

# Metodologia i experimentació Bioquímica II

Professor ?

En ser aquesta una assignatura de laboratori no té un programa sino un index d'experiments a realitzar; els números de la dreta indiquen la pàgina on cada experiment és descrit al manual que s'entrega als alumnes en començar l'assignatura:

## ÍNDEX GENERAL

### Part I

Fraccionament del fetge de rata: caracterització de les fraccions subcel·lulars, 4

- Aïllament de teixits i fraccionament del fetge de rata, 7
- Estimació del contingut de DNA, RNA i proteïnes, 16
- Distribució d'enzims a la cèl·lula, 21
  - Glucosa-6-fosfatasa , 22
  - Lactat deshidrogenasa, 26
  - Succinat deshidrogenasa, 27

Purificació de la lactat deshidrogenasa de múscul, 36

- Preparació de l'extracte, 39
- Cromatografia d'afinitat, 39
- Assaig de l'activitat, 40
- Determinació de la quantitat de proteïna pel mètode de Bradford, 41
- Electroforesi no desnaturalitzant en gels de poliacrilamida, 43
  - Tinció per activitat enzimàtica, 45

Cromatografia d'afinitat II: purificació de l'acetilcolinesterasa de cervell, 49

- Preparació de la columna d'afinitat, 51
- Preparació de l'AChE de cervell, 53
- Purificació de l'acetilcolinesterasa, 54
- Assaig de l'activitat, 55

Detecció immunològica de proteïnes immobilitzades: Western Blot 57

- Electroforesi, 60
- Transferència, 62
- Bloqueig i incubació amb anticòs, 64
- Detecció, 65

Anàlisi de les mostres acumulades per electroforesi en poliacrilamida-SDS 66

## Part II

### Metodologies bàsiques de manipulació i anàlisi de DNA, 67

- Transformació de cèl·lules competents d'*Escherichia coli*, 67
    - Preparació de cèl·lules competents, 72
    - Transformació de cèl·lules competents, 72
    - Rèplica de transformants, 73
    - Lectura de les rèpliques, 74
  - Minipreparacions de DNA plasmídic, 75
  - Minipreparació de DNA genòmic de *E. coli*, 78
  - Obtenció de DNA de timus de vedella, 80
    - Anàlisi espectrofotomètrica del DNA, 81
  - Digestió amb enzims de restricció i anàlisi de la restricció, 83
    - Electroforesi en gel d'agarosa, 85
- 

## Part III

### Mètodes bàsics en bioquímica de lípids, 91

- Extracció i purificació de fosfatidilcolina, 91
    - Extracció dels fosfolípids, 92
    - Purificació del fosfolípids, 93
  - Preparació de liposomes multilemelars grans, 95
    - Caracterització dels fosfolípids obtinguts, 96
    - Determinació del grau d'oxidació dels preparats durant el procés, 96
- 

## INFORMACIÓ SOBRE L'ASSIGNATURA

### Informacions generals

Tots els experiments d'aquestes pràctiques es faran en grups de dues persones, amb algunes excepcions que s'indicaran oportunament, però cada membre del grup pot recolectar dades independentment i construir les seves pròpies gràfiques, donat que la presentació de les memòries, que és imprescindible per a que l'assignatura pugui ser avaluada, 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 cada un dels apartats. El seu format pot ser el d'una petita memòria del treball experimental dut a terme, en la que es pot incloure, a més dels resultats elaborats, una introducció, una discussió, i els comentaris que puguin semblar adients, relacionats amb l'experiència acumulada 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).

## Ubicacions del laboratori i grups d'experimentació

Les parts I i II es duen a terme a la Unitat de Ciències del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular (laboratoris C2-523 i C2-519 respectivament). La part III es duu a terme als laboratoris de la Unitat de Biofísica del mateix Departament (Lab. M-002).

Normalment, es formen tres grups per a les parts I i II i dos o tres grups per a la part III. La formació dels grups no és rígida ni per ordre alfabètic; per tant, són els mateixos alumnes els que trien quines dates els hi són més convenients, havent de respectar només la norma de que el nombre de persones per grup sigui igual. Una vegada al laboratori es treballa per parelles.

## Mètode d'avaluació

S'avaluarà l'assignatura en base a tres criteris:

1. Actitud al laboratori i qualitat de la feina feta, tenint també en compte la capacitat de treballar ordenadament i neta.
  2. Qualitat dels resultats.
  3. Qualificació de la memòria elaborada.
-