

# **PROVA PRÀCTICA 2**

## **OLIMPÍADA DE BIOLOGIA DE CATALUNYA**



Olimpíada de Biologia  
de Catalunya

**Febrer 2019**



Olimpiada de Biologia  
de Catalunya

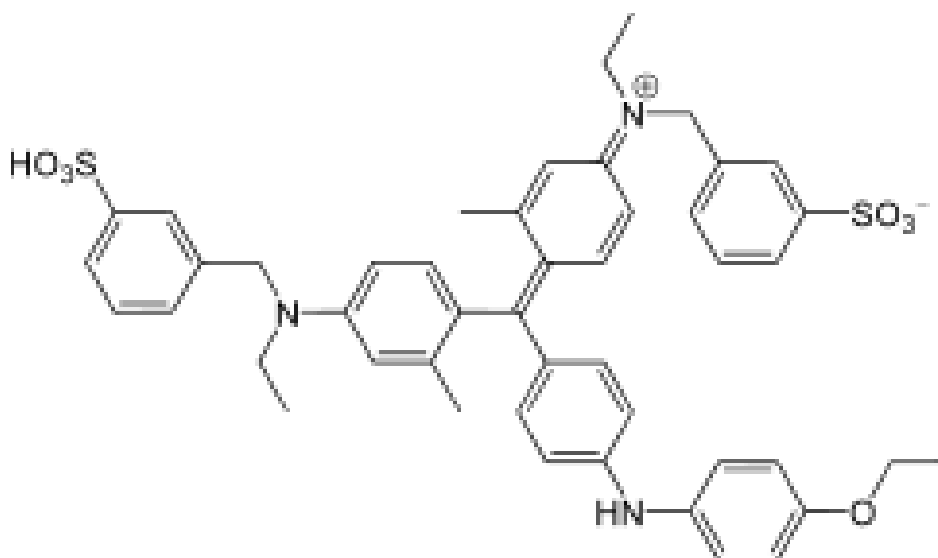
COGNOM I NOM \_\_\_\_\_

LLOC EN EL LABORATORI \_\_\_\_\_

## DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNA DE LA LLET PER UN MÈTODE COLORIMÈTRIC.

### 1.Introducció

Hi ha diferents mètodes colorimètrics per tal de determinar la concentració total de proteïna d'una mostra, com per exemple els mètodes de biuret, Lowry i Bradford. El mètode de biuret és el més antic i es basa en una reacció de quelació i una reacció redox. El mètode de Lowry, que implica dues reaccions redox, és més sensible que l'assaig de biuret, però es veu afectat per interferències provinents de substàncies i reactius d'ús habitual en el laboratori. L'assaig de Bradford utilitza un colorant anomenat Blau de Coomassie G-250, l'ús del qual va ser descrit per primera vegada per M. Bradford l'any 1976.



Blau de Coomassie G-250

Aquest assaig es basa en les propietats químiques del colorant i la seva capacitat d'interaccionar amb les cadenes laterals d'aminoàcids específics. El colorant Coomassie G-250 presenta diferents formes: com a constituent de la solució de Bradford, el colorant existeix en el seu estat catiònic (protonat) i pren un color roig marró. El pic d'absorció del colorant en aquest estat és de 470 nm. Quan el colorant s'uneix i interacciona amb els aminoàcids, el colorant es converteix en la seva forma estable desprotonada i el pic d'absorció es desplaça des de 470 nm a 595 nm, prenent un color blau. Aquesta forma estable del colorant es pot observar i quantificar fàcilment en un espectrofotòmetre. Hi ha una correlació entre la intensitat del color blau i la quantitat de proteïna de la mostra: així, com més intens és el color blau que pren la mostra, més quantitat de proteïna conté. Utilitzant dilucions seriades de proteïnes de concentració coneguda, es pot generar una corba de calibratge. Aquesta corba és utilitzada per quantificar la quantitat de proteïna que conté una mostra problema, basant-nos en la intensitat del color blau que pren. L'assaig de Bradford és senzill, molt sensible i no resulta molt afectat per les substàncies i reactius d'ús habitual en el laboratori.

Les interaccions químiques del Blau de Coomassie G-250 amb les proteïnes son de tres tipus. Les interaccions primàries es donen a través dels residus d'arginina, un aminoàcid molt bàsic, que interacciona amb els grups sulfònic del colorant mitjançant interaccions electrostàtiques. Els anells aromàtics del colorant també estableixen interaccions més febles amb els anells aromàtics dels aminoàcids, com el triptòfan, tirosina i fenilalanina (interaccions de tipus "stacking"). Finalment, el colorant també

interacciona dèbilment amb els aminoàcids que presenten cadenes laterals hidrofòbiques, com la leucina.

En aquest assaig de laboratori, el mètode de Bradford s'utilitza per tal de quantificar el contingut de proteïna en llet sencera de vaca i en un preparat de soja. Les proteïnes majoritàries de la llet de vaca són les caseïnes, la  $\alpha$ -lactalbúmina i la  $\beta$ -lactoglobulina. Les caseïnes (almenys 4 formes diferents en llet de vaca) són les proteïnes més abundants de la llet i tenen bastants aminoàcids que poden interaccionar fortament amb el colorant Blau de Coomassie G-250: arginines, triptòfan, tirosines, histidines i també lisines.

## **2. Objectiu.**

L'objectiu d'aquest experiment és determinar la concentració de proteïna que hi ha en una mostra de llet sencera i en un preparat de soja, que teniu a la vostra gradeta.

## **3. Experiment.**

**L'assaig de Bradford es realitza en quatre etapes principals:**

- Preparació d'una dilució seriada d'estàndards de proteïna i preparació de les mostres problema.
- Addició del colorant de Bradford (marró, forma catiónica) i incubació durant més de cinc minuts (sense excedir de 60 minuts). La unió del colorant a la proteïna porta a la formació de la forma desprotonada del colorant, el que produeix un viratge de color cap al blau.
- Lectura de l'absorció a 595 nm en un espectrofotòmetre.

- Construcció d'una corba de calibratge amb les dades obtingudes a partir dels patrons de concentració coneguda i determinació de la concentració de proteïna continguda a les mostres problema.

### 3.1 Material i equipament:

- Tampó PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Fosfat sòdic, 2 mM Fosfat potàssic a pH de 7.4).
- Reactiu de Bradford concentrat (Blau de Coomassie G-250).
- Dissolució estàndard de  $\gamma$ -globulina bovina a una concentració de 0,2 mg/mL
- Una mostra de llet sencera de vaca i una mostra de preparat de soja. **Aquestes 2 mostres han estat diluïdes prèviament 100X (a partir dels productes comercials), per tal que les seves concentracions de proteïna "entrin" dins de la corba de calibratge.**
- Espectrofotòmetre per mesurar la densitat òptica a una longitud d'ona de 595 nm ( $A_{595}$ , o també  $OD_{595}$ ).
- Micropipetes (P1000, P200 i P20).
- Puntetes de pipeta (cons de plàstic blaus i grocs) i tubs "eppendorf".
- Gradeta per tubs "eppendorf".
- Guants. El reactiu de Bradford és irritant per la pell.

### 3.2 Mètode:

**Es farà una corba de calibratge amb  $\gamma$ -globulina bovina com proteïna estàndard. S'interpolaran a aquesta corba de calibratge els valors obtinguts**

**de les absorbàncies de les dissolucions problema, per tal de determinar la concentració proteica en aquestes dissolucions.**

- Retolar 11 tubs “ependorf” del 1 al 11 i deixar-los a la gradeta.
- Preparar 1 blanc i 6 dissolucions estàndard de  $\gamma$ -globulina bovina (de 2 a 20  $\mu\text{G}/\text{mL}$ ) en tubs “ependorf”, tal com s'explica a la taula següent:

Tub	$\mu\text{L}$ de Tampó PBS	$\mu\text{L}$ de $\gamma$ -globulina a [0,2 mG/mL]	$\mu\text{G}$ de proteïna al tub	Concentració final de proteïna al tub en $\mu\text{G}/\text{mL}$
1 (blanc)	1000	0	0	0
2	990	10	2	2
3	980	20	4	4
4	960	40	8	8
5	940	60	12	12
6	920	80	16	16
7	900	100	20	20

- Posar els  $\mu\text{L}$  corresponents de PBS a cadascun dels tubs “ependorf” emprant el mateix con de plàstic a la punta de la pipeta. Comencem pel tub nº 1 al que posarem 1 mL de PBS: un cop agafat el volum d'1 mL de tampó amb la pipeta, es recolza l'extrem del con que hi ha a la punta de la pipeta en el lateral del tub “ependorf”. A continuació es prem suaument l'èmbol de la pipeta fins al primer topall de la pipeta, esperar uns dos segons perquè el líquid surti i a continuació es continua prement fins al segon topall (seguir les instruccions del manual “Com pipetejar correctament”).
- A continuació ajustarem la pipeta per tal que agafi 0,99 mL i després d'agafar-los els dispensarem al tub nº 2, seguint les normes anteriors.

- Continuarem així, sense canviar el con de la pipeta fins haver dispensat 0,9 mL a l'ependorf nº 7.
- Ara dispensarem a cada tub "ependorf" el volum corresponent de la dissolució de  $\gamma$ -globulina patró (que està a una concentració de 0,2 mg/mL). Abans, però, invertirem el tub en el que està la dissolució de  $\gamma$ -globulina patró dues o tres vegades (per assegurar que la dissolució sigui homogènia).
- A la pipeta adient li posarem un con de plàstic i agafarem 10  $\mu$ L de la dissolució de  $\gamma$ -globulina patró. A continuació dispensarem aquests 10  $\mu$ L a l'ependorf nº 2: introduïrem la punta del con de la pipeta dintre del tub, de forma que la punta del con estigui dintre del líquid (són els 0,99 mL de PBS que li hem posat abans). A continuació es prem l'èmbol de la pipeta fins al primer topall de la pipeta, esperar uns dos segons perquè el líquid surti i a continuació continuar prement fins al segon topall. **Sense deixar de prémer l'èmbol treure la punta del con de dins de la dissolució** i expulsar la punta el receptacle de recollida de residus adequat.
- Ara posarem un nou con de plàstic i agafarem 20  $\mu$ L de la dissolució de  $\gamma$ -globulina patró, que posarem dintre del "ependorf" nº 3, de la mateixa forma que hem indicat abans.
- Es procedirà així, fins haver completat els 7 tubs, que ens permetran construir la corba de calibratge.
- A continuació, prepararem les dissolucions que contindran la mostra de llet i la de soja, fent duplicats de cada mostra. Emprarem els tubs que hem retolat 8, 9, 10 i 11.
- En els quatre tubs posarem 0,98 mL de PBS sense canviar el con de la pipeta.
- A continuació, invertirem dues o tres vegades els tubs en els que estan la llet sencera i el preparat de soja.

- Ara agafarem la pipeta adient a la que posarem un con de plàstic i agafarem 20  $\mu$ L de la mostra de llet sencera. Dispensarem aquests 20  $\mu$ L al tub nº 8 (que conté 0,98 mL de PBS) i amb un altre con, 20  $\mu$ L de la mateixa mostra al tub nº 9.

- A continuació, canviarem el con de la pipeta, i dispensarem 20  $\mu$ L de preparat de soja al tub nº 10 (que conté 0,98 mL de PBS) i després de canviar el con, 20  $\mu$ L del mateix preparat al tub nº 11..

Tub 8	980 $\mu$ L de tampó PBS	20 $\mu$ L de la mostra de llet sencera
Tub 9	980 $\mu$ L de tampó PBS	20 $\mu$ L de la mostra de llet sencera
Tub 10	980 $\mu$ L de tampó PBS	20 $\mu$ L de la mostra del preparat de soja
Tub 11	980 $\mu$ L de tampó PBS	20 $\mu$ L de la mostra del preparat de soja

- Afegir a cadascun dels 11 tubs “ependorfs” (1 amb blanc, 6 amb estàndards de proteïna, 2 amb la mostra de llet i 2 amb la de soja), 200  $\mu$ L de **reactiu de Bradford concentrat**.

- Agafarem la pipeta adient i afegirem 200  $\mu$ L de reactiu de Bradford al tub eppendorf nº 1. Després taparem el tub nº1 i l’invertirem dues o tres vegades, perquè es doni la reacció amb el reactiu de Bradford i que la barreja resultant sigui homogènia.

- Canviarem el con de la pipeta i agafarem 200  $\mu$ L de reactiu de Bradford que afegirem al tub nº2, tapant-lo a continuació i invertint-lo dues o tres vegades. Procedirem així, fins haver afegit el reactiu de Bradford als 11 tubs.

La taula següent indica el punt en el que estem ara:



Tub	µL de Tampó PBS	µL de γ-globulina a [0,2 mG/mL]	µL de reactiu de Bradford
1 (blanc)	1000	0	200
2	990	10	200
3	980	20	200
4	960	40	200
5	940	60	200
6	920	80	200
7	900	100	200
8	980	20 µL de la mostra de llet sencera	200
9	980	20 µL de la mostra de llet sencera	200
10	980	20 µL de la mostra del preparat de soja	200
11	980	20 µL de la mostra del preparat de soja	200

- A continuació, tornarem a invertir cadascun dels 11 tubs dues o tres vegades per assegurar la homogeneïtat de la dissolució.

- Incubar a temperatura ambient els tubs “ependorfs” per un període comprés entre 5 minuts (com mínim) i 1 hora (com a màxim).

**Les absorbàncies dels onze tubs s’han de llegir seqüencialment des de el blanc (tub nº 1) fins la última mostra (tub nº 11). És important que tots els tubs estiguin el mateix temps en contacte amb el reactiu de Bradford:**

- Mentre els tubs “ependorf” estan incubant-se, seleccionarem a l’espectrofotòmetre una longitud d’ona de 595 nm.

- Ara llegirem les absorbàncies de les dissolucions dels 11 tubs "eppendorf" començant pel "blanc". **Les cubetes s'agafen per la seva part rugosa i opaca, no tocant mai la part transparent. Per a determinar les absorbàncies dels 11 tubs emprarem tres cubetes: una primera pel blanc i per les solucions estàndard de  $\gamma$ -globulina, una segona cubeta per les mostres amb llet sencera i la tercera per les mostres del preparat de soja.** Abocar el contingut del tub "eppendorf" marcat com "blanc" (**tub 1**) a una cubeta d'espectrofotòmetre. Posar-la dins de l'espectrofotòmetre en el que estarà seleccionada la longitud d'ona de 595 nm (**la cubeta s'orienta dins l'espectrofotòmetre de forma que les parets transparents de la cubeta estiguin encarades amb el feix de llum**). Prémer el botó corresponent de l'espectrofotòmetre per a posar l'absorbància a zero. Donat que aquest tub eppendorf no conté proteïna, la  $A_{595}$  ( $OD_{595}$ ) que indica (resultant de la interacció del tampó amb el reactiu de Bradford) és la del "blanc". En lloc d'anar restant aquest valor a tots els altres tubs, posarem la lectura de l'aparell a absorbància 0 (prement el botó adient de l'espectrofotòmetre) i, d'aquesta forma, les lectures de les absorbàncies de les dissolucions que tenen proteïna, ja estaran corregides per la absorbància del tub "blanc".

- Tornar el contingut de la cubeta amb el blanc al seu "eppendorf" corresponent i abocar a la mateixa cubeta el contingut de l'eppendorf (**tub nº 2**) en el que hi havia el primer estàndard a una concentració de proteïna de 2  $\mu$ G/mL de  $\gamma$ -globulina bovina. Anotar l'absorbància a 595 nm obtinguda en aquesta concentració de proteïna. Utilitzar la taula que hi ha a la pàgina 12.

- Tornar el contingut de la cubeta amb el primer estàndard al seu eppendorf corresponent i abocar a la mateixa cubeta el contingut de l'eppendorf en el

que hi havia el segon estàndard (**tub 3**). Anotar l'absorbància a 595 nm d'aquesta concentració de proteïna.

- Continuar així en sentit creixent de concentració de proteïna fins al darrer tub estàndard, aquell en el que la  $\gamma$ -globulina bovina està a una concentració de 20  $\mu$ G/mL (**tub 7**). Es pot utilitzar la mateixa cubeta, perquè anem fent les mesures en sentit creixent de concentració de proteïna. L'error que es pugui fer degut a la presència de gotes de líquid del estàndard "anterior" és molt baix.

- Les lectures de les absorbàncies de les dos mostres de la llet sencera les farem en una cubeta nova. Agafar la segona cubeta nova i abocar-hi el contingut de l'ependorf que contenia la mostra de llet sencera diluïda i els 200  $\mu$ L de reactiu de Bradford (**tub 8**). Anotar l'absorbància a 595 nm.

- Tornar el contingut de la cubeta amb la primera mostra de llet sencera diluïda al seu eppendorf corresponent (n<sup>o</sup> 8) i abocar a la mateixa cubeta el contingut de l'ependorf en el que hi havia la segona mostra de llet sencera diluïda (**tub 9**). Anotar l'absorbància a 595 nm.

- Agafar la tercera cubeta nova i abocar-hi el contingut de l'ependorf que contenia la mostra de soja diluïda i els 200  $\mu$ L de reactiu de Bradford (**tub 10**). Anotar l'absorbància a 595 nm.

- Tornar el contingut de la cubeta amb la primera mostra del preparat de soja diluït al seu eppendorf corresponent (n<sup>o</sup> 10) i abocar a la mateixa cubeta el contingut de l'ependorf en el que hi havia la segona mostra del preparat de soja diluït (**tub 11**). Anotar l'absorbància a 595 nm.

- Tornar el contingut de la cubeta al tub n<sup>o</sup> 11.

Tub	$\mu\text{L}$ de Tampó PBS	Concentració final de proteïna al tub en $\mu\text{G/mL}$	$A_{595}$
1 (blanc)	1000	0	
2	990	2	
3	980	4	
4	960	8	
5	940	12	
6	920	16	
7	900	20	
8	980	x1	
9	980	x2	
10	980	y1	
11	980	y2	

## 4. Resultats

### Anàlisi de les dades.

Representar les absorbàncies obtingudes a 595 nm vs la concentració de proteïna (en  $\mu\text{G/mL}$ ) estàndard que hi ha a cada tub. La representació de les absorbàncies vs les concentracions de proteïna de cada estàndard hauria de donar una corba de calibratge bastant lineal.

- Dibuixar la millor recta que passi per tots els punts amb un regle.
- Fer la mitjana dels dos valors d'absorbància determinats pel duplicat de la mostra de llet sencera diluïda i del duplicat del preparat de soja diluït.
- Interpolar aquestes mitjanes a la recta de calibratge, per tal de trobar les concentracions "problema". Ara ja coneixem les concentracions de proteïna (de les mostres de llet i soja) a les cubetes d'espectrofotòmetre respectives. -
- A partir d'aquests valors i tenint en compte el volum de dissolució agafat de cada mostra problema i del volum de dissolució a la cubeta, podem calcular

la concentració de proteïna de les dissolucions de llet sencera i del preparat de soja que heu trobat a la gradeta.

**Aquesta segona part de la pràctica de Bioquímica serveix per completar la primera, encara que per manca de temps no s'ha de fer al laboratori. S'ha d'entendre, però, el principi per poder contestar després una sèrie de qüestions.**

## **SEPARACIÓ DE LES PROTEÏNES DE LA LLET PER ELECTROFORESIS EN SDS**

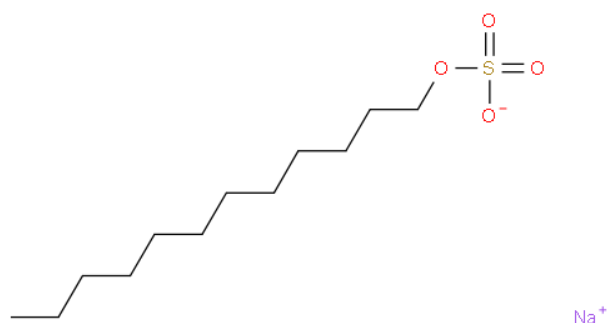
Els mètodes de separació electroforètica es basen en l'aplicació d'un camp elèctric a través d'un suport insoluble i porós però que és permeable a una dissolució tamponada.

L'electroforesi en gels de poliacrilamida (PAGE) és una tècnica emprada per a separar i visualitzar proteïnes i també DNA i RNA de baix pes molecular. Els gels d'agarosa són utilitzats normalment per a la separació de molècules grans de DNA o RNA.

Les cadenes polipeptídiques de les proteïnes perden l'estructura quan s'escalfen durant 5 minuts a 100 °C, a pH neutre, en 1% dodecil sulfat sòdic (SDS) (molècula de la figura) i

0.1 M mercaptoetanol.

Els ponts disulfur es trenquen per l'acció del mercaptoetanol i els complexos formats per les



subunitats de proteïna i el SDS adquireixen una forma de “bastó”. Les proteïnes sotmeses a aquest tractament es comporten com si tinguessin

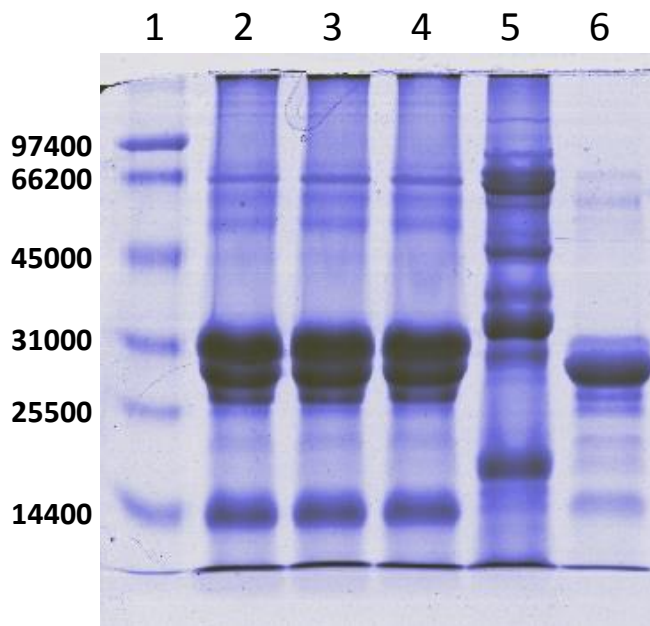
una forma semblant i una relació càrrega-massa idèntica. La càrrega ve doncs determinada pel SDS més que per la càrrega intrínseca de cada proteïna. Les molècules de detergent s'uneixen a la proteïna per la seva part hidrofòbica, mentre que el grup àcid del SDS queda cap a l'exterior, el que destrueix la conformació nativa de la proteïna i li confereix una càrrega superficial negativa uniforme. Ja que els complexos SDS-proteïna tindran la mateixa relació càrrega-massa, la mobilitat electroforètica de cada proteïna vindrà determinada pel seu pes molecular. El gel actua com un garbell a través del qual han de passar les molècules, les més petites trobaran més fàcilment el camí pels porus del gel i migraran més de pressa cap el pol positiu: la mobilitat és més gran a mida que disminueix el pes molecular de les proteïnes.

Com ja s'ha comentat anteriorment, les proteïnes majoritàries de la llet de vaca són les caseïnes (almenys 4 formes diferents en llet de vaca), la  $\alpha$ -lactalbúmina i la  $\beta$ -lactoglobulina. Les caseïnes, però, en són les proteïnes més abundants.

Un cop s'ha acabat la electroforesis, per tal de visualitzar les proteïnes en el gel, es submergeix aquest en una dissolució de tinció que porta blau de Coomassie, es deixa una hora i es destenyeix amb la dissolució decolorant (de forma que al final del procés només es vegin les proteïnes colorejades).

## Resultats

La figura de baix correspon a un gel en el que s'han carregat 6 mostres: al carril número 1 una barreja de proteïnes estàndard (amb les Mr (masses moleculars relatives) indicades), en els carrils 2, 3 i 4, s'han carregat 40 µG de proteïna de llet sencera, 40 µG de proteïna de llet semidesnatada i 40 µG de proteïna de llet desnatada, respectivament. El carril número 5 porta 40 µG de proteïna del preparat de soja i al carril número 6, s'han carregat 13 µG de β-caseïna pura.



## PROVA PRÀCTICA 2





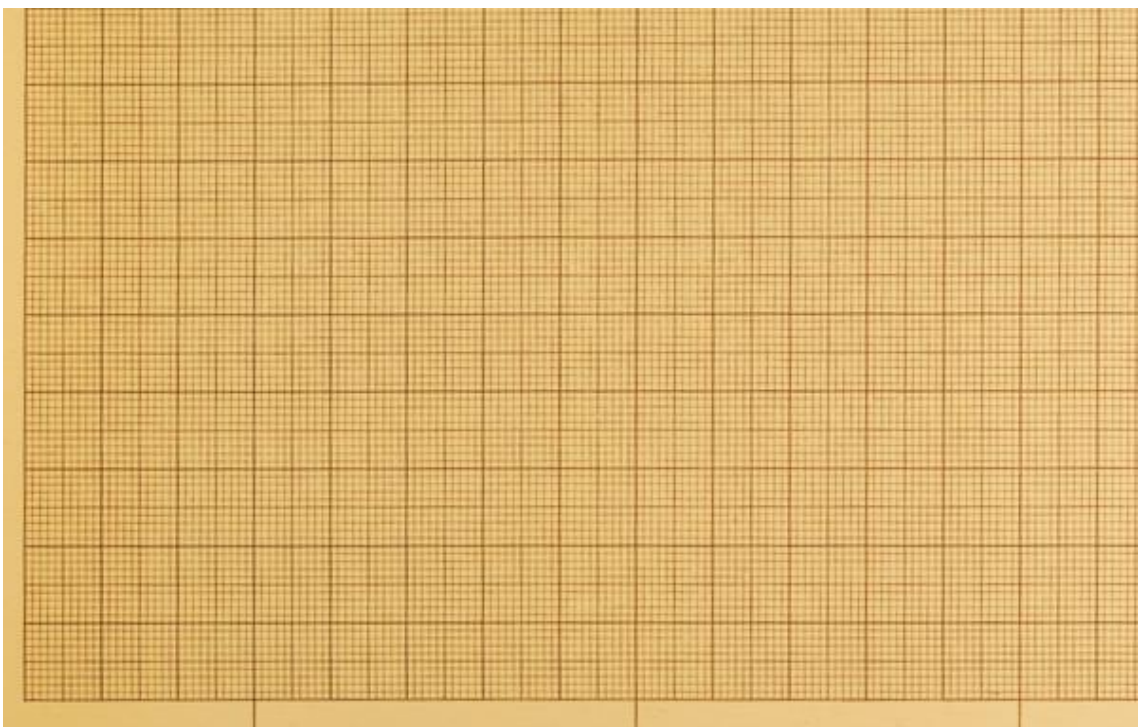
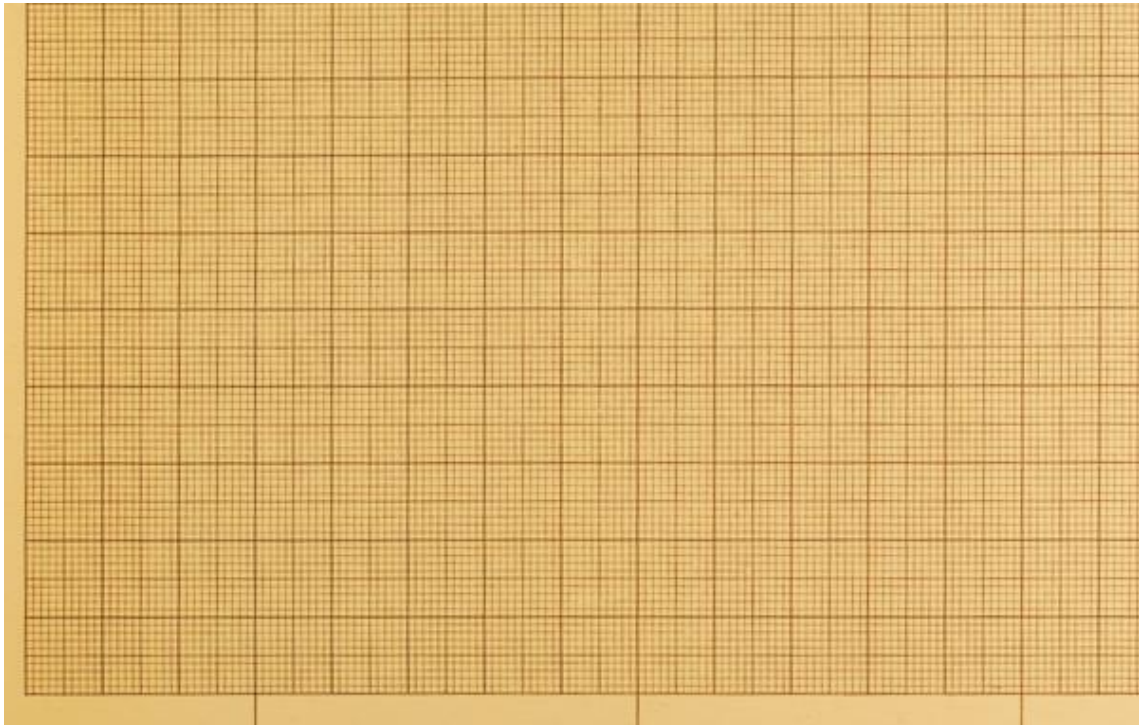
Olimpiada de Biologia  
de Catalunya

COGNOM I NOM \_\_\_\_\_

LLOC EN EL LABORATORI \_\_\_\_\_

## PREGUNTES I QÜESTIONS

1. Quines són les concentracions de proteïna de les mostres assajades de la llet sencera i del preparat de soja?



2. Tenint en compte que les mostres assajades són el resultat de diluir 100X els productes comercials, quins valors haurien de portar les etiquetes de baix?

INGREDIENTS: Llet sencera

INFORMACIÓ NUTRICIONAL / Valor mitjà per 100ml

Valor energètic	62 kcal/260kJ
Proteïnes	→ g
Hidrats de Carboni	4,5 g
Greixos	3,6 g
Calci	120 mg (15%QDR)*

\*QDR: QUANTITAT DIÀRIA RECOMANADA

Preparat de soja

Información nutricional  
valores medios

por 100ml

Valor energético	43 kcal / 178 kJ
Proteínas	→ g
de las cuales	
-proteínas lácteas	0 g
Hidratos de carbono	2,8 g
de las cuales	
-azúcares	2,8 g
-lactosa	0 g
Grasas	1,9 g
de las cuales ácidos grasos	
-saturados	0,3 g
-monoinsaturados	0,4 g
-poliinsaturados	1,2 g
de las cuales	
- ácido linoléico (OMEGA-6)	1,09 g
- ácido alfa-linolénico (OMEGA-3)	0,14 g
-colesterol	0 mg
Fibra alimentaria	0,6 g
Sodio	0,05 g
Calcio	120 mg (15% CDR*)
Vitaminas	
-B2	0,24 mg (15% CDR*)
-B12	0,15 µg (15% CDR*)

**3.** Quina és la Mr (massa molecular relativa) aproximada de la  $\beta$ -caseïna?

**4.** Creus que les diferències entre les llets sencera, semidesnatada i desnatada són degudes al seu contingut proteic? Raona la resposta.

**5.** Creus que el preparat de soja conté  $\beta$ -caseïna? Raona la resposta. Quines són les Mr aproximades de les tres proteïnes majoritàries del preparat de soja?