

## **II-MATERIALS I MÈTODES**

## 1. OBTENCIÓ DE PROTEÏNES

### 1.1 Obtenció de nucleoplasmina nativa de *Xenopus laevis*

#### Obtenció i dissecció de les granotes

La nucleoplasmina s'extreu a partir dels ous de femelles sexualment madures de la granota *Xenopus laevis*. Les granotes es van adquirir al *Centre National de la Recherche Scientifique*, Montpeller (França) i es van transportar fins a Barcelona dins de bosses de plàstic foradades que contenien trossos d'escuma molla. Es va condicionar com a aquari una pica amb aigua corrent en la qual, mitjançant la circulació de l'aigua d'entrada a través d'un canal obert, s'afavoria l'evaporació del clor.

Les granotes són de color marró fosc amb algunes taques negres. Externament estan envoltades per una capa de mucus protector que les fa relliscoses i difícils d'agafar. Són animals totalment aquàtics. Les femelles solen ser més grans que els mascles i tenen vàlvules cloacals. El tret distintiu dels mascles sexualment madurs són els anomenats *coixinets nupcials* o taca negra a la part interior de l'avantbraç.

Les granotes es treuen de l'aquari amb l'ajut d'un salabret i per adormir-les i insensibilitzar-les es cobreixen totalment amb gel (anestèsia per hipotèrmia). Cal deixar-les com a mínim una hora a la cambra freda cobertes de gel, abans de poder començar la dissecció. Per disseccionar-les, s'ha de col·locar l'animal en una safata i cobrir-lo totalment amb gel, excepte la part ventral. Cal obrir les granotes fent una incisió en l'abdomen i retirar la pell i la capa muscular exterior fins a deixar al descobert tota la cavitat abdominal. Els ovaris són molt visibles i els oòcits estan agrupats en raïms de color verd marronós. Cal anar tallant els ovaris i dipositar-los en el tampó de rentat OR2 en fred (vegeu la taula II.1). Les granotes se sacrifiquen tallant-los el cor.

#### Processament dels ous i obtenció de nucleoplasmina

Es van processar els ovaris d'unes trenta granotes. Els ovaris es renten diverses vegades amb tampó (volum total aproximat 2 litres) per eliminar les restes de sang i impureses. Al protocol 1 es detallen els passos que es van seguir per obtenir extractes de nucleoplasmina de *Xenopus* i a la taula II.1 es mostra la composició dels tampons utilitzats.

**Taula II.1 Tampons usats en l'obtenció de nucleoplasmina de *Xenopus laevis***

<b>Tampons per a l'obtenció de NP de <i>X. laevis</i></b>		
<u>tampó de rentat OR2</u> 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM CaCl <sub>2</sub> 5 mM Hepes pH 7,5 1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 82,5 mM NaCl 2,5 mM KCl	<u>tampó d'homogeneïtzació</u> 1 mM EGTA 1 mM PMSF 10 mM clorur de benzamidina	<u>tampó de processament</u> 10% etilenglicol 250 mM sacarosa 100 mM NaCl 25 mM MgCl <sub>2</sub> 2 mM DTT 10 mM Hepes pH 7,5 1 mM EGTA 1 mM PMSF 10 mM clorur de benzamidina

**Protocol 1. Obtenció de nucleoplasmina de *Xenopus laevis*.** En els passos de centrifugació s'han utilitzat tubs i rotor GSA i una centrífuga Sorvall.

<b>Obtenció de NP de <i>X. laevis</i></b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1- Renteu els ovaris amb tampó de rentat OR2 fent diversos canvis, fins a eliminar les restes de sang i les impureses.</li> <li>2- Afegiu-hi 1 volum de solució d'homogeneïtzació i homogeneïtzeu amb batedora (velocitat mitjana, 30").</li> <li>3- Afegiu-hi 1 volum de tampó de processament.</li> <li>4- Centrifugueu durant 15 minuts a 16.300 g (4 °C).</li> <li>5- Filtreu el sobrenedant amb gasa (quatre capes) i posteriorment reclarifiqueu el filtrat amb tela empesa. El filtrat final l'anomenem <i>extracte inicial</i>.</li> <li>6- Afegiu-hi 1 volum de triclorotrifluoroetà (TCTFE) per extreure els lípids i agiteu.</li> <li>7- Centrifugueu durant 10 minuts a 4.000 g (4 °C) per separar les dues fases.</li> <li>8- Separeu la fase aquosa superior (on hi haurà les proteïnes).</li> <li>9- (Opcional) Reclarifiqueu el sobrenedant del pas 8, centrifugueu durant 15 minuts a 16.300 g (4 °C) i separeu la fase aquosa superior.</li> <li>10- Afegiu-hi 0,0025 volums de PMSF 34 mM (per optimitzar la precipitació de proteïnes).</li> <li>11- Escalfeu a 80 °C durant 15 minuts.</li> <li>12- Centrifugueu durant 30 minuts a 16.300 g (4 °C).</li> <li>13- Separeu el sobrenedant termoestable (on hi haurà la nucleoplasmina).</li> <li>14- Porteu al 55% de saturació amb sulfat amònic i deixeu precipitar tota la nit a 4°C (la NP és soluble a aquest percentatge de saturació amb sulfat amònic).</li> <li>15- Centrifugueu durant 10 minuts a 16.300 g i separeu el sobrenedant (repetiu aquest pas si és necessari).</li> <li>16- Purifiqueu el sobrenedant per cromatografia de fenilsefarosa (v. l'apartat 2.2) aplicant un gradient de 2,25 M a 0 M de sulfat amònic en Tris 20 mM pH 7,5.</li> </ol>

## 1.2 Obtenció de nucleoplasmina recombinant

### 1.2.1 El sistema d'expressió pET

El sistema de plasmidis pET (Novagen) és un dels més utilitzats per al clonatge i l'expressió de proteïnes recombinants en *Escherichia coli*. Aquests plasmidis deriven del plasmidi pBR322. Els vectors pET es troben sota el control de forts senyals de transcripció i traducció del bacteriòfag T7. L'expressió serà induïda gràcies a una font de T7 RNA polimerasa en el cromosoma bacterià de la cèl·lula hoste, dirigida sota el control del promotor lacUV5, que és activat per IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosid). La T7 RNA polimerasa s'unirà al seu promotor i permetrà la transcripció del gen recombinant, que es troba sota el control del promotor T7. Els vectors originals pET van ser desenvolupats per Studier i Moffatt (1986) i Rosenberg et al. (1987); posteriorment se n'han anat desenvolupant noves versions millorades. Com a hostes d'expressió se solen utilitzar les soques d'*E. coli* BL21  $\lambda$ DE3 lisogèniques. Aquestes soques són defectives per la proteasa lon i per la proteasa de la membrana externa ompT, que podrien degradar proteïnes durant l'expressió i la purificació (Grodberg i Dunn, 1988).

En absència d'IPTG hi pot haver una mica d'expressió basal de T7 RNA polimerasa a partir del promotor lacUV5; això pot ser força problemàtic si el producte del gen clonat és tòxic per al bacteri. Per evitar aquest problema hi ha diverses estratègies:

#### a) vectors amb el promotor T7 lac

Aquest tipus de vectors tenen l'operador lac just després del promotor T7 i tenen el gen lacI que codifica pel repressor lac (Studier et al., 1990; Dubendorff i Studier, 1991). Quan no hi ha inducció, el repressor lac actua reprimint tant el promotor lacUV5 (i impedeix la transcripció de la T7 RNA polimerasa) com el promotor T7 (i impedeix la transcripció de la proteïna recombinant).

#### b) soques pLysS

Són soques d'*E. coli* BL21(DE3) que porten el plasmidi pLysS, que confereix resistència al cloramfenicol i codifica pel T7 lisozim, el qual actua com a inhibidor natural de la T7 RNA polimerasa (Moffatt i Studier, 1987; Studier, 1991). El lisozim és una proteïna bifuncional: d'una banda s'uneix a la RNA polimerasa i inhibeix la transcripció, i de l'altra, talla un enllaç específic en la capa de peptidoglicà de la paret bacteriana. La quantitat de lisozim produïda per aquestes soques pot ser tolerada pel bacteri, ja que és incapaç de passar a través de la membrana interna i arribar a la paret i permet inhibir la possible RNA polimerasa present en estat basal. No obstant això, quan hi ha inducció no hi ha prou lisozim per inhibir la gran quantitat de T7 RNA polimerasa produïda, la qual cosa permet l'expressió del gen clonat. La presència de lisozim té com a avantatge addicional el fet d'augmentar l'eficiència del procés de lisi cel·lular, que facilita l'alliberació de la proteïna recombinant cap al medi.

Per al clonatge de diferents formes de nucleoplasmina s'han utilitzat vectors pET dels tipus pET-16b i pET-20b. A la figura II.1 s'esquematitza el mapa dels plasmidis pET utilitzats i un detall de la regió de clonatge i expressió.

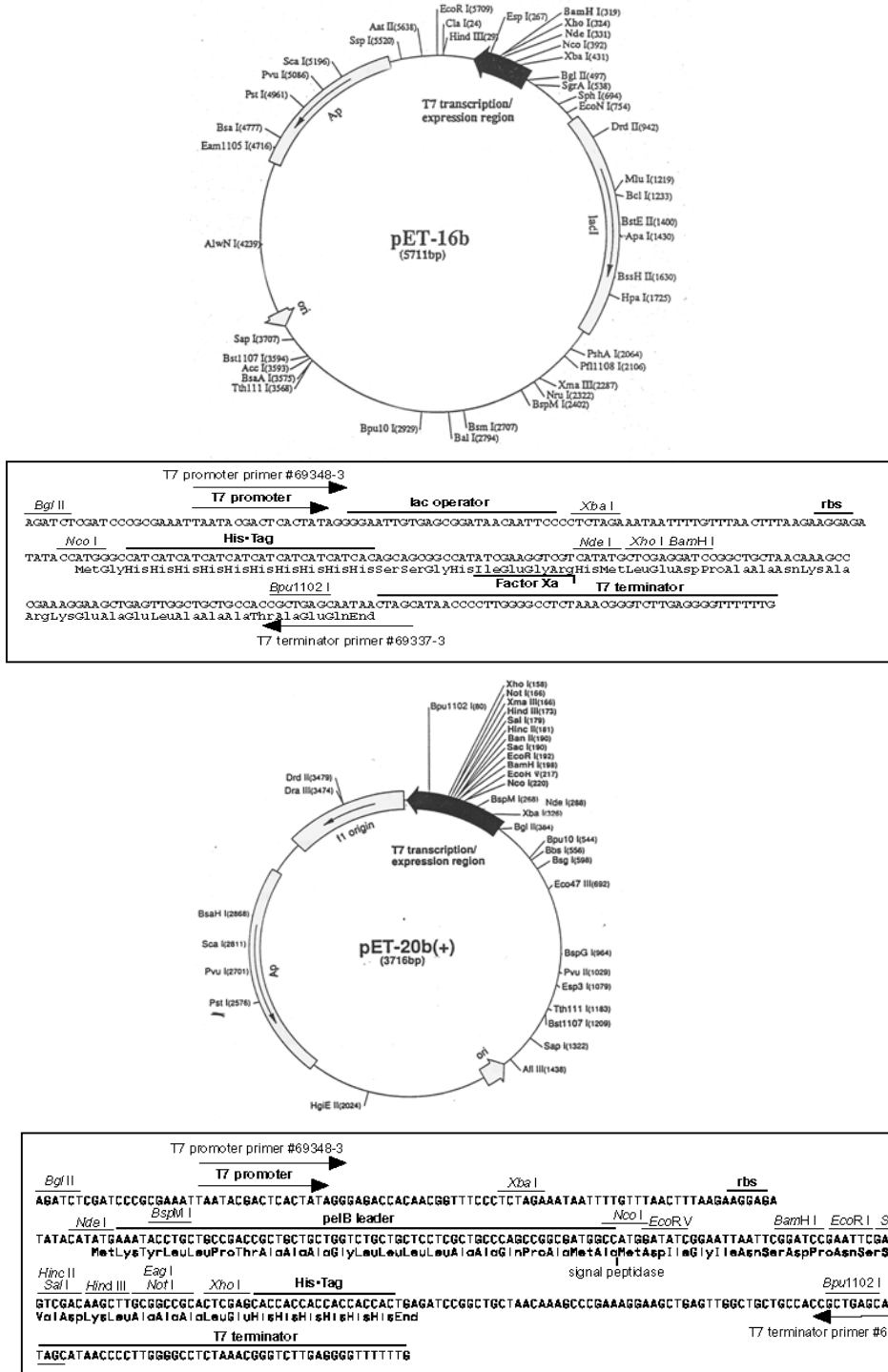


Fig. II.1 Plasmidis pET per a l'expressió de proteïnes en *E. coli*. Es representen els plasmidis pET-16b i pET-20b (Novagen) i un detall de la regió de clonatge. Ambdós plasmidis confereixen resistència a l'ampicil·lina.

### 1.2.2 Expressió de nucleoplasmina recombinant en *E. coli*

El clon de nucleoplasmina utilitzat en aquest treball correspon al publicat per Bürglin et al. (1987) (núm. de seqüència Y00204 a l'NCBI-GenBank). El clon original prové del plasmidi pET16b-NED cedit pel Dr. J. F. Kalinich (*Armed Forces Radiology Research Institute*, Bethesda, MD). Posteriorment s'han fet diferents modificacions a partir del clon original (v. l'apartat III-2.1).

#### Obtenció de bacteris competents

Els bacteris poden adquirir DNA del medi en el procés denominat *transformació*. La majoria de mètodes de transformació bacteriana es basen en les observacions de Mandel i Higa (1970), que van mostrar que bacteris tractats amb solucions fredes de clorur càlcic i després breument escalfats podien ser transfectats amb el DNA del fag lambda. El mateix mètode va ser utilitzat per transformar bacteris amb plasmidis (Cohen et al., 1972). El tractament de competència indueix un estat transitori en el qual els bacteris són capaços d'adquirir DNA del medi (vegeu el protocol 2).

**Protocol 2. Obtenció de bacteris competents.** Mètode del MgCl<sub>2</sub> i CaCl<sub>2</sub>. Tot el procés s'ha de fer en fred i en condicions estèrils (material autoclavat i treballant a la flama).

<b>BACTERIS COMPETENTS</b>
1- Feu un cultiu en càpsula de la soca bacteriana desitjada i incubeu-la O/N a 37 °C.
2- Inoculeu un tub amb 3 ml de medi LB i feu créixer O/N a 37 °C i 250 rpm.
3- Inoculeu 250 ml de medi LB fresc amb els 3 ml del cultiu O/N i deixeu créixer a 37 °C i 250 rpm fins a arribar a una DO a 600 nm de 0,7.
(Per conservar un nou estoc de la soca bacteriana podem congelar 1,5 ml de cultiu O/N + 0,5 ml de glicerol al 60% (autoclavat) i guardar-ho a -80 °C).
4- Centrifugueu el cultiu repartit en dos tubs a 4.000 g, durant 5 minuts, 4 °C (centrífuga Sorvall, rotor GSA), i descarteu el sobrenedant.
5- Resuspeneu el sediment amb 50 ml (25 ml/tub) de MgCl <sub>2</sub> 100 mM (fred) i incubeu en gel 30 minuts.
6- Centrifugueu a 4.000 g, 5 minuts i a 4 °C, i descarteu el sobrenedant.
7- Resuspeneu el sediment amb 50 ml (25 ml/tub) de CaCl <sub>2</sub> 100 mM (fred) i deixeu en gel de 30 a 90 minuts.
8- Centrifugueu a 4.000 g, durant 5 minuts i a 4 °C, i descarteu el sobrenedant.
9- Resuspeneu el sediment amb 20 ml de CaCl <sub>2</sub> 85 mM - 15% glicerol (10 ml / tub) (prepareu-lo al moment barrejant 15 ml de CaCl <sub>2</sub> 100 mM + 5 ml de glicerol 60%).
10- Feu alíquotes de 200 µl de cèl·lules competents (en tubs estèrils i en fred) i congeleu immediatament a -80 °C.

### Transformació bacteriana

La transformació consisteix a introduir DNA exogen a l'interior de bacteris competents (vegeu el protocol 2). En el nostre cas introduïm el plasmidi que conté el cDNA de la NP en cèl·lules d'*E. coli* BL21(DE3)pLysS. En el protocol 3 es detalla el procés de transformació bacteriana. Convé utilitzar alíquotes de cèl·lules competents d'un sol ús per evitar congelar/descongelar diverses vegades, ja que es perd eficiència de transformació.

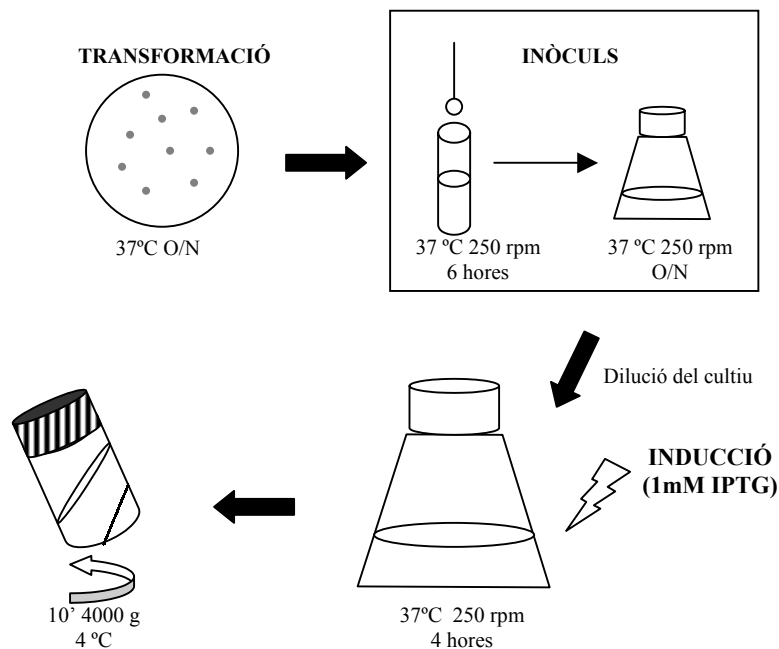
#### **Protocol 3. Transformació d'*E. coli*.**

<b>TRANSFORMACIÓ BACTERIANA</b>
1- Descongeleu 100 µl de cèl·lules competents (en gel) i afegiu-hi 0,05-0,1 µg de plasmidi (barregeu donant uns copets al tub).
2- Incubeu en gel durant 15 minuts.
3- Incubeu durant 5 minuts a 37 °C (en un bany d'aigua).
4- Refredeu durant 2 minuts en gel.
5- Afegiu-hi 1 ml de medi LB (vegeu l'apèndix A) i incubeu durant 1 hora a 37 °C (al bany).
6- Centrifugueu durant 3 minuts a 4.000 rpm en una microcentrífuga. Extraieu 1 ml del sobrenedant i resuspeneu les cèl·lules sedimentades amb els 100 µl restants.
7- Escampeu sobre càpsules d'LB + ampicil·lina (50 µg/ml) i incubeu O/N a 37 °C.

### Inducció i expressió

Inicialment haurem de preparar un inòcul de cèl·lules transformades en medi líquid (vegeu la fig. II.2). Picarem una única colònia de la càpsula de transformació en un tub amb 3 ml d'LB + ampicil·lina (50 µg/ml) i ho deixarem créixer aproximadament durant 6 hores a 37 °C i agitació orbital (250 rpm), en incubadora Certomat (B. Braun Biotech International), fins que veiem terbolesa. Inocularem tot el contingut del tub sobre medi fresc amb antibiòtic (25-50 ml) i ho deixarem créixer O/N a 37 °C i 250 rpm. Per aconseguir un bon aireig del medi convé que aquest ocupi només el 20% del volum total de l'Erlenmeyer. Si treballem amb soques d'*E. coli* pLysS, és convenient afegir també cloramfenicol (25 µg/ml) al medi, per assegurar comprovar la conservació del plasmidi pLysS.

Per preparar el cultiu d'expressió, diluirem el cultiu O/N sobre medi fresc amb antibiòtic (1 litre) fins a aconseguir una DO a 600 nm de 0,1-0,2. Deixarem créixer el cultiu a 37 °C i agitació de 250 rpm durant aproximadament 1,5-2 hores fins a aconseguir una DO a 600 nm de 0,6-0,8. En aquest punt iniciarem la inducció afegint-hi 1 mM d'IPTG. Deixarem créixer el cultiu durant 3-4 hores en les mateixes condicions de temperatura i agitació. Finalment recollirem les cèl·lules per centrifugació en pots GSA a 4.000 g durant 10 minuts a 4 °C (en centrífuga Sorvall). Decantarem el medi i congelarem les cèl·lules a -80 °C fins al moment de processar-les.



**Fig. II.2 Expressió de proteïna recombinant en *E. coli*** (vegeu el text per a més detalls).

### Processament dels pèl·lets bacterians i obtenció de nucleoplasmina

Caldrà descongelar els pèl·lets bacterians en gel i resuspendre'ls amb el tampó adequat i un còctel d'inhibidors de proteases (v. apèndix B) per minimitzar la degradació de proteïna. Si treballem amb cèl·lules pLysS, el pas de congelació/descongelació afavorirà un trencament de la membrana interna i l'alliberació del lisozim cap al periplasma bacterià i permetrà el seu contacte amb la



paret bacteriana, cosa que n'afavorirà la lisi. Els diferents passos del processament dels pèl·lets bacterians s'esquematitzen en el protocol 4.

Una vegada trencades les cèl·lules, preferiblement mitjançant sonicació, se sotmet l'extracte bacterià a un xoc tèrmic a 80 °C durant 10 minuts. La nucleoplasmina és una proteïna termoestable i romandrà soluble en aquestes condicions, mentre que bona part de les proteïnes bacterianes precipitaran i podran ser separades per centrifugació. D'aquesta manera obtindrem extractes enriquits en nucleoplasmina, que anomenem *sobrenedants termoestables*.

**Protocol 4. Processament dels pèl·lets bacterians i obtenció d'extractes enriquits en nucleoplasmina.**

<b>Processament dels pèl·lets bacterians i obtenció de NP</b>
1- Resuspeneu el pèl·let bacterià amb el tampó adequat (30 ml/L cultiu) que contingui inhibidors de proteases (vegeu l'apèndix B). Obtindrem l'extracte inicial.
2a- Trenqueu les cèl·lules mitjançant ultrasons, 20 segons x 3 vegades ( <i>microtip</i> , intensitat 7, sonicador Branson Sonic Power Company).
2b- Com a alternativa al pas de sonicació es pot fer una digestió amb DNasa 20 µg/ml i MgCl <sub>2</sub> 10 mM durant 10 minuts a temperatura ambient (fins que la barreja no quedi viscosa).
3- Centrifugueu l'extracte sonicat durant 10 minuts a 5.900 g i a 4 °C i separeu el sobrenedant que contindrà les proteïnes solubles (al sediment romandran les restes cel·lulars).
4- Xoc tèrmic a 80 °C durant 10 minuts per precipitar altres proteïnes (la NP és termoestable i romandrà soluble).
5- Centrifugueu a 17.300 g durant 30 minuts a 4 °C i separeu el sobrenedant termoestable.

**1.3 Obtenció de proteïnes d'oòcits i espermatozoides d'*Echinaster sepositus***

Les estrelles de mar *Echinaster sepositus* (estrella vermella) es van recollir al Port de la Selva (Girona) el mes de juliol i es van transportar cap a Barcelona en recipients que contienien aigua de mar freda. Es van guardar en aigua de mar a 4 °C fins al moment de la dissecció.

Els animals s'han d'obrir ventralment fent una incisió en l'esquelet intern i tallant en direcció a cada una de les cinc extremitats. Aquests animals tenen simetria pentaradial i el seu sistema reproductor està repartit entre els cinc braços.

Obtenció de proteïnes termoestables de l'òocit

Es van dissecar les femelles per extreure'n els òocits, els quals es troben agrupats en raïms i són de color vermell intens. Per processar els òocits de l'estrella de mar es va seguir el mateix protocol utilitzat per a la nucleoplasmina de *Xenopus* (vegeu el protocol 1 i la taula II.1). En el pas 2 del protocol 1, es va utilitzar un homogeneïtzador Dounce en comptes de la batidora. Una vegada precipitada la mostra amb sulfat amònic i un cop separat el sobrenedant del sediment (pas 15 del protocol 1), es va bombollear amb N<sub>2</sub> la fracció del sobrenedant i es va guardar a 4 °C.

Obtenció de proteïnes espermàtiques bàsiques

Es van dissecar els mascles per extreure'n la gònada masculina i obtenir les proteïnes espermàtiques bàsiques. S'utilitza un protocol d'extracció basat en la solubilització de proteïnes amb àcid clorhídric seguint un protocol modificat de Saperas (1992), (protocol 5).

**Protocol 5. Extracció de proteïnes espermàtiques bàsiques.**

<b>Extracció de proteïnes espermàtiques bàsiques (PEB)</b>
1- Disgregueu la gònada masculina en aigua de mar (50 ml d'H <sub>2</sub> O per 10 g de gònada) i homogeneïtzeu lleugerament amb un Dounce.
2- Filtreu l'homogenat de gònada amb gasa.
3- Centrifugueu el filtrat durant 10 minuts a 4.000 g (4 °C) i descarteu el sobrenedant.
4- Resuspeneu el sediment amb HCl 0,24 N i deixeu solubilitzar la barreja O/N a 4 °C i en agitació.
6- Centrifugueu durant 15 minuts a 16.000 g (4 °C).
7- Recupereu el sobrenedant i filtreu-lo amb gasa.
8- Afegiu-hi 6 volums d'acetona freda i remeneu bé.
9- Deixeu precipitar 4 hores a -20 °C.
10- Centrifugueu durant 15 minuts a 16.000 g (4 °C) i descarteu el sobrenedant.
11- Renteu el sediment amb acetona.
12- Centrifugueu durant 15 minuts a 16.000 g (4 °C) i descarteu el sobrenedant (si cal, es pot tornar a centrifugar).
13- Assequeu el sediment en un dessecador connectat a la trompa de buit.

#### 1.4 Obtenció de protamina de *Dicentrarchus labrax*

La protamina s'ha obtingut a partir de nuclis espermàtics del peix *Dicentrarchus labrax* (llobarro). S'ha utilitzat la solubilització en àcids. Inicialment, s'homogeneïtzen els nuclis espermàtics i es fa una extracció amb 4-5 volums d'àcid acètic al 35%, que extreu les proteïnes de tipus histona, segons el mètode descrit per Subirana et al. (1973). Posteriorment, se centrifuga la mostra (10 minuts a 11.000 g), se solubilitzen les protamines del sediment en 4-5 volums d' HCl 0,4 N i es precipiten amb 6 volums d'acetona. Finalment, es purifica l'extracte mitjançant una columna d'intercanvi catiònic (CM52, Whatman) eluint la protamina en un gradient de 0,8 M a 2 M de NaCl en tampó acetat sòdic 50 mM pH 6.

#### 1.5 Obtenció de proteïna $\phi_0$ d'*Holothuria tubulosa*

L'extracció de la proteïna  $\phi_0$  s'ha fet a partir de mascles de l'holotúria *Holothuria tubulosa* (cogombre de mar) recollits durant el mes de juliol al Port de la Selva (Girona). Aquests animals es van transportar fins a Barcelona dins de recipients que contenien aigua de mar freda.

Inicialment s'obtenen els nuclis espermàtics per homogeneïtzació en NaCl 150 mM i cacodilat sòdic 10 mM pH 7,5 i posterior filtració. Les histones s'extreuen amb HCl 0,4 N i se centrifuga la mostra (10 minuts a 4.000 g). A partir de la fracció del sobrenedant s'insolubilitzen les histones amb àcid perclòric al 5% i queden solubles la histona H1 i la proteïna  $\phi_0$ . Se centrifuga la mostra (15 minuts a 16.300 g) i el sobrenedant es precipita amb 6 volums d'acetona i s'asseca a la trompa de buit.

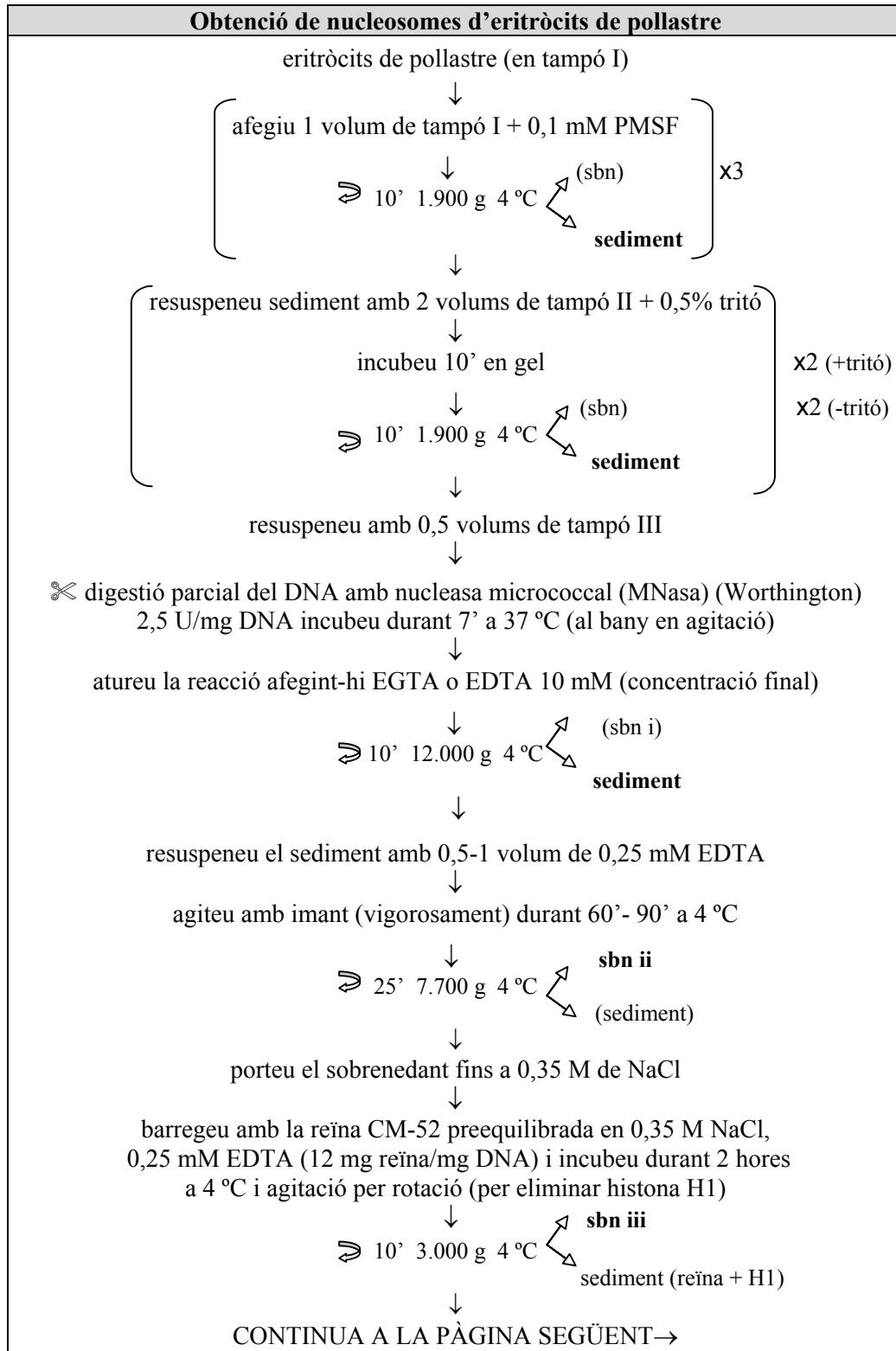
La proteïna seca (que conté una barreja d'histona H1 i proteïna  $\phi_0$ ) es dissol en HCl 0,1 N i es dialitza enfront d'acetat sòdic 50 mM pH 6,7, NaCl 0,8 M i azida sòdica 0,02%. Una vegada dialitzada, es purificarà mitjançant cromatografia d'intercanvi catiònic usant una reïna de carboximetil-Sephadex C25 i eluint-la en un gradient de 0,8 M a 2 M de NaCl en 50 mM d'acetat sòdic pH 6,7, segons un mètode modificat a partir de Casas et al. (1989). Posteriorment, la mostra purificada es dialitza enfront d'H<sub>2</sub>O i es liofilitza.

#### 1.6 Obtenció d'histones d'eritròcits de pollastre

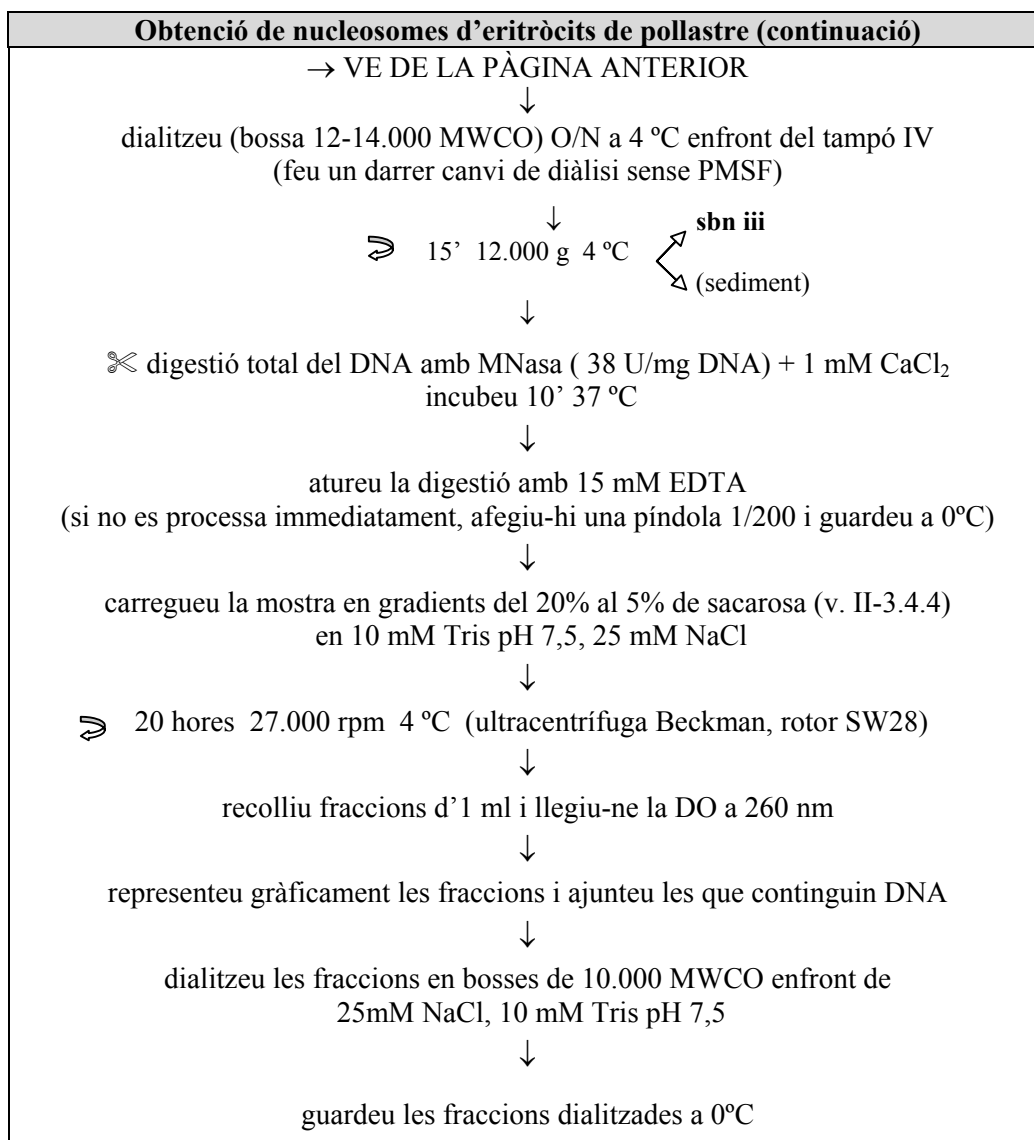
##### 1.6.1 Obtenció de nucleosomes

Els nucleosomes s'han obtingut a partir d'eritròcits de pollastre, els quals es guarden congelats a -80 °C en tampó I (vegeu la taula II.2 i el protocol 6). Els nucleosomes d'eritròcit de pollastre van ser proporcionats pel Dr. Joan Ausió, Universitat de Victoria (Canadà), i la part corresponent a l'obtenció de nucleosomes i purificació d'histones es va realitzar durant l'estada al seu laboratori.

**Protocol 6. Obtenció de nucleosomes d'eritròcits de pollastre.** Els volums són respecte al volum inicial de mostra. A cada pas de centrifugació s'indica en negreta la fracció que es conserva. La píndola indica barreja d'inhibidors de proteases (v. apèndix B). La concentració de nucleosomes és en funció de la quantitat de DNA, segons la relació: 1 DO 260 nm = 50 µg/ml.



**Protocol 6 (continuació). Obtenció de nucleosomes d'eritròcits de pollastre.**



**Taula II.2 Tampons per l'obtenció de nucleosomes.**

Tampons per a l'obtenció de nucleosomes			
<u>tampó I</u>	<u>tampó II</u>	<u>tampó III</u>	<u>tampó IV</u>
0,15 M NaCl	0,1 M KCl	0,1 M KCl	25 mM NaCl
15 mM citrat sòdic	50 mM Tris pH 7,5	50 mM Tris pH 7,5	10 mM Tris pH 7,5
10 mM fosfat sòdic pH 6.8	1 mM MgCl <sub>2</sub>	1 mM CaCl <sub>2</sub>	0,1 mM PMSF
	0,1 mM PMSF (0,5% tritó X-100)		

### 1.6.2 Obtenció d'octàmers d'histones nucleosòmiques

Per obtenir histones es parteix de nucleosomes als quals s'ha d'extreure el DNA. Es van utilitzar nucleosomes d'eritròcit de pollastre purificats (vegeu l'apartat anterior). Per separar les histones i el DNA es va utilitzar una columna d'hidroxiapatita (vegeu l'apartat II-2.1). En el protocol 7 es detallen les condicions de purificació. Les histones s'elueixen amb 2M de NaCl i a aquesta força iònica es poden mantenir agrupades en forma d'octàmer; per tant, els quatre tipus d'histones estarien en quantitats estequiòmicament equivalents.

**Protocol 7. Purificació d'octàmers d'histones nucleosòmiques.** Protocol d'obtenció d'octàmers d'histones natives a partir de nucleosomes d'eritròcits de pollastre, per purificació en columna d'hidroxiapatita. Els volums són en relació amb el volum de matriu.

<b>Purificació d'octàmers d'histones</b>
1- Equilibreu la columna d'HAP (Bio-Rad DNA-grade) amb 5-10 volums de 0,1 M tampó fosfat sòdic pH 6,8.
2- Carregueu la mostra de nucleosomes en tampó 25 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5.
3- Eluïu les histones en 2 volums de 2 M NaCl, 0,1 M tampó fosfat sòdic pH 6,8.
El flux de la columna és de 0,5-1 volum/hora en tots els passos.

### 1.6.3 Obtenció d'octàmers d'histones nucleosòmiques tripsinitzades

Per obtenir histones sense les cues bàsiques caldrà fer una digestió amb tripsina. La tripsina és un enzim digestiu que trenca específicament aquells enllaços peptídics on el grup carboxílic prové de Lys o Arg. Aquest enzim se sol tractar amb L-1-tosilamido-2-feniletíl clorometilcetona (TPCK) per inhibir l'activitat quimotripsina contaminant.

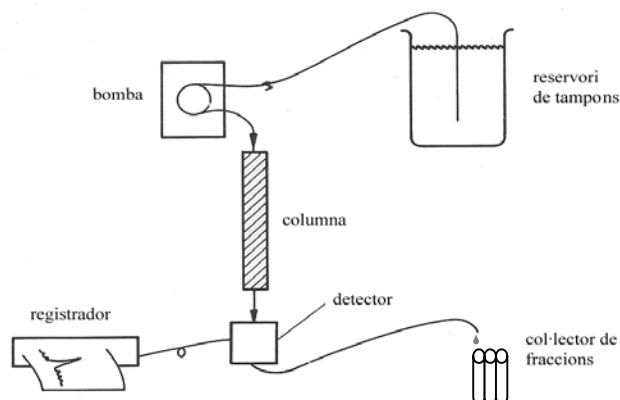
S'ha utilitzat TPCK-tripsina immobilitzada en boles d'agarosa (Pierce). L'avantatge d'utilitzar l'enzim immobilitzat seria una més ràpida i eficient separació de l'enzim després de la digestió, que es pot dur a terme mitjançant una lleugera centrifugació (vegeu el protocol 8). S'han utilitzat nucleosomes d'eritròcit de pollastre, obtinguts segons el protocol 6. És convenient fer un assaig previ de l'activitat de l'enzim, mitjançant una sèrie de digestions a petita escala, per tal d'optimitzar tant la quantitat d'enzim que s'ha d'utilitzar com el temps necessari per a una digestió eficient. Una vegada digerides les histones en forma de nucleosomes, es purifiquen per columna d'hidroxiapatita en les mateixes condicions que per a les histones natives (vegeu el protocol 7).

**Protocol 8. Digestió d'histones nucleosòmiques amb tripsina immobilitzada.**

<b>Digestió amb tripsina immobilitzada</b>
1- Preequilibreu i renteu la matriu amb 20 volums de 25 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5.
2- Deixeu sedimentar la reïna per gravetat o centrifugueu durant 5 minuts a 1.500 g i descarteu el sobrenedant.
3- Repetiu el pas de rentat 5 vegades.
4- Barregeu la mostra i la matriu a raó de 13 unitats de TPCK-tripsina per mg de nucleosomes (estimat segons la quantitat de DNA mitjançant la relació 1 DO a 260 nm = 50 µg/ml).
5- Incubeu durant 70-80 minuts en agitació per rotació (Labquake Shaker) a temperatura ambient.
6- Centrifugueu 5 minuts a 1.500 g (el sobrenedant contindrà la proteïna digerida).

**2. TÈCNiques CROMATOGRÀFIQUES PER PURIFICAR PROTEÏNES**

La cromatografia és la separació diferencial dels components d'una mostra entre una fase mòbil i una fase estacionària. En la majoria de les aplicacions, la fase estacionària consisteix en partícules esfèriques que són empaquetades a l'interior d'una columna. Un empaquetament homogeni és crucial per a uns bons resultats cromatogràfics. El flux serà determinat per acció de la gravetat o bé per sistemes de bombeig (v. fig. II.3).



**Fig. II.3 Components d'un sistema cromatogràfic.** La majoria de sistemes cromatogràfics consten dels components següents: columna cromatogràfica, bomba peristàtica, detector òptic (llegeix la concentració de proteïna eluïda i/o concentració de sal), enregistrator-ordinador (per visualitzar gràficament l'absorbància i/o conductància), col·lector de fraccions. Figura adaptada de Harris (1989).

La barreja de proteïnes que ha de ser separada s'introdueix a la fase mòbil i es deixa que migri a través de la columna. Aquelles proteïnes que tinguin una major atracció per la fase sòlida (estacionària) migraran més lentament. Escollint convenientment la reïna es pot fraccionar la mostra segons diferents principis de separació (càrrega, mida, afinitat, etc.). Convé que tant la mostra com els tampons estiguin lliures d'impureses; per tant, convé centrifugar la mostra i filtrar els tampons abans d'utilitzar-los per a la cromatografia.

## 2.1 Cromatografia d'hidroxiapatita

Les columnes d'hidroxiapatita (HAP), desenvolupades per Tiselius et al. (1956), es componen de fosfat càlcic cristal·lí  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ . El mecanisme d'adsorció de les proteïnes a la matriu implicaria tant els ions  $\text{Ca}^{2+}$  com els ions  $\text{PO}_4^{3-}$ , en una mena d'interacció dipol-dipol. Les proteïnes àcídiques i les de càrrega neutra s'unirien als grups calci, mentre que les proteïnes bàsiques ho farien als grups fosfat (Bernardi, 1971). Algunes proteïnes no complirien aquestes regles.

La matriu que s'ha utilitzat per a aquest tipus de columna ha estat la d'hidroxiapatita DNA-grade de Bio-Rad. Inicialment s'ha d'hidratar i rentar la reïna per posteriorment empaquetar-la dins la carcassa o columna cromatogràfica. Cal pesar una quantitat adequada de matriu; per cada gram de matriu en pols s'obtenen aproximadament 4 ml de matriu hidratada. Aquesta matriu s'ha de resuspendre en 4-5 volums del tampó d'equilibrat, per inversió dins d'una proveta. Posteriorment s'ha de deixar empaquetar i sifonar el sobrenedant, que contindrà impureses i conservants. Cal repetir el rentat un parell de vegades més i finalment empaquetar la reïna dins la columna. És preferible afegir tota la suspensió dins la carcassa d'un sol cop per evitar una sedimentació per estrats, que afectaria negativament els resultats. En el protocol 9 es mostra un esquema de la purificació mitjançant columna d'hidroxiapatita, per a la NP recombinant.

**Protocol 9. Cromatografia d'hidroxiapatita.** Protocol de purificació per a formes de NP recombinant mitjançant cromatografia d'hidroxiapatita. La mostra de partida estarà en tampó 20mM Hepes pH 7,5, 10 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Els volums s'expressen en relació amb el volum de matriu.

<b>CROMATOGRAFIA D'HIDROXIAPATITA</b>
1- Renteu/equilibreu amb 10 volums d'1M NaCl, 20mM Hepes pH 7,5, 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (flux 5 volums/hora).
2- Carregueu la mostra (flux 1 volum/hora).
3- Renteu amb 8 volums de 2M NaCl, 20 mM Hepes pH 7,5, 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .
4- Renteu amb 6 volums de 20 mM Hepes pH 7,5, 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .
5- Renteu amb 8 volums de 20 mM Hepes pH 7,5, 100 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .
6- Gradient (12 volums) entre 100 mM i 300 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4$ en 20 mM Hepes pH 7,5.
7- Renteu amb 8 volums de 20 mM Hepes pH 7,5, 300 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .
(El flux dels passos 3-7 és de 2 volums/hora.)



## 2.2 Cromatografia de fenilsefarosa (interaccions hidrofòbiques)

La hidrofobicitat d'una proteïna serà determinada pel nombre d'aminoàcids apolars que tingui. La majoria d'aquests aminoàcids es trobaran interaccionant hidrofòbicament a l'interior del "glòbul proteic", però alguns es poden trobar a la superfície de la proteïna i exposats al medi.

En aquest tipus de cromatografia se solen utilitzar fases estacionàries basades en polímers hidrofílics com l'agarosa, als quals s'han unit covalentment grups hidrocarbonats com el grup fenil. Generalment, la mostra que s'hi aplica prové d'un pas previ de precipitació amb sulfat amònic que li confereix les condicions idònies per a la seva retenció.

S'han utilitzat matrius de fenilsefarosa CL-4B (Pharmacia Biotech) en les quals el grup fenil està covalentment unit a una matriu d'agarosa al 4% (vegeu el protocol 10). La matriu s'ha de rentar prèviament amb aigua (8 volums repartits en 2 rentats) per extreure'n les restes d'etanol, i finalment s'ha de barrejar amb 0,25 volums de tampó d'equilibratge i desgasificar durant 10 minuts (en trompa de buit). Aquest tipus de columna es pot utilitzar tant a temperatura ambient com a 4 °C, però s'ha de tenir en compte que les interaccions hidrofòbiques disminueixen en disminuir la temperatura.

**Protocol 10. Cromatografia de fenilsefarosa.** La mostra de partida estarà en tampó 2,25 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20 mM Tris pH 7,5. Els volums s'expressen en relació amb el volum de matriu.

<b>CROMATOGRAFIA DE FENILSEFAROSA</b>
1- Equilibreu amb 7-8 volums de 2,25 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20 mM Tris pH 7,5.
2- Carregueu de la mostra (en tampó d'equilibratge).
3- Renteu amb 5 volums de 2,25 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20 mM Tris pH 7,5.
4- Gradient (8 volums) entre 2,25 M i 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en 20 mM Tris pH 7,5.
5- Renteu amb 5 volums de 20 mM Tris pH 7,5.
(Flux 0,4-1 volums/hora.)

## 2.3 Cromatografia d'intercanvi iònic

En aquest tipus de cromatografia la fase estacionària té grups carregats que interaccionen electrostàticament amb ions de signe contrari de la fase mòbil. Hi ha reïnes d'intercanvi catiònic com la CM-52 (carboximetilcel·lulosa) i reïnes d'intercanvi aniònic com la DEAE-52 (dietilaminoetilcel·lulosa).

Per purificar mostres de nucleoplasmina s'han utilitzat reïnes DEAE-52 (Whatman) (vegeu el protocol 11). A l'hora de preparar la reïna, cal tenir en compte que el seu volum, una vegada hidratada, serà aproximadament el doble del volum que ocupa en sec. La reïna s'ha de rentar prèviament amb 3,5 volums de tampó 0,2 M Tris

pH 7,5, barrejar per inversió en una proveta i deixar sedimentar. Posteriorment, cal sifonar el sobrenedant i repetir el rentat anterior dues vegades més. En el darrer rentat, es deixa empaquetar la reina a l'interior de la columna.

**Protocol 11. Cromatografia d'intercanvi aniònic.** Protocol de purificació per a nucleoplasmines recombinants en cromatografia d'intercanvi aniònic DEAE-52 (Whatman). Els volums s'expressen en relació amb el volum de matriu.

<b>CROMATOGRAFIA D'INTERCANVI ANIÒNIC</b>
1- Renteu/equilibreu amb 5-10 volums de 0,1 M NaCl, 25 mM Tris pH 7,5, 1mM EDTA.
2- Carregueu la mostra (en tampó d'equilibratge).
3- Renteu amb 3,5 volums de tampó 0,1 M NaCl, 25 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA.
4- Gradient (10-14 volums) entre 0,1-0,4 M NaCl en 25 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA.
5- Renteu amb 3,5 volums de tampó 0,4 M NaCl, 25 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA.
(Flux 1 volum/hora, excepte 0,6 volums/hora en la càrrega de la mostra.)

## 2.4 Cromatografia de quelació amb níquel

Les tècniques de DNA recombinant permeten la construcció de proteïnes a les quals s'ha afegit una etiqueta que en facilitarà la purificació mitjançant cromatografia d'afinitat. Concretament, en aquest treball s'ha utilitzat l'addició de trams d'histidines, les quals tenen afinitat pel níquel (cromatografia d'afinitat per metall). Aquestes etiquetes, generalment formades per 6-10 histidines, no solen interferir en l'estructura o la funció de la proteïna estudiada i poden ser detectades per anticossos.

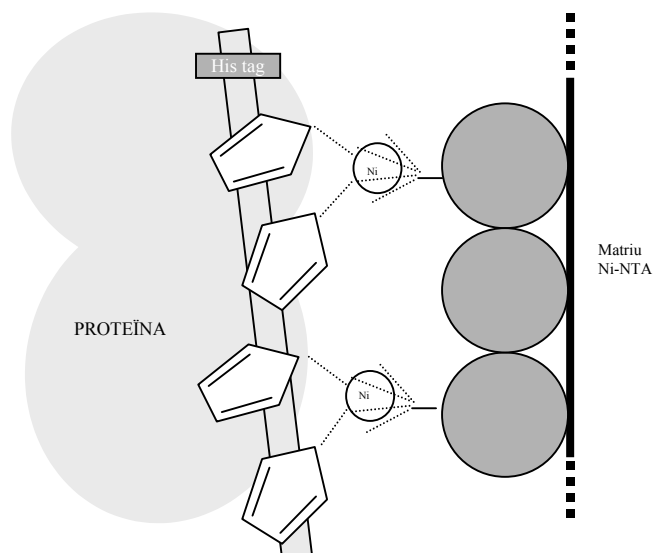
La cromatografia d'afinitat amb metalls immobilitzats (IMAC) va ser utilitzada per primera vegada per Porath et al. (1975) fent servir com a lligand l'àcid iminodiacètic (IDA). Posteriorment es van començar a utilitzar ions metàl·lics com el  $Zn^{2+}$ , el  $Cu^{2+}$  o el  $Ni^{2+}$ , que eren lligats a l'IDA i utilitzats per purificar diferents proteïnes i pèptids (Sulkowski, 1985). L'IDA només té tres llocs de quelació de metall i uneix el metall dèbilment. La unió feble pot donar lloc a pèrdues de l'ió durant els diferents passos cromatogràfics i donar com a resultat una disminució en la quantitat i puresa de la proteïna purificada.

Una alternativa són les reïnes a base de Ni-NTA (àcid níquel-nitrilotriacètic) acoblades a agarosa (Qiagen). L'NTA ocupa quatre dels sis llocs d'unió a lligand en l'esfera de coordinació de l'ió níquel i deixa dos llocs lliures per interaccionar amb l'etiqueta d'histidines (vegeu la fig. II.4). L'NTA uneix els ions metàl·lics de manera molt més estable que altres reïnes i reté els ions en una àmplia varietat de condicions (Hochuli, 1989). Aquesta reïna pot ser utilitzada tant en condicions natives com desnaturalitzants i permet purificar de 5 a 10 mg de proteïna per ml de reïna.

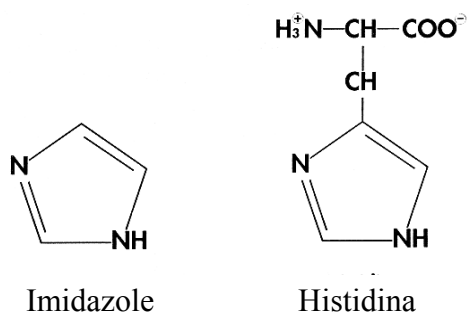
En aquest treball s'han utilitzat tant suports de Ni-IDA (Novagen) com de Ni-NTA (Qiagen), aquests darrers molt adequats quan es vol treballar en condicions reductores, ja que toleren fins a 20 mM de 2-mercaptoetanol.

### Purificació en condicions natives

L'elució de la proteïna recombinant es fa mitjançant un efecte de competència d'unió al níquel per part de l'imidazole. L'anell imidazole és part de l'estructura de la histidina (vegeu la fig. II.5). Quan la concentració d'imidazole augmenta per sobre de 100-250 mM, la proteïna es dissocia perquè ja no pot competir pels llocs d'unió al níquel. A baixa concentració d'imidazole l'afinitat de l'etiqueta d'histidines pel Ni és forta i s'evita la unió inespecífica d'altres proteïnes contaminants. Es poden utilitzar entre 0,3-2 M de NaCl per evitar unions inespecífiques a causa d'interaccions hidrofòbiques o electrostàtiques.



**Fig. II.4 Interacció de l'etiqueta d'histidines amb el níquel.** Representació esquemàtica de la interacció His-Ni en les columnes Ni-NTA (Qiagen).



**Fig. II. 5 Comparació de l'estructura de l'imidazole i la histidina**

La purificació es pot fer en columna o en tub Eppendorf (minipurificació) (vegeu els protocols 12 i 13). Els gradients discontinus són més efectius que els gradients lineals, per a aquest tipus de columnes. Reactius com l'EDTA o l'EGTA són quelants de metalls i poden causar l'alliberació del Ni de la columna i/o del complex proteïna-metall; per tant, cal anar amb compte amb la seva utilització. La reïna que hagi perdut el color verdós i es torni blanca haurà perdut el níquel i caldrà recarregar-la amb Ni. Si s'utilitza una quantitat excessiva de reïna, altres proteïnes es podrien unir inespecíficament als llocs desocupats i eluir-se com a contaminants.

**Protocol 12. Cromatografia de quelació amb níquel en condicions natives (columna).** Protocol per purificar diferents formes de nucleoplasmina recombinant amb una etiqueta d'histidines. La mostra de partida estarà en tampó 20 mM Tris pH 7,9, 0,5 M NaCl. Aquest tipus de columna s'ha realitzat a temperatura ambient. Els volums són en relació amb el volum de matriu.

#### CROMATOGRAFIA DE NÍQUEL (NATIVA) - COLUMNA

- 1- Renteu/equilibreu amb 10 volums de 5 mM imidazole, 20 mM Tris pH 7,9, 0.5 M NaCl.
  - 2- Carregueu la mostra.
  - 3- Renteu amb 6 volums de 5 mM imidazole, 20 mM Tris pH 7,9, 0.5 M NaCl.
  - 4- Renteu amb 6 volums de 60 mM imidazole, 20 mM Tris pH 7,9, 0.5 M NaCl.
  - 5- Eluiu amb 4 volums de 200 mM imidazole, 20 mM Tris pH 7,9, 0.5 M NaCl.
  - 6- Eluiu amb 5 volums de 400 mM imidazole, 20 mM Tris pH 7,9, 0.5 M NaCl.
- (en tots els passos s'ha utilitzat un flux de x10 volums/hora)

**Protocol 13. Cromatografia de quelació amb níquel en condicions natives (tub).** Protocol per purificar proteïnes amb etiquetes d'histidines a molt petita escala (tubs de tipus Eppendorf). La mostra de partida estarà en tampó 20 mM Tris pH 7,9, 0,5 M NaCl.

#### CROMATOGRAFIA NÍQUEL (NATIVA) - TUB

- 1- Barregeu la mostra (100 µl) i la reïna (50 µl) en un tub Eppendorf i invertiu 10 vegades.
  - 2- Centrifugueu durant 1 minut a 500 g, separeu el sobrenedant on hi haurà les proteïnes que no s'han unit a la reïna.
  - 3- Afegiu-hi 300 µl de tampó 5mM imidazole, 20 mM Tris pH 7,9, 0,5 M NaCl, invertiu el tub 10 vegades.
- Aneu fent passos successius de centrifugació i barreja del corresponent tampó. (Els tampons són els mateixos que s'han utilitzat en els passos 3, 4, 5 i 6 del protocol anterior.)

Elució per canvis de pH

Els residus d'histidina tenen un pKa d'aproximadament 6 i esdevenen protonats si el pH es redueix (pH 4,5-5,3). Sota aquestes condicions, la proteïna amb l'etiqueta d'histidines es dissocia de la reïna de níquel. Per eliminar proteïnes contaminants es fa un rentat a pH 6,3. Els monòmers de proteïna s'elueixen aproximadament a pH 5,9, mentre que els oligòmers ho fan a pH 4.5 (vegeu el protocol 14).

**Protocol 14. Cromatografia de quelació amb níquel (elució per canvis de pH).**

Aquest tipus de cromatografia es pot fer a temperatura ambient o a 4°C. Els volums s'expressen en relació amb el volum de matriu.

<b>CROMATOGRAFIA DE NÍQUEL (elució per pH)</b>
1- Rentatge/equilibratge (10 volums) 50 mM tampó fosfat sòdic pH 8, 0,3 M NaCl.
2- Carregat de la mostra (en tampó d'equilibrat).
3- (10 volums) tampó d'equilibratge.
4- (10 volums) tampó d'equilibratge pH 6,3.
5- (10 volums) tampó d'equilibratge pH 5,9.
6- (10 volums) tampó d'equilibratge pH 5.
7- (10 volums) tampó d'equilibratge pH 4,2.
8- (10 volums) tampó d'equilibratge pH 8.
(flux 10 volums/hora en tots els passos)

Purificació en condicions desnaturalitzants i reductores

Sota condicions desnaturalitzants (6 M clorur de guanidina o 8 M urea), l'etiqueta d'histidines estaria totalment exposada i la unió de la proteïna a la reïna de Ni i la posterior purificació serien més eficients. Es pot treballar en condicions reductores utilitzant 2-mercaptoetanol a baixa concentració (20 mM) per evitar la copurificació de proteïnes de l'hoste que hagin pogut formar ponts disulfur amb la proteïna d'interès durant la lisi cel·lular. No convé utilitzar DTT ja que podria reduir els ions níquel i evitar la seva unió a l'etiqueta d'histidines. Convé escalfar la mostra a 55-60 °C abans de carregar-la a la columna, ja que afavorirà l'acció dels agents reductors (vegeu el protocol 15).

En aquest tipus de cromatografia en condicions desnaturalitzants i reductores es treballa amb tampons que contenen una elevada concentració de sals. Per evitar que hi hagi precipitació dels tampons, la cromatografia s'ha de dur a terme a temperatura ambient.

El clorur de guanidina precipita en presència d'SDS, per tant, caldrà precipitar amb TCA aquelles mostres que continguin clorur de guanidina prèviament al seu anàlisi mitjançant SDS-PAGE.

**Protocol 15. Cromatografia de quelació amb níquel en condicions desnaturalitzants i reductores.** Protocol utilitzat per purificar formes recombinants de NP amb histidines a l'extrem carboxil terminal. La mostra estarà en tampó A. Aquesta columna es realitza a temperatura ambient. Els volums s'expressen en relació amb el volum de matriu.

<b>CROMATOGRAFIA DE NÍQUEL condicions desnaturalitzants i reductores</b>			
1- Renteu /equilibreu amb 20 volums de tampó A. 2- Carregueu de la mostra prèviament escalfada a 55-60 °C. 3- Renteu amb 3 volums de tampó A . 4- Renteu amb 12 volums de tampó B. 5- Eluïu amb 6 volums de tampó C. 6- Renteu amb 8 volums de tampó D. (el fluxe és de 10 volums/hora per a tots els passos)			
<u>tampó A</u>	<u>tampó B</u>	<u>tampó C</u>	<u>tampó D</u>
10 mM Hepes pH 7,9 6 M clorur de guanidina 0,2 mM EDTA 20 mM β-mercapto. 5 mM imidazole	10 mM Hepes pH 7,9 8 M urea 0,2 mM EDTA 20 mM β-mercapto. 5 mM imidazole	10 mM Hepes pH 7,9 8 M urea 0,2 mM EDTA 20 mM β-mercapto. 20 mM imidazole	10 mM Hepes pH 7,9 8 M Urea 0,2 mM EDTA 20 mM β-mercapto. 500 mM imidazole

La renaturalització i el replegament de la proteïna es poden dur a terme en la mateixa columna abans d'eluir la proteïna (Holzinger et al., 1996) o bé en solució (Wingfield et al., 1995). Per a les mostres de nucleoplasmina s'ha utilitzat la renaturalització mitjançant diàlisi en tampons de concentració decreixent d'urea: 8 M → 6 M → 4 M → 2 M → 0 M, en tampó 10 mM Tris pH 7,9, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT. Es pot dur a terme un darrer pas de diàlisi per treure el DTT.

## 2.5 Cromatografia de filtració en gel

La cromatografia de filtració en gel també s'anomena d'exclusió molecular. El suport està format per una matriu de polímers molt hidrofílics en forma de micropartícules esfèriques de mida variable. Les molècules petites podran passar per l'interior de les micropartícules i per tant s'eluiran més tard que les molècules de mida més gran.

S'han utilitzat matrius del tipus Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia Biotech). Aquesta matriu està formada per dextrà unit covalentment a boles d'agarosa poroses i té un rang de separació òptim d'entre 3.000 i 70.000 Da. Aquesta columna s'ha utilitzat acoblada a un sistema de FPLC (vegeu l'apartat següent).

## 2.6 Cromatografia líquida d'alta resolució

El tipus de cromatografia d'alta resolució per excel·lència és la d'HPLC (cromatografia líquida d'alt rendiment, *high performance liquid chromatography*). Aquest tipus de cromatografia sovint s'anomena d'*elevada pressió*. La fase estacionària està formada per partícules de gran rigidesa mecànica com la sílice. El fet de treballar a pressió elevada fa que s'hagin d'utilitzar materials resistents. Així, tant les carcasses de les columnes com els conductes solen ser d'acer inoxidable. L'elevada pressió s'aconsegueix mitjançant bombes de pistons. S'ha utilitzat el sistema HPLC-Beckman System Gold.

El fonament cromatogràfic utilitzat en aquest treball és l'anomenat de *fase reversa*, on la fase mòbil és més polar que la fase estacionària. El suport cromatogràfic està fet de sílice, però els grups silanol són químicament derivatitzats amb organosilans com l'octadesil (C18), Vydac. Les proteïnes s'elueixen incrementant la quantitat de solvent orgànic per augmentar la hidrofobicitat. Se solen utilitzar com a eluents: (A) 0,1% TFA i (B) acetonitril. Tots els solvents i additius han de ser de puresa elevada i han d'estar lliures de partícules o aire; s'han de filtrar i desgasificar abans d'utilitzar. Un dels inconvenients de la tècnica és que la proteïna pot perdre la seva estructura terciària, i per tant, la seva activitat biològica, a causa dels eluents utilitzats, que la poden desnaturalitzar.

Alternativament als sistemes d'HPLC, hi ha sistemes com el FPLC (Pharmacia Akta-FPLC) que treballen a pressió mitjana, però el disseny és molt similar al d'HPLC. Aquest sistema no requereix fases estacionàries tan rígides i permet una resolució millor que la cromatografia convencional de baixa pressió.

## 3. MÈTODES GENERALS PER A L'ESTUDI DE PROTEÏNES

### 3.1 Electroforesi en gels de poliacrilamida (PAGE)

Les tècniques de separació de proteïnes per electroforesi es basen en la migració de molècules carregades mitjançant un camp elèctric. Les PAGE utilitzen un suport de poliacrilamida, possible gràcies a l'entrecreuament de llargues cadenes de monòmers d'acrilamida amb N,N'-metilè-bisacrilamida. En funció de la concentració d'acrilamida s'obtenen entramats més o menys densos. La reacció de polimerització

està catalitzada per l'addició de PSA (persulfat amònic) i TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina), que a través de la formació de radicals sulfat i radicals lliures, respectivament, inicien i acceleren la formació d'un gel tridimensional. S'ha d'evitar la presència d'oxigen, ja que inhibeix la polimerització en bloquejar els radicals lliures. Els monòmers (en pols o en dissolució) són neurotòxics, per absorció cutània o inhalació. Una vegada s'ha donat la polimerització, la toxicitat és molt reduïda però encara hi pot haver presència d'alguns monòmers lliures.

La separació electroforètica de proteïnes depèn directament de la mida, càrrega i forma de les macromolècules, així com de les propietats físicoquímiques del medi com ara: pH, temperatura o composició iònica. També cal tenir en compte que, segons el percentatge d'acrilamida que utilitzem, obtindrem un gel més o menys dens que també influirà en la mobilitat de les proteïnes. A la taula II.3 es mostra el percentatge d'acrilamida que se sol utilitzar en funció del pes molecular de la proteïna segons Hames (1981).

**Taula II.3 Percentatges d'acrilamida.**  
Tant per cent d'acrilamida utilitzat en gels PAGE segons el pes molecular de la proteïna estudiada.

% acrilamida	MW proteïna (kDa)
5	60-212
7,5	30-120
10	18-75
12,5	15-60
15	15-45

### 3.1.1 Electroforesi d' SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

El sistema d'electroforesi utilitzat és un sistema discontinu de tampons introduït per Laemmli (1970). Aquest tipus de gels consta d'una petita part de gel concentrador o *stacking* de baix tant per cent d'acrilamida (2-3%) seguida de la part separadora o *resolving* de major tant per cent d'acrilamida (7-25%). Els polipeptids entren en el gel concentrador (amb un tampó de pH neutre inferior al del tampó de cubeta) i s'acumulen abans d'entrar en el gel separador. Quan entren en el gel separador, de pH bàsic i igual al del tampó de cubeta, es dona la migració dels polipeptids proporcionalment al seu pes molecular.

L'SDS (dodecil sulfat de sodi) és un detergent aniònic que s'utilitza per desnaturalitzar proteïnes i evitar la interacció entre proteïnes durant l'electroforesi. L'SDS revesteix les proteïnes i els confereix càrrega neta negativa proporcionalment a la seva massa. S'uneix 1 molècula d'SDS cada 2 aminoàcids (1,4 g d'SDS per gram de proteïna aproximadament). Les proteïnes migraran cap al pol positiu de manera inversament proporcional a la seva mida. Una unió uniforme de l'SDS és crítica per a



una bona migració electroforètica; per això s'escalfen les proteïnes a 100 °C en presència d'un excés d'SDS. L'SDS s'afegeix tant als gels com al tampó de mostra i de cubeta (vegeu el protocol 16 i les taules II.4, II.6 i II.7).

### Muntatge i preparació dels gels

L'electroforesi en placa és la forma més habitual i se sol desenvolupar en posició vertical. Per obtenir el gel, es necessiten dos vidres entre els quals es col·locaran uns separadors de gruix variable (normalment de 0,75 mm o 1,5 mm) que determinaran el gruix del gel. Per evitar que el sistema vessi, s'han de segellar els dos extrems laterals i l'extrem inferior mitjançant agarosa líquida al 2% o bé amb l'ús d'una goma adequada. Es manté unit tot el conjunt mitjançant diverses pinces. El sistema que més s'ha utilitzat és l'anomenat CBS (CBS Scientific Company), que inclou un sistema de gomes i pinces particular. A la part superior del gel hi posarem la pinta de tefló del mateix gruix que els separadors i amb un nombre variable de dents. Una vegada acabada la polimerització, retirarem la pinta i obtindrem una sèrie de pous on es dipositaran les mostres que s'han d'analitzar.

Després de fer el muntatge, es preparen les barreges d'acrilamida (vegeu el protocol 16 i la taula II.4). Es comença per la part inferior o gel separador. Una vegada preparada la barreja, s'aboca entre els vidres fins a 0,5 cm per sota del nivell de la pinta. S'afegeix una fina capa d'isopropanol per sobre del gel separador, d'una banda per evitar el contacte amb l'oxigen, que alenteix la polimerització, i d'altra banda perquè quedi una superfície ben plana. Una vegada polimeritzada la part inferior del gel, s'aboca l'isopropanol, es neteja amb aigua i s'asseca amb paper de filtre. Ara ja es pot preparar la part superior o gel concentrador. Una vegada abocat entre els vidres, s'hi col·loca la pinta. Els gels polimeritzats es poden guardar aproximadament durant una setmana a 4 °C, protegits amb plàstic fi perquè no s'assequin.

El gel polimeritzat es col·loca en la cubeta d'electroforesi que contindrà el corresponent tampó (vegeu la taula II.6). Se solen utilitzar cubetes de metacrilat que consten de dos reservoris, un de superior i un d'inferior. Cada reservori té un elèctrode de platí disposat longitudinalment per assegurar un camp elèctric uniforme. Haurem de retirar la pinta i el separador inferior per permetre el contacte directe amb el tampó i la circulació del camp elèctric orientat verticalment. Convé eliminar les possibles bombolles d'aire que s'hagin pogut formar a la base del gel ja que podrien frenar la circulació del corrent elèctric. Si s'augmenta la longitud del gel també augmentarà la resolució de l'electroforesi, però n'incrementarà el temps de duració. La duració del procés és variable i pot oscil·lar entre 1 i 15 hores segons la intensitat que circuli pel sistema (vegeu la taula II.8).

### Preparació de la mostra

La mostra es prepara barrejant-la amb el tampó de mostres (vegeu la taula II.7). El tampó de mostres es prepara al mateix pH que el gel concentrador i se li afegeix un

colorant per poder visualitzar la migració. Se li afegeix un agent reductor per desfer complexos que estiguin units per ponts disofre i també glicerol per donar densitat a la barreja. Per permetre una bona unió de l'SDS convé bullir la mostra durant 3-6 minuts abans de carregar-la al gel. El volum de mostra que podem carregar dependrà de la mida dels pous. La quantitat de proteïna aplicada hauria de ser de l'ordre d'1-20 µg. L'aplicació de la mostra es pot fer amb micropipeta o xeringa Hamilton. Quan la banda de colorant (front de migració) es troba a 1 cm del final, l'electroforesi es pot donar per acabada.

### 3.1.2 Electroforesi nativa (PAGE nativa)

Aquests gels s'elaboren igual que els d'SDS-PAGE però sense utilitzar condicions desnaturalitzants ni reductores (vegeu la taula II.5). No s'utilitza ni SDS ni 2-mercaptoetanol, ni tampoc es bullen les mostres abans de carregar-les al gel. Permet estudiar la conformació de la proteïna en estat natiu, ja que manté l'estructura terciària i quaternària. Un voltatge constant permetrà una mobilitat constant durant l'electroforesi. Si el corrent és massa elevat, un excés de calor pot desnaturalitzar les proteïnes, i si el corrent és massa baix, hi pot haver difusió de les bandes. Determinar el pes molecular de les proteïnes en aquest tipus de gels és difícil, ja que s'ha de tenir en compte tant la massa com la càrrega de la partícula.

#### Protocol 16. Estocs PAGE. Preparació de solucions estoc per a PAGE.

<b>Solucions estoc per a PAGE</b>
<p>SOL. A: <u>acrilamida 30%: bisacrilamida 0,8%</u>            Per 500 ml peseu 150 g d'acrilamida i 4 g de bisacrilamida i dissoleu-los en aigua. Filtreu al buit amb un filtre de 0,45 µm de porus. Guardeu la barreja a 4 °C.</p>
<p>SOL. B: <u>1,5 M Tris-HCl pH 8,8</u>            Per 500 ml peseu 90,83 g de Tris i ajusteu el pH amb HCl. Guardeu-ho a temperatura ambient.</p>
<p>SOL. C: <u>10% SDS</u> Per 250 ml peseu 25 g. Guardeu-ho a temperatura ambient.</p>
<p>SOL. D: <u>0,5 M Tris-HCl pH 6,8</u>            Per 250 ml peseu 15,14 g de Tris i ajusteu el pH amb HCl. Guardeu-ho a temperatura ambient.</p>
<p><u>PSA 10%</u> Per 10 ml peseu 1 g. Feu alíquotes d'1 ml i guardeu-ho a -20 °C.</p>

**Taula II.4 SDS-PAGE.** Preparació de gels per SDS-PAGE (vegeu el protocol 16 per a composició de solucions A, B, C i D).

SDS-PAGE				
gel concentrador		gel separador		
	3 ml		12% 10 ml	15% 10 ml
<b>Sol. A</b>	600 µl	<b>Sol. A</b>	4 ml	5 ml
<b>Sol. D</b>	750 µl	<b>Sol. B</b>	2,5 ml	2,5 ml
<b>Sol. C</b>	30 µl	<b>Sol. C</b>	100 µl	100 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1,59 ml	<b>H<sub>2</sub>O</b>	3,35 ml	2,3 ml
<b>TEMED</b>	3 µl	<b>TEMED</b>	4,5 µl	4,5 µl
<b>PSA</b>	30 µl	<b>PSA</b>	75 µl	75 µl
<b>concentracions finals gel concentrador:</b> 6% acrilamida, 0,16% bisacrilamida, 125 mM Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% PSA, 0,1% TEMED				
<b>concentracions finals gel separador:</b> 12-15% acrilamida, 0,4% bisacrilamida, 375 mM Tris pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% PSA, 0,1% TEMED				

**Taula II.5 PAGE nativa.** Preparació de gels per PAGE nativa (vegeu el protocol 16 per a composició de solucions A, B i D).

PAGE nativa			
gel concentrador		gel separador	
	3 ml		10% 10 ml
<b>Sol. A</b>	375 µl	<b>Sol. A</b>	3,33 ml
<b>Sol. D</b>	750 µl	<b>Sol. B</b>	2,5 ml
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1,85 ml	<b>H<sub>2</sub>O</b>	4,08 ml
<b>TEMED</b>	3,75 µl	<b>TEMED</b>	5 µl
<b>PSA</b>	25 µl	<b>PSA</b>	75 µl
<b>concentracions finals gel concentrador:</b> 3,75% acrilamida, 0,1% bisacrilamida, 125 mM Tris pH 6,8, 0,08% PSA, 0,125% TEMED			
<b>concentracions finals gel separador:</b> 10% acrilamida, 0,275% bisacrilamida, 375 mM Tris pH 8,8, 0,075% PSA, 0,05% TEMED			

**Taula II.6 Tampó de cubeta.** Preparació de tampons de cubeta per SDS-PAGE i PAGE nativa.

tampó de cubeta						
SDS-PAGE				PAGE nativa		
	5x (1 L)	1x (1 L)	concentracions (1x)		1x (1 L)	concentracions
<b>Tris</b>	30 g	6 g	0,05M	<b>Tris</b>	3 g	0,025 M
<b>glicina</b>	144 g	28,8 g	0,38 M	<b>glicina</b>	14,4 g	0,19 M
<b>SDS</b>	5 g	1 g	0,1%	<b>SDS</b>	-	-

**Taula II.7 Tampó de mostres.** Preparació de tampons de mostres per SDS-PAGE i PAGE nativa.

<b>tampó de mostres</b>			
<b>SDS-PAGE</b>			
	<b>2x (10 ml)</b>	<b>4x (10 ml)</b>	<b>concentració 1x</b>
<b>Tris</b>	2,5 ml Tris 0,5 M pH 6,8	1,25 ml Tris 2M pH 6,8	62 mM
<b>glicerol</b>	2 ml	4 ml	10%
<b>SDS</b>	4 ml SDS 10%	0,8 g	2%
<b>2-mercaptoetanol</b>	1 ml	2 ml	5%
<b>blau de brom fenol</b>	punta d'espàtula	punta d'espàtula	0,01%
<b>PAGE nativa</b>			
	<b>5x (10 ml)</b>	<b>concentració 1x</b>	
<b>Tris</b>	1,54 ml Tris 2M pH 6,8	62 mM	
<b>glicerol</b>	5 ml	10%	
<b>blau de brom fenol</b>	punta d'espàtula	0,01%	

**Taula II.8 Condicions d'electroforesi.**

<b>condicions d'electroforesi</b>		
	<b>voltatge</b>	<b>temps aproximat</b>
<b>gels petits</b> 11,2 x 9,8 cm	100-120 V	1,5 h
	150 V	1 h
<b>gels mitjans</b> 16,4 x 14,5 cm	150 V	3 h
	30V	15 h

### 3.1.3 Tinció amb blau de Coomassie

El colorant més utilitzat en els gels d'acrilamida és el blau de Coomassie. És un compost no polar que té grups carregats ( $-\text{SO}_3^-$ ) mitjançant els quals s'uneix electrostàticament a les proteïnes. El gel se submergeix en la solució de colorant (vegeu la taula II.9) i es manté en agitació. La tinció del gel sol durar de 30 a 60 minuts. Tradicionalment els reactius de tinció dels gels de poliàcrilamida tenien metanol, que feia funció de fixador. El metanol és tòxic tant per inhalació com per ingestió o per contacte amb la pell, motiu pel qual es va substituir per isopropanol.

Després de la tinció, el gel queda tot tenyit de color blau intens i cal destenyir-lo per eliminar l'excés de colorant. Se submergeix el gel en el destenyidor (vegeu la taula II.9) i es deixa destenyint-se de 2 a 3 hores en agitació o tota la nit. Convé fer diversos canvis amb destenyidor net fins a obtenir bandes blaves sobre un fons transparent. El

destenyidor es pot reciclar filtrant-lo a través d'un filtre recobert de carbó vegetal, que retindrà el colorant i permetrà recuperar el destenyidor transparent. El blau de Coomassie permet visualitzar 0,1-0,5 µg de proteïna per banda. Els gels es poden guardar en solució destenyidora durant alguns mesos. És convenient fotografiar el gel o escanejar-lo per tenir-ne un registre gràfic. Posteriorment, per conservar-lo indefinidament, es pot assecar el gel entre dos fulls de cel·lofana mullada, subjectats amb pinces sobre un suport rígid, i deixar-lo assecar a l'aire durant un parell de dies.

**Taula II.9 Tenyidor i destenyidor.** Preparació de tenyidor i destenyidor per a PAGE.

	Tinció (amb metanol)	Tinció (amb isopropanol)
<b>colorant</b>	45% metanol 10% àcid acètic 0,25% Coomassie (per a 2 L) 5 g blau de Coomassie G-250 900 ml metanol (es dissol el colorant) 200 ml àcid acètic Cal filtrar la solució amb paper de filtre	10% isopropanol 10% àcid acètic 0,25% Coomassie (per a 2 L) 5 g blau de Coomassie G-250 200 ml isopropanol 200 ml àcid acètic Cal filtrar la solució amb paper de filtre
<b>destenyidor</b>	5% metanol 7,5% àcid acètic (per a 2 L) 100 ml metanol 150 ml àcid acètic	10% isopropanol 10% àcid acètic (per a 2 L) 200 ml isopropanol 200 ml àcid acètic

### 3.1.4 Tinció amb plata

Aquest mètode és molt sensible i permet detectar fins a 0,1 ng de proteïna per banda. Cal anar amb compte de mantenir el gel net i treballar amb guants, ja que podríem tenir artefactes de tinció. Els principals inconvenients són que la tècnica és força laboriosa i cara i no és totalment específica per a proteïnes, ja que també tenyeix polisacàrids i àcids nucleics. S'utilitza aquest tipus de tinció quan la quantitat de proteïna disponible és molt escassa. La tècnica es basa en la reducció de l'ió  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$  metàl·lica induïda pel formaldehid (vegeu el protocol 17). És sabut que hi participen les cadenes laterals d'aminoàcids com Cys, Lys o Met i que hi ha una diferència en el potencial redox entre les regions ocupades per les proteïnes i la resta del gel, cosa que indueix la reducció de l'ió plata. Les proteïnes queden tenyides de color marró fosc però difícilment queda un fons incolor. Convé fer un registre fotogràfic del gel al més aviat possible perquè amb el temps es poden donar canvis de color i augment del soroll de fons.

**Protocol 17. Tinció amb plata.** Protocol per tenyir gels amb plata (en tots els passos cal agitació suau).

<b>TINCIÓ AMB PLATA</b>	
1-	Fixeu el gel (mínim 1 hora) amb: metanol 50% àcid acètic 12% formaldehid 0,5%
2-	Renteu amb etanol 50% durant 20 minuts (x3).
3-	Pretractament amb $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L (preparat fresc) durant 1 minut.
4-	Renteu amb $\text{H}_2\text{O}$ durant 20 segons (x3).
5-	Impregneu durant 20 minuts amb solució fresca de: $\text{AgNO}_3$ 2 g/L HCHO 37% 750 $\mu\text{l/L}$
6-	Renteu amb $\text{H}_2\text{O}$ durant 20 segons (x2).
7-	Reveleu amb: $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 60 g/L HCHO 37% 0,5 ml/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4 mg/L (5-6 cristallets) durant 10 minuts o fins al temps necessari per poder visualitzar les bandes.
8-	Renteu amb $\text{H}_2\text{O}$ durant 20 segons (x2).
9-	Renteu 10 minuts amb: metanol 50% àcid acètic 12%
10-	Renteu amb metanol 50% durant 20 minuts.

### 3.1.5 Electroforesi preparativa

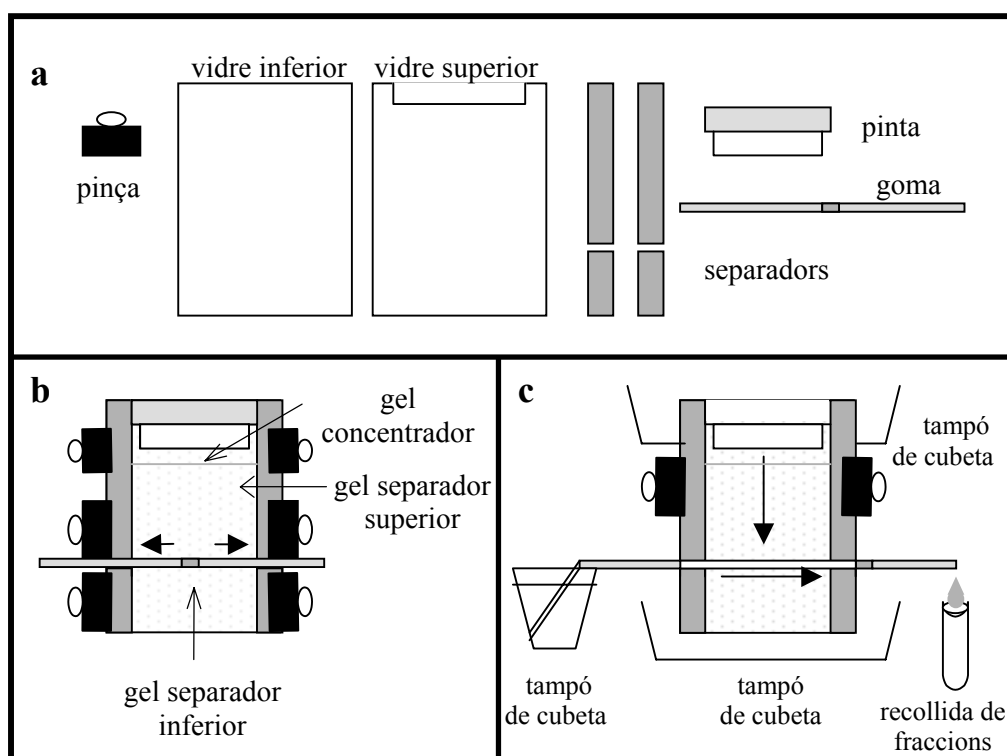
Es va utilitzar la tècnica d'electroforesi preparativa per separar proteïnes a partir d'un gel de poliacrilamida i poder-les recollir en diferents fraccions. Les proteïnes migren en condicions normals a través del gel fins a arribar a l'alçada d'un canal que travessa el gel horitzontalment i per on circula tampó de cubeta que serà impulsat per una bomba. Les proteïnes seran arrossegades pel tampó i conduïdes cap a un detector i col·lector de fraccions.

Es va utilitzar un gel de poliacrilamida natiu de mida mitjana i de 3 mm de gruix. A la meitat inferior del gel separador s'hi va col·locar una goma tova de 5 mm de diàmetre extern (3 mm de diàmetre intern), formada per dues meitats connectades mitjançant un connector rígid, de manera que travessés longitudinalment el gel i passés entre els dos separadors de cada costat. El gel tindria tres parts: gel concentrador, gel separador superior (per sobre de la goma) i gel separador inferior (per sota de la goma).

Cal engrèixar bé amb greix de silicona (Rhône-Poulenc) tant els separadors com la goma i també recobrir les juntes dels vidres, ja que interessa que tot el conjunt quedi ben segellat per evitar pèrdues. A la figura II.6 s'esquematisza el muntatge del gel. Prepararem les diferents parts del gel amb l'ordre següent:

- (1) gel separador superior (24 ml), s'hi ha d'afegir capa d'isopropanol fins que polimeritzi.
- (2) gel separador inferior (24 ml), cal invertir el muntatge cap per avall a l'hora de polimeritzar-lo; s'hi ha d'afegir capa d'isopropanol fins que polimeritzi.
- (3) gel concentrador (12 ml), s'hi ha d'afegir pinta d'un únic pou ample.

Una vegada polimeritzats els dos gels separadors, cal estirar la goma perquè quedi un canal intern per on circularà el tampó. A l'hora d'omplir el canal amb tampó de cubeta, convé que no es formin bombolles d'aire a l'interior ja que dificultarien el pas de corrent elèctric.



**Fig. II.6 Electroforesi preparativa.** a) Peces del gel; b) Muntatge i polimerització del gel; c) Electroforesi i recollida de fraccions; el tampó de cubeta és impulsat per una bomba.

Es va utilitzar un volum de mostra variable entre 500 µl i 2 ml i una quantitat de proteïna entre 500 µg i 1 mg. La mostra es barreja amb el corresponent tampó de mostres natiu (vegeu la taula II.7), que conté blau de brom fenol i que ens permetrà visualitzar la migració del front. El sistema es connecta a intensitat constant d'entre 10 i 25 mA, que correspon a un voltatge d'entre 30 V i 100 V (idealment un voltatge de 60-80 V seria l'adequat). Quan el front és a punt d'arribar a l'alçada del canal, convé connectar el sistema de tampó a la bomba a un flux de 100 ml/hora i observar si el front és eficientment arrossegat pel flux de tampó. Si veiéssim que part del front arriba al gel separador inferior, hauríem de disminuir el voltatge de la font d'electroforesi o bé augmentar el flux del tampó. A partir d'ara ja podem començar a col·lectar fraccions.

La durada total de l'electroforesi oscil·la entre les 18 i les 24 hores. Se sol deixar la primera part de l'electroforesi, fins a veure com s'elueix el front, durant el dia i posteriorment la recollida de fraccions es fa durant tota la nit. Convé treballar a un voltatge relativament baix per evitar un sobreescalfament del sistema. Alternativament es podria realitzar l'electroforesi a la cambra freda per evitar la possible degradació de la proteïna, però això augmentaria la durada de l'electroforesi.

Aquest sistema presenta força inconvenients. D'una banda, el muntatge dels gels es força complex i sovint es donen pèrdues de tampó de cubeta per l'extrem de les gomes. És un mètode força llarg, tant en la preparació com en el tractament posterior de la mostra, ja que aquesta s'obté en forma molt diluïda i sempre s'ha de dialitzar i concentrar. Com a dificultat afegida tindríem el baix rendiment de la tècnica.

## **3.2 Precipitació de proteïnes**

### **3.2.1 Precipitació amb àcid tricloroacètic (TCA)**

És una tècnica força utilitzada per precipitar proteïnes que es troben en tampons que contenen una elevada concentració de sal, que dificultaria la migració en gels de poliacrilamida. La proteïna precipitada quedarà lliure de sal i es podrà dissoldre amb el tampó desitjat. La tècnica té com a inconvenient que després del tractament la proteïna quedarà desnaturalitzada irreversiblement. Després de precipitar amb TCA es fa un rentat amb acetona freda (vegeu el protocol 18).



**Protocol 18. Precipitació amb TCA.** Protocol de precipitació amb àcid tricloroacètic al 25%.

<b>PRECIPITACIÓ AMB TCA 25%</b>
1- Afegiu a la mostra el volum necessari de TCA 100% en fred perquè la concentració final sigui del 25%. Barregeu amb vòrtex.
2- Incubeu durant 10 minuts en gel.
3- Centrifugueu durant 5 minuts a 10.500 g → descarteu el sobrenedant.
4- Renteu amb acetona freda. Barregeu amb vòrtex.
5- Centrifugueu durant 5 minuts a 10.500 g → descarteu el sobrenedant.
6- Assequeu el sediment a l'Speed-Vac® durant 10 minuts.
7- Resuspeneu el sediment sec amb el volum desitjat de tampó de mostres.

### 3.2.2 Precipitació amb sulfat amònic

Quan hi ha una quantitat elevada de sal al medi, les proteïnes tendeixen a agregar-se i precipitar. Aquest fenomen també es coneix com a *salting-out* i depèn dels grups hidrofòbics que puguin trobar-se a la superfície de la proteïna. Les molècules d'aigua estan en contacte amb aquests grups hidrofòbics, però quan s'afegeixen sals al sistema es dona un fenomen de solvatació i un augment de l'exposició dels grups hidrofòbics, de manera que podran interaccionar amb els d'altres proteïnes i donar com a resultat una agregació de molècules.

La sal més utilitzada per precipitar proteïnes és el sulfat amònic, ja que és barata i suficientment soluble i de menor densitat que els agregats de proteïna, característica que en facilitarà la separació per centrifugació. La concentració de sulfat amònic se sol expressar com a percentatge de saturació, assumint que l'extracte dissoldrà la mateixa quantitat de sulfat amònic que l'aigua pura. Per calcular els grams de sulfat amònic que s'haurien d'afegir a 1 litre per arribar a la concentració desitjada, es poden utilitzar les equacions següents, segons Harris (1989) i Scopes (1982), depenent de la temperatura de treball:

$$20\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow g = 533 (S_2 - S_1) / 100 - 0,3 S_2$$

$$0\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow g = 515 (S_2 - S_1) / 100 - 0,27 S_2$$

on g són els grams de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $S_1$  és la concentració de sal inicial i  $S_2$  és la concentració final. En aquestes equacions ja es té en compte l'augment de volum degut a l'addició de sal. Alternativament, la quantitat de sulfat amònic que s'ha d'afegir es pot llegir d'alguna de les taules estandarditzades (vegeu la taula II-10 i el protocol 19).

El sulfat amònic pot acidificar lleugerament l'extracte; per contrarestar-ho se sol afegir 1 µl de NaOH 1 N per gram de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Convé anar afegint el sulfat amònic a poc a poc i utilitzar agitació constant; cal evitar que es formin bombolles d'aire a causa d'una agitació massa vigorosa, ja que podrien desnaturalitzar la proteïna.

### Protocol 19. Precipitació amb sulfat amònic.

PRECIPITACIÓ AMB SULFAT AMÒNIC	
1-	Afegiu lentament a la mostra (en agitació) la quantitat necessària de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sòlid, per tal d'arribar al percentatge de saturació desitjat (vegeu la taula II.10).
2-	Afegiu 1 µl de NaOH 1N per gram de sulfat amònic.
3-	Deixeu precipitar un mínim de 3 hores o bé tota la nit a 4 °C.
4-	Centrifugueu durant 15 minuts a 20.000 g a 4 °C.
5-	Separau el sediment i el sobrenedant.
6-	Resuspeneu el sediment amb un tampó adequat.
7-	Dialitzeu el sobrenedant i el sediment enfront del tampó desitjat.

**Taula II.10 Percentatge de saturació de sulfat amònic a 0°C.** La taula indica els grams de sulfat amònic que s'han d'afegir a 1 L de solució per produir el canvi desitjat en el percentatge de saturació de sulfat amònic a 0 °C.

		Percentatge de saturació de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ final a 0 °C																
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
Percentatge de saturació de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ inicial a 0 °C	0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
	5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
	10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
	15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
	20		27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
	25			27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
	30				28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
	35					28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
	40						29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
	45							29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
	50								30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
	55									30	61	93	127	161	197	235	273	313
	60										31	62	95	129	164	201	239	279
	65											31	63	97	132	168	205	244
	70												32	65	99	134	171	209
	75													32	66	101	137	174
80														33	67	103	139	
85															34	68	105	
90																34	70	
95																	35	

Cada proteïna, segons la seva naturalesa hidrofòbica, té diferent sensibilitat a precipitar amb sulfat amònic. La majoria de proteïnes precipiten entre el 24% i el 80% de saturació. Treballant a prop del límit de precipitació de la nostra proteïna, podem eliminar aquelles proteïnes més sensibles a precipitar, mentre que la nostra proteïna quedaria soluble. Aquesta tècnica es pot utilitzar com a mètode per purificar proteïnes. Se sol treballar a 4 °C per evitar possibles degradacions de la proteïna. Les proteïnes solubles se separen de les que han precipitat mitjançant centrifugació. De vegades s'utilitza la precipitació amb sulfat amònic com a tècnica per establir proteïnes per conservar-les.

### 3.3 Quantificació de proteïnes

Els mètodes més utilitzats actualment per mesurar la concentració de proteïna es basen en l'absorció en l'UV o bé en l'espectrometria en el visible després de la reacció de la proteïna amb un reactiu per generar un cromòfor. En aquest treball s'han utilitzat espectrofotòmetres dels tipus Shimadzu UV-240 i Cary (Varian).

#### 3.3.1 Mètode de Bradford

S'ha utilitzat el *Bio-Rad protein assay* (Bio-Rad), que permet quantificar proteïnes segons el mètode de Bradford (1976). Es tracta d'un mètode colorimètric que es basa en el canvi de color d'una solució àcida de blau brillant de Coomassie (G-250), que, en unir-se a proteïnes, canvia el seu màxim d'absorbància de 465 nm a 595 nm. Té avantatges respecte a altres mètodes com el de Lowry, ja que és més fàcil d'utilitzar, requereix un únic reactiu, és ràpid i té menys interferències.

Convé obtenir una recta patró a partir d'una proteïna de concentracions conegudes, típicament albúmina sèrica bovina (BSA), tot i que en un sistema ideal la proteïna patró hauria de ser la mateixa que la proteïna d'estudi per permetre una determinació més acurada de la concentració. Es representen els valors d'absorbància respecte de la concentració i s'obté una regressió lineal. A partir del valor d'absorbància obtingut per la mostra que es vol analitzar, es pot calcular la concentració mitjançant la recta patró obtinguda. Si l'absorbància de la proteïna problema cau fora del rang de la patró, l'error podria ser bastant gran i per tant convindria afegir més mostra o bé diluir-la i repetir la quantificació.

S'ha utilitzat el procediment de microassaig (vegeu el protocol 20), que permet detectar d'1 a 20 µg de proteïna a una concentració igual o inferior a 25 µg/ml. Convé preparar una corba patró cada vegada que es faci un nou assaig. És recomanable preparar duplicats tant de les mostres patró com de les mostres problema.

El complex proteïna-colorant té una estabilitat òptima d'entre 15 i 60 minuts. Les mostres es llegeixen a l'espectrofotòmetre a 595 nm utilitzant cubetes de plàstic (poliestirè).

**Protocol 20. Mètode de Bradford.** Preparació de patró, reactiu i mostres pel mètode de Bradford, seguint el microassaig del *Bio-Rad protein assay*.

<b>MÈTODE DE BRADFORD</b>	
<u>Recta patró</u>	
<b>BSA (1mg/ml)</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>
0 µl .....	500 µl
2 µl .....	498 µl
6 µl .....	494 µl
10 µl .....	490 µl
14 µl .....	486 µl
<u>Preparació del reactiu</u>	
Se'n prepara la quantitat suficient barrejant 1 part de reactiu amb 5 parts d'aigua.	
<u>Preparació de mostres</u>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Volum de mostra + H<sub>2</sub>O fins a 500 µl + 500 µl reactiu (barregeu amb vòrtex immediatament).</li> <li>▪ Incubeu durant 15-20 minuts. Posteriorment llegiu patró i mostres a 595 nm.</li> </ul>	

### 3.3.2 Mètode de Lowry

El mètode de Lowry (Lowry et al., 1951) és un dels mètodes més utilitzats per determinar la concentració de proteïnes. Aquest mètode es basa en la reacció de Biuret de les proteïnes amb el coure, en condicions alcalines. Es dona la reducció del reactiu de Folin-Ciocalteu, que dona lloc a un producte de color blau, catalitzada per l'oxidació dels aminoàcids aromàtics per part del coure. Es poden detectar concentracions de proteïna en el rang de 5 µg/ml a 100 µg/ml.

Els principals inconvenients del mètode serien: inestabilitat d'alguns reactius, interferència amb un elevat nombre de substàncies (Peterson, 1979) i mètode lent ja que s'han de seguir força passos.

Una de les modificacions del mètode de Lowry va ser proposada per Hartree (1972); el protocol següent es basa en aquestes modificacions. La concentració de la proteïna d'interès es determina comparant els valors obtinguts amb els de la corba patró, preparada en paral·lel amb concentracions conegudes de BSA.

**Protocol 21. Mètode de Lowry.** Preparació de la recta patró, estocs i protocol de Lowry segons Hartree (1972).

<b>MÈTODE DE LOWRY</b>		
<u>Recta patró</u>		
<u>BSA (1mg/ml)</u>		<u>H<sub>2</sub>O</u>
20 µl .....		180 µl
40 µl .....		160 µl
60 µl .....		140 µl
80 µl .....		120 µl
100 µl .....		100 µl
<u>Protocol</u>		
1- Diluïu la mostra fins a 200 µl en aigua (el rang de proteïna hauria d'estar entre 15 µg/ml i 150 µg/ml).		
2- Afegiu-hi 180 µl de solució A, escalfeu la barreja a 50 °C durant 10 minuts i deixeu refredar a temperatura ambient durant 15 minuts.		
3- Afegiu-hi 20 µl de solució B i deixeu reaccionar la barreja durant 15 minuts.		
4- Ràpidament afegiu-hi i barregeu 600 µl de solució C.		
5- Escalfeu a 50 °C durant 10 minuts i refredeu a temperatura ambient durant 15 minuts.		
6- Llegiu a l'espectre a 650 nm (en cubetes de plàstic).		
<u>Solució A</u>	<u>Solució B</u>	<u>Solució C</u>
2 g tartrat de Na i K 100 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Dissoleu en 500 ml de NaOH 1 N i diluïu a 1 L	2 g de tartrat de Na i K 1 g CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O 90 ml H <sub>2</sub> O 10 ml 1 N NaOH	Barregeu en fresc: 1 volum reactiu Folin-Ciocalteu 15 volums H <sub>2</sub> O

### 3.3.3 Quantificació mitjançant l'absorbància a 276 nm

Aquesta tècnica de determinació directa de la concentració té com a avantatges la seva rapidesa i que és una tècnica no destructiva. Té com a principal desavantatge la forta interferència amb nucleòtids i àcids nucleics. Si la relació  $A_{276}/A_{260}$  es troba al voltant de 2, la concentració d'àcids nucleics és negligible. Podem mesurar proteïnes d'una concentració d'entre 0,2 mg/ml i 2 mg/ml. Cal utilitzar cubetes de quars, ja que les de plàstic o vidre absorbeixen llum en el rang UV.

### Càlcul del coeficient d'extinció

La concentració de proteïnes es determina de manera acurada mitjançant l'espectroscòpia d'absorbància. L'absorbància  $A$  és directament proporcional a la concentració molar  $c$  segons l'equació de Beer-Lambert:

$$A = \varepsilon \times c \times l$$

on  $\varepsilon$  és el coeficient d'extinció molar i  $l$  és el pas de llum. Quan  $l = 1$  cm l'absorbància s'anomena *densitat òptica* (DO). L'absorbància d'una proteïna en la regió aromàtica entre 270 nm i 300 nm és deguda a tres cromòfors: triptòfan, tirosina i, en menor proporció, cistina (quan hi ha ponts disofre).

El mètode emprat per calcular el coeficient d'extinció es basa en la mesura de l'absorbància de compostos model en 20 mM de tampó fosfat pH 6,5 i 6 M de clorur de guanidina. Aquest mètode se sol anomenar d'Edelboch, ja que s'utilitzen dades de compostos model d'una publicació d'Edelboch (1967). El mètode és descrit amb més detall per Gill i von Hippel (1989) i Pace et al. (1995). El coeficient d'extinció molar d'una proteïna es pot calcular amb l'equació següent:

$$\varepsilon \text{ (M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)} = \varepsilon_{\text{Trp}} \times n^{\circ} \text{ Trp} + \varepsilon_{\text{Tyr}} \times n^{\circ} \text{ Tyr} + \varepsilon_{\text{Cistina}} \times n^{\circ} \text{ S-S}$$

Els residus de Tyr exposats o bé enterrats difereixen en la seva absorbància a 280 nm; per tant, es recomana que es determini el coeficient d'extinció de les proteïnes en el pic de màxima absorció per les Tyr (275-277 nm). En el cas de les mostres de nucleoplasmina, s'ha mesurat la concentració a partir de l'absorbància a 276 nm i s'ha assumit l'absència de ponts disofre. Per tant, s'obtidria la següent equació simplificada:

$$\varepsilon_{\text{NP}(276 \text{ nm})} = 1450 \times n^{\circ} \text{ Trp} + 5400 \times n^{\circ} \text{ Tyr}$$

### Càlcul de la concentració de proteïna

Sabent el  $\varepsilon_{276}$  de la nostra proteïna i el seu pes molecular (PM), podem obtenir el quocient  $\varepsilon_{276} / \text{PM}$ . Per a cubetes de longitud igual a 1 cm, quan l'absorbància a 276 nm té el mateix valor que el quocient anterior, tindriem una concentració de proteïna equivalent a 1 g/L.

### 3.3.4 Quantificació mitjançant l'absorbància a 230 nm

Per a les proteïnes que no tenen aminoàcids aromàtics, es pot utilitzar l'absorció a longituds d'ona properes a l'enllaç peptídic. L'enllaç peptídic és el cromòfor més important de les proteïnes i presenta un màxim d'absorció al voltant dels 200 nm (Scopes, 1974).

Una de les proteïnes estudiades amb absència d'aminoàcids aromàtics és la protamina de llobarro. A partir de l'anàlisi d'aminoàcids d'una solució aquosa de protamina de llobarro amb una absorbància coneguda a 230 nm i utilitzant concentracions conegudes de norleucina com a estàndard intern, s'ha aconseguit la següent relació (Prieto, 2002):

- Protamina de llobarro:  $DO_{230} = 2,12$  correspon a 1 mg/ml

Una altra proteïna que s'ha estudiat és la  $\phi_0$  d'holotúria. Per a aquesta proteïna s'ha utilitzat la relació donada per Subirana (comunicació personal):

- $\phi_0$  d'holotúria:  $DO_{230} = 1,2$  correspon a 1 mg/ml

Per determinar la concentració de l'octàmer d'histones s'ha utilitzat la relació donada per Stein (1979):

- Octàmer d'histones natives:  $DO_{230} = 4,2$  correspon a 1 mg/ml
- Octàmer d'histones tripsinades:  
no és possible calcular el coeficient d'extinció molar per a les histones tripsinades; la seva concentració es calcula de manera aproximada a partir de la  $DO_{260}$  (Wang et al., 2000) segons la relació:

$$DO_{260} = 0,23 \text{ correspon a 1 mg/ml.}$$

### 3.3.5 Quantificació de proteïnes mitjançant SDS-PAGE

A partir d'un gel de poliacrilamida amb SDS podem determinar la quantitat de proteïna present en les diferents bandes del gel. Caldrà escanejar el gel una vegada tenyit i assecat i integrar els pics (corresponents a cada banda de proteïna) mitjançant un densitòmetre. Per calcular una recta patró, en el mateix gel haurem de tenir mostres de la mateixa proteïna de concentració coneguda (proteïnes diferents poden tenir diferent afinitat per unir-se al colorant). Sabent la relació entre les intensitats dels pics de la proteïna patró i la seva concentració, podrem determinar la concentració de la proteïna estudiada. Aquest tipus d'anàlisi es pot fer mitjançant programes com l'AlphaEase™ (Alpha Innotech Corporation).

### 3.4 Altres mètodes

#### 3.4.1 Diàlisi de proteïnes

Freqüentment és necessari treure les sals o canviar el tampó que acompanya les proteïnes i se sol utilitzar la tècnica de diàlisi. La solució de proteïna es col·loca en una bossa de membrana semipermeable i es posa dins d'un recipient amb un tampó adequat. Les molècules petites podran passar a través de la membrana, mentre que les molècules més grosses seran retingudes a l'interior.

S'han utilitzat membranes de cel·lulosa regenerada de la casa Spectra/Por<sup>®</sup> (Spectrum<sup>®</sup>) de diferent mida de porus, el qual determina el pes molecular mínim (MWCO) que serà retingut per la membrana. S'han utilitzat membranes de MWCO 10.000 Da per a mostres de nucleosomes, 6.000-8.000 Da per a mostres de nucleoplasmina i 3.500 Da per a mostres d'histones, protamina i  $\phi_0$ .

Cal humitejar i rentar prèviament la membrana amb aigua o tampó per extreure'n les restes de glicerol. Per tancar els extrems de la membrana se solen utilitzar uns clips especials de la casa Spectrum<sup>®</sup>. Les molècules petites passen lliurement a través de la membrana fins que la pressió osmòtica a dins i a fora de la membrana s'igualen. Se solen fer canvis del tampó de diàlisi amb una freqüència aproximada de 3 hores amb agitació constant. Amb l'augment del MWCO, disminueix el temps necessari per arribar a l'equilibri. Les diàlisis se solen realitzar a 4 °C per evitar la possible degradació de la proteïna.

La diàlisi també es pot utilitzar com a mètode per concentrar proteïnes, en la denominada *diàlisi inversa*. Les proteïnes es dialitzen enfront d'un medi altament higroscòpic, com per exemple el PEG 35.000 al 15%, i per tant, les bosses de diàlisi aniran perdent tampó i la proteïna s'anirà concentrant.

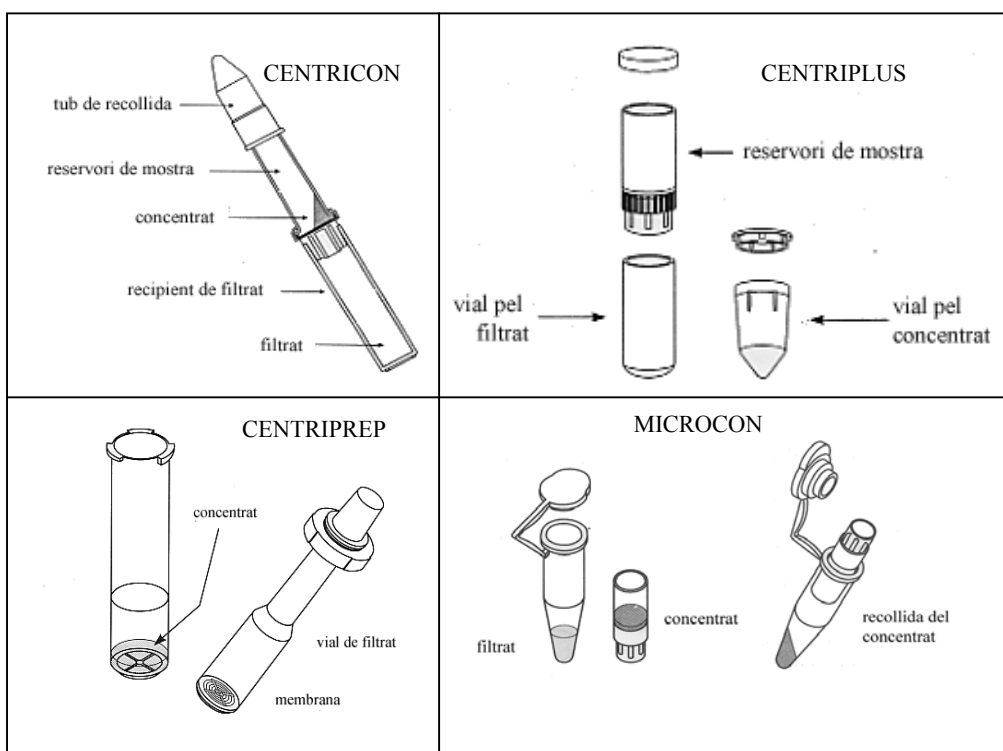
#### 3.4.2 Concentració de proteïnes per ultrafiltració

El sistema que s'ha utilitzat majoritàriament per concentrar proteïnes es basa en l'ús d'uns dispositius de concentració per centrifugació. Concretament, s'han fet servir els concentradors de tipus Centricon<sup>®</sup> i les seves variants Centriplus<sup>®</sup>, Centriprep<sup>®</sup> i Microcon<sup>®</sup>, de la casa Amicon<sup>®</sup> (vegeu la taula II.11 i la figura II.7). La concentració es dona per ultrafiltració de la mostra a través d'una membrana anisotròpica. La força centrífuga condueix el solvent i els soluts de baix pes molecular a través de la membrana i cap al vial de filtrat. Els macrosoluts per sobre del pes molecular límit (MWCO) són retinguts en el reservori. A mesura que va disminuint el volum de la mostra, va augmentant la seva concentració.



**Taula II.11 Concentradors per ultrafiltració.** Per a les mostres de nucleoplasmina s’han utilitzat MWCO de 10.000. S’ha utilitzat un rotor SS-34 i centrífuga Sorvall per Centricon, Centriplus i Centriprep i una microcentrífuga Sigma per Microcon.

CONCENTRADORS				
Dispositiu	Força centrífuga concentració	Volum inicial	Força centrífuga recollida	Volum final
Centricon	3.000 g	2 ml	1.000 g	40 µl
Centriplus	3.000 g	15 ml	1.000 g	<1 ml
Centriprep	3.000 g	15 ml	-	0,7 ml
Microcon	10.000 g	0,5 ml	1.000 g	10 µl



**Fig. II.7 Concentradors.** Es mostren els diferents dispositius de concentració de proteïnes utilitzats.

Per eliminar les restes de glicerol que conté la membrana convé rentar prèviament el dispositiu amb aigua i centrifugar a la velocitat de treball durant 15-20 minuts. La proteïna que volem concentrar hauria de ser del 30-50% més gran que el MWCO per assegurar que serà retinguda. Per recuperar al màxim la mostra una vegada concentrada, cal recollir el concentrat dins el vial de recollida invertint el tub concentrador i centrifugant a baixa velocitat.

Aquest mètode també pot servir per dessalar la mostra. Podem concentrar la mostra i posteriorment diluir-la amb un tampó adequat i tornar-la a concentrar. Podem anar fent passos de concentració-dilució fins a aconseguir una disminució suficient de sal.

### 3.4.3 Determinació de la composició aminoacídica de proteïnes

Un dels mètodes més utilitzats per saber la composició aminoacídica de proteïnes és la hidròlisi en medi àcid (vegeu el protocol 22). El mètode estàndard per a la hidròlisi de proteïnes utilitzant 6 N HCl a 110 °C durant 24 hores va ser descrit per Moore i Stein (1963). En aquest mètode es dóna una pèrdua del 5-40% de Ser, Thr i Tyr i 50-100% de Cys, Trp, sucres aminats i aminoàcids fosforilats. També hi ha una destrucció d'Asn i Gln a causa de la conversió del grup amida a carboxil, que dóna lloc a Asp i Glu, respectivament (Allen, 1989). Hi ha certs enllaços peptídics que no queden totalment hidrolitzats, com ara els dels aminoàcids hidrofòbics Val, Leu i Ile. Existeixen algunes alternatives a la hidròlisi àcida convencional que minimitzen la degradació de determinats residus.

**Protocol 22. Hidròlisi de proteïnes.** Hidròlisi de proteïnes en medi àcid per determinar la composició aminoacídica de proteïnes.

<b>HIDRÒLISI DE PROTEÏNES</b>
1- Porteu la mostra de proteïna fins a 6 N HCl. Convé afegir-hi un control negatiu sense proteïna.
2- Poseu la barreja al tub d'hidròlisi (prèviament rentat amb solució cròmica) i congeleu-la amb neu carbònica i acetona.
3- Feu el buit a l'interior del tub per evitar la presència d'oxigen.
4- Segelleu el tub de vidre hermèticament.
5- Col·loqueu el tub a l'estufa d'hidròlisi a 110 °C durant 24 hores.
6- Obriu el tub i assequeu immediatament al rotavapor (45 °C, durant 10-15 minuts) per evaporar l'àcid.

Després de l'etapa d'hidròlisi caldrà separar i identificar els diferents aminoàcids alliberats. Aquesta part del procés s'ha realitzat als Serveis Científico-tècnics de la Universitat de Barcelona (SCT-UB).

La majoria d'aminoàcids no posseeix una absorbància a l'UV o fluorescència significant a longituds d'ona adequades per detectar-los. Per tant, es fa necessària la formació de derivats d'aquests aminoàcids de manera que puguin ser detectats. La derivatització dels aminoàcids es pot dur a terme abans o després de la seva separació cromatogràfica i bàsicament consisteix en la reacció del grup amino primari de l'aminoàcid per donar un derivat acolorit o fluorescent.

Es va utilitzar un autoanalitzador d'aminoàcids de tipus LKB Alpha-Plus (Pharmacia Biotech) que utilitza una reïna d'intercanvi catiònic de poliestirè sulfonat. La mostra es dissol en tampó citrat de liti a pH 2,2 i es filtra abans de carregar-la a la columna. L'elució es fa mitjançant tampons de citrat de liti de pH i força iònica creixents. La derivatització es fa postcolumna i l'eluït es fa reaccionar a flux continu i temperatura elevada (135 °C) amb ninhidrina. Els derivats que s'obtenen tenen un màxim d'absorció al voltant de 570 nm per als aminoàcids i 440 nm per als iminoàcids.

La identificació dels diferents aminoàcids es fa a partir del seu temps de retenció, comparant-lo amb un patró que s'hagi eluït en les mateixes condicions que la mostra. La quantificació es fa comparant les àrees de cada pic respecte a les àrees del patró de concentració coneguda. L'aparell utilitza un patró intern de norleucina i ió amoni.

#### 3.4.4 Gradients de sacarosa

Els gradients de sacarosa s'utilitzen per separar molècules amb diferent coeficient de sedimentació (v. ap. II-7.2). Els gradients s'elaboren amb l'ajut d'un formador de gradients, que consisteix en un sistema de vasos comunicants on en un dels recipients es posa la solució concentrada i en l'altre la diluïda. El recipient per a la solució concentrada tindrà un sistema de barreja (per vibració o mitjançant un petit imant) i a mesura que va sortint la solució més concentrada (cap al tub de recollida) hi anirà entrant solució diluïda. S'han d'utilitzar tampons freds i els tubs de centrifuga on es recull el gradient han d'estar en gel. Per separar les mostres de nucleoplasmina i d'histones es van utilitzar gradients lineals continus del 20% al 5% de sacarosa. Una vegada format el gradient, la mostra es diposita a la part superior del tub. S'utilitza una ultracentrifuga amb un rotor flotant i les diferents molècules s'aniran separant per bandes segons el seu coeficient de sedimentació. Finalment, les diferents fraccions es recullen des del fons del tub amb l'ajuda d'una bomba i un col·lector de fraccions.

## 4. MÈTODES D'OBTENCIÓ I MANIPULACIÓ DE DNA

### 4.1 Preparació de DNA plasmídic

#### 4.1.1 Preparació de DNA plasmídic (*miniprep*)

La preparació de DNA plasmídic a petita escala també s'anomena *miniprep* o *mini*. Per obtenir *minipreps* se solen utilitzar bacteris *E. coli* TG1. Aquesta soca bacteriana es caracteritza pel fet de tenir molta facilitat per ser transformada, ja que només requereix una incubació durant 30 minuts en gel.

S'ha utilitzat el Quantum Prep<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit (Bio-Rad), que permet la ràpida purificació de DNA plasmídic a partir d'un cultiu de poc volum. El DNA plasmídic es purifica mitjançant una matriu de diòxid de silici, que té una gran afinitat per al DNA. En el darrer pas s'elueix el DNA plasmídic amb 50 µl d'aigua estèril prèviament escalfada a 70 °C. Aquest mètode permet obtenir rendiments de 25 µg de DNA a partir d'1,5 ml de cultiu.

#### 4.1.2 Preparació de DNA plasmídic (*midiprep*)

La preparació de DNA plasmídic a escala mitjana també s'anomena *midiprep* o *mid*. S'ha fet servir el Plasmid Purification Kit (Qiagen), que utilitza un protocol de purificació de DNA plasmídic basat en el mètode de la lisi alcalina (Birnboim i Doly, 1979). S'han descrit rendiments d'entre 20-100 µg de plasmidi purificat per 100 ml de cultiu, per plasmidis de baix nombre de còpia com els derivats de pBR322 (per exemple, els vectors pET). Es recomana utilitzar la soca d'*E. coli* XL1-Blue ja que, tot i ser de creixement lent, dona de DNA de gran qualitat (ideal per a seqüenciació). Després de recollir els bacteris del cultiu, es fa una lisi alcalina amb NaOH-SDS; posteriorment es neutralitza afegint-hi acetat potàssic i es purifica mitjançant una reïna d'intercanvi aniónic. Finalment es fa una precipitació amb isopropanol que permetrà dessalar i concentrar la mostra.

### 4.2 Electroforesi de DNA en gels d'agarosa

L'electroforesi és el mètode habitual per a la separació i identificació de molècules o fragments de DNA i RNA. Se solen utilitzar gels de poliacrilamida per a fragments petits de DNA (5-500 pb), oligonucleòtids i RNA. Per a fragments grans de DNA (500 pb-10 Mb) s'utilitzen gels d'agarosa.

Els àcids nucleics estan carregats negativament, a causa de la càrrega negativa procedent del grup fosfat, i migraran cap al pol positiu. La migració serà proporcional

a la mida de la molècula, però podrà ser influenciada per la seva conformació. El DNA pot ser lineal o circular i el DNA circular de doble hèlix pot estar relaxat o superenrotllat. Migren més els DNA circulars que els lineals i encara més si estan superenrotllats.

En aquest treball s'han utilitzat únicament els gels d'agarosa per a la separació de DNA. L'agarosa és un polisacàrid que s'obté d'algues marines. Habitualment s'utilitzen agaroses amb un punt de fusió al voltant de 80-90 °C i un punt de gelificació de 35 °C aproximadament. L'agarosa en pols es dissol amb el tampó d'electroforesi escalfant a 100 °C. Una vegada dissolta, s'aboca en un suport horitzontal, que ja contindrà la pinta.

El percentatge d'agarosa que utilitzarem dependrà de la mida del DNA que vulguem separar (vegeu la taula II.12). S'han utilitzat gels a l'1% d'agarosa (vegeu la composició de gels d'agarosa i tampons a la taula II.13). L'electroforesi es porta a terme en cubetes horitzontals, de manera que el tampó de cubeta cobreixi totalment el gel.

**Taula II.12 Percentatges d'agarosa.** Percentatge d'agarosa utilitzat segons la mida del DNA que es vol separar.

% agarosa	mida DNA (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2	0,1-0,2

**Taula II.13 Electroforesi en gels d'agarosa.** Electroforesi per separar DNA.

Electroforesi en gels d'agarosa		
gel d'agarosa	tampó de cubeta (TAE)	tampó de mostres
1% agarosa en TAE 0,5 µg/ml BrEt  (per a 30 ml) 0,3 g agarosa en 30 ml TAE 1,5 µl BrEt 10 mg/ml	(per a 1 L 50x) 242 g Tris 57,1 ml àcid acètic glacial 100 ml EDTA 0,5 M pH 8  (composició 1x) 0,04 M Tris-acetat 0,001 M EDTA pH 8	(per a 10 ml 6x)  0,25% (w/v) taronja G es dissol en 5 ml TAE s'hi afegixen 5 ml de glicerol

Per visualitzar el DNA en els gels d'agarosa se sol utilitzar la detecció amb bromur d'etidi (BrEt). El bromur d'etidi és un compost aromàtic que s'intercala entre les bases del DNA. Aquest compost es pot afegir directament al gel abans que gelifiqui o bé es pot tenyir el gel *a posteriori* amb una solució de bromur d'etidi. En il·luminar el gel amb llum UV, els complexos DNA-BrEt emeten fluorescència. Cal fotografiar el gel per tenir un registre gràfic dels resultats (s'utilitza filtre Wratten 22A de color taronja, Kodak).

### 4.3 Mutagènesi dirigida

La mutagènesi dirigida és una tècnica molt valuosa per estudiar la relació estructura-funció en les proteïnes. Hem utilitzat el QuikChange™ Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Cal tenir un vector de doble cadena (motllo) que tingui l'insert d'interès i dos oligonucleòtids (oligos o *primers*) que tinguin la mutació desitjada (vegeu el protocol 23).

S'utilitza la tècnica de PCR i l'enzim Pfu Turbo™ DNA polimerasa (amb més fidelitat que la tradicional Taq DNA polimerasa). Després dels cicles de temperatura, cal digerir el DNA no mutat (motllo) mitjançant l'enzim Dpn I endonucleasa, que és específic per a DNA metilat i hemimetilat (seqüència diana 5'-Gm6ATC-3'). El DNA aïllat de la majoria de soques d'*E. coli* és metilat. El DNA mutat contindrà un *nick* que haurà de ser reparat en cèl·lules Epicurian Coli® XL1-Blue supercompetents (vegeu el protocol 24).

**Protocol 23. Disseny d'oligonucleòtids per mutagènesi dirigida.** Els oligonucleòtids utilitzats en aquest treball han estat sintetitzats per ARK Scientific (Ecogen).

DISSENY D'OLIGONUCLEÒTIDS
1- Els dos oligos han de tenir la mutació i anellar-se a la mateixa seqüència però en cadenes oposades del plasmidi.
2- Els oligos han de tenir una mida d'entre 25-45 pb i una Tm de $\geq 78$ °C. $Tm = 81,5 + 0,41(\% GC) - 675/N - \% \text{desaparellament}$ N és la mida del <i>primer</i> en bases (% GC i % desaparellament són nombres sencers)
3- La mutació ha d'estar al mig de l'oligo i amb 10-15 bases de seqüència correcta a cada cantó.
4- Els oligos haurien de tenir un %GC del 40% i haurien d'acabar en una o més G o C.
5- Convé que els oligos s'hagin purificat per cromatografia o PAGE.

**Protocol 24. Mutagènesi dirigida.** Resum del protocol utilitzat amb el Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit (Statagene) per a la introducció de mutacions puntuals.

<b>MUTAGÈNESI DIRIGIDA</b>	
1- <u>Preparació de la barreja de reacció</u> (afegiu en aquest ordre):	
5 µl de barreja de reacció (10x)	
2 µl (20 ng) de DNA (preparat a 10 ng/µl)	
1,25 µl (125 ng) d'oligo 5' (preparat a 100 ng/µl)	
1,25 µl (125 ng) d'oligo 3' (preparat a 100 ng/µl)	
1 µl de dNTP <i>mix</i>	
39,5 µl d'H <sub>2</sub> O estèril	
1 µl de Pfu Turbo DNA polimerasa (2,5 U/µl)	
cobriu amb 30 µl d'oli mineral	
2- <u>Cicles de temperatura</u> (per mutacions puntuals), per a un termociclador PTC-150 Minicycler (MJ Research)	
cicles	(x1) 95 °C 30''
	(x12) desnaturalització 95 °C 30''
	anellament 55 °C 1'
	polimerització 68 °C 2'/kb de plasmidi
(x1) 4 °C 5' (mínim)	
3- <u>Digestió amb Dpn I</u>	
1 µl d'enzim (10 U/µl) per 10 µl de reacció de PCR	
incubeu durant 1 hora a 37 °C	
4- <u>Transformació</u>	
(1)- Barregeu 50 µl de cèl·lules Epicuran Coli XL1-blue + 1 µl de DNA digerit amb DpnI.	
(2)- Incubeu en gel durant 30 minuts.	
(3)- Xoc tèrmic a 42 °C durant 45 segons.	
(4)- Incubeu en gel durant 2 minuts.	
(5)- Afegiu-hi 0,5 ml de medi NZY <sup>+</sup> (v. apèndix A) preescalfat a 42 °C, 1 hora a 37 °C i 250 rpm.	
(6)- Escampeu sobre una càpsula amb LB + antibiòtic i incubeu O/N a 37 °C.	

#### 4.4 Seqüenciació de DNA

S'ha utilitzat una tècnica de seqüenciació de DNA basada en el mètode de Sanger (1978). Aquest mètode utilitza DNA de cadena senzilla, DNA polimerasa i barreja de desoxinucleòtids (dNTP) i didesoxinucleòtids (ddNTP). Els ddNTP no tenen un dels grups hidroxil; per tant, es podran incorporar a la cadena però no permetran formar un enllaç amb el següent nucleòtid, cosa que provocarà una aturada en la polimerització. La incorporació de ddNTP es donarà a l'atzar i permetrà obtenir

una barreja de fragments de DNA de mida diferent, i es cobriran totes les mides possibles per a un DNA d'una mida determinada. Els ddNTP poden estar marcats radioactivament. Es fa una reacció per a cada tipus de nucleòtid per separat i s'analitzen els resultats en gels de poliacrilamida, per deduir la seqüència nucleotídica, amb l'autoradiografia prèvia del gel.

Actualment s'utilitza molt més la tècnica de seqüenciació per fluorescència. S'ha utilitzat l'ABI Prism<sup>®</sup> Big Dye<sup>™</sup> Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE, Applied Biosystems) (vegeu protocol 25).

**Protocol 25. Seqüenciació de DNA per fluorescència.** S'ha utilitzat l'ABI Prism<sup>®</sup> Big Dye<sup>™</sup> Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, v.2.0 (PE, Applied Biosystems) i un termociclador PTC-150 Minicycler (MJ Research).

<b>SEQÜENCIACIÓ PER FLUORESCÈNCIA</b>		
1- <u>Preparació de la barreja de reacció</u>		
	4 µl <i>ready reaction mix</i>	
	0,5 µl DMSO	
	200-500 ng DNA plasmídic (motllo)	
	3,2 pmol oligo ( <i>primer</i> )	
	H <sub>2</sub> O fins a 10 µl	
	20 µl d'oli mineral	
2- <u>Cicles de temperatura</u>		
cicles	{	(x1) 94 °C 3'
		(x25) desnaturalització 96 °C 30''
		anellament 45 °C 15''
		polimerització 60 °C 4'
		(x1) 4 °C 5' (mínim)
3- <u>Precipitació amb EtOH</u>		
(1)- Barregeu 27,5 µl H <sub>2</sub> O + 62,5 µl EtOH 96% (concentració final de EtOH 60 ± 3%).		
(2)- Afegiu-hi la reacció de PCR (10 µl) i barregeu amb vòrtex suaument.		
(3)- Incubeu durant 15 minuts a T <sup>a</sup> ambient.		
(4)- Centrifugueu durant 30 minuts a velocitat màxima.		
(5)- Separeu totalment el sobrenedant.		
(6)- Afegiu-hi 200 µl de EtOH 70% (no vòrtex), centrifugueu durant 5 minuts a velocitat màxima. Descarteu el sobrenedant.		
(7)- Repetiu el pas anterior.		
(8)- Assequeu la mostra 15-20 minuts a l'aire i porteu-la a seqüenciar als SCT-UB.		

Aquest sistema utilitza l'AmpliTa<sup>®</sup>q DNA Polymerasa (FS), la qual és una variant de la Taq polimerasa amb menor discriminació contra els ddNTP i sense



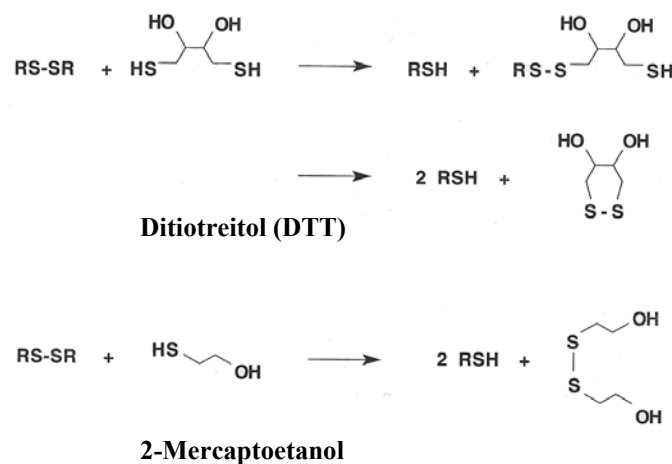
activitat 5'→3' nucleasa. El sistema incorpora ddNTP o terminadors marcats amb un fluoròfor diferent per a cada nucleòtid, de manera que es podrà fer la reacció de seqüència en un sol tub.

Per desfer-nos de les restes de ddNTP que no s'hagin incorporat a la seqüència, és molt important eliminar totalment el sobrenedant després del primer pas de centrifugació (passos 4 i 5 del protocol 25). La presència de ddNTP lliures podria interferir en els resultats de seqüenciació i donar soroll de fons, tot i que és normal observar traces de ddNTP al començament de la seqüència. La incorporació de DMSO es recomana en DNA ric en GC per evitar la formació d'estructures secundàries que interferirien en la polimerització. El producte de les reaccions de seqüenciació es porta als SCT-UB, on serà seqüenciat mitjançant l'aparell ABI Prism 3700 DNA Analyser.

## 5 MÈTODES PER A L'ESTUDI DE LES CISTEÏNES

### 5.1 Agents reductors

Els agents reductors permeten la reducció o guany d'electrons. Són molt utilitzats per prevenir l'oxidació dels grups tiol dels residus de Cys. Existeixen diversos agents reductors; els més comuns són el β-mercaptoetanol i el DTT (ditiotreitòl o reactiu de Cleland) (Cleland, 1964). El DTT té certs avantatges, com la resistència a l'oxidació per l'aire i una olor no tan desagradable com la del β-mercaptoetanol. A la figura II.8 es mostra l'estructura d'aquests compostos.



**Fig. II.8 Agents reductors.** Es mostra l'estructura del DTT i el β-mercaptoetanol i la seva interacció amb els grups tiol de les proteïnes. Figura adaptada de Kellner et al. (1999).

## 5.2 Alquilació amb iodoacetamida

La iodoacetamida (vegeu la figura II.9) és un agent alquilant que s'uneix als grups SH de les cisteïnes de manera ràpida i irreversible. Els grups tiol que estiguin enterrats a l'interior de la molècula no reaccionaran fàcilment amb la iodoacetamida en condicions natives, però sí que ho faran si desnaturalitzem la proteïna. Només els tiols ionitzats serien reactius. Tenint en compte que el pK de la majoria de tiols es troba entre 8 i 10, el pH de la solució de proteïna hauria de ser neutre o lleugerament alcalí. Al protocol 26 es detalla l'alquilació de proteïnes en condicions reductores, mètode basat en Gusse et al. (1983).



**Fig. II.9 Iodoacetamida.** Es mostra el mecanisme d'acció de l'agent alquilant iodoacetamida en reaccionar amb els grups tiol de les cisteïnes.

**Protocol 26. Alquilació de proteïnes amb iodoacetamida.** Protocol basat en Gusse et al. (1983).

<b>Alquilació amb iodoacetamida</b>	
1-	Reduïu i desnaturalitzeu la proteïna amb 1 ml per 0,2 mg de proteïna de la solució:
	8 M urea 20 mM DTT 10 mM Tris pH 8 0,5 M NaCl
2-	Bombollegeu la mostra amb N <sub>2</sub> (per eliminar l'oxigen).
3-	Incubeu la barreja a 37 °C durant 30 minuts.
4-	Afegiu-hi iodoacetamida 50 mM (en 50 mM Tris pH 8).
5-	Bombollegeu la mostra amb N <sub>2</sub> .
6-	Incubeu a 37 °C durant 30 minuts.

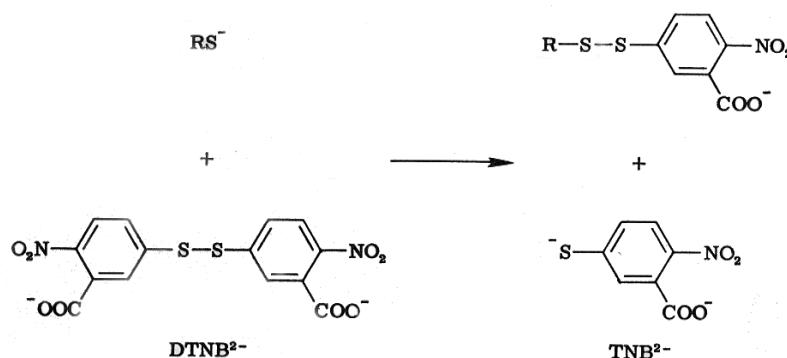
## 5.3 Quantificació de grups tiol lliures

Per a la quantificació dels grups tiol en les proteïnes se sol utilitzar el reactiu d'Ellman o DTNB (5,5'-ditiobis(2-àcid nitrobenzoic)) (Ellman, 1959). És un reactiu

soluble en aigua i estable a pH neutre si es protegeix de la llum, amb un màxim d'absorció a 324 nm. Quan reacciona amb el grup  $R-S^-$  (base conjugada del tiol) de les cisteïnes, es descompon i dona lloc a l'anió  $TNB^{2-}$  (de color groc), que té el seu màxim d'absorció a 412 nm (v. fig. II.10).

L'assaig de quantificació de grups tiol mitjançant DTNB se sol fer amb un excés de DTNB (Riddles et al., 1983). La quantificació es fa segons l'equació de Beer-Lambert  $A=\epsilon lxc$ , on els valors d'absorbància ( $A$ ) es mesuraran a 412 nm, el coeficient d'extinció molar ( $\epsilon$ ) a 412 nm correspon a  $14.150 M^{-1} cm^{-1}$  per al  $TNB^{2-}$ , i la concentració ( $c$ ) correspondrà a la dels grups tiol.

Els grups tiol que estiguin enterrats seran inaccessibles al DTNB i caldrà desnaturalitzar la proteïna per poder quantificar-los. Per minimitzar la descomposició del DTNB que no ha reaccionat, cal treballar en condicions de pH 7,27. També cal tenir en compte que, en presència d'oxigen, l'ió  $TNB^{2-}$  es podria reoxidar per donar DTNB i causaria un decrement en la DO a 412 nm al llarg del temps; per això convé treballar amb els tampons i la mostra prèviament bombollejats amb  $N_2$ .



**Fig. II.10 Estructura del DTNB.** Estructura del DTNB (reactiu d'Ellman) i descomposició en l'ió  $TNB^{2-}$  en reaccionar amb el grup SH de les cisteïnes. Figura adaptada de Riddles et al. (1983).

També hi pot haver una oxidació dels residus de cisteïna, abans que reaccionin amb el DTNB, catalitzada per la presència de traces de metalls de transició, que en podria dificultar la interacció amb el DTNB. És aconsellable treballar en presència d'1 mM EDTA. S'han utilitzat dues aproximacions per a la quantificació dels grups tiol: la primera, mitjançant la determinació directa de l'absorbància segons un protocol modificat de Riddles et al. (1983) (vegeu el protocol 27), i la segona, mitjançant una recta patró amb Cys segons el mètode descrit per Hierro (2002) (vegeu el protocol 28).

**Protocol 27. Quantificació de Cys (mètode 1).** Quantificació de Cys lliures en proteïnes natives, mitjançant DTNB. El tampó convé que estigui bombollejat amb N<sub>2</sub> durant 1 minut, just abans d'iniciar l'anàlisi, per minimitzar la presència d'oxigen. A la cubeta de referència hi tindrem 0,1 M tampó fosfat sòdic pH 7,27, 1 mM EDTA (sense DTNB).

<b>Quantificació de Cys (mètode 1)</b>
1- Quantifiqueu entre 50-100 µg de proteïna, porteu fins a 50 µl amb 0,1 M tampó fosfat sòdic pH 7,27, 1 mM EDTA. Prepareu en paral·lel un blanc idèntic però sense proteïna.
2- Afegiu-hi 200 µl 0,1 M tampó fosfat sòdic pH 7,27, 1 mM EDTA.
3- Afegiu 50 µl de DTNB 4 mg/ml (en el tampó anterior).
4- Afegiu-hi 700 µl del tampó anterior.
5- Feu vòrtex per barrejar bé.
6- Passeu les mostres i el blanc a cubetes de poliestirè amb tap hermètic i manteniu-hi la mostra durant tot l'assaig.
7- Llegiu DO 412 nm al cap de 5', 10', 15', 30', 45', 60' (per a cada mostra i blanc).
8- Calculeu els increments d'absorbància entre la mostra i el blanc per a cada interval de temps.
9- Representeu gràficament els intervals i agafeu el valor d'absorbància més alt.
10- Apliqueu-hi la fórmula: $A = \epsilon \cdot l \cdot c$ on ( $\epsilon$ ) correspondrà a $14.150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ i ( $c$ ) serà la concentració molar de Cys de la mostra.

**Protocol 28. Quantificació de Cys (mètode 2).** Protocol facilitat pel Dr. Arturo Muga (Universitat del País Basc).

<b>Quantificació de Cys (mètode 2)</b>						
1- Prepareu en paral·lel el patró amb cisteïna i les mostres segons la taula següent: (convé bombollejar els tampons prèviament amb N <sub>2</sub> ).						
<b>recta patró</b>	<b>[Cys] final</b>	<b>Cys 250 µM</b>	<b>tampó</b>	<b>tampó</b>	<b>DTNB</b>	<b>tampó</b>
	0 µM	0 µl	45 µl	200 µl	50 µl	700 µl
	1,25 µM	5 µl	40 µl	200 µl	50 µl	700 µl
	2,5 µM	10 µl	30 µl	200 µl	50 µl	700 µl
	5 µM	20 µl	20 µl	200 µl	50 µl	700 µl
	7,5 µM	30 µl	10 µl	200 µl	50 µl	700 µl
	10 µM	40 µl	0 µl	200 µl	50 µl	700 µl
<b>mostres</b>	-	X µl	fins a 50µl	200 µl	50 µl	700 µl
2- Incubeu durant 15 minuts a T <sup>a</sup> ambient.						
3- Llegiu a 412 nm (a la cubeta de referència hi tindrem tampó sense DTNB).						
4- Representeu la recta patró per a les Cys (Abs 412 nm respecte a [Cys]).						
5- Extrapoleu els valors de concentració de les mostres a la recta obtinguda.						
<u>estocs de Cys</u> (prepareu en fresc) <b>L-Cys (Fluka)(250 mM)</b> <b>1000x</b> dissoleu 30 mg en 1 ml 0,1 M tampó fosfat sòdic pH 7,27, 1 mM EDTA <b>1x (250 µM) → estoc patró</b> 1µl en 999 µl del tampó anterior				<u>estoc DTNB</u> (4 mg/ml) <b>DTNB (Sigma)</b> Dissoleu 4 mg en 1 ml 0,1 M tampó fosfat sòdic pH 7,27, 1 mM EDTA		

## 6. TÈCNiques IMMUNOLÒGIQUES

### 6.1 Obtenció d'anticossos policlonals anti-NP

#### 6.1.1 Preparació de l'antigen i immunització

En aquest treball s'han obtingut anticossos policlonals en ous de gallina. Els ous provinents de gallines immunitzades són una font alternativa d'obtenció d'anticossos de manera senzilla i econòmica.

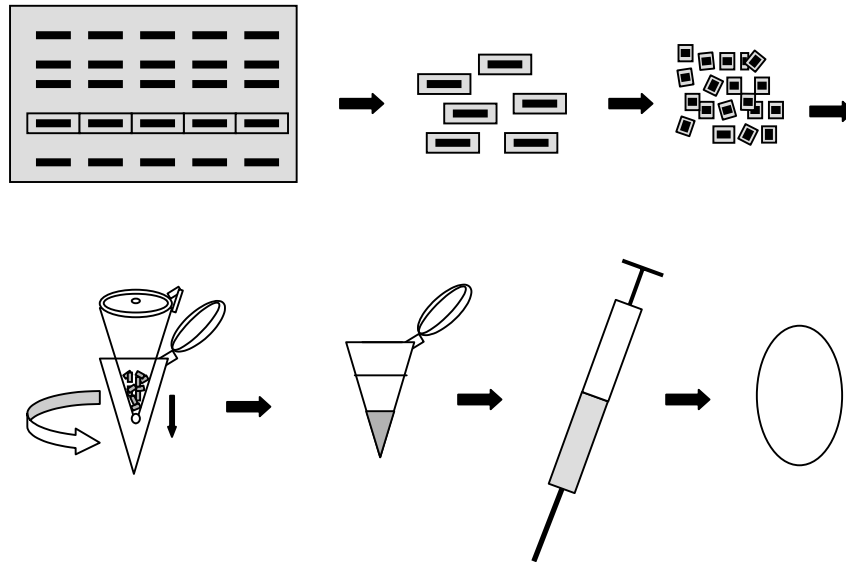
#### Preparació de l'antigen

Els antigens es preparen directament a partir d'un gel d' SDS-poliacrilamida al 15% de 0,75 mm de gruix. El gel es tenyeix amb Coomassie R-250 al 0,05% en aigua, durant 10 minuts, i es destenyeix en aigua durant unes hores, protocol descrit per Harlow i Lane (1988). Algunes proteïnes, concretament la r-NP121, tenen baixa afinitat per aquest colorant i pràcticament no es tenyeixen. Convé tenyir un dels carrils del gel, amb el colorant convencional per a gels de poliactilamida, per tenir-lo com a control. Es talla la banda d'antigen i es trinx a fins que quedi ben fi i es col·loca dins d'un Eppendorf amb la tapa i la base foradades. Aquest tub es col·loca dins d'un altre tub i se centrifuga a màxima velocitat durant 2' perquè el gel, en passar a través del forat de la base del tub, quedi com una pasta; aquest procés es pot repetir diverses vegades (vegeu la figura II.11). Posteriorment es resuspèn amb tampó PBS (volum final 500 µl) i s'hi afegeix 1 volum d'adjuvant.

#### Immunització

Les immunitzacions van ser realitzades per la Dra. Josefina Casas a l'estabulari del CID-CSIC (Barcelona). S'immunitzen gallines de la raça Prat (de plomatge marró), les quals es punxen sota l'ala. Per a cada immunització s'utilitzen aproximadament 80 µg d'antigen particulat. Es fa una primera immunització amb antigen i adjuvant complet, i a intervals de 15 dies dos recordatoris amb antigen i adjuvant incomplet.

Els adjuvants són estimulants inespecífics de la resposta immune; el més conegut és l'adjuvant de Freund (Freund, 1956). Es compon d'una barreja d'olis minerals que formaran una capa protectora de l'antigen contra el catabolisme. D'altra banda, porten substàncies estimulants de la resposta immune. Podem distingir entre adjuvant complet o incomplet. L'adjuvant complet genera una resposta immune primària més forta que l'incomplet. Aquest fet és degut a un dels seus components: el muramil dipèptid del bacteri *Mycobacterium tuberculosis*.



**Fig. II.11 Preparació de l'antigen.** Preparació de l'antigen directament a partir d'un gel d'SDS-poliacrilamida. Les bandes d'antigen es tallen en petits fragments i se centrifuga per homogeneïtzar, s'hi afegeix tampó PBS i el corresponent adjuvant i s'injecta directament a la gallina. Els anticossos s'obtidran a partir dels ous (vegeu el text per a més detalls).

### 6.1.2 Extracció d'anticossos

Els ous són recollits diàriament, es marquen i es guarden a 4 °C fins al moment de ser processats. Està descrit que els anticossos apareixen al rovell set dies després d'immunitzar, i se n'aconsegueix la màxima producció als dies 9-11; els nivells es mantenen durant 6-12 dies més (Bar-Joseph i Malkinson, 1980). Es van processar els ous a partir de set dies després de la tercera immunització i durant setze dies. Els ous van ser processats en grups de quatre.

Un dels inconvenients en la purificació d'anticossos a partir dels ous és la dificultat de separació de les IgY (IgG del rovell), dels lípids i la vitel·lina. S'ha utilitzat una modificació de la tècnica descrita per Polson i von Wechmar (1980), on s'utilitza el polietilenglicol per permetre la separació de les IgY i els lípids.

De la barreja d'anticossos que s'obté, només aproximadament el 5% serien específics per al nostre antigen. El protocol d'aquesta tècnica (protocol 29) va ser facilitat pel Dr. Jordi Bernués (CID-CSIC, Barcelona).

**Protocol 29. Extracció d'anticossos d'ous de gallina.** Aquest protocol permet obtenir extractes crus d'IgY. Els volums s'expressen en relació amb el volum inicial de rovell.

<b>Extracció d'anticossos d'ous de gallina</b>		
<p>1- Trenqueu els ous amb cura, separeu-ne els rovells (intenteu que no quedin restes de clara) i recolliu-los en una proveta. Mesureu el volum de quatre rovells junts.</p> <p>2- Afegiu-hi 2 volums de solució A i barregeu amb agitació magnètica durant 5 minuts.</p> <p>3- Centrifugueu a 23.300 g durant 10 minuts, a 4 °C (centrífuga Sorvall, rotor GSA).</p> <p>4- Recupereu el sobrenedant filtrat a través de dues capes de gasa.</p> <p>5- Afegiu-hi 1/3 de volum de solució B i barregeu amb agitació magnètica durant 5 minuts.</p> <p>6- Centrifugueu a 23.300 g durant 15 minuts o més.</p> <p>7- Resuspeneu el sediment amb PBS (1/3 - 1 volum).</p> <p>8- Guardeu la barreja d'anticossos a 4 °C amb azida sòdica 0,02%.</p>		
<p><u>PBS</u>                      1,37 mM NaCl                      0,027 mM KCl                      0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>                      0,0176 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                      pH 7,2                      (se sol preparar un estoc 10X)</p>	<p><u>Solució A</u>                      10 mM tampó fosfat pH 7,5                      100 mM NaCl                      5,25% PEG 8.000</p>	<p><u>Solució B</u>                      10 mM tampó fosfat pH 7,5                      100 mM NaCl                      37,5% PEG 8.000</p>

### 6.1.3 Purificació d'anticossos per immunoafinitat

El mètode que s'utilitza per purificar anticossos específics per a un antigen determinat és la purificació per immunoafinitat. L'antigen s'uneix covalentment a un suport sòlid; només els anticossos específics per a l'antigen s'hi podran unir i la resta seran eliminats en el rentat. Els desavantatges d'aquest mètode són que requereix grans quantitats d'antigen i els mètodes d'elució requereixen condicions que poden comportar la pèrdua d'activitat de l'anticòs.

El mètode de purificació més utilitzat és el que es basa en una cromatografia sobre una matriu d'agarosa activada amb bromur de cianogen. Els desavantatges d'aquest tipus de reïna són, d'una banda, la gran toxicitat del bromur de cianogen i, d'altra banda, que la unió de l'antigen a la fase sòlida no és gaire estable.

S'ha utilitzat una reïna de Sepharosa 4B activada amb bromur de cianogen (Sigma), a la qual s'uneix l'antigen a través dels seus grups amino lliures (vegeu el protocol 30).

Posteriorment s'hi passa la barreja d'anticossos policlonals, que contindrà també algunes restes de proteïnes del rovell (extracte cru). L'elució dels anticossos específics té lloc per variacions en el pH del tampó (vegeu el protocol 31).

**Protocol 30. Preparació de la matriu per immunoafinitat.** Els volums es refereixen al volum inicial de matriu. Protocol segons la casa Sigma.

<b>Preparació de la matriu d'immunoafinitat</b>
1- Renteu i hidrateu la matriu de Sepharosa 4B-bromur de cianogen amb 1 mM HCl en fred (200 ml/g matriu), repartit en 5 rentats de 40 ml (6 minuts cada rentat), utilitzant agitació per rotació (per eliminar la lactosa i el dextrà que estableixen la reïna i preservar els grups reactius, que s'hidrolitzen a pH elevat). Deixeu sedimentar durant 5' i descarteu el sobrenedant en cada rentat.
2- Renteu la matriu amb H <sub>2</sub> O (5-10 volums), en agitació per rotació durant 10 minuts. Deixeu sedimentar durant 5' i descarteu el sobrenedant.
3- Renteu amb tampó 0,5 M NaCl i 0,1 M NaHCO <sub>3</sub> pH 8,3-8,5 (5 ml/g matriu) i immediatament carregueu l'antigen (5 mg antigen/ml de matriu empaquetada).
4- Incubeu la barreja O/N a 4 °C i agitació per rotació (alternativament es pot deixar 2 hores a T <sup>a</sup> ambient).
5- Deixeu sedimentar durant 15 minuts i separeu el sobrenedant (amb l'antigen no unit).
6- Renteu el lligand no unit amb 10 volums de tampó (vegeu el pas 3), repartit en x2 rentats de 6 minuts, deixeu sedimentar durant 5' i descarteu el sobrenedant.
7- Bloquegeu els grups que no han reaccionat, amb 10 volums de 0,2 M glicina pH 8, durant 2 hores a T <sup>a</sup> ambient (alternativament, 16 hores a 4 °C).
8- Renteu extensivament per eliminar el tampó de bloqueig amb 4 cicles bàsic/àcid: <ul style="list-style-type: none"> <li>- cicle bàsic: 0,5 M NaCl, 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,3-8,5 5 volums, 5' en agitació → sedimenteu 5' → descarteu el sobrenedant</li> <li>- cicle àcid: 0,5 M NaCl, 0,1 M tampó acetat sòdic pH 4 5 volums, 5' en agitació → sedimenteu 5' → descarteu el sobrenedant</li> </ul>
9- Afegiu-hi x5 volums de tampó 1 M NaCl, 0,03% azida sòdica i guardeu a 4 °C.

Els anticossos se solen guardar amb azida sòdica al 0,02%. Són estables a 4 °C durant mig any aproximadament. Es poden congelar a -20 °C, preferentment amb glicerol al 50% en petites alíquotes, ja que perden activitat en congelar/descongelar repetides vegades. Per quantificar els anticossos purificats, es pot utilitzar la relació 1 DO 280 nm = 0,75 mg/ml .



**Protocol 31. Purificació d'anticossos per immunoafinitat.** Protocol modificat de Harlow i Lane (1988). Els volums s'expressen en relació amb el volum inicial de matriu. Tots els passos estan fets a 4 °C excepte el primer.

<b>Purificació d'anticossos per immunoafinitat</b>
1- Equilibreu la columna de Sheparosa-bromur de cianogen amb x5 volums de PBS per gravetat.
2- Centrifugueu la mostra durant 10 minuts a 12.000 g (4 °C) (algunes mostres poden presentar, amb el temps, una capa de lípids a la superfície que caldrà separar per filtració i/o centrifugació).
3- Carregueu la mostra (flux 10-15 ml/hora) i recolliu l'eluit ( <i>flow through</i> ).
4- Renteu amb 10-20 volums de 10 mM Tris pH 7,5 (flux 10-15 ml/hora).
5- Renteu amb 10-20 volums de 0,5 M NaCl, 10 mM Tris pH 7,5 (flux 10-15 ml/hora).
6- Eluïu anticossos sensibles a interaccions àcides amb 10 volums de 100 mM glicina pH 2,5 (flux 15-20 ml/hora). Recolliu l'eluit en dos tubs (2x5 ml) sobre 500 µl d'1 M Tris pH 8 (en cada tub).
7- Renteu amb Tris 10 mM pH 8,8, 15-20 volums o fins que el pH s'hagi recuperat (flux 15-20 ml/hora).
8- Eluïu anticossos sensibles a interaccions bàsiques amb 10 volums de 100 mM trietilamina pH 11,5 (flux 15-20 ml/hora). Recolliu l'eluit en dos tubs (2x5 ml) sobre 500 µl d'1 M Tris pH 8 (en cada tub).
9- Renteu amb Tris 10 mM pH 7,5, 15-20 volums o fins que el pH s'hagi recuperat (flux 15-20 ml/hora).
10- Finalment, feu un rentat amb 5 volums de Tris 10 mM pH 7,5, azida sòdica 0,03% (gardeu la matriu en aquest tampó).

## 6.2 Transferència de proteïnes (*western-blot*) i immunodetecció

Aquesta tècnica consisteix en la transferència (*blotting*) dels antígens des d'un gel SDS-PAGE cap a un suport sòlid (membrana) i la reacció posterior amb un anticòs primari específic per a l'antigen. Posteriorment, s'hi afegeix un segon anticòs (secundari) que estarà marcat enzimàticament i reconeixerà l'anticòs primari; donarà un senyal colorimètric o lluminós en incubar-lo amb el substrat adequat.

### Transferència (*western-blot*)

La transferència de molècules a partir d'un gel d'electroforesi cap a una membrana va ser descrita originalment per Southern (1975) i s'anomenà *southern-blot* per a molècules de DNA. Posteriorment es va aplicar a molècules de RNA (*northern-blot*) i a proteïnes (*western-blot*) (Towbin et al., 1979).

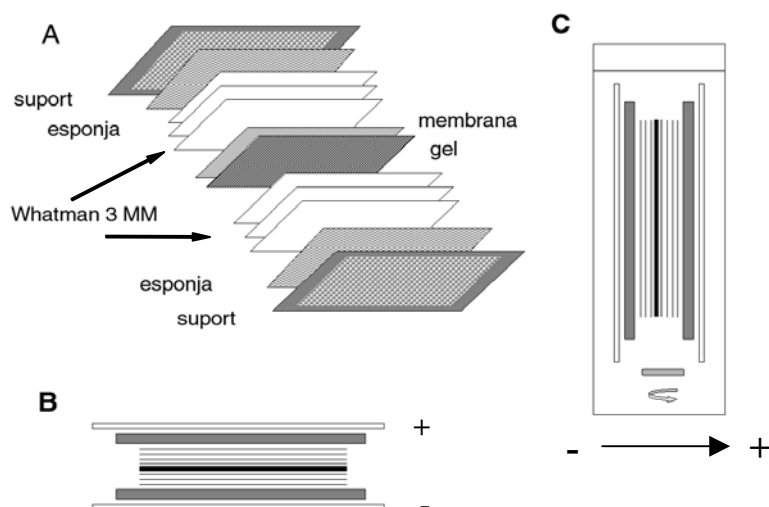
Les primeres membranes utilitzades per a la transferència van ser les de nitrocel·lulosa, amb una gran capacitat d'unió a proteïnes. Les proteïnes s'uneixen a la membrana mitjançant interaccions electrostàtiques o hidrofòbiques. Recentment s'han desenvolupat membranes de naturalesa hidrofòbica com les de PVDF (diflorur de polivinilidè), que retenen una quantitat més gran de proteïna, són mecànicament més estables i tenen una gran resistència química a diferents reactius.

Es fan córrer al mateix gel d' SDS-PAGE tant les proteïnes que s'han de separar com els controls negatius, i posteriorment es transfereixen del gel a la membrana. Convé córrer dos gels idèntics, un per transferir-lo (sense tenyir) i l'altre per tenyir-lo i tenir-lo com a control. Una vegada finalitzada la transferència, també caldrà tenyir el gel transferit per verificar que no hi quedin proteïnes.

S'han utilitzat dos protocols lleugerament diferents per als *western-blots* (s'expliquen en paral·lel); en el protocol A s'han utilitzat membranes de nitrocel·lulosa Protran BA 85 (Schneider & Schuell) de 0,45 µm de porus, i en el protocol B s'han utilitzat membranes de PVDF (Bio-Rad) (vegeu els protocols 32 i 33, i fig. II.12).

### Protocol 32. Electrotransferència (*western-blot*)

<b>ELECTROTRANSFERÈNCIA</b>							
<p>1- <u>Muntatge del sandvitx de transferència</u> (vegeu la figura II.12; tots els components s'han d'equilibrar en tampó de transferència, cal evitar presència de bombolles d'aire entre els diferents components, les membranes de PVDF s'han de preequilibrar amb metanol durant 1-2 minuts i s'han de rentar amb aigua 2' abans d'utilitzar-les).</p> <p style="margin-left: 40px;">           suport rígid foradat            esponja (Scotch-Brite)            3 fulls Whatman 3 MM (de la mida del gel)            gel SDS-PAGE (sense <i>stacking</i>)            membrana (de la mida del gel)            3 fulls Whatman 3MM (de la mida del gel)            esponja (Scotch-Brite)            ▼ suport rígid foradat         </p>							
<p>2- <u>Electrotransferència</u></p> <p>Col·loqueu el sandvitx dins la cubeta de transferència (el gel orientat al pol negatiu i la membrana al positiu) i aboqueu-hi tampó de transferència fins a cobrir totalment el sandvitx. Transferiu-ho a 4 °C per evitar sobreescalfament. El sistema ha d'estar en contínua agitació magnètica per afavorir l'homogeneïtat del tampó.</p> <p>Deixeu transferir: - 1 hora a 500 mA (intensitat constant) (protocol A).            - 2 hores a 100 V (voltatge constant) i amb la cubeta envoltada de gel, ja que s'escalfa molt (protocol B).</p>							
<p><b>tampó de transferència A (5 L)</b></p> <p>25 mM Tris (15 g)            40 mM glicina (15 g)            0,05% SDS (25 ml SDS 10%)            20% metanol (1 L)</p>	<p style="text-align: center;"><b>tampó de transferència B</b></p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="text-align: center;"><b>5x (500 ml)</b></td> <td style="text-align: center;"><b>1x</b></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">125 mM Tris (7,57 g)</td> <td style="text-align: center;">25 mM Tris</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">0,96 M glicina (36,03 g)</td> <td style="text-align: center;">192 mM glicina</td> </tr> </table>	<b>5x (500 ml)</b>	<b>1x</b>	125 mM Tris (7,57 g)	25 mM Tris	0,96 M glicina (36,03 g)	192 mM glicina
<b>5x (500 ml)</b>	<b>1x</b>						
125 mM Tris (7,57 g)	25 mM Tris						
0,96 M glicina (36,03 g)	192 mM glicina						



**Fig. II.12 Electrotransferència (*western-blot*).** A) Components del sandvitx. Per evitar la presència de bombolles d'aire dins del sandvitx es fa rodolar una vareta de vidre entre capa i capa (excepte sobre el gel i la membrana). B) Sandvitx muntat. C) Muntatge dins la cubeta amb el gel orientat cap al pol negatiu i la membrana orientada cap al pol positiu. El tampó de transferència està en agitació contínua mitjançant una vareta magnètica.

Per tal d'assegurar-nos que les proteïnes s'han transferit correctament a la membrana, podem tenyir la membrana amb roig de Ponceau al 0,02% en aigua durant 1-2 minuts i destenyir-la amb aigua. Aquest tipus de tinció és temporal i reversible i és compatible amb la majoria de tècniques de detecció de l'antigen. També cal tenyir el gel transferit per tenir un control de les proteïnes no transferides.

### Immunodetecció

Prèviament a la detecció amb els anticossos, caldrà bloquejar la membrana amb solució de bloqueig o *blotto* per tancar els llocs on no hi hagi proteïna. Aquest bloqueig evita la unió inespecífica d'anticossos, que ens donaria molt senyal de fons (vegeu la taula II.14 i el protocol 33).

**Taula II.14 Tampons per a incubacions de membrana (*western-blot*).**

Tampons incubacions membrana		
<u>blotto (protocol A)</u> per a 100 ml 100 ml PBS 0,1% Tritó X-100 5% llet en pols desnatada	<u>blotto (protocol B)</u> per a 100 ml 100 ml PBS 0,1% Tween 20 3% llet en pols desnatada	<u>solució Ac (protocol B) 30 ml</u> 0,35 M NaCl (2,63 ml NaCl 4 M) 1% llet en pols desnatada (0,3 g) dissoleu en PBS-Tween 20 0,1% fins a 30 ml

**Protocol 33. Immunodetecció.** S'expliquen en paral·lel dos protocols lleugerament diferents, A (per membrana de nitrocel·lulosa) i B (per membrana de PVDF).

<b>IMMUNODETECCIÓ</b>	
1- <u>Bloqueig de les membranes</u>	<p>Incubeu la membrana amb solució de bloqueig o <i>blotto</i> (50 ml/membrana).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- protocol A: incubeu durant 1 hora a T<sup>a</sup> ambient i agitació suau.</li> <li>- protocol B: incubeu durant 1 hora a T<sup>a</sup> ambient i agitació i deixeu O/N a 4 °C (amb <i>blotto</i> però sense agitació).</li> </ul>
2- <u>Rentats</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- protocol A: renteu amb PBS-Tween 20 0,1% (2 rentats de 5 minuts).</li> <li>- protocol B: no es fa cap rentat en aquest pas.</li> </ul>
3- <u>Incubació amb l'anticòs primari</u>	<p>Incubeu amb anticòs primari (volum final 10 ml):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- protocol A: Ac dissolt en PBS-Tween 20 0,1%, incubeu durant 1 hora a T<sup>a</sup> ambient i agitació.</li> <li>- protocol B: Ac dissolt en solució Ac, incubeu durant 1,5 hores a T<sup>a</sup> ambient i agitació.</li> </ul>
4- <u>Rentats</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- protocol A: renteu amb PBS-Tween 20 0,1% (3 rentats de 5 minuts).</li> <li>- protocol B: renteu amb PBS-Tween 20 0,1% (4 rentats de 15 minuts).</li> </ul>
5- <u>Incubació amb l'anticòs secundari</u>	<p>Incubeu amb l'anticòs secundari (volum final 10 ml):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- protocol A: Ac dissolt en PBS-Tween 20 0,1% (dilució 1:10.000) incubeu 1 hora a T<sup>a</sup> ambient i agitació.</li> <li>- protocol B: Ac dissolt en solució Ac (dilució 1:10.000), incubeu durant 45 minuts a T<sup>a</sup> ambient i agitació.</li> </ul>
6- <u>Rentats</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- protocol A: renteu amb PBS-Tween 20 0,1% x5 rentats de 5 minuts.</li> <li>- protocol B: renteu amb PBS-Tween 20 0,1% x4 rentats de 15 minuts. renteu amb PBS x 4 rentats de 10 minuts.</li> </ul>

### Anticòs secundari

L'anticòs secundari és l'encarregat de detectar les fraccions Fc de l'anticòs primari que estarà unit a l'antigen. L'anticòs secundari es troba conjugat a un enzim que permet donar lloc a una reacció colorimètrica o quimioluminescent en interaccionar amb el seu substrat. L'enzim més utilitzat per al marcatge d'anticòsos és la peroxidasa de rave (HRP).

En aquest treball s'han utilitzat dos tipus d'anticòsos secundaris conjugats amb HRP: *Donkey (anti-chicken IgY) IgG* i *F(ab')<sub>2</sub>, fragment de Donkey (anti-chicken IgY) IgG*, ambdós de la casa Jackson Immuno-Research.

### Detecció per quimioluminescència

La immunodetecció per quimioluminescència és un dels mètodes més sensibles i permet detectar a partir d'1 pg d'antigen. S'utilitzen anticossos secundaris conjugats amb HRP. En presència de peròxid d'hidrogen, la peroxidasa oxida un compost fluorescent (luminol o 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinadiona) que emet fotons. L'activitat d'emissió pot incrementar-se 1.000 vegades en presència de derivats fenòlics potenciadors (*enhancers*) com l'àcid p-hidroxycumarínic (àcid 4-hidroxycinàmic) que s'inclouen en el tampó de reacció. L'emissió de fotons es detecta mitjançant autoradiografia (vegeu el protocol 34). El protocol d'aquesta tècnica va ser facilitat pel Dr. Jordi Bernués (CID-CSIC, Barcelona).

**Protocol 34. Detecció per quimioluminescència.** El luminol és fotosensible i convé preservar-lo de la llum.

<b>Detecció per quimioluminescència</b>	
<p>1- Barregeu 10 ml de luminol amb 100 µl de potenciador i aboqueu-ho sobre la membrana. Incubeu durant 1 minut amb agitació manual (algunes vegades s'ha fet la reacció amb 1 ml de luminol i 10 µl de potenciador cobrint només la superfície de la membrana).</p> <p>2- Deixeu assecar la membrana a l'aire, sobre Whatmann 3 MM, durant uns minuts, i posteriorment emboliqueu-la amb film de plàstic (tipus Glad o Saran Wrap).</p> <p>3- A les fosques (llum vermella) poseu en contacte la membrana amb una pel·lícula de raigs X. S'ha utilitzat pel·lícula Hyperfilm MP (Amersham-Pharmacia) i Biomax (Kodak). Convé fer deteccions al cap de diferents temps: 30'', 1', 5' (variable segons el senyal obtingut).</p> <p>4- Finalment reveleu la pel·lícula:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- revelador (Kodak) 5 minuts.</li> <li>- solució de parada (àcid acètic 3,75%) 1 minut.</li> <li>- fixador (Kodak) 5-15 minuts.</li> <li>- aigua corrent 10-20 minuts.</li> <li>- esbandiu amb aigua destil·lada.</li> <li>- assequeu a l'aire.</li> </ul>	
<p><u>luminol</u> (200 ml)</p> <p>0,1 M Tris pH 8,6-8,7 (200 ml)</p> <p>1,25 mM luminol sòdic (Sigma) (50 mg)</p> <p>2,7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (62 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%)</p>	<p><u>potenciador</u> (1ml)</p> <p>1,1 mg àcid p-hidroxycumarínic (trans) (Sigma), 0,1% concentració final.</p> <p>1 ml DMSO</p>

Una vegada finalitzat el procés, convé tenyir permanentment la membrana. El mètode de tinció varia en funció del tipus de membrana utilitzat (vegeu el protocol 35).

**Protocol 35. Tinció de membranes.** Tinció permanent de membranes.

TINCIÓ DE MEMBRANES	
<u>nitrocel·lulosa</u>	<u>PVDF</u>
- tenyiu 5' en: 0,1% amido <i>black</i> 45% MetOH 10% àcid acètic	- tenyiu 1'-2' en colorant de gels PAGE (vegeu la taula II.9)
- destenyiu (2x5') en: 90% MetOH 2% àcid acètic	- destenyiu (2x5') en: 50% MetOH 10% àcid acètic

**6.3 Quantificació d'anticossos (ELISA)**

L'ELISA (anàlisi d'immunosorbent unit a enzim, *enzyme-linked immunosorbent assay*) és una tècnica immunoenzimàtica que permet quantificar anticossos i antigens. Aquesta tècnica va ser descrita inicialment per Engvall i Perlmann (1971). Una quantitat constant d'antigen s'immobilitza en una placa de poliestirè, posteriorment s'incuba amb l'anticòs específic per a l'antigen (Ac primari) i s'afegeix un segon anticòs en excés (Ac secundari) marcat enzimàticament, que reconeixerà el primari. Seguidament s'hi afegeix un substrat cromogènic que serà transformat enzimàticament i en podem llegir la densitat òptica (vegeu el protocol 36). Un dels inconvenients de les tècniques immunocitoquímiques és el soroll de fons a causa de reaccions inespecífiques. Per reduir aquest soroll de fons, s'hauria de treballar amb antigens purs i anticossos específics.

**Protocol 36. ELISA.** Quantificació d'anticossos per ELISA (anàlisi d'immunosorbent unit a enzim). Es treballa amb volums de 100 µl/pou per a cada reactiu. Els rentats es fan amb volums aproximats omplint els pous directament mitjançant una pipeta Pasteur. Les incubacions (excepte els rentats i la detecció cromogènica) es poden fer durant 2 hores a 37 °C o bé O/N a 4 °C, però sempre en cambra humida. És convenient fer duplicats per a cada mostra.

ELISA
1- Carregueu la placa amb 100 ng d'antigen en PBS i els corresponents controls negatius.
2- Renteu 2x3' en PBS-Tween 20 0,1% (PBS-T).
3- Bloquegeu els llocs no units amb 3% de llet en pols desnatada en PBS-T.
4- Renteu 2x3' en PBS-T.
5- Incubeu amb anticòs primari (feu dilucions seriades).
6- Renteu 2x3' en PBS-T.
7- Incubeu amb anticòs secundari (conjugat amb HRP) dilució 1:1.000 en PBS-T.
8- Renteu 2x3' en PBS-T.
9- Incubeu amb el substrat ABTS (Bio-Rad) durant 30 minuts a T <sup>a</sup> ambient (a les fosques).
10- Atureu la reacció amb 50 µl d'àcid oxàlic al 3%-9% .
11- Llegiu la placa a 414 nm.

Existeixen diferents substrats cromogènics per a la peroxidasa. En aquest treball s'ha utilitzat l'ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-àcid sulfònic) a partir del Peroxidase Substrate Kit (Bio-Rad). La reacció dóna un producte de color verdós que es pot quantificar a 405 nm. Si s'utilitza l'àcid oxàlic per aturar la reacció, s'haurà de fer la quantificació a 414 nm. La lectura de les plaques es va fer al CID-CSIC amb el lector Multiskan EX (Labsystems) i el programa Genesis.

## 7. TÈCNIQUES BIOFÍSQUES

### 7.1 Dicroisme circular (DC)

El dicroisme circular (DC) s'observa quan la matèria òpticament activa absorbeix la llum polaritzada, a la dreta i a l'esquerra, de manera diferenciada, i es dóna un fenomen d'el·lipticitat. La llum polaritzada és quirals; consisteix en dos components circularment polaritzats de la mateixa intensitat. La major part de molècules biològiques també són quirals i podran ser estudiades mitjançant dicroisme. El DC permet distingir entre els diferents tipus d'estructura secundària presents en pèptids, proteïnes i àcids nucleics. També podem determinar si una proteïna es troba estructurada o bé està plegada a l'atzar (*random coil*). Aquesta tècnica també permet fer estudis d'unió a lligands o d'interacció proteïna-proteïna i proteïna-DNA.

L'ultraviolat llunyà o regió amida (170-250 nm) permet observar la contribució dels enllaços peptídics i, per tant, de l'esquelet o estructura secundària, mentre que l'espectre a l'ultraviolat proper (250-300 nm) mostra el senyal dels aminoàcids aromàtics. Els ponts disulfur poden donar diverses bandes de DC.

#### Preparació de la mostra i recollida de dades

Idealment, cal dialitzar la mostra abans de fer l'anàlisi i utilitzar el tampó del dialitzat com a blanc. S'han d'utilitzar tamps a una concentració de l'ordre de 10-20 mM que presentin una baixa absorbància a les longituds d'ona de treball. L'absorbància de la mostra de proteïna, després de dialitzar, ha de ser igual o inferior a 1, mesurada a 230 nm. S'ha de calcular la concentració de proteïna de manera acurada, preferiblement mitjançant absorbància directa. Convé centrifugar o filtrar la mostra, prèviament a l'anàlisi, per evitar la presència de partícules en suspensió.

Se solen utilitzar cubetes circulars, de longitud variable. Si es treballa a l'UV proper s'acostumen a utilitzar d'1 cm. En treballar a l'UV llunyà cal disminuir la longitud de la cubeta (0,2-0,01 cm o menys) i augmentar la concentració de proteïna. S'han utilitzat cubetes circulars d'1 mm de longitud.

El DC es mesura mitjançant un espectropolarímetre, com el Jasco J-720. L'aparell necessita un circuit de refrigeració per evitar l'escalfament i també una purga constant amb nitrogen per evitar la producció d'ozó, que podria danyar el sistema òptic i també l'usuari. L'espectre de DC és funció de la longitud d'ona i es recull de manera contínua en un rang determinat. Inicialment, cal recollir l'espectre del tampó, que servirà de blanc o línia de base i que s'haurà de restar a l'espectre obtingut per a la mostra. Per augmentar la relació senyal/soroll (S/N) s'han d'optimitzar els paràmetres de recollida de dades (segons el manual Jasco J-720):

- amplada de banda..... (0,2-2 nm) quan és gran augmenta el S/N
- amplada d'esclatxa (*slit*)..... es deixa en automàtic (interrelacionat amb l'amplada de banda)
- sensibilitat..... (1-1.000 mdeg) quan és gran disminueix el S/N
- temps de resposta..... (0,5 msec-16 seg) quan és llarg augmenta el S/N
- velocitat d'escaneig..... (1-5.000 nm/min) si és curt augmenta el S/N (està relacionat amb el temps de resposta i han de ser compatibles)
- resolució..... (0,025- 5 nm) cal disminuir si els pics són massa estrets
- nre. d'acumulacions..... com més acumulacions (nre. d'escanejors), millor S/N

El dicroisme circular es pot expressar segons [eq. 1], on ( $\Delta\epsilon$ ) és el dicroisme circular molar, ( $\epsilon_E$ ) i ( $\epsilon_D$ ) són els coeficients d'extinció molar a dreta i esquerra expressats en  $M^{-1} cm^{-1}$ , ( $A_E$ ) i ( $A_D$ ) són els dos components de l'absorbància, ( $c$ ) és la concentració molar i ( $l$ ) és la longitud de la cubeta en cm. L'aparell mesura el dicroisme i el converteix en el·lipticitat (en *deg* o graus) [eq. 2], que es pot convertir a el·lipticitat molar per residu (tenint en compte el nombre de residus,  $n_r$ , i el pes molecular,  $M$ ) [eq. 3] equacions segons Schmid (1997) i Woody (1995). Les unitats de treball solen ser  $deg \cdot cm^2 / dmol \cdot residu$ .

$$[\text{eq. 1}] \quad \Delta\epsilon = \epsilon_E - \epsilon_D = (A_E - A_D) / c \times l$$

$$[\text{eq. 2}] \quad \theta = 32.98 \times (\Delta\epsilon \times c \times l)$$

$$[\text{eq. 3}] \quad \theta_{mr} = (\theta \times 100 \times M) / (c \times l \times n_r)$$

Les mesures de dicroisme es van fer al laboratori del Dr. Joan Ausió (Universitat de Victoria, Canadà).



### Descomposició d'espectres de dicroisme

Hi ha diversos mètodes per descompondre els espectres de dicroisme circular en els seus components d'estructura secundària (revisats per Greenfield, 1996), alguns dels quals s'esquematitzen a la taula II.15.

Recentment han aparegut paquets informàtics que engloben diferents programes al mateix temps i permeten una predicció més acurada de l'estructura secundària, per exemple: CDPro (<http://lamar.ColoState.EDU/~sreerama/CDPro>) (Sreerama i Woody, 2000) i Dicroprot (<http://dicroprot-pbil.ibcp.fr>). La majoria d'aquests programes utilitzen grups de proteïnes de referència, d'estructura cristal·logràfica i espectre de DC coneguts, on estan representats els diferents tipus d'estructura secundària. Es compara l'espectre de DC obtingut amb els espectres de referència, mitjançant una sèrie d'algoritmes, i seguidament es porta a terme una anàlisi estadística per predir la fiabilitat dels resultats.

**Taula II.15 Mètodes per descomposició d'espectres de DC.**

mètode	referència
CONTIN	Provencher i Glöckner (1981)
LINCOMB/CCA	Perczel et al. (1991)
K2d	Andrade et al. (1993)
SELCON	Sreerama i Woody (1993)
CDSSTR	Johnson (1999)

### **7.2 Ultracentrifugació analítica (UA)**

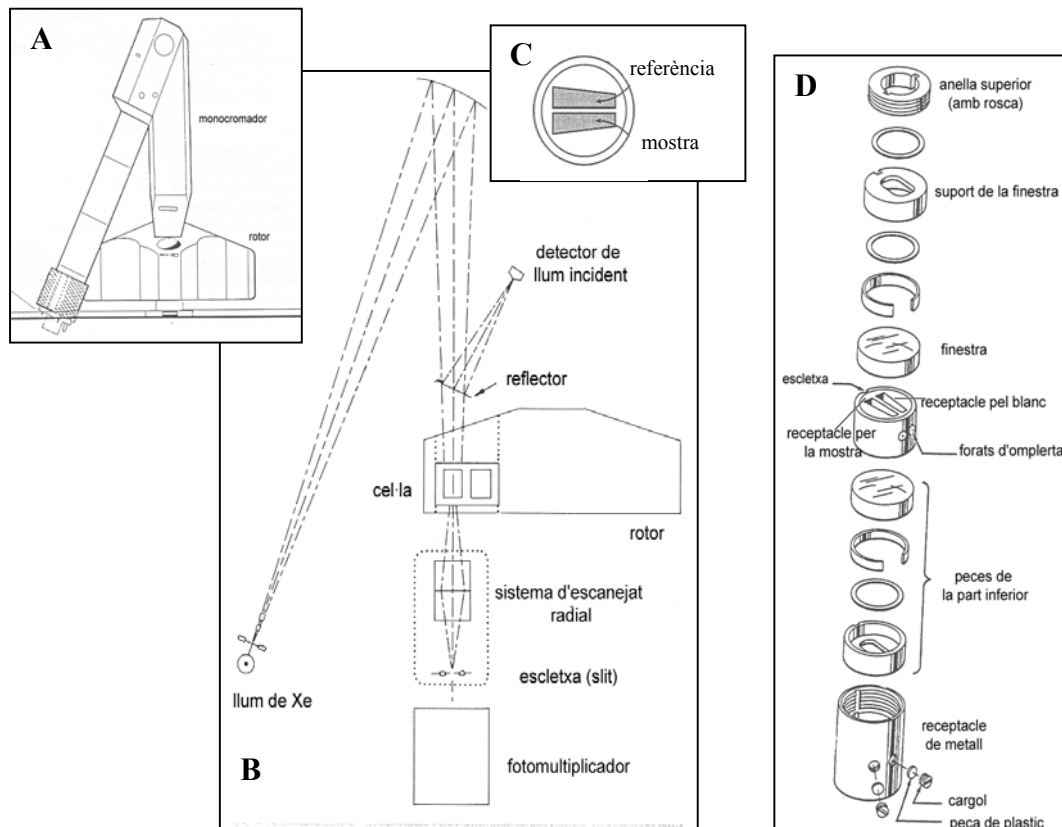
La ultracentrifugació analítica permet observar el comportament de macromolècules sota la influència d'un camp centrífug. Amb aquesta tècnica es pot determinar el pes molecular de molècules en solució, calcular constants d'associació i fer estudis d'homogeneïtat, forma de la molècula i altres paràmetres moleculars.

S'ha utilitzat la ultracentrífuga analítica XL-A (Beckman). L'aparell permet determinar, mitjançant un sistema òptic apropiat i a qualsevol temps, la distribució de macromolècules al llarg de la dimensió radial (vegeu la figura II.13).

Els recipients per a la mostra s'anomenen cel·les de centrifugació i són en forma de cilindre en el qual hi ha dues perforacions on es carrega la mostra i el tampó de referència, respectivament. S'han utilitzat cel·les Kel-F de 12 mm i de doble sector. La cel·la es completa amb dues finestres de quars o plàstic que, adossades a les bases del cilindre, defineixen la cavitat que conté la mostra (vegeu la figura II.13).

Se solen utilitzar tampons en el rang de 10-20 mM i s'ha de minimitzar la utilització de sals per evitar un augment en la viscositat. Convé dialitzar la mostra abans d'analitzar-la i utilitzar el dialitzat com a tampó de referència.

Els experiments a la ultracentrífuga analítica es van fer al laboratori del Dr. Joan Ausió (Universitat de Victòria, Canadà).



**Fig. II.13 Ultracentrifugació analítica.** A) Monocromador. B) Esquema del sistema òptic. C) Secció transversal de la cel·la. D) Parts d'una cel·la d'ultracentrifugació. Figura adaptada del manual de la ultracentrífuga analítica XL-A (Beckman).

### 7.2.1 Velocitat de sedimentació

En aquest tipus d'anàlisi es determina la velocitat amb què les molècules es mouen cap al fons de la cel·la. Permet calcular el coeficient de sedimentació ( $s$ ), que està relacionat amb el pes molecular ( $M$ ) i amb el coeficient de fricció ( $f$ ) segons l'equació de Svedberg (Svedberg i Pederson, 1940):

$$s = M(1 - \nu\rho) / N_A \quad f = M(1 - \nu\rho)D / RT$$

on  $\nu$  = volum específic parcial de la molècula (en  $\text{cm}^3/\text{g}$ ),  $\rho$  = densitat de la solució (en  $\text{g}/\text{cm}^3$ ),  $N_A$  = nombre d'Avogadro ( $6.023 \times 10^{23}$ ),  $R$  = constant dels gasos ( $8.313 \times 10^7$  erg/mol·K),  $T$  = temperatura absoluta (en °K) i  $D$  = coeficient de difusió (en  $\text{cm}^2/\text{segon}$ ). El coeficient de sedimentació se sol expressar, per conveni, corregit segons la densitat de l'aigua i a 20 °C ( $s_{20,w}$ ) (van Holde, 1975).

Per a l'anàlisi del coeficient de sedimentació es fa servir el mètode desenvolupat per van Holde i Weischet (1978). L'anàlisi de les dades s'ha fet amb el programa Utrascan-Origin versió 4.1 (Borries Demeler). El volum específic parcial (Vep) pot ser calculat de manera precisa mitjançant un picnòmetre a partir de volums coneguts de la mostra, però de manera habitual se sol calcular mitjançant una estimació a partir de la composició aminoacídica segons el mètode de Cohn i Edsall (1943) i utilitzant els volums específics parcials per als diferents aminoàcids segons Perkins (1986). Per a proteïnes, se solen obtenir valors de Vep al voltant de  $0,73 \text{ cm}^3/\text{g}$ .

En els experiments de velocitat de sedimentació, les elevades velocitats del rotor generen una sèrie de límits (*boundaries*) en moviment que corresponen a les molècules que s'estan sedimentant dins la cel·la (vegeu la figura II.14). A l'inici de l'experiment, la concentració de mostra és constant al llarg de la cel·la. El límit (*boundary*) es forma quan les molècules presents en el menisc es comencen a sedimentar. Amb el temps, el límit es va desplaçant cap al fons de la cel·la de manera proporcional al coeficient de sedimentació de la macromolècula. A partir d'aquests límits es pot calcular el coeficient de sedimentació mitjà.

En l'anàlisi segons van Holde i Weischet (1978), cada límit es divideix en fraccions iguals (normalment 20 fraccions, cada una de les quals representa el 5% del total). Es calcula el coeficient de sedimentació aparent de cada fracció, el qual es veurà influenciat tant per la sedimentació com per la difusió de les molècules, aplicant l'equació:

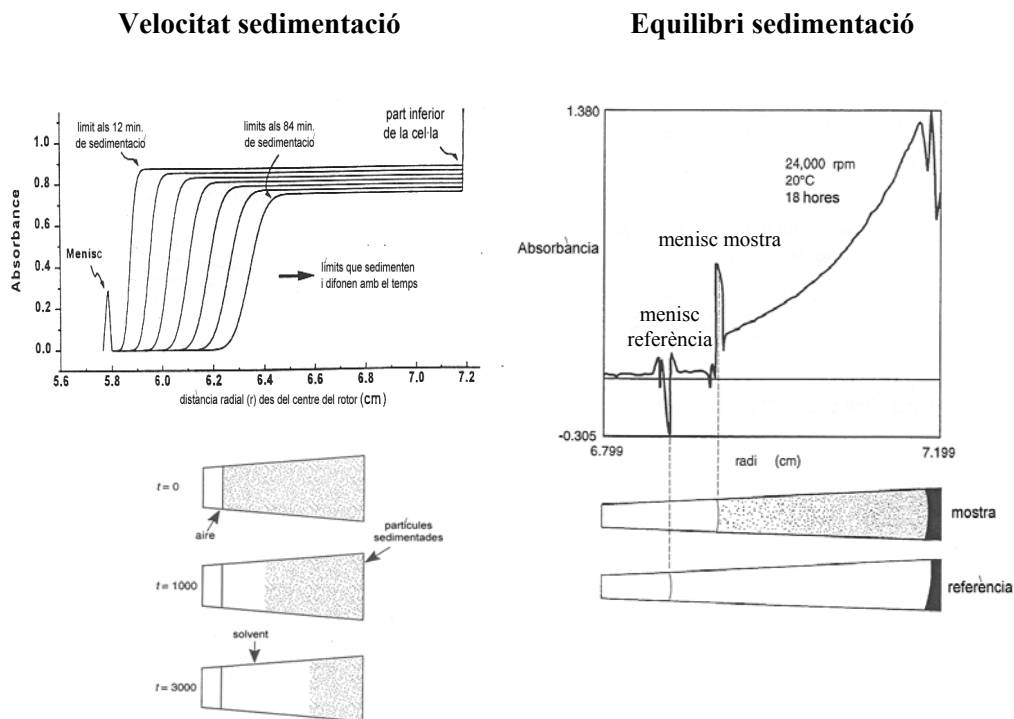
$$S_{i(\text{app})} = \ln(r_i/r_m)/\omega^2 t$$

on  $S_{i(\text{app})}$  (coeficient de sedimentació aparent de la fracció  $i$ ),  $r_m$  (posició radial del menisc a temps 0),  $r_i$  (posició radial del menisc de la fracció  $i$ ),  $t$  (temps en què és escanejat cada límit). Aquesta anàlisi es realitza en diferents intervals de temps i es van recollint els diferents escanejors per a cada un dels límits (*boundaries*). Finalment, es representa gràficament el coeficient de sedimentació aparent respecte al  $t^{-1/2}$  (es minimitza l'efecte de la difusió i només es té en compte la sedimentació) i s'obté un gràfic en ventall (*fan plot*). Un altre tipus de representació és en forma de distribució integral on els coeficients de sedimentació de cada fracció es representen de manera acumulativa. Si la mostra és homogènia, el coeficient de sedimentació serà el mateix en tots els punts (Hansen et al., 1997; Ausió i Moore, 1998; Ausió J., 2000).

Per als assajos de velocitat de sedimentació, es treballa a velocitats de l'ordre de 40.000 rpm i se solen utilitzar rotors d'alumini. A la taula II.16 s'especifiquen els volums utilitzats per a velocitat de sedimentació. Se sol treballar amb mostres que presenten una DO a 230 nm de 0,8.

**Taula II.16 Volums de referència i mostra per UA.** S'especifiquen els volums utilitzats per a assajos de velocitat i equilibri de sedimentació a la ultracentrifuga analítica.

	velocitat	equilibri
referència	425 $\mu\text{l}$	125 $\mu\text{l}$
mostra	400 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$



**Fig. II.14 Velocitat de sedimentació i equilibri de sedimentació.** Figures adaptades de Hansen et al. (1997) i del manual Optima XL-A (Beckman).

## 7.2.2 Equilibri de sedimentació

L'equilibri de sedimentació s'aconsegueix quan la tendència de la molècula que s'ha de sedimentar és contrarestada per la tendència a difondre en contra del gradient de concentració que s'estableix. A l'equilibri, la distribució de concentració dins la cel·la no canvia al llarg del temps. Aquest mètode s'utilitza per determinar pesos moleculars i per a estudis d'homogeneïtat i associacions moleculars.

Per als experiments d'equilibri de sedimentació s'utilitzen velocitats de centrifugació menors, temps més llargs i menor quantitat de mostra que per als experiments de velocitat de sedimentació. A la taula II.16 s'especifiquen els volums utilitzats per a velocitat de sedimentació. Se solen utilitzar rotors de titani per a aquest tipus d'assajos.

Al final de l'experiment d'equilibri, cal mesurar l'absorbància del tampó, que servirà de línia de base. La mesura es pren després de fer córrer el rotor a velocitat elevada durant un curt període de temps, perquè les molècules quedin sedimentades al fons de la cel·la.

L'aparell mesura l'absorbància de la proteïna en funció de la distància radial des del centre del rotor. Per analitzar l'heterogeneïtat de la mostra, cal representar el  $\ln A$  respecte a  $r^2$ . En un sistema monodispers i sense associació, la gràfica hauria de ser lineal. El pendent de la recta ens permetrà calcular el pes molecular mitjà. Per calcular el pes molecular (M) es fa servir l'equació següent:

$$M = (d \ln A / dr^2) \times 2RT / (1 - v\rho) \omega^2$$

on  $A$  = absorbància,  $r^2$  = radi elevat al quadrat,  $R$  = constant dels gasos ( $8.313 \times 10^7$  erg/mol.K),  $\omega^2$  = velocitat angular (en rad/seg),  $\rho$  = densitat (en g/cm<sup>3</sup>),  $v$  = volum específic parcial (en cm<sup>3</sup>/g),  $T$  = temperatura (en °K),  $(d \ln A / dr^2)$  és el pendent.

### 7.3 Ressonància magnètica nuclear (RMN)

La ressonància magnètica nuclear permet determinar l'estructura tridimensional de proteïnes en solució (Wüthrich et al., 1982, Wüthrich, 1989) i obtenir dades complementàries a les obtingudes per cristal·lografia de raigs X.

Alguns nuclis atòmics com els d'hidrogen <sup>1</sup>H, carboni <sup>13</sup>C o nitrogen <sup>15</sup>N es comporten com a petits imants. El gir del protó carregat positivament genera un moment magnètic que pot tenir orientació alfa o beta, quan es troba sota la influència d'un camp magnètic extern. Segons la localització dels diferents nuclis en la molècula, absorbiran energia a diferents freqüències de ressonància (desplaçament químic). El desplaçament químic es mesura en parts per milió (ppm) en relació amb un compost patró (tetrametilsilà) i per a les proteïnes sol tenir un valor d'entre 1 i 9 ppm.

Es poden recollir diferents tipus d'espectres de RMN en una, dues o tres dimensions. Entre els espectres bidimensionals, el NOESY permet representar gràficament les parelles de protons que es trobaven pròxims en la molècula (distància menor de 5 Å). Altres tipus d'espectres bidimensionals inclouen el COSY (permet determinar acoblament entre protons) i el TOCSY. També es poden obtenir espectres mixtos, amb diversos tipus de nuclis magnèticament actius a la vegada, mitjançant RMN multidimensional.

L'anàlisi estructural de les dades de RMN requerirà tècniques matemàtiques com la geometria de distàncies. Inicialment s'hauran d'identificar tots els hidrògens de la molècula i posteriorment determinar les distàncies entre els nuclis i els angles de torsió, fins a obtenir la conformació de la molècula. Finalment s'haurà d'optimitzar i refinar la conformació calculada perquè s'ajusti al màxim al valor experimental.

Els espectres de RMN van ser recollits per la Dra. M. Ángeles Jiménez (*Instituto de Estructura de la Materia*, CSIC, Madrid). Es va utilitzar l'aparell Bruker (Avance) de 600 MHz i el programa de processament XWIN-NMR (Silicon).

## 8. ANÀLISI DE LA CAPACITAT DESCONDENSADORA DE CROMATINA ESPERMÀTICA

Per als assajos de la capacitat descondensadora de cromatina espermàtica s'han utilitzat nuclis espermàtics desmembranats del peix *Dicentrarchus labrax* (llobarro), obtinguts tal com es descriu a Prieto, 2002. Els nuclis van ser amablement cedits pel Dr. Manel Chiva (Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Bellvitge).

Si es marca el DNA amb un fluorocrom es pot detectar un canvi de volum gràcies a la fluorescència emesa. Es va utilitzar com a fluorocrom el Hoechst (Sigma 33258), compost que s'uneix al DNA i emet fluorescència quan és irradiat amb llum ultraviolada a 360 nm. El Hoechst es prepara a una concentració estoc d'1 mg/ml en aigua i convé guardar-lo a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  i protegit de la llum. En el moment de la seva utilització se'n prepara una solució 0,1 mg/ml en tampó EM (100 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM Tris pH 7,4).

Se sol treballar amb 2  $\mu\text{l}$  de suspensió de nuclis espermàtics que continguin aproximadament  $3,6 \times 10^5$  nuclis en tampó EM als quals es barreja 1 volum de Hoechst 0,1 mg/ml. Finalment cal afegir 5  $\mu\text{l}$  d'una solució de proteïna a una concentració aproximada d'1 mg/ml i se n'avalua la seva capacitat descondensadora de cromatina espermàtica.

Les mostres es van observar utilitzant el microscopi de fluorescència Jenalumar amb un sistema digital acoblat Olympus DP-11. Aquest experiment es va realitzar al Departament de Fisiologia de la Facultat de Medicina (Universitat de Barcelona, Bellvitge).

## 9. MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA

S'han utilitzat tècniques de microscòpia electrònica de transmissió (TEM). El microscopi electrònic de transmissió té com a font d'il·luminació un filament o càtode situat a la part superior d'una columna cilíndrica i emet electrons que són accelerats (en el buit) i formen un feix que travessarà la mostra. Alguns electrons seran dispersats

i d'altres seran enfocats formant una imatge sobre una placa fotogràfica o una pantalla fluorescent.

El contrast depèn del nombre atòmic dels àtoms de la mostra; com més alt sigui el nombre atòmic, més alt serà el nombre d'electrons dispersats i s'obtindrà més contrast. Les molècules biològiques estan compostes per àtoms d'un nombre atòmic molt baix i per fer-les visibles s'han de contrastar amb sals de metalls pesants com l'osmi, l'urani o el molibdè.

La preparació de mostres per microscòpia i la posterior observació i registre d'imatges s'han realitzat en col·laboració amb la Dra. M. Teresa Casas (ETSEIB, Universitat Politècnica de Catalunya). S'han utilitzat els microscopis Philips 301 i Tecnai 10 (Fei-Philips).

### **9.1 Tècniques de tinció negativa**

Les macromolècules s'adsorbeixen sobre una fina pel·lícula de carbó i es renten amb una solució de sal de metall pesant (acetat d'uranil, molibdat d'amoni) com a agents contrastants. Una pel·lícula molt fina de sal metàl·lica cobrirà la pel·lícula de carbó pertot arreu excepte en els llocs ocupats per la macromolècula. El material biològic es mostrarà relativament transparent als electrons en comparació amb el colorant electrodens i es crearà una imatge negativa de la macromolècula. La microscòpia electrònica permet obtenir informació tant qualitativa (puresa i homogeneïtat) com quantitativa (concentració, mida i oligomerització). La mida límit mínima per aquesta tècnica és de 30 kDa.

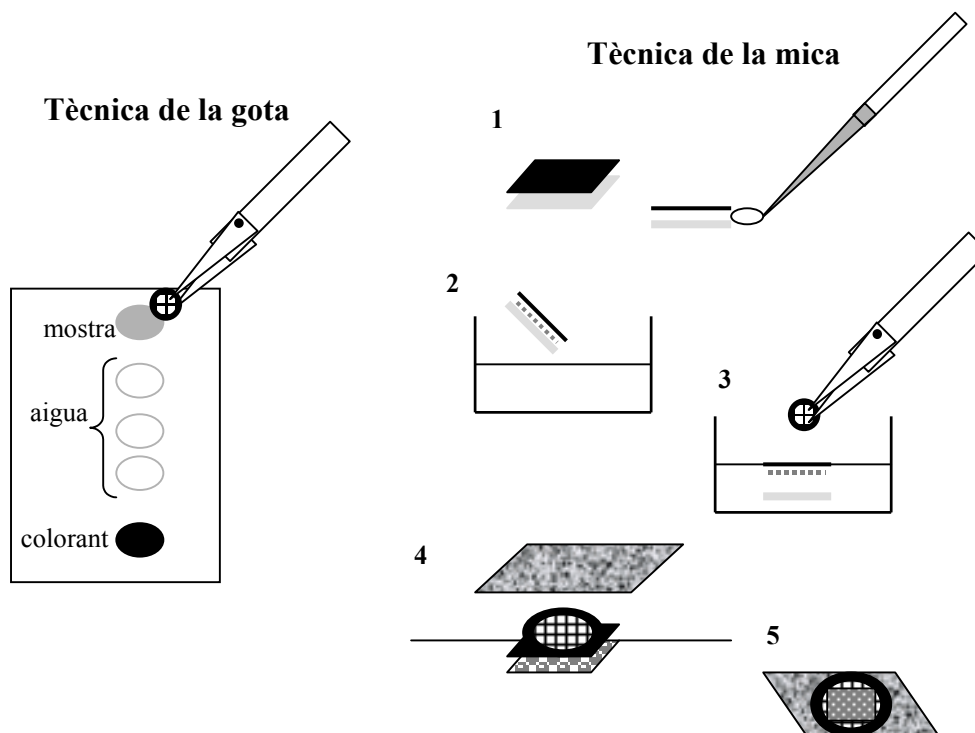
Si la proteïna és suficientment gran (> 100 kDa), es pot calcular l'estructura tridimensional mitjançant una sèrie de projeccions bidimensionals, gràcies a les diferents orientacions de la mostra sobre la reixeta, que permetran reconstruir la imatge. Es requereix un elevat nombre d'imatges per calcular un model. Es pot obtenir una resolució d'entre 20 i 30 Å. Per a aquest tipus d'estudis és molt millor treballar amb tècniques de criomicroscòpia, però es requereixen partícules de mida superior a 300 kDa.

#### Tècnica de la gota

Permet observar la proteïna tal com es troba en solució. S'utilitzen reixetes de coure recobertes d'una fina pel·lícula de carbó. Sobre un tros de Parafilm es posen gotes de 20 µl en aquest ordre: mostra, aigua (x3 gotes), colorant. La reixeta es posa sobre la gota de mostra (de 50 a 500 µg/ml, concentració òptima 250 µg/ml) i es deixa adsorbir durant dos minuts. Posteriorment es passa la reixeta per 3 gotes d'aigua consecutives per d'eliminar l'excés de proteïna no adsorbida. Finalment, es tenyeix sobre una gota d'acetat d'uranil al 2%, es treu l'excés de colorant tocant amb la punta de la reixeta el paper de filtre i es deixa assecar. Tècnica segons Harris (1997) (vegeu la figura II.15).

### Tècnica de la mica

S'utilitza una làmina de mica sobre la qual s'evapora carbó, i posteriorment se'n talla un tros petit de 4x4 mm. Amb el tros de mica amb la capa de carbó sempre orientada cap amunt, es col·loquen 1-2 µl de mostra entre el carbó i la mica (el líquid s'escampa per capil·laritat). En una càpsula de Petri s'hi col·loca el colorant (acetat d'uranil 2%) i s'hi enfonsa la mica amb un angle de 45°. El carbó amb la mostra enganxada quedarà flotant, mentre que la mica anirà a parar al fons del recipient. Utilitzarem una reixeta prèviament encolada. La cola s'obté a partir de 5 cm de cinta adhesiva submergida en 10 ml de cloroform (la cola es dissol i el plàstic queda intacte). Col·locarem la reixeta sobre el carbó i ho pescarem mitjançant un trosset de paper de diari col·locat a sobre de la reixeta i ho deixarem assecant-se a l'aire durant uns minuts cara amunt (vegeu figura II.15). Protocol cedit pel Dr. Guy Schoehn (EMBL-Grenoble, França).



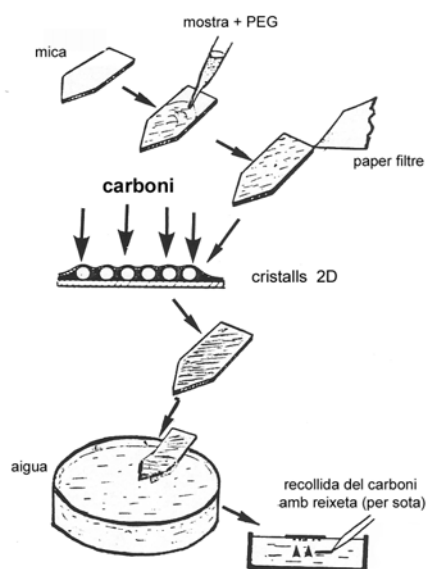
**Fig. II.15 Tinció negativa: tècnica de la gota i tècnica de la mica** (vegeu el text per a més detalls).

## 9.2 Obtenció de cristalls bidimensionals

Aquesta tècnica va ser inicialment descrita per Horne i Pasquali-Ronchetti (1974) en la seva recerca sobre virus de plantes i posteriorment modificada per Wells



et al. (1981) i adaptada per Harris i Horne (1994). La proteïna (500 µg/ml) es barreja amb un volum igual de 0,1% polietilenglicol (1K-10K) en 2% de molibdat amònic (pH 5,5-8,5). La barreja (10 µl) s'estén sobre una fulla de mica recentment exfoliada i s'elimina l'excés de líquid per capil·laritat mitjançant un paper de filtre. La mica es deixa assecat a temperatura ambient i cambra humida. Posteriorment es recobriran les miques amb una fina pel·lícula de carbó on quedaran adsorbides les proteïnes en forma de cristalls 2D, que s'hauran format en el procés d'assecat. Per desprendre el carbó de la mica, es fa flotar sobre aigua i es van recollint diferents trossets sobre reixetes netes. Finalment es tenyeixen les reixetes amb acetat d'uranil al 2% (vegeu la figura II.16). S'hi pot afegir 1 mM OG (octilglucòsid) per afavorir una tinció negativa més completa.



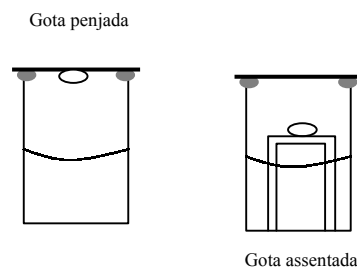
**Fig. II.16 Obtenció de cristalls bidimensionals.** Figura adaptada de Harris (1999) (vegeu el text per a més detalls).

## 10. TÈCNIQUES CRISTAL·LOGRÀFIQUES

### 10.1 Cristal·lització per difusió de vapor

Les tècniques de cristal·lització consisteixen en desplaçar la proteïna des d'un estat soluble cap a condicions en les quals la solució de proteïna està supersaturada i es podria promoure la nucleació i el creixement de cristalls. Hi ha diferents factors que afecten la solubilitat de la proteïna, com la concentració, el pH, la temperatura i els precipitants (sals, solvents orgànics i PEG). Per trobar les condicions òptimes de cristal·lització d'una proteïna, inicialment cal provar una bateria de condicions diferents com per exemple les publicades per Jancarik i Kim (1991) o les que comercialitza la casa Hampton Research.

Una de les tècniques més utilitzades en cristal·lografia és la difusió de vapor. La proteïna en solució es col·loca en difusió de vapor enfront d'un reservori, de manera que perdrà aigua i esdevindrà més concentrada, fins que la pressió de vapor s'iguali amb la del reservori. Majoritàriament s'utilitzen plaques de poliestirè de 24 pous (Linbro) en les quals es poden fer experiments de gota penjada o bé de gota assentada (vegeu la figura II.17). Les gotes s'observen en un estereomicroscopi o lupa (s'han utilitzat les de les cases Zeiss i Leica) amb un filtre de llum polaritzada, que permet observar la birefringència dels cristalls de macromolècules.



**Fig. II.17 Cristal·lització per difusió de vapor.**  
Sistema de gota penjada i gota assentada (vegeu el text per a més detalls).

En el sistema de gota penjada, es col·loca una gota típicament constituïda mig per proteïna i mig per la solució del reservori (pou). Les gotes es col·loquen a la superfície de cobreobjectes prèviament tractats amb diclorodimetilsilà, per prevenir que la gota s'escampi. El cobreobjectes es posa invertit a sobre de la superfície del pou, prèviament recoberta amb greix de silicona (Rhône-Poulenc), per evitar l'evaporació.

El sistema de gota assentada funciona igual que el de gota penjada però la gota es posa a sobre d'un pont de plàstic o vidre. Aquest mètode permet cristal·litzar solucions de proteïna de major volum.

Per fer una exploració ràpida de les condicions de cristal·lització, es pot utilitzar una tècnica denominada *microbatch*. Se solen utilitzar miniplaques de 72 minipous (Hampton Research), en les quals a cada pou es barregen 2 µl de proteïna i 2 µl de tampó de cristal·lització. Tots els pous es cobreixen amb una barreja d'oli de silicona i parafina (*Al's oil*). Aquest sistema permet una difusió d'aigua, des de la gota cap a l'oli, i permetrà que tant la proteïna com el tampó es concentrin i facilitin la cristal·lització.

En els tampons de cristal·lització, sovint s'hi afegeix un agent antimicrobià com l'azida sòdica ( $\text{NaN}_3$ ) a una concentració 0,05%. L'azida sòdica és molt tòxica i, alternativament a la seva utilització, es pot treballar amb material autoclavat i reactius filtrats i mantenir un ambient de treball tan net com sigui possible.

## 10.2 Sembra de cristalls

La sembra de cristalls (*seeding*) consisteix a portar la proteïna cap a un estat proper a la saturació i afegir-hi una llavor de cristalls. Posteriorment caldrà ajustar les condicions perquè les llavors creixin i formin centres de nucleació per a nous cristalls. Existeixen dos tipus de sembra: microsebra i macrosebra (McPherson, 1990).

La microsebra consisteix a introduir petites llavors (obtingudes a partir de la fragmentació d'un cristall) a una solució fresca de proteïna i posar-la en equilibri de vapor, per tal d'afavorir la formació de cristalls. Se sol obtenir una solució estoc de microcristalls i posteriorment es fan dilucions seriadades fins a obtenir aproximadament una llavor per microlitre.

En la macrosebra l'objectiu és permetre que un cristall prèviament format continuï creixent mitjançant l'addició de proteïna fresca. El cristall s'ha de rentar prèviament en una sèrie de solucions intermèdies, la qual cosa permetrà una neteja de la superfície del cristall que n'afavorirà el creixement.

## 10.3 Tinció de cristalls de proteïna

Els cristalls proteics solen ser força tous i fràgils i tendeixen a trencar-se amb facilitat si són manipulats. Un dels sistemes per detectar si els cristalls obtinguts tenen un origen proteic i descartar-los dels cristalls inorgànics és la tinció amb colorants.

S'han descrit diferents agents de tinció amb aquesta finalitat, entre els quals hi ha: metil violeta, blau de brom fenol, blau de Comassie, IZIT (Hampton Research), etc. Si el cristall és proteic, absorbirà fortament el colorant i apareixerà de color molt més intens que el medi o solució que envolta el cristall (Wilkosz et al., 1995). També s'utilitza aquesta tècnica per detectar cristalls d'àcids nucleics utilitzant com a colorants el blau de metilè o el taronja d'acridina. Els cristalls d'origen inorgànic no queden tenyits.

La concentració del colorant és crítica i convé utilitzar la quantitat adequada perquè la gota no quedi excessivament fosca i al final de la reacció hi pugui haver un bon contrast entre el cristall i el fons de la gota. S'ha treballat a concentracions de colorant de 3 mg/ml, i s'hi han afegit 0,5 µl per a gotes de 4 µl. El resultat de la tinció es pot observar en unes hores.

## 10.4 Congelació de cristalls

Actualment s'acostuma a treballar mitjançant criocristal·lografia, la qual es basa a recollir les dades de difracció de raigs X aproximadament a les temperatures del

nitrogen líquid i s'utilitzen cristalls prèviament congelats amb nitrogen. Quan un cristall es congela, l'aigua del seu interior es transforma en gel cristal·lí i s'expandeix. La congelació pot causar trencament, desordre i problemes amb les intensitats de difracció. Per evitar aquests efectes adversos, s'utilitzen els crioprotectors (McPherson, 1999).

Els crioprotectors són solucions aquoses que contenen una proporció d'alcohols no volàtils de baix pes molecular, com ara: MPD, etilenglicol o propilenglicol, PEG-400, etc. Aquestes substàncies tenen grups hidroxil que formen ponts d'hidrogen amb les molècules d'aigua i inhibeixen la seva associació habitual. Eviten la formació de gel cristal·lí i afavoreixen la formació de gel vitri, més desordenat i menys perjudicial per al cristall.

L'addició de l'agent crioprotector es pot fer rentant el cristall que s'ha de congelar directament amb una solució que contingui 10-30% de crioprotector (en el cas de l'MPD o l'etilenglicol). En alguns casos, sobretot quan es treballa amb solvents volàtils, es recomana anar augmentant la concentració del crioprotector de manera progressiva. El cristall es transfereix a solucions amb concentració de crioprotector creixent (augment del 2-3% a cada pas) i es deixa equilibrar la gota amb el pou corresponent durant 40'-60' en cada pas. En el darrer pas convé deixar equilibrar la gota O/N. Finalment, el cristall es pesca amb un llaç (*loop*) de niló d'una mida similar a la del cristall i es congela amb nitrogen líquid.

## 10.5 Difracció de raigs X

Per poder *veure* els àtoms individuals d'una molècula, cal treballar amb una radiació de longitud d'ona semblant a la distància interatòmica (0,15 nm-1,5 Å), propietat acomplerta pels raigs X. Els raigs X es produeixen accelerant un feix d'electrons contra un ànode de metall. Una font alternativa de raigs X s'obté quan els electrons són accelerats mitjançant un camp magnètic, en un sincrotró, i s'obtenen raigs X molt més intensos.

Algunes tècniques de difracció requereixen el muntatge del cristall a l'interior d'un capil·lar. S'utilitzen uns capil·lars especials fets de vidre sense àtoms pesants, per evitar que interaccionin amb els raigs X. Aquests capil·lars tenen un dels extrems més ample, on es connecta una pipeta a través de la qual s'aspira el cristall juntament amb una mica de tampó de la mateixa gota. Posteriorment cal trencar el capil·lar a la mida desitjada i segellar-lo pels dos extrems amb cera. El capil·lar es fixa amb plastilina sobre un col·limador si es vol obtenir una fotografia d'angle fix (càmera Warhus) o sobre un goniòmetre si es vol obtenir una fotografia a diferents angles (diffractòmetre CAD-4). Per a la recollida de dades a l'Image Plate o a les fonts de raigs X del sincrotró, s'utilitzen cristalls units a un llaç (*loop*) de niló.

Un feix estret de raigs X travessarà el cristall i una part d'aquests serà difractada per la mostra i podrà ser detectada mitjançant una pel·lícula de raigs X o un detector. L'amplitud de l'ona difractada per un àtom és proporcional al seu nombre d'electrons. Les diferents ones difractades es poden combinar de manera dependent de

la disposició tridimensional dels diferents àtoms en la molècula. Com a resultat de la difracció obtindrem una fotografia amb una sèrie de taques anomenades reflexions, d'intensitat (amplitud) coneguda. La fotografia és sotmesa a una complexa anàlisi que, mitjançant un elevat nombre de càlculs matemàtics, permetrà la determinació de l'estructura tridimensional de la molècula.