

## PROGRAMA DE METODOLOGIA I EXPERIMENTACIO BIOQUIMICA 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. PURIFICACION DE LACTAT DESHIDROGENASA DE MUSCUL ESQUELETIC.

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 PROTEINES 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. PURIFICACION D'ACETILCOLINESTERASA DE CERVELL.

Preparació de la reina d'afinitat per activacions químiques successives. Preparació de l'extracte de cervell. Purificació i assaig enzimàtic de l'acetil colinesterasa.

### 5. DETECCIO IMMUNOLOGICA DE PROTEINES IMMOBILITZADES: WESTERN BLOTH.

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

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

### 7. METODOLOGIES BASIQUES DE MANIPULACIO I ANALISI DE DNA.

Preparació i transformació de cèl.lules competents de Escherichia coli. Rèplica de transformants. Lectura de les repliques. 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 BASIQUES EN BIOQUIMICA DE LIPIDS.

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