

# TESI DOCTORAL

Fina Martínez Soler

Nucleomorfogènesi espermàtica i condensació de la cromatina dels Cefalòpodes *Sepia officinalis* i *Octopus vulgaris*.  
*Altres models.*

Juliol, 2007

### **III. MATERIAL I MÈTODES**



## III. MATERIAL I MÈTODES

### III.1 Material Biològic

#### III.1.a) *Descripció de les espècies estudiades.*

Les dues espècies estudiades en aquest apartat d'aquest treball pertanyen al grup dels Cefalòpodes: la Sèpia (*Sepia officinalis*) i el pop (*Octopus vulgaris*). En tots dos models, hem estat sempre interessats en les gònades, concretament gònades masculines ja sigui per a l'estudi de l'espermioquèsi o bé per a la obtenció i processament de cèl·lules espermàtiques.

#### **Els Cefalòpodes**

Els Cefalòpodes són una classe d'invertebrats marins que pertanyen al filum dels Mol·luscs. En aquest grup d'animals, la conquilla (exoesquelet calcari i quitinós al qual l'animal està adherit mitjançant músculs potents) es troba reduïda, ocupant una posició interna o bé ha desaparegut en segons quines espècies.

Els Cefalòpodes tenen cèl·lules pigmentàries (els cromatòfors) sobre la pell, de manera que poden canviar la seva tonalitat i aparença externa en qüestió de segons per mimetitzar-se amb el medi i passar desapercebuts. Aquesta capacitat també la utilitzen entre ells per comunicar-se així per exemple els mascles en època reproductiva adopten també una coloració característica.

Tenen un sistema nerviós complex amb ganglis nerviosos que formen un autèntic cervell, protegit per un crani cartilaginós.

La majoria de Cefalòpodes són de sexes separats i copulen després d'una parada nupcial on el mascle deposita els espermatozous a la femella. Els mascles de moltes de les espècies tenen un o dos braços modificats per a la còpula la forma dels quals varia considerablement. Aquest braç modificat rep el nom d'hectocòtil, i la seva principal funció és la de transferir els espermatozous a la femella. La fecundació en els Cefalòpodes sol ser externa i té lloc en la cavitat del mantell de la femella; algunes espècies però també presenten fecundació interna. Solen fer una sola posta d'ous a la

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

vida, morint després de la posta o eclosió dels ous; encara que això no és sempre estrictament cert, ja que també ens podem trobar espècies com el *Nautilus*, l'*Octopus* i la *Sèpia*, que fan diverses postes en intervals més o menys regulars al llarg de la seva vida.

#### *Sepia officinalis*

La *Sepia* és un mol·lusc Cefalòpode Decàpode, que pertany a l'ordre dels Sèpides (Sepiida). És un exemple de modificació de la conquilla: es troba molt reduïda i se situa a la cara dorsal del cos; dels compartiments originals en queden només petites làmines calcàries. Es caracteritza per tenir vuit braços i dos tentacles (d'aquí el nom de Decàpode).

El seu hàbitat són els mars poc profunds prop del litoral, generalment entre herbes i algues aquàtiques. *Sepia officinalis* és una espècie molt comú en les costes catalanes. És un mol·lusc que té vida nocturna, i s'alimenta principalment de llagostes, crustacis i peixos petits. Pot arribar a mesurar entre 30 i 40cm de llargada i és una espècie de vida curta (viu entre 18-30 mesos), i de creixement ràpid.

#### Comportament sexual de *S.officinalis*

L'època de l'any en què presenten maduresa sexual, és durant la primavera-estiu. Una femella sol posar uns 500 ous aproximadament, que poc després de ser fecundats són depositats entre les algues, i al cap de dos mesos els ous eclosionen en forma de *Sepia* d'un cm de llarg amb costums i comportaments similars als de la *Sepia* adulta. El mascle de *Sepia officinalis* deposita els espermatòfors en el lòbul dorsal de la membrana bucal de la femella, i els espermatozoides viatgen fins a la cavitat de la paret del mantell on s'hi queden ancorats (Tinbergen 1939). És en aquesta cavitat també on quan els òvuls madurs són alliberats es fecunden, essent doncs, una fecundació externa a l'animal.

En aquest treball hem estat en tot moment interessats en l'espermiogènesi de *S. Officinalis*, i també en l'estudi i evolució del grau de maduresa sexual de les gònades masculines. Per això hem estat recollint mostres i fent disseccions al llarg de diferents èpoques de l'any.

#### Recol·lecció de material i dissecció en el laboratori

Per a la dissecció de les *Sèpies*, es va procedir de la manera següent: Es va col·locar en una safata que contenia gel, l'exemplar amb el ventre cara amunt. En el mascle, l'aparell reproductor es troba situat a la part anterior dorsal de l'animal; si la gònada està madura, no és difícil de veure, sol ser gran i més blanca, i de forma arrodonida. Es va procedir fent una fissura per la part ventral fins que l'animal va quedar del tot al descobert. La gònada es troba adjacent a la bossa de tinta, per això amb molta cura de no rebentar la bossa, el primer que vàrem fer va ser retirar-la separant la membrana que la manté unida a l'aparell reproductor. Seguidament, amb cura es va poder procedir més fàcilment a l'aïllament i separació de tot l'aparell reproductor masculí.

#### Descripció de l'aparell reproductor masculí de *Sepia officinalis*.

Com mostra l'esquema de la figura III.1, la gònada es troba connectada a través del conducte deferent amb les glàndules que aporten substàncies per formar els espermatòfors (glàndules espermatofòriques) i amb la bossa de Needham's que és on s'emmagatzemen els espermatòfors ja formats i plens d'espermatozoides. Els espermatòfors són alliberats a través de l'orifici genital.

Es va separar tot l'aparell reproductor de la resta d'estructures i es va col·locar en una placa de petri que contenia una solució isotònica per a la cèl·lula: Sacarosa 0.25M, Tris-HCl 10mM pH 7.4, CaCl<sub>2</sub> 3mM, Mg Cl<sub>2</sub> 5mM i clorur de benzamidià 50mM com inhibidor de la proteòlisi. Procedim separant les diferents parts de l'aparell reproductor: la gònada, l'epidídim (o conducte deferent) i els espermatòfors.

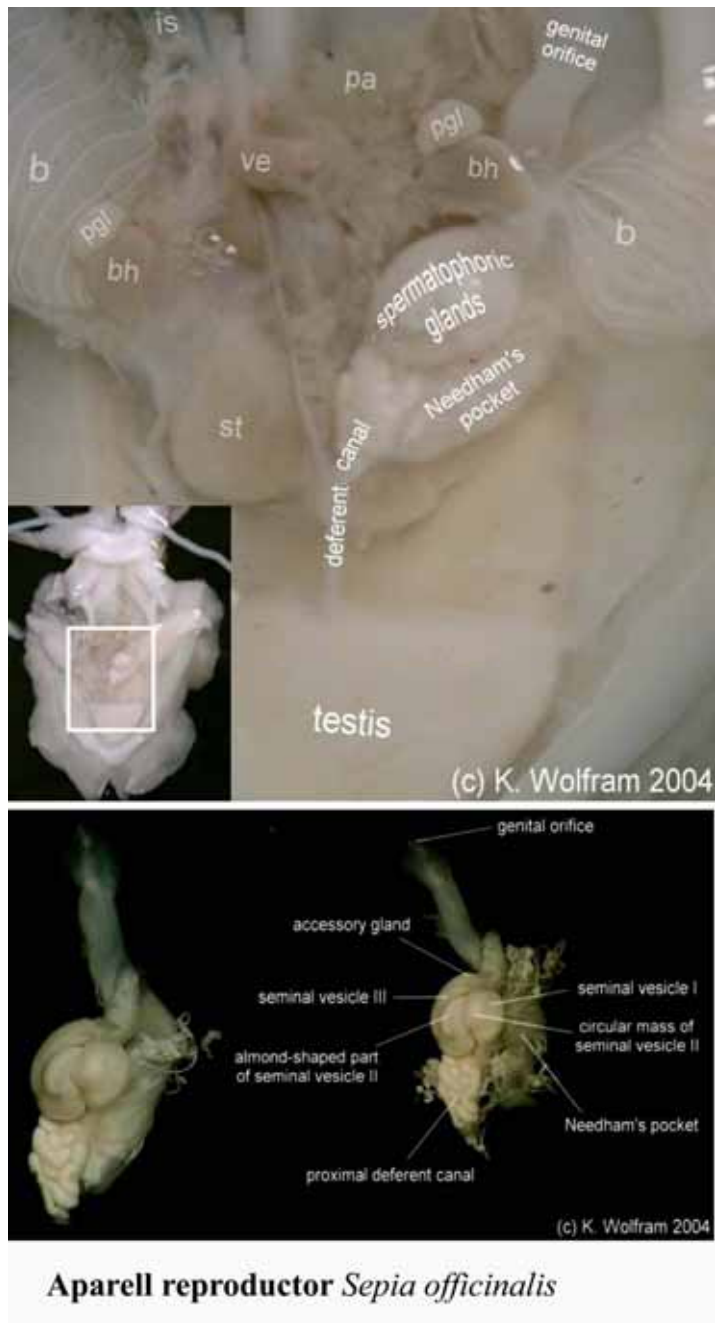
Per a l'anàlisi de proteïnes vàrem guardar les mostres de teixit en aquesta solució isosmòtica amb glicerol al 40% per evitar la congelació i la ruptura d'estructures cel·lulars a -20°C fins al moment de processar-les.

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

**Fig.III.1: Aparell reproductor masculí de *S.officinalis*.** (K. Wolfram, 2004). Esquema de l'aparell reproductor masculí de Sepia una vegada se li ha apartat la bossa de tinta (A) i esquema de les glàndules accessoríes, i deferent (B).

---



#### *Octopus vulgaris*

Els pops (ordre Octòpodes, *Octopoda*), pertanyen a la família dels Octopòdits (*Octopodidae*). Es caracteritzen per tenir 8 braços iguals amb dues fileres de ventoses en cada un d'ells. En el mascle, un d'aquests braços també es modifica per realitzar la funció de transferència dels espermatozòfors durant l'aparellament; rep el nom d'hectocòtil; el grau de modificació de l'hectocòtil és variable, en el cas d'*Octopus vulgaris*, adopta forma de cullera.

Els pops presenten una conquilla (característica dels Cefalòpodes) inexistent . Tenen també tres cors. El pop es tracta d'un Cefalòpode molt intel·ligent, ja que tenen la capacitat de recordar colors i formes diferents durant un període llarg de temps.

El seu hàbitat durant l'hivern sol ser de 30 a 50m de profunditat, però així que arriba la primavera-estiu, època de maduresa sexual i reproducció, pugen més a la superfície i s'instal·len entre escletxes o forats de les roques. Són també espècies de creixement ràpid (el pop pot arribar a pesar fins a 10Kg) però de vida curta: normalment, la femella després de la posta dels ous mor.

#### *Comportament sexual dels pops*

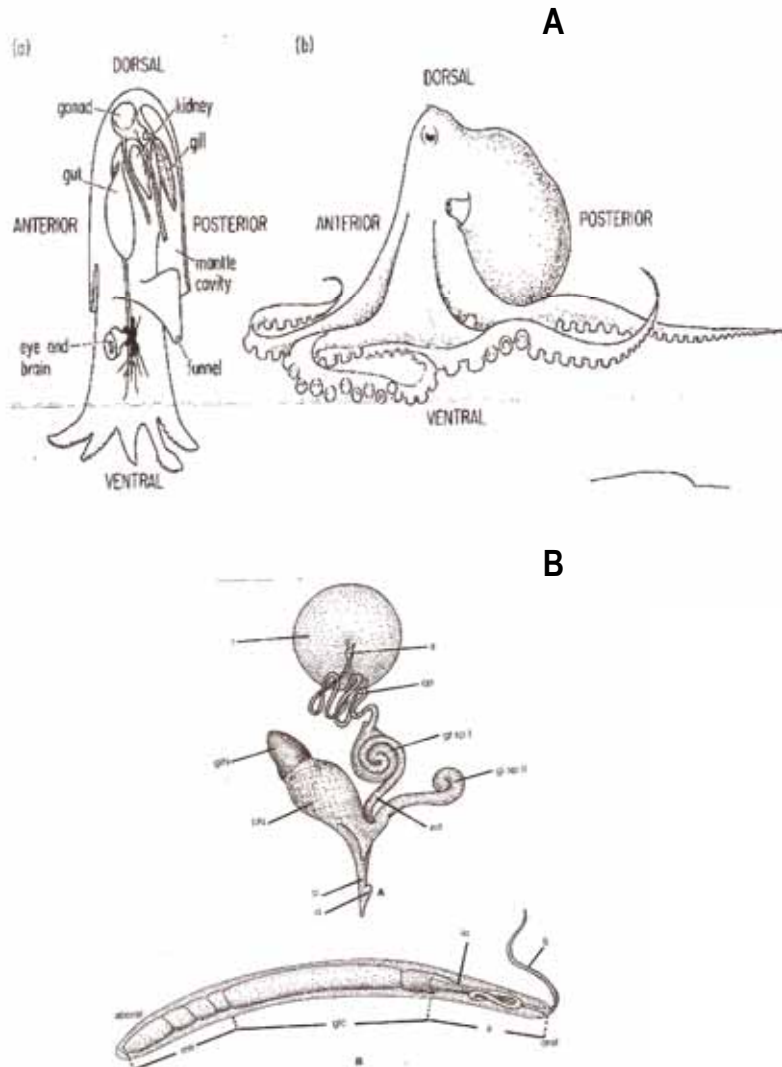
Els pops presenten fecundació interna: durant la còpula, l'hectocòtil rep els espermatozòfors que són alliberats pel sífo o bé els agafa de la bossa de Needham (veure esquema Fig. III.2B) i els inserta en la cavitat del mantell de la femella, (de nou esquema Fig. III.2A) a la paret del mantell prop de l'orifici de l'oviducte. Una vegada els espermatozòfors dins la femella, els espermatozoides que contenen són alliberats a la mateixa paret del mantell de la femella. Quan la femella ja ha rebut l'esperma, si no es troba sexualment madura, aquesta emmagatzema els espermatozoides durant llargs períodes de temps fins que té els oòcits madurs.

Una vegada els ous són fecundats, es recobreixen d'una càpsula protectora i s'expulsen a l'exterior.



### III.MATERIAL I MÈTODES

---



---

**Fig.III.2: Parts del cos d'*Octopus vulgaris*, i parts de l'aparell reproductor masculí. A:** Eixos de simetria de l'*Octopus vulgaris*(b), organització i distribució dels òrgans interns (a). **B:** Dibuix-esquema on s'hi representa (a la part superior) desglossat l'aparell reproductor masculí d'*Octopus vulgaris*, i (a la part inferior), l'estructura de l'espermatòfor. T, testicle; ep, espermiducte proximal; gl sp I, glàndula espermatofòrica I; ed, espermiducte distal; gl sp II, glàndula espermatofòrica II; gN, glàndula de Needham; bN, bossa de Needham; p, penis; a, anus.

---

#### Descripció de l'aparell reproductor masculí d'*Octopus vulgaris*.

En la Fig.III.2B es mostra un esquema de l'aparell reproductor masculí del pop: en la gònada o testicle (t) hi té lloc l'espermatogènesi, els espermatozoides viatgen cap a l'espermiducte proximal (ep) i espermiducte distal (ed) passant per la glàndules espermatofòriques I i II (glsp I i II), les qual aporten les substàncies i materials necessaris per a la formació dels espermatozoides. Els espermatozoides són emmagatzemats en la bossa de Needham (bN) (on alhora també reben substàncies procedents de la glàndula de la mateixa bossa de Needham (glN)), fins al moment de l'ejaculació, moment en què els espermatozoides són alliberats a través del penis (p).

#### Recol·lecció de material i dissecció en el laboratori

En el cas d'*Octopus vulgaris* es va procedir de manera similar a la *Sepia* per a la dissecció de l'aparell reproductor.

Per obtenir el material fresc hem anat al mercat de la Boqueria de Barcelona on els exemplars provenen de la costa Mediterrània Catalana. Vàrem traslladar els exemplars directament al nostre laboratori en bosses isotèrmiques per mantenir-les en fresc, i es va procedir a la dissecció de l'animal. En *Octopus*, les gònades es troben localitzades en la part posterior dorsal de l'animal (Fig.III.2Ab), i per trobar-les sense dificultat el més adient és fer una fissura a part ventral. Un mascle adult té les gònades molt desenvolupades d'aspecte blanc i forma rodona, les qual són de fàcil identificació. L'extirpació de tot l'aparell reproductor no suposa molta dificultat, ja que les membranes i la capa de greix que el recobreixen el mantenen força aïllat de la resta dels òrgans.

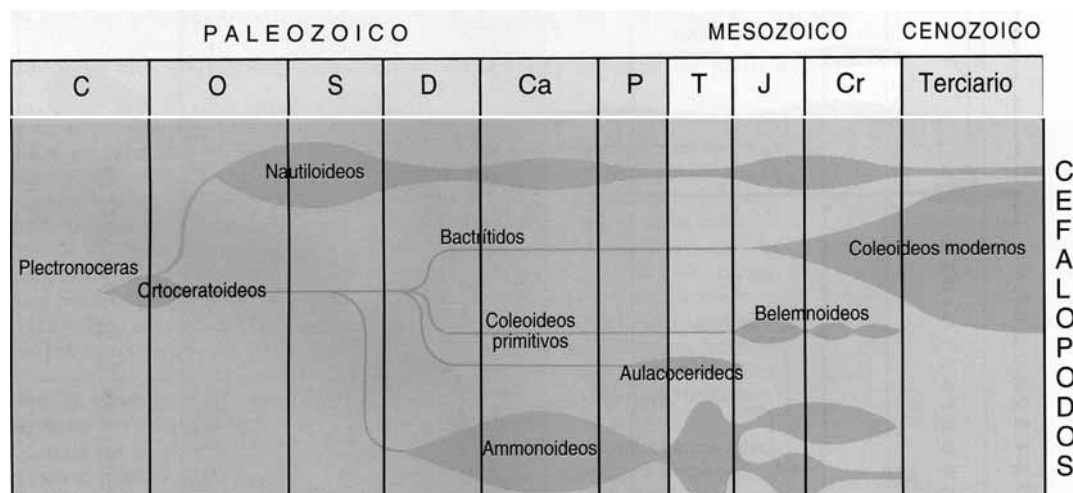
Una vegada vàrem obtenir tot l'aparell reproductor, el vàrem posar també en una placa de petri amb solució isosmòtica (Sacarosa 0.25M, Tris-HCl 10mM pH 7.4, CaCl<sub>2</sub> 3mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM i clorur de benzamidina 50mM), i es va procedir a separar la gònada, el conducte deferent i els espermatozoides.

Les diferents parts de l'aparell reproductor es van homogeneïtzar amb la mateixa solució isosmòtica en el *Dounce* i es vàrem guardar a -20°C amb DMSO al 40% fins la seva utilització.

### III.MATERIAL I MÈTODES

#### III.1.b.- Posició filogenètica de les espècies estudiades

La següent figura, (Fig.III.3) representa un esquema de l'origen i evolució dels Cefalòpodes. (Investigación y Ciencia, abril, 2006). La Classe Cefalòpodes com mostra la figura, està representada actualment per dues Subclasses: els Nautiloïdes (*Nautiloidea*) i els Coleoïdes (*Coleoidea*). La SCI. Nautiloïdes es troba actualment representada per una sola família, els Nautilíds (*Nautilida*); es tracta d'una Subclasse que el seu l'origen és molt antic en comparació amb els Coleoïdes, data al Paleozoic (Ordovícic). Els Coleoïdes moderns malgrat no saber amb exactitud la data, es troba entre al Triàsic superior i el Juràsic inferior.



**Fig.III.3: Esquema de la possible ramificació dels mol·luscs, Investigación y Ciencia, abril, 2006.**

Dins la Subclasse dels Coleoïdes, segons la classificació en la Història Natural dels Països Catalans, hi ha els següents ordres:

- O. Sèpids (*Sepiida*) (sèpies)
- O. Sepiòlids (*Sepiolida*) (sepioles)
- O. Tèutids (*Teuthida*) (calamars)
- O. Vampiriforms (*Vampiriforma*)
- O. Octòpodes (*Octopoda*) (pops)

*Sepia officinalis* pertany a l'ordre *Sepiida*, Fam. *Sepiidae*

*Octopus vulgaris*, pertany a l'ordre *Octopoda*, S.O. *Incirrata*, Fam. *Octopodidae*

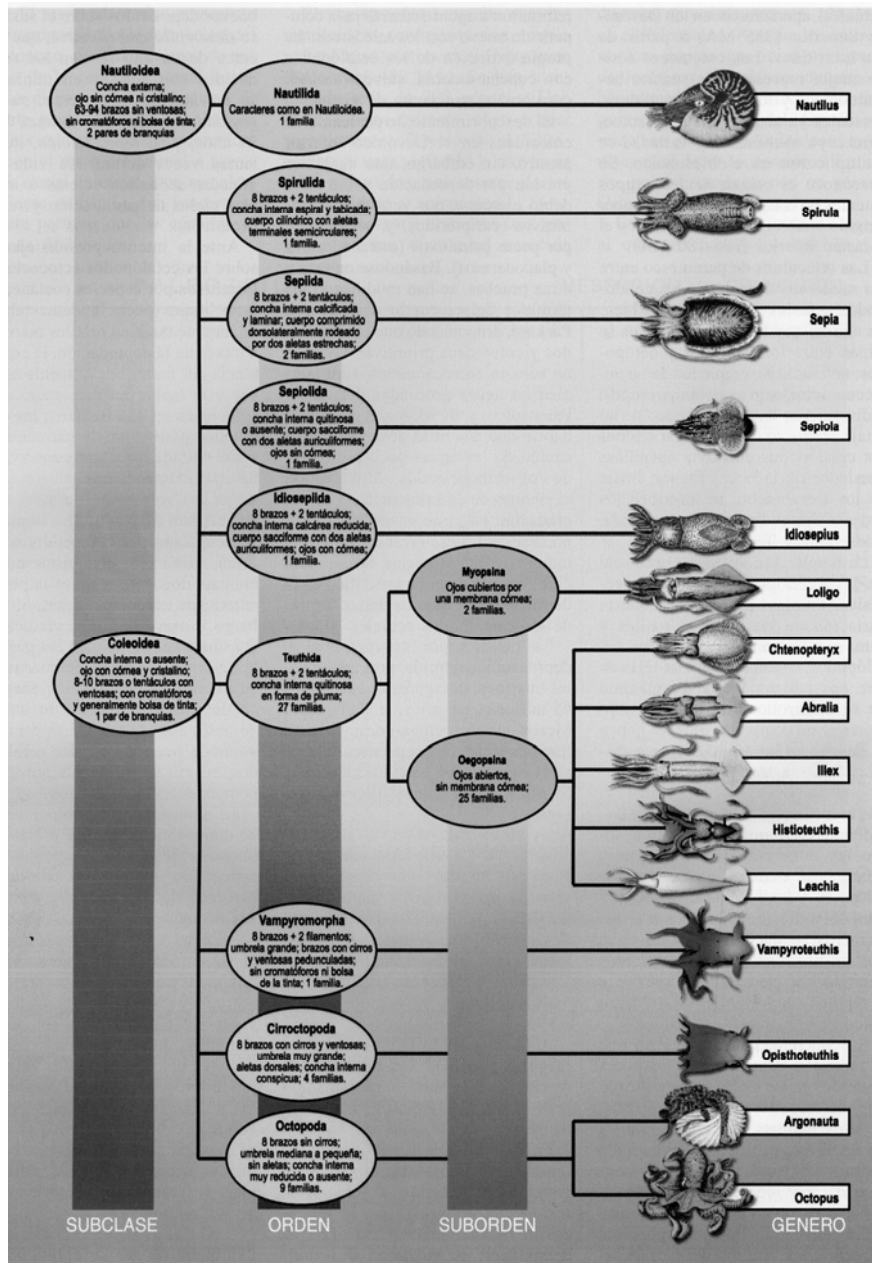


Fig.III.4: Classificació actual dels Cefalòpodes, on es destaquen alguns dels gèneres més importants. (Investigación y Ciencia, abril, 2006).

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

Les relacions filogenètiques entre els diferents ordres de la S.Cl. Coleoides com hem vist en la Introducció d'aquest treball ha estat des de fa temps motiu d'estudi de varis autors, i sovint no totes coincideixen a la perfecció. La següent figura, representa una de les versions més actualitzades de la línia evolutiva dels Coleoides, extret de Investigación i Ciència, abril, 2006.

#### III.2.- Obtenció de nuclis espermatogènics i espermatozoides: preparació de les mostres.

El procés d'obtenció de nuclis espermàtics a partir de gònades, epidídimos o espermatòfors, consisteix bàsicament en un seguit d'homogenitzacions amb tampons que són isosmòtics per a la cèl·lula i que es troben a pHs fisiològics, i centrifugacions successives per tal d'anar eliminat les restes cel·lulars de la mostra i enriquir-la gradualment en nuclis de cèl·lules espermàtiques. El mètode utilitzat en aquest treball per a l'aïllament de nuclis espermàtics (ja sigui de la gònada, epidídim, o bé espermatòfors) de *Sepia officinalis* i d'*Octopus vulgaris* es basa en el mètode original de Chaveau et al.(1956), autors que descriuen per primera vegada la utilització de solucions de sacarosa per a la purificació de nuclis.

Els tampons utilitzats són els següents:

##### **Solució A.** Sacarosa 0.25M

Tris-HCl 10mM pH 7.4  
MgCl<sub>2</sub> 3mM  
CaCl<sub>2</sub> 5mM  
Espermina 0.1mM  
Espermidina 0.25mM  
Clorur de Benzamidina 50mM (en fresc).

##### **Solució B:** Solució A

Tritó X-100 (0.5% w/v) (Dissolvent de lípids).  
Clorur de Benzamidina 50mM(en fresc)

##### **Solució C:** Tris-HCl 1mM pH 8

EDTA 1mM  
Clorur de Benzamidina 50mM (en fresc)

---

**Solució D:** Tris-HCl 10mM pH 7.4

Clorur de Benzamidina 50mM (en fresc).

L'experiment el realitzarem sempre en fred a 4°C, perquè el fred també actua com a inhibidor de la proteòlisi, i en els acrosomes hi ha molts enzims i proteases que ens podrien degradar la mostra; per això posem sempre les alíquotes després de cada centrifugat en gel a més a més de posar en cada solució clorur de benzamidina (50mM) (en fresc, ja que amb el temps perd l'activitat) que també actua com a inhibidor de la proteòlisi (Chiva et al. 1988)..

#### *Sepia officinalis*

La mostra de partida, en el cas de *Sèpia*, ha estat principalment gònada a partir de la qual hem obtingut els diferents estadis de cèl·lules espermatogèniques que s'hi troben, però en algunes ocasions quan hem volgut comparar el contingut proteic de la gònada amb l'epidídim o bé els espermatòfors també hem fet la obtenció de nuclis de la mateixa manera que amb la gònada. La presentem a continuació.

- i.* En primer lloc, (si no partim de material recent disseccionat i fresc) traiem la mostra del congelador i la deixem descongelar una estona a temperatura ambient. Com que les mostres guardades contenen glicerol al 40%, el primer que farem serà un rentat amb Sol. A per tal d'eliminar el crioprotector. Per als rentats i homogenitzacions utilitzem habitualment el *Dounce*, i fem en cada pas 5 passades. (en aquesta primera homogenització, a part d'eliminar el glicerol, també separem cap cua i acrosoma de les espermàtides que es troben en la mostra).
- ii.* Filtrem la mostra a través de 2 capes de gassa de manera que si la mostra conté alguns grumolls o agregats, aquesta siguin eliminats.
- iii.* Centrifuguem la mostra a 8.000rpm durant 10min. a 4°C.
- iv.* Eliminem el sobrenedant (cues i acrosomes) i homogenitzem de nou amb el *Dounce* el sediment (nuclis espermiogènics i encara algunes restes cel·lulars.) amb Sol A.

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

- v. Centrifuguem la mostra a 5.000rpm (reduïm la velocitat de centrifugació degut a què ara la mostra sense glicerol, és menys viscosa), durant 10 min. a 4°C.
- vi. Descartem el sobrenedant i amb el sediment que ens queda fem una tercera homogenització amb la Sol. B. La solució B a més a més del que conté la Solució A, porta un 0.5% (w/v) del detergent no iònic Tritó X-100. L'efecte que fa el detergent en la nostra mostra és la de dissoldre lípids, en concret les membranes cel·lulars de les espermatides, d'aquesta manera les cèl·lules es troben més accessibles als tractament que els farem a continuació. Homogenitzem bé la mostra amb el *Dounce* (5 passades) fins que la suspensió adopti un aspecte homogeni.

*Nota: En cada pas, avanç de posar la mostra a centrifugar, fem controls al microscopi òptic de la mostra per tal de veure si encara queden restes de cues i 7o acrosomes en la mostra; si és el cas es podem eliminar fent uns quants (2 ò 3) rentats més amb la Sol. B*

- vii. Centrifuguem de nou a 5.000rpm. durant 10 min. a 4°C, i descartem el sobrenedant.
- viii. De nou resuspenem i homogenitzem el sediment amb la sol. C. L'EDTA (que es troba en la sol. C) és un quelant de ions divalents com poden ser el Ca<sup>++</sup> o bé el Mg<sup>++</sup>; en l'espermatozoide, sovint aquests ions es troben entre les fibres de cromatina, fent que es mantinguin unides entre elles i estabilitzant-ne l'estructura. Si aquests ions són eliminats del nucli, de nou la cromatina espermàtica es troba més accessible a les solucions d'extracció de proteïnes nuclears a les que més endavant serà sotmesa.
- ix. centrifuguem a 5.000rpm la mostra durant 10 min. a 4°C. i descartem el sobrenedant.
- x. De nou homogenitzem el sediment amb la Sol. D.
- xi. Centrifuguem a 5.000rpm. durant 10min. a 4°C i descartem el sobrenedant.

El sediment obtingut d'aquestes successives centrifugacions, es tracta d'un sediment enriquit en nuclis espermàtics de les diferents cèl·lules espermiogèniques de la mostra.

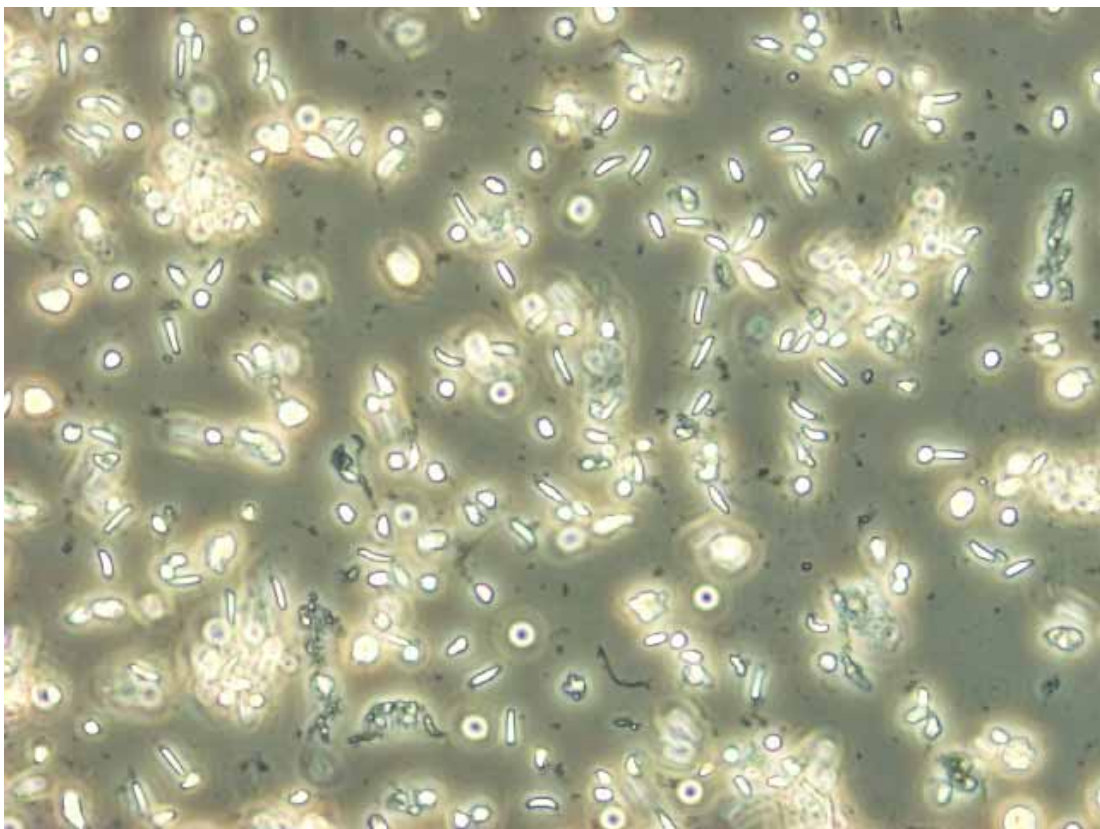
### III.MATERIAL I MÈTODES

---

La Fig.III.5 mostra una fotografia representativa de nuclis espermàtics purificats a partir de la gònada de *Sepia*.

**Fig.III.5: Nuclis espermiogènics purs d'una gònada de *Sepia* en estat de maduresa intermedia.**

---



Aquests passos descrits per a la obtenció de nuclis espermàtics de *Sepia*, són passos que se solen seguir (amb algunes variacions) de manera general per a la obtenció de nuclis espermiogènics per a la majoria d'espècies, a continuació presentem el procediment en forma d'esquema per tal de fer-lo més entenedor

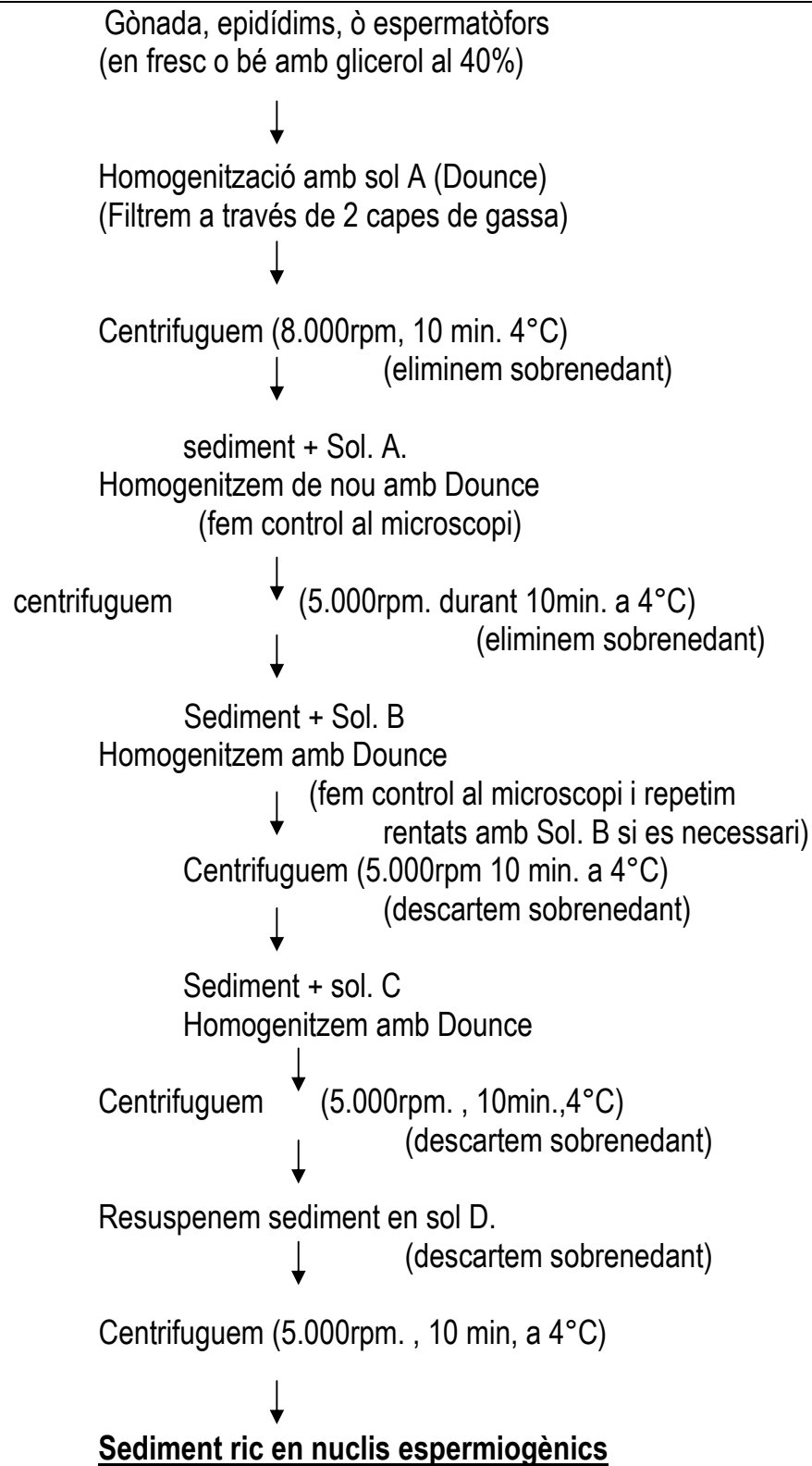
**Fig.III.6 (pàgina següent): Esquema d'obtenció de nuclis espermàtics de *Sepia officinalis***

---



### III.MATERIAL I MÈTODES

---



#### *Octopus vulgaris*

En el cas d'*Octopus vulgaris*, la obtenció de nuclis es va fer igual que en *Sepia officinalis* des dels passos *i-vii*, després amb el sediment obtingut en el pas *vi* el vàrem resuspendre i homogeneïtzar amb la Sol. B +  $\beta$ -mercaptoetanol fins a l'1% (v/v), es va centrifugar en les mateixes condicions que fins al moment, i vàrem seguir el protocol des del pas *viii* fins al final. El  $\beta$ -mercaptoetanol és un agent reductor que aquí principalment evita la formació de ponts disofre deixant els grups -SH lliures.

#### **III.2.1.- Inflaments de nuclis espermàtics d'*Octopus vulgaris***

En el cas d'*Octopus*, per tal d'esbrinar una mica més sobre les propietats del nucli espermàtic es varen fer uns tractaments amb solucions salines a diferents concentracions i diferents nivells de reducció. (veure resultats *O.vulgaris* IV.2.2d), i en cada pas un control al microscopi de fluorescència per a veure l'estat dels espermatozoides.

- a) Obtenció de nuclis espermàtics (tal i com hem descrit en apartat 2) a partir d'espermatòfors en dues alíquotes iguals. (a i b).
- b) Resuspenem i homogenitzem l'alíquota "a" amb NaCl 1M i l'alíquota "b" amb NaCl 2M .
- c) Centrifuguem 5.000 rpm durant 10 min. a 4°C, i recuperem el sediment i el sobrenedant de les dues alíquotes.

En el sobrenedant hi ha les proteïnes nuclears bàsiques extretes per la sal, i en el sediment hi queden els nuclis espermàtics.

Per tal de veure les proteïnes extretes per a la sal i les que queden encara en els nuclis dels espermatozoides es va procedir a l'extracció de protamines amb HCl 0.4N dels sediments i sobrenedants (veure apt. 3.1.2 Material i mètodes).

I per poder visualitzar els nuclis dels espermatozoides tractats amb la sal es va procedir al marcatge amb Hoechst d'una petita porció dels sediments

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

*Nota:* En els experiments que hem tractat els nuclis a diferent grau de reducció amb  $\beta$ -mercaptoetanol, simplement en el pas de reducció de nuclis hem afegit l'agent reductor fins el percentatge indicat; i en el cas de fer un tractament oxidatiu hem substituït el  $\beta$ -mercaptoetanol per  $H_2O_2$  al ----%

#### III.3.- Anàlisi de proteïnes

##### III.3.1.- Extracció de proteïnes bàsiques de nuclis espermiogènics (SNBPs).

Les histones i les protamines que es troben en el nucli espermàtic són proteïnes més o menys bàsiques (les protamines més que les histones), que es podem extreure del nucli, solubilitzant-les en àcids diluïts i precipitant-les posteriorment.

Així, d'una mostra ( ja sigui gònada, epidídim o bé espermatòfors) de la qual n'hem obtingut els nuclis purs podem procedir a la solubilització de les proteïnes nuclears bàsiques contingudes en el nucli de les cèl·lules.

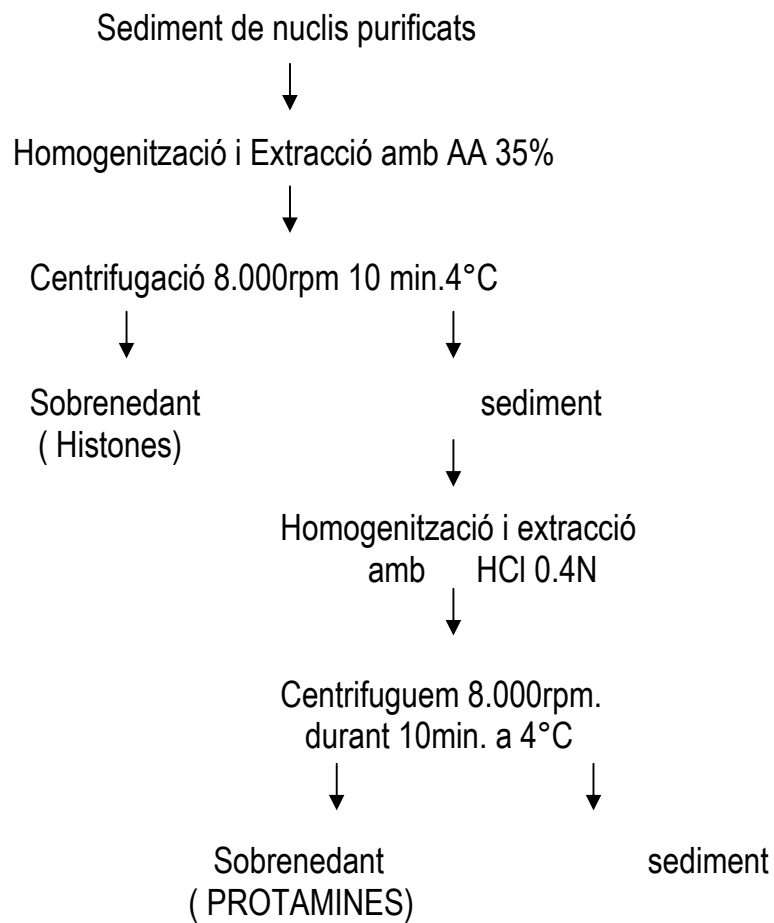
##### III.3.1.1.- Extracció d' histones

L'àcid acètic al 35% (v/v) solubilitza i extreu les histones del nucli però no les protamines ni precursors (Subirana et al. 1973).

D'aquesta manera, en les ocasions en què ens interressi fer una extracció molt pura de protamines, primer farem una extracció prèvia les histones amb àcid acètic al 35% per obtenir després una fracció molt més pura de les protamines. El procediment és el següent: resuspenem el sediment obtingut de la purificació de nuclis i homogenitzem bé (amb el *Dounce*) amb 3-4 volums d'àcid acètic al 35%. Centrifuguem la mostra a 8.000rpm durant 10min. a 4°C . En el sobrenedant hi tenim les histones (i proteïnes similars) solubilitzades en àcid acètic al 35%, i en el sediment hi queden els nuclis espermàtics. El procés et pot repetir una segona vegada per tal de fer una millor extracció de les histones. El següent pas consisteix en fer una extracció global de les proteïnes bàsiques que queden en el nucli amb HCl 0.4N (apt. 3.1.2) i la mostra obtinguda és més neta i rica en protamines. La fig.III.7 esquematitza aquest procediment.

En el nostre cas vàrem seguir aquest protocol d'extracció de SNBPs per a la obtenció i purificació del precursor de la protamina de la *Sepia* per la posterior gènesi de l'anticòs contra el precursor de la protamina (Veure Material i mètodes apt. III.3.9.1)

---



---

**Fig.III.7: Protocol d'extracció de protamines dels nucli espermàtics, eliminant prèviament part de les histones presents en les nuclis, per tal d'obtenir un fracció més pura de les protamines.**

---

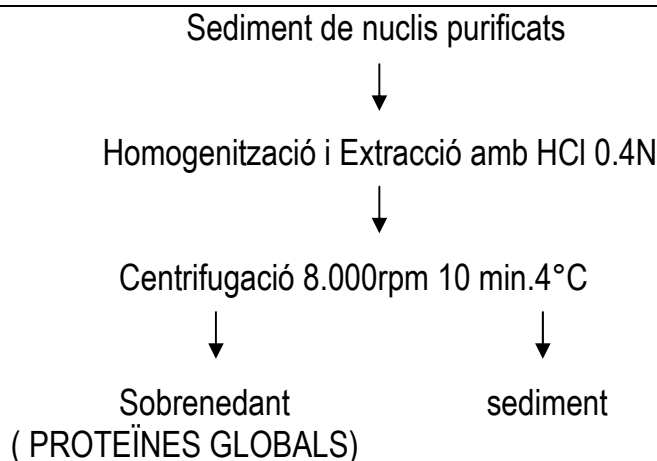
### III.MATERIAL I MÈTODES

---

#### III.3.1.2.- Extracció de proteïnes bàsiques amb HCl 0.4N

El mètode més freqüent que hem utilitzat per a la solubilització de les proteïnes nuclears bàsiques (histones i protamines), ha estat una fer una homogenització de la mostra amb HCl 0.4N.

Així al sediment de nuclis purificats s'hi afegeixen de 3-4 volums d'HCl 0.4N homogenitzem bé amb el Dounce, i centrifuguem la mostra a 8.000rpm 10min. a 4°C. En el sobrenedant hi ha les proteïnes bàsiques totals solubilitzades en l'àcid. (v. Fig.III---B)



**Fig.III.8: Extracció directe amb HCl 0,4N de les proteïnes bàsiques nuclears.**

---

Algunes protamines de certes espècies, tenen un elevat contingut de cisteïna, com és el cas dels condrictis (Bols i Kasinsky, 1976; Gusse et al., 1983; Saperas et al.,1993) i també dels mamífers (Oliva i Dixon, 1991). Els residus -SH de cisteïna poden reduir-se i formar ponts disofre (S-S) intra o bé intermolecularment. Aquests ponts impedeixen que en el moment de l'extracció de les protamines amb HCl 0.4N aquestes es solubilitzin; és necessari fer una reducció prèvia a l'extracció, de manera que els pont disofre es trenquen (-SH+HS-) i les protamines es poden solubilitzar.

---

#### III.3.2.-Precipitació de proteïnes

Fins ara tots els passos descrits d'anàlisi de proteïnes ens han conduït a la obtenció de proteïnes nuclears que es troben solubilitzades en un medi líquid (àcid). El que cal a continuació és utilitzar un mètode que precipiti les proteïnes i que les permeti recuperar per centrifugació.

Els mètodes més utilitzats en aquest treball han estat principalment dos:

##### III.3.2.1. Precipitació amb acetona

Els sobrenedants obtinguts de les homogenitzacions tant amb àcid acètic al 35% com amb l'HCl 0.4N contenen les proteïnes dissoltes. Aquestes proteïnes es poden precipitar afegint 6 volums d'acetona freda (guardada a  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Immediatament, a l'afegir l'acetona freda, la mostra adopta una coloració tèrbola i blanquinosa i si el sobrenedant conté molta quantitat de proteïna dissolta, el precipitat és blanc i molt evident. Deixarem les proteïnes precipitant durant aproximadament una hora a  $-20^{\circ}\text{C}$ . També si és necessari per qüestió de temps, les proteïnes es poden quedar en acetona durant tota la nit.

*Nota:* En aquells casos en què l'extracció de proteïnes s'ha fet amb solucions salines concentrades, és necessari primer de tot dialitzar el sobrenedant en front d'aigua deslligada per evitar que precipiti també la sal juntament amb la proteïna quan afegeixes l'acetona. Després al sobrenedant dialitzat avanç de tirar-l'hi els 6 volums d'acetona se l'hi afegeix HCl fins a 0.1N perquè la precipitació amb acetona requereix un medi mínimament àcid.

Després d'haver precipitat les proteïnes a  $-20^{\circ}\text{C}$ , centrifuguem la mostra a 5.000rpm durant 10 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ ; retirem el sobrenedant amb cura de no perdre el sediment, ja que sovint el sediment en acetona es desprèn amb facilitat del tub. Seguidament rentem (2 o 3 vegades) el sediment amb una solució que conté acetona /HCl 0.1N a una proporció 6:1 respectivament. I centrifuguem cada vegada a les mateixes condicions per recuperar el sediment. Finalment, fem un últim rentat amb acetona pura (a temperatura ambient) per tal d'eliminar les restes d'HCl que quedin en la mostra. Centrifuguem de nou el sediment (que conté les proteïnes precipitades i rentades) l'assequem a l'*Speed vac* o bé en una bomba de buit. (v.ap.3.3)

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

#### III.3.2.2. Precipitació amb àcid tricloracètic (TCA)

L'àcid tricloracètic també permet precipitar les proteïnes que es troben dissoltes en els sobrenedants de les extraccions. El TCA té la propietat de fer precipitar les proteïnes bàsiques de manera diferencial segons la concentració a la que es troba: així, si utilitzem una concentració de TCA al 5% precipiten només les histones del nucleosoma, mentre que la histona H1 (i similars) es queden solubles en el sobrenedant, en canvi, si utilitzem una concentració de TCA entre 20 i 25% precipiten totes les proteïnes bàsiques (Platz i Meistrich,1997).

Així també podem precipitar les proteïnes dels nostres sediments afegint àcid tricloracètic fins al 20% (v/v), deixem en gel 5min. i centrifuguem la mostra a 5.000rpm. durant 10min. a 4°C. El sediment, que conté les proteïnes precipitades es renta ( 2 o 3 vegades) amb etanol (ja que si fem els rentats amb acetona les proteïnes adopten una textura com de goma similar a un xiclet). Finalment després de l'últim rentat, assequem les proteïnes igual que l'apartat anterior o bé a l'*Speed vac* o en una bomba de buit.

*Nota:* La precipitació amb acetona o TCA té els seus avantatges i inconvenients: Per una banda la precipitació amb acetona és una precipitació ràpida que permet veure les proteïnes fàcilment ja que adopten una tonalitat molt blanca, però per l'altra el fet de precipitar amb sis volums d'acetona, implica haver de treballar amb volums importants.

En aquest aspecte la precipitació amb TCA és més ràpida ja que permet treballar amb quantitats de volums més petits però per contrapartida el precipitat que s'obté costa més de veure i les proteïnes s'enganxen molt més a les parets dels tubs.

### III.3.3 Assecat de proteïnes.

#### Bomba de buit

Finalment per tal d'eliminar l'acetona (o etanol) que pugui quedar en els sediments de l'últim rentat, s'utilitza un dessecador connectat en una bomba de buit fins que veiem que a la mostra ja no hi queden restes d'acetona o etanol. (uns 10-15min, aproximadament).

### III.3.4 Concentració de proteïnes en dissolució

#### III.3.4.1 *Speed vac*

Aquest aparell serveix per concentrar una mostra mitjançant l'evaporació del dissolvent fins a arribar a un volum desitjat. Es tracta d'una micròfuga que està connectada a una bomba de buit i que treballa a baixa velocitat. Tambés es pot regular la temperatura a la qual treballa, de manera que els dissolvent es pot dissoldre més o menys ràpid. Cal tenir present que amb aquest mètode es podem concentrar a part de les proteïnes presents en la dissolució també les sals i altres components que hi siguin presents. En aquest casos on la concentració de sal sigui significativa es recomana primer dialitzar la mostra en front d'aigua destil·lada i després concentrar-la.

També podem utilitzar l'*Speed vac* de manera alternativament a la bomba de buit per assecar les proteïnes que han estat precipitades i rentades o bé amb acetona o TCA al 20%.

#### III.3.4.2 Liofilització

Un segon mètode per concentrar les proteïnes és la liofilització, que consisteix en congelar la dissolució (en el nostre cas els sobrenedants amb les proteïnes dissoltes) amb nitrogen líquid i després passar la mostra congelada directament a gas (sublimació) en condicions de pressió molt baixa. Generalment, és un mètode que s'utilitza quan es treballa amb volums importants i s'obté directament pols de proteïna fent que les pèrdues de mostra siguin gairebé nul·les. Després amb la pols obtinguda es pot resuspendre amb el volum de dissolvent que més convingui.



### III.MATERIAL I MÈTODES

---

#### III.3.5. Purificació de proteïnes per mètodes cromatogràfics.

##### III.3.5.1. Cromatografia líquida d'alta resolució en fase reversa (HPLC)

Un mètode per separar proteïnes i pèptids a través de tècniques cromatogràfiques, és l'HPLC (Cromatografia líquida d'alta resolució en fase reversa). Aquest mètode està basant en la hidrofobicitat de les proteïnes respecte una matriu apolar a la qual se li aplica un gradient, de manera que les proteïnes hidrofíliques s'elueixin primer (en el nostre tipus de mostres protamines i precursors) i després les proteïnes més hidrofòbiques (les histones).

El fet que s'anomeni "fase reversa" indica el fet d'utilitzar un sistema al rebés respecte la metodologia convencional on les cromatografies es desenvolupen en una fase estacionària relativament polar, en canvi en l'HPLC, la fase estacionària és essencialment apolar i la fase mòbil és més polar. Aquest terme de "fase reversa" va ser primer introduït per Howard i Martin, (1950).

La fase estacionària està constituïda per partícules esfèriques de sílice a les que s'hi uneixen covalentment grups silanoalquils originant d'aquesta manera una superfície hidrofòbica. Els grups alquil poden ser de diferent nombre de carbonis, sent els més corrents els de tipus C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub> i C<sub>18</sub>.

Els tampons d'elució utilitzats en HPLC de fase reversa de proteïnes i pèptids, consisteixen en un agent contra ió i un gradient creixent d'un dissolvent orgànic per provocar l'elució de la mostra, i s'apliquen a una pressió elevada. L'agent contra ió més freqüentment utilitzat és l'àcid trifluoroacètic (TFA) al 0.05-0.2%, mentre que l'acetonitril és la fase orgànica més comuna, ja que dona pics més ben definits i millor resolució que cap altre dissolvent orgànic. L'etanol i l'isopropanol poden ser utilitzats sol o en combinació per eluir proteïnes més hidrofòbiques.

L'ús d'un contra ió suposa un medi de neutralització que permet la separació de molècules altament polars o compostos iònics. Els polipèptids s'adhereixen a la superfície hidrofòbica i es desadhereixen quan s'arriba a una concentració específica i crítica del dissolvent orgànic. D'aquesta manera les molècules més hidrofòbiques, requeriran altres concentracions de dissolvent orgànic per eluir-se, mentre que les

més hidrofíliques s'eluiran més de pressa. D'altra banda la longitud de la cadena de carbonis també influeix en el temps de retenció. En principi, quan la longitud de les cadenes alquil lligades a la matriu augmenta, augmenta també la retenció dels compostos. En general, es recomanen columnes de tipus C<sub>4</sub> per a la separació de proteïnes i pèptids de més de 3.500-5.000Da i per polipèptids molt hidrofòbies de qualsevol mida, mentre que les C<sub>18</sub> es recomanen per pesos moleculars menors de 3.000-5.000 Da.

El sistema i columnes d'HPLC utilitzat en aquest treball ja estat:

- Columnes Vydac C<sub>4</sub> i C<sub>18</sub> acoblades a un sistema de bombes LKB i treballant amb el sistema GOLD, amb un detector d'absorbància de 230nm. Aquest sistema s'ha utilitzat per la separació de les protamines, precursors de les protamines, histones i pèptids al laboratori del Dr. Juan Ausió al Departament de Bioquímica i Microbiologia de la Universitat de Victoria, Canadà.

#### III.3.6. Mètodes electroforètics

L'electroforesi és una de les tècniques més utilitzades en el cap de la biologia molecular. És un mètode per separar molècules, basat en la mobilitat diferencial en un camp elèctric degut a la seva relació càrrega/massa i a la seva conformació molecular, en la que s'utilitza un gel d'acrilamida com a matriu de suport. La separació de les proteïnes de la mostra depèn de la relació massa càrrega i de la seva interacció amb l'estructura porosa del gel.

Els tipus d'electroforesi que hem utilitzat en aquest treball per a l'estudi de protamines i histones dels nuclis espermàtics són el següents:

##### III.3.6.1. Gels de poliacrilamida /àcid acètic/ urea (GPAU)

Les electroforesi de poliacrilamida/acètic/urea separen les proteïnes fonamentalment segons la seva càrrega. Ens permet separar proteïnes bàsiques com les protamines, les quals no entren en gels d'SDS.

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

La poliacrilamida actua com a medi de suport, establint una malla plàstica formada per llargues fibres d'acrilamida entrecreuades per ponts de bisacrilamida (N'N'-metilen-bisacrilamida). La presència d'àcid acètic confereix un pH àcid al medi, de tal manera que les proteïnes queden carregades de forma positiva; així doncs a l'inversa que en els gels d'SDS, la orientació dels electrodes en la font d'electroforesi serà de positiu a negatiu. La urea, agent desnaturalitzant, elimina les interaccions entre les proteïnes i afavoreix la seva migració en el gel. Com a catalitzador de la reacció de polimerització del gel, s'utilitza aigua oxigenada al 30% (v/v).

La mida del porus del gel, i per tant la capacitat de separar les diferents proteïnes, ve determinada tant per la concentració de la mostra com per la relació acrilamida/bisacrilamida. Concentracions més altes d'acrilamida estableixen el gel porus de menor tamany

La mida del porus del gel depèn de la concentració dels monòmers d'acrilamida i de la relació acrilamida/bisacrilamida. Concentracions elevades d'acrilamida condueixen a un porus més petit, però els efectes de la concentració d'agent entrecreudador són més complicats. Donada una concentració d'acrilamida, la mida mínima de porus s'aconsegueix amb una concentració de bisacrilamida el voltant del 5% de la concentració del monòmer. A concentracions superiors de l'agent entrecreudador es formen porus de major tamany.

Els gels que s'han fet en aquest treball es basen en el mètode de Hurley (1977), el qual és una modificació de Panyim i Chalkley (1969) en que es substitueixen el PSA i el TEMED per tiourea (fins el 0.09%) i  $H_2 O_2$  (fins el 0.002%), per no fer pre-electroforesi i reduir el temps de polimerització.

Els GPAU utilitzats en aquest treball per separar protamines i histones, han estat del 15% d'acrilamida i 6.25M d'urea.  
La composició del gel és la següent:

**Taula III.1: Solucions i quantitats necessàries per un gel GPAU 6.25M urea/15% acrilamida d' 1.5mm de gruix.**

SOLUCIONS	2ML	30ML	60ML
Acri.30%/bis0.2%	6ml	15ml	30ml
Àcid acètic 43,2%	1.5ml	3.75ml	7.5ml
Urea	4.5gr	11.25gr	22.5gr
Tiourea	15mg	26.3mg	52.5mg
H <sub>2</sub> O destil·lada fins a 60ml	12ml	30ml	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	67.5µl	168.75µl	337.5µl

Les mostres a carregar en el gel d'electroforesi es dissolen a una concentració 1mg/ml en tampó de mostres. La composició del tampó pels GPAU 6.25Murea/15% acrilamida és la següent:

β-mercaptoetanol 20mM  
 Urea 8M  
 Àcid acètic 5%  
 Verd de metil 1% (que s'afegeix en fresc, una punta d'espàtula).

El tampó de recorregut dels gels acètic/urea és l'àcid acètic al 5%.

Les electroforesi les hem corregut sempre a 100V fins que el colorant del tampó de mostres arriba al final dels vidres del gel.

### III.3.6.2. Gels de poliacrilamida /àcid acètic/ tritó / urea (GPTU)

Els gels GPAU arriben a mostrar els 4 tipus principals d'histones i algunes de les seves isoformes; malgrat tot, sovint no és possible resoldre bé les histones H2A, H2B i H3 (i les seves subfraccions) ja que podem quedar solapades. La resolució de les diferents isoformes de les histones pot millorar molt significativament amb l'addició de detergents no iònics en els gels d'acrilamida al provocar una reducció diferencial en

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

la mobilitat electroforètica de les isoformes (Zweidler i Cohen, 1972). Aquest efecte és degut a la formació de micel·les entre el detergent i les regions hidrofòbiques de les proteïnes, i és molt sensible a petites diferències en les propietats hidrofòbiques de les molècules (Franklin i Zweidler, 1975,1977).

En general, el que se sol fer és fixar la concentració de detergent (Tritó X-100 6mM) i es varia la concentració d'urea, que és un inhibidor de la unió de les proteïnes amb el detergent. D'aquesta manera es podem escollir les condicions que millor resolen la teva mostra.

Nosaltres en aquest treball després de provar diferents concentracions de Tritó X-100 i d'urea hem utilitzat dues concentracions diferents d'Urea sota una mateixa concentració de Tritó X-100 (6MUrea/6mMTritó X-100 i 3MUrea /6mM Tritó X-100) per a estudiar les possibles isoformes de les histones del nucli espermàtic de la Sèpia i també comparar-les amb les del teixit somàtic de la mateixa espècie. Hem utilitzat aquests gels GPTU per a la primera dimensió de les electroforesis bidimensionals. (v. apt.3.6.4)

La composició d'aquests dos tipus de gels GPTU a partir de solucions mare és la següent:

**Taula.III.2:Solucions i quantitats necessàries per un gel GPTU 6M urea/6mM Tritó X-100/15% acrilamida d' 1.5mm de gruix.**

<b>SOLUCIONS</b>	<b>3MUrea/6mMTritó</b>	<b>6MUrea/6mMTritóX-100</b>
Acri.60%/bis0.4%	0.200	0.200
10MUrea, 6.67% àcid acètic	0.300	0.600
0.3M Tritó X-100	0.020	0.020
TEMED	0.005	0.005
Àcid acètic glacial	0.028	0.005
H <sub>2</sub> O destil·lada	0.442	0.150
40mg/ml PSA	0.025	0.020

---

#### III.3.6.3. Gels de poliacrilamida / SDS (SDS-PAGE)

Això com els gels GPAU separen les proteïnes segons la seva càrrega elèctrica, els gels que contenen SDS permeten separar les proteïnes segons el seu pes molecular. L'SDS és un detergent (Dodecil sulfat sòdic) que actua com a detergent desnaturalitzant (Shapiro et al., 1967; Weber i Osborn., 1969; Dunker i Rueckeret, 1969).

Els gels d'SDS són gels d'acrilamida discontinus, que contenen SDS. L'electroforesi discontinua en presència d'SDS (Laemmli, 1970) ofereix una extraordinària definició i és molt poc sensible a variacions de càrrega i estructura de les proteïnes. L'explicació per a aquest fenomen va ser donada per Pitt-Rivers i Impiombato (1968) i Reynolds i Tanford (1970a,1970b) que van trobar que, sota les condicions adequades, tots els polipèptids reduïts s'unien a una mateixa quantitat d'SDS (1.4gr/gr polipèptid). Aquesta unió provoca la pèrdua de l'estructura secundària de les subunitats proteiques mitjançant la formació d'una niqueta aniònica que embolcalla totalment la proteïna; a més a més, la pròpia càrrega del detergent apantalla les càrregues intrínseques de la proteïna. Així la càrrega global de la micel·la depèn quasi exclusivament del pes molecular de la pròpia proteïna. En aquesta situació, les proteïnes es comporten com si tinguessin una forma similar i una relació càrrega/massa idèntica i en conseqüència, en principi, la seva mobilitat està relacionada únicament amb el seu pes molecular. No obstant, s'ha de tenir en compte que els polipèptids no reduïts contenint ponts disofre intactes no s'uniran a la quantitat òptima d'SDS presentat una mobilitat electroforètica diferent, al igual com passa en altres proteïnes que són excepcions.

L'SDS s'uneix principalment a les regions hidrofòbiques dels polipèptids, mentre que les regions hidrofíliques en capten molt menys. El perquè amb diferents hidrofobicitats capten la mateixa quantitat d'SDS per gram no és encara comprès (See i Jackowski, 1989). Les protamines, amb la seva forta densitat de càrregues, precipiten en presència de solucions que contenen SDS, i per tant no les podem estudiar en aquest tipus de gels (Chiva et al., 1987).

En aquest treball hem utilitzat els gels discontinus d'SDS de Laemmli(1970) adaptat per Thomas i Kornberg (1978), amb algunes modificacions. Els gels d'SDS

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

contenen un gel empilador i un altre gel separador. El gel empilador ( que es troba a la

part superior), a més a més de concentrar les proteïnes, fa que es generi un gradient de voltatge entre els dos gels. La glicina principal ió del tampó de recorregut d'aquest tipus de gels, al pH 8.3 del tampó de recorregut i al del gel separador que és 8.8, té una càrrega neta positiva i corre en el mateix sentit que les proteïnes; però al gel empilador que té un pH de 6.8, la glicina té càrrega zero. D'aquesta manera, es crea una diferència de potencial local que fa que les proteïnes que es trobin abans d'aquesta interfase es vegin accelerades, mentre que les que comencen a passar-la s'enlenteixen, originant-se així bandes molt planes i ben definides. El gel separador, donarà la separació electroforètica segons el pes molecular.

La composició dels gels separadors i empiladors és la que mostra la taula III.3

*Per a preparar un gel d'SDS cal seguir els següents passos:*

- a) Posem les quantitats adequades dels components del gel separador posant el TEMED i PSA (catalitzador) al final, i ràpidament avanç que polimeritzi tirem el gel entre els vidres del sistema electroforètic.
- b) Per tal que el gel polimeritzi adequadament, i l'oxigen (que és un inhibidor de la polimerització no interfereixi), es posa una capa fina d'aigua o isobutanol saturat d'aigua just per damunt del gel separador. D'aquesta manera la interfase entre el gel separador i empilador queda millor definida.
- c) Un cop el gel separador ja ha polimeritzat (aproximadament uns 30min.), es retira l'aigua o isobutanol saturat amb paper de cel·lulosa (amb cura de no tocar i malmetre el gel polimeritzat), i es renta la interfase amb aigua destil·lada i de nou la retirem amb una mica de paper de cel·lulosa.
- d) Finalment es mesclen els components del gel empilador, i amb la pinta col·locada enter el vidres tirem el gel empilador damunt del separador i esperem que polimeritzi durant aproximadament 15 min.

### III.MATERIAL I MÈTODES

**Taula III.3 :Solucions mare i components d'un gel d' SDS al 15% d'acrilamida de 1.5mm de gruix.**

<b><u>Gel empilador</u></b>			
SOLUCIONS	3ml	16ml	24ml
Acrilamida 30%/bis 0.8%	600µl	3.2ml	4.8ml
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	0.75ml	4ml	6ml
SDS 10%	30µl	160µl	240µl
DdH <sub>2</sub> O	30µl	8.48ml	12.72ml
TEMED	3µl	16µl	24µl
PSA 10%	30µl	160µl	240µl

<b><u>Gel separador</u></b>			
SOLUCIONS	8ml	15ml	45ml
Acrilamida 30%/bis 0.8%	4ml	7.5ml	22.5ml
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	2ml	3.75ml	11.25ml
SDS 10%	80µl	150µl	450µl
DdH <sub>2</sub> O	1.87ml	3.5ml	10.5ml
TEMED	3.6µl	6.75µl	20.25µl
PSA 10%	45.3µl	85µl	225µl

El tampó de recorregut dels gels SDS és el següent:

Tampó de recorregut: 0.6% Tris-HCl  
2.88% glicina  
0.1% SDS

El tampó de mostres per a un gel SDS és el següent:

Tampó de mostres: Tris-HCl 0.0265M pH 6.8  
SDS 10%  
β-mercaptoetanol 5% (0.7M)



### III.MATERIAL I MÈTODES

---

En aquest cas, les proteïnes queden carregades negativament, així la posició dels electrodes en la font d'electroforesi serà de negatiu a positiu al rebés del que passa amb els GPAU.

En el moment de córrer el gel són important dues coses:

- 1) Posar un marcador de pes molecular , per tal de poder saber aproximadament, el pes moleculars de les bandes (proteïnes) obtingudes en la mostra.
- 2) Avanç de carregar les mostres és necessari bullir-les durant 2-3 minuts, perquè així les proteïnes perdin la seva estructura secundària i migren de manera uniforme pel gel.

L'electroforesi de gels SDS el fem córrer a 100V mentre les proteïnes es troben al gel empilador, i una vegada en front de l'electroforesi ha passat al gel separador pugem el voltatge a 150V , i parem l'electroforesi fins que el front arriba al final del gel.

#### III.3.6.4. Anàlisi de proteïnes per electroforesi bidimensional

Les electroforesis anomenades bidimensionals, permeten obtenir una major resolució de les bandes de proteïnes, ja que una mateixa banda es pot córrer dues vegades en dos tipus de gels diferents i per tant, separar-se també segons dos criteris diferents. Normalment, com a primera dimensió se sol fer un gel de tipus GPAU o GPTU on la mostra es separada segons la seva càrrega, i després es corre una segona electroforesi anomenada segona dimensió ( amb la mateixa mostra ) en un gel SDS, on les bandes que prèviament s'havien resolt segons la seva càrrega ara es resolen segons el seu pes molecular.

Les electroforesis bidimensionals permeten , en molts casos, veure diferents isoformes d'una proteïna que en una electroforesi convencional deixariem de veure. Aquest mètode és doncs un bon sistema per estudiar isoformes o variants d'una proteïna.

En el nostre cas, hem utilitzat aquest tipus d'anàlisi per estudiar la possibilitat de la presència d'una(es) proteïna(es) de transició i les possibles variants i isoformes de les histones gonadals de *Sepia officinalis*. També per fer una comparació de la dotació d'histones de la gònada amb la de teixit somàtic. (v. Apt. IV.1.2b.4.2 Resultats).

Per a aquest objectiu hem fet gels bidimensionals de dos tipus diferents:

- 1) Una primera electroforesi bidimensional on la primera dimensió ha estat un gel GPTU 6MUrea/6mM Tritó X-100 i la segona dimensió un gel SDS.
- 2) Un segon tipus on la primera dimensió ha estat un gel GPTU amb diferent concentració d'Urea: 3MUrea/6mM Tritó X-100 i la segona dimensió SDS.

*El procediment per fer un gel bidimensional és el següent:*

- 1) Es fa una primera dimensió GPAU o GPTU (v. Apt. III.3.6.1 i III.3.6.1 de Material i mètodes).
- 2) Una vegada finalitzada la primera dimensió, se separen els vidres electroforètics i es talla el gel verticalment a tires de manera que cada tira correspon a un pou on s'hi ha separat les proteïnes. Aquesta tira serà l'origen per a la segona dimensió.
- 3) El següent pas és montar el gel SDS de la segona dimensió. En aquest cas el gel SDS estarà compost només del gel separador degut a què el gel empilador serà substituït per a la nostra tira de la primera dimensió. Primer de tot, i prèviament a montar la segona dimensió és necessari equilibrar la tira de la primera dimensió perquè la primera dimensió és un gel GTPU i l'hem d'afegir el un gel SDS com si e tractés del gel epmilador. El procés d'equilibri de la primera dimensió consisteix en posar la tira en immersió amb el mateix gel empilador dels gels SDS (v. components Taula III.3) però sense els catalitzadors de la reacció, ni TEMED ni PSA. Deixarem la tira equilibrant-se a temperatura ambient i en agitació durant 30-45min.

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

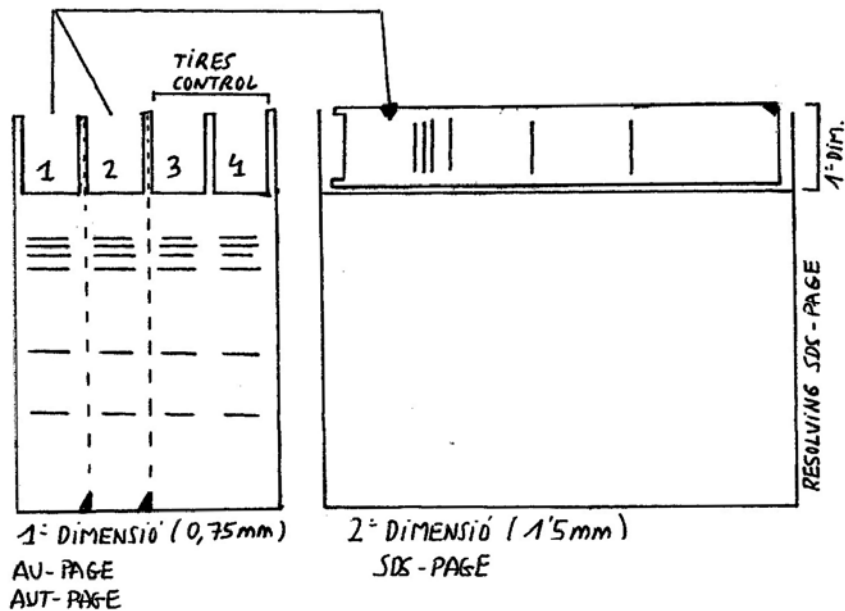
- 4) Seguidament amb l'ajut de les pinces i amb molta cura de no trencar la tira la col·locarem damunt del gel separador de la segona dimensió.

Nota<sub>1</sub>: Cal tenir present en tot moment quin és l'origen de la tira de la primera dimensió per tal de col·locar-la adequadament en la segona. Un manera d'identificar la primera dimensió es fent una marca a la part superior dreta de la tira, per exemple.

Nota<sub>2</sub>: Durant el procés d'equilibrar la tira de la primera dimensió, aquesta s'ha anat impregnant a poc a poc del gel empilador per a la segona dimensió, i en conseqüència ha augmentat de gruix. Per aquest motiu es necessari que la primera dimensió es faci en un gel més prim que la segona. En el nostre cas per exemple la primera dimensió es va fer en gel de 0.5mm de gruix i la segona en gels de 1.5mm de gruix.

La figura III.9, mostra de manera esquemàtica el procés de les electroforesis bidimensionals que vàrem fer per a la *S. officinalis*, i *Sepiola*.

---



---

**Fig.III.9: Dibuix-esquema del procediment que es va seguir per l'elaboració de les electroforesis bidimensional.**

---

- 5) Una vegada la tira està en contacte amb el gel separador, afegim per tal d'omplir tots els buits i fixar bé la primera dimensió una mica de gel empilador amb els polimeritzats. És opcional però en casos en què no es coneix bé els components de la mostra es recomana posar en un lateral del gel un pou per poder posar un estàndard , ja sigui de pes molecular o bé d'una mostra que ens serveixi de referència per identificar la mostra.
  
- 6) Una vegada el gel empilador ja ha polimeritzat (uns 10-15min.), ja podem engegar la segona dimensió. L'electroforesi es desenvolupa primer a 100V, i quan el front ja ha sobrepassat la primera dimensió el pugem a 120V fins que el front arriba al final del gel.

#### III.3.7. Detecció de bandes en gels d'electroforesi

Una vegada tenim feta l'electroforesi, les bandes resoltes del gel s'han de visualitzar, i per això fa falta tenyir el gel en una solució que ens permeti detectar les proteïnes. Existeixen diverses maneres de tenyir les proteïnes en el gel, en aquest treball hem utilitzat la tinció en blau de Comassie.

##### III.3.7.1. Tinció de gels en Blau de Comassie

La tinció amb el colorant blau de Comassie és el mètode més comú per visualitzar les bandes de proteïnes en un gel. Aquest colorant s'uneix a les proteïnes aproximadament de manera similar a totes elles, i també aproximadament en funció de la seva quantitat.

La solució de tinció a la qual s'han de submergir els gels en agitació són:

Solució de tinció: Comassie blue (R-250 per als gels GPAU i G-250 per al gels d' SDS 0.25%(w/v)  
En una solució d'aigua/metanol/àcid acètic en proporcions 5/5/1

El temps de tinció pot variar en funció del gruix del gel des de 30min. En els més primers fins a tota la nit en els gels més gruixuts.

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

Una vegada els gels estan ben tenyits, es posen també en agitació a temperatura ambient en una solució destenyidora que per difusió va eliminant a poc a poc el color de fons i es va obtenint un millor contrast de les bandes.

La solució destenyidora tant per als gels de tipus GPAU com per als d'SDS és la següent:

Solució destenyidora:

Aigua/metanol/àcid acètic en proporcions 5/5/1

Tant la solució de tinció com la solució destenyidora poden ser reutilitzades tantes vegades com faci falta. En el cas de la solució de tinció es fa una decoloració prèvia amb carbó actiu.

Els gels d'acrilamida, una vegada s'han destenyit suficient es poden escanejar entre dos fulls de transparències per tenir una versió digitat del gel i després per conservar-los de forma permanent, es col·loca el gel entre dos fulls humits de cel·lofana i es deixa secar a temperatura ambient durant 3 o 4 dies.

#### III.3.8. Determinació de la quantitat de proteïnes de mostres en dissolució.

##### III.3.8.1.- Absorbància de la mostra a 320nm.

En algunes ocasions pesar la pols de proteïna obtinguda no ens ha estat possible ja que pesar-la implica perdre'n tota o la major part, i la única manera de recuperar-la és dissoldre la pols en un tampó. En aquestes ocasions, per tal de saber aproximadament la quantitat de proteïna que tenim resuspesa, hem fet una dilució de la mostra i hem llegit la seva absorbància a 230nm, utilitzant sempre com la blanc la solució amb què hem dissolt la pols de proteïna.

Les proteïnes de tipus protamines quan es troben a una concentració d'1mg/ml donen una absorbància a 230nm al voltant d'1, mentre que les histones (*core*) donen quan es troben també a la mateixa concentració (i les llegim a la mateixa absorbància) una lectura d'aproximadament 4.3 O.D.s . La histona H1 i similars absorbeixen a 230nm aproximadament 2.0 quan es troben a una concentració d'1mg/ml. (Ausió, 1980). Així si tenim una dissolució de la nostra extracció de proteïnes nuclears bàsiques llegint l'absorbància a 230nm en podem deduir la concentració aproximada

si tenim en compte les dades anteriors. També cal tenir present que aquestes relacions es poden aplicar per valors d'absorbància compresos entre 0.1 i 2.0, ja que fora d'aquests valors, ja no es compleix la Llei de Beer-Lambert i es perd la linearitat.

En el nostre treball hem utilitzat aquest mètode per quantificar la mostra durant el procés d'obtenció i purificació del pèptid precursor de la protamina, i també per calcular la quantitat d'antígen a injectar al conill.

#### III.3.9. Gènesi d'anticossos

##### III.3.9.1. Gènesi de l'anticòs per al precursor de la protamina de *Sepia officinalis*.

Per tal de poder estudiar amb més profunditat la composició proteica de la cromatina espermiogènica de *Sepia officinalis* ens vàrem plantejar l'objectiu de generar un anticòs específicament contra la part precursora de les molècules T1 i T2 de *Sepia officinalis*

El primer pas a fer va ser purificar les molècules precursors de la protamina a partir de gònades madures de *S. Officinalis*.

##### III.3.9.1.1. Obtenció i purificació del precursor de la protamina

Es va partir de tres gònades madures conservades en etanol al 90% i es va procedir a la obtenció i purificació de nuclis espermàtics. (v. apt. III.2 Material i mètodes).

Seguidament amb el sediment enriquit de nuclis espermàtics es fa procedir a una extracció de proteïnes nuclears bàsiques (v. apt. III.3.1).

Amb la pols de proteïna obtinguda es va purificar la mostra mitjançant HPLC (v. apt. III.3.5.1), i es varen recollir i ajuntar els pics de proteïna corresponent, indistintament, a les dues molècules del precursor de la protamina de *S.officinalis* T1 i T2. Es va obtenir un volum total de 97.5ml que per tal de no perdre proteïna es vàrem liofilitzar (v. apt. III.3.4.2) i resuspendre de nou amb 2ml d'aigua destil·lada.

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

Una vegada vàrem tenir quantitat suficient de proteïna vàrem procedir a la digestió enzimàtica del precursor per tal de separar el pèptid N-terminal (primers 21 aminoàcids) de la resta de la molècula. Es va fer una digestió amb quimiotripsina.

#### III.3.9.1.2. Digestió enzimàtica del precursor de la protamina amb quimiotripsina i purificació del pèptid precursor per HPLC.

La quimiotripsina, és una endopeptidassa que talla per residus hidrofòbics situats a l'extrem C-terminal, especialment per la Phe, Thr, Thyr i Leu en ordre decreixent de susceptibilitat. De vegades hi ha trencament en l'extrem carboxil de la Met i His, sobretot a llargs temps d'incubació. Residus veïns poden influir en el ritme de tall i ponts peptídics on hi ha Pro es tornen relativament resistents. (Aitken et al., 1989).

La part precursora de la molècula de la proteïna de *S.officinalis*, és un pèptid hidrofòbic que correspon als primers 21 aminoàcids. Després de la part precursora, ens trobem amb la protamina madura, que presenta un elevat contingut en Arg (--%), fet que l'hi dóna a la proteïna un caràcter mol bàsic. La quimiotripsina que s'ha utilitzat en aquest treball per digerir el precursor obtingut de les gònades de *S. officinalis* és de pàncreas boví (SIGMA C-7762 tipus I-S). Hem seguit el següent procediment:

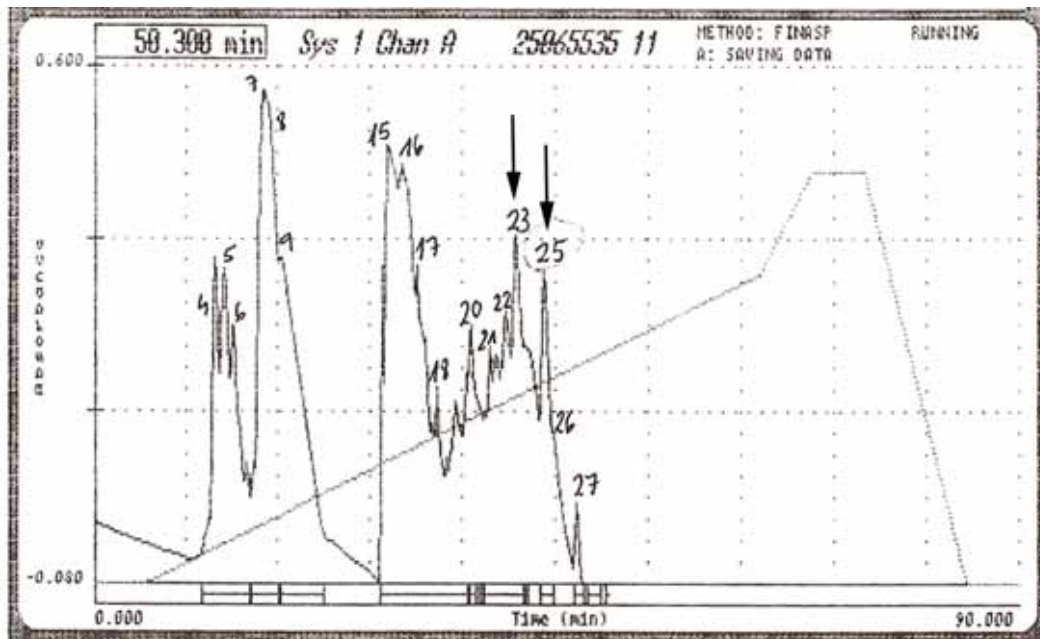
- i. Vàrem agafar 50µl de la mostra a digerir ( que corresponen a 30µg de precursor aproximadament, ja que la mostra quantificada (v. Apt. III.3.8 per quantificació de proteïnes en dissolució) ens va donar 6µg/µl) i hi vàrem afegir 50µl d'acetat d'amoni 0.2M pH 5.0. Així la reacció de digestió té lloc a una concentració d'acetat d'amoni 0.1M i pH 5.0.
- ii. Seguidament es va afegir l'enzim preparat en fresc amb el mateix tampó acetat amoni 0.1M pH 5.0 a una relació enzim: substrat 1/200
- iii. La reacció va tenir lloc a 37°C durant 3h 30min.
- iv. Per aturar la reacció (que es pot fer de varies maneres) vàrem afegir tampó de mostres per a gels GPAU que conté àcid acètic, acidifica per

### III.MATERIAL I MÈTODES

- v. tant la mostra, i atura la reacció i vàrem posar la reacció immediatament en gel. D'aquesta manera, a més a més de parar la reacció de digestió, ja es té la mostra preparada per ser carregada en un gel GPAU i fer així un control electroforètic de l'experiment.

Una vegada vàrem establir les condicions adequades de digestió es van repetir els passos i-iv amb més quantitat de mostra (4,8g de precursor de protamina), i per a aturar la reacció enlloc d'afegir tampó de mostres per a gels GPAU, una vegada transcorregut el temps d'incubació, es va congelar la mostra immediatament amb nitrogen líquid i es va liofilitzar. Seguidament, es va resuspendre la proteïna digerida amb aigua destil·lada i es va injectar a l'HPLC per separar-ne els pèptids.

En la Fig. III.10 es mostra el patró obtingut en l'HPLC i els pèptids resultants de la digestió.



**Fig.III.10: Patró de l'HPLC obtingut després de la digestió de la molècula precursora de la protamina de *S.officinalis* amb quimiotripsina. Els pics 23 i 25 de la figura, van ser després analitzats per espectrometria de masses.**

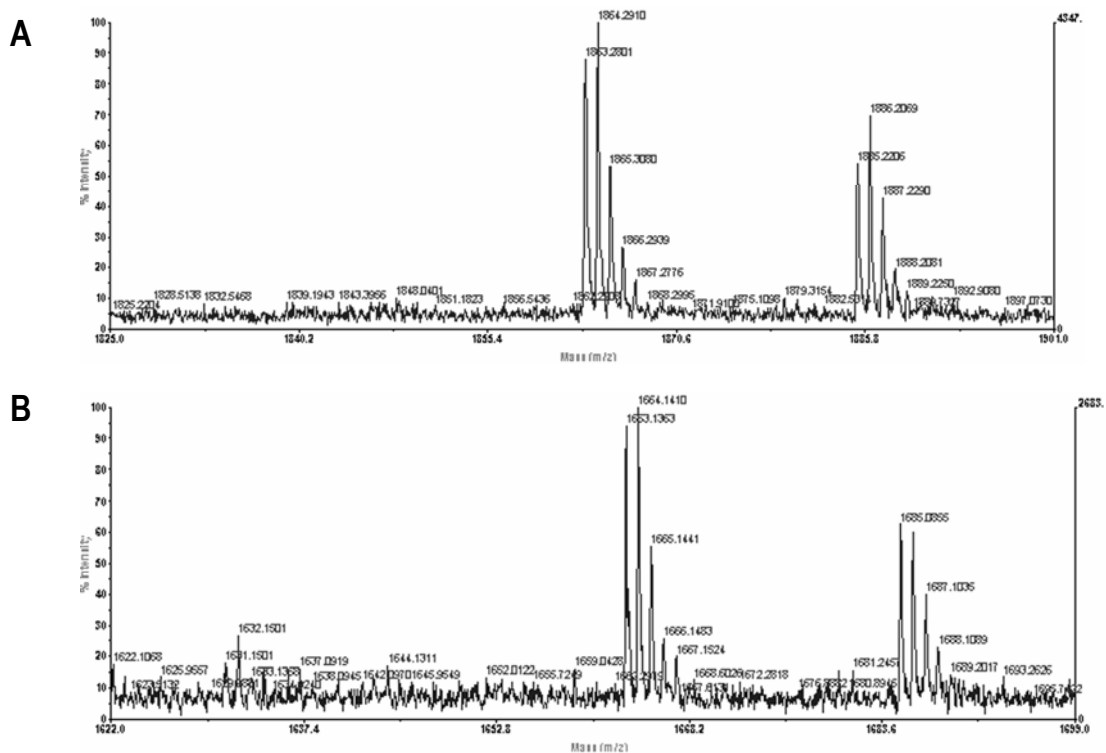


### III.MATERIAL I MÈTODES

---

El pèptid precursor al ser hidrofòbic, es desprèn de la matriu de C<sub>18</sub> més tard que les porcions de la proteïna que són hidrofíliques.

Avanç de procedir a la injecció al conill del pèptid que havíem obtingut en l'HPLC, es va procedir a fer un anàlisi d'espectrometria de masses dels pics senyalats en l'HPLC per tal d'acabar de confirmar la identitat del pèptid. El resultat es mostra en la Fig.III.11. Tenint en compte els pèptids obtinguts amb aquest enzim en el treball de Sautière et al. (1988) i la predicció mitjançant programes informàtics del pes molecular dels possibles pèptids que es podem obtenir digerint el precursor de la protamina amb quimiotripsina, vàrem identificar dos pesos moleculars, en els pics analitzats (23 i 25), que es troben senyalats en la figura: en l'anàlisi del pic 23 vàrem identificar 1.864,2910 Da que correspondria al pèptid identificat per Sautière C-1' de 17 residus,



**Fig.III.11: Espectrometria de masses dels pics 23 (A) i 25 (B) obtinguts de l'HPLC de la digestió amb quimiotripsina del precursor de la protamina.**

---

derivat de T1 i 1.664,1410 de 15 residus identificat també per Sautière et al. com a pèptid C-1 procedent de la isoforma del precursor T2. En el pic 25 tenim també el pèptid C-1 procedent de T2 (1.663,1). Vàrem decidir que malgrat la presència d'altres pèptids que no vàrem identificar com a part del pèptid precursor, injectàvem en el conill la mescla dels dos pics analitzats.

*Nota:* Possiblement els resultats obtinguts en els experiments d'immunolocalització amb aquest anticòs (v. Apt.s. IV.1.2b.4.5 i IV.1.2b.4.6 de Resultats), on hem vist que la unió del sèrum generat no és exclusivament específica per al precursor de la protamina sinó que també presenta reacció creuada amb la forma madura de la protamina, puguin ser degut a la presència d'aquests altres pèptids detectats en l'anàlisi d'espectrometria de masses que donat el fet que la digestió amb quimiotripsina es va fer amb el precursor purificat, molt possiblement fossin fraccions de la mateixa proteïna.

Donat que els pèptids que volem injectar en el conill són de pes molecular petit, és necessari per tal de fer a l'antígen més immunogènic, conjuguar-lo prèviament amb una proteïna més gran (carrier protein).

#### **III.3.9.1.3. Conjugació de l'antígen amb mcKLH.**

Es va conjugat doncs, els pèptids obtinguts amb la proteïna KLH (*keyhole Limpet Hemocyanin*) utilitzant EDC per acoblar-los. Per conjuguar els pèptids, vàrem utilitzar el kit de la casa comercial Pierce (prod. # 77653) i seguir el protocol d'aquesta casa comercial. El procediment consisteix en unes reaccions d'incubació on es conjuguen els pèptids amb la proteïna KLH, i després purificar els conjugats a través d'unes mini-columnnes també proporcionades pel Kit.

#### **III.3.9.1.4. Injecció del conjugat al conill**

En la primera injecció (intramuscular) del conjugat al conill es van injectar aproximadament 420µg (en 800µl) del conjugat mesclat amb 800µl de l'adjuvant "Freund's Complete Adjuvant (Pierce Biotechnology), que consisteix en una emulsió d'aigua i oli mineral que conté *Mycobacterium* mort. La mescla es va emulsionar amb un sonicador fins que la textura de l'emulsió va ser consistent i blanca.

---

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

En les següents injeccions (també intramusculars) es va injectar la mateixa quantitat de conjugat però mesclat amb l'adjuvant "Freud's incomplete adjuvant" que consisteix només en una emulsió d'oli mineral i aigua.

Després de 7-10 dies després de la tercera injecció es va sacrificar l'animal i es va deixar coagular la sang a 4°C tota la nit. El dia següent, es va centrifugar (3.500 rpm. 10min.) la sang i el sobrenadat (sèrum amb l'anticòs) es va portar fins al 0.1% (v/v) d'azida sòdica, i es varen guardar les alíquotes a -80°C fins la seva utilització.

#### III.3.9.2. Gènesi de l'anticòs contra l'H2A de timus de vedella.

En el nostre laboratori ja disposaven d'un estàndard d'histona H2A obtinguda a partir de timus de vedella amb el mètode de Johns (1967).

Es va utilitzar aquest stock d'histona H2A en pols per injectar-la en el conill i generar anticossos contra la histona H2A.

Els anticossos varen ser generats al Servei d'Animalari de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB) del *Consejo Superior de Investigaciones Científicas* (CSIC)

El procediment que es va seguir és anàleg al del precursor de la protamina, en aquest cas, al tractar-se d'una proteïna sencera no es va conjuguar amb mckLH i es va subministrar l'antigen dissolt en PBS. Concretament, s'administraren 250µg de l'antigen dissolts en 500µl de PBS emulsionats amb l'adjuvant Complet de Freud a una proporció 1:1 (1ml final.) en la primera injecció, i amb l'adjuvant Incomplet de Freud en les tres restants. La injecció és per via subcutània en conills mascles NZW.

#### III.3.10.- Immunodetecció de proteïnes amb anticossos. Western Blot.

La tècnica de Western blot és una tècnica molt utilitzada en els laboratoris de biologia molecular per la identificació immunològica de les proteïnes. Es basa en la electrotransferència de les proteïnes resoltes en un gel (SDS o bé GPAU), a una membrana, on les molècules hi queden unides. Les membranes més comunament utilitzades són les de nitrocel·lulosa (NC) o bé de difluorur polivinidilè (PVDF).

---

La detecció i identificació de les proteïnes que estan immobilitzades a la membrana es duu a terme mitjançant incubacions de la membrana amb anticossos (mono o policlonals) específics per a una proteïna seguit d'una segona incubació amb un anticòs secundari que reconeix l'anticòs primari i que alhora aquest anticòs secundari està conjugat amb la substància que ens permetrà detectar la reacció antígen anticòs primari. La molècula conjugada a l'anticòs secundari, sol ser la Horse Radish Peroxidase (HRP) que es detecta mitjançant la intensitat de la quimioluminiscència obtinguda en el substrat ECL. Per tal de minimitzar les unions inespecífiques dels anticossos, es dilueixen tots dos anticossos amb una solució de bloqueig rica en proteïnes que minimitza el background, és a dir les unions inespecífiques. Es tracta d'un mètode ràpid, senzill i molt sensible

Nosaltres en aquest treball hem estudiat mitjançant Western blot la reacció dels antiserums generats per al precursor de la protamina de *Sepia* i per la histona H2A de timus de vedella. El protocol que vàrem seguir és el següent:

#### **Protocol de transferència i incubació amb anticossos**

- i. Una vegada finalitzada l'electroforesi, se separa el gel dels vidres electroforètics i es fa una marca en algun dels costats per identificar l'ordre de les mostres. Seguidament, s'equilibra en gel per a la transferència submergint-lo en tampó de transferència durant 10-15min. El Western blot del precursor de la protamina es fa fer en un gel GPAU mentre que per a l'incubació amb l'anticòs anti-H2A es va córrer un gel d' SDS, es va incubar doncs, cada tipus de gel amb el seu tampó de transferència corresponent
- ii. .Es talla una porció de membrana del mateix tamany que el gel .En els nostres estudis hem utilitzat membrana de difluorur polivinidilè (PVDF), la qual requereix una activació prèvia a ser utilitzada:
  - 1.- Submergim la membrana 10 segons en metanol
  - 2.- Després la deixem 5 min. en aigua destil·lada
  - 3.- La deixem en tampó de transferència uns 10-15 min.

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

El tampó de transferència per a gels SDS conté:

SDS 0.1%  
Tris 25mM  
Glicina 0.2M  
Metanol al 20%

El tampó de transferència per a gels GPAU conté:

Metanol 10%  
àcid acètic 0.7%

iii. Per la transferència es monta un sandvitx que conté:

Sobre el suport de la transferència un fregall tipus "scotch-brite" humit amb el tampó de transferència. Damunt el fregall es col·loquen tres papers Whatman 3MM també empapats amb tampó de transferència.

Seguidament col·loquem la membrana de PVDF equilibrada, i damunt de la membrana el gel.

Nota<sub>1</sub>: En els gels SDS millor eliminar el gel empilador, ja que no ens aportarà informació a l'experiment.

Nota<sub>2</sub>: Per tal de saber l'ordre en què les proteïnes es tranfereixen del gel a la membrana millor fer també una marca en un dels costats de la membrana i fer-la coincidir amb la marca del gel.

Posem damunt del gel 3 papers Whatman 3MM també humits amb tampó de transferència, i amb cura de què no hagin quedat atrapades bombolles entre el gel i la membrana, es desplaïa un tub net sobre el sandwich com un rodolo i s'eliminen les possibles bombolles.

Finalment, es cobreixen els papers Whatman amb un segon fregall tipus "scotch-brite" (humit amb tampó de transferència) i es tanca el suport del sandwich.

Perquè les proteïnes es transfereixin correctament (del gel a la membrana) col·loquem la cara negra del sandwich junt amb la cara negra de la cubeta de transferència. Col·loquem també un bloc de gel i un agitador magnètic i cobrim el sandwich amb tampó de transferència.

En el moment de realitzar la transferència s'ha de tenir en compte la polaritat: en els gels d' SDS, la migració de les proteïnes a la membrana és del càtode a l'ànode, i en gels de tipus GPAU al rebés. Vàrem fer la transferència a un amperatge constant de 400mA durant 45min. a 4°C i en agitació.

#### **Bloqueig de la membrana i incubació amb anticòs primari**

Una vegada la membrana ja s'ha transferit, es desmonta el sandwich i sempre amb la membrana cara amunt (és a dir amb la cara on hi ha les proteïnes transferides) es procedeix als rentats i incubacions amb els anticossos.

- Es renta primer la membrana dues vegades amb aigua destil·lada i una tercera amb PBS.

##### Stock 10X 0.1M Phosphate Buffered Saline (PBS)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  13.61g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  56.56g

$\text{NaCl}$  450g

Enrasar fins a 5L amb aigua destil·lada i ajustar pH a 7.4

*Nota:* De manera opcional, per tal de saber si la transferència ha anat correctament es pot tenyir la membrana amb el colorant *Ponceau* (SIGMA: P3504) que permet visualitzar les proteïnes damunt la membrana. Amb dos o tres rentats el colorant desapareix i es pot procedir amb la incubació. Alternativament, es pot tenyir amb blau de *Comassie* el gel transferit on s'hi hauria de veure gens o molt poca proteïna.

El següent pas és el bloqueig de la membrana. El que pretén aquest pas és introduir una solució molt rica en proteïnes alienes que cobreixin la membrana de manera que no quedin llocs lliures inespecífics on s'hi puguin unir els anticossos. És

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

un pas que requereix ser ajustat, ja que en determinats anticossos que presenten una reacció forta amb l'antígen serà necessari un bloqueig més fort que un anticòs que presenti una reacció més dèbil.

En el nostre estudi les solucions de bloqueig que vàrem utilitzar van ser:  
Anti-precursor: 15% Fetal calf serum, 15% llet desnatada en PBS 1X durant 2 hores a temperatura ambient en agitació  
Anti-histona H2A: 5% llet desnatada en PBS 1X durant 2 hores a temperatura ambient en agitació.

Seguidament després del bloqueig i sense cap rentat entremig, es procedeix a la incubació amb l'anticòs primari. De nou aquest pas necessita ser optimitzat en cada anticòs, ja que la dilució pot variar considerablement d'un anticòs a un altre.

Nosaltres vàrem utilitzar les següents dilucions:  
Anti-precursor: 1/1000 diluït en la solució de bloqueig, incubat durant 1h a temperatura ambient.  
Anti- histona H2A: 1/500 també diluït en la solució de bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient.

Nota<sub>1</sub>: Alternativament, les incubacions amb l'anticòs primari també es pot deixar tota la nit a 4°C en agitació.

Nota<sub>2</sub>: L'anticòs primari es pot guardar al congelador (o a 4°C) i reutilitzar les vegades que siguin necessàries.

#### **Rentats**

Procedim el Western amb rentats:

- PBS-Tween 20 (0.05%) 2 x 5min.
- PBS 1x 5min.
- 

El detergent (Tween-20) ajuda a eliminar les restes d'anticòs primari que queden a la membrana, evitant així possibles unions inespecífiques. Prèviament a la incubació amb l'anticòs primari és necessari un rentat sense detergent, ja que el detergent té tendència també a atraure inespecificitats.

#### **Incubació amb l'anticòs secundari**

Seguidament incubem les membranes amb l'anticòs secundari. Aquest anticòs ha de ser generat a partir de la mateixa espècie que ha estat generat l'anticòs primari, del contrari no es podria reconèixer.

En el nostre cas tant l'anticòs anti-precursor com anti-histona H2A són anticossos policlonals contra conill per tant hem utilitzar en ambdós casos un anticòs secundari "goat anti-rabbit" conjugat amb la proteïna HRP. Els anticossos es varen utilitzar a una dilució 1/3.000 en cada cas diluït amb la solució de bloqueig.

#### Rentats:

PBS-Tween 20 (0.05%) 2x5min.

PBS 1x5min.

#### **Revelat de la membrana**

La detecció de la reacció es va fer per quimioluminiscència, mitjançant el Kit *ECL Western Revealing* (Amersham Biosciences). El Kit es compon de dos reactius, A i B. L'emissió de quimioluminiscència és el resultat de la reacció química (oxidació) del luminol catalitzada per la HRP (*Horse Radish Peroxidase*) en condicions alcalines.

Per el revelat de la membrana, s'utilitza 1 ml de cada reactiu i es deixen sobre la membrana durant un minut perquè reaccionin. Agafant la membrana amb unes pinces s'elimina l'ECL i es posa la membrana en el cassette revelador, on a la cambra fosca es pot exposar la quimioluminiscència en un film de raigs X (AGFA). Es poden fer varies exposicions a diferents temps en funció de la intensitat de reacció de l'anticòs

#### **III.3.11. Determinació de la composició aminoacídica d'una proteïna.**

L'anàlisi de la composició d'aminoàcids d'una proteïna consta de dues parts: una primera on s'hidrolitzen els enllaços peptídics de la proteïna, alliberant els diferents aminoàcids, i una segona fase on s'identifiquen cada un dels residus aminoacídics.



### III.MATERIAL I MÈTODES

---

#### III.3.11a) Hidròlisi de la proteïna

El trencament dels enllaços peptídics es realitza mitjançant una hidròlisi àcida. El procediment estàndard consisteix en posar la proteïna en HCl 6N en un tub on se l'ha aplicat el buit i es manté a 110°C durant 24hores. Addicionalment es pot afegir fenol a una concentració final de 0,25% (v/v) per evitar així la degradació de la Tyr (un dels aminoàcids més inestable en contacte amb l'HCl). Seguidament es deixi atemperar el tub a temperatura ambient, es trenca el buit i s'elimina l'àcid amb un rotavapor. Així els aminoàcids queden enganxats a les parets del tub. ( És important l'eliminació ràpida de l'àcid en el moment en què es trenca el buit, ja que es pot donar fàcilment una degradació oxidativa dels aminoàcids.

Com descriu Allen (1989), aquests sistemes d'hidròlisi presenten alguns problemes en alguns aminoàcids en concret: per exemple el Trp es destrueix quasi per complet, o bé alguns enllaços peptídics no són totalment hidrolitzats, com és el cas de les unions entre la Ile i la Val ja sigui entre elles o entre si mateixes. A més a més, molts residus aminoacídics modificats post-traduccionalsment es destrueixen o bé es retornen a l'aminoàcid original.

Hi ha sistemes per minimitzar o corregir alguns d'aquestes efectes; no obstant, com que els aminoàcids més afectats no es troben en les proteïnes del nostre estudi, no s'han realitzat correccions sobre els resultats dels anàlisis d'aminoàcids.

#### III.3.11b) Anàlisi d'aminoàcids.

Una vegada la proteïna ja està hidrolitzada i els seus aminoàcids enganxats a les parets dels tubs, l'anàlisi s'efectua separant els aminoàcids en columnes cromatogràfiques, detectant la seva aparició i quantificant-la.

La majoria dels aminoàcids no posseeixen una absorció als UV o fluorescència significant a longituds d'ona adequades per a la seva detecció. És necessària la formació de derivats d'aquests aminoàcids de tal manera que puguin ser detectats.

La derivatització d'aminoàcids pot dur-se a terme abans o després de la separació cromatogràfica dels mateixos, (derivatització pre o post-columna), i bàsicament consisteix en la reacció del grup amino de l'aminoàcid de manera que es produeixi un derivat colorat o fluorescent. Aquests han de ser, en el cas de modificacions pre-columna, estables sota les condicions en què es realitza la cromatografia.

Entre les derivatitzacions pre-columna, és molt utilitzada la reacció amb fenilisotiocianat (PITIC) (Heinrikson i Meredith, 1984), mentre que entre les post-columna és freqüent l'ús de l'ortoftaldehid (OPA) i la nihidrina (Moore i Stein, 1948).

En aquest treball hem utilitzat un d'analitzador d'aminoàcid del model *Applied Biosystems 420A*, fent una derivatització post-columna i seguint una metodologia anàloga a la descrita en Carlos et al. (1993a,b). Aquests anàlisis es van realitzar al *Protein Microbiology Centre*, de la Universitat de Victòria, Canadà.

#### III.3.12. Espectrometria de masses.

En algunes ocasions, quan ens ha calgut informació precisa de la identitat, grau de puresa, grau de fosforilació etc. hem recorregut a l'anàlisi del pes molecular de la molècula mitjançant la tècnica d'espectrometria de masses.

L'espectròmetre de masses utilitzat en aquest treball és de tipus MADLI-ToF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*). Les mostres es cristal·litzaren en la reïna àcida:  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinàmic-àcid (Sigma c 2020). Aquesta matriu absorbeix l'energia del làser a què se sotmet la mostra quan s'injecta a l'aparell, i permet que la mostra s'ionitzi sense que aquesta es destrueixi. Després de la ionització de la mostra, les partícules (ions) són accelerats i introduïts en un tub on hi ha el buit. En aquest tub, l'energia cinètica de tots els ions és la mateixa, i està en funció només de la seva massa i velocitat. Això significa que els ions més lleugers viatjaran més ràpid que els ions més pesats a través del tub. Com que la llargada del tub és coneguda, i l'acceleració inicial de cada ió inicia un  $t_0$ , es pot calcular la massa dels ions que componen la nostra mostra.

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

En el nostre cas, hem fet ús d'aquesta tècnica en el moment d'identificar els pèptids resultants de la digestió del precursor de la protamina amb quimiotripsina.

Aquesta tècnica es va utilitzar al *Genome BC Proteomics Centre* de la Universitat de Victoria, Canadà.

#### III.3.13. Mètodes de microscopia

##### III.3.13.1. Microscopia òptica

###### III.3.13.1.1. Observació dels nuclis espermàtics amb el fluorocrom *Hoechst*

El *Hoechst* (*Hoechst 33258*, [2'-(4-hidroxifenil)-5-(4-metil-1-piperazini)-2,5'-bi-bencimidazol]) (SIGMA), és un fluorocrom que s'uneix de forma reversible a seqüències de tres o més parells de bases d'A-T en la cadena de DNA; en conseqüència, quan el fluorocrom s'excita per exposició a la llum ultraviolada, ens permet visualitzar el nucli de les cèl·lules al microscopi òptic. Aquest fluorocrom és sensible a la llum, de manera que és convenient protegir el recipient que el conté amb paper d'alumini.

En aquest treball hem utilitzat aquest fluorocrom per veure l'efecte del tractament de les solucions de força iònica elevada en els nuclis espermàtics d'*Octopus vulgaris* (apt. IV.2.2d de Resultats). La intensitat de marcatge i forma del nucli respecte els nuclis control ens donen informació del grau de condensació de la cromatina i estat del nucli.

Una vegada finalitzat el tractament dels nuclis es varen posar 3µl de mostra damunt d'un portaobjectes, i els varen mesclar bé amb 3µl de *Hoechst* 1mg/ml. Es va posar el cubreobjectes i protegir amb paper d'alumini fins a la observació al microscopi.

#### III.3.13.1.2. Fixació de mostres en paraformaldehid (4%) i inclusió de en parafina

##### Tampons:

*Preparació del tampó PS (per a 1 litre):*

- 1.- Pesar 40g de paraformaldehid i dissoldre'ls en 900ml d'H<sub>2</sub>O destil·lada.
- 2.- Escalfar la solució a 60-70°C (no més) sota una campana d'extracció de gasos.
- 3.- Afegir NaOH ( 1 ò 2 pastilles) i la solució es clarificarà.
- 4.- Deixar refredar a temperatura ambient, i afegir 75g de sacarosa
- 5.- Afegir 4ml d'EDTA 0.5M
- 6.- Afegir 5ml de BHT (Sigma B-1378)
- 7.- Ajustar el pH a 7.4 (Amb NaOH).
- 8.- Enrasar fins 1000ml, filtrar guardar el fixador a 4°C un màxim de 4 setmanes.

*Preparació del tampó de Sacarosa (per a 1 litre):*

- 1.- Pesar 150g de sacarosa i dissoldre'ls en 900ml d'H<sub>2</sub>O aproximadament.
- 2.- Ajustar el pH a 7.4 amb NaOH
- 3.- Enrasar la solució a 1000ml. Guardar a 4°C.

##### Protocol:

Partim de teixit fresc, just després de la dissecció en el laboratori:

- 1.- Posem una porció de la gònada (entre 1-1.5 cm<sup>3</sup> aproximadament) de *S. officinalis* dins una càpsula d'anatomia i la submergim en el tampó fixador PS. Ho deixem en el fixador entre 1 i 2 dies a 4°C.
- 2.- Després deixem les càpsules d'anatomia en tampó de sacarosa durant 24h. a 4°C
- 3.- Després iniciem el procés de deshidratació de la mostra, deixant-ho primer 2 dies en etanol al 50% ( a 4°C), i després,

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

4.- en etanol al 70%. Ho podem deixar en aquest tampó a 4°C fins a procedir a la inclusió amb parafina.

#### **Inclusió i confecció dels blocs amb parafina de les mostres:**

5.- Posem les mostres en etanol de 98% durant 24h a 4°C

6.- L'endemà en etanol absolut durant 3h a 4°C.

7.- Seguidament passem a submergir les mostres en Xilol i ho deixem 1h, màxim 1.5h.

8.- Del Xilol passem les càpsules d'anatomia a la Parafina I i ho deixem tota la nit .

9.- L'endemà passem les mostres de parafina I a parafina II (de grau de puresa superior) i ho deixem 3h aproximadament.

10.- Procedim a la confecció de blocs de parafina, on es posen les porcions de teixit dins un motlle de metall, es recobreix de parafina líquida, i mitjançant una placa freda s'arrefreda la mostra i es solidifica la parafina.

#### **III.3.13.1.3. Tinció Hematoxilina-Eosina a partir de mostres parafinades.**

A partir dels blocs de parafina fem talls amb el micròtom de 6 nm de gruix i els posem en portaobjectes que han estat tractats prèviament amb polilisina (SIGMA) al 0.05% per evitar que es talls es desenganxin del portaobjectes durant la tinció.

Partim de mostres posades en el portaobjectes tallades amb el micròtom, i comencem per el procés de desparafinació i hidratació de la mostra:

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

1.-Posem les mostres 5 min. per la bateria de xilols, i 5 min. per la bateria d'alcohols (AA%; A90%; A70% respectivament).

2.- Deixem la mostra 5 min. en aigua destil·lada

3.- Procedim amb la tinció amb hematoxilina (SIGMA), prèviament filtrada amb paper de cel·lulosa. Deixem les mostres 5 min. en hematoxilina.

4.- Seguidament fem dos rentats amb aigua de l'aixeta.

5.- Fer un rentat en alcohol clorhídric fins que l'hematoxilina viri a un color rogenc.

*Preparació de l'alcohol clorhídric: 1ml HCl conc. en 198ml d'alcohol 96°.*

6.- Seguim fent un rentat amb aigua de l'aixeta.

7.- Rentem amb aigua amoniaca

*Preparació de l'aigua amoniaca: agafem 200ml d'aigua de l'aixeta i hi tirem 6 gotes d'amoniac.*

8.- Fem un nou rentat amb aigua de l'aixeta

9.- Procedim amb la tinció amb eosina. Ho deixem només 1 min., i seguidament prosseguim a la deshidratació i muntatge de la mostra

*Preparació de la eosina: Fem una dilució 1:8 en alcohol de 80°.*

10.- Passem les mostres per la bateria d'alcohols (A70%; A90% ;AA)primer durant 1 min. aprox. en cada un d'ells, i per la bateria de xilols, 3 min. en cada un d'ells aproximadament.

11.- Finalment muntem la mostra en medi DPX (BDH), tirant una gota sobre el teixit i posant-hi el cubreobjectes al damunt. Deixar assecat i observar al microscopi òptic

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

#### III.3.13.2. Microscopia de fluorescència. Confocal

Per a la immunofluorescència, després de provar varies condicions de treball, el protocol seguit per la localització de la histona H2A i el precursor de la protamina en la gònada de *S. officinalis* ha estat el següent:

##### **Immunofluorescència:**

Partim de talls semi-fins (0.5µm de gruix) de gònada de *S.officinalis*. que han estat fixats en paraformaldehid al 4% i glutaraldehid al 0.1% i inclosos en la resina lowcryl per a la immunolocalització (veure protocol en apt. III.3.13.2.2 Material i Mètodes).

Els talls histològics es varen col·locar al igual que es va fer amb les mostres parafinades, en un portaobjectes prèviament tractats amb HISTPGRIP (Zymed, 00-8050) per tal d'evitar que durant el procés de rentats i incubacions amb els anticossos el teixit es despregui del portaobjectes.

Tot el protocol es duu a terme a temperatura ambient.

1.- Fem primer dos rentat amb PBS-T 0.1%(w/v) durant 10 min.

*Nota: PBS-T: Phosphate Saline Buffer amb Tween 20 al 0.1% . El Tween 20 és un detergent no iònic que solubilitza les membranes de les cèl·lules fent així el teixit més permeable al tractament amb els anticossos.*

2.- Seguim amb un rentat amb PBS durant 10 min.

3.- Procedim a bloquejar el teixint de les unions inespecífiques amb la solució: -10% (v/v) de serum de cabra (*Normal Serum Goat*)

- 1% (w/v) de BSA (*Bovine Serum Albumin*).

- Glicina 20mM

- en PBS 1X

durant 30 min.

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

*Nota: La glicina se sol posar en els teixits que han estat fixats amb glutaraldehyd per desfer o evitar les reaccions creuades que forma amb l'ADN.*

4.- Procedim després del bloqueig amb la incubació amb els anticossos.

Tant per al serum anti-histona H2A com per al del precursor de la protamina, fem una dilució 1:50 amb la solució de bloqueig:

- 10% (v/v) de serum de cabra
  - 1% (w/v) BSA
  - en PBS-T (0.1%) 1X
- i ho deixem a 4°C tota la nit.

*Nota :Durant tot el procés és important que la mostra no s'assequi en cap moment, i és per això que les incubacions amb els anticossos les vàrem fer en una "cambra humida" creada per nosaltres: posant damunt el teixit amb una pipeta la solució amb l'anticòs i cobrint-ho amb cura de que no quedin bombolles, amb una tira de parafilm (per la cara interna). Alhora el portaobjectes es posa en una caixa de portaobjectes que conté a sota paper de cel·lulosa humit amb aigua destil·lada.*

5.- L'endemà deixem primer atemperar les mostres (30 min. aproximadament), retirem el parafilm, i procedim amb rentats:

- Fem dos rentats amb PBS-T 0.1% (w/v) de 10 min. cada un
- 1 rentat amb PBS 1X durant 10 min.

6.- Seguidament procedim amb la incubació amb l'anticòs secundari (tant per al precursor de la protamina com per la histona H2A) Goat-anti rabbit Alexa Fluor 488 (Molecular probes) a una dilució 1:500 diluït amb la mateixa solució de dilució que per als anticossos primaris. Deixem les mostres en l'anticòs secundari durant 1h a temperatura ambient.

*Nota: Aquest pas el vàrem fer també en la "cambra humida."*

7.- Procedim amb la tinció dels nuclis de les cèl·lules amb el fluorocrom TOPRO-3 (Molecular Probes) a una dilució 1:6000 en PBS. Deixem les mostres durant 5 min..



### III.MATERIAL I MÈTODES

---

8.- Fem 3 rentats amb PBS 1X de 5 min. cada un d'ells.

9.- Finalment muntem la mostra amb el medi de muntatge per a fluorescència immunofluore (MP BIOMEDICALS). Fixen el cubreobjectes amb laca d'ungles i ho deixem assecar durant 24h a 4°C abans de la seva observació al microscopi confocal.

#### III.3.13.3. Microscopia electrònica

##### III.3.13.2.1. Fixació i inclusió de mostres per a ultraestructura

En els estudis histològics en general i sobretot a nivell ultraestructural, és molt important en primer lloc, partir de material biològic el màxim de fresc possible, per tal d'evitar la degradació dels teixits, producte de l'acció d'enzims proteolítics com a conseqüència del pas del temps i increment de la temperatura; i en segon lloc, procedir de manera ràpida i immediata a la fixació i inclusió del teixit, per preservar aquests estructures i fer una bona observació.

##### **Protocol de fixació i inclusió de gònades de *S.officinalis* i *O. Vulgaris* per a l'estudi ultraestructural de l'espermioogènesi:**

En el moment de la dissecció es vàrem fer porcions molt petites de les gònades d'ambdues espècies (1mm<sup>3</sup>aproximadament), i vàrem procurar d'agafar zones diferents dins de la mateixa gònada per tenir varis blocs representatius del teixit.

##### **FIXACIÓ 1<sup>a</sup>:**

La finalitat de la fixació és per una banda preservar l'estructura del teixit viu i no alterar-ne l'estat, i per altra, protegir-lo de qualsevol trencament en el moment de la inclusió amb la resina corresponent, de fer els talls, o durant l'exposició de la mostra al feix d'electrons.

En la majoria dels casos, la fixació per ultraestructura es fa en dos passos, un primer on es fixa amb glutaraldehyd i una concentració inferior de formaldehyd, que permet una fixació inicial més ràpida ja que el formaldehyd penetra més fàcilment que el glutaraldehyd en els teixits (Karnovsky, 1971). Després, es procedeix a una segona fixació amb tetraòxid d'osmi que entre d'altres accions, afavoreix la preservació de les membranes (reaccionant amb els lípids) i glicògen.

1.- Es vàrem submergir les porcions de gònada en un vialet que contenia aproximadament 4 vegades el volum de la mostra en la solució fixadora primera:

- 2.5% Glutaraldehyd
  - 2% Paraformaldehyd
  - en tampó cacodilat 0.1M a pH 7.4
- i ho vàrem deixar tota la nit a 4°C

*(Nota: la fixació primera hauria de ser d'un mínim de 4hores).*

2.- Per tal d'eliminar el fixador, procedirem fent un mínim de 3 a 4 rentats amb tampó cacodilat 0.1M pH 7.4 de 5 min. cada un.

*Nota: És preferible fer més rentats curts que no pas pocs rentats i més llargs.*

#### **FIXACIÓ 2ª:**

El tetraòxid d'osmi (sovint anomenat erròniament "osmi"), actua com a segon fixador reaccionant en primer lloc amb els lípids. Els greixos insaturats s'oxiden amb el tetraòxid d'osmi i aquest es redueix a osmi metàl·lic; això afegeix densitat i contrast a la mostra. També s'han descrit altres tipus de reaccions del tetraòxid d'osmi que expliquen l'estabilització d'altres components cel·lulars. El tetraòxid d'osmi actua també com a mordent, és a dir com una substància que facilita possibles posteriors tincions.

3.- Per osmificar la nostra mostra després de l'últim rentat amb tampó cacodilat, cobrim la porció de gònada amb tetraòxid d'osmi a l'1%. i ho deixem entre 2 i 4 hores a 4°C.

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

4.- Procedim fent rentats amb tampó cacodilat 0.1M (3 ò 4 de 5 min. cada un d'ells).

#### **DESHIDRATACIÓ:**

Prèviament a la inclusió, és necessari deshidratar la mostra, perquè les resines són substàncies hìdrofòbiques. Habitualment, s'utilitza acetona o etanol a concentracions gradualment superiors per anar substituint també de manera gradual l'aigua, que és el component majoritari, de lluny, de les cèl·lules.

5.-Per a la deshidratació de les porcions de gònada fixades vàrem seguir la següent bateria de dilucions:

- Acetona 30%                      2 rentats de 10 min.
- Acetona 50%                      2 rentats de 10 min.
- Acetona 70%                      2 rentats de 10 min.
- Acetona 90%                      2 rentats de 10 min.
- Acetona 100%                    3 ò 4 rentats de 5 min.

#### **INCLUSIÓ:**

La infiltració de la resina dins la mostra, és un procés que reemplaça l'agent deshidratant (en aquest cas l'acetona) per la resina líquida utilitzada, de textura viscosa mentre no es polimeritzi. El dissolvent es barreja amb la resina incrementant la proporció de la resina gradualment, fins a utilitzar la resina pura. En aquest treball s'ha utilitzat com a resina l'Spurr, que és un medi d'inclusió de baixa viscositat.

6.- Així doncs, procedim després de l'últim rentat amb acetona al 100% a la inclusió, fent les següents proporcions:

- Acetona: Spurr (3:1)                      3 ò 4 hores a temperatura ambient
- Acetona: Spurr (2:1)                      1 hora a temperatura ambient.
- Acetona :Spurr (1:2)                      tota la nit a temperatura ambient.
- Spurr pur                                  6 hores
- Spurr pur                                  3 hores

*Nota: És adient que durant la infiltració els vials amb el teixit estiguin en agitació en un aparell rotatori inclinat uns 30°. Els vials han d'estar ben tancats, per tal d'evitar que vessi la resina i que entri aire durant la infiltració.*

#### **CONFECCIÓ DE BLOCS:**

L'últim pas del processament de la mostra consisteix en la confecció dels blocs: per fer-ho, s'agafen les porcions de gònada amb unes pinces i es posen en un racó d'un motlle de mides adequades. Després, amb l'ajuda d'una pipeta *Pasteur* es cobreix el motlle amb Spurr. Repetim el procediment per a cada una de les porcions de teixit fixades, i posem el motlle en una estufa a 70°C durant dos o tres dies perquè la resina polimeritzi poc a poc i es confeccionin els blocs.

#### **III.3.13.2.2. Fixació, inclusió i tractament de mostres per a immunolocalització**

Per a l'estudi amb els anticossos i fer les immunolocalitzacions les porcions de gònada es van fixar amb un fixador més suau i incloure també en una resina menys agressiva per a la cèl·lula de manera que els epítops puguin ser reconeguts per els seus anticossos.

Es va procedir de la següent manera:

- 1.- El tampó de **fixació** és: - paraformaldehid al 4% i glutaraldehid al 0.1% en tampó cacodilat 0.1M pH: 7,4. Es van deixar les mostres en aquest fixador durant 3 hores a 4°C.
- 2.- Després es va eliminar el fixador i es varen deixar les mostres durant alguns dies en paraformaldehid al 4%.
- 3.- Es va procedir fent varis rentats amb cacodilat 0.1M per tal d'eliminar completament el fixador,
- 4.- I es varen tractar les mostres amb Clorur d'amoni 150mM en cacodilat 0.1M pH 7,4.

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

*Nota: El tractament amb Clorur d'amoni, bloqueja els grups aldehids lliures que s'han produït durant la fixació.*

5.- Després seguim amb rentats (2 ò 3) amb tampó cacodilat 0.1M.

6.- La **deshidratació** es va realitzar mitjançant la metodologia del PLT (*Progressive Lowering Temperature*) (Carlemalm et al., 1982).

7.- La **inclusió** es va fer amb la resina Lowicryl K4M (Kellenberg et al., 1980; Carlemalm et al., 1985). I la polimerització de la mostra es va realitzar a -35°C i amb llum ultraviolada a 360nm.

Aquests procediments es van seguir per a les gònades i epidídims de *S.officinalis* i *O. vulgaris*. Als Serveis Científico-tècnics de l'Hospital Clínic (Facultat de Medicina de la UB), ens varen fer els talls semi-fins de 0.5µm de gruix amb un ultramicrotòtom Ultracut E i una ganiveta de vidre.

Els talls ultrafins, de 70-90nm de gruix, es van obtenir amb l'ultramicrotòtom Ultracut UCT i ganiveta de diamant (de Diatome). Les seccions es van recollir sobre reixetes d'or amb membrana de formvar.

Les observacions es varen fer en un microscopi electrònic de transmissió Hitachi 4-600 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japó).

#### *Tractament de les mostres per immunolocalització*

Per a la localització de la histona H2A i el precursor de la protamina, es va procedir a fer les incubacions a les reixetes que contenen els talls ultrafins, posicionades cap per avall, amunt la gota del tampó amb què s'incuba en cada pas. El procediment es fa a temperatura ambient :

1.- Comencem per **bloquejar** les reixetes les reixetes en:

- BSA 4% (w/v)
  - 1% (v/v) Serum de cabra (Normal Goat Serum)
  - Glicina 20mM
  - 0.1% (w/v) Tween-20
  - en PBS 0,1M pH 8.5
- Durant 30 min. a temperatura ambient.

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

*Nota: Els fixadors que contenen grups aldehids com és el glutaraldehid deixen aquest grup funcional lliure, que és molt actiu i té tendència a reaccionar les proteïnes del teixit. Per evitar que això passi, hem tractat ja després de la fixació la mostra amb Clorur d'amoni; ara en el pas del bloqueig de la mostra la presència de glicina i del detergent tween-20 ajuden a reduir aquestes interaccions inespecífiques. Addicionalment, el pH més elevat (el pH estàndard és de 7.4) ajuda a disminuir l'afinitat de les partícules d'or conjugades amb l'anticòs secundari per la cromatina de l'espermàtida, especialment en estadis més avançats, on és cada vegada més electrodensa.*

2.- El pas immediatament després del bloqueig és la incubació amb les solucions que contenen els **anticossos primaris** a la dilució adequada. Després de varies proves en la dilució dels nostres anticossos varem utilitzar:

- Per l'anti-serum de la histona H2A: 1:500
- Per al precursor de la protamina: 1:400; 1:600 i 1:1000, en ambdós casos la solució de dilució dels anticossos va ser:
  - 4% (w/v) BSA
  - 1% (v/v) Serum de cabra
  - 0.1 % (w/v) Tween-20
  - en PBS 0,1M a pH 8.5

La incubació amb els anticossos es varen fer durant 2 hores a temperatura ambient.

3.- Després procedim, abans de la incubació amb l'anticòs secundari 3 ò 4 rentats de 5 min. cada un amb PBS 0.1M pH 8.5 per tal d'eliminar bé les restes d'anticòs primari de la mostra.

4.- Seguidament fem la incubació amb l'**anticòs secundari**: en el nostre cas que tant per a la histona H2A com per el precursor de la protamina (que tots dos són anticossos policlonals generats a partir de conill) varem utilitzar l'anticòs secundari *goat anti-rabbit* conjugat amb una partícula d'or coloidal de 15nm, a una dilució 1:25 i amb la mateixa solució de dilució que la de l'anticòs primari. Per a l'anticòs secundari es fa una incubació d'1 hora a temperatura ambient.

### III.MATERIAL I MÈTODES

---

5.- Després fem 4 ò 5 rentats de 5 min. cada un de les reixetes a temperatura ambient amb PBS 0.5M pH 8.5.

6.- Finalment, fem 4 rentats més també de 5 min. cada una amb aigua milliQ.

*Nota: L'últim rentat amb l'aigua es fa agafant la reixeta amb les pinces i tirant un chorro directe damunt la reixeta.*

7.- Prèviament a la observació de les mostres al microscopi electrònic es contrasten les reixetes amb acetat d'uranil al 2% durant 15 min. i amb citrat de plom durant 5 min.