

METODOLOGIA I EXPERIMENTACIÓ BIOQUÍMICA II

MANUAL DE PRÀCTIQUES

CURS 1999/2000

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

UNITATS DE LA FACULTAT DE CIÈNCIES I DE BIOFÍSICA

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

INDEX GENERAL

Part I

Fraccionament del fetge de rata: caracterització de les fraccions subcel.lulars	3
Aïllament de teixits i fraccionament del fetge de rata	6
Estimació del contingut de DNA, RNA i proteïnes	15
Distribució d'enzims a la cèl.lula	20
Glucosa-6-fosfatasa	21
Lactat deshidrogenasa	25
Succinat deshidrogenasa	26
Purificació de la lactat deshidrogenasa de múscul	35
Preparació de l'extracte	38
Cromatografia d'afinitat	38
Assaig de l'activitat	39
Determinació de la quantitat de proteïna pel mètode de Bradford	40
Electroforesi no desnaturalitzant en gels de poliacrilamida	42
Tinció per activitat enzimàtica	44
Cromatografia d'afinitat II: purificació de l'acetilcolinesterasa de cervell	48
Preparació de la columna d'afinitat	50
Preparació de l'AChE de cervell	52
Purificació de l'acetilcolinesterasa	53
Assaig de l'activitat	54
Detecció immunològica de proteïnes immobilitzades: Western Blot	56
Electroforesi	59
Transferència	61
Bloqueig i incubació amb anticòs	63
Detecció	64
Anàlisi de les mostres acumulades per electroforesi en poliacrilamida-SDS	65

Part II

Metodologies bàsiques de manipulació i anàlisi de DNA	67
Transformació de cèl.lules competents d' <i>Escherichia coli</i>	67
Preparació de cel.lules competents	72
Transformació de cèl.lules competents	72
Rèplica de transformants	73
Lectura de les rèpliques	74
Minipreparacions de DNA plasmídic	76
Minipreparació de DNA genòmic de <i>E. coli</i>	79
Obtenció de DNA de timus de vedella	81
Anàlisi espectrofotomètrica del DNA	82
Digestió amb enzims de restricció i anàlisi de la restricció	84
Extracció de RNA total	87
Electroforesi en gel d'agarosa	89

Part III

Mètodes bàsics en bioquímica de lípids	94
Extracció i purificació de fosfatidilcolina	94
Extracció dels fosfolípids.	95
Purificació del fosfolípids	96
Preparació de liposomes multil·lamelars grans	97
Determinació del grau d'oxidació dels fosfolípids	99
Caracterització dels fosfolípids obtinguts.	99
Incorporació d'una substància colorejada en MLVs i SUVs.	100

NORMES DE FUNCIONAMENT

Tots els experiments d'aquestes pràctiques es faran en grups de dues persones, amb algunes excepcions que s'indiquen oportunament, però cada membre del grup pot recolectar dades independentment i construir les seves pròpies gràfiques, donat que la presentació de les memòries ha de ser individual.

La memòria, que ha d'estar elaborada en un plaç no posterior a les tres setmanes després d'acabada la part pràctica, contindrà, com a mínim, un recull dels resultats fet de la manera que s'explicita a cadascun dels apartats. El seu format pot ser el d'una petita memòria del treball experimental dut a terme, en la que es pot incloure una introducció de l'experiment a descriure, els resultats obtinguts i la seva elaboració corresponent i una discussió. A més, s'hi pot afegir aquells comentaris que puguin semblar adients relacionats amb l'experiència acumulada, amb problemes experimentats (no sempre surten els experiments pràctics, per molt provats que estiguin) o bé amb possibles modificacions o millores dels mètodes emprats. No cal, en cap cas, repetir els protocols experimentals, ja presents en aquest manual de pràctiques, i només és necessari fer esment de les metodologies si s'ha fet quelcom que no sigui present aquí. És convenient utilitzar bibliografia complementària (llibres de text de Bioquímica general, específics de metodologia bioquímica o llibres de text d'exercicis pràctics).

La major part de les dissolucions que fan falta per a dur a terme aquestes pràctiques estaran ja preparades. S'indicarà oportunament aquelles que han de ser preparades pels alumnes.

La qualificació de l'assignatura de Metodologia i Experimentació Bioquímica II es farà en base a la qualificació de la memòria de pràctiques i de l'examen de l'assignatura i d'una valoració de l'actitud, el treball de l'alumne i la qualitat dels seus resultats feta pel professor/a. L'examen es convocarà el dia previst pel calendari oficial o bé algun dia anterior a l'inici del període d'exàmens si s'arriba a aquest acord entre professors i estudiants. A l'examen serà possible disposar de la memòria elaborada per cada alumne. Per evitar retornar memòries no corregides abans d'hora, és recomanable que cada alumne conservi una còpia de la seva memòria de pràctiques per preparar l'examen.

PROFESSORS

Part I Rosario Fernández
 Carme Espuña
 Jaume Piñol
 Francesc Miró
 Maria Plana
 Josep Vendrell

Part II Susana Martínez
 Josep A. Biosca

Part III Ramon Barnadas