

PART 3:

Anàlisi funcional de la construcció de DNA plasmídic: *Westernblot* i assaig luciferasa

(BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR)

Amb aquests experiments es pretén obtenir extractes a partir de les línies cel·lulars per tal d'analitzar, mitjançant una electroforesi en gel de poliacrilamida i un *Western* posterior, la presència de la luciferasa en les línies transfectades. A més, es mesurarà l'activitat enzimàtica corresponent a l'expressió d'aquest enzim.

Protocol C1: PREPARACIÓ D'EXTRACTES

1. Cadascun dels grups ha d'emprar cultius cel·lulars corresponents a dues de les línies cel·lulars següents:
 - cèl·lules 293 no transfectades (proporcionades pel professor).
 - cèl·lules 293 transfectades amb el vector pRES2:GFP.
 - cèl·lules 293 transfectades amb el plasmidi derivat de pRES2:GFP que conté la fusió HA-luciferasa.
 - cèl·lules 293 transfectades amb un plasmidi que conté la proteïna de fusió HA-PTP-SL (com a control positiu de l'anticòs anti-HA).
2. S'afegeixen 300 µL de tampó de lisi de luciferasa (al qual s'ha d'haver addicionat prèviament DTT i Triton X-100) a les cèl·lules i s'incuben durant 5 minuts per tal de resuspendre-les. Durant aquest temps es poden agitar les plaques en un incubador o amb l'ajuda d'una pipeta.
3. Les cèl·lules es transfereixen tot seguit amb un rascador de cèl·lules ("cell scraper") en un tub Eppendorf de 1,5 mL. És fonamental tenir la seguretat de recuperar la major quantitat de cèl·lules possible de cada pouet de la placa.
4. Les cèl·lules es recullen per centrifugació a 13000 rpm durant 10 min. El sobrenadant de la centrifugació representa l'extracte proteic total.
5. 60 µL del sobrenadant es transfereixen en un tub nou (marcat com "EXT"), 100 µL a un altre ("QUAN") i la resta a un tercer (identificat com "ACT"). La mostra "ACT" s'ha de fer servir per a mesurar l'activitat luciferasa, la "QUAN" per tal de determinar la concentració de proteïna als extractes, i la marcada com a "EXT" per a l'anàlisi electroforètica.
6. Les cèl·lules dels eppendorf "ACT" i "QUAN" es guarden a -20°C per mesurar la concentració i l'activitat en les següents sessions de pràctiques.

Protocol C2: PREPARACIÓ DE MOSTRES PER A ELECTROFORESI

1. S'afegeix 20 μL de solvent de mostres 4X (preparat prèviament pel professor a partir del 5X) al tub d'Eppendorf que conté 60 μL d'extracte total. Idealment aquest volum hauria de contenir aproximadament 50-100 μg de proteïna total.
2. S'incuben les mostres 5' a 95°C.
3. Es guarden a 4°C fins l'endemà.

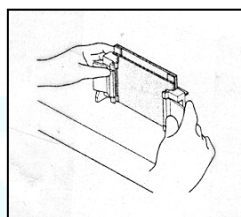


Protocol C3: PREPARACIÓ DE GELS DE POLIACRILAMIDA PER A L'ANÀLISI DE LA PRESENCIA DE LA LUCIFERASA ETIQUETADA AMB HA EN ELS EXTRACTES

S'han de preparar dos gels per cada grup de pràctiques.

1) Muntatge del sistema i polimerització de l'acrilamida

- Es netegen a fons les plaques de vidre i la pinta de plàstic amb etanol i s'assequen.
- Es col·loca la placa curta damunt i en un extrem de la placa amb espaiadors, tractant d'ajustar-la en una sola vegada per tal d'evitar moviments addicionals.
- Se situen les dues plaques dins del marc de polimerització, amb la placa curta cap a fora. Cal assegurar que les dues plaques arriben exactament al nivell inferior del marc.
- Es bloquegen amb les pinces de pressió per segellar les dues plaques de vidre.
- Es disposa el marc sobre el suport i s'encaixa amb la pinça, de manera que les plaques de vidre pressionen en la goma del fons del suport.



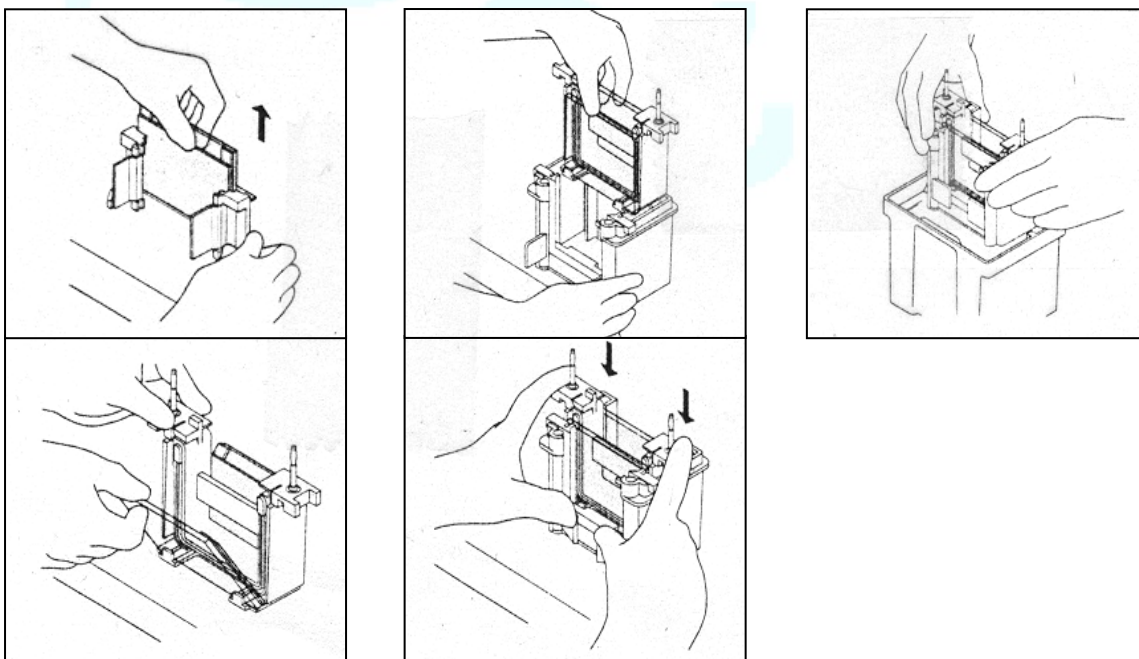
-Com que es realitzarà una electroforesi discontinua, es polimeritzen dos gels: l'inferior (gel de resolució) amb un 10% (p/v) d'acrilamida, i el superior (gel concentrador) de 4% (p/v) d'acrilamida. Els gels es preparen d'acord amb les dades que s'inclouen a la taula següent, en què els volums corresponen a les quantitats necessàries per a 2 gels d'1,5 mm.

Gel inferior: 10% (p/v) acrilamida		Gel superior: 4% (p/v) acrilamida	
Dissolució A	7 mL	Dissolució A	1 mL
Dissolució B	11,25 mL	Dissolució BX	3,75 mL
Aigua	4 mL	Aigua	2,7 mL
Persulfat amònic 10% (p/v) (C)	225 µL	Persulfat amònic 10% (p/v)	75 µL
TEMED	15 µL	TEMED	10 µL

Nota: En primer lloc, cal preparar la solució del gel inferior. Només quan aquesta haja gelificat entre les plaques s'haurà de procedir a la preparació de la del 4% (p/v). No s'han de confondre les dissolucions B i BX perquè difereixen en concentració i pH, i cadascuna s'ha de fer servir exclusivament per al gel corresponent.

-Es vessa la mescla corresponent al gel inferior (10% (p/v) de poliacrilamida) entre les plaques de vidre, fins a ocupar aproximadament 5 cm des de l'extrem inferior. Posteriorment, es cobreix amb butanol amb l'ajuda d'una microxeringa, evitant la formació de bombolles i la distorsió de la línia superficial. Es deixa gelificar (30-45 min aprox.).

-S'elimina el butanol per decantació i es renta algunes vegades amb aigua. Es vessa la dissolució corresponent al gel superior (4% (p/v) acrilamida, vegeu la taula que s'hi adjunta) i es col·loca la pinta. En aquest pas és important evitar que es formen bombolles d'aire entre la pinta i el gel. Les dents de la pinta s'han de trobar a una distància aproximada de 0,5 cm de la part superior del gel inferior. Es continua vessant fins que la dissolució arribi a l'extrem superior de la placa a través dels canals formats entre les dents de la pinta. Es deixa gelificar durant almenys una hora (es pot deixar tota la nit).



Protocol C4: QUANTIFICACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES ALS EXTRACTES

Amb aquesta finalitat, es fa servir el “Pierce BCA protein assay kit”, que permet determinar aquesta concentració mitjançant la reacció de l'àcid bicinconínic (BCA) amb complexos resultants de la interacció de les proteïnes amb reactius de Cu (vegeu les figures següents, proporcionades pel proveïdor de kit).

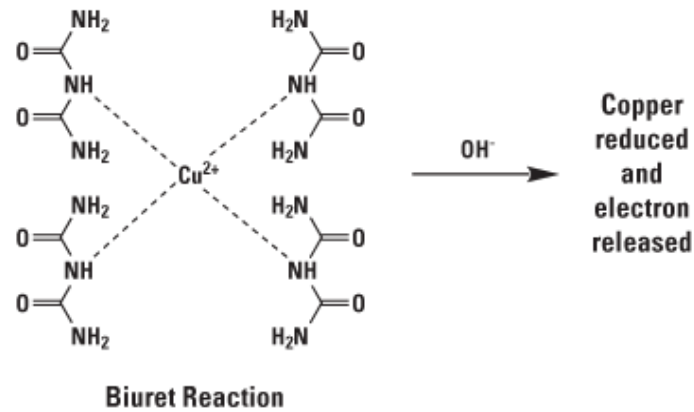
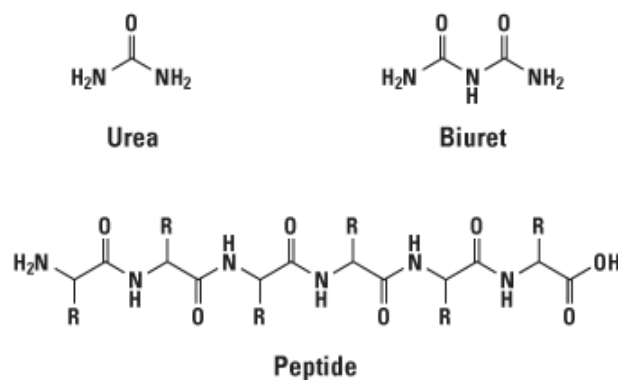
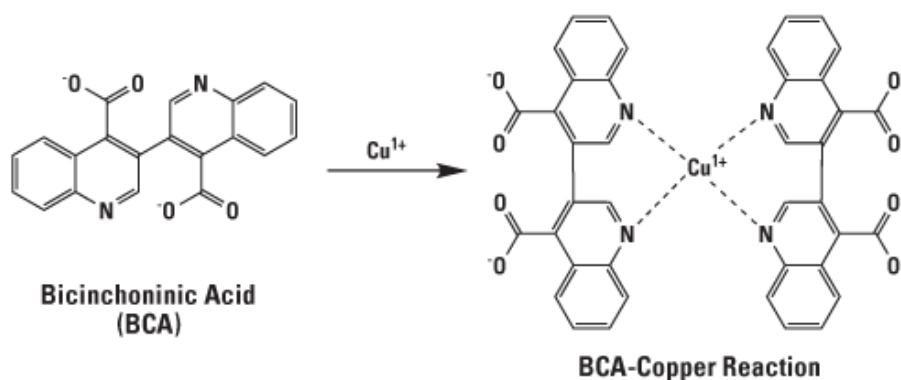


Diagram of the biuret reaction. By reducing the copper ion from cupric to cuprous form, the reaction produces a faint blue-violet color.



Structures of urea, biuret and peptide. Because polypeptides have a structure similar to biuret, they are able to complex with copper by the biuret reaction.



The reaction of BCA with cupric ion. Two molecules of BCA bind to each molecule of copper that had been reduced by a peptide-mediated biuret reaction.

1. Per tal de disposar de una corba patró de BSA que ens permeta determinar, per interpolació, la concentració de proteïnes, cal preparar dilucions d'una solució estoc de BSA 2 mg/mL, seguint l'esquema següent:

Tub	Volum d'aigua (µL)	Volum i font de BSA (µL)	Concentració de BSA (µg/µL)
A	0	25 d'estoc	2
B	125	375 d'estoc	1.5
C	325	325 d'estoc	1
D	175	175 del tub B	0.75
E	325	325 del tub C	0.5
F	325	325 del tub E	0.25
G	325	325 del tub F	0.125
H	400	100 del tub G	0.025
I	400	0	0 (blanc)

Cada 4 parelles de pràctiques han de preparar una sèrie de tubs com els indicats en la taula.

2. Es prepara una mescla del reactiu A i del reactiu B en una proporció 50:1 (per cada bancada es necessiten 25 mL de volum total).
3. En cubetes de colorímetre s'afegeixen 25 µL de cadascuna de les dilucions de BSA i dels extractes proteics diluïts 5 vegades.
4. S'afegeix 1 mL de la combinació dels reactius A i B en cada cubeta i es mescla bé.
5. S'incuba durant 30 min a 37°C i després es tempera durant uns minuts a temperatura ambient.

6. Es mesura la DO_{562} de cadascuna de les mostres. Es fa servir com a blanc per al colorímetre la mostra I de la corba patró.
7. Es representa gràficament la mesura de cada dilució de BSA respecte de la seua concentració. Es fa servir aquesta representació per a determinar la concentració de proteïnes en cadascun dels extractes i la quantitat carregada als gels de poliacrilamida.



Protocol C5: ELECTROFORESI EN GEL DE POLIACRILAMIDA. TRANSFERÈNCIA DE LES PROTEÏNES A FILTRE DE NITROCEL·LULOSA. INCUBACIÓ AMB ANTICOSSOS I DETECCIÓ

- 1) S'apliquen 30 µL de cada extracte en els gels de poliacrilamida. Es carrega també 10 µL del patró de proteïnes Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher) en cadascun.
- 2) Es corren les electroforesis a intensitat constant (almenys 45 mA) durant 2 hores.
- 3) Acabada l'electroforesi, s'extrauen els gels de poliacrilamida de les plaques de vidre (només la part corresponent al gel separatiu) i se submergeixen durant 15 min en una cubeta amb tampó de transferència.
- 4) Durant el temps d'incubació del gel previ al "Western", es tallen quatre trossos de paper Whatman 3MM d'una grandària lleugerament superior a la del gel i es banyen en el tampó. Es prepara també un tros de de nitrocel·lulosa d'una grandària igual a la del gel a transferir, se submergeix en aigua destil·lada i es deixa en el tampó de transferència durant el temps indicat en 3).
- 5) Tot seguit es prepara un *sandvitx* posant els elements següents en la disposició que s'indica en la figura:

PART SUPERIOR

Costat clar del sistema d'assemblatge

Espanja (4)

2 fulls de paper *Whatman* 3MM

Filtre (3)

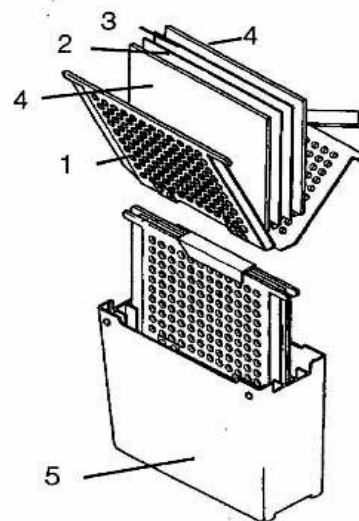
Gel (2)

2 fulls de paper *Whatman* 3 MM

Espanja (4)

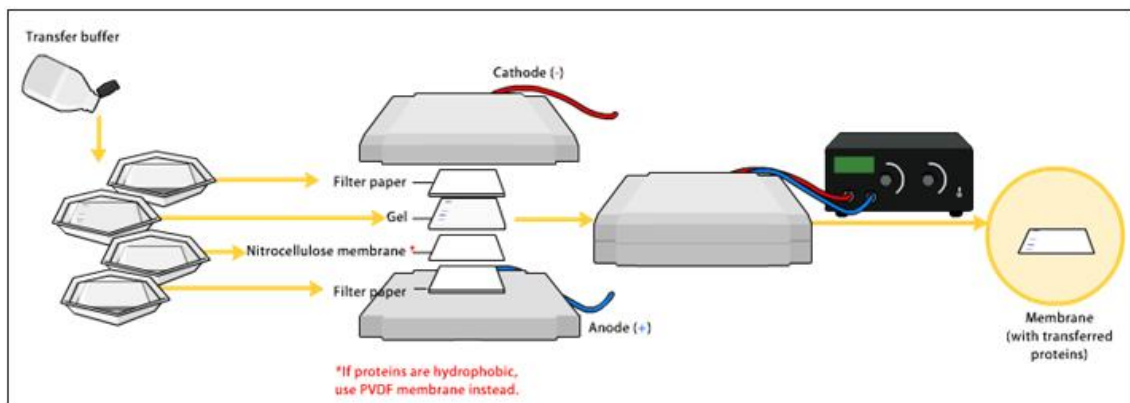
Costat negre del sistema d'assemblatge (1)

PART INFERIOR



S'ha d'evitar que durant tot el muntatge descrit anteriorment es formen bombolles i s'asseque el filtre de nitrocel·lulosa.

- 6) Una vegada acoblat el sistema, es procedeix al muntatge en una cubeta d'electrotransferència, de manera que el costat clar del *sandvitx* aparega dirigit cap a l'elèctrode roig i el costat negre cap a l'elèctrode negre. Es col·loquen dos acumuladors que s'havien mantingut congelats a -20°C (per evitar un augment excessiu de temperatura durant la transferència), s'ompli la cubeta amb tampó de transferència i es connecten els elèctrodes en una font d'alimentació. Es fixa un potencial constant de 100 V i es duu a terme l'electrotransferència durant 45 min.

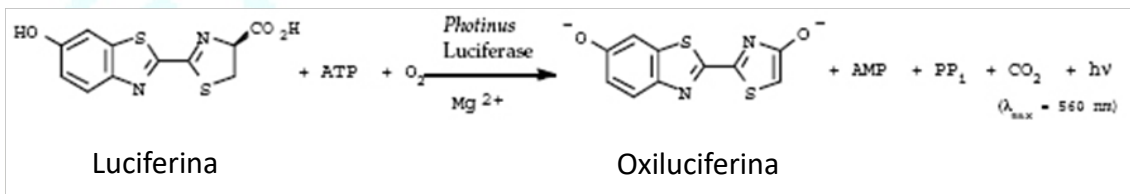


- 7) Acabada la transferència, es procedeix a comprovar-ne l'eficàcia. Amb aquesta finalitat, es tinya el filtre amb solució de roig Ponceau, i per això es renta amb àcid acètic 1% (v/v), s'incuba durant 5 min en la solució colorant i es fan tres rentats de 5 min amb àcid acètic 1% (v/v) i un final amb TBST 0,01% (p/v). Abans de fer aquest darrer tractament, s'escaneja el filtre per tal de guardar una imatge de la transferència. També es podria dur a terme una tinció del gel amb blau de Coomassie per comprovar que no ha quedat proteïna sense transferir; això suposaria una incubació de 5 min en aigua destil·lada i durant 1 h en el colorant, per a posteriorment submergir en la solució decolorant corresponent.
- 8) Una vegada comprovada la transferència correcta de les proteïnes al filtre, es procedeix al seu bloqueig en tampó TBST 0,01% (p/v) amb llet desnatada al 5% (p/v). S'incuba durant almenys 1 hora a temperatura ambient.
- 9) A continuació, s'afegeixen 20 mL de la solució d'anticossos formada per anti HA peroxidasa d'alta afinitat (Roche, Ref. 11667475001) diluït 1:1000 en solució de bloqueig, i primari anti GFP (Roche, Ref. 11-814-446-001) diluït 1:2000. Les dilucions es preparen en el moment d'ús i els filtres s'incuben durant tota la nit a 4°C .

- 10) Al matí següent s'elimina l'excés d'anticòs. Per tal de fer això, es retira la solució d'anticossos (que ha de ser conservada a -20°C per a posteriors usos) i es renta el filtre amb TBST 0.01% (dos rentats ràpids seguits de 3 de 10 min). Tot seguit s'afegeix una solució recent preparada d'anticòs secundari (*antimouse* conjugat amb peroxidasa, GE Healthcare) diluït 1:1000 (es podrien fer servir dilucions entre 1:1000 i 1:40000 depenent de les concentracions de proteïna als extractes i de l'origen de l'anticòs) en solució de bloqueig TBST 0,01%. S'incuba durant 1 h a temperatura ambient. Després es duen a terme els mateixos rentats que després de la incubació amb els anticossos primaris.
- 11) Durant el segon rentat de 5 min, es trau de la nevera la solució de revelatge del kit Luminata Forte (de Merck Millipore).
- 12) Acabats els rentats, s'afegeix 1 mL de la solució de revelatge a cada filtre i s'incuba durant 5 min. Cal assegurar que el filtre hi estiga permanentment submergit.
- 13) Després se separa el filtre i s'elimina totalment la solució de revelatge amb l'ajuda de paper Whatman 3MM.
- 14) Tot seguit, es detecta la quimioluminiscència del filtre amb l'instrument ImageQuant LAS 4000 Mini (General Electric). Es programa de manera que proporcione imatges després d'exposicions successives d'1 min durant un temps màxim de 10 min. En cas de no disposar d'aquest aparell, es col·locaria el filtre entre dos plàstics en una "cassette" d'autoradiografia i, en la foscor i en la cambra de revelatge, es disposaria sobre aquesta una pel·lícula i 2 min després es revelaria. Si la imatge obtinguda no és l'adequada (per poca o molta exposició), es procediria a exposar una altra pel·lícula durant el temps que es considerara escaient.

Protocol C6: MESURA DE L'ACTIVITAT LUCIFERASA

- 1) En una placa mutipouets es dipositen 15 µL de cadascun dels extractes guardats el primer dia a -20°C.
- 2) En cadascun dels pouets ocupats s'afegeix 100 µL del tampó d'assaig de luciferasa, al qual s'ha d'haver addicionat prèviament DTT i ATP.
- 3) Es programa el luminòmetre per a la mesura.
- 4) S'afegeix 50 µl d'una solució de luciferina 0.3 mg/mL preparada prèviament i conservada a -20°C en cadascun dels pouets. Es mescla amb una pipeta.
- 5) En aquest experiment cal incloure controls negatius (sense extracte i sense luciferina), així com un control positiu amb luciferasa comercial diluïda (1:100) en un pouet molt allunyat dels altres per tal d'evitar qualsevol interferència amb la mesura.
- 6) Es procedeix a dur a terme la mesura, s'anoten els resultats i es representen en forma d'histograma.



MATERIAL, PRODUCTES I DISSOLUCIONS

DTT 100 mM (2 mL distribuïts en parts alíquotes de 100 µL)

Tampó de lisi per a luciferasa (per a 10 mL): (6 mL per grup distribuïts en dues parts alíquotes de 3 mL)

Tris-HCl 0,025 M	250 µL	1 M pH 8	
EDTA 0,002 M	40 µL	0,5 M pH 8	
Glicerol 10% (v/v)	1 mL	estoc	
NP40 1% (v/v)	100 µL		(en usar)
DTT 0,002 M	200 µL	0,1 M	(en usar)

Triton X-100 20 % (p/V) (10 mL)

BSA 2mg/mL (2 mL/grup)

Pierce BSA protein assay kit de Thermo Scientific # 23227

SDS 5X (5 mL):	SDS 10 % (p/v)	1 g
	glicerol 50% (v/v),	5 mL
	blau de bromofenol 0,034% (p/v)	0,0034 g
	Tris-HCl 0,31 M, pH 7.5	3,125 mL
		Tris-HCl 1 M pH 7.5 / 10 mL

SDS 4X (1 mL per grup de pràctiques): 800 µL de SDS 5X
90 µL DTT 1M
110 µL aigua

Tampó d'assaig de luciferasa (50 mL)	MgSO ₄ 0.015 M	750 µL	1 M
	KH ₂ PO ₄ 0.015 M	750 µL	1 M pH 8
	EGTA	1 mL	0.2 M pH 8
	DTT 2 mM	20 µL	100 mM / mL en usar
	ATP 2 mM	20 µL	100 mM / mL en usar

ATP 100 mM (3 mL en parts alíquotes de 100 µL))

D-luciferina (Sigma L9504). 5 mg. En començar el primer grup de pràctiques el professor la dissol en DMSO a una concentració 10 mM (1,75 mL de DMSO per als 5 mg). Posteriorment, es dilueix 1/10 en aigua i es guarda congelada en parts alíquotes de 1 mL. També es pot dissoldre en Triton 0,01% (v/v) a una concentració de 0,3 mg/mL (en un volum de 16,7 mL) i congelar, encara que sol observar-se un cert precipitat.

Dissolució A (60 mL): Acrilamida 30 % (p/v),
Bisacrilamida 0,8 % (p/v)

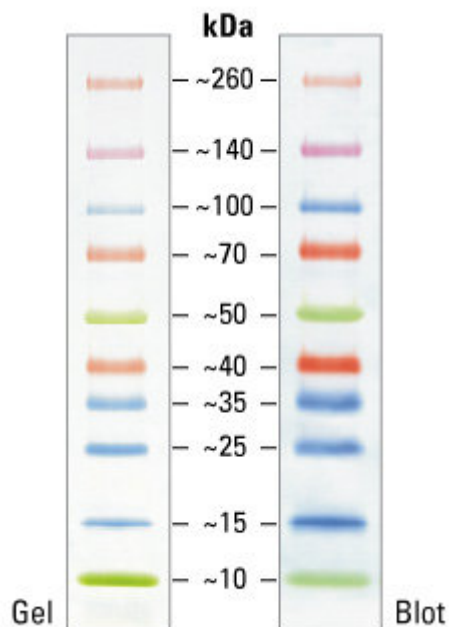
Dissolució B (60 mL): (tampó gel inferior) Tris-HCl 1,5 M pH 8,8,
SDS 0,4 % (p/v)

Dissolució BX (60 mL): (tampó gel superior) Tris-HCl 0,5 M pH 6,8,
SDS 0.4 % (p/v)

Dissolució C (3 mL): persulfat amònic 10% (p/v). Es prepara abans del seu ús o es conserva congelada.

Tampó d'electroforesi (6 L): Tris 0,025 M,
glicina 0,192 M,
SDS 0,10 % (p/v)

Patró de grandàries d'electroforesi de proteïnes Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher # 26634): mescla de proteïnes de 10, 15, 25, 35, 40, 50, 70, 100, 140 i 260 kDa



Àcid acètic 1 % (v/v) 100 mL per grup

Solució roja de Ponceau (200 mL): 3 % (p/v) en àcid acètic 0,1 % (v/v)

Tampó de transferència (5 L): Tris 0,025 M
Glicina 0,192 M
SDS 0,1 % (p/v)
Metanol 20% (v/v)

TBS (1 L): Tris 20 mM
NaCl 150 mM

TBST: TBS 0,01% (v/v) Tween-20. Es prepara en cada grup de pràctiques.

Llet desnatada

Tween 1 % (v/v) (50 mL)

Un equip d'electroforesi amb capacitat per a 2 gels i un equip d'electrotransferència

Kit Luminata Forte (Merck Millipore # WBLUF0100)

Membrana de nitrocel·lulosa Protran BA (Whatman)

Paper Whatman 3MM

Centrifugadora per a eppendorfs

Rascadors de cèl·lules ("Cell scrapers")

Termobloc a 95°C

Estufa a 37°C

Colorímetres

Cubetes de colorímetre

Plaques multipouet per a la mesura de l'activitat luciferasa

Recipients per a incubació amb anticossos i tincions

Agitador de balanceig

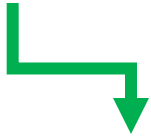
Anticossos descrits en el procediment experimental

Bloc I:
Lab. de genètica

Clonació del gen luciferasa (Luc) en un vector d'expressió en cèl·lules de mamífers

Bloc II:
Lab. de B. cel·lular

Transfecció de DNA plasmídic en cèl·lules de mamífers i anàlisi microscòpica



Bloc III:
Lab. de bioquímica

Anàlisi funcional de la construcció de DNA plasmídic en cèl·lules de mamífers

**Bloc III:
Lab. de bioquímica**

Anàlisi funcional de la construcció de DNA plasmídic en cèl·lules de mamífers

Sessió 1

- Obtenció d'extractes per a anàlisi Western i activitat luciferasa
- Preparació d'un gel de poliacrilamida del 10%

Sessió 2

- Desenvolupament de l'electroforesi. Electrotransferència. Bloqueig. Incubació amb anticòs primari
- Quantificació dels extractes

Sessió 3

- Rentats i incubació de la membrana amb anticòs secundari. Revelat del filtre
- Mesura de l'activitat luciferasa i representació dels resultats obtinguts

Bloc III:
Lab. de bioquímica

Anàlisi funcional de la construcció de DNA plasmídic en cèl·lules de mamífers

Es preparen extractes proteics a partir de cèl·lules transfectades amb el plasmidi pIRES2-GFP-Luc i algun dels controls disponibles per a tractar de detectar:

- la presència de les proteïnes HA-luc i GFP
- l'existència d'activitat luciferasa

- Abans de preparar els extractes proteics, es posen en comú les dades d'eficiència de transfecció de les quals disposa cadascuna de les parelles.
- Es construeix la taula de la diapositiva següent, que permet establir a partir de quines dues mostres preparareu extractes cadascuna de les parelles:

Una ha de ser-ne necessàriament la corresponent a la transfecció amb la construcció pIRES2-GFP-HaLuc

L'altra ha de correspondre al control HA o al vector (que permet expressar GFP).

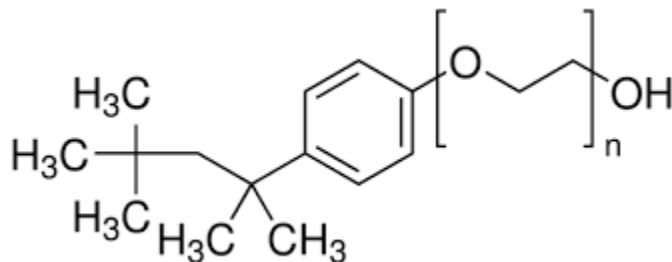
Dades d'eficiència de transfecció

Grup	HA-PTP-SL	GFP	HA-LUC
1		*	*
2	*		*
3		*	*
4	*		*
5	*		*
6		*	*
7		*	*
8	*		*
	* Mostres	a utilitzar	

- ❖ **LISI CEL·LULAR:** s'afegeixen a les cèl·lules 300 μ L de tampó de lisi de luciferasa (al qual s'ha addicionat prèviament NP-40 i DTT) i s'incuben durant 5 minuts. Es poden agitar les plaques durant aquest temps en un incubador o es pot fer servir una pipeta per a resuspendre les cèl·lules al tampó.
- ❖ **TRANSFERÈNCIA DE CÈL·LULES A UN TUB:** amb l'ajut d'un rascador de cèl·lules ("cell scraper") es transfereixen en un tub d'Eppendorf de 1.5 mL. Cal assegurar la recuperació de la màxima quantitat de cèl·lules presents en cada pouet.
- ❖ **OBTENCIÓ DE L'EXTRACTE PROTEIC CRU:** es recullen les cèl·lules per centrifugació a 13000 rpm durant 10 min. **El sobrenadant de la centrifugació representa l'extracte proteic total.**

La composició del tampó de lisi està descrita en el protocol. Es tracta de triar un tampó que permeta l'alliberament de la luciferasa de l'interior cel·lular sense que es produísca la seua desnaturalització i, per tant, la pèrdua de la seua activitat. En aquest sentit és fonamental:

- El manteniment d'un **pH** molt pròxim a 8 amb tampó Tris.
- La presència d'un **agent antioxidant (DTT)** que s'afegeix en el moment d'ús.
- També seria convenient afegir inhibidors de proteases, però això no s'ha de fer en aquest cas, perquè la preparació dels extractes és molt ràpida i aquests s'utilitzaran en un molt curt termini de temps.
- L'ús d'un **detergent**. S'ha triat **Nonidet NP-40 o IGEPAL**, perquè, com que és **no iònic**, evita la desnaturalització de les proteïnes durant el procés de lisi:



Bloc III:
Lab. de bioquímica

Preparació d'extractes proteics II: aclariments

El **rascador de cèl·lules** (“cell scraper”) és un instrument molt útil per a la recollida de les cèl·lules adherides a la placa utilitzada per al seu cultiu.



❖ Es transfereixen

60 μ L del sobrenadant en un nou tub (marcat com “EXT”),

100 μ L a un altre (“QUAN”) i

la resta a un tercer (identificat com a “ACT”).

La mostra “ACT” s’ha de fer servir per a mesurar l’activitat luciferasa, la part alíquota “EXT” per a l’anàlisi electroforètica i la “QUAN” per a determinar la concentració de proteïna als extractes.

❖ Les cèl·lules dels eppendorf “ACT” i “QUAN” es guarden a -20°C per mesurar la concentració i l’activitat en les sessions de pràctiques següents.

- ❖ S'afegeixen 20 μL de solvent de mostres 4X als tubs marcats com EXT.
- ❖ S'incuben les mostres 5' a 95°C.
- ❖ Es guarden a 4°C fins l'endemà.

**Bloc III:
Lab. de bioquímica**

Preparació de dos gels de poliacrilamida del 10% (p/v)

Els gels es preparen de la forma habitual, fent servir la informació de la taula següent, que indica la quantitat de cada solució per tal de preparar conjuntament els dos gels.

Gel inferior: 10% (p/v) acrilamida		Gel superior: 4% (p/v) acrilamida	
Dissolució A	7 mL	Dissolució A	1 mL
Dissolució B	11,25 mL	Dissolució BX	3,75 mL
Aigua	4 mL	Aigua	2,7 mL
Persulfat amònic 10% (p/v) (C)	225 µL	Persulfat amònic 10 % (p/v)	75 µL
TEMED	15 µL	TEMED	10 µL

En un laboratori d'investigació és necessari comprar els productes més adequats tenint en compte aspectes com la qualitat o el preu. Aquesta tasca de selecció també recau en el grup d'investigació. A més, en propostes de projectes d'investigació és fonamental valorar les despeses dels experiments que es plantegen.

Per tot això, amb la finalitat de completar la vostra formació al laboratori, heu de consultar catàlegs en línia de cases comercials de reactius i equipaments per a biologia cel·lular i molecular i localitzar codis i, si és possible preus, de tot el necessari per a determinar l'activitat luciferasa, és a dir,

Components del tampó d'assaig d'activitat luciferasa (mireu el protocol)

D-Luciferina

Luciferasa

Luminòmetre

Com a suggeriment de cases comercials amb catàlegs en línia que podeu consultar, vos propose, per exemple, les següents (encara que quan introduïu en un cercador el producte o equipament podeu trobar-ne d'altres):

Fluka

Panreac

Promega

Quimigen

Sigma Aldrich

Thermo Scientific

En l'enllaç següent podeu trobar detalls sobre com saber el nivell de qualitat i, per tant, la utilitat, d'un determinat producte:

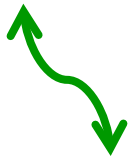
<http://www.ictsl.net/plaintext/productos/productosquimicos/panreac/index.html>

Bloc I:
Lab. de Genètica

Clonació del gen *Luciferasa* (Luc) en un vector d'expressió en cèl·lules de mamífers

Bloc II:
Lab. de B. Cel·lular

Transfecció de DNA plasmídic en cèl·lules de mamífers i anàlisi microscòpica



Bloc III:
Lab. de Bioquímica

Anàlisi funcional de la construcció de DNA plasmídic en cèl·lules de mamífers

**Bloc III:
Lab. de Bioquímica**

Anàlisi funcional de la construcció de DNA plasmídic en cèl·lules de mamífers

Sessió 1

- Obtenció d'extractes per a anàlisi Western i activitat luciferasa.
- Preparació d'un gel de poliacrilamida del 10%.

Sessió 2

- Desenvolupament de l'electroforesi. Electrotransferència. Bloqueig. Incubació amb anticòs primari.
- Quantificació dels extractes.

Sessió 3

- Rentatges i incubació de la membrana amb anticòs secundari. Revelatge del filtre.
- Mesura de l'activitat luciferasa i representació dels resultats obtinguts.

- ❖ S'apliquen aproximadament 100-200 μg (30 μL) de proteïna total corresponent a cada extracte en els gels de poliacrilamida. S'hi carreguen també 10 μL del patró de proteïnes "Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder" en cada un.
- ❖ Es fa córrer l'electroforesi a intensitat constant (45 mA en el cas de dos gels) durant 2 hores.
- ❖ ACLARIMENT: El més raonable seria dur a terme una determinació de la quantitat de proteïna present en els extractes i, d'acord amb la informació obtinguda, carregar en els gels de poliacrilamida 150 μg de proteïna total. En el nostre cas, per l'organització de les sessions de pràctiques, no procedim d'aquesta manera. Això no obstant, després de la quantificació calcularem la quantitat de proteïna total de cada mostra carregada en els gels.

Bloc III: Lab. de Bioquímica

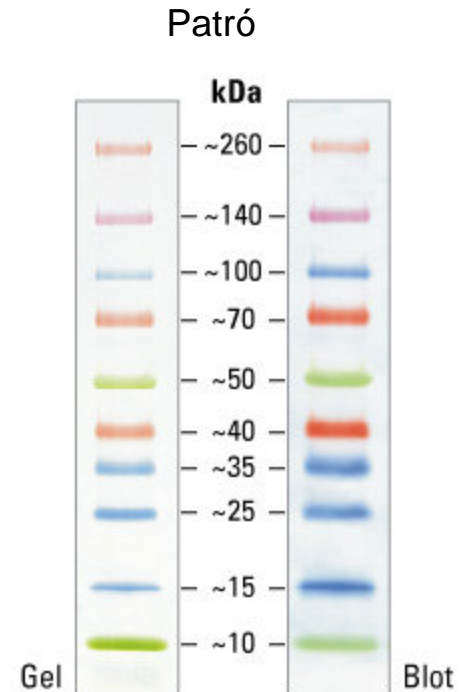
Desenvolupament de l'electroforesi

Ordre de càrrega de les mostres Gel 1

1. HA-PTP-SL-2
2. " -4
3. " -5
4. " -8
5. IRESGFP-1
6. " -3
7. " -6
8. IRESGFP-7
9. Patró

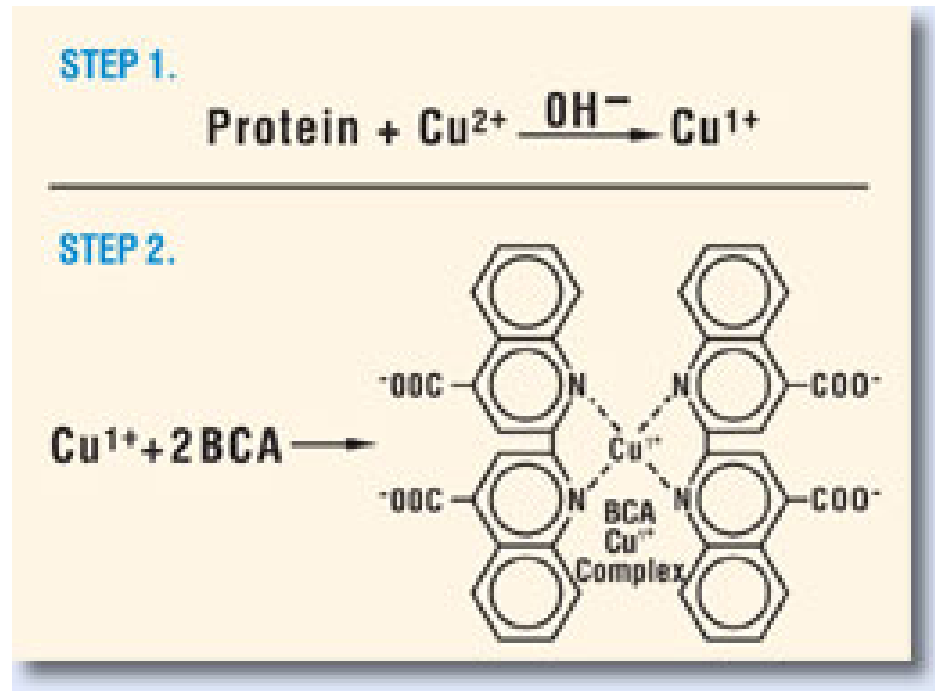
Ordre de càrrega de les mostres Gel 2

1. HALUC -1
2. " -2
3. " -3
4. " -4
5. Patró
6. HALUC -5
7. " -6
8. " -7
9. " -8



També seria convenient disposar d'un extracte de cèl·lules no transfectades, una part alíquota del qual es podria carregar en l'últim pouet lliure de cada gel.

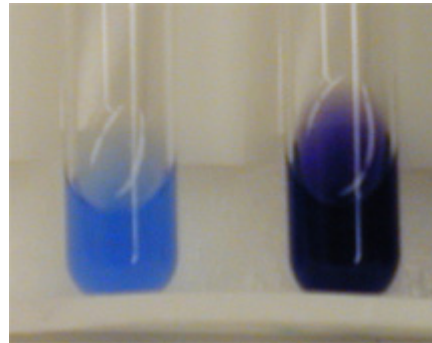
Quantificació de les proteïnes presents en els extractes mitjançant la reacció del biuret + BCA (I)



BCA Protein Assay combines the well-known reduction of Cu^{2+} to Cu^{1+} by protein in an alkaline medium with the highly sensitive and selective colorimetric detection of the cuprous cation (Cu^{1+}) by bicinchoninic acid. The first step is the chelation of copper with protein in an alkaline environment to form a light blue complex. In this reaction, known as the biuret reaction, peptides containing three or more amino acid residues form a colored chelate complex with cupric ions in an alkaline environment containing sodium potassium tartrate.

Bloc III: Lab. de Bioquímica

Quantificació de les proteïnes presents en els extractes mitjançant la reacció del biuret + BCA (II)



In the second step of the color development reaction, bicinchoninic acid (BCA) reacts with the reduced (cuprous) cation that was formed in step one. The intense purple-colored reaction product results from the chelation of two molecules of BCA with one cuprous ion. The BCA/copper complex is water-soluble and exhibits a strong linear absorbance at 562 nm with increasing protein concentrations. The BCA reagent is approximately 100 times more sensitive (lower limit of detection) than the pale blue color of the first reaction.

The reaction that leads to BCA color formation is strongly influenced by four amino acid residues (cysteine or cystine, tyrosine, and tryptophan) in the amino acid sequence of the protein. However, unlike the Coomassie dye-binding methods, the universal peptide backbone also contributes to color formation, helping to minimize variability caused by protein compositional differences.

<http://www.qcbio.com/pierce/BCA%20Protein%20Assay%20Reagent.htm>

**Bloc III:
Lab. de Bioquímica**

Quantificació de les proteïnes presents en els extractes mitjançant la reacció del biuret + BCA (III)

Per a disposar d'una corba patró d'ASB (*BSA*) que ens permeta determinar, per interpolació, la concentració de proteïnes, cal preparar dilucions d'una solució estoc d'ASB 2 mg/mL, seguint l'esquema següent (**es prepararà un conjunt de mostres per cada 4 parelles**):

Tub	Volum d'aigua (μL)	Volum i origen d'ASB (μL)	Concentració d'ASB ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
A	0	25 d'estoc	2
B	125	375 d'estoc	1,5
C	325	325 d'estoc	1
D	175	175 del tub B	0,75
E	325	325 del tub C	0,5
F	325	325 del tub E	0,25
G	325	325 del tub F	0,125
H	400	100 del tub G	0,025
I	400	0	0 (blanc)

Bloc III: Lab. de Bioquímica

Quantificació de les proteïnes presents en els extractes mitjançant la reacció del biuret+ BCA (IV)

- Es prepara una mescla del reactiu A i del reactiu B en una proporció 50:1

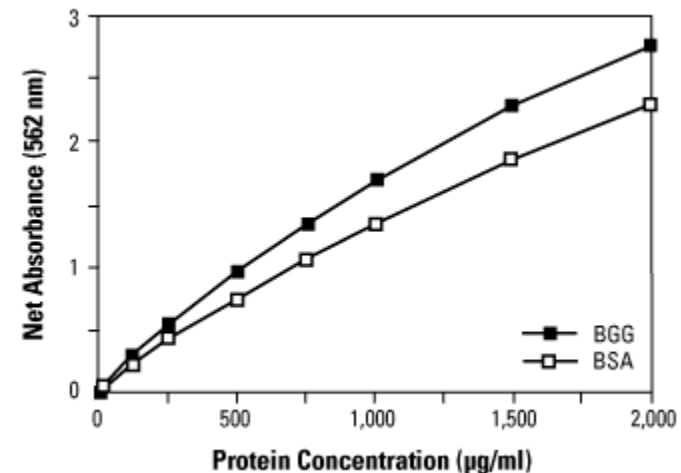
- En cubetes de colorímetre s'afigen **25 µL de cada una de les dilucions d'ASB i dels extractes proteics diluïts 5 vegades.**

- S'afig 1 mL de la combinació dels reactius A i B en cada cubeta i es mescla bé.

S'incuba durant 30 min a 37°C i després es tempera durant uns quants minuts a temperatura ambient.

Es mesura la DO_{562} de cada mostra. La mostra I de la corba patró es fa servir com a blanc per al colorímetre.

- Es representa gràficament la mesura de cada dilució d'ASB enfront de la concentració. Aquesta representació s'utilitza per a determinar la concentració de proteïnes en cada extracte i la quantitat carregada en els gels de poliacrilamida.



<http://www.qcbio.com/pierce/BCA%20Protein%20Assay%20Reagent.htm>

Qüestió per a resoldre en parella (2)

En el vostre experiment de quantificació obteniu els resultats que es mostren en la taula següent:

Tub	DO ₅₆₂
A	1,975
B	1,432
C	1,073
D	0,861
E	0,577
F	0,288
G	0,145
H	0,032
I	0

Si en l'extracte corresponent a la mostra IRES2-GFP-HALuc detecteu un valor de DO₅₆₂ de 0,413 i en l'extracte del vostre control d'HA o GFP de 0,321, quants micrograms de proteïna total haureu carregat de cada una d'aquestes mostres en els gels?

Bloc III: Lab. de Bioquímica

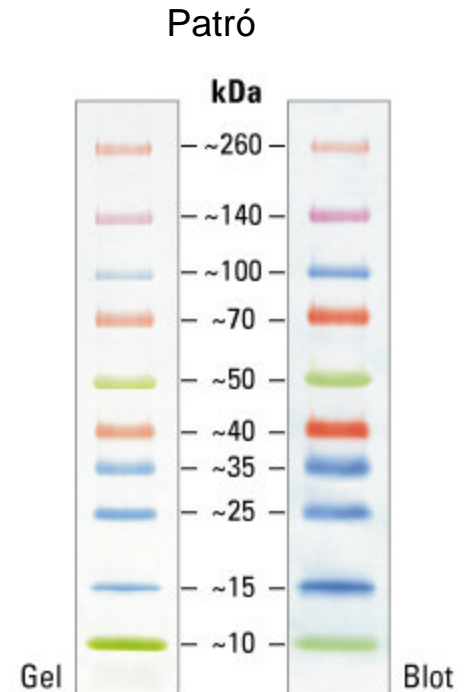
Desenvolupament de l'electroforesi

Ordre de càrrega de les mostres Gel 1

- | | | |
|----|-------------|------|
| 1. | HA-PTP-SL-2 | X µg |
| 2. | " -4 | " |
| 3. | " -5 | " |
| 4. | " -8 | " |
| 5. | IRESGFP-1 | " |
| 6. | " -3 | " |
| 7. | " -6 | " |
| 8. | IRESGFP-7 | " |
| 9. | Patró | |

Ordre de càrrega de les mostres Gel 2

- | | | |
|----|----------|------|
| 1. | HALUC -1 | X µg |
| 2. | " -2 | " |
| 3. | " -3 | " |
| 4. | " -4 | " |
| 5. | Patró | |
| 6. | HALUC -5 | " |
| 7. | " -6 | " |
| 8. | " -7 | " |
| 9. | " -8 | " |



Ara ja podem refer la taula amb la informació de les mostres carregades en l'electroforesi, incloent-hi la quantitat de proteïna present en cada una.

Les diapositives següents introdueixen els diferents mètodes que es poden fer servir per a quantificar proteïnes, i els avantatges i inconvenients que presenten. Considerem de gran importància que els conegueu.

Quins mètodes podem fer servir per a quantificar proteïnes?

Els mètodes principals de quantificació de proteïnes són:

✚ UV 280

✚ Bradford

✚ Biuret

✚ Lowry

✚ BCA

Quins mètodes podem fer servir per a quantificar proteïnes?

Els mètodes principals de quantificació de proteïnes són:

 UV 280

 Bradford

 Biuret

 Lowry

 BCA

Quins mètodes podem fer servir per a quantificar proteïnes?

MÈTODE UV

LES PROTEÏNES MOSTREN UN FORT GRAU D'ABSORCIÓ A 280 nm DEGUT SOBRETOT ALS RESIDUS DE TRIPTÒFAN I TIROSINA. PER A ESTIMAR LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES ES POT FER SERVIR L'ABSORBÀNCIA A 280 nm.

Quins mètodes podem fer servir per a quantificar proteïnes?

AVANTATGES DEL MÈTODE UV:

- **ÉS RÀPID I RELATIVAMENT SENSIBLE (ALGUNES VEGADES MÉS SENSIBLE QUE EL MÈTODE DEL BIURET).**
- **NO HI HA INTERFERÈNCIA PER SULFAT D'AMONI I ALTRES SALS PRESENTS EN AMORTIDORS.**
- **NO ÉS DESTRUCTIU PER A LA MOSTRA.**
- **ES FA SERVIR, PER EXEMPLE, PER A LA DETECCIÓ DE PROTEÏNES EN FRACCIONS CROMATOGRÀFIQUES.**

INCONVENIENTS DEL MÈTODE UV:

- **ELS ÀCIDS NUCLEICS TAMBÉ ABSORBEIXEN EN LA REGIÓ DE 280 nm.**
- **EL CONTINGUT EN AMINOÀCIDS AROMÀTICS DIFEREIX CONSIDERABLEMENT ENTRE UNES PROTEÏNES I ALTRES.**
- **LA SOLUCIÓ HA DE SER CLARA I INCOLORA. LA TERBOLESA POT CONDUIR A RESULTATS ERRÀTICS.**
- **ES REQUEREIX UN MATERIAL RELATIVAMENT PUR PER A UTILITZAR AQUEST MÈTODE.**

Quins mètodes podem fer servir per a quantificar proteïnes?

Els mètodes principals de quantificació de proteïnes són:

 UV 280

 Bradford

 Biuret

 Lowry

 BCA

CAL ELABORAR UNA CORBA ESTÀNDARD DE CONCENTRACIÓ ENFRONT D'ABSORBÀNCIA (p. ex. amb albúmina sèrica de boví (ASB))

Quins mètodes podem fer servir per a quantificar proteïnes?

Els mètodes principals de quantificació de proteïnes són:

 UV 280

 **Bradford**

 Biuret

 Lowry

 BCA

Quins mètodes podem fer servir per a quantificar proteïnes?

MÈTODE DE BRADFORD

EL BLAU DE COOMASSIE G-250 S'ADHEREIX A LA PROTEÏNA, EL COLORANT ES TORNA DE ROGENC A BLAVÓS I EL MÀXIM D'ABSORCIÓ DEL COLORANT CANVIA DE 465 A 595 nm. EL VALOR D'ABSORBÀNCIA A 595nm RESULTANT ÉS PROPORCIONAL A LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNA EN LA MOSTRA.

Quins mètodes podem fer servir per a quantificar proteïnes?

MÈTODE DE BRADFORD

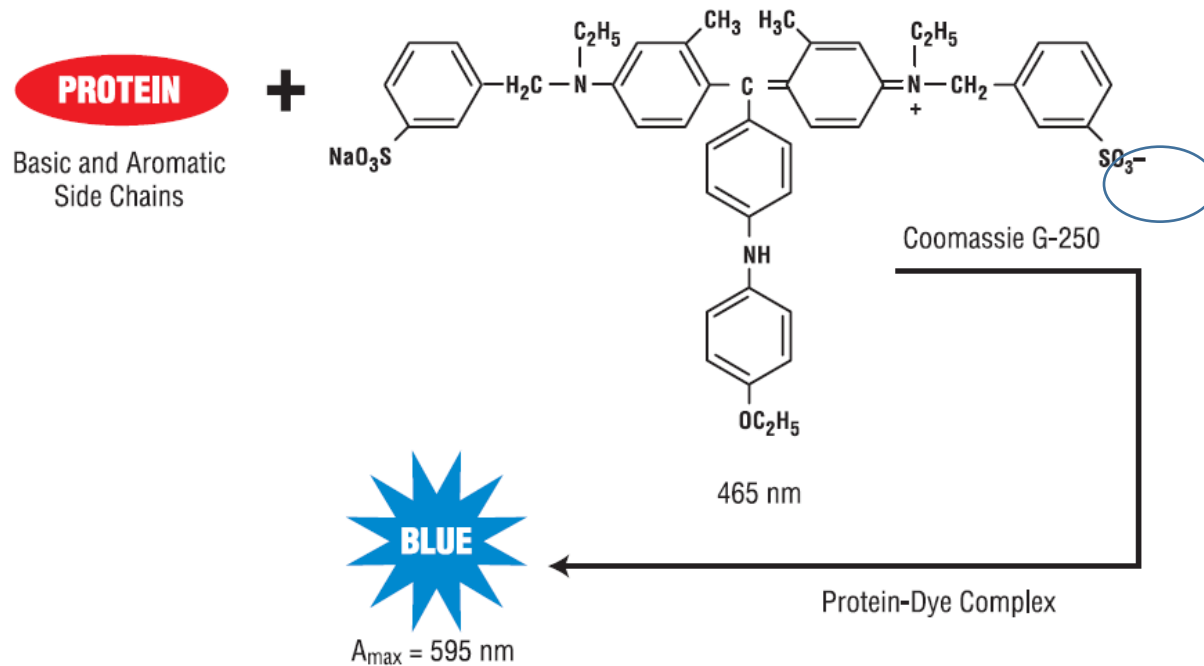


Figure 1. Reaction schematic for the Coomassie dye-based protein assays (the Coomassie [Bradford] Protein Assay, the Coomassie Plus – The Better Bradford™ Assay and the Coomassie Dry Protein Assay Plates).

Quins mètodes podem fer servir per a quantificar proteïnes?

AVANTATGES DEL MÈTODE DE BRADFORD:

- **RAPIDESA**
- **REPRODUCTIBILITAT**
- **SENSIBILITAT**
- **NO INTERFERÈNCIA AMB SALS (K^+ , Na^+ , Mg^{++}), AGENTS REDUCTORS O QUELANTS**

Quins mètodes podem fer servir per a quantificar proteïnes?

INCONVENIENTS DEL MÈTODE BRADFORD:

- **EL COMPLEX PROTEÏNA-COLORANT FORMAT S'UNEIX FORTAMENT A LAS CEL·LES DE PLÀSTIC.**
- **VARIACIÓ DE COLOR DEPENDENT DE LA NATURALES A DE LA PROTEÏNA (cal seleccionar amb cura la proteïna estàndar).**
- **INTERFERÈNCIA AMB ALGUNS DETERGENTS.**

Quins mètodes podem fer servir per a quantificar proteïnes?

Els mètodes principals de quantificació de proteïnes són:

✚ UV 280

✚ Bradford

✚ Biuret

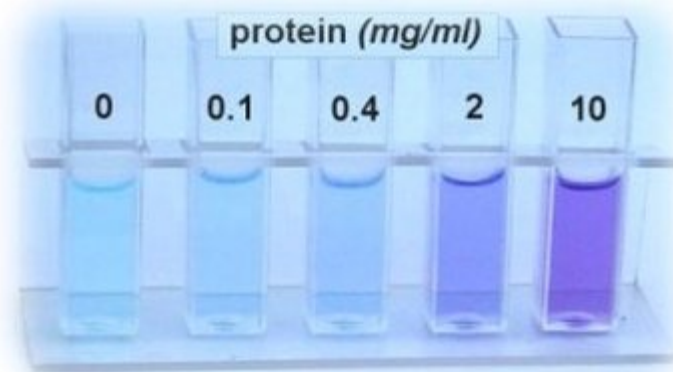
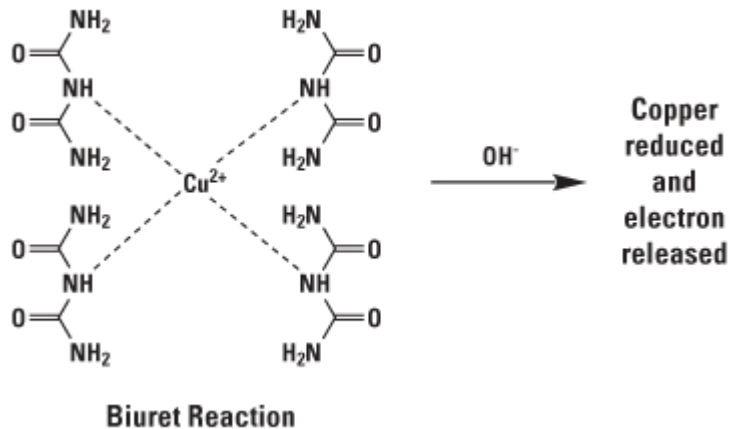
✚ Lowry

✚ BCA

**Bloc III:
Lab. de Bioquímica**

Quins mètodes podem fer servir per a quantificar proteïnes?

MÈTODE DEL BIURET



<https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-protein-assays.html>

<https://biology-igcse.weebly.com/food-test-4--biuret-test-for-proteins.html>

AVANTATGES DEL MÈTODE DEL BIURET:

- **RÀPID**
- **COMPATIBLE AMB DETERGENTS**
- **MENORS VARIACIONS PROTEÏNA A PROTEÏNA QUE EN EL CAS DEL MÈTODE BRADFORD**
- **APLICABLE A PÈPTIDS**

Quins mètodes podem fer servir per a quantificar proteïnes?

INCONVENIENTS DEL MÈTODE DEL BIURET:

- **ÉS POC SENSIBLE**
- **QUELANTS COM EDTA, AGENTS REDUCTORS I CONCENTRACIONS ALTES DE SALS D'AMONI INTERFEREIXEN EN LA REACCIÓ**

Quins mètodes podem fer servir per a quantificar proteïnes?

Els mètodes principals de quantificació de proteïnes són:

 UV 280

 Bradford

 Biuret

 Lowry

 BCA

DESENVOLUPATS A PARTIR DEL
BIURET PER A INCREMENTAR LA
SENSIBILITAT

Quins mètodes podem fer servir per a quantificar proteïnes?

Els mètodes principals de quantificació de proteïnes són:

✚ UV 280

✚ Bradford

✚ Biuret

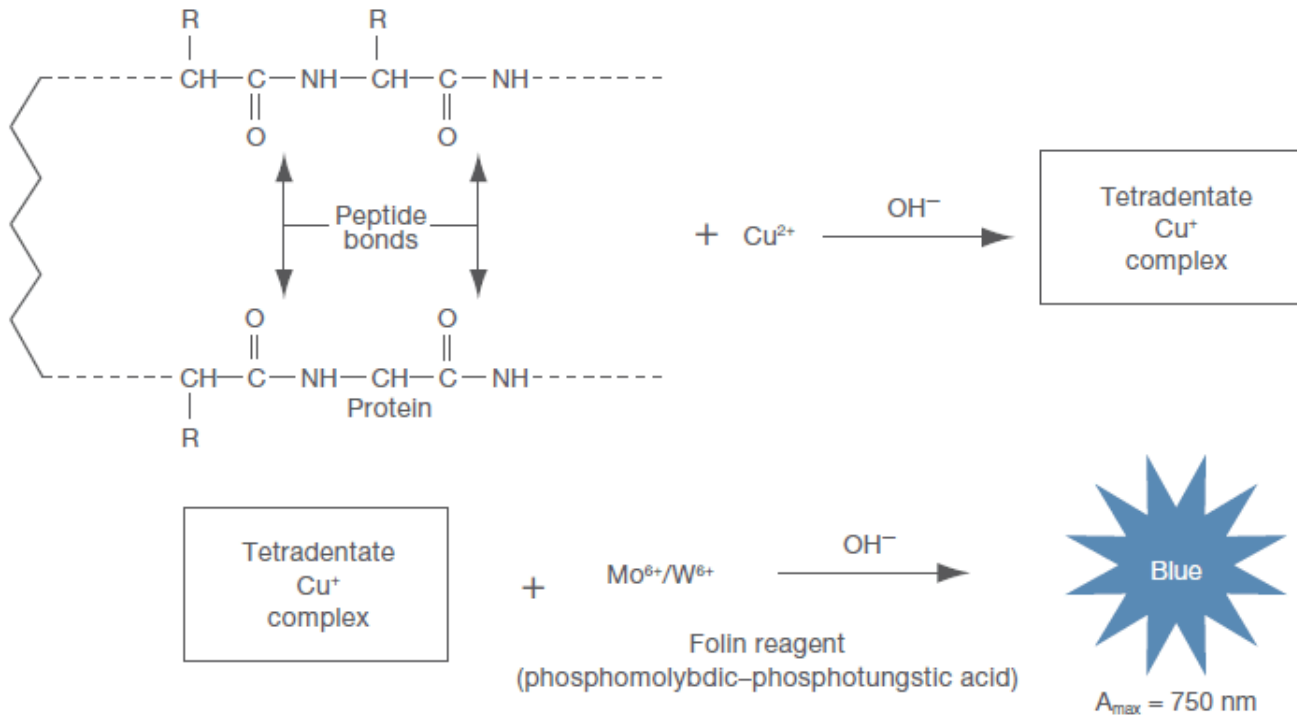
✚ Lowry

✚ BCA

**Bloc III:
Lab. de Bioquímica**

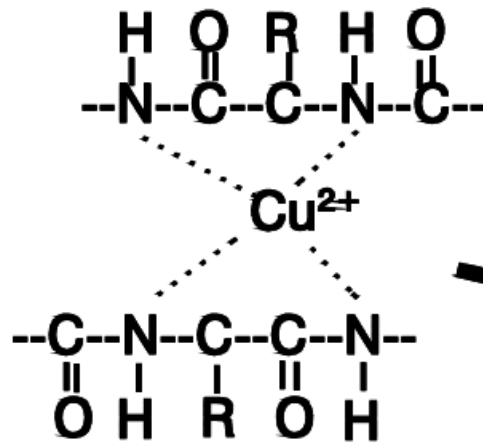
Quins mètodes podem fer servir per a quantificar proteïnes?

MÈTODE DE LOWRY



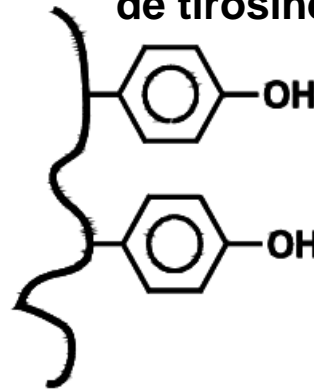
Quins mètodes podem fer servir per a quantificar proteïnes?

MÈTODE DE LOWRY

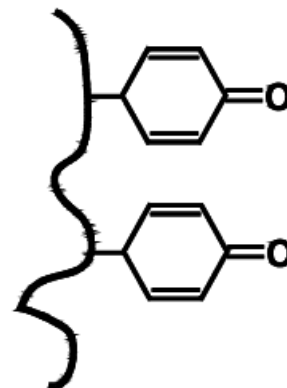


Complex Cu^{2+} -
proteïna en medi
alcalí
(color blau pàl·lid)

Residus fenòlics
de tirosines



Reactiu de Folin
(W^{6+} , Mo^{6+})
(color groc)



Reactiu de Folin reduït
(W^{6+} , Mo^{5+})
(color blau)

MÈTODE DE LOWRY

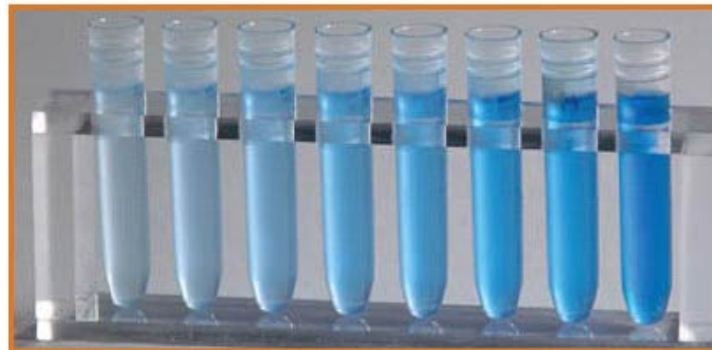
1) FORMACIÓ DE COMPLEXOS Cu-PROTEÏNA. Els ions Cu^{2+} , en medi bàsic, es redueixen a Cu^+ i s'uneixen a les proteïnes formant complexos amb els àtoms de nitrogen dels enllaços peptídics. Aquests complexos Cu^+ -proteïna tenen color blau clar. A més, provoquen el desplegament parcial de l'estructura tridimensional de la proteïna, de manera que resten exposats altres residus que poden participar en la segona etapa de la reacció.

2) REDUCCIÓ DEL REACTIU DE FOLIN-CIOCALTEAU. El principal constituent d'aquest reactiu és l'àcid fosfomolibdotúngstic, de color groc, que, en ser reduït pel Cu^+ , dona lloc a la formació d'un complex de color blau intens. La presència de Tyr, Trp, Cys, His i Asn proporciona equivalents de reducció addicionals (s'incrementa la intensitat del color).

Quins mètodes podem fer servir per a quantificar proteïnes?

AVANTATGES DE MÈTODE DE LOWRY:

- **MOLT SENSIBLE**
- **MENOR VARIACIÓ PROTEÏNA A PROTEÏNA QUE EN EL MÈTODE DE BRADFORD**



INCONVENIENTS DEL MÈTODE DE LOWRY:

- **EL COLOR, SEGONS LA NATURALESA DE LA PROTEÏNA, VARIA MÉS QUE EN EL MÈTODE DE BIURET.**

- **DIFERENTS COMPOSTS INTERFEREIXEN AMB LA REACCIÓ:**

SURFACTANTS I IONS K⁺ (ES FORMEN PRECIPITATS)

LÍPIDS, AMORTIDORS FOSFAT I HEXOSAMINES

SULFAT D'AMONI, QUELANTS I ELEVADES CONCENTRACIONS DE SUCRES REDUCTORS

Quins mètodes podem fer servir per a quantificar proteïnes?

Els mètodes principals de quantificació de proteïnes són:

 UV 280

 Bradford

 Biuret

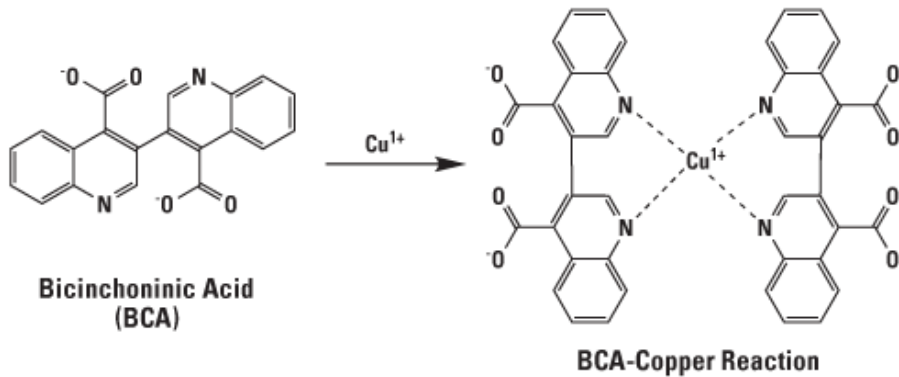
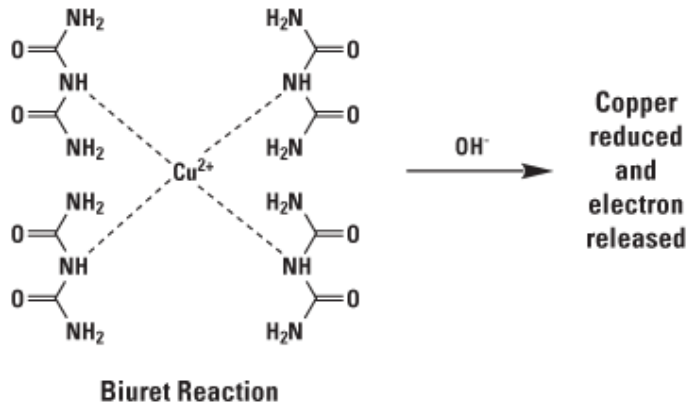
 Lowry

 **BCA**

**Bloc III:
Lab. de Bioquímica**

Quins mètodes podem fer servir per a quantificar proteïnes?

MÈTODE BCA



Bloc III: Lab. de Bioquímica

Quins mètodes podem fer servir per a quantificar proteïnes?

Mètode	Temps d'incubació	λ (nm)	Avantatges	Inconvenients: Substàncies interferents *	Rang conc. (mg/mL)
Biuret	30 min (flexible)	540	<ul style="list-style-type: none"> - Simple - Compatible amb detergents - Menors variacions proteïna a proteïna que Bradford - <i>Funciona amb pèptids</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Agents reductors - Composts nitrogenats ((NH₄)₂SO₄, Tris, urea...) - EDTA (quelants) - Tyr, Trp, Gly 	5-160
BCA	30 min (flexible)	562	<ul style="list-style-type: none"> - Simple - Compatible amb detergents - Menors variacions proteïna a proteïna que Bradford - <i>Funciona amb pèptids</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Agents reductors - Composts nitrogenats ((NH₄)₂SO₄, Tris, urea...) - EDTA (quelants) - Tyr, Trp, Gly 	0,1-2
Lowry	10 min (exactes) + 30 min	750	<ul style="list-style-type: none"> - Menors variacions proteïna a proteïna que Bradford (<i>però més que biuret</i>) - Compatible amb SDS - <i>Funciona amb pèptids</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Agents reductors - Composts nitrogenats ((NH₄)₂SO₄, Tris, urea...) - EDTA (quelants) - Glicerol, K⁺ - Tyr, Trp - Detergents 	0,001-1,5
Bradford	10 min	595	<ul style="list-style-type: none"> - Simple - Compatible amb agents reductors, amortidors, ions metàl·lics, agents quelants 	<ul style="list-style-type: none"> - Detergents • Altres inconvenients: Variacions proteïna a proteïna Unió forta de colorant a cubetes <i>No aplicable a proteïnes < 3 Kda</i> 	0,1-1,5
Directe	-	280	<ul style="list-style-type: none"> - És el més simple (no requereix corba patró però sí conèixer el coeficient d'extinció de la proteïna) - No és destructiu 	<ul style="list-style-type: none"> - Àcids nucleics • Aplicació a solucions pures de proteïna o a detecció cromatogràfica 	

- Hi ha noves versions (kits comercials) que redueixen algunes d'aquestes interferències (vegeu les instruccions del proveïdor). Així, hi ha un kit de BCA que permet quantificar amb seguretat mostres que contenen DTT.

- ❖ Acabada l'electroforesi, s'extrauen els gels de poliacrilamida de les plaques de vidre (només la part corresponent al gel separatiu) i se submergeixen durant 15 min en una cubeta amb amortidor de transferència.
- ❖ Durant el temps d'incubació del gel previ al "Western" es tallen quatre trossos de paper *Whatman 3MM* d'una grandària lleugerament superior a la del gel i es banyen en l'amortidor. Es prepara també un tros de de nitrocel·lulosa d'una grandària igual a la del gel a transferir, se submergeix en aigua destil·lada i es deixa en l'amortidor de transferència.

Tot seguit es prepara un “sandwich” posant els elements següents en la disposició que s’indica en la figura:

PART SUPERIOR

Costat clar del sistema d’assemblatge

Esponja (4)

2 fulls de paper *Whatman* 3MM

Filtre (3)

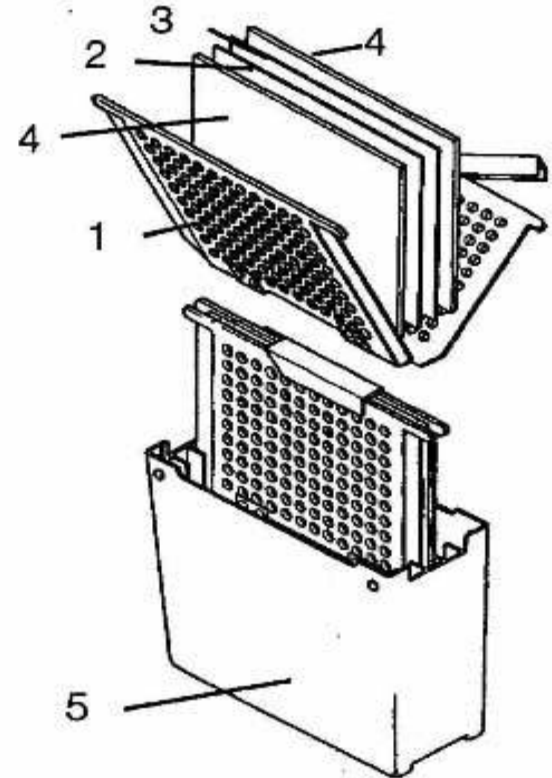
Gel (2)

2 fulls de paper *Whatman* 3 MM

Esponja (4)

Costat negre del sistema d’assamblatge (1)

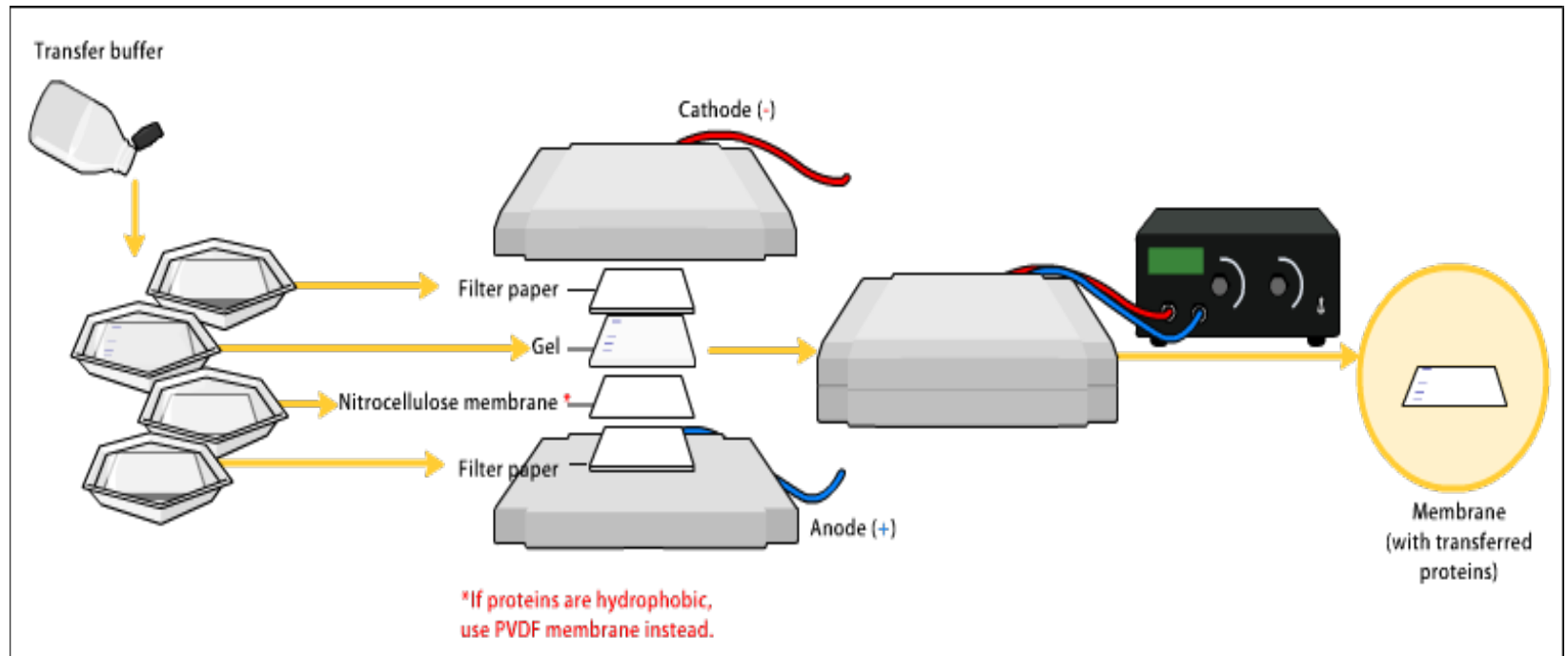
PART INFERIOR



Si es fixa un potencial constant de 100 V, es du a terme l’electrotransferència durant 40 min.

**Bloc III:
Lab. de Bioquímica**

Electrotransferència (III)



❖ Acabada la transferència es procedeix a la **tinció del filtre amb solució de roig Ponceau**. Amb aquesta finalitat es renta el filtre amb àcid acètic 1% (v/v), s'incuba durant 5 min en la solució colorant i es fan tres rentatges de 5 min amb àcid acètic 1% (v/v) i un rentatge final amb TBST 0,01% (p/v). També es podria tenyir el gel amb blau de Coomassie i comprovar que pràcticament no queden proteïnes.

❖ Les diapositives següents mostren reactius que permeten la tinció de gels de poliacrilamida i/o filtres de nitrocel·lulosa després de l'electroforesi.

La finalitat de la tinció és doble perquè ens permet comprovar:

- La eficiència de la transferència
- La integritat de les proteïnes

Common Stains Used in Western Blott

	Detection Reagent
Reversible	Ponceau-S
	Fast Green FC
	CPTS
	Sypro Ruby
	Sypro Rose
Irreversible	Amino black 10B
	Coomassie Brilliant Blue 250
	India Ink
	Colloidal gold

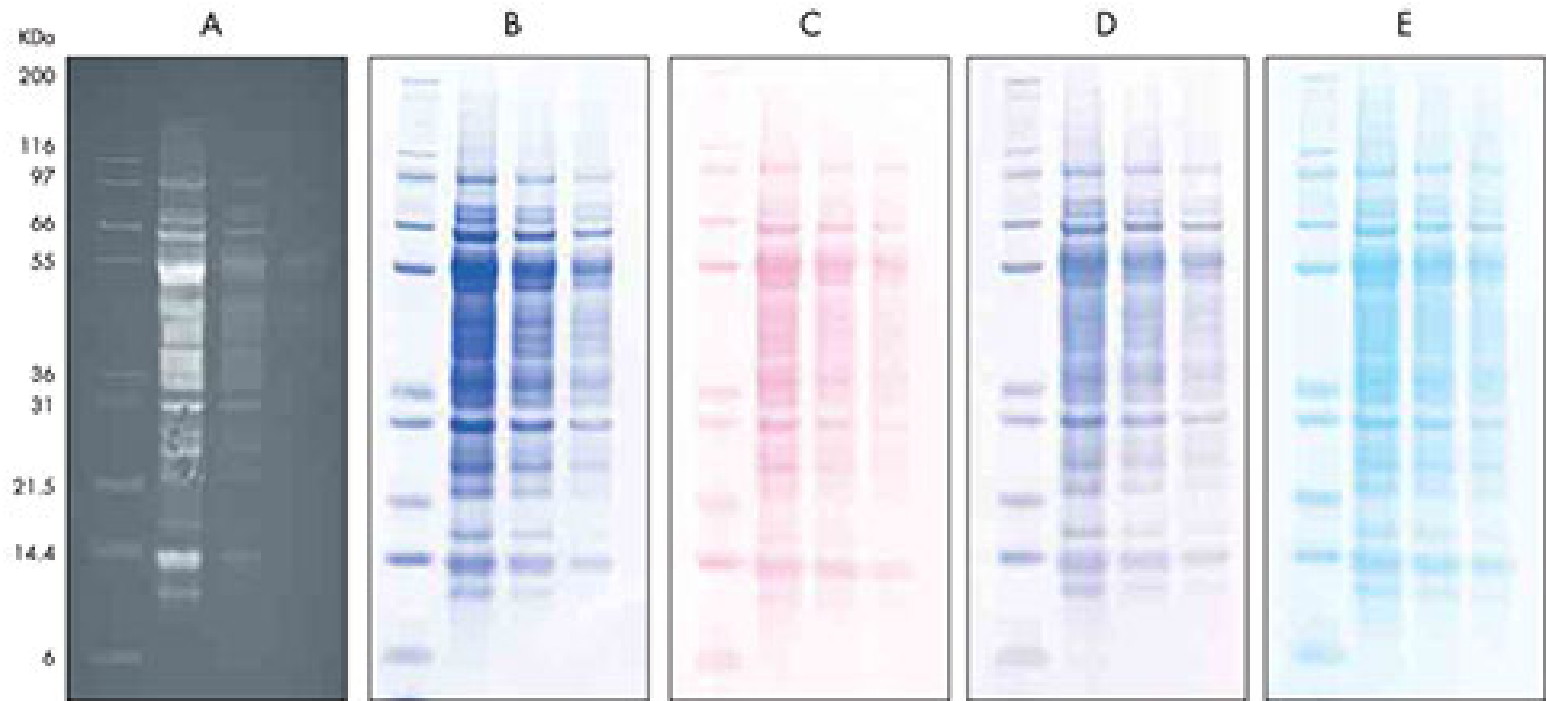
Table 10.8.1 Staining Sensitivities and Membrane Compatibilities for Nonfluorescent Stains^a

Stain	Minimum amount detected ^b	Membrane type ^c		
		PVDF	Nitrocellulose	Nylon
Amido black	50 ng	+	+	+
Coomassie blue	50 ng	+	-	+
Ponceau S	200 ng	+	+	+
Colloidal gold	2 ng	+	+	-
Colloidal silver	5 ng	+	+	-
India ink	5 ng	+	+	-

^aSensitivity of fluorescent stains is very dependent on protein amino acid composition.

^bMinimum amount detected based on amount of protein loaded onto gel. The actual amount on the blot will be slightly lower because of losses during electrotransfer. Values are based on use of a full-sized gel (11 cm × 16 cm × 1.5 mm). Sensitivity will be ~2 to 5 times higher when minigels (8 cm × 10 cm × 1.0 mm) are used because the protein bands are concentrated on a smaller area of membrane.

^c+ indicates stains well; - indicates membrane not compatible.



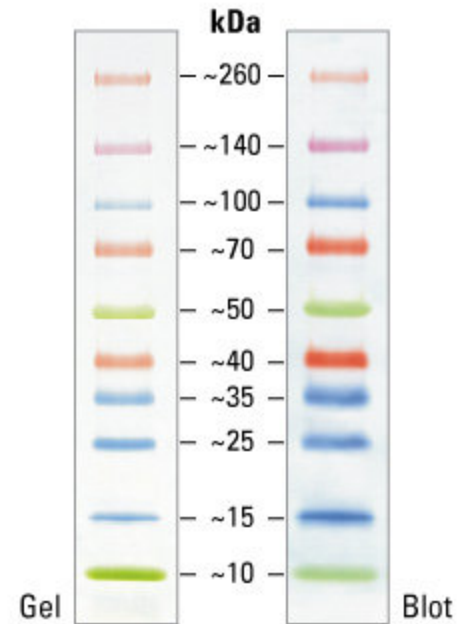
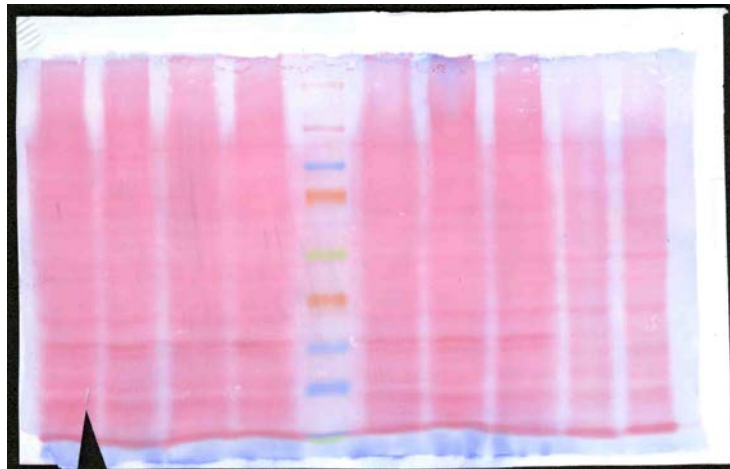
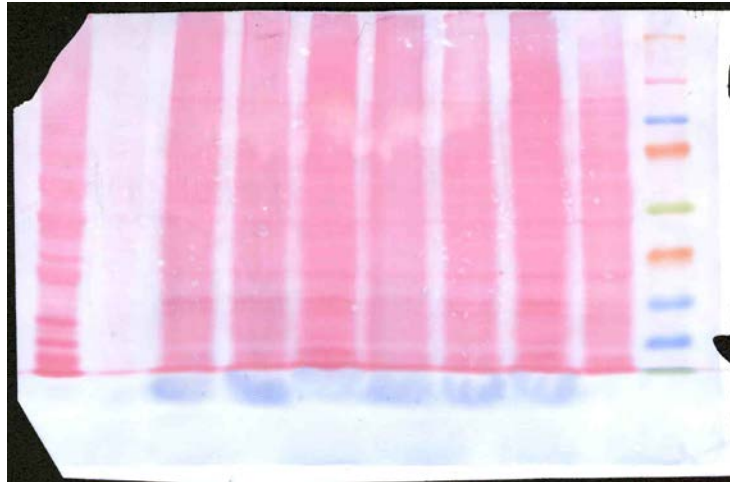
Calf liver proteins were visualized after electroblotting to Immobilon-P membranes: (A) Transillumination, (B) Coomassie™ Brilliant Blue, (C) Ponceau-S red, (D) Amido black and (E) CPTS total protein stains. Left to right, molecular weight standards and 12.2 µg, 6.1 µg, 3.1 µg of the lysate per lane.

<http://www.komabiotech.co.kr/www/techniques/proteinSandT/tAandvProtocol.html>

Les membranes es poden conservar durant llargs períodes de temps després de la transferència de les proteïnes sense que hi haja efectes negatius sobre el filtre ni sobre les proteïnes (fins a 2 setmanes a 4 °C, 2 mesos a -20 °C i temps més llargs a -70 °C).

Aquestes imatges mostren el resultat d'una tinció amb roig Ponceau de filtres com els que s'obtenen en pràctiques després de l'electrotransferència.

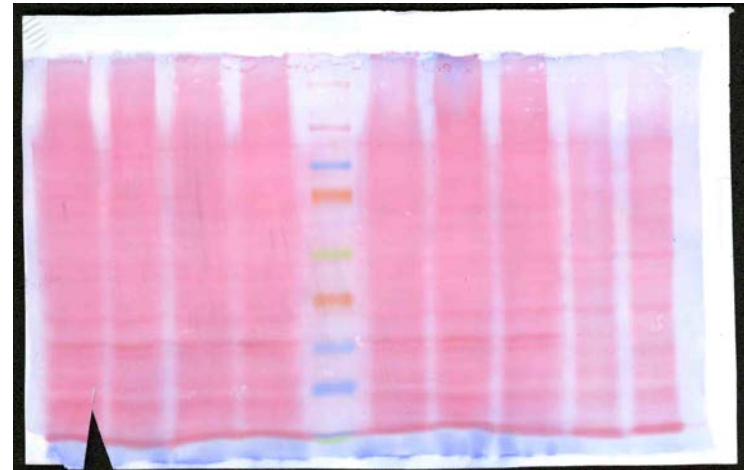
Es pot concloure que la transferència ha funcionat, que hi ha bona quantitat de proteïna i que no hi ha degradació significativa (si passara això es detectaria un predomini de proteïnes de baixa massa molecular).



Suposeu que en un dels vostres gels de pràctiques obteniu el resultat següent:

Ordre de càrrega de les mostres i quantitat de proteïna total carregada d'acord amb la quantificació amb BCA

- | | |
|---------------------|------------|
| 1. HALUC -1 | 198 microg |
| 2. " -2 | 128 microg |
| 3. " -3 | 123 microg |
| 4. " -4 | 169 microg |
| 5. Patró | |
| 6. HALUC -5 | 252 microg |
| 7. GFP -6 | 197 microg |
| 8. " -7 | 131 microg |
| 9. Control HA-luc | |
| 10. No transfectada | |



Qüestió per a reflexionar (3):

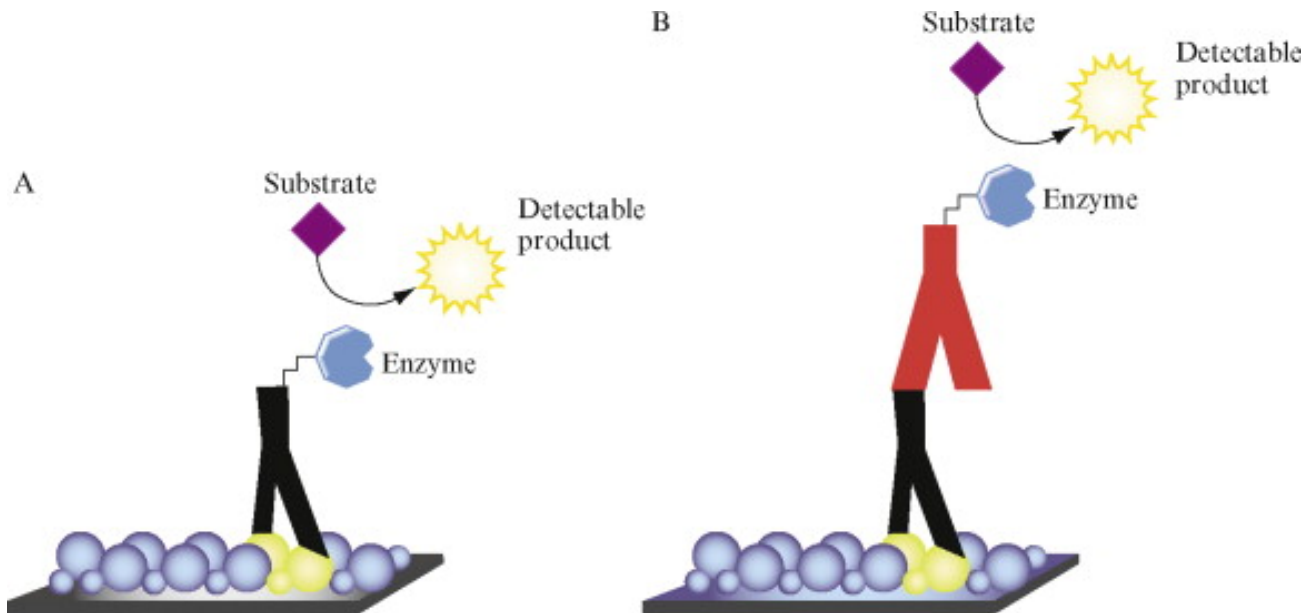
- Les diferències entre les quantitats de proteïna total aplicada en els diferents pouets, determinada mitjançant l'assaig del BCA, està d'acord amb l'observació de la membrana tenyida amb Ponceau? Raona la resposta.

- La membrana pot unir proteïnes.
- Es tracta de proteïnes com els anticossos o les de la mostra.
- Perquè no hi haja una unió inespecífica de l'anticòs en zones on no hi ha proteïnes (entre bandes) o bé que s'unisca a proteïnes que no són la d'interès, cal **BLOQUEJAR LA UNIÓ NO ESPECÍFICA.**
- Per aconseguir això s'afeg una solució diluïda de proteïna, la qual s'uneix en tots els llocs on no hi ha proteïna (allí més que en altres zones).
- Així doncs, l'anticòs s'uneix després preferentment a llocs on hi ha proteïna o a aminoàcids blanc (proteïna d'interès).
- La solució de bloqueig conté llet descremada, ASB o gelatina i, a vegades, s'hi afeg algun detergent com ara Triton X-100, Tween o Nonidet NP-40.

- Una vegada comprovada la transferència correcta de les proteïnes al filtre, es bloquegen en amortidor TBS Tween 0,01% (p/v) amb llet descremada al 5% (p/v). S'incuba durant almenys 1 hora a temperatura ambient.
- Recordeu que, en funció dels anticossos que es facen servir, s'ha de triar l'amortidor més adequat (normalment PBS o TBS) i la concentració de Tween (que sol oscil·lar entre 0,01 i 0,1%).

Directa

Indirecta



A
Anticòs primari
marcat

B
Anticòs primari
no marcat

Detection in Western Blots

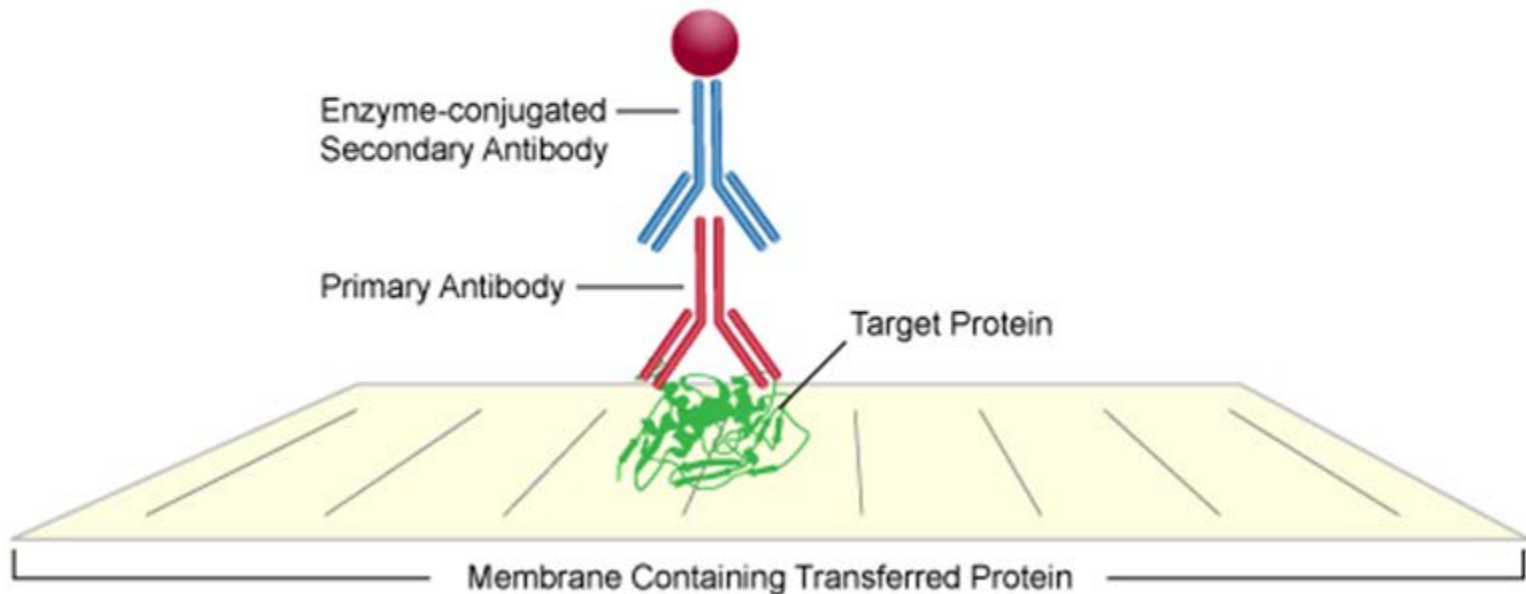


Diagram 2: Illustration of detection in Western Blots.

ACLARIMENTS:

- La detecció indirecta permet, en principi, una major sensibilitat. Malgrat això, en l'actualitat es disposa d'anticossos per a la detecció directa que proporcionen molt bons resultats i permeten dur a terme el procés amb més rapidesa.

- En els experiments que es duen a terme en pràctiques es fan servir:
 - ❑ Un anticòs primari conjugat amb peroxidasa que permetria la detecció directa de proteïnes que contenen l'epítot HA (detecció directa).
 - ❑ Un anticòs primari per a GFP que requereix l'ús d'un anticòs secundari conjugat amb peroxidasa (detecció indirecta). Com que en cada filtre s'ha de detectar GFP i proteïnes de fusió amb HA en pràctiques es procedeix com si en ambdós casos la detecció fora indirecta.

❖ Després del bloqueig s'afigen 20 mL de la solució d'anticossos formada per **anti-HA peroxidasa d'alta afinitat** (Roche, Ref. 11667475001) diluït 1:1000 en solució de bloqueig, i primari **anti-GFP** (Roche, Ref. 11-814-446-001) diluït 1:2000. Les dilucions es preparen en el moment d'usar-les i els filtres s'incuben durant tota la nit a 4°C

**Bloc III:
Lab. de Bioquímica**

Anàlisi funcional de la construcció de DNA plasmídic en cèl·lules de mamífers

Sessió 1

- Obtenció d'extractes per a anàlisi Western i activitat luciferasa.
- Preparació d'un gel de poliacrilamida del 10%.

Sessió 2

- Desenvolupament de l'electroforesi. Electrotransferència. Bloqueig. Incubació amb anticòs primari.
- Quantificació dels extractes.

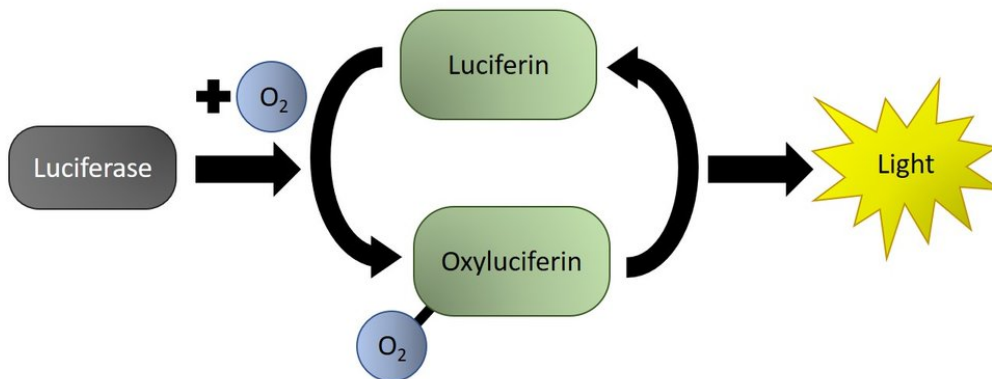
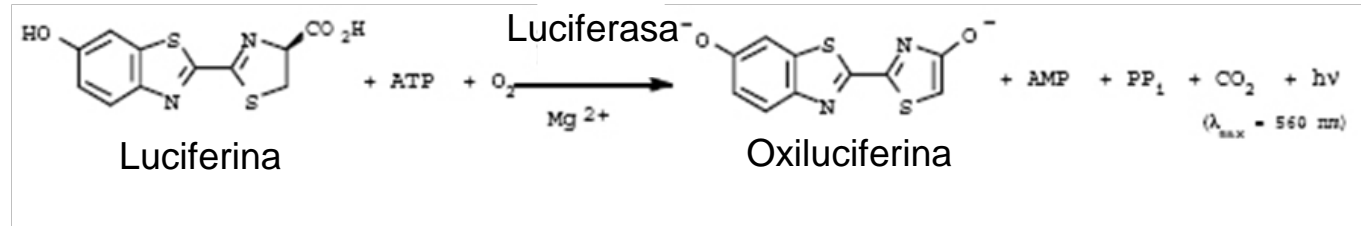
Sessió 3

- Rentatges i incubació de la membrana amb anticòs secundari. Revelatge del filtre.
- Mesura de l'activitat luciferasa i representació dels resultats obtinguts.

- ❖ Al matí següent s'elimina l'excés d'anticòs. Amb aquesta finalitat es retira la solució d'anticossos (que serà conservada a -20°C per a usos posteriors) i es renta el filtre amb TBST 0,01% (dos rentatges ràpids, un de 15 min i, finalment, 3 de 5 min).
- ❖ Tot seguit s'hi afegiu una solució recent preparada d'**anticòs secundari** (*antimousse conjugat amb peroxidasa*, GE Healthcare) diluït 1:1000 (s'hi podrien fer servir dilucions entre 1:1000 i 1:40000 segons les concentracions de proteïna en els extractes) en solució de bloqueig TBST 0,01%. S'incuba durant 1 h a temperatura ambient.
- ❖ Durant aquest temps d'incubació es determina l'activitat luciferasa, per a la qual cosa se segueixen les instruccions de les diapositives següents.
- ❖ Després es duen a terme els mateixos rentatges que s'havien fet en acabar la incubació amb els anticossos primaris.

Mesura d'activitat luciferasa (I)

- ❖ En una placa multipouets es depositen 100 μL de l'amortidor d'assaig de luciferasa, al qual s'haurà addicionat prèviament DTT i ATP.
- ❖ En cada pouet ocupat s'afeg 15 μL de cada un dels extractes guardats el primer dia a -20°C .
- ❖ Es programa el luminòmetre per a la mesura.

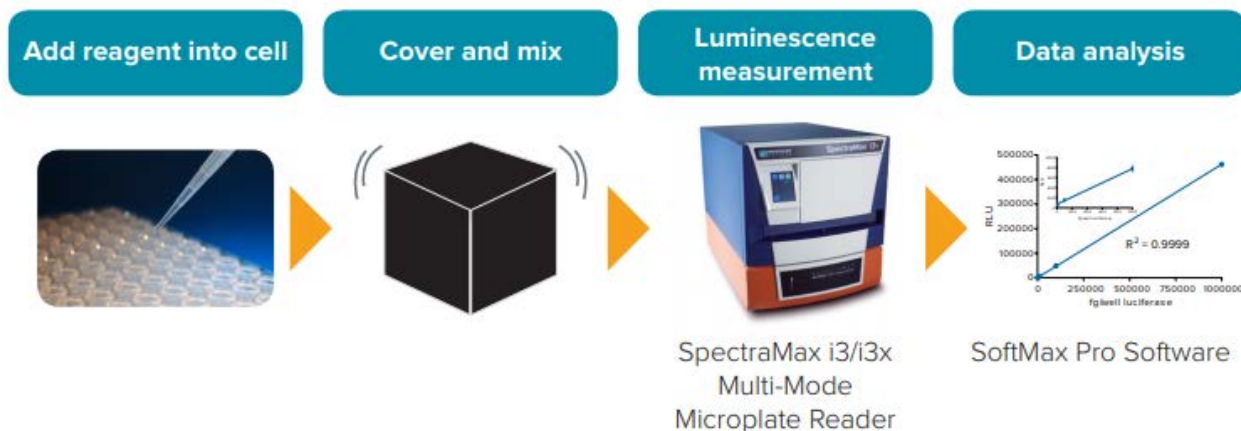


<http://www.signaltonoisemag.com/allarticles/2018/8/31/putting-the-spotlight-on-artists-who-glow>

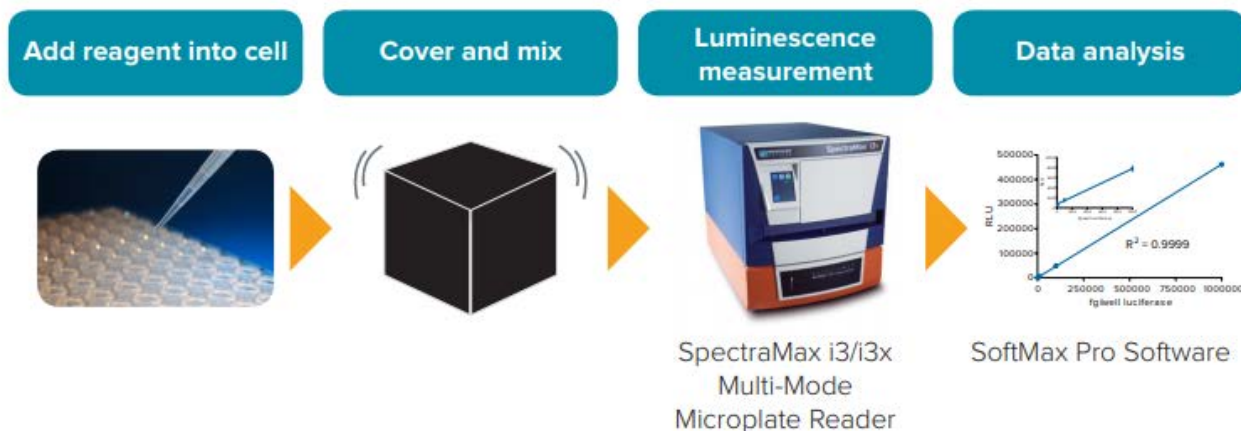
Bloc III: Lab. de Bioquímica

Mesura d'activitat luciferasa (II)

- ❖ S'afeg 50 μl d'una solució de luciferina 0,3 mg/mL, preparada prèviament i conservada a -20°C , en cada un dels pouets.
- ❖ Es mescla amb una pipeta.
- ❖ Es du a terme la mesura.
- ❖ S'anoten els resultats i es representen en forma d'histograma en escala logarítmica.



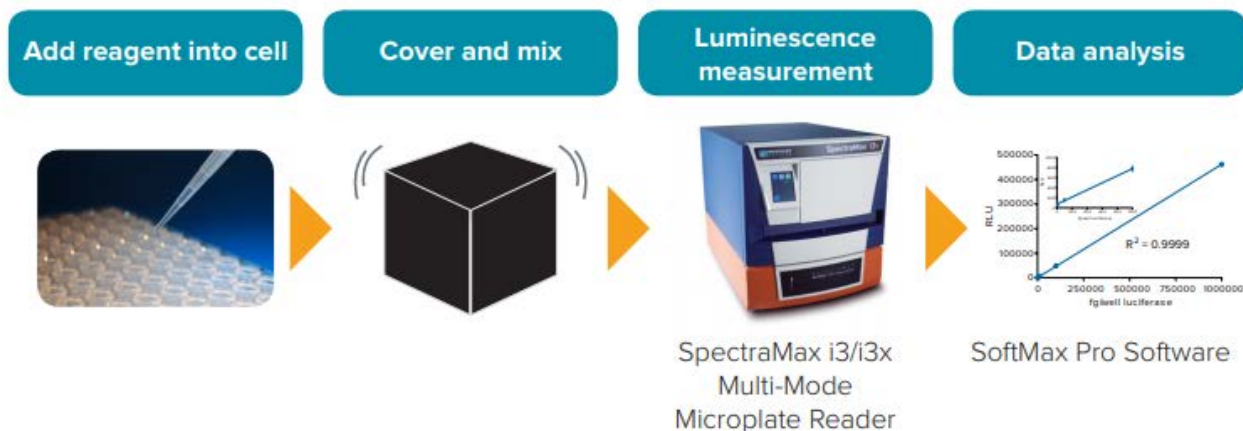
- ❖ Es pot fer una corba patró per a determinar unitats d'activitat luciferasa.
- ❖ Disposem de luciferasa 24 U (1 mg) / mL
- ❖ Es poden preparar dilucions seriades i analitzar les mostres en el luminòmetre en paral·lel amb les mostres problema. Preparem dilucions 1/10, 1/50 i 1/100.



❖ CONTROL POSITIU: en un pouet s'ha de posar amortidor d'assaig, luciferina i luciferasa comercial.

❖ CONTROLS NEGATIUS:

- ❑ En un pouet es posa amortidor d'assaig i luciferina.
- ❑ En un altre es posa amortidor d'assaig i extracte.



	Posició en la placa	Luciferasa comercial	Extracte	Amortidor	Luciferina	Aigua
1 (blanc 1)	A1	-	-	100	50	15
2 (blanc 2)	B1		15	100		50
3 (mostra HA-luc)	Columna 3		15	100	50	
4 (mostres GFP, HA-PTP-SL)	Columna 5		15	100	50	
Luc comercial 1	A8	15 (1/10)		100	50	
Luc comercial 2	D8	15 (1/50)		100	50	
Luc comercial 3	H8	15 (1/100)		100	50	
No transfectada	C1		15	100	50	

Els volums indicats són en μL

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0,0188		24,45		0,0509			969,9
B	0,0026		90,97		0,0987			
C	0,0106		96,23		0,0185			
D			30,92		0,0291			157,3
E			293,9		0,0521			
F			225		84,25			
G			563,3		0,1109			
H			654,4		0,0829			57,39

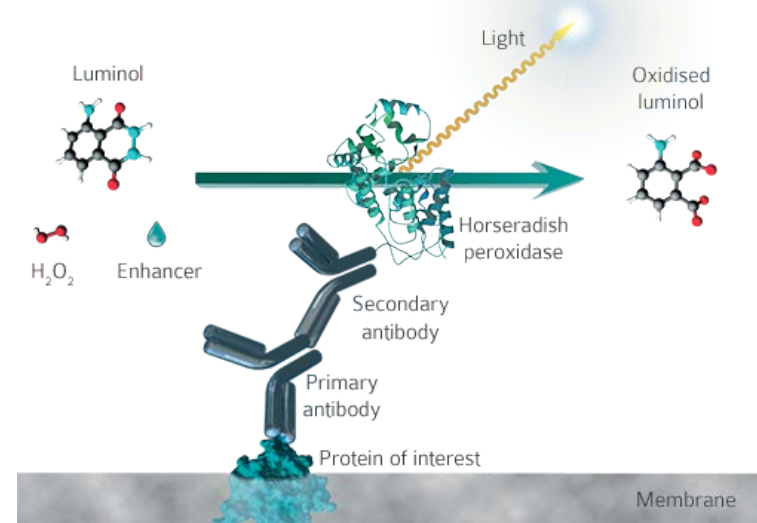
Els valors d'activitat se solen definir com a "unitats de llum" o "intensitat de llum"

4. Quines conclusions generals es poden traure de les dades obtingudes per als controls i per a les mostres problema?
5. En quines mostres els resultats que s'han obtingut no serien els esperats? Com es podrien explicar aquestes discrepàncies?
6. Creieu que hauria d'haver-hi una correlació entre l'activitat luciferasa i l'eficiència de transfecció? Per què?
7. Podríeu calcular les unitats d'activitat luciferasa per microgram de proteïna? Com s'hauria de fer?

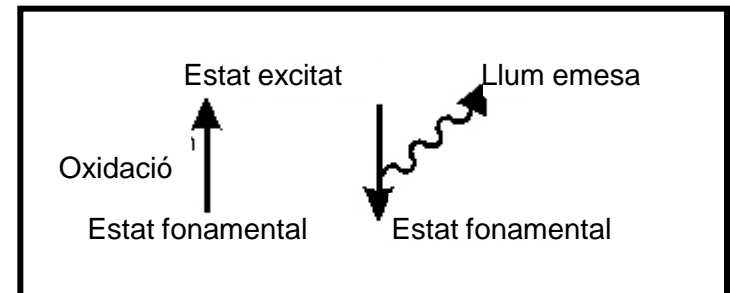
- ❖ Durant el segon rentatge de 5 min es trau de la nevera la solució de revelatge del kit "Luminata Forte" (de Merck Millipore).
- ❖ Acabats els rentatges s'afeg 1 mL de la solució de revelatge a cada filtre i s'incuba durant 5 min. Cal assegurar que el filtre hi estiga submergit permanentment.
- .
- ❖ Després se separa el filtre i s'elimina totalment la solució de revelatge amb l'ajuda de paper *Whatman 3MM*.
- ❖ Tot seguit es detecta la quimioluminescència del filtre amb l'instrument *ImageQuant LAS 4000 Mini* (General Electric). Es programa de manera que proporcione imatges després d'exposicions successives d'1 min durant un temps màxim de 10 min.

Tècnica quimioluminescent

- ❑ Mètode molt sensible per a la detecció d'antígens fent servir anticossos marcats amb **peroxidasa**.
- ❑ La reacció es basa en l'ús de substrats de la peroxidasa que reaccionen amb el peròxid d'hidrogen i una substància potenciadora, i emeten llum intensa que es pot convertir fàcilment en imatge mitjançant l'ús de pel·lícules o detectors.
- ❑ La gran sensibilitat d'aquests mètodes permet treballar amb concentracions molt reduïdes d'anticossos.

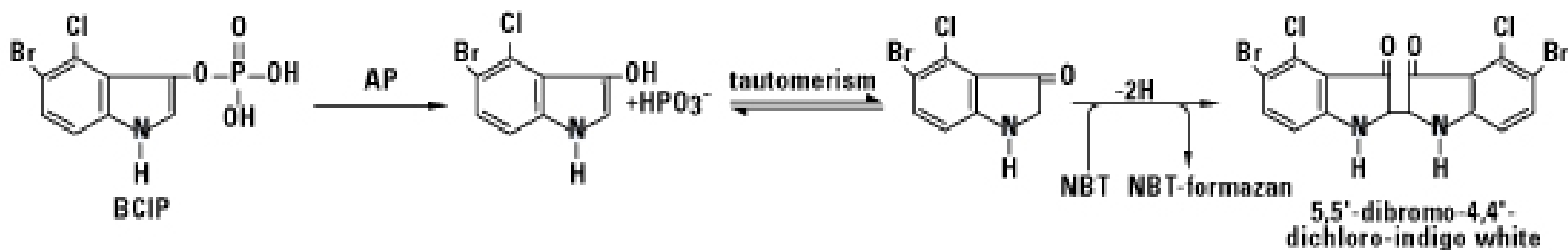


https://resources.rndsystems.com/images/site/Quantiglo-Step_36411.gif



Tècnica alternativa

- Anticòs secundari conjugat amb **fosfatasa alcalina**
- Reactius per a fosfatasa, **BCIP** (1H-indol-3-ol, 5-bromo-4-cloro-dihidrogenfosfat) i **NBT** (nitroblau de tetrazole)



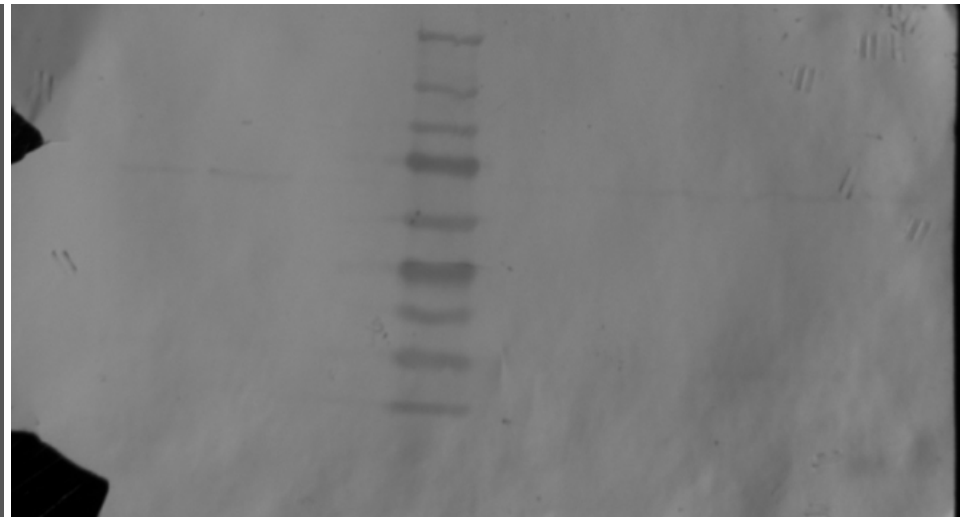
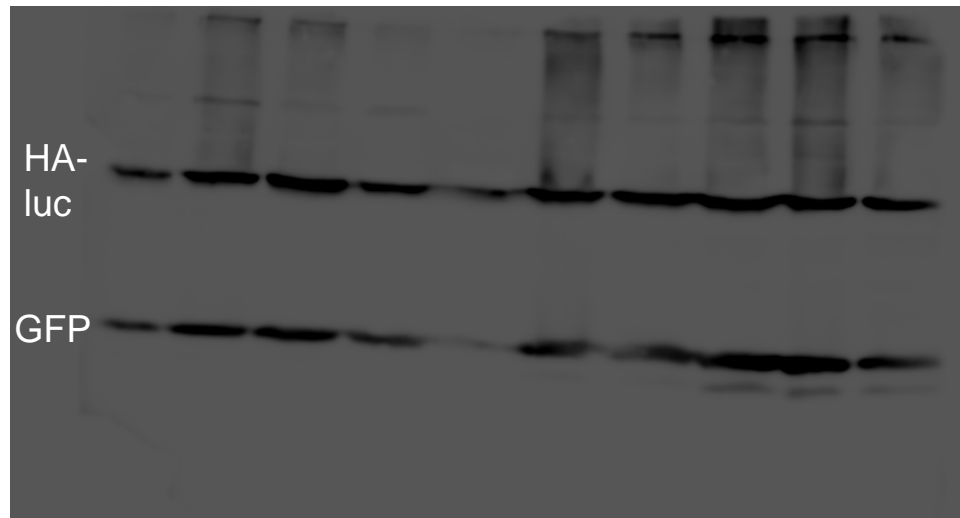
BC indoxil intermediari

Precipitat
púrpura

Sal de formazan
insoluble, pp blau

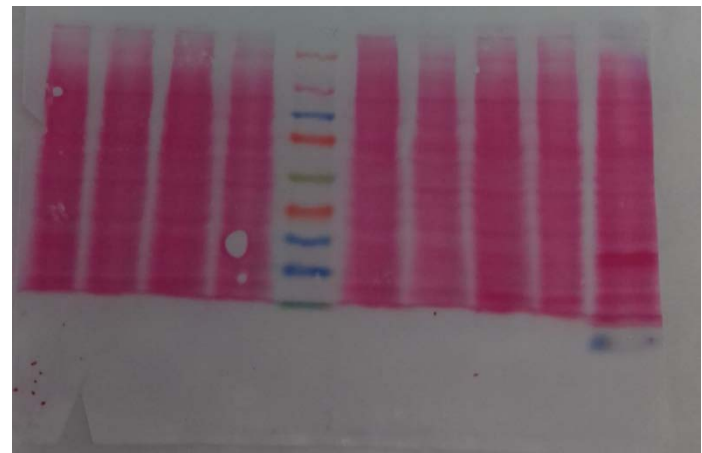
- NBT is an oxidant used in combination with BCIP or BCIP derivatives to enhance detection of alkaline phosphatase activity.

En aquesta diapositiva es mostra el resultat obtingut en un grup de pràctiques del curs 2016-2017.



Ordre de càrrega de les mostres

1. 1 – HALUC 72 microg
2. 2- “ 155 microg
3. 3- “ 149 microg
4. 4- “ 58 microg
5. Patró
6. 5 – HALUC 98 microg
7. 6 - “ 84 microg
8. 7 - “ 87 microg
9. 8 - “ 71 microg
10. 8- Sediment HA-luc



8. Què es pot deduir sobre l'expressió de GFP i HA-Luc en les mostres que heu fet servir?

9. En la diapositiva anterior no es mostra el resultat del segon gel d'electroforesi, en el qual es carregaren els controls. En vista dels resultats observats, penseu que aportaria alguna informació addicional? Raoneu la resposta.

**Bloc III:
Lab. de Bioquímica**

Correlació entre eficiència de transfecció, concentració de proteïnes, activitat luciferasa i detecció en Western.

Grup	Eficiència de transfecció (GFP)	µg de proteïna aplicats en el gel	Activitat luciferasa (unitats de llum)	Senyal en <i>Western Blot</i>
1	4.4			
2	14			
3	1.1			
4	10.7			
5	4.13			
6	10			
7	2.4			
8	1.1			

Al final de la pràctica hauríem de poder completar aquesta taula i traure'n conclusions.

10. Completeu la taula anterior tenint en compte que les dades d'eficiència de transfecció corresponen a les dades del grup de pràctiques en què s'obtingueren els valors d'activitat luciferasa que es mostren en la diapositiva 8 i el resultat del Western de la 13. En la columna WT heu d'indicar amb el signe + si es detectà la banda corresponent a HA-Luc (podeu marcar +, ++ o +++ en funció de la intensitat del senyal observat); poseu-hi – si no es detecta cap banda.

11. És possible trobar algun tipus de correlació en l'experiment els resultats del qual s'han inclòs en aquesta presentació entre els aspectes següents?

- Eficiència de transfecció - activitat luciferasa
- Proteïna carregada en el gel – senyal en transferència de proteïnes (*Western blot*)
- Activitat luciferasa- senyal en WB