

III.MATERIAL I MÈTODES

III.1.-Material general utilitzat

Els instruments utilitzats en el laboratori per realitzar la part experimental són:

Accessori controlador de temperatura Peltier de doble cel·la , Varian Cary
Agitador horitzontal MAGNA AS-15
Agitador magnètic DINKO, model D
Agitador vòrtex VELP scientifica; model 2X3
Autoclau DARLAB
Bany Termostàtic d'aigua DARLAB
Bany Termostàtic d'aigua Digiterm 300542, connectat mitjançant tubs a les dues cel·les del espectrofotòmetre.
Balança SCALTEC SAS 61
Balança Precisa QUALITY
Bloc tèrmic; Grant Boeckel.
Bomba de Buit DINKO D-95
Cabina de Seguretat Biològica de Fluxe Laminar Classe II (NuAIRE)
Centrífuga d'Eppendorfs ORTO-ALRESA; BIOGEN
Centrífuga de Falcons i Eppendorfs amb controlador de temperatura; ORTO-ALRESA; DIGICEN-R.
Centrífuga Kubota 6500, rotor AG 506R
Dipòsit GT35 de Nitrogen líquid Air Liquide
Espectrofotòmetre UV-Vis Varian, model Cary 1E
GRAMS/32 program; Galactic Industries, versió 4.01.
Làmpades amb filtres vermells KODAK 2 safe light
Màquina de gel Teuro's
Microscopi Invertit Olympus, Model CK30
pHmetre Hanna Instruments; Model pH213
Plaques de cultiu cel·lular 90 mm de diàmetre; NUNC, Brand Products.
Sistema Desionitzador MilliPore
Termociclador Gene Cyclor™, BioRad
Ultracentrifuga Preparativa Optima LE-80K; Beckman Coulter™
Water-Jacketed US Autoflow Automatic CO₂ Incubator (NuAIRE)

III.2.-Mètodes utilitzats per a l'obtenció, purificació i caracterització de rodopsines de ROS i recombinants.

III.2.1.-Obtenció de rodopsina a partir de retines bovines

Seguint un procediment llarg i complexe es purifica la rodopsina a partir de retines. Aquest passos s'esquematitzen en la figura 3.1.

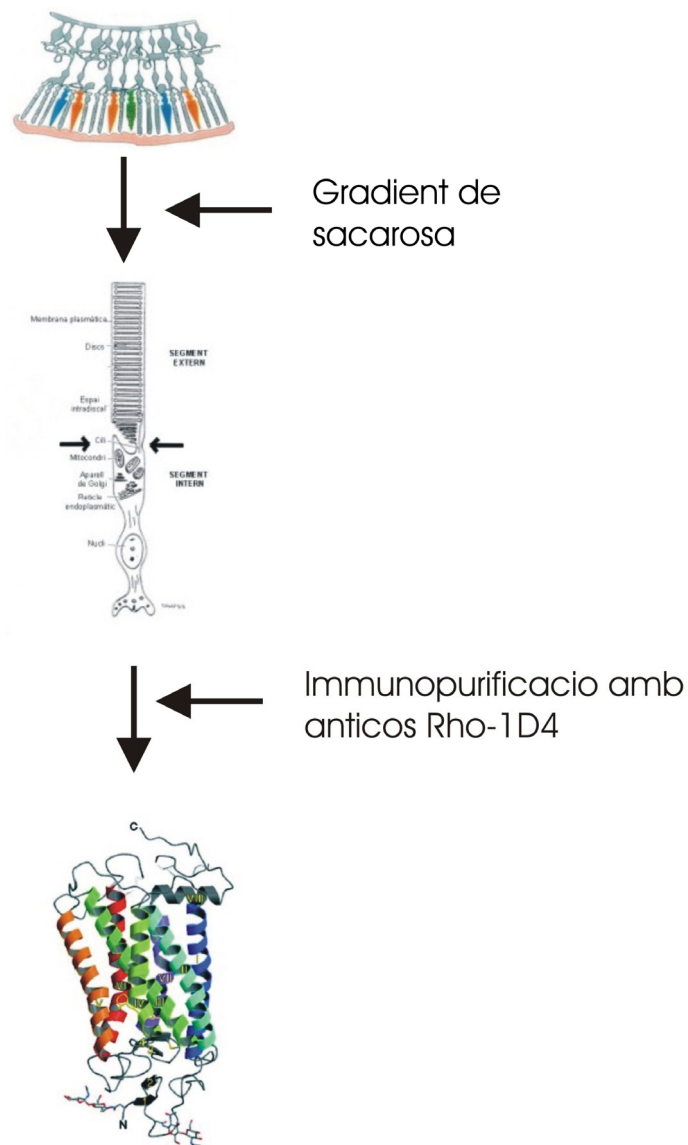


Fig 3.1: Esquema general del procés de purificació de rodopsina a partir de retines.

III.2.1.1-Extracció de ROS a partir de retines bovines

Pels experiments s'utilitza rodopsina bovina que presenta un 93.4% d'identitat respecte la rodopsina humana (Nathans i Hogness, 1984). La rodopsina representa el 80% de la proteïna present en la membrana dels discs i el 60% del total present en la membrana plasmàtica de ROS (Molday, 1998) i excedeix en una relació molar de 100:1 o més a la resta de proteïnes presents en ROS. El protocol de purificació que se segueix és una modificació del proposat per Papermaster i Dreyer (Papermaster i Dreyer, 1974) (Fig. 3.1).

Material i equipament utilitzat

1-100 retines bovines (mantingudes a -80°C i proporcionades per Lawson and Co. Ltd), xeringa, agulla de 0.7mm x 80mm, homogeneïtzador de vidre o *pestle* i agulla de 21G. Tris (hidroximetil) aminoetà) (Tris (Panreac), MgCl_2 (Sigma), sacarosa (Sigma), àcid etilendiamintetracètic (EDTA (Sigma)), KH_2PO_4 (Sigma) i $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma).

2-Les solucions utilitzades són: tampó d'extracció (70 mM tampó fosfat potassi i 0.1mM EDTA; pH 6.9), tampó hipotònic (5mM Tris-HCl) pH 7.5 i 0.5 mM MgCl_2), solucions pel gradient de sacarosa al 30%, 15%, 0.64M, 0.78M, 1.00M i 1.20M en tampó d'extracció preparades a 4°C .

3-Rotor JA 25.50 (Beckman-Coulter), rotor T865 (Sorvall) i rotor AH629 (Sorvall) i centrífuga Beckman-Coulter i ultracentrífuga Sorvall model Combi Plus.

Procediment experimental

El procés es realitza a 4°C i amb filtre de llum vermella kodak n^o2.

1-Es descongelen 100 retines tota la nit a 4°C .

2-Les retines es resuspenen en 80 ml de sacarosa 30%, s'agiten de forma vigorosa i es centrifuguen a 3000 gravetats (*g*) durant 5 min en el rotor JA 25.50. Es guarden els sobrenedants (SN), recollint-los amb molta cura per què el *pellet* està poc enganxat al fons del tub. L'agitació vigorosa permet trencar els

bastons pel cil·lium i separa el ROS del segment intern. Amb la centrifugació es separa el ROS parcialment de la resta de retina.

3-Els *pellets* es resuspenen amb un volum final de 80 ml de sacarosa 30%. Es centrifuga 5 min a 3000g en el rotor JA 25.50 i es guarda el SN.

4-Els SN es dilueixen amb un volum de tampó d'extracció i la barreja es centrifuga a 25000g durant 10 min en el rotor JA 25.50.

5-Es decanta el SN, es resuspen el *pellet* amb sacarosa 15% i s'homogeneitzen amb el *pestle* i 3 vegades amb xeringa i agulla de 21G.

6-El resuspès es reparteix amb molta cura en tubs que contenen sacarosa 0.64M i es centrifuga durant 10 min a 25000g en el rotor JA 25.50. El SN es decanta i es resuspenen els *pellets* amb sacarosa 0.64 M mitjançant una xeringa amb agulla de 0.7mm x 80mm, el *pestle* i 3 vegades amb xeringa i agulla de 21G.

7-El resuspès es reparteix en tubs de polietilè que contenen un gradient de diferents concentracions de sacarosa (0.78M, 1.00M i 1.2M). Es centrifuga durant 45 min a 100000g sense fre i en el rotor basculant AH629. Immediatament i evitant qualsevol moviment brusca es recupera la banda entre 0.78M i 1.00 M amb l'ajut d'una pipeta pasteur (vegeu Fig. 3.2). Si la mostra s'ha manipulat correctament i s'han mantingut les condicions en fosc, aquesta banda ha de ser vermella i en teoria hauria de contenir el 90% de rodopsina present en la retina (Papermaster i Dreyer, 1974).

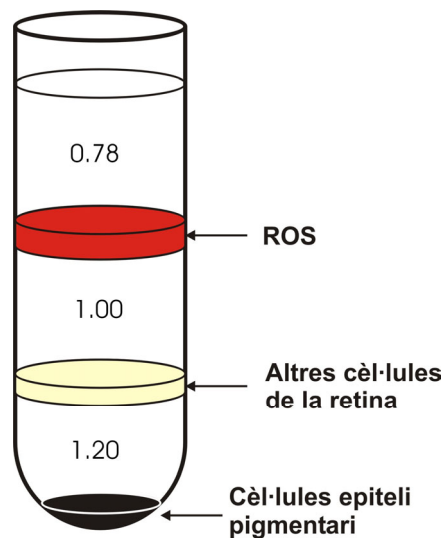


Fig. 3.2: Gradient de sacarosa després de la centrifugació durant el procés d'extracció de ROS.

8-Les bandes es dilueixen en 160 ml de tampó d'extracció, es reparteix la barreja en tubs i es centrifuga a 40000g durant 30 min en el rotor T865.

9-Es decanten els SN i els *pellets* es resuspenen amb xeringa i agulla de 0.7mm x 80mm, el *pestle* i 3 vegades amb xeringa i agulla de 21G en tampó d'extracció, la barreja es centrifuga a 90000g durant 30 min en el rotor T865.

10-El pas 9 es repeteix dues vegades més.

11-El SN es descarta i els *pellets* es guarden tapats amb paper d'alumini en gel tota la nit i a 4°C.

12-Els *pellets* s'homogeneïtzen amb tampó hipotònic de la mateixa manera que les vegades anteriors (vegeu pas 9). Es centrifuguen durant 30 min a 162000g i 4°C en el rotor T865. Es decanta el SN i es repeteixen la homogeneïtzació dels *pellets* i la centrifugació dues vegades més. Es descarten els SN i s'homogeneïtzen els *pellets* amb tampó d'extracció.

13-El resuspès es centrifuga a 25000g durant 20 min en el rotor T865. Es descarta el SN i es repeteix la homogeneïtzació amb el tampó d'extracció (tal i com s'ha explicat en el pas 9). Finalment, els *pellets* es resuspenen amb tampó d'extracció. Es guarden amb paper d'alumini a -20°C.

III.2.1.2.-Solubilització de ROS

La solubilització de ROS es realitza amb detergent, que permet disgregar les membranes de ROS en petites vesícules formades per membrana lipídica, detergent i rodopsina i facilita l'estudi espectroscòpic de la proteïna. S'han utilitzat diversos detergents, com el CHAPS, detergent carregat negativament (Oprian *et al.*, 1987), la digitonina i el dodecil maltòsid (DM) (Franke *et al.*, 1992) que és un detergent suau que permet solubilitzar a la rodopsina en micel·les mantenint a determinades concentracions algunes funcions concretes de la proteïna (DeGrip i Bovee-Geurts, 1979; Ramon *et al.* 2003).

Material i equipament utilitzat

1-Mostra de ROS, DM (Anatrace) i tampó d'extracció (70 mM Tampó fosfat potassi + 1mM EDTA; pH 6.9)

2-Rotor Ti50 (Beckman Coulter)

Procediment experimental

Es realitza en fosc i mantenint les mostres en gel.

1-Es prenen 100 µl de ROS i es dilueix amb 800 µl de tampó d'extracció i 100 µl de DM 10% i s'incuba durant 1 h a 4°C en agitació.

2-La mostra es centrifuga durant 30 min a 35000 revolucions per minut (rpm) i 4°C.

3-Es fa un espectre de la mostra solubilitzada (vegeu apartat **III.2.5.2**) i es calcula la concentració de proteïna i la relació A_{280nm}/A_{500nm} . Utilitzant la llei de Lambert-Beer (vegeu l'apartat **III.2.5.1**) es pot calcular la quantitat de ROS en 100 retines.

III.2.1.3.-Rentat amb urea

Un cop obtinguda la mostra de ROS solubilitzada, es fa un espectre i es calcula la relació entre l' A_{280nm}/A_{500nm} . Si aquesta és superior a 3,0, es pot augmentar l'eficiència de la purificació mitjançant un rentat amb urea que consisteix en fer rentats a la mostra de ROS purificada amb una solució d'urea per tal d'obtenir una *ratio* A_{500}/A_{380} inferior a 3, ja que desnaturalitza proteïnes unides de forma inespecífica a la membrana.

Material i equipament utilitzat

1-ROS, TrisHCl 1 M pH=8 (Sigma), TrisHCl 50 mM pH=8 (Sigma), tampó d'urea (50 mM TrisHCl pH=8 + 5M Urea (Amresco) + 5mM EDTA (Amresco), tampó 70 mM fosfat potassi i 0.1mM EDTA; pH 6.9 i fluorur de fenilmetilsulfonil (PMSF; Sigma).

2-Xeringa, agulla de 0.7mm x 80mm, homogeneïtzador de vidre o *pestle* i agulla de 21G.

3- Les centrifugues i els rotors utilitzats en l'apartat **III.2.1.1**.

Procediment experimental

Tot el procediment es realitza a 4°C i en foscor.

1-El ROS obtingut anteriorment (apartat **III.2.1.1**) es centrifuga durant 20 min a 30.000 rpm.

2-Es guarda el SN i es resuspen el *pellet* amb tampó d'urea amb xeringa i agulla de 0.7mm x 80mm.

3- La mostra s'incuba durant 1 h agitant diverses vegades.

4-Per tal de diluir l'urea, es barreja la mostra amb TrisHCl 50 mM pH=8 i es centrifuga a 35.000 rpm durant 30 min.

5-El SN es decanta i el *pellet* es resuspen amb TrisHCl 50 mM pH=8 amb l'ajut d'una xeringa, s'homogeneitza amb el *pestle* i després es disgrega la mostra 3 vegades amb una xeringa.

6-Es repeteix el pas anterior dues vegades més.

7-Es resuspen el *pellet* amb tampó 70 mM tampó fosfat de potassi i 0.1mM EDTA; pH 6.9 que conté 0.1 mM de PMSF.

8-Es realitza un espectre de la mostra solubilitzada (vegeu apartat **III.2.5.2**).

A partir de ROS obtinguda de les retines es pot purificar rodopsina mitjançant cromatografia d'immunoafinitat utilitzant una sefarosa acoblada a un anticòs que reconeix a rodopsina.

III.2.1.4.-Acoblament de l'anticòs Rho-1D4 a sefarosa

Aquest procés ens permetrà obtenir una reina de sefarosa acoblada a l'anticòs Rho-1D4. Aquest s'uneix específicament als últims 9 aminoàcids de la rodopsina (Thr-Glu-Thr-Ser-Gln-Val-Ala-Pro-Ala) (Molday i MacKenzie, 1983).

La matriu utilitzada és de sefarosa que és un derivat glucosídic i per si mateixa no té la capacitat d'unió a l'anticòs, sinó que requereix de determinats grups funcionals per acoblar-lo. S'ha descrit una manera d'activar la sefarosa amb bromur d'etidi (Cuatrecasas *et al.*, 1968) i actualment també s'utilitzen derivats éster N-hidroxisuccinimida de l'agarosa (Rosenberg, 1996).

La reina obtinguda ens permetrà purificar la rodopsina mitjançant cromatografia d'immunoafinitat.

III.2.1.4.1.-Diàlisi de l'anticòs Rho-1D4

L'anticòs Rho-1D4 reconeix els últims 9 aminoàcids de l'extrem C-terminal de la rodopsina i es troba en una solució que no permet una unió correcta a la sefarosa, per aquest motiu prèviament es dialitza.

Material utilitzat

- 1-Anticòs Rho-1D4 (proporcionat pel National Cell Culture Facilities (USA)) i tampó d'acoblament (0.25M NaHCO₃ (Sigma) + 0.9M NaCl (pH=9) (Sigma)).
- 2-Sac de diàlisi mitjà amb *cut off* de 12-14 Da (Medicell International Ltd)

Procediment experimental

- 1-Es calcula la concentració de l'anticòs realitzant un espectre de la proteïna (vegeu apartat **III.2.5.2.**) i utilitzant la llei de Lambert-Beer.
- 2-Es transfereix l'anticòs al sac de diàlisi mitjà i es col·loca en una proveta que conté un agitador magnètic i uns 500 ml de tampó d'acoblament. S'incuba unes 2 h a 4°C.
- 3-Es canvia el tampó i es deixa el sac de diàlisi amb tampó d'acoblament nou tota la nit a 4°C.
- 4-Es fan dos canvis més de tampó d'acoblament, de 2 o 3 h cadascun.
- 5-Finalment, es treu el sac de la proveta i amb una pipeta pasteur es recupera tot l'anticòs del sac. Es fa un espectre d'una dilució 1:10 per tal de calcular la quantitat d'anticòs i realitzar l'acoblament amb la sefarosa.

III.2.1.4.2.-Acoblament de l'anticòs Rho-1D4 a sefarosa

Material utilitzat

- 1-Anticòs Rho-1D4 dialitzat (vegeu apartat anterior) i sefarosa 4B activada amb bromur de cianògen (Sigma).
- 2-Embut filtrant SCHOT DURAN (150 ml), kitasatos i sistema per a fer el buit.

3-Les solucions emprades són: tampó d'acoblament (0.25M NaHCO₃ (Sigma) + 0.9M NaCl (pH=9) (Sigma)), tampó de rentat (1 mM HCl (pH 2-3), agent de bloquejament (0.2M Glicina (pH=8.0) (Sigma)), tampó de rentat final (1) (0.1M tampó d'acetat pH=4.0 (0.2M Acid Acètic (Sigma) + 0.2M Acetat d'anhidrid sòdic (Sigma), pH=4.0) + 0.5M NaCl), tampó de rentat final (2) (0.1M TrisHCl(pH=8) (Sigma)+ 0.5M NaCl), tampó d'emmagatzematge (2mM NaH₂PO₄ (pH=6) (Sigma)+ 0.001% Azida sódica (Sigma)) i àcid nítric (MERCK).

Procediment experimental

Com a precaució i per evitar possibles contaminants, es rentarà tot el material que estarà en contacte directe amb la sefarosa amb àcid nítric al 10% tota la nit o el cap de setmana i posteriorment s'esbandirà diverses vegades amb aigua destil·lada.

1-A partir del càlcul de la concentració de l'anticòs (vegeu apartat **III.2.1.4.1**), es pot determinar la quantitat de sefarosa necessària per a l'acoblament seguint la relació 1 g/3.5ml de gel i 10 mg d'anticòs/ml de gel.

2-En un vas de precipitats es posa la quantitat de sefarosa calculada i s'infla amb un volum de gel de tampó de rentat barrejant amb una vareta de vidre. Aquest procés ha de durar uns 15 min.

3-La sefarosa inflada es renta amb tampó de rentat (un màxim de 200 ml tampó/g de sefarosa) durant 30 min dins l'embut filtrant connectat al buit.

4-Es renta la reina amb 2 volums de gel de tampó d'acoblament i amb l'ajut d'una espàtula es posa la sefarosa en un tub que conté l'anticòs Rho-1D4 i s'incuba en agitació tota la nit a 4°C. Aquest pas també es pot fer durant 2h a temperatura ambient.

5-La barreja sefarosa-anticòs es passa a l'embut filtrant i es renta amb 5 volums del gel de tampó d'acoblament per eliminar l'anticòs no unit.

6-Els grups de bromur de cianògen encara actius de la sefarosa s'inactiven incubant la barreja anticòs-sefarosa amb agent de bloqueig durant 2h en agitació a temperatura ambient.

7-La sefarosa tractada es filtra en l'embut i s'alternen 6 cicles amb 5 volums de gel del tampó de rentat final (1) i del tampó de rentat final (2) agitant suaument la reïna amb una vareta de vidre.

8-Es transfereix la sefarosa acoblada a un volum de gel del tampó d'emmagatzematge i es guarda a 4°C.

III.2.1.4.3.-Determinació de la capacitat d'unió de la reïna acoblada

Aquest procediment permet calcular la quantitat de rodopsina, en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, que pot unir la sefarosa acoblada en l'apartat anterior.

La unió de la rodopsina a la reïna és específica, per tal d'eluir-la s'usarà un pèptid format pels últims 9 aminoàcids de la rodopsina, que són els mateixos en els que s'uneix l'anticòs.

Material utilitzat

1-Mostra de ROS solubilitzada anteriorment, sefarosa acoblada prèviament a l'anticòs Rho-1D4 i pèptid 9-mer (proporcionat pel laboratori Síntesi de Pèptids de la Facultat de Químiques de la Universitat de Barcelona).

2-El tampons usats són: tampó C (KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2HPO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM equilibrat a $\text{pH}=7.2 + 0.05\%\text{DM}$), tampó D (Na_2HPO_4 2mM $\text{pH}=6$ (Sigma), DM 0.05%), tampó C + 100 μM pèptid, tampó D + 100 μM pèptid i tampó E (Tampó D + 150mM NaCl (Sigma) + 0.05%DM).

Procediment experimental

1-Es solubilitza una mostra de ROS (explicat en l'apartat **III.2.1.2**) i es fa un espectre del SN de la proteïna solubilitzada (vegeu apartat **III.2.5.2**). Utilitzant la llei de Lambert-Beer es calcula la concentració i els μg de rodopsina que hi ha a la mostra inicial (vegeu apartat **III.2.5.1**)

2-El SN s'incuba amb 200 μl de reïna acoblada durant 2h a 4°C en agitació.

3-La barreja es centrifuga durant 3 min a 3000 rpm i 4°C i es pren el SN per a fer un espectre i es calcula la quantitat de proteïna no unida a la reïna.

4-Es resuspèn la reina amb 1 ml de tampó C i es centrifuga a 3000 rpm i 4°C durant 3 min i es decanta el SN. Es repeteix aquest pas una altra vegada.

5-Es resuspèn la reina amb 1 ml de tampó D i es centrifuga a 3000 rpm i 4°C durant 3 min. Es repeteix aquest pas una altra vegada.

6-La reina es resuspèn amb 1 ml de tampó D + 100 µM pèptid 9-mer i s'incuba en agitació durant 30 min a 4°C. Es centrifuga la mostra 3 min a 3000 rpm i 4°C i es fa l'espectre del SN.

7-Es repeteix el pas 6, sis vegades més utilitzant 500 µl del tampó D + pèptid.

8-Finalment es resuspèn la reina amb 500 µl amb tampó E i s'incuba durant 30 min a 4°C. Es centrifuga en les mateixes condicions anteriors i es fa espectre del SN.

III.2.1.5.-Purificació de rodopsina de ROS

En aquest procediment es purifica rodopsina de ROS un cop s'ha determinat la capacitat d'unió de la reina.

Material utilitzat

1-El material utilitzat és el mateix que el descrit en **III.2.1.4.3**.

Procediment experimental

1-Es solubilitza una mostra de ROS (explicat en l'apartat **III.2.1.2**) i es fa un espectre del SN de la proteïna solubilitzada (vegeu apartat **III.2.5.2**).

2-El SN s'incuba amb 150 µl de reina acoblada durant 2h a 4°C en agitació.

3-La barreja es centrifuga durant 3 min a 3000 rpm i 4°C i es descarta el SN.

4-Es resuspen la reina amb 1 ml de tampó C i es centrifuga a 3000 rpm i 4°C durant 3 min i s'aspira el SN. Es repeteix aquest pas una altra vegada.

5-Es resuspen la reina amb 1 ml de tampó D i es centrifuga a 3000 rpm i 4°C durant 3 min, s'aspira el SN i es repeteix aquest pas una altra vegada

6-La reina es resuspen amb tampó D + 100 µM pèptid i s'incuba en agitació durant 30 min a 4°C. Es centrifuga la mostra 3 min a 3000 rpm i 4°C i es fa l'espectre del SN.

7- Es repeteix el pas 6 fins que en l'espectre dels SN ja no hi observem una banda a $\lambda=500\text{nm}$.

III.2.2.-Material biològic procariota utilitzat per a l'obtenció de DNA recombinant

El vector que conté el gen de la rodopsina és amplificat en les cèl·lules DH5 α , una soca d'*E. coli* àmpliament utilitzada en biologia molecular. Aquestes cèl·lules són preparades prèviament per a que puguin introduir el vector mitjançant un xoc tèrmic.

E. coli és un bacteri aerobi que creix en diversos medis de cultiu com el Luria-Bertani i el medi enriquit Terrific broth, en el nostre cas creixeran en el també medi ric *2 x yeast extract triptone* (2YT, veure la composició en l'**annex 1.1**).

III.2.2.1.-Creació de cèl·lules DH5 α competents

Aquest protocol ens permetrà preparar cèl·lules per a que puguin captar DNA exògen mitjançant un xoc tèrmic (Mandel i Higa, 1970). S'utilitza CaCl₂, que altera la membrana de la cèl·lula, fent-la més permeable.

Material utilitzat

1-Cèl·lules *E.coli* DH5 α (Invitrogen).

2-CaCl₂ 50 mM estèril, glicerol estèril, medi 2YT (vegeu **annex 1.1**).

Procediment experimental

Tot el procés es realitza en condicions estèrils.

1-S'incuba tota la nit (entre 12 i 16 h) 10 μl de cèl·lules DH5 α en 50 ml de medi 2YT a 37°C i 250 rpm.

2-S'inoculen 2 ml del cultiu nocturn i es fa créixer en 100 ml de 2YT a 37°C i 250 rpm durant 2 h i 30 min.

3-El cultiu és incubat durant 30 min en gel i a 4°C per tal d'aturar el creixement bacterià i es centrifuga durant 10 min a 0°C i 3000 rpm.

4-El SN es descarta i es resuspenen les cèl·lules amb 50 ml de CaCl₂ 50 mM amb una l'ajut d'una pipeta. S'incuben les cèl·lules durant 1 h en gel i 4°C.

5-Les cèl·lules es centrifuguen durant 10 min a 0°C i es descarta el SN. Es resuspen el *pellet* amb 10 ml de CaCl₂ 50mM que conté un 20% de glicerol.

6-S'incuben les cèl·lules d'entre 2 a 3 h en gel i a 4°C, s'aliuquen en eppendorfs de 650 µl en 650 µl i es mantenen a -80°C.

III.2.2.2.-Transformació de les cèl·lules *E.coli* DH5α competents

El protocol de transformació és el que ens permet introduir el vector pMT4 a les cèl·lules competents preparades prèviament. La tècnica es basa en aplicar un xoc tèrmic a les cèl·lules i permetre l'entrada del DNA dins les cèl·lules. Aquest protocol en uns principis es va utilitzar per a la transformació de DNA del fag λ (Mandel i Higa, 1970) però posteriorment es va realitzar ja amb DNA extracromosòmic (Cohen *et al.*, 1972) i en DNA cromosomal d'*E.coli* (Oishi i Cosloy, 1972) .

El vector pMT4, que conté el gen de l'opsina (vegeu apartat **III.2.4.2**), té a més a més un gen de resistència a l'ampicil·lina. Per a seleccionar les cèl·lules que han introduït el vector s'utilitzarà medi que contingui aquest antibiòtic.

Material utilitzat

1-Cèl·lules DH5α competents.

2-Nansa de digraslky i plaques de petri de 90 mm que contenen 2YT + ampicil·lina, medi 2YT, medi 2YT + ampicil·lina (sòlid) (vegeu **annex 1.1** i **1.2**).

Procediment experimental

1-Es descongelen les cèl·lules DH5α competents en gel.

2-Es barreja 1 o 2 µg del DNA d'interès amb 300 µl de cèl·lules competents i s'incuben 30 min en gel i a temperatura ambient.

3-El xoc tèrmic de les cèl·lules es fa a 42°C durant 45 s i es tornen a incubar les cèl·lules durant 2 min en gel.

4-Les cèl·lules es dilueixen en 500 µl de medi 2YT i s'incuben durant 1 h a 37°C i 250 rpm.

5-Es centrifuguen les cèl·lules durant 2 min a 4°C i 3000 rpm i es descarta part del SN.

6-Les cèl·lules es resuspenen amb l'altra part del SN i es sembren per extensió mitjançant una nansa de digralsky en una placa que conté 2YT + Ampicil·lina.

7-Les colònies es deixen créixer entre 12 a 16 h a 37°C en la placa invertida.

III.2.2.3.-Purificació de DNA plasmídic a petita escala

Un cop hem obtingut colònies de la transformació cal comprovar si el DNA introduït pels bacteris és el vector pMT4. Per aquest fet es realitzarà una *miniprep*, que consisteix en la purificació de DNA plasmídic a petita escala, és a dir, a partir d'uns mil·lilitres de cultiu s'obindrà la quantitat necessària de DNA per comprovar que conté el gen d'interès mitjançant digestions amb enzims de restricció i posterior seqüenciació.

Material utilitzat

1-Medi 2YT (composició a l'**annex 1.1**), ampicil·lina (100mg/ml (USB)), Tris (Panreac), EDTA sal disòdica (Sigma), NaOH (Panreac), HCl (Fluka), Dodecil Sulfat sodi (SDS, *sodium dodecyl sulfat*) (AMRESCO), acetat de potassi (Sigma), àc. acètic glacial (Fluka), NaCl (Panreac) i etanol (Baker). A més a més els enzims de digestió EcoRI i Sall i els correponents tampons (AmershamBiosciences) .

2-Cistelletes del kit de Miniprep MoBiolab.

3-Es preparen les solucions següents: solució 1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA sal disòdica (pH 8.0) i afegir 100 mg de RNasa (Sigma) en 1 litre), solució 2 (200 mM NaOH, 1% SDS), solució 3 (1 M acetat de potassi, ajustar a pH 5 amb àcid acètic glacial), solució 4 (Tris 10 mM pH 7.0, 1 M NaCl i 50% Etanol) , solució 5 (10 mM Tris pH 7.0) i la solució de Tris EDTA (Tris 10 mM i 0.1 mM EDTA).

Procediment experimental

- 1-Es prenen les colònies crescudes (vegeu **III.2.2.2.**) en la placa i s'inoculen en 6 ml de 2YT + 100µg/ml d'ampicil·lina. S'incuben durant 8 h a 37°C en agitació a 250 rpm.
- 2-Es reparteix el cultiu en 3 eppendorfs de 2 ml i es centrifuguen 6 min a 12000g i temperatura ambient.
- 3-Es descarta part del SN i la resta l'utilitzarem per ajuntar les cèl·lules en un únic tub. Es centrifuga el tub per descartar tot el SN.
- 4- Es resuspenen les cèl·lules amb 50 µl de la solució 1 mitjançant vòrtex.
- 5-Es posen 100µl de solució 2 i s'agita el tub invertint-lo diverses vegades.
- 6-Es posen 325 µl de solució 3 i s'agita diverses vegades per inversió.
- 7-Es centrifuga el tub a 12000g i a temperatura ambient durant 6 min. Es transfereix el SN a un tub que conté un filtre i es centrifuga 1 min.
- 8-Es descarta l'eluit i es posen 300 µl de solució 4 es centrifuga durant 1 min a temperatura ambient.
- 9-La cistella que conté el filtre es canvia a un tub nou i es posen 50 µl de solució 5. Es centrifuga el tub durant 1 min a temperatura ambient.
- 10-Es posen 100µl d'etanol 100% fred i 2 µl de NaCl 5M. Es centrifuga 15 min a 12000g i temperatura ambient.
- 11-El SN es descarta i el *pellet* s'asseca a temperatura ambient durant 30 min. Es resuspen el DNA amb 20µl d'aigua milliQ.
- 12-Es prenen 5 µl del DNA purificat i es realitza una digestió amb els enzims de digestió EcoRI i SalI (que tallen als extrems del gen de la opsina, vegeu figura **3.3**) durant 2-3 h a 37°C i es carreguen les mostres digerides i 5µl de mostra no digerides en un gel d'agarosa (vegeu **annex 4**).

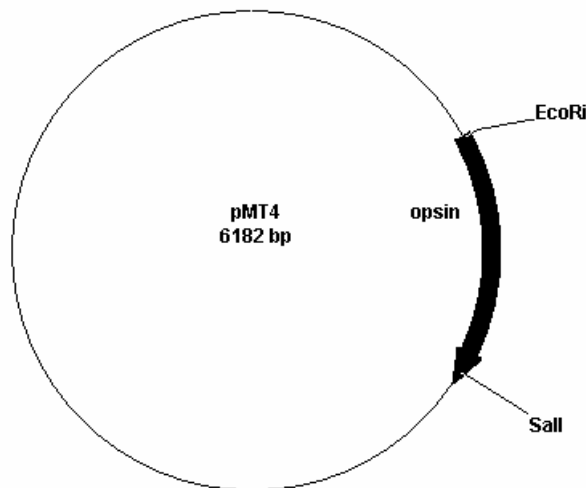


Fig. 3.3: Esquema del vector pMT4 on es mostren els llocs de tall de *EcoRI* i *SalI*.

13-S'envien 5 µl de la mostra al servei de seqüenciació (Consorti laboratori CSIC-IRTA de Genètica Molecular vegetal, Barcelona) que utilitza el mètode Big Dye (d'un 98% de fiabilitat).

III.2.2.4.-Purificació de DNA plasmídic a gran escala

Aquest protocol permet obtenir fins a milígrams de DNA a partir de 400 ml de cultiu crescut en medi ric. El DNA obtingut s'utilitzarà per a l'expressió de rodopsina en cèl·lules eucariotes.

Material i equipament utilitzat

1-Medi 2YT (composició al **annex 1.1**), ampicil·lina (100mg/ml (USB)), Tris (Panreac), EDTA sal disòdica (Sigma), NaOH (Panreac), HCl (Fluka), dodecil sulfat sodi (SDS) (AMRESCO), acetat de potassi (Sigma), àc. acètic glacial (Fluka), NaCl (Panreac), etanol (Baker) i isopropanol (Baker).

2-Es preparen les solucions següents: solució 1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA (pH 8.0) i afegir 100 mg en 1 litre), solució 2 (200 mM NaOH, 1% SDS), solució 3 (1 M acetat de potassi, ajustar a pH 5 amb àcid acètic glacial) i la solució de Tris-EDTA (Tris 10 mM i 0.1 mM EDTA).

3-Centrífuga model 6500 (Kubota) amb el rotor AG-506R.

Procediment experimental

- 1-Es pica una colònia de DH5 α que conté el DNA d'opsina d'interès (vegeu apartat **III.2.2.2**) i es deixa créixer durant 8 h a 37°C en agitació a 250 rpm en 6 ml de 2YT + 6 μ l d'ampicil·lina (100 mg/ml).
- 2-El minicultiu s'afegeix en 400 ml de 2YT + 400 μ l ampicil·lina repartit en 2 erlenmeiers de 500 ml i s'incuba tota la nit a 37°C en agitació a 250 rpm.
- 3-El cultiu es centrifuga 5 min a 6000 rpm i 4°C repartit en 6 tubs i es descarta el SN.
- 4-Es repeteix el pas 3 però no es descarta tot el SN ja que s'utilitzarà per ajuntar els *pellets* dels 6 tubs en dos. Es centrifuguen aquests dos tubs a 4°C, 6000 rpm durant 5 min.
- 5-Es descarta tot el SN i es resupenen els *pellets* amb 10 ml de la solució 1 i es vortexa per disgregar les cèl·lules.
- 6-Es posen 10 ml de la solució 2 s'agiten per inversió i s'incuben els tubs durant 5 min a temperatura ambient. S'afegeixen 10 ml de solució 3 a cada tub, s'inverteixen diverses vegades i es mantenen 20 min en gel a temperatura ambient.
- 7-Les mostres es centrifuguen durant 30 min a 20000g i 4°C. Posteriorment es filtra el SN per una gassa i es reparteix en 2 tubs.
- 8-Els tubs es centrifuguen durant 30 min, 20000g i 4°C. S'ajunten els SN en una proveta i es mesura el volum total.
- 9-Aquests SN es barregen en 0.7 volums d'isopropanol i es reparteixen en dos tubs. Les mostres es centrifuguen durant 30 min a 20000 g i 4°C.
- 10-El SN es descarta i es resuspèn el DNA en 4 ml de EtOH 70% amb una pipeta pasteur. Es reparteix en 3 eppendorfs de 2 ml.
- 11-Les mostres es centrifuguen durant 15 min a 12000g a temperatura ambient. Es descarta el SN i es deixa evaporar l'etanol restant en el tub.
- 12-Es resuspèn el DNA en 100 μ l Tris-EDTA per tub amb una pipeta i s'ajunta el contingut dels tubs.
- 13-Es llegeix l'absorbància del DNA en dilució 1/1000 a A_{260nm}. I mitjançant la relació 1 D.O_{260nm} = 50 μ g/ml es calcula la concentració del DNA en μ g/ μ l.

Les tècniques explicades en aquest apartat ens permeten purificar els DNA mutants d'opsina que s'hauran construït seguint el procediment descrit en el següent apartat.

III.2.3.-Tècniques de DNA recombinant utilitzades per a la construcció de mutants de la rodopsina

Per a la construcció dels mutants de rodopsina s'utilitzaran dues tècniques:

1. Mutagènesi de lloc dirigit
2. Mutagènesi per *cassette*

III.2.3.1.-Mutagènesi de lloc dirigit

Des del descobriment del codi genètic es va obrir una nova porta a la investigació ja que a partir del DNA aïllat es tenia el diccionari que traduïa la informació genètica a proteïnes. Posteriors descobriments com el de la DNA lligasa, que permet unir fragments de DNA, la síntesi del primer gen, la transcriptasa inversa, la seqüenciació de DNA han permès el desenvolupament de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR; *polymerase chain reaction*) que permet amplificar ràpidament un fragment de DNA. Gràcies a aquesta tècnica es varen poder desenvolupar organismes modificats genèticament incloent plantes amb resistència a virus, insectes i herbicides, amb capacitat d'emmagatzematge i algunes podien expressar proteïnes animals. També es varen desenvolupar animals transgènics que podien secretar determinades proteïnes terapèutiques. Actualment hi ha un gran nombre de publicacions en les que es construeixen mutants puntuals, mutants amb delecions i/o insercions d'una proteïna que se'n vol estudiar la relació estructura i funció, com és el cas de la rodopsina .

Els mutants d'aquesta tesi construïts per aquesta estratègia es troben a la taula

3.1.

Mutant	DNA motlle	encebadors(*)
L46R	WT	L46R1/L46R2
E247A	WT	E247A1/E247A2
E247Q	WT	E247Q1/E247Q2
T251A	WT	T251A1/T251A2
T251E	WT	T251E1/T251E2
T251K	WT	T251K1/T251K2
E134Q/T251A	E134Q	T251A1/T251A2
E134Q/T251E	E134Q	T251E1/T251E2
E134Q/T251K	E134Q	T251K1/T251K2
E247A/T251A	E247A	T251A1/T251A2
E247A/T251E	E247A	T251E1/T251E2
E247A/T251K	E247A	T251K1/T251K2
E247Q/T251A	E247Q	T251A1/T251A2
E247Q/T251E	E247Q	T251E1/T251E2
E247Q/T251K	E247Q	T251K1/T251K2
E134Q/E247A/T251A	E134Q/E247A	T251A1/T251A2
E134Q/E247A/T251E	E134Q/E247A	T251E1/T251E2
E134Q/E247A/T251K	E134Q/E247A	T251K1/T251K2
E134Q/E247Q/T251A	E134Q/E247Q	T251A1/T251A2
E134Q/E247Q/T251E	E134Q/E247Q	T251E1/T251E2
E134Q/E247Q/T251K	E134Q/E247Q	T251K1/T251K2

(*)La seqüència dels encebadors és a l'**annex 3.2, 3.3 i 3.4**.

Taula **3.1**: Mutants construïts per mutagènesi de lloc dirigit.

Per a la construcció dels mutants es segueixen les instruccions del Quickchange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Aquesta estratègia es basa en una reacció d'amplificació de DNA en la que s'utilitzen uns encebadors que contenen la mutació desitjada i així totes les cadenes sintetitzades utilitzant aquests encebadors presentaran aquesta mutació.

Les pautes a seguir són:

1-Disseny dels *primers* o encebadors:

Les pautes de construcció dels oligonucleòtids són:

a) La mida dels *primers* ha de ser entre 25 i 45 bases.

b) La T_m del oligonucleòtid ha d'esser igual o superior a 78°C . Per a calcular-la s'utilitza la fórmula següent:

$$T_m = 81.5 + 0.41 (\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$$

A on:

T_m = temperatura de fusió del oligonucleòtid

$\%GC$ = percentatge de GC que conté el oligonucleòtid

N = llargària en bases del *primer*

$\% \text{ mismatch}$ =el percentatge de canvis introduïts en la seqüència respecte la seqüència original.

c) La mutació desitjada preferiblement ha d'estar al mig del *primer* amb 10 i 15 bases correctes fins arribar als extrems de l'oligonucleòtid.

d) Els *primers* haurien de tenir com a mínim un 40% de bases GC i acabar amb 1 o 2 bases C o G. Els *primers* són sintetitzats per Operon (Izasa).

2-Els oligonucleòtids són proporcionats de forma liofilitzada i es prepara una concentració 100 ng/ μl amb aigua milliQ estèril.

3-Els diferents components es barregen en les proporcions que segueixen a continuació:

- 5 μl Tampó reacció 10X
- 1.25 μl de DNA motlle (40 ng/ μl)
- 1.25 μl del *primer* 3' \rightarrow 5' (100 ng/ μl)
- 1.25 μl del *primer* 5' \rightarrow 3' (100 ng/ μl)
- 1 μl de dNTP barreja
- 40.25 μl d'aigua milliQ estèril
- 2 μl de PfuTurbo

La barreja de reacció es realitza en eppendorfs de 200 μl i es posen dins d'un termociclador (Gene Cyclor™, BioRad).

Es posen les mostres en el termociclador quan està a 95°C i s'incuben durant 30 s a aquella temperatura. Aquest pas previ és per temperar la barreja de reacció i començar la reacció d'amplificació a 95°C . Després s'inicia pròpiament la reacció d'amplificació i es repeteixen 18 cicles ens les condicions següents:

30 s 95°C per separar els oligonucleòtids del DNA motlle i entre ells mateixos

1 min a 55°C: per a permetre la unió dels oligonucleòtids al DNA motlle

12 min i 20 seg a 68°C per a que es faci la reacció d'amplificació.

4-Un cop finalitzada la reacció (dura unes 5 h), es mantenen les mostres uns minuts a temperatura ambient i s'afegeixen 2 µl de l'enzim DpnI, es tracta d'un enzim que digereix les cadenes parentals. Per a la digestió les mostres s'incuben a 37°C durant 2 h.

5-Finalment es realitza la reacció de transformació a cèl·lules DH5α (vegeu a l'apartat **III.2.2.2**).

6-Un cop obtingudes les colònies, es purifica el seu DNA amb una *miniprep* i es comprova per seqüenciació si s'ha introduït la mutació (vegeu l'apartat **III.2.2.3**). En el cas dels mutants que tenen mutat l'aminoàcid 251, es poden descartar falsos positius mitjançant la digestió del DNA amb l'enzim MluI, que té la seva única diana de restricció en aquesta posició i per tant s'elimina la diana al insertar-hi la mutació.

III.2.3.2.-Mutagènesi per *cassette*

Per a la construcció dels mutants puntuals en la posició 94 i dels dobles mutants E134Q/E247A i E134Q/E247Q s'ha utilitzat la tècnica de mutagènesi per *cassette*. Aquesta tècnica permet crear mutants substituint un oligonucleòtid sintètic per un fragment del vector. En els mutants es varen seguir dues estratègies diferents:

III.2.3.2.1.-Construcció dels dobles mutants E134Q/E247A i E134Q/E247Q

Es digereix el vector pMT4 que conté el DNA opsina E134Q/M257Y, E247A i E247Q amb NheI (que talla al vector) i PstI (que talla en el gen just abans de la mutació) (Fig. **3.4**) per separat. Llavors es lliguen els fragments que inclouen les mutacions E134Q i E247A o E247Q.

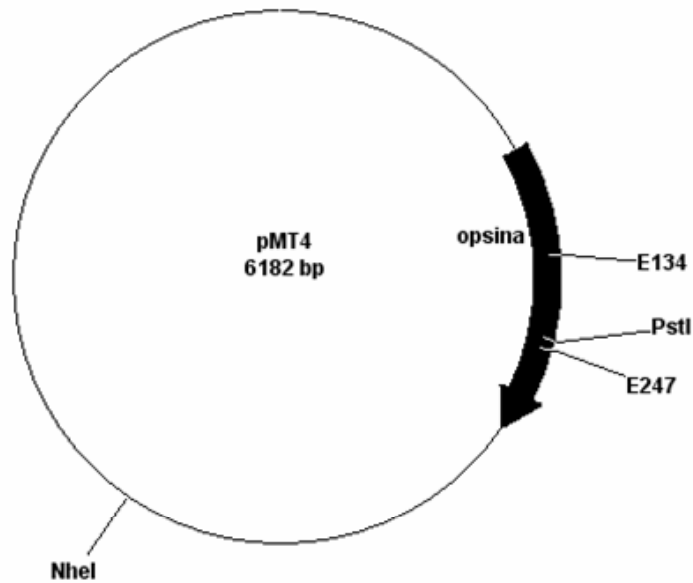


Fig. 3.4: Esquema del vector pMT4 on s'assenyalen la posició 134 i 247 i les dianes de restricció dels enzims utilitzats en la construcció dels mutants E134Q/E247A i E134Q/E247Q.

Material utilitzat

- 1-Els DNA d'opsina que contenen les mutacions E134Q/M257Y, E247Q i E247A.
- 2-Enzims PstI i NheI i els respectius tampons (New England Biolabs).

Procediment experimental

Els enzims NheI i PstI no presenten una compatibilitat en els tampons i això fa que la doble digestió hagi de ser seqüencial.

1-Fer la barreja següent:

	DNA d'opsina E134Q/M257Y	DNA d'opsina E247A	DNA d'opsina E247Q
DNA (µg)	2	2	2
Aigua milliQ (µl)	6	6	6
Buffer 10X NheI(µl)	1	1	1
Enzim NheI (µl)	1	1	1

2-S'incuba durant 2 o 3 h a 37°C per assegurar la completa digestió del DNA.

3-Es fa la barreja següent:

	DNA opsina E134Q/M257Y	DNA opsina E247A	DNA opsina E247Q
Aigua milliQ (µl)	2.9	2.9	2.9
Buffer 10X PstI (µl)	1.1	1.1	1.1
Enzim PstI (µl)	-	1	1

4-S'incuben les mostres durant 4 o 5 h o tota la nit a 37°C.

5-Es carreguen les mostres en un gel d'agarosa (veure **annex 4**).

6-Es tallen les bandes d'interès i es guarden a 4°C fins a la seva purificació.

Per a la purificació de les bandes d'interès a partir del gel d'agarosa es segueix el procediment explicat a continuació.

Material utilitzat

DNA purification kit (MoBiolab) i Tris-EDTA (10mM pH=7.5 + 0.1 mM EDTA)

Procediment experimental

1-Es tallen els fragments del gel d'agarosa i es pesen. Es resuspèn en 3 volums de la solució d'*ultrasalt* del kit, que conté una sal iodada que desfà l'agarosa.

2-S'incuba durant 5 min (o fins la total disgregació de l'agarosa) entre 55 i 65°C.

3-Es posen 8 µl d'*ultrabind*, una reïna de sílice que uneix el DNA. Les mostres es centrifuguen a 12000g i a temperatura ambient per precipitar la reïna de sílice.

4-El SN es descarta i es resuspèn la matriu de sílice amb la solució d'*ultrawash* mitjançant un vòrtex. Aquesta solució conté Tris + NaCl + EDTA que permet rentar la reïna. Es precipita la reïna per centrifugació i es decanta el SN.

5-Es torna a centrifugar la mostra per acabar de treure tot el SN i es resuspèn el *pellet* curosament amb 20 µl de Tris-EDTA.

6-Es repeteix la centrifugació per recollir el SN i guardar-lo a 4°C fins a la reacció de lligament.

Pel lligament dels fragments de DNA purificats s'utilitza el següent protocol:

Material utilitzat

Tampó de lligació 10 x i enzim lligasa T4 (New England Biolabs), ATP (Sigma) 20 mM, fragments de DNA purificats.

Procediment experimental

1-Es barregen els següents components:

- 2 µl lligasa T4
- 2 µl ATP 20 mM
- 3.5 µl tampó lligasa 10x
- 9 µl fragment NheI/PstI DNA E134Q/M257Y
- 18 µl fragment PstI/NheI DNA E247Q o bé E247A
- 0.5 µl d'aigua milliQ

2-S'incuba la barreja entre 48 i 72 h a 4°C.

3-Es realitza el protocol de transformació (veure apartat **III.2.2.2.**).

A partir de les colònies crescudes en la transformació, es realitza una *miniprep* i es porten a seqüenciar (veure apartat **III.2.2.3.**).

III.2.3.2.2.-Construcció dels mutants en la posició T94

En la construcció dels mutants de la posició T94 es va dissenyar l'oligonucleòtid sintètic considerant que havia de tallar entre les dianes de restricció BglII i NcoI del vector i per tant havia de ser de 51 bases.

Aquests oligonucleòtids s'escalfen primer a elevades temperatures per separar les cadenes i posteriorment es disminueix la temperatura de manera gradual i lenta per tal que el DNA s'uneixi per complementarietat de bases.

Material utilitzat

1-Tampó A 10x (50 mM Tris-HCl pH=8.0 + 10 mM MgCl₂), els enzims EcoRI, BglII, NotI i XmnI i els corresponents tampons (New England Biolabs).

2-Oligonucleòtids sintètics 50µM (la seqüència es troba en l'**annex 3.1**) (proporcionats per Operon, Izasa)

Procediment experimental

Unió de les cadenes complementàries dels oligonucleòtids:

1-Es barregen els oligonucleòtids per obtenir una concentració final de 2 µM en tampó A 1x i es cobreix amb oli mineral.

2-La mostra s'incuba a 90°C durant 3 min i es deixa refredar suaument fins a temperatura ambient. Aquest procés es deixa tota la nit.

3-Es recull la mostra per sota del oli mineral i es guarda a -20°C fins a la seva utilització.

Per a la digestió i lligament dels fragments d'opsina d'interès es segueix el següent procediment:

1-Es digereix el vector pMT4 amb els enzims EcoRI, BglII, NcoI i XmnI que es troben en les posicions assenyalades en la figura **3.5**.

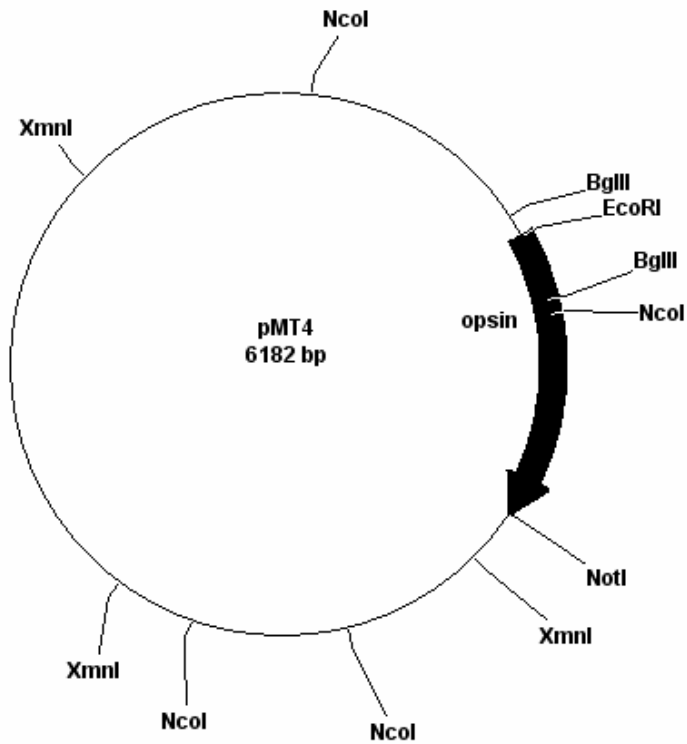


Fig. 3.5: Vector pMT4 on s'assenyalen les dianes de restricció dels enzims EcoRI, BglII, NotI i XmnI i NcoI.

Es realitzen les 3 digestions seguint les condicions :

(en µl)	Digestió EcoRI/BglII	Digestió NcoI/XmnI/NotI	Digestió EcoRI/NotI
DNA opsina (µg)	3	3	3
Aigua milliQ	6	5	6
Enzim EcoRI	1	-	1
Enzim BglII	1	-	-
Enzim NotI	-	1	1
Enzim NcoI	-	1	-
Enzim XmnI	-	1	-
Tampó EcoRI/BglII	1	-	1
Tampó NcoI/XmnI/NcoI	-	1	-

2- Les mostres s'incuben entre 3 o 4 h a 37°C per assegurar la completa digestió del vector.

3-Posteriorment es carreguen les mostres digerides en un gel d'agarosa (veure l'**annex 4**) i es talla el fragment desitjat amb una fulla d'afaitar.

4-Per eliminar l'agarosa dels fragment de DNA, s'utilitza el kit de MOBIOLAB (el protocol és descrit en l'apartat **III.2.3.2.1**).

5-Es lliguen els fragments seguint les condicions que s'han explicat en l'apartat anterior i es procedeix a la transformació del DNA lligat en cèl·lules DH5 α (apartat **III.2.2.2**).

6-De les colònies crescudes, se'n purifica el DNA mitjançant la *miniprep* i es seqüencien (vegeu l'apartat **III.2.2.3**).

Un cop obtingut els DNA purificats ja es poden expressar en cèl·lules COS-1.

III.2.4.- Obtenció de rodopsines recombinants

El vector pMT4, que presenta inserit el gen de l'opsina, és introduït dins les cèl·lules COS-1 les quals expressaran la proteïna i posteriorment mitjançant immunopurificació s'obtidran les rodopsines mutades, que podran ser caracteritzades posteriorment (Fig 3.6).

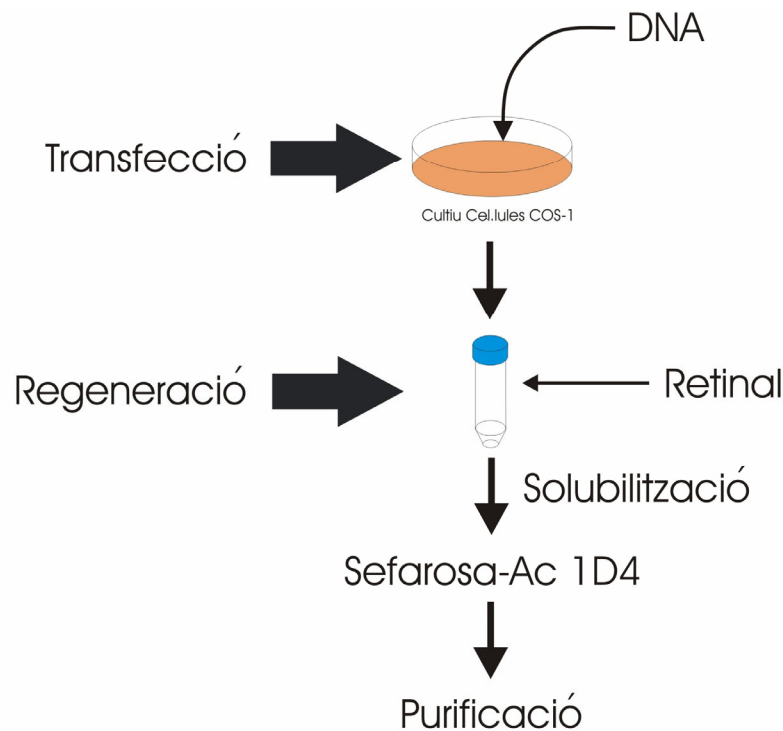


Fig. 3.6: Esquema del procés de transfecció i purificació de rodopsina recombinant expressada en cèl·lules COS-1.

III.2.4.1.- Línia cel·lular

III.2.4.1.1.- Característiques generals

Les cèl·lules utilitzades per a l'expressió de rodopsina provenen de fetge de mico verd africà i s'anomenen cèl·lules COS-1. Aquestes cèl·lules, i les COS-3 i COS-7 són diverses línies de cèl·lules de mico obtingudes a partir de la transformació de cèl·lules CV-1 (cèl·lules de simi permissives per el desenvolupament lític del virus SV40) amb el DNA de SV40 mutants en l'origen de replicació (Guzman, 1981). Les cèl·lules COS en general, són molt emprades per a transfeccions transitòries, i poden arribar a produir milers i centenars de milers de còpies de proteïnes en les 72h posteriors a la transfecció (Rosenberg, 1996). Estudis anteriors (Oprian *et al.*, 1987) han permès demostrar el nivell d'expressió de rodopsina per part d'aquestes cèl·lules. La utilització de cèl·lules eucariotes per a l'obtenció d'aquestes proteïnes és per que poden produir la proteïna ja biològicament activa, és a dir amb els canvis postransduccionals (com les glicosilacions en el cas de la rodopsina) que les cèl·lules procariotes no poden realitzar. Tanmateix aquestes modificacions a vegades no es realitzen de la mateixa manera que en la cèl·lula original, com és el cas de la rodopsina on es produeix una glicosilació heterogènia (Oprian *et al.*, 1987).

III.2.4.1.2.- Manteniment

Les cèl·lules COS-1 es mantenen en plaques de 150 mm tractades en la superfície per tal d'afavorir l'adhesió cel·lular a 37°C de temperatura, 5% CO₂ i humitat saturada. Quan les plaques es troben suficientment confluent de cèl·lules, es desprenen mitjançant un tractament enzimàtic amb tripsina i es reparteixen en quatre plaques. En 60 h les plaques tornen a ser confluent en un 80-90%. El manteniment de les cèl·lules es realitza en el medi *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) complementat amb sèrum fetal boví (SFB) (veure **annex 2.1**), antibiòtics (veure **annex 2.3**) i un antifúngic. L'observació de les cèl·lules es realitza mitjançant un microscopi òptic invertit.

Material utilitzat

1-Cèl·lules COS-1 (proporcionades per *European Collections of Cell Cultures*), DMEM High Glucose Pyruvate (Gibco), PBS (Pyruvate Phosphate Buffered Saline) (Gibco), SFB (10X, Gibco), Streptomina (Strp) + Glutamina (Gln) + Penicil·lina (Pen) (100X, Gibco), amfotericina-B o fungizona (250 µl/ml, Sigma) i tripsina-EDTA 10X (veure **annex 2.2**, Biomedia).

2-Pel manteniment de les cèl·lules s'utilitza DMEM+++ (DMEM + Strept + Pen + Gln + SFB) i plaques de cultiu de 150 mm de diàmetre (NUNC).

Procediment experimental

1-S'aspira el medi de cultiu de les plaques amb una pipeta pasteur connectada al buit i es renten amb PBS.

2-Apliquem 5 ml de tripsina a les plaques, es van desprendre les cèl·lules amb una pipeta i es van transferint en un vas de precipitats que conté 55 ml de DMEM+++ + 250 µg/µl amfotericina-B.

3-Es reparteix el contingut del vas de precipitats en 4 plaques i s'incuben a 37°C, 5%CO₂ i humitat saturada.

III.2.4.1.3.- Congelació

Les cèl·lules es mantenen congelades a -196°C en un dipòsit de nitrogen líquid en criotubs de 4 ml. El medi de congelació conté DMEM, SFB i DMSO (Dimetilsulfòxid), un compost que actua com a crioprotector però a la vegada s'ha de manipular amb molta cura per que és molt tòxic per a les cèl·lules. El contacte de les cèl·lules a temperatura ambient cal que sigui mínim (Ashwood-Smith, 1967).

Material utilitzat

1-Criotubs de 4 ml i el dipòsit de N₂ líquid de 35 litres (Air liquide).

2-El medi de congelació (20% SFB, 10% DMSO i DMEM) i DMEM +++ (DMEM + Strp + Gln + Pen + SFB).

Procediment experimental

1-Es tripsinitzen les cèl·lules de diverses plaques i es posen en un falcon de 50 ml i s'acaba d'omplir de DMEM+++ a temperatura ambient.

2-Es centrifuguen les cèl·lules durant 5 min a 3000 rpm i 4°C i s'aspira el SN amb una pipeta pasteur connectada al buit

3-Es resuspenen les cèl·lules amb 3 ml de medi de congelació atemperat a 4°C, a causa del DMSO.

4-El resuspès es transfereix en un criotub i s'incuba durant 2 h a -20°C per finalment guardar-les al dipòsit de N₂ líquid.

III.2.4.1.4.- Descongelació

El pas crític d'aquest procés és quan les cèl·lules són descongelades, és important descongelar-les o bé a 4 °C o bé només 1 min a 37 °C (el procés ha de ser el més curt possible) a causa de la elevada toxicitat que presenta el DMSO per a les cèl·lules quan es troba a temperatures superiors a 4°C.

Després de descongelar les cèl·lules, aquestes estan afectades per les baixes temperatures i 24 h després de la descongelació i mantingudes en medi s'observen moltes cèl·lules mortes, és a dir no adherides a la placa, les qual seran aspirades i es canviarà el medi per tal que les cèl·lules adherides vagin dividint-se i augmentin la confluència de la placa.

Material utilitzat

1-Cèl·lules COS-1 en criotubs que estaran a -196°C.

2-DMEM, DMEM +++ (DMEM + Pen + Strep + Gln + SFB), amfotericina-B (250µg/ml, Sigma), PBS i plaques de cultiu cel·lular de 90 i 150 mm (NUNC).

Procediment experimental

1-Es descongela el criotub a 4°C i es traspassen les cèl·lules dins un tub falcon de 50 ml que conte DMEM fred.

2-Es centrifuga el tub a 3000 rpm, durant 5 min a 4°C.

3-S'aspira el SN amb una pipeta pasteur connectada al buit i es resuspenen les cèl·lules amb 10 ml de DMEM+++ + amfotericina-B.

4-Es passen les cèl·lules en una placa de 90 mm de diàmetre i s'incuben a 37°C, 5%CO₂ i Humitat saturada. Al cap de 24 h, s'aspira el medi per eliminar les cèl·lules no adherides, es fa un rentat amb PBS i es torna a posar DMEM +++ + amfotericina B i s'incuben a 37°C, 5% CO₂ i humitat saturada.

5-Quan la placa estigui 90-100% confluent es tripsinitzarà (vegeu apartat **III.2.4.1.2**) i es passarà a una placa de 150 mm de diàmetre.

6- La placa s'incuba a 37°C, 5% CO₂ i humitat saturada

III.2.4.2.- Transfecció del DNA d'opsina en cèl·lules COS-1

El gen de l'opsina bovina utilitzat en els experiments de transfecció ha estat sintetitzat a partir de diferents oligonucleòtids (Ferretti *et al.*, 1986) (Fig. **3.7**). El vector pMT4, d'elevat nombre de còpies, presenta inserit aquest gen entre els llocs de restricció EcoRI i NotI en les posicions 1061 i 2129 i com s'ha esmentat anteriorment inclou un gen de resistència a l'ampicil·lina (Franke *et al.*, 1988) (Fig. **3.8**).

El procés de transfecció ens permetrà introduir el vector dins les cèl·lules eucariotes per que expressin la proteïna. El mètode utilitzat és el del dietilaminoetil-dextrà (DEAE-dextrà), compost que s'uneix al vector i l'introdueix dins de la cèl·lula. És un catió polimèric que unit molt fortament a la càrrega negativa del DNA el transfereix a dins la cèl·lula (vegeu **annex 2.4**).

La cloroquina (Chlo) s'utilitza per que augmenta l'eficiència de la transfecció i depenent del tipus cel·lular pot arribar a ser tòxic (vegeu **annex 2.5**).


```

GAATTCATGAACGGTACCGAAGCCCAAACTTCTACGTTCTTTCTCCAACAAGACGGGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTTAAGTACTTGCCATGGCTTCCGGGTTTGAAGATGCAAGGAAAGAGGTTGTTCTGCCCG
E F M N G T E G P N F Y V P F S N K T G
*
GTGGTGGCAGCCCGTTCCGAGGCTCCGCAGTACTACCTGGCGGAGCCCTGGCAGTTCTCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACACCGGTGGGCAAGCTCCGAGGCGTCATGATGGACCGCCTCGGGACCGTCAAGAGG
V V R S P F E A P Q Y Y L A E P W Q F S
ATGCTGGCCGCTACATGTTCTGCTGATCATGCTTGGCTTCCCGATCAACTTCTCTCACG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACGACCGCGGATGTACAAGGACGACTAGTACGAACCGAAGGCTAGTTGAAGGAGTGC
M L A A Y M F L L I M L G F P I N F L T
CTGTACGTCACAGTCCAGCACAGAAGCTTCGCACACCGCTCAACTACATCCTGCTCAAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GACATGCAGTGTCAAGTCTGTTCTTTCGAAGCGGTGGCGAGTTGATGTAGGACGAGTTG
L Y V T V Q H K K L R T P L N Y I L L N
CTGGCCGTGGCAGATCTCTTCATGGTCTTCGGTGGCTTACCACCACCCTTACACCTCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GACCGGCACCGTCTAGAGAAGTACCAGAAGCCACCGAAGTGGTGGGAGATGGAGA
L A V A D L F M V F G G F T T T L Y T S
CTCCATGGTACTTCGTCCTTGGGCCGACGGGCTGCAACCTCGAGGGCTTCTTTGCCACC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAGGTACCCATGAAGCAGAAACCCGGCTGCCCGACGTTGGAGCTCCCGAAGAACCGTGG
L H G Y F V F G P T G C N L E G F F A T
CTGGCCGTGAAATGCACTGTGGTCTCTGGTAGTACTGGCGATCGAGCGGTACGTGGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GACCCGCCACTTTAACGTGACACCAGACCATCATGACCGCTAGCTCGCCATGCACCAC
L G G E I A L W S L V V L A I E R Y V V
GTGTGCAAGCCCATGAGCAACTTCCGCTTCGGTGAGAACCACGCCATCATGGCCCTCCCG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACACGTTCCGGTACTCGTTGAAGGCGAAGCCACTCTTGGTGGGTAGTACCCGCAGCGG
V C K P M S N F R F G E N H A I M G V A
TTCACCTGGTTCATGGCTTGGCCCTGTGGCCCGCCCGCTCGTGGGCTGGTCTAGATAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAGTGGACCCAGTACCGAGACCGGACACGCGGGCGGCGAGCAGCCGACCATCTATG
F T W V M A L A C A A P P L V G W S R Y
ATCCCGAGGGCATGCAGTGTCTGTCGGGATCGATTACTACACGCCGACGAGGAGACC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAGGGCCTCCCGTACGTCACGACACGCCCTAGCTAATGATGTGGCGGTGCTCCCTCTGG
I P E G M Q C S C G I D Y Y T P H E E T
AACAAATGAGTCGTTGCTCATCTACATGTTGTTGGTCCACTTCATCATCCGCTGATGTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGTTACTCAGCAAGCAGTAGATGTACAAGCACCGGTGAAGTAGTAGGGGCACTAACAG
N N E S F V I Y M F V V H F I I P L I V
ATCTTCTTCTGCTATGGCCAGCTGGTGTTCACCGTCAAGGAGGCTGCAGCCGACGAGCAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAGAAGAAGACGATACCGGTGACCAACAAGTGGCAGTTCCTCCGACGTCGGGTCTGCTC
I F F C Y G Q L V F T V K E A A A Q Q Q
GAGAGCGCCACCACTCAGAAGCCGAGAAGGAGTCAAGCGTATGGTTATCATCATGGTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTCTCCGGTGGTGGTCTTCCGGCTCTTCTCCAGTGGCATAACCAATAGTAGTACCG
E S A T T Q K A E K E V T R M V I I M V
ATCGCTTCTCCTAATCTGCTGGCTGCCATATGCTGGTGGTGGCTTCTACATCTTCAACCAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAGCGAAAGGATTAGACGACCGACGGTATACGACCACACCGCAAGATGTAGAAGTGGSTA
I A F L I C W L P Y A G V A F Y I F T H
CAGGGCTCTGACTTTGGGCCCATCTTTCATGACCATCCCGGCTTCTTTGCCAAGACGTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCCCGAGACTGAAACCCGGTAGAAGTACTGGTAGGGCCGAAAGAACCGTCTTGCAGA
Q G S D F G P I F M T I P A F F A K T S
GCCGTCTACAACCCGGTCACTACATCATGATGAACAAGCAGTTCGGGAACGTCATGGTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGGCAGATGTTGGGCCAGTAGATGTAGTACTACTTGTTCGTCAAGGCCTTGACGTACCG
A V Y N P V I Y I M M N K Q F R N C M V
ACCACTCTCTGCTGTGGCAAGAACCCTGGGTGACGACGAGGCGTCGACACCGTCTCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGGTGAGAGACGACACCGTCTTGGGGCAGCCACTGCTGCTCCGACGCTGGTGGCAGAGG
T T L C C G K N P L G D D E A S T T V S
AAGACAGAGACCAGCCAAGTGGCCCTGCCTAAGCGGGCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCTGCTCTGGTGGGTTACCCGCGGACGGATTCCGGCCGC
K T E T S Q V A P A * A A

```

Fig. 3.7: Seqüència del gen sintètic de l'opsina emprat. En asterisc es marquen el principi i final del gen.

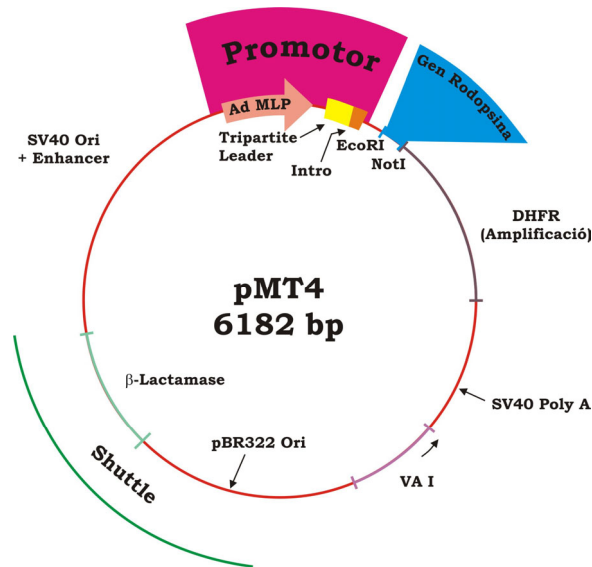


Fig. 3.8: Vector pMT4 que te inserit el gen de l'opsina flanquejat entre les dianes de restricció dels enzims EcoRI i NotI.

Material utilitzat

1-Cèl·lules COS-1 en placa, DEAE-dextrà (Sigma), Chlo (Sigma), DMEM +++ (DMEM (Gibco) + SFB (Gibco) + Strep + Gln + Pen (Gibco)), PBS (Gibco) i els DNA d'opsina.

2-Per a la transfecció s'utilitzen les següents solucions: solució DEAE-dextrà (5 ml DEAE-dextrà 2.5 mg/ml (Sigma) , Tris-HCl 0.1M pH=8.0 i 100 µg del DNA corresponent i enrasar a 50 ml amb DMEM +++)) i la solució de Chlo : 5 ml Chlo 0.1 mM (Sigma) enrasant a 50 ml amb DMEM +++.

Procediment experimental

Les plaques de cèl·lules COS-1 es preparen 60 h prèvies a la transfecció en plaques de 150 mm de diàmetre i incubades en DMEM+++ + 2.5 µg/µl de amfotericina a 37°C, 5%CO₂ i humitat saturada (vegeu apartat **III.2.4.1.2**). S'utilitzen 5 plaques per a cada mutant.

1-S'aspira el medi amb una pipeta pasteur connectada al buit.

2-Després d'haver rentat les cèl·lules amb PBS, es posen 10 ml de la solució de DEAE-dextrà per a cada placa.

3-S'incuben les cèl·lules entre 5 i 6 h a 37 °C, 5% CO₂ i humitat saturada.

4-S'aspira tot el medi i es posen 10 ml de la solució de Chlo a cada placa.

5-S'incuben les cèl·lules entre 2 i 3 h a 37°C, 5% CO₂ i humitat saturada.

6- El medi s'aspira amb pipeta pasteur connectada al buit.

7-Es renten les plaques amb 10 ml de PBS aspirant-lo posteriorment amb una pipeta pasteur connectada al buit.

8-Es posen 15 ml de DMEM +++ per placa i s'incuben a 37°C, 5%CO₂ i humitat saturada entre 48 i 60 h.

III.2.4.3.- Resuspensió del retinal

El 11-*cis*-retinal és un derivat de la vitamina A fotosensible i que s'adquireix en forma sòlida. Per a la seva utilització en els experiments, és necessari que estigui en solució etanòlica i emmagatzemat a -20°C per mantenir-se estable. Quan es parla d'estabilitat es refereix a la seva capacitat d'isomeritzar-se a d'altres formes o que s'agregui. En aquest treball també s'utilitzen d'altres isoformes de retinal com el tot-*trans*-retinal i el 9-*cis*-retinal, els quals també es resuspenen en medi etanòlic.

Material utilitzat

1-11-*cis*-retinal (proporcionat pel Dr. P. P. Philippov, Moscow State University), tot-*trans*-retinal (Sigma), 9-*cis*-retinal (Sigma) i etanol 100% (Merck).

Procediment experimental

1-Es resuspen el retinal en 1 ml d'etanol al 100% i es realitza un espectre d'una dilució 1/1000 en el cas de 11-*cis*-retinal i dilució 1/10000 en els altres dos.

2-Mitjançant la llei de Lambert-Beer es pot calcular la concentració de retinal corresponent. Sabent que cada retinal te una longitud d'ona amb màxima absorbància i una ϵ diferent (taula **3.2**).

Retinal	$\lambda_{\text{màx}}(\text{nm})$	$\epsilon(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$
9- <i>cis</i> -retinal	373	36068
11- <i>cis</i> -retinal	376.5	24935
tot- <i>trans</i> -retinal	383	42900

Taula **3.2**: Valors de les longituds d'ona d'absorbància màxima i coeficient d'extinció molar de 11-*cis*-retinal, tot-*trans*-retinal i 9-*cis*-retinal en etanol (Garwin i Saari, 2000).

3-Les mostres es guarden a -20°C tapades amb paper d'alumini.

III.2.4.4.- Purificació de rodopsines recombinants

Quan les cèl·lules han introduït el DNA requereixen entre 60 i 72 h per a l'expressió de la proteïna. Posteriorment, i un cop recollim les cèl·lules cal regenerar l'opsina amb el retinal per constituir la rodopsina. Les cèl·lules COS-1 no són cèl·lules fotoreceptores ni estan en un sistema que li proporcioni el retinal, per tant no tenen el cromòfor per a la síntesi final de la rodopsina. Tots els passos posteriors a quan s'afegeix el retinal a les cèl·lules es treballa a la cambra fosca amb uns filtres especials. Tot i així s'ha vist que alguns mutants que provoquen l'RP si se'ls inclou el retinal durant l'expressió del mutant en les cèl·lules, són capaces de formar el cromòfor si es compara amb l'expressió del mutant i posterior addició del retinal (Noorwez *et al.*, 2004).

Material utilitzat

1-PBS (Gibco), 11-*cis*-retinal, *scraper* (Sigma), DM (Anatrace), PMSF (Sigma) 100 mM en metanol, sefarosa acoblada al anticòs Rho-1D4 (vegeu apartat **III.2.1.4.2.**).

2-Els tampons usats durant la purificació són: tampó A (KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2HPO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2), (tampó A + 0.05% DM); tampó D (Na_2HPO_4 2mM pH=6, DM 0.05%); tampó D + pèptid (tampó D + 100 uM Pèptid); tampó C + pèptid (tampó C + 100 uM Pèptid).

3-La manipulació de les mostres a partir de l'addició del retinal es fa en fosc i làmpades de filtre de kodak n° 5 (12.7 cm-17.8 cm).

Procediment experimental

- 1-Després de 60-72 h de l'inici de la transfecció, es renten les cèl·lules amb 5 ml de PBS i s'aspira posteriorment.
- 2-Es raspen les cèl·lules de les plaques amb un *scraper* i 5 ml de tampó A i es centrifuguen a 3000 rpm durant 5 min i a 4°C.
- 3-Les cèl·lules es resuspenen amb 2 ml de tampó A per placa. S'addicionen 20 µM de retinal, es segellen els tubs amb parafilm, es tapen amb paper d'alumini i s'incuben entre 4 i 5 h a 4°C en agitació.
- 4-Es posa a cada tub 1% DM i 0.1 mM PMSF, es segellen amb parafilm i s'emboliquen amb paper d'alumini. S'incuben durant 1 h a 4°C i en agitació
- 5-Es centrifuguen les mostres durant 35 min a 35000 rpm i a 4°C.
- 6-Es recullen els SN en falcons que contenen 150 µl de sefarosa acoblada al anticòs Rho-1D4 i s'incuben els tubs segellats amb paper de filtre i tapats amb paper d'alumini tota la nit a 4°C.
- 7-Es centrifuguen les mostres a 3000 rpm, 4°C durant 3 min. S'aspira el SN i es passa la reïna en eppendorfs amb 1-1.5 ml de tampó C.
- 8-Es centrifuguen les mostres uns segons a 12000g i s'aspira el SN. Es posen entre 1-1.5 ml de tampó C i es repeteix la centrifugació.
- 9-Es repeteix el pas 8 dues vegades més amb tampó D o C. S'afegeixen 500 µl de tampó C o D + pèptid i es tapen les mostres amb paper d'alumini.
- 10-S'incuben les mostres durant 30 min a 4°C i agitació.
- 11-Es centrifuguen les mostres i es guarden els SN a 4°C fins a realitzar els espectres.
- 12-Es realitza un espectre de cada proteïna seguint les condicions de mesura de l'apartat **III.2.5.2**.

III.2.4.5.-Preparació de membranes de cèl·lules COS-1

Aquest protocol ens permet estudiar la proteïna en la membrana de la cèl·lula sense ser utilitzada amb detergent. Aquest protocol s'ha utilitzat pel mutant de l'RP L46R mitjançant una modificació del proposat per Robinson (Robinson, 2000).

Material i equipament utilitzat

1-PBS (Gibco), 11-*cis*-retinal, *scraper* (Sigma), *pestle*, xeringa de 20 ml i agulla 23G, vòrtex i DM (Anatrace).

2-Tampó fosfat pH=7.0 + 150 mM (Sigma), tampó hipotònic (10 mM Tris (Panreac) pH=7.4, 10 mM (Sigma) i 3 mM MgCl₂ (Panreac)).

3-Rotor Ti50 (Beckman Coulter).

Procediment experimental

1-Es segueixen els passos 1, 2 del apartat **III.2.4.4.**

2-Es resuspen els *pellets* amb 10 ml de tampó fosfat i es vortexen.

3-Les mostres es centrifuguen durant 5 min a 1500 rpm. Es descarta el SN i es resuspen el *pellet* amb 15 ml de tampó hipotònic i es vortexa, s'homogenitza pel *pestle*, 7 o 8 vegades i després es disgrega la barreja per xeringa i agulla de 23G 5 vegades.

4-L'homogeneïtzat es centrifuga durant 3 min a 1500 rpm. Es guarden els SN a 4°C. Es repeteix el pas 3 amb els *pellets* i es centrifuguen durant 3 min a 1500 rpm i 4°C.

5-Els SN s'ajunten i es centrifuguen durant 45 min a 35000 rpm i 4°C. El SN es descarta i es resuspen el precipitat amb 1 ml final de solució final. Es guarda en eppendorfs a -20°C.

Un cop purificades les proteïnes es poden estudiar mitjançant diverses tècniques com l'espectroscòpia UV-Vis, la fluorescència o l'electroforesi entre d'altres que s'expliquen a continuació.

III.2.5.-Espectroscòpia UV-Vis per a la caracterització de la rodopsina.

III.2.5.1.-Característiques generals

L'espectroscòpia UV-Vis és una tècnica clàssica que es basa en la interacció de la radiació electromagnètica o llum amb la matèria. La llum és un camp elèctric i un camp magnètic que es propaguen perpendicularment entre ells. La radiació electromagnètica té un rang ampli i s'expressa en longitud d'ona (λ) que té la unitat en cm tot i que en UV-Vis la unitat en que s'expressen és en nm. La regió que compren el UV-Vis és entre 180-700 nm, on $\lambda < 350$ nm és el UV i $\lambda > 350$ és el Vis.

En UV-Vis es mesura la radiació que absorbeix o que transmet (deixa passar) una mostra després d'haver estat irradiada per llum d'una λ en concret.

Un espectre es pot mesurar quantitativament a través de la llei de Lambert-Beer que es resumeix amb l'equació següent:

$$I = I_0 \times e^{-\epsilon lc}$$

A on I_0 ; intensitat de la llum incident, I ; intensitat tramessa, ϵ ; coeficient d'extinció molar (o d'absortivitat molar), l ; camí òptic (distància que recorre la llum).

c : concentració del cromòfor (concentració dels grups químics que absorbiexen la llum a la longitud d'ona en concret).

Aplicant logaritmes a la equació, ens queda resumida en:

$$A = \epsilon \times c \times l$$

A on A ; absorbància, ϵ ; coeficient d'extinció molar (o d'absortivitat molar), l ; camí òptic (distància que recorre la llum, 1 cm), c ; concentració del cromòfor (concentració dels grups químics que absorbeixen la llum a la longitud d'ona en concret)

Amb aquesta fórmula podem calcular la concentració d'una molècula que absorbeix la llum a una determinada longitud d'ona.

Quan es mesura en un espectrofotòmetre hi ha diversos paràmetres que cal tenir en compte:

-velocitat d'escombrat (nm/min): té una relació amb el soroll de fons i el temps de resposta.

-amplada d'esclatxa: que ens permet augmentar la resolució de l'espectre.

III.2.5.2- Condicions de mesura

Per a la realització dels experiments espectroscòpics s'utilitza l'espectrofotòmetre UV-Vis Varian, model Cary 1E. Aquest aparell està acoblat a un accessori controlador de temperatura Peltier.

Les cubetes utilitzades són de quars amb paret negra i amb tap de tefló per tal d'evitar l'evaporació de les mostres en els experiments d'estabilitat tèrmica. La seva capacitat és de 500-600 µl, que permet fer espectres amb un mínim de 300 µl de mostra.

Les condicions de mesura dels espectres utilitzades són:

Temps promig de mesura per punt és de 0.5 s.

Interval de mesura de dades: 1.5 nm

Velocitat de rastreig: 180 nm/min

Rang de longituds d'ona dels espectres: 250-650 nm.

Donada la fotosensibilitat de la rodopsina els experiments espectroscòpics es realitzen en una cambra fosca que conté llums amb filtre de kodak nº 2 (12.7 cm-17.8 cm).

La rodopsina absorbeix llum a 500 nm i a partir del valor d'absorbància i considerant la llei de Lambert-Beer on ϵ és de $40600\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ es pot calcular la concentració que tenim a la mostra.

III.2.5.3.-Assaigs espectroscòpics per a la caracterització de rodopsines recombinants i l'estudi de la influència de diversos factors en l'estabilitat de la rodopsina de ROS.

III.2.5.3.1.-Assaigs espectroscòpics per estudiar l'efecte del zenc en l'estabilitat de la rodopsina

III.2.5.3.1.a-Estudi de l'estabilitat tèrmica de la forma inactiva de la rodopsina en presència de zenc i d'altres cations

L'objectiu d'aquest experiment és estudiar l'estabilitat tèrmica de rodopsina purificada de ROS en el seu estat inactiu. Es treballa a 55°C en absència i presència de zenc a 15 µM i 50µM i de diferents cations a 50 µM.

Material i equipament utilitzat

1-Clorur de zenc (Sigma); clorur de colina (Sigma); clorur de cadmi (Sigma); clorur de cobalt (Sigma); clorur de calci (Sigma) i clorur de coure (Sigma). La concentració inicial dels cations és de 5mM dissolts en hepes 20 mM pH 7.4. La mostra de rodopsina purificada es troba en hepes 20 mM pH 7.4, NaCl 145 M, MgCl₂ 2 mM i 0.02%DM.

2-Espectofotòmetre UV-Vis Varian, model Cary 1E; làmpades amb filtres vermells KODAK 2 safe light; programa Varian CARY i accessori controlador de temperatura Peltier de doble cel·la, Varian Cary.

3-Pel tractament dels espectres s'utilitza el programa GRAMS/32 Versió 4.01 i pel tractament de les dades s'utilitza el programa SigmaPlot versió 8.02 (SPSS Inc.).

Procediment experimental

1-S'enregistra un espectre de rodopsina a 20°C. En els experiments de presència de cations, primer es farà l'espectre sense el catió i posteriorment un altre amb el catió a la concentració final de 50µM (per cobalt, calci, cadmi, colina, coure i zenc) o de 15 µM (només pel zenc).

2-Es treu la cubeta de l'espectrofotòmetre i es guarda a temperatura ambient en foscor (tapada amb paper d'alumini).

3-S'augmenta la temperatura del sistema a 55°C i es programa l'espectrofotòmetre per a que enregistri els espectres cada 5 min.

4-Es col·loca la cubeta de nou al espectrofotòmetre i s'inicia el recompte de cicles.

III.2.5.3.1.b.-Estabilitat tèrmica de membranes de ROS en presència de zenc

Aquest assaig ens permet estudiar l'estabilitat tèrmica de ROS en presència i absència de zenc en condicions més semblants a les naturals.

Material i equipament utilitzat

1- ROS en hepes 20 mM pH 7.4, NaCl 145 M, MgCl₂ 2 mM i clorur de zenc 5mM (Sigma) dissolt en hepes 20 mM pH 7.4.

2-L'equipament utilitzat es descriu en l'apartat **III.2.5.3.1.a.**

Procediment experimental

1-S'obté un espectre de ROS a 20°C. Es posen els µl necessaris per obtenir la concentració final a 100 µM de clorur de zenc i es fa un espectre.

2-Es treu la cubeta de l'espectrofotòmetre i es guarda a temperatura ambient en foscor (tapada amb paper d'alumini).

3-S'augmenta la temperatura del sistema a 55°C i es programa l'espectrofotòmetre per que enregistri els espectres cada 5 min.

4-Es col·loca la cubeta de nou a l'espectrofotòmetre i s'inicia l'enregistrament d'espectres.

5-Es repeteixen els passos anteriors en absència de zenc.

III.2.5.3.1.c.-Càlcul dels paràmetres termodinàmics a partir de la desnaturalització tèrmica de la rodopsina en presència de zenc

Aquest experiment consisteix en el càlcul dels paràmetres termodinàmics E_a (energia d'activació), ΔH (entalpia), ΔG (energia lliure) i ΔS (entropia) a partir de la constant de velocitat d'inestabilitat de la proteïna (experiment d'estabilitat tèrmica a 55°C, vegeu apartat **III.2.5.3.1.a**).

Material i equipament utilitzat

- 1-Rodopsina en hepes 20 mM pH 7.4, NaCl 145 M, MgCl₂ 2 mM i 0.02%DM i clorur de zenc 5mM (Sigma) dissolt en hepes 20 mM pH 7.4.
- 2-L'equipament utilitzat es descriu en l'apartat **III.2.5.3.1.a**.
- 3-Les equacions utilitzades pel càlcul dels diferents paràmetres termodinàmics són a la taula **3.3**.

$\Delta H = E_a - RT$
$k = - \Delta G/RT$
$\Delta G/RT = \Delta H/RT + \Delta S/RT$
La E_a es calcula a partir de la pendent de la recta en el gràfic d' <i>Arrhenius</i> .

Taula **3.3**: Equacions utilitzades pel càlcul de paràmetres termodinàmics en l'estabilitat de rodopsina en presència i absència de zenc (T= 55°C i R = 8.3 J·mol⁻¹·K⁻¹).

Procediment experimental

- 1-S'enregistra un espectre de rodopsina a 20°C. Es posen els µl necessaris per obtenir la concentració final a 50 µM de clorur de zenc i es fa un espectre.
- 2-Es treu la cubeta del espectrofotòmetre i es guarda a temperatura ambient en fosc (tapada amb paper d'alumini).
- 3-S'augmenta la temperatura del sistema a 57.9°C i es programa l'espectrofotòmetre per a que enregistri els espectres cada 5 min.
- 4-Es col·loca la cubeta de nou al espectrofotòmetre i s'enregistren els espectres en mode de cicles.

5-Es repeteixen els passos anteriors a 56.8°C, 55.8°C, 54.7°C, 53.6 °C i 52.6 °C a aquesta mateixa concentració de zenc.

6-Es repeteixen els passos anteriors en absència de zenc.

Un cop obtinguts els espectres, es mesura l'absorbància a 500 nm respecte el temps i es calcula la constant de velocitat de disminució de l'absorbància. A partir d'aquí es podrà realitzar el gràfic d'Arrhenius (\ln de la constant de velocitat del *decay* (k) respecte l'invers de la temperatura) i els paràmetres termodinàmics seguint les equacions descrites en la taula **3.3**.

III.2.5.3.1.d.- Assaig de regeneració de la rodopsina en presència de diferents concentracions de zenc

Aquest experiment consisteix en afegir el cromòfor a la cubeta de l'espectrofotometre i il·luminar la mostra amb un filtre de $\lambda > 495$. Es segueix al llarg del temps la capacitat d'aquesta proteïna il·luminada per tornar a unir-se el retinal i observar l'augment d'absorbància a $\lambda = 500$ nm respecte el temps. En el cas que l'experiment es realitzi en presència dels cations, aquests s'afegeixen abans de l'addició del retinal.

Material i equipament utilitzat

1-11-*cis*-retinal (proporcionat pel Dr. P. P. Philippov, Moscow State University); rodopsina en hepes 20 mM pH 7.4, NaCl 145 M, MgCl₂ 2 mM i 0.02%DM i clorur de zenc 5mM (Sigma) dissolt en hepes 20 mM pH 7.4

2-L'equipament utilitzat es descriuen en l'apartat **III.2.5.3.1.a** i la font d'il·luminació FIBER-LITE MI-150 amb filtre $\lambda > 495$ nm (*Dolan Jenner*).

Procediment experimental

El procés es realitza contínuament a 20°C.

1-Es fa un espectre inicial de la mostra de rodopsina primer en absència i un altre després d'haver afegit el catió a una concentració final de 50 μ M.

2-S'afegeix la quantitat d'11-*cis*-retinal equivalent a 2.5 vegades la concentració de rodopsina i s'enregistra un espectre.

3-Es prepara l'espectre per que realitzi espectres cada 5 min i s'il·lumina la mostra durant 10 s a la màxima intensitat.

4-S'inicia l'enregistrament d'espectres cada 5 min durant 2 h.

5-Es repeteixen els passos 1, 2, 3 i 4 en absència de cations i en presència de 100µM i 200 µM de ZnCl₂.

III.2.5.3.1.e.- Assaig de regeneració de membranes de ROS en presència de zenc

Aquest assaig és similar a l'anterior però s'utilitza ROS sense detergent per a la realització dels experiments. Es vol la proteïna en les condicions més semblants a les naturals.

Material i equipament utilitzat

1-11-*cis*-retinal (proporcionat pel Dr. P. P. Philippov, Moscow State University); rodopsina en hepes 20 mM pH 7.4, NaCl 145 M, MgCl₂ 2 mM i clorur de zenc 5mM (Sigma) dissolt en hepes 20 mM pH 7.4.

2-L'equipament utilitzat és descrit en l'apartat **III.2.5.3.1.d.**

Procediment experimental

El procés es realitza contínuament a 20°C.

1-Es fa un espectre inicial de la mostra de ROS primer en absència i un altre després d'afegir el clorur de zenc a 200 µM.

2-S'afegeix l'11-*cis*-retinal (en relació molar 2.5:1 respecte rodopsina) i s'enregistra un espectre.

3-Es prepara l'espectrefotòmetre per a que realitzi espectres cada 5 min i s'il·lumina la mostra durant 10 s a la màxima intensitat.

4-S'inicia l'adquisició dels espectres cada 5 min durant 2 h.

5-Els passos 1, 2, 3 i 4 es repeteixen en absència de zenc.

III.2.5.3.1.f.-Efecte del zenc en la formació de MetaIII

La MetaIII és un dels intermediaris del procés d'activació de la rodopsina (vegeu taula **I.1**). És un estat que no uneix transducina i s'ha observat que podria actuar de reservori d'opsina unida al retinal (Heck, *et al.* 2003). Espectroscòpicament es pot seguir aquesta conformació per que presenta una absorbància màxima a $\lambda=465$ nm. L'assaig consisteix en la determinació de l'absorbància a aquesta longitud d'ona a diferents temps d'una mostra de rodopsina il·luminada en presència i absència de zenc.

Material i equipament utilitzat

- 1-Mostra de rodopsina en hepes 20 mM pH 7.4, NaCl 145 M, MgCl₂ 2 mM i 0.02%DM; clorur de zenc 5mM (Sigma) dissolt en hepes 20 mM pH 7.4
- 2-L'equipament descrit en l'apartat **III.2.5.3.1.d.**

Procediment experimental

- 1-Es fa un espectre inicial amb rodopsina a 20°C. S'afegeix el ZnCl₂ 5 mM a la cubeta per obtenir una concentració final de 100 µM i s'enregistra un altre espectre.
- 2-Es prepara el programa Varian Cary a mode de cicles i s'il·lumina la mostra durant 10 s a la màxima intensitat.
- 3-S'enregistren els espectres cada 5 min durant 2 h.

III.2.5.3.1.g-Quarta derivada de l'espectre d'absorbància UV-Vis per observar l'efecte del zenc en l'entorn dels aminoàcids aromàtics de la rodopsina.

La quarta derivada d'un espectre d'absorció permet la separació dels diferents components electrònics corresponents als residus de Phe, Tyr i Trp que formen part de les proteïnes, això permet una anàlisi detallada de canvis en l'entorn d'aquests aminoàcids com a conseqüència de canvis en el medi (Padrós *et al.*, 1982). En aquest cas s'estudiarà la influència del zenc en la conformació de la proteïna.

Material i equipament utilitzat

1-Mostra de rodopsina en hepes 20 mM pH 7.4, NaCl 145 M, MgCl₂ 2 mM i 0.02%DM i clorur de zenc 5mM (Sigma) dissolt en hepes 20 mM pH 7.4.

2-Equipament descrit en l'apartat **III.2.5.3.1.d**.

3-Les condicions de mesura en aquest assaig són diferents a les descrites anteriorment (apartat **III.2.5.2**).

Temps promig de mesura per punt: 0.1 s.

Interval de mesura de dades: 0.05 nm

Velocitat de rastreig: 30 nm/min.

Rang de longituds d'ona dels espectres: 240-340.

Procediment experimental

1-Es fa un espectre inicial amb mostra de rodopsina a 20°C. S'acumulen 30 espectres en aquestes condicions inicials per millorar la relació senyal-soroll de l'espectre resultant.

2-S'illumina la proteïna durant 10 s a màxima intensitat i s'inicia una sèrie de 110 cicles de 5 min cadascun.

3-Es calcula la mitjana de cada 5 espectres de cadascun dels tractaments i es calcula la quarta derivada de cada mitjana. S'utilitza l'algoritme de Savitzky-Golay (en el programa GRAMS/32 Versió 4.01).

En els experiments en presència de Zenc, es repeteixen els passos 1, 2 i 3 però afegint una concentració final de 200 µM de clorur de zenc a la cubeta del espectrofotòmetre.

III.2.5.3.2.-Isomerització específica de l'11-cis-retinal unit a rodopsina sota condicions de desnaturalització tèrmica

En aquest assaig s'estudia la isomerització de l'11-cis-retinal en experiments de perturbació tèrmica quan està unit a rodopsina i també en estat lliure mitjançant espectroscòpia UV-Vis.

III.2.5.3.2.a.-Estabilitat tèrmica de l'11-*cis*-retinal

Aquest experiment es basa en el mateix procediment explicat en l'apartat **III.2.5.3.1.a** però aquesta vegada s'aplica al 11-*cis*-retinal.

Material i equipament utilitzat

1-11-*cis*-retinal (proporcionat pel Dr. P. P. Philippov, Moscow State University); rodopsina purificada en tampó Na₂HPO₄ 2mM pH=6 i 0.05% DM.

2-L'equipament es descriu en l'apartat **III.2.5.3.1.d**.

Procediment experimental

1-Es realitza un espectre del retinal a 20°C.

2-Es treu la cubeta de l'espectrofotòmetre i es guarda a temperatura ambient en fosc.

3-Augmentem la temperatura a 55°C i es programa l'espectrofotòmetre per a que enregistri els espectres cada 5 min durant 30 min.

4-Es torna a posar la cubeta a l'espectrofotòmetre i comença el recompte de cicles.

5-S'il·lumina la mostra a màxima intensitat durant 10 s i es fa un espectre.

6-Es realitza un espectre de diferència entre la mostra del retinal abans i després d'il·luminar.

7-Els passos 1, 2, 3, 4, 5 i 6 es repeteixen de nou amb mostra de rodopsina purificada.

III.2.5.3.2.b.-Comportament en front la il·luminació del 11-*cis*-retinal i el tot-*trans*-retinal

Aquests assajos ens permetran determinar quin és l'espectre de diferència entre els espectres il·luminats i en fosc de les mostres de retinal per poder-ho comparar amb els resultats obtinguts en la desnaturalització. D'aquesta manera es podrà determinar si després de la perturbació tèrmica del 11-*cis*-retinal i de la rodopsina tenim el mateix isòmer.

Material i equipament utilitzat

1-11-*cis*-retinal (proporcionat pel Dr. P. P. Philippov, Moscow State University) i tot-*trans* Retinal (Sigma) resuspesos en etanol al 100% (Merck).

2-Equipament descrit en **III.2.5.3.1.d.**

Procediment experimental

1-S'enregistra un espectre del 11-*cis*-retinal a 20°C .

2-S'il·lumina el retinal durant 10 s sense filtre (ja que el retinal absorbeix a 380 nm) i es fa un espectre.

3-Es realitza un espectre de diferència entre l'espectre il·luminat i en fosc.

4-Repetir els passos 1, 2 i 3 amb tot-*trans*-retinal.

III.2.5.3.3.-Efecte del DM en l'estabilitat de la rodopsina

El DM és un detergent que pot afectar la conformació i la funció de rodopsina, en aquest cas es vol estudiar l'efecte d'aquest detergent en l'estabilitat dels intermediaris MetaII i MetaIII

III.2.5.3.3.a.-Efecte de diferents concentracions de DM en l'estabilitat de MetaII

Es vol determinar l'estabilitat de la forma activa de la rodopsina, és a dir, quan es troba en l'estadi de MetaII a diferents concentracions de DM. Per aquest experiment primer il·luminem la mostra de rodopsina i després a diferents temps l'acidifiquem amb àcid sulfúric 2N. Amb aquesta acidificació reprotonem la base de Schiff que quan es passa de rodopsina a MetaII es desprotona. Aquesta reprotonació es detecta mitjançant el pic a 440 nm (Sakamoto i Khorana, 1995). Només la part de proteïna que estigui en conformació de MetaII serà la que contribuirà al pic a 440 nm. L'experiment es fa a 20°C.

Material i equipament utilitzat

1-Rodopsina es troba en tampó fosfat potassi 70 mM i EDTA 0.1mM pH 6.9 i 0.012% DM i àcid sulfúric 2N.

2-L'equipament es descriu en l'apartat **III.2.5.3.1.d.**

Procediment experimental

1-Es fa un espectre inicial amb rodopsina, s'il·lumina durant 10 s i es fa un espectre.

2-Immediatament s'afegeixen 4 µl d'àcid sulfúric 2N i al cap de 5 min es realitza un espectre.

3-Els passos anteriors es repeteixen amb diferents mostres de rodopsina de ROS afegint l'àcid a 8, 16, 30 min i a 1 i 2 h després d'haver il·luminat la mostra.

4- Es repeteixen els passos 1, 2, i 3 en presència d'una concentració final a la cubeta de 0.0175%, 0.025% i 0.05% DM.

III.2.5.3.3.b.-Formació de MetaIII en presència de diferents concentracions de DM

Aquest assaig s'ha dut a terme en l'apartat **III.2.5.3.1.f.** però en aquest cas es realitzarà en absència de cations.

Material i equipament utilitzat

1-Mostra de rodopsina en tampó fosfat potassi 70 mM i EDTA 0.1mM pH 6.9 i 0.012%.

2-L'equipament és descrit en l'apartat **III.2.5.3.1.f.**

Procediment experimental

1-Es repeteixen els passos 1, 2, i 3 de l'apartat **III.2.5.3.1.f** per a la mostra de rodopsina.

2-El pas 1 es repeteix amb concentracions finals de 0.0175%, 0.025% i 0.05% DM.

III.2.5.3.4.-Caracterització espectroscòpica dels mutants de la rodopsina associats a malalties de la retina

III.2.5.3.4.a.-Estabilitat tèrmica i reactivitat enfront de la hidroxilamina en el mutant de la CNC T94I

Per a l'estabilitat tèrmica es segueix el mateix procediment explicat en l'apartat **III.2.5.3.1.**, en absència de cations, l'única diferència és que en aquest cas els experiments es realitzen a 37° C.

L'experiment de reactivitat enfront de la hidroxilamina es basa en utilitzar aquest compost, que té la capacitat de reaccionar amb la base de Schiff. Si la proteïna és compacte, com succeeix en la rodopsina nativa la hidroxilamina no presentarà cap efecte sobre la proteïna ja que no podrà accedir a la base de Schiff. Es segueix la disminució al màxim punt d'absorbància de cada espectre en el màxim d'absorció en el Vis respecte del temps.

Material i equipament utilitzat

1-Mostres de T94I, T94D, T94S i WT en KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2HPO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH=7.2 i 0.05%DM i hidroxilamina 1M (Sigma) pH 7.0.

2-L'equipament utilitzat es descriu en l'apartat **III.2.5.3.1.a.**

Procediment experimental

1-Es fa un espectre de la proteïna a 20°C.

2-Es prepara l'espectrofotòmetre per a que enregistri espectres cada 5 min durant 2 h.

3-S'afegeixen 30 mM d'hidroxilamina pH=7 a la cubeta i s'inicia l'enregistrament dels espectres.

III.2.5.3.4.b.-Característiques espectroscòpiques del mutant de l'RP L46R

Es segueix el procediment descrit en l'apartat **III.2.5.2.** un cop la proteïna ha estat purificada.

III.2.5.3.5.-Caracterització espectroscòpica dels mutants de la rodopsina de la part citoplasmàtica de les hèlices 3 i 6

III.2.5.3.5.a-Estabilitat tèrmica dels mutants en la posició 134, 247 i 251

Es segueix el procediment descrit en l'apartat **III.2.5.3.1.**, en absència de cations, de les proteïnes purificades però els experiments es realitzen a 45°C.

III.2.5.3.5.b-Reactivitat enfront de la hidroxilamina dels mutants en la posició 134, 247 i 251.

Es segueix el procediment descrit en l'apartat **III.2.5.3.4.a.**

III.2.6.-Determinació de l'estabilitat de MetaII per espectroscòpia de fluorescència

L'espectroscòpia de fluorescència és una tècnica que mesura la llum emesa per una partícula (anomenada fluoròfor) després d'esser irradiada per una llum de longitud d'ona inferior.

En les proteïnes s'utilitzen dos tipus de fluoròfors, uns extrínsecs que s'afegeixen externament associats a la proteïna per enllaç covalent o interaccions no covalents i els intrínsecs que són els aminoàcids aromàtics (Phe, Trp i Tyr) on el Trp és el que presenta més rendiment quàntic i la Phe el que menys. La fluorescència del Trp va des de 308 nm a 350-353 nm per a proteïnes desnaturalitzades i pèptids.

La informació que ens proporciona l'espectroscòpia de fluorescència en les proteïnes es basa en la conformació, ja que els canvis en la fluorescència d'aquests aminoàcids depenen del seu entorn, ja sigui canvis en el solvent o l'aproximitat d'aminoàcids (García-Segura, *et al.* 1996).

Aquesta tècnica s'ha aplicat en l'estudi de l'estabilitat de MetaII a partir de l'alliberament del retinal (Farrens i Khorana, 1995). Es basa en l'augment de fluorescència del Trp que és paral·lel a l'alliberament del retinal de la proteïna. La longitud d'ona d'excitació de la proteïna és 295 nm (escletxa = 0.25nm) i la d'emissió és 330nm, (escletxa= 12 nm).

Material i equipament utilitzat

1-Rodopsina en tampó Na₂HPO₄ 2mM pH=6 i 0.05% DM.

2-Accessori controlador de temperatura Peltier de doble cel·la Varian Cary; aparell il·luminador FIBER-LITE MI-150 amb filtre $\lambda > 495$ nm (*Dolan Jenner*); SPEX 212X fluorog Instrument (Spex Industries Inc., Edison, NJ).

3-Pel tractament de les dades s'utilitza el programa SigmaPlot versió 6.00 (SPSS Inc.).

Procediment experimental

1-La mostra de rodopsina es manté al fluorímetre durant 30 min a 20°C per estabilitzar la línia base.

2-S'il·lumina la mostra durant 30 s.

3-S'enregistra la corba d'augment de fluorescència, s'ajusta a una corba exponencial i es calcula el temps de vida mitja.

III.2.7.-Caracterització electroforètica de les rodopsines recombinants mutades

III.2.7.1.-Característiques generals

Es tracta d'un mètode analític-semipreparatiu que separa a les biomolècules en dependència de la seva càrrega sota la influència d'un camp elèctric. El gel de poliacrilamida com a tal va ser utilitzat per primera vegada als anys 30 i molt posteriorment al 1970 es va introduir el SDS (Laemmli *et al.*, 1970), que combinat amb agents reductors va permetre la separació de les proteïnes per la

seva massa molecular i es varen anomenar gels de poliacrilamida amb SDS (SDS-PAGE, *SDS- polyacrilamide gel electrophoresis*).

La porositat d'aquests gels ve condicionada pel percentatge d'acrilamida i l'addició del SDS en la mostra desnaturalitza completament la proteïna i trenca les interaccions no covalents. El grup dodecil es col·loca al interior mentre que els grups sulfat queden a la superfície i tots els complexos SDS-proteïnes queden carregats negativament, sobrepassant la càrrega neta de la proteïna. La migració del complex proteïna-SDS és inversament proporcional al logaritme de la seva massa molecular. Aquest fet permet als gels SDS-PAGE estimar la massa molecular de les proteïnes si es compara amb un patró de massa molecular conegut.

III.2.7.2.-Preparació dels gels de SDS-PAGE

Material i equipament utilitzat

1-Acrlamida (Fluka), bisacrilamida (Fluka), Tris-HCl, (AMRESCO), SDS (Amresco), Persulfat amònic (Sigma), TEMED (Sigma) i marcador de pesos moleculars (PM) (Amersham Biosciences; 6500-205000).

2-Tampó de càrrega (Tris 0.0625M (Sigma), SDS 2% (Sigma), Glicerol 10% (Panreac), β -mercaptoetanol 5% (AMRESCO) i 0.1% blau de bromofenol; es preparen 5 ml finals amb aigua destil·lada i s'aliquota de 1 ml en 1 ml en tubs eppendorf, els tubs no utilitzats es guarden a -20°C fins a la seva utilització) i tampó d'electroforesi 2X (Tris 0.6% (0.05M) (Sigma), Glicina 2.88% (0.38M) (Sigma) i SDS 0.1% (Sigma) en 1 litre).

3-Sistema d'electroforesi MiniProteanII (BioRad),

Procediment experimental

1-Es barregen els components que segueixen a continuació.

Gel separador:

Components	Stock	Condicions del gel	Volum
Acrilamida/Bisacrilamida	30%/0.8%	12%/5%	4 ml
Tris-HCl	1.5M pH=8.8	0.75 M	5 ml
SDS	10%	0.1%	0.1 ml
PSA(Persulfat amoni)	10%	0.1%	0.1 ml
TEMED (Sigma) (N,N,N',N', Tetrametilenediami)	10%	0.05%	0.05 ml
Aigua milliQ	-	-	0.75 ml

Mentre solidifica el gel, es cobreix amb isopropanol per evitar la oxidació de determinats grups del TEMED els quals podrien dificultar la solidificació.

Gel apilador:

Components	Stock	Condicions del gel	Volum
Acrilamida/Bisacrilamida (Sigma)	30%/0.8%	5%/0.13%	0.83 ml
TrisHCl (AMRESCO)	0.5M pH=6.8	0.125 M	1.25 ml
SDS (AMRESCO)	10%	0.1%	0.05 ml
PSA(Persulfat amoni) (Sigma)	10%	0.1%	0.05 ml
TEMED (Sigma) (N,N,N',N', Tetramethyethylenediamine)	10%	0.1%	0.05 ml
Aigua milliQ	-	-	2.77 ml

Es posen les pintes i es deixa solidificar.

2-Es preparen les mostres per ser carregades en el gel seguint les següents pautes.

	PM	BSA	Rodopsina bovina	Rodopsina recombinant
PM	2 µl	--	--	--
BSA	--	4		
mostra	--		9 µl	12 µl
Aigua destil·lada	4 µl		--	--
Tampó de càrrega	2 µl		3 µl	4 µl

3-Les mostres es bullen durant 5 min i posteriorment es centrifuguen per fer baixar les gotetes del tub.

4-S'apliquen les mostres al gel i es resol a 50mA i 100V fins a que la banda de blau de bromofenol hagi assolit el final del gel.

5-Es desmunta el sistema i es tenyeix el gel tal i com es descriu en el següent apartat.

III.2.7.3.-Tinció dels gels de SDS-PAGE

Per a la tinció dels gels de SDS-PAGE es poden utilitzar diverses tècniques, en aquesta tesi es presenten tres mètodes diferents.

1-Blau de *coomassie*

2-Tinció en plata

3-Electrotransferència de proteïnes i detecció immuno específica

III.2.7.3.1-Tinció de blau de *coomassie*

Material utilitzat

1-Solució blau de *coomassie* (2.5 g blue R-250 (Sigma), 100 ml àc. acètic concentrat (Panreac), 400 ml Metanol (Panreac) i enrasar a un litre amb aigua destil·lada i solució destenyidora (400 ml etanol (Panreac), 100 ml àc acètic concentrat (Merck) i s'enrasa a 1 litre amb aigua destil·lada).

2-Càmera fotogràfica Kodak DC290 Zoom Digital camera i pel tractament de les imatges s'utilitza el programa Quantity One (BioRad).

Procediment experimental

1-El gel d'electroforesi es col·loca en una placa de petri de 144 mm de diàmetre on hi ha uns 10 ml de solució de blau de *coomassie*.

2-S'incuben uns 10-15 min en agitació a temperatura ambient i es retira el blau de *coomassie*, que es pot reciclar evocant-lo directament en la mateixa ampolla.

3-Es procedeix a la destinció del gel afegint a la placa 10 ml de solució destenyidora i incubant durant 5 min la primer vegada, i 10 min les següents o fins i tot tota la nit.

4-Aquests gels es poden fotografiar o guardar-se directament un cop assecats amb paper de celofana.

III.2.7.3.2-Tinció de plata

La tinció de plata és una tècnica d'elevada resolució per a la tinció de gels de proteïnes. Al 1979 es va desenvolupar per primera vegada un mètode molt més resolutiu que el blau de *coomassie* però molt car i complicat però on el soroll de fons afectava a la bona interpretació dels gels, era la tinció en plata. Actualment i amb una sèrie de modificacions, s'ha aconseguit disminuir el cost, la complexitat i el soroll de fons (Wray *et al.* 1981).

Material i equipament utilitzat

1-Metanol (Panreac), Formaldehid 37% (Sigma), β -mercaptoetanol (Amresco), AgNO_3 (Panreac), NaOH (Panreac), NH_3OH (Sigma), àcid cítric (Sigma).

2-Equipament descrit en **III.2.7.3.1.**

Procediment experimental

Abans de realitzar aquest protocol, convé tenir tot el material completament net per evitar que aparegui soroll de fons en el revelat del gel. També és important no tocar en cap moment el gel ni tant sols amb guants. Tot el procés es realitza en agitació i a temperatura ambient i les solucions han de ser preparades al moment i amb aigua milliQ.

- 1-El gel de proteïnes és incubat en agitació a temperatura ambient tota la nit o un cap de setmana dins una placa de petri de 150 mm neta en una solució que conté 50% metanol, 0.05% de formaldehid 37% i 0.07% de β -mercaptoetanol en aigua milliQ.
- 2-S'incuba el gel amb una solució de 50% metanol i 0.05% de formaldehid 37% en aigua milliQ. La incubació pot durar d'entre 30 min a 2 h. S'aspira la solució per evitar qualsevol contacte amb el gel.
- 3-Es repeteix el pas anterior 4 o 5 vegades més.
- 4-El gel s'incuba 1 h amb metanol al 50% en aigua milliQ.
- 5-Es renta el gel diverses vegades amb aigua milliQ i mentre es prepara la solució de plata per a la tinció, s'incuba el gel en aigua milliQ.
- 6-Es prepara la solució de plata de la següent manera:
 - Es pesen 0.8g de AgNO_3 i es resuspenen en 4 ml d'aigua milliQ.
 - Apart es barregen 21 ml de NaOH 0.09M i 1.6ml de NH_3 14M i s'agita a alta velocitat mentre s'hi afegeix amb una pipeta pasteur molt a poc a poc la solució de AgNO_3 fins el moment abans de que apareguin precipitats de plata.
 - S'enrasa a 100 ml amb aigua milliQ.
- 7-S'incuba el gel durant 15 min amb aquesta solució i posteriorment s'aspira.
- 8-El gel es renta diverses vegades amb aigua milliQ aspirant-la posteriorment. Com més rentats, menys soroll de fons apareixarà en el revelatge del gel.
- 9-S'incuba el gel en una solució que conté 0.0375% de formaldehid 37% i 0.375% de àcid cítric 1% en aigua milliQ fins a que comencin a aparèixer les bandes de proteïnes.
- 10-La reacció s'atura amb metanol 50% i la tinció queda fixada.
- 11-La foto cal fer-la com a molt tard 1 h després de la fixació ja que el gel comença a ennegrir-se.

III.2.7.3.3.-Electrotransferència de proteïnes i detecció immuno específica

Material i equipament utilitzat

1-Espongetes Scotch-Brite, paper watman (Sigma), plaques de petri netes, membrana de nitrocel·lulosa 0.45 µm de diàmetre (Sigma), anticòs primari Rho-1D4 (5mg/ml), Immunoglobulina G (IgG) acoblada a fosfatasa alcalina (Sigma) i *5-bromo-4-choro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium* (NBT/BCIP) (Sigma).

2-Les solucions emprades són: tampó de transferència (25 mM tris (Sigma), 190mM (Sigma) i 20% metanol (Baker)) no cal ajustar el pH (pH 8.3) i enrasar a 5 litres; tris *buffer* salí (TBS) (10mM Tris, 150mM NaCl); tween-TBS (TTBS) (TBS + 0.001% Tween 20) i tampó de bloquejament (TTBS + 5% albúmina).

3-Aparell de transferència Transblot System MiniProteanII (Biorad) i el descrit en **III.2.7.3.1.**

Procediment experimental

1-S'incuben les espongetes, el paper watman i el gel en tampó de transferència en plaques separades durant 15 min.

2-La membrana de nitrocel·lulosa s'incuba primer amb aigua destil·lada durant 45 min i posteriorment en tampó de transferència durant 15 min.

3-Es monta el sistema en un lloc net i pel següent ordre evitant bombolles entre el gel i la membrana.

Part negra del sistema de transferència
Espongeta Scotch-Brite
3 papers watman
Gel d'electroforesi
Membrana de Nitrocel·lulosa
3 papers Wattman
Espongeta Scotch Brite
Part transparent del sistema de transferència

4-Es posa el sistema a dins de les cubetes d'electroforesi que contenen el tampó de transferència i es corre a 500 mA durant 2 h mantenint el sistema en gel per evitar el seu escalfament.

5-Es desmunta el sistema i es deixa incubant la membrana amb tampó de bloqueig durant tota la nit o el cap de setmana a temperatura ambient en agitació.

6-Paral·lelament, el gel pot tenyir-se amb blau de *coomassie* per comprovar que s'ha produït la transferència (veure apartat **III.2.7.3.1.**).

7-Es renta la membrana 5 o 6 vegades amb TTBS en incubacions de 10 a 30 min en agitació a temperatura ambient.

8-La membrana és tractada amb una dilució 1/10000 de l'anticòs primari en TTBS i s'incuba durant 30 min en agitació a temperatura ambient.

9-Es renta la membrana 9 o 10 vegades amb TTBS en incubacions de 10 a 30 min en agitació a temperatura ambient.

10-La membrana és tractada amb una dilució 1/10000 de la IgG en TTBS i s'incuba durant 30 min a temperatura ambient.

11-Es renta la membrana 5 o 6 vegades amb TBS en incubacions de 10 a 30 min en agitació a temperatura ambient. Cal treure tot el tampó al final de l'últim rentat.

12-Amb ajut d'una pipeta pasteur, s'afegeix directament sobre la membrana unes gotes de la solució NBT/BCIP i s'esperen uns segons.

13-Immediatament apareixeran les bandes tenyides de rodopsina i s'atura la reacció rentant diverses vegades amb aigua destil·lada.

III.2.8.-Cromatografia líquida d'alta pressió per a la identificació dels retinals

Les proteïnes es poden separar segons les seves propietats físiques (com la mida, càrrega, forma, hidrofobicitat i afinitat) respecte d'altres molècules. La cromatografia en fase líquida a alta pressió (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) permet la separació de molècules sota condicions d'alta pressió en una columna d'acer inoxidable que conté una matriu.

En aquest cas es produirà la separació dels diferents isomers de retinal després de l'aplicació de les mescles de retinals extrets d'una mostra de rodopsina o de retinal en solució.

Material i equipament utilitzat

1-Hexà (Baker); hidroxiltoluè butilat (Baker); metanol (Baker); 11-*cis*-retinal i tot-*trans*-retinal resuspendos en etanol 100%, acetonitril aquós (Baker), acetat de potassi (Panreac), àcid acètic glacial (Sigma); rodopsina tractada a 55°C seguint les condicions establertes en l'apartat **III.2.5.3.2.**

2-Les solucions utilitzades són: tampó d'equilibri (72% acetonitril aquós (volum/volum) i 0.015 M acetat amoni ajustat a pH= 5.5 amb acid acètic glacial).

3-Vòrtex, columna cromatogràfica de fase reversa C18 (25 x 0.46 cm, 5µm de mida de partícules) (Tracer) i un instrument Perkin-Elmer.

4-L'anàlisi dels cromatogrames va ser realitzar amb el programa Tubochrom Navigator (Perkin-Elmer).

Procediment experimental

1-Es transfereix per la columna cromatogràfica tampó d'equilibri a un flux de 3ml/min.

1-S'afegeixen 0.1 ml de hidroxiltoluè butilat i 2 ml d'hexà a 500 µl de mostra de rodopsina prèviament tractada a 55°C (apartat **III.2.5.3.2.**) i s'homogeneïtza amb el vòrtex.

2-S'afegeix a la barreja 2 ml de metanol i 1 ml d'aigua milliQ i es vortexa de nou.

3-La barreja es centrifuga durant 5 min a 3000rpm i 4°C i es recull la fase superior, la que conté hexà i es deixa assecar la fase.

4-La part sòlida es resuspend amb 200 µl de metanol-tampó d'equilibri (volum/volum).

5-Les mostres de retinal són diluïdes en tampó d'equilibri i es barregen.

6-Es transfereixen les mostres de l'apartat 4 i 5 per la columna cromatogràfica i s'eluïxen amb tampó d'equilibri.

7-Les dades obtingudes són analitzades mitjançant el programa Tubochrom Navigator.