



PATENTE

Procedemento para a detección de recombinación homóloga in vivo analizando formas de proteína verde fluorescente (GFP) recombinantes

Sistema para a identificación, con microscopio de fluorescencia, de reordenacións no xenoma (recombinación) orixinadas por diferentes condicións. Emprega lévedos que expresan proteínas fluorescentes de diferente localización celular.

Áreas de coñecemento:



Ciencias da vida e da saúde

Estado de protección da tecnoloxía

Tecnoloxía xa patentada.

Que buscamos?

Búscanse empresas interesadas na licenza desta tecnoloxía.

Descrición

A nosa tecnoloxía (patente ES2610744) proporciona un sistema que permite identificar, con células vivas, o efecto tanto de axentes químicos como de mutacións xénicas con consecuencias na reorganización dos xenes e potencialmente canceríxenos. Esta identificación realízase no microscopio de fluorescencia con



OTRI

OFERTA
TECNOLÓGICA

Edificio de Servizos Centrais
de Investigación Campus de
Elviña, s/n 15071 A Coruña

981 167 173

otri.udc.es

células sometidas ás condicións que se queiran estudar.

O procedemento permite obter resultados en moi curto espazo de tempo.

Na primeira versión desta análise de recombinación empréganse dous xenos modificados, neste caso ao fusionalos con proteína fluorescente verde (GFP), presentes no lévedo *Saccharomyces cerevisiae*. Os devanditos xenos dan lugar a dúas proteínas fluorescentes con diferente localización celular: unha delas é nucleolar e emite unha fluorescencia intensa; a outra emite unha fluorescencia máis tenue e é citosólica (véxase a imaxe 1). A recombinación entre os dous xenos fusionados a GFP causa cambios no padrón de fluorescencia celular (nucleolar *versus* citosólico) pola perda dun deles (véxase a imaxe 2). A súa frecuencia pode ser cuantificada.

Esta tecnoloxía non implica grandes infraestruturas e poden analizarse dun modo rápido as frecuencias de recombinación sen ter que facer extraccións de ácidos nucleicos nin análises moleculares. O procedemento é aplicable a células vexetais e humanas. Estas últimas aplicacións teñen cabida en medicina e biotecnoloxía.

Valores engadidos

No estado actual de desenvolvemento, esta tecnoloxía permite identificar cambios orixinados por mutacións celulares, axentes químicos externos ou fármacos que causen reorganizacións xénicas, empregando lévedos como organismo modelo e sen necesidade de facer ningún tipo de procesado celular. Unicamente mediante visualización por microscopía de fluorescencia.

Unha gran vantaxe fronte aos estudos que aplican técnicas de PCR é que aquí as células se visualizan directamente tras cultivalas, mentres que a análise por PCR require o procesado das mostras, a propia PCR e a electroforese. Por outro lado, coa nosa técnica podemos identificar casos de recombinación en células individuais que poderían pasar desapercibidos, se a súa frecuencia é baixa, nunha PCR co DNA de varias células.

Ademais, no caso do estudo de recombinación por técnicas de xenética clásica, cómpre detectar crecemento celular en placas selectivas, o que supón un gasto de tempo (normalmente 2-3 días) e materiais de cultivo.

A tecnoloxía é aplicable e está patentada para o seu uso en calquera tipo de célula eucariota. Por tanto, nestes casos tampouco é necesario facer extraccións de ADN nin PCR. Así mesmo, permite diferenciar o sentido da recombinación segundo se perda a fluorescencia citosólica ou a nucleolar. Inclúe dúas cepas de lévedo para ter un control positivo e outro negativo nos estudos a que se aplique.

Por último, esta tecnoloxía permite o desenvolvemento dun software específico de análise de imaxe.

Outra información de interese:

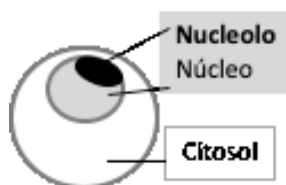
Publicacións y difusión relacionados con a tecnoloxía:

Varela-Rodríguez, B. M.; Alvarez-Felgar, T.; Rodríguez Torres, A. M. e Freire-Picos M. A. «A microscopy based system to detect homologous recombination in yeasts». Congreso BAC2017, León, xullo de 2017, p. 105. ISBN: 978-84-947468-0-2.

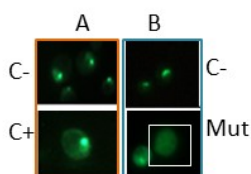
Varela Rodríguez, B. «Expresión de formas recombinantes de GFP en levaduras: efecto de la cepa y componentes del poro nuclear». Memoria de licenciatura, Facultade de Ciencias, UDC novembro de 2013.

Varela Rodríguez, B. «Expresión en levaduras de genes GFP recombinantes en el mutante Δ nup84 del Complejo del Poro nuclear». Tráballo de fin de máster, Facultade de Ciencias, UDC, xuño de 2014.

Varela-Rodríguez, B. M.; Rodríguez Torres, A. M.; Álvarez, T. e Freire-Picos, M. A. «3'-Untranslated regions are involved in Nup84-dependent recombinant events». Artigo en prensa, 2018.



Representación esquemática das posibles localizacións celulares



Exemplo. **A** Célula non sometida a cambios (C- control negativo) (C+ control positivo con fluorescencia nucleolar e citosólica). **B** Experimento en células mutadas.

Aplicacións por sector

Exemplos de aplicación por sector:

- Investigación básica e/ou aplicada: analizar *in vivo* o efecto causado pola mutación dun xene que afecte á reorganización xenómica. Esta aplicación xa foi validada polo noso grupo de investigación e serve para outras especies, plantas, animais e
- Medioambiental: estudar o aumento de frecuencia da recombinación celular causada por axentes potencialmente daniños presentes en medios acuáticos, coas subseguintes consecuencias negativas para os seres vivos.
- Farmacolóxico e biomédico: efecto dun medicamento ou dun potencial fármaco, na taxa de recombinación, que estea asociado cun aumento das probabilidades de cancro.

Procedemento para a detección de recombinación homóloga in vivo analizando formas de proteína verde fluorescente (GFP) recombinantes



Gandaría e
veterinaria



Medio ambiente



Saúde e benestar



Grupo de Investigación



Expresión Xénica en Lévedos (LEVAGEN)



Grupo Fisiopatoloxía Endócrina, Nutricional e Médica (FENM)

Responsable



María Angeles Freire Picos



Ana M^a Rodríguez Torres



Bárbara M^a Varela Rodríguez