

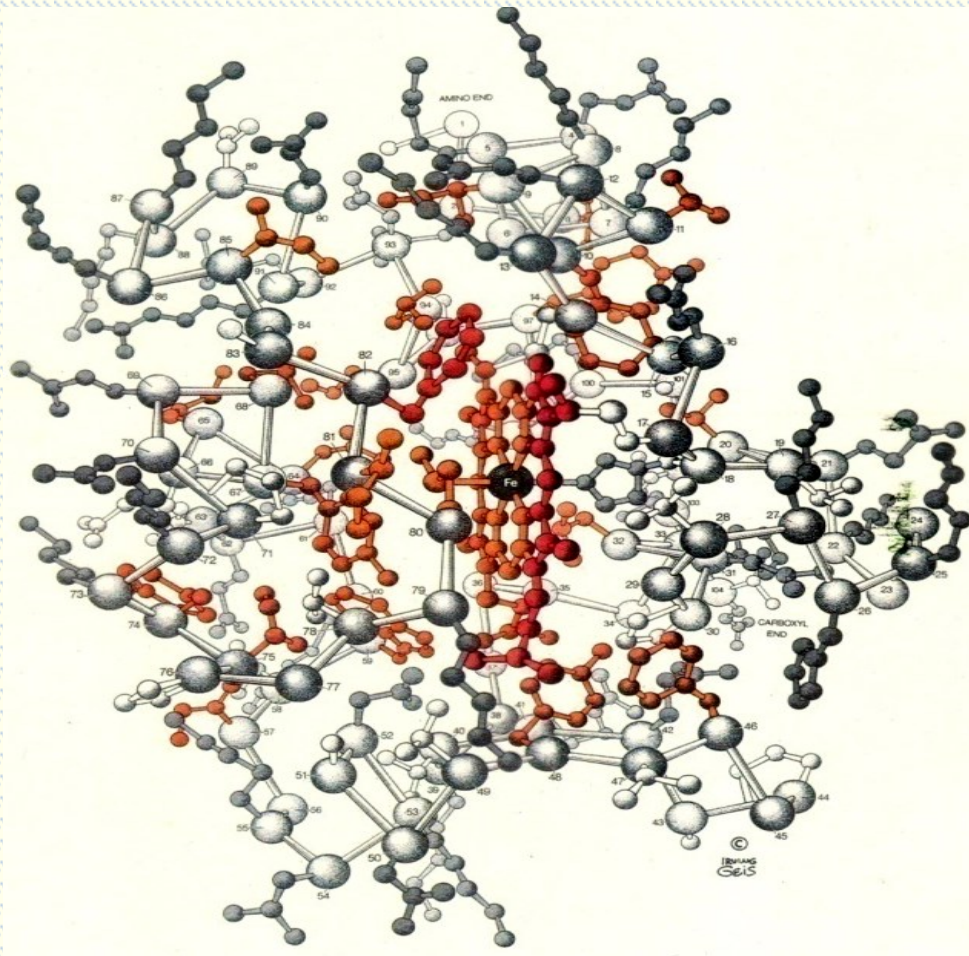


UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA
MOLECULAR**

GRAU EN BIOLOGIA

PRÀCTIQUES DE BIOQUÍMICA



ÍNDIX

Consideracions generals

Seguretat i treball en el laboratori	1
Precisió de les mesures	2
Preparació de solucions	2
Elaboració i presentació de resultats	3
Ús del pHmetre	4
Ús del colorímetre	5

Guió de pràctiques

<i>Pràctica 1: Solucions tampó. Punt isoelèctric de les proteïnes</i>	7
<i>Pràctica 2: Tècniques de separació de proteïnes:</i>	
<i>Cromatografia i electroforesi</i>	11
<i>Pràctica 3: Activitat enzimàtica fosfatasa alcalina</i>	21
<i>Pràctica 4: Obtenció i anàlisi electroforètica de DNA</i>	25
<i>Pràctica 5: Reaccions lluminoses de la fotosíntesi</i>	31
<i>Pràctica 6: Metabolisme d'hidrats de carboni</i>	37

CONSIDERACIONS GENERALS

Seguretat i treball en el laboratori

Els laboratoris són considerats llocs de treball perillosos i els usuaris han de ser conscients dels riscos potencials i de la manera en què s'ha d'actuar en cas d'urgència. Cal portar bata, preferiblement de cotó, per tal de protegir-se dels productes químics. Com a protecció personal, s'utilitzaran les ulleres de seguretat i els guants i les màscares, si és el cas.

En el laboratori no s'ha de menjar, ni tampoc beure, per tal d'evitar el perill d'enverinament per contacte accidental d'algun compost amb la boca.

Cal netejar el material abans i després d'usar-lo.

S'ha de manipular amb precaució el material de vidre, per tal d'evitar trencaments.

Mai s'han de pipetejar les solucions amb la boca sinó amb l'ajuda d'una propipeta. No pipetegeu mai directament del flascó d'aigua destil·lada.

Cal fixar-se en el nom de les solucions i els productes abans d'utilitzar-los. S'han de manipular amb precaució els solvents i productes tòxics. Abans de tirar qualsevol solució a la pica, obriu l'aixeta i deixeu córrer una estona l'aigua. Els productes perillosos no han de vessar-se en les piques. En el laboratori hi ha recipients adequats per a la recollida dels residus perillosos (bromur d'etidi, fenol...). També hi ha recipients per recollir els fragments de vidre en cas de trencament.

Precisió de les mesures

No hi ha cap mesura efectuada en el laboratori que siga exacta. Un error és la variació que existeix entre un valor mesurat llegit i el valor exacte o correcte, i no s'ha de confondre amb l'error de manipulació. Els errors provenen de variacions estadístiques. Són inevitables, però poden minimitzar-se si es treballa correctament.

Els errors de manipulació, per altra banda, són inherents a la incompetència humana i poden i han de ser eliminats. En nombrosos experiments biològics es produeixen errors a causa d'un control insuficient. Els experiments cal plantejar-los de manera que cada vegada es modifiqui només un paràmetre de tots els que poden afectar l'assaig, de manera que la resta dels paràmetres es mantinguen constants. La lectura d'una escala o d'un menisc solen ser errors humans freqüents. Cal comptar també amb els límits de precisió dels materials i aparells usats. Una font addicional d'error experimental es pot deure a un incorrecte calibratge dels aparells de mesura.

Corbes de calibratge. Per tal d'obtenir el valor més precís possible d'una quantificació, els errors han de ser reduïts al mínim. Cal treballar correctament i utilitzar solucions control de concentració coneguda. La solució control ha de tractar-se de manera idèntica a la solució que cal estudiar. Es traça una corba o recta patró que mostre la variació d'allò que es mesura en funció de la quantitat de mostra. Els valors obtinguts per a la quantificació de la solució problema han d'estar compresos entre els de la gamma patró. Un altre control, el blanc, ha d'utilitzar-se. En aquesta prova en blanc, l'aigua destil·lada substitueix la substància que cal quantificar i el seu tractament és el mateix que el de la solució que cal analitzar i el de la solució control. La utilització pràctica d'aquests controls està ben il·lustrada en les nombroses quantificacions colorimètriques d'aquest manual.

Preparació de solucions

A l'hora de fer els càlculs, cal tenir en compte les característiques del producte inicial quant a puresa, hidratació, etc. Les concentracions de les solucions solen expressar-se en termes de molaritat (M) (mol de substància per litre de solució). Tanmateix, també poden expressar-se en grams de substància per litre de solució (g/L, o el seu equivalent mg/mL), o fins i tot en percentatge (%), bé p/v (g/100 mL de solució), p/p (g/100 g de solució), o v/v (mL/100 mL de solució).

A partir de sòlids:

- 1) Calculeu la quantitat necessària de solut.
- 2) Peseu en un vas de precipitats amb l'ajuda d'una espàtula.

- 3) Afegiu al vas una quantitat de dissolvent (habitualment aigua) inferior al volum de solució que es vol preparar.
- 4) Una vegada dissolt tot el solut, amb l'ajuda d'una vareta de vidre o d'un agitador magnètic, aboqueu el contingut a un matràs aforat o a una proveta per tal de mesurar de manera exacta el volum total de solució.
- 5) Afegiu un poc de solvent al vas per tal de recollir els residus de solució. Aboqueu-lo a la proveta.
- 6) Afegiu-hi solvent fins que la part inferior del menisc coincidisca amb el volum desitjat.

A partir de líquids:

- 1) Calculeu la quantitat necessària de líquid de partida.
- 2) Mesureu-ne el volum amb l'ajuda d'una pipeta amb propipeta, o d'una proveta, segons la quantitat de líquid que calga preparar.
- 3) Vesseeu el líquid en una proveta.
- 4) Afegiu-hi solvent fins que la part inferior del menisc coincidisca amb el volum desitjat.

Elaboració i presentació de resultats

L'objectiu del treball de laboratori és la comunicació de resultats i d'idees als altres d'una manera comprensible. La redacció d'un treball pràctic (els objectius, el desenvolupament, els resultats obtinguts, la discussió i les conclusions d'aquest) és un bon exercici per a la redacció d'una publicació científica. El quadern de laboratori convé que siga rígid i folrat. Si és de fulls enganxats amb anelles, és pràctic per a la inserció de resultats experimentals, encara que siga possible perdre fulls. La redacció dels experiments ha de fer-se amb el detall que exigeix el fet de poder reproduir-los exactament. La presència d'esquemes dels aparells o de procediments de purificació de biomolècules i figures que mostren els resultats de, per exemple, una electroforesi, pot donar sovint més informacions que les llargues descripcions en el text. Els resultats experimentals solen resumir-se en forma de taula o de gràfica. Les taules s'han de numerar ordenadament en el text (Taula 1, Taula 2) i han de tenir un títol. En alguns casos, pot ser interessant donar-ne detalls en una llegenda, sota del títol. Les unitats en les quals s'expressen els resultats han de donar-se en la part superior de cada columna i no en cada línia de xifres. Aquestes unitats cal triar-les de manera que en la taula es presente un nombre limitat de xifres (per exemple, una concentració de 0,0072 mol/litre, s'escriu més fàcilment 7,2 amb la llegenda "concentració (mmol/litre)" o 72 amb la llegenda " $10^4 \times$ concentració (mol/L)". En general, els valors obtinguts es presentaran en forma de gràfica i no de taula. A l'hora de traçar una gràfica, els valors de la variable independent (paràmetre conegut) es porten habitualment sobre l'eix de les abscisses (x), mentre que els de la variable dependent (paràmetre desconegut), sobre l'eix vertical d'ordenades (y). Per a la identificació d'una gràfica cal:

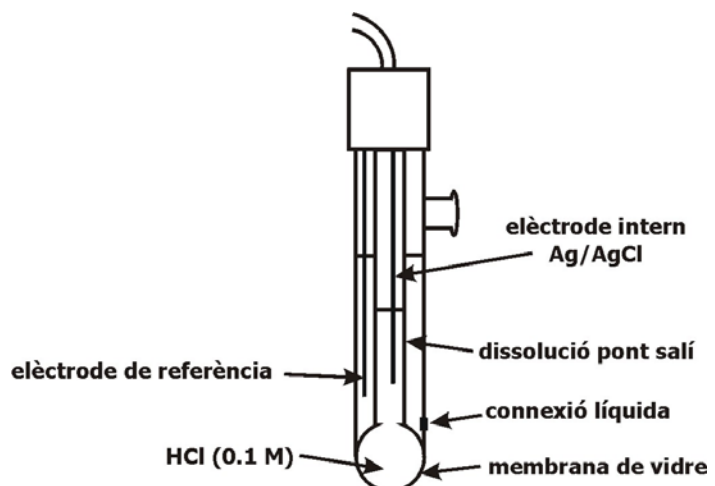
- (1) Donar un títol simple i concís que informe de l'experiment del qual deriva.
- (2) Indicar clarament les quantitats i les unitats sobre els eixos.
- (3) Ajustar les escales a fi d'obtenir un pendent d'uns 45° .
- (4) Utilitzar nombres senzills (15 mmol/L és preferible a 0,015 mol/L).
- (5) Utilitzar símbols clarament definits (●, ○, ■, □).
- (6) Unir els punts amb una corba o recta contínua.

En aquest manual es fan servir les unitats del SI (sistema internacional). Cal recordar que els símbols de les unitats del SI s'han d'escriure en minúscules (excepte si deriven d'un nom propi), si bé excepcionalment en el cas de litre s'accepta "L" per tal d'evitar confusions amb el símbol unitat "l". Els símbols s'escriuen igual en singular i plural (7 mol és correcte, 7 mols és incorrecte). Quan es tracta amb unitats compostes, producte de dues o més unitats, poden escriure's amb punt o sense entre elles. De la mateixa manera, si es divideixen dues o més unitats, també són correctes les formes mol/L o $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. A més, amb la finalitat de no emprar números massa petits, el SI admet l'ús de submúltiples de les unitats, fet que s'ha d'indicar amb un prefix unit al símbol de la unitat a la qual modifiquen. Els prefixes més utilitats en bioquímica són: p (10^{-12}); n (10^{-9}); μ (10^{-6}); m (10^{-3}).

Ús del pHmetre

La concentració de protons (H^+) de la majoria de les solucions és extremadament baixa. Per tal de no haver d'utilitzar aquestes quantitats s'introdú l'escala de pH o logaritme (canviat de signe) de la concentració de H^+ d'una solució. Així doncs, $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$.

El mètode més fiable per mesurar un pH és utilitzar el pHmetre. Aquest mesura la força electromotriu d'una cèl·lula de concentració que està formada per un elèctrode de referència, la solució que cal mesurar, i per un elèctrode de vidre sensible als H^+ (vegeu la figura).



A l'hora de la manipulació dels pHmetres cal prendre les precaucions següents:

1. Una solució ha d'estar ben mesclada abans de mesurar-ne el pH.
2. La solució ha d'estar a temperatura ambient, ja que el pH i el pK_a depenen de la temperatura.
3. L'elèctrode s'ha de llavar bé (utilitzant els flascons de plàstic) en aigua destil·lada abans i després d'usar-lo i no s'ha de tocar amb els dits.
4. El pHmetre s'ha de calibrar amb una solució patró (de pH conegut i pròxim al de la solució que cal analitzar).
5. El pHmetre no es desconnecta mai del corrent elèctric. En canvi, una vegada utilitzat, cal deixar-lo en posició 0 (de no mesura). L'elèctrode sempre ha d'estar submergit en aigua destil·lada, per tal d'evitar que s'asseque.

Ús del colorímetre

Llei de Lambert-Beer. La llum, considerada una ona, consisteix en un camp magnètic i un camp elèctric perpendiculars entre ells, que oscil·len sinusoidalment a mesura que es propaguen a través de l'espai. L'energia de la radiació es relaciona amb la seua longitud d'ona, segons: $E = h\nu = hc/\lambda$, on h és la constant de Planck i ν , la freqüència de la llum, la qual es relaciona directament amb la seua velocitat (c) i, de manera inversa, amb la seua longitud d'ona (λ). Quan una ona de llum es troba amb una molècula, pot ser que la llum siga *dispersada* (i en canvie la direcció) o *absorbida* per la molècula (amb la qual cosa la molècula s'excita i, per a tornar al seu estat fonamental, perd l'energia d'excitació en forma de calor en xocar amb una altra molècula de la solució). El fet que ocorrega una cosa o l'altra depèn de les propietats de la molècula. Fins i tot, una molècula absorbeix llum d'una determinada longitud d'ona i no d'una altra segons certes propietats de la molècula (vibracionals, rotacionals dels enllaços que la constitueixen, distribució espacial dels seus electrons).

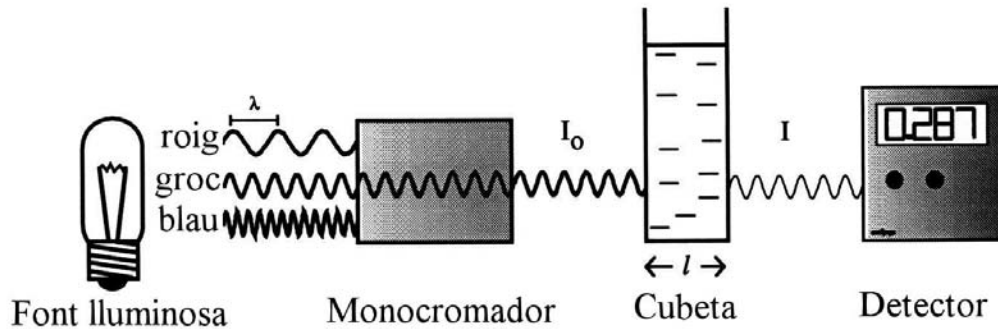
Quan la llum monocromàtica (d'una determinada λ), d'intensitat I_0 , travessa una solució d'una substància en una cubeta transparent, si una part de la llum és absorbida, la intensitat de la llum transmesa (I) és inferior a la inicial (I_0). La relació entre I i I_0 depèn de la longitud del trajecte òptic en el medi (l) i de la concentració molar (c) de la solució que absorbeix la llum. Açò està expressat en la *lleï de Lambert-Beer* de la manera següent:

$$\log (I_0/I) = A = \varepsilon^{1M} c l$$

on A és l'absorbància d'una solució que conté una concentració molar (c) d'una substància que té un coeficient d'extinció molar característic (ε^{1M}) i que es troba en una cubeta on la llum recorre una distància en cm (l). El valor de A no té unitats, tanmateix, les unitats d' ε^{1M} són $M^{-1} \cdot cm^{-1}$.

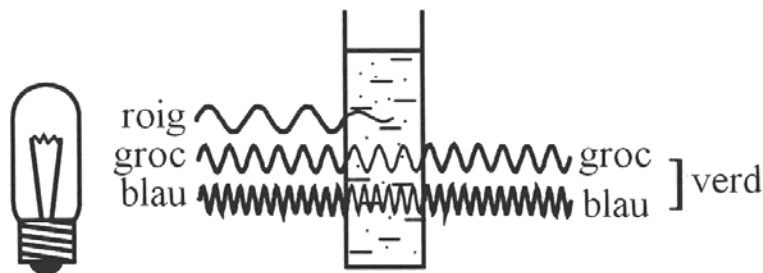
En el cas que no es conega la massa molecular de la substància, s'utilitza el coeficient d'extinció específic ($\epsilon^{0,1\%}$), el qual és l'absorbància d'una solució, mesurada amb un trajecte òptic d'1 cm i una concentració expressada en mg/mL [1 mg/mL = 0,1% (p/v)].

En resum, l'absorbància d'una substància en solució és proporcional a la concentració d'aquesta.



Esquema d'un espectrofotòmetre

La mesura de l'absorbància es realitza en els espectrofotòmetres, aparells que subministren llum de longituds d'ona (λ) des de 200 nm fins a 800 nm. En particular, dels 200 als 400 nm correspon a la zona de la llum ultraviolada (UV) i dels 400 als 800 nm, a la zona de l'espectre visible. Les solucions colorades, de manera natural o per reacció amb determinats reactius, absorbeixen la llum de la zona de l'espectre visible ($400 \text{ nm} < \lambda < 800 \text{ nm}$). El color d'una solució depèn de la λ d'absorció màxima de les molècules presents. En la següent figura es mostra per què les solucions són colorades. En aquest cas, la solució ha absorbit la llum roja mentre que la groga i la blava han estat transmeses; això fa que la solució siga verda. És a dir, les solucions colorades absorbeixen la llum complementària a la transmesa.



En les solucions colorades, les mesures d'absorbància –directament proporcionals a la concentració de la substància que dona color– es realitzen en el colorímetre, que és un espectrofotòmetre que solament permet determinacions a λ de la regió del visible.

PRÀCTICA 1

SOLUCIONS TAMPÓ. PUNT ISOELÈCTRIC DE LES PROTEÏNES

El control del pH a l'interior de les cèl·lules és essencial per a mantenir l'estructura i funcionalitat dels components d'aquestes. En experimentació, és igual d'important el manteniment del pH en les solucions on tenen lloc les reaccions i els processos bioquímics. Hi ha sistemes que resisteixen els canvis de pH després de l'addició o eliminació de protons. Les solucions que contenen aquests sistemes s'anomenen *solucions amortidores de pH* o *solucions tampó*. Les substàncies que actuen com a tampons són àcids febles (protonats, HA) que es troben en la solució en equilibri amb la seua base conjugada (desprotonada, A⁻):



Els OH⁻ afegits a aquesta solució reaccionen amb la forma protonada per formar la base, mentre que els H⁺ addicionats reaccionen amb la forma dissociada per formar l'àcid. Així, gran part dels H⁺ afegits són consumits, no contribueixen al pH i, per tant, aquest no baixa. L'addició d'una base consumeix H⁺, però aquests són reposats per la dissociació de l'àcid i així el pH no puja. Els àcids febles funcionen com a tampons en l'interval de valor de pH que correspon a ± 1 unitat del valor de pKa de cadascun dels seus grups ionitzables.

La capacitat amortidora del pH dels àcids febles es posa de manifest amb les *corbes de valoració* que es construeixen addicionant base forta (per exemple, NaOH) a la solució de l'àcid i seguint simultàniament al pHmetre la variació de pH que es produeix. En una corba de valoració hi ha una regió (al voltant del seu pKa, que s'estén des de pKa-1 fins a pKa+1) en què no hi ha canvis importants de pH, malgrat l'addició de la base forta, la qual és precisament la zona tampó. Aquesta resistència als canvis de pH no s'observa en solucions no amortidores de pH (no tampó).

Les propietats àcid-base de les proteïnes són atribuïbles als grups ionitzables terminals de la cadena polipeptídica, $\alpha\text{-NH}_3^+$ i $\alpha\text{-COO}^-$, i als presents en la cadena lateral d'alguns aminoàcids. Així, la composició d'aminoàcids determina el tipus i nombre de grups ionitzables d'una proteïna. Per tant, el nombre de càrregues positives i negatives d'una proteïna, i en definitiva la seua càrrega neta (suma de càrregues positives i negatives), dependrà del pH del medi.

El *punt isoelèctric (pI)* d'una proteïna és el valor de pH en el qual la seua càrrega neta és zero: el nombre de càrregues positives és igual al nombre de càrregues negatives. Quan el pH < pI, predominen les càrregues positives (forma P⁺), mentre que si el pH > pI, predominen les càrregues negatives (forma P⁻). En general, les proteïnes tenen una solubilitat mínima quan el pH del medi de solució és igual a llur punt isoelèctric. Aquesta propietat s'utilitza per a aïllar i purificar proteïnes per la tècnica de la *precipitació isoelèctrica*: les molècules de proteïna

quan $\text{pH}=\text{pI}$ tenen càrrega neta zero, tendeixen a l'agregació i poden arribar a precipitar de la solució. Ans al contrari, a un $\text{pH} > \text{o} < \text{el seu pI}$, totes les molècules de la proteïna es repel·liran pel fet de tenir la mateixa càrrega neta, negativa, o positiva, respectivament.

Un primer objectiu és preparar i comprovar la capacitat amortidora de pH de dues solucions d'àcid acètic/acetat. Aquest tampó es farà servir al **segon objectiu** on s'analitzarà la variació de la solubilitat de la caseïna de la llet en funció del pH i se'n determinarà el pI . Com a **tercer objectiu** s'obtindrà caseïna de la llet de vaca pel mètode de precipitació isoelèctrica.

Protocol experimental

1. Materials i reactius

- | | |
|--|--------------------------------------|
| —pHmetre | —Microones |
| —Vòrtex | —Gradeta amb 8 tubs d'assaig |
| —Espàtula | —Vasos precipitats [50 (2) i 100 mL] |
| —Mussolina per a filtració | —Embut |
| —Vareta de vidre | —Matrassos d'Erlenmeyer (2) |
| —Provetes (100 mL i 2 de 50 mL) | —Pipetes (1, 2, 5 i 10 mL) |
| —Bureta (50 mL) i suport | —Etanol absolut |
| —Pipetes Pasteur | —Paper de filtre |
| —Acetat sòdic sòlid ($M_r=82,03$) | —Àcid acètic 1 M i 0,1 M |
| —HCl 0,1 M | —Acetat sòdic 1 M i 0,1 M |
| —Llet descremada | |
| —Caseïna (C-7078, Sigma) 0,3 % (p/v) en NaOH 25 mM | |

2. Procediment

2.1. Preparació de tampons àcid acètic/acetat sòdic i comprovació de la capacitat amortidora del pH d'aquests

A partir d'àcid acètic 1 M i acetat sòdic 1 M es prepararan 50 mL dels tampons següents, tenint en compte els resultats dels càlculs que prèviament hem fet:

- àcid acètic/acetat sòdic 0,01 M pH 5,0.
- àcid acètic/acetat sòdic 0,1 M pH 5,0.

Es mesuren els volums d'àcid acètic 1 M i acetat sòdic 1 M amb pipeta i es mesclen en la proveta que s'enrasa amb aigua destil·lada fins a 50 mL.

Es transvasen en vasos de precipitats i es mesura el pH .

Per tal de comprovar la capacitat amortidora del tampons preparats:

Afegiu 2 mL de HCl 0,1 M (0,20 mmol) a les solucions tampó 0,1 M, 0,01 M i a un tercer vas de precipitats amb 50 mL d'aigua destil·lada. Mesureu els pH. Seguidament, afegiu 2 mL més de HCl 0,1 M (0,20 mmol) a les mateixes solucions i tornar a mesurar el pH.

Observeu, anoteu i discutiu els canvis de pH produïts i la major o menor resistència que se'n produeix a la baixada de pH.

2.2. Estudi de la variació de la solubilitat de la caseïna en funció del pH

Determinareu la solubilitat de la caseïna en un interval de pH de 3,7 a 5,7, que inclou el valor del seu punt isoelèctric, on la solubilitat és mínima. A partir d'una solució de caseïna al 0,3% (p/v), es preparen 7 tubs d'assaig d'acord amb la taula següent (quantitats en mL). La mescla de l'àcid acètic i acetat sòdic, en diferents proporcions, origina solucions tampó de distints valors de pH entre 3,8 i 5,7.

Tub	Volum (mL)			pH teòric
	Àcid acètic 0,1 M	Acetat sòdic 0,1 M	Caseïna 0,3 %	
1	9,0	1,0	1,0	3,80
2	7,0	3,0	1,0	4,40
3	6,0	4,0	1,0	4,60
4	5,0	5,0	1,0	4,75
5	4,0	6,0	1,0	4,90
6	3,0	7,0	1,0	5,10
7	1,0	9,0	1,0	5,70

Agiteu bé les mescles al vòrtex.

Observeu els canvis de solubilitat de la proteïna amb el pH de la solució. Estimeu el pI aproximat de la caseïna.

2.3. Obtenció de la caseïna de la llet per precipitació isoelèctrica

La caseïna és una mescla de fosfoproteïnes presents de manera majoritària en la llet de vaca (representen el 80 % del total de proteïnes). Les diferents formes de caseïna de la llet (anomenades α -s1; α -s2; β i κ) difereixen en el punt isoelèctric i es troben en totes elles entre 4,1 i 5,8. Per precipitació isoelèctrica, a pH 4,5-4,7 on es troben els pI de les formes majoritàries (isofomes α -s1 i β), es pot obtenir una gran quantitat de la caseïna continguda en la llet.

En un erlenmeyer de 100 mL diluïu 30 mL de llet descremada amb 30 mL d'aigua destil·lada. La mescla ha d'estar temperada, si no és així, escalfeu-la amb un microones uns segons fins que quede tèbia. S'hi afegeix 0,5 mL d'acetat sòdic 1 M i s'agita amb la mà. Seguidament, s'afegeix 3,4 mL d'àcid acètic 1 M,

moment en el qual la mescla queda tamponada a pH 4,6 aproximadament. S'agita immediatament i es deixa reposar uns 5 min. Es forma un precipitat de proteïna, el qual pot ser recollit filtrant la suspensió a través d'un tros de mussolina sostingut sobre un embut. Amb una espàtula s'arregla sobre un vas de precipitats amb 10 mL d'etanol. Es filtra de nou, però ara sobre paper de filtre. Es deixa assecar a l'aire. La pols resultant és caseïna aïllada i parcialment purificada.

QÜESTIONS PRÀCTICA 1

1. Ordeneu, i justifiqueu-ho, les següents solucions de glucosa (Mr 180) de major a menor concentració:

- (a) glucosa 5 mM;
- (b) glucosa al 5 % (p/v);
- (c) glucosa 5 mg/mL;
- (d) glucosa 5 g/L.

2. Expliqueu com prepararíeu 100 mL de les solucions següents:

- (a) NaCl 2 M (Mr= 58);
- (b) Tris 50 mM, a partir d'una solució Tris 1 M (Tris, Mr= 121);
- (c) HAcO 0,1 M a partir de HAcO 1 M;
- (d) NaOH 0,1 M a partir de sòlid (Mr= 40);
- (e) HCl 0,1 M a partir de HCl 37 % (p/p), densitat= 1,19 kg/L i Mr= 36,46).

3. Descriviu la preparació de 100 mL de solució tampó àcid acètic/acetat sòdic (pKa=4,75) 0,1 M pH 5,0 a partir de:

- (a) àcid acètic 0,5 M i acetat sòdic 0,5 M;
- (b) àcid acètic 0,5 M i NaOH 0,5 M;
- (c) acetat sòdic 0,5 M i HCl 0,5 M;
- (d) àcid acètic glacial (pur, densitat 1,05 kg/L, Mr=60,05) i acetat sòdic sòlid (Mr= 82,03);

Quina d'aquestes solucions resultarà més eficaç per amortir els canvis de pH? Per què?

4. Disposem de dues solucions tampó àcid acètic/acetat sòdic de concentració 0,1 M: la solució A a pH 4,2 i la solució B a pH 5,2. Quina de les dues té més capacitat amortidora de H⁺? Per què? I si hi adicionàrem una base forta, com NaOH, quina de les dues resistiria més la pujada de pH?

5. Si després de la precipitació isoelèctrica de la caseïna partint de 30 mL de llet pesem la quantitat de proteïna recollida i resulta que és de 0,73 g, quin és el rendiment del procediment si sabem que el contingut de caseïna en la llet és de 35 g/L?

PRÀCTICA 2

TÈCNiques DE SEPARACIÓ DE PROTEÏNES: CROMATOGRÀFIA I ELECTROFORESI

La variació de l'estat d'ionització dels grups dissociables de les proteïnes amb el pH fa que la càrrega elèctrica neta de les proteïnes siga funció del pH del medi. D'acord amb les propietats àcid-base de les proteïnes, aquestes es poden separar i/o purificar per *cromatografia de canvi iònic*. La cromatografia de canvi iònic es fonamenta en el fenomen de la interacció iònica. Per açò s'utilitzen columnes que s'omplen amb un suport (gel o resina) que porta units grups aniònics o catiònics. Els ions fixats (o proteïnes) poden ser desplaçats del suport si es canvia el pH o la força iònica de la solució d'elució de la columna. D'altra banda, la *densitat de càrrega* d'una molècula és la relació entre la càrrega elèctrica i la seua massa (q/m). Quan les molècules carregades són sotmeses a un camp elèctric, en un medi electrolític que condueix el corrent, migren cap a l'elèctrode de polaritat oposada. Per tant, una proteïna P, que pot existir, segons la càrrega neta que presente, sota tres formes: P^+ , P^0 i P^- , es desplaçarà sota l'acció d'un camp elèctric cap al càtode (P^+), l'ànode (P^-) o no es desplaçarà si té càrrega global nul·la (P^0). Aquest principi s'utilitza en l'*electroforesi* per separar proteïnes amb càrregues globals diferents.

Tanmateix, la tècnica electroforètica més emprada per analitzar proteïnes utilitza gels de poliàcrilamida en presència del detergent aniònic desnaturalitzant SDS (dodecilsulfat sòdic), *SDS-PAGE*, i les separa en funció de les masses moleculars. La senzillesa i, sobretot, l'extraordinària capacitat de resolució que aconsegueix aquest tipus d'electroforesi, l'ha convertit en una eina ordinària en els laboratoris de bioquímica. Primerament, les proteïnes són tractades amb SDS, el qual en provoca la desnaturalització i l'adquisició d'una gran quantitat de càrrega negativa, tanta que les càrregues pròpies de cada proteïna queden emmascarades. Durant la migració electroforètica dels complexos SDS-proteïna, la xarxa tridimensional de poliàcrilamida actua com un tamís i els separa d'acord amb la grandària d'aquests. Les proteïnes són tant més retardades en el seu moviment com més gran és la seua massa molecular.

L'objectiu és estudiar el comportament, en cromatografia d'intercanvi aniònic i catiònic, i en electroforesi en acetat de cel·lulosa de proteïnes de diferent pI. Es mostrarà també que l'electroforesi en gels SDS-PAGE, separant les proteïnes exclusivament en funció de la seua massa molecular, troba la seua aplicació en la determinació de la massa molecular d'una proteïna.

Protocol experimental

1. Materials i reactius

- Thermoblock*
 - Pipetes (1, 2, 5 i 10 mL)
 - Pipeta automàtica P20
 - Pipetes Pasteur
 - Microcentrifugadora
 - Provetes
 - Vasos de precipitats
 - Gradeta amb tubs d'assaig
- Cromatografia de canvi iònic:
- Columnes de plàstic amb gel o resina de canvi catiónic CM-Sepharose CL-6B (uns 5 mL) equilibrades en tampó acetat sòdic 0,1 M pH 5,5 (tampó d'equilibrat).
 - Solucions tampó de la cromatografia: (1) tampó d'equilibrat: acetat sòdic 0,1 M pH 5,5; (2) tampó d'elució de la proteïna: borat sòdic 0,1 M pH 9 i (3) tampó de regeneració: tampó d'elució que conté 2 M NaCl.
 - Mostra per a la cromatografia: una mescla (v/v) de cromat potàssic 0,1% (p/v) i hemoglobina 5 mg/mL, en tampó d'equilibrat.
- Electroforesi en acetat de cel·lulosa:
- Tires d'acetat de cel·lulosa i metanol 40 % per a conservar-les a 4 °C.
 - Cubeta i font d'alimentació.
 - Tampó d'electroforesi per a acetat de cel·lulosa: Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 (1,5 L)
 - Mostra de la mescla (v/v/v) de proteïnes: hemoglobina, seroalbúmina bovina (BSA) i citocrom *c*, a l'1 % (p/v) en tampó d'electroforesi. Es conserva en congelador a -20 °C.
 - Colorant de proteïnes: A 0,5 g de negre amido dissolts en 50 mL d'etanol, s'hi afegeixen 10 mL d'àcid acètic i 40 mL d'aigua.
 - Decolorant: metanol/àcid acètic/aigua (5/1/4).
- Electroforesi SDS-PAGE:
- Sistema de preparació dels gels d'electroforesi SDS-PAGE.
 - Solvent de mostres 3X SDS: 0,187 M Tris-HCl pH 6,8; 6,0 % SDS, 6 % 2-mercaptoetanol, 25 % (v/v) glicerol i 0,006 % blau de bromofenol.
 - Solucions preparació gels de poliacrilamida:
 - Solució A (*Protogel*): Acrilamida 30 % (p/v), Bis-acrilamida 0,8 % (p/v).
 - Solució B (tampó gel inferior): 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,4 % SDS.
 - Solució C (tampó gel superior): 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,4 % SDS.
 - Solució D: persulfat amònic 10 %.
 - TEMED.
 - Cubeta per a electroforesi SDS-PAGE i font d'alimentació.
 - Tampó d'electroforesi (pH 8,3-8,5): 0,025 M Tris; 0,192 M glicina i 0,1 % SDS. Es pot preparar una solució 10x i conservar-la en nevera.

- Solucions d'hemoglobina, seroalbúmina bovina (BSA) i citocrom *c*, a 0,1 mg/mL en solució de mostres: 62 mM Tris-HCl pH 6,8; 2 % SDS; 2 % 2-mercaptoetanol, 7,5 % (v/v) glicerol i 0,002 % (p/v) blau de bromofenol. Aquestes solucions s'escalfen 5 min a 95°C i es conserven en congelador a -20 °C fins a l'anàlisi electroforètica.
- Mostra de saliva (extracte de proteïnes).
- Colorant de tinció gels de poliacrilamida: 0,1 % (p/v) Blau Coomassie R; 8 % (v/v) àcid acètic i 46 % (v/v) metanol.
- Decolorant de tinció gels de poliacrilamida: 30 % (v/v) metanol i 5 % (v/v) àcid acètic.

2. Procediment

2.1. Cromatografia de canvi iònic aplicada a l'hemoglobina

La cromatografia de canvi iònic pot emprar-se per a separar molècules que presenten càrregues diferents. La mostra de cromatografia, els components de la qual volem separar, està formada per una mescla (v/v) d'hemoglobina 5 mg/mL i d'anió cromat 0,1 % (p/v) dissolts en tampó acetat sòdic 0,1 M pH 5,5 (el tampó d'equilibrat de la columna).

2.1.a. Canvi catiònic

El principi de la separació que es proposa es basa en el fet que l'hemoglobina ($pI=6,8$) en un tampó de pH 5,5 presentarà una càrrega neta (+) i interaccionarà amb la resina canviadora de cations (CM-Sepharose CL-6B) que presenta càrregues negatives a causa dels grups carboxil de la resina. Aquestes interaccions es modifiquen si es varia el medi tamponat, la força iònica d'aquest i/o el pH. En el nostre cas, si utilitzem com a tampó d'elució el borat sòdic 0,1 M pH 9,0, l'hemoglobina s'elueix de la columna ja que en aquest medi la càrrega neta de la molècula és negativa i, per tant, serà repel·lida per les negatives del gel.

Per tal de separar els dos components de la mescla per cromatografia de canvi catiònic drem a terme els passos següents (**atenció**, en cadascun d'aquests passos cal esperar fins que la columna ja no gotege abans de passar al pas següent):

- (1) S'hi aplica 1 mL de la mescla de cromat potàssic (groc) i de l'hemoglobina (roig-marró) deixant que entre lentament en la columna que s'haurà col·locat de manera vertical en un erlenmeyer o en una proveta.
- (2) Per a eluir el cromat que no ha interaccionat amb la resina, es llava la columna amb 5 mL del tampó d'equilibrat (acetat sòdic 0,1 M pH 5,5) i el cromat potàssic que elueix de la columna es recull en un tub d'assaig.

- (3) L'hemoglobina, que ha quedat retinguda per la resina en l'interior de la columna, s'elueix amb 5 mL del tampó de pH 9,0 (borat sòdic 0,1 M pH 9,0) i es recull en un altre tub d'assaig.
- (4) La columna es regenera fent-hi passar 2 o 3 volums de columna (10-15 mL) del tampó d'elució que conté NaCl 2 M.
- (5) Finalment, la columna es llava amb 10-15 mL de tampó d'equilibrat i es conserva a 4 °C.

2.1.b. Canvi aniònic

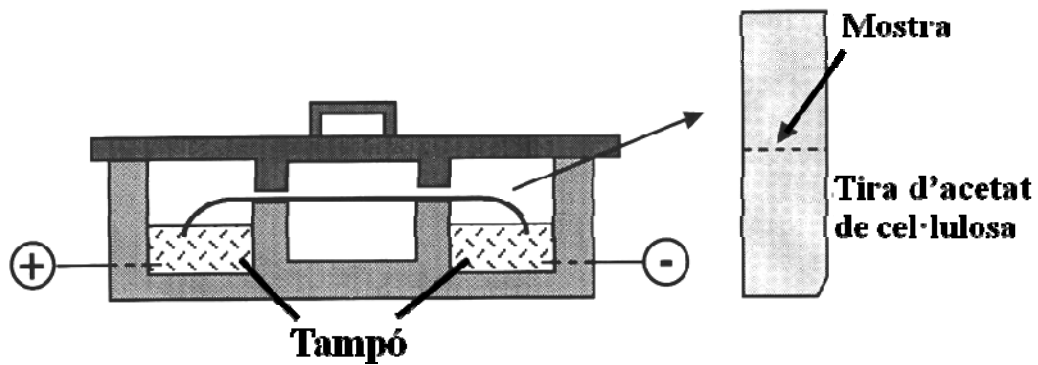
El principi de la separació per cromatografia de canvi aniònic es basa en el fet que la resina canviadora d'anions (DEAE-Sepharose CL-6B) presenta càrregues positives a causa dels grups DEAE (dietilaminoetil) i podrà, per tant, interaccionar amb molècules carregades negativament en el pH en el qual es realitzi la cromatografia, que quedaran retingudes en la columna. Per contra, les molècules que tinguen càrrega positiva no seran retingudes. Per eluir les molècules retingudes caldrà modificar el pH del medi, o variar la força iònica, amb l'objecte de modificar aquesta interacció.

Aquest tipus de cromatografia només es discutirà en el laboratori.

2.2. Separació de proteïnes per electroforesi en funció de la densitat de càrrega

La mobilitat electroforètica d'una molècula es defineix com la migració per unitat de camp elèctric i depèn de la grandària, forma i càrrega de la molècula i de la viscositat del medi. Per a l'electroforesi és indispensable un generador de corrent continu. L'electroforesi es realitza en un suport, que pot ser paper, acetat de cel·lulosa, agarosa o acrilamida. L'acetat de cel·lulosa, que emprarem en aquesta part de la pràctica, és un suport no restrictiu (per les grans dimensions dels seus porus) per la qual cosa la mobilitat electroforètica dependrà de la densitat de càrrega de la molècula (relació q/m).

Les tires d'acetat de cel·lulosa són submergides durant 15-30 min en el tampó d'electroforesi Tris-HCl 50 mM pH 8,5. S'assequen amb paper de filtre i es col·loquen en la cubeta d'electroforesi (vegeu la figura), assegurant-se que els extrems de les tires contacten amb el tampó (1,5 L).



Amb l'ajuda d'una pipeta automàtica, s'apliquen 5 μL de la solució de la mescla de proteïnes (hemoglobina, $M_r=64\,500$ i $pI=6,8$; BSA, $M_r=67\,000$ i $pI=5,0$; i citocrom *c*, $M_r=12\,400$ i $pI=10,5$), al llarg d'una línia en el centre de la tira, sobre la superfície mat. Es connecta la cubeta a una font d'alimentació, a 100 V durant 1 h 15 min.

La visualització de les bandes de proteïna es fa per coloració amb el reactiu negre amido durant uns 10 min i llavats successius en solució decolorant.

2.3. Separació de proteïnes per electroforesi en funció de la massa molecular: SDS-PAGE

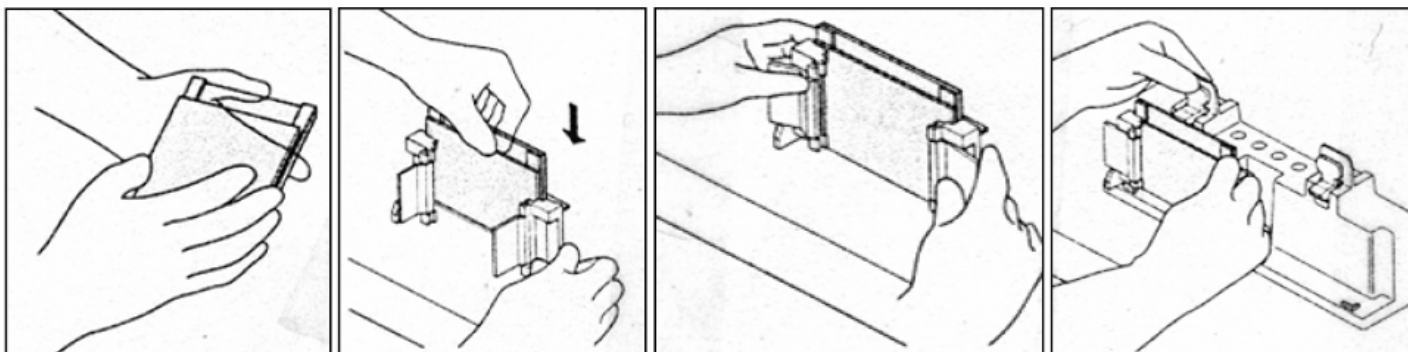
En l'electroforesi en gel de poliacrilamida en presència de SDS (SDS-PAGE) les proteïnes desnaturalitzades amb SDS són sotmeses a un camp elèctric i transportades a través d'un suport restrictiu (medi amb porus xicotets que dificulta el moviment dels complexos SDS-proteïna), la xarxa tridimensional del polímer d'acrilamida. Donat que el SDS iguala la densitat de càrrega de totes les proteïnes, aquestes són separades d'acord amb la massa molecular per l'efecte tamís de la poliacrilamida. La variació del percentatge d'acrilamida permet obtenir gels amb porus de diferents grandàries que poden servir per a separar proteïnes de distints rangs en les masses moleculars. Els gels de poliacrilamida es preparen en el propi laboratori per reacció de polimerització a partir dels monòmers dins d'un motlle apropiat.

La separació de proteïnes patró, de massa molecular coneguda, i de proteïnes problema en una mateixa SDS-PAGE, permet determinar fàcilment la massa molecular d'aquestes últimes.

2.3.1. Preparació del gel de poliacrilamida-SDS

- Netegeu a fons les plaques de vidre i la pinta de plàstic amb etanol i assequeu-les.
- Col·loqueu la placa curta damunt i en un extrem de la placa amb espaiadors per tractar d'ajustar-la.

- Col·loqueu les dues plaques dins del marc de polimerització amb la placa curta cap a fora i assegureu-vos que les dues plaques arriben exactament al nivell inferior del marc.
- Bloqueu amb les pinces de pressió per a segellar les dues plaques de vidre.
- Situeu el marc sobre el suport, encaixeu-lo amb la pinça i assegureu-vos que les plaques de vidre pressionen en la goma del fons del suport.



- Es polimeritzen 2 minigels (volum total 10 mL). Atès que es realitzarà una electroforesi discontinua, cal preparar dues solucions: una corresponent al gel inferior (gel de resolució) amb un 14 % d'acrilamida, i un altra del gel superior (gel concentrador) amb un 4 % d'acrilamida. Els gels es preparen seguint la Taula següent (s'indiquen les quantitats per a 1 minigel).

Gel inferior: 14 % acrilamida	
Solució A	2,40 mL
Solució B	1,25 mL
Aigua	1,30 mL
TEMED	10 μ L
pers. am. 10% (D)	40 μ L

Gel superior 4 % acrilamida	
Solució A	200 μ L
Solució C	375 μ L
Aigua	900 μ L
TEMED	8 μ L
pers. am. 10% (D)	20 μ L

Nota: Totes les solucions (la composició de les quals s'ha detallat en l'apartat de solucions) es donen ja preparades. La solució D (persulfat amònic) s'hi afegeix immediatament abans de vessar la mescla entre les plaques. En primer lloc, es prepara la solució del 14 %, es vessa i es cobreix amb isopropanol o butanol per millorar la polimerització. Després que aquesta haja gelificat, s'elimina l'alcohol, es llava amb aigua la superfície del gel i es vessa la solució del 4 %. Immediatament després, es col·loca la pinta i es deixa gelificar. Aquests gels convé preparar-los almenys un dia abans d'utilitzar-los i es poden conservar sense traure'ls la pinta fins a dues setmanes en nevera i ben embolicats.

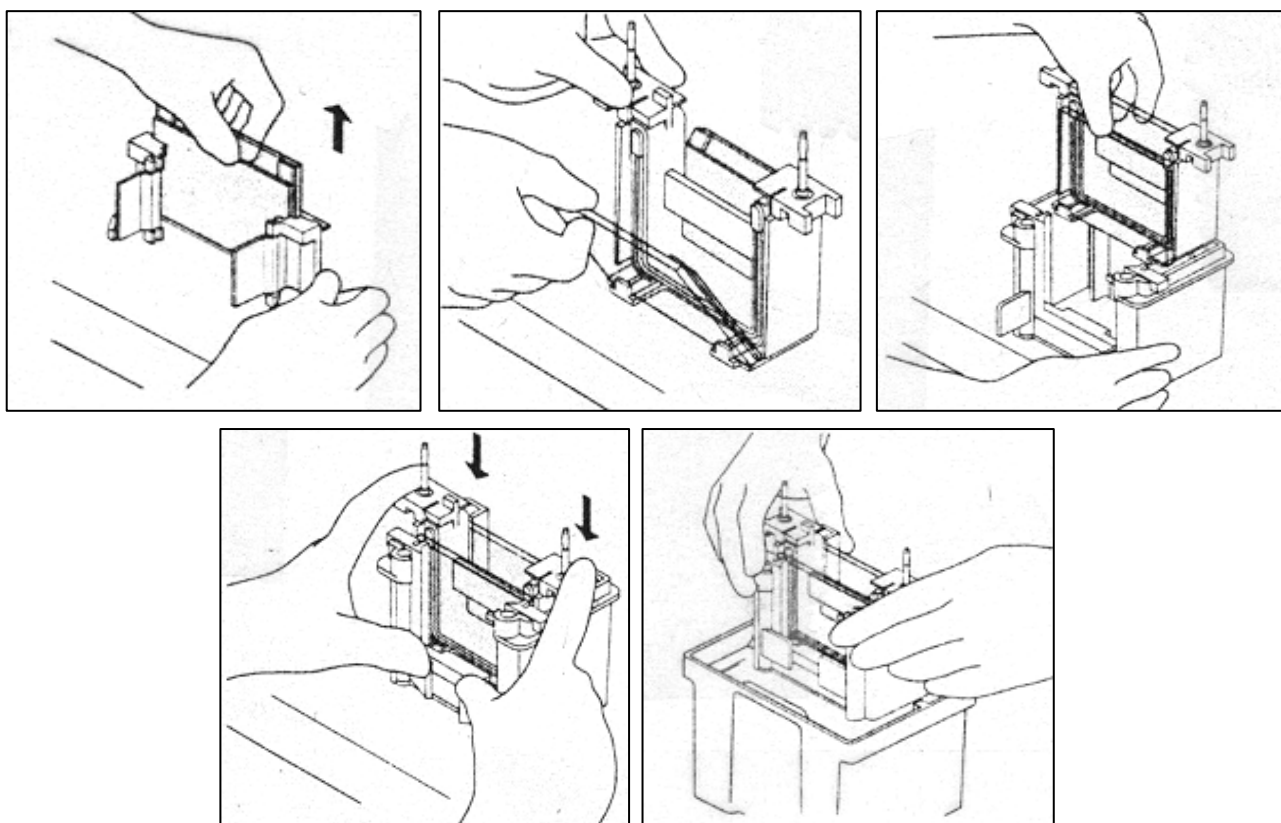
- Feu un senyal amb un retolador a uns 5,5 cm de la vora inferior.
- Aboqueu entre les plaques de vidre la mescla corresponent al gel inferior (14 % acrilamida) fins a arribar al senyal. Cobriu posteriorment, amb ajuda d'una

microxeringa, amb butanol cuidant d'evitar la distorsió de la línia superficial. Deixeu gelificar (30-45 min aprox.).

- Elimineu el butanol per decantació i renteu diverses vegades amb aigua. Aboqueu la solució de gel superior (4 % acrilamida) i col·loqueu la pinta cuidant que no es formen bombolles d'aire entre la pinta i el gel. Les dents de la pinta han de trobar-se a una distància d'aproximadament 0,5 cm de la part superior del gel inferior. Seguiu abocant fins que la mescla arribi a la vora superior de la placa. Deixeu gelificar.

2.3.2. Preparació de la placa per a l'electroforesi

- Tragueu les plaques del suport. Lleveu curosament la pinta procurant no trencar els pouets. Dibuixeu els pouets amb un retolador i numereu-los.
- Col·loqueu la placa amb el gel en el suport d'electroforesi, amb la placa curta cap a l'interior, i col·loqueu el conjunt dins de la cubeta d'electroforesi.
- Afegiu el tampó d'electroforesi als recipients exterior i interior cuidant que el tampó estiga en contacte amb el gel.



- Dipositeu en els pouets els volums de les mostres i patrons amb una pipeta automàtica.
- Mostres:

* Patró de proteïnes: *LMW SDS Marker kit* ref. 17-0446-01, *GE Healthcare*. Utilitzarem una mescla comercial de proteïnes de massa molecular coneguda (vegeu Taula): 2,5 μ L.

Proteïna	Mr
Fosforilasa <i>b</i>	97 000
Albúmina de sèrum boví	66 000
Ovoalbúmina	45 000
Anhidrasa carbònica	30 000
Inhibidor de tripsina	20 100
α -lactoalbúmina	14 400

- * Patró multicolor *broad range* SM1841 Fermentas (kDa: 260, 135, 95, 72, 52, 42, 34, 26, 17 i 10): 3 μ L
- * Hemoglobina (0,1 mg/mL solvent de mostres 1X): 5 μ L
- * BSA (0,1 mg/mL solvent de mostres 1X): 5 μ L
- * Citocrom *c* (0,1 mg/mL solvent de mostres 1X): 5 μ L
- * Extracte de saliva, mostra preparada mesclant 50 μ L de saliva d'un estudiant voluntari amb 25 μ L de solució 3X SDS, escalfada 5 min a 95 °C i refredada: 10 μ L.

2.3.3. Electroforesi i tinció de les proteïnes

- Connecteu l'elèctrode positiu (roig) a la font de corrent continu i al born inferior de la cubeta, i el negatiu, al born superior. Seleccioneu un voltatge constant de 120 V.
- Desconnecteu la font quan el marcador del solvent de mostres (blau de bromofenol) arribe al final del gel.
- Traieu el gel de les plaques de vidre i submergiu-lo en la solució colorant durant almenys 30 min (alternativament, uns segons en microones).
- Decoloreu el gel amb successius llavats de decolorant i transferiu-lo finalment a aigua destil·lada. Finalment, escanegeu el gel i imprimeu la imatge.

2.3.4. Determinació de la massa molecular de les proteïnes problema

Representeu el log Mr de les proteïnes patró enfront de la distància recorreguda en el gel. Interpoleu la distància de cada proteïna problema (hemoglobina, BSA, citocrom *c*) i d'aquelles que s'observen en la mostra de saliva sobre la recta patró i calculeu-ne les Mr.

Discutiueu els resultats obtinguts tenint en compte els coneixements previs sobre les grandàries de les proteïnes problema i sobre les estructures quaternàries.

QÜESTIONS PRÀCTICA 2

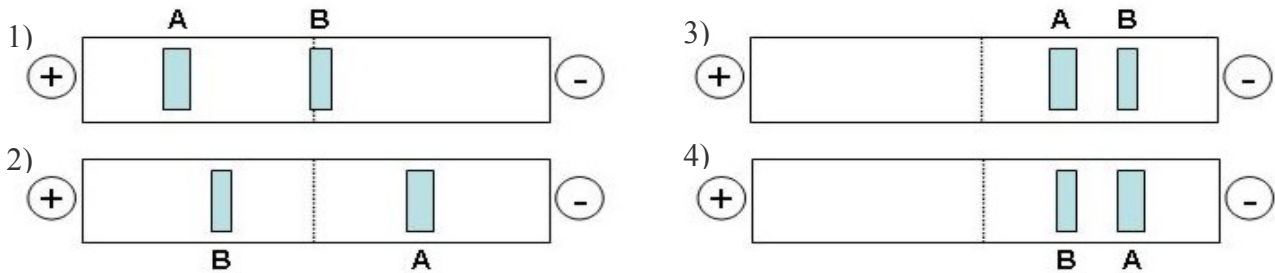
1. Expliqueu per a què es fan servir els següents reactius, instruments i/o tècniques:

- (a) Electroforesi en acetat de cel·lulosa
- (b) Negre amido
- (c) Cromatografia de canvi catiònic
- (d) SDS
- (e) Blau Coomassie

2. Es disposa d'una solució de dues proteïnes A i B, algunes característiques de les quals es recullen en la Taula següent:

	Mr	pI
Proteïna A	14 000	6,0
Proteïna B	60 000	8,5

Si aquesta mescla de proteïnes s'aplica al centre de la tira d'acetat de cel·lulosa, sobre la línia discontinua, i se sotmet a una electroforesi a pH 4,0, quin dels resultats següents seria possible? Justifiqueu-ho.



3. Contesteu vertader o fals i raoneu breument la resposta:

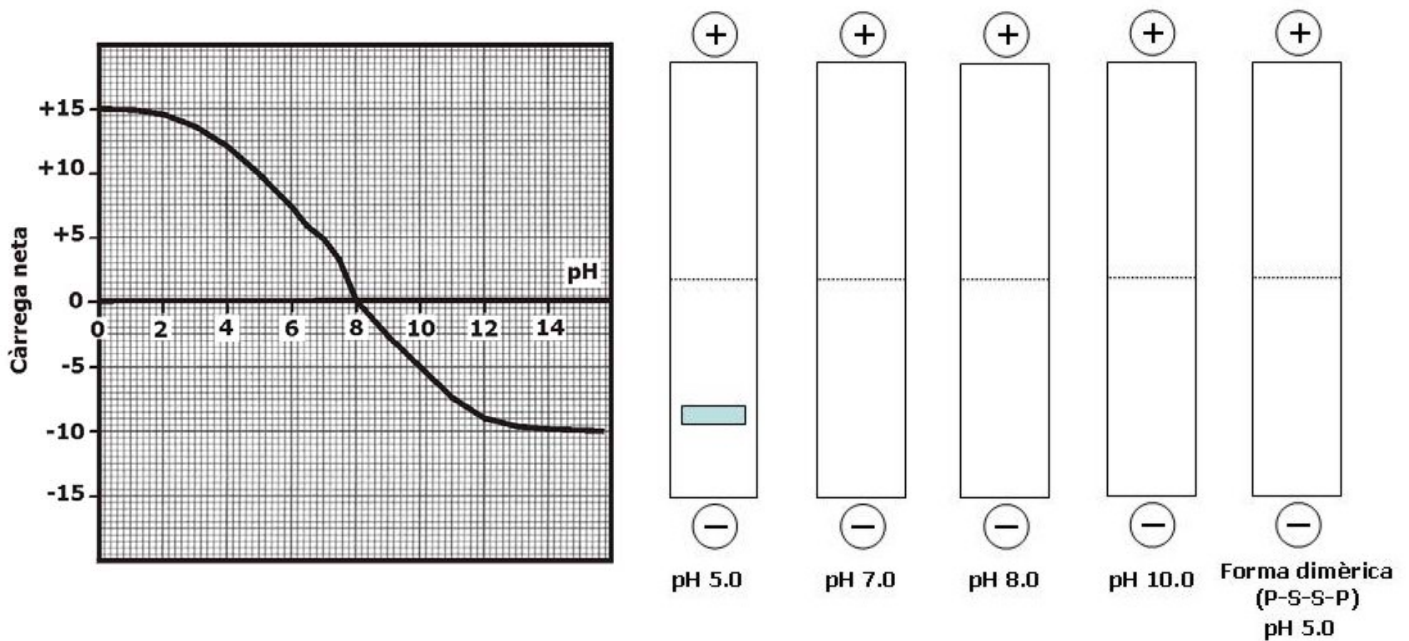
- (a) En una cromatografia de canvi catiònic a pH 4,0 una proteïna amb pI 6,0 queda retinguda.
- (b) Per tal de mesurar el volum exacte (100 mL) d'una solució cal utilitzar un vas de precipitats perquè s'agita més fàcilment.
- (c) En una electroforesi en un suport no restrictiu, com més petita siga la massa d'una proteïna major en serà la mobilitat electroforètica.
- (d) En SDS-PAGE, l'hemoglobina genera 4 bandes.
- (e) En electroforesi en gel de poliacrilamida en presència de SDS, les proteïnes més grans es desplacen més.

4. Feu un esquema del resultat d'una anàlisi electroforètica en acetat de cel·lulosa (pH 7,0) de les proteïnes següents. Comenteu-ho breument.

	Mr	pI
Proteïna A	60 000	7,0
Proteïna B	20 000	8,0
Proteïna C	60 000	5,0

5. La càrrega neta d'una proteïna depèn de la composició d'aminoàcids i del pH del medi. En la figura es mostra la variació de la càrrega neta d'una proteïna A (Mr 20 000, pI 8,0) en funció del pH.

- (a) Quan s'analitza la proteïna A en electroforesi en acetat de cel·lulosa a pH 5,0 (100 V, 1 hora), s'obté el resultat mostrat més avall. Dibuixeu el resultat que obtindríeu en diverses electroforesis de la proteïna a pH 7,0, 8,0 i 10,0 (mantenint invariables el voltatge i el temps). Justifiqueu els resultats.
- (b) La proteïna té una Cys i en condicions oxidants pot participar en un pont disulfur (-S-S-) amb una Cys d'un altra molècula de proteïna i originar dímers: A-S-S-A (Mr 40 000, pI 8,0). Si analitzàrem en electroforesi en acetat de cel·lulosa a pH 5,0 (100 V, 1 hora) la proteïna dimeritzada, quin resultat caldria esperar? Expliqueu-ho.
- (c) Quin estat de la proteïna presentaria més migració electroforètica: la proteïna completament protonada (a pH molt baix) o la proteïna completament desprotonada (a pH elevat)? Raoneu la resposta.



6. Feu un esquema del resultat d'una electroforesi sobre acetat de cel·lulosa i en SDS-PAGE d'una proteïna de pI àcid i constituïda per dues cadenes polipeptídiques (de massa molecular 21 000 i 36 000 Da). Obteniu la mateixa informació dels dos tipus d'electroforesi? Hi ha diferències, quant al nombre de bandes detectades, entre els dos tipus d'electroforesi? A què es pot atribuir aquesta possible diferència?

PRÀCTICA 3

ESTUDI DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA FOSFATASA-ALCALINA

Els enzims són catalitzadors específics i potents que fan possible la coexistència d'un elevat nombre de reaccions químiques dins la cèl·lula. En la majoria dels casos, són de naturalesa proteica, però també se'n coneixen que són RNA. El mecanisme de cinètica enzimàtica més simple és el representat per l'equació de Michaelis-Menten, que explica el fenomen de saturació.

Les fosfatases-alcaldines (PA) són enzims (ortofosfòric-monoèster-hidrolases), àmpliament distribuïts en organismes procariotes i eucariotes, responsables d'eliminar grups fosfat d'una varietat de molècules com nucleòtids, proteïnes i alcaloides. En teixits animals, es localitzen en la membrana i són particularment abundants en ossos, fetge, placenta, intestins i ronyó; l'augment o disminució de PA en plasma sanguini té significat clínic. La PA d'*Escherichia coli* és un metal·loenzim dimèric (M_r del monòmer 94 000) amb 2 àtoms de Zn i 1 de Mg per monòmer. S'ha determinat l'estructura tridimensional de l'enzim i se sap que el residu de Ser que es fosforila reversiblement i transitòriament durant la catàlisi es localitza prop dels llocs d'unió dels metalls, en una butxaca on cap el fosfat inorgànic, el qual pot actuar com a inhibidor de la reacció. L'enzim actiu es localitza en l'espai periplàsmic i catalitza la hidròlisi inespecífica d'èsters de l'àcid fosfòric, substàncies que normalment són incapaces de travessar la membrana plasmàtica. La síntesi de l'enzim augmenta quan les cèl·lules creixen en medis deficientes en fosfat, la qual cosa explica la funció de l'enzim per subministrar fosfat inorgànic al bacteri.

L'acció de la fosfatasa-alcaldina sobre un substrat artificial incolor com és el fosfat de *p*-nitrofenil origina fosfat inorgànic (P_i) i un producte de color groc que absorbeix llum visible de 400 nm i amb un coeficient d'extinció molar (ϵ) de $1,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Ací farem ús de la colorimetria, una tècnica espectroscòpica, per tal de realitzar les anàlisis cinètiques d'un enzim.

L'objectiu és l'obtenció dels valors de velocitats inicials de reacció catalitzada per la fosfatasa-alcaldina d'*E. coli* en absència i en presència de fosfat inorgànic, un inhibidor de l'enzim. A partir de la representació gràfica dels dobles inversos (Lineweaver-Burk) es determinaran els paràmetres cinètics (constant de Michaelis, K_m , i V). També es calcularà el valor de la constant de dissociació de l'inhibidor (K_i).

Protocol experimental

1. Materials i reactius

- Colorímetre
- Cubetes de plàstic d'1 mL (10 per parella)
- Pipetes Pasteur de plàstic
- Pipetes automàtiques : P200 i P1000
- Inhibidor: Fosfat sòdic 3 mM (0,5 mL per parella)
- Tampó del medi de reacció: Tris-HCl 2 M pH 8,0
- Substrat 1 mM: Fosfat disòdic de *p*-nitrofenil (Sigma 104-0) conservat a -20 °C. Es dissol 11,1 mg en 30 mL de aigua poc abans d'utilitzar-lo (3 mL per parella).
- Enzim fosfatasa-alcalina (Sigma P 4377, 100 U). Es mesclen 230 µL d'enzim amb 35 mL de tampó 10 mM Tris pH 8,0 (2 mL per parella).

2. Procediment

Per a les anàlisis cinètiques en absència i en presència de l'inhibidor es procedirà preparant directament a les cubetes les mescles de reacció i afegint en l'ordre que s'indica en la Taula 1 i Taula 2, respectivament, la quantitat (mL) dels components de la mescla.

Les cinètiques es realitzaran **per separat** de cadascuna de les mescles de reacció de la mateixa manera i començant per la mescla 1. Després d'afegir la quantitat de substrat que pertoca, es mesclen tots amb la pipeta Pasteur i es col·loca al colorímetre per tal d'ajustar a 0 el valor de A_{400} . Es trau la cubeta, s'afegeix l'enzim, es mescla bé, es col·loca al colorímetre i es pren nota dels valors de A_{400} als 20, 40, 60 i 80 s després d'haver afegit l'enzim (temps 0). Noteu que aquesta cinètica es realitza a diferents concentracions de substrat, sense que varïe la quantitat d'enzim. A partir del valor del pendent $\Delta A_{400}/\text{min}$ per a cadascuna de les concentracions de substrat, es calculen les v_0 emprant l'equació de Lambert-Beer i ϵ .

2.1. Cinètica de la fosfatasa-alcalina en absència d'inhibidor

Es prepararan les mescles de reacció que s'indiquen en la Taula 1 i es procedirà com s'ha indicat anteriorment.

Taula 1 (Volums en mL)

Cubeta	1	2	3	4	5
Tampó Tris 2 M pH 8	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
Aigua	0,58	0,54	0,50	0,35	0,05
Substrat 1 mM	0,07	0,11	0,15	0,30	0,60

A cadascuna de les mescles de reacció se li afegeixen 0,15 mL de la solució d'enzim.

Una vegada acabat l'experiment, calculeu les velocitats inicials de reacció ($v_0 = \Delta[P]/s$) de cadascuna de les mescles i representeu, en paper mil·limetrat, els valors inversos de v_0 (en l'eix d'ordenades) enfront dels inversos de la concentració de substrat (en abscisses) i calculeu els valors dels paràmetres cinètics K_m i V .

2.2. Cinètica de la fosfatasa-alcalina en presència d'inhibidor

Es prepararan les mescles de reacció que s'indiquen en la Taula 2 i es procedirà s'ha indicat anteriorment.

Taula 2 (Volums en mL)

Cubeta	1	2	3	4	5
Tampó Tris 2 M pH 8	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65
Aigua	0,58	0,54	0,50	0,35	0,05
Inhibidor (fosfat sòdic 3 mM)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Substrat 1 mM	0,07	0,11	0,15	0,30	0,60

A cadascuna de les mescles de reacció se li afegixen 0,15 mL de la solució d'enzim.

Una vegada acabat l'experiment, calculeu les velocitats inicials de reacció ($v_0 = \Delta[P]/s$) de cadascuna de les mescles i representeu els valors sobre la mateixa gràfica que deriva de les anàlisis cinètiques en absència d'inhibidor. Calculeu els paràmetres cinètics de la reacció inhibida i la constant de dissociació de l'inhibidor.

QÜESTIONS PRÀCTICA 3

1. Expliqueu per a què es fan servir els següents reactius, instruments i/o paràmetres:

- (a) Colorímetre;
- (b) Tampó;
- (c) Fosfat de *p*-nitrofenil;
- (d) Coeficient d'extinció molar.

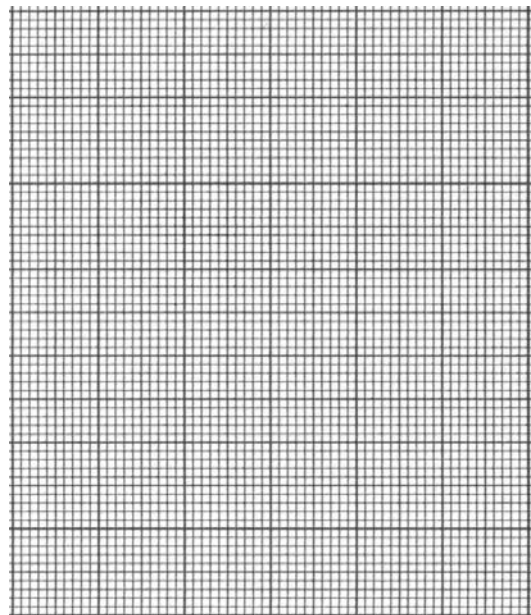
2. Contesteu vertader o fals i raoneu breument la resposta: “El pendent de la gràfica en la qual es representa la velocitat inicial de reacció (v_0 , M/s) en funció de la quantitat de substrat (M) ens permet determinar la constant de Michaelis”.

3. Considereu la reacció enzimàtica $A \rightarrow B$, on A és un substrat de color groc amb un màxim d'absorció a 420 nm i B és un producte de color verd amb un màxim d'absorció a 560 nm.

- (a) Proposeu dos mètodes per determinar la velocitat de reacció enzimàtica a una concentració fixa d'enzim i a concentració saturant de substrat.
 (b) Com faríeu per expressar la velocitat en mol de B formats $\cdot L^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$?

4. Per a determinar la velocitat inicial d'una reacció enzimàtica $S \rightarrow P$ s'ha mesurat la variació de l'absorbància a 530 nm (màxim d'absorbància de S) en funció del temps, i s'han obtingut els resultats que es mostren en la taula següent. Amb les dades de la taula, i sabent que el ϵ^{1M} del substrat de la reacció és $10\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, feu-ne la representació gràfica corresponent i calculeu la velocitat inicial de la reacció.

t (min)	A_{530}
1	1,00
2	0,70
3	0,42
4	0,34
5	0,15



PRÀCTICA 4

OBTENCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE DNA

Els àcids nucleics són macromolècules portadores d'informació dels sistemes vius. Hi ha dues classes principals d'àcids nucleics: àcid ribonucleic (RNA) i àcid desoxiribonucleic (DNA). Ambdós són polímers de nucleòtids, els quals són èsters fosfat de nucleòsids. Les bases nitrogenades que es troben en els àcids nucleics són purines substituïdes (adenina i guanina) i pirimidines (citosina i uracil, en el RNA, i citosina i timina en el DNA). Els residus de nucleòtids estan connectats els uns als altres en una cadena polinucleotídica per enllaços 3'-5' fosfodièsters. Les molècules de DNA són extremadament grans, i la seua grandària sol expressar-se mitjançant el nombre de parells de bases que conté (pb, o kpb).

El DNA és polianiónic, ja que cadascun dels enllaços fosfodièster porta una càrrega negativa en condicions fisiològiques, i presenta una densitat de càrrega (relació q/m) constant, per la qual cosa per a ser analitzades en electroforesi cal emprar un suport restrictiu, com l'agarosa, que en permet la separació en funció de la grandària.

La majoria del DNA d'una cèl·lula eucariota es troba en forma lineal i empaquetat al nucli, i forma complexos amb proteïnes catióniques denominades histones. Aquest complex nucleoproteic s'anomena cromatina.

Els bacteris, a més del DNA cromosòmic circular, contenen molècules de DNA circulars de menor grandària, anomenades plasmidis, que en condicions natives es troben empaquetades per superenrotllament negatiu. Aquests plasmidis poden aïllar-se del bacteri i manipular-se en el tub d'assaig mitjançant tècniques de biologia molecular i enginyeria genètica. Per exemple, els enllaços fosfodièster del DNA poden ser hidrolitzats enzimàticament amb endonucleases de restricció que catalitzen el trencament del DNA de doble cadena en llocs palindròmics de reconeixement altament específics, fragmenten el plasmidi i originen un o més fragments lineals (segons talle en un o més llocs en la seua seqüència).

L'objectiu és l'obtenció i visualització de fibres de DNA de tim de vedella i de DNA plasmídic d'*Escherichia coli*, així com l'observació dels patrons de migració electroforètica de DNA de diferents conformacions i l'estimació de la grandària i concentració de DNA en gel d'agarosa.

Protocol experimental

1. Materials i reactius

- Vòrtex
- Tim de vedella
- Homogeneïtzador Osterizer
- Agitador magnètic
- Tubs de vidre de centrifugadora
- Pipetes de vidre (1, 2, 5 i 10 mL)
- Pipeta automàtica de 200 i 20 μ L
- Erlenmeyer de 100 (8) i 250 ml
- Centrifugadora de taula i microcentrifugadora
- Cubeta i accessoris d'electroforesi de DNA
- Font d'alimentació de corrent
- NaCl 10 % (p/v)
- Etanol 96 % fred (-20 °C)
- SDS 10 % (p/v) en etanol 50 % (v/v)
- Cloroform: alcohol isoamílic (3:1)
- Agarosa (Tipus I, A-6013, Sigma)
- Cultiu d'*E. coli* en LB+Ampicil·lina. Cèl·lules conservades a -20 °C
- Tampó lisi: 10 mM Tris·HCl pH 8,0; 1 mM EDTA, 15 % (p/v) sacarosa, 2 mg/mL liozima, 0,2 mg/mL RNasa i 0,1 mg/mL BSA. Conservat a -20 °C.
- Tampó d'homogeneïtzació: Tris-HCl 0,01 M pH 7,5
- Tampó d'electroforesi de DNA: 0,5X TBE (TBE: 45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA. Per a 1 L de 5X TBE pH 8,3: 54 g Tris + 27,5 g àcid bòric + 20 mL 0,5 M EDTA)
- Mostres d'electroforesi:
Solucions de DNA plasmídic natiu i lineal (fragmentat amb endonucleases de restricció), de DNA del fag λ i d'unes mesclades de DNA de grandàries diferents (DNA patró: *GeneRuler 1kb plus DNA ladder* -4 000, 3 000; 2 500; 2 000; 1 500; 1 000; 750; 500; i 250 pb- *SM1334, Fermentas* i fag λ HindIII - 23 130; 9 416; 6 557; 4 361; 2 322; 2 027; i 564 pb-) preparades en solvent de mostres d'electroforesi.
- Solvent de mostres de DNA (6X): 0,25 % (p/v) blau de bromofenol, 0,25 % (p/v) xilencianol i 30 % (v/v) glicerol en tampó Tris-HCl 60 mM, EDTA 6 mM, pH 7,5; i solvent 2X
- Microones
- Tubs d'Eppendorf
- Varetes de vidre
- Agitador de tubs
- Thermoblock*

2. Procediment

2.1. *Obtenció del DNA*

2.1.a. *Obtenció del DNA cromosòmic de tim de vedella*

En un primer pas es procedeix al trencament de les estructures cel·lulars, seguidament es dissocien els complexos nucleoproteics utilitzant una solució concentrada de NaCl, un detergent i solvents orgànics i, a l'últim, es purifica el DNA per precipitació.

S'homogeneïtzen (**atenció** a les condicions: 5-10 min en posició *Blend* de l'aparell; o bé, al núm. 1 durant uns 5 min) 12 g de tim de vedella trossejat en 150 mL de tampó Tris 0,01 M pH 7,5. Es transvasa en un erlenmeyer de 250 mL i s'agita durant 5 min. S'hi afegeix 17 mL de SDS al 10 % en etanol per tal d'obtenir una concentració final 1 %. S'agita suaument durant 5-10 min. A cadascun dels grups se'ls dona 10 mL de la mescla per continuar l'extracció. A cada alíquota de 10 mL s'afegeix, en un erlenmeyer de 100 mL, 1 volum (10 mL) de cloroform:alcohol isoamílic (3:1, v:v). Ben tapat l'erlenmeyer, s'agita amb la mà enèrgicament durant 10-15 min fins a obtenir una mescla homogènia. Es centrifuga en un tub a unes 4 000 rpm durant 10 min. La fase aquosa superior opalescent es transvasa en un erlenmeyer de 100 mL. S'hi afegeixen 20 mL de NaCl 10 % i es mescla. S'hi afegeix 1 volum (uns 25 mL) d'etanol fred i s'enrotllen les fibres del DNA sobre una vareta de vidre.

2.1.b. *Obtenció del DNA plasmídic d'Escherichia coli*

S'utilitza un mètode ràpid d'extracció que consisteix, en un primer pas, en el trencament de les estructures cel·lulars i la degradació del RNA i després en la desnaturalització de les diferents macromolècules. Tot açò permet separar el DNA plasmídic per centrifugació. Amb aquest procediment s'obté, en molt poc de temps, DNA plasmídic parcialment purificat, el qual pot ser analitzat mitjançant electroforesi en gel d'agarosa i fins i tot digerit amb endonucleases de restricció.

En un tub d'Eppendorf s'ha preparat un cultiu de la soca d'*E. coli* que conté el plasmidi Bluescript (pBS) de 3,0 kpb, inoculant una colònia en 1,5 mL de medi LB+Ampicil·lina i incubant-lo a 37 °C durant 16 h. El cultiu obtingut se centrifuga a 5 000 rpm durant 5 min, a temperatura ambient, en una microcentrifugadora. Se n'elimina el sobrenadant per decantació i el sediment cel·lular es resuspèn en 50 µL de tampó de lisi. S'agita breument en un vòrtex i s'incuba a 95 °C durant 1 min. Després d'una incubació en gel durant 1 min, se centrifuga 20 min a la màxima velocitat en una microcentrifugadora i a temperatura ambient. El sobrenadant, sense arrastrar el sediment, es transvasa a un altre tub d'Eppendorf.

Per analitzar el DNA obtingut es realitza una electroforesi en gel d'agarosa (apartat 2.2). 5 μL de sobrenadant diluïts amb 5 μL de solvent de mostres (2X) s'apliquen al gel d'agarosa.

2.2. Electroforesi de DNA en gel d'agarosa

L'agarosa és un polímer lineal que s'extrau d'algues i està constituït per la unitat disacàridica bàsica: D-galactosa-3,6-anhidro-L-galactosa. Els gels d'agarosa s'utilitzen com a suports restrictius d'electroforesi per als àcids nucleics, a causa de la seua elevada porositat. Quan un camp elèctric s'aplica a través d'un gel d'agarosa, el DNA que està carregat negativament a pH neutre, i que té una relació q/m constant, es desplaça cap a l'ànode a una velocitat que depèn de diferents paràmetres: la grandària (nombre de parells de bases) i conformació del DNA (superenrotllat, circular, lineal), la concentració d'agarosa, la composició del tampó, el voltatge aplicat, etc.

Es fon l'agarosa, preparada al 0,8 % (p/v) en el tampó d'electroforesi (0,5X TBE). Es preparen 75 mL per a tot el grup. Refredada a uns 60 °C, s'hi afegeix bromur d'etidi a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ i s'aboca en el suport on es formarà el gel. Sobre aquest suport s'haurà col·locat prèviament un motlle per tal que s'hi formen els pouets on s'apliquen les mostres de DNA. El gel preparat se submergeix en la cubeta, de manera que estiga completament cobert pel tampó (vegeu la figura següent).

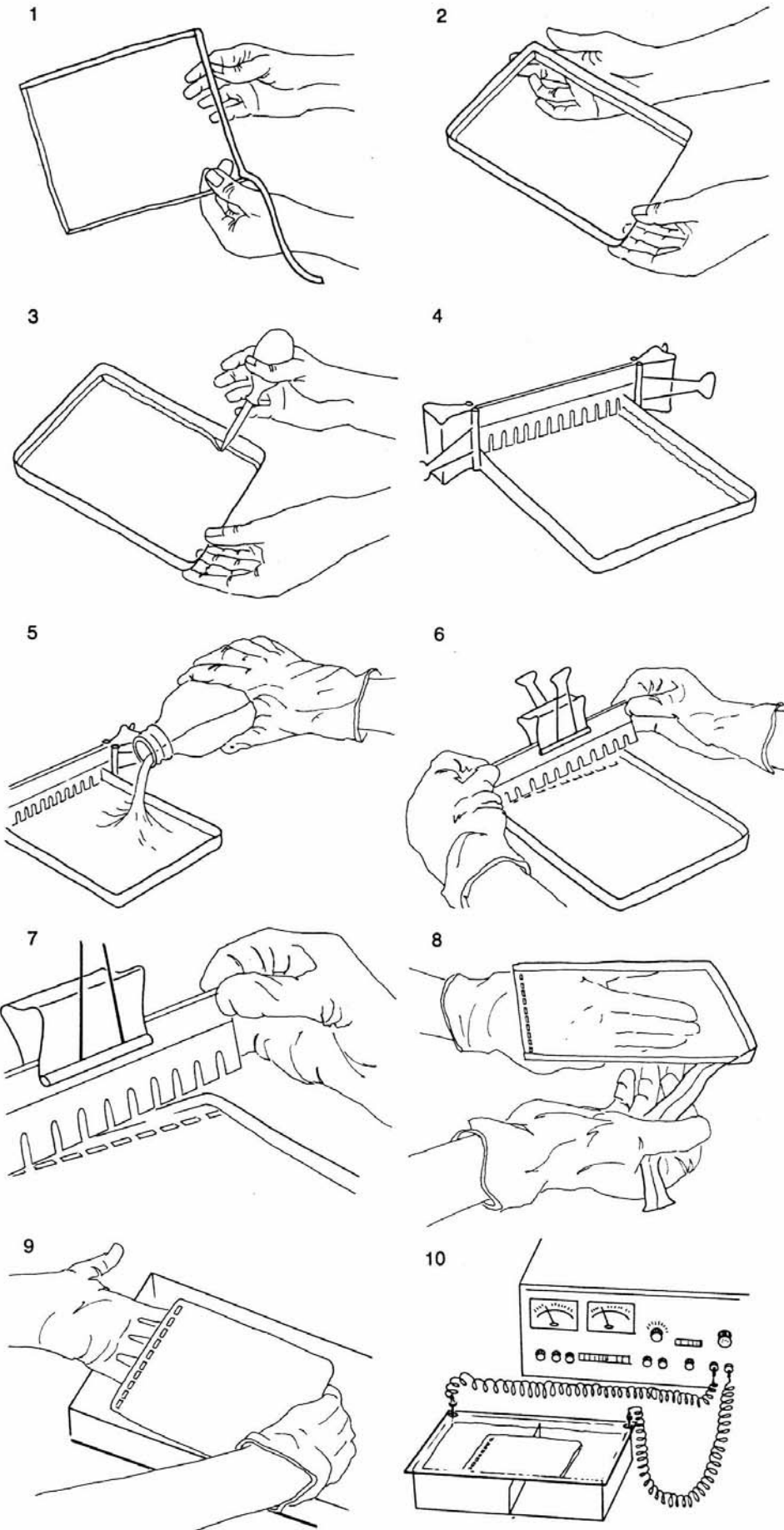
S'hi apliquen les mostres de DNA següents:

- DNA plasmídic natiu (superenrotllat i, en menor proporció, circular relaxat)
- DNA plasmídic lineal (digerit amb un enzim que talla en un únic lloc)
- DNA plasmídic fragmentat (digerit amb un enzim que talla en dos llocs)
- Patró de grandàries (*1kb plus SM1334, Fermentas i fag λ HindIII*)
- Diferents quantitats de DNA del fag λ
- Una mostra de cadascun dels DNA plasmídics obtinguts durant la sessió

Es connecta la cubeta a la font d'alimentació, a uns 5 V/cm durant 1 h 30 min, a uns 100 V fins que el colorant estiga a un dit i mig de l'extrem inferior. Es fa una foto del gel col·locat sobre un transil·luminador de llum ultraviolada (UV), per tal d'observar la fluorescència deguda a la intercalació del bromur d'etidi entre les bases nitrogenades del DNA.

Justifiqueu la mobilitat electroforètica de cadascuna de les formes de DNA plasmídic analitzades (superenrotllada, circular i lineal). Estimeu la grandària del plasmidi i de cadascun dels fragments obtinguts per digestió amb les endonucleases de restricció, comparant amb la mobilitat del patró de grandàries moleculars. Estimeu la quantitat de DNA plasmídic, comparant amb les diferents quantitats de DNA fàgic.

Preparació d'un gel d'agarosa



QÜESTIONS PRÀCTICA 4

1. Expliqueu com preparàrieu 100 mL de les solucions següents:

- (a) Cloroform:alcohol isoamílic 3:1 (v:v);
- (b) SDS al 10 % (p/v) en etanol al 50 % (v/v).

2. Expliqueu per a què es fan servir els següents reactius, instruments i/o tècniques:

- (a) Gel d'agarosa
- (b) Bromur d'etidi
- (c) Bombeta de llum UV
- (d) Etanol
- (e) Font d'electroforesi
- (g) Homogeneïtzador Osterizer

3. Contesteu vertader o fals i raoneu breument la resposta:

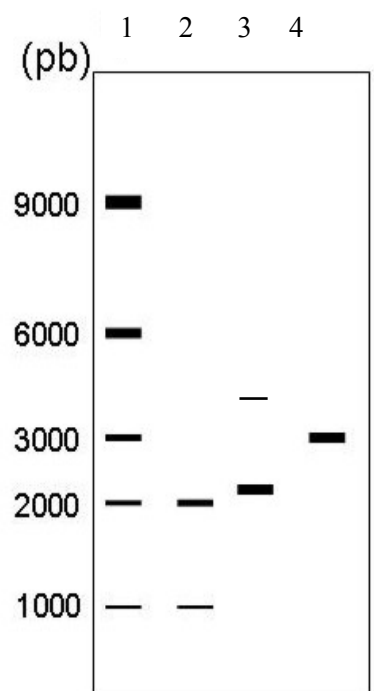
- (a) El bromur d'etidi s'empra per acolorir proteïnes en electroforesi perquè s'intercala entre els aminoàcids.
- (b) El plasmidi superenrotllat, per ser més compacte i ocupar menys volum que el plasmidi relaxat, es desplaça més en electroforesi d'agarosa.
- (c) La forma lineal d'un plasmidi migra en electroforesi en agarosa amb més mobilitat electroforètica que la superenrotllada.

4. Heu aïllat DNA de cèl·lules bacterianes. Expliqueu breument com determinaríeu la concentració de DNA en la solució.

5. En la figura es mostra un gel d'electroforesi en agarosa on s'han aplicat diferents mostres (en un ordre diferent del que s'indica a continuació):

- Un plasmidi natiu (mostra A);
- El plasmidi digerit amb un enzim de restricció que talla en un sol lloc (mostra B);
- El plasmidi digerit amb un altre enzim de restricció que talla en dos llocs (mostra C);
- Patró de grandàries moleculars (mostra D).

- (a) Indiqueu en la figura les carreres corresponents a les mostres A, B, C i D. Justifiqueu l'elecció.
- (b) Justifiqueu la mobilitat dels fragments de DNA del patró de grandàries moleculars.
- (c) Quina és la grandària del plasmidi? Justifiqueu la resposta.
- (d) Indiqueu per a les carreres 2, 3 i 4 les característiques de les molècules de DNA que originen cadascuna de les bandes mostrades (en especial pel que fa referència a la seua grandària i conformació).



PRÀCTICA 5

REACCIONS LLUMINOSSES DE LA FOTOSÍNTESI

La fotosíntesi consisteix en la conversió de la radiació lluminosa en potencial reductor i energètic que, posteriorment, s'utilitza per a la reducció i assimilació d'elements biogenèsics que es troben en un elevat estat d'oxidació o en formes de baixa reactivitat (CO_2 , SO_4^{2-} , NO_3^- ...). Per radiació lluminosa entenem les ones electromagnètiques emeses pel Sol en forma de paquets energètics discrets (quants o fotons), l'energia dels quals depèn de la longitud d'ona, o freqüència de la radiació emesa ($E = h\nu$), sent la de l'espectre visible la compresa entre longituds d'ona de 400 a 800 nm. Els elements biogenèsics no són altres que els que formen part dels constituents orgànics: proteïnes, hidrats de carboni, greixos, etc. En la fotosíntesi que té lloc al cloroplast, l'energia solar transforma l'aigua i el CO_2 de l'atmosfera en hidrats de carboni, i s'allibera oxigen.

En el procés fotosintètic es distingeixen dues fases:

Transport d'electrons fotosintètic, en el qual la llum dirigeix la transferència d'electrons des de, per exemple, l'aigua fins al NADP^+ amb producció d'oxigen i de NADPH. Al llarg d'una seqüència de reaccions d'oxidació-reducció s'allibera energia que, en part, s'utilitza per a la síntesi de ATP. Cal assenyalar que si bé alguns organismes fotosintètics (plantes, algues, cianobacteris) utilitzen molècules d'aigua com a font de poder reductor, els bacteris fotosintètics, treballant en general en medis anaerobis, utilitzen com a font de poder reductor compostos de sofre reduïts, l'hidrogen o uns altres, sense que hi haja, per tant, alliberament d'oxigen.

Fixació autotròfica del CO_2 , o assimilació reductora de compostos oxidats utilitzant els productes de la fase lluminosa, l'ATP i el poder reductor. La fixació de CO_2 té lloc en el cloroplast mitjançant el cicle reductor de les pentoses (cicle de Calvin).

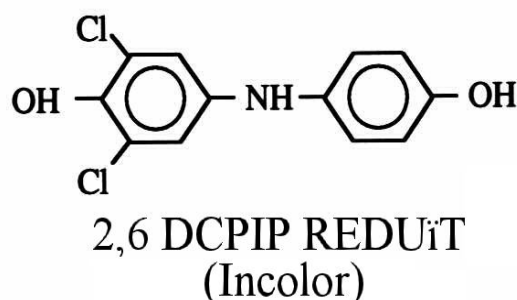
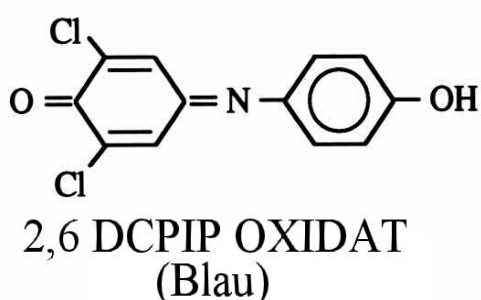
Aquesta divisió de la fotosíntesi en dues fases pot fer-se palesa mitjançant la utilització d'acceptors artificials d'electrons no fisiològics (coneguts com reactius de Hill), amb un potencial de reducció estàndard E° similar al del parell $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, com, per exemple, complexos d'ions fèrrics (ferricianur), benzoquinones o colorants derivats de l'indofenol (com és el que nosaltres utilitzarem, el 2,6-diclorofenol indofenol, o 2,6-DCPIP). Aquests compostos poden reduir-se en lloc de la molècula de NADP^+ , fet que permet el funcionament de la cadena de transport electrònic fotosintètica, amb producció d'oxigen, sense que es produïska NADPH ni, per tant, síntesi d'hidrats de carboni. El canvi espectroscòpic provocat per la reducció del 2,6-DCPIP ens permetrà el seguiment del procés fotosintètic.

L'objectiu és estudiar la reducció fotosintètica d'un reactiu derivat de l'indofenol, el 2,6-diclorofenol-indofenol (2,6-DCPIP) per cloroplastos aïllats de fulles de bledes, amb llum de diferent longitud d'ona (de diferents colors).

Protocol experimental

1. Material i reactius

- Fulles de bleada i gel
- Tisores
- Colorímetre
- Morter de porcellana
- Embut de vidre
- Erlenmeyer de 100 mL
- Pipetes d'1, 2, 5 i 10 mL i propipetes
- Tubs (4), 2 folrats amb filtres roig i verd i un amb paper d'alumini
- Solució tampó d'homogeneïtzació pH 6,2. Per a 250 mL de tampó: 0,7 g de Na_2HPO_4 ; 1,6 g de KH_2PO_4 ; 27,5 g de sacarosa i 1,03 g de KCl
- Reactiu 2,6-diclorofenol-indofenol (2,6-DCPIP) 0,025% (p/v) en aigua
- Tubs d'assaig (6)
- Cronòmetre
- Bombetes de 100 W
- Mussolina per a filtrar
- Tubs de colorímetre
- Proveta de 25 mL



2. Procediment

2.1. Aïllament dels cloroplastos

Es llaven amb aigua 2 fulles de bledes i es trosseguen amb les tisores rebutjant els nervis majors. Es trituren, en el morter, 5 g de trossos de bleada amb 10 mL dels 25 mL del tampó d'homogeneïtzació fred, durant 2-5 min. Se'n filtra l'extracte, a través d'una doble capa de mussolina prèviament mullada amb el tampó, i es manté en un vas de precipitats sobre gel.

2.2. Optimització de les condicions d'assaig

Per tal de conèixer quina serà la quantitat de cloroplastos més escaient per a realitzar els experiments que ens proposem, es preparen 6 tubs d'assaig, com s'indica en la Taula:

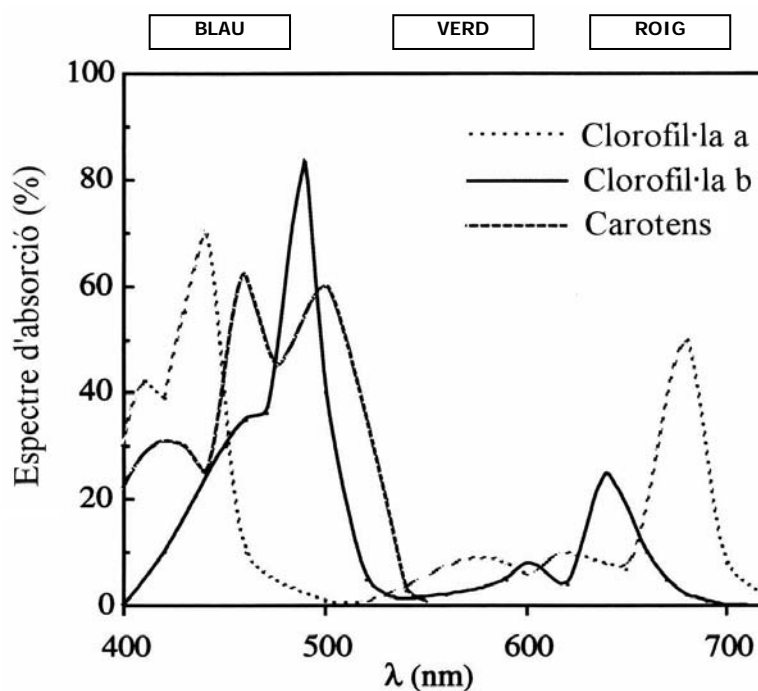
Tubs	Volum (mL)	
	suspensió cloroplastos	tampó homogeneïtzació
1	0,0	4,5
2	0,1	4,4
3	0,2	4,3
4	0,3	4,2
5	0,4	4,1
6	0,5	4,0

S'afegeixen a cadascun dels tubs anteriors 0,5 mL del 2,6-DCPIP. Es mescla bé la suspensió i es col·loquen els tubs en el suport enfront d'un llum de 100 W, a uns 25 cm de distància. Es pren nota del temps (en min) que tarda a desaparèixer el color blau del reactiu de cadascun dels tubs i, per tant, la suspensió torna a la coloració verda inicial.

Per als estudis posteriors ens interessa utilitzar la quantitat de cloroplastos que haja necessitat uns 12-17 min a tornar a la coloració verda.

2.3. Efecte de la longitud d'ona sobre la capacitat reductora dels cloroplastos

La clorofil·la és un pigment verd, majoritari en els cloroplastos i capaç d'absorbir la llum visible de longituds d'ona corresponents als colors blau i part del roig, per la qual cosa els cloroplastos són verds (complementari al color absorbit). Altres pigments vegetals, que participen també en la fotosíntesi, absorbeixen llum d'altres longituds d'ona (vegeu la figura).



Per tal d'estudiar quina de les diferents longituds d'ona que assajarem presenta més rendiment fotosintètic, utilitzarem tubs folrats amb filtres de diferents colors (verd i roig). Un tub sense folrar, que rebrà llum blanca, i un altre folrat amb paper d'alumini, per tal de simular les condicions de foscor, serviran com a controls de l'experiment.

Una vegada seleccionada la quantitat escaient de la suspensió de cloroplastos en l'apartat anterior, es mesuren les quantitats que pertoquen multiplicades per 7 i es col·loquen en un vas de precipitats. Es mescla bé i, en un tub de colorímetre, se n'hi afegeixen 6 mL per tal d'ajustar l'aparell a zero (és el "blanc", sense colorant). A la resta, **just abans de començar les mesures**, s'hi afegeixen 3 mL del reactiu 2,6-DCPIP, es mescla bé i se'n col·loquen 6 mL en **4** tubs de colorímetre que introduïrem dins dels tubs més grans que ens proporcionaran les diferents condicions d'il·luminació (*foscor*, *llum blanca*, *llum verda* i *llum roja*) i que estaran col·locats en el suport a uns 25 cm de la bombeta de llum. Com que es tracta de mesurar la variació de l'absorbància (color, estat reduït del reactiu) en funció del temps (cada 3 min durant un total de 18 min) a diferents longituds d'ona de llum, per tal d'obtenir més ràpidament els resultats cal treballar amb els 4 tubs alhora de la següent manera:

- 1) Una vegada calibrat el colorímetre a zero, amb el tub que no conté reactiu (blanc), es llig la A_{652} del primer tub ($t=0$) abans de col·locarlo dins del tub folrat amb el paper d'alumini (foscor). En aquest moment, **comença a comptar el temps**.
- 2) Al cap de **45 s** col·locarem el segon tub dins del tub sense folrar (llum blanca) i així successivament s'anirà col·locant cada tub de colorímetre dins dels tubs folrats de color verd i roig, sempre amb intervals de 45 s.
- 3) **45 s** després d'haver col·locat el tub 4 davant de la llum en el tub folrat en roig, ja es pot mesurar l'absorbància en el colorímetre del tub 1, perquè hauran transcorregut els primers 3 min. I immediatament després es tornarà a col·locar dins del tub. Se segueix mesurant l'absorbància dels altres tubs en intervals de temps de **45 s** entre cadascun.
- 4) Es repeteix el procés per tal de tenir els valors de A_{652} de cada tub als 6, 9, 12, 15 i 18 min. **No oblideu prendre nota del valor de A_{652} a temps 0 de cadascun dels tubs. Utilitzeu la taula següent per prendre nota d'aquests valors.**

Absorbància a 652 nm				
Temps (min)	fosc	llum blanca	llum verda	llum roja
0				
3				
6				
9				
12				
15				
18				

Per tal de determinar l'efecte de la llum sobre el poder reductor dels cloroplastos al llarg del temps, es representarà gràficament, per a cada tub, en ordenades els valor de A_{652} i en absisses, el temps transcorregut en min. Se'n discutiran els resultats.

QÜESTIONS PRÀCTICA 5

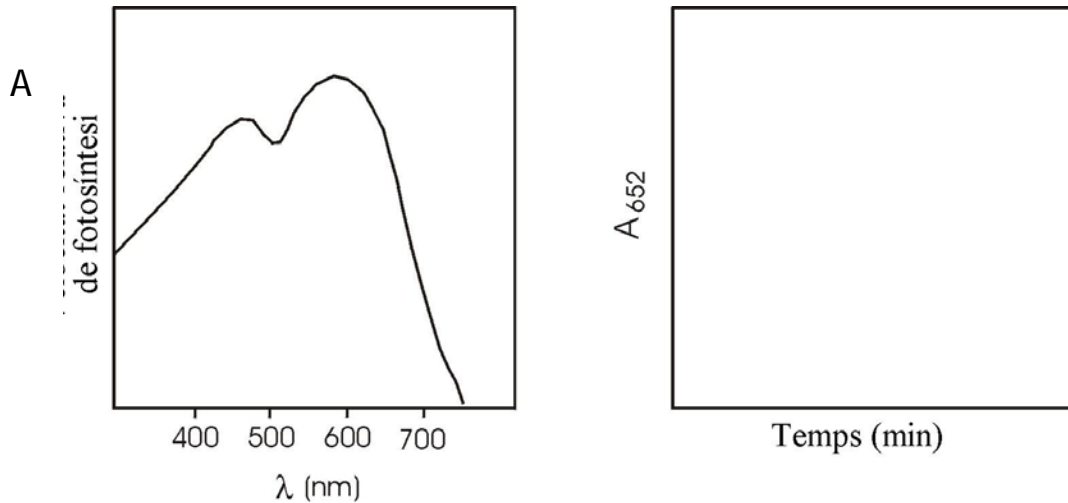
1. Expliqueu per a què es fan servir els següents reactius, instruments i/o tècniques:

- (a) 2,6-diclorofenol-indolfenol (2,6-DCPIP);
- (b) Filtres de colors;
- (c) Sacarosa.

2. Contesteu vertader o fals i raoneu breument la resposta:

- (a) Una suspensió de cloroplastos col·locada en un tub folrat amb un filtre blau no farà fotosíntesi si s'il·lumina amb llum groga.
- (b) La llum roja és més activa fotosintèticament perquè el reactiu que s'utilitza per mesurar la velocitat, el 2,6-DCPIP, com és de color blau, absorbeix la radiació complementària, la roja.

3. Després d'una extracció de cloroplastos d'una planta tropical es va obtenir l'espectre d'absorció (a causa dels pigments fotosintètics) que es mostra en la figura. Indiqueu quins resultats obtindríeu si mesureu la velocitat de fotosíntesi amb 2,6-DCPIP a distintes longituds d'ona (blanca, blava, roja, verda) i en condicions de fosc. Justifiqueu les respostes.



4. Per tal de determinar l'activitat fotosintètica d'una suspensió de cloroplastos obtinguda a partir de fulles d'espínacs es prepararen 3 tubs amb idèntiques quantitats de suspensió de cloroplastos i de reactiu 2,6-DCPIP. Cadascun dels tubs es tractà de manera diferent:

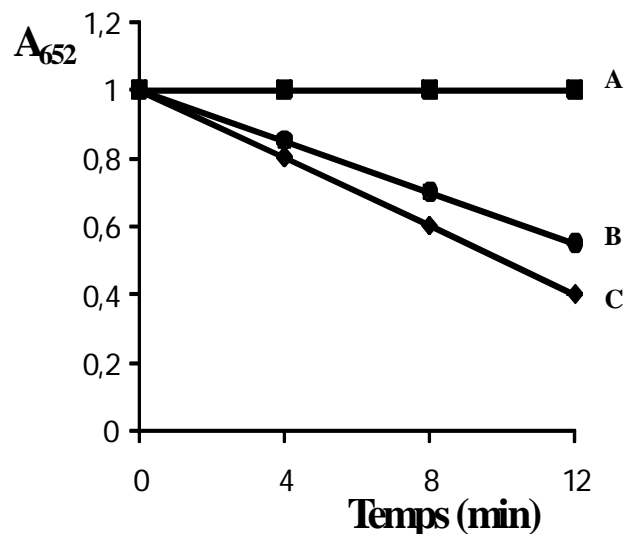
Tub 1: s'irradià amb llum blanca.

Tub 2: se li afegí detergent Triton X-100 a 0,1% (disgregant de membranes) i s'irradià amb llum blanca.

Tub 3: s'irradià amb llum roja.

Es mesurà la variació de A_{652} al llarg del temps durant 12 minuts i es va obtenir la gràfica que es mostra en la figura.

Indiqueu a quin tub (1, 2 i 3) correspon cadascuna de les representacions de la gràfica anterior (A, B i C), i justifiqueu-ho breument.

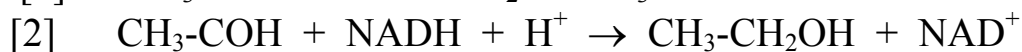
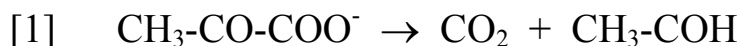


PRÀCTICA 6

METABOLISME D'HIDRATS DE CARBONI

La glicòlisi és la ruta metabòlica que transforma la glucosa i altres monosacàrids de 6 carbonis en dues molècules de 3 carbonis —el piruvat— mitjançant una seqüència de 10 reaccions enzimàtiques. Aquest procés genera energia (ATP) i poder reductor (NADH). Les cèl·lules aeròbies utilitzen la glicòlisi com a primera etapa de la degradació completa dels hidrats de carboni fins a CO₂ i H₂O. Els anaerobis, microorganismes que viuen en absència d'oxigen, poden obtenir tot l'ATP que necessiten a partir d'aquest procés. Aquests microorganismes utilitzen dues rutes principals per a oxidar els equivalents de reducció —NADH— formats a la glicòlisi i subministrar els NAD⁺ necessaris per tal que el procés glicolític pugui continuar. Açò fa que la glicòlisi pugui ser part d'una *fermentació*, ja que no hi ha canvi net de l'estat d'oxidació dels substrats (glucosa) en transformar-se en productes (etanol + CO₂, o lactat).

La *fermentació alcohòlica* la realitza el llevat (*Saccharomyces cerevisiae*). Consisteix en una primera etapa (1) de descarboxilació del piruvat, producte de la glicòlisi, catalitzada per la piruvat-descarboxilasa, on es produeix CO₂ i acetaldehid. En una segona etapa (2), catalitzada per l'alcohol-deshidrogenasa, l'acetaldehid es redueix a etanol.

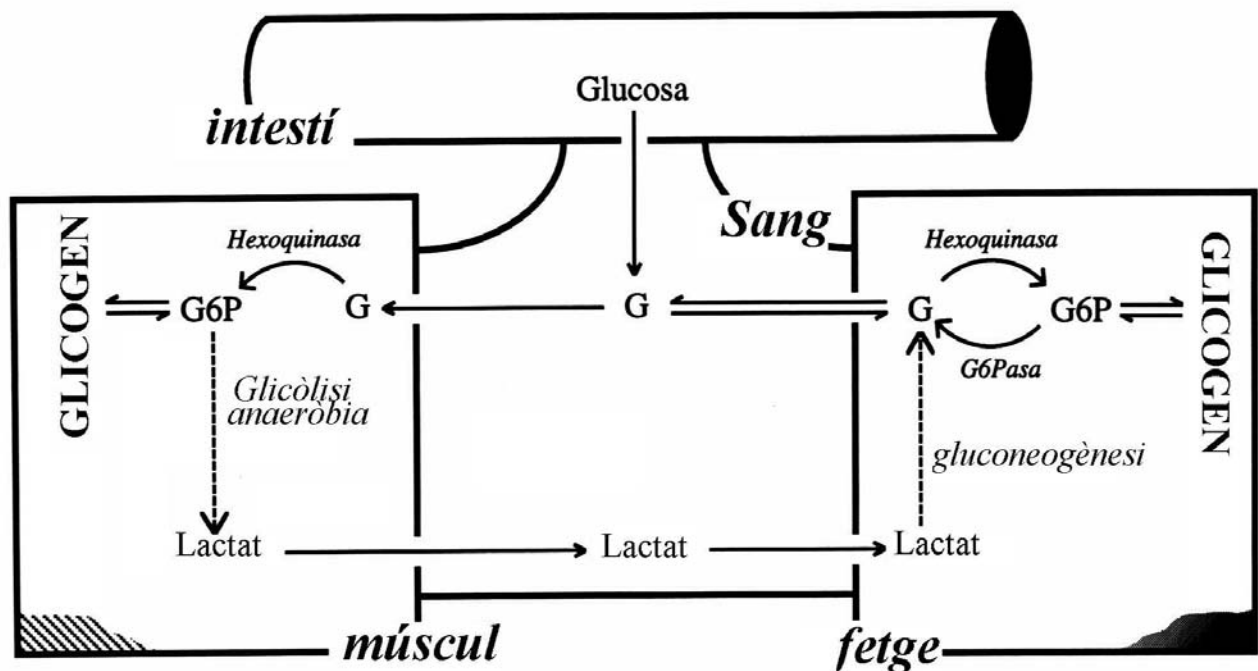


El llevat usat en els forns fa aquesta fermentació: el CO₂ que es produeix és el responsable de l'augment de volum del pa, i l'etanol que es forma s'evapora durant la cocció del pa. Es també aquest tipus de fermentació el que produeix l'etanol de les begudes alcohòliques.

Els animals disposen d'una reserva d'energia en forma de sucres que és el *glicogen*, un polímer lineal de residus de glucosa units per enllaços glicosídics (α-1,4) i que presenta ramificacions (α-1,6) cada 10 residus de glucosa. Quasi tot el glicogen es localitza en el fetge i en el múscul esquelètic. En un animal ben alimentat, la glucosa es transforma en glicogen en el fetge i en el múscul (*glicogenogènesi*). En dejú, el glicogen hepàtic es mobilitza, es degrada (*glicogenòlisi*), per tal de subministrar glucosa a l'organisme, i s'exhaureix gairebé tota la reserva d'aquest combustible al cap de 24-48 h. A partir d'aquest moment, té una gran importància el procés de *gluconeogènesi*, que en utilitzar substrats no glicídics (lactat del múscul esquelètic, glicerol dels triacilglicerols, alguns aminoàcids de les proteïnes, etc) genera la glucosa que tot l'organisme requereix, especialment el cervell. El glicogen del múscul esquelètic no és particularment afectat pel dejuni, de manera que, en absència d'exercicis violents,

el seu nivell és relativament constant. A més, aquest glicogen, a diferència de l'hepàtic, no cedeix glucosa a la circulació sanguínia perquè en el teixit muscular no hi ha activitat enzimàtica glucosa-6-fosfatasa (vegeu la figura).

*L'objectiu és estudiar la degradació de sucres en condicions anaeròbiques (fermentació alcohòlica de la glucosa pel llevat *Saccharomyces cerevisiae*) i determinar el contingut de glicogen extret a partir de teixit hepàtic.*



Protocol experimental

1. Materials i reactius

- Vas de precipitats de 50 mL
- Pinceres d'acer inoxidable i tisores
- Centrifugadora
- Sacarímetre
- Tubs d'assaig i boles de vidre (7)
- KOH (300 g/litre)
- HCl 1,2 M
- Etanol absolut fred
- Llevat de forner (20 g/sessió)
- Pipetes d'1, 2, 5 i 10 mL i propipetes
- Glucosa a l'1 % (p/v) (acabada de preparar pel professor per a tots els grups, 200 mL) en tampó acetat 0,2 M pH 5,5 desgasificat.
- Vareta de vidre
- Bany a 100 °C
- Tubs de centrifugadora (2)
- Colorímetre
- Pipeta automàtica, P1000 i puntes
- NaOH 0,5 M
- Na₂SO₄ saturat
- Glucosa 2,5 mM (0,46 g/L)
- Teixit hepàtic de conill (7 g/sessió)

- Tampó acetat 0,2 M pH 5,5 (6,06 g d'acetat sòdic i 0,39 mL d'àcid acètic glacial en 250 mL d'aigua).
- Reactiu 3,5-dinitrosalicilat (3,5-DNS). Es prepara de la manera següent: dissoldre 5 g de 3,4-DNS amb 300 mL d'aigua destil·lada a 50 °C en agitació; afegir-hi 50 mL de NaOH 4 M i mesclar bé. Afegir 150 g de tartrat sodi-potàssic i, una vegada ben dissolt, afegir-hi aigua destil·lada fins completar 500 mL.

2. Procediment

2.1. Fermentació alcohòlica de la glucosa

Es prepara una suspensió de 2 g de llevat en 20 mL de glucosa a l'1 % (p/v) en un vas de precipitats. Es mescla ràpidament amb la vareta i immediatament després, amb l'ajuda d'una pipeta, se n'aboquen 14 mL en el sacarímetre amb la precaució que el tub estiga completament ple.

Preneu nota de l'aparició de bombolles i de la formació de CO₂ (volum de líquid desplaçat en el sacarímetre) al llarg del temps, aproximadament cada 10 min fins recollir-ne 7 mL.

Feu una representació gràfica dels mL de gas (CO₂) produïts (ordenades) davant del temps (min, en abscisses). Discussiu-ne els resultats.

2.2. Quantificació del glicogen en teixit hepàtic

En un primer pas, s'obté el glucogen a partir del teixit hepàtic de conill. A continuació, es procedeix a hidrolitzar aquest glicogen per tal de determinar, per reacció colorimètrica amb el 3,5-dinitrosalicilat (3,5-DNS), la quantitat de glucosa que conté.

2.2.a. Obtenció del glicogen

Es col·loquen 0,7 g de fetge en un tub de centrifugadora. S'hi afegeixen 2 mL de KOH, es tapa amb una boleta de vidre i s'escalfa en un bany en ebullició durant 20 min, agitant de tant en tant la mescla. Es refreda el tub amb gel. S'hi afegeixen 0,4 mL del Na₂SO₄ saturat i 5 mL d'etanol absolut fred. Es mescla bé, es tapa amb parafilm i es deixa reposar 5 min en gel. El glicogen sedimentat s'arregla en el sediment de la centrifugació a 3 000 rpm durant 10 min. El sobrenadant se separa per decantació. El glicogen sedimentat es dissol afegint-hi 1,0 mL d'aigua. Si és necessari, escalfeu suaument fins a la dissolució completa del glicogen.

2.2.b. Hidròlisi del glicogen

A la solució de glicogen preparada com s'ha indicat en l'apartat anterior s'afegeix 1,5 mL de HCl 1,2 M, es tapa amb una bola de vidre i s'escalfa a 100 °C durant 30 min. Es refreda el tub. S'hi afegeixen 4 mL de NaOH 0,5 M per tal de neutralitzar la solució.

2.2.c. Determinació de la glucosa alliberada del glicogen

Es tracta de determinar la quantitat de glucosa present en les mostres de glicogen hidrolitzat utilitzant el reactiu 3,5-dinitrosalicilat (3,5-DNS) i comparant l'absorbància a 540 nm de la solució problema amb la dels tubs que contenen quantitats conegudes de glucosa (corba patró; vegeu la Taula).

Tub	Volum (mL)			
	Glucosa 2,5 mM	H ₂ O	mg glucosa	A ₅₄₀
1	0,0	2,0		
2	0,2	1,8		
3	0,5	1,5		
4	1,0	1,0		
5	1,5	0,5		
6	2,0	0,0		

Una vegada preparats els tubs de la Taula anterior, en un altre tub d'assaig (tub 7) s'afegeixen 2,0 mL de la mostra de glicogen hepàtic hidrolitzat. A tots els tubs se'ls afegeix 1 mL del reactiu 3,5-DNS. Es mescla bé. S'escalfa a 100 °C durant 5 min. Es refreda i es dilueix amb l'aigua afegint 3 mL. Es llig l'absorbància a 540 nm, utilitzant el tub 1 com a blanc.

Expresseu els resultats en mg de glucosa per g de teixit.

QÜESTIONS PRÀCTICA 6

1. Expliqueu per a què es fan servir els següents reactius, instruments i tècniques:

- | | |
|---------------------------|-----------------------|
| (a) Sacarímetre; | (e) Glucosa; |
| (b) 3,5-dinitrosalicilat; | (f) Llevat de forner; |
| (c) Etanol; | (g) KOH. |
| (d) HCl; | |

2. Indiqueu si són vertaderes o falses i comenteu les frases següents:

- (a) Durant la fermentació alcohòlica el piruvat es diposita en el fons del sacarímetre.
- (b) L'absorbància obtinguda en una mostra de glicogen hidrolitzat de fetge de conill, després de reaccionar amb 3,5-DNS, fou de 0,147 nm.
- (c) Els polisacàrids s'hidrolitzen escalfant-los a 100 °C en medi àcid.

3. Es realitza una extracció de glicogen partint de 2 g de fetge de rata, i seguidament el glicogen s'hidrolitza amb HCl en un volum total de 5 mL. Per tal de valorar el contingut en glucosa, es prenen 0,5 mL i es realitza la reacció amb el 3,5-dinitrosalicilat (3,5 DNS), es mesura l'absorbància a 540 nm i quan s'interpol·la en la corba patró, s'obté un valor de 0,9 mg de glucosa. Quina quantitat de glucosa hi ha per gram de teixit?

4. En un experiment de valoració de glicogen en el fetge i en el múscul esquelètic procedent de rates sotmeses a dejuni i de rates control que no deixaren de menjar, s'obtingueren els resultats següents en mg de glucosa per g de teixit:

	Control	Dejuni
Fetge	40,6	1,2
Múscul	0,1	2,0

Si considerem que no hi ha cap errada experimental i que una de les rates es va escapar i va ser capturada i sacrificada després d'algunes hores de persecució, quina és la justificació bioquímica d'aquests resultats?

5. En la sessió pràctica de laboratori heu determinat la quantitat de glicogen present en el teixit hepàtic de conill en mg de glucosa per g de teixit. Com faríeu per expressar aquestes dades en mg de glicogen per g de teixit?

6. En la determinació de glicogen realitzada, esteu segur que la glucosa que quantifiqueu prové exclusivament del glicogen? Expliqueu-ho.

NOTES
