



CURS 2012-13

TÈCNIQUES INSTRUMENTALS SEPARATIVES

**Professor Sergi Maicas i Prieto
Universitat de València
Departament de Microbiologia i Ecologia
Facultat de Ciències Biològiques**

TEMARI

BLOC 1. TÈCNIQUES CROMATOGRÀFIQUES

PRÀCTICA 1. Cromatografia en paper (*SESSIÓ 1*)

PRÀCTICA 2. Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) i cromatografia de gasos (GC) (*SESSIÓ 2*)

PRÀCTICA 3. Cromatografia en capa fina (TLC) (*SESSIÓ 3*)

BLOC 2. TÈCNIQUES ELECTROFORÈTIQUES

PRÀCTICA 4. Electroforesi de proteïnes (*SESSIONS 4 i 5*)

PRÀCTICA 5. Electroforesi d'àcids nucleics (*SESSIONS 6 i 7*)

RESULTATS (*SESSIÓ 8*)

PRÀCTICA 1. DETERMINACIÓ D'ÀCIDS ORGÀNICS EN VINS MITJANÇANT CROMATOGRÀFIA EN PAPER

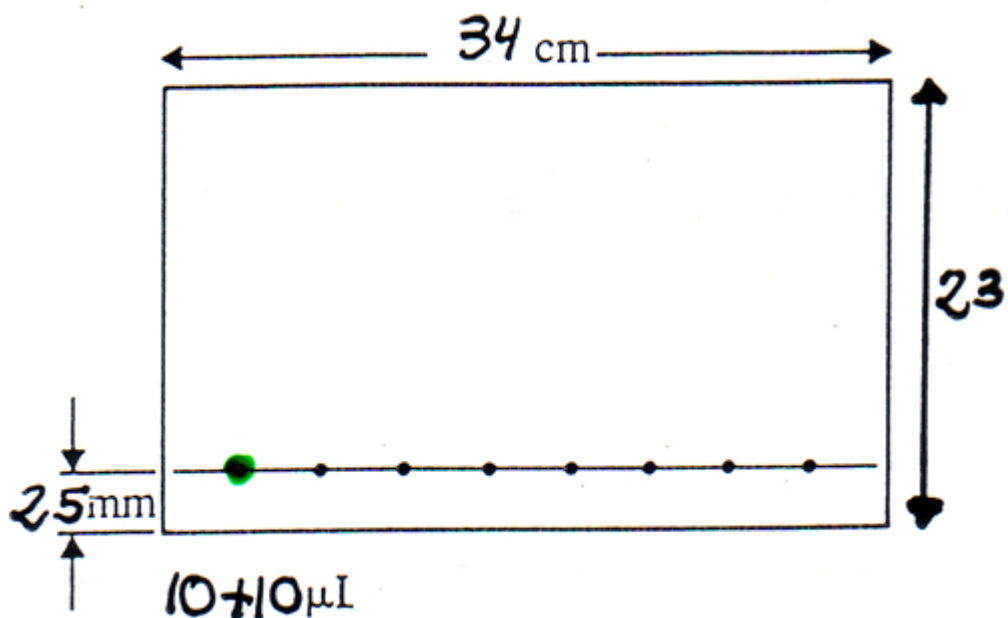
INTRODUCCIÓ

La cromatografia en paper és una tècnica analítica que s'utilitza per a la separació i la identificació de mescles que són, o poden ser, de color. Aquest mètode ha estat substituït en gran mesura per la cromatografia de capa fina. Tanmateix, continua sent una poderosa eina per l'ensenyament. En algunes ocasions es realitzen cromatografies bidimensionals, fet que implica l'ús de dos dissolvents i girar el paper 90° després de realitzar la primera cromatografia. Aquesta tècnica és útil per a la separació de mescles complexes de compostos similars, com ara els aminoàcids.

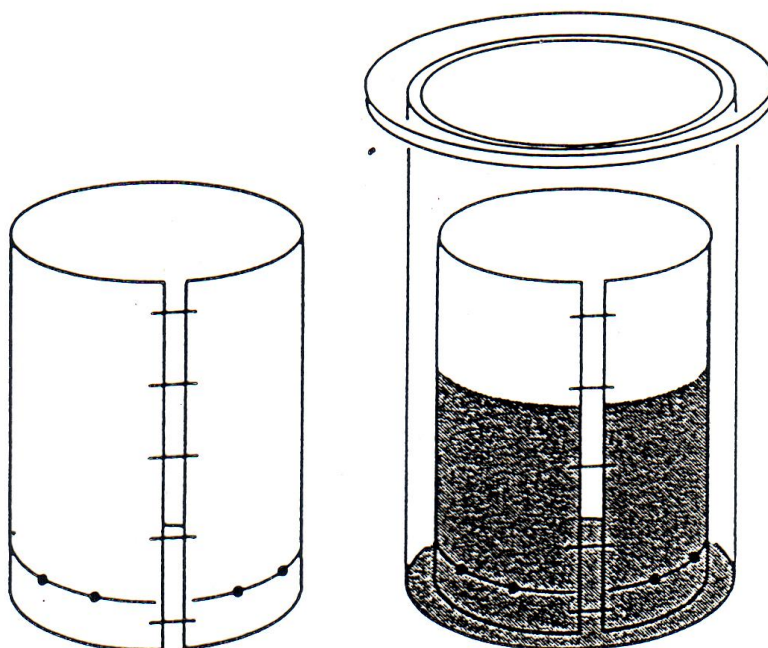
L'objectiu d'aquesta pràctica és la separació dels àcids majoritaris del vi: tartàric, màlic, cítric i làctic utilitzant un senzill protocol de cromatografia en paper. Els àcids que intentarem separar procedeixen del gra de raïm i del metabolisme microbià durant el procés de fermentació. L'avaluació de les concentracions d'aquests àcids determinarà les característiques organolèptiques i enològiques del producte acabat. Els àcids es detecten qualitativament i quantitativa per la seua situació i àrea de la taca groga sobre fons blau del paper.

PROTOCOL

1. Tallar una làmina de paper Whatman MM de 23 cm d'alt. L'ample dependrà del nombre de mostres que calga analitzar, a més de les solucions patró (àcid Cítric, àcid Màlic, àcid Làctic i àcid Tartàric) i la mida de la cubeta de cromatografia que s'utilitze.
2. No doblegar ni manipular el paper en excés per evitar la interferència en els resultats.
3. Marcar una línia horitzontal amb un llapis a 2,5 cm de la base del paper. Assenyalar sobre aquesta línia els punts d'inoculació de les mostres i deixar una separació mínima de 2 cm.
4. Dipositar 10 µl de cada mostra o patró en cadascuna d'aquestes marques. Cal que afegiu els 10 µl gota a gota perquè la mida de la zona d'aplicació no siga molt gran. Marcar sota cada punt el nom del vi o del patró **amb llapis**.



5. Grapar el rectangle de paper formant un cilindre i introduir-lo en la cubeta de cromatografia que ja ha de contenir la fase mòbil.



6. Tancar la cubeta i deixar desenvolupar la cromatografia fins que el front de l'eluent arribe fins a una distància de 3 a 5 cm de la vora superior del paper.

7. Traure el paper de la cubeta, marcar amb llapis l'alçada assolida per l'eluent en els dos extrems del paper.

8. Calcular el R_f i la concentració aproximada dels àcids del vi amb els patrons.

REACTIUS I MATERIALS

Patrons: Solucions de 20 g/l dels diferents àcids (C, M, L, T)

Paper Whatman de 3mm

Micropipetes de 20, 200 i 1000 μ l

Tubs Eppendorf

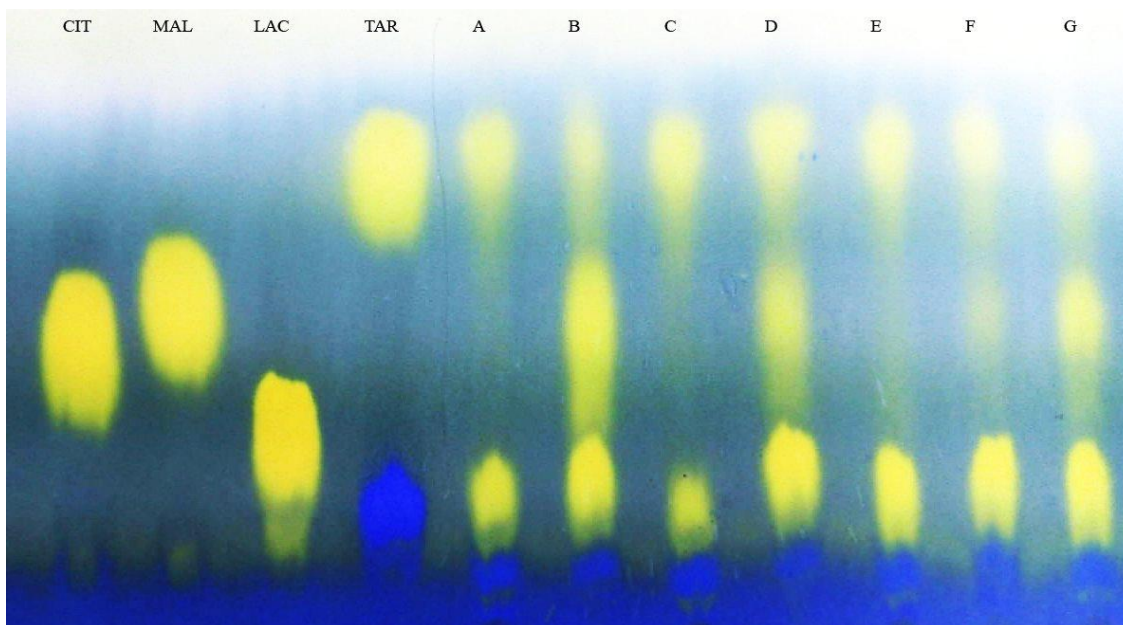
Fase mòbil (eluent): Consta de dues solucions:

Solució A		Solució B	
n-butanol	572 ml	Àcid acètic glacial	91,2 ml
Blau de bromofenol	0,572 g	Àcid fòrmic	22,8 ml
		Aigua destil·lada	114 ml

Per preparar la fase mòbil es barregen les dues solucions (volum final de 800 ml) i la mescla es guarda en una botella de color topazi.

RESULTATS

Calcular el R_f i la concentració aproximada dels àcids del vi amb els patrons.



PRÀCTICA 2. RESOLUCIÓ DE PROBLEMES DE CROMATOGRAFIA

2.1. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS VOLÀTILS DEL VI

INTRODUCCIÓ

La major part dels compostos responsables de l'aroma del vi es formen durant la fermentació del most com a conseqüència del metabolisme dels llevats. Entre els compostos volàtils formats, l'acetaldehid i l'acetat d'etil són de gran importància pel seu notable efecte en la qualitat del vi, i són especialment negatius quan es troben en concentracions excessivament elevades.

L'acetaldehid representa més del 90% del total dels aldehids del vi i se sol trobar en concentracions que varien entre els 10 i 300 mg/l, encara que en els vins licorosos, tipus vins de Jerez, els seus nivells són més elevats però beneficiosos organolèpticament. La seua producció està influïda per els llevats presents al final de la fermentació.

Dels èsters que trobem presents en el vi, alguns provenen en petites quantitats del raïm, però la major part es formem durant la fermentació, i l'acetat d'etil és un dels més importants. Aquest es troba en concentracions que varien entre 30 i 150 mg/l i contribueix a l'aroma afruitat dels vins joves, però és perjudicial en concentracions superiors pel fet que és el responsable de la sensació olfactiva que s'aprecia en els vins picats (amb excés d'acetat d'etil).

MOSTRES

Vins A, B, D, E i altres.

MATERIAL

Cloroform(20ml per extracte), sulfat de sodi anhidre, embut de decantació, vials amb rosca, microxeringa, 2-nonanol (patró intern), got de precipitats 50 ml, embut de vidre, paper de filtre.

INSTRUMENTAL

La pràctica es du a terme amb un cromatògraf de gasos model HP5890-Sèrie II amb detector d'ionització de flama (FID). El registre de les dades es du a terme mitjançant el programari HP 3365 Chemstation. La columna utilitzada és una HP20M (Carbowax 20M) de 50 m de longitud, 0,2 mm de diàmetre intern, amb 0,2 µm de gruix de fase.

	$\delta_{20,4}$	R	VS1	VS2	VS3	VS4	V1	V2	V3	V4
Acetaldehid	788	0.995	5	50	250	500	1.28	12.75	63.77	127.54
Acetat d'etil	902	0.990	5	50	250	500	1.12	11.20	55.99	111.98
			V'1	V'2	V'3	V'4	C1	C2	C3	C4
Acetaldehid			1.3	12.8	64	128	5.096	50.180	250.899	501.798
Acetat d'etil			1.1	11.2	56	112	4.911	50.007	250.054	500.069

Les condicions de la cromatografia són:

Volum d'injecció: 0'5 µl

Temperatura inicial del forn: 60 °C

Temps isoterma inicial: 5 min

Gradient de temperatura: 2,5 °C / min

Temperatura final: 190 °C

Temps isoterma final: 22 min **Patrons**

Preparació de quatre vins sintètics amb concentracions conegudes dels compostos que cal examinar, que han d'estar compreses entre els valors que apareixen en la bibliografia, ja que a l'hora de quantificar els valors cal interpol·lar-les en la recta de calibratge, no extrapolar-les, ja que desconeixem si la tendència és lineal fora dels nostres punts.

Acetaldehid 5-500 mg/l

Acetat d'etil 5-500 mg/l

Taula de volums i concentracions dels patrons per a 200ml de solució

Els valors de densitat estan expressats en mg/ml, els volums en ml i les concentracions en mg/ml.

El patró ha d'estar en una concentració idèntica i coneguda en tots els vins.

PROTOCOL D'EXTRACCIÓ

1. Introduir en un embut de decantació 20 ml del vi problema (o del vi sintètic per als patrons), 12.5 µl de 2-nonanol (patró intern) i 10 ml de cloroform (CH₃Cl).
2. Agitar durant 5 minuts i deixar reposar per a separar les fases orgànica (inferior) i aquosa (superior).
3. Decantar la fase orgànica en un got de precipitats.
4. Afegir sulfat sòdic anhidre i agitar.
5. Prendre una alíquota de 2 ml del sobrenadant i passar-la a un vial.
6. Dur a terme la cromatografia.

Càlcul dels factors de resposta

$$F_{ri} = (C_i/C_{pi}) (A_{pi}/A_i)$$

C_i = concentració del component i

	δ _{20,4}	R	C _p	V _p	V' _p	C' _p
2-nonanol	823	0.970	500	125.26	125.26	498.944

C_{pi} =

concentració del patró intern

A_i = Àrea del component i

A_{pi} = Àrea del patró intern

F_{ri} = factor de resposta cromatogràfic del compost i respecte del patró intern)

A partir dels cromatogrames de les dissolucions patró es du a terme la representació de (A/A_{pi}) davant (C_i/C_{pi}) per compost i s'obtenen mitjançant un ajust les rectes, les pendents corresponen als factors de resposta cromatogràfics de cada compost respecte del patró intern (F_{ri}).

$$(C_i/C_{pi}) = F_{ri} (A_i/A_{pi})$$

Coneguts aquests factors de resposta respecte del 2-nonanol, les concentracions de cada component en les mostres problemes es calculen mitjançant l'expressió:

$$C_i = (F_{ri} C_{pi} A_i) / A_{pi}$$

Taules per calcular els factors de resposta dels dos compostos que cal determinar:

Ai acetaldehid	Ci acetaldehid	Ap1 2-nonanol	Cpi 2-nonanol	Ai/Api	Ci/Cpi

Càlcul de la recta de regressió per ajust de mínims quadrats:

$$y = ax+b$$

a =

b =

Fri acetaldehid =

r =

Ai acetat d'etil	Ci acetat d'etil	Ap1 2-nonanol	Cpi 2-nonanol	Ai/Api	Ci/Cpi

Càlcul de la recta de regressió per ajust de mínims quadrats:

$$Y = ax+b$$

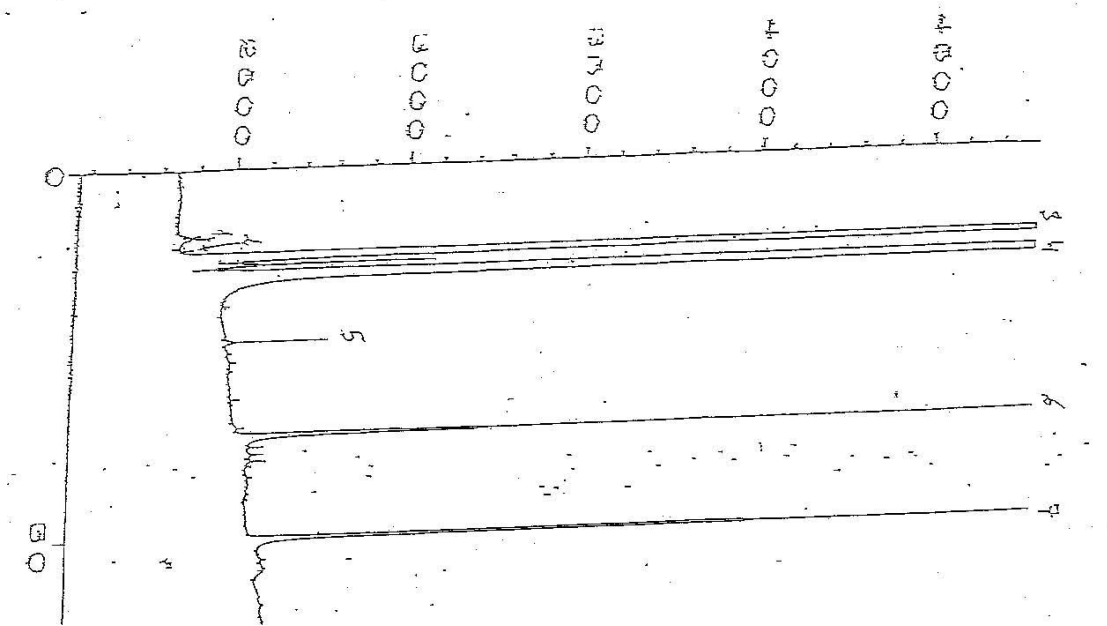
A =

b =

Fri acetat d'etil =

r =

PATRONS 5 mg/ml



1. Acetaldehid
2. Acetat d'etil
3. Etanol
4. Triclorometà (cloroform)
5. Isopentanol
6. Trans 3 hexenol
7. 2-nonanol

#	Temps de retenció	Àrea	Alçada	Tipus	Amplada	Àrea %
1	5.538	521	58	MM	0.149	0.0022
2	6.424	294	47	MM	0.104	0.0013
3	6.836	1221641	134741	BB	0.110	5.2252
4	8.297	22019500	2682857	FB	0.100	94.1811
5	14.026	1060	258	BB	0.052	0.0045
6	21.581	65209	11896	BB	0.067	0.2789
7	29.944	71727	12743	BB	0.074	0.3068

PATRONS 50 mg/ml

#	Temps de retenció	Àrea	Alçada	Tipus	Amplada	Àrea %
	5.502	895	118	MM	0.126	0.0053
	6.393	621	135	MM	0.077	0.0037
	6.809	1129045	129443	BB	0.108	6.6672
	8.284	15668000	2665541	FB	0.098	92.5227
	13.999	5785	1194	BB	0.058	0.0342
	21.551	63654	11613	BB	0.070	0.3759
	29.908	66218	11798	BB	0.073	0.3910

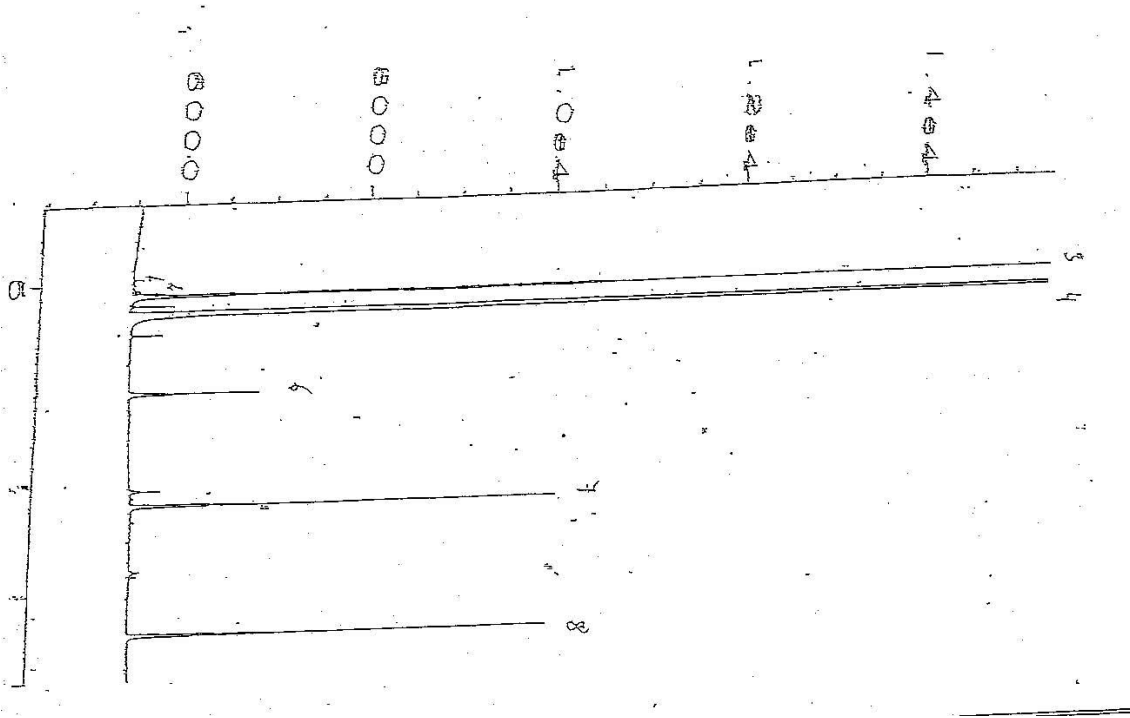
PATRONS 250 mg/ml

#	Temps de retenció	Àrea	Alçada	Tipus	Amplada	Àrea %
	5.624	4353	585	MM	0.124	0.0192
	6.538	4976	821	MM	0.101	0.0219
	6.962	1253822	134722	FB	0.111	5.5257
	8.427	21231900	2587769	FV	0.098	93.5710
	14.224	27125	5228	BV	0.062	0.1195
	21.793	71801	12826	BB	0.077	0.3164
	30.173	96706	15872	BB	0.082	0.4262

PATRONS 500 mg/ml

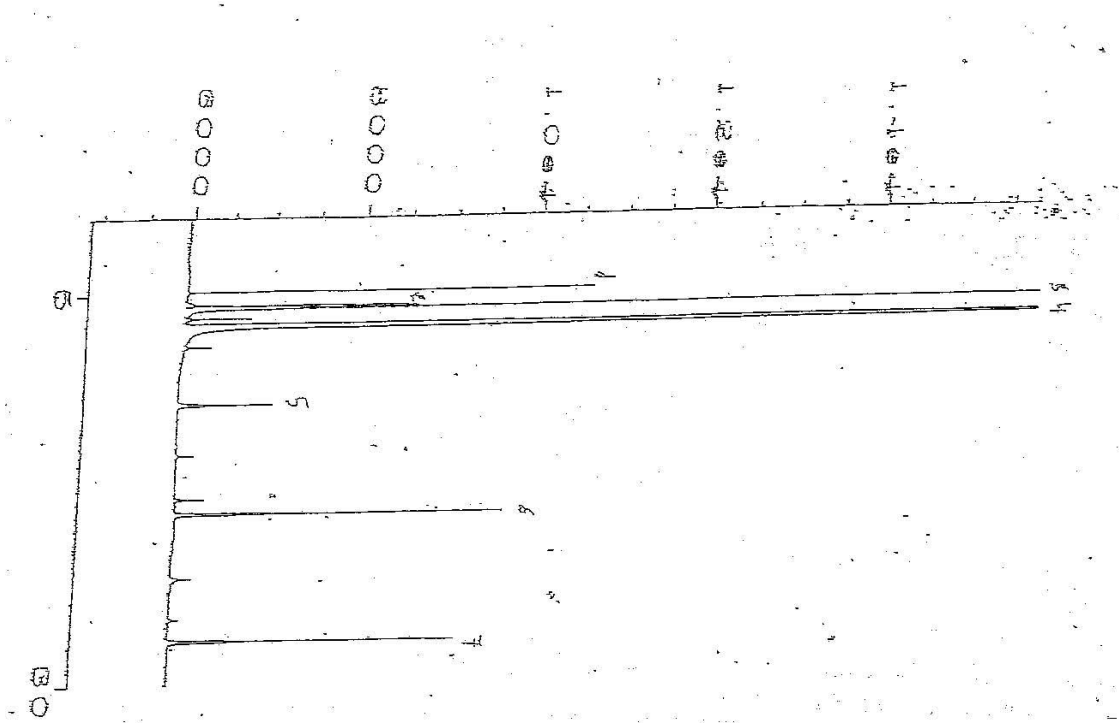
#	Temps de retenció	Àrea	Alçada	Tipus	Amplada	Àrea %
	5.573	11365	1623	MM	0.117	0.0420
	6.484	6791	1190	MM	0.095	0.0251
	6.921	1522146	165039	BF	0.116	5.6218
	8.391	25278300	2843108	FB	0.110	93.3614
	14.202	65833	13334	BB	0.068	0.2431
	21.759	83458	15093	BB	0.081	0.3082
	30.126	107852	17279	BB	0.084	0.3983

VI NEGRE OBERT FA 12 HORES



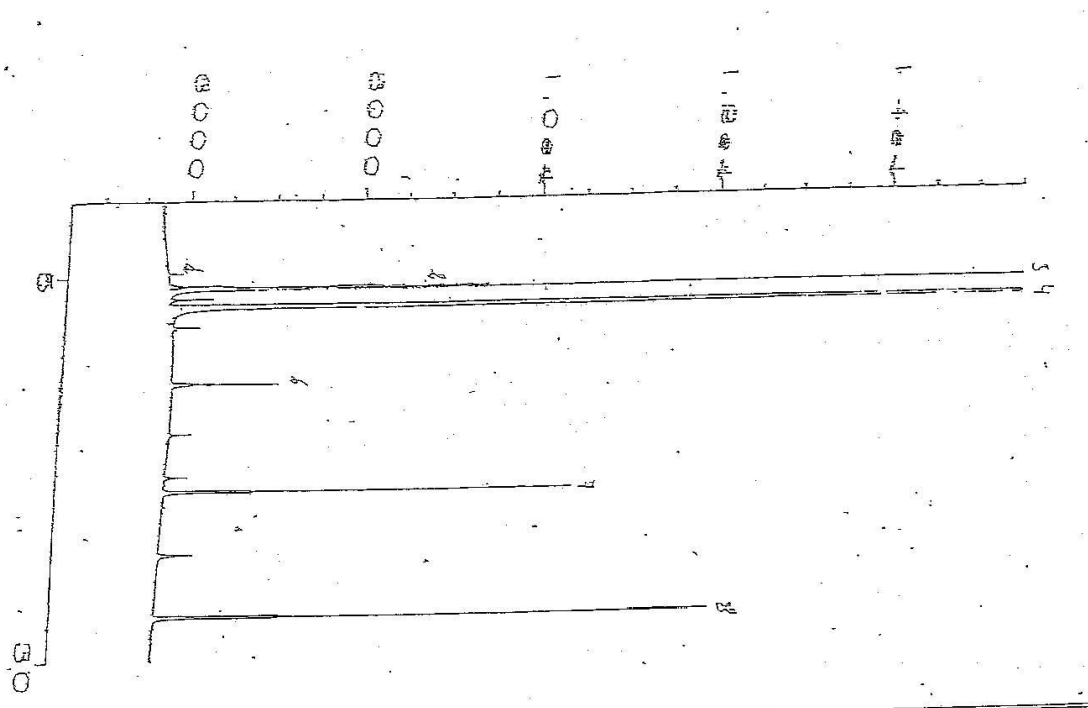
#	Temps de retenció	Àrea	Alçada	Tipus	Amplada	Àrea %
	5.520	219	104	MM	0.035	0.0034
	6.376	753	350	BB	0.027	0.0118
	6.877	298863	103580	BF	0.043	4.6805
	6.925	6031713	1131357	FV	0.072	94.4637
	7.842	7	20	VB	0.006	0.0001
	11.993	7701	1395	BF	0.067	0.1206
	19.033	22975	4530	BV	0.061	0.3598
	30.075	22988	4470	FV	0.062	0.3600

VI NEGRE OBERT FA DIES



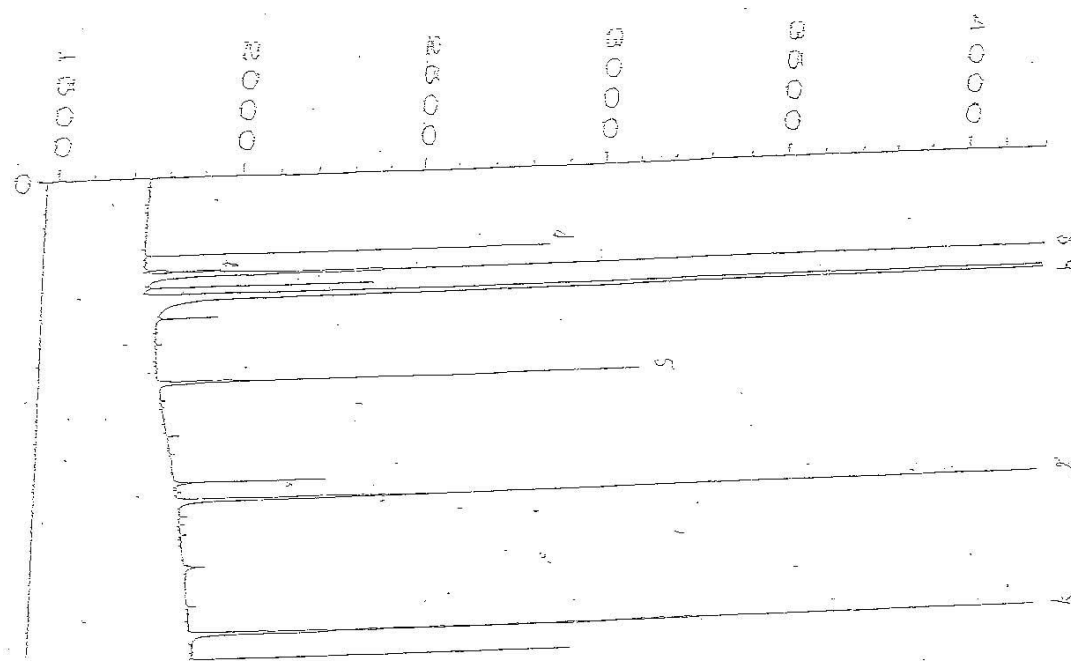
#	Temps de retenció	Àrea	Alçada	Tipus	Amplada	Àrea %
	5.767	9874	4656	PF	0.029	0.1576
	6.437	5782	2622	FV	0.033	0.0923
	6.800	298342	102663	BF	0.044	4.7608
	6.999	5909813	1147133	BB	0.071	94.3055
	12.076	6366	1118	BF	0.069	0.1016
	19.125	19646	3721	BB	0.073	0.3135
	30.175	16848	3216	BB	0.069	0.2689

VI NEGRE ALTERAT



#	Temps de retenció	Àrea	Alçada	Tipus	Amplada	Àrea %
	5.547	318	160	BB	0.024	0.0049
	6.360	7856	3630	BV	0.029	0.1200
	6.770	291422	101965	BF	0.043	4.4521
	6.990	6183068	1166621	BV	0.073	94.4596
	9.222	23	40	VB	0.010	0.0004
	11.971	6748	1219	BF	0.068	0.1031
	19.007	23590	4608	BF	0.066	0.3604
	29.920	32703	6247	FV	0.064	0.4996

VI DE XERÈS



#	Temps de retenció	Àrea	Alçada	Tipus	Amplada	Àrea %
	5.512	2343	1103	BB	0.028	0.0493
	6.390	432	210	BV	0.027	0.0091
	7.276	390981	137352	BB	0.044	8.2335
	8.380	4303465	1188479	FB	0.054	90.6253
	12.833	6782	1321	BB	0.063	0.1428
	20.291	21404	4496	BB	0.062	0.4507
	30.142	23226	4758	BB	0.063	0.4891

2.2. DETERMINACIÓ D'ÀCIDS ORGÀNICS, SUCRES I ALCOHOLS EN VINS MITJANÇANT CROMATOGRFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ (HPLC)

PROTOCOL

1. Dipositar 1 ml de la mostra en un tub Eppendorf d'1,5ml, marcar el nom amb retolador de vidre i centrifugar a 13000g durant 5 minuts.
2. Recuperar 900 ml del sobrenadant amb una pipeta neta i filtrar-lo a través d'un filtre de 0.22 µm prèviament acoblat a una xeringa d'insulina. Filtrar el vi i recollir l'eluït en un tub Eppendorf de 0,5ml.
3. Col·locar els tubs Eppendorf a la gradeta de l'injector automàtic i anotar el nombre de punxada corresponent a cada mostra.
4. Injectar les mostres i processar els resultats.

Descripció de l'equip de HPLC

Les mostres s'injecten en un equip HPLC (Merck-Hitachi) dotat de dos detectors, UV-visible a 210 nm i índex de refracció. S'utilitzen dues columnes HPX-87H Aminex (Bio-Rad) connectades en sèrie precedides d'una precolumna Catió H⁺ (Merck). El senyal cromatogràfic es registra i es processa posteriorment mitjançant un programa informàtic.

Condicions cromatogràfiques

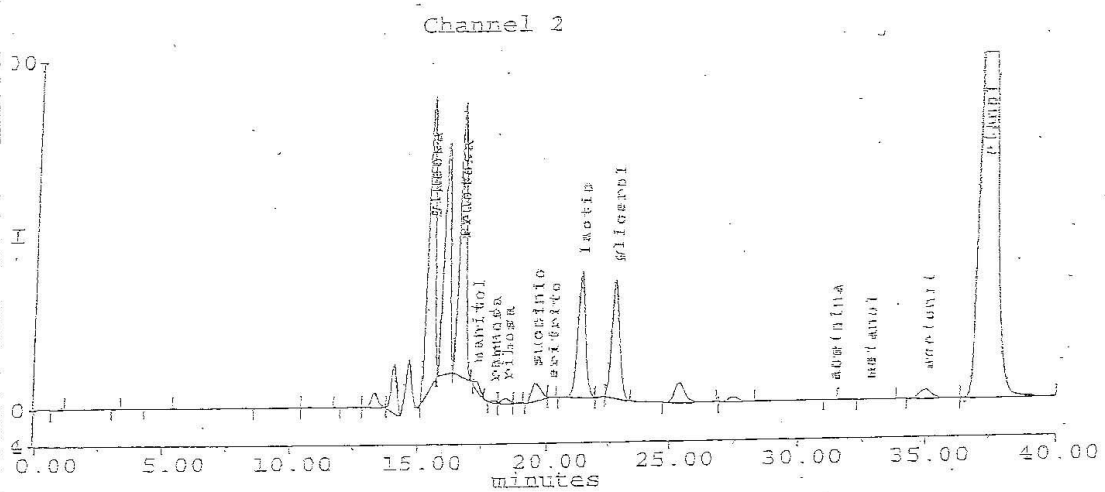
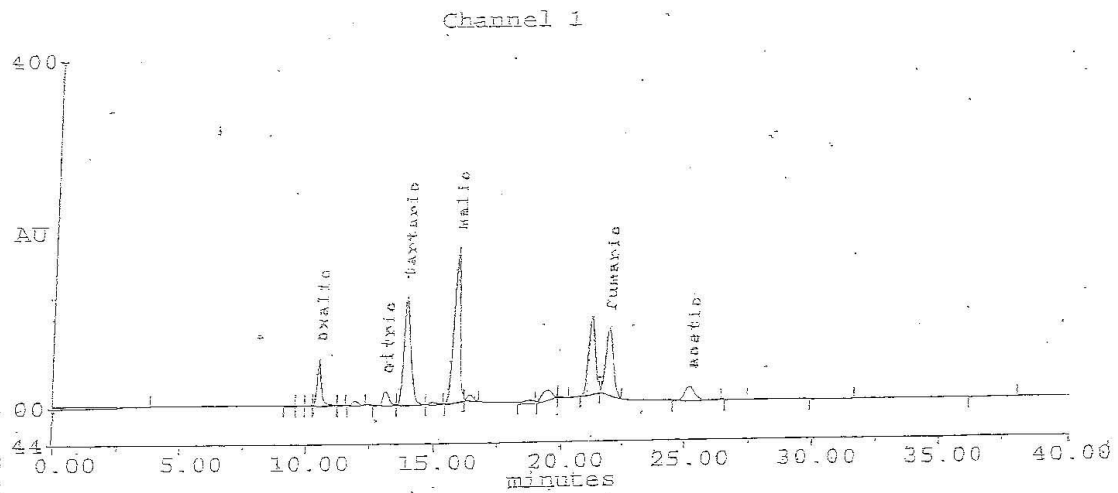
Volum d'injecció	1 µL
Temperatura de treball	60°C
Fase mòbil	0,75mL/L H ₃ PO ₄ al 85% (v/v) en aigua MilliQ
Flux de treball	0,7mL/min

La identificació es du a terme per comparació dels temps de retenció relatius (RRT) amb els obtinguts en les solucions patró. Els àcids orgànics, exceptuant el làctic i el succínic, es determinen amb el detector UV-visible, mentre que els sucres, els alcohols i els dos àcids esmentats mitjançant el detector d'índex de refracció.

La quantificació es du a terme mitjançant interpolació en una recta patró obtinguda per cadascun dels compostos a partir de tres dilucions decimals de patrons externs injectats en les mateixes condicions.

D-6000 HPLC Manager Report

Date: Jun 6, 1997 9:34 Reported: Oct 7, 1997 12:57
 Title : AMINEX 87H Data File : 87-HA052.RW Channels 1&2
 : 87-HA STD3- Inj 1 Vial No. = 0 Vol = 0 ul
 : Aminex 1:1



Title : AMINEX 87H
 Type : AMINEX 87H
 Name : Sergi Ferrer
 :
 : .75 ml/l H3PO4

Rt	Area	Height	g / L
	Channel 1		
10.47	293004	26491	0.136
13.04	107103	7492	0.583
13.79	1125653	62404	4.131
16.76	1365074	89160	10.160
21.07	799250	30420	0.053
25.13	177601	7690	2.000
	Channel 2		
15.34	2817007	170145	10.016
16.67	2723460	167144	10.190
17.19	55870	2701	0.571
17.86	10609	854	0.122
18.35	38009	2412	0.219
19.54	240450	10009	2.050
20.19	1984	159	4.000
21.41	1691000	72412	7.400
22.76	1502912	67016	7.000
31.33	500	24	0.100
32.74	19001	640	0.500
34.96	160326	4907	0.100
37.21	13052603	360023	13.000

Rt	Area	Height	g / L
	Channel 1		
10.45	29355	2665	0.014
13.04	10920	795	0.058
13.85	112400	7954	0.413
16.68	143600	9267	1.016
21.07	77962	3779	0.005
25.13	18702	813	0.200
	Channel 2		
15.33	271357	16653	1.002
16.55	274900	15796	1.019
17.19	5396	271	0.057
17.86	909	82	0.012
18.33	4406	246	0.022
19.83	31136	1177	0.205
31.73	381	17	0.000
32.75	1427	33	0.050
34.97	210750	6639	0.010
37.43	1300370	39805	1.300

Rt	Area	Height	g / L
	Channel 1		
10.46	4700	763	0.001
13.01	864	64	0.006
13.85	10018	800	0.041
16.67	14306	921	0.102
21.07	8072	306	0.001
25.14	2034	86	0.020
	Channel 2		
15.32	20032	1715	0.100
16.66	20610	1614	0.102
19.88	2314	120	0.021
20.11	166	19	0.040
21.39	14449	603	0.074
22.76	17246	767	0.070
31.49	260	25	0.001
33.16	869	39	0.005
34.98	173242	5305	0.001
37.45	140460	4063	0.130

Rt	Area	Height	g / L
	Channel 1		
12.87	26050	1082	
13.88	120154	6690	
15.68	60093	3913	
21.07	19066	1044	
25.14	249914	10063	
15.33	133182	8768	
16.56	171907	8162	
	Channel 2		
17.93	2762	106	
18.42	3712	206	
19.47	67002	2001	
19.91	3511	211	
21.41	146093	6046	
22.77	910141	39094	
29.97	110517	3686	
31.39	56170	1386	
32.83	43400	1435	
34.97	135007	4271	
37.39	4264741	120216	

Rt	Area	Height	g / L
	Channel 1		
13.87	200464	12002	
16.67	17006	1176	
21.03	2122	121	
25.15	54635	2277	
15.33	127070	7600	
16.56	175486	8120	
	Channel 2		
17.98	1235	86	
18.43	3826	193	
19.47	93438	3864	
21.41	405604	18652	
29.32	892949	39241	
31.67	2965	180	
32.83	50680	1700	
34.97	133606	4242	
37.36	4800796	137077	

Rt	Area	Height	g / L
	Channel 1		
13.86	240206	14661	
15.69	292014	18317	
21.07	69036	7970	
26.16	49411	1627	
15.33	90533	5096	
16.66	126900	6709	
	Channel 2		
17.9	7396	474	
18.43	3004	109	
19.47	101306	4245	
21.41	164314	7697	
22.72	966734	42646	
31.63	20183	757	
32.83	64720	1826	
34.97	132604	4235	
37.36	5664964	164799	

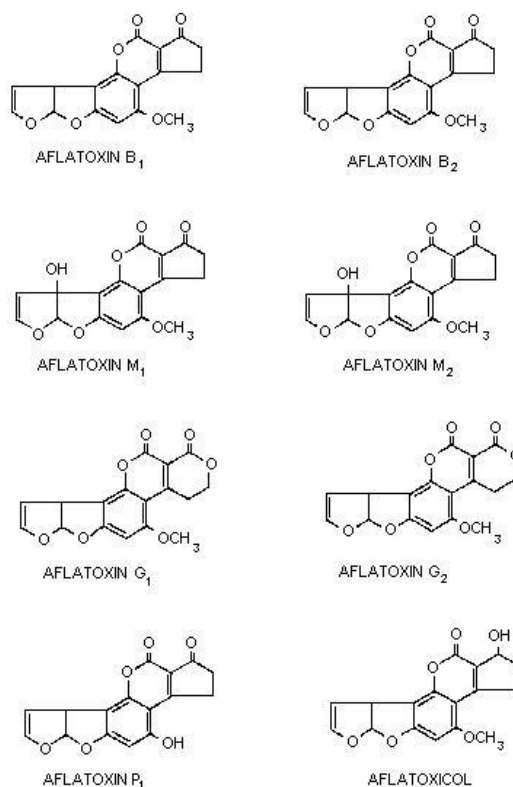
PRÀCTICA 3. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC) DETERMINACIÓ QUALITATIVA D' AFLATOXINES

INTRODUCCIÓ

La cromatografia de capa fina, TLC (de l'anglès *Thin Layer Chromatography*) és una tècnica cromatogràfica utilitzada, entre altres usos, per separar els components purs que formen part d'una mescla. Aquesta separació es basa en la diferent interacció que experimenten els components d'una mescla amb la fase estacionària; una capa fina de material adsorbent immobilitzada sobre un suport inert, i la fase mòbil (dissolvent o mescla de dissolvents que es desplaça per la làmina per capil·laritat. La diferència d'adsorció (diferència de polaritat dels components) es tradueix en un major o menor desplaçament de cada component per la capa fina i en permet la separació i identificació.

Les aflatoxines són micotoxines que es produeixen de manera natural per moltes espècies de fongs del gènere *Aspergillus* (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* i *Aspergillus parasiticus*) així com del gènere *Penicillium*, com *P. verrucosum*.

Les aflatoxines són tòxiques i considerades uns dels productes més carcinogènics per a animals (humans inclosos). Després de l'entrada al cos, les aflatoxines es metabolitzen en el fetge cap a AFB1-8,9-epòxid, un intermediari molt reactiu capaç d'unir-se a proteïnes i àcids nucleics, i alteren el gen p53 supressor de tumors, o bé poden ser hidroxilades i transformar-se en l'aflatoxina M₁, menys perillosa. L'objectiu d'aquesta pràctica és separar les diferents aflatoxines produïdes per dues soques, una d'*Aspergillus flavus*, i un altra d'*Aspergillus parasiticus*.



MATERIAL	PRODUCTES
Medis de cultiu	Cloroform
Vials i tubs de vidre i plàstic	Metanol
Micropipetes	Acetonitril
Llum de llum UV 363 nm	2-propanol
MEDI DE CULTIU	EQUIP DE CROMATOGRAFIA
	Cromatoplaques de silicagel 60
YES (extret de llevat, 5g; glucosa, 30 g; agar, 20 g)	Cubeta de cromatografia

REACTIUS

DISSOLVENT D'EXTRACCIÓ: Cloroform: Metanol (2:1).

DISSOLVENT DE DESENVOLUPAMENT: Cloroform:acetonitril:2-propanol (92:5:3)

MICROORGANISMES:

Aspergillus flavus CECT 2686

Aspergillus parasiticus CECT 2681

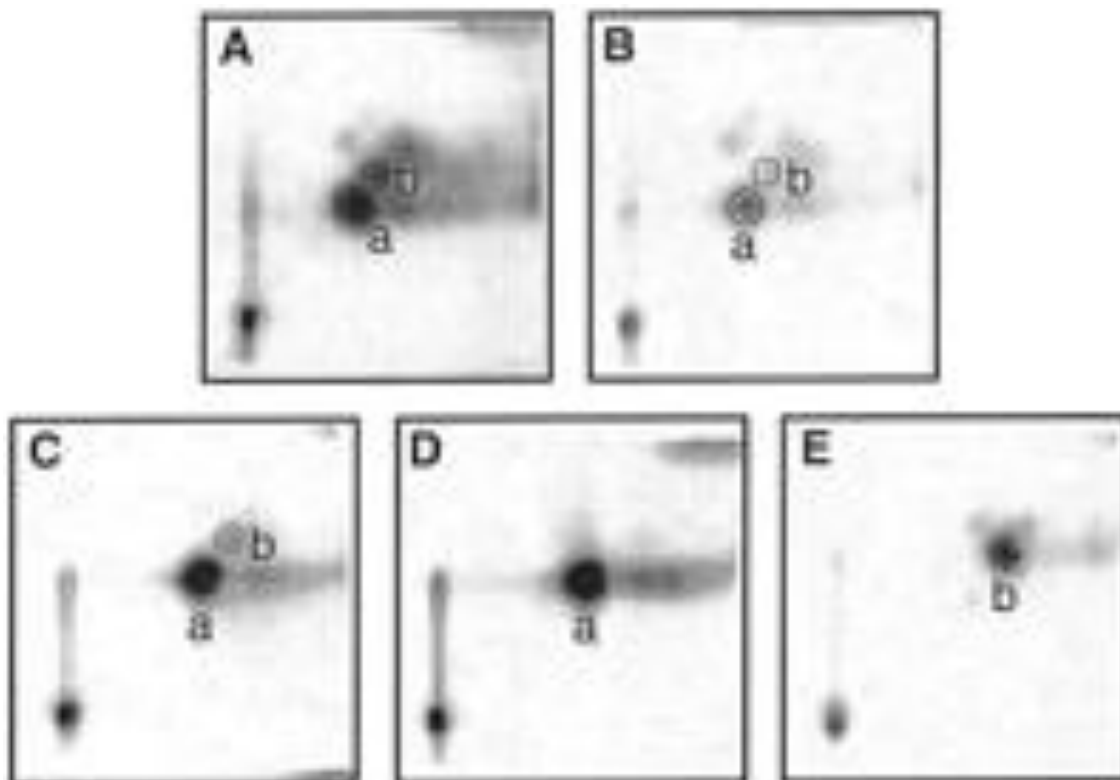
PROTOCOL

A) Extracció d'aflatoxines

1. Tallar l'extrem d'una punta groga i utilitzar la part ampla d'aquesta (per on s'acobla a la micropipeta) a manera de màquina perforadora per agafar tres cilindres de medi de cultiu que contenen miceli i conidis del fong. Introduir els cilindres en un tub Eppendorf de 1,5 mL.
2. Afegir 0,5 ml de solvent d'extracció (Cloroform: Metanol, 2:1 V:V) al tub i agitar intermitentment durant deu minuts.
3. Centrifugar 1 min a màxima velocitat abans d'aplicar 10 µL a la placa de TLC.

B) Cromatografia

1. Marcar amb llapis a la cromatoplaca una línia a 1,5 cm de la vora. Sobre aquesta línia es marquen els punts regularment espaiats en què es dipositaran les mostres problema i els patrons.
2. Amb la finalitat de reduir al màxim l'àrea del punt d'aplicació, pipetejar les mostres problema i patrons dipositant 2 μ L cada vegada i deixant assecar un poc entre aplicacions.
3. Abocar 100 ml de dissolvent de desenvolupament a la cubeta de cromatografia. Posar la cromatoplaca amb la zona d'aplicació a la part inferior de la cubeta. Tancar la cubeta de cromatografia.
4. Deixar desenvolupar la cromatografia fins que el dissolvent pugue uns 15 cm. Traure la cromatoplaca i deixar-la assecar a l'aire.
5. Observar la placa amb il·luminació UV i comparar les taques fluorescents de la solució patró d'aflatoxines amb les de les mostres.

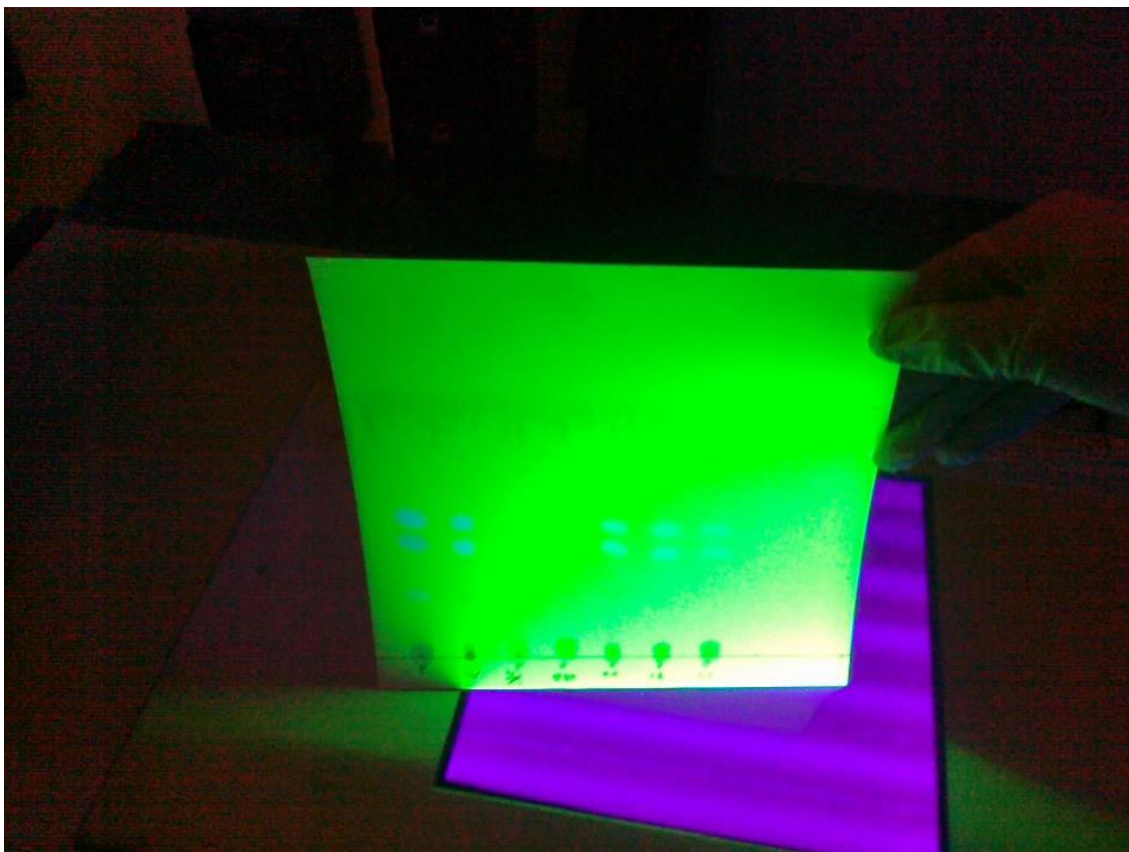


RESULTATS

A partir del resultat de la cromatografia, caldria calcular el factor de retenció (R_f). És el quocient entre la distància recorreguda pel compost i la distància recorreguda pel front de dissolvent. Aquest paràmetre depèn de la naturalesa de la fase estacionària i de la fase mòbil, i és característic de cada compost. D'aquesta manera, l' R_f d'una substància es mantindrà constant entre experiments sempre que les condicions cromatogràfiques siguin les mateixes (adsorbent, eluent, temperatura).

El valor d'aquest paràmetre oscil·la entre 0 i 1. Els compostos apolars interaccionen poc amb la fase estacionària, de manera que el recorregut per la làmina és gran, i per aquest motiu presenten factors de retenció elevats. Contràriament, els compostos polars interaccionen fortament amb la fase estacionària, es desplacen menys per la làmina i, per tant, tenen factors de retenció menors.

Heu de calcular el R_f de les dues taques blaves (aflatoxines majoritàries).



PRÀCTICA 4. ELECTROFORESI DE PROTEÏNES. OBTENCIÓ I ELECTROFORESI DE PRODUCTES EXTRACEL·LULARS (ECPs)

INTRODUCCIÓ

L'objectiu d'aquesta pràctica consisteix a obtenir les proteïnes excretades per bacteris (ECPs; *extracellular proteins*) i la seua separació mitjançant electroforesi, utilitzant dos tipus de PAGE-SDS (electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecil sulfat sòdic): en condicions reductores i no reductores.

Algunes espècies bacterianes secreten al medi exoenzims encarregats de degradar substrats que per la seua gran mida no poden ser internalitzats per les cèl·lules. Per a obtenir aquestes ECPs, utilitzarem el mètode del paper de cel·lofana (Liu, 1957, *J. Bacteriol.* 74: 718-727), que consisteix a posar sobre la superfície d'un medi de cultiu sòlid una làmina de cel·lofana estèril i sembrar sobre aquesta un cultiu en gespa. Una vegada crescut, es recullen les cèl·lules de la superfície rentant amb tampó i la cel·lofana evita l'arrossegament del medi de cultiu. D'aquesta manera s'aconsegueix recuperar les ECPs, a nivell adequat per a analitzar-les, sense necessitat de concentrar.

Una vegada recollits els ECPs, es calcularà la concentració de proteïna que contenen per determinar el volum de cada mostra que calga carregar en el gel. A continuació, es prepararan les mostres que se separaran per electroforesi barrejant el volum adequat d'ECPs amb tampó de mostra amb i sense mercaptoetanol, segons siguin per electroforesi en condicions reductores o no reductores, respectivament.

Després de carregar les mostres en els gels i sotmetre-les a electroforesi, es durà a terme la detecció de les proteïnes separades, mitjançant tinció, i la interpretació dels resultats obtinguts.

MATERIALS

- Cultius crescuts en placa amb cel·lofana de: *Aeromonas hydrophila*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Bacillus* sp.
- Tubs Eppendorf, pipetes automàtiques, puntes estèrils, anses Digrafsky
- Tampó fosfat salí(PBS)
- BSA (seroalbúmina bovina) 1 mg/ml
- Reactiu de Bradford
- Tampó de mostra amb i sense mercaptoetanol
- Gels de poliacrilamida amb SDS
- Tampó de cubeta
- Solució de Blau Coomassie R
- Solució de destenyida per gels tenyits amb Blau Coomassie R
- Espectrofotòmetre i cubetes de plàstic
- Centrífuga
- Cubeta d'electroforesi i font d'alimentació

PROCEDIMENT

Recollida de les ECPS

- Posar 1 ml de PBS en la superfície de la placa i recollir les cèl·lules amb ajuda de la nansa Digrafsky, inclinant la placa i en condicions d'esterilitat.
- Recollir la suspensió de cèl·lules, amb una pipeta, en un tub Eppendorf estèril.
- Centrifugar a 12.000 rpm 10 minuts a 4°C.
- En un nou Eppendorf, recollir el sobrenedant i tornar a centrifugar en les mateixes condicions.
- En un altre Eppendorf, recollir el sobrenedant amb compte de no agafar cèl·lules. Mantenir les mostres en gel.
- Calculeu la concentració de proteïna (mètode de Bradford).

Determinació de la concentració de proteïna en les mostres (mètode de Bradford)

- A partir d'una solució d'1 mg/ml de BSA (seroalbúmina bovina), preparar dilucions segons l'esquema següent:
 - En un tub net posar: el volum corresponent (vegeu la taula) de PBS, de BSA i el de reactiu de Bradford.
 - Per a les mostres, posar en un tub net: de 2-5µl de mostra, completar amb PBS fins a 800µl+ 200µl de reactiu de Bradford.
- Llegir transcorreguts entre 5 i 30 min en espectrofotòmetre a 595nm.
- Calcular la concentració de proteïna de les mostres emprant els valors d'absorbància dels patrons.
- En dos nous tubs Eppendorf posar la quantitat de mostra necessària per carregar 15µg de proteïna per vaset del gel i afegir el volum corresponent de tampó de mostra amb mercaptoetanol en un tub i sense mercaptoetanol en un altre.

µl de sol de BSA 1 mg/ml	µl de tampó (PBS)	µl de reactiu
4	796	200
8	792	200
12	788	200
16	784	200
20	780	200
0	800	200

ELECTROFORESI

1. Posar els gels en la cubeta i posar tampó d'electroforesi segons les instruccions de cada sistema.
2. Carregar les mostres. En un pouet posar 10 µl del patró de pesos moleculars.
3. Carregar en un gel les mostres que porten tampó de mostra reductor i en un altre les que porten tampó de mostra no reductor.
4. Anotar l'ordre de col·locació de les mostres i el patró.
5. Connectar els elèctrodes i córrer a un voltatge constant de 200V. Dura aproximadament 1h.

TINCIÓ DE GELS DE PROTEÏNES

En acabar l'electroforesi traure acuradament el gel dels vidres i submergir-lo en una cubeta que continga la solució de tinció. Deixar com a mínim 30 minuts o tota la nit, amb agitació suau. Després de la tinció, el gel quedarà completament blau. Per destenyir el fons mantenint tenyides únicament les proteïnes, submergir el gel en la solució de destenyida. Canviar la solució cada mitja hora fins que apareguen bandes blaves sobre un fons transparent.

Solució de tinció

Blau Coomasie R 0,3% (p/v)
Metanol 150 ml
Àcid acètic glacial 30 ml
Aforament a300 ml amb aigua destil·lada

Solució de destenyida de gels de proteïnes

Àcidacèticglacial10% (v/v) Metanol 10 % (v/v)

Tampó de mostra

62.5 mM Tris-HCl pH 6,8 10 % glicerol 2 % de SDS
0.05 % blau de bromofenol (addicionar 5 % de mercaptoetanol al tampó de mostra reductor)

Tampó de cubeta

25 mM Tris base 192 mM glicina, a pH 8,3
0.1 % SDS

Tampó PBS

50 mM Tampó fosfat pH 7.4 150 mM NaCl

Products for Electrophoresis

Catalog #	Description
161-0363	Precision Plus Protein Standards, unstained, 1,000 µl
161-0373	Precision Plus Protein Standards, all blue, 500 µl
161-0374	Precision Plus Protein Standards, dual color, 500 µl
161-0737	Laemmli Sample buffer, 30 ml
161-0786	Bio-Safe™ Coomassie Stain, 1 L

Coomassie is a trademark of BASF Aktiengesellschaft.

BIO-RAD

Bio-Rad Laboratories, Inc.
2000 Alfred Nobel Dr., Hercules, CA 94547 USA
(510) 741-1000 4110182 Rev D

Instruction Manual

Precision Plus Protein™ Standards

Kaleidoscope™

Catalog #161-0375
Product shipped at room temperature.
Store at -20°C upon arrival.

BIO-RAD

Representative lot of Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ prestained standards on a Criterion™ 4-20% Tris-HCl Gel



The Precision Plus Protein Kaleidoscope standards provide a 10-band, broad range recombinant ladder with multiple colors. These standards have five colors: a yellow 10 kD band, a green 37 kD band, a purple 150 kD band, pink 25 kD and 75 kD bands, and blue 15, 20, 50, 100, and 250 kD bands. The colors allow easy band referencing and blot orientation.

Ideal applications and uses for Precision Plus Protein Kaleidoscope standards:

Application:	Use:
Gel electrophoresis	Migration path monitoring during the run
Western blotting	Assessing transfer efficiency and estimating MW
Blot development	Visual reference of MW for proteins of interest

Product Description

Precision Plus Protein Kaleidoscope standards contain ten recombinant protein bands of 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, and 250 kD.

Recombinant prestained protein standards are carefully engineered for precise and accurate molecular weights. The staining process has been optimized to guarantee the same electrophoretic molecular weight with each lot. Traditional prestained proteins, on the other hand, are blended from naturally occurring proteins. They have an inherent variability in the amount and location of dye that covalently binds to the protein; this produces diffuse, broader bands than those of the recombinant prestained standards and the resulting molecular weights vary from lot to lot.

Molecular Weight Estimation

The molecular weights of Precision Plus Protein Kaleidoscope standards are confirmed by migration in a Laemmli SDS-PAGE system. Using Precision Plus Protein Kaleidoscope standards, the molecular weight of an unknown protein can be assessed at an accuracy of 95%. See Figure 1 below for an r^2 plot. For electrophoretic determination of molecular weights at an accuracy of >95%, Precision Plus Protein standards, unstained (catalog #161-0363), should be used.

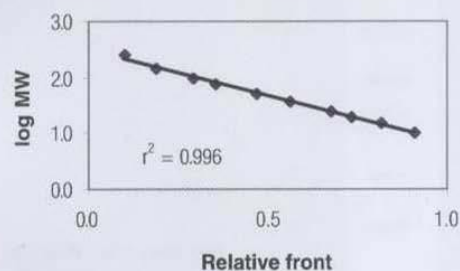


Fig. 1. r^2 plot for Precision Plus Protein Kaleidoscope standards determined on a Criterion 4–20% gel. r^2 values >0.99 are typical for Precision Plus Protein Kaleidoscope standards.

Specifications

Catalog #	161-0375
Volume	500 μ l
Number of applications	50
Loading buffer	30% (w/v) glycerol, 2% SDS, 62.5 mM Tris, pH 6.8, 50 mM DTT, 5 mM EDTA, 0.02% Na ₂ S ₂ O ₃
Shelf life	12 months at -20°C *
	* If the product has been stored as directed for 12 months, its shelf life may be extended by adding dithiothreitol (DTT) to approximately 50 mM.
Total protein conc.	1.5 mg/ml

Instructions for Use

Precision Plus Protein Kaleidoscope standards are provided in loading buffer, and are ready to load with no dilution required. Allow the tube to reach room temperature and thoroughly mix before use by inversion or vortexing. This will ensure that any solids that may have precipitated at -20°C have returned to solution. Do not heat the product above room temperature. The product is stable from -70°C to 25°C . The product has been denatured and exposure to temperatures over 25°C could result in protein degradation.

Recommended Loading Volumes

Load Volume	Application
10 μ l	Mini gel electrophoresis
5 μ l	Mini gels to be blotted, to monitor transfer
20 μ l	Large gel electrophoresis

PATRONS

Utilitzarem dues proteïnes model, la immunoglobulina G (IgG) i la albúmina bovina del sèrum (BSA). La IgG és una de les cinc classes d'anticossos humorals produïts per l'organisme. Es tracta de la immunoglobulina predominant en els fluids interns del cos, com són la sang, el líquid cefaloraquidi i el líquid peritoneal. Aquesta proteïna especialitzada se sintetitza per l'organisme en resposta a la invasió de bacteris, fongs i virus.

La IgG és l'única classe d'immunoglobulina que travessa la placenta i transmet la immunitat de la mare al fetus. La IgG constitueix el 80% de les immunoglobulines totals. És la immunoglobulina més petita, amb una massa molecular de 150.000 Daltons, així pot passar fàcilment del sistema circulatori del cos als teixits. La síntesi de la IgG es controla principalment per l'estímul dels antígens. En el cas dels animals axènics (sense microbis), amb nivells d'IgG molt baixos, el nivell d'IgG s'eleva quan se'l trasllada a un ambient normal.

Uns nivells elevats en sang d'una IgG específica (enfront d'un germen) solen ser indicatius d'una infecció antiga o crònica per a aquell germen.

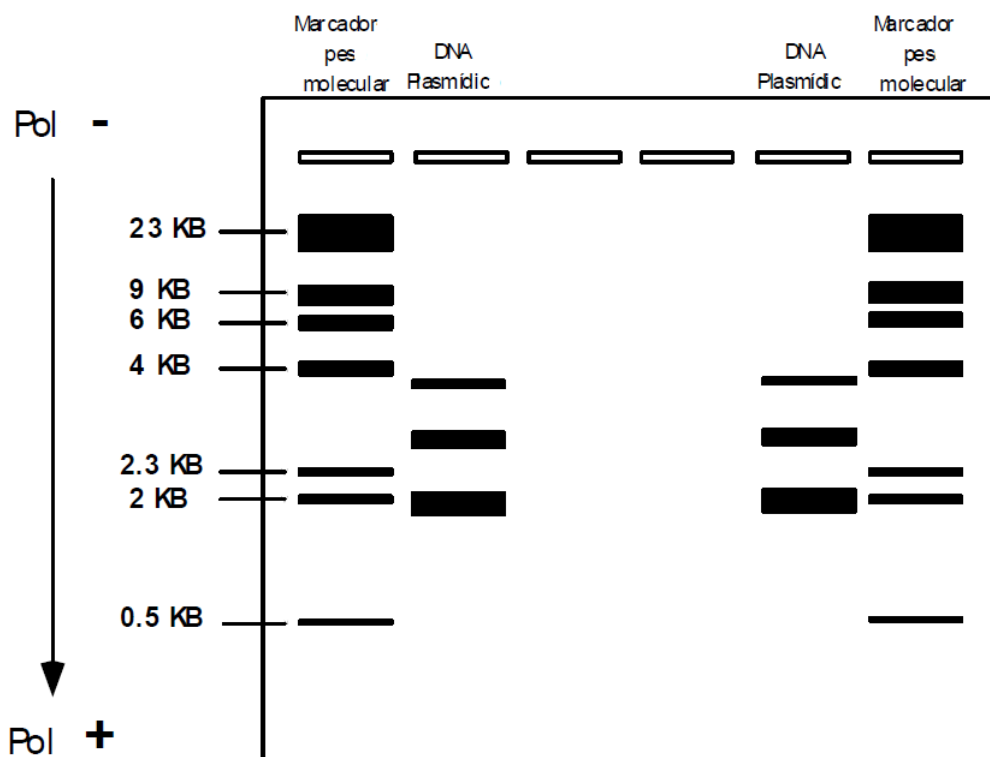
RESULTATS

En annex I.

PRÀCTICA 5. ELECTROFORESI D'ÀCIDS NUCLEICS. AÏLLAMENT DE DNA PLASMÍDIC

INTRODUCCIÓ

L'electroforesi en gel d'agarosa és de les més utilitzades per analitzar i caracteritzar àcids nucleics de diferents procedències. Els gels es comporten com un tamís molecular i permeten separar molècules carregades en funció de la seua mida i forma. Així, molècules de DNA de diferent grandària emigraran de manera diferent en una electroforesi en gel d'agarosa. A més, si en aquesta electroforesi s'apliquen marcadors de pes molecular (fragments de DNA de mida coneguda), es pot calcular la mida aproximada del DNA en estudi. En aquesta pràctica, es pretén que l'alumnat compregua el fonament teòric d'aquesta tècnica i les seues aplicacions, i que duga a terme la separació electroforètica en gel d'agarosa de DNA plasmídic que l'alumnat mateix aïllarà en la primera sessió i purificarà a partir d'un cultiu bacterià (*Escherichia coli*). S'han desenvolupat un gran nombre de mètodes per a la purificació de DNA plasmídic de bacteris i tots ells impliquen invariablement tres passos: creixement de la soca bacteriana portadora, recollida i anàlisi dels bacteris i purificació del DNA plasmídic. A continuació, el DNA aïllat es pot analitzar mitjançant electroforesi en gel d'agarosa.



PROTOCOL D'EXTRACCIÓ

- 1) A partir d'1 ml d'un cultiu bacterià de 18 hores, es recullen les cèl·lules per centrifugació en Eppendorf a 12.000 rpm, 5 min.
- 2) Resuspendre les cèl·lules en 0,2 ml de solució GETL, incubar 5 minuts en gel.
- 3) Afegir 0,4 ml de solució NS i barrejar per inversió diverses vegades. Deixar almenys 10 min en gel.
- 4) Afegir 0,3 ml d'una solució KAc mantinguda prèviament en gel, remoure per inversió ràpida diverses vegades. Deixar almenys 10 min en gel.
- 5) Centrifugar a 12000 rpm 15 min.
- 6) Passar 0,75 ml del sobrenadant a un tub Eppendorf net amb cura de no arrossegar cap material precipitat.
- 7) Afegir 0,45 ml de isopropanol a -20 °C. Barrejar bé. Deixar 30 min a -20 °C.
- 8) Centrifugar a 12000 rpm 10 min.
- 9) Eliminar la major part possible del sobrenadant decantant. Rentar el precipitat amb 1 ml d'etanol del 70% a 4 °C. Centrifugar a 12000 rpm 5 min a temperatura ambient.
- 10) Eliminar el sobrenadant al màxim i assecar 5 min a 37 °C.
- 11) Resuspendre el sediment en 50-100 µl de TE
- 12) Guardar les mostres a 4 °C

SEPARACIÓ PER ELECTROFORESI

Agafar 8 µl de mostra i barrejar amb 2 µl de tampó de càrrega. Sotmetre a electroforesi en gel d'agarosa al 0,8% en TBE 0.5x a voltatge constant (80 V).

MATERIALS I SOLUCIONS

GET

50 mM glucosa

10 mM EDTA pH 8.0

25 mM Tris HCl pH 8.0

Aquesta solució es pot guardar a 4 °C. Just abans d'utilitzar-la, s'afegeix lisozim a una concentració final de 5 mg/ml.

KAc

60,0 ml 5 M Kac

11,5 ml àcid acètic glacial

28,5 ml aigua

NS

20 ml NaOH 1.0 N

5 ml SDS al 20%

75 ml aigua

Aquesta solució ha de ser de preparació recent (no utilitzar mai si no és de la mateixa setmana).

TE

10 mM Tris • HCl pH 8.0 1 mM EDTA pH 8.0

TBE 0.5x

0,045 M Tris-borat pH 8.0

0,001 M EDTA pH 8.0

Tampó de càrrega

30% Glicerol

0,25% Blau de bromofenol

Gel d'agarosa

0,8 g agarosa

100 ml TBE 0.5x pH 8.0

Referència bibliogràfica soca *E. coli* V517 (marcador pes molecular plasmídic)

—Macrina, F. L.; Kopecko, D. J.; Jones, K. R.; Ayers, D. J. i McCowen, S. M. (1978):
“A multiple plasma-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasma molecules”. *Plasmid*, núm. 1: pàg. 417-420.

RESULTATS

En annex II.