCl	180 mM
	Citrat sòdic	15 mM		Na ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1,6 mM
	Ajustar a pH 7			NaHPO ₄ ·2H ₂ O	8,4 mM
				EDTA	1 mM
				Ajustar a pH 7,4	
<i>TAE:</i>	Tris-Base	40 mM	<i>TBE:</i>	Tris-Base	89 mM
	EDTA	2 mM		EDTA	2 mM
	Ac. Acètic	5,71 %		Ac.Bòric	89 mM

<i>Inhibidors de proteases:</i>	E-64	2 µM
(concentracions de treball)	Leupeptina	42 µM
	Pepstatina	1 µM
	PMSF	100 µM

4.2. Medis generals

<i>LB:</i>	Triptona	10 g/L	<i>YEB:</i>	Extracte de vedella	5 g/L
	Extracte de llevat	5 g/L		Extracte de llevat	1 g/L
	NaCl	10 g/L		Peptona	5 g/L
	Ajustar pH a 7,5 amb NaOH.			Sacarosa	5 g/L
				MgSO ₄	0,48 g/L
				Ajustar pH a 7,2.	
<i>MS:</i>	MS sals i vitamines (Duchefa)	4,4 g/L			
	Sacarosa	20 g/L			
	MES	0,5 g/L			
	Ajustar pH a 5,8 amb KOH.				
	Agar (DifcoBacto)	8 g/L			

B. Mètodes

Les tècniques de manipulació i anàlisi d'àcids nucleics i proteïnes s'han realitzat seguint els manuals *Molecular Cloning: A laboratory manual* (Sambrook i col., 2001) i *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel i col., 2003). Els mètodes que es descriuen a continuació corresponen a tècniques que s'han posat a punt al llarg d'aquest treball o bé que resulten d'especial interès per a l'obtenció dels resultats que es presenten.

1. Tècniques d'anàlisi i manipulació d'àcids nucleics

1.1. Extracció de DNA genòmic en plaques de 96 pous

En aquesta tècnica el MATAB (*Mixed Alkyltrimethyl ammonium bromide*) permet una extracció ràpida sense necessitat de purificar el DNA genòmic amb clorur de cesi. A més, gràcies a la utilització de plaques de 96 pous (Qiagen, ref. 19560) i de pipetes multicanal es poden processar un gran nombre de mostres a la vegada. Aquesta tècnica s'ha utilitzat bàsicament per als cribratges de les línies transgèniques d'arròs però també es pot aplicar per a l'extracció de DNA genòmic d'altres espècies vegetals.

Protocol:

1. Tallar teixit foliar en petits trossos i omplir $\frac{3}{4}$ parts dels pous de la placa on prèviament s'ha introduït una bola de vidre (Prolabo). Es convenient deixar un cert espai entre la bola i la mostra per que la trituració sigui eficient. Congelar en N₂ líquid i guardar les plaques a -80°C fins a l'extracció.
2. Refredar les plaques en N₂ líquid i triturar les mostres amb l'homogeneïtzador *Tissue lyser* (Qiagen) utilitzant 4 cicles de 1 min a 30 c/s. Després de cada cicle es convenient tornar a refredar les mostres.
3. Centrifugar 1 min a 6200 g per fer baixar les mostres.
4. Afegir 300 µL de tampó d'extracció prèviament escalfat a 72 °C i agitar vigorosament.

<i>Tampó d'extracció:</i>	Tris-HCl pH8	100mM
	NaCl	1,5 M
	EDTA pH8	20mM
	MATAB	2%
	Sulfit de sodi	0,5%
	PEG 6000	1%

5. Incubar 1h a 72°C agitant les mostres cada 15 min.
6. Afegir 360 µL de cloroform-isoamílic (24:1) sota la campana i barrejar les dues fases per inversió varies vegades.
7. Centrifugar 20 min a 6200 g i passar 250 µL de la fase superior aquosa a una altra placa.
8. Afegir 200 µL d'isopropanol (0,8 vol.) i barrejar per inversió varies vegades.
9. Centrifugar 20 min a 6200 g a 4 °C i descartar el sobrenedant per decantació.
10. Afegir 500 µL d'etanol al 70 % i tornar a centrifugar 10 min a 6200 g a 4 °C.
11. Descartar el sobrenedant per decantació i assecar els sediments durant 10-20 min a 60°C.
12. Resuspendre els sediments amb 50 µL de TE + RNasa (1,5 U/mostra) amb l'ajuda d'una pipeta.
13. Conservar el DNA genòmic a 4 °C.

Notes:

- En els passos on es produeix una variació de la temperatura es convenient posar un pes a sobre dels taps per evitar que aquests saltin perdent la mostra.
- També es poden utilitzar tubs Eppendorf de 1,5 mL com a suport per realitzar l'extracció. Serà necessari doblar els volums i afegir dos o tres boles de vidre en cada tub.
- Les centrifugacions es poden realitzar a més velocitat si el rotor ho permet.

1.2. Extracció de RNA total

L'extracció de RNA total s'ha realitzat mitjançant el reactiu TRIzol (Invitrogen) modificant lleugerament les instruccions del fabricant. Abans de treballar amb RNA cal tenir en compte que es degrada molt fàcilment. Per tant, hem de prendre precaucions com: canviar-nos sovint els guants, utilitzar puntes i tubs Eppendorf autoclavats dos vegades, fornejar el material de vidre a 200°C com a mínim durant 4 h i tractar totes les solucions que sigui possible amb DEPC.

Protocol:

1. Triturar la mostra amb morter i N₂ líquid sense deixar que es descongeli.
2. Transferir 100 mg a un tub Eppendorf i afegir 900 µL de TRIzol.
3. Agitar bé i deixar reposar 5 min.
4. Afegir 200 µL de cloroform, barrejar per inversió i deixar reposar 3 min.
5. Centrifugar 15 min a 12000 g a 4 °C.
6. Transferir la fase superior a un tub Eppendorf nou i afegir 500 µL d'isopropanol.
7. Barrejar per inversió i deixar 10 min en repòs.
8. Centrifugar 10 min a 12000 g a 4 °C i descartar el sobrenedant per decantació.
9. Afegir 500 µL d'etanol al 70 %.
10. Centrifugar 5 min a 12000 g a 4 °C i descartar el sobrenedant amb pipeta.
11. Resuspendre el sediment en 50 µL d'aigua DEPC i escalfar 10 min a 65 °C.
12. Guardar el RNA a 4 °C per ús immediat o congelar a -80 °C.

1.3. Extracció de DNA plasmídic

Per a l'obtenció de DNA plasmídic a partir de cultius bacterians s'han fet servir diferents procediments segons la necessitat final:

- **Minipreparació per lisi alcalina.** S'ha realitzat seguint el protocol descrit per Birnboim (1983). Aquest mètode s'ha utilitzat per a la comprovació de clonatges per restricció. Per a l'extracció de DNA plasmídic a partir de *Agrobacterium thumefaciens* s'ha modificat lleugerament el protocol per tal d'augmentar l'eficiència. Els passos afegits són els següents:
 - Centrifugar 4,5 mL de cultiu i rentar el sediment amb solució STE (NaCl 0,1M, Tris-HCl pH 8 10mM, EDTA 1mM).
 - Afegir lisozim a 4mg/mL a la solució I de la miniprep (TrisHCl pH8 25 mM, Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM).
 - Realitzar dos purificacions amb fenol-cloroform 1:1.
- **Midipreparació.** Per a l'obtenció de DNA plasmídic a mitja escala s'ha utilitzat el *Plasmid Purification Midi Kit* (Qiagen) i s'han seguit les instruccions del fabricant. El DNA obtingut per aquest mètode és de gran puresa i lliure de DNases, el qual pot ser utilitzat en tot tipus de reaccions enzimàtiques.

1.4. Subclonatge de fragments de DNA en plasmidis

1.4.1. Reaccions de modificació del DNA

Durant la realització d'aquest treball s'han emprat les següents reaccions de modificació del DNA: digestió amb enzims de restricció, desfosforilació, empenat d'extrems protuberants i lligació. Els protocols utilitzats són els descrits per Ausubel i col. (2003) i Sambrook i col. (2001), tenint en compte, a més, les recomanacions dels fabricants per a cadascun dels productes utilitzats.

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

El mètode emprat està basat en la utilització d'una reïna que uneix el DNA. S'ha purificat amb el kit *DNA Gel Band Purification Kit* (Qiagen) seguint les instruccions del fabricant.

1.4.3. Preparació i transformació de cèl·lules competents d'*Escherichia coli*

El mètode utilitzat es basa en una modificació del descrit per Ausubel i col. (2003) el qual permet obtenir una eficàcia de transformació al voltant de 10^5 - 10^6 cfu/ μ g de DNA mitjançant el procés de xoc tèrmic.

Protocol de preparació de cèl·lules competents:

1. Inocular un minicultiu de 5 mL de LB a partir d'un glicerinat de la soca de *E.coli* que ens interressi (en el nostre cas DH5 α F') i incubar O/N a 37 °C en agitació.
2. Fer una dilució 1/100 en un cultiu de 250 mL de LB i incubar durant aproximadament 1 h i 30 min a 37 °C.
3. Quan la DO a 600 nm arribi a 0.3-0.4, traspasar el cultiu a un tub de centrifuga i mantenir-ho a 4°C durant 15 min.
4. Centrifugar 15 min a 4 °C a 1000 g.
5. Descartar el sobrenedant i resuspendre suaument el sediment amb 75 mL de tampó TFB1.

<i>Tampó TFB1:</i>	KOAc	30mM
	MnCl ₂	50mM
	CaCl ₂	10mM
	RbCl	100mM
	Glicerol	15%
	- ajustar pH a 5,8 amb àcid acètic i autoclavar.	

6. Mantenir a 4°C durant 15 minuts i tornar a centrifugar 15 min a 4 °C a 1000 g.
7. Descartar el sobrenedant i resuspendre suaument el sediment amb 10 mL de tampó TFB2.

<i>Tampó TFB2:</i>	MOPS	10mM
	CaCl ₂	75mM
	RbCl	10mM
	Glicerol	15%
	- ajustar pH a 7 amb NaOH i autoclavar.	

8. Aliquotar en tubs Eppendorf a 100 μ L/tub i congelar immediatament en N₂ líquid.
9. Guardar les cèl·lules competents a -80 °C.

Protocol de transformació de cèl·lules competents per xoc tèrmic:

1. Descongelar les cèl·lules en gel.
2. Afegir el plasmidi o producte de lligació i barrejar suaument.
3. Incubar 10 min en gel.

4. Incubar 5 min a 37 °C.
5. Incubar 2 min en gel.
6. Afegir 800 µl de medi LB i deixar 1 h a 37 °C en agitació.
7. Plaquejar 1/3 i 2/3 del volum en dues plaques amb medi LB i l'antibiòtic adequat.
8. Incubar O/N a 37 °C en posició invertida.

1.5. PCR

La tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) és una tècnica àmpliament utilitzada per amplificar DNA (Mullis, 1986). En aquest treball s'ha utilitzat per amplificar seqüències de DNA genòmic, per cribrellar colònies bacterianes i per obtenir sondes. A continuació es descriuen les condicions utilitzades per a l'amplificació del promotor RP5 a partir de DNA genòmic d'arròs.

1.5.1. Amplificació promotor RP5 de DNA genòmic d'arròs

Reacció de PCR: 100 ng DNA genòmic d'arròs de la varietat Senia,
1 µL dels encebadors RP5R i RP5F 10 µM (c.f. 0,2 µM),
1 µL de d'NTPs 10mM (c.f. 0,2 mM),
3 µL de MgCl₂ 25 mM (c.f. 1,5 mM),
5 µL de tampó de la polimerasa 10x,
2 U de polimerasa *Expand High Fidelity* (Roche),
H₂O fins a 50 µL.

Condicions de PCR: 1. 94 °C 2 min
2. (94 °C 45 s + 55 °C 1 min + 68 °C 1 min) x 30 cicles
3. 68 °C 7 min

1.5.2. Clonatge de fragments de DNA amplificats per PCR

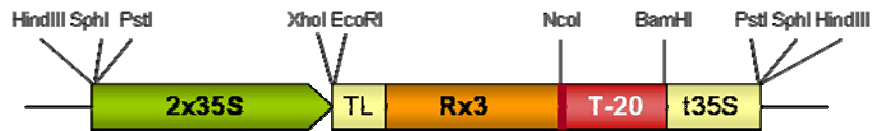
Els fragments de PCR generats en aquest treball s'han purificat a partir de gels d'agarosa (apartat 1.4.2) i s'han clonat en plasmidis utilitzant dos kits comercials:

- *pGEM-T Easy Vector System* (Promega).
- *SureClone ligation Kit* (Amersham).

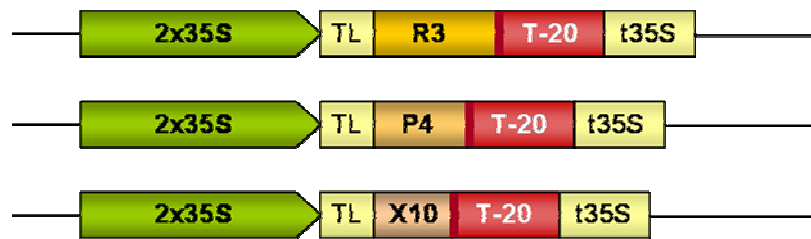
1.6. Construccions plasmídiques

A continuació es descriuen les construccions plasmídiques emprades en aquest treball. En els esquemes s'han inclòs les dianes de tall dels enzims de restricció més comuns situades en els cassettes d'expressió.

pBRx3-T20: Plasmidi emprat en l'expressió constitutiva de la proteïna de fusió Rx3-T20 en plantes de tabac transformades de forma estable i transitòria. La seqüència codificant del T-20 amb la diana de digestió pel Factor Xa s'ha subclonat en pauta darrera de la seqüència Rx3 de la γ -zeïna en el vector pURx3 generat anteriorment en el laboratori (Torrent). El cassette d'expressió 2x35S::TL::Rx3-T20::t35S generat s'ha transferit a un plàsmid binari pBin19 (Frisch i col., 1995) per la diana *HindIII*.

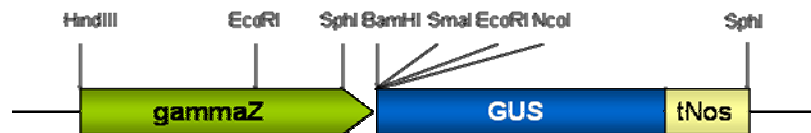


pBR3-T20, pBP4-T20 i pBX10-T20: Plasmidis emprats per expressar a tabac les proteïnes de fusió R3-T20, P4-T20 i X10-T20. L'obtenció dels plasmidis s'ha realitzat de la mateixa manera que pRx3-T20, però emprant els plàsmids pUR3, pUP4 i pUX10 (Torrent, no publicat) per a introduir en pauta la seqüència del T-20 a diferents dominis de γ -zeïna.

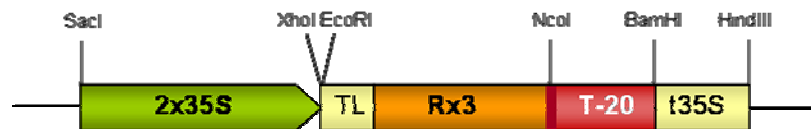


2x35S: doble promotor 35S de CaMV; TL: seqüència 5'-flanquejant del *tobacco etch virus*; t35S: terminador 35S.

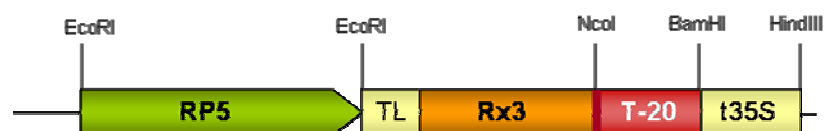
pC- γ 63GUS: Plasmidi utilitzat per a l'anàlisi de l'activitat del promotor gammaZ en plantes transformades d'arròs. La seqüència reguladora -1639 a +61 del gen de la γ -zeïna s'ha obtingut mitjançant digestió amb *BamHI* i *HindIII* del vector 1639 γ Z (Marzábal, 1998) i s'ha subclonat en el plasmidi binari pCambia1391Z digerit amb els mateixos enzims.



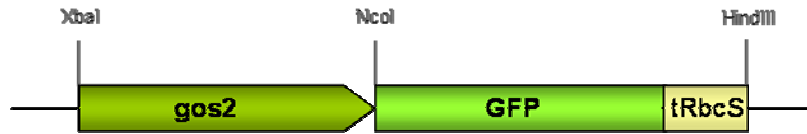
pC-35SRx3T: Plasmidi utilitzat per a l'expressió constitutiva de la proteïna de fusió Rx3-T20 en plantes transformades d'arròs i en plantes de tabac agroinfiltrades. Per obtenir aquest plasmidi s'ha subclonat el cassette d'expressió 2x35S::TL::Rx3-T20::t35S per *HindIII* i *SacI* en el vector binari pCambia5300.



pC-RP5Rx3T: Plasmidi utilitzat per a l'expressió específica a gra de Rx3-T20 en plantes transformades d'arròs. La seqüència reguladora -1075 a -1 del gen de la prolamina de 13 kD (promotor RP5) s'ha subclonat per *EcoRI* en plasmidi pC-35SRx3T on s'ha extret prèviament el promotor 2x35S.



pX1-H: Plasmidi utilitzat en la posta a punt del sistema de transformació d'arròs. En aquest vector binari pCambia5300 la GFP (Heim i col., 1995) és expressada sota el promotor constituït d'arròs *gos2* (Pater i col., 1992) i amb la senyal de poliadenilació *TrbcS* (Matsuoka i col., 1987). Plasmidi cedit per Dr.Emmanuelle Guiderdoni (CIRAD-AMIS).



1.7. Tècniques de transferència i hibridació d'àcids nucleics

1.7.1. Southern Blot

Per realitzar aquesta tècnica s'ha utilitzat el protocol de transferència descrit per Southern (1975). Aquesta tècnica es basa en el fraccionament dels àcids nucleics en gel d'agarosa i la posterior transferència a una membrana de niló per capil·laritat. En el protocol que es descriu a continuació també s'ha inclòs la digestió prèvia del DNA genòmic amb enzims de restricció així com l'hibridació de les membranes amb una sonda radioactiva. En aquest treball aquesta tècnica s'ha emprat bàsicament per a la determinació del nombre d'integracions de DNA en les línies transgèniques d'arròs gZ-GUS, 35S-Rxt3 i RP5-Rxt3.

Protocol:

A/ Digestió DNA genòmic amb enzims de restricció

1. Escalfar el DNA genòmic durant 20 min a 65 °C per provocar el seu estirament.
2. Preparar la barreja de digestió amb els següents components:
 - DNA genòmic (10 µg),
 - enzim(s) de restricció (2,5 U/µg de DNA),
 - tampó de digestió (segons enzim),
 - espermidina (2,5 mM),
 - H₂O fins a 200µL.
3. Incubar O/N a 37 °C (o temperatura òptima de l'enzim).
4. Comprovar la digestió analitzant 20 µL de la barreja de digestió en un gel d'agarosa al 0,8 %. Si s'observa DNA genòmic no digerit, cal afegir més enzim de restricció i incubar un parell d'hores més.

B/ Precipitació DNA genòmic digerit

5. Afegir a la barreja de digestió 20 µL d'acetat de sodi 3M i 500 µL d'etanol absolut fred i incubar 45 min a -80 °C.
6. Centrifugar durant 20 min a 12000 g a 4 °C.
7. Descartar sobrenedant per decantació i afegir 500 µL d'etanol al 70 % al sediment.
8. Tornar a centrifugar 5 min a 12000 g a 4 °C i descartar sobrenedant amb pipeta.
9. Assecar el sediment durant 10-20 min a 60 °C.
10. Resuspendre el DNA en 20 µL de Tris-HCl pH 7,5 20 mM amb l'ajuda de la pipeta. Es convenient escalfar la mostra a 65 °C durant 10 min per facilitar la resuspensió.

C/ Migració del DNA digerit

11. Carregar les mostres en un gel d'agarosa al 0,8 % preparat amb TBE_x1.
12. Migrar durant aproximadament 3 h a 90 V o O/N a 15 V.
13. Fotografiar el gel amb un regle al costat.

D/ Transferència a una membrana de niló Hybond-N (Amersham)

14. Incubar el gel en HCl 0,25 N durant 10 min (o fins que el bromofenol es torni groc).
15. Rentar el gel amb H₂O.
16. Incubar el gel 2 vegades durant 15 min en solució desnaturalitzant.

<i>Solució desnaturalitzant:</i>	NaOH	0,5M
	NaCl	1,5M

17. Rentar el gel amb H₂O.
18. Incubar el gel 2 vegades durant 15 min en solució neutralitzant.

<i>Solució neutralitzant:</i>	Tris-HCl pH8	0,5M
	NaCl	1,5M

19. Rentar el gel amb H₂O.
20. Transferir el gel a una membrana *Hybond-N* (Amersham) O/N amb SSC 10x.

<i>Solució SSC 20x:</i>	NaCl	3M
	Citrat trisòdic deshidratat	0,3M

21. Fixar el DNA a membrana amb *UV-Stratalinker 2400*.

E/ Hibridació de les membranes

22. Incubar la membrana en solució de prehibridació durant un mínim de 2h a 42 °C dins d'un tub d'hibridació.

<i>Solució de prehibridació:</i>	Formamida desionitzada	40 %
	SDS	0,5 %
	SSPE	5x
	Denhardts	5x
	DNA esperma de salmó	0,5 µg/µL
	(desnaturalitzat 10 min a 100 °C)	

23. Barrejar la solució d'hibridació amb una sonda desnaturalitzada durant 5 min a 95 °C. Es convenient utilitzar el mínim volum de solució d'hibridació per tal que la sonda estigui el màxim de concentrada al mateix temps que la membrana quedi coberta.

<i>Solució d'hibridació:</i>	solució prehibridació +	
	Dextran sulfat	10 %

24. Llençar la solució de prehibridació i afegir la solució d'hibridació amb la sonda marcada.
25. Incubar O/N a 42 °C en agitació.

F/ Rentat de les membranes i exposició

26. Llençar la solució d'hibridació amb la sonda en un recipient adequat. També es pot guardar la sonda congelant la solució d'hibridació a -20 °C per reutilitzar-la posteriorment.

27. Rentar la membrana amb les següents solucions i condicions:
 - 20 min a 42 °C amb SSC 2x + SDS 0,1%,
 - 20 min a 65 °C amb SSC 1x + SDS 0,1 %,
 - 20 min a 65 °C amb SSC 0,5x + SDS 0,1 %,
 - 20 min a 65 °C amb SSC 0,2x + SDS 0,1 %.
28. Mesurar la radioactivitat de la membrana amb un Geiger i si encara està “bruta” fer un o dos rentats més amb l’última solució de rentat.
29. Segellar bé les membranes dins de plàstic i exposar-les en una pantalla de *Phosphorimager* (Bio-Rad). La durada de l’exposició dependrà del senyal obtingut, variant entre 1 h i 24 h.
30. Revelar amb *Molecular Imager FX* (Bio-Rad) utilitzant l’aplicació *Quantity-One* (Bio-Rad).

1.7.2. Northern Blot

La resolució del RNA es realitzà en gels d'agarosa-formaldehid segons el mètode descrit per Lehrach i col. (1977). L'electroforesi en presència de formaldehid crea unes condicions desnaturalitzants que eviten la degradació del RNA. Per a la hibridació de les membranes s'ha utilitzat el protocol descrit per Church (1984). Aquesta tècnica s'ha emprat per l'anàlisi dels nivells d'expressió de les quatre proteïnes de fusió en plantes transformades de tabac.

Protocol:

A/ Migració del RNA

1. Preparar un gel al 1,2% d'agarosa en H₂O. Fondre i deixar atemperar a 60°C.
2. Afegir MEN 10x i formaldehid 37% a concentracions finals de 1x i 6% respectivament, barrejar, abocar sobre el motlle i deixar solidificar sota la campana.
3. Posar el gel a la cubeta amb tampó MEN 1x sense cobrir-lo totalment i tancar el gel amb *saran-wrap* excepte la zona dels pous.
4. Preparar les mostres barrejant 10 µg de RNA (vol. màxim 20 µL) amb 25 µL de tampó de càrrega. Escalfar 15 min a 65°C i guardar en gel.

<i>Tampó de càrrega:</i>	formamida desionitzada	66 %
	formaldehid	7,4 %
	MEN	1x
	bromur d'etidi	50 ng/µL

5. Carregar les mostres i córrer el gel a 80-100 V unes 2 h. Per visualitzar l'evolució del gel es pot carregar una gota de solució de blau de bromofenol en un dels pous.

B/ Transferència a una membrana de niló Hybond-N (Amersham)

6. Transferir O/N a una membrana de niló per capilaritat en SSC 10x.
7. Comprovar al UV que la transferència ha estat correcta.
8. Fixar el RNA a la membrana mitjançant *UV-Stratalinker 2400*.

C/ Hibridació de les membranes

28. Incubar la membrana en tampó de Church durant un mínim de 30 min a 65 °C dins d'un tub d'hibridació.

<i>Tampó Church:</i>	Tampó fosfat pH7,2	125 mM
	EDTA pH8	1mM
	SDS	7 %
	DNA d'esperma de salmó	2,5 mg/mL
	(desnaturalitzat 10 min a 100°C)	

29. Preparar la solució d'hibridació (Tampó de Church) afegint una sonda desnaturalitzada durant 5 min a 100 °C.
30. Llençar la solució de prehibridació i afegir la solució d'hibridació amb la sonda marcada.
31. Incubar O/N a 65 °C.

F/ Rentat de les membranes i exposició

32. Llençar la solució d'hibridació amb la sonda en un recipient adequat.
33. Rentar la membrana 3 vegades durant 20 min a 65 °C amb la solució de rentat.

<i>Solució de rentat:</i>	Tampó fosfat pH 7,2	50mM
	EDTA pH8	1mM
	SDS	1 %

34. Mesurar la radioactivitat de la membrana amb un Geiger i si encara està "bruta" fer un o dos rentats més amb l'última solució.
35. Segellar bé les membranes dins de plàstic i exposar-les en una pantalla de *Phosphorimager* (Bio-Rad).
36. Visualitzar la senyal amb *Molecular Imager FX* (Bio-Rad). La mesura de la intensitat de les bandes s'ha realitzat amb l'aplicació *Quantity-One* (Bio-Rad).

1.7.3. Obtenció de sondes marcades radioactivament

A continuació es descriuen els fragments de DNA utilitzats com a sondes en les hibridacions de les membranes de *Southern Blot* i *Northern Blot*.

- **GUS**, sonda per al gen de la β -glucuronidasa. Obtinguda per restricció amb MluI a partir del plasmidi pC1391Z.
- **Hpt**, sonda per al gen de resistència a l'higromicina. Obtinguda per restricció amb XhoI a partir del plasmidi pC1300.
- **T20**, seqüència codificant del T-20. Obtinguda per PCR amb els encebadors V20L i V20R.
- **Rxt3**, seqüència codificant de la proteïna de fusió Rx3-T20. Obtinguda per PCR amb els encebadors MT1 i V20R.

Per a obtenir les sondes radioactives es van marcar entre 20 i 100 ng de DNA amb ^{32}P -dCTP (3000 Ci/nmol) utilitzant el kit comercial *Random Primed DNA labeling kit* (Roche) i es van purificar a través d'una columna *Probe-Quant 50* (Amersham). El marcatge es va comprovar mesurant la radioactivitat de la columna i de la sonda obtinguda amb un Geiger.

1.7.4. Deshibridació de les membranes

Si s'extreu la sonda radioactiva de les membranes, aquestes es poden reutilitzar per realitzar altres hibridacions. Es convenient guardar les membranes deshibridades en un ambient sec per tal de que no es degradin.

Protocol :

1. Escalfar H₂O amb SDS al 1% fins a ebullició.
2. Tirar sobre la membrana i incubar 30 min a 42 °C.
3. Repetir el procés una altra vegada.
4. Comprovar la deshibridació amb un Geiger o exposant la membrana a un film nou.
5. Si la deshibridació ha estat bona, eixugar la membrana amb paper de filtre i guardar-la en ambient sec.

1.8. Purificació d'oligonucleòtids en gel desnaturalitzant d'urea

En aquest treball, la seqüència de DNA codificant del T-20 es va obtenir per síntesi química d'oligonucleòtids (Ramon Eritja, IBMB-CSIC). Degut a que amb aquest sistema es produeixen un cert percentatge de productes incomplets és preferible purificar els oligonucleòtids sintètics en gels desnaturalitzants d'urea per al seu posterior ús.

Protocol:

A/ Electroforesi en gel desnaturalitzant d'urea

1. Afegir tampó de càrrega a 100-200 µg dels oligonucleòtids dissolts em H₂O i desnaturalitzar les mostres incubant a 95 °C durant 5 min.

<i>Tampó de càrrega x2:</i>	Formamida desionitzada	50 %
	NaOH	10 mM
	EDTA	1 mM
	Bromofenol	0,04 %

2. Preparar un gel desnaturalitzant d'urea al 12 % en acrilamida en un aparell d'electroforesi vertical d'aproximadament 20 cm d'altura. A continuació s'indica la composició del gel:

Component	Volum
Acril/bisacrilamida 40 %	37 mL
Urea	57,9 g
TBE 10x	12 mL
APS 10 %	480 µL
TEMED	60 µL
H ₂ O	Fins a 120 mL

3. Carregar tot el volum de les mostres en el gel (pous de 1,5 cm d'ample per 2 mm d'espessor) i córrer l'electroforesi amb TBEx1 en les següents condicions:
 - 300 V 15-20 min Migració en blanc (sense mostra),
 - 180 V 1 h,
 - 200 V 1 h,
 - 250 V fins que el blau de bromofenol hagi recorregut 2/3 parts del gel.
4. Desmuntar l'aparell d'electroforesi, embolicar el gel d'acrilamida en un plàstic transparent (*saran-wrap*) i col·locar-lo sobre una placa de sílica-gel F254.
5. Visualitzar el DNA per il·luminació directa del gel amb llum UV (longitud d'ona 250 nm). L'absorció de la llum UV pel DNA produeix una ombra sobre la placa de sílica-gel que permet marcar sobre el plàstic que recobreix el gel la posició que ocupa el producte majoritari corresponent a l'oligonucleòtid complet.
6. Retallar la banda marcada amb un bisturí estèril i tallar-la en fragments el més petits possibles.

B/ Elució de l'oligonucleòtid

7. Els fragments d'acrilamida es disposen en un tub Eppendorf al que se li ha eliminat la tapa i al que se li ha practicat un petit orifici a la base amb una agulla. Aquest tub es col·loca sobre un altre tub Eppendorf i es centrifuga a màxima velocitat fins que tots els trossos d'acrilamida han passat per l'orifici. D'aquesta forma s'aconsegueix triturar completament l'acrilamida.
8. Afegir el mínim volum de tampó d'elució perquè l'acrilamida s'agiti correctament a 37 °C durant tota la nit.

<i>Tampó d'elució:</i>	Tris-HCl pH 8	10 mM
	EDTA	1 mM
	NaCl	150 mM

9. Separar l'acrilamida del DNA eluit mitjançant una columna *Microspin* (Amersham) seguint les instruccions del fabricant.

C/ Precipitació de l'oligonucleòtid

10. Afegir al oligonucleòtid eluit:

	<u>c.f.</u>
AcNH ₄	2,5 M
Cl ₂ Mg	10 mM
Etanol fred	75%.
11. Deixar precipitar durant 1 hora a -80 °C i centrifugar a 12000 g durant 30 min a 4°C.
12. Descartar el sobrenedant i afegir 500 µL d'etanol al 70 % fred.
13. Centrifugar novament a 13000 g durant 15 min a 4 °C.
14. Descartar el sobrenedant i deixar assecar totalment el sediment.
15. Resuspendre en 20 µL de H₂O i quantificar la concentració a l'espectrofotòmetre.

2. Transformació de tabac i d'arròs

2.1. Obtenció d'*Agrobacterium thumefaciens* recombinants

Per a la transformació de plantes de tabac, tan estable com transitòria, s'ha utilitzat la soca d'*A. thumefaciens* LBA4404, mentre que per a la transformació d'arròs s'ha emprat la soca EHA105 que presenta una alta virulència. El procediment de preparació de competents i transformació són idèntics per ambdós soques.

2.1.1. Preparació de cèl·lules d'*A.thumefaciens* competents

La preparació d'agrobacteris competents s'ha realitzat d'acord amb el protocol descrit per An i col. (1988).

Protocol:

1. Inocular un minicultiu de 4 mL d'LB amb rifampicina 100 mg/L amb un glicerinat d'*Agrobacterium thumefaciens* i incubar O/N a 28°C an agitació (150 rpm).
2. Diluir 1/100 en una maxicultiu de 100 mL LB amb rifampicina 100 mg/L i incubar O/N a 28°C en agitació.
3. Quan la DO a 600 nm sigui de 0,6-0,8 centrifugar a 3000 g durant 10 min a 4 °C.
4. Resuspendre el sediment en 2 mL de CaCl₂ 20 mM estèril i fred.
5. Aliquotar en 100 µL i congelar immediatament amb N₂ líquid. Guardar a -80 °C un màxim de 4 mesos.

2.1.2. Transformació de cèl·lules competents d'*A.thumefaciens*

Protocol:

1. Descongelar cèl·lules competents en gel i afegir 500 ng del plasmid d'interès.
2. Incubar 5 min en N₂ líquid.
3. Incubar 5 min en 37 °C.
4. Incubar 2 min en gel.
5. Afegir 800 µL de medi LB i incubar 2-4 h a 28 °C en agitació.
6. Plaquejar en medi YEB amb rifampicina 100 mg/L i l'antibiòtic de selecció (en el nostre cas kanamicina 50 mg/L o higromicina 50 mg/L) i incubar 2 dies a 28 °C

Per assegurar que l'agrobacteri utilitzat conté el plasmidi recombinant, s'han realitzat minipreps (apartat B.1.3.) i anàlisi del patró de restricció de diferents colonies.

2.2. *Nicotiana tabacum*

2.2.1. Esterilització de llavors de tabac

Protocol:

1. Transferir a un tub Eppendorf la quantitat de llavors equivalents a 50 µL.
2. Afegir 700 µL d'etanol al 70 % i barrejar per inversió durant 30 s.
3. Treure l'etanol amb una pipeta i rentar les llavors amb 700 µL de H₂O estèril.
4. Treure l'H₂O i afegir 700 µL de solució d'esterilització:

Hipoclorit sòdic (Carlo Erba)	20 %
Tween-20	0,1 %
5. Incubar durant 10 min barrejant per inversió periòdicament.
6. Rentar les llavors 3 vegades amb H₂O estèril.
7. Treure l'H₂O i abocar les llavors sobre paper de filtre estèril.
8. Les llavors es poden sembrar seguidament o conservar a 4 °C en un ambient sec i estèril.

2.2.2. Germinació i creixement de tabac

Protocol:

1. Preparar plaques de 9 cm de diàmetre (Corning) amb medi de germinació.

Medi de germinació de tabac:

MS sals i vitamines	4,4 g/L
Sacarosa	10 g/L
MES	0,5 g/L

Ajustar pH a 5,8 amb KOH 1M

Afegir Gelrite (Duchefa) 2 g/L

Autoclavar i una vegada el medi estigui temperat afegir l'antibiòtic de selecció (en el nostre cas kanamicina 150 mg/L) si es volen sembrar llavors provinents de plantes transgèniques.

2. Sembrar les llavors estèrils (apartat B.2.1.1.) amb l'ajuda d'una agulla emmanegada. Per facilitar que les llavors s'enganxin a l'agulla es pot introduir la punta en el medi i seguidament agafar una llavor. Si el que es pretén és analitzar la segregació del transgen per determinar si segueix l'herència mendeliana es convenient sembrar un mínim de 100 llavors de cada línia transgènica.
3. Incubar les plaques *in vitro* en les següents condicions de creixement:
 - Temperatura: 25-26 °C.
 - Fotoperíode: 16 h de llum i 8 h de fosc.
 - Llum: blanca freda generada amb un fluorescent Philips TLD58W/33
 - Intensitat llum: 1700 Lux
4. Al cap d'1 mes les plantes resistents es poden traspasar a pots amb medi MS per créixer les plantes en condicions *in vitro* o es poden passar directament a aclimatar a l'hivernacle.
5. Aclimatació a hivernacle:
 - a) Preparar test fèrtils petits amb substrat TC2 (Sicosa) que conté una barreja de torba rossa, negre i fibra de coco.
 - b) Posar els tests fèrtils en una safata amb dos dits d'H₂O i deixar que s'impregnin.
 - c) Fer un forat al mig del test, introduir la planta i tapar amb substrat l'espai que sobri.
 - d) Traslladar les safates a l'hivernacle i tapar-les amb una coberta de plàstic transparent.
 - e) Durant la primera setmana, obrir gradualment la coberta per que les plantes s'aclimatïn a les condicions d'hivernacle.
6. Una vegada les plantes estiguin aclimatades es poden traspasar a un test més gran i fer créixer en condicions d'hivernacle fins a floració.
7. Quan les plantes hagin produït llavors, s'espera que s'assequin totalment abans de recollir-les.

2.2.3. Transformació estable de tabac

El protocol utilitzat es basa en el descrit per Draper i col. (1988) on s'han introduït algunes modificacions. Aquesta tècnica s'ha utilitzat en aquest treball per generar plantes transgèniques de tabac que expressessin constitutivament les quatre proteïnes de fusió.

Protocol:

A/ Preparació del cultiu bacterià

1. Quatre dies abans de la transformació sembrar l'*Agrobacterium thumefaciens* LBA4404 recombinant en una placa amb medi YEB fresc que contingui rifampicina 100 µg/mL i l'antibiòtic de selecció del plasmidi introduït (en el nostre cas kanamicina 50 µg/mL). Incubar 3 dies a 28 °C.
2. El dia anterior a la transformació inocular a partir de la placa un cultiu de 100 mL de medi YEB amb els antibiòtics i incubar O/N a 28 °C en agitació suau (150 rpm).
3. Quan el cultiu estigui en fase exponencial (DO a 600nm de 0,4-0,8), transferir-lo a tubs Falcon estèrils i centrifugar 10 min a 3000 g.
4. Descartar el sobrenedant i resuspendre immediatament el sediment en 25-50 mL de medi MS líquid amb l'ajuda d'una pipeta.
5. Deixar uns 20 min a 28 °C en agitació suau per que els bacteris es recuperin.

B/ Preparació del material vegetal

6. El material de partida són plantes de *Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38 crescudes durant 6-8 setmanes sobre medi MP. Per a la transformació s'utilitzaran només fulles joves ben desenvolupades (3 o 4 a partir de l'àpex).

<i>Medi MP:</i>	MS sals i vitamines	4,4 g/L
	Sacarosa	10 g/L
	MES	0,5 g/L
	Ajustar pH a 5,8 amb KOH 1M	
	Afegir Agar (DifcoBacto)	8 g/L
	Autoclavar.	

7. Tallar quadrats de fulla de 0,5 cm dins una placa amb 20 mL de medi líquid MS amb l'ajuda d'un bisturí. Eliminar el nervi central i les vores de la fulla. Normalment es preparen uns 50 quadrats per transformació, més 10 que s'utilitzen com a control.
8. Traspasar els fragments de fulla a una placa amb 7mL de medi líquid MS amb el revers de la fulla mirant cap a dalt.

C/ Infecció dels fragments de fulla amb l'agrobacteri

9. Afegir 3 mL del cultiu d'agrobacteri preparat anteriorment a la placa que conté els fragments de fulla i coincubar durant 5 min amb una agitació manual suau.
10. Assecar els fragments de fulla amb paper estèril i col·locar-los amb el revers cap avall en plaques amb medi MS' que conté hormones per induir la formació de calls.

<i>Medi MS':</i>	MS sals i vitamines	4,4 g/L
	Sacarosa	30 g/L
	MES	0,5 g/L
	Ajustar pH a 5,8 amb KOH 1M	
	Afegir Gelrite (Duchefa)	2 g/L
	Autoclavar i una vegada el medi estigui temperat afegir les hormones:	
	BAP	1 mg/L
	NAA	0,1 mg/L

11. Incubar durant 2 dies a la foscor a 26 °C. Si coincideix en cap de setmana es poden deixar durant 3 dies a 23 °C.

D/ Inducció de calls transgènics

12. Observar els trossos de fulla sota la lupa per avaluar el creixement de l'agrobacteri en els costats de les fulles. Si el creixement és excessiu serà necessari rentar les fulles amb medi MS líquid amb l'antibiòtic timentina a 200 mg/L.
13. Si el creixement de l'agrobacteri és correcte s'assequen els fragments sobre paper de filtre estèril i es traslladen a plaques amb medi MSI. Aquest medi conté hormones per induir la formació del call, timentina per impedir el creixement de l'agrobacteri i kanamicina que selecciona les cèl·lules transformades.

<i>Medi MSI:</i>	MS sals i vitamines	4,4 g/L
	Sacarosa	30 g/L
	MES	0,5 g/L
	Ajustar pH a 5,8 amb KOH 1M	
	Afegir Gelrite (Duchefa)	2 g/L
	Autoclavar i una vegada el medi estigui temperat afegir les hormones i els antibiòtics:	
	BAP	1 mg/L
	NAA	0,1 mg/L
	Timentina	100 mg/L
	Kanamicina	100 mg/L

14. Incubar les plaques a 26 °C a la llum durant 2-3 setmanes. En aquest període les fulles es corben, s'endureixen i apareixen calls a les vores.

E/ Regeneració de brots transgènics

15. Quan els calls tenen un mida de 2-3 mm, s'aïllen i es traspassen a medi MSI fresc.
16. Incubar les plaques a 26 °C a la llum durant 2-3 setmanes més. En aquest temps apareixeran els primers brots espontàniament.

F/ Arrelament dels brots

17. Una vegada els brots presenten dos o més fulles i una tija ben diferenciada, es tallen i es traspassen a tubs amb medi d'arrelament. Aquest medi conté la meitat de sals i vitamines MS que el tradicional medi MS. És important eliminar qualsevol resta de call, ja que pot inhibir la formació d'arrels.

<i>Medi d'arrelament:</i>	MS sals i vitamines	2,2 g/L
	Sacarosa	30 g/L
	MES	0,5 g/L
	Ajustar pH a 5,8 amb KOH 1M	
	Afegir Gelrite (Duchefa)	2 g/L
	Autoclavar i una vegada el medi estigui temperat afegir les hormones i els antibiòtics:	
	Timentina	100 mg/L
	Kanamicina	100 mg/L

18. Quan els brots hagin arrelat ja es poden passar a pots amb medi MS i fer créixer les plantes en les condicions descrites en l'apartat B.2.1.2.

2.2.4. Agroinfiltració de plàntules de tabac

Aquesta tècnica de transfromació transitòria permet expressar una proteïna recombinant en tabac de forma ràpida i eficient sense la necessitat de generar línies estables. En aquest treball s'ha utilitzat per analitzar el grau d'acumulació de les quatre proteïnes de fusió en teixit vegetatiu de tabac així com per determinar la seva localització subcel·lular mitjançant experiments de fraccionament subcel·lular.

Protocol:

A/ Preparació material vegetal

1. Esterilitzar llavors de *Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38 (apartat B.2.1.1.).
2. Sembrar-les en pots petits amb medi MS a raó de 50 llavors per pot (apartat B.3.2.2.). Es convenient augmentar la concentració de Gelrite a 3 g/L per evitar que el medi és trenqui durant l'agroinfiltració.
3. Fer créixer les plantes durant 3-4 setmanes en condicions *in vitro* (apartat B.2.2.2.) fins que presentin una mida de 2-3 cm.

B/ Preparació del cultiu bacterià

4. Preparar un erlenmeyer de 100 mL amb 30 mL de medi LB amb rifampicina 100 mg/L i l'antibiòtic de selecció, en el nostre cas kanamicina 50 mg/L.
5. Inocular-lo amb 1 mL de glicerinat d'*Agrobacterium thumefaciens* LBA4004 recombinant.
6. Incubar O/N a 28 °C en agitació (150 rpm).
7. Centrifugar el cultiu a 3000 g durant 10 min.
8. Descartar el sobrenedant i resuspendre el sediment en 10 mL de medi MMA amb l'ajuda d'una pipeta.

Medi MMA: MS sals i vitamines 4,4 g/L
 Sacarosa 20 g/L
 MES 2 g/L
 Ajustar pH a 5,6 amb KOH 1M
 Autoclavar.

9. Anar afegint la suspensió de bacteris a un erlenmeyer amb 250 mL de medi MMA fins que la DO a 600 nm sigui de 0,1-0,2.
10. Afegir al cultiu 250 µL d'una solució d'acetosiringona. Aquest compost fenòlic provoca l'activació del gens de virulència de l'agrobacteri augmentant l'eficiència de transformació. La solució es prepara dissolent 78 mg d'acetosiringona en 2 mL d'una barreja d'H₂O i DMSO 1:1.
11. Incubar 1-2h a 28 °C en agitació (150 rpm).

C/ Infiltració de l'agrobacteri en condicions de buit

12. Abocar el cultiu d'agrobacteri sobre les plàntules procurant que quedin submergides.
13. Introduir el pot destapat dins d'una campana de buit i generar buit amb una bomba d'oli.
14. Quan apareguin bombolles en el cultiu d'agrobacteri (aproximadament a 27 inchHg), mantenir el buit 5 s i desfer-lo molt suaument per evitar que el medi es fragmenti. En aquest procés es pot observar com les fulles de tabac es tornen translúcides indicant que la infiltració a funcionat correctament.
15. Retirar el cultiu d'agrobacteri amb cura de no desenganxar el medi del recipient. El cultiu es pot descartar o reutilitzar per agroinfiltrar més plàntules.

D/ Creixement i recollida de les plàntules

16. Una vegada s'ha finalitzat l'agroinfiltració, es tapen els pots i es traslladen a la cambra de cultiu *in vitro* de tabac per fer créixer les plàntules durant 4 dies en condicions controlades (apartat B.2.1.2.). En aquest temps les plantes es recuperen de l'estrès sofert i expressen la proteïna recombinant.
17. Al cap de 4 dies es poden recollir les plantes (evitant agafar medi) i analitzar-les o congelar-les a -80 °C.

2.3. *Oryza sativa*

2.3.1. Esterilització de llavors d'arròs

Protocol:

1. Pelar les llavors i posar-les dins d'un tub Falcon de 50 mL.
2. Afegir etanol al 70 % i deixar 1 min en agitació suau.
3. Tirar l'etanol i rentar les llavors amb H₂O estèril.
4. Afegir una solució d'hipoclorit sòdic al 30 % i deixar en agitació suau durant 30 min.
5. Tirar la solució de llegiu i rentar 3 vegades amb H₂O estèril.
6. Deixar les llavors en H₂O estèril durant aproximadament 1 h en agitació suau.
7. Tornar a rentar 3 vegades amb H₂O estèril.
8. Eliminar l'H₂O i sembrar les llavors o guardar-les a 4°C en un ambient sec i estèril.

2.3.2. Germinació i creixement d'arròs

Protocol:

1. Preparar plaques de 9 cm de diàmetre (Corning) amb medi de germinació.

Medi de germinació d'arròs:

MS sals i vitamines	4,4 g/L
Sacarosa	20 g/L
MES	0,5 g/L

Ajustar pH a 5,8 amb KOH 1M

Afegir Gelrite (Duchefa) 2 g/L

Autoclavar i una vegada el medi estigui temperat afegir l'antibiòtic de selecció (en el nostre cas higromicina 50 mg/L) si es volen sembrar llavors provinents de plantes transgèniques.

2. Sembrar les llavors estèrils (apartat B.2.2.1.) amb l'ajuda d'una agulla enmanegada.
3. Incubar les plaques *in vitro* en les següents condicions de creixement:
 - Temperatura: 28-29 °C.
 - Fotoperíode: 12 h de llum i 12 h de fosc.
 - Llum: blanca freda generada amb un fluorescent Philips TLD58W/33
 - Intensitat llum: 1700 Lux
4. Al cap d'un mes les plantes resistents es poden traspasar a pots amb medi MS per créixer les plantes en condicions *in vitro* o es poden passar directament a aclimatar a l'hivernacle.
5. Aclimatació a hivernacle:
 - De la mateixa manera que amb tabac (apartat B.2.1.2.) però amb el següent substrat: torba Torfsicosa Plantaflor (Sicosa) i vermiculita en proporcions 1:1, CaCO₃ 1 g/Kg, abono 15-15-15 1g/Kg.
6. Una vegada les plantes estiguin aclimatades es poden traspasar a un test més gran i fer créixer en condicions d'hivernacle fins a floració.
7. Quan les plantes hagin produït llavors, s'espera que s'assequin totalment abans de recollir-les.

2.3.3. Transformació estable d'arròs

El protocol utilitzat per a la generació de plantes transgèniques d'arròs es basa en la transformació de calls embriogènics amb *Agrobacterium tumefaciens* recombinants. S'ha modificat el procediment descrit per Hiei i col.(1994) per tal d'adequar-lo a les instal·lacions del IBMB-CSIC i a la varietat autòctona d'arròs Senia.

Protocol:

A/ Inducció de calls embriogènics a partir de l'escutel d'embrions zigòtics madurs

1. Esterilitzar 150 llavors d'arròs de la varietat Senia amb el procediment descrit anteriorment (apartat B.2.2.1.).
2. Sembrar les llavors desinfectades en medi d'inducció de calls NB a raó de 12 per placa. Es convenient eliminar la condensació d'aigua de les plaques.
3. Incubar a 28 °C durant 20 dies a la foscor. En aquest temps l'escutel de l'embrió formarà un call primari compacte de 0,5-1 cm de diàmetre on es poden diferenciar petites unitats embriogèniques de 0,5-1 mm de diàmetre i consistència compacte.
4. Transferir els nòduls embriogènics a medi NB fresc a raó de 30-50 per placa i incubar durant 10 dies a 28 °C a la foscor. Durant aquest període els nòduls proliferaran en calls que es fragmentaran en tres tipus de formacions:
 - unitats de mida inferior a 1 mm que poden ser transferits novament a medi NB,
 - unitats esfèriques de 0,3-0,5 cm amb superfície rugosa que s'utilitzaran en la transformació,
 - calls de forma complexa i mida superior que seran descartats.
5. Un dia abans de la transformació, seleccionar les unitats embriogèniques i agrupar-les en una placa amb medi NB. Els criteris de selecció són els següents:
 - *Mida*: les unitats seleccionades han de mesurar entre 3 i 5 mm de diàmetre. Formacions més grosses faran disminuir l'eficiència de transformació, mentre que unitats més petites tendiran a necrosar-se després del cocultiu.
 - *Forma*: han de presentar forma esfèrica amb una superfície rugosa. Les unitats amb una superfície llisa i blanca s'han de descartar ja que tenen un cert grau de diferenciació.
 - *Color*: les unitats seleccionades han de presentar un color groc clar i ser opaques. Els calls translúcids, blancs o marrons s'han de descartar.
 - *Textura*: els calls han de ser compactes i resistents a la manipulació amb pinces. S'han d'evitar els calls amb consistència tova.
6. Deixar els calls seleccionats a 28 °C a la foscor fins al moment del cocultiu.

B/ Preparació del cultiu bacterià

7. Quatre dies abans de la transformació, inocular a partir del glicerinat d'*Agrobacterium thumefaciens* EHA105 recombinat un minicultiu de 5mL de medi LB que contingui rifampicina 100 mg/L i l'antibiòtic de selecció, en el nostre cas kanamicina 50 mg/L. Incubar O/N a 28 °C amb una agitació suau (150 rpm).
8. Sembrar dos plaques amb medi AB + antibiòtics amb 200 µL del minicultiu. Incubar 3 dies a 28 °C. En aquest temps els agrobacteris formaran una capa viscosa sobre el medi.
9. Transferir els agrobacteris que hagin crecut en ¼ part d'una placa a un tub falcon que contingui 30 mL de medi R2-CL amb l'ajuda d'una espàtula estèril.
10. Resuspendre les bacteris sense utilitzar el vortex i mesurar la DO a 600 nm. Ajustar la DO a 0,7-1,0 afegint més bacteris o més medi.

C/ Cocultiu de l'agrobacteri amb els calls embriogènics

11. Transferir 150 calls embriogènics per construcció a transformar a una placa de Petri que contingui 25 mL de la suspensió d'agrobacteris.
12. Incubar durant 15 min amb una suau agitació manual.
13. Transferir els calls a sobre d'una pila de papers Whatman 1 estèrils i fer-los rodar fins que estiguin completament secs (no han de deixar humitat en contacte amb el paper).
14. Traspasar els calls a medi R2-CS a raó de 10 per placa. Deixar evaporar la condensació de les plaques, segellar-les i incubar durant 3 dies a 25 °C a la foscor.

D/ Selecció de teixits transformats

- Transferir els calls amb la mateixa densitat a plaques amb medi R2-S. Els calls que presentin un mucileg viscos produït pel creixement excessiu de l'agrobacteri s'han d'eliminar.
- Incubar els calls durant dos setmanes a 28 °C a la foscor. En el decurs d'aquest període els calls s'enfosquiran progressivament degut al baix contingut en nutrients d'aquest medi. També poden aparèixer les primeres unitats transgèniques blanques.
- Transferir els calls a medi NBS a raó de 6 per placa i incubar durant 1 setmana més a 28 °C a la foscor. En aquest temps apareixeran múltiples unitats transgèniques blanques, mentre que els calls es necrosaran.
- Separar les unitats transgèniques al voltant dels calls dels quals provenen i incubar 2 setmanes més en les mateixes condicions. Aquestes unitats creixeran formant calls de color groc clar, consistència compacte i aspecte rugós. Els calls translúcids o de color marró, amb consistència tova i contorn poc definit seran considerats no transgènics i seran eliminats.

E/ Maduració dels calls resistents

- Traspassar els calls resistents a medi de pre-regeneració PR-AG a raó de 12 per placa i incubar 7 dies a 28 °C a la foscor. Els calls augmentaran de mida i adquiriran un color groc més pujat.

F/ Regeneració de brots transgènics

- Transferir els calls a medi de regeneració RN a raó de 5 per placa i incubar 2 dies a 28 °C a la foscor. Els calls es tornaran més compactes i s'emblanquiran.
- Treure les plaques a la llum i incubar 3 setmanes a 28 °C. En aquest temps alguns calls adquiriran un color verdós i apareixeran brots transgènics.
- Quan els brots estiguin ben diferenciats es poden transferir a tubs de cultiu amb medi d'arrelament P i incubar 3 setmanes en les mateixes condicions.
- Les plantes que hagin desenvolupat arrels es poden passar a aclimatar a l'hivernacle (apartat B.2.2.2.) o es poden transferir a pots amb medi MS per conservar les plantes *in vitro*.

G/ Medis de cultiu i solucions

Medi pel creixement de l'agrobacteri:

Medi AB:	tampó:	K ₂ HPO ₄	3 g/L
		KH ₂ PO ₄	1 g/L
	sals:	NH ₄ Cl	1 g/L
		MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3 g/L
		KCl	150 mg/L
		FeSO ₄ ·7H ₂ O	2,5 mg/L
		Glucosa	5 g/L
		Agar (DifcoBacto)	15 g/L

Autoclavar, deixar temperar i afegir els rifampicina 100 mg/L i l'antibiòtic de selecció (kanamicina 50 mg/L).

Solucions base:

		<u>g/L</u>		<u>mg/L</u>	
Macro N6: (Stock 20x)	KNO ₃	56,6	Micro B5: (Stock 100x)	MnSO ₄ ·H ₂ O	758
	(NH ₄) ₂ SO ₄	9,26		H ₃ BO ₃	300
	KH ₂ PO ₄	8,0		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	200
	CaCl ₂ ·H ₂ O	3,3		KI	75
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,7		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	25
			CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,5	
			CoCl ₂ ·6H ₂ O	2,5	

<i>FeEDTA N6:</i> (Stock 100x)	FeSO ₄ ·7H ₂ O Na ₂ EDTA	<u>g/L</u> 2,78 3,72	<i>Vitamines B5:</i> (Stock 100x)	àcid nicotínic piridoxina HCl tiamina	<u>mg/L</u> 100 100 1000
<i>Macro R2:</i> (Stock 10x)	KNO ₃ (NH ₄) ₂ SO ₄ NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O MgSO ₄ ·7H ₂ O CaCl ₂ ·H ₂ O	40 3,3 3,12 2,46 1,46	<i>Micro R2-II:</i> (Stock 100x)	MnSO ₄ ·H ₂ O ZnSO ₄ ·7H ₂ O H ₃ BO ₃ CuSO ₄ ·5H ₂ O Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	160 220 283 19,5 12,5
<i>FeEDTA R2:</i> (Stock 100x)	FeSO ₄ ·7H ₂ O Na ₂ EDTA	1,25 0,177	<i>Vitamines R2:</i> (Stock 40x)	tiamina	200

Medis base:

<i>NB-Bàsic:</i>	Macro N6 FeEDTA N6 Vitamines B5 Micro B5 Myo-inositol Prolina Glutamina Hidrolisat de caseïna	50 mL/L 2,78 mL/L 10 mL/L 10 mL/L 100 mg/L 500 mg/L 500 mg/L 300 mg/L	<i>R2-Bàsic:</i>	Macro R2 FeEDTA R2 Vitamines R2 Micro R2	100 mL/L 10 mL/L 25 mL/L 1 mL/L
------------------	--	--	------------------	---	--

Medis de plantes:

<i>Medi NB:</i>	NB-Bàsic + Sacarosa Phytigel 2,4-D Ajustar pH a 5,8	30 g/L 2,6 g/L 2,5 mg/L	<i>Medi R2-CL:</i>	R2-Bàsic + Glucosa Acetosiringona 2,4-D Ajustar pH a 5,2!	10 g/L 100 µM 2,5 mg/L
<i>Medi R2S:</i>	R2-Bàsic + Sacarosa 2,4-D Cefotaxima Vancomicina Higromicina Agarosa tipus I Ajustar pH a 6	30 g/L 2,5 mg/L 400 mg/L 100 mg/L 50 mg/L 7 g/L	<i>Medi R2-CS:</i>	Medi R2-CL + Agarosa tipus-17 g/L	
<i>Medi PR-AG:</i>	NB-Bàsic + Sacarosa Cefotaxima Vancomicina Higromicina ABA BAP NAA Agarosa tipus I Ajustar pH a 5,8	30 g/L 100 mg/L 100 mg/L 50 mg/L 5 mg/L 2 mg/L 1 mg/L 7 g/L	<i>Medi NBS:</i>	NB-Bàsic + Sacarosa 2,4-D Cefotaxima Vancomicina Higromicina Agarosa tipus I Ajustar pH a 6	30 g/L 2,5 mg/L 400 mg/L 100 mg/L 50 mg/L 7 g/L
<i>Medi P:</i>	MS sals i vitamines Sacarosa Phytigel	4,4 g/L 50 g/L 2,6 g/L, Ajustar pH a 5,8.	<i>Medi RN:</i>	NB-Bàsic + Sacarosa Higromicina BAP NAA Phytigel Ajustar pH a 5,8	30 g/L 50 mg/L 3 mg/L 0,5 mg/L 4,5 g/L

3. Tècniques d'anàlisi i manipulació de proteïnes

3.1. Extracció de proteïnes de teixits vegetals

Aquest protocol s'ha utilitzat bàsicament per l'anàlisi de les proteïnes de teixits vegetals de plantes transgèniques per *Western Blot*. A continuació es descriu un procediment general indicant les variacions fetes en funció del tipus de mostra i del tampó d'extracció utilitzat.

Protocol:

1. Recollir el material vegetal, congelar-lo amb N₂ líquid i guardar-lo a -80 °C fins al moment de l'extracció.
2. Homogenitzar el teixit amb un dels següents sistemes evitant que la mostra s'escalfi:
 - *Morter i N₂ líquid*: emprat en mostres especialment dures com grans d'arròs.
 - *Homogeneïtzador cònic* (Rubilador): emprat en mostres petites de fulla de tabac.
 - *Tissue Lyser* (Qiagen): emprat per al cribratge de línies transgèniques.
3. Afegir 5 volums de tampó d'extracció per unitat de pes de la mostra i agitar a 4 °C durant 15 min.

<i>Tampó d'extracció T:</i>	Tris-HCl pH8	50 mM
	DTT	200 mM (o β-ME 2%)
	Inhibidors de proteases (veure apartat A.4)	

<i>Tampó d'extracció total:</i>	Tris-HCl pH8	50 mM
	NaCl	10 mM
	SDS	1 %
	β-Mercaptoetanol	5 %
	Inhibidors de proteases.	

El tampó d'extracció T s'ha emprat per l'extracció de les diferents proteïnes de fusió a partir de material vegetal.

4. Centrifugar durant 20 min a 12000 g a 4 °C.
5. Guardar el sobrenedant en gel i conservar el sediment. Per valorar la proteïna que no s'ha solubilitzat, es pot fer una reextracció del sediment directament amb tampó de càrrega i analitzar-la conjuntament amb l'extracte per *Western Blot*.
6. Determinar la quantitat de proteïnes de l'extracte proteic amb el mètode de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*, BioRad) utilitzant com a patró diferents dilucions de BSA. Per que el resultat sigui fiable no es pot congelar la mostra abans de la quantificació.
7. Guardar l'extracte proteic a -80 °C o precipitar les mostres amb àcid tricloracètic (TCA) per tal de reduir el volum:
 - Afegir TCA a una concentració final del 15 %.
 - Incubar 45 min en gel.
 - Centrifugar durant 20 min a 12000 g a 4 °C
 - Descartar el sobrenedant amb pipeta i afegir acetona per rentar el sediment.
 - Centrifugar durant 5 min a 13000 g a 4 °C.
 - Descartar el sobrenedant amb pipeta i assecar el sediment a l'aire.
 - Resuspendre les proteïnes amb tampó de càrrega x1.

3.2. Electroforesi en condicions desnaturalitzants

3.2.1. Electroforesi SDS-PAGE

S'ha utilitzat el mètode descrit per Laemmli (1970) emprant com a suport l'aparell *Miniprotean II* (BioRad).

Preparació del gel:

Gel concentrador	
Tampó gel concentrador	1 mL
Acril:bisacrilamida 40%	0,5 mL
H ₂ O	2,25 mL
Temed	5 µL
APS 15 % (p/v)	50 µL

Gel concentrador	15 %	12,5 %	10 %	7,5 %
Tampó gel separador	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Acril:bisacrilamida 40 %	3,75 mL	3,13 mL	2,5 mL	1,88 mL
H ₂ O	3,75 mL	4,38 mL	5 mL	5,63 mL
Temed	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
APS 15 % (p/v)	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL

Tampó gel concentrador: Tris-HCl pH 6,5 0,5 M
SDS 0,4 %

Tampó gel separador: Tris-HCl pH 8,8 1,5 M
SDS 0,4 %

Preparació mostres:

1. Afegir el mateix volum que la mostra de tampó de càrrega (TMx2).
2. Afegir β-ME a concentració final del 5 %.
3. Bullir 5 min a 100 °C.
4. Deixar temperar i carregar en el gel.

Tampó TMx2: Tris-HCl pH 6,8 125 mM
Glicerol 20 %
SDS 4 %
Blau de bromofenol 0,04 %

Condicions de migració:

Voltatge: 80 mV durant 30 min i 120 mV la resta.

Tampó d'electroforesi: Glicina 1,92 M
Tris-HCl pH 8,5 0,25 M
SDS 10 %

3.2.2. Electroforesi de Tris-Tricina.

Aquest tipus d'electroforesi permet una bona resolució de proteïnes de baix pes molecular. En aquest treball s'ha utilitzat per detectar les proteïnes de fusió P4-T20 i X10-T20.

Preparació del gel:

Gel concentrador	
H ₂ O	1 mL
Tris-HCl 3M pH 8,5	0,5 mL
Acril:bisacrilamida 40% (38:1)	0,5 mL
SDS 20%	8 µL
Temed	5 µL
APS 15 % (p/v)	50 µL

Gel separador	15 %	18 %
H ₂ O	1,25 mL	0,45 mL
Glicerol	1,2 mL	1,2 mL
Tris-HCl 3M pH 8,5	3,35 mL	3,35 mL
Acril:bisacrilamida 40 % (38:1)	4,05 mL	4,85 mL
SDS 20%	50 µL	50 µL
Temed	5 µL	5 µL
APS 15 % (p/v)	50 µL	50 µL

Preparació mostres:

1. Afegir el mateix volum que la mostra de tampó de càrrega (TTx2).
2. Bullir 5 min a 100 °C.
3. Deixar atemperar i carregar en el gel.

<i>Tampó TTx2:</i>	Tris-HCl pH 6,8	100 mM
	Glicerol	24 %
	SDS	8 %
	DTT	0,2 M
	Blau de Coomassie	0,04 %

Condicions de migració:

Voltatge: 30 mV durant 30 min, 80 mV 1 h, 100 mV la resta.

<i>Tampó d'electroforesi del ànode:</i>	Tris-HCl pH 8,9	0,2 M
---	-----------------	-------

<i>Tampó d'electroforesi del càtode:</i>	Tris-Base	12,11 g/L
	Tricina	17,92 g/L
	SDS	0,1 %

3.2.3. Electroforesi en dos dimensions

Aquesta tècnica permet la separació de proteïnes segons el seu pI (1^a dimensió) i el seu pes molecular (2^a dimensió). Per a la primera dimensió s'han utilitzat tires (*strips*) amb un gradient de pH de 3 a 11 creat amb amfolines que provoquen la migració de les proteïnes fins a la regió de la tira on el pH és igual al seu pI. La segona dimensió consisteix en una separació de les proteïnes per mida en gel de SDS-PAGE. Aquesta tècnica resulta útil per detectar diferents isoformes d'una mateixa proteïna. En aquest treball s'ha utilitzat per analitzar la proteïna Rx3 purificada per HPLC.

Protocol:

A/ Primera dimensió: Isoelectroenfoc

1. Afegir a 10 µg de proteïna a analitzar: 2 µL Destríc (Amersham)
1 µL tampó IpG (Amersham)
Tampó de rehidratació fins a 125 µL

<i>Tampó de rehidratació:</i>	Tris-HCl	18 mM
	Urea	7 M
	Tiourea	2 M
	CHAPS	4 % (p/v)
	Bromofenol	0,04 % (p/v)

2. Introduir la mostra dins del sarcòfag (*holder*) i posar a sobre un *strip Immobiline Destríc pH 3-11* (Amersham) amb l'acrilamida cap a baix.

3. Transferir el sarcòfag a un aparell *IpG-Phor* (Amersham) i executar un programa d'isoelectroenfoc amb les següents condicions:

Temps	Voltatge
6 h	0 V (rehidratació)
6 h	30 V
1 h	500 V
1 h	1000 V
6 h	5000 V

Per a l'isoelectroenfoc de la proteïna Rx3, les dades al finalitzar el programa van ser:

Voltatge total: 15630 V/h
 Temps: 13 h 47 min + 6 h de rehidratació
 Voltatge màxim: 3240 V

4. Congelar el *strip* a -80 °C un mínim de 1 h.

B/ Segona dimensió: separació per massa

5. Descongelar el *strip* i equilibrar-lo rentant dos vegades durant 15 min en cadascuna de les següents solucions:
- Tampó d'equilibrat + DTT 10 mg/mL
 - Tampó d'equilibrat + Iodoacetamida 25 mg/mL

<i>Tampó d'equilibrat:</i>	Tris-HCl pH 8,8	50 mM
	Urea	6 M
	Glicerol	30 % (v/v)
	SDS	2 % (p/v)
	Bromofenol	0,04 % (p/v)

6. Rentar el *strip* amb H₂O milli-Q i posar-lo a sobre d'un gel SDS-PAGE (15 % d'acrilamida en el nostre cas) sense gel concentrador (apartat B.3.2.1.).
7. Cobrir el *strip* amb agarosa 1 % i córrer el gel en les següents condicions:
- 30 V durant 15 min,
 - 100 V fins que el blau arribi a baix.
8. Tenyir el gel amb nitrat de plata per tal de visualitzar les proteïnes (apartat B.3.3.2.).

3.3. Tinció de gels de poliacrilamida

3.3.1. Tinció amb blau de Coomasie

Aquesta tinció s'ha utilitzat rutinàriament tan per analitzar patrons proteics com per comprovar la quantitat de proteïna transferida per *Western Blot*. El seu límit de detecció és de 0,1-0,2 µg de proteïna per banda.

Protocol:

1. Fixar les proteïnes amb una solució de blau de Coomasie R (Sigma) 0,45 % i TCA 50 % durant 10 min.
2. Fer rentats successius amb una solució de metanol 30 % i àcid acètic 10 %.
3. Quan el fons estigui destenyit, fer dos rentats amb H₂O i guarda el gel en H₂O.

3.3.2. Tinció amb nitrat de plata

La tinció amb nitrat de plata presenta un límit de detecció inferior al Coomassie podent detectar 5-10 ng de proteïna. A més el protocol descrit permet el posterior anàlisi de les bandes per espectrometria de masses. Per obtenir una tinció nítida és especialment important preparar totes les solucions en H₂O milli-Q i utilitzar exclusivament recipients de vidre.

Protocol:

1. Fixar les proteïnes en una solució d'etanol 40 % i àcid acètic 10 % durant 30 min.
2. Sensibilitzar el gel durant 30 min en la següent solució:

Etanol	30 %
Na ₂ S ₂ O ₃	0,2 %
Acetat sòdic	6,8 %
3. Rentar el gel 3 vegades durant 5 min amb H₂O milli-Q.
4. Incubar durant 20 min amb AgNO₃ 2,5 g/L.
5. Rentar el gel 2 vegades durant 5 min amb H₂O milli-Q.
6. Revelar fins que apareguin les bandes de proteïna (2-5 min) amb una solució de Na₂CO₃ 2,5 % i formaldehid 0,01 % (40 µL de formaldehid en 100 mL de solució).
7. Parar la reacció incubant 10 min amb Na₂-EDTA 14,6 g/L.
8. Rentar el gel 2 vegades durant 5 min amb H₂O milli-Q.
9. Guardar el gel en H₂O milli-Q.

3.4. Western Blot

Aquesta tècnica ha estat utilitzada per identificar així com per avaluar els nivells d'expressió de les proteïnes recombinants en les línies transgèniques de tabac i arròs. A continuació es detalla els protocols tan de transferència com d'immunodetecció emprats.

3.4.1. Transferència de proteïnes

En el decurs d'aquest treball s'han utilitzat dos sistemes diferents per transferir les proteïnes resoltes en gels d'acrilamida a membranes de nitrocel·lulosa de 0,2 µm (*Schleicher & Schuell*). Els protocols detallats es descriuen a *Current Protocols in Protein Science* (Coligan, 2004).

- **Transferència horitzontal** mitjançant el sistema *SemiDry* (BioRad). És un sistema ràpid i senzill encara que l'eficiència de transferència és baixa per proteïnes grans. Les condicions de treball emprades han estat 15 V durant 20 min amb el següent tampó.

<i>Tampó de transferència horitzontal:</i>	Tris Base	48 mM
	Glicina	39 mM
	Metanol	20 %
	SDS	10%
	No cal ajustar pH que ha d'estar al voltant de pH 9.	

- **Transferència vertical** en fase líquida (BioRad). És un sistema de duració més llarga però que permet aconseguir una eficiència de transferència del 100 %. Resulta molt útil per a proteïnes grans o poc abundants. En aquest cas les condicions de treball han estat de 350 mA durant 1 h o bé 90 mA O/N a 4 °C en el tampó de transferència que es detalla a continuació. Si es realitza una transferència de 1 h és necessari refrigerar la cubeta per evitar l'escalfament excessiu .

<i>Tampó de transferència vertical:</i>	Tris Base	48 mM
	Glicina	39 mM
	No cal ajustar pH que ha d'estar al voltant de pH 9.	

Una vegada les proteïnes han estat transferides, les membranes s'han tenyit amb roig de Ponceau per tal de visualitzar les proteïnes i marcar les bandes dels marcadors de pes molecular. També es poden tenyir els gels transferits amb blau de Coomassie per avaluar l'eficiència de la transferència.

Protocol tinció Ponceau:

1. Incubar les membranes en una solució de roig de Ponceau 0,1 % i àcid acètic 1 % durant 5 min.
2. Rentar amb H₂O fins que el fons resti blanc.
3. Incubar les membranes en PBS per destenyir-les.

3.4.2. Immunodetecció de proteïnes

Protocol:

1. Bloquejar la membrana en una solució del 10 % de llet en pols desnatada en PBS-T i incubar 1 h a TA o O/N a 4 °C.

PBS-T: 0,1 % de Tween-20 en PBS.

2. Rentar durant 5 min amb PBS-T.
3. Incubar amb la dilució d'anticòs primari (apartat A.3.) que ens interessi en 3 % de llet en pols en PBS-T durant 1 h a TA o O/N a 4 °C.
4. Rentar 3 vegades durant 5 min amb PBS-T.
5. Incubar amb l'anticòs secundari en 3 % de llet en pols en PBS-T durant 1 h a TA. En aquest treball s'ha utilitzat en la gran majoria de casos una dilució 1/10000 d'un anticòs secundari anti-IgG de conill conjugat a la peroxidasa de rave (Amersham).
6. Rentar 3 vegades durant 5 min amb PBS-T.
7. Detectar les proteïnes marcades amb el kit *ECL Western Blotting Detection* (Amersham) seguint les instruccions del fabricant.

3.5. ELISA

Aquesta tècnica s'ha utilitzat per quantificar el nivell d'acumulació de la proteïna de fusió Rx3-T20 en fulles de tabac transgènic. L'experiment dissenyat consisteix en la unió de l'extracte proteic transgènic a pous d'una placa *MaxiSorp* (Nunc) i la detecció de la proteïna recombinant amb un anticòs específic. Com a patró s'ha emprat un pèptid sintètic de T-20 conjugat a BSA dins d'una matriu d'extracte salvatge. El T-20 sintètic ha estat produït per Meritxell Teixidó gràcies a un acord de col·laboració amb el IRBB del Parc Científic de Barcelona.

Protocol de conjugació del T-20 a BSA mitjançant glutaraldehyd:

1. Dissoldre el pèptid en AcOH 0,1 N a una concentració final de 10 mM (16,65 mg T-20 en 375 µL de AcOH 0,1 N).
2. Per altra banda, dissoldre BSA en tampó fosfat pH 7,5 a una concentració de 100 mM (10 mg BSA en 500 µL tampó fosfat).
3. Barrejar el pèptid amb la BSA i ajustar si és necessari el pH a 7,5 amb NaOH 0,1 M.
4. Afegir a poc a poc durant 5 min a temperatura ambient (TA) 1 mL de solució de glutaraldehyd al 0,2 %.

5. Deixar reaccionar 30 min a TA. En aquest temps la solució es torna groga.
6. Afegir 250 µL de Glicina 1M i deixar reaccionar durant 30 min més.
7. Dialitzar O/N a 4 °C en front a NH₄HCO₃ 10 mM.
8. Quantificar el grau de conjugació per anàlisi d'aminoàcids. En el nostre cas el resultat va ser el següent: 3,07 mg/µL T-20 + 2,48 mg/µL BSA
Grau de conjugació: 18,15 mols de T-20/mol de BSA

Protocol d'ELISA:

9. Preparar la corba patró formada per:
 - diferents dilucions de T-20 conjugat a BSA (T20-BSA),
 - extracte proteic de planta salvatge (la mateixa quantitat que la dilució més concentrada d'extracte transgènic a analitzar),
 - tampó carbonat 100 mM pH 9 fins a 200 µL.
10. Preparar les mostres a quantificar:
 - diferents dilucions d'extracte proteic transgènic,
 - extracte proteic salvatge fins a la concentració emprada en la corba patró,
 - tampó carbonat 100 mM pH 9 fins a 200 µL.
11. Repartir les mostres i la corba patró en una placa *MaxiSorp* (NUNC) i incubar O/N a 4 °C en una cambra humida. Els volums que s'afegeixen en cada pou són sempre de 200µL.
12. Rentar la placa 4 vegades amb PBLs (PBS + Tween-20 0,05 %).
13. Saturar els pous amb 3 % de BSA en PBLs durant 1 h a TA o O/N a 4 °C.
14. Rentar la placa 4 vegades amb PBLs.
15. Incubar amb una dilució de l'anticòs primari (en el nostre cas αT20 1/500) en 1 % de BSA en PBLs durant 2 h a TA o O/N a 4 °C.
16. Rentar la placa 4 vegades amb PBLs.
17. Incubar amb una dilució de l'anticòs secundari (en el nostre cas anti-conill-HRP 1/10000) en 1 % de BSA en PBLs durant 1 h a TA.
18. Revelar amb una solució de TMB fins que aparegui color blau en els pous amb mostra (3-30 min). *Atenció: la reacció pot ser molt ràpida.*

Solució de revelat TMB: 200 µL de TMB (3,3',5,5'-tetrametil-benzidina) 0,6 % en DMSO
50 µL de H₂O₂ al 1 %
12,5 mL de tampó citrat 100mM pH 5,5

19. Parar la reacció afegint 50 µL de H₂SO₄ 2N a cada pou. El color blau virarà a groc.
20. Llegir la DO a 450 nm i tractar les dades.

3.6. Obtenció d'un anticòs policlonal contra T-20

Amb la finalitat de poder detectar el T-20 per *Western Blot* en extractes proteics de les línies transgèniques es va produir un anticòs policlonal en conill. Degut a que T-20 és un pèptid petit es va conjuguar a KLH (*keyhole limpet hemacyanin*) per augmentar la resposta immune. Aquesta conjugació va ser realitzada per Merixell Teixidó (IRBB-PCB) donant com a resultat:

1,296 mg/µL de T20 + 1,098 mg/µL de KLH
Grau de conjugació: 1322,32 mols de T-20/ mol de KLH

Es van utilitzar conills immunodeprimits de la varietat *New Zealand White*, ja que son fàcils de mantenir i toleren les extraccions sanguínies. Les extraccions de sang es van realitzar a la vena marginal de l'orella dels conills, que és de fàcil accés i presenta poques terminacions nervioses. A continuació es detalla el programa d'immunitzacions i sagnada que es va realitzar.

Programa d'immunització:

- Abans de la primera immunització, se'ls va extreure sang que s'utilitzaria com a control negatiu.
- Primera immunització. Injecció subcutània de 260 µg de T-20 conjugat a KLH (T20-KLH) per conill amb l'adjuvant de Freud complet (CFA).
- Segona immunització (14 dies després). Injecció subcutània de 260 µg de T20-KLH per conill amb l'adjuvant de Freud incomplet (IFA).
- Tercera immunització (14 dies després). Injecció subcutània de 260 µg de T20-KLH per conill amb l'adjuvant IFA. Una setmana després es va realitzar la primera sagnada.
- Quarta immunització (30 dies després). Injecció subcutània de 260 µg de T20-KLH per conill amb l'adjuvant IFA. Una setmana després es va realitzar la segona sagnada extraient tota la sang possible.

- Per separar el sèrum es va deixar la sang O/N a 4°C perquè el coàgul es retragués i es va centrifugar durant 15 min a 3000 g. El sobrenedant corresponent al sèrum es va aliquotar i es va guardar a -80 °C.
- El sèrum provinent de la segona sagnada es va titular per *Dot Blot* utilitzant com a patró diferents concentracions de T-20 sintètic. Finalment, es va decidir utilitzar-lo per *Western Blot* a una dilució de 1/500.

3.7. Purificació de T-20 a partir de fulles de tabac transgènic

Per purificar T-20 a partir de fulles de tabac transgènic s'ha optimitzat un protocol tenint en compte 3 factors importants per a un sistema de producció:

- *Costos:* ha de ser un procés que no comporti un elevat cost del producte.
- *Escalat:* s'ha de poder aplicar a escala industrial.
- *Integritat del fàrmac:* ha de preservar la funcionalitat del fàrmac purificat.

El procés de purificació es divideix en dos grans parts. En la primera es purifica la proteïna de fusió Rx3-T20 gràcies a les seves característiques físico-químiques (apartats B.3.7.1. fins B.3.7.3.), mentre que en la segona s'aïlla el T-20 mitjançant la digestió de la proteïna de fusió amb una proteasa específica i una purificació per HPLC (apartats B.3.7.4 i B.3.7.5.). Com a material de partida s'ha escollit fulles seques de tabac de la línia transgènica Rx3.31 ja que presenta els nivells més alts d'acumulació de Rx3-T20.

3.7.1. Homogeneïtzació i extracció proteica

L'extracció de la proteïna recombinant a partir de teixit vegetal és un dels passos que comporta més pèrdues en el procés de purificació (Nicolov, 2004). En el nostre cas, per solubilitzar la proteïna de fusió Rx3-T20 s'ha emprat un tampó que conté agent reductor ja que s'ha pogut comprovar que la fusió presenta les mateixes característiques de solubilitat que la γ -zeïna. Aquesta característica ha permès realitzar una preextracció sense agent reductor eliminant gran quantitat de proteïnes.

Protocol:

1. Recollir fulles de la línia transgènica Rxt3.31 i assecar-les durant dos setmanes a 37 °C amb ventilació.
2. Triturar les fulles seques amb una picadora domèstica (Molinox) fins obtenir una pols fina.
3. Transferir 10 g de farina de fulla a un tub de centrifuga de 400 mL i afegir 300 mL de tampó Tris-HCl pH 8 50 mM.

4. Barrejar bé i deixar 15 min en agitació a 4 °C.
5. Centrifugar a 10000 rpm durant 20 min a 4 °C (rotor JA-10 Beckman).
6. Descartar el sobrenedant ja que la fusió Rx3-T20 no és soluble en un tampó sense agent reductor. Amb aquest pas eliminem de l'extracte proteic moltes proteïnes solubles en un tampó aquós. Degut a que el sediment es resuspen amb molta facilitat és convenient filtrar el sobrenedant amb l'ajuda de paper de filtre Miracloth i un *kitasatos*. D'aquesta manera es pot recuperar a partir del paper de filtre el sediment resuspès.
7. Afegir 300 mL de Tris-HCl pH 8 50 mM i repetir els passos 4 a 7 dos vegades més.
8. Afegir 300 mL de tampó d'extracció, barrejar bé i deixar 30 min a 4 °C en agitació.

Tampó d'extracció: Tris-HCl pH 8 50mM
β-ME 2 %

9. Centrifugar a 10000 rpm durant 30 min a 4 °C (rotor JA-10 Beckman).
10. Filtrar l'extracte proteic amb paper Miracloth i l'ajuda d'un *kitasatos* i descartar el sediment. Amb l'addició de β-ME al tampó d'extracció la proteïna Rx3-T20 es solubilitza. Tot i això, gran part (aproximadament el 50 %) de la proteïna recombinant resta en el sediment, sent aquesta etapa la que més pèrdues provoca en el procés de purificació. Si es realitza una segona extracció es possible extreure aproximadament un 10 % més de Rx3-T20, encara que el volum d'extracte augmentarà al doble.

3.7.2. Precipitació selectiva amb sulfat d'amoni

Com es va poder comprovar experimentalment, el cert grau d'hidrofobicitat de la proteïna de fusió Rx3-T20 fa que precipiti a una baixa concentració de sulfat d'amoni, mentre que la majoria de proteïnes resta en solució. Així doncs, una precipitació selectiva al 30 % de saturació de sulfat d'amoni permet purificar notablement la proteïna de fusió. El protocol utilitzat ha estat lleugerament modificat a partir del descrit en *Current Protocols in Protein Science* (Coligan, 2004).

Protocol:

1. Transferir l'extracte proteic a un vas de precipitats situat sobre un agitador magnètic i envoltat de gel.
2. Afegir a l'extracte (en agitació continua) la quantitat de sulfat d'amoni necessària per assolir un 10 % de saturació. És molt important afegir a poc a poc el sulfat d'amoni per tal de que no es superi la concentració desitjada.
3. Deixar durant 20 min en gel amb agitació constant.
4. Transferir la solució a tubs de centrifuga de 200 mL i centrifugar a 14000 rpm durant 45 min a 0 °C (rotor JA-14 Beckman).
5. Descartar el sediment i transferir el sobrenedant a un vas de precipitats. Amb aquest pas s'eliminen proteïnes molt hidrofòbiques que precipiten al 10 % de saturació de sulfat amoni així com pigments presents en l'extracte vegetal. Si el sediment es resuspen es pot utilitzar el paper de filtre i *kitasatos* per separar-lo del sobrenedant.
6. Afegir la quantitat de sulfat d'amoni necessària per assolir un 30 % de saturació amb una agitació continua.
7. Transferir la solució a tubs de centrifuga de 200 mL i centrifugar a 14000 rpm durant 45 min a 0 °C (rotor JA-14 Beckman).
8. Eliminar el sobrenedant completament i guardar el sediment en gel o congelar a -20 °C.
9. Resuspendre el precipitat amb 20 mL del tampó que es detalla a continuació i deixar O/N a 4 °C en agitació. Per aconseguir la solubilització del precipitat de sulfat d'amoni ha estat necessari incrementar la concentració d'agent reductor i afegir un detergent en el tampó de resuspensió.

Tampó de resuspensió SA: Tris-HCl pH 8 50 mM
β-ME 5 %
CHAPS 1 %
Inhibidors de proteases

10. Centrifugar a 14000 rpm durant 15 min a 4 °C (rotor JA-14 Beckman).
11. Descartar el precipitat i transferir el sobrenedant a un vas de precipitats.

3.7.3. Cromatografia de bescanvi aniònic

Aquesta tècnica permet separar proteïnes en funció del seu punt isoelèctric. Les columnes emprades (Hitrap Q) presenten un grup amino amb càrrega positiva que provoca la retenció a la columna de la fusió Rx3-T20, carregada negativament a pH 7,5. Per eluir la proteïna s'ha dissenyat un gradient de NaCl amb dos platós que permeten una millor separació de Rx3-T20.

Protocol:

1. Dialitzar l'extracte O/N a 4 °C en front de tampó Tris-HCl pH 8 20 mM amb 2 % de β -ME. Aquest pas es realitza per adequar el tampó de la mostra a les condicions de FPLC.
2. Centrifugar a 14000 rpm durant 15 min a 4 °C (rotor JA-14 Beckman) i descartar el sediment. Amb aquest pas la mostra ja està preparada per injectar-la a la columna de cromatografia.
3. Equilibrar una columna Hitrap Q^{hp} de 5 mL (Amersham) en un aparell AKTA-FPLC (Amersham) seguint les instruccions del fabricant.
4. Injectar la mostra a un flux de 0,5 mL/min i realitzar un gradient continu de 0 a 0,5 M de NaCl amb dos platós realitzats de forma manual. D'aquesta manera s'aconsegueix una millor separació de la proteïna Rx3-T20 respecte a les altres. A continuació es resumeixen les condicions de treball del FPLC:
 - *Tampó A:* Tris-HCl pH 8 20 mM, 2 % β -ME
 - *Tampó B:* Tris-HCl pH 8 20 mM, 2 % β -ME, 0,5 M NaCl
 - *Gradient:* de 0 a 0,5 M NaCl en 150 mL
 - *Detecció:* 270 nm
 - *Flux del gradient:* 1 mL/min
 - *Fraccions de recollida:* 2 mL
 - *Platós:*
 - a) quan la conductància arribi a 8,8 mS/cm aturar el gradient manualment durant 10 fraccions
 - b) quan la conductància arribi a 20 mS/cm aturar el gradient manualment durant 10 fraccions.
5. Recollir fraccions de 2 mL i guardar-les en gel.
6. Analitzar 5 μ L de cada fracció mitjançant SDS-PAGE i *Western Blot* amb l'anticòs α G2 (apartats B.3.2.2 i B.3.4.) per determinar en quines fraccions es troba la proteïna recombinant Rx3-T20.
7. Analitzar 10 μ L de les fraccions amb Rx3-T20 per SDS-PAGE i tinció amb nitrat de plata (apartats B.3.2.2 i B.3.3.2.) per determinar el grau de puresa de les fraccions.
8. Ajuntar les fraccions on Rx3-T20 es trobi en una alta puresa i guardar-les en gel.

3.7.4. Digestió de Rx3-T20 amb Factor Xa

L'estratègia de producció emprada implica la necessitat de tallar la proteïna de fusió amb una proteasa específica per tal d'alliberar el T-20. S'ha escollit l'endoproteasa Factor Xa ja que talla específicament per l'extrem C-terminal de la seqüència aminoacídica IEGR, diana absent en el T-20 i Rx3. D'aquesta manera no s'afegeix cap residu al T-20 fet que podria afectar a la seva funcionalitat. A continuació es descriuen les condicions optimitzades per a la digestió de la proteïna de fusió Rx3-T20.

Protocol:

1. Concentrar les fraccions de FPLC per centrifugació amb filtres Amicon-15 (Millipore) canviant al mateix temps la proteïna a tampó Tris-HCl pH 7,5 20 mM. És molt important eliminar l'agent reductor de la mostra ja que aquest pot inhibir la digestió amb el Factor Xa. Ajustar la concentració de la proteïna aproximadament a 0,5 µg/µL per realitzar la digestió.
2. Preparar la barreja de digestió formada per:
 - 1 mL Rx3-T20 concentrada a 0,5 µg/µL, concentració final 250 ng/µL
 - 200 µL Tampó de digestió 10x
 - 10 µL Factor Xa 2 U/µL (Qiagen), 1 U Factor Xa per 30 µg de Rx3-T20.
 - 790 µL de H₂O estèril.

<i>Tampó de digestió 10x:</i>		<u>c.f.</u>
Tris-HCl pH 7,5	300 mM	30 mM
NaCl	500 mM	50 mM
CaCl ₂	25 mM	2,5 mM
CHAPS	10 %	1 %

Les condicions de digestió han estat optimitzades per a la proteïna Rx3-T20, sent especialment important la concentració de proteïna, el pH i l'addició d'un detergent no iònic (CHAPS).

3. Incubar de 3h a O/N a 22 °C en agitació suau per aconseguir una digestió completa.
4. Afegir PMSF a 1 mM per parar la reacció, deixar 15 min a TA i liofilitzar la mostra.

3.7.5. Purificació de T-20 per HPLC semipreparatiu

L'última etapa per a la purificació del T-20 consisteix en l'aïllament del T-20 de la barreja de digestió mitjançant HPLC semipreparatiu. Aquesta tècnica s'ha dut a terme en el IRBB del PCB amb la inestimable ajuda de Meritxell Teixidó i Ester Zurrilla.

Protocol:

1. Resuspendre la mostra en 700 µL d'H₂O i conservar-la en gel fins al moment de la injecció.
2. Equilibrar una columna C18-symmetry (7,8 x 100 mm, 5 µm, 100 Å, Waters) en un aparell d'HPLC-semipreparatiu (Waters).
3. Inyectar la mostra i realitzar un gradient continu amb les següents condicions de treball:
 - *Eluent A:* H₂O + TFA 0,1 %,
 - *Eluent B:* AcN + TFA 0,1 %,
 - *Gradient:* de 30 a 70 % AcN en 30 min,
 - *Flux:* 4 mL/min,
 - *Detecció:* 220 nm,
 - *Fraccions:* 2 mL.
4. Recollir les fraccions i analitzar 100 µL de cadascuna d'elles per HPLC-PDA (Waters) utilitzant una columna C18-symmetry (3,8 x 150 mm, 5 µm, 120 Å, Waters). D'aquesta manera es pot determinar la presència i puresa del T-20 en les fraccions analitzades. En aquest cas les condicions de treball són:
 - *Eluent A:* H₂O + TFA 0,045 %,
 - *Eluent B:* AcN + TFA 0,026 %,
 - *Gradient:* de 30 a 70 % AcN en 15 min,
 - *Flux:* 1 mL/min,
 - *Detecció:* 220 nm.

5. Ajuntar les fraccions on el T-20 està amb una alta puresa, liofilitzar i resuspendre en un volum petit d'H₂O.
6. Quantificar el T-20 purificat de plantes per HPLC-PDA amb les condicions descrites utilitzant com a corba patró diferents dilucions de un T-20 produït per síntesi química i quantificat per anàlisi d'aminoàcids.
7. Finalment, el producte obtingut s'analitza per MALDI-TOF amb l'aparell *Proteomics Analyser 4700* (Applied Biosystems) per comprovar que l'espectre de masses correspon al T-20.

3.8. Tècniques de localització subcel·lular de proteïnes

En aquest treball s'han emprat tres tècniques diferents per determinar la localització subcel·lular de les proteïnes de fusió en plantes de tabac i arròs. Com a primera aproximació experimental s'ha emprat l'anàlisi per *Western Blot* de diferents fraccions subcel·lulars obtingudes mitjançant gradients de densitat de sacarosa. Posteriorment els resultats s'han confirmat emprant tècniques de immunolocalització al microscopi òptic i electrònic.

3.8.1. Fraccionament subcel·lular mitjançant gradients de densitat

La densitat característica dels diferents orgànuls subcel·lulars permet aïllar-los en gradients de densitat. Així els cossos proteics presenten una alta densitat sedimentant per sota d'una solució del 50 % (p/v) de sacarosa, mentre que el reticle endoplasmàtic rugós és una estructura menys densa i sedimenta entre solucions de 20-30 % (p/v) de sacarosa. D'aquesta manera, analitzant per *Western Blot* diferents fraccions subcel·lulars obtingudes a partir d'homogenats de les plantes transgèniques podem dir en quin compartiment s'acumulen les proteïnes de fusió. El protocol utilitzat ha estat modificat a partir del descrit per Geli i col. (1994).

Protocol:

1. Homogenitzar 2 g de teixit fresc en 10 mL de tampó PBP-10 més inhibidors de proteases amb l'ajuda d'un morter.

<i>Tampó PBP:</i>	Tris-HCl pH 8	100 mM
	KCl	50 mM
	MgCl ₂	10 mM
	EDTA	10 mM

<i>Tampó PBP-10:</i>	Tampó PBP +	
	Sacarosa	10 % (p/v)

2. Agitar l'homogenat durant 15 min a 4 °C en un agitador orbital.
3. Centrifugar a 1000 g durant 10 min a 4 °C.
4. Filtrar el sobrenedant a través de 4 filtres Miracloth i conservar l'homogenat en gel.
5. Preparar un gradient discontinu de densitat en un tub d'ultracentrifuga amb les següents concentracions de sacarosa dissoltes en tampó PBP:

Conc. sacarosa (p/v)	Equivalència en p/p	Volum (mL)
20 %	19 %	2
30 %	27 %	3
50 %	42 %	3
70 %	56 %	1,5

6. Aplicar 3,5 mL d'homogenat sobre del gradient i centrifugar a 24000 g durant 2 h a 4 °C (rotor Sw 40 Ti Beckman).
7. Separar amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur les diferents interfases formades, el sobrenedant i el sediment.
8. Precipitar amb TCA al 15 % un terç del volum de les interfases i el sobrenedant.
9. Resuspendre el precipitat amb 100 µL de tampó TMx2 (apartat B.3.2.1.). Si es vol analitzar el sediment del gradient, resuspendre'l en 300 µL de tampó TMx1.
10. Analitzar enter 10 i 30 µL de les mostres per SDS-PAGE i *Western Blot* per tal de localitzar la proteïna en qüestió en les diferents fraccions cel·lulars obtingudes.

3.8.2. Immunolocalització al microscopi òptic

Aquesta tècnica s'ha emprat per la immunolocalització de la proteïna de fusió Rx3-T20 en fulles de tabac transgènic.

A/ Fixació de fulles de tabac

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

1. Tallar troços petits de fulla (0,5-1 mm) sobre una gota de solució fixadora i introduir-los en un tub Eppendorf amb 500 µL de fixador.
2. Deixar fixar durant 1 h a TA. És necessari aplicar xocs de buit fins que els troços de fulla quedin submergits en la solució. Tot aquell material que quedi surant s'haurà de descartar.
3. Rentar amb PBS 3 cops en agitació suau durant 15 min. a TA. Guardar a 4°C.

Fixador fulles tabac:

paraformaldehid	2,5 % (p/v)
glutaraldehid	1 % (v/v)
Tampó fosfat pH 7,2	20 mM

B/ Inclusió en parafina

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

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

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

** Histoclear™-II (National diagnostics).

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

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

C/ Preparació dels blocs de parafina per a l'obtenció de seccions

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

D/ Microtomia i preparació de les seccions

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

E/ Incubació dels talls de blat de moro amb l'anticòs αG2

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

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

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

ETAPA	SOLUCIÓ	TEMPS	TEMP	REP		
9	Incubació amb Ac 1ari	αG2	Tampó PBSBN + Ac (1/1500)	o/n	4°C	x1
		sèrum preimmune	Tampó PBSBN + Ac (1/300)	o/n	4°C	x1
10	Rentat	PBS	5 min.	TA	x3	

11	Incubació amb Ac 2ari fluorescent*	Tampó PBSBN + Ac (1/2000)	1-2 h	TA	x1
12	Rentat	PBS	10 min.	TA	X3

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

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

F/ Opservació al microscopi

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

FLOUROCROM	EXCITACIÓ	EMISSIÓ
<i>Alexa Fluor® 488</i>	495	519

11. Les imatges s'han adquirit amb el Leica TCS SP confocal laser scanning microscope (Heidelberg, Alemanya), del servei de microscòpia de l'IBMB-CSIC de Barcelona, fixant la longitud d'ona d'emissió d'un làser d'argó a 488 nm. Durant l'escanejat, per visualitzar la fluorescència del fluorocrom Alexa Fluor® 488, es va utilitzar un filtre triple-dicroic (TD 488/543/633) i la finestra d'emissió es va fixar a 490-540 nm. Es van realitzar seccions òptiques seriadades de 1,5 µm i les imatges confocals es van combinar com projeccions x-y. La llum làser transmesa pel làser d'argó emetent a 488 nm es va recollir en un tub fotomultiplicador (PMTT), per generar les imatges de microscòpia de transmissió.

G/ Tampons i solucions

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

<i>Tampó de rentat (PBS):</i>	PBS 0,1 M, pH 7,4.
<i>Tampó permeabilització (PBST):</i>	0,5% Triton X-100 en PBS 0,1 M, pH 7,4.
<i>Tampó d'incubació (PBSBN):</i>	0,5% BSA i 5% Normal Goat Serum (NGS, Gibco) en PBS 0,1 M, pH 7,4.

Preparació del Mowiol:

1. Pesar 2,4 g de Mowiol (Calbiochem), afegir 4,88 mL de glicerol 87% i incubar a TA O/N en agitació.
2. Afegir 12 mL Tris-HCl 0,2 M, pH 8,5 i agitar.
3. Escalfar 10 min a 50°C.
4. Conservar a 4°C o a -20°C (per a períodes superiors a un mes).

3.8.3. Immunolocalització al microscopi electrònic

La fixació dels grans d'arròs s'ha realitzat seguint els protocols de Takemoto i col. (2002). La inclusió i la preparació de talls semi-fins i ultra-fins ha estat realitzada pel Servei Científico-tècnic del PCB. L'immunocitoquímica s'ha portat a terme segons el protocol descrit per Moore i col. (1991). A continuació es detallen les condicions de treball utilitzades.

Procediment:

- Fixar petits trossos d'endoperma d'arròs de 14 DAF en la solució de fixació durant 1 h a TA. Posteriorment, les mostres es renten amb tampó PIPES 20 mM pH 7, CaCl₂ 0,5 mM.

<i>Fixador grans d'arròs:</i>	paraformaldehid	4 % (p/v)
	glutaraldehid	0,2 % (v/v)
	PIPES pH 7	20 mM
	CaCl ₂	0,5 mM

- Infondre les mostres fins a 2,3 M de sacarosa com a crioprotector. Posteriorment, congelar amb propà líquid a -190 °C (Leica EM CPC, Viena) i guardar en nitrogen líquid a -196 °C fins al moment de la criosubstitució.
- La criosubstitució s'ha realitzat en un aparell AFS (Leica) utilitzant metanol amb 0,5 % d'acetat d'uranil durant 3 dies a -90 °C. Al quart dia augmentar la temperatura suaument, a 5 °C/h, fins a -50 °C.
- Rentar les mostres amb metanol a -50 °C i incloure-les en Lowicryl HM20.
- Obtenir seccions ultrafines utilitzant un ultramicrotom Leica Ultracut UCT i dipositar els talls en reixetes de níquel o or.
- La immunocitoquímica s'ha realitzat segons el protocol descrit per Moore i col. (1991) utilitzant l'anticòs α R8 a una dilució 1/1500 O/N a 4 °C i proteïna A-or col·loidal (10 nm) durant 1h a TA.
- Rentar les mostres i contrastar-les amb 2 % d'acetat d'uranil durant 20 min.
- Observar al microscopi electrònic (Jeol 1010) amb SIS Mega View III CCD.

3.9. Detecció de l'activitat glucuronidasa

La presència de l'enzim β -glucuronidasa (GUS) en teixits vegetals pot ser determinada de dos maneres diferents. La tinció histoquímica amb X-Glu permet localitzar GUS en el teixit analitzat, mentre que l'anàlisi fluoromètric d'extractes proteics ens dona una informació quantitativa de l'acumulació d'aquesta proteïna.

3.9.1. Tinció històquímica de GUS

Aquesta tècnica permet localitzar l'activitat GUS en teixits vegetals mitjançant la incubació del material en una solució amb el substrat X-Glu (5-Bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucosid). El protocol utilitzat ha estat lleugerament modificat a partir del descrit per Hiei i col. (1994). En aquest treball s'ha emprat la tinció GUS per determinar l'activitat del promotor gammaZ en diferents teixits de les línies transgèniques d'arròs gZ-GUS.

Protocol:

1. Tallar el material i introduir-lo en la següent solució.

Tampó fosfat pH 7	50 mM
X-Glu	1 mM
Metanol	20 %
2. Infiltrar al buit durant 5 min i incubar durant 1h a 37 °C.

3. Rentar amb metanol dos vegades durant 2 h abans de l'observació.
4. Guardar les mostres tenyides en etanol al 70 %.

3.9.2. Determinació de l'activitat GUS en teixits vegetals

L'anàlisi quantitatiu de l'activitat GUS s'ha realitzat seguint l'assaig fluorimètric descrit per Jefferson i col. (1987). L'assaig es basa en la detecció del producte fluorescent 4-metilumbeliferona (4-MU), generat a partir del substrat àcid metilumbeliferil- β -glucuronid (MUG) per acció de la β -glucuronidasa. Aquesta tècnica s'ha emprat per quantificar el nivell d'expressió del promotor gammaZ en fulles i grans d'arròs de les línies transgèniques gZ-GUS.

Protocol:

1. Extreure la proteïna GUS de les mostres de teixit (apartat B.3.1.) amb el següent tampó d'extracció.

<i>Tampó d'extracció GUS:</i>	Tampó fosfat pH 7	50 mM
	EDTA	10 mM
	SDS	0,1 %
	Triton X-100	0,1 %

2. Quantificar la concentració de proteïnes solubles amb el mètode de Bradford (BioRad) i conservar els extractes en gel.
3. Preparar la corba patró afegint el producte 4-MU a partir d'un estoc de 10 μ M a 200 μ L de tampó de reacció. Les quantitats emprades han estat 0, 50, 100, 200, 300 i 500 pmols 4-MU en 200 μ L de tampó de reacció.
4. Afegir el volum de mostra corresponent a 10 μ g de proteïna a 200 μ L de tampó de reacció i barrejar bé.

<i>Tampó de reacció GUS:</i>	3mL tampó d'extracció GUS
	1 mL metanol
	1,764 mg MUG (10 mM final)

5. Repartir la corba patró i les mostres en una placa de 96 pous negra (Nunc) i introduir-la en el fluorímetre Victor³ (Perkin-Elmer). Executar un protocol que presenti les següents condicions de treball:
 - Longitud d'ona d'excitació: 355 nm
 - Longitud d'ona d'emissió: 460 nm
 - Realitzar lectures cada 30 min durant 4 h.
6. Amb les dades obtingudes representar la corba patró i establir la relació pmol 4-MU / unitat de fluorimetria.
7. Representar la variació de l'aparició de 4-MU en les mostres al llarg del temps i establir dos punts (T1 i T2) entre els quals la gràfica sigui lineal.
8. Calcular l'activitat GUS de les mostres mitjançant la següent fórmula:

$$\text{Activitat GUS (pmols4-MU/min/mg)} = (\text{UT1}-\text{UT0})/(\text{k} \times (\text{T1}-\text{T0})) \times 10$$

on UT1 i UT0 són les unitats de fluorimetria a temps 1 i temps 0 i
k és la relació unitats de fluorimetria/pmol 4-MU.

3.10. Anàlisi de l'activitat i citotoxicitat del T-20 en cultius cel·lulars

Els assaigs d'activitat i citotoxicitat han estat realitzats pel grup del Dr. José Esté del laboratori de retrovirologia de la Fundació IRSI-Caixa, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (HUGTP).

Es van realitzar experiments on cèl·lules humanes (MT-4) que expressen el receptor viral CD4 son infectades amb el virus VIH-1 (soca NL4-3) en presència de diferents concentracions d'un determinat agent antiviral. Es deixen proliferar les cèl·lules durant 5 dies i posteriorment es quantifica el nombre de cèl·lules viables mitjançant el mètode colorimètric de tertrazolium (Pauwels i col. 1988). Per als assaigs de citotoxicitat es van utilitzar concentracions elevades del compost sobre cèl·lules MT-4 no infectades amb el virus i es va realitzar el mateix anàlisi.

D'aquesta manera es va avaluar l'activitat i citotoxicitat del T-20 produït a plantes (pT-20) així com la del pèptid produït per síntesi química (sT-20). També es van incloure en l'assaig els antivirals AZT i AMD-3100 com a fàrmacs control amb diferent mecanisme d'acció que el T-20. AZT és un anàleg de nucleòsid que inhibeix la retrotranscriptasa viral, mentre que AMD-3100 es un inhibidor de l'entrada que impedeix la unió de la glicoproteïna viral gp120 amb el coreceptor CXCR4. A demés, per comprovar el mecanisme d'acció del T-20 produït a plantes es van realitzar els mateixos assaigs amb una soca de VIH-1 resistent a T-20 (NL4-3/T-20r) en la qual s'ha produït una mutació en la seqüència de la glicoproteïna gp41 que impedeix la unió del T-20.

