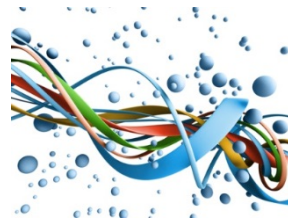
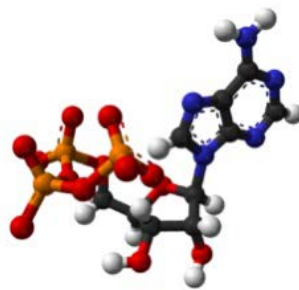




DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR



MANUAL DE PRÀCTIQUES INTEGRADES DE MÈTODES

GRAU EN BIOTECNOLOGIA

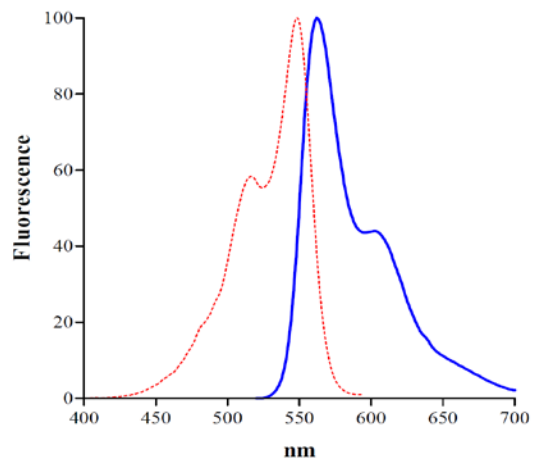
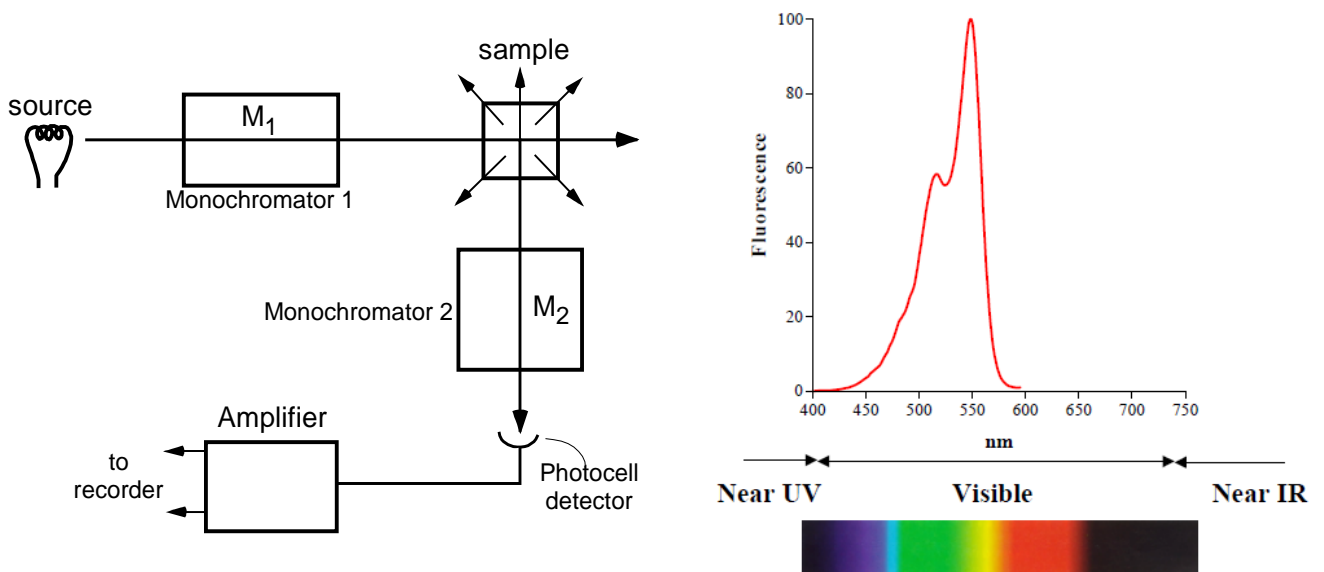


UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

GRAU EN BIOTECNOLOGIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA
MOLECULAR

PRÀCTIQUES INTEGRADES DE MÈTODES
Primera part



PRÀCTICA 1

INTRODUCCIÓ A L'ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISIBLE

1.1. Introducció

En aquesta pràctica pretenem que els estudiants es familiaritzen amb l'espectrofotometria UV-visible. S'hi utilitzarà tant l'espectrofotòmetre UV-visible com la seua versió limitada a la llum visible, el colorímetre. Tots dos instruments s'empraran en aquesta sessió per a dur a terme experiències similars a les que es realitzen més freqüentment als laboratoris de bioquímica: determinació de concentracions de substàncies cromòfòres en solució; determinació de coeficients d'extinció; obtenció d'espectres d'absorció i estudi de la influència de l'entorn sobre aquests; identificació de punts isobèstics i anàlisi de mescles de cromòfors.

L'hemoglobina, un dels cromòfors que utilitzarem en aquesta sessió, és una proteïna globular constituïda per quatre subunitats, $\alpha_2\beta_2$ (figura 1), localitzada en els eritròcits i encarregada de transportar el O_2 des dels pulmons fins als teixits.

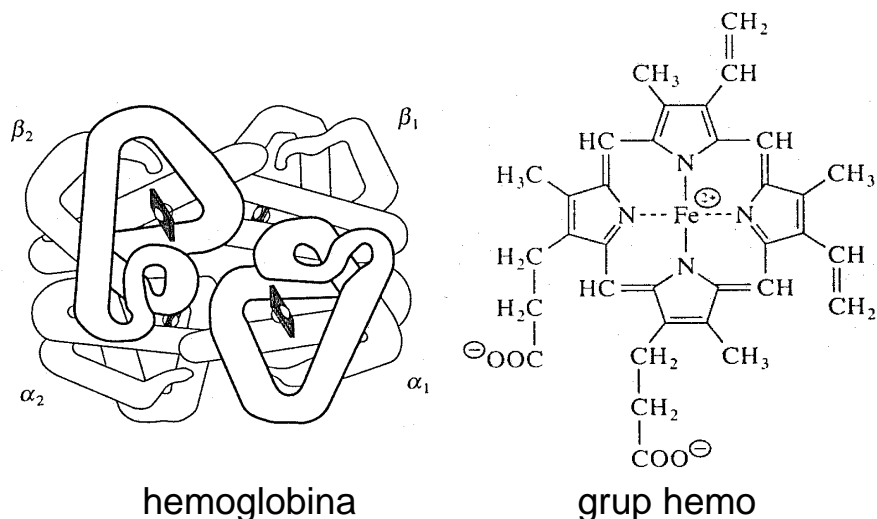


Figura 1. Estructura de l'hemoglobina que mostra les quatre cadenes polipeptídiques constituents, amb els grups hemo units en butxaques hidrofòbiques, i l'estructura del grup hemo.

El color roig característic de la sang és degut precisament a l'hemoglobina, que absorbeix en diverses longituds d'ona. La més intensa és la banda d'absorció a 405 nm (llum blava). En aquesta

longitud d'ona la proteïna presenta un coeficient d'extinció elevat, indicatiu d'una alta probabilitat d'absorbir un fotó per a donar lloc a la transició electrònica corresponent.

Cada molècula d'hemoglobina conté 4 grups hemo, cadascun associat a una cadena polipeptídica (figura 1). El grup hemo és el responsable de la forta absorció de l'hemoglobina en la zona del visible.

En aquesta pràctica determinareu experimentalment el coeficient d'extinció (ϵ^{1M} i $\epsilon^{0,1\%}$) de l'hemoglobina a 405 nm amb la utilització de l'hemoglobina purificada. Posteriorment, amb aquest paràmetre, calculareu la concentració d'hemoglobina en una solució problema.

L'altre cromòfor que analitzareu és el blau de bromofenol (figura 2). Aquest compost presenta dos grups fenòlics ionitzables (indistingibles) responsables de l'absorció de llum visible. La forma protonada i desprotonada del blau de bromofenol presenta diversos espectres d'absorció amb diferents $\lambda_{m\grave{a}x}$. i, per això, els valors d'absorbància de les seues solucions depenen del pH.

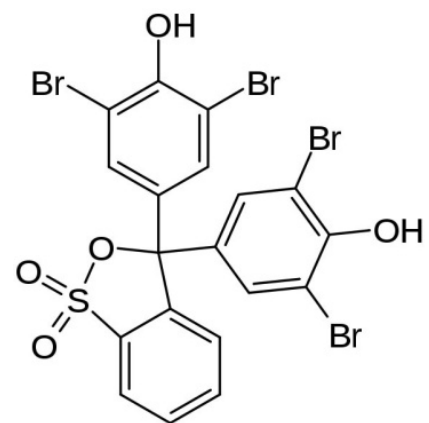


Figura 2.
Estructura del blau de bromofenol.

Heu d'observar els canvis de les propietats espectroscòpiques del cromòfor segons l'estat d'ionització. Aprofitareu l'existència de dos cromòfors en una solució per a dur a terme una anàlisi de mesclades per a determinar les concentracions de cadascun d'aquests. Per a això, ambdues espècies han de tenir espectres d'absorció diferents i cal conèixer el ϵ a dos λ per a cadascuna de les substàncies. Així podreu establir un sistema de dues equacions que permet el càlcul de la concentració de cada espècie.

$$A_{\lambda 1} = \epsilon_{\lambda 1,a} \cdot l \cdot C_a + \epsilon_{\lambda 1,b} \cdot l \cdot C_b$$

$$A_{\lambda 2} = \epsilon_{\lambda 2,a} \cdot l \cdot C_a + \epsilon_{\lambda 2,b} \cdot l \cdot C_b$$

1.2. Materials, reactius i solucions

Materials

- Colorímetre
- Gradeta de tubs d'Eppendorf
- Pipetes Pasteur i xumets
- Pipetes de vidre: 1, 2, 5 i 10 mL
- Cubetes de colorímetre de plàstic 1 mL
- Pipetes automàtiques: 1000, 200 i 20 μ L
- Espectrofotòmetre
- Provetes: 50 i 100 mL
- Tubs Corning de 15 mL (4) i de 50 mL (2)
- Agitador de tubs
- Propipeta

Reactius

- Hemoglobina (bovina, Mr 60000, Sigma, H-2625)
- Blau de bromofenol (Merck 1.08122). MM 670; $pK_a = 4,2$

Solucions

- Solució Tris base 0,2 M, ja preparada; aquesta solució s'utilitzarà per a preparar 50 mL de solució amortidora de pH, Tris 10 mM, pH 8,0, ($pK_a = 8,1$) utilitzant també la següent solució de HCl.
- Solució HCl 0,1 M. Ja preparada.
- Solució amortidora de citrat sòdic, 0,2 M pH: 2,4; 3,4; 4,2 i 5,8. Aquestes solucions s'han de preparar a partir d'àcid cítric (Panreac, 141808) ajustant el pH desitjat amb NaOH concentrat. Ja preparat (5 mL/grup).
- Solució d'hemoglobina de 4 mg/mL en un amortidor de Tris-HCl pH 8,0. Ja preparat (5 mL/grup).
- Solucions d'hemoglobina problema X i Y de concentració desconeguda (2 mL de cadascuna/grup).
- Solució de blau de bromofenol 0,2 mg/mL en aigua. Cada grup prepararà 10 mL de blau de bromofenol a 0,02 mg/mL per dilució de l'anterior solució.

1.3. Procediment experimental

1.3.1. Espectrofotometria de l'hemoglobina

Determinació del coeficient d'extinció de l'hemoglobina

Comenceu preparant 50 mL de solució amortidora de pH Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 a partir de Tris base 0,2 M i HCl 0,1 M. Feu els càlculs adients, agafeu el volums corresponents de les solucions de partida, enraseu a 50 mL amb aigua i comproveu el pH amb pH-metre.

A continuació prepareu les diferents solucions d'hemoglobina de concentracions conegudes, les quals us serviran per a demostrar la dependència lineal entre l'absorbància i la concentració d'un cromòfor (lleï de Lambert-Beer). Això us permetrà, a més, obtenir el coeficient d'extinció (ϵ) de l'hemoglobina a la longitud d'ona de les mesures (405 nm).

A continuació, heu de preparar dilucions seriadades de la solució d'hemoglobina 4 mg/mL. Cada solució serà una dilució 1/2 de l'anterior fins a completar la sèrie següent: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 i 1/256.

Així, per exemple, per a realitzar la dilució 1/2, heu de barrejar en un tub 1 mL de la solució d'hemoglobina 4 mg/mL en un amortidor de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, amb 1 mL del mateix amortidor. Cal tapar el tub i agitar-lo.

A continuació, a partir de la dilució 1/2, heu de preparar en un altre tub la dilució 1/4, tot mesclant 1 mL de la dilució 1/2 amb 1 mL de l'amortidor. Així, successivament, heu de fer les dilucions anteriorment assenyalades.

Nota: és important agitar bé les solucions abans d'agafar una altra mostra per a realitzar la dilució següent.

Ajusteu el colorímetre a zero (amb la longitud d'ona seleccionada a 405 nm) emprant una cubeta que continga només dissolvent (solució amortidora de Tris-HCl de 10 mM, pH 8,0). Després de tancar la cambra de mesura cal ajustar a zero. No heu de tornar a tocar aquest botó durant tota la presa de mesures.

Mesureu l'absorbància a 405 nm de les dilucions d'hemoglobina preparades. Es recomana començar a mesurar per les més diluïdes i continuar amb les concentracions creixents. D'aquesta manera no cal rentar la cubeta entre mesures, n'hi ha

prou amb invertir-la i recolzar-la sobre un paper absorbent per a eixugar-la. Una vegada introduïda la cubeta que conté la mostra, cal anotar el valor d'absorbància.

Representeu gràficament la A_{405} en funció de la concentració d'hemoglobina (mg/mL o molar; MM hemoglobina 60000) en cada mostra. Cal determinar el rang en què es compleix la llei de Lambert-Beer.

A partir de la representació gràfica obtinguda, calculeu el valor del coeficient d'extinció de l'hemoglobina $\epsilon_{405}^{0,1\%}$ [coeficient d'extinció al 0,1 % (p/v)] a 405 nm. També heu d'obtenir el ϵ_{405}^{1M} (coeficient d'extinció molar).

Determinació de la concentració d'hemoglobina en solucions problema

Mesureu, de la mateixa manera que abans, l'absorbància a 405 nm de les solucions problema d'hemoglobina X i Y. Determineu, a partir dels coeficients d'extinció, o mitjançant la interpolació en la gràfica anteriorment preparada, les concentracions d'hemoglobina d'aquestes solucions.

Tenint en compte la possibilitat que alguna solució problema estiga excessivament concentrada i que el valor d'absorbància no caiga en la zona lineal de la representació (fora del rang en què es compleix la llei de Lambert-Beer), realitzeu les dilucions i les mesures oportunes per a confirmar els valors de concentració d'hemoglobina obtinguts.

1.3.2. Espectres d'absorció del blau de bromofenol

Influència del pH sobre l'espectre d'absorció del blau de bromofenol

Prepareu quatre tubs i retoleu en cada tub els valors de pH següents: 2,4; 3,4; 4,2, i 5,8. Pipetegeu de cada tub:

1 mL de solució de blau de bromofenol [0,02 mg/mL, que heu de preparar per dilució de una solució estoc més concentrada (0,2 mg/mL). Prepareu 10 mL].

1 mL de solució amortidora del citrat corresponent.

Els quatre tubs han de contenir, doncs, blau de bromofenol amb la mateixa concentració (0,01 mg/mL) i amb diferent pH.

Heu de realitzar en l'**espectrofotòmetre** una línia base de calibratge (zero en totes les longituds d'ona de l'espectre que cal realitzar). Per a això, poseu una cubeta amb aigua en la cel·la del blanc i una altra en la de la mostra. En el *MENÚ PRINCIPAL (MODE)*, seleccioneu l'opció número 8 (*CONDITION SET*) i, dins d'aquest, la número 1, que correspon a *BASELINE*.

Retireu la cubeta amb aigua situada en la cel·la de la mostra i col·loqueu-ne una que continga la mostra a pH 2,4 (en aquest pH el blau de bromofenol només existeix en la seua forma protonada). Després, torneu al *MENÚ PRINCIPAL*, seleccioneu l'opció 2 (*SPECTRUM*) i feu l'espectre entre 350 nm i 700 nm.

Determineu el valor de la $\lambda_{\text{màx}}$ d'absorció de la forma protonada (que anomenem λ_1).

A continuació, obteniu l'espectre d'absorció amb la mostra a pH 5,8 (en aquest pH el blau de bromofenol existeix només en la seua forma desprotonada). Determineu el valor de la $\lambda_{\text{màx}}$ d'absorció de la forma desprotonada (que anomenem λ_2).

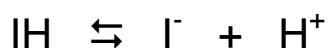
Observeu les diferències en els espectres d'absorció del blau de bromofenol en diferents estats d'ionització.

A partir dels espectres superposats, determineu-ne el punt isosbèstic (λ_{isos}).

Nota: després de mesurar les mostres, torneu-les als tubs corresponents.

Determinació de la concentració de dues substàncies cromòfores en una mescla

El blau de bromofenol és un indicador de pH que es troba completament protonat (IH) a un pH baix (p. e., pH 2,4) i completament desprotonat (I⁻) a un pH major (p. e., pH 5,8). A qualsevol altre pH entre aquests dos valors, ambdues formes, protonada i desprotonada, coexisteixen d'acord amb l'equilibri:



al qual correspon la constant de dissociació: $K_a = ([\text{I}^-] \cdot [\text{H}^+]) / [\text{IH}]$.

Les mesures d'absorbància permeten conèixer les concentracions de les dues formes en qualsevol pH. En aquesta part de la pràctica heu de determinar les concentracions de IH i I⁻ a dos pH diferents: 3,4 i 4,2.

Measureu en el **colorímetre** l'absorbància a λ_1 de les solucions de blau de bromofenol preparades als diferents pH (totes, de pH 2,4; 3,4; 4,2 i 5,8). Abans de mesurar, calibreu a zero el colorímetre per a aquesta λ amb una cubeta amb aigua.

Nota: després de mesurar les mostres, retorneu-les als tubs corresponents.

Repetiu el procediment i obteniu les absorbàncies a λ_2 i a λ_{isos} , i tingueu la precaució de posar a zero el colorímetre abans de cada sèrie de mesures.

Calculeu els coeficients d'extinció 1 mg/mL ($\epsilon^{0,1\%}$) per a cada espècie (IH i I⁻), tant en λ_1 com en λ_2 .
[és a dir, $\epsilon_{\lambda_1(\text{IH})}$; $\epsilon_{\lambda_2(\text{IH})}$; $\epsilon_{\lambda_1(\text{I}^-)}$ i $\epsilon_{\lambda_2(\text{I}^-)}$].

Prenent els valors d'absorbància obtinguts en λ_1 i en λ_2 en les mostres corresponent als pH 3,4 i 4,2, calculeu les concentracions de blau de bromofenol en la seua forma protonada i desprotonada presents en cadascun d'aquests pH.

Expliqueu els valors de l'absorbància a λ_{isos} obtinguts per a les solucions als diferents pH.

1.4. Bibliografia

1. GARCIA-SEGURA, J. M.; GAVILANES, J. G.; MARTÍNEZ DEL POZO, A.; MONTERO, F.; OÑADERRA, M.; VIVANCO, F. (1996): "Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica", cap. 2. Ed. Síntesis. Capítol de llibre de teoria en què es descriuen els fonaments de les tècniques d'espectrofotometria UV-visible i les seues aplicacions en bioquímica.
2. <http://www.ph-meter.info/pH-measurements-indicators>. En aquesta pàgina web s'ofereixen explicacions sobre els equilibris acidobàsics, el funcionament de pH-metres i la utilitat dels indicadors de pH. S'hi poden trobar una llarga llista d'altres indicadors de pH. Ofereixen també enllaços a llocs en què s'expliquen resolucions de problemes acidobàsics.

1.5. Qüestions proposades

1. Per què la representació de A_{405} en funció de la concentració d'hemoglobina deixa de ser una recta? Quina o quines poden ser les raons de la pèrdua de linealitat?
2. El coeficient d'extinció d'un cromòfor a una determinada λ canvia si modifiqueu la composició del dissolvent? Per què?
3. En la pràctica realitzada heu emprat un espectrofotòmetre de doble enfocament. Quins són els avantatges que s'obtenen amb aquesta manera de funcionament? Hi ha algun possible inconvenient?
4. Podríeu determinar la concentració dels components d'una mescla de cromòfors a partir de valors d'absorbància en el punt isosbèstic? Per què? I si en feu una segona mesura a una altra λ ?
5. Quins són les diferències i similituds, en general, entre un espectrofotòmetre i un colorímetre?

PRÀCTICA 2

ANÀLISI CINÈTICA D'UN ENZIM LIPASA PER COLORIMETRIA I TURBIDIMETRIA

2.1. Introducció

L'objecte d'aquesta pràctica és seguir dues activitats d'un mateix enzim: una lipasa. La funció natural de les lipases és hidrolitzar triacilglicèrids en els seus components d'àcids grassos i glicerol; aquesta activitat es coneix com a **activitat lipasa o lipolítica** i, tenint en compte que els triacilglicèrids són insolubles en aigua, el substrat ha de trobar-se emulsionat i la catàlisi ocórrer en un medi heterogeni. D'altra banda, les lipases també posseeixen la capacitat d'hidrolitzar petits èsters solubles, una activitat coneguda com a **esterasa**, en què la catàlisi ocorre en un medi homogeni.

En aquesta pràctica pretenem comprovar ambdues activitats de la lipasa del pàncrees porcí (ppL): (a) l'activitat esterasa per colorimetria, seguint la hidròlisi de l'acetat de p-nitrofenil (PNPA), ja que el producte de la reacció (p-nitrofenol) posseeix un màxim d'absorció a 400 nm, i (b) l'activitat lipasa per turbidimetria, per una disminució de la terbolesa (mesurada com a absorbància a 660 nm) d'una emulsió de proteïna i oli d'oliva (lipoproteïna artificial). A més, comprovarem l'efecte inhibidor de l'àcid fenilborònic (PBA) sobre l'activitat esterasa de l'enzim. Determinarem els paràmetres cinètics (K_m i $V_{m\grave{a}x.}$) de l'enzim sobre el substrat artificial PNPA en absència i presència d'inhibidor PBA.

2.2. Materials, reactius i solucions

Materials

- Colorímetre
- Gradeta de tubs d'Eppendorf
- Pipetes Pasteur i xumets
- Cubetes de colorímetre de plàstic d'1 mL
- Pipetes automàtiques: 1000, 200 i 20 μ L

- Bany de gel
- Tubs Corning de 15 mL (4)
- Pipeta de vidre de 5 i de 10 mL
- Tisores i Parafilm

Reactius

- Lipasa de pàncrees porcí, ppL (Sigma L-3126)
- Goma aràbiga (Sigma G-9752)
- Oli d'oliva (Sigma O-1500)
- Albúmina de sèrum boví, BSA (Sigma A-6003)
- Acetat de *p*-nitrofenil, PNPA (Sigma N-8130)
- Àcid fenilborònic, PBA (Fluka 78181)
- Acetonitril (Panreac)

Solucions

- Solució amortidora d'assaig, Tris-HCl 100 mM, pH 7,5. Ja preparat (50 mL/ grup).
- PNPA 30 mM en acetonitril. Ja preparat (2 mL/grup). Manteniu-lo en un tub de vidre folrat amb paper d'alumini.
- PBA 50 mM en una solució amortidora d'assaig. S'utilitzarà per a preparar, pels estudiants, 1 mL a concentració 20 mM. Diluir emprant solució amortidora d'assaig.
- ppL 10 mg/mL en una solució amortidora d'assaig: 5 mL, a preparar pels estudiants. Guardeu-lo en un tub Corning. Manteniu sempre la solució d'enzim freda.
- ppL 2 mg/mL: 5 mL (per dilució 1/5 de l'anterior). Manteniu sempre la solució d'enzim freda.
- Lipoproteïna artificial: 10 mL. Ja preparada. Cal obtenir-la com segueix: a) Mescleu en un tub d'Eppendorf 97 μ L d'oli d'oliva i 903 μ L de la solució de goma aràbiga al 2% (p/v) en una solució amortidora d'assaig. Emulsioneu-la bé fins que n'obtingueu un aspecte blanc lletós (preferiblement, exposeu-la a sonicació 30 min o més). b) Mescleu en un tub Corning 400 μ L d'aquesta emulsió amb 9,6 mL de solució de BSA al 5% (p/v) en una solució amortidora d'assaig, agiteu-la suaument i incubeu-la a 30°C durant 30 min. Guardeu-la a temperatura ambient.

2.3. Procediment experimental

2.3.1. Activitat esterasa de la ppL

En primer lloc, cada grup ha de preparar les solucions de l'enzim ppL (a 10 mg/mL i 2 mg/mL) tal com hem descrit en l'apartat 2.2 Solucions. Manteniu aquestes solucions en fred durant tota la sessió.

Variació de la velocitat d'hidròlisi amb la concentració del substrat PNPA

En aquesta experiència heu de mantenir constant la concentració de ppL (0,1 mg/mL) i variar la de PNPA entre 0,3 i 2,1 mM. Cal preparar, per a cada cinètica, la mescla de reacció afegint directament a la cubeta de mesura els volums corresponents de la taula 1. Tenint en compte que el PNPA és inestable al medi aquós (s'hidrolitza), els tubs s'han de preparar i quantificar d'un en un. Per tant, per a cada tub cal afegir l'enzim i, a continuació, el substrat, just abans d'iniciar la cinètica.

Mètode:

- Seleccioneu en el colorímetre la longitud d'ona de 400 nm.
- Amb la cubeta que conté l'amortidor, cal fer un autozero en començar l'experiment.
- Per a començar cada cinètica, heu d'afegir-hi 50 μ L de solució de ppL 2 mg/mL i, després, el substrat (PNPA 30 mM) que corresponga. Agiteu-les ràpidament i introduïu-les en el colorímetre.
- Anoteu la A_{400} cada 30 s durant 3 min.

TAULA 1

μ L amortidor	μ L PNPA (30 mM)
940	10
930	20
920	30
910	40
900	50
880	70

Nota: heu d'injectar el PNPA en la solució amortidora (no el deixeu sobre la paret) i heu d'agitar-lo suaument per a mesclar (utilitzeu Parafilm). Eviteu que s'entelen les cubetes a l'interior del colorímetre. Per a això és convenient airejar el portacubetes.

Representeu en la mateixa gràfica, per a cada concentració de PNPA, la variació de A_{400} en funció del temps. Amb els valors del pendent per a cada concentració, representeu la variació de la velocitat inicial ($\Delta A_{400}/s$) en funció de la [PNPA]. Realitzeu una estimació de la K_m de l'enzim per a aquest substrat mitjançant una representació de dobles inversos.

Inhibició de l'activitat esterasa de ppL per PBA

Abans de començar, heu de preparar la solució de l'inhibidor 20 mM en solució amortidora d'assaig (1 mL cada grup) a partir d'una solució estoc de 50 mM.

Els àcids borònics (PBA) són, en general, inhibidors de lipases. Pretenem comprovar la disminució d'activitat de l'enzim per la presència de l'inhibidor PBA, així com la determinació del tipus d'inhibició i constant de dissociació (K_i) de l'inhibidor.

En aquesta experiència heu de mantenir constants tant la concentració de ppL (0,1 mg/mL) com la de l'inhibidor PBA (0,5 mM) i heu de variar la del substrat, similarment a l'apartat anterior, entre 0,3 i 2,1 mM. L'heu de fer igual que en l'apartat anterior, d'acord a la taula 2, tot afegint-hi també l'enzim i el PNPA just abans de començar les mesures.

Mètode:

- Per a començar cada cinètica, heu d'afegir-hi 50 μ L de solució de ppL 2 mg/mL i, després, el substrat (PNPA 30 mM). Agiteu-les ràpidament i introduïu-les en el colorímetre.
- Anoteu la A_{400} cada 30 s durant 3 min.

TAULA 2

μL amortidor	μL PBA (20 mM)	μL PNPA (30 mM)
915	25	10
905	25	20
895	25	30
885	25	40
875	25	50
855	25	70

Determineu de nou els pendents de les representacions de A_{400} en funció de temps. Representeu en la mateixa gràfica de l'apartat anterior $\Delta A_{400}/s$ en funció de la [PNPA]. Determineu, de la mateixa manera que abans, K_m i $V_{m\grave{a}x.}$, així com el tipus d'inhibició que exerceix el PBA. Determineu K_i a partir de les constants cinètiques.

2.3.2. Activitat lipasa de la ppL: seguiment de la hidròlisi de l'oli d'oliva per turbidimetria

Els productes de la hidròlisi dels triacilglicèrids produeixen un canvi de les propietats de l'emulsió que fa disminuir la terbolesa. Heu de seguir la disminució de la terbolesa, mitjançant la variació de la A_{660} amb dues concentracions d'enzim. La concentració de substrat s'ha de mantenir fixa.

Cada cinètica s'ha de preparar directament en la cubeta de mesura, d'acord amb la taula 3 (tot afegint-hi els reactius en l'ordre en què apareixen).

Mètode:

- Seleccioneu en el colorímetre la longitud d'ona de 660 nm.
- Amb la cubeta que conté la solució amortidora, cal fer un autozero en començar l'experiment.
- Després d'afegir la lipasa a la cubeta, agiteu-la, introduïu-la en el colorímetre i premeu el temps zero.
- Anoteu la A_{660} cada 2 min durant 30 min. Podeu fer les dues cinètiques simultàniament: prepareu les mescules en les cubetes i realitzeu les mesures alternativament a intervals d'un minut.

TAULA 3

[ppL], mg/mL	μL amortidor	μL lipoproteïna artificial	μL ppL (10 mg/mL)
0,50	750	200	50
1,50	650	200	150

Representeu en la mateixa gràfica la variació de la A_{660} en funció del temps per a cada concentració de lipasa. Durant la hidròlisi, heu d'observar una disminució de la turbolesa (A_{660}), més acusada com més gran és la concentració d'enzim.

2.4. Bibliografia

1. BERGMEYER, H. U. (1974): "Methods in enzymatic analysis", vol. 2 (2a ed.), Verlag Chemie. Llibre de consulta sobre procediments generals de mesura d'activitats enzimàtiques (biblioteca del departament).
2. SUGIHARA, A.; GARGOURI, Y.; PIERONI, G.; RIVIERE, C.; SARDA, L.; VERGER, R. (1986): "Activities and interfacial properties of *Rhizopus delemar* and porcine pancreatic lipases after treatment with phospholipids" *Biochemistry*, **25**, 3430-3034. Article en què es descriu l'assaig turbidimètric de la lipoproteïna artificial (sol·liciteu-lo al professor de pràctiques).

2.5. Qüestions proposades

1. Descriviu les reaccions que esteu mesurant en aquesta pràctica.
2. Quins altres mètodes es poden emprar per a mesurar d'activitat lipasa?
3. Penseu que els mètodes utilitzats podrien servir per a determinar la concentració de ppL en una mostra? Com?

PRÀCTICA 3

MESURA DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA I DELS METABÒLITS PER ESPECTROFOTOMETRIA

3.1. Introducció

El primer objectiu d'aquesta pràctica és mesurar una activitat enzimàtica nucleasa utilitzant l'espectrofotometria en la regió ultraviolada. L'enzim que estudiarem és la nucleasa de micrococ (MNasa o nucleasa de *Staphylococcus aureus*), enzim que posseeix tant activitat endonucleolítica com exonucleolítica i que pot hidrolitzar tant DNA com RNA. Entre els diferents mètodes espectrofotomètrics, descrits per a la determinació de l'activitat nucleasa, utilitzareu el que es basa en l'efecte hipercròmic, pel qual la hidròlisi dels àcids nucleics va acompanyada d'un increment d'absorbància a 260 nm.

Tot aprofitant aquesta propietat, heu de determinar les velocitats inicials de la reacció catalitzada per la MNasa com la variació d'absorbància a 260 nm respecte del temps, en els primers instants, emprant DNA com a substrat. Utilitzant aquest procediment, heu d'esbrinar el rang de proporcionalitat entre la concentració d'enzim i la velocitat inicial.

En aquesta sessió també heu de determinar, utilitzant reaccions catalitzades enzimàticament, la concentració d'un metabòlit, l'etanol, en begudes. Aquesta determinació es basa en la transformació del metabòlit problema en un producte cromòfor, en una reacció catalitzada per un enzim, i la subseqüent quantificació espectrofotomètrica del cromòfor. És essencial que la transformació del metabòlit siga completa i, per això, la reacció enzimàtica ha d'estar desplaçada termodinàmicament cap a la formació del producte. En reaccions bisubstrat, la presència del segon substrat en excés facilita la transformació completa. En altres ocasions podeu utilitzar reaccions acoblades, de manera que el producte de la primera reacció és transformat en un altre compost en una segona (o tercera) reacció. Així es garanteix la transformació total i la quantificació precisa del metabòlit problema.

3.2. Materials, reactius i solucions

Materials

- Espectrofotòmetre
- Cubetes de quars d'1 mL
- Agitador de tubs
- Provetes: 50 mL i 100 mL
- Gradeta de tubs d'Eppendorf
- Pipetes automàtiques: 1000, 200 i 20 μ L
- Cubetes de colorímetre de plàstic 1 mL
- Colorímetre
- Espàtules: 1 gran i 1 fina
- Pipetes Pasteur i xumets
- Tub Corning de 50 i de 15

Reactius

- DNA d'esperma d'areng (Boehringer 223646) (4°C)
- MNasa: nucleasa S7 de *Staphylococcus aureus*, 15.000 U/mg (Boehringer 107921) estoc a 1 mg/mL en aigua (-20°C).
- NAD⁺ (Sigma N-7004)
- Alcohol-deshidrogenasa (Sigma A7011, 15000 U)
- Etanol absolut
- Cervesa
- Cervesa sense alcohol

Solucions

- Solució amortidora d'assaig, Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 9,0. Ja preparada (25 mL/grup).
- DNA substrat: 50 μ g DNA/mL en una solució amortidora d'assaig. Ha de donar una A₂₆₀ aproximada de 0,9. Ja preparat (25 mL/grup).
- MNasa (125 μ L/grup). Diluïu la solució estoc (1 mg/mL, ja preparada): 2,5 μ L solució estoc + 122,5 μ L de solució amortidora d'assaig).
- Solució amortidora de glicina/Tris, pH >9,0; 0,2 M glicina i 0,3 M Tris. Comproveu que el pH és superior a 9,0. Solució a

- preparar pels estudiants a partir dels productes sòlids (25 mL/grup). MM glicina= 75; MM Tris= 121,1.
- NAD⁺ 50 mM: 33 mg/mL en aigua. Ja preparada (0,6 mL/grup).
 - Alcohol-deshidrogenasa 4 mg/mL en aigua. Ja preparada (250 µL/ grup).
 - Etanol 10 mM. Ja preparada (5 mL/grup).

3.3. Procediment experimental

3.3.1. Anàlisi de l'activitat enzimàtica nucleasa per espectrofotometria

Determinació de la variació de l'activitat nucleasa amb la concentració de MNasa

En aquesta experiència heu de mantenir constant la concentració de DNA substrat (50 µg/mL) i si varieu la concentració de MNasa (entre 0 i 0,6 µg/mL), heu de determinar les velocitats inicials.

Prepareu, en tubs d'Eppendorf, les mescles de la taula 1 (no hi afegiu encara la MNasa, ja ho fareu just abans d'iniciar la cinètica en l'espectrofotòmetre):

TAULA 1

Nre. tub	Conc. final MNasa (µg/mL)	mL DNA (50 µg/mL)	µL MNasa (40 µg/mL)
0	0	1	0
1	0,08	1	2,0
2	0,16	1	4,0
3	0,32	1	8,0
4	0,48	1	12,0
5	0,64	1	16,0
6	0,80	1	20,0

Preparació de l'espectrofotòmetre:

- En la cinètica, escolliu la longitud d'ona 260 nm.
- Temps total de la cinètica: 60 s.
- Valors d'absorbància: cada 10 s.
- Escolliu l'escala: una escala adequada per a aquest cas pot ser entre 0,8 i 1,2.
- Ajust a zero: ompliu les dues cubetes (referència i mostra) amb la solució amortidora d'assaig i heu de prémer "autozero". A partir d'ara només treballareu amb la cubeta mostra i heu de deixar la cubeta de referència que conté la solució amortidora d'assaig en l'espectrofotòmetre.

Agafeu el tub 1 i hi afegiu la quantitat corresponent de la mostra de MNasa. Agiteu-la i transferiu-la amb la pipeta Pasteur a la cubeta. Col·loqueu-la en l'espectrofotòmetre i comenceu la cinètica prement *start*. El tub 0 no cal mesurar-lo, però s'ha de conservar per a una experiència posterior.

Una vegada acabada la cinètica, heu d'imprimir la gràfica resultant i recuperar la mostra de la cubeta. Cal fer-ho de la mateixa manera amb els tubs restants, tot afegint les quantitats de MNasa corresponents (taula 1).

En acabar aquest experiment, heu de guardar a temperatura ambient els tubs (0 al 6) que utilitzarem més tard.

Determineu les velocitats inicials amb els valors proporcionats per l'espectrofotòmetre (calculeu el pendent en els primers instants de mesura). Expresseu la velocitat inicial com a $\Delta A_{260}/\text{min}$, representeu v_0 en funció de la concentració d'enzim. Hi ha una dependència lineal entre concentració d'enzim i velocitat inicial? És indefinida? Determineu-ne el rang de resposta lineal.

Espectres d'absorció del DNA intacte i del DNA hidrolitzat: efecte hiperocròmic

Els experiments realitzats en l'apartat anterior han estat possibles gràcies a l'augment en l'absorció que experimenta el DNA en la despolimerització, és a dir, per l'efecte hiperocròmic. L'objecte d'aquest apartat és obtenir els espectres d'absorció del DNA intacte i del DNA hidrolitzat, en la mateixa concentració, i comparar-los. Llavors, determinareu l'increment en el coeficient d'extinció ($\Delta\epsilon$) que experimenta el DNA en la hidròlisi.

Preparació de l'espectrofotòmetre:

- Escolliu les longituds d'ona entre 400 i 220 nm.
- Manteniu una escala entre 0 i 2.
- Feu coincidir els dos espectres.

En la cubeta de mostra, col·loqueu el contingut del tub 0 de l'experiment anterior ("DNA intacte"). Realitzeu l'espectre i determineu el valor numèric de A_{260} .

Feu l'espectre del tub 6 del mateix experiment ("DNA hidrolitzat"). Obteniu també el valor de A_{260} i imprimeu els dos espectres que heu fet coincidir.

Determineu-ne $\Delta\epsilon_{260}$ (utilitzeu l'aproximació d'una MM per als ρb de 600).

3.3.2. Determinació enzimàtica d'etanol en la cervesa

L'etanol és present en productes d'origen biològic molt diversos i és especialment abundant en begudes obtingudes mitjançant fermentació, com el vi o la cervesa.

L'etanol es pot determinar bioquímicament per l'oxidació amb NAD^+ en presència d'alcohol-deshidrogenasa (reacció 1):



En principi, la formació del NADH, mesurada per absorbància en la seua banda d'absorció al voltant de 340 nm, és proporcional a la quantitat d'etanol. No obstant això, l'equilibri d'aquesta reacció està molt desplaçat cap a l'etanol ($K_e = 1,94 \cdot 10^{-11} \text{ M}^{-1}$!), per la qual cosa es fa imprescindible una segona reacció acoblada que assegure la conversió completa de l'etanol. L'oxidació quantitativa de l'etanol es pot aconseguir emprant reactius que "atrapen" l'acetaldehid. Una possibilitat és l'eliminació enzimàtica de l'acetaldehid en la reacció acoblada catalitzada per aldehyd-deshidrogenasa ($\text{acetaldehid} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{acetat} + \text{NADH} + \text{H}^+$). De la mateixa manera, s'ha descrit que el Tris [tris(hidroximetil)aminometà], en condicions de pH alt, forma complexos amb compostos carbonil com l'acetaldehid, de manera que pot ser utilitzat com a agent atrapant en la determinació d'etanol.

Els mètodes enzimàtics de determinació d'etanol, com el que utilitzareu, són especialment sensibles i capaços de quantificar quantitats molt petites. És per això que aquests mètodes es fan servir per a investigació bioquímica i tecnologia d'aliments, en clínica i, a més, en medicina forense, en la determinació d'etanol sanguini o en teixits.

En aquest apartat de la pràctica utilitzareu un mètode enzimàtic de determinació d'etanol, emprant alcohol-deshidrogenasa i Tris, com a agent eliminador de l'acetaldehid. Per a posar a prova el mètode, heu de determinar el contingut alcohòlic en dues begudes comercials (cervesa i cervesa sense alcohol).

Preparació de patró i mostres (cervesa i cervesa sense alcohol):

- En primer lloc prepareu 25 mL de solució amortidora de pH glicina/Tris (glicina 0,2 M i Tris 0,3 M), 25 mL/grup. Feu els càlculs en grams que hi ha que pesar de cada producte sòlid i dissoleu-los junts en un volum final de 25 mL amb aigua. Comproveu, amb el pH-metre, que el pH és major de 9,0.
- Prepareu 1 mL d'etanol 1,0 mM a partir de la solució estoc 10 mM proporcionada.
- Prepareu dilucions de les begudes d'acord amb el seu contingut en etanol (que figura en l'etiqueta) i el quadre següent:

% etanol	dilució que cal utilitzar (H₂O)
≤ 1,0	1/500 i 1/2000
1,0 - 5,5	1/2000 i 1/10000
5,5 - 12	1/10000 i 1/50000
≥ 12	1/50000 i 1/100000

Prepareu en tubs d'Eppendorf les mescles de la taula 2.

TAULA 2

Nre tub	[etanol] estàndards (μM)	μL etanol (1,0 mM)	μL H ₂ O	μL amortidor Gly/Tris	μL NAD ⁺ (50 mM)	μL ADH (4 mg/mL)
1	0	0	200	930	50	20
2	20	25	175	930	50	20
3	40	50	150	930	50	20
4	60	75	125	930	50	20
5	80	100	100	930	50	20
6	120	150	50	930	50	20
7	160	200	0	930	50	20
8	cervesa, dil.1/2000, 200 μL			930	50	20
9	cervesa, dil.1/10000, 200 μL			930	50	20
10	sense alcohol, dil.1/500, 200 μL			930	50	20
11	sense alcohol, dil.1/1000, 200 μL			930	50	20

Per tal de facilitar la preparació dels tubs podeu fer servir la següent estratègia: en un tub a banda mescleu 11,2 mL ($\approx 930 \mu\text{L} \times 12$) de solució amortidora de pH (Gly/Tris), 0,6 mL ($\approx 50 \mu\text{L} \times 12$) de NAD⁺ 50 mM i 240 μL ($\approx 20 \mu\text{L} \times 12$) ADH 4 mg/mL. Afegiu 1 mL d'aquesta mescla a tots els tubs, de l'1 a l'11.

Els tubs de l'1 al 7 són estàndards preparats amb concentracions conegudes d'etanol, a partir dels quals s'ha d'obtenir una corba patró.

En fer les mescles, la concentració final de NAD⁺ és aproximadament 2 mM, en excés i saturant per a l'enzim. La concentració final d'alcohol-deshidrogenasa és d'unes 20 U/mL, també en excés per a aconseguir una conversió ràpida.

Finalment, heu d'afegir-hi l'enzim i incubar-ho a temperatura ambient durant 15 min. Mesureu la A_{360} dels tubs amb el colorímetre en cubetes de plàstic. Podeu ajustar a zero amb el tub 1.

(Nota: el màxim d'absorció del NADH és 340 nm, però les mesures s'han de fer a 360 nm, perquè el colorímetre proporcione valors més precisos).

Amb els resultats de la corba patró (A_{360} en funció de la concentració d'etanol dels tubs 1 a 7) determineu, per interpolació, el contingut d'alcohol de les begudes problema.

Expresseu-ho en g/100 mL (Mr etanol 46) i en mL/100mL (densitat etanol, $\rho = 0,789$ g/mL).

Si el coeficient d'extinció molar del NADH a 360 nm és de $4270 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, determineu el contingut d'etanol de les begudes problema. Expresseu-ho també en g/100 mL i en mL/100 mL.

3.4. Bibliografia

1. CUATRECASAS, P.; FUCHS, S.; ANFINSEN, C.B. (1967): "Catalytic properties and specificity of the extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*". *J. Biol. Chem.*, **242**, 1541-1547. Article en què es descriu per primera vegada el mètode de mesura d'activitat nucleasa basat en l'efecte hipercròmic (demaneu-lo al professor de pràctiques).
2. DÍAZ, P.; DABAN, J. R. (1986): "Enzymatic probes for histone-DNA complexes: micrococcal nuclease activity under conditions useful for the investigation of chromatin structure". *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **13**, 57-59. Un article en què s'estudien les propietats de l'enzim MNasa que s'utilitza en aquesta pràctica (sol·liciteu-lo al professor de pràctiques).
3. BERGMEYER, U. (1983) "Methods in enzymatic analysis", vol. I i vol. IV, 3a ed. Verlag Chemie. Un llibre de consulta sobre els procediments generals de mesura d'activitats enzimàtiques i de metabòlits (biblioteca del departament).
4. THOMAS, R. (1993): The denaturation of DNA. *Gene*, **135**; 77-79. Efecte hipercròmic aplicat a estudis de desnaturalització del DNA (demaneu-lo al professor).
5. WALKER, J. R. L. (1992): "Spectrophotometric determination of enzyme activity: alcohol deshydrogenase (ADH)". *Biochem. Educ.*, **20**, 42-43. Un article breu sobre la utilització de l'espectrofotometria en l'assaig d'activitat alcohol-deshidrogenasa (hemeroteca de ciències).
6. CORNELL, N. W.; VEECH, R. (1983): "Enzymatic measurement of ethanol or NAD in acid extracts of biological samples". *Anal. Biochem.*, **132**, 418-423. Un estudi detallat del procediment de mesura d'etanol en mostres biològiques emprat en aquesta pràctica (hemeroteca de ciències).

3.5. Qüestions proposades

1. A què és degut l'augment d'absorció que experimenten els àcids nucleics en la seua despolimerització?
2. Quina és l'acció de l'enzim sobre el substrat (DNA)? El mètode que utilitzem per a mesurar l'activitat enzimàtica és adequat tant per a endonucleases com per a exonucleases? I per a RNases?
3. Com es podria utilitzar $\Delta\varepsilon$ per a passar la $V_{\text{màx.}}$ d'unitats arbitràries ($\Delta A_{260}/\text{min}$) a internacionals (mols amb enllaços trencats)?
4. Quines són les raons de la desviació de la linealitat de l'activitat enzimàtica en variar la concentració d'enzim? Si suposem que l'enzim segueix la cinètica de Michaelis-Menten, quins són els paràmetres cinètics que es podrien obtenir? Com es podrien determinar, en un assaig d'activitat nucleasa com el que s'ha emprat en aquesta pràctica? S'obtidria una recta en una representació de v_0 en funció de $[\text{DNA}]$ ([substrat])? Per què?
5. En la valoració d'etanol realitzada, quina és la sensibilitat del mètode?

PRÀCTICA 4

INTERACCIÓ PROTEÏNA-LLIGAND, SEGUIMENT PER FLUOROMETRIA

4.1. Introducció

L'objecte d'aquesta pràctica és que els estudiants es familiaritzen amb l'ús de l'espectrofluorímetre: obtenir espectres d'emissió i espectres d'excitació; esbrinar la dependència de la intensitat de fluorescència amb la concentració del fluoròfor; comprovar la influència de l'entorn sobre l'espectre d'emissió d'un fluoròfor, i seguir la unió d'un fluoròfor a una proteïna pels canvis en l'espectre d'emissió.

Com a fluoròfors utilitzarem l'anilinaftalè-sulfonat (ANS) i la proteïna albúmina de sèrum boví (BSA), la fluorescència intrínseca del qual és deguda als residus de triptòfan. D'altra banda, és conegut que la BSA posseeix cavitats que poden unir petits lligands relativament hidrofòbics, com el ANS. Els canvis en les propietats de fluorescència del ANS, després de la seua unió a la BSA, permetran analitzar les característiques d'aquesta unió.

4.2. Materials, reactius i solucions

Materials

- Espectrofluorímetre
- Gradetes de tubs, 2
- Cubetes d'espectrofluorímetre de 3 mL
- Pipetes automàtiques: 5000, 1000, 200 i 20 μ L
- Tubos de 10 mL
- Pipetes Pasteur i xumets
- Probetes de 25 i 50 mL

Reactius

- Metanol
- Etanol absolut
- Àcid anilinaftalè-sulfònic (ANS) (Sigma A-3125)
- Albúmina de sèrum boví, BSA (MM 64000, Sigma A-6003)

Solucions

- Solució Tris base 0,2 M; aquesta solució s'utilitzarà per a preparar, pels estudiants, una solució amortidora de pH, Tris 10 mM, pH 7,5, ($pK_a = 8,1$; 50 mL/grup), utilitzant també la següent solució de HCl.
- Solució HCl 0,1 M. Ja preparada.
- ANS 2 mM en aigua. Ja preparat (1 mL/grup).
- ANS 1 mM en aigua (per dilució 1/2 de l'anterior, 1 mL/grup).
- BSA 1 mg/mL. Ja preparat (10 mL/grup).
- Etanol 50% (v/v), ja preparada.

4.3. Procediment experimental

4.3.1. Fluoròfor BSA

Espectre d'emissió de la BSA i dependència amb la concentració

Comenceu preparant 50 mL de solució amortidora de pH Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, a partir de Tris base 0,2 M i HCl 0,1 M. Feu els càlculs adients, agafeu el volums corresponents de les solucions de partida, enraseu a 50 mL amb aigua i comproveu el pH amb pH-metre.

Prepareu també 20 mL de la proteïna BSA a concentració 0,1 mg/ mL per dilució de la solució més concentrada (1 mg/mL).

La BSA és una proteïna monomèrica (MM 64000), la capacitat d'absorció de llum UV de la qual és conseqüència, principalment, del seu contingut en residus de triptòfan. Aquests són fluorescents i, doncs, la BSA és una proteïna amb fluorescència intrínseca. La pràctica comença amb la comprovació d'aquesta propietat amb la realització d'espectres d'emissió de la BSA a diferent concentració, la qual cosa permetrà, a més, analitzar la variació de la intensitat de fluorescència amb la concentració del fluoròfor.

Prepareu en tubs de 5 mL les solucions de la taula 1, que contenen concentracions creixents de BSA.

Transferiu les solucions a la cubeta de l'espectrofluorímetre amb una pipeta Pasteur i obteniu-ne els espectres d'emissió.

TAULA 1

μL amortidor	μL BSA (0,1 mg/mL)	Conc. final BSA ($\mu\text{g/mL}$)
3000	0	
2750	250	
2500	500	
2000	1000	
1500	1500	
1000	2000	
500	2500	
0	3000	

Nota: la solució de BSA s'ha d'injectar en l'amortidor (no en deixeu sobre la paret) i s'ha d'agitar suaument per a mesclar-la.

Condicions del fluorímetre:

- $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm.
- Valors de longitud d'ona d'emissió: des de 300 fins a 450 nm.
- Mesureu en primer lloc la solució més concentrada. D'aquesta manera escollireu l'escala més convenient.

Representeu la variació de la intensitat de fluorescència, a la longitud d'ona del màxim d'emissió, en funció de la concentració de proteïna.

4.3.2. Fluoròfor ANS

Espectres d'excitació i d'emissió del ANS

En primer lloc, prepareu una solució de ANS de concentració 20 μM mesclant 30 μL de ANS 2 mM amb 3 mL d'etanol al 50% (v/v).

Amb l'espectrofluorímetre, obteniu d'aquesta solució l'*espectre d'emissió* de fluorescència, entre 400 i 600 nm. Utilitzeu com a λ_{ex} la longitud d'ona del màxim d'absorció (370 nm).

Amb la mateixa solució, obteniu l'*espectre d'excitació* entre 280 i 450 nm ajustant la λ_{em} amb el màxim obtingut en l'espectre d'emissió determinat anteriorment.

Espectre d'emissió del ANS en dissolvents de diferent polaritat

Per a analitzar la naturalesa de l'entorn sobre les propietats d'emissió de fluorescència d'un fluoròfor, preparareu solucions de ANS en dissolvents de diferent polaritat, d'acord amb la taula 2.

TAULA 2

Dissolvent	μL metanol	μL etanol	μL aigua	μL ANS (2 mM)
Aigua	-	-	3000	30
Metanol 20%	600	-	2400	30
Metanol 40%	1200	-	1800	30
Metanol 60%	1800	-	1200	30
Etanol 20%	-	600	2400	30
Etanol 40%	-	1200	1800	30
Etanol 60%	-	1800	1200	30

Condicions del fluorímetre:

- $\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$.
- Valors de longitud d'ona d'emissió: des de 400 fins a 550 nm.
- Mesureu en primer lloc la solució amb etanol 60%. D'aquesta manera escollireu l'escala més convenient.

Observeu el canvi en els espectres i interpreteu-los.

4.3.3. Interacció ANS-BSA

El fluoròfor ANS s'uneix a la proteïna BSA i aquesta unió està acompanyada per un canvi important en les propietats de fluorescència del ANS. Això permetrà conèixer la concentració del lligand ANS unit a la proteïna (complexos ANS-BSA) i, a partir d'això, heu de determinar la constant d'associació del ANS a la proteïna.

Prepareu una sèrie de solucions amb la mateixa concentració final de proteïna BSA (0,213 mg/mL, MM 64000), però variant la concentració de ANS, d'acord amb la taula 3.

TAULA 3

[ANS] ₀ μM	μL amortidor	μL BSA (1 mg/mL)	μL H ₂ O	μL ANS (1 mM)
0	2300	640	60	0
1,0	2300	640	57	3
2,0	2300	640	54	6
4,0	2300	640	48	12
6,0	2300	640	42	18
8,0	2300	640	36	24
10,0	2300	640	30	30
12,0	2300	640	24	36
16,0	2300	640	12	48
20,0	2300	640	0	60

Per tal de facilitar la preparació dels tubs podeu fer servir la següent estratègia: en un tub a banda mescleu 25 mL ($\approx 2300 \mu\text{L} \times 11$) d'amortidor i 7 mL ($\approx 640 \mu\text{L} \times 11$) de BSA, 1 mg/mL. Afegiu 3 mL d'aquesta mescla a tots els tubs. Afegiu a continuació el que corresponga dels altres components, aigua (per tal d'ajustar els volums) i ANS 1 mM.

Condicions del fluorímetre:

- $\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$.
- Valors de longitud d'ona d'emissió: de 400 a 550 nm.
- Mesureu en primer lloc la solució més concentrada en ANS. D'aquesta manera escollireu l'escala més convenient.

Determineu la intensitat de fluorescència (I_F) a λ_{em} del màxim per a cada concentració de ANS. Interpreteu els resultats.

Assumiu que la BSA només conté un lloc d'unió per al ANS i determineu la constant d'associació (K_a). Per a això tingueu en compte el que segueix:

L'equilibri que governa aquesta unió:



Que li correspon la constant de dissociació ($K_d = 1/K_a$)

$$K_d = \frac{[\text{ANS}][\text{BSA}]}{[\text{ANS-BSA}]},$$

en què [ANS] i [BSA] són les concentracions de ANS i BSA lliures, no units, respectivament. Per a qualsevol concentració de ANS,

$$I_F = Q \cdot [\text{ANS} \cdot \text{BSA}],$$

en què Q és la constant de proporcionalitat entre I_F i la concentració per al fluorímetre particular emprat. En condicions de saturació del lligand ANS, es compleix que:

$$I_{F\text{màx.}} = Q \cdot [\text{BSA}]_0,$$

i $[\text{BSA}]_0$ és la concentració total de proteïna BSA.

Així mateix, també:

$$[\text{ANS}] = [\text{ANS}]_0 - [\text{ANS} \cdot \text{BSA}],$$

i $[\text{ANS}]_0$ és la concentració total del lligand ANS.

Amb tot, s'arriba a la *funció de saturació* expressada en termes d'intensitat de fluorescència:

$$I_F = I_{F\text{màx.}} \cdot [\text{ANS}] / (K_d + [\text{ANS}])$$

La representació dels dobles inversos ($1/I_F$ vs $1/[\text{ANS}]$) ha d'originar una línia recta que permeta la determinació de K_d i, per tant, K_a .

4.4. Bibliografia

1. STRYER, L. (1968): "Fluorescence spectroscopy of proteins", *Science*, **162**, 526-533. Un article sobre les tècniques d'espectroscòpia de fluorescència per a l'estudi de l'estructura, les interaccions i la dinàmica de les proteïnes (hemeroteca de ciències).
2. MÖLLER, M.; DENICOLA, A. (2002): "Study of protein-ligand binding by fluorescence", *Biochem. Mol. Biol. Edu.*, **30**, 309-312. Descripció d'una pràctica molt semblant a la que heu realitzat, encara que emprant una aproximació diferent per a l'anàlisi de les dades de fluorescència i la determinació de la constant d'unió ANS-BSA (demaneu-la al professor).

4.5. Qüestions proposades

1. Quina diferència hi ha entre els espectres d'absorció, excitació i emissió de fluorescència? Dibuixeu els espectres d'absorció, emissió i excitació que cal esperar d'una proteïna com la BSA, i indiqueu-ne en cada cas la longitud d'ona del monocromador fix.
2. En l'apartat 4.3.2 amb ANS com a fluoròfor, canviaria l'espectre d'emissió en variar la λ_{ex} (per exemple, emprant una λ un poc més baixa o un poc més alta que λ_{ex} del màxim)? Com? Per què? I l'espectre d'excitació, canviaria si varieu la λ_{em} ? Per què?
3. Justifiqueu la (freqüent) utilització del ANS per a detectar canvis conformacionals en proteïnes.
4. Podríeu determinar la constant d'unió del ANS a la BSA a partir de les dades de l'experiment 4.3.3? Caldria corregir els espectres?
5. Compareu, després de la realització de la pràctica, les diferències en l'equip, i la manera d'operar entre un espectrofluorímetre i un espectrofotòmetre UV-VIS.

PRÀCTICA 5

SONDES FLUORESCENTS: DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE Ca^{2+} I DETERMINACIÓ DEL pH

5.1. Introducció

Una sonda fluorescent és un compost fluoròfor les propietats d'excitació i/o d'emissió del qual canvien en unir-se a un metabòlit problema amb el qual interacciona específicament. La magnitud del canvi fluorescent depèn de la quantitat de complex sonda-metabòlit produït, la qual cosa és al seu torn una funció de la concentració del metabòlit problema. Les mesures del canvi de fluorescència amb un fluorímetre permeten determinar la concentració del metabòlit problema.

L'objecte de la pràctica és emprar la fluorescència per a determinar la concentració de Ca^{2+} o el pH d'una solució. Per a aquests casos, utilitzarem sondes fluorescents amb propietats d'emissió que varien amb la magnitud que cal mesurar: la concentració de Ca^{2+} o el pH. Comprovareu com els espectres d'excitació dels fluoròfors QUIN2 i 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(6)-carboxifluoresceïna (BCECF) varien en unir Ca^{2+} o en canviar el pH respectivament. Després d'analitzar els espectres d'excitació, heu d'obtenir corbes patró que permetran esbrinar la concentració de Ca^{2+} o el pH d'una solució problema.

5.2. Materials, reactius i solucions

Materials

- Espectrofluorímetre
- Tubs de 5 mL
- Cubetes d'espectrofluorímetre de 3 mL
- Pipetes automàtiques: 5000, 1000, 200 i 20 μL
- Gradetes de tubs
- Pipetes Pasteur i xumets
- Tubs *corning* 15 mL (12)

Reactius

- QUIN2 (Interchim FP-AY6581)
- 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(6)-carboxifluoresceïna (BCECF, Molecular Probes, Invitrogen B-1151)
- HCl concentrat

Solucions

- Solució amortidora Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. Ja preparat (10 mL/grup). Aquesta solució s'ha de preparar amb un Tris especial, de contingut molt baix en Ca^{2+} , Tris-base (Roche, ref. 03573826001).
- Solució fosfat monosòdic (NaH_2PO_4) 50 mM. Ja preparat.
- Solució fosfat disòdic (Na_2HPO_4) 50 mM. Ja preparat. Aquesta solució i l'anterior s'utilitzaran, pels estudiants, per a preparar solucions de diferent pH.
- BCECF 10 μM , en un amortidor Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. Ja preparada (1 mL/grup).
- QUIN2, 1 mM, en un amortidor Tris (especial)-HCl 10 mM, pH 7,5 ($\epsilon_{354} = 5000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, sense Ca^{2+}). Guardeu la solució en un tub de vidre folrat amb paper d'alumini. Ja preparada (0,5 mL/grup).
- CaCl_2 1 mM, en un amortidor Tris (especial)-HCl 10 mM, pH 7,5. Ja preparada (1 mL/grup).
- MgCl_2 1 mM, en un amortidor Tris (especial)-HCl 10 mM, pH 7,5. Ja preparada (1 mL/grup).

5.3. Procediment experimental

5.3.1. Fluoròfor QUIN2

Espectre d'excitació de QUIN2 i de QUIN2- Ca^{2+}

Col·loqueu en la cubeta de l'espectrofluorímetre 2,9 mL de la solució amortidora de Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 i hi afegiu 100 μL de la solució 1 mM de QUIN2. Obteniu l'espectre d'excitació emprant un rang de longituds d'ona d'excitació entre 290 i 400 nm i utilitzant una λ_{em} de 495 nm.

A continuació, afegiu en la mateixa cubeta 5 μL de la solució de CaCl_2 1 mM i obteniu un nou espectre. Tot seguit, hi afegiu, de 5 en 5 μL , la mateixa solució de Ca^{2+} i repetiu aquesta operació,

tal i com indica la Taula 1, fins que observeu que hi ha saturació (aproximadament 10-12 addicions) Després de la realització de cada espectre, determineu la intensitat de fluorescència a la λ màxima d'excitació (≈ 328 nm).

TAULA 1

$\mu\text{L CaCl}_2$ 1 mM	I_F	Conc. final $\text{CaCl}_2, \mu\text{M}$
0		0
(+5) 5		
(+5) 10		
(+5) 15		
(+5) 20		
(+5) 25		
(+5) 30		
(+5) 35		
(+5) 40		
(+5) 45		
(+5) 50		
(+5) 55		

Representeu les dades d'intensitat de fluorescència en funció de la concentració de Ca^{2+} resultant després de cada addició de la solució de CaCl_2 i obteniu així una corba patró.

Servirien igualment el resultats dels espectres d'emissió que els d'excitació per a les determinacions de Ca^{2+} ?

Determinació de la concentració de Ca^{2+} en una solució problema

Col·loqueu en altres tubs 2800 μL de solució amortidora de Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, i hi afegiu 100 μL de la solució 1 mM de QUIN2 i 100 μL de la solució problema, de la qual voleu conèixer la concentració de Ca^{2+} . Obteniu l'espectre d'excitació de la mateixa manera que abans. Interpoleu el valor de I_F a 340 nm en la corba patró i deduiu la concentració de Ca^{2+} .

Determineu, de la mateixa forma, la concentració de Ca^{2+} en l'aigua de l'aixeta (utilitzeu inicialment 100 μL).

Especificitat del QUIN2

Heu de comprovar si la unió de l'ió Ca^{2+} al QUIN2 és específica o, per contra, hi ha altres cations divalents, com el Mg^{2+} , també abundant en sistemes biològics, que també poden induir canvis en les propietats de fluorescència del QUIN2. Per a esbrinar aquesta qüestió, heu d'emprar la sal MgCl_2 .

Afegiu a un tub 2800 μL de l'amortidor de Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, i 100 μL de QUIN2, 1 mM. Realitzeu l'espectre d'excitació amb una λ_{em} de 495 nm. A continuació afegiu, en la mateixa cubeta, 100 μL d'una solució 1 mM de MgCl_2 i obteniu-ne un nou espectre. La presència de Mg^{2+} altera l'espectre d'excitació del QUIN2? És llavors el QUIN2 específic per a la detecció i quantificació de Ca^{2+} ?

5.3.2. Sonda fluorescent BCECF (2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(6)-carboxifluoresceïna)

Espectres d'excitació de BCECF: efecte del pH

En primer lloc prepareu les solucions amortidores a diferents pH mesclant, en diferents proporcions com indica la següent taula (Taula 2), fosfat monosòdic 50 mM i fosfat disòdic 50 mM. Prepareu 10 mL de cada solució amortidora. D'aquesta forma es disposarà d'una sèrie de solucions amortidores de igual concentració (50 mM en fosfat sòdic) i de diferent pH. Anoteu els valors de pH teòrics.

TAULA 2

$\text{NaH}_2\text{PO}_4:\text{Na}_2\text{HPO}_4$	pH teòric	pH observat
10:0	<5,0	
9:1		
8:2		
7:3		
6:4		
5:5		
4:6		
3:7		
2:8		
1:9		
0:10	>9,0	

Agiteu bé les mescles i determineu, amb el pH-metre, el pH resultant de cada tub.

A continuació prepareu les solucions de BCECF ($pK_a = 6,98$) a diferents pH emprant aquestes solucions amortidores de fosfat sòdic. Per a això, mescleu en tubs, 3 mL de cada solució amortidora de fosfat sòdic de pH conegut i 20 μL de la sonda BCECF a 10 μM . Obteniu l'espectre d'excitació de cada solució emprant un rang de λ_{ex} entre 400 i 520 nm i una λ_{em} fixa de 530 nm. Compareu els espectres obtinguts. Deduïu de cada espectre d'excitació, a diferent pH, la intensitat de fluorescència a λ_{ex} de 495 nm.

TAULA 3

pH observat	I_F
pH problema=	
pH aigua de l'aixeta=	
pH aigua destil·lada=	

Nota: resulta convenient mesurar en primer lloc la solució de pH més alt, després rentar la cubeta i, a continuació, mesurar les altres solucions en ordre creixent de pH sense necessitat de rentar la cubeta entre mesures.

Representeu els valors de I_F en funció del pH per a obtenir la corba de calibratge o patró.

Determinació del pH d'una solució problema

Afegiu 3 mL de la solució problema de pH desconegut a la cubeta de l'espectrofluorímetre. A continuació, hi afegiu 20 μL de BCECF 10 μM i obteniu l'espectre d'excitació en les mateixes

condicions que les emprades per a la corba de calibratge. Determineu la I_F a λ_{ex} de 495 nm.

Repetiu de igual forma els espectres amb aigua de l'aixeta i amb aigua destil·lada.

Interpoleu el valor de I_F en la corba patró anterior i deduiu els pH de les solucions problema.

5.4. Bibliografia

1. GRYNKIEWICZ, G.; POENIE, M.; TSIEN, R. Y. (1985): "A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties", *J. Biol. Chem.*, **260**, 3340-3350 (hemeroteca de ciències).
2. TSIEN, R.; POZZAN, T. (1989): "Measurement of cytosolic free Ca^{2+} with Quin2", *Meth. Enzymol.*, **172**, 230-244 (accés lliure a Internet).
3. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Indicators-for-Ca2-Mg2-Zn2-and-Other-Metal-Ions.html>. Pàgina web de l'empresa Invitrogen amb molta informació sobre indicadors fluorescents, incloent-hi QUIN2, de diversos ions metàl·lics. Mostra múltiples figures amb espectres i proporciona molts detalls de la manera d'utilitzar i d'interpretar les dades amb les sondes fluorescents.
4. NEDERGAAD, M.; DESAI, S.; PULSINELLI, W. (1990): "Dicarboxy-dichlorofluorescein: a new fluorescent probe for measuring acidic intracellular pH". *Anal. Biochem.*, **187**, 109-114 (hemeroteca de ciències).
5. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/pH-Indicators.html>. Pàgina web de l'empresa Invitrogen amb molta informació sobre diverses sondes fluorescents utilitzades per a la determinació del pH en cèl·lules. Inclou figures amb els diferents espectres de les sondes, també de BCECF emprat en aquesta pràctica.

5.5. Qüestions proposades

1. Què es pot deduir de la comparació dels espectres obtinguts del QUIN2 en absència i presència de Ca^{2+} ? Com expliques els canvis en les propietats de fluorescència del QUIN2 pel Ca^{2+} ?
2. Els espectres d'excitació del QUIN2 són diferents segons la concentració de l'ió Ca^{2+} . Creieu que també seran diferents els espectres d'emissió? Es podrien emprar els canvis en els espectres d'emissió, induïts pel Ca^{2+} , si n'hi hagueren, per a estimar la concentració d'aquest catió en una solució problema?
3. Hi ha algun punt isoemissiu (punt isoestílbic) en els espectres d'excitació del QUIN2 amb i sense Ca^{2+} ? Què s'entén per punt isoemissiu?
4. Què deduïu de la comparació dels espectres d'excitació del QUIN2 en presència de CaCl_2 i MgCl_2 ?
5. Què es pot deduir de la comparació dels espectres obtinguts amb BCECF a diferent pH? Quina informació proporciona la representació de la intensitat de fluorescència en funció del pH?
6. Quines limitacions pot tenir la BCECF per a la mesura del pH?



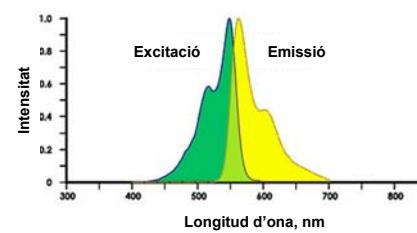
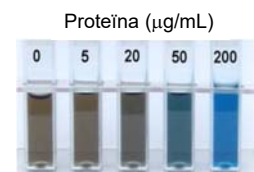
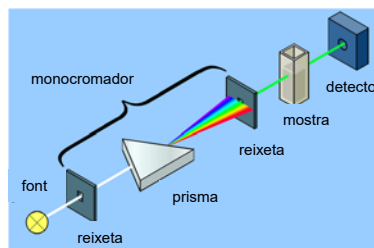
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

GRAU EN BIOTECNOLOGIA

PRÀCTIQUES INTEGRADES DE MÈTODES

Primera part

Explicacions



Pràctiques integrades de mètodes (1a part)

- **Pràctica 1:**
 - INTRODUCCIÓ A L'ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISIBLE
- **Pràctica 2:**
 - ANÀLISI CINÈTICA D'UN ENZIM LIPASA PER COLORIMETRIA I TURBIDIMETRIA
- **Pràctica 3:**
 - MESURA DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA I DELS METABÒLITS PER ESPECTROFOTOMETRIA
- **Pràctica 4:**
 - INTERACCIÓ PROTEÏNA-LLIGAND. SEGUIMENT PER FLUORIMETRIA
- **Pràctica 5:**
 - SONDES FLUORESCENTS: DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE Ca^{2+} I DETERMINACIÓ DEL pH

Avaluació:

Primera part de l'assignatura = 50% de la qualificació

Examen = 4 punts

Qüestionari = 1 punt

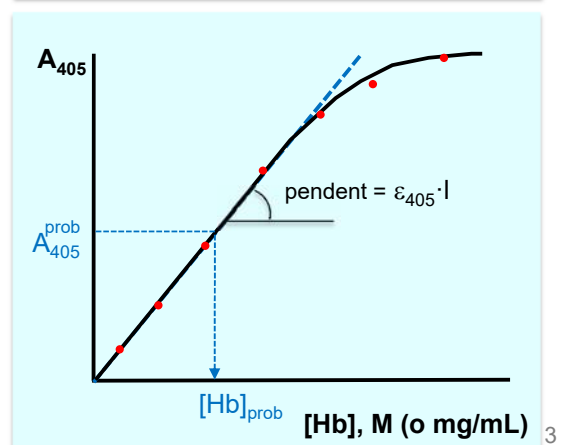
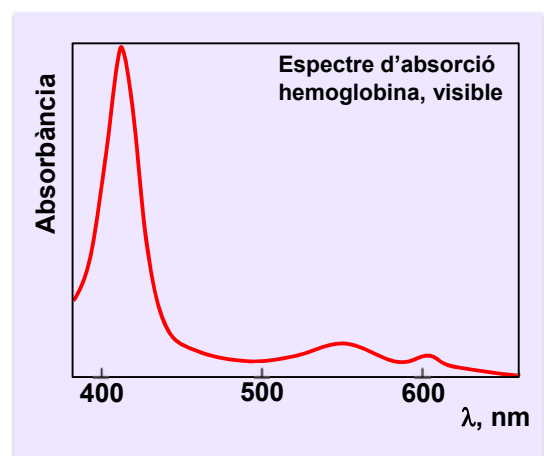
PRÀCTICA 1: INTRODUCCIÓ A L'ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISIBLE

Introducció

- L'hemoglobina (Hb) presenta diverses bandes d'absorció a λ visibles, a causa del cofactor hemo, la qual cosa li dóna el color roig.
- El blau de bromofenol és un indicador del pH amb espectres d'absorció diferents per a les formes protonada i no protonada.
- Les mesures d'absorbància a λ visible es realitzen amb un colorímetre.

Coeficient d'extinció de l'hemoglobina a 405 nm

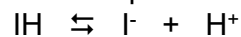
- Mesureu A_{405} de solucions de Hb a diferents concentracions conegudes.
- Lambert-Beer: $A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c$. Representeu A_{405} davant de concentració (mg/mL i/o M) de Hb. Ajusteu el tram lineal i obteniu el pendent ($= \epsilon_{405} \cdot l$).
- Deduïu ϵ_{405} ($l = 1$ cm) i expresseu-ho en $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ i $(mg/mL)^{-1} \cdot cm^{-1}$.
- A_{405} de mostres de Hb del problema X i Y. Deduïu la concentració interpolant sobre la recta anterior o a partir del ϵ_{405} . Diluïu les solucions convenientment si cal.



PRÀCTICA 1: INTRODUCCIÓ A L'ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISIBLE

Influència del pH sobre l'espectre d'absorció del blau de bromofenol

- El blau de bromofenol és un indicador del pH amb l'equilibri de dissociació:



al qual correspon la constant: $K_a = \frac{[\text{I}^-][\text{H}^+]}{[\text{IH}]}$. Així també:

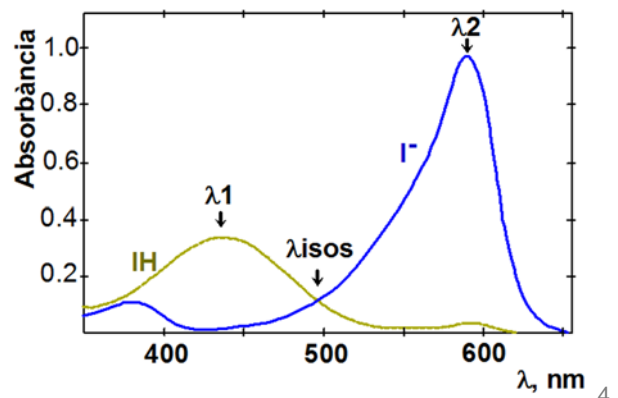
$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \left(\frac{[\text{I}^-]}{[\text{IH}]} \right)$$

Si el pH és baix ($\text{pH} \ll \text{p}K_a$), només IH. Si el pH és alt ($\text{pH} \gg \text{p}K_a$), només I⁻. Si el pH és al voltant de $\text{p}K_a$, ambdues formes coexisteixen al 50%.

- Els espectres d'absorció de les formes protonada (IH) i desprotonada (I⁻) són diferents, amb diferents $\lambda_{\text{màx}}$: [$\lambda_1(\text{IH})$ i $\lambda_2(\text{I}^-)$].
- La λ en què les dues formes absorbeixen igualment (els espectres es creuen): **punt isosbèstic** (λ_{isos}).

- Mesureu A_{λ_1} i A_{λ_2} d'una solució (de concentració coneguda de l'indicador) a pH baix (pH 2,4; només hi ha IH). Deduïu $\epsilon_{\lambda_1(\text{IH})}$ i $\epsilon_{\lambda_2(\text{IH})}$. Les unitats dependran de les utilitzades per a la concentració.

- Mesureu A_{λ_1} i A_{λ_2} d'una solució (de concentració coneguda de l'indicador) a pH alt (pH 5,8; només hi ha I⁻). Deduïu $\epsilon_{\lambda_1(\text{I}^-)}$ i $\epsilon_{\lambda_2(\text{I}^-)}$.



PRÀCTICA 1: INTRODUCCIÓ A L'ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISIBLE

Concentració de cromòfors en mescles

- L'absorbància a dues λ , λ_1 i λ_2 , permet determinar les concentracions de les dues formes, dissociada i no dissociada, en qualsevol pH (o determinar el pH a partir d'aquests valors d'absorbància) en qualsevol solució en què són presents.
- Apliqueu el sistema de dues equacions:

$$\begin{aligned}A_{\lambda_1} &= \epsilon_{\lambda_1, \text{IH}} \cdot l \cdot c_{\text{IH}} + \epsilon_{\lambda_1, \text{I}^-} \cdot l \cdot c_{\text{I}^-} \\A_{\lambda_2} &= \epsilon_{\lambda_2, \text{IH}} \cdot l \cdot c_{\text{IH}} + \epsilon_{\lambda_2, \text{I}^-} \cdot l \cdot c_{\text{I}^-}\end{aligned}$$

- Mesureu A_{λ_1} i A_{λ_2} de les solucions de blau de bromofenol en qualsevol pH (per exemple, pH 3,4 i 4,2). Apliqueu les equacions anteriors i deduiu les concentracions de IH i I⁻.
- Com són els valors de $A_{\lambda_{\text{isos}}}$ en els diferents pH? Per definició de punt isobèstic, han de ser iguals per a tots els pH.

PRÀCTICA 2: ANÀLISI CINÈTICA D'UN ENZIM LIPASA PER COLORIMETRIA I TURBIDIMETRIA

Introducció

- Enzim = lipasa de pàncrees porcí (ppL)

- Presenta activitat ESTERASA:
 - Hidrolitza enllaços èster de molècules solubles (per exemple, acetat de *p*-nitrofenil, PNPA).
 - Catàlisi en medi homogeni.
 - Seguiment per COLORIMETRIA (A_{400} , aparició d'un producte acolorit, *p*-nitrofenol, groc).
 - Estudiarem l'efecte inhibidor del PBA (àcid fenilborònic) sobre l'activitat esterasa.

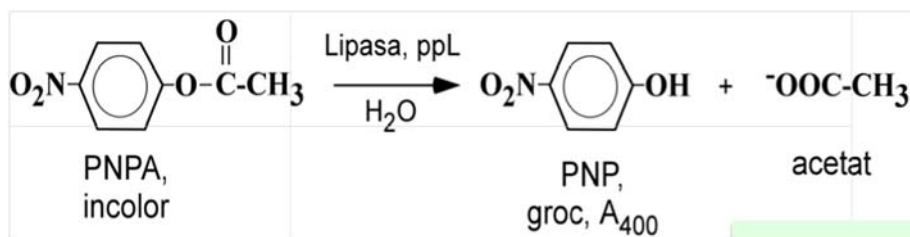
- Presenta activitat LIPASA:
 - Hidrolitza triglicèrids (per exemple, l'oli d'oliva) i origina àcids grassos lliures i glicerol.
 - El substrat, com que és insoluble, ha d'estar emulsionat amb una proteïna (BSA) com a lipoproteïna artificial.
 - Catàlisi en un medi heterogeni.
 - Seguiment per TURBIDIMETRIA (A_{660}) amb l'ús d'un colorímetre.

PRÀCTICA 2: ANÀLISI CINÈTICA D'UN ENZIM LIPASA PER COLORIMETRIA I TURBIDIMETRIA

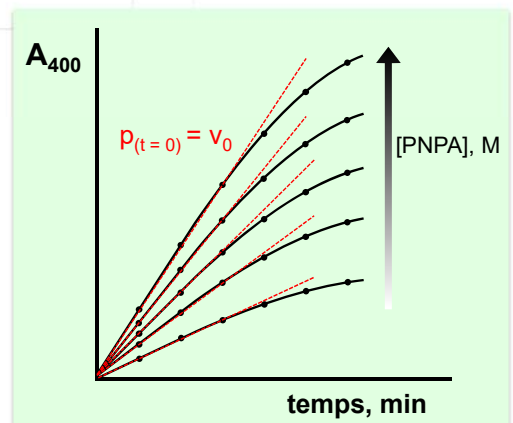
Estudi de l'activitat esterasa

Variació de la velocitat d'hidròlisi del substrat amb la concentració: determinació de K_m

- Enzim = lipasa de pàncrees porcí (ppL) a una concentració constant de 0,1 mg/mL.
- Substrat = PNPA (acetat de *p*-nitrofenil), concentració variable.
- Reacció de l'activitat ESTERASA:



- Determinació dels paràmetres cinètics K_m i $V_{m\grave{a}x}$.
- Per a cada concentració de substrat (PNPA) determineu la A_{400} cada 30 s, durant 3 min. Representeu A_{400} durant el temps (min) i obteniu el pendent en els primers instants ($t \rightarrow 0$, la tangent): pendent = v_0 ($\Delta A_{400}/\text{min}$).

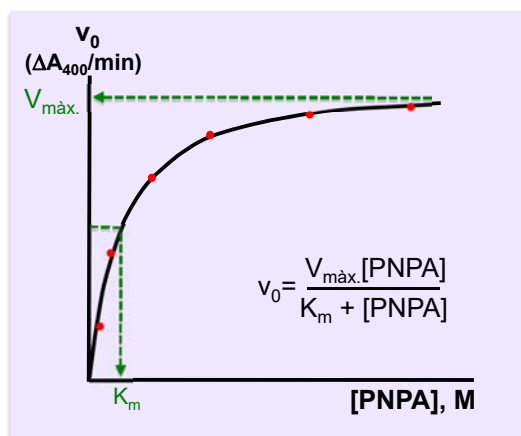


7

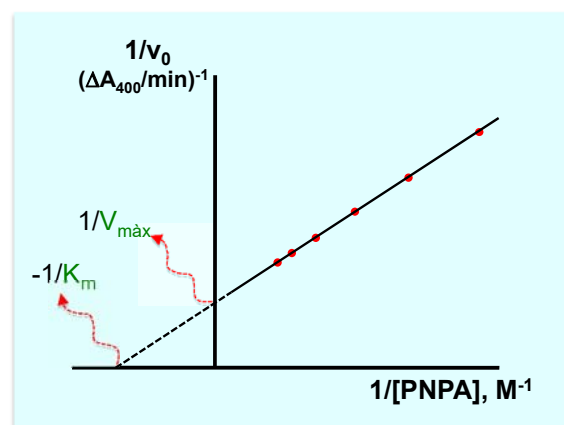
PRÀCTICA 2: ANÀLISI CINÈTICA D'UN ENZIM LIPASA PER COLORIMETRIA I TURBIDIMETRIA

- Realitzeu les representacions directa (v_0 vs [PNPA]) i de dobles inversos ($1/v_0$ vs $1/[PNPA]$). No oblideu incloure-hi les unitats.
- Deduïu K_m i $V_{m\grave{a}x}$ (dobles inversos) de la ppL per a aquest substrat, PNPA.

Representació directa



Representació de dobles inversos

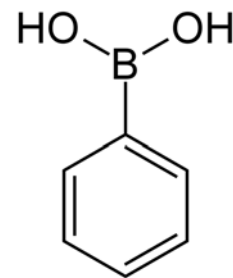


PRÀCTICA 2: ANÀLISI CINÈTICA D'UN ENZIM LIPASA PER COLORIMETRIA I TURBIDIMETRIA

Estudi de l'activitat esterasa

Efecte inhibidor de l'àcid fenilborònic (PBA)

- ppL a una concentració constant, 0,1 mg/mL.
- Substrat PNPA, concentració variable.
- Inhibidor àcid fenilborònic a una concentració de 0,5 mM



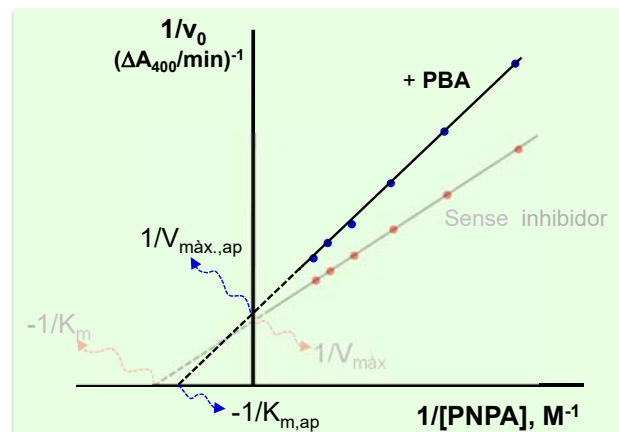
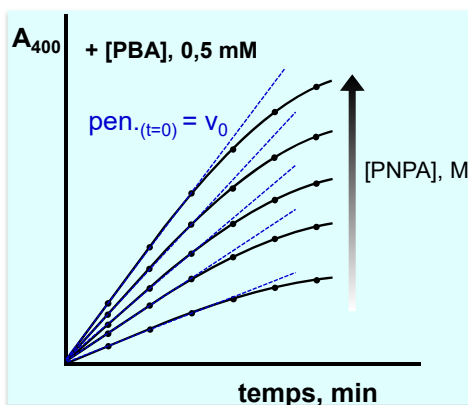
Àcid fenilborònic, PBA

- Determineu igualment que abans v_0 per a cada [PNPA] en presència de l'inhibidor PBA 0,5 mM.
- Obteniu K_m i $V_{m\grave{a}x}$ amb inhibidor (és a dir, $K_{m,ap}$ i $V_{m\grave{a}x,ap}$) de la representació de dobles inversos.

PRÀCTICA 2: ANÀLISI CINÈTICA D'UN ENZIM LIPASA PER COLORIMETRIA I TURBIDIMETRIA

- Determineu v_0 per a cada [PNPA] en presència de l'inhibidor PBA 0,5 mM.
- Obteniu K_m i $V_{m\grave{a}x}$ amb inhibidor ($K_{m,ap}$ i $V_{m\grave{a}x,ap}$) de la representació de dobles inversos.
- Determineu el tipus d'inhibició exercit pel PBA comparant aquests paràmetres en presència i en absència de l'inhibidor.

Representació de dobles inversos

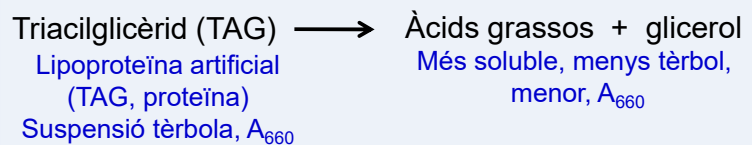


PRÀCTICA 2: ANÀLISI CINÈTICA D'UN ENZIM LIPASA PER COLORIMETRIA I TURBIDIMETRIA

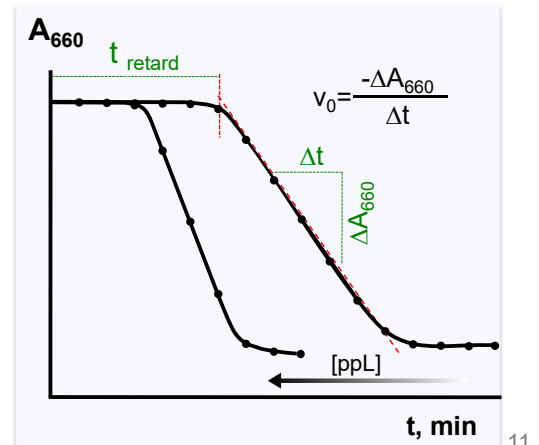
Estudi de l'activitat lipasa: seguiment per turbidimetria

Variació de la velocitat d'hidròlisi de TAG amb la concentració d'enzim

- Enzim = lipasa de pàncrees porcí (ppL) a una concentració constant, 0,1 mg/mL.
- Substrat = triacilglicèrids (TAG) en forma de lipoproteïna artificial (emulsió TAG amb BSA)
- Reacció activitat LIPASA:



- La llum és dispersada per les partícules en suspensió. El descens de la terbolesa amb la hidròlisi de TAG, es mesura com a A_{660} .
- Dues concentracions de ppL A_{660} cada 2 min, durant 30 min. Representeu A_{660} en funció del temps.
- Després d'un temps de retard, la A_{660} disminueix amb un pendent proporcional a la quantitat de ppL.
- El **temps de retard** (en el qual la ppL interacciona amb la lipoproteïna i produeix la seua activació) també depèn de [ppL], més curt amb més enzim.



11

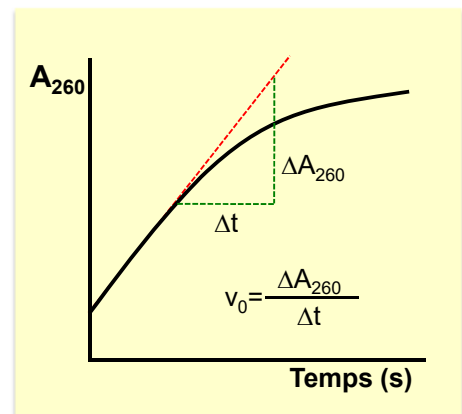
PRÀCTICA 3: MESURA DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA I DELS METABÒLITS PER ESPECTROFOTOMETRIA

Introducció

- Mesura d'activitat d'hidròlisi del DNA per espectrofotometria amb llum UV.
- Contingut d'etanol en aliments emprant reaccions enzimàtiques i espectrofotometria.

Valoració de l'activitat nucleasa per espectrofotometria UV

- Enzim:
 - Nucleasa de micrococ (MNasa)
 - Activitat endo- i exo- nucleasa sobre DNA (i també RNA)
- Substrat:
 - DNA de doble cadena (d'esperma d'areng).
- Fonament: efecte hipocròmic
 - La hidròlisi del DNA incrementa A_{260} . L'absorció de llum UV de les bases és menor quan formen part d'un polinucleòtid que quan són lliures.
- Velocitat de reacció (v_0) seguint A_{260} en funció del temps
- El pendent quan $t \rightarrow 0$ és v_0

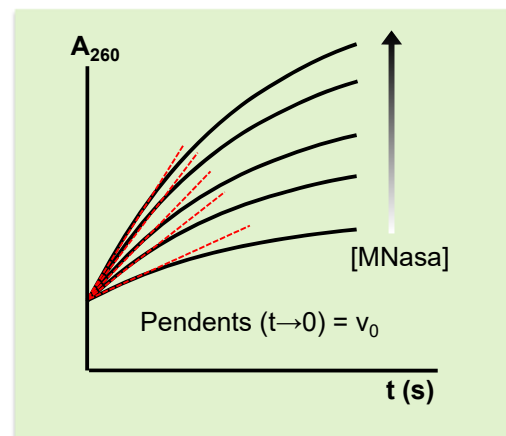


PRÀCTICA 3: MESURA DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA I DELS METABÒLITS PER ESPECTROFOTOMETRIA

Variació velocitat d'hidròlisi del DNA amb la concentració MNasa (v_0 vs [enzim])

- [DNA]: constant (50 $\mu\text{g/mL}$)
- [MNasa]: variable (entre 0 i 0,6 $\mu\text{g/mL}$)
- Una cinètica per a cada [MNasa], en què es determine v_0 a partir dels pendents a $t=0$.
- Representeu v_0 en funció de [MNasa] i estimeu el rang en el qual v_0 és proporcional a la [MNasa]. Només en aquest tram:

- Com que $v_0 = \text{constant} \cdot [E]_0$, una mesura de v_0 permet esbrinar la concentració de MNasa en una solució problema

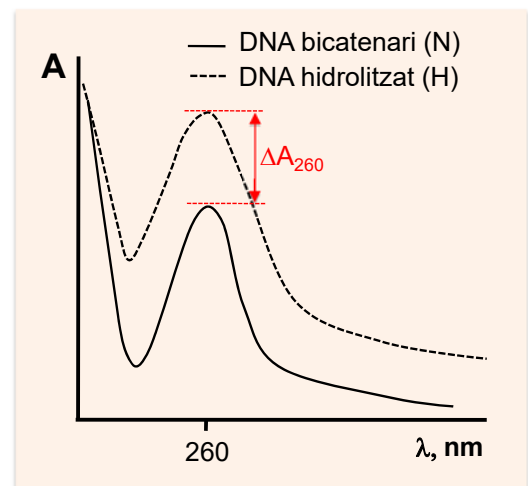


PRÀCTICA 3: MESURA DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA I DELS METABÒLITS PER ESPECTROFOTOMETRIA

Observació de l'efecte hiperocròmic i determinació de $\Delta\epsilon_{260}$

- Compareu els espectres de DNA bicatenari (N) i de DNA hidrolitzat (H) (a igual concentració)
- Calculeu $\Delta\epsilon_{260}$ a partir de ΔA_{260} produït com a conseqüència de la hidròlisi

$$\begin{aligned}
 A_{260}^N &= \epsilon_N \cdot l \cdot [\text{DNA}] \\
 A_{260}^H &= \epsilon_H \cdot l \cdot [\text{DNA}] \\
 \Delta A_{260} &= A_{260}^H - A_{260}^N \\
 \Delta A_{260} &= (\epsilon_{260}^H - \epsilon_{260}^N) \cdot l \cdot [\text{DNA}] \\
 \Delta A_{260} &= (\Delta\epsilon_{260}) \cdot l \cdot [\text{DNA}] \\
 \Delta\epsilon_{260} &= \frac{\Delta A_{260}}{l \cdot [\text{DNA}]}
 \end{aligned}$$



- Determinarem $\Delta\epsilon^{1M}$ (per mol de parell de bases/L) i haurem de transformar les unitats de [DNA]:

$$[\text{DNA}] \text{ (mg/mL)} \rightarrow [\text{DNA}] \text{ (mol de pb/L)}$$

sabent que la Mr d'un parell de bases és aprox. 600.

Significat de $\Delta\epsilon_{260}^{1M}$

És el ΔA_{260} que es produeix per cada mol de parell de bases/L alliberat des del polímer.

PRÀCTICA 3: MESURA DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA I DELS METABÒLITS PER ESPECTROFOTOMETRIA

Determinació enzimàtica d'etanol en aliments

- Avantatges dels mètodes enzimàtics en la determinació de metabòlits:
 - Sensibilitat (permet detectar quantitats molt petites)
 - Especificitat (permet distingir entre molècules semblants)
 - Precisió (permet obtenir resultats reproduïbles)
 - Rapidesa
- Quan s'utilitza una reacció enzimàtica per a determinar un metabòlit: $X \xrightarrow{E} Y$ és perquè X no pot mesurar-se directament, però pot transformar-se, mitjançant una reacció enzimàtica, en Y, que sí que pot quantificar-se per espectrofotometria.
- **Consideracions** que cal tenir en compte:
 - La K_{eq} de la reacció ha de ser molt alta (equilibri desplaçat cap a la formació de Y).
 - En reaccions bisubstrat: $X + S2 \xrightarrow{E} Y$ el segon substrat (S2) ha d'estar en excés.
 - Si la K_{eq} no és molt alta, pot utilitzar-se una reacció acoblada (enzimàtica o química):
$$X + S2 \xrightleftharpoons{E_1} Y + P2$$
$$P2 + S3 \xrightarrow{E_2} P3$$
 - La concentració de l'enzim o els enzims ha de ser prou alta per a arribar a l'equilibri en poc de temps.

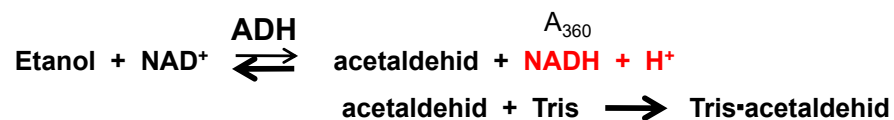
PRÀCTICA 3: MESURA DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA I DELS METABÒLITS PER ESPECTROFOTOMETRIA

Determinació enzimàtica d'etanol en aliments

- Mostra: cervesa amb i sense alcohol.
- Fonament:
 - L'etanol és oxidat per l'enzim alcohol-deshidrogenasa (ADH) a acetaldehid, i es redueix el coenzim NAD^+ a NADH , que absorbeix a 360 nm:



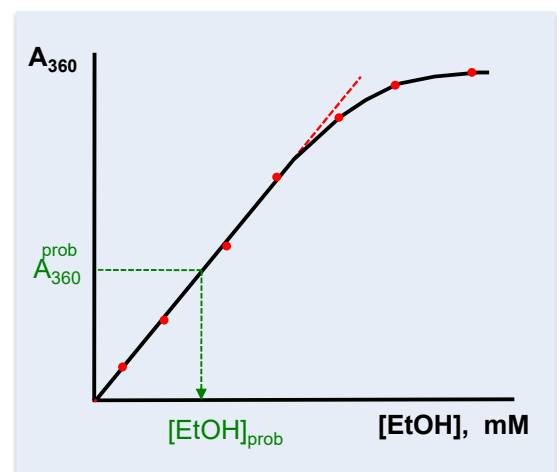
- La K_{eq} és molt petita, desplaçada cap a l'esquerra. Per a aconseguir desplaçar-la cap a productes (acetaldehid i $\text{NADH} + \text{H}^+$) s'utilitza pH bàsic (>9,0) i una alta concentració de Tris (0,25 M), que forma un complex amb l'acetaldehid, i actua així com a "agent atrapant", amb el qual es consumeix tot l'etanol.



- La $[\text{NAD}^+]$ és alta i no limitant (2 mM en l'assaig), i la quantitat d'ADH ha de ser suficient perquè la transformació ocòrriga ràpidament.
- A partir de la A_{360} del NADH es dedueix la concentració d'etanol en la mostra problema mitjançant dues vies possibles.

PRÀCTICA 3: MESURA DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA I DELS METABÒLITS PER ESPECTROFOTOMETRIA

- Realitzeu la mateixa reacció amb quantitats conegudes d'etanol.
- Representeu A_{360} davant de $[\text{EtOH}]$.
- Ajusteu a una recta, eviteu els valors de saturació.
- Interpoleu la A_{360} de les mostres problema.
- Assegureu-vos que els valors queden en el tram lineal.
- Deduiu la $[\text{EtOH}]$ de les mostres originals (cervesa amb i sense alcohol) tenint amb compte les dilucions i els volums emprats.
- Obteniu el % (g d'etanol/100 mL)
- Alternativament, podeu utilitzar $\epsilon_{360} = 4.270 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ del NADH per a calcular-ne la concentració i deduir, amb l'estequiometria de la reacció, la concentració d'EtOH en la mostra problema.
- Quin mètode és més exacte?



Si s'han realitzat duplicats o dilucions diferents d'una mateixa mostra, el resultat final ha de ser la mitjana. Compareu els valors obtinguts amb els que proporciona el fabricant.

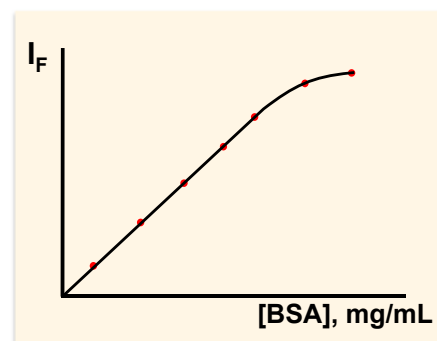
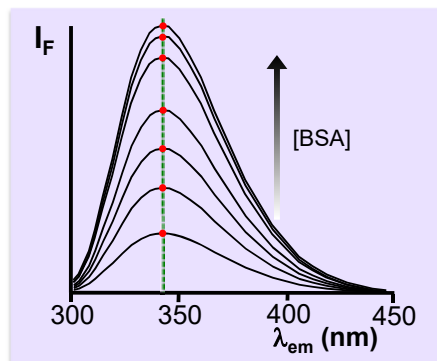
PRÀCTICA 4: INTERACCIÓ PROTEÏNA-LLIGAND. SEGUIMENT PER FLUORIMETRIA

Introducció

- Dos fluorocroms: BSA (albúmina de sèrum boví) i ANS (anilinaftalè sulfonat).
- Comproveu la proporcionalitat entre intensitat de fluorescència (I_F) i concentració (BSA).
- Realitzeu espectres d'excitació i emissió de ANS.
- Estudieu l'efecte de polaritat del dissolvent sobre l'emissió fluorescent (ANS).
- Seguiment de la unió ANS-BSA per fluorescència, i determinació de la $K_{afinitat}$.

BSA: espectres d'emissió i dependència amb la concentració

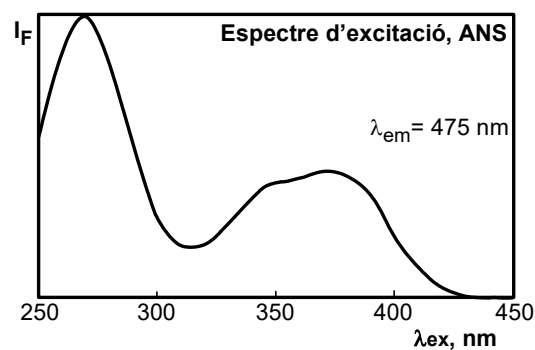
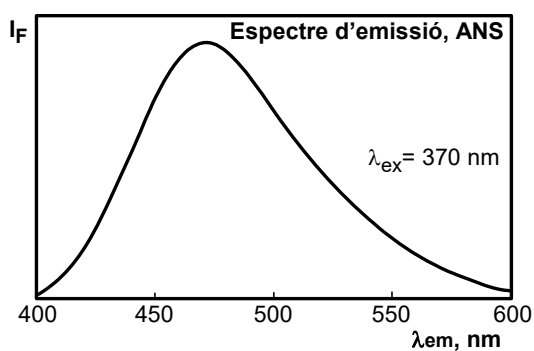
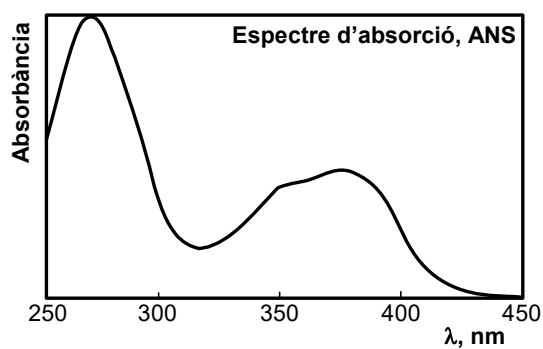
- La fluorescència de la BSA és deguda als Trp.
- Exciteu-la amb una llum de 280 nm i registreu l'espectre d'emissió entre 300 i 450 nm, amb diferents [BSA], entre 0 i 0,1 mg/mL.
- Representeu la I_F en funció de la [BSA] i comproveu-ne la proporcionalitat.



PRÀCTICA 4: INTERACCIÓ PROTEÏNA-LLIGAND. SEGUIMENT PER FLUORIMETRIA

ANS: espectres d'emissió i excitació

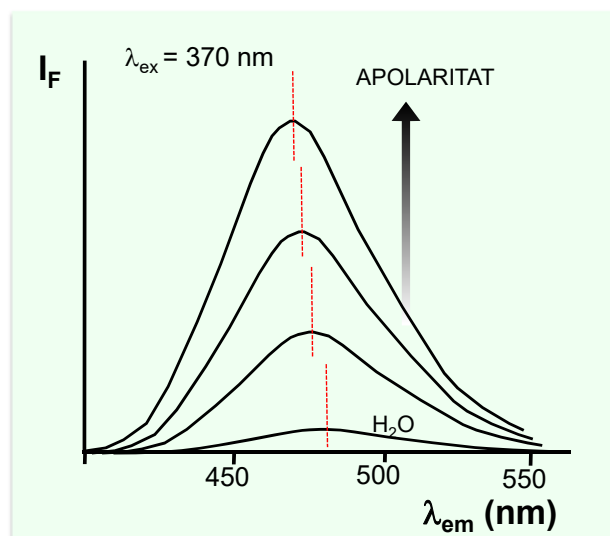
- Obteniu l'espectre d'emissió (λ_{ex} = màx. d'absorció, 370 nm) entre 400 i 600 nm de λ_{em} .
- Realitzeu espectres d'excitació entre 280 i 450 nm. Utilitzeu λ_{em} màxim observat en l'espectre d'emissió.



PRÀCTICA 4: INTERACCIÓ PROTEÏNA-LLIGAND. SEGUIMENT PER FLUORIMETRIA

ANS: efecte de la polaritat del dissolvent sobre l'emissió fluorescent

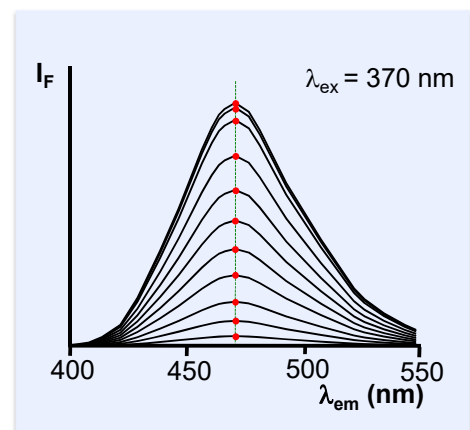
- [ANS] = constant, 20 μM
- Solvents de diferent polaritat: aigua i metanol i etanol al 20, 40 i 60 % (v/v)
- Obteniu espectres d'emissió entre 400 i 550 nm, amb radiació de 370 nm
- Comproveu que la I_F augmenta amb l'apolaritat del solvent i que té lloc un petit desplaçament cap al blau. Noteu que el ANS pràcticament no és fluorescent en una solució aquosa, però el seu rendiment quàntic s'incrementa en entorns més apolars.



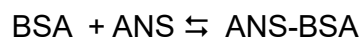
PRÀCTICA 4: INTERACCIÓ PROTEÏNA-LLIGAND. SEGUIMENT PER FLUORIMETRIA

Estudi de la unió del ANS a la BSA

- BSA posseeix cavitats hidrofòbiques on s'uneix ANS.
- La I_F del ANS unit és molt més gran que la del ANS lliure, permet determinar la $[ANS-BSA]$.
- $[BSA]_0$, total de BSA, constant (0,213 mg/mL).
- $[ANS]_0$, total de ANS, variable, entre 0 i 20 μ M.
- Obteniu espectres d'emissió ($\lambda_{ex} = 370$ nm) entre 400 i 550 nm de les mescles ANS i BSA.
- Determineu I_F a per a cada concentració de ANS.
- Determineu la constant de dissociació ANS-BSA.



- Si assumim per a la BSA un sol lloc d'unió per al ANS, l'equilibri és:



i la constant de dissociació és: $K_d = \frac{[BSA][ANS]}{[ANS-BSA]}$

$[BSA]$ és la concentració de proteïna BSA no unida; $[ANS]$ la concentració de ANS no unit (lliure), i $[ANS-BSA]$ la del complex proteïna-lligand.

PRÀCTICA 4: INTERACCIÓ PROTEÏNA-LLIGAND. SEGUIMENT PER FLUORIMETRIA

- Així, també $[BSA]_0 = [BSA] + [ANSA-BSA]$ i $[ANS]_0 = [ANS] + [ANSA-BSA]$
- Per a totes les mescles es compleix que I_F és proporcional (Q) a la concentració del complex proteïna-l·ligand, és a dir:

$$I_F = Q \cdot [ANS-BSA] \quad (1) \text{ ja que ANS lliure pràcticament no és fluorescent.}$$

- En condicions de saturació pel lligand totes les molècules de proteïna es trobaran unint ANS. Així s'obtindrà un valor de fluorescència màxim: $I_{Fm\grave{a}x.}$, proporcional a la concentració de proteïna total:

$$I_{Fm\grave{a}x.} = Q \cdot [BSA]_0 \quad (2)$$

- La funció de saturació (ν) es defineix com a:
$$\nu = \frac{\text{mol de lligand unit}}{\text{mol de proteïna total}} = \frac{[ANS-BSA]}{[BSA]_0} \stackrel{\text{amb eq. (1) i (2)}}{=} \frac{I_F/Q}{I_{Fm\grave{a}x.}/Q} = \frac{I_F}{I_{Fm\grave{a}x.}} \quad (3)$$

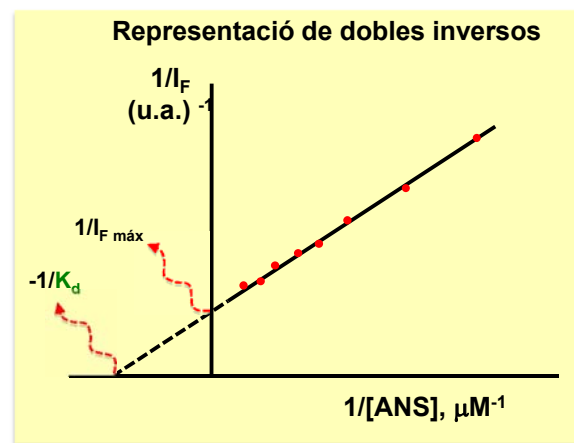
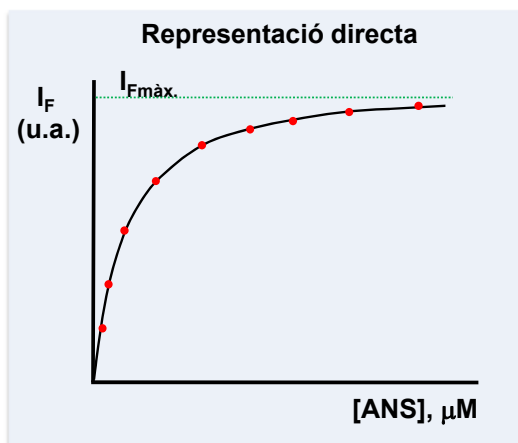
- Per a una proteïna amb un sol lloc d'unió, la ν és:
$$\nu = \frac{[L]}{K_d + [L]} \stackrel{\text{En aquest cas per al lligand ANS}}{=} \frac{[ANS]}{K_d + [ANS]} \quad (4)$$

- Si igualem les equacions (3) i (4),
$$I_F = \frac{I_{Fm\grave{a}x.} [ANS]}{K_d + [ANS]} \quad (5)$$

Aquesta equació (d'una hipèrbola), en què la I_F queda en funció de la concentració de ANS lliure ([ANS]), permet deduir la K_d i, per tant, $K_a = 1/K_d$

PRÀCTICA 4: INTERACCIÓ PROTEÏNA-LLIGAND. SEGUIMENT PER FLUORIMETRIA

- S'obté $I_{F\text{màx}}$ de la mescla amb la concentració de ANS major, assumint que és saturant. De l'equació (2) i com es coneix la $[BSA]_0$, es dedueix la constant de proporcionalitat Q .
- Aquesta constant Q s'aplica a cadascuna de les mescles, amb l'equació (1), i s'obté la $[ANS\text{-}BSA]$, i aquesta es resta a $[ANS]_0$ per a deduir la $[ANS]$ (ANS lliure) que apareix en l'equació (5): $[ANS] = [ANS]_0 - [ANS\text{-}BSA]$.
- Representeu I_F en funció de $[ANS]$, originant una corba hiperbòlica, d'asíptota $I_{F\text{màx}}$.
- Per a determinar la K_d es representen els dobles inversos ($1/I_F$ vs $1/[ANS]$). Cal ajustar els valors a una línia recta. L'extrapolació, fins a tallar l'eix d'abscisses (x) permet obtenir K_d , i d'ací la constant d'afinitat o d'associació K_a .



PRÀCTICA 5: SONDES FLUORESCENTS: DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE Ca^{2+} I DETERMINACIÓ DEL pH

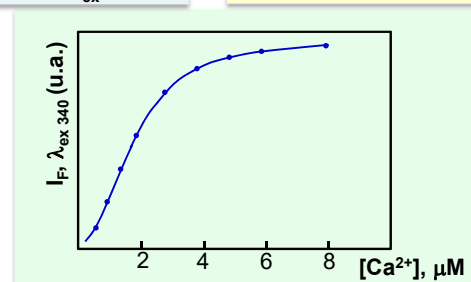
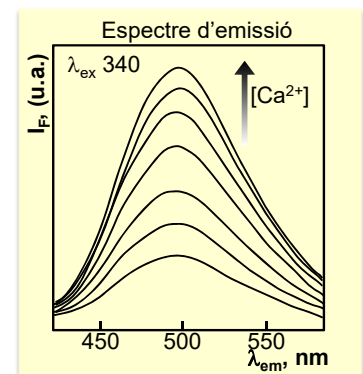
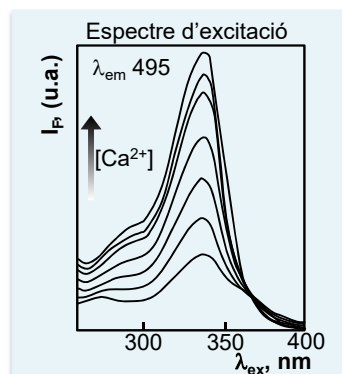
Introducció

- Utilitzarem dues sondes fluorescents: QUIN2, un indicador de Ca^{2+} , i BCECF, un indicador del pH.
- Per a determinar la $[\text{Ca}^{2+}]$ i el pH en solucions problema, en ambdós casos es preparen corbes de calibratge (patró) amb solucions de $[\text{Ca}^{2+}]$ o pH coneguts.

QUIN2

Espectres d'excitació en presència de Ca^{2+}

- Tant els espectres d'excitació com d'emissió són diferents per al QUIN2 i QUIN2- Ca^{2+} .
- Comproveu l'efecte de concentracions creixents de Ca^{2+} sobre l'espectre d'excitació del QUIN2: $\lambda_{\text{em}} = 495$; λ_{ex} entre 290 i 400 nm.
- Determineu la I_F a $\lambda_{\text{exmàx}}$ (340 nm). Representeu I_F en funció de $[\text{Ca}^{2+}]$ per a obtenir la corba patró.



PRÀCTICA 5: SONDES FLUORESCENTS: DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE Ca^{2+} I DETERMINACIÓ DEL pH

QUIN2

Determinació de la concentració de Ca^{2+} en una mostra problema i en aigua de l'aixeta

- Espectre d'excitació de la mescla de solució problema i solució QUIN2. El mateix amb aigua de l'aixeta.
- Interpoleu el valor de I_F a 340 nm resultant sobre la corba patró anterior.

Especificitat de la sonda QUIN2

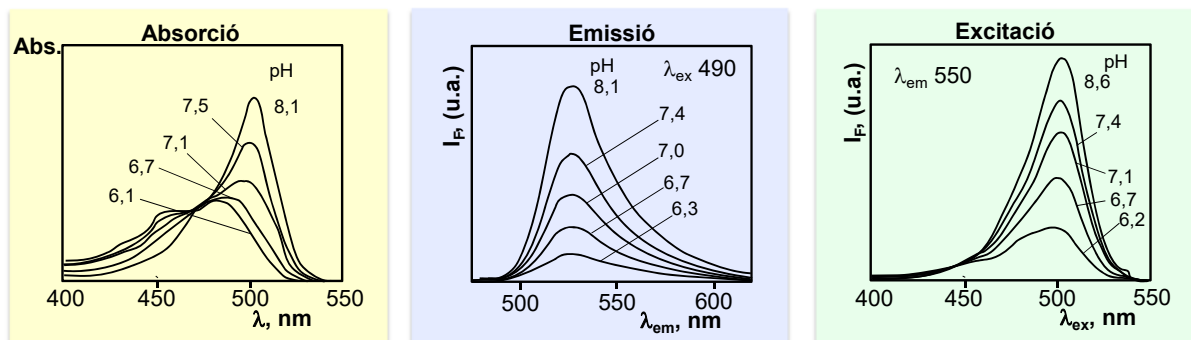
- Per a comprovar si el QUIN2 pot detectar cations divalents diferents al Ca^{2+} , com el Mg^{2+} , es realitza l'espectre d'excitació de la mescla de solució de QUIN2 (amortidor + QUIN2) i MgCl_2 .

PRÀCTICA 5: SONDES FLUORESCENTS: DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE Ca^{2+} I DETERMINACIÓ DEL pH

Sonda fluorescent BCECF (2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(6)-carboxifluoresceïna)

Espectres d'excitació del BCECF: efecte del pH

- Els espectres d'absorció, d'excitació i d'emissió de les formes protonada i desprotonada de BCECF són molt diferents. En estat protonat, el BCECF pràcticament no és fluorescent.



PRÀCTICA 5: SONDES FLUORESCENTS: DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE Ca^{2+} I DETERMINACIÓ DEL pH

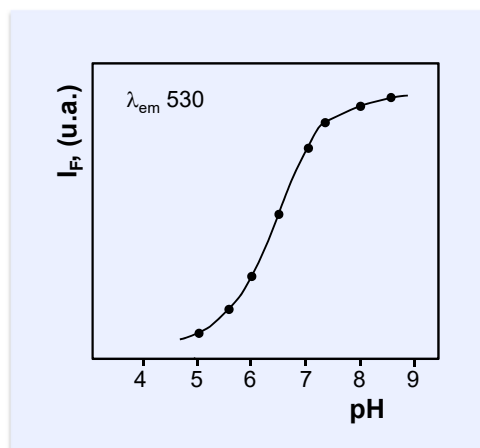
BCECF

Espectres d'excitació del BCECF: efecte del pH

- La I_F emesa depèn del grau de dissociació del BCECF i, per tant, del pH. Requereix la preparació d'una corba patró o de calibratge.
- Corba patró: prepareu solucions de BCECF amb diferent pH en un amortidor de fosfat.
- Obteniu els espectres d'excitació (400-520 nm, $\lambda_{em} = 530$ nm).
- Representeu els valors de I_F a $\lambda_{ex} = 495$ nm en funció del pH.

pH de solucions problema

- Afegiu BCECF a la solució problema. Obteniu l'espectre d'excitació igual que abans i deduïu I_F a $\lambda_{ex} = 495$ nm.
- Interpoleu en la corba patró anterior.
- Determineu de la mateixa forma el pH en l'aigua de l'aixeta i en aigua destil·lada



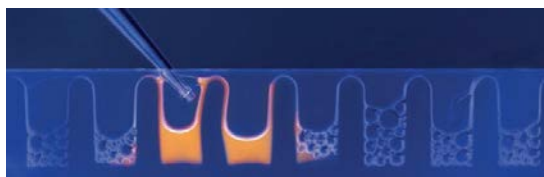
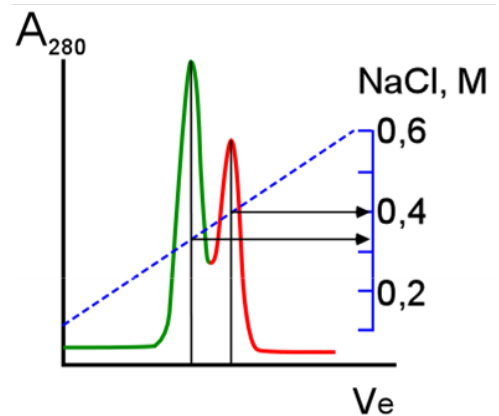
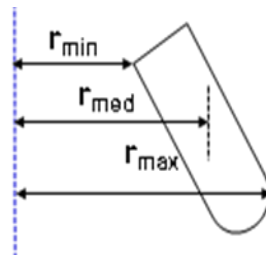
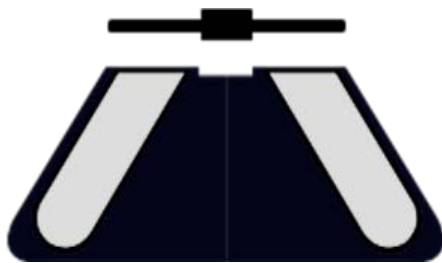


UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

GRAU EN BIOTECNOLOGIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA
MOLECULAR

PRÀCTIQUES INTEGRADES DE MÈTODES
Segona part



ESTUDI DE LA RIBULOSA-1,5-BISFOSFAT-CARBOXILASA-OXIGENASA DE FULLES DE TARONGER

1. Introducció

L'objectiu d'aquesta pràctica és la purificació de l'enzim ribulosa-1,5-bisfosfat-carboxilasa-oxigenasa (RuBisCO) a partir de fulles de taronger. Aquest enzim catalitza la primera etapa del cicle de Calvin, ruta metabòlica que condueix a la fixació del CO_2 atmosfèric i la seua conversió en matèria orgànica. L'activitat carboxilasa de la RuBisCO produeix la unió covalent del CO_2 a la pentosa ribulosa-1,5-bisfosfat i el trencament de l'intermediari inestable de sis carbonis resultant en dues molècules de 3-fosfoglicerat. Una d'aquestes dues molècules és portadora del carboni del CO_2 i constitueix el seu grup carboxil.

La RuBisCO es troba a les parts verdes de les plantes, fonamentalment a les fulles, i es localitza en l'estroma dels cloroplasts i constitueix al voltant del 50% de la proteïna de l'orgànul (d'un 20 a un 25% de la proteïna soluble de les fulles verdes).

En plantes superiors, l'enzim té una estructura complexa constituïda per 8 subunitats grans (L) que són catalítiques i 8 subunitats petites (S), reguladores, i presenta una massa molecular relativa pròxima als 500.000. Les subunitats majors s'aparellen de dues en dues i els seus centres catalítics queden a la zona de contacte entre ambdues subunitats. Els quatre dímers així formats s'agrupen i formen una espècie de barril. Les 8 subunitats menors es disposen als extrems d'aquest barril. L'eix central del barril hi deixa un petit buit. La subunitat gran està codificada en el genoma del cloroplast mateix, mentre que la petita ho està en el nucli de la cèl·lula.

Tots els enzims RuBisCO coneguts procedents de diferents organismes fotosintètics, tant eucariòtics com procariòtics, presenten, a més, una segona activitat enzimàtica, activitat oxigenasa. En la reacció d'oxigenació, el O_2 competeix amb el CO_2 per unir-se a la RuBisCO, especialment quan la $[\text{CO}_2]$ és baixa i la $[\text{O}_2]$ és alta. La reacció d'oxigenació de la ribulosa-1,5-bisfosfat produeix una unitat de la molècula 3-fosfoglicerat i un

compost de dos carbonis, el 2-fosfoglicolat. L'oxigenació és la primera de les reaccions de la fotorespiració que porta a la pèrdua del carboni fixat, ja que part dels àtoms de carboni del 2-fosfoglicerat es converteixen de nou en CO_2 .

L'activitat oxigenasa de la RuBisCO sembla ser un procés inservible, perquè produeix una reducció important de l'eficiència de fixació del CO_2 . No obstant això, es debat si podria resultar útil en condicions de llum intensa i baixes concentracions de CO_2 a causa del tancament estomàtic causat per estrès hídric. També es creu que podria tenir un paper en la prevenció de la fotooxidació i la fotoinhibició.

El procediment de purificació de la RuBisCO que es durà a terme al llarg de les sessions pràctiques inclou els passos següents:

- 1) Extracció de proteïnes per homogeneïtzació de les fulles de taronger utilitzant un molinet de ganivetes. Es pretén el trencament de les estructures cel·lulars de les fulles i l'alliberament de la RuBisCO des dels cloroplasts. L'enzim s'ha de recuperar, juntament amb altres proteïnes cel·lulars, solubilitzat en una solució amortidora d'extracció. L'addició de 2-mercaptoetanol i de polivinilpolipirrolidona (PVP) evitarà l'oxidació de les proteïnes.
- 2) Fraccionament de les proteïnes de l'extracte cru per precipitació amb polietilenglicol (PEG). El PEG és un polímer no iònic, molt soluble en aigua, que produeix la precipitació sense desnaturalitzar les proteïnes. En la solució, el PEG elimina molècules d'aigua de la capa de solvatació de les proteïnes, la qual cosa incrementa les interaccions proteïna-proteïna i porta a la precipitació. La concentració de PEG requerida per a la precipitació depèn de cada proteïna. Cal eliminar una part important de les proteïnes contaminants duent l'extracte cru a 10% en PEG, concentració a la qual la RuBisCO no precipita. La RuBisCO es precipitarà amb una concentració del 20%. En tots dos casos les proteïnes precipitades s'han de recollir per centrifugació.
- 3) El precipitat del 20% del PEG, que inclou la RuBisCO, s'ha de dialitzar per a eliminar el PEG residual contaminant i per a

disposar les proteïnes en un medi (solució amortidora d'equilibratge) adequat per al pas següent de purificació.

- 4) Cromatografia de canvi aniònic. Cal preparar una columna cromatogràfica emprant com a fase estacionària DEAE-cel·lulosa. Després d'aplicar-hi les proteïnes, dissoltes en una solució amortidora d'equilibratge com a fase mòbil, la columna s'ha de rentar amb el mateix medi per a eliminar-ne les proteïnes no retingudes. Els soluts units, entre els quals hi ha la RuBisCO, s'han d'eluir reduint-ne els factors de capacitat mitjançant un gradient lineal de força iònica. Aquest gradient s'ha de preparar amb un formador de gradients emprant la sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dissolta en la solució amortidora d'equilibratge. L'eluat cromatogràfic s'ha de recollir amb un col·lector de fraccions. S'obindrà el perfil cromatogràfic després de l'anàlisi espectrofotomètric de les fraccions resultants.

El seguiment de tot el procés de purificació de la RuBisCO es farà prenent mostres de cadascun dels extractes i les fraccions obtinguts. L'examen es farà per electroforesi discontinua desnaturalitzant sobre gel de poliacrilamida en presència de dodecilsulfat sòdic (SDS), SDS-PAGE. Després de la tinció del gel electroforètic, les bandes de proteïna corresponents a les subunitats de la RuBisCO s'han de quantificar mitjançant una densitometria de la imatge del gel d'electroforesi. Aquesta anàlisi permetrà determinar el grau de purificació, el rendiment i la qualitat de la purificació realitzada.

2. Materials, reactius i solucions

2.1. Material/grup

- Homogeneïtzador de ganivetes
- Centrifugadora Beckman
- Provetes (2 L, 1 L, 250 mL i 100 mL)
- Agitador magnètic
- Columnes de vidre (2 x 25 cm)
- Bomba peristàltica
- Suport, pinces i connexions de columna

- Cubeta d'electroforesi
- Pinta d'electroforesi
- Membrana de diàlisi
- Espàtules
- Bany per a bullir
- Plaques de vidre d'electroforesi
- Espectrofotòmetre
- Tubs del col·lector de fraccions (30 x 5 mL)
- Pipetes automàtiques: 1.000, 200 i 20 μ L
- Vasos de precipitats (2; 1; 0,5; 0,25 i 0,1 L)
- pH-metre
- Tubs de centrifugadora
- Densitòmetre
- Barretes magnètiques
- Llana de vidre
- Formador de gradients
- Col·lector de fraccions
- Font d'electroforesi
- Safates de tinció de gels
- Erlenmeyer de 250 mL
- Tubs d'Eppendorf
- Puntetes de pipeta
- Gasa
- Cubetes de quars d'1 mL (2)

2.2. Reactius

- Tris ($M_r = 121,14$; pK_a 8,1)
- $MgSO_4$ ($M_r = 246,48$)
- $(NH_4)_2SO_4$ ($M_r = 132,14$)
- Metanol
- PEG ($M_r = 3.350$)
- DEAE-cel·lulosa
- Patrons de massa molecular
- Polivinilpirrolidona (PVP)
- Albúmina de sèrum boví (BSA)
- 2-mercaptoetanol ($M_r = 78,13$; 1 L = 1,12 kg)
- Glicina ($M_r = 75,1$)
- SDS
- Àcid acètic
- H_2SO_4 diluït (1 M)

- Blau de Coomassie (G i R250)
- Persulfat amònic

2.3. Solucions

Solucions que han de preparar cadascun dels grups (el primer dia):

- Solució amortidora d'extracció, 250 mL/grup: Tris-H₂SO₄ 100 mM, MgSO₄ 10 mM, pH 8,0. Ajusteu el pH afegint H₂SO₄ diluït (1 M).
- Solució 50% (p/v) PEG en una solució amortidora d'extracció (50 mL/grup).
NOTA: prepareu-la amb precaució perquè és fàcil excedir el volum final. Escalfeu-la per a dissoldre completament el PEG si fóra necessari.
- Solució amortidora d'equilibratge, 1,5 L/grup: Tris-H₂SO₄ 10 mM, pH 7.8. Ajusteu el pH afegint H₂SO₄ diluït (1 M).
- Solució amortidora d'equilibratge amb (NH₄)₂SO₄ 0,2 M, 100 mL/grup.
- Solució amortidora de regeneració: prepareu una solució amortidora d'equilibratge que continga 1 M (NH₄)₂SO₄, 100 mL/grup.

Solucions que ha de preparar un grup per a compartir:

GRUP A:

- Reactiu de Bradford (blau de Coomassie G) 5X 100 mL. Dissoleu 40 mg de blau de Coomassie G en 20 mL d'etanol 96%; afegiu 40 mL de H₃PO₄ i aigua fins a 100 mL.
NOTA: aquest reactiu està concentrat cinc vegades. Just abans d'utilitzar-lo, l'heu de diluir amb quatre parts d'aigua i filtrar-lo.

GRUP B:

- Solució amortidora d'electroforesi, 2 L: Tris 0,025 M, glicina 0,192 M i SDS 0,10% (p/v).

GRUP C:

- Colorant de tinció de gels, 200 mL: blau de Coomassie R-250 al 0,1% (p/v) en àcid acètic 8% (v/v) i metanol 40% (v/v).

GRUP D:

- Decolorant de gels, 1 L: 5% (v/v) àcid acètic, 20% (v/v) metanol.

Solucions ja preparades:

- BSA 0,12% (p/v).
- Solucions d'electroforesis:
 - SDS 3X: SDS 6,5%, mercaptoetanol 2 M, glicerol 25% (v/v), blau de bromofenol 0,02% (p/v) i Tris-HCl 0,25 M, pH 6,8.
 - Solució A: ProtoGel, acrilamida 30% (p/v), bisacrilamida 0,8% (p/v).
 - Solució B: (solució amortidora de gel inferior) Tris-HCl 1,5 M, SDS 0,4%, pH 8,8.
 - Solució BX: (solució amortidora de gel superior) Tris-HCl 0,5 M, SDS 0,4%, pH 6,8.
 - Solució C: persulfat amònic 10% (p/v). Cal preparar-lo just abans d'utilitzar-lo.

3. Procediment experimental**3.1. Presa de mostres i extracció de proteïnes**

Heu d'arreglar unes 25 fulles de taronger unes hores abans de començar els experiments i guardar-les en una bossa a 4°C fins que les utilitzeu. Heu de rentar les fulles amb aigua de l'aixeta i, posteriorment, amb aigua destil·lada, i cal eixugar-les amb paper de filtre. Heu de pesar 10 g de fulles. Heu de prendre 40 mL de solució amortidora d'extracció, refredar-la sobre gel i afegir-hi 2-mercaptoetanol fins a una concentració de 20 mM (1,4 µL/mL). Aquest volum d'amortidor l'heu d'abocar a l'homogeneïtzador de ganivetes (Osterizer). Heu de tallar els 10 g de fulles de taronger amb tisores, en trossos petits (0,5 cm²,

aprox.), i dipositar-los en el vas de l'Osterizer sobre l'amortidor. A continuació, heu de triturar les fulles fent servir un nivell de potència mitjà en el molinet, fins que n'obteniu una barreja homogènia (n'hi ha prou amb 1 min x 3 vegades, però cada vegada que pareu, heu de recollir-ne els trossos que queden per les parets i submergir-los de nou en la solució amortidora). L'extracte obtingut heu de filtrar-lo a través d'una gasa sobre un embut, mesurar el volum de filtrat i deixar-lo sobre gel. Heu d'afegir al filtrat polivinilpolipirrolidona (PVP) sòlida per a obtenir una concentració final de 2% (p/v). Heu d'agitar la mescla i, després, centrifugar-la a 3.330g (5.300 rpm) durant 10 min. Tot seguit, cal recuperar el sobrenadant (heu de descartar-ne el sediment) i mesurar-ne el volum (a aquest volum farem referència en apartats posteriors). Aquest sobrenadant constitueix l'extracte total inicial; l'heu de conservar refrigerat i s'anomena *extracte cru*, **mostra 1 (M1)**. A continuació, agafeu 2 alíquotes (porcions) en tubs d'Eppendorf d'aquesta mostra 1:

Una de les alíquotes l'heu d'utilitzar per a sotmetre les proteïnes presents a electroforesi (en gel de poliacrilamida en presència de SDS) i servirà per a avaluar tot el procés de purificació. Aquesta alíquota consisteix en 100 μ L (de la mostra 1) i 50 μ L de la solució SDS3X (*solvent de mostres*). Després d'afegir-hi el solvent de mostres, heu de bullir la mescla (o escalfar-la a 95°C) durant 5 min per a facilitar la desnaturalització completa de les proteïnes per part del SDS. El solvent de les mostres conté 2-mercaptoetanol per a trencar els ponts disulfur de les proteïnes.

La segona de les alíquotes ha de servir per a la quantificació de les proteïnes. Aquesta alíquota també consisteix en 100 μ L (de la mostra 1) i l'heu de mantenir en gel fins que s'obtinguen les altres mostres al llarg de tot el procés de purificació, perquè així fareu la quantificació de manera conjunta.

NOTA: retoleu clarament tots els tubs per a identificar-los posteriorment.

3.2. Fraccionament de l'extracte amb PEG

El PEG és un polímer hidrofílic que fa precipitar les proteïnes per exclusió estèrica del dissolvent. Heu d'utilitzar la precipitació amb PEG en la purificació de RuBisCO com a alternativa a la precipitació amb $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

La RuBisCO precipita al 20% (p/v) de PEG, però no al 10% (p/v). Per a començar el fraccionament amb PEG, heu d'afegir a l'extracte cru (sobrenadant de la centrifugació anterior, M1) el volum requerit de la solució de PEG al 50% (p/v), de manera que la mescla final siga 10% (p/v) en PEG. Heu d'agitar la mescla, mantenir-la a 4°C i centrifugar-la a 12.000g (10.000 rpm) durant 15 min. Separeu per decantació el sediment (**mostra 2, M2**) i el sobrenadant (**mostra 3, M3**). El sediment (M2) l'heu de resuspendre en la solució amortidora d'extracció emprant un 1/3 del volum d'extracte cru inicial (M1). Preneu, igual que heu fet abans amb la mostra 1, alíquotes per a l'electroforesi i per a la quantificació de proteïnes.

Heu de mesurar el volum del sobrenadant (M3) i prendre mostres per a l'electroforesi i per a la quantificació de proteïnes. A continuació, hi afegiu una solució de PEG 50% (p/v) fins a dur l'extracte a una concentració de 20% (p/v). Agiteu bé la mescla, incubeu-la uns minuts sobre gel i centrifugueu-la a 12.000g durant 15 min. El precipitat és la **mostra 4 (M4)** i el sobrenadant la **mostra 5 (M5)**. El precipitat (M4) l'heu de redissoldre amb solució amortidora d'extracció, utilitzant un 1/3 del volum d'extracte cru inicial. Agafeu porcions de 100 µL, igual que heu fet anteriorment, per a l'electroforesi i per a la quantificació de les proteïnes, tant de la mostra 4 com de la 5. Finalment, heu de dialitzar tot el volum de la mostra 4 en 1 L de solució amortidora d'equilibratge durant tota una nit.

3.3. Cromatografia de canvi iònic sobre DEAE-cel·lulosa

Muntatge de la columna

Heu d'utilitzar una columna de vidre de 2 x 25 cm que subjectareu amb pinces a un suport metàl·lic en posició vertical. Per a evitar la pèrdua de gel cromatogràfic per la part inferior de la columna, heu de col·locar-hi un filtre de llana de vidre. Amb la

columna tancada amb una pinça, l'heu d'omplir aproximadament fins a la meitat amb una solució amortidora d'equilibratge i introduir-hi, amb l'ajuda d'una vareta, la llana de vidre fins al fons de la columna.

Per a empaquetar la columna, obriu una mica la pinça i, amb un flux molt lent, aboqueu-hi, amb un embut, la suspensió de gel per la part superior. Cal evitar que s'hi forme una interfase entre el gel sedimentat i el líquid abans d'abocar tot el gel. Heu d'afegir-hi uns 40 mL de gel.

Després, amb el gel ja sedimentat, heu d'equilibrar-lo afegint la solució amortidora d'equilibratge (almenys dos volums del gel empaquetat). Per a això cal connectar, a través d'un tub de plàstic i el tap perforat, la columna a un recipient (reservori) que conté la solució amortidora d'equilibratge.

Abans de desenvolupar la cromatografia, determineu el flux lliure màxim (sense pinça). Això heu de fer-ho recollint aquest flux durant 5 min de la fase mòbil (amortidor d'equilibratge) a l'eixida de la columna. Una vegada conegut el flux lliure, heu de connectar el tub d'eixida de la columna a una bomba peristàltica i aquesta l'heu d'ajustar a un flux d'aproximadament el 50% del flux lliure. Heu de determinar, igual que abans, el flux real que s'està obtenint, tot recollint el volum a l'eixida de la bomba durant un temps d'uns 5 min. Seguidament, heu d'estimar el temps que el col·lector de fraccions necessita per a recollir-ne 5 mL (cal tenir en compte que el col·lector mesura en segons centesimals i no hexadecimals). Finalment, després de connectar el col·lector de fraccions a la bomba peristàltica, heu de comprovar que tot el muntatge funciona correctament. Una vegada comprovat, heu de realitzar la cromatografia emprant la mostra 4, tal com es descriu en l'apartat següent.

Desenvolupament de la cromatografia en columna

Després de la diàlisi, heu d'aplicar la mostra (M4) en la columna. Elimineu, amb una pipeta Pasteur, el líquid que hi ha sobre el gel de DEAE-cel·lulosa i, també amb una pipeta Pasteur, dipositeu amb cura la mostra per a no distorsionar la superfície del llit cromatogràfic. Connecteu la bomba peristàltica i deixeu que la mostra penetri en el suport cromatogràfic. No heu de recollir l'eluat (que contindrà els soluts que no són retinguts pel canviador

iònic) durant aquest procés d'aplicació de la mostra. Quan acabe d'entrar-hi tota la mostra, pareu de nou la bomba. Hi afegiu la solució amortidora d'equilibratge i connecteu el tap perforat i el tub de plàstic al recipient reservori. Connecteu de nou la bomba peristàltica i feu passar uns 25 mL de solució amortidora d'equilibratge. D'aquesta manera, el suport cromatogràfic és rentat, tot eliminant completament els soluts que no interaccionen amb el canviador d'ions. Tampoc no heu de recollir l'eluat durant el rentatge.

A continuació, feu passar per la columna 150 mL d'un gradient de 0 a 0,2 M en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Per a això heu de preparar prèviament una solució 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en una solució amortidora d'equilibratge, de la qual utilitzareu 75 mL juntament amb altres 75 mL de solució amortidora d'equilibratge en els recipients corresponents del formador de gradient. Amb la bomba peristàltica apagada, connecteu el tub de plàstic del tap perforat al formador de gradient, poseu en marxa l'agitador magnètic i obriu les vàlvules del formador de gradient. Connecteu el tub d'eixida de la bomba al col·lector de fraccions i, immediatament, poseu en marxa la bomba peristàltica i el col·lector per a recollir-ne 5 mL per fracció, tal com hem estimat anteriorment.

Quan tot el gradient haja passat, afegiu, en el mateix formador de gradient, uns 20 mL de l'amortidor que conté 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i continueu recollint unes quantes (4-5) fraccions més (d'aquesta manera aconseguireu recollir completament tot el gradient aplicat).

Finalment, el canviador d'ions s'ha de regenerar fent passar per la columna uns 50 mL de solució amortidora d'equilibratge: 1 M en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i, a continuació, 50 mL o més de la solució amortidora d'equilibratge. Després d'això, heu de desmuntar la columna, recuperar el gel de DEAE-cel·lulosa i rentar el recipient de vidre, eixugar-lo i guardar-lo.

Mesura de A_{280} de les fraccions

A fi d'identificar la presència de proteïnes en les fraccions recollides, heu de mesurar l'absorbància a 280 nm de cadascuna. Després, heu de representar el perfil d'elució, com A_{280} en funció del nombre de fracció, i també, de manera aproximada, el

gradient de concentració de sal (sulfat amònic). De la fracció amb el màxim d'absorbància, heu de determinar-ne la relació de A_{280}/A_{260} , un indicador del grau de puresa de la proteïna i del grau de contaminació per àcids nucleics, polianions que també són retinguts per un canviador d'anions com la DEAE-cel·lulosa. Finalment, prepareu una alíquota per a electroforesi (100 μL de fracció + 50 μL SDS3X i bulliu 5 min), **mostra 6 (M6, enzim purificat)**.

3.4. Determinació de la concentració de proteïnes

Heu de mesurar el contingut en proteïnes de l'extracte cru, i de les diferents solucions contenint RuBisCO, utilitzant el mètode de Bradford, que es basa en la reacció del blau de Coomassie amb les proteïnes i la mesura posterior de la intensitat del color generat com a absorbància a 595 nm. Per a això cal disposar d'una corba patró que represente la dependència de la A_{595} amb la concentració de proteïna, per a després interpolar sobre aquesta els valors de A_{595} de les diferents solucions problema.

Corba patró amb la proteïna BSA

En primer lloc, heu d'utilitzar la solució patró d'albumina de sèrum boví (BSA) al 0,1% (p/v). L'heu de preparar pesant 6 mg de BSA en la balança de precisió i dissolent-los en 5 mL d'aigua. Tenint en compte que la BSA en pols s'hi troba hidratada, la concentració de les solucions preparades gravimètricament és només aproximada. La concentració exacta de la BSA en la solució patró heu de determinar-la espectrofotomètricament a partir del seu $\epsilon_{280}^{1\%}$, que és $6,60 \text{ (cm}\cdot\text{g/100mL)}^{-1}$.

Les mescules de reacció necessàries per a l'obtenció de la corba patró i les dels extractes es detallen en la taula següent (prepareu-les en tubs d'Eppendorf):

μL solució BSA (1,2 mg/mL)	μL aigua	μL mostres	A₅₉₅
0 (blanc)	20	-	
2,5	17,5	-	
5,0	15	-	
10	10	-	
15	5,0	-	
20	0	-	
M1	17,5	2,5	
M2	17,5	2,5	
M3	17,5	2,5	
M4	17,5	2,5	
M5	17,5	2,5	

La corba patró amb BSA resultarà d'emprar diferents volums de solució de BSA 1,2 mg/mL (els μL indicats). Per a les 5 diferents mostres del procés de purificació heu de preparar-ne 5 tubs, cadascun dels quals amb 2,5 μL de cada mostra problema i 17,5 μL d'aigua. Finalment, les mostres problema han d'originar un valor d'absorbància inclòs entre els obtinguts per a la corba patró amb BSA (si no fóra així, caldria repetir la mesura corresponent amb un volum major o menor).

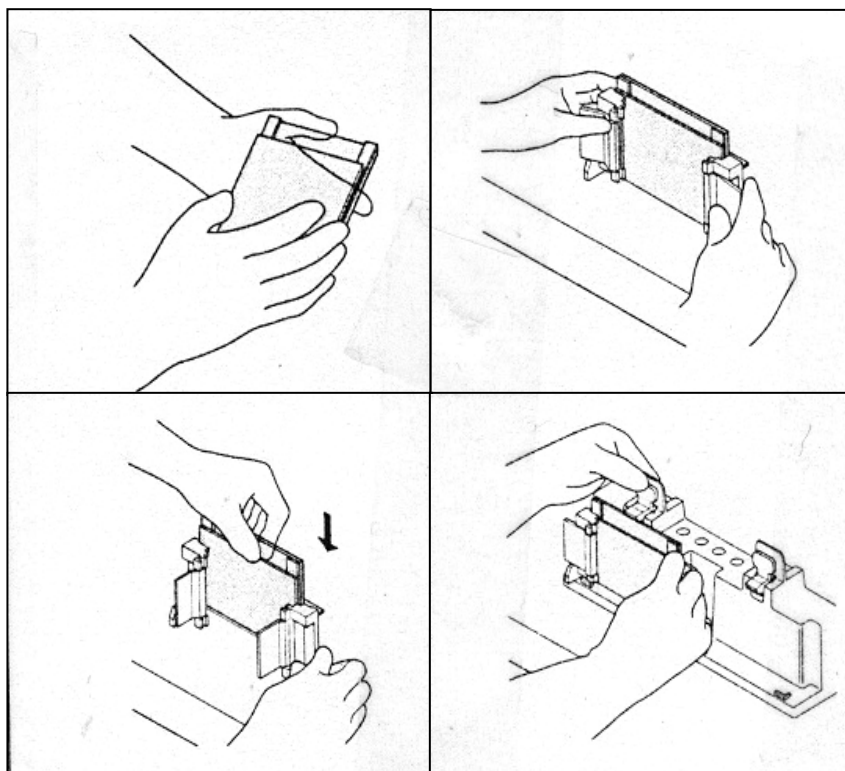
Desenvolupament de la reacció acolorida

Heu de preparar 25 mL de reactiu de Bradford (1X) per dilució de la solució més concentrada (5X) amb aigua (5 mL solució 5X i 20 mL d'aigua → reactiu de Bradford 1X). Després de fer la mescla i agitar-la convenientment, heu de filtrar la solució amb paper de filtre i un embut. A cada tub que conté les solucions de BSA patró o mostra problema, afegiu 1 mL d'aquest reactiu 1X filtrat. Heu d'agitar les mescles i, després d'uns 5 min (però abans de 30 min), heu de mesurar la A₅₉₅. Representeu la A₅₉₅ dels tubs patró en funció de la concentració de proteïna BSA. El càlcul de la proteïna que contenen les mostres problema l'heu de realitzar interpolant en la corba patró. Expresseu els resultats en mg de proteïna per mL d'extracte o fracció, per a la qual cosa heu de considerar els factors de correcció i dilució necessaris.

3.5. Seguiment de la purificació de la RuBisCO per electroforesi en gel de poliacrilamida en presència de SDS

Muntatge de l'armadura i la polimerització de l'acrilamida

- Netegeu les plaques de vidre i la pinta amb etanol i eixugueu-les.
- Col·loqueu la placa curta damunt de la placa amb espaiadors i d'ajusteu-la.
- Feu lliscar 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.
- Bloquegeu les dues plaques de vidre amb les pinces de pressió per a segellar-les.
- Col·loqueu el marc sobre el suport i encaixeu-lo amb la pinça, tot assegurant-vos que les plaques de vidre pressionen sobre la goma del fons del suport.



- Tenint en compte que es farà una electroforesi discontinua, heu de polimeritzar 2 gels: l'inferior (gel de resolució) amb un 14% d'acrilamida i el superior (gel concentrador) amb un 4% d'acrilamida. Heu de preparar els gels seguint la taula següent:

Gel inferior: 14% acrilamida	
solució A	2,3 mL
solució B	1,25 mL
aigua	1,4 mL
pers. am.10% (C)	15 μ L
TEMED	4 μ L

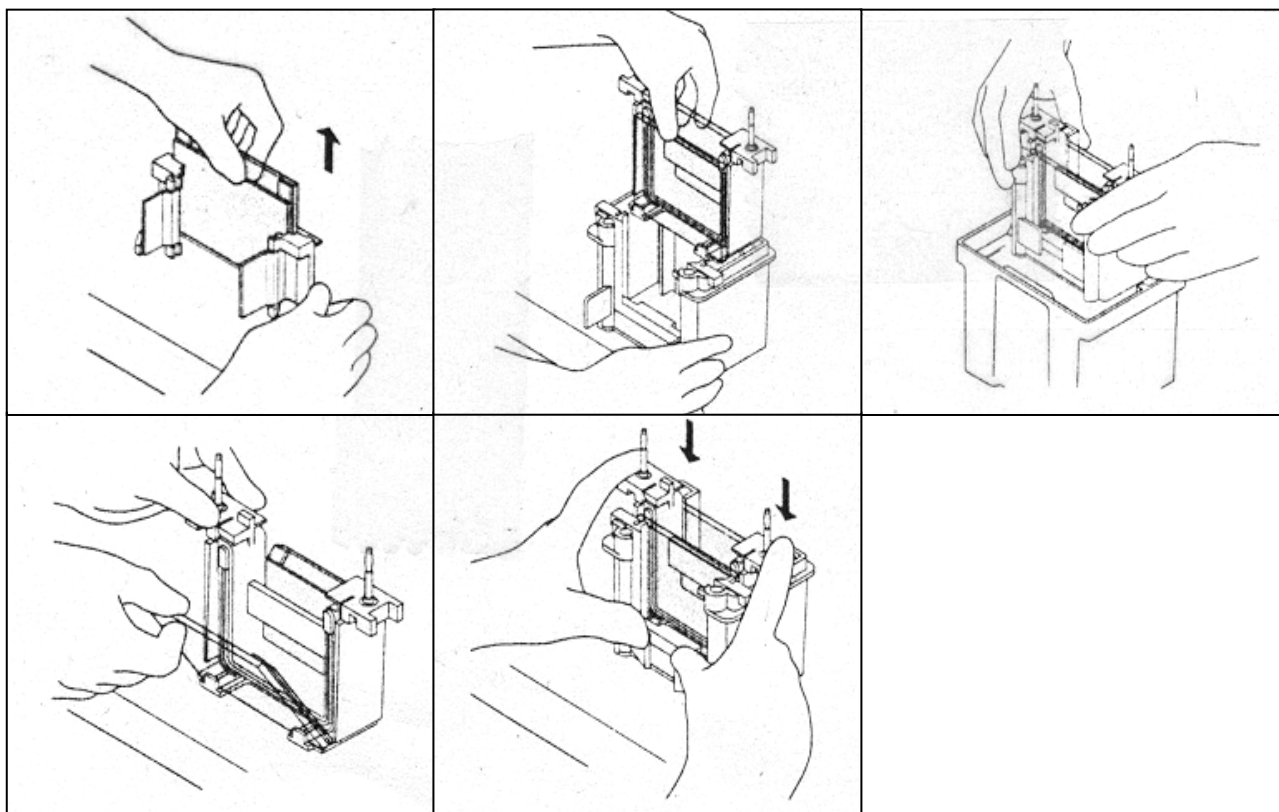
Gel superior 4% acrilamida	
solució A	200 μ L
solució BX	375 μ L
aigua	900 μ L
pers. am.10% (C)	10 μ L
TEMED	5 μ L

NOTA: les solucions A, B i BX (la composició de les quals es detallen en l'apartat de solucions) es donen ja preparades. Només cal preparar la solució C (0,1 g de persulfat amònic en 1 mL d'aigua) just abans de fer les mescles. En primer lloc, heu de preparar la mescla del gel inferior, del 14%, i quan aquesta mescla haja gelificat entre les plaques, heu de preparar la del gel superior, del 4%. No heu de confondre les solucions B i BX, ja que difereixen en concentració i pH, i cadascuna s'ha d'utilitzar exclusivament per al gel corresponent.

- Feu un senyal amb un retolador a aproximadament 5 cm de la vora inferior.
- Aboqueu entre les plaques de vidre la mescla corresponent al gel inferior (14% d'acrilamida) fins a arribar al senyal. Cobriu-la posteriorment, amb l'ajuda d'una microxeringa amb butanol, tenint en compte d'evitar la formació de bombolles i la distorsió de la línia superficial. Deixeu-la gelificar (30-45 min aprox.)
- Elimineu-ne el butanol per decantació i renteu-ho diverses vegades amb aigua. Aboqueu la solució corresponent al gel superior (4% acrilamida) i col·loqueu la pinta tenint en compte 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 aproximada de 0,5 cm de la part superior del gel del 14%. Continueu abocant fins que la solució arribe a la vora superior de la placa. Deixeu-la gelificar almenys durant una hora (es pot deixar tota la nit).

Acoblament del gel en la cubeta d'electroforesi

- Traieu les plaques del suport de gelificació. Lleveu acuradament la pinta i procureu 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 fiqueu el conjunt dins de la cubeta d'electroforesi.



- Afegiu la solució amortidora d'electroforesi als recipients exterior i interior, tenint en compte que la solució estiga en contacte amb el gel i que no queden bombolles entre tots dos.

Aplicació de les mostres

Al llarg de tot el procés d'extracció heu pres alíquotes de 100 μL de les diferents mostres (tal com hem indicat). Immediatament, després d'afegir 50 μL de la solució de mostres, SDS3X, heu de bullir les mescles (o escalfar-les a 95°C) durant 5 min. Heu de guardar refrigerats els tubs fins al moment de l'electroforesi.

Mostra 1 (M1)	Extracte cru (sobrenadant de la primera centrifugació)
Mostra 2 (M2)	Precipitat 10% PEG (redissolt en 1/3 del volum d'extracte cru)
Mostra 3 (M3)	Sobrenadant 10% PEG
Mostra 4 (M4)	Precipitat 20% PEG (redissolt en 1/3 del volum d'extracte cru)
Mostra 5 (M5)	Sobrenadant 20% PEG
Mostra 6 (M6)	Fracció eluïda de la columna de DEAE-cel·lulosa amb més A_{280}

En el moment de realitzar l'electroforesi, dipositeu, amb una pipeta automàtica i en el primer pouet, 3 μL d'una solució que és una mescla de proteïnes patró de massa molecular coneguda (es proporciona ja preparada), la composició de la qual és:

Proteïna	M_r (kDa)
fosforilasa <i>b</i>	94,0
seroalbúmina bovina	67,0
ovoalbúmina	43,0
anhidrasa carbònica	30,0
inhibidor de tripsina	20,1
lactoalbúmina	14,4

A continuació, heu d'anar dipositant en els pouets successius: 15 μL de la **mostra 1**; 10 μL de la **mostra 3**; 5 μL de la **mostra 4** i 15 μL de la **mostra 6**. En els pouets següents, 5 μL de la **mostra 2** i 15 μL de la **mostra 5**.

En principi, les mostres 1, 3, 4 i 6 deuen contenir la proteïna RuBisCO i aquesta deu estar absent en les mostres 2 i 5. La presència de RuBisCO en les mostres 2 i 5 indicarà pèrdua de la proteïna, cosa que conduirà a rendiments baixos. Caldrà tenir en compte els volums de cada extracte i la fracció original (abans de la barreja amb el SDS) que s'hi aplica per al càlcul posterior de la quantitat de proteïna per pouet (segons les concentracions calculades pel mètode de Bradford). La concentració de proteïnes

en la mostra 6 l'heu de determinar espectrofotomètricament considerant un $\epsilon_{280}^{1\%}$ de la RuBisCO de $16,7 \text{ (cm}\cdot\text{g/100mL)}^{-1}$.

En resum, l'ordre i els volums suggerits són:

1. patrons (3 μL)
2. M1 (15 μL)
3. M3 (10 μL)
4. M4 (5 μL)
5. M6 (15 μL)
6. buit
7. M2 (5 μL)
8. M5 (15 μL)

Electroforesi i tinció del gel

- Connecteu el pol positiu (roig) de la font de corrent continu al born inferior de la cubeta, i el negatiu al born superior. Seleccioneu un voltatge constant de 70 V fins que la mostra haja penetrat en el gel i, després, continueu a 150 V.
- Desconnecteu la font quan el marcador (blau de bromofenol, present en la solució de mostres) es trobe a menys d'1 cm de la vora inferior del gel.
- Traieu el gel que hi ha entre les plaques de vidre i submergiu-lo en la solució colorant durant almenys mitja hora.
- Decoloreu el gel durant tota la nit i transferiu-lo a aigua destil·lada al matí següent.

Fotografia i anàlisi del gel

Heu de fotografiar el gel amb un sistema de transil·luminació i càmera connectat a un ordinador. Feu servir un programa de quantificació de bandes anomenat Image J, de descàrrega gratuïta des de la xarxa. La imatge fotogràfica heu d'obrir-la com a JPG. Amb el rectangle de selecció heu d'incloure-hi la carrera sencera. Seleccioneu *analyze/gels/select first line* i *analyze/gels/plot line*, que representa el perfil de tota la carrera.

Amb les eines *pencil* o la línia recta, podeu dibuixar la base de tots els pics corresponents a les bandes de proteïna que cal quantificar, que queden marcats en groc. Amb la vareta, seleccioneu totes les àrees. Els valors estan proporcionats d'esquerra a dreta i de dalt a baix.

4. Bibliografia

1. ANDERSSON, I. (2008): "Catalysis and regulation in Rubisco", *J. Exp. Bot.*, **59**, 1555-1568 (hemeroteca de ciències).
2. ATHA, D. H.; INGHAMG, K. C. (1981): "Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols", *J. Biol. Chem.*, **256**, 12108-12117 (hemeroteca de ciències).
3. DEUTSCHER, M. P. (ed.) (1990): *Guide to protein purification*, Academic press, San Diego (biblioteca del departament).
4. GUTTERIDGE, S.; GATENBY, A. A. (1995): "RuBisCO synthesis, assembly, mechanism and regulation", *Plant Cell* **7**, 809-819 (hemeroteca de ciències).
5. MATTHEWS, C. K.; VAN HOLDE, K. E.: *Biochemistry*, pp. 54-56 i 214-215 (biblioteca de ciències).
6. PEÑARRUBIA, L.; MORENO, J.; CARRASCO, P. (1988): "A visual-electrophoretic method for following the purification of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase", *Biochem. Educ.*, **16**, 234-236 (hemeroteca de ciències).
7. PEÑARRUBIA, L.; MORENO, J. (1988): "Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from citrus leaves", *Phytochemistry*, **27**, 1999-2005 (hemeroteca de ciències).
8. SCHNEIDER, G.; LINDQVIST, Y.; BRÄNDÉN, C. I. (1992): "RuBisCO: structure and mechanism", *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **21**, 119-143 (hemeroteca de ciències).

5. Qüestions

Qüestions que heu de resoldre el primer dia de pràctiques

1. Calculeu els pesos (de sòlids) i els volums (de líquids o solucions) que cal emprar per a preparar els reactius i les solucions que utilitzareu en la pràctica (consulteu la llista que figura al principi del text).
2. Com prepararíeu la solució de PEG al 50% (p/v)? A partir de la solució anterior, com faríeu l'extracte cru (de volum desconegut) 10% (p/v) de PEG? Com portaríeu al 20% (p/v) de PEG el sobrenadant (de volum desconegut) que ja és prèviament 10% de PEG?
3. Feu un esquema-guió del procés de purificació de manera que servisca de guia durant la realització de la pràctica.

Altres qüestions proposades

1. Expliqueu breument la funció de la ribulosa-1,5-difosfat carboxilasa, les característiques, les bandes electroforètiques que espereu obtenir, així com la forma en què es poden identificar.
2. Per a què serveix la polivinilpirrolidona (PVP) que afegiu a l'extracte cru?
3. Quin és el fonament de la columna de canvi iònic que heu utilitzat en la pràctica? En aquest pas, quins tipus de compostos principalment són eliminats de la proteïna?
4. Per què bulliu les mostres d'extractes destinades a electroforesi? Quina funció té cadascun dels components de la solució de mostres SDS amb la qual es bull?
5. Quina és la funció de la bisacrilamida, el TEMED i el persulfat amònic en el procés de polimerització de l'acrilamida?

6. Com convertiríeu el contingut percentual de la RuBisCO, determinat per l'electroforesi, en un contingut absolut?
7. Com calcularíeu el rendiment i el factor de purificació de la proteïna al llarg del procés?

Pla de treball

Dia 1	Resolució de qüestions. Preparació de les solucions. Muntatge de la columna DEAE-cel·lulosa
Dia 2	Extracció. Fraccionament amb PEG. Diàlisi. Preparació mostres per a electroforesi
Dia 3	Cromatografia en columna DEAE-cel·lulosa. Mesura espectrofotomètrica de les fraccions cromatogràfiques. Muntatge del gel d'electroforesi
Dia 4	Electroforesi i tinció del gel. Determinació de proteïnes. Demostració del programa d'anàlisi d'imatge, ImageJ
Dia 5	Fotografia del gel. Determinació del % d'àrees i de les masses moleculars mitjançant l'anàlisi de la imatge



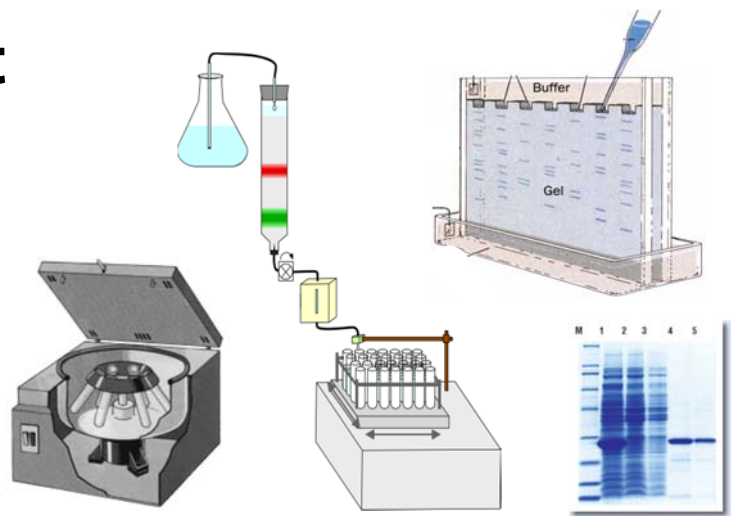
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

GRAU EN BIOTECNOLOGIA

PRÀCTIQUES INTEGRADES DE MÈTODES

Segona part

Explicacions



ESTUDI DE LA RIBULOSA-1,5-BISFOSFAT-CARBOXILASA-OXIGENASA DE FULLES DE TARONGER

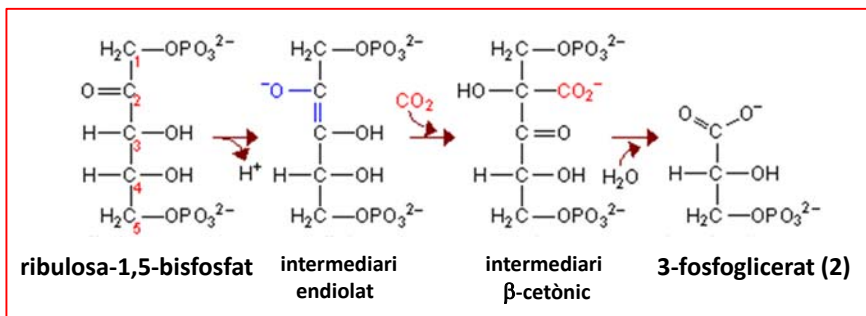
Aquesta pràctica s'ha de fer en cinc sessions seguides (una setmana) en les quals, amb l'ús de diferents tècniques separatives, preparatives i analítiques, es purificarà i analitzarà una proteïna.

Pràctiques Integrades de Mètodes. Segona Part

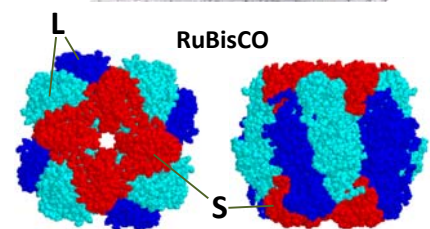
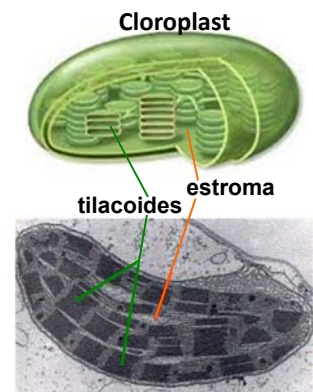
ESTUDI DE LA RIBULOSA-1,5-BISFOSFAT-CARBOXILASA-OXIGENASA DE FULLES DE TARONGER

Introducció

- Objectiu: purificació de l'enzim ribulosa-1,5-bisfosfat-carboxilasa-oxigenasa (RuBisCO) de taronger.
- Enzim que catalitza (activitat carboxilasa) la primera etapa del cicle de Calvin, pel qual es fixa el CO₂ atmosfèric.



- Es localitza en forma soluble en l'estroma del cloroplast.
- En les plantes té una massa molecular al voltant de 500.000 i està constituït per 8 subunitats grans (L, MM aprox. 50.000), catalítiques i 8 subunitats petites (S, MM 15.000) amb una funció reguladora.
- Totes les RuBisCO tenen també activitat oxigenasa. Aquesta és la primera reacció de la fotorespiració.

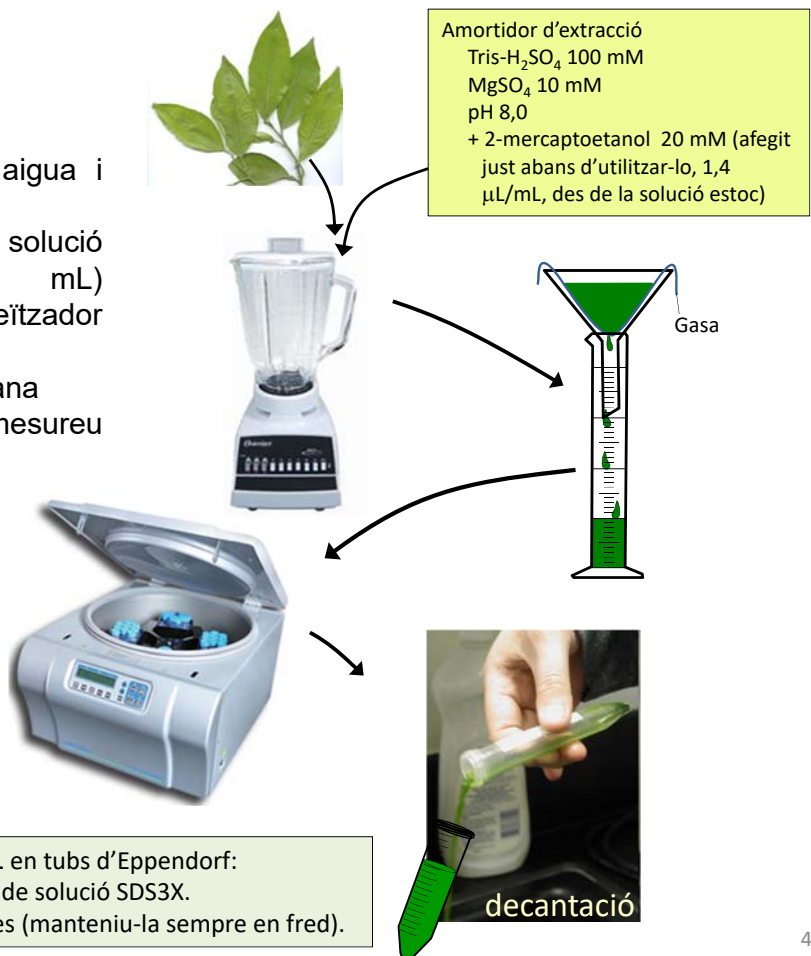


ESTUDI DE LA RIBULOZA-1,5-BISFOSFAT-CARBOXILASA-OXIGENASA DE FULLES DE TARONGER

Procediment de purificació

Extracció

- Unes 25 fulles, rentades amb aigua i eixugades. Peseu-ne 10 g.
- Trossegeu les fulles sobre la solució amortidora d'extracció (40 mL) refredada, ja dins de l'homogeneïtzador de ganivetes (Osterizer)
- Trituració 3 x 1 min, potència mitjana
- Filtració per gasa, amb embut (mesureu el volum recollit)
- Hi afegiu PVP sòlid, 2 g/100 mL d'extracte i l'agiteu.
- Centrifugueu 3.330g, 10 min
- Decanteu i **recolliu el sobrenadant: EXTRACTE CRU, mostra 1 (M1)**. Manteniu en fred
- Mesureu el volum de **M1**.



Separeu dues alíquotes de 100 μL de **M1** en tubs d'Eppendorf:

*Una per a electroforesi: afegiu 50 μL de solució SDS3X.

*L'altra per a quantificació de proteïnes (manteniu-la sempre en fred).

ESTUDI DE LA RIBULOSA-1,5-BISFOSFAT-CARBOXILASA-OXIGENASA DE FULLES DE TARONGER

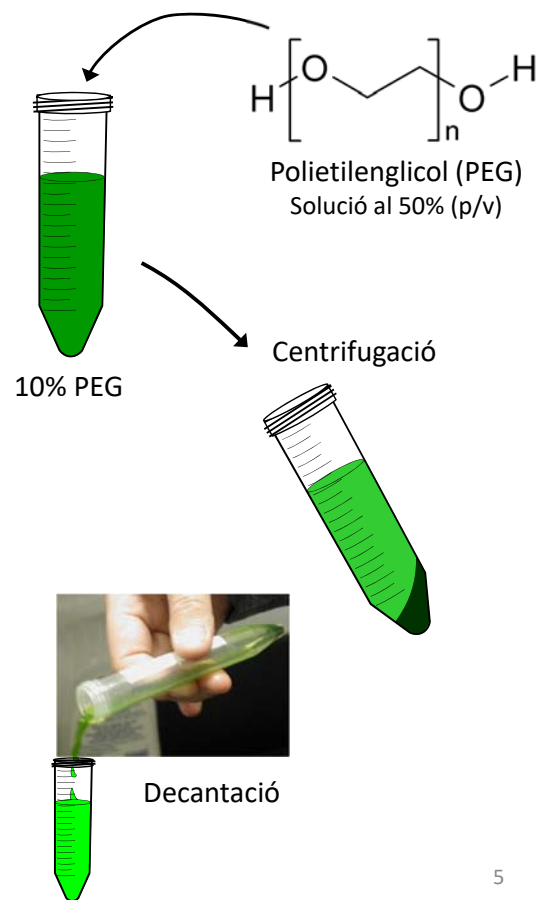
Procediment de purificació

Fraccionament amb PEG (sempre en fred)

- Porteu l'extracte cru (M1) a 10% (p/v) PEG utilitzant PEG 50% (p/v). La RuBisCO no precipita, però altres proteïnes sí
- Centrifugueu 12.000g, 15 min
- Decanteu, recolliu el sobrenadant: **mostra 3 (M3)**.
- Dissolueu el precipitat amb una solució amortidora d'extracció (un 1/3 del volum d'extracte cru): **mostra 2 (M2)**
- Mesureu els volums de **M2 i M3**

Separeu dues alíquotes de 100 µL de **M2 i M3** en tubs d'Eppendorf:

- *Una per a electroforesi: afegiu 50 µL de solució SDS3X.
- *L'altra per a quantificació de proteïnes (manteniu-la sempre en fred).



ESTUDI DE LA RIBULOSA-1,5-BISFOSFAT-CARBOXILASA-OXIGENASA DE FULLES DE TARONGER

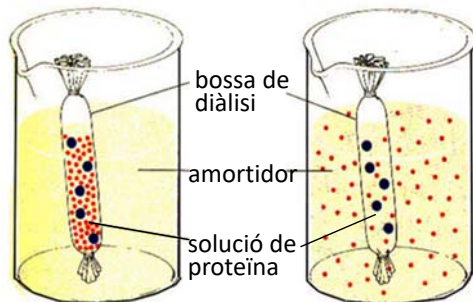
Procediment de purificació

Fraccionament amb PEG

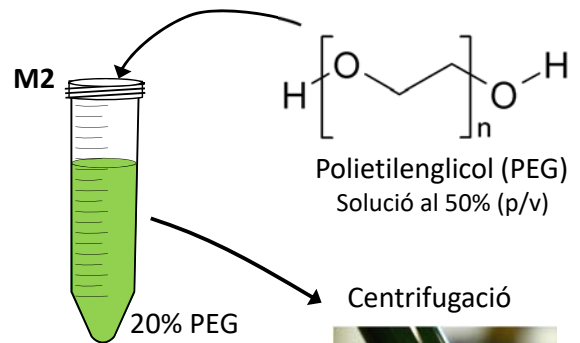
- Porteu el sobrenadant anterior (**M2**) a 20% (p/v) PEG utilitzant PEG 50% (p/v). Incubeu sobre gel. La RuBisCO **precipita**.
- Centrifugueu 12.000g, 15 min
- Precipitat, conté RuBisCO
- Sobrenadant, **mostra 5 (M5)**.
- Dissoleu el precipitat amb solució amortidora d'extracció (un 1/3 del volum d'extracte cru): **mostra 4 (M4)**

Separeu dues alíquotes de 100 µL de **M4** i **M5**
(per a l'electroforesi i per a la quantificació de proteïnes)

- Dialitzeu **M4** amb solució amortidora d'equilibratge (1L) tota una nit i mesureu-ne el volum



Amortidor d'equilibratge
Tris-H₂SO₄ 10 mM pH 7,8



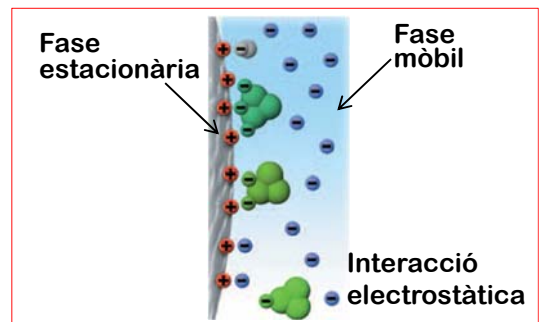
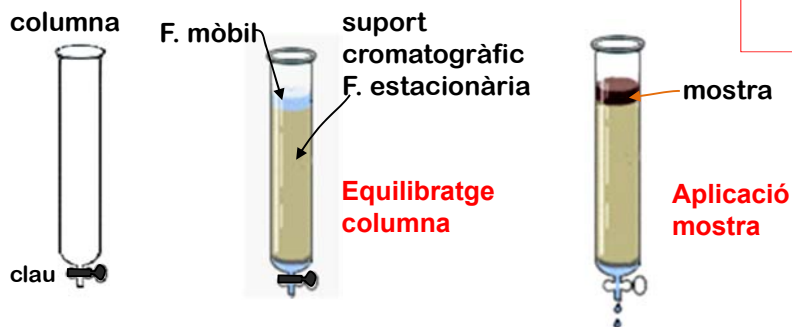
Decantació

ESTUDI DE LA RIBULOUSA-1,5-BISFOSFAT-CARBOXILASA-OXIGENASA DE FULLES DE TARONGER

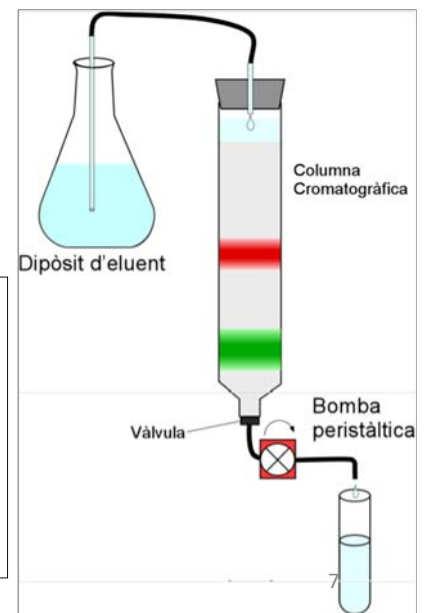
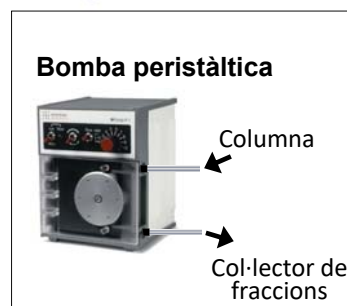
Procediment de purificació

Cromatografia de canvi iònic: DEAE-cel·lulosa

- Cromatografia en columna (vidre):
 - Muntatge de la columna
 - Equilibratge de la columna (solució amortidora d'equilibratge)



- Desenvolupament de la cromatografia
 - Estimació del flux lliure màxim
 - Connexió de la columna a una bomba peristàtica amb un flux aprox. del 50% del màxim
 - Aplicació de la mostra
 - Després de l'entrada de la mostra, renteu amb una solució amortidora d'equilibratge (uns 25-30 mL)



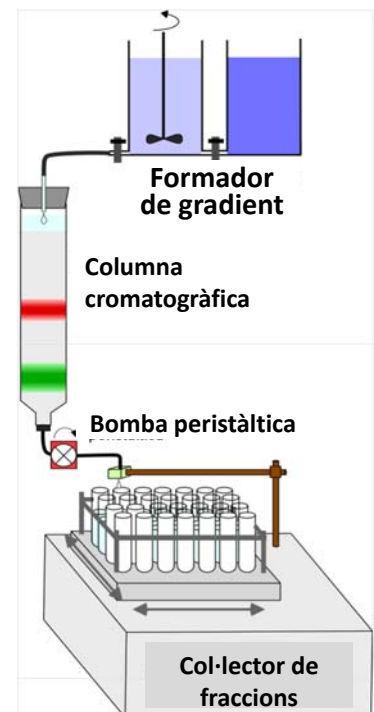
ESTUDI DE LA RIBULOUSA-1,5-BISFOSFAT-CARBOXILASA-OXIGENASA DE FULLES DE TARONGER

Procediment de purificació

Cromatografia de canvi iònic: DEAE-cel·lulosa

- Connexió al formador de gradient [75 mL d'amortidor d'equilibratge + 75 mL amortidor d'equilibratge 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]
- Fraccionament eluït: recolliu 5 mL/fracció amb col·lector de fraccions (programeu el col·lector per temps i estimeu els temps, minuts, per a aquest volum)

Col·lector de fraccions



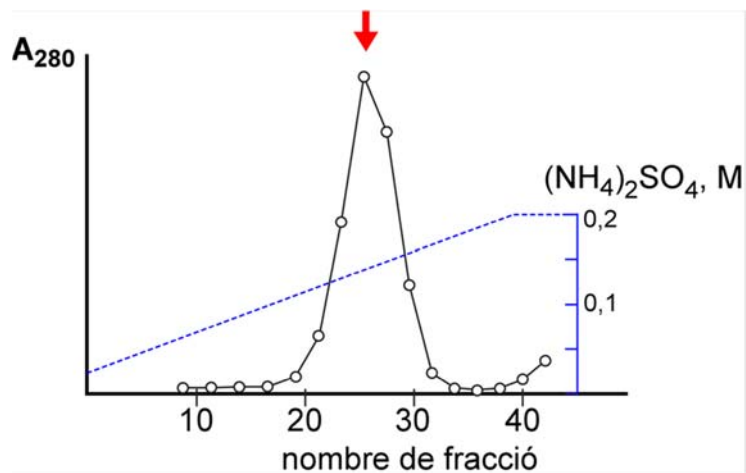
- En acabar el gradient, passeu 20 mL d'amortidor d'equilibratge 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i recolliu-ne 4-5 fraccions més.
- Regenerau el canviador d'anions passant 50 mL d'amortidor d'equilibratge 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, després 50 mL de solució amortidora d'equilibratge. Finalment, desmunteu la columna i recupereu la DEAE-cel·lulosa.

ESTUDI DE LA RIBULOSA-1,5-BISFOSFAT-CARBOXILASA-OXIGENASA DE FULLES DE TARONGER

Procediment de purificació

Determinació del perfil d'elució

- Mesureu l'absorbància a 280 nm de les fraccions
- Representeu A_{280} en funció del nombre de fracció
- Representeu el gradient de concentració $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aproximadament
- De la fracció amb màxim de A_{280} , determineu-ne A_{260} (contaminació per àcids nucleics)

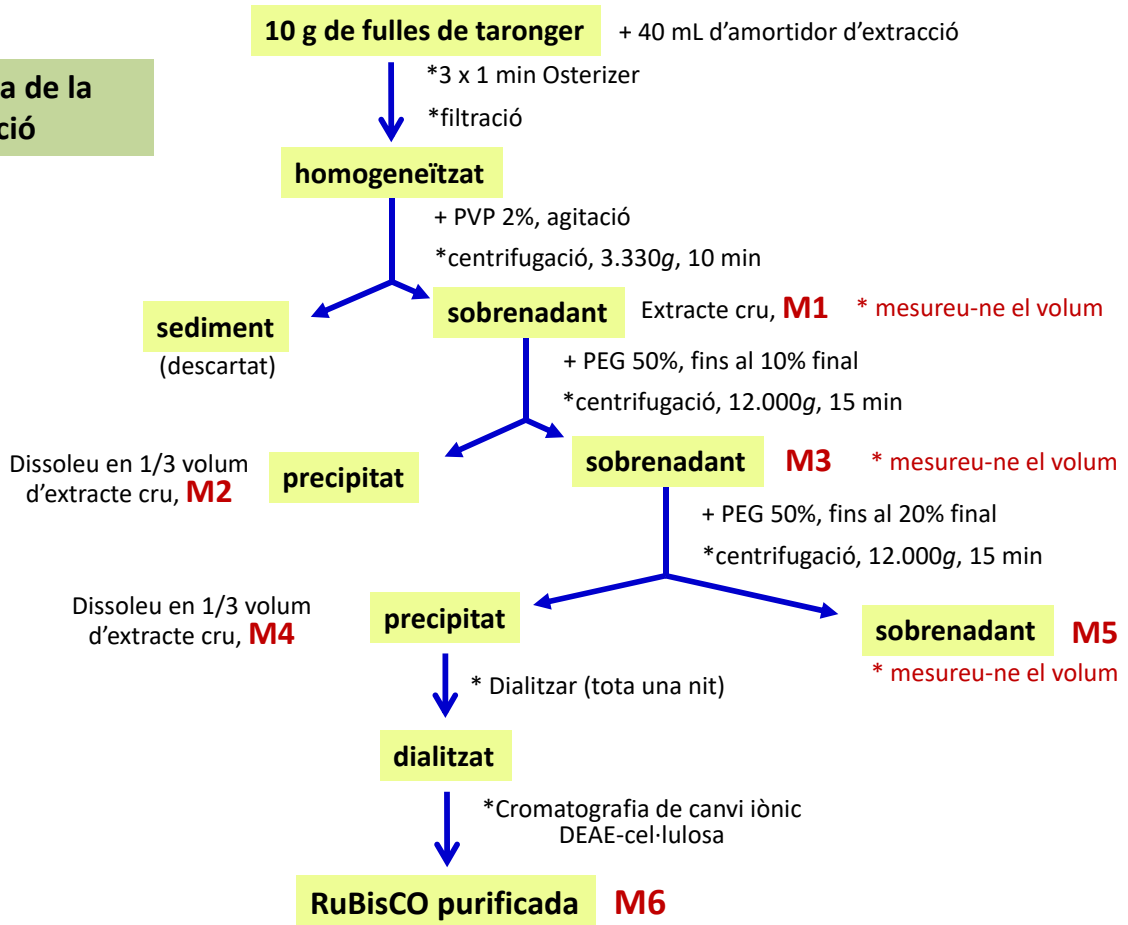


- Conserveu la fracció amb màxim de A_{280} , **mostra 6 (M6)**
- Separeu l'alíquota de 100 μL de **M6** (per a electroforesi) i afegiu 50 μL de solució SDS3X

La A_{280} de **M6** serveix per a determinar la concentració de proteïna, suposant que conté només RuBisCO i sabent que $\epsilon_{280}^{1\%}$ de la RuBisCO és $16,7 \text{ (cm}\cdot\text{g}/100\text{mL)}^{-1}$

ESTUDI DE LA RIBULOSA-1,5-BISFOSFAT-CARBOXILASA-OXIGENASA DE FULLES DE TARONGER

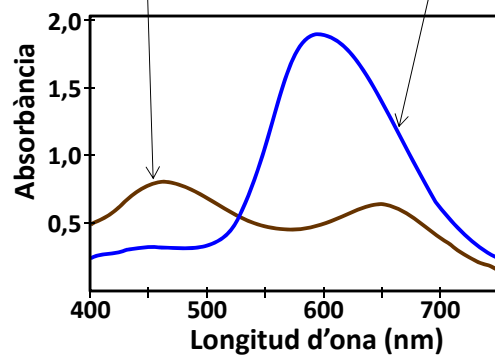
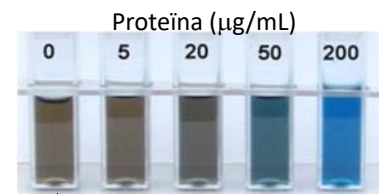
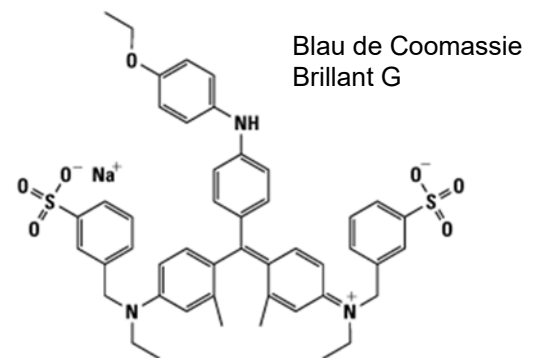
Esquema de la purificació



ESTUDI DE LA RIBULOZA-1,5-BISFOSFAT-CARBOXILASA-OXIGENASA DE FULLES DE TARONGER

Determinació de la concentració de proteïnes en mostres M1-M5

- Mètode de Bradford: reacció del blau de Coomassie amb les proteïnes i generació del color blau (absorció a 595 nm).
- En un medi àcid, el Coomassie és marró (màxim d'absorció 465 nm); en unir-se a les proteïnes, el complex blau de Coomassie-proteïna resultant és blau (màxim d'absorció 610 nm). La intensitat del color blau (l'absorció al voltant de 600 nm) és proporcional a la concentració de les proteïnes.
- La unió del colorant a les proteïnes depèn de la presència d'aminoàcids bàsics (Arg, Lys i His). Les forces de Van der Waals i les interaccions hidrofòbiques també participen en la unió del blau de Coomassie a les proteïnes.



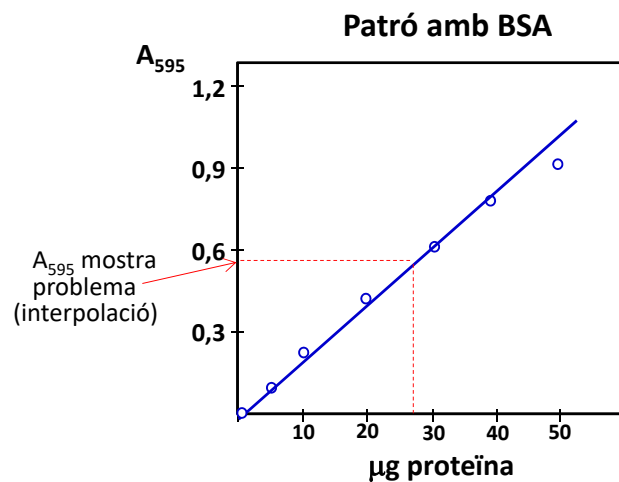
ESTUDI DE LA RIBULOSA-1,5-BISFOSFAT-CARBOXILASA-OXIGENASA DE FULLES DE TARONGER

Determinació de la concentració de proteïnes en mostres M1-M5

- Prepareu la corba patró amb la proteïna BSA.
- Mescleu les quantitats de la taula amb 1 mL de reactiu de Bradford 1X.
- Mesureu la A_{595} 5 min després.
- Representeu una corba patró. Deduïu les concentracions de proteïna en les solucions M1-M5 per interpolació.

Reactiu de Bradford 1X
 -Diluir 1/5 del reactiu de Bradford 5X, amb aigua (15 mL 5X+ 60 mL H₂O).
 -Filtrar amb paper de filtre

	μL solució BSA (1,2 mg/mL)	μL aigua	μL mostres	A_{595}
Patró	0 (blanc)	20	-	
	2,5	17,5	-	
	5,0	15	-	
	10	10	-	
	15	5,0	-	
	20	0	-	
Solucions problema	M1	17,5	2,5	
	M2	17,5	2,5	
	M3	17,5	2,5	
	M4	17,5	2,5	
	M5	17,5	2,5	



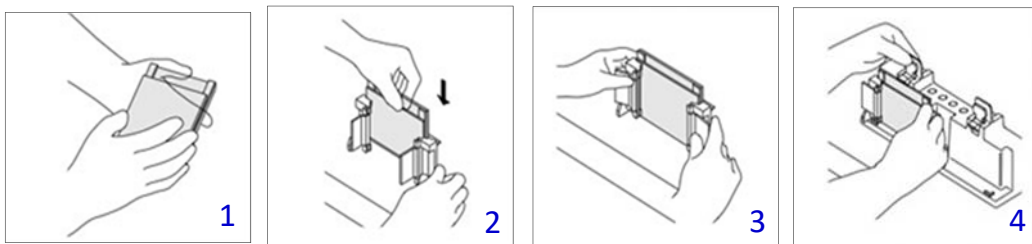
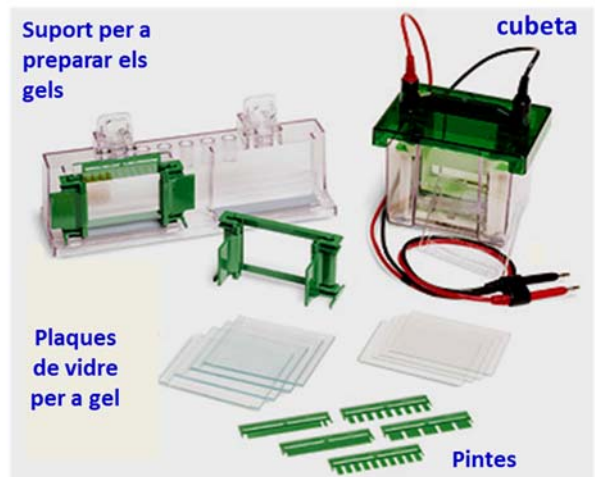
ESTUDI DE LA RIBULOSA-1,5-BISFOSFAT-CARBOXILASA-OXIGENASA DE FULLES DE TARONGER

Seguiment de la purificació de RuBisCO

Electroforesi: gel de poliacrilamida en presència de SDS (SDS-PAGE)

La qualitat i el grau de purificació de la RuBisCO en els diferents passos és analitzada per electroforesi **discontínua** en gel de poliacrilamida. En presència de SDS, les proteïnes són desnaturalitzades i adquireixen molta càrrega negativa. Els complexos SDS-proteïna se separen per electroforesi en un suport restrictiu com la poliacrilamida d'acord amb les masses moleculars

- Preparació del gel d'electroforesi
 - Munteu el "sandvitx" amb les plaques de vidre (1)
 - Poseu el "sandvitx" en el marc (2)
 - Subjecteu-lo amb les pinces del mateix marc (3)
 - Encaixeu-lo i subjecteu el marc en el suport (4)



ESTUDI DE LA RIBULOSA-1,5-BISFOSFAT-CARBOXILASA-OXIGENASA DE FULLES DE TARONGER

Electroforesi: gel de poliacrilamida en presència de SDS (SDS-PAGE)

- Preparació del gel d'electroforesi
 - Prepareu la mescla del **gel de resolució** (inferior) d'acord amb la taula.
 - Aboqueu-la al "sandvitx", tot deixant 1,5 cm superiors sense omplir. Cobriu amb un poc de butanol (per tal de separar el gel de l'oxigen de l'aire, que inhibeix la polimerització).
 - Polimeritzeu en 30-40 min.

Gel inferior: 14% acrilamida	
solució A	2,3 mL
solució B	1,25 mL
H ₂ O	1,4 mL
pers.am. 10% (C)	15 µL
TEMED	4 µL

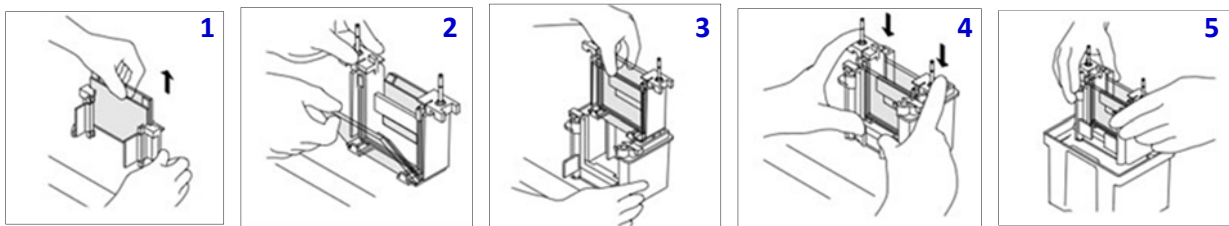
- Elimineu-ne el butanol i renteu amb aigua
- Aboqueu la mescla del **gel de concentració** (superior) i col·loqueu la pinta.
- Deixeu que gelifique i conserveu-la en nevera fins que la utilitzeu.

Gel superior: 4% acrilamida	
solució A	200 µL
solució BX	375 µL
H ₂ O	900 µL
pers.am. 10% (C)	10 µL
TEMED	5 µL

ESTUDI DE LA RIBULOSA-1,5-BISFOSFAT-CARBOXILASA-OXIGENASA DE FULLES DE TARONGER

Electroforesi: gel de poliacrilamida en presència de SDS (SDS-PAGE)

- Muntatge de la cubeta d'electroforesi i aplicació de les mostres
 - Traieu el "sandvitx" del marc (1), traieu la pinta i retoleu els pouets sobre la placa llarga
 - Poseu el "sandvitx" al suport, la placa curta a l'interior (2) i tot dins de la carcassa. Fixeu-ho amb les pinces (3 i 4)
 - Col·loqueu el conjunt a la cubeta d'electroforesi (5)



- Afegiu la solució amortidora d'electroforesi als recipients intern i extern.

Amb la pipeta automàtica, apliqueu les mostres.
La taula suggereix un possible ordre d'aplicació.

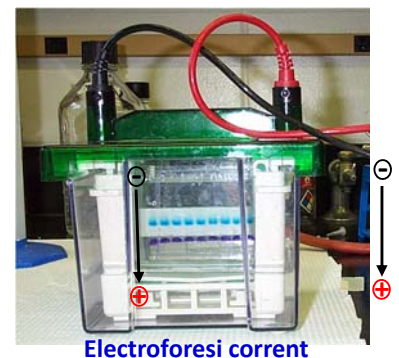
Pouet	Mostra	Volum (μL)
1	Patró MM	5
2	M1	15
3	M3	10
4	M4	5
5	M6	15
6	-	-
7	M2	5
8	M5	15
9	-	-
10	-	-

D'acord amb el procés de purificació emprat, cal trobar RuBisCO en les mostres M1, M3, M4 i M6, mentre que en M2 i M5 no. La presència de RuBisCO en M2 i M5 significarà pèrdua de proteïna i, per tant, un rendiment baix.

ESTUDI DE LA RIBULOSA-1,5-BISFOSFAT-CARBOXILASA-OXIGENASA DE FULLES DE TARONGER

Electroforesi: gel de poliacrilamida en presència de SDS (SDS-PAGE)

- Posada en marxa de l'electroforesi
 - Col·loqueu la tapa i endol·leu els cables a la font de corrent continu (font d'electroforesi): **positiu-roig**, **negatiu-negre**. Les proteïnes tenen càrrega negativa per la presència de SDS.
 - Seleccioneu 70 V i connecteu la font. Quan les mostres hagen penetrat, augmenteu a 150 V.
- Quan el colorant marcador, blau de bromofenol, arribe a aproximadament 1 cm del final del gel, desconnecteu la font i traieu el gel de les plaques de vidre.
- Teniu les proteïnes submergint el gel en una solució colorant (30-60 min, amb agitació).
- Elimineu l'excés de colorant deixant el gel en decolorant fins al dia següent. Transferiu el gel a aigua destil·lada.

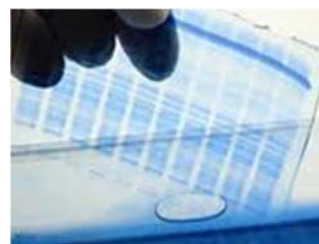


Colorant:

Blau de Coomassie R-250 0,1% (p/v), àcid acètic 8% (v/v), metanol 40% (v/v)

Decolorant:

Àcid acètic 5% (v/v), metanol 20% (v/v)



Gel de poliacrilamida després de tenyir i destenyir

ESTUDI DE LA RIBULOSA-1,5-BISFOSFAT-CARBOXILASA-OXIGENASA DE FULLES DE TARONGER

Anàlisi del gel d'electroforesi: estimació de la qualitat de la purificació de la RuBisCO

El rendiment i grau de purificació de la RubisCO obtinguts en el procediment realitzat es determina mitjançant una anàlisi d'imatge del gel d'electroforesi que conté mostres després de cadascun dels passos de purificació aplicats.

■ Fotografia del gel

- Utilitzeu un transil·luminador amb càmera connectada a un ordinador. Obteniu-ne una imatge digitalitzada (JPEG, per exemple) per a l'anàlisi.

■ Anàlisi de la imatge

- Amb el programa ImageJ, lliure, descarregat d'Internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)



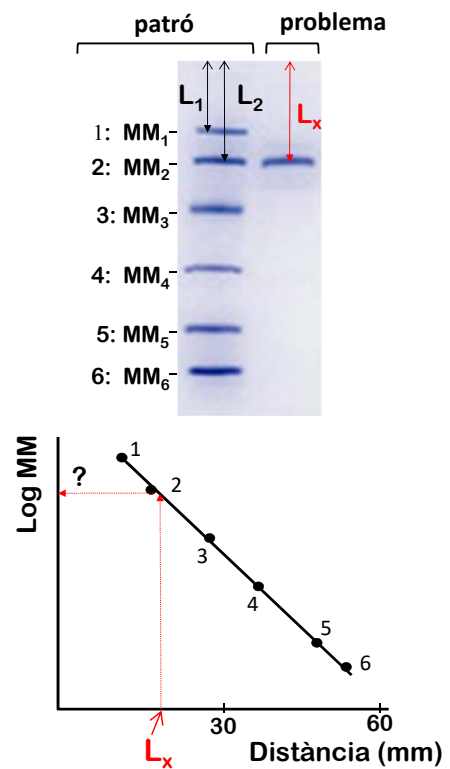
- Amb l'eina "rectangle" seleccioneu cada carrera. Amb *analyze/gels/select first line* i *analyze/gels/plot line* es mostra el perfil d'intensitat de tota la carrera. L'eina *pencil* permet dibuixar la base dels pics de les bandes de proteïna que cal quantificar (queden en groc). Amb la vareta heu de seleccionar totes les àrees, que apareixen seguint l'ordre d'esquerra a dreta i de dalt a baix. Les àrees proporcionen la quantitat relativa de proteïna de cada banda.

ESTUDI DE LA RIBULOSA-1,5-BISFOSFAT-CARBOXILASA-OXIGENASA DE FULLES DE TARONGER

Anàlisi del gel d'electroforesi: estimació de masses moleculars

La massa molecular de les bandes de proteïna d'interès es determina comparant la seua mobilitat electroforètica amb la de proteïnes patró de massa molecular coneguda.

- Determinació de la distància recorreguda (dins del gel de resolució)
 - Amb la imatge digitalitzada i el programa *ImageJ* podeu obtenir la distància recorreguda per cada proteïna.
 - També la podeu determinar mesurant-la directament sobre el gel o sobre una imatge impresa.
- Representeu **logMM** en funció de la **distància** per a les proteïnes patró: obteniu així una recta de calibratge
- Interpoleu sobre la gràfica la distància de cada proteïna problema i deduïu-ne la massa molecular



18

ESTUDI DE LA RIBULOSA-1,5-BISFOSFAT-CARBOXILASA-OXIGENASA DE FULLES DE TARONGER

Qualitat del procés de purificació de la RuBisCO de fulles de taronger

Amb les dades obtingudes de l'anàlisi de la imatge del gel d'electroforesi heu d'emplenar les taules següents (corresponents al qüestionari).

Mostra	Àrea L	Àrea S	Àrea total	%L	%S
M1					
M3					
M4					
M6					

Qüestió 5: Valors obtinguts directament de l'anàlisi de la imatge

MM patró	Migració

Mostra	MM, L	MM, S	MM, holoenzim	Estequiometria S/L
M1				
M3				
M4				
M6				

Qüestió 6: Per a obtenir la recta de calibratge i determinar-ne la MM de les subunitats de la RuBisCO. Per a l'estequiometria: les proteïnes amb major MM donen bandes més intenses (uneixen més colorant), amb la mateixa quantitat molar. Per això, les àrees de cada subunitat s'han de dividir per la MM i el resultat aplicat en el quocient S/L .

ESTUDI DE LA RIBULOSA-1,5-BISFOSFAT-CARBOXILASA-OXIGENASA DE FULLES DE TARONGER

Qualitat del procés de purificació de la RuBisCO de fulles de taronger

Amb les dades obtingudes de l'anàlisi d'imatge del gel d'electroforesi

Mostra	Vol (mL)	Prot. (mg)	RuBisCO (%)	RuBisCO (mg)	Rend. (%)	Rend./pas	f	f/pas
Ext. Cru M1								
PEG Sb M3								
PEG Sd M4								
DEAE-Cel M6								

Qüestió 7: Taula resum de tot el procés de purificació

- **Vol (mL):** volum d'extracte després de cada pas de purificació.
- **Prot. (mg):** contingut en proteïna després de cada pas. La concentració de proteïna l'heu de determinar amb el mètode de Bradford (M1, M2 i M4) o amb la A_{280} (M6). Amb el volum obteniu la quantitat de proteïna total.
- **RuBisCO (%):** l'anàlisi d'imatge del gel proporciona els % de L i S respecte de la proteïna total en cada carrera (o extracte); la suma dels dos dóna el % de RuBisCO.
- **RuBisCO (mg):** l'heu de calcular amb el % anterior i la quantitat de proteïna total (mg).
- **Rend. (%):** rendiment. L'heu d'obtenir respecte de l'extracte cru (M1), dividint el mg de RuBisCO en cada pas pels mg de RuBisCO en M1. Expresseu-lo en %.
- **Rend./pas:** rendiment de cada pas. Dividiu els mg de RuBisCO després de cada pas pels mg RuBisCO obtinguts en el pas anterior.
- **f:** factor de purificació. Nombre de vegades que una proteïna ha esta enriquida en un procés de purificació. Resulta de dividir $(\text{mg de RuBisCO}/\text{mg de prot.})_{\text{després de cada pas}}/(\text{mg de RuBisCO}/\text{mg de prot.})_{\text{extracte cru, M1}}$. Numèricament és igual que el quocient entre $(\% \text{ de RuBisCO})_{\text{cada pas}}/(\% \text{ de RuBisCO})_{\text{extracte cru, M1}}$.
- **f/pas:** f de cada pas. Dividiu $(\text{mg de RuBisCO}/\text{mg de prot.})_{\text{després de cada pas}}/(\text{mg de RuBisCO}/\text{mg de prot.})_{\text{pas anterior}}$

Pla de treball

Dia 1	Resolució de qüestions. Preparació de les solucions. Muntatge de la columna DEAE-cel·lulosa
Dia 2	Extracció. Fraccionament amb PEG. Diàlisi. Preparació de mostres per a l'electroforesi
Dia 3	Cromatografia en columna DEAE-cel·lulosa. Mesura espectrofotomètrica de les fraccions cromatogràfiques. Muntatge del gel d'electroforesi
Dia 4	Electroforesi i tinció del gel. Determinació de la concentració de proteïnes. Demostració del programa d'anàlisi d'imatge, ImageJ
Dia 5	Fotografia del gel. Determinació del % d'àrees i de les masses moleculars mitjançant l'anàlisi de la imatge

ANEXE I

Qüestions de la 1a part de Pràctiques integrades de mètodes

En algunes respostes és convenient incloure les gràfiques que s'han utilitzat, o enganxades o en dibuixos. És també convenient incloure les equacions i càlculs matemàtics utilitzats.

Pràctica 1

1.1. Determina el coeficient d'extinció (ϵ^{1M} i $\epsilon^{0,1\%}$) de l'hemoglobina a 405 nm?

Com expliques la pèrdua de linealitat en la representació de A_{405} en funció de la concentració de l'hemoglobina?

1.2. Si coneixem el ϵ_{405} de l'hemoglobina, podríem saber l'absorbància d'una solució d'aquesta proteïna a 280 nm?

- 1.3. Determina les concentracions del indicador en estat protonat i desprotonat, als pHs 3,4 i 4,2, utilitzant les dades d'absorbància obtingudes experimentalment.
Pots determinar aquestes concentracions i, per tant, del pH de la solució, amb una mesura d'absorbància en el punt isosbètic? Explica-ho.

Pràctica 2

- 2.1. Descriu les reaccions que s'estan mesurant en aquesta pràctica (amb els dos substrats), dibuixant les estructures de substrats i productes.

- 2.2. Determina K_m de la ppL per al PNPA amb les dades experimentals obtingudes.
Quin tipus d'inhibició exerceix l'àcid fenilborònic sobre aquest enzim? Explica-ho.

2.3. Podries haver determinat els paràmetres cinètics de la ppL, actuant com a esterasa, si el compost acolorit fóra el substrat i no el producte de la reacció? Explica com.

Pràctica 3

3.1. Creus que el mètode de mesura emprat serviria també per a estudiar la desnaturalització del DNA? Què produiria un major increment en els valors d'absorbància, la desnaturalització o la hidròlisi? Per què?

3.2. A partir dels espectres d'absorció i suposant que s'aconsegueix una hidròlisi completa del DNA amb MNasa, determina $\Delta\epsilon_{260}/M$ de parell de bases (es tracta d'esbrinar l'increment en l'absorció produïda per l'alliberament d'un parell de bases (en mol/L) des del polímer).

3.3. Determina la concentració d'etanol en les mostres de cervesa.
Què és més convenient per a aquesta determinació, emprar una corba patró o utilitzar $\epsilon_{360}(\text{NADH})$ directament? Per què?

Pràctica 4

4.1. Quina és la causa de les diferències en l'emissió fluorescent del ANS en els diferents solvents? I en presència de BSA?

4.2. Determina la constant d'unió del ANS a la BSA a partir de les mesures de fluorescència d'aquesta pràctica.

4.3. Com has vist, la BSA és una proteïna fluorescent, així si la unió d'un lligand (L) **no** fluorescent a la BSA produïra una disminució de l'emissió de fluorescència de la BSA, podríem determinar també la constant d'unió L-BSA? Descriu quins experiments i representacions gràfiques hauries de fer.

Pràctica 5

- 5.1. Determina les concentracions de Ca^{2+} de la solució problema i de l'aigua de l'aixeta? Si la intensitat de fluorescència obtinguda amb la solució problema fóra un valor similar a l'originat amb concentracions de Ca^{2+} saturants, podríes encara determinar la concentració de Ca^{2+} problema? Com?

5.2. En els experiments amb QUIN2 hem determinat I_F a $\lambda_{ex}= 340$ nm. Tanmateix, podríem haver realitzat aquestes mesures a una altra λ_{ex} (per exemple, a 310)? Com s'hagueren vist afectats els valors? Serien majors o menors? En què afectaria això a la determinació de la $[Ca^{2+}]$ problema?

5.3. Podria servir l'indicador de pH fluorescent BCECF per a estimar un pH àcid amb un valor, per exemple, entre 3 i 4? Per què? Quin requisit hauria de complir la sonda de pH per a poder deduir aquest valor de pH àcid?

3. a) Quin és el valor de la relació A_{280}/A_{260} obtingut per a la RuBisCO purificada? De què informa aquest paràmetre?

b) Cal esperar que varie en les diferents fraccions al llarg del pic d'elució de la RuBisCO? De què pot dependre?

4. a) Representeu gràficament (a part) la corba patró per a la quantificació de proteïnes

b) Completeu la taula amb les dades de la valoració de proteïnes.

Mostra	A_{595}	mg proteïna/mL	mg proteïna/pouet
M1			
M3			
M4			
M6 (A_{280})			

c) Per què utilitzem el mètode de Bradford en lloc de mesures espectrofotomètriques i el coeficient d'extinció molar de la RuBisCO per a la determinació de proteïnes al llarg del procés de purificació?

5. a) Mostreu (a part) una figura del gel que heu obtingut en les pràctiques. Assenyaleu a què corresponen cadascuna de les carreres i les bandes de proteïna que identifiqueu.

b) Completeu la taula següent amb les dades que proporciona el programa d'anàlisi d'imatge.

Mostra	Àrea L	Àrea S	Àrea total	% L	% S
M1					
M3					
M4					
M6					

6. a) Completeu la taula següent i representeu (a part) la recta de calibratge corresponent.

MM patró	Migració

b) Calculeu gràficament la MM de les subunitats de la RuBisCO en la mostra M6.

c) Incloeu en la taula següent els resultats obtinguts mitjançant l'anàlisi d'imatge del gel.

Mostra	MM, L	MM, S	MM, holoenzim	Estequiometria S/L
M1				
M3				
M4				
M6				

d) Compareu les grandàries obtingudes en la mostra M6 amb les de la bibliografia. Comenteu-ne els resultats.

e) Com podríeu explicar la variació de la relació estequiomètrica entre subunitats al llarg del procés de purificació?

7. Taula resum del procés de purificació

Mostra	Vol (mL)	Prot (mg)	RuBisCO (%)	RuBisCO (mg)	Rend. (%)	Rend/pas	f	f/pas
Ext. Cru M1								
PEG Sb M3								
PEG Sd M4								
DEAE-Cel M6								

a) Quin és el millor pas de purificació pel que fa al rendiment?

b) I pel que fa al factor de purificació?

c) I des d'un punt de vista global?

d) Per què és tan baix el rendiment en la cromatografia de canvi iònic? Com podríeu incrementar-lo? Afectaria a la purificació l'increment del rendiment?