

BIOQUÍMICA EN VIU (2013)



¿QUÉ ES LA BIOQUÍMICA?

La bioquímica és la ciència que estudia com funciona la cèl·lula a nivell molecular, la composició química dels éssers vius, especialment les proteïnes, glúcids, lípids, i els àcids nucleics, a més d'altres petites molècules presents en les cèl·lules i les reaccions químiques d'aquests composts (metabolisme) que les permet obtenir energia (catabolisme) i generar biomolècules pròpies (anabolisme).

¿Qué s'estudia?

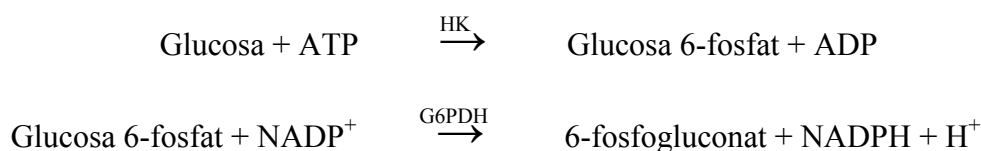
Biologia Cel·lular
Genètica Molecular i Enginyeria Genètica
Enzimologia
Processos microbians
Immunologia
Regulació del Metabolisme
Estructura de Biomolècules
Bioquímica Clínica i Patologia Molecular
Biotecnologia (Animal, Microbiana i Vegetal)

DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE GLUCOSA

La glucosa és el principal metabòlit que utilitzen els diferents teixits dels organismes per obtenir energia mitjançant la glucòlisi. Per tant, la concentració de glucosa en sang està fortament regulada per assegurar una concentració mínima que faci viable el funcionament dels diferents teixits. Igualment la concentració de la glucosa en gran quantitat és tòxica perquè modifica l'estructura de les proteïnes i la seva funcionalitat. És per això que la concentració de la glucosa es manté sempre en uns marges molt estrets. Aquest procés de concentració de la glucosa es manté sempre en uns marges molt estrets. Aquest procés de control s'anomena homeòstasi de la glucosa. En l'ésser humà la concentració de glucosa en sang en dejú es troba entre 3.9 i 5.9 mM. Si per alguna causa aquest mecanisme falla, es produeix una pujada de la quantitat de glucosa en sang i ens troben en una situació patològica anomenada diabetis. La diabetis és la principal malaltia metabòlica i afecta un 8 % de la població mundial.

Degut a aquesta alta incidència és molt important tenir bons mètodes per mesurar la concentració de glucosa en sang i poder diagnosticar les persones diabètiques. L'objectiu d'aquesta pràctica és la determinació de la concentració de glucosa en sang de diferents mostres utilitzant un mètode enzimàtic. Aquests mètodes utilitzen les propietats dels enzims, com la seva especificitat de substrat, per a la determinació de diferents substàncies; així obtenim mètodes molt específics i amb una bona sensibilitat analítica, és a dir, un límit de detecció baix.

Les reaccions enzimàtiques que ens permeten mesurar la glucosa són:



on HK: hexoquinasa i G6PDH: glucosa 6-fosfat deshidrogenasa.

En la primera reacció l'hexoquinasa converteix la glucosa que hi ha en la mostra en glucosa 6-fosfat mitjançant l'utilització d'una molècula d'ATP. En la segona reacció es produeix una oxidació en la qual l'aldehid de la glucosa s'oxida a àcid carboxílic. Aquesta reacció s'utilitza perquè un dels productes que obtenim (el NADPH) presenta unes propietats que no tenen cap dels altres productes que participen en la reacció: la seva absorció específica a una longitud d'ona de 340 nm, que mesurarem utilitzant un espectrofotòmetre. Per tant, a major concentració de glucosa en la mostra se'ns formarà més NADPH. De fet per cada molècula de glucosa utilitzada obtenim una molècula de NADPH, i així l'absorció és major. El que estem fent és relacionar la concentració de glucosa en la mostra amb un increment d'absorbància. Aquestes dues magnituds estan relacionades matemàticament mitjançant la *llei de Lambert-Beer*.

$$A = \varepsilon * l * c$$

on A: absorbància, ε : coeficient d'absorció molar (depèn de cada substància), l: la longitud de la cubeta i c: la concentració.

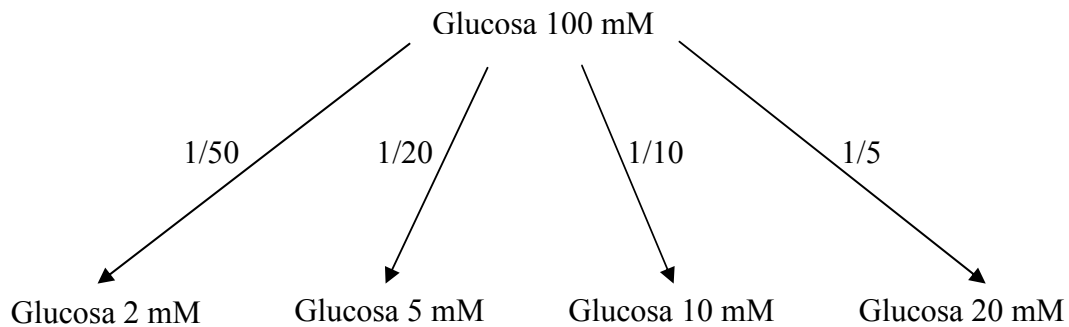
Normalment la longitud de la cubeta és d'1 cm i, com que mesurem l'absorbància del NADPH, la ε val $6300 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Per realitzar aquesta pràctica farem una recta de calibratge a partir de solucions de concentració coneguda de glucosa i així calcularem el factor que relaciona l'absorbància amb la concentració, que és el pendent de la recta. Un cop obtinguda la recta i coneixent l'absorbància de les mostres problema, calculem pel mètode d'interpolació la concentració de glucosa que tenim.

PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

1. Preparació de les solucions de concentració coneguda

Primer de tot tenim 100 ml d'una solució mare de glucosa 100 mM que hem utilitzat per fer les solucions de concentració coneguda de la recta de calibratge (estàndards). Per construir la recta de calibratge utilitzareu estàndards de concentracions 2, 5, 10 i 20 mM de glucosa. Fixeu-vos que hem triat unes concentracions tals que les concentracions normals en sang en l'ésser humà entrin dins aquest rang.

Per obtenir els estàndards hem fet el següent banc de dilucions:



Els estàndards estan preparats en tubs eppendorf d'1.5 ml, agiteu-los i afegiu 5 μ l de cadascun dels estàndards en una cubeta. En un altre cubeta afegiu 5 μ l d'aigua mil·liQ que utilitzareu com a blanc de lectura.

2. Preparació de les mostres

Agafeu 5 μ l de les mostres (A, B, C o D) i afegiu-los a dues cubetes.

3. Addició de reactius

Per iniciar la reacció, afegiu 1 ml d'una solució que conté els enzims i les substàncies necessàries per obtenir NADPH a tots els tubs que tenim preparats i espereu **30 minuts**.

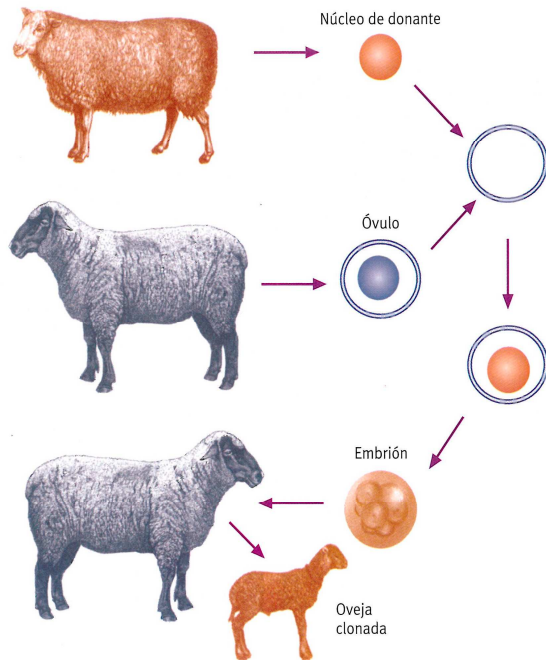
Solució reactiva:	Tampó de Pipes, pH 7.6	80 mM
	NAD ⁺	3.04 mM
	ATP	1.76 mM
	Azida sódica	< 0.1 %
	Hexoquinasa	≥ 1.7 U/ml
	Glucosa 6-fosfat deshidrogenasa	≥ 1.7 U/ml
	Sulfat de magnesi	4 mM

4. Lectura de les absorbàncies

Un cop finalitzat el temps d'incubació, passeu a la lectura de les absorbàncies en el espectrofotòmetre amb l'ajut del monitor. Recordeu que la longitud d'ona serà de 340 nm. Primer de tot, a la cubeta de lectura afegiu la solució que utilitzeu com a blanc i ajusteu l'absorbància a zero. Després procediu a construir la recta de calibratge, llegiu sempre l'absorbància començant per les solucions menys concentrades i acabant per les més concentrades. Després d'obtenir la recta de calibratge ja podeu llegir les mostres i calcular-ne la concentració de glucosa.

PRÀCTICA AULA INFORMÀTICA

LA CLONACIÓ



Què és la clonació per transferència nuclear?

La transferència nuclear és una tècnica que es basa en introduir el nucli d'una cèl·lula del donant en una cèl·lula d'un altre individu que prèviament s'ha desnucleat. A partir d'aquí es forma un nou embrió (esquema de l'esquerra). La clonació més coneguda és la que va donar lloc a l'ovella Dolly (Figura 2). Tant en el cas de l'ovella Dolly com de la vedella Uschi, el nucli cel·lular procedia de cèl·lules de la mamella. Quan es realitza la transferència nuclear passa alguna cosa fascinant que encara no acabem d'entendre: el nucli cel·lular, que fins ara estava especialitzat completament en

la seva funció a la mamella, es reprograma, es converteix i es "rejuveneix" en un nucli cel·lular que pot tornar a activar el programa per totes les funcions orgàniques posteriors. Per això, s'atura temporalment el programa genètic i es torna a posar en funcionament mitjançant mecanismes complexos. L'òvul acceptor i el nucli cel·lular funcionen llavors com una unitat comparable als processos que ocorren després de fecundar un òvul. L'èxit d'una transferència nuclear depèn, sobretot, d'aquesta interacció.



Figura 2. L'ovella Dolly (primer mamífer clonat al 1995 a Edinburg) i la vedella Uschi (clonat al 1998 a Munich).

OBJECTIUS DE LA PRÀCTICA

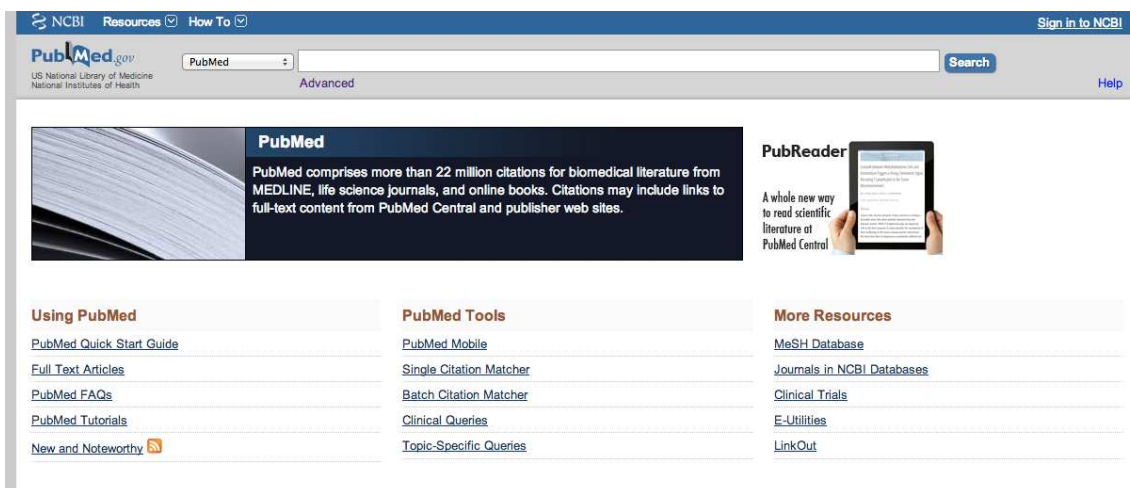
1. CERCA BIBLIOGRÀFICA
2. CLONAR UN RATOLÍ VIRTUALMENT

1. CERCA BIBLIOGRÀFICA

Els científics per tal de donar a conèixer els nous descobriments publiquen els seus resultats en articles que apareixen en revistes científiques especialitzades com Nature, Cell, Science entre d'altres.

Aquestes revistes estan disponibles a Internet i el cercador que concentra tots els articles publicats en l'àrea de la bioquímica i biomedicina és el Pubmed, de la Biblioteca Nacional de Medicina dels Estats Units:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>



La cerca d'articles d'un determinat tema es realitza mitjançant l'ús de paraules clau. Quan s'introdueix una cadena de cerca, com poden ser unes paraules clau sobre un determinat experiment o informació del nostre interès, s'obté una llista amb tots els articles que parlen d'aquell experiment o tema que es busca. En aquesta llista els articles estan ordenats cronològicament. Tots porten el nom dels autors, el títol i un resum del treball que han fet. Clicant sobre el títol es pot accedir a l'article complet.

Cerca d'articles científics amb paraules clau:

1. Buscar l'article original on descriu la clonació del primer mamífer: L'ovella Dolly. Paraules clau a introduir en el camp: **sheep cloned wilmur**.
2. Seria possible clonar un animal que s'ha extingit? Paraules clau: **Capra pyrenaica cloning**.
3. Seria possible clonar espècies que es van extingir?. Per exemple un MAMUT (fa 10.000 anys que es van extingir)? Paraules clau: **cloned mammoth**.
4. I un dinosaure, extingit fa 65 milions d'anys? Seria possible? Paraules clau: **Tyrannosaurus rex Toporski**.
5. I a un humà, seria possible clonar-lo? S'ha fet ja? Paraules clau: **human blastocyt cloned Hwang**.
6. I a un neandertal? Com ha saltat recentment a la premsa: **El profesor George Church, de la Harvard Medical School, quiere traer de nuevo a la vida a nuestro extinto ancestro, el Neardental. Church, uno de los genetistas más reconocidos a nivel**

mundial, dice contar con los medios necesarios para clonar a un Neandertal a partir de la extracción de ADN de antiguos fósiles

2. CLONAR UN RATOLÍ VIRTUALMENT

Seguiu els següents passos:

- Ens dirigim a la següent adreça: <http://learn.genetics.utah.edu/>
- Cliquem a **GENETIC TECHNOLOGY**
- Cliquem a **CLONING**
- I finalment cliquem a **CLICK AND CLONE** (<http://learn.genetics.utah.edu/content/tech/cloning/clickandclone/>)

En aquest recorregut virtual tindrem la missió de crear un clon genèticament idèntic d'una ratolina de pèl de color marró, la Mimi.

- Cliquem a sobre la Mimi i comencem el procés.
- Ens apareixen tots els materials, instruments i ratolins que ens calen per fer aquesta clonació.
- Cliquem LET'S CLONE MIMI.
- I ens apareixen els diferents passos que té el protocol de clonació:
 1. Aïllar les **cèl·lules somàtiques donadores** de la Mimi (ratolina que volem clonar) i de la Megdo (donadora de l'**òvul**). Tot aquest procés es realitzarà "in vitro", és a dir, en una placa de Petri.
 2. **Eliminar el nucli de l'òvul.**
 3. **Transferir el nucli** de la cèl·lula somàtica de la Mimi (allà on hi ha tota la informació genètica que defineix la Mimi) a l'òvul que ja no té el nucli (i que contenia tota la informació genètica de la Megdo). Cal un temps perquè el DNA del nucli s'adapti a la nova situació i pugui continuar el procés.
 4. **Estimulem la divisió cel·lular** (mitosi) perquè es comenci a dividir l'òvul i es desenvolupi l'embrió (concretament la mòrula, que són 16 cèl·lules). Aquesta estimulació és necessària en el procés "in vitro", contràriament a la situació "in vivo" on l'inici de divisió s'estimula quan els espermatozous fertilitzen l'òvul.
 5. **Implantem l'embrió a la "mare de lloguer"**, la Momi, que serà qui l'acollirà en el seu úter i qui finalment donarà a llum la ratolina clonada.
 6. Després de 19-21 dies s'acabarà l'embaràs, i la ratolina clonada neixerà.
 7. **PREGUNTA:** de quin color creieu que serà la ratolina clonada?
 - a. marró com la donant del nucli.
 - b. negre com la donant de l'òvul
 - c. blanca com la "mare de lloguer".

PRECIPITACIÓ DE LA CASEÏNA DE LA LLET PER ACCIÓ DEL pH

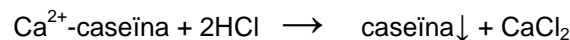
OBJECTIU:

Extreure la caseïna de la llet.

FONAMENT:

La llet conté més de 25 proteïnes diferents però predominen les anomenades caseïnes. En realitat la caseïna és una barreja de quatre proteïnes. La més abundant en la llet de vaca és la caseïna alfa 1 formada per una cadena de 199 aminoàcids. Depenent del pH del medi els aminoàcids poden tenir càrrega positiva, negativa o compensada. Per tant, la càrrega d'una proteïna depèn del tipus d'aminoàcids que la formen i del pH del medi en que es troba. El pH de la llet és ~ 6,6. A aquest pH la caseïna té càrrega negativa i és soluble. La caseïna es present a la llet com a sal càlcica (caseïnat de calci, on les diferents caseïnes formen una micel·la soluble). El punt isoelèctric de la caseïna és a pH=4,8. El punt isoelèctric d'una proteïna és aquell pH en el qual la càrrega neta de la proteïna és zero (mateix nombre de càrregues + i -). La solubilitat és més elevada quantes més formes iòniques hi ha, per tant, per les proteïnes la seva solubilitat és mínima en el punt isoelèctric.

Quan afegim àcid es protonen els grups fosfat, neutralitzant les càrregues negatives, i la proteïna precipita, mentre que els ions Ca^{2+} queden a la dissolució.



El precipitat és un sòlid blanc-groguenc, sense olor, ni sabor, insoluble en aigua, però que es solubilitza en medis bàsics i àcids, com per exemple NaOH o HCl, amb els que forma caseïnats de sodi o clorhidrats de caseïna, respectivament.

PROCEDIMENT:

- 1) En un tub d'assaig s'addiciona 5 mL de llet que prèviament s'ha diluït amb aigua a una proporció 1:4.
- 2) Amb l'ajuda d'una micropipeta s'addiciona 350 μL d'àcid clorhídric 0,1 M.
- 3) S'observa l'aparició d'un sòlid blanc indicant-nos que hem assolit un pH al voltant de 4,8, que és el punt isoelèctric de la caseïna.
- 4) Cal agitar amb compte i esperar uns minuts a que tota la caseïna es precipiti al fons de tub
- 5) Per assegurar-nos i comprovar que el precipitat blanc és la proteïna caseïna i no pas un altre compost, es pot redissoldre afegint 350 μL d'hidròxid de sodi 0,1 M. La caseïna es redissolt formant caseïnats de sodi.

SEPARACIÓ DE PROTEÏNES EN UN GEL SDS-PAGE

L'electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS (SDS-PAGE) és el sistema més clàssic per resoldre barreges de proteïnes segons la seva mida. La tècnica fou descrita per Laemmli (1970). L'extracte proteic es tracta amb tampó de Laemmli, que conté SDS (dodecilsulfat de sodi). L' SDS és un detergent que s'afegeix per solubilitzar les mostres i conferir càrrega negativa a les proteïnes i mantenir la relació càrrega/massa constant. La mostra de proteïnes es fa córrer a través d'un gel, que és una malla d'un polímer d'acrilamida-bisacrilamida, per l'acció d'un camp elèctric. Els gels de poliacrilamida s'obtenen per la polimerització de molècules d'acrilamida i bisacrilamida, les quals formen una xarxa tridimensional. En aquesta malla tridimensional, la mida dels porus depèn de la concentració d'acrilamida i de bisacrilamida. Quant menor sigui la concentració d'acrilamida més gran és la mida del porus;

però la mida del porus també varia segons quina sigui la proporció de bisacrilamida. Quant més gran és la proporció de bisacrilamida respecte la de l'acrilamida, la mida del porus disminueix perquè es formen més ramificacions.

En aquest tipus d'electroforesi s'utilitzen dues classes de gels de diferent concentració d'acrilamida i diferent pH: el gel concentrador (stacking) a la part superior, en el qual es fan els pous; i el gel separador (running) a la part inferior. El primer té com a finalitat apilar les proteïnes davant l'inici del gel de corredua, i té una composició d'acrilamida del 4% (pes/volum). El gel separador és més espès i té la finalitat de separar les proteïnes per la seva grandària; en el nostre cas és d'un 10% d'acrilamida (pes/volum).

Per revelar les proteïnes presents en el gel, és fa servir un colorant específic de proteïnes que és el blau de coomassie. El revelat és un procés que consta de dues etapes:

- Tinció: el gel es submergeix en una solució colorant formada per 0,25% (pes/volum) de blau de coomassie, 10% (volum/volum) d'àcid acètic i 25% (volum/volum) d'isopropanol.

- Destinció: es destenyeix el gel amb la solució de destinació composta per un 10% (volum/volum) d'àcid acètic i 25% (volum/volum) d'isopropanol.

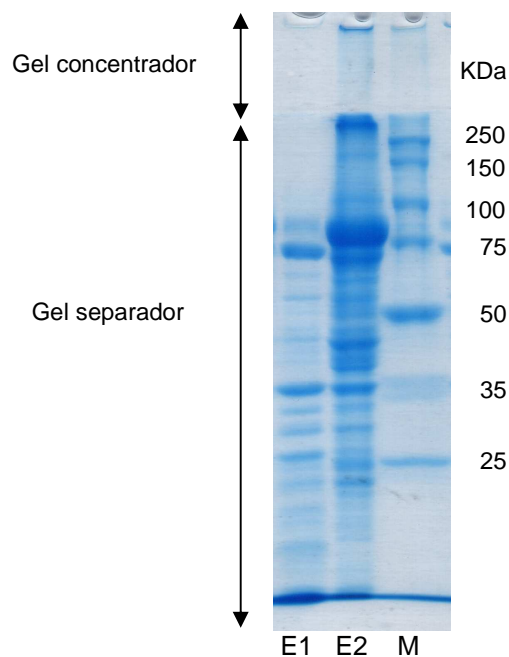


Figura 1. Gel concentrador del 4% (pes/volum) d'acrilamida seguit pel gel separador del 10% (pes/volum) d'acrilamida on es poden observar dos extractes proteics diferents (E1 i E2) i un marcador de pes molecular (M).