



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

**Proyecto de Innovación y Mejora de la Calidad Docente**

**Convocatoria 2015**

**Proyecto 106**

**Diseño y utilización de unas prácticas de Regulación del Metabolismo como  
herramienta integradora de conocimientos multidisciplinares en el  
Grado en Biología (II)**

**Alberto Guillén Maestro**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**

## 1. Objetivos propuestos en la presentación del proyecto

Este proyecto se planteó como continuación del PIMCD 2014-24, y sus objetivos se enmarcaban en tres grandes apartados:

1) Prácticas de Regulación del Metabolismo, utilizando un material microbiológico y un modelo de regulación de la expresión génica:

- a) Puesta a punto definitiva de las prácticas en el laboratorio de alumnos con los productos, reactivos y anticuerpos para cuya adquisición se solicitaba financiación.
- b) Elaboración de un manual definitivo de prácticas.
- c) Redacción en inglés del manual de prácticas.
- d) Generación de materiales didácticos para el Campus Virtual y de apoyo durante la impartición de las prácticas.
- e) Elaboración de cuestionarios de autoevaluación.

2) Prácticas de Microbiología:

- a) Estudio de la viabilidad de la incorporación a las prácticas de Microbiología de la parte experimental que se impartiría en forma de “dry labs” en las prácticas de Regulación del Metabolismo, con la perspectiva de alcanzar el mayor grado de integración posible entre las prácticas de ambas asignaturas, que se cursan simultáneamente en segundo año del Grado en Biología.
- b) Elaboración de protocolos experimentales.
- c) Puesta a punto en el laboratorio de alumnos de los protocolos experimentales.
- d) Modificación del guión de prácticas.

3) Trabajo de Fin de Grado:

- a) Estudio de la adaptación a Trabajo de Fin de Grado de un modelo similar de prácticas integradas, con incorporación de técnicas de ingeniería genética.
- b) Elaboración de una propuesta de Trabajo de Fin de Grado.

## 2. Objetivos alcanzados

A pesar de no haber obtenido la financiación solicitada, requerida para la puesta a punto en el laboratorio de las prácticas de Regulación del Metabolismo propuestas, con el cada vez más escaso dinero de la Ayuda a la Docencia recibido por el Departamento se han adquirido los productos, reactivos y anticuerpos necesarios, y este objetivo se ha alcanzado exitosamente. Con los resultados obtenidos se ha elaborado un manual definitivo de prácticas (ver anexo). Hay que señalar que las prácticas propuestas se han impartido ya a los estudiantes de Regulación del Metabolismo durante el curso 2016-17. Asimismo se han generado materiales didácticos para el Campus Virtual y de apoyo durante la impartición de las prácticas, y se han elaborado cuestionarios de autoevaluación. Algunos de estos materiales se han incorporado al manual de prácticas. A este manual se han incorporado también cuestionarios de autoevaluación (ver anexo).

También se ha estudiado la viabilidad de la incorporación a las prácticas de Microbiología de la parte inicial de las prácticas de Regulación del Metabolismo, que actualmente realizan los técnicos de laboratorio del Departamento de Bioquímica y que a los estudiantes se les imparte en forma de “dry labs”: precultivos y cultivos de Escherichia coli en medio líquido, seguimiento espectrofotométrico del crecimiento bacteriano, inducción de  $\beta$ -

galactosidasa con isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y obtención de un extracto de proteínas bacterianas, a partir del cual comienzan a trabajar los estudiantes. Este objetivo se ha descartado, no ya por la distorsión que provocaría en unas prácticas bastante consolidadas como las de Microbiología, sino fundamentalmente porque, por razones organizativas que afectan a la Facultad, hay estudiantes que realizan sus prácticas de Microbiología después de las prácticas de Regulación del Metabolismo, mientras que otros las realizan primero, que es lo que sería deseable para todos.

Sin embargo estas prácticas de Regulación del Metabolismo son fácilmente adaptables para su impartición como Trabajo Fin de Grado (de la modalidad de los que se realizan en los laboratorios comunes de la Facultad), con la incorporación de técnicas de ingeniería genética, como la clonación en vectores con un sitio de inserción en el gen que codifica la  $\beta$ -galactosidasa. En este sentido, se está finalizando la elaboración de una propuesta para que sea estudiada en los órganos pertinentes de la Facultad a finales del curso 2016-2017, que es cuando se redefinirán los Trabajos Fin de Grado en Biología.

### **3. Metodología empleada en el proyecto**

- 1) Reuniones de los miembros del grupo: estudio de la viabilidad de la incorporación de algunos contenidos de las prácticas de Regulación del Metabolismo a las prácticas de Microbiología; estudio de la adaptación a Trabajo de Fin de Grado de un modelo similar de prácticas integradas, con incorporación de técnicas de ingeniería genética, y elaboración de una propuesta; diseño de materiales de apoyo a la docencia.
- 2) Trabajo en el laboratorio: puesta a punto definitiva de las prácticas de Regulación del Metabolismo e impartición a los alumnos el curso 2016-17.
- 3) Generación de materiales de apoyo a la docencia: manual de prácticas de Regulación del Metabolismo; materiales didácticos para el Campus Virtual y de apoyo durante la impartición de las prácticas; elaboración de cuestionarios de autoevaluación.

### **4. Recursos humanos**

En el desarrollo de este proyecto ha participado un grupo multidisciplinar, constituido por 9 profesores pertenecientes a 3 Departamentos de la Facultad de Biología de la UCM: Bioquímica y Biología Molecular I, Genética y Microbiología III. Muchos de estos profesores imparten las tres asignaturas más directamente relacionadas con el proyecto: Regulación del Metabolismo, Genética y Microbiología. El resto de los profesores imparten otras asignaturas también relacionadas: Métodos en Biología, Bioquímica y Trabajo Fin de Grado.

Susana Serrano Barrero, Blanca Pérez Uz y Lucía Arregui García-Rovés pertenecen al Departamento de Microbiología III, ambas imparten Microbiología y Trabajo Fin de Grado, y las tres cuentan con amplia experiencia en materia de innovación educativa.

Rosario Linacero de la Fuente y Carmen Callejas Hervás pertenecen al Departamento de Genética y ambas son profesoras de las asignaturas de

Genética y de Trabajo Fin de Grado. Rosario Linacero ha sido profesora de Métodos en Biología y es Directora del Departamento de Genética. Carmen Callejas es Vicedecana de Investigación y RRII de la Facultad de Biología.

Carmen Acebal Sarabia, Alicia Megías Fresno, Begoña Gómez Miguel y Alberto Guillén Maestro pertenecen al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Carmen Acebal posee una dilatada experiencia como profesora de Bioquímica y ha desempeñado durante bastante tiempo tareas de gestión universitaria como Vicedecana de la Facultad, Subdirectora de la Fundación General UCM y Vicerrectora de Investigación de la UCM. Alicia Megías también es profesora de Bioquímica, con demostrada experiencia en innovación educativa, Begoña Gómez imparte Trabajo Fin de Grado, y Alberto Guillén, responsable de este proyecto, es profesor de Regulación del Metabolismo y fue responsable de dos PIMCD multidisciplinares, los años 2005 y 2014.

## **5. Desarrollo de las actividades**

- 1) Adquisición de productos, reactivos y anticuerpos necesarios, y puesta a punto en el laboratorio de las prácticas de Regulación del Metabolismo.
- 2) Elaboración de un manual de estas prácticas.
- 3) Generación de materiales didácticos para el Campus Virtual y de apoyo durante la impartición de las prácticas.
- 4) Elaboración de cuestionarios de autoevaluación.
- 5) Estudio de la viabilidad de la modificación de las prácticas de Microbiología.
- 6) Estudio de la viabilidad de un modelo similar, aunque más amplio, de prácticas integradas como Trabajo Fin de Grado (propuesta en fase de elaboración).
- 7) Impartición a los estudiantes de estas prácticas de Regulación del Metabolismo en el curso 2016-17.

## **6. Anexos**

Se adjunta el manual de prácticas de Regulación del Metabolismo que los estudiantes han manejado el curso 2016-17.



**PRACTICAS DE REGULACION DEL METABOLISMO. GRADO EN BIOLOGIA  
SECCION DEPARTAMENTAL DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR I  
FACULTAD DE BIOLOGIA. UCM**

**INDUCCION POR ISOPROPIL  $\beta$ -D-1-TIOGALACTOPIRANOSIDO DE LA  
EXPRESION DE  $\beta$ -GALACTOSIDASA EN E. COLI**

### 1. Introducción

El metabolismo se regula mediante el control de la actividad enzimática o mediante el control de la concentración de las enzimas. En este último caso, el control normalmente se lleva a cabo a nivel transcripcional. La transcripción en eucariotas es compleja (Fig.1). Se requiere la formación de un complejo de transcripción constituido por proteínas unidas directa o indirectamente a la región promotora de los genes, los factores de transcripción (TFs), que permiten: i) la asociación de proteínas implicadas en la remodelación de la cromatina, y ii) el anclaje de la RNA polimerasa II (RNA pol II). La regulación de la transcripción en eucariotas también es compleja (Fig.1) y tiene lugar en respuesta a señales extracelulares o a señales metabólicas, de una forma directa o mediante la inducción de la fosforilación de estos factores de transcripción.

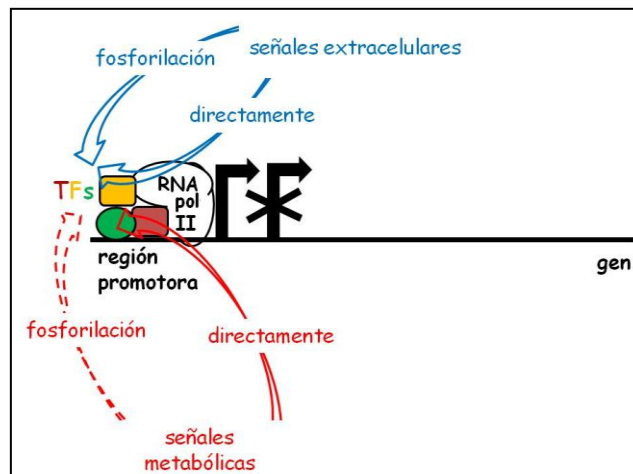


Fig.1. Transcripción en eucariotas y su regulación

La transcripción en procariontes y su regulación son mucho más simples. Uno de los ejemplos mejor conocidos es la regulación de la expresión en *Escherichia coli* del gen *lacZ*, que forma parte del operón *lac* y codifica la  $\beta$ -galactosidasa. Esta enzima, que es un homotetrámero, hidroliza el enlace glicosídico  $\beta(1\rightarrow4)$  del disacárido lactosa, rindiendo los dos monosacáridos constituyentes, galactosa y glucosa (Fig.2). La  $\beta$ -galactosidasa solo se expresa significativamente cuando la bacteria se encuentra en un medio que contiene lactosa, es decir, se trata de una enzima inducible por su sustrato. La transcripción del gen *lacZ* se encuentra regulada no solo por lactosa sino también, y de manera opuesta, por glucosa, de modo

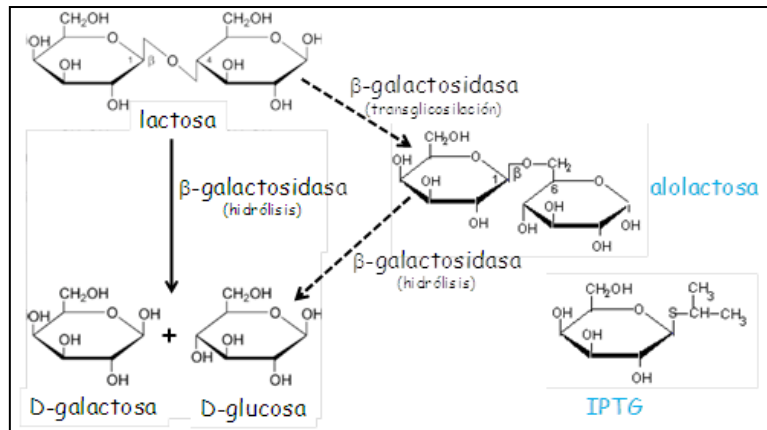


Fig.2. Reacciones catalizadas por la  $\beta$ -galactosidasa

que *E. coli* utiliza lactosa como fuente de energía alternativa cuando no dispone de suficiente glucosa en el medio (Fig.3).

- i) Cuando *E. coli* crece en presencia de glucosa y en ausencia de lactosa, el gen *lacZ* no se transcribe, se encuentra reprimido. La asociación de una proteína represora al promotor impide la unión de la RNA polimerasa.
- ii) En presencia de glucosa y de lactosa tiene lugar una débil transcripción de *lacZ*. La inducción de la transcripción del gen *lacZ* no es llevada a cabo directamente por lactosa sino por 1,6-alolactosa, producida por transglucosilación de la lactosa en una reacción colateral catalizada también por la  $\beta$ -galactosidasa (Fig.2). La unión de 1,6-alolactosa a la proteína represora impide la asociación de ésta al promotor,

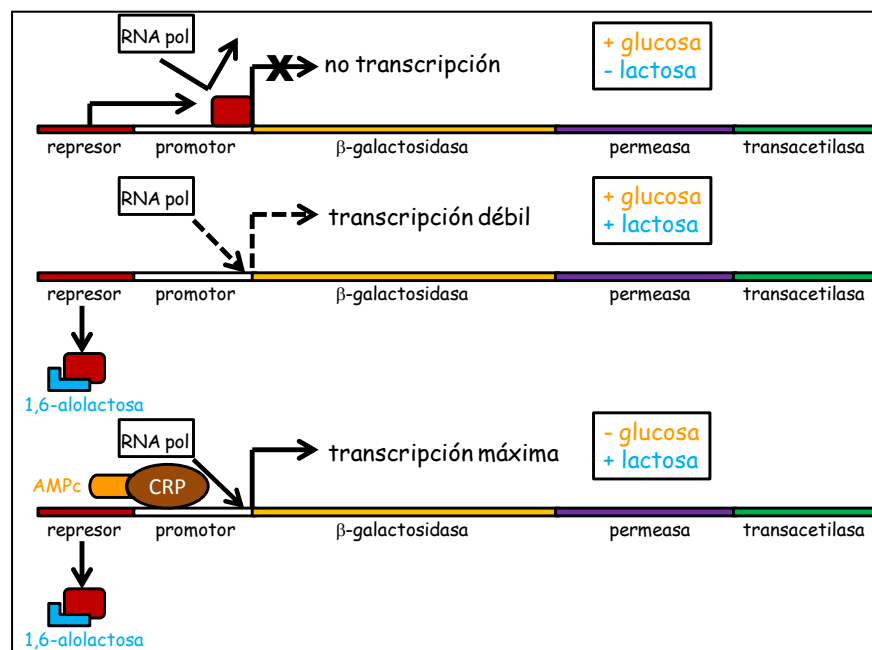


Fig.3. Regulación del operón *lac*

permitiendo a su vez la unión de la RNA polimerasa, que tiene una baja afinidad por dicho promotor. El isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) mimetiza el efecto de la 1,6-alolactosa (Fig.2) y, a diferencia de ésta, no resulta hidrolizado por la  $\beta$ -galactosidasa, por lo que su concentración permanece constante y es muy utilizado en experimentos de inducción de la transcripción de este gen.

- iii) En ausencia de glucosa y en presencia de lactosa, la transcripción del gen es máxima y, por tanto, los niveles de  $\beta$ -galactosidasa serán máximos. La ausencia de glucosa eleva los niveles intracelulares de AMPc. En esta condición, una proteína de respuesta a AMPc (CRP) se asocia al promotor, lo que incrementa la afinidad de la RNA polimerasa por el mismo.

Para este experimento se realizan dos cultivos de una estirpe salvaje de *E. coli* en medio líquido Luria Bertani hasta alcanzar un valor de  $A_{600nm} \sim 0.6$ , que coincide con el final de la fase de crecimiento exponencial de las bacterias, cuando se ha agotado la mayor parte de la glucosa del medio de cultivo. A uno de los dos cultivos se añade IPTG y se continúa la incubación de ambos cultivos. El medio de cultivo se elimina mediante centrifugación de las bacterias y sucesivos lavados de las mismas con tampón. Finalmente, las bacterias se lisan por ultrasonificación en un tampón con inhibidores de proteasas, obteniéndose un extracto de proteínas solubles por centrifugación del lisado bacteriano. Los extractos de proteínas solubles de las bacterias cultivadas en ausencia y en presencia de IPTG se suministran a los estudiantes (Fig.4).

Los estudiantes llevarán a cabo una cuantificación de proteínas en ambos extractos por el método de Bradford y estudiarán los niveles de expresión de la  $\beta$ -galactosidasa en las dos condiciones de cultivo mediante las técnicas de "Western blot" y de "Dot blot", realizando una inmunodetección indirecta con un anticuerpo primario monoclonal anti- $\beta$ -galactosidasa (IgG de ratón) y un anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de ratón, acoplado a la fosfatasa alcalina (Fig.4). Asimismo, mediante la técnica de "Western blot" se calculará el peso molecular de esta enzima.

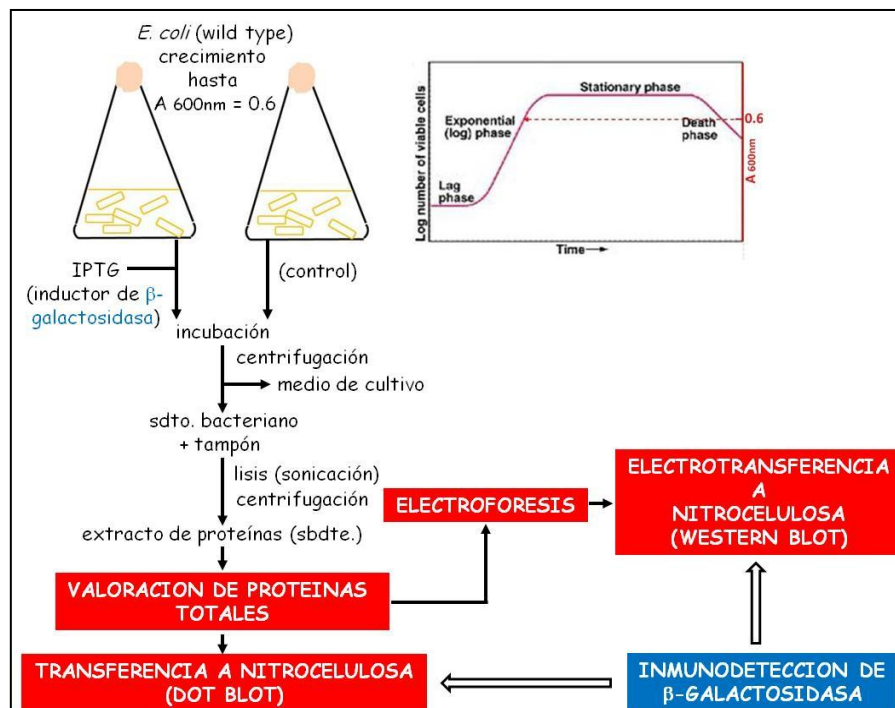


Fig.4. Esquema general del experimento

## 2. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford

El cromóforo azul de Coomassie puede interactuar con la cadena lateral de los aminoácidos básicos y aromáticos de una proteína. El azul de Coomassie en medio ácido (reactivo de Bradford) presenta un máximo de absorbancia a 465 nm.

Este máximo se desplaza a 595 nm cuando se encuentra interaccionando con una proteína. Para una relación cromóforo/proteína adecuada, el valor de  $A_{595nm}$  será proporcional a la concentración de proteínas. Si se construye una recta de calibrado con distintas concentraciones conocidas de proteína, se puede interpolar el valor de  $A_{595nm}$  de una muestra problema y conocer su concentración de proteína. También ha de utilizarse un blanco para restar el valor de  $A_{595nm}$  del cromóforo en ausencia de proteína.

#### Procedimiento experimental:

- (1) Preparar un blanco, una serie de tubos por duplicado para la recta de calibrado (1 a 4) y las muestras problema por duplicado (M1 y M2, extractos de bacterias cultivadas en ausencia y presencia de IPTG, respectivamente).

TUBO	BSA (0.1 mg/ml)	Muestra	H <sub>2</sub> O	Reactivo de Bradford
Blanco	--	--	800 $\mu$ l	200 $\mu$ l
1,1'	20 $\mu$ l	--	780 $\mu$ l	200 $\mu$ l
2,2'	40 $\mu$ l	--	760 $\mu$ l	200 $\mu$ l
3,3'	60 $\mu$ l	--	740 $\mu$ l	200 $\mu$ l
4,4'	100 $\mu$ l	--	700 $\mu$ l	200 $\mu$ l
M1,M1'	--	10 $\mu$ l	790 $\mu$ l	200 $\mu$ l
M2,M2'	--	10 $\mu$ l	790 $\mu$ l	200 $\mu$ l

- (2) Agitar los tubos y esperar 10 min (5-30 min) a temp. ambiente
- (3) Ajustar el espectrofotómetro a un valor de  $A_{595nm} = 0$  con el blanco. Medir  $A_{595nm}$  en el resto de los tubos.

**Construir la recta de calibrado. Calcular la concentración de proteína en las muestras problema.**

### 3. "Western Blot"

#### 3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

La electroforesis es el transporte de moléculas cargadas bajo la acción de un campo eléctrico. La movilidad electroforética de una molécula depende no solo de su carga sino también de otros factores como el tamaño y la forma. La separación electroforética de proteínas se lleva a cabo principalmente en geles de poliacrilamida y en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS). Este tipo de electroforesis (conocida por sus siglas en inglés SDS-PAGE) se realiza habitualmente en placa vertical. Para la preparación del soporte se utiliza acrilamida, que forma largas cadenas lineales, entrecruzadas por N,N'-metilen bisacrilamida. Asimismo se emplean persulfato amónico y N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED), compuestos que generan radicales libres, para la iniciación y la propagación de la polimerización, respectivamente. Este soporte reticulado presentará un entramado más o menos denso, con un tamaño de poro menor o mayor, en función de la concentración de los monómeros acrilamida y bisacrilamida.

El SDS se une a las proteínas a razón de una molécula de SDS por cada dos aminoácidos, desplegándolas y disociando subunidades en el caso de proteínas oligoméricas. Los complejos proteína-SDS están cargados negativamente debido al grupo  $SO_4^-$  del SDS, presentando una densidad de carga (relación carga/tamaño) constante, independientemente de la carga intrínseca de las proteínas. Además, todas



las proteínas en presencia de SDS adoptan la misma forma, elipsoides que solo se diferencian en su longitud, acorde con el tamaño de la proteína. Así pues, la separación de proteínas en SDS-PAGE se realiza únicamente en función del tamaño de las mismas. Todas las proteínas migrarán hacia el ánodo, polo positivo, teniendo lugar, gracias al soporte, un tamizado molecular que permitirá que las proteínas avancen más cuanto más pequeño sea su tamaño. La SDS-PAGE se realiza normalmente en condiciones reductoras, en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol o ditioneitol, para romper puentes disulfuro intra e intercatenarios. De este modo, las proteínas se despliegan totalmente en presencia de SDS y del agente reductor, evitándose movi­lidades electroforéticas anómalas (Fig.5), y, en el caso de proteínas oligoméricas, se posibilita la separación de sus subunidades si están unidas por puentes disulfuro.

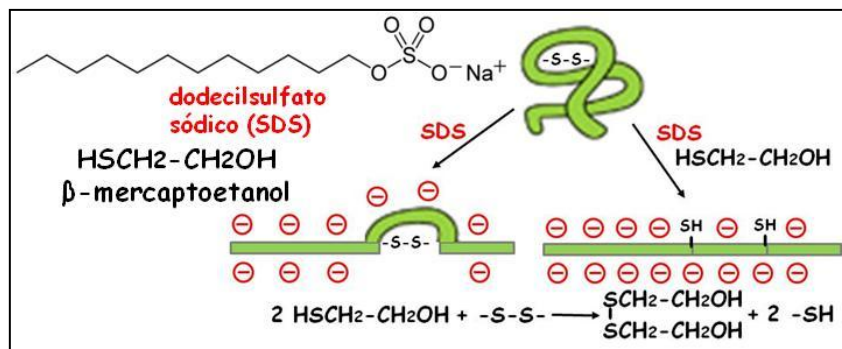


Fig.5. Efecto del SDS y del  $\beta$ -mercaptoetanol sobre el desplegamiento de las proteínas

Generalmente la SDS-PAGE se realiza en un gel discontinuo, con una parte superior concentrante y una parte inferior separadora. El gel concentrante, en el que se aplica la muestra, presenta una menor concentración de monómeros que el gel separador, con lo que el tamaño del poro es mucho mayor, difiriendo también ambos geles en el pH y la fuerza iónica. Estas diferencias hacen que la muestra se concentre en el gel superior, dando lugar a una resolución más elevada de las bandas de proteínas en el gel separador. Las muestras contienen azul de bromofenol, compuesto coloreado de bajo peso molecular, que presenta carga negativa a los valores de pH de la electroforesis y que migra, al igual que los complejos proteína-SDS, hacia el ánodo. Este compuesto permite observar cómo se concentra la muestra durante su migración por el gel concentrante y seguir el frente de electroforesis en el gel separador.

En este experimento, la electroforesis se va a realizar en un gel discontinuo, con una parte concentrante con acrilamida 4% y una parte separadora con acrilamida 10%, siendo en ambos casos la relación acrilamida/bisacrilamida = 37.5. Además de las muestras problema, se va a aplicar una muestra con una mezcla de proteínas patrón de peso molecular (M) conocido, que sirve como indicador de la separación electroforética y, además, va a permitir el cálculo de M de la proteína objeto de estudio.

#### Procedimiento experimental:

¡ Acrilamida y bisacrilamida son neurotóxicos en polvo o en disolución. Aunque una vez que se ha producido la polimerización dejan de ser tóxicos, todo el proceso de electroforesis ha de realizarse con guantes ante la posible presencia de monómeros libres !

## Primer día

**Diluir la muestra más concentrada con agua para que la concentración de proteína en ambas muestras (M1 y M2) sea idéntica.**

- (1) Una vez realizada la dilución, pasar 30  $\mu$ l de muestra a un tubo Eppendorf. Añadir 30  $\mu$ l de tampón de muestra (Tris-HCl 120 mM, pH 6.8 / SDS 4% / glicerol 20% /  $\beta$ -mercaptoetanol 10% / azul de bromofenol 0.01%), agitar y dar un pulso de centrifuga. Hacer lo mismo con la otra muestra.
- (2) Incubar los tubos de las muestras y un tubo con una mezcla de proteínas patrón (con las tapas perforadas con la parte biselada de una aguja) a 100°C durante 5 min. Dar un pulso de centrifuga.

## Segundo día

- (3) Eliminar el tampón de conservación de los pocillos del gel. Instalar el molde con el gel en la cubeta de electroforesis. Añadir tampón de electroforesis (Tris 25 mM / glicina 0.2 M / SDS 0.1%) al compartimento inferior de la cubeta hasta que sobrepase en 1 cm el límite inferior del gel. Añadir también tampón al compartimento superior hasta que rebose de los pocillos.
- (4) Aplicar en los pocillos 15  $\mu$ l de cada muestra y 15  $\mu$ l de la mezcla de proteínas patrón. Aplicar en los pocillos vacíos 15  $\mu$ l de tampón de muestra diluido 1/2 con agua (las aplicaciones quedan en los pocillos gracias a la densidad conferida por el glicerol que contienen).
- (5) Llevar a cabo la electroforesis a 170 V (**comprobar que el polo positivo, rojo, se ha conectado a la parte inferior de la cubeta**). Detener cuando el frente, indicado por el azul de bromofenol, llegue al final del gel.
- (6) Eliminar el tampón de electroforesis y extraer el molde de la cubeta. Separar cuidadosamente una de las placas de vidrio y eliminar el gel concentrante.

**Medir la distancia migrada por el azul de bromofenol en el gel separador o, en caso de salida del frente, medir la longitud del gel separador. Este será el valor de  $D$  para el cálculo de la movilidad electroforética relativa de las proteínas ( $R_f$ ).**

### 3.2. Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas

La transferencia de proteínas desde el gel a una membrana permite que las proteínas queden accesibles para su identificación, lo que no ocurre cuando éstas se encuentran en el gel. En la electrotransferencia, los complejos proteína-SDS, cargados negativamente, se transfieren desde el gel a la membrana gracias a un campo

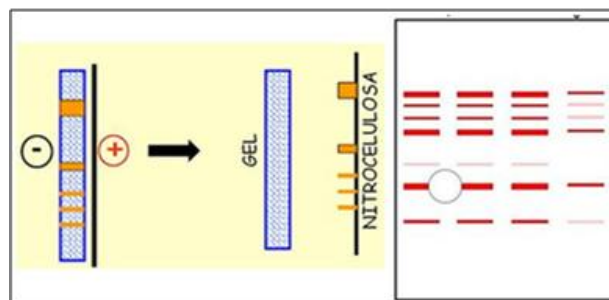


Fig.6. Electrotransferencia y tinción de la nitrocelulosa con rojo Ponceau

eléctrico aplicado perpendicularmente al plano del gel, estando la membrana siempre orientada hacia el polo positivo. La membrana se tiñe con rojo Ponceau para visualizar

las proteínas transferidas. Este compuesto se une reversiblemente a las proteínas, de modo que se puede eliminar fácilmente para no interferir en la posterior identificación de las mismas con anticuerpos (Fig.6).

La identificación de las proteínas con anticuerpos generalmente se realiza de forma indirecta, empleándose dos anticuerpos. La membrana primero se bloquea con una proteína (seroalbúmina o caseína) para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos. El anticuerpo primario, habitualmente monoclonal, se une a la proteína que se pretende identificar. El anticuerpo secundario está dirigido frente al anticuerpo primario y se encuentra covalentemente unido a una enzima (peroxidasa o fosfatasa alcalina). Estas enzimas convierten sustratos solubles e incoloros en productos coloreados e insolubles, que permiten visualizar las bandas a las que se han unido los anticuerpos. Los anticuerpos secundarios suelen ser policlonales, por lo que a cada molécula de anticuerpo primario se puede unir más de una molécula de anticuerpo secundario, teniendo lugar una amplificación de la señal (Fig.7).

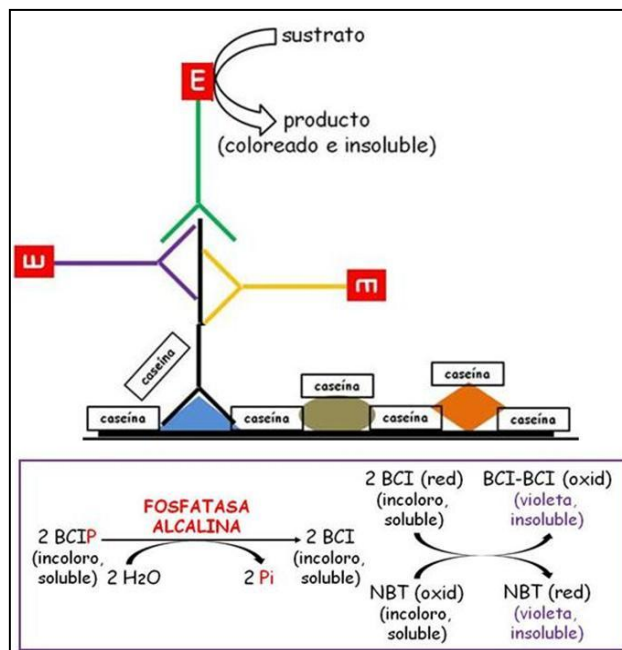


Fig.7. Inmunodetección indirecta de proteínas con un anticuerpo primario monoclonal y un secundario policlonal. Visualización de las bandas mediante la reacción de la fosfatasa alcalina

#### Procedimiento experimental:

¡ Todos los lavados e incubaciones se hacen a temperatura ambiente con agitación, excepto donde se indica !

#### Primer día

- (1) Colocar sobre la tapa negra de la "cassette" de transferencia una esponja, tres trozos de papel Whatman 3<sup>MM</sup>, el gel separador y la membrana. **Es muy importante que un lado de la membrana coincida perfectamente con el lado del gel separador correspondiente a la interfase con el concentrante.** Colocar otros tres trozos de papel Whatman y una esponja. Todo ha de estar previamente embebido en tampón de transferencia (Fig.8). **Hay que poner especial empeño en que no haya burbujas entre las diferentes capas, para lo cual se pasa un rodillo entre paso y paso.** Cerrar la "cassette".

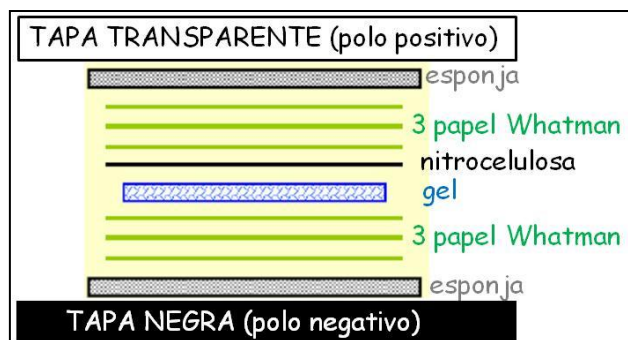


Fig.8. Montaje de la "cassette" de electrotransferencia

- (2) Llenar la cubeta con tampón de transferencia (Tris 25 mM / glicina 0.2 M / metanol 20%). **Instalar la "cassette" con la tapa negra orientada hacia el polo negativo, negro.** Desarrollar la transferencia durante toda la noche a 10 V.

### Segundo día

- (3) Sacar la "cassette", extraer la membrana e introducirla en una cubeta. Añadir 15 ml de rojo Ponceau 0.1% en ácido acético 5% y teñir durante 5 min. Desteñir con agua hasta visualizar las bandas de proteínas.

**Comprobar la transferencia. Medir la distancia migrada por los patrones de peso molecular. Estos serán los valores de  $d$  para el cálculo de los  $R_f$ .**

- (4) Continuar los lavados con agua hasta eliminar la mayor parte del colorante unido a las proteínas.  
 (5) Lavar la membrana dos veces durante 5 min con 15 ml de tampón A (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 / NaCl 500 mM) y dos veces durante 20 min con 15 ml de solución bloqueante (leche en polvo desnatada 4% en tampón A).  
 (6) Incubar durante toda la noche, en bolsa de plástico sellada, con anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -galactosidasa (IgG de ratón) diluido 1/5000 en 5 ml de sol. bloqueante diluida 1/3 en tampón A.

### Tercer día

- (7) Lavar cinco veces durante 5 min con 15 ml de tampón B (Tween-20 0.05% en tampón A).  
 (8) Incubar durante 1 h a **37°C**, en bolsa de plástico sellada, con anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1/10000 en 5 ml de solución bloqueante diluida 1/3 en tampón A.  
 (9) Lavar cinco veces durante 5 min con 15 ml de tampón B y dos veces durante 5 min con 15 ml de tampón fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM, pH 9.5 / NaCl 100 mM /  $MgCl_2$  50 mM).  
 (10) Revelar **sin agitación** con 10 ml de tampón fosfatasa alcalina, 45  $\mu$ l de NBT y 35  $\mu$ l de BCIP, hasta la aparición de bandas coloreadas. Lavar abundantemente con agua. Dejar secar la membrana sobre papel de filtro.

**Medir la distancia migrada por la  $\beta$ -galactosidasa (banda coloreada). Este será el valor de  $d$  para el cálculo de su  $R_f$ . Calcular los  $R_f$  de las proteínas patrón y de la  $\beta$ -galactosidasa ( $R_f = d/D$ ). Construir una recta de calibrado con las proteínas patrón ( $\log M$  vs  $R_f$ ). Interpolar el valor de  $R_f$  de la  $\beta$ -galactosidasa y calcular  $M$ .**

## Comparar las intensidades de color de las bandas (niveles de $\beta$ -galactosidasa) en ausencia y en presencia de IPTG.

### 4. "Dot Blot"

#### Procedimiento experimental:

#### Primer día

- (1) Añadir 60  $\mu$ l de tampón de muestra sin azul de bromofenol a 60  $\mu$ l de cada muestra (M1 y M2), una vez realizada la dilución. Agitar y dar un pulso de centrifuga. Incubar a 100°C durante 5 min y dar un pulso de centrifuga.
- (2) Cortar un trozo de nitrocelulosa que abarque los pocillos que se van a utilizar. Humedecer la membrana de nitrocelulosa mediante incubación con agitación durante 10 min en tampón A. Eliminar el exceso de tampón sobre papel de filtro.
- (3) Comprobar que los agujeros de la pieza selladora coinciden con los agujeros del soporte (alineal empujando ligeramente en las esquinas de la pieza selladora). Colocar la membrana sobre la pieza selladora, eliminando las burbujas que se puedan formar entre ambas. Los agujeros que no resulten recubiertos por la membrana han de ser recubiertos por Parafilm. Ni la nitrocelulosa ni el Parafilm deben sobrepasar la marca en el perímetro de la pieza selladora.
- (4) Colocar la tapa con los pocillos y apretar los tornillos en diagonal. Aplicar vacío y apretar de nuevo los tornillos.
- (5) Cortar el vacío y añadir 100  $\mu$ l de tampón A. Aplicar vacío/aire hasta el vaciado de los pocillos y cortar el vacío inmediatamente.
- (6) Aplicar 100  $\mu$ l de cada una de las muestras. Comprobar que no hay burbujas en los pocillos. Dejar drenar por gravedad (**si en este paso o en el siguiente se conecta el vacío aparecen halos en las aplicaciones**).
- (7) Lavar con 100  $\mu$ l de tampón A, dejar drenar por gravedad.
- (8) Conectar el vacío, aflojar los tornillos y quitar la tapa con los pocillos. Cortar el vacío, quitar la nitrocelulosa y dejar secar sobre papel de filtro, apoyando la cara que no contiene las proteínas.

#### Segundo y tercer día

- (9) Seguir los puntos (5) a (10) del protocolo de inmunodetección de proteínas. Los lavados de ambas nitrocelulosas se realizarán en la misma cubeta. Las incubaciones con los anticuerpos se llevarán a cabo en la misma bolsa de

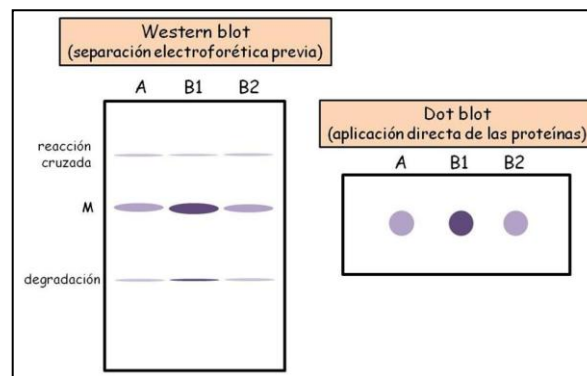


Fig.9. Inmunodetección de proteínas en "Western blot" y en "Dot blot"

plástico, con la precaución de que los dorsos de ambas membranas estén en contacto (las caras donde se encuentran las proteínas deben quedar hacia el plástico). El revelado también se realizará en la misma cubeta.

**Comparar las intensidades de color en ambos puntos. Comparar los resultados con los obtenidos mediante “Western blot” (Fig.9). Ventajas e inconvenientes de ambas técnicas.**

## 5. Planificación de las prácticas

LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES	DÍA EN AULA
Valoración de proteínas.	Dilución de las muestras. Preparación de las muestras para electroforesis y “Dot Blot”. “Dot Blot”.	Electroforesis. Electrotransferencia.	Tinción de proteínas transferidas en ambos “blots”. Incubación de ambos “blots” con el anticuerpo primario.	Incubación de ambos “blots” con el anticuerpo secundario y revelado.	Discusión de resultados.

## 6. Ejercicios de autoevaluación

**Questionario** Responde marcando las casillas V ó F

**V**      **F**

**1. Valoración de proteínas por el método de Bradford:**

- a) El azul de Coomassie interacciona con los residuos ácidos y aromáticos de las proteínas
- b) El azul de Coomassie en medio ácido no absorbe a 595nm en ausencia de proteínas

**2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), en condiciones reductoras y en gel discontinuo:**

- a) Una mezcla de proteínas de bajo peso molecular se resuelve mejor en un gel separador con acrilamida al 12.5% que al 7.5%
- b) La ruptura de puentes disulfuro intracatenarios por  $\beta$ -mercaptoetanol permite que el SDS despliegue completamente esas cadenas polipeptídicas, evitándose así moviidades electroforéticas anómalas

**3. Electrotransferencia de proteínas separadas mediante SDS-PAGE:**

- a) Las proteínas electrotransferidas quedan retenidas en la superficie de la nitrocelulosa libres de SDS, que continúa su migración hacia el ánodo
- b) Para visualizar las proteínas electrotransferidas, la nitrocelulosa se puede teñir con cualquier colorante de proteínas ya que el colorante unido nunca interfiere en el posterior reconocimiento de las proteínas por los anticuerpos



**4. Inmunodetección de proteínas en “Dot blot” y en “Western blot”:**

- a) La saturación de la nitrocelulosa con caseína o con cualquier otra proteína no evita las reacciones cruzadas que pueden darse cuando se utiliza un anticuerpo policlonal, detectándose estas reacciones cruzadas en ambos tipos de “blot”
- b) En una inmunodetección indirecta realizada con un anticuerpo primario monoclonal y un anticuerpo secundario también monoclonal nunca es necesaria la purificación de los anticuerpos y siempre se obtiene una amplificación de la señal

**5. Control transcripcional del gen que codifica la β-galactosidasa (gen *lac Z*):**

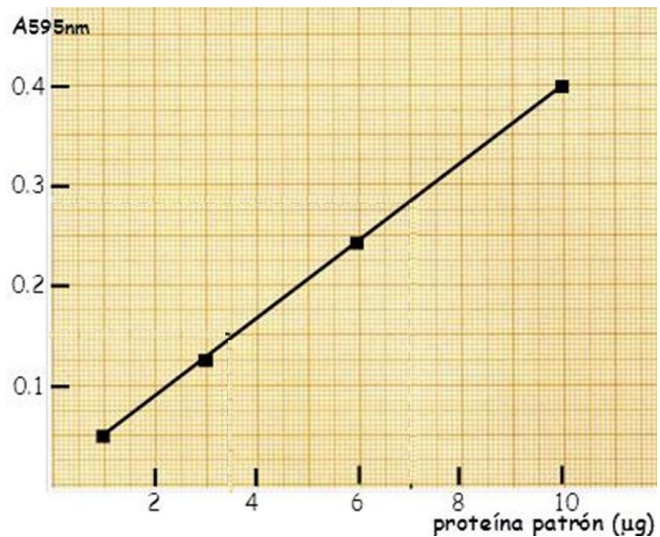
- a) La unión de 1,6-alolactosa a la proteína represora hace que esta proteína se una al promotor del operon *lac*, que contiene el gen *lac Z*, impidiendo la unión de la RNA polimerasa
- b) La unión de la proteína de respuesta a AMPc (CRP) al promotor facilita la unión de la RNA polimerasa

**Problemas**

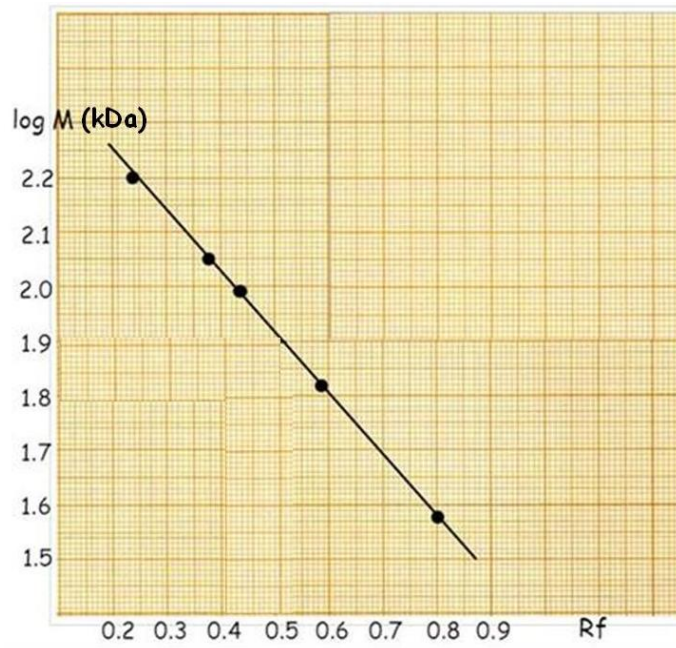
1. Se han obtenido dos extractos de proteínas de una línea celular cultivada en dos condiciones diferentes (cultivo a y cultivo b) y se ha procedido a su valoración colorimétrica. Los resultados se muestran en la tabla y con los mismos se ha construido la correspondiente recta patrón. ¿Cuál es la concentración de proteína, en mg/ml, en cada uno de los extractos?

A595nm	proteína patrón (µg)	muestra (10 µl)
0.050	1	--
0.125	3	--
0.240	6	--
0.400	10	--
0.150	--	cultivo a
0.285	--	cultivo b

¿Cómo se prepararía un volumen final de 1 ml de una dilución de la muestra más concentrada para llevarla a la concentración de la muestra más diluida?



2. En una SDS-PAGE se ha aplicado en una pista una muestra de proteínas patrón de peso molecular conocido. En otras tres pistas se han aplicado 4  $\mu\text{g}$  de proteína del extracto del cultivo a (A), 4  $\mu\text{g}$  del cultivo b (B1) y 1  $\mu\text{g}$  del cultivo b (B2). La electroforesis se ha desarrollado hasta que el azul de bromofenol ha migrado 8.0 cm en el gel separador. Las proteínas del gel separador se han electrotransferido a un soporte de nitrocelulosa. Las proteínas se han visualizado por tinción de la nitrocelulosa con rojo Ponceau, se ha medido la migración de las



proteínas patrón, y se ha obtenido la recta patrón que se adjunta. Posteriormente se ha realizado una inmunodetección indirecta visualizándose en las pistas correspondientes a las proteínas de la línea celular una banda que ha migrado 5.5 cm. ¿Cuál es el peso molecular (indicar las unidades) de la proteína reconocida por el anticuerpo primario?

3. En la figura se muestra la porción del anterior "Western blot" que contiene las bandas reconocidas por el anticuerpo. Comentar el resultado obtenido.



## 7. Resolución de ejercicios de autoevaluación

**Cuestionario** Responde marcando las casillas V ó F

**V**      **F**

1. Valoración de proteínas por el método de Bradford:

- a) El azul de Coomassie interacciona con los residuos ácidos y aromáticos de las proteínas  **X**
- b) El azul de Coomassie en medio ácido no absorbe a 595nm en ausencia de proteínas  **X**

2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), en condiciones reductoras y en gel discontinuo:

- a) Una mezcla de proteínas de bajo peso molecular se resuelve mejor en un gel separador con acrilamida al 12.5% que al 7.5% **X**



b) La ruptura de puentes disulfuro intracatenarios por  $\beta$ -mercaptoetanol permite que el SDS despliegue completamente esas cadenas polipeptídicas, evitándose así movi- lidades electroforéticas anómalas

**3. Electrotransferencia de proteínas separadas mediante SDS-PAGE:**

a) Las proteínas electrotransferidas quedan retenidas en la superficie de la nitrocelulosa libres de SDS, que continúa su migración hacia el ánodo

b) Para visualizar las proteínas electrotransferidas, la nitrocelulosa se puede teñir con cualquier colorante de proteínas ya que el colorante unido nunca interfiere en el posterior reconocimiento de las proteínas por los anticuerpos

**4. Inmunodetección de proteínas en "Dot blot" y en "Western blot":**

a) La saturación de la nitrocelulosa con caseína o con cualquier otra proteína no evita las reacciones cruzadas que pueden darse cuando se utiliza un anticuerpo policlonal, detectándose estas reacciones cruzadas en ambos tipos de "blot"

b) En una inmunodetección indirecta realizada con un anticuerpo primario monoclonal y un anticuerpo secundario también monoclonal nunca es necesaria la purificación de los anticuerpos y siempre se obtiene una amplificación de la señal

**5. Control transcripcional del gen que codifica la  $\beta$ -galactosidasa**

(gen *lac Z*):

a) La unión de 1,6-alolactosa a la proteína represora hace que esta proteína se una al promotor del operon *lac*, que contiene el gen *lac Z*, impidiendo la unión de la RNA polimerasa

b) La unión de la proteína de respuesta a AMPc (CRP) al promotor facilita la unión de la RNA polimerasa

**Problemas**

1. Se han obtenido dos extractos de proteínas de una línea celular cultivada en dos condiciones diferentes (cultivo a y cultivo b) y se ha procedido a su valoración colorimétrica. Los resultados se muestran en la tabla y con los mismos se ha construido la correspondiente recta patrón. ¿Cuál es la concentración de proteína, en mg/ml, en cada uno de los extractos?

A595nm	proteína patrón ( $\mu$ g)	muestra (10 $\mu$ l)
0.050	1	--
0.125	3	--
0.240	6	--
0.400	10	--
0.150	--	cultivo a
0.285	--	cultivo b

$\text{cultivo a} = 3.5 \mu\text{g}/10 \mu\text{l} = 0.35$

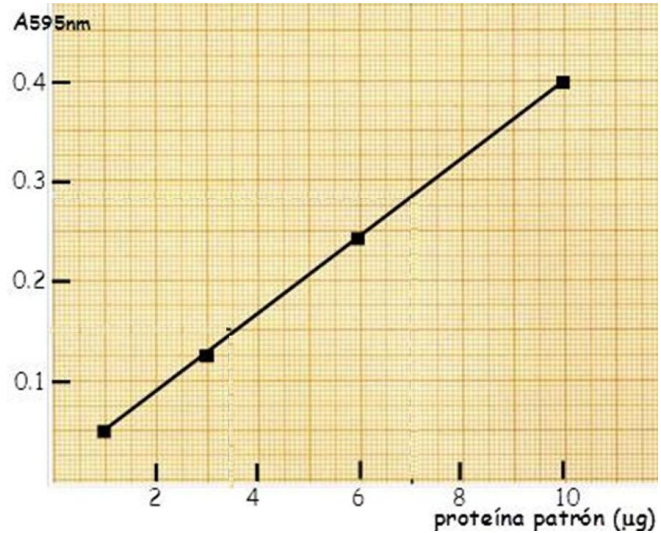
$\mu\text{g}/\mu\text{l} = 0.35 \text{ mg/ml}$

$\text{cultivo b} = 7.0 \mu\text{g}/10 \mu\text{l} = 0.70$

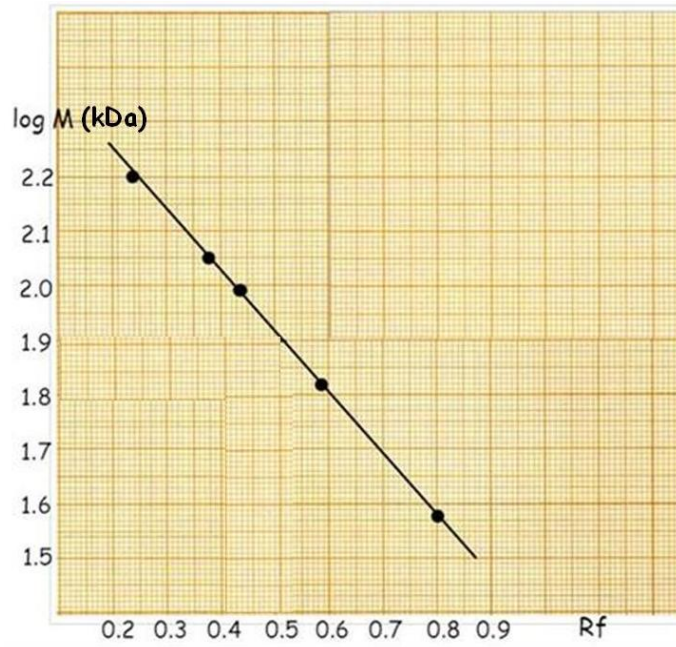
$\mu\text{g}/\mu\text{l} = 0.70 \text{ mg/ml}$

¿Cómo se prepararía un volumen final de 1 ml de una dilución de la muestra más concentrada para llevarla a la concentración de la muestra más diluida?

500  $\mu$ l cultivo b + 500  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

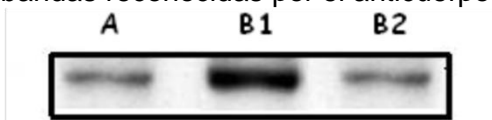


2. En una SDS-PAGE se ha aplicado en una pista una muestra de proteínas patrón de peso molecular conocido. En otras tres pistas se han aplicado 4  $\mu$ g de proteína del extracto del cultivo a (A), 4  $\mu$ g del cultivo b (B1) y 1  $\mu$ g del cultivo b (B2). La electroforesis se ha desarrollado hasta que el azul de bromofenol ha migrado 8.0 cm en el gel separador. Las proteínas del gel separador se han electrotransferido a un soporte de nitrocelulosa. Las proteínas se han visualizado por tinción de la nitrocelulosa con rojo Ponceau, se ha medido la migración de las



proteínas patrón, y se ha obtenido la recta patrón que se adjunta. Posteriormente se ha realizado una inmunodetección indirecta visualizándose en las pistas correspondientes a las proteínas de la línea celular una banda que ha migrado 5.5 cm. ¿Cuál es el peso molecular (indicar las unidades) de la proteína reconocida por el anticuerpo primario?  $R_f = 5.5 \text{ cm} / 8 \text{ cm} = 0.69$ ;  $\text{antilog } 1.7 = 50$ ;  $M_w = 50 \text{ kDa}$

3. En la figura se muestra la porción del anterior "Western blot" que contiene las bandas reconocidas por el anticuerpo. Comentar el resultado obtenido.



Las condiciones en las que se ha realizado el cultivo b han provocado un incremento en la expresión de la proteína reconocida por el anticuerpo, lo que se deduce de que a igualdad de proteína total aplicada (A vs B1) hay mayor señal en B1. Cuando se aplica la cuarta parte de proteína del extracto de cultivo b, se igualan las señales (B2 vs A), lo que indica que dicho incremento es de aproximadamente cuatro veces.