

PROGRAMA DE METODOLOGIA I EXPERIMENTACIÓ BIOQUÍMICA II

1. FRACCIONAMENT SUBCEL·LULAR.

Aïllament de fetge, cervell i múscul de rata. Fraccionament subcel·lular del fetge de rata: preparació de fracció nuclear, mitocondrial, microsomal i citosòlica. Estimació del contingut de DNA, RNA i proteïna en les fraccions subcel·lulars. Distribució d'enzims marcadors en les diferents fraccions: glucosa-6-fosfatasa, lactat deshidrogenasa i succinat deshidrogenasa.

2. PURIFICACIÓ DE LACTAT DESHIDROGENASA DE MÚSCUL ESQUELÈTIC.

Preparació d'extracte de múscul de rata. Cromatografia d'afinitat amb Cibachron-Blue-Agarosa. Assaig d'activitat lactat deshidrogenasa i contingut de proteïna de les diferents fraccions eluïdes de la columna d'afinitat. Elaboració de la taula de purificació de l'enzim.

3. ELECTROFORESI NO DESNATURALITZANT DE PROTEÏNES EN GELS DE POLIACRILAMIDA.

Mesura d'activitat lactat deshidrogenasa en gel no desnaturalitzant (zimograma). Càrrega, separació i tinció per activitat de les diferents fraccions provinents de la purificació de lactat deshidrogenasa del múscul.

4. PURIFICACIÓ D'ACETILCOLINESTERASA DE CERVELL.

Preparació de la reïna d'afinitat per activacions químiques successives. Preparació de l'extracte de cervell. Purificació i assaig enzimàtic de l'acetilcolinesterasa.

5. DETECCIÓ IMMUNOLÒGICA DE PROTEÏNES IMMOBILITZADES: WESTERN BLOT.

Preparació d'extracte de múscul de rata. Separació de les diferents proteïnes components en gel de poliacrilamida. Transferència de les proteïnes des del gel de poliacrilamida a membrana de nitrocel·lulosa. Tinció de proteïnes en la membrana de nitrocel·lulosa. Incubació amb anticòs policlonal i detecció de proteïnes específiques.

6. ANÀLISI DE LES MOSTRES OBTINGUDES DELS DIFERENTS TEIXITS PER ELECTROFORESI EN POLIACRILAMIDA-SDS.

7. METODOLOGIES BÀSIQUES DE MANIPULACIÓ I ANÀLISI DE DNA.

Preparació i transformació de cèl·lules competents de *Escherichia coli*. Rèplica de transformants. Lectura de les rèpliques. Minipreparacions de DNA plasmídic. Minipreparacions de DNA genòmic de *Escherichia coli*. Obtenció de DNA de timus de vedella. Anàlisi espectrofotomètrica del DNA. Digestió amb enzims de restricció i anàlisi de la restricció. Electroforesi en gels d'agarosa.

8. METODOLOGIES BÀSIQUES EN BIOQUÍMICA DE LÍPIDS.

Extracció i purificació de fosfatidilcolina. Preparació i caracterització de liposomes multilamel·lars grans. Caracterització dels fosfolípids obtinguts i determinació del seu grau d'oxidació.