

MANUAL DE TÈCNIQUES DE BIOLOGIA MOLECULAR

Curs pràctic de tècniques analítiques per a la separació
i quantificació d'àcids nucleics i proteïnes



SECCIÓ D'ESTUDIANTS
DE LA SOCIETAT CATALANA DE BIOLOGIA

Barcelona, 4 al 15 de maig de 1987

MANUAL DE TÈCNQUES DE BIOLOGIA MOLECULAR

**"Curs pràctic de Tècniques Analítiques per a la separació i
quantificació d'àcids nucleics i proteïnes"**

Barcelona del 4 al 15 de maig de 1987

Relació de les tècniques emprades durant l'esmentat curset.

Coordinador: Joaquim Prats i Rafael Romero.

Organització : Secció d'estudiants de la S.C.B.

Col·lecció : "Manual de Tècniques de Laboratori" Vol 1.

This One



9YT9-TZH-T6TZ

T A U L A

PRESENTACIÓ	7
QUANTIFICACIÓ DELS ACIDS NUCLEICS D'UNA MOSTRA BIOLOGICA MITJANÇANT TÈCNiques ESPECTROFOTOMÈ- TRiques per J. Prats i R. Romero	9
VALORACIÓ PROTEICA D'UNA MOSTRA BIOLÒGICA per R. Romero i J. Prats	19
ELECTROFORESI D'ACIDS NUCLEICS EN GELS D'AGAROSA per R. Romero i J. Prats	25
CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA per A. Villarroya	33
ELECTROFORESI EN GELS D'ACRILÀMIDA AMB SDS per A. Villarroya	39
ALTRES TÈCNiques UTILITZADES EN LA PURIFICACIÓ DE PROTEINES per A. Villarroya	46
DETERMINACIÓ DEL RECANVI PROTEIC per F. López .	58

PRESENTACIÓ

Aquest recull de tècniques no vol ésser un compendi de totes les metodologies emprades en la separació i caracterització d'àcids nucleics i proteïnes sinó només, un resum de les tècniques més bàsiques i usuals.

Aquest manual pretén ésser un guió de les pràctiques que es realitzaran durant el curs de "Tècniques analítiques per a la separació i quantificació d'Àcids Nucleics i Proteïnes" a la vegada que orientar a tots aquells que estiguin interessats en iniciar-se en aquest camp de treball.

A grans trets, podem observar que cada tècnica que aquí es descriu està estructurada de la següent manera : una introducció inicial, on es comenta l'aplicació de la tècnica així com els seus objectius, una descripció dels materials necessaris per a dur-la a terme, una "recepta" del protocol de la tècnica, una discussió on s'expliquen els avantatges i els inconvenients que té i finalment una bibliografia bàsica, concreta i orientativa.

Voldríem agrair a tots aquells que d'alguna manera han col·laborat directa o indirectament en la realització d'aquest curs, especialment al departament de Bioquímica i Fisiologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona dirigit pel Dr. Marià Alemany, que ha posat a la nostra disposició tot allò que ens era necessari per a la preparació i realització d'aquest curs.

Agraïm també la col·laboració del departament de Genètica de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona per la cessió de material per a la realització d'aquest curs.

Restem altament reconeguts amb el Dr. Lluís Cornudella (investigador del C.S.I.C.) per a les seves gestions en la realització d'aquest manual de tècniques, i a la Dra. Sílvia Atrian (professora del Dpt. de Genètica).

D'altra banda no podríem menys que expressar el nostre agraïment a aquelles persones que han realitzat tasques no gens menys importants en la preparació d'aquest curs i volem així reconèixer al Sr. Agustí Bonet (Cap de Consergeria de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona).

Volem agrair també a C.T.A (Ciència i Tecnologia Aplicada) per a totes les facilitats donades en la impressió d'aquest recull.

Finalment cal dir que aquest curs no s'hagués pogut realitzar sense el suport institucional i econòmic de la S.C.B. (filial de l'I.E.C.) la qual, constantment es preocupa per estimular les activitats científiques dins el nostre país.

Joaquim Prats i Rafael Romero.

Barcelona, Maig 1987.

QUANTIFICACIO D'ACIDS NUCLEICS

I PROTEINES.

QUANTIFICACIÓ DELS ÀCIDS NUCLEICS D'UNA MOSTRA BIOLÒGICA MITJANÇANT TÈCNiques ESPECTROFOTOMÈTRIQUES

J. Prats i R. Romero.
Departament de Genètica .
Facultat de Biologia.
Universitat de Barcelona.

INTRODUCCIÓ

Aquesta tècnica es pot dividir en dues parts; una extracció dels productes dels àcids nucleics (ribonucleòtids i desoxiribonucleòtids) i una altra de valoració pròpiament dita.

La valoració dels àcids nucleics es realitza a través de la quantificació dels productes d' hidròlisi del RNA i del DNA, mitjançant l'anàlisi espectrofotomètric del contingut de fòsfor dels ribonucleòtids i d'una reacció colorada dels desoxiribonucleòtids (Difenilamina).

Els ribonucleòtids s'aconsegueixen a través d'una hidròlisi bàsica amb KOH en calent (37° C), posteriorment s'hidrolitza el DNA en condicions àcides (PCA IN) i a temperatura elevada (70°C).

La valoració del contingut de DNA mitjançant els seus nucleòtids (reacció de la difenilamina) es basa, en la formació d'un complex colorat quan la difenilamina s'uneix a la deoxiribosa (Reacció de Dische, 1930). Posteriorment aquesta reacció ha estat modificada amb l'adició d'acetaldehid (Burton K 1955) fent-la molt més sensible.

Aquesta tècnica d'extracció i valoració, encara que bastant antiga, és molt útil per la seva precisió i rapidesa, i perquè a partir d'una única extracció en què es separen nucleòtids de RNA i de DNA també s'obté una resta proteica que permet la seva valoració per mètodes com Lowry, Bio-Rad, etc.

L'inconvenient però, radica que no es realitza una separació dels àcids nucleics intactes i/o funcionals; per tant no pot ser utilitzada en treballs on siguin necessàries aquestes condicions.

OBJECTIUS

- Valoració quantitativa del contingut de DNA i RNA d'una mostra biològica.

APARELLS I REACTIUS

Reactius

- Acid perclòric (PCA) - Fluka -
- Etanol - Merck -
- Eter - Merck -
- Acid acètic - Merck -
- Acid sulfúric - Merck -
- Hidròxid de sodi - Merck -
- Hidròxid de potasi - Merck -
- Acetaldehid - Merck -
- Diphenylamine - Merck -
- DNA : Deoxyribonucleic acid from herring sperm.
Lyph sodium salt. - Boehringer -

Aparells

- Homogenitzador o sonicador.
- Centrífuga.
- Incubador (Bany Maria)
- Balança automàtica.
- Estufa.
- Espectrofotòmetre.

MATERIAL

- Tubs de centrífuga.
- Tubs d'assaig i gradetes.
- Pipetes automàtiques.
- Pipetes Pasteur.
- Pipetes normals.
- Rellotge.
- Tips.
- Parafilm.
- Paper de mesura de pH.
- Gel.
- Guants de plàstic.

SOLUCIONS

- Preparar PCA a les següents concentracions :
70 %, 1 N, 0,5 N, 2 N, 3 N.
- K OH 0,3 N.
- Etanol : Eter (1 : 1)
- Reactiu colorimètric de Diphenylamine (per 100 ml.) :

Diphenylamine	1.5 gr.
Acid acètic	100 ml.
Acid Sulfúric	1.5 ml.

Guardar aquesta solució en una ampolla fosca tapada amb paper d'estany a 4°C.

- Solució Standard de DNA (la preparem a una concentració de 0.3 mg/ml)

DNA comercial	30 mg
Na OH 5 mM	100 ml

Dissoldre bé tot el DNA en 80 ml de Na OH 5 mM (Alerta costa bastant de dissoldre)
Portar-ho després fins a un volum de 100 ml amb més Na OH 5 mM
Aquesta solució ens permetrà fer la recta patro.

PROTOCOL

COMENÇAR A TREBALLAR A 4° C.

- 1 - Posar la mostra en un tub de centrifuga i afegir-hi 1 ml d'aigua destil·lada.
- 2 - Homogenitzar la mostra. (Cal tenir els tubs en gel).
- 3 - Afegir 94.7 µl de PCA 70 % fred.
- 4 - Afegir 4 ml de PCA 1 N fred a cada tub.
- 5 - Centrifugar durant 15 minuts a 1500 rpm a 4° C.
- 6 - Despreciar el sobrenedant i resuspendre amb 4 ml de PCA 1 N fred.
- 7 - Centrifugar durant 5 minuts a 1500 rpm a 4° C.
- 8 - Despreciar es sobrenedant i resuspendre amb 5 ml d'etanol absolut fred.
- 9 - Centrifugar durant 5 minuts a 1500 rpm a 4° C.
- 10- Despreciar el sobrenedant i resuspendre amb 5 ml d'etanol : Eter (1:1) fred.
- 11- Centrifugar durant 5 minuts a 1500 rpm a 4° C.
- 12- Despreciar el sobrenedant i deixar assecar el sediment.

A PARTIR D'AQUI JA ES POT TREBALLAR A TEMPERATURA AMBIENT.

SI ES VOL PRECIPITAR NOMES EL DNA CONTINUAR AL PAS 21.

- 13 - Afegir a cada tub 1.5 ml de KOH 0.3 N. Comprovar amb un paper de pH que aquest és bàsic.
- 14 - Deixar 2 hores a 37° C. (Alternativament pot deixar-se tota la nit a 30 °C).
- 15 - Refredar els tubs amb gel.
- 16 - Neutralitzar les mostres amb 0.12 ml de PCA 3 N.
- 17 - Afegir un volum igual al que tenim de PCA 2 N (Així la concentració final de PCA serà d' 1 N).
- 18 - Deixar reposar 20 minuts en fred.
- 19 - Centrifugar durant 15 minuts a 1500 rpm.

Ara tindrem

Sobrenedant : Determinació RNA

Sediment : Determinació de DNA i proteïnes.

- 20 - Decantar el sobrenedant i guardar-lo en fred fins a la determinació espectrofotomètrica (i/o radioactiva si s'escau) del RNA.
(Veure pas 37).
- 21 - Afegir al precipitat 1 ml de PCA 0.5 N.
- 22 - Posar en un altre tub 1 ml de DNA standard
i 1 ml de PCA 1 N.
- 23 - Tapar tots els tubs amb taps o parafilm.
- 24 - Posar els tubs al Bany Maria (a 70 °C) durant 10 minuts
- 25-Deixar refredar i centrifugar 10 minuts a 1500 rpm.

- 26 - Treure el sobrenedant i posar-lo en tubs d'assaig normals.
- 27 - Afegir al precipitat 1 ml de PCA 0.5 N.
- 28 - Tornar a posar els tubs al Bany Maria a 70 °C durant 10 minuts.
- 29 - Deixar refredar i centrifugar a 1500 rpm durant 10 minuts.
- 30 - Decantar el sobrenedant i afegir-lo als tubs del pas 26.

Alerta : Tots els tubs tindran ara 2 ml de solució i estaran a una concentració 0.5 N de PCA.

Aquí es pot aturar el procés guardant els tubs a 4 °C

- 31 - Fer de cada mostra una rèplica.
- 32 - Amb el DNA standard fer un banc de dissolucions :

TUB	SOLUCIÓ	[DNA]
1	1 ml de DNA std.	300 µg
2	0.5 ml DNA std. + 0.5 ml de PCA 0.5 N	150µg.
3	0.25 ml de DNA std. + 0.75 ml de PCA 0.5 N.	75 µg.
4	0.10 ml de DNA std. + 0.90 ml de PCA 0.5 N.	30 µg.
5	0.05 ml de DNA srd. + 0.95 ml de PCA 0.5 N.	15 µg.
B	0.05 ml de PCA 1 N + 0.5 ml de Na OH 5 mM.	0 µg.
B _m	1 ml de PCA 0.5 N	0 µg.

(On B és el blanc per al banc de dilucions i B_m el blanc per a les mostres).

33 - Fer una dilució 1 : 50 amb acetaldehid i aigua destil·lada.

Alerta ja que l'acetaldehid és molt volàtil, fer aquesta dilució a 4° C.

Dilució : 100 μ l d'acetaldehid + 4900 μ l d'aigua destil·lada.

34 - Afegir 0.1 ml d'acetaldehid 1 / 50 per cada 20 ml de Reactiu colorimètric de Diphenylamine.

35 - Afegir a cada tub 2 ml del reactiu obtingut en el pas 34.

36 - Tapar els tubs amb parafilm i posar-los a incubar en una estufa a 30 °C de 18 a 20 hores.

(Alternativament es pot fer 16 hores a 37° C)

37 - Llegir les mostres a l'espectrofotòmetre :

Per determinar el DNA llegir a 600 nm i 650 nm. Per determinar el RNA llegir a 260 nm i 1275 nm (Fer el Blanc per RNA amb PCA 1 N).

CÀLCULS

Determinació de RNA

Per calcular els µg de RNA-P cal corregir les lectures obtingudes a 260 nm i 275 nm tot aplicant la següent fórmula :

$$(A_{260} - B_{260}) \times 11.57 - (A_{275} - B_{275}) \times 10.60 = \mu\text{g RNA-P}$$

Aquest valor s'ha de referir al volum total de la mostra inicial.

El contingut en P ve a ésser un 10 % del RNA total de manera que :

$$\mu\text{g RNA - P} \times 10 = \mu\text{g RNA total}$$

Determinació colorimètrica de DNA

Llegir tots els tubs a 600 nm i 650 nm. Aplicar després la següent fórmula :

$$(A_{600} - B_{600}) - (A_{650} - B_{650}) = \Delta A$$

$$\text{Sabem que : } [\text{DNA}]_{\text{prbl.}} = ([\text{DNA}]_{\text{std.}} / \Delta A_{\text{DNA std.}}) \times \Delta A_{\text{DNA prbl.}} \quad (1)$$

Aquest valor (1) pot calcular-se fent la mitjana dels increments de la concentració respecte la D.O. de la solució Patró.

Altrament pot representar-se la Recta Patró i extrapolar després els valors d' A obtinguts de la mostra problema.

$$\text{Quantitat de DNA per cèl.lula} = ([[\text{DNA}] \mu\text{g} / \text{ml}] / (\text{n}^{\circ} \text{ de cèl.} / \text{ml})) \times \text{Volum inicial.}$$

Relacions teòriques

Algunes relacions teòriques d'interès són :

$A_{260} / A_{280} = 1.8$ per DNA pur. $A_{260} / A_{280} = 2$ per DNA
contaminat amb RNA

D. O. 260 nm / 20 = mg DNA / ml

Si $A_{320 \text{ nm}} = 0$ vol dir que no hi ha contaminació de proteïnes.

CONTINGUT DE DNA PER GENOMA HAPLONT EN ALGUNS ORGANISMES

Home	3,2 pg.
Pollastre	1,3 pg.
Rata	3,1 pg.
Ratolí	2,5 pg.
Granota	6,5 pg.
Planària	0,5 a 3,5 pg. (segons l'espècie)
Drosophila	0,18 pg.
Planta del tabac	1,2 pg.
Lleuat	0,018 pg.
E. coli	0,0047 pg.

L'estratègia d'aquesta tècnica consisteix en precipitar els àcids nucleics d'una mostra biològica per hidrolitzar-los després i quantificar així, els nucleòtids que en resultin mitjançant tècniques espectrofotomètriques.

La precipitació dels àcids nucleics la fem amb àcid perclòric (PCA) - passos del 1 al 12 - . En aquests passos eliminem els mucopolisacàrids i els lípids i ens quedem amb la fracció dels àcids nucleics i de les proteïnes.

El tercer pas es fa només per portar la mostra a una concentració de 1 N de PCA.

La hidròlisi del RNA es realitza des del pas 13 fins al 20. Aquesta hidròlisi és bàsica (KOH 0,3 N) i afecta exclusivament al RNA i en poca o en cap mesura al DNA, donant com a resultat un sobrenedant (pas 19) on hi tenim nucleòtids de RNA que quantificaran el contingut de fòsfor mitjançant l'espectrofotòmetre. La quantitat de fòsfor mesurada d'aquesta manera correspon al 10% del RNA total, ja que les fortes condicions de la hidròlisi són capaces d'alliberar fòsfor en forma inorgànica que finalment no es valora.

En les passes 21 - 30 es realitza la hidròlisi del DNA (PCA en calent) restant els nucleòtids en el sobrenedant i restes proteics en el precipitat. Aquesta operació és aconsellable fer-la dos cops (passes 27 i 30) on es pot observar una segona reextracció dels nucleòtids productes de la hidròlisi del DNA.

A partir del pas 33 es fa la reacció colorimètrica de la Difenilamina que permetrà la quantificació del contingut de DNA de la mostra a través dels seus nucleòtids.

Finalment és interessant esmentar que es pot utilitzar TCA (Àcid tricloroacètic) en comptes de PCA però aquest presenta l'inconvenient de donar interferències en la mesura de la radiactivitat dels àcids nucleics marcats (^3H , ^{14}C . etc).

PRECAUCIONS

- Tot allò que toqui la Diphenylamine s'ha de rentar primer amb etanol ja que si ho rentem directament amb aigua queda un precipitat blanc que costa molt de treure.
- Alerta amb el PCA, perquè és un àcid altament corrosiu.
- Quan el reactiu de Diphenylamine pren una coloració blava vol dir que està passat.

DISCUSSIO DE LA TECNICA

Aquesta tècnica permet quantificar d'una manera ràpida el contingut d'àcids nucleics que té una mostra biològica. L'inconvenient més gran que presenta, és que no permet aïllar-los ni purificar-los en estat intacte, ja que aquests són hidrolitzats d'una manera dràstica pel PCA o la KOH i romanen en forma de nucleòtids.

Així doncs, els productes obtinguts després de l'extracció no són adequats per altres estudis en què siguin necessaris els àcids nucleics intactes, ja que finalment només en conservem els seus nucleòtids. Per contra podrem aplicar totes aquelles tècniques basades en l'estudi i quantificació d'aquests.

La precipitació dels àcids nucleics es realitza amb àcid perclòric en fred (PCA) (passes 1 al 12) on s'eliminen nucleòtids lliures, mucopolisacàrids, i altres molècules en el sobrenedant (Fracció soluble). Els lípids i les molècules liposolubles s'extrauen amb dissolvents orgànics de manera que el producte final consisteix en una solució on tenim els àcids nucleics i proteïnes que s'hidrolitzaran posteriorment en calent.

Es interessant destacar que la precipitació inicial s'ha de realitzar amb PCA en fred a fi de no hidrolitzar els àcids nucleics abans d'hora. Això faria que perdessin nucleòtids en la fracció soluble (que es descarta) i per tant obtindríem una sotavaloració del contingut de RNA i DNA de la mostra problema.

BIBLIOGRAFIA

BURTON K. (1955) Biochem. J. 61; 473.

BURTON K. (1956) " A study of the conditions and mechanism of the Diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of Deoxyribonucleic Acid " Biochem. J. 62 : 315-323.

DAVIDSON, JN (1972) " The Biochemistry of the Nucleic Acids " (7 th Ed.)

FLECK, A. and MURRO, H.N. (1962) " Molecular Cloning. A Laboratory Manual " Cold Spring Harbor Laboratory. U.S.A.

MANIATIS, T. et al. (1982) " Molecular Cloning. A Laboratory Manual " Cold Spring Harbor Laboratory. U.S.A.

VALORACIÓ PROTEICA D'UNA MOSTRA BIOLÒGICA

R. Romero i J. Prats.
Departament de Genètica.
Facultat de Biologia.
Universitat de Barcelona.

INTRODUCCIÓ

El mètode Bio-Rad entre d'altres (Biuret, Lowry, etc), és un dels més utilitzats en la quantificació de proteïnes, a causa de la facilitat i rapidesa (15-20 minuts) de manipulació, ja que només és necessari un sol reactiu, així com per la seva precisió en l'anàlisi proteica.

L'assaig està basat en la mesura de l'absorció a 595 nm del complex format per la unió de la proteïna i el Coomassie Brilliant Blue G-250. Aquest colorant incrementa el seu màxim d'absorció de 450 nm fins 595 nm, quan s'uneix a les proteïnes. Així doncs el mètode està fonamentat en la mesura de la densitat òptica a 595 nm, d'un banc de solucions de proteïna (usualment B.S.A.) de concentració creixent i coneguda, a la qual es referirà la densitat òptica de la mostra problema.

El mètode es descriu amb dues variants que estan en funció de la previsible concentració de la mostra: l'assaig estàndard (200-1400µg prot / ml) i el microassaig (20-140 µg Prot / ml), on l'única diferència està en utilitzar el reactiu concentrat (microassaig) o bé diluït (estàndard), a part que en el microassaig és necessari un volum major de mostra.

OBJECTIUS

- Valorar quantitativament el contingut proteic d'una mostra biològica.

REACTIUS

- Reactiu Bio- Rad (Bio- Rad Chemical division)
- B.S.A. (Bovine Serum Albumin)

APARELLS

- Espectrofotòmetre.
- Balança.
- Agitador.

MATERIAL

- Cubetes espectrofotometria (vidre).
- Tubs d'assaig.
- Micropipetes.
- Pipetes o dispensador.

SOLUCIONS

- Solució del reactiu Bio-Rad (1 : 4) en aigua destil·lada i filtrada amb paper Wattman nº 1 o similar (no es pot emmagatzemar un temps superior a 15 dies. Es però recomenable que es prepari en el mateix moment de la seva utilització).

- Solució stok de B.S.A. La concentració d'aquesta solució ha d'estar en relació amb la concentració proteica de les mostres a analitzar. Normalment es prepara una solució de B.S.A. en tampó de treball (pot ser qualsevol dels normalment utilitzats) d'una concentració al voltant d'un mg / ml. Aquesta solució es pot conservar durant un mes congelada a - 20 °C . A partir d'aquesta solució es faran les dilucions estàndar pertinents per a confeccionar la corba de referència.

- Tampó de treball. Es pot utilitzar qualsevol tipus de tampó dels usuals. (Són rares les excepcions).

- Solucions estàndard de B.S.A. Es realitzen a partir de la solució stok mitjançant al·lquotes creixents d'aquesta, diluïdes convenientment amb tampó.

PROTOCOL

- Col·locar a cada tub d'assaig 0.1 ml (0.8 ml) de solució estàndar de B.S.A. de diferents concentracions creixents i de les mostres problema.

- Preparar un tub amb 0.1 ml (0.8 ml) de tampó (el farem servir com a blanc de les mesures).

- Afegir-hi a tots els tubs 5 ml de solució diluïda del reactiu. (Per la microanàlisi, 0.2 ml del reactiu concentrat i filtrat).

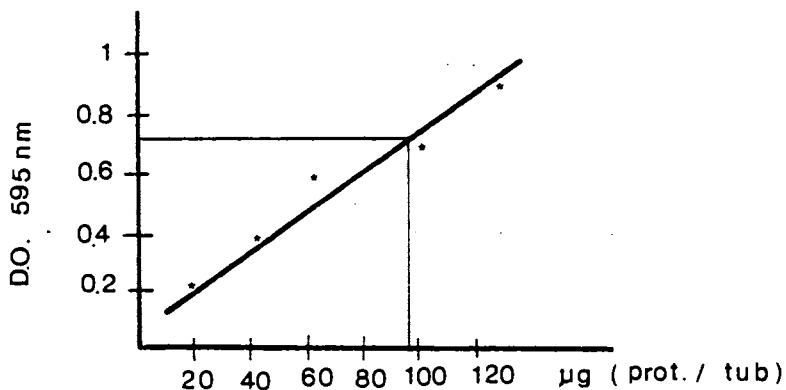
- Barrejar correctament (agitador).

- Després d'un període de 5 minuts a 1 hora, mesurar la densitat òptica a 595 nm en front del blanc.

NOTA - Els valors entre parèntesi corresponen a la microanàlisi ($\leq 25 \mu\text{g prot / ml}$).

CÀLCULS

Confeccionar una gràfica referència amb la densitat òptica i concentració de les solucions estàndards de proteïnes (fig. a)



- La concentració de la mostra problema s'obté a partir de la recta estàndard segons s'indica a la fig. a. També es pot aconseguir la recta de regressió entre la D.O. i la concentració en les solucions estàndard de proteïna (B.S.A.); a partir d'aquesta equació s'obté la concentració de la mostra problema.

- El valor obtingut correspon als µg de proteïna que contenen 0.1 ml de mostra. 10 vegades aquest valor, ens donarà la concentració en µg prot/ml.

DISCUSSIO DE LA TECNICA

Un punt important a tenir en compte, és la necessitat que les proteïnes de les mostres a valorar estiguin en completa solució; la formació de precipitats detectables per la turbidesa o el sediment, duu a una sotavaloració del contingut proteic.

D' altra banda és imprescindible que l'interval de mesures de D.O. de les dilucions estàndard estiguin en relació a la de la mostra problema; és a dir la D.O. ha de caure dins de l'interval de les lectures de les solucions estàndard de B.S.A., ja que si no és així, poden donar-se desviacions força importants en la quantificació.

La barreja de reactiu lligat a les proteïnes s'adhereix a la cubeta de mesura deixant-la de color blau, per això és força important, després de cada mesura, rentar-la amb alcohol i amb aigua destil·lada les vegades que calgui, fins que resti perfectament transparent, a fi que unes i altres mesures no s'interfereixin. Un altre sistema no tan segur està en començar a llegir tubs que presentin una menor coloració, seguint de manera creixent fins arribar finalment a mesurar el tub de major coloració.

BIBLIOGRAFIA

- BRADFORD. M. (1976).- Anal. Biochem. 72, 248.
- REISNER. A. H., NEMES P. § BUCHOLTZ C. (1975) - Anal Biochem 64,509.
- SEDMAK J.J. § GROSSBERG S.E. (1977) - Anal Biochem. 79, 544.

NOTA - Per informació més específica veure el manual d'instruccions que proporciona la casa Bio - Rad.

- La marca Bio- Rad a Barcelona està representada per CULTEK. S.L. (Entença 332-334) on s'avenen a qualsevol consulta i comanda.

ELECTROFORESI D'ÀCIDS NUCLEICS EN GELS D'AGAROSA

R. Romero i J. Prats
Departament de Genètica.
Facultat de Biologia.
Universitat de Barcelona.

INTRODUCCIÓ

Aquesta tècnica permet identificar, separar i àdhuc purificar fragments i mol·lècules sensers de DNA d'una manera ràpida i senzilla a la vegada que pot fer-se extensiva al RNA.

La separació dels diferents dels àcids nucleics s'esdevé al fer-los passar per un camp elèctric utilitzant com a suport l'agarosa. Aquestes mol·lècules i fragments migren en funció de la seva grandària i del seu estat conformacional a la vegada que, el porus del gel (concentració d'agarosa) i el voltatge aplicat (intensitat del camp elèctric) en són també factors determinants.

Tenyint el gel amb bromur d'etidi i observant-lo a la llum ultraviolada, hom pot localitzar els diversos fragments dels àcids nucleics gràcies a la fluorescència emesa per les diferents bandes.

El bromur d'etidi és un compost que conté un grup capaç d'intercalar-se entre les bases del DNA i RNA incrementant-ne així l'intensitat d'emissió de fluorescència (a 590 nm) quan s'excita amb llum ultraviolada (300 a 360 nm). D'aquesta manera hom pot fins i tot diferenciar entre el DNA de doble cadena (alta intensitat de fluorescència) i el RNA que en ésser de cadena senzilla presenta una fluorescència de menor intensitat.

Amb aquest mètode es poden detectar petites quantitats d'àcids nucleics, concretament quantitats de l'ordre de 10 µg, alhora que ens permet veure l'estat en que es troben els àcids nucleics en qualsevol moment d'una extracció. Així doncs i fem córrer un gel RNA sovint veurem unes bandes molt difoses que hauran migrat molt ja que els fragments són molt petits i això és degut a la forta degradació que s'ha produït durant l'extracció.

Finalment val a dir que aquesta no és la tècnica més escaient per a quantificar la grandària de les mol·lècules dels àcids nucleics sinó, tan sols ens permet identificar-les alhora que tenir-ne una idea aproximada de l'estat en que es troben.

OBJECTIUS

Identificar i caracteitzar mol·lècules d'àcids nucleics de diferents grandàries.

REACTIUS

- Agarosa (Tipus 2).
- Tris- hidroxiaminometà.
- Acid b:oric.
- E.D.T.A.
- Dietilpirocarbonat (DPC).
- Blau de Bromofenol.
- Glicerol.

MATERIAL

- Font elèctrica.
- Cubeta d'electroforesi i accessoris.
- Material divers de vidre.
- Guants.

SOLUCIONS

- TAMPO TBE (Tris; Borat EDTA).

Hi ha diferents tampons que es poden utilitzar per a la confecció del gel (TAE, TPE, TBE etc.). Nosaltre hem escollit el TBE.

Tris-hidroximetil aminometà	10,8g.
Acid bòric	5,5 g.
EDTA 0,5 M (pH 8)	20 ml

Aigua destil.lada autoclavada fins 1 litre
(Si s'ha d'utilitzar per córrer RNA és necessari tractar l'aigua amb DPC)

- SOLUCIÓ D'AGAROSA PER AL GEL

Agarosa (tipus 2)	2,3 g.
Tampó TBE	fins a 100 ml.

- SOLUCIÓ DE BROMUR D'ETIDI.

Bromur d'etidi	10 mg.
Aigua destil.lada	1 ml.

S' emmagatzema a 4 °C en ampolles aïllades de la llum.

- TAMPÓ ELECTROLIT.

TBE (El mateix que l'utilitzat en la formació del gel).

- SOLUCIÓ DE BLAU DE BROMOFENOL.

Glicerol al 30 % en aigua on s'afegeix blau de bromofenol al 0,25 % de concentració final.

Preparació del gel d'agarosa.

- La quantitat d'agarosa per a preparar el gel està en funció de la grandària de les mol.lècules que volem analitza. Nosaltres utilitzem agarosa al 0,3 % en tampó TBE que és l'utilitzat per a un interval prou gran de grandàries mol.leculars.

- Un cop s'ha fet la barreja s'escalfa a 50°C fins que resta una solució transparent i fluida.

- S'afegeix la solució de Bromur d'etidi a una concentració final de 0,5 µg / ml.

- S'aboca la solució d'agarosa en el motllo i es deixa que gelifiqui per refredament. (Es important aconseguir un gruix de 0,5 cm aproximadament).

Preparació de la mostra.

Barrejar 2-5 ml de Blau de Bromofenol en cada una de les mostres.

Aquesta barreja és necessària per a augmentar la densitat de les mostres (glicerol) i per utilitzar el Blau de Bromofenol com a marcador per a determinar el final de l'electroforesi.

La concentració de la mostra ha d'estar en relació al volum dels pouets preparats per a elles. Usualment es posen de 5 a 10 µg d'àcid nucleic per forat.

PROTOCOL

- Col·locar el gel amb el suport a la cubeta d'electroforesi.
- Omplir de tampó TBE les cubetes de l'electròlit.
- Posar les mostres dintre dels pouets corresponents amb una micropipeta.
- Connectar les dues cubetes de manera que constantment estigui circulant l'electròlit d'una cubeta a l'altra.
- Connectar la font elèctrica de manera que suministri un voltatge no superior a 5 Vols per centímetre.

Quan el Blau de bromofenol arriba al final del gel es desconnecta la font elèctrica i ja es pot passar a il·luminar amb llum U.V.

DISCUSSION

Es molt important resaltar l'extrema perillositat del Bromur d'Etidi ja que és un agent altament mutagènic fet que fa necessari l'ús de guants quan es manipula aquest producte o les seves dissolucions.

La concentració en agarosa del gel està en funció de la grandària de la mol·lècula que volem identificar. Si les mol·lècules són petites lògicament haurem d'augmentar la concentració en agarosa aconseguint així una migració més lenta dintre del gel i per tant una major resolució; per contra les mol·lècules de grandària considerable pràcticament no correran per efecte del camp elèctric, a causa de la forta concentració en agarosa.

Per identificar diverses mol·lècules de RNA és fonamental que tot el material estigui tractat especialment a fi d'eliminar el possible efecte de les ribonucleases que el degradarien i provocarien una forta difusió de les bandes. Es per aquesta raó que aquest mètode, si bé és molt ràpid en la identificació de la grandària mol·lecular dels àcids nucleics no és normalment utilitzat en l'anàlisi d'alta precisió.

BIBLIOGRAFIA

- FISHER MP. and DIGMAN C W. (1971) - Biodrem 10 : 895.
- HELLIN R B., GOODMAN H.M. BOYER H.W. (1974).- J. Virol 14 : 1235.
- MANIATIS T. FRITSCH E. F. J. SAMBROOK (1982)
"Molecular Cloning : a laboratori normal." Cold. Spring Harbor
Laboratory Publications. USA .
- SHARP P.A.; SUGDEM B. SAMBROOK J. (1973) Biodrem 12 : 3055.

SEPARACIÓ I PURIFICACIÓ DE
PROTEINES.

SEPARACIO I PURIFICACIO DE PROTEINES

El primer problema amb que ens enfrontem a l'hora de caracteritzar una determinada proteïna és el de separar-la de tots aquells compostos que l'envolten, incloent altres proteïnes.

En aquestes pràctiques hom parteix d'una mescla simplificada formada per dues proteïnes i sals, ja que la purificació real a partir de material biològic acostuma a ser un procés costós i requereix un temps excessiu per a les finalitats d'aquest curset. De totes maneres, s'ha seguit un procés que pot considerar-se lògic i aplicable a molts casos.

Es comença amb la cromatografia líquida, una tècnica que en qualsevol o, normalment, en diverses de les seves variables s'utilitza per a la purificació de proteïnes. Segueix una electroforesi en gel d'acrilamida amb SDS de les fraccions obtingudes a la primera pràctica. Així sabrem on està cada proteïna pura, o bé si no les hem aconseguit separar.

Les fraccions que continguin les proteïnes és freqüent que s'agrupin i es quantifiquin en primer lloc per tècniques espectrofotomètriques. Com serà lògic que es trobin diluïdes en un tampó que contingui certes sals que no ens interessa conservar es procedeix a dialitzar-les fins a la seva eliminació. Si ens interessa una quantificació exacta, efectuarem una anàlisi d'aminoàcids i, per últim, si ens interessa guardar la proteïna sola i estable procedirem a la seva liofilització.

Volem destacar que les següents pàgines no pretenen ser un compendi exhaustiu, ni molt menys, de les tècniques descrites. S'ha intentat donar una visió molt global pensant que van dirigides a estudiants que han tingut poques oportunitats de veure com s'apliquen tècniques de les quals només s'han sentit parlar a classes de teoria.

CROMATOGRAFIA LIQUIDA

Angel Villarroya
*Departament de Genètica .
Facultat de Biologia.
Universitat de Barcelona.*

INTRODUCCIO

Generalitats

En realitat aquesta denominació comprèn diverses tècniques experimentals, però de manera general s'entén per cromatografia líquida la separació de diferents compostos d'una mescla mitjançant l'ús de dues fases :

- a) Estacionària, l'estàtica
- b) Mòbil, que flueix per l'anterior.

La primera es troba dins d'una columna de vidre i a través d'ella passa la fase mòbil. Diverses classificacions són possibles, però les més importants es basen en el tipus de fase estacionària. Nosaltres distingirem, segons aquest criteri, els tipus següents :

- Cromatografia d'exclusió. En la qual la fase estacionària no interactua químicament amb els compostos que s'han de separar, sinó que es tracta d'un material porós que va sent travessat més ràpidament com més gran sigui el pes molecular del compost.

- Cromatografia d'intercanvi iònic. La fase estacionària posseeix grups amb càrrega enllaçats químicament. A ella s'hi enllaçaran ions de signe contrari. Si la matriu posseeix grups positius se li uniran ions negatius (cromatografia aniònica) i en el cas contrari es denominarà cromatografia catiònica. Els compostos es separen segons la seva absorció reversible. Primer es deixa que s'uneixin a la matriu i després es separen diferencialment mitjançant canvis de pH, força iònica, etc.

- Cromatografia d'afinitat. La fase estacionària posseeix una afinitat específica per a la substància que ens interessa purificar d'una mescla.

Cromatografia d'exclusió

En aquesta pràctica ens centrarem en la cromatografia d'exclusió. Es d'ús molt general perquè no depèn de la naturalesa dels compostos a separar sinó del seu pes molecular.

La fase estacionària és sempre una substància amb porus de mida coneguda i escollida d'acord amb el rang dels pesos moleculars a separar

La longitud i diàmetre de la columna cromatogràfica depenen de la quantitat de mescla que s'ha de separar, de la seva complexitat i del volum en què es troba redissolta. A més a més, el diàmetre de la columna ens determinarà com de diluïdes han d'estar les mostres. Com menor sigui el diàmetre menor ha de ser el volum de la mostra que s'hagi de separar i més grans seran les atencions necessàries a l'hora de muntar la columna i d'utilitzar-la.

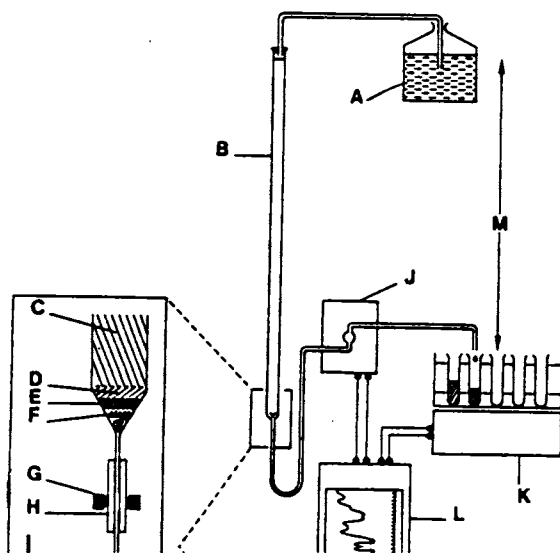
El flux depèn del tipus de material que constitueix la fase estacionària, de les dimensions de la columna i de la precisió en la separació que ens interessa. En general, per a columnes grans i precisió petita s'utilitzaran fluxos elevats i vice-versa.

La fase mòbil s'escull en funció de la solubilitat de la mostra, que no perjudiqui la fase estacionària, de la seva absorbància a la longitud d'ona amb què efectuarem les lectures i d'altres factors diversos com l'origen de la mostra, processos posteriors, etc.

Com que normalment ens interessa visualitzar, enregistrar i recollir els productes separats, a la columna se li ha d'afegir una sèrie d'aparells :

- Dipòsit de fase mòbil.
- Bomba peristàtica que ens permeti regular el flux a la velocitat desitjada.
- Espectrofotòmetre, que va mesurant l'absorbància a una determinada longitud d'ona, del líquid que va sortint de la columna. Quan es treballa amb proteïnes se sol prendre $\lambda = 280 \text{ nm}$.
- Conductímetre. S'utilitza quan ens interessa conèixer els canvis de conductivitat. Per exemple, si esperem que apareguin sals.
- Col·lector de fraccions, que anirà canviant de tub automàticament segons un determinat volum o temps fixat.

Un esquema de tot això seria :



A : Dipòsit. B: Columna. C: Fase estacionària (Sephacry S- 200 Superfí)

D, E, F: Tap inferior de la columna G: "Pinça per aturar el flux. H: Conexió de silicona. I: Tub de polietilén. J: Espectrofotòmetre. K : Colector de fraccions. L: Enregistrador. M: Força hidrostàtica que determinarà el flux. Una bomba peristàtica és més còmoda.

Fig. de G. Allen. Sequencin of protein and peptides (1981). Elsevier / Worth- Holland.

La cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC) mereix una menció especial , ja que últimament ha adquirit una importància extraordinària. Es basa en els mateixos principis que la cromatografia líquida tradicional però amb partícules de gel de mida més reduïda que comporten una elevació de les pressions de la columna i una reducció del caudal del sistema. Amb tot això s'aconsegueix una superior resolució i un temps menor. Naturalment exigeix una major sofisticació de tot el sistema.

OBJECTIUS

- Separar els components que formen una mescla.

MATERIAL

- Varetes de vidre.
- Columnes per aprendre el seu muntatge.
- Sephacryl S-200. Superfí.
- Columna de 1m x 1.5 cm de diàmetre, on la fase estacionària és Sephacryl S-200 superfí.
- Bomba peristàtica.
- Espectrofotòmetre.
- Conductímetre.
- Enregistrador.
- Col.lector de fraccions.
- 100 tubs d'assaig.
- Pipetes Pasteur.
- Erlenmeyer d' 1 litre.
- 1 matràs de Kitasat.
- Tampó Tris - HCl 20 mM, pH = 8,6 que serà la fase mòbil.

PROTOCOL

Muntatge d'una columna:

- Desgasificar la fase mòbil (sobretot si la columna és de mida petita) .
- Injectar fase mòbil amb una xeringa per la part inferior de la columna de manera que s'eliminin totes les possibles bombolles d'aire que poguessin quedar retingudes.
- Tancar la columna deixant una mica de fase mòbil en el seu interior.
- Un cop inflada i feta la fase estacionària (segons s'indiqui en els prospectes comercials) s'aboca amb l'ajut d'una vareta de vidre a l'interior de la columna de manera que caigui suaument per les parets sense que es formin bombolles d'aire.
- Es deixa que es dipositi la fase estacionària.
- S'elimina l'excés de fase mòbil.
- Es remou la part superior de la fase estacionària i s'aboca més fase estacionària com abans.
- Es repeteixen les operacions anteriors fins que la fase estacionària arribi a l'alçada desitjada.
- Un cop aconseguit això es fa que la fase mòbil passi a través de la columna a una velocitat lleugerament superior a la que haurà d'anar quan es passi la mostra. S'observarà que una altra vegada el nivell de la fase estacionària baixa.
- Es repeteix l'operació anterior fins que la fase estacionària arribi a l'alçada desitjada.

(NOTA: En qualsevol cas per al muntatge i utilització d'una determinada fase estacionària s'han de seguir les instruccions dictades per les firmes que les comercialitzen.)

Processament de la mostra problema.

- Muntatge de tot el sistema cromatogràfic necessari. La columna escollida és: 1 m x 1,5 cm de diàmetre de Sephacry S-200 Superfi.
- S'elimina la fase mòbil que queda per sobre de la fase estacionària.
- S'aplica la mostra amb una pipeta Pasteur deixant que llisqui per les parets per a no formar turbulències a la fase estacionària.
- Es connecta la bomba peristàltica amb una velocitat aproximada de 8 ml / hora que prèviament haurà estat calibrada.

- Just quan la mostra hagi penetrat en la fase estacionària (però sense permetre que aquesta quedi sense líquid) s'afegeix suaument fase mòbil.
- Es tapa la columna i es connecta al dipòsit de fase mòbil.
- Cal assegurar-se que les gotes que cauen del col.lector ho facin a l'interior dels tubs d'assaig.
- Connectar l'enregistrador i el col.lector que es fixa a 60 gotes / tub.
- Comprovar el sistema i deixar-lo funcionant fins que hagin passat els 100 tubs.

DISCUSSIO DE LA TECNICA

Es tracta d'una tècnica d'ús molt general a causa de la seva gran versatilitat i que sol donar una bona recuperació de les mostres separades. Però es pot generalitzar que la cromatografia líquida tradicional s'aplica amb finalitats preparatives la majoria de les ocasions. Essent el HPLC més adequat per finalitats analítiques.

Es una tècnica tan universal que hom pot afirmar que és aplicable a qualsevol mostra mentre la puguem solubilitzar en una determinada fase mòbil.

BIBLIOGRAFIA

- Es recomana llegir els prospectes comercials que solen ser àmpliament informatius.
- L. Fischer. Gel Filtration Chromatography (1980).
Elsevier Science Publishers B. V
- L. R. Snyder and S.S. Kirkland. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd. ed., John Wiley and Sons Inc, New York, 1979, .

ELECTROFORESI EN GELS D'ACRILAMIDA AMB SDS

Angel Villarroya
Departament de Genètica.
Facultat de Biologia.
Universitat de Barcelona.

INTRODUCCIO

Es una de les tècniques més utilitzades per tal d'analitzar barreges de proteïnes. Està basada en la unió de les proteïnes amb un detergent : el dodecilsulfat de sodi (SDS) formant un complex carregat negativament. La quantitat de SDS que s'uneix a la proteïna és directament proporcional a la seva grandària . A més, la unió del detergent provoca generalment la solubilització i desnaturalització de les proteïnes amb la qual cosa s'eliminen possibles interferències degudes a les estructures secundàries, terciàries i quaternàries, que serien indesitjables ja que ens interessa una separació basada únicament en el pes molecular.

Un cop tinguem les proteïnes en aquestes condicions, es separen per electroforesi en gels d'acrilamida. La mostra s'aplica en un gel concentrador (normalment del 3% d'acrilamida) amb la misió de concentrar les mostres que s'introdueixen en volums excessius per una bona resolució. Al gel concentrador, li segueix el separador en què la quantitat d'acrilamida és variable segons la mida de les mostres que s'han de separar; com més gran sigui el percentatge d'aerilamida millor es separaran els pèptids més petits i viceversa.

L'aplicació d'un camp elèctric fa que els complexos proteïna-SDS es desplacin vers el pol positiu atravesant el gel concentrador i el separador. L'espai recorregut és inversament proporcional al pes molecular existint una correlació perfecta entre la distància de migració i el logaritme del pes molecular, així doncs, podem establir una recta patró a partir de proteïnes de pesos moleculars coneguts, i estimar el que correspon a qualsevol proteïna que s'hagi desplaçat en el mateix gel.

OBJECTIUS

- Conèixer la composició proteica d'una mostra.
- Determinar pesos moleculars.

APARELLS I MATERIAL

Aparells

- Protean 16 CM (aparell comercial de BIO-RAD dissenyat per al montatge d'aquest tipus de gels).
- Sistema de refrigeració.
- Font d'alimentació amb amperatge constant.
- Bomba de buit.

Materials

- 2 Kitasats.
- 1 pipeta de 1 ml
- 1 pipeta de 2 ml.
- 1 pipeta de 5 ml.
- 2 pipetes de 10 ml.
- Pipetes automàtiques de 200 i 20 μ l.
- 2 gots de precipitats de 50 ml.
- Xeringues de 25 ml.
- Paper de filtre.

Solucions

- Tampó separador: Tris-HCl, 1,87 M, pH=8,8.
- Tampó concentrador: Tris- HCl, 0,6 M, pH=6,8.
- Tampó de mostres: 0,0625 M, Tris- HCl, 3% SDS, 20% glicerol, 5% mercaptoetanol.
- Tampó de les cubetes: 0,025 M Tris- glicina, 0,1 %, SDS, 0,1% mercaptoetanol.
- Fixador format per 1 Metanol : Ac. acètic : Aigua. (5 : 1 : 5)
- Solució de tinció: 0,1 % Commassie blue en fixador.
- Decolorant: 7% àcid acètic i 5% de metanol en aigua.

PROTOCOL EXPERIMENTAL.

1- Montar el Protean 16 CM

TREBALLAR SEMPRE AMB GUANTS I NO PIPETEJAR AMB LA BOCA.

2- Preparació del gel separador (per 15 ml)

a- En un Kistat s'hi posa:

-6 ml. d'una solució Acrilamida : Bisacrilamida (30 : 0,8)

-3 ml de tampó separador.

-5,1 ml d'aigua destil.lada.

b- Es desgasifica aquesta solució.

c- S'aboca en un vas de precipitats sense que es formin bombolles.

d- S'afegeixen 150 µl de SDS al 10 %.

e- Afegir 5 µl de TEMED.

f- Afegir 80 µl de Persulfat amònic (AMPS) al 10 %, és el polimeritzador.

g- Succonar la solució amb una xeringa, i s'aplica lentament les dues plaques de vidre (Protcan 16 CM), procurant que no es formin bombolles.

h- Acte seguit i amb la mateixa xeringa s'aboquen 2 ó 3 ml d'aigua destil.lada molt suaument, de manera que quedi per damunt sense barrejar-s'hi. Així s'aconsegueix que la superfície d'aquest sigui llisa i horitzontal.

i- Esperar que gelifiqui. S'aprecia clarament per la diferència de fases entre el gel i l'aigua.

3- Un cop gelificat es decanta l'aigua de la superfície del gel que s'acaba d'eliminar per capilaritat amb un paper de filtre.

4- Col.locar les dents.

5- Preparació del gel concentrador (per 10 ml)

a- En un kitasat s'hi posa :

- 1 ml d'una solució acrilamida : bisacrilamida (30 : 0,8).

- 1,25 ml de tampó concentrador.

- 7,54 ml d'aigua destil.lada.

b- Desgasificar.

c- S'aboca a un vas de precipitats.

d- Afegir 100 µl de SDS 10%

e- Afegir 5 µl de TEMED.

f- Afegir 100 µl de AMPS 10 %.

g- S'aplica amb una xeringa com en el cas anterior.

h- Esperar que gelifiqui.

6- Retirar les dents molt lentament i aplicar tampó de cubetes amb una pipeta Pasteur per sobre perquè no s'assequin els pouets.

7- Preparació de les mostres :

- a- Es recullen les al·lquotes corresponents i es posen cadascuna en un eppendorf, es marquen i es dessequen.
- b- Un cop dessecades les mostres es redissolen en 10 µl de tampó de mostres, i una quantitat infima de blau de bromofenol per visualitzar l'avanç de l'electroforèsi.
- c- Es posen a 80° C durant 15 minuts.

8- Cada mostra es col·loca en el pouet correspondent amb una xeringa Hamiltó (Rentar-la bé abans de cada aplicació).

9- Montar la cubeta superior.

10- Col·locar tot el conjunt en la cubeta gran que ja tindrà 1'5 li de tampó de cubetes.

11- Afegir el tampó de cubetes a la part superior.

12- Connectar el sistema de refrigeració i la font d'alimentació.

13- Fixar l'amperatge a uns 8 miliamperis per gel i deixar-ho córrer finsque el blau de bromofenol arriba al límit inferior. A aquest amperatge ha de córrer durant tota la nit.

14- Aturar tot el sistema i extreure amb cura el gel separador.

15- Col·locar-lo en un recipient amb fixador, 15 minuts a 37° C.

16- Canviar el fixador per la sol·lució de tinció, 15 minuts a 37° C en agitació.

17- Posar el gel a la sol·lució decolorant (37° C) que es va canviant fins eliminar la tinció de fons, quedant només les bandes de proteïnes.

Càlculs

A partir de les proteïnes preses com a patrons i amb pes molecular conegut , elaborar una recta patró i calcular el pes molecular de les mostres problema.

<u>Proteïna</u>	<u>Pes Molecular</u>
Seroalbúmina bovina	68.750
Ovoalbúmina	45.000
Anhidrasa carbònica	31.000
Mioglobina	17.800
Cítocrom C	12.300

DISCUSSION DE LA TECNICA

Es una tècnica amb finalitats analítiques, és a dir, s'utilitza per a conèixer la puresa o composició d'una mostra o per a determinar pesos moleculars, però no s'acostuma a utilitzar amb finalitats preparatives. Encara que el desenvolupament de tècniques com el Western blotting (transferència de les proteïnes d'un gel a un filtre de nitrocel·lulosa o membranes d'un altre tipus) o l'electroelució, ambdues similars a les realitzades amb el DNA, s'estan utilitzant per a aïllar pèptids i proteïnes encara que sempre en quantitats limitades.

Malgrat els avantatges de ser una tècnica ràpida, fàcil de realitzar i molt sensible, presenta els inconvenients de no ser adequada per una quantificació precisa de la quantitat de cada proteïna, tampoc és adequada per pèptids petits, perquè són difícils de ser fixats i tenyits.

Existeixen nombroses modificacions del mètode descrit originalment per Laemmli (1970) aplicables a diferents situacions.

En principi és aplicable a qualsevol tipus de proteïna, però si el contingut de sals de la sol·lució és elevat es poden produir interferències a l'electroforesi.

BIBLIOGRAFIA

- Laemmli, U. K. (1970) Nature, 227, 680-685.
- Methods in Molecular Biology Vol 1 : Proteins Edited by S. M. Walner. Human Press. Clifton, New Jersey. (1984).

ALTRES TÈCNiques UTILITZADES EN LA PURIFICACIÓ DE PROTEÍNES

Angel Villarroya
Departament de Genètica.
Facultat de Biologia.
Universitat de Barcelona.

DIALISI

INTRODUCCIÓ

La diàlisi és un procés de separació basat en el transport diferencial de soluts de diferents mides a través d'una barrera porosa (la membrana de diàlisi) que separa dos líquids, quan la força conductora és tan sols un gradient de concentracions que, lògicament, tendiran a igualar-se.

Se sol utilitzar per a separar soluts de mida molecular gran, que no poden difondre a través de la membrana, d'altres que són prou petits per a fer-ho. Per això també es pot utilitzar per a canviar el tampó on es troba la mostra de manera suau, quan no és aconsellable la seva liofilització i posterior redissolució.

El tampó de diàlisi, el que envolta la membrana, ha de tenir un volum molt més gran que la mostra. S'han d'evitar canvis bruscs de característiques entre una i altra banda de la membrana. I, si el tampó final on ha de quedar la mostra ha de ser molt diferent de l'inicial, és preferible fer el procés gradualment en una sèrie de canvis de tampó.

El nombre de canvis de tampó i el temps de cadascun dependrà de les característiques de la mostra i com d'exhaustiva desitgem que sigui la diàlisi.

Existeixen membranes de diàlisi de diferents dimensions i amb diferents mides del porus. L'elecció en cada cas dependrà de les característiques de la mostra.

OBJECTIUS

- Eliminació de soluts de mida petita que acompanyin les substàncies que ens interessen.

- Canvi de tampó on es troba una mostra.

MATERIALS

- Membrana de diàlisi.
- Vas de precipitats de 100 ml.
- Vas de precipitats de 2 litres.
- Agitador magnètic.
- Bec de gas Buntzen.
- Pipetes Pasteur.
- Solució 1 mM EDTA
- Aigua destil·lada que serà el tampó de diàlisi utilitzat.

PROTOCOL

- Es bull el tub de diàlisi durant 10 minuts en la solució 1 mM EDTA.
- Es renta amb aigua destil·lada.
- Es fan dos nusos a la part inferior de la membrana.
- S'introdueix la mostra amb una pipeta Pasteur.
- Es lliga la part superior de la membrana.
- Es col·loca en el vas de precipitats que contindrà els dos litres d'aigua destil·lada.
- Es col·loca a 4° C sobre l'agitador magnètic de manera que es produeixi una agitació molt suau.
- S'efectuen els canvis corresponents.

DISCUSSIO

La diàlisi emprada en els casos ja citats, té els avantatges de ser una tècnica fàcil i amb una recuperació de la mostra excel·lent. Com a desavantatge front a la cromatografia líquida, que pot substituir-la en alguns casos, hem de dir que sol ésser més lenta.

Per a la seva aplicació hem d'estar segurs que els productes que ens interessa conservar siguin prou grans perquè no puguin difondre a través de la membrana, i que els soluts que s'han d'eliminar han de ser prou petits per a que ho puguin fer.

LIOFILITZACIÓ

INTRODUCCIÓ

La liofilització consisteix en la congelació de la mostra i l'aplicació d'un gran buit mantenint sempre la mostra congelada. Així s'aconsegueix que l'aigua i tots els compostos volàtils passin directament d'estat sòlid a gasós i s'eliminen pel buit existent.

Evidentment abans de liofilitzar una mostra hem de pensar en els possibles compostos no volàtils que puguin acompanyar el producte que ens interessa liofilitzar. Per exemple, si tenim un tampó que contingui sals que no ens interessa que persisteixin, s'ha de sotmetre la mostra a una diàlisi (o bé una altra tècnica amb el mateix propòsit) i posteriorment a la seva liofilització.

Un liofilitzador ha de posseir obligatòriament :

- Un sistema de refrigeració que impedeixi la descongelació de les mostres.
- Una bomba de buit que anirà eliminant l'aigua i els compostos volàtils.

Encara que és una tècnica molt simple hi ha alguns punts en què s'ha d'anar amb compte:

- El primer és que el recipient utilitzat sigui l'adequat, tant per la seva forma i capacitat com per ser capaç de resistir les baixes temperatures i el buit interior a què ha de ser sotmès. Els matrassos de liofilització ja estan dissenyats pensant en tot el que acabem de dir.

- Hem d'estar segurs que la mostra que ha de ser liofilitzada estigui ben congelada abans d'efectuar el buit, perquè si no fos així bulliria i es vessaria. El millor sistema és submergir la part del matràs fins on arribi la mostra (mai tot ell) en nitrogen líquid que s'ha d'utilitzar amb màxima cura (la seva temperatura és de $-195,8^{\circ}\text{C}$).

- Un cop col·locada la mostra i fet el buit és convenient vigilar-la durant els primers minuts, ja que és quan hi ha més possibilitats de descongelacions parcials.

- Es considera que la mostra està liofilitzada completament quan ja no es condensa aigua a les parets del matràs.

OBJECTIUS

- Eliminació de l'aigua i altres compostos volàtils que acompanyen la proteïna (o les proteïnes) que ens interessa de manera que aquestes es vegin afectades el mínim possible.

- Concentració de proteïnes en dissolució.

MATERIAL

- Liofilitzador.
- Matrassos de liofilització.
- Recipient on s'efectuarà la congelació del matràs.
- Nitrogen líquid.

PROTOCOL

- Connectar el liofilitzador. El buit no es connectarà fins que la temperatura no hagibaixat a uns -50°C .
- Col·locar la mostra en un matràs de congelació.
- Congelar-la uniformement mitjançant una immersió en nitrògen líquid.
- Aplicar-la al liofilitzador.
- Esperar que s'hagi eliminat tota l'aigua que contenia.
- Treure la mostra i desconnectar el liofilitzador, tenint en compte que s'ha de fer entrar aire abans de desconnectar el buit.

DISCUSSIO

La liofilització és una tècnica molt emprada en treballar amb proteïnes ja que normalment estan dissoltes en algun tampó, però per al seu emmagatzemament i conservació ens sol interessar tenir tans sols la proteïna, però de manera que es vegi afectada el mínim possible. Com a exemple il·lustratiu tenim la liofilització de certs aliments.

Presenta els avantatges front una dessecació normal que les proteïnes liofilitzades solen conservar bona part de la seva activitat si hom les resuspèn, donat que , normalment, la seva estructura no s'afecta gaire. Però és freqüent que la seva solubilització sigui més difícil que abans de ser liofilitzades.

Es pot aplicar a totes les proteïnes, encara que és convenient conèixer els possibles productes que puguin acompanyar-les.

PREPARACIÓ DE MOSTRES PER A UNA ANÀLISI D'AMINOÀCIDS

INTRODUCCIÓ

La tècnica que emprarem serà la hidròlisi àcida en HCl 6 N, que és la més utilitzada.

Mitjançant l'ús de HCl, a una temperatura que sol ser de 105° C a 110° C, s'aconsegueix el trencament d'enllaços peptídics. Així, passat un cert temps (hom acostuma a prendre temps de 24, 48, 72 i 96 hores) ens quedaran en forma lliure els aminoàcids que composaven la proteïna. Per a la posterior identificació i quantificació d'aquests aminoàcids hi ha moltes possibilitats; però no entrarem en detalls perquè és molt llarg d'enumerar i com que sol estar molt automatitzat no ens preocuparà. En quasi tots els casos s'efectua una derivatització química dels aminoàcids a fi d'incrementar la seva posterior detecció. La seva separació i quantificació s'efectua a través d'un autoanalitzador (aparell dissenyat exclusivament per aquest propòsit) o d'un HPLC.

La tendència és a reduir cada cop més la quantitat de mostra necessària per a obtenir una anàlisi fiable, ja que moltes vegades la quantitat de proteïnes o pèptids de què es disposa és limitada i no convé oblidar que es tracta d'una tècnica destructiva. Així en els autoanalitzadors clàssics es treballa amb al·lotes que havien de contenir de l'ordre de nanomols de cada aminoàcid i, avui en dia, amb l'aplicació del HPLC es pot treballar a nivell de picomols.

S'acostuma a efectuar hidròlisi a diferents temps ja que existeixen aminoàcids com Thr, Ser i Tyr que s'hidrolitzen parcialment amb el HCl 6 N i per a la seva quantificació es sol fer una extrapolació a temps zero. En canvi Val i Ile si estan adjacents formen un enllaç molt estable, per això per a la seva quantificació s'efectuen extrapolacions a temps infinit.

La hidròlisi es realitza en tubs tancats al buit per evitar l'oxidació de la mostra.

Es la tècnica més segura i fiable per a la quantificació de proteïnes aïllades o per a determinar la seva composició.

Naturalment per una anàlisi fiable és fonamental la total neteja del material utilitzat i l'ús de reactius altament purificats.

OBJECTIUS

- Determinació de la quantitat de proteïna ja purificada que disposem si la seva composició i nombre de cada aminoàcid són ja coneguts. En aquest cas pot servir també per a comprovar la seva puresa.
- Determinar la composició qualitativa i quantitativa dels aminoàcids d'una mostra.

MATERIAL

- Forn a 105° C.
- Liofilitzador.
- Soplet.
- Llapis de diamant.
- Pinces.
- Tubs d'assaig Pyrex.
- 6M HCl (suprapur), 0.005 % 2-mercaptoetanol.

PROTOCOL

- Es determina el volum total de la mostra i es liofilitza una alíquota en un tub Pyrex per a ser analitzada.
- A aquesta alíquota hom hi afegeix 300 µl de la solució que conté el HCl.
- Aquest tub s'estira al foc amb el soplet.
- Es congela en nitrògen líquid.
- Es col.loca al liofilitzador i s'espera a que es produeixi el buit total a l'interior del tub.
- Es tanca el tub amb el soplet procurant que no hi hagi porus.
- Es col.loca a 105° C el temps correspondent.
- S'obre el tub amb l'ajut del llapis de diamant i del soplet.
- Es desseca al buit sobre Na OH.
- Posteriorment la mostra es redissoldrà en el tampó adequat i s'entrarà a l'analitzador.

DISCUSSIO

La hidròlisi al buit és la tècnica més precisa per a la quantificació d'una proteïna pura o per estudiar la seva composició.

Respecte altres tècniques emprades per a la quantificació d'una proteïna pura com pot ser l'absorbància a una determinada longitud d'ona quan és conegut el seu coeficient d'extinció molar, presenta l'avantatge de ser més fiable però requereix més temps, la mostra ha d'estar lliure de compostos que puguin interferir en la posterior detecció dels aminoàcids i les al·lòquies que es prenen es destrueixen. Encara que això últim gairebé no és problema en poder treballar a nivell de picomols.

La hidròlisi àcida amb HCl presenta l'inconvenient que destrueix el Trp i de que Gln i Asn es converteixen en els seus àcids corresponents (Glu i Asp). Per a la determinació del Trp una alternativa és la hidròlisi amb àcid para-toluésulfònic i per Gln i Asn hi ha diferents solucions a la bibliografia.

BIBLIOGRAFIA.

- G. Allen. Sequencing of proteins and pèptids (1981). Elsevier / North- Holland.
- Methods in Molecular Biology. Vol. 1. Proteins. Edited by John M. Walker (1984). Human Press, Clifton, New Jersey.
- PIERCE 1985-86 Handbook § General Catalog (és un catàleg comercial).
- Altres prospectes comercials.

ESPECTRES D'ABSORCIO

INTRODUCCIO

La utilització de l'espectrofotòmetre en el camp de les proteïnes presenta múltiples variants.

En la cinètica enzimàtica quan l'aparició o desaparició d'un dels productes, substrat, cofactors, etc. provoca variacions quantificables en l'absorbància a una determinada longitud d'ona, hom pot seguir el curs de la reacció enregistrant els canvis en l'absorbància.

És ja sabut que l'enllaç peptídic absorbeix fortament a la regió de 200 a 210 nm. A més a més els grups aromàtics de certs aminoàcids (Tyr, Phe, His i Trp) contribueixen a augmentar l'absorbància a longituds d'ona entre 220 i 230 nm. Malauradament, la majoria de solvents i tampons que podem utilitzar absorbeixen molt a aquestes longituds d'ona. D'aquí que quan es treballa amb proteïnes es sol fer a 280 nm per ser una regió on la majoria de proteïnes tenen un segon màxim i, en canvi, l'absorbància dels solvents on estan dissoltes acostuma a ser molt menor. D'aquí que alguns processos de separació de proteïnes i pèptids, com la cromatografia líquida, siguin seguits enregistrant l'absorbància a la longitud d'ona adequada.

Si podem disposar d'una proteïna pura en solució sempre ens serà útil determinar el seu espectre d'absorció entre dues longituds d'ona. D'aquesta manera, si en qualsevol altre ocasió volem comprovar que tenim la mateixa proteïna pura, un primer pas serà comprovar que els espectres coincideixen (encara que això a la pràctica no sempre és útil ja que diferents proteïnes poden presentar espectres similars). També ens pot orientar a quina longitud d'ona podem treballar en posteriors ocasions. Però el més important és que si coneixem la quantitat de proteïna pura que tenim en solució podem aplicar la fórmula:

$$A_{\lambda} = E_{\lambda} \times c \times l$$

A: absorció enregistrada a la longitud d'ona λ
(280 nm a la majoria d'ocasions).

c: concentració de la proteïna expressada en mols/litre.

l: longitud travessada pel feix de llum (amplada de la cubeta).

E_{λ} : coeficient d'extinció molar a λ nanòmetres.

Calculem E_{λ} i posteriorment sempre que tinguem aquesta mateixa proteïna en solució podrem saber directament la seva concentració llegint directament a la longitud d'ona λ .

Altres tècniques espectrofotomètriques de quantificació de proteïnes en solució ja han estat descrites en aquest llibre.

OBJECTIUS

- Determinar l'espectre d'absorció molar d'una proteïna.
- Quantificació d'una proteïna purificada en solució.

MATERIALS

- Espectrofotòmetre que fagi "scanning" i enregistri l'espectre gràficament.
- Cubetes de quars per a poder llegir l'absorbància en el U.V.

PROTOCOL

- Connectar l'espectrofotòmetre i programar-lo perquè faci "scanning" entre les longituds d'ona desitjades.
- Col·locar com a blanc una cubeta que contingui el tampó on hi tenim dissolta la proteïna i a l'altra cubeta el problema.
- Iniciar l'"scanning".
- Si es pretén quantificar la concentració de proteïna anotar l'absorbància a la longitud d'ona desitjada i efectuar els càlculs corresponents.

DISCUSSIO

Es tracta d'una tècnica ràpida, simple i sense pèrdues de mostra, ja que aquesta no es distribueix ni reacciona amb cap compost. És útil com a primera aproximació per a conèixer la concentració de proteïna que posseïm però és menys exacta que una anàlisi d'aminoàcids.

S'ha d'aplicar a solucions amb proteïnes pures si el que es pretén és la seva quantificació.

DETERMINACIO DEL RECANVI PROTEIC.

DETERMINACIÓ DE LA VELOCITAT DE RECANVI PROTEIC.

Francesc López.

Departament de Bioquímica i Fisiologia.

Facultat de Biologia.

Universitat de Barcelona.

INTRODUCCIÓ

Les proteïnes són macromol·lècules que continuament estan sotmeses a processos de síntesi i de degradació, processos que es verifiquen a una velocitat gairebé constant, amb petites variacions tan sols sota situacions d'inducció amb una dieta rica en proteïnes durant el període de creixement. A aquesta continuada síntesi i degradació se l'anomena recanvi ("turnover"). La velocitat o taxa de recanvi per a una determinada proteïna o per a un conjunt de proteïnes varia en funció de la seva naturalesa, tot i sent força constant; malgrat tot, poden presentar lleugeres modificacions sota diferents situacions fisiològiques i/o patològiques. Aquesta velocitat normalment es presenta com la "vida mitjana" ($t_{1/2}$), la qual és el temps necessari per a que es degradi o es sintetitzi la meitat d'una determinada proteïna. Per a procedir al càlcul d'aquest paràmetre "in vivo" es determina la desaparició de la proteïna després d'haver-la marcada radiactivament amb algun tipus de traçador.

La tècnica més utilitzada per a determinar la velocitat de recanvi proteic consisteix en l'administració d'un aminoàcid radiactiu i quantificar a diferents temps la radiactivitat remanent a la fracció proteica. Diferents autors han proposat diversos procediments, com per exemple la perfusió continuada del traçador, per a portar a terme aquesta determinació, malgrat que cap d'ells es pot considerar perfecte. Els principals problemes associats a aquestes metodologies són la dificultat per a mantenir constant la radiactivitat específica durant l'experiment, la possible reutilització dels aminoàcids alliberats com a conseqüència de la degradació proteica, així com de les interconversions entre aminoàcids i altres compostos (glúcids i lípids). L'aproximació més adient i alhora la més senzilla des del punt de vista metodològic, consisteix en la utilització de l'aminoàcid L-(guanido- ^{14}C)-arginina com a traçador, donat que aquest compost és activament incorporat a les proteïnes i la probabilitat que sigui reutilitzat és molt baixa, ja que és degradat a nivell del fetge per l'enzim arginasa; d'aquesta manera s'elimina la radiactivitat amb l'orina en forma d'urea i no es pot incorporar a les proteïnes.

OBJECTIUS.

L'objectiu principal d'aquest experiment és determinar la velocitat de recanvi proteic als principals teixits de la rata. En funció dels resultats obtinguts, hom pot donar una explicació a les diferències observades entre els diversos teixits en funció del seu paper fisiològic.

Aquest mètode es pot aplicar a d'altres espècies d'animals, principalment de mamífers. La quantitat de radioactivitat administrada es modifica en funció del pes corporal de l'espècie estudiada. Per exemple, en el cas del ratolí la quantitat de radioactivitat relativa al pes corporal és semblant a la de la rata, aproximadament $0,05 \mu\text{Ci}$ per gram de pes; en canvi la quantitat absoluta serà molt més petita ($1,25 \mu\text{Ci}$), a causa del menor pes corporal d'aquest animal.

APARELLS I MATERIALS

Reactius

- L-(guanido- ^{14}C)- arginina (Amersham, Anglaterra).
- Sali: NaCl (Panreac) 0,9%(p/v) en aigua destil.lada.
- Heparina (Analema).
- Acetona (Panreac).
- Solubilitzador de teixits NCS (Amersham, Estats Units): és una solució d'una base. d'amoni quaternari en tolué
- Tolué (Fluka).
- Peròxid d'hidrogen (Foret) de 110 vol.
- Acid acètic (Panreac) al 25% (p/v).
- Líquid de escintil.lació:
 - 750 ml de xilé.
 - 250 ml de tritó X-100.
 - 3 g de PPO (2,5-difeniloxazol) .
 - 100 mg de POPOP (1,4-bis-(2-(5-fenoxiloxazolil)-benzè).
- Nitrògen líquid.

Material

- Xeringues.
- Material de cirurgia.
- Pipetes Pasteur.
- Pipetes de vidre.
- Pipetes automàtiques.
- Tubs de vidre Pyrex amb tap de rosca.
- Tubs d'homogenització.
- Vials de comptatge de radiactivitat.
- Guants de plàstic.

Aparells

- Centrífuga Coolspin MSE.
- Comptador de radiactivitat Packard TriCarb 460C.
- Homogenitzadors.
- Balança automàtica.
- Bany d'incubació.

Animals

- Rates (*Rattus norvegicus*) mascles de la soca Wistar, de 150 grams de pes aproximat.

PROTOCOL EXPERIMENTAL

- Administrar 10 μCi de L-(guanido- ^{14}C)-arginina a quatre rates per via intraperitoneal (concentració de la solució del traçador: 20 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$).

Sacrificar els animals per decapitació a les 12, 24, 36, i 48 hores des del moment de l'administració, recollint la sang, que es centrifuga a 2000 rpm durant 15 minuts.

- Extracció dels teixits (fetge, múscul, teixit adipós blanc i marró, cor, pulmó, cervell i ronyó). Els teixits es congelen amb nitrògen líquid.

- Homogenitzar els teixits: 250 mg de teixit amb 2 ml d'aigua destil·lada.

- Precipitar les proteïnes: agafar 1,5 ml de l'homogenat i barrejar amb 1,8 ml d'acetona en tubs amb tap de rosca. Centrifugar a 2000 rpm durant 30 minuts, eliminant el sobresurant.

- Digestió de les proteïnes del precipitat amb NCS: afegir al precipitat 0,1 ml d'aigua destil·lada i 0,25 ml de NCS.

- Incubar 2 hores a 50° C.

- Decolorar les mostres: afegir als tubs 0,25 ml de tolué, 0,2 ml de peròxid d'hidrògen. Incubar 15 minuts a les mateixes condicions.

- Neutralitzar les mostres: afegir als tubs 0,05 ml d'àcid acètic al 25%.

- Comptatge de les mostres: afegir 10 ml de líquid d'escintil·lació, deixar a les fosques 12 hores i comptar les mostres durant 5 minuts.

PROTOCOL EXPERIMENTAL

Preparació i administració del traçador.

La solució comercial de L-(guanido- ^{14}C)-arginina és de 50 μCi en 1 ml d'aigua amb 2% d'etanol. Aquesta solució es liofilitza i el residu sòlid es resuspén en 2,5 ml de salí, amb la qual cosa s'obté una concentració final de 20 $\mu\text{Ci/ml}$. Aquesta solució de treball es conserva a 4° C fins el moment de la seva utilització.

S'administra a cadascun dels quatre animals experimentals una dosi consistent en 10 μCi de L-(guanido- ^{14}C)-arginina per via intraperitoneal (0,5 ml de la solució de treball). L'administració intraperitoneal té com objectiu fer més lenta l'absorció del traçador, perllongant-hi així el temps de marcatge de les proteïnes.

Sacrifici i obtenció de les mostres

A les 12, 24, 36, i 48 hores des del moment de l'administració del traçador es procedeix al sacrifici dels animals per decapitació amb una guillotina manual de doble fulla. La sang que vessa de la ferida del coll es recull amb un got heparinitzat i posteriorment es centrifuga a 2000 rpm durant 15 minuts a 4° C; el plasma obtingut s'agafa amb una pipeta Pasteur i es guarda a -20° C.

Simultàniament es procedeix a l'extracció dels diferents teixits a estudiar: fetge, múscul, teixit adipós blanc, teixit adipós marró, cor, pulmó, cervell, ronyó. Els teixits són immediatament congelats amb nitrògen líquid i finalment es guarden al congelador a -40° C fins al moment del seu processament.

Homogenització dels teixits

Es pesen exactament trossos dels teixits congelats de aproximadament 250 mg, i són posats dins del tub d'homogenització amb 2 ml d'aigua destil·lada; seguidament s'homogenitzen amb el tub ficat dins d'un recipient amb gel. De l'homogenitzat s'agafen 1,5 ml i es col·loquen en un tub de vidre Pyrex amb tap de rosca amb 1'8 ml d'acetona, barrejant-ho bé. Els tubs es centrifuguen a 2000 rpm durant 30 minuts a 4° C, i finalment s'elimina el sobresurant amb una pipeta Pasteur.

Per al processament de les mostres de plasma s'agafen directament 1,5 ml de plasma i es segueix el protocol indicat anteriorment.

Digestió de les proteïnes i comptatge

El precipitat obtingut amb el tractament assenyalat i constituït per les proteïnes del teixit, es digereix per addició de 0'25 ml del solubilitzador NCS i 0'1 ml d'aigua destil·lada, tot deixant els tubs a 50° C en un bany durant 2 hores. Un cop digerides les mostres, s'hi afegeixen 0'25 ml de tolué i 0'2 ml de peròxid d'hidrogen, (agent decolorant) i 15 minuts més tard 0,05 ml d'àcid acètic al 25% (agent acidificant). Finalment, el contingut dels tubs, que ja és transparent i incolor, es posa en vials d'escintil·lació amb 10 ml de líquid d'escintil·lació. Els vials es deixen un mínim de 12 hores a les fosques, per a reduir al màxim els efectes de la quimioluminiscència, i es compten durant 5 minuts.

La desaparició de la radioactivitat específica de les proteïnes segueix una corba de tipus exponencial:

$$R = R_0 \times e^{-kt} \quad (1)$$

éssent R_0 la radioactivitat específica al moment de l'administració del traçador ($t = 0$) i R la radioactivitat específica a un moment determinat t .

Si es procedeix a la transformació logarítmica de l'equació (1)

$$\ln R = \ln R_0 - kt \quad (2)$$

i ara es transformen els logaritmes naturals a logaritmes decimals

$$\log R = \log R_0 - kt/2.303 \quad (3)$$

es pot obtenir l'equació d'una recta el pendent de la qual és :

$$m = -k/2.303 \quad (4)$$

La vida mitjana de les proteïnes és el temps necessari perquè es redueixi a la meitat la radioactivitat específica, és a dir perquè $R = R_0/2$. D'acord amb l'equació (1):

$$R_0/2 = R_0 \times e^{-kt} \quad \text{_____} \quad 1/2 = e^{-kt} \quad (5)$$

i si es fa la transformació logarítmica corresponent

$$\ln 1/2 = -kt \quad \text{_____} \quad t = 0.693/k \quad (6)$$

ja que es coneix el valor de k a partir del valor del pendent de la recta (m), es pot determinar la vida mitjana de les proteïnes.

Càlculs

Amb les dpm obtingudes al comptatge pels diferents teixits, tot coneixent el contingut de proteïnes de cada teixit, es calcula el logaritme de la radiactivitat específica (radiactivitat per gram de proteïna) i es representa sobre paper mil·limetrat en front del temps passat des del moment de l'administració del traçador. Un cop representats els diferents punts pels diferents teixits, s'hi representen les corresponents rectes de regressió, el pendent de les quals ens permetrà de calcular la velocitat de recanvi proteic.

D'aquesta forma, amb els valors de radiactivitat (dpm) de cadascuna de les mostres, es calcula la radiactivitat específica (dpm per miligram de proteïna) i, per a un determinat teixit es representa gràficament el logaritme decimal de la radiactivitat específica en funció del temps passat des del moment de l'administració del traçador:

Essent m el pendent de la recta obtinguda per a un determinat teixit, calculem el valor de k de la següent manera:

$$k = -2,303 \times m$$

I ara, amb aquesta dada ja podem calcular la vida mitjana de les proteïnes del teixit ($t_{1/2}$):

$$t_{1/2} = 0,693 / k$$

Precaucions de la radiactivitat

Donat el perill potencial que representa la utilització de la radiactivitat en qualsevol tècnica de laboratori, és necessària l'observació d'unes mínimes normes de precaució.

Totes les manipulacions de les mostres s'han de fer amb guants de plàstic d'un sol ús. En especial s'ha d'anar en compte durant el procés d'extracció de les mostres; aquestes operacions es faran damunt un paper de filtre, i alhora es cobrirà la taula amb un full de plàstic, per tal d'evitar que es contami.

El material contaminat (tubs, vials de comptatge, etc) es descontaminaran pel mètode de la dilució infinita, deixant-ho dins d'un cubell amb aigua corrent durant un dia sencer. El material no recuperable i les deixalles biològiques s'eliminaran utilitzant unes bosses de brossa especials, d'acord amb la normativa de la instal·lació radiactiva.

DISCUSSIO

Els mètodes més utilitzats en la determinació de la velocitat de recanvi proteic mitjançant l'ús d'isòtops es poden classificar en dos tipus, en funció que l'administració del traçador es verifiqui en forma d'una única dosi o bé per administració contínua. El principal inconvenient d'aquestes metodologies és la dificultat d'assolir una radioactivitat específica constant del traçador, malgrat la qual cosa continuen essent els mètodes emprats més sovint.

L'administració d'una única dosi de traçador presenta l'avantatge de la seva major simplicitat en el moment de l'administració, que es porta a terme principalment per via intraperitoneal i, de vegades, per via intravenosa. A més a més la quantitat de radioactivitat utilitzada és més petita, amb la qual cosa es redueixen les despeses econòmiques de l'experiment. En canvi, l'administració continuada del traçador és, metodològicament parlant, més complexa i econòmicament molt més costosa.

El principal desventatge del mètode de l'administració única és la possible reutilització dels aminoàcids marcats alliberats com a conseqüència de la degradació de les proteïnes. La solució d'aquest problema s'assoleix mitjançant l'ús d'aminoàcids que tinguin una baixa probabilitat de reutilització, com és el cas de la L-guanido-arginina, que és el que s'utilitza més freqüentment.

BIBLIOGRAFIA

- Alemany, M. : Effect of amino acid reutilization in the determination of protein turnover in mice. Hormone and Metabolic Research, 8: 70-73 (1976)
- Everett, A.W.; Zak, R. : Problems and interpretations of techniques used in studies of protein turnover. " Degradative processes in heart an skeletal muscle", (ed. K. Wildenthal), pp. 31-47. Elsevier/North-Holland biomedical Press, Amsterdam (1980).
- Pilo, A. : Simple injection versus constant infusion technique in tracer studies. The Journal of Nuclear Biology and Medecine, 19 : 45-51 (1975).
- Schimke, R. T. : Regulation of protein degradation in mammalian tissue. "Mammalian protein Metabolism" (ed. H.N. Munro), pp. 177-228. Academic Press, New York (1970).
- Schmke, R. T. : On tue properties and mechanisms of protein turnover. " Intracellular protein turnover" (eds. R. tT. Schimke, N. Katunuma), pp. 173-186. Academic Press, New York (1975).
- Scornik, O.A. : Role of protein degradation in the regulation of cellular protein content and amino acid pools. Federation Proceedings, 43: 1283-1288 (1984).
- Thrasher, J. D. : Turnover of intracellular proteins. " Cellular and molecular renewal in the mammalian body" (eds. I. L. Cameron, J.D. Thrasher), pp. 153-219. Academic Press, New York - London (1971) .
- Waterlow, J. C. : Protein turnover with special reference to man. Quaterly Journal of Experimental Physiology, 69: 409-438 (1984).
- Waterlow, S. : Use of carbon-14-labelled arginine to measure the catabolic rate of serum and liver proteins and the extent of amino-acid recycling. Nature (London), 211'978-980 (1966).

