

## **VII. ANNEXOS**

## **Annex 1: Medis Bacterians**

### **1.1.-Medi 2YT líquid (per 1 litre)**

Aquest medi juntament amb el *terrific broth* es caracteritzen pel seu elevat contingut en triptona i extracte de llevat proporcionen un elevat creixement dels cultius bacterians.

1- Fer la barreja dels següents components:

16 g Triptona (Pronadisa)

10 g Extracte de Llevat (Pronadisa)

5 g NaCl (Panreac)

2-Es resuspèn tot en 800 ml d'aigua destil·lada.

3-S'ajusta a pH 7.0-7.4 amb NaOH 5N i s'enrasa a 1000 ml amb aigua destil·lada.

4-S'autoclava (30 min a 120°C) i es guarda a temperatura ambient.

### **1.2.-Medi 2YT sòlid + 100 ug/ml ampil·lina (per 500 ml)**

1-Es barregen els següents components en 300 ml d'aigua destil·lada en un erlenmeier:

8 g Triptona (Pronadisa)

5 g Extracte de Llevat (Pronadisa)

5 g Agar Bacteriològic (Pronadisa)

2.5 g NaCl (Panreac)

2-S'ajusta a pH 7.0-7.4 i s'enrasa a 500 ml amb aigua destil·lada. Es tapa l'erlenmeier amb paper de plata.

3-S'autoclava (30 min a 120°C) i es deixa refredar però sense solidificar (és a dir, fins que es pugui aguantar l'erlenmeier en el palmell de la mà). Quan cal refredar ràpidament el medi, es posa sota l'aixeta d'aigua freda agitant l'erlenmeier per a que el refredament sigui homogeni.

4-S'afegeixen 500 µl d'ampil·lina (USB) 100mg/ml, es barreja suaument i es reparteix en plaques (15-20 ml/placa).

5-Es deixa solidificar a temperatura ambient, també es poden incubar tota la nit a temperatura ambient.

Per comprovar que l'ampicil·lina no sigui inactiva en la placa, es posen a créixer en les plaques cèl·lules competents (apartat de material i mètodes **III.2.2.1.**) sense transformar tota la nit a 37°C.

## **Annex 2: Medis eucariotes**

### **2.1.-El sèrum fetal boví**

El SFB (Gibco) ha estat obtingut a partir de la sang extreta d'una punció cardíaca de fetus boví. Posteriorment, es separa el sèrum respecte el coàgul i es congela. Tot el procediment es realitza a temperatures refrigerades. El sèrum utilitzat en els experiments descrits està lliure de virus i micoplasma. Per la presència en el sèrum dels factors complement, prèviament s'ha d'inactivar mitjançant un tractament tèrmic a 56°C durant 30 min. Després s'aliquota en tubs de 50 ml en 50 ml i en guarden a -20°C fins a la seva utilització.

### **2.2.-La tripsina-EDTA**

La tripsina és un dels tres enzims proteolítics digestius i actua trencant les proteïnes de la dieta en pèptids i aminoàcids i en l'organisme és produït pel pàncrees. Presenta histidines i serines en el centre catalític i digereix pels enllaços peptídics d'aminoàcids que contenen arginina i lisina. La tripsina també s'utilitza per a la determinació de la seqüència de determinades proteïnes. En els nostres experiments és utilitzada per a desenganxar les cèl·lules de la capa adherent de la placa de cultiu. La casa comercial (BioMedia) ens el proporciona amb EDTA, un agent quelant per evitar la inactivació de l'enzim per efecte de determinats ions. Es troba concentrat 10 X en ampolles de 100 ml, es reparteixen de 10 ml en 10 ml i cada vegada i es guarda a -20°C fins a la seva utilització. Per la seva utilització, es dilueix amb PBS.

### **2.3.-La penicil·lina + estreptomicina + glutamina**

La Pen i la Strpt són els antibiòtics utilitzats com a suplement per evitar la contaminació bacteriana en els cultius cel·lulars. A més s'hi afegeix una suplement de Gln. La casa comercial, Gibco, ens proporciona els tres components junts en ampolletes de 100ml a una concentració 100X . Només els descongelem i les repartim de 10 ml en 10 ml per una més fàcil utilització.

## **2.4.-El DEAE-Dextra**

El DEAE-Dextrà és un compost format per DEAE un compost policatiònic derivat del dextrà i el dextrà pròpiament dit en una relació 1:3 respectivament. Quan es troba en forma sòlida és molt estable i la seva efectivitat pot durar més de cinc anys. En solució a temperatura ambient també és estable en un rang de pH de 4 a 10, per fora d'aquest rang de pH i a temperatures elevades el dextrà es podria despolimeritzar.

El compost pot tenir moltes funcions, una d'elles és la transfecció transitòria de gen clonats en cèl·lules de mamífer des de fa 40 anys (Vaheri i Pagano, 1965) . A partir d'aquell moment s'han realitzat diverses millores en el procés de transfecció i s'han arribat a definir les condicions òptimes ambientals de les cèl·lules i la composició del medi (Gonzalez i Joly, 1995).

La preparació del DEAE-Dextrà (2.5mg/ml), es realitza per a 100 ml:

- 1- Es pesen 0.250 g de DEAE-Dextrà (Sigma)
- 2-S'enrasa a 100 ml amb 90 ml DEMEM + 1 ml Strp+Gln+Pen + 10 ml FCS
- 3-S'agita amb vigorositat per tal de desfer la pasta que forma el DEAE en aquesta solució i posteriorment es filtra en una xeringa connectada a un filtre de 0.22 µm de porus (Millipore).
- 4-Es guarda a 4°C fins a la seva utilització.

## **2.5.-La cloroquina**

La chlo es troba dins del grup de la amino-4-quinolina, un derivat de la quinolina. És un compost utilitzat en farmacologia per diverses aplicacions com a antimalàric, ameobicida i antiinflamatori. La chlo a per si sola és poc soluble en solució aquosa però altament en dissolvents orgànics com el cloroform. Al laboratori utilitzem la forma fosfatada per augmentar-ne la solubilitat en solució aquosa i en solució àcida. La seva fórmula molecular és  $C_{18}H_{29}ClN_3 \cdot 2H_3PO_4$  amb un pes molecular de 515.92. La seva forma sòlida es caracteritza per ser cristal·lina i amarga i la seva estabilitat és d'almenys 5 anys però és sensible a la

llum. En la transfecció, la chlo s'ha relacionat amb la millora de l'efectivitat de la transfecció, tot i que no se sap quina és la seva funció concreta.

La preparació de la chlo (1 mM) en 100 ml:

1-Es pesen 0.052 g de chlo en un vas de precipitat protegit de la llum amb paper de plata.

2-S'afegeixen 60 ml d'aigua milliQ i s'ajusta el pH=7.2 amb NaHCO<sub>3</sub> en pols.

3-S'acaba d'enrasar amb aigua milliQ fins als 100 ml.

4-Es filtra amb una xeringa que està connectada en un filtre de 0.22 µm

5-Es guardar a 4°C envoltat de paper d'alumini.

### Annex 3: Encebadors utilitzats per a la construcció dels mutants de rodopsina

#### 3.1.-Oligonucleòtids sintètics utilitzats en la construcció dels mutants en la posició 94.

T94I1	5'-gAT CTC TTC Atg gTC TTC ggT ggC TTC ACC ACC <b>ATC</b> CTC TAC ACC TCT CTC-3'
T94I2	5'-C ATg gAg AgA ggT gTA gAg <b>gAT</b> ggT gAA gAA gCC gAA gAC CAT gAA gAC CAT gAA gA-3'
T94D1	5'-gAT CTC TTC Atg gTC TTC ggT ggC TTC ACC ACC <b>GAT</b> CTC TAC ACC TCT CTC-3'
T94D2	5'-C ATg gAg AgA ggT gTA gAg <b>ATC</b> ggT gAA gAA gCC gAA gAC CAT gAA gAC CAT gAA gA-3'
T94S1	5'-gAT CTC TTC Atg gTC TTC ggT ggC TTC ACC ACC <b>TCT</b> CTC TAC ACC TCT CTC-3'
T94S2	5'-C ATg gAg AgA ggT gTA gAg <b>AgA</b> ggT gAA gAA gCC gAA gAC CAT gAA gAC CAT gAA gA-3'
T94K1	5'-gAT CTC TTC Atg gTC TTC ggT ggC TTC ACC ACC <b>AAg</b> CTC TAC ACC TCT CTC-3'
T94K2	5'-C ATg gAg AgA ggT gTA gAg <b>CTT</b> ggT gAA gAA gCC gAA gAC CAT gAA gAC CAT gAA gA-3'

#### 3.2.-Encebadors utilitzats en la construcció dels mutants E247A i E247Q.

E247Q1	5'-gCCCAGCAGCAGgAgAgCgCCACCACTCAGAAggCCCA <b>g</b> AAggA ggTCA-3'
E247Q2	5'-CgCgTgACCTCCTT <b>CT</b> gggCCTTCTgAgTggTggCgCTCTCCTgC TgCTgggCTgCA-3'
E247A1	5'-gCCCAGCAGCAGgAgAgCgCCACCACTCAGAAggCC <b>gCg</b> AAggA ggTCA-3'
E247A2	5'-CgCgTgACCTCCTT <b>Cg</b> CggCCTTCTgAgTggTggCgCTCTCCTgC TgCTgggCTgCA-3'

### 3.3.-Encebadors utilitzats en la construcció del mutant L46R

L46R1	5'-CgCCTACATgTTCC <b>gg</b> CTgATCATgCTTgg-3'
L46R2	5'-CCAAgCATgATCA <b>gCC</b> ggAACATgTAggCg-3'

### 3.4.-Encebadors utilitzats en la construcció dels mutants T251A, T251E i T251K simples, dobles i triples mutants.

T251A1	5'-gAAggAggTC <b>gCgCg</b> TATggTTATCATCATggTC-3'
T251A2	5'-gACCATgATgATAACCATACg <b>CgCg</b> ACCTCCTTC-3'
T251E1	5'-gAAggAggTC <b>gAgCg</b> TATggTTATCATCATggTCATCg-3'
T251E2	5'-CgATgACCATgATgATAACCATACg <b>CTCg</b> ACCTCCTTC-3'
T251K1	5'-gAAggAggTCA <b>AgCg</b> TATggTTATCATCATggTCATC-3'
T251K2	5'-gATgACCATgATgATAACCATACg <b>CTTg</b> ACCTCCTTC-3'



## **Annex 4. Gels d'agarosa analítics i preparatius.**

Un cop formats els fragments de DNA digerit o obtingut el DNA d'una purificació a partir de cèl·lules bacterianes es poden visualitzar en un gel d'agarosa. L'agarosa en els gels es forma per què les cadenes del polímer s'uneixen entre si formant una xarxa rígida tridimensional de superfibras helicoidals que li confereixen rigidesa al gel. La mida dels porus del gel és relativament gran i permet el pas del DNA, lipoproteïnes i partícules víriques. És possible formar gels útils per electroforesi utilitzant quantitats d'agarosa compreses entre 0.4% fins 5% d'agarosa. Concentracions superiors no són recomanables ja que els gels resulten poc elàstics i difícilment manejables i llavors es substitueixen pels PAGE.

El gel que utilitzem és de baixa electroendosmosi (EEO). Aquest fenomen consisteix en que l'agarosa presenta determinats grups aniònics estabilitzats per càrregues positives, aquestes càrregues es troben solvatades per molècules d'aigua. En presència d'un corrent elèctric, les càrregues positives corren cap al càtode, enduent-se les molècules d'aigua amb elles, això provoca que es distorsioni tant el moviment de les mostres com l'estructura del propi gel. En el nostre cas, l'agarosa està modificada amb la presència de substitucions que fan abaixar el grau d'EEO.

El bromur d'etidi és un colorant vermell fluorescent carcinogen de la família de les sals de fenantridini. També se l'anomena bromur de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridini o EtBr, la seva fórmula molecular és  $C_{21}H_{20}N_3Br$  i el seu pes molecular és de 394.3. És un agent intercal·lant de les bases nitrogenades del DNA, el que permet detectar-lo en gel d'agarosa quan s'irradia amb llum UV.

### *Material i equipament utilitzat*

1-Agarosa D-1 Baja EEO (Pronadisa), EtBr (Sigma; 10 mg/ml), el marcador de pesos moleculars  $\lambda$  DNA-HindIII digest (Pharmacia) i Kb DNA Ladder (Stratagene).

2-TAE1X (preparat del stock 25X (Tris-Base 1M (Panreac), 0.5M àc. acètic Glacial (Panreac) i EDTA 25 mM pH=8.0 (Sigma) en aigua destil·lada) i el

tampó de càrrega (6x) (en 5 ml conté 3.5 ml TAE 1X, 1.5 ml de glicerol (Sigma), 0.25% de blau de bromofenol (Sigma) i s'aliqota de 1ml en 1 ml i es guarda a -20°C).

3-Els aparells d'electroforesi utilitzats són Sub-Cell GT mini i Sub-Cell GT wide mini (BioRad), la càmera fotogràfica Kodak DC290 Zoom Digital Camera™ i pel tractament dels gels s'utilitza el programa Quantity One (BioRad).

### *Procediment experimental*

1-Es pesen 0.5 g d'agarosa i es resuspenen en 50 ml de TAE1X.

2-Es dissol l'agarosa durant 2 minuts al microones. Es deixar refredar (sense solidificar) i s'afegeix el EtBr (a una concentració final de 0.5 µg/ml).

3-Abans que es solidifiqui, es passa l'agarosa en la plantilla del aparell d'electroforesi que te la pinta corresponent en funció de les mostres que es vulguin carregar i es deixa solidificar.

4-A cada mostra s'afegeix la quantitat necessària de tampó de càrrega (6x) i es carreguen en el gel.

5-El gel es resol a 75V i 500 mA.

6-Un cop el front blau, donat pel blau de bromofenol del tampó de càrrega, arriba al final del gel, es para la font de corrent i es fotografia el gel.