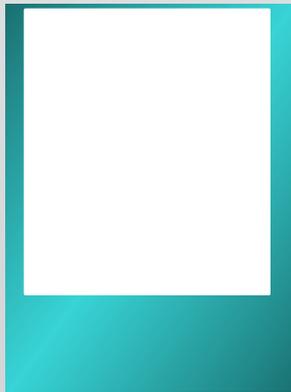




## TRABAJO PRÁCTICO N° 3.

Transducción de Señales: “Participación de fosfolípidos en la respuesta al estrés salino y osmótico en plántulas de cebada”.



*Dpto. de Biología Molecular  
Universidad Nacional de Río Cuarto*

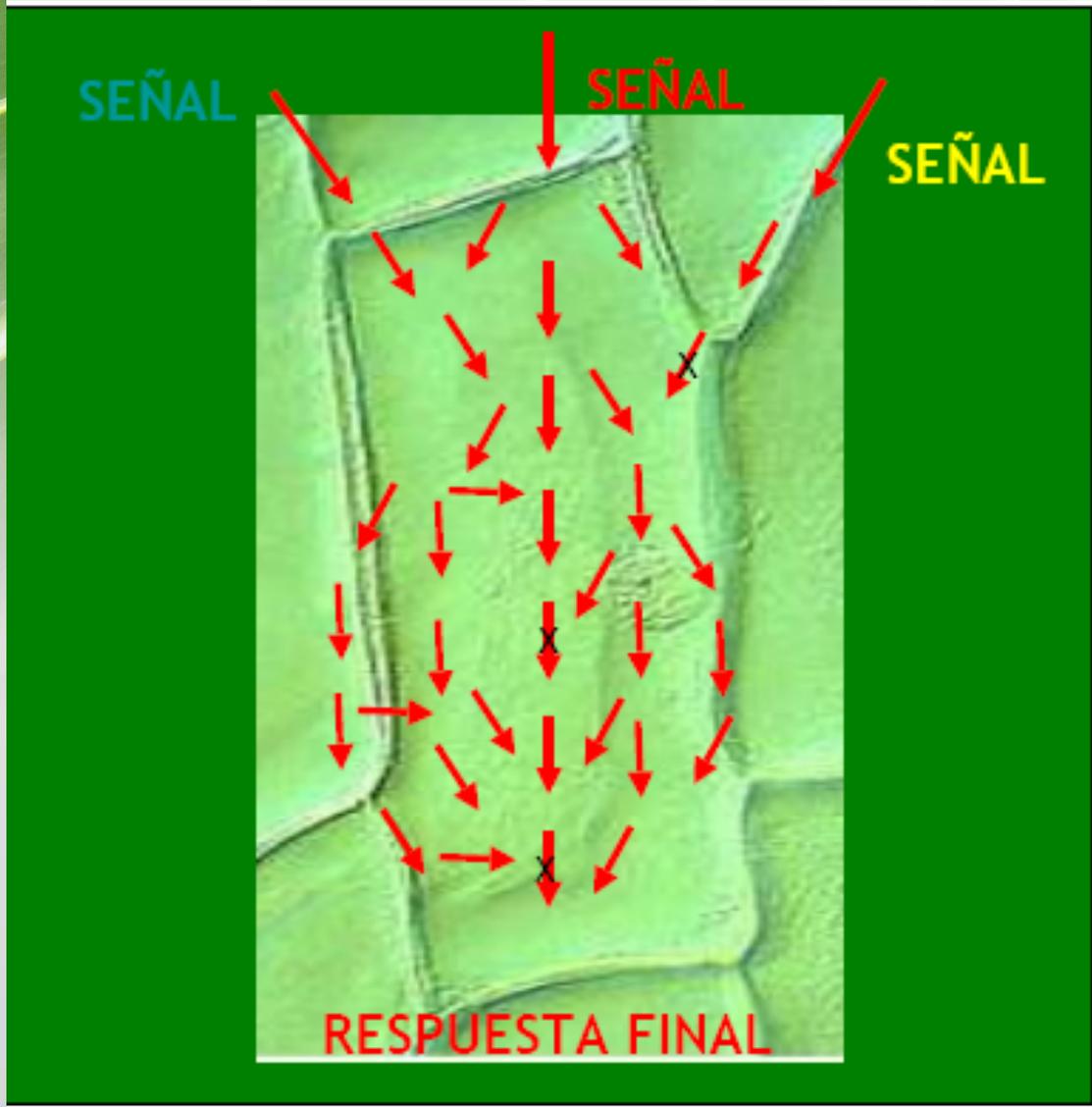


SEÑAL

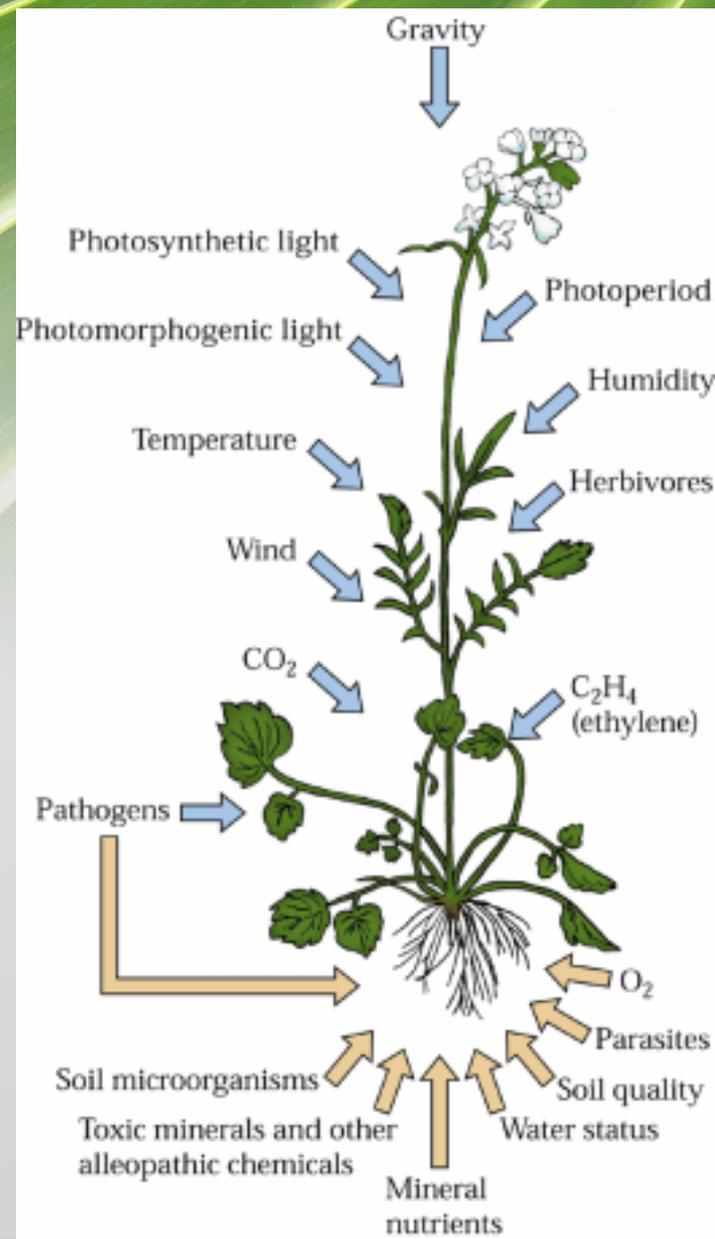


¿?

RESPUESTA CELULAR



# Señales que recibe una planta....

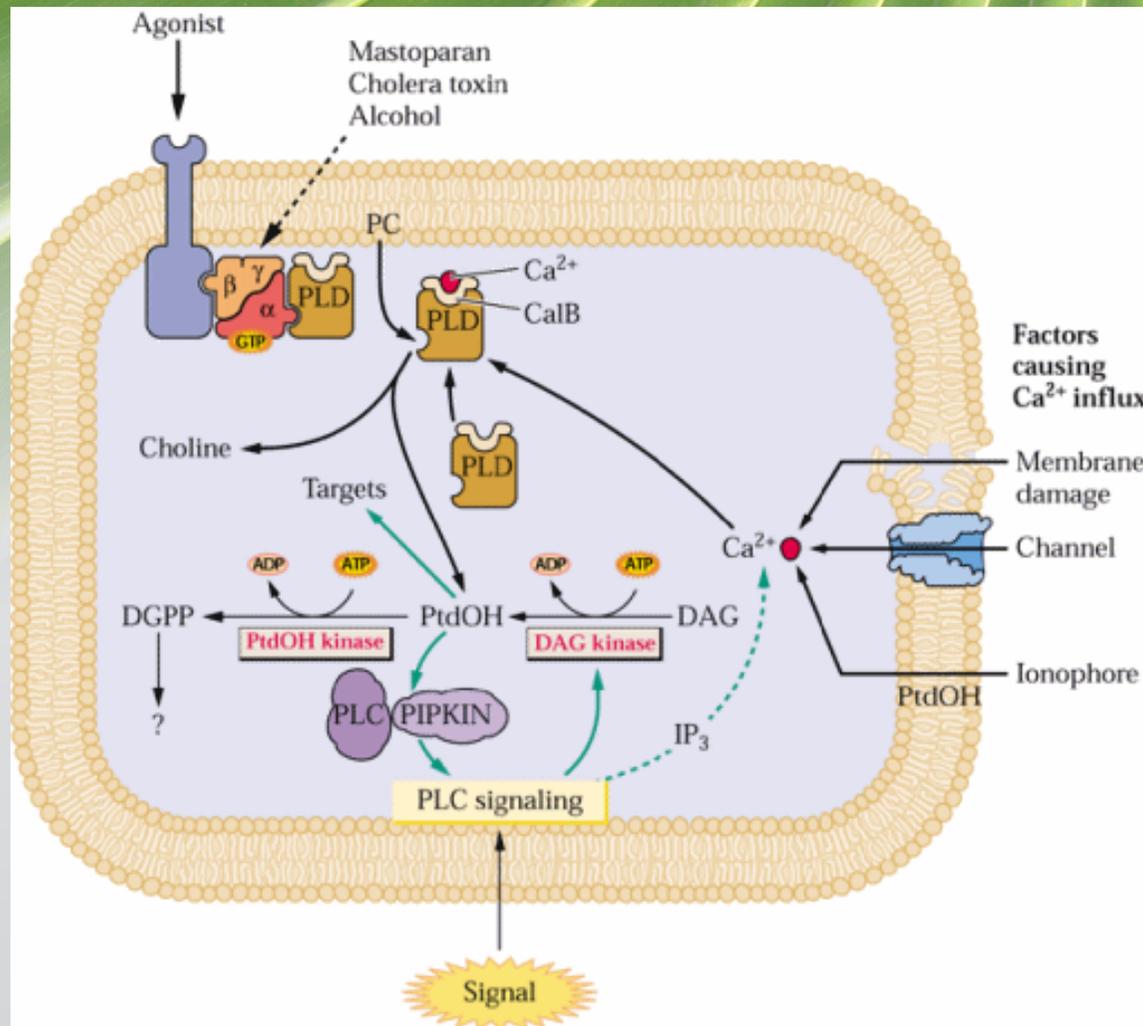


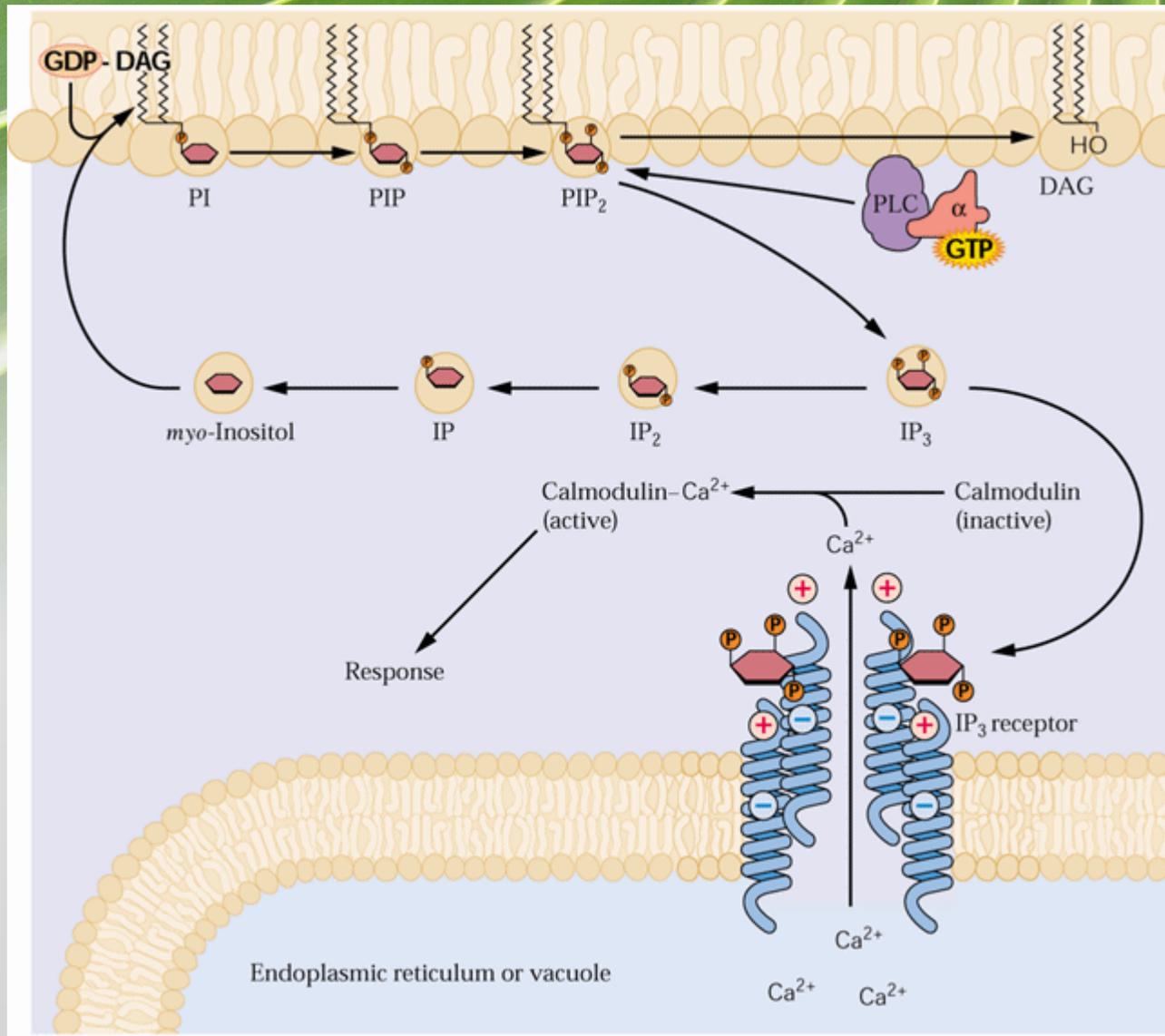


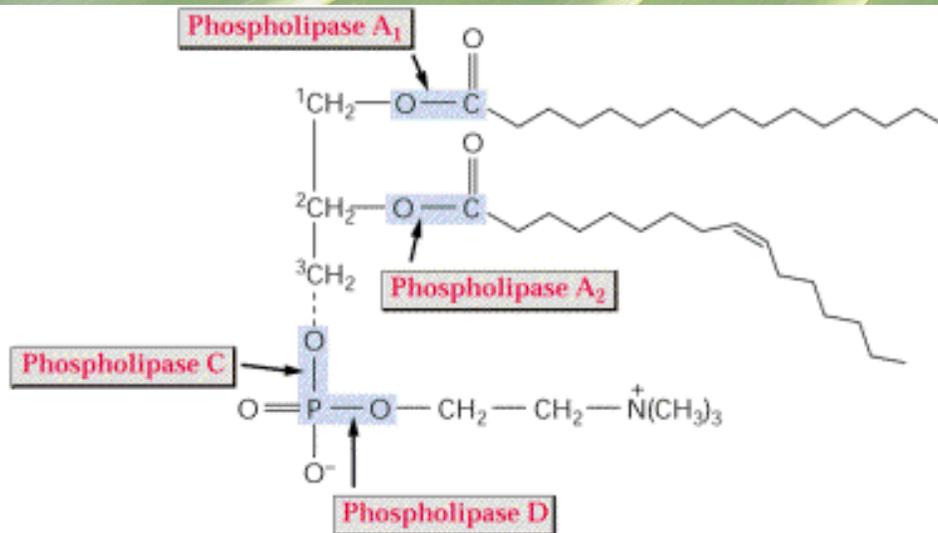
HAY ALGO QUE RECIBE LA SEÑAL

HAY ALGO QUE TRASMITTE LA SEÑAL

HAY ALGO QUE RESPONDE A ESA SEÑAL







Enzyme	Products of phosphatidylcholine cleavage
<b>PLA</b>	Free fatty acid and lysophospholipid
<b>PLC</b>	DAG and phosphocholine
<b>PLD</b>	Phosphatidic acid and choline

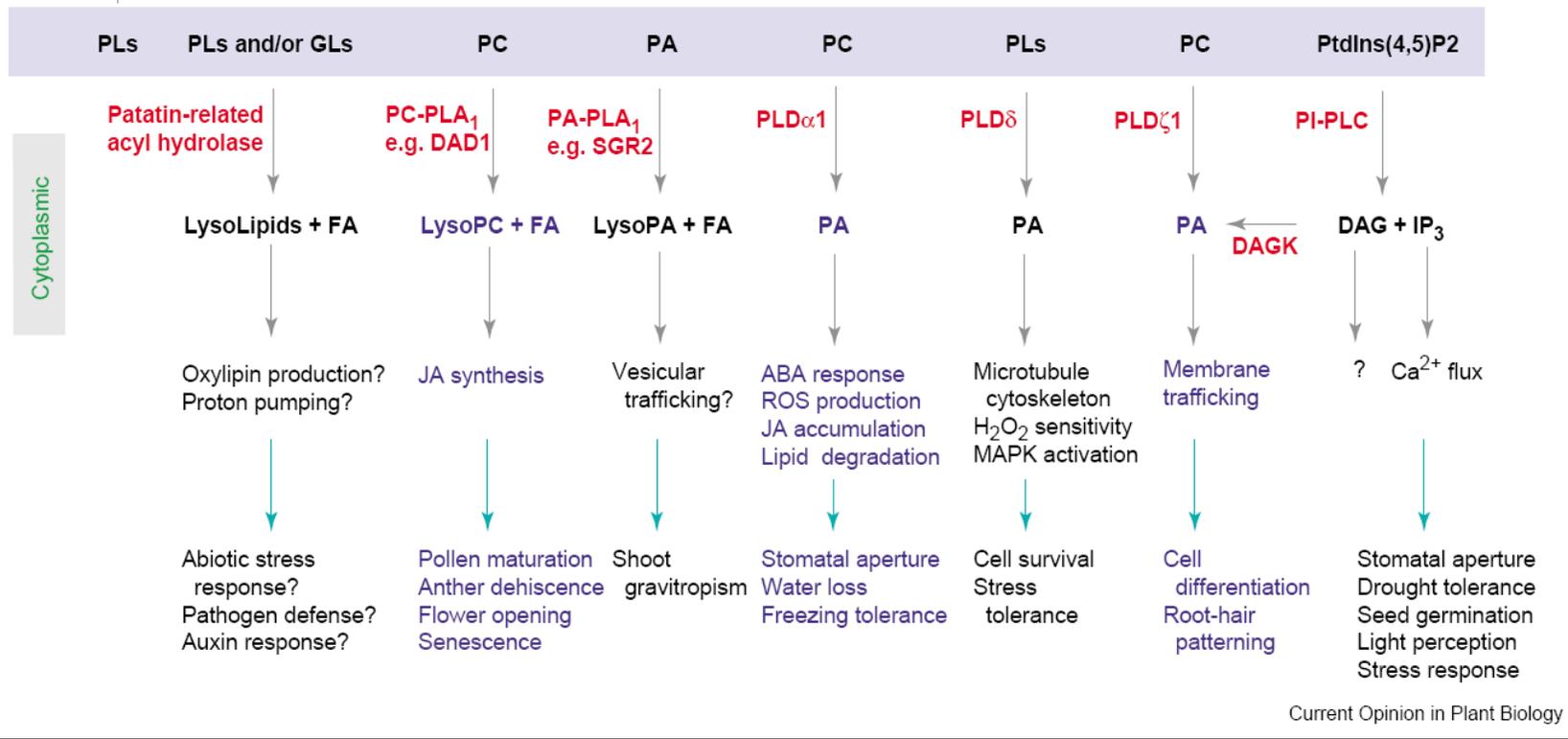
Cell elongation, gravitropism

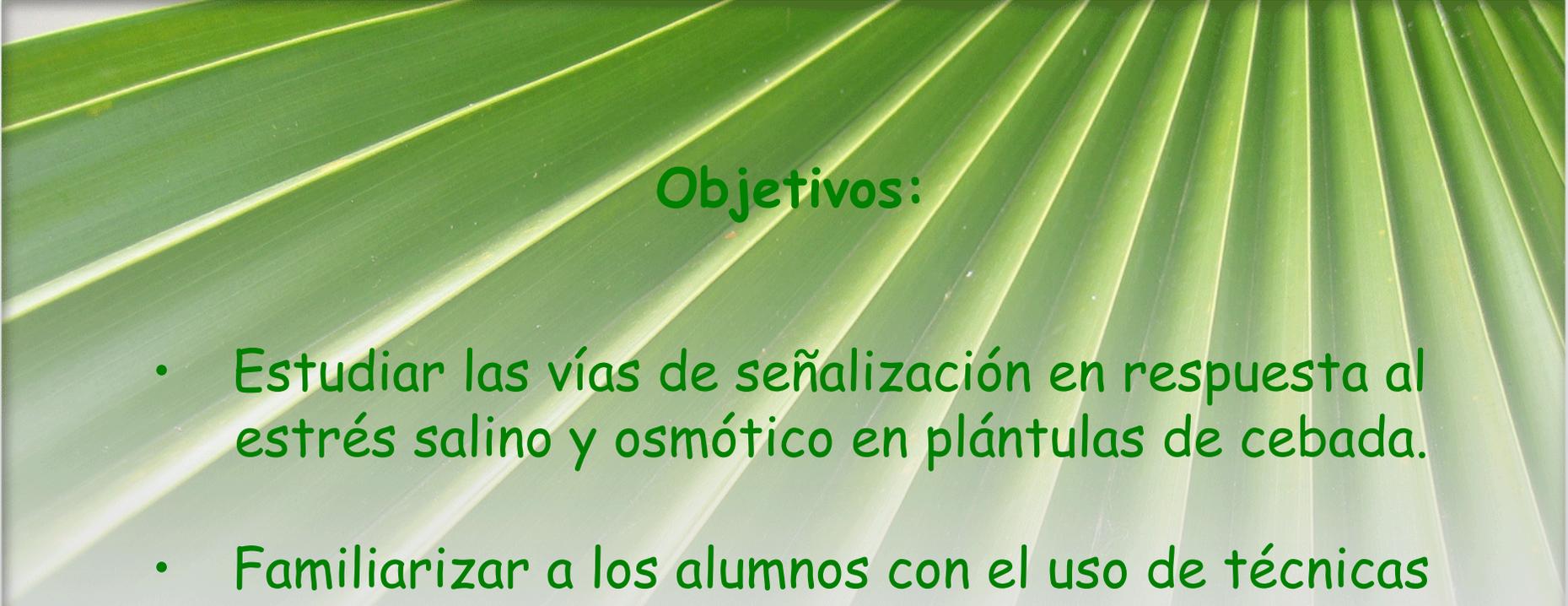
Proton pumping?

LyoLipids + FA

sPLA<sub>2</sub>

Apoplastic



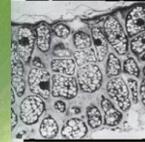


## Objetivos:

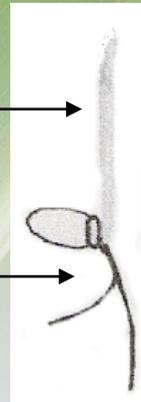
- Estudiar las vías de señalización en respuesta al estrés salino y osmótico en plántulas de cebada.
- Familiarizar a los alumnos con el uso de técnicas bioquímicas involucradas en la determinación de lípido quinasa y la cinética de fosforilación de lípidos señales.
- Adquirir destreza en la extracción, separación y cuantificación de fosfolípidos mediante el uso de cromatografía en capa delgada.

## SISTEMAS DE ESTUDIO

- Células de aleurona



- Coleóptilo →



- Raíz →

## CONDICIONES DE GERMINACIÓN

- Control ( $H_2O$ )
- NaCl (100 mM)
- Manitol (200 mM)

## Material biológico

Semilla de cebada sin embrión



Esterilizar con NaOCL 30 min.



Enjuagar con agua estéril

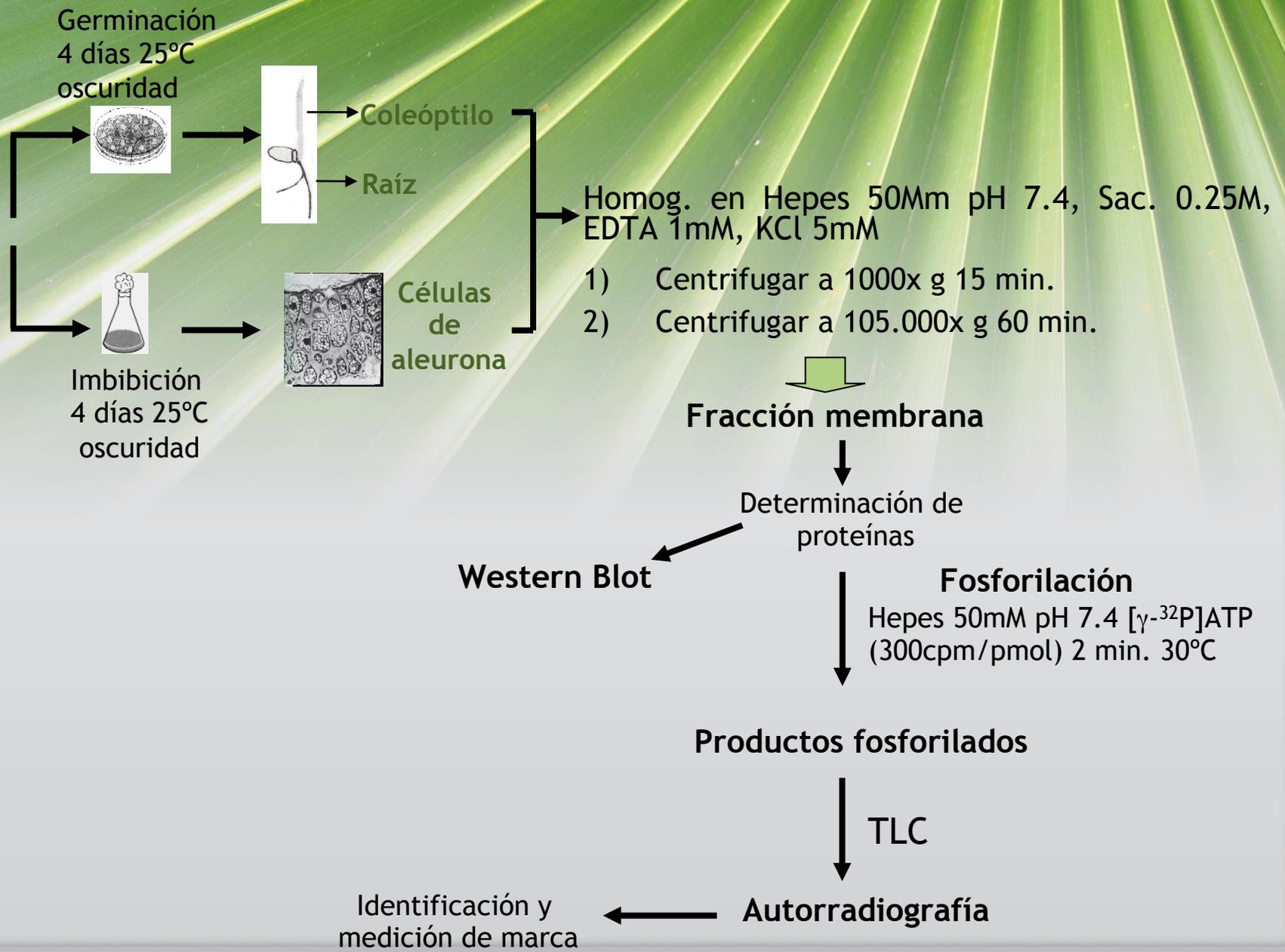


Neutralizar con HCL



Imbibición en condiciones estériles y oscuridad  
Temperatura ambiente 4 días

# METODOLOGÍA





$^{14}\text{C}$        $^3\text{H}$        $^{32}\text{P}$

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$

## Preparación de la mezcla de fosforilación (mix)

	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
Hepes 200 $\mu\text{M}$	332,4
Vanadato	27,2
EDTA	6,72
$\text{MgCl}_2$	8,48
DTE	13,28
Mg-ATP	13,28
ATP*	3,3
Agua c.s.p. 800 $\mu\text{l}$	395,34

## Cálculo de ATP\*

$1,0 \times 10^6$  pmoles  $\rightarrow$  1000  $\mu$ l

$1,28 \times 10^6$  pmoles  $\leftarrow$  800  $\mu$ l

750 cpm  $\rightarrow$  1 pmol

$9,6 \times 10^8$  cpm  $\rightarrow$   $1,28 \times 10^6$  pmol

$2,2 \times 10^{10}$  cpm  $\rightarrow$  70  $\mu$ l (vol. de frasco)

$9,6 \times 10^8$  cpm  $\rightarrow$  3  $\mu$ l

3  $\mu$ l  $\rightarrow$  90 %

3,3  $\mu$ l  $\leftarrow$  100 %

## Control de la actividad específica de la mix

2  $\mu$ l  $\longrightarrow$  1.200.000 cpm

800  $\mu$ l  $\longrightarrow$  x1 =

x1  $\longrightarrow$  1,28  $\times 10^6$  pmoles

x2 = (750 cpm)  $\longleftarrow$  1 pmol

## Determinación de la actividad lípido quinasa

Fosforilación en presencia de [ $^{32}\text{P}$ ]ATP



Extracción lipídica



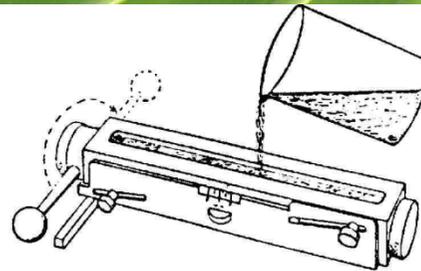
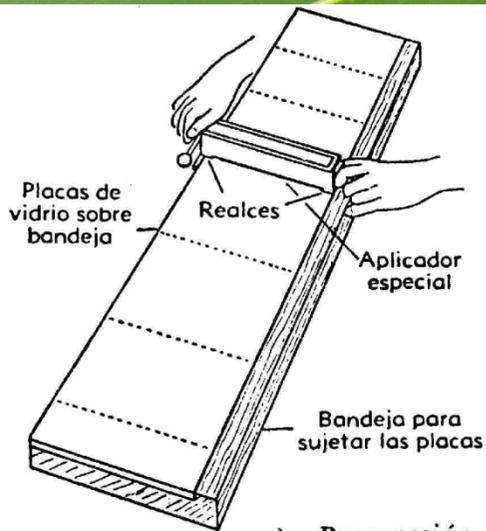
Cromatografía en capa delgada (TLC)



Autoradiografía



Determinación de radioactividad en contador de centelleo

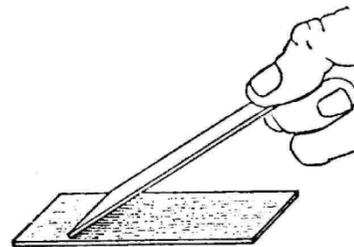


La papilla se coloca en el aplicador (para el manejo se gira como se indica, descargándose la papilla por el fondo del aplicador, que se desliza a lo largo de las placas y forma una película de un espesor determinado por los realces)

a) Preparación de placas grandes.



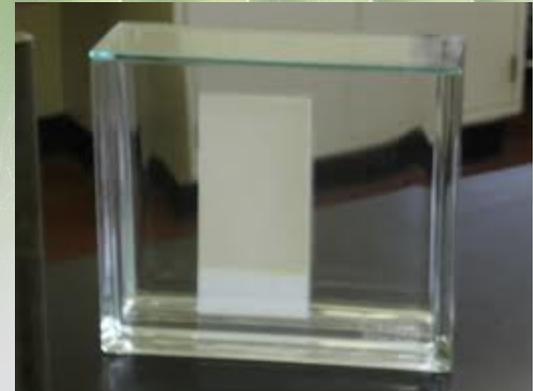
I. Aplicación de un poco de papilla sobre el porta



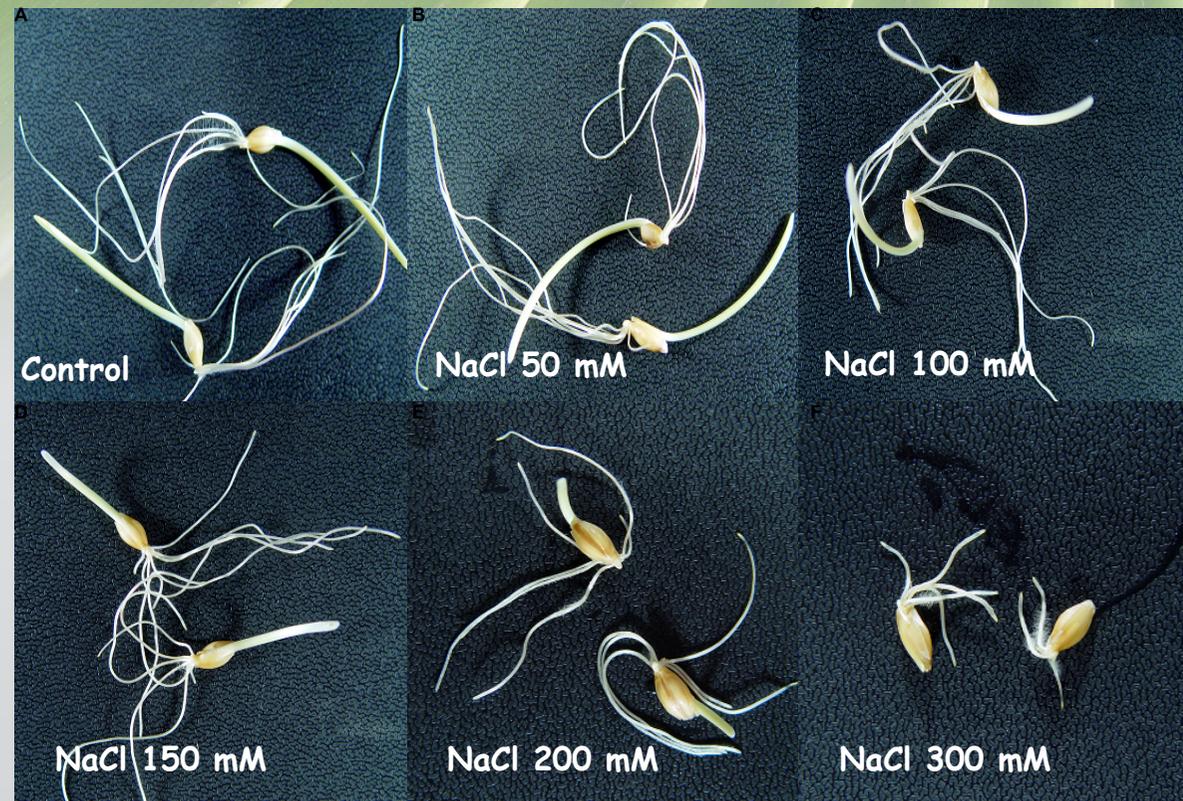
II. Extensión de la papilla mediante otro porta

b) Placas sencillas sobre portas de microscopio.

FIG. 22. Preparación de placas cromatográficas.



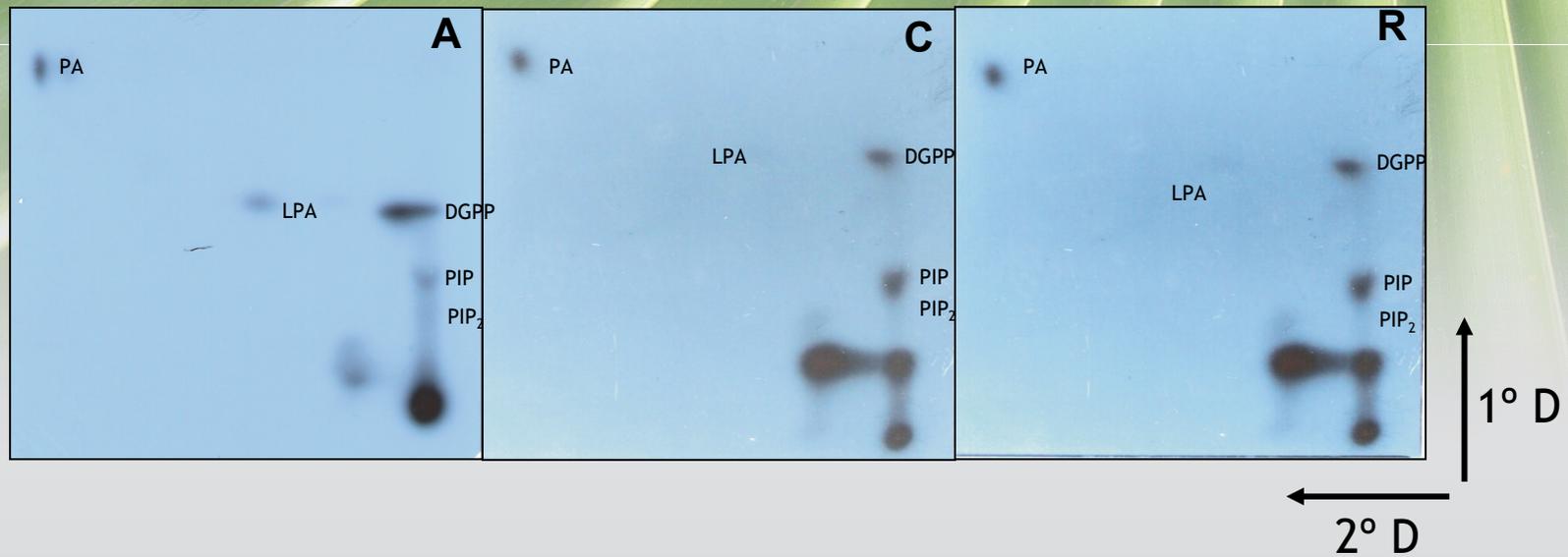
## Efecto de diferentes concentraciones de NaCl sobre la germinación de semillas de cebada



## Efecto del NaCl y Manitol en la germinación



Actividad lípido quinasas en aleuronas (A), coleóptilo (C) y raíz (R)



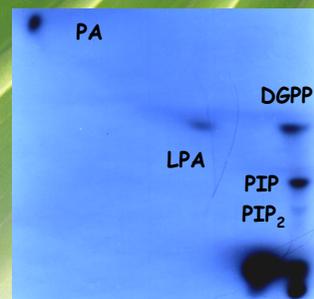
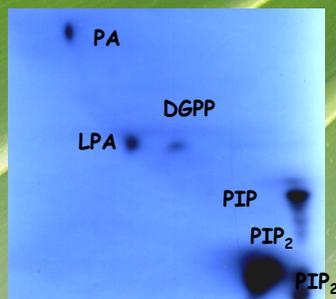
Solvente I: cloroformo/metanol/acetona/ác. acético/agua (40:14:15:12:7, v/v).

Solvente II: cloroformo/piridina/ác fórmico (35:30:7, v/v).

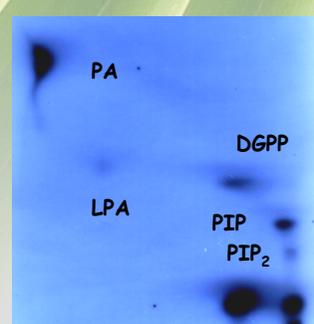
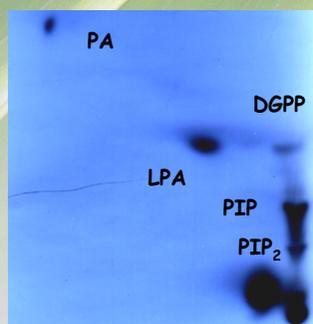
## Coleóptilos

## Raíces

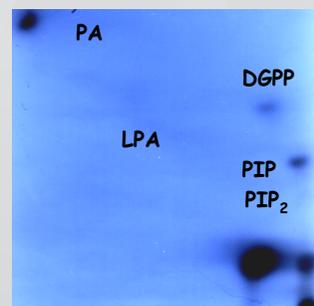
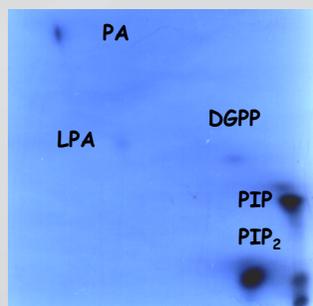
Control



NaCl



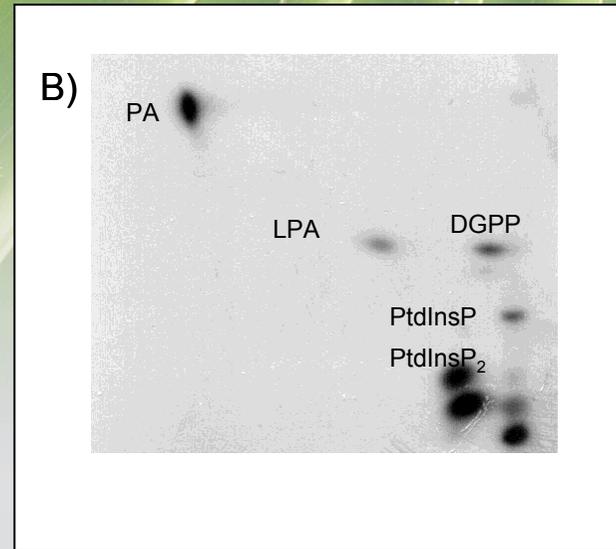
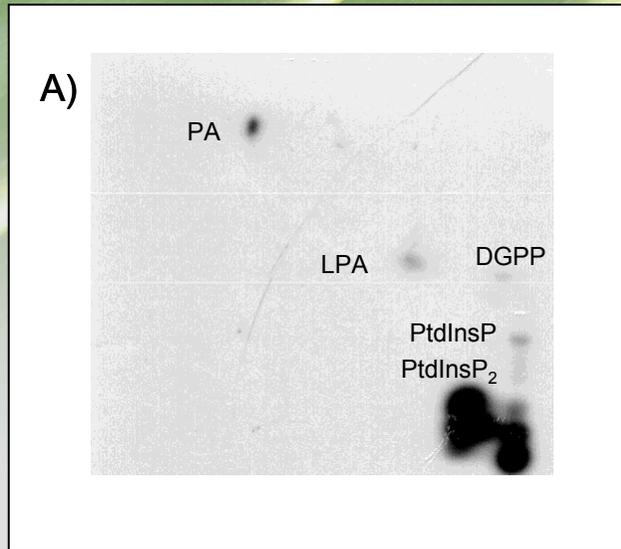
Manitol



Solvente I: cloroformo/metanol/acetona/ác. acético/agua (40:14:15:12:7, v/v). ↑

Solvente II: cloroformo/piridina/ác fórmico (35:30:7, v/v). ←

## ABA estimula las actividades de lípido quinazas



Solvente I

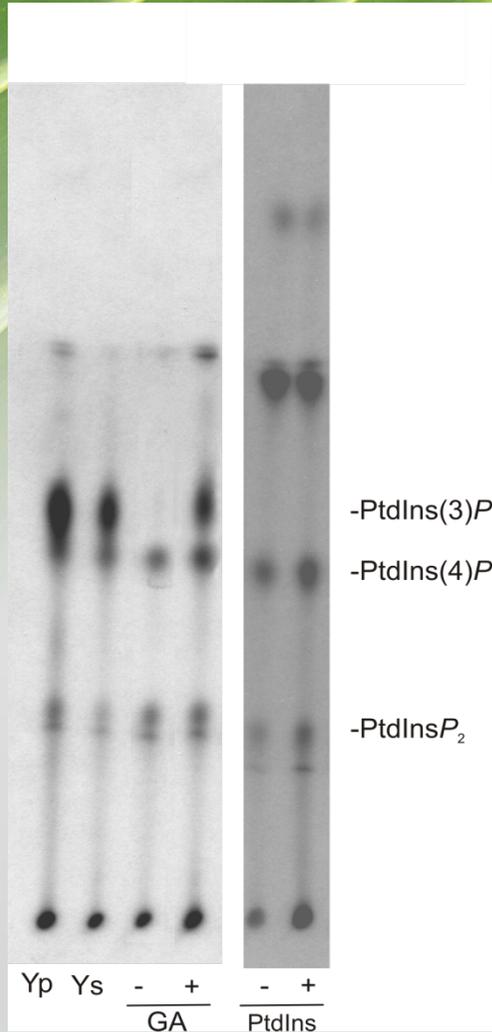
Solvente II

Autorradiografía de los productos de fosforilación de lípido quinazas de aleuronas de cebada estimuladas con ABA. Los lípidos de membrana fueron fosforilados en presencia de  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$  exógeno y sustratos lipídicos endógenos, extraídos y separados por TLC bidimensional.

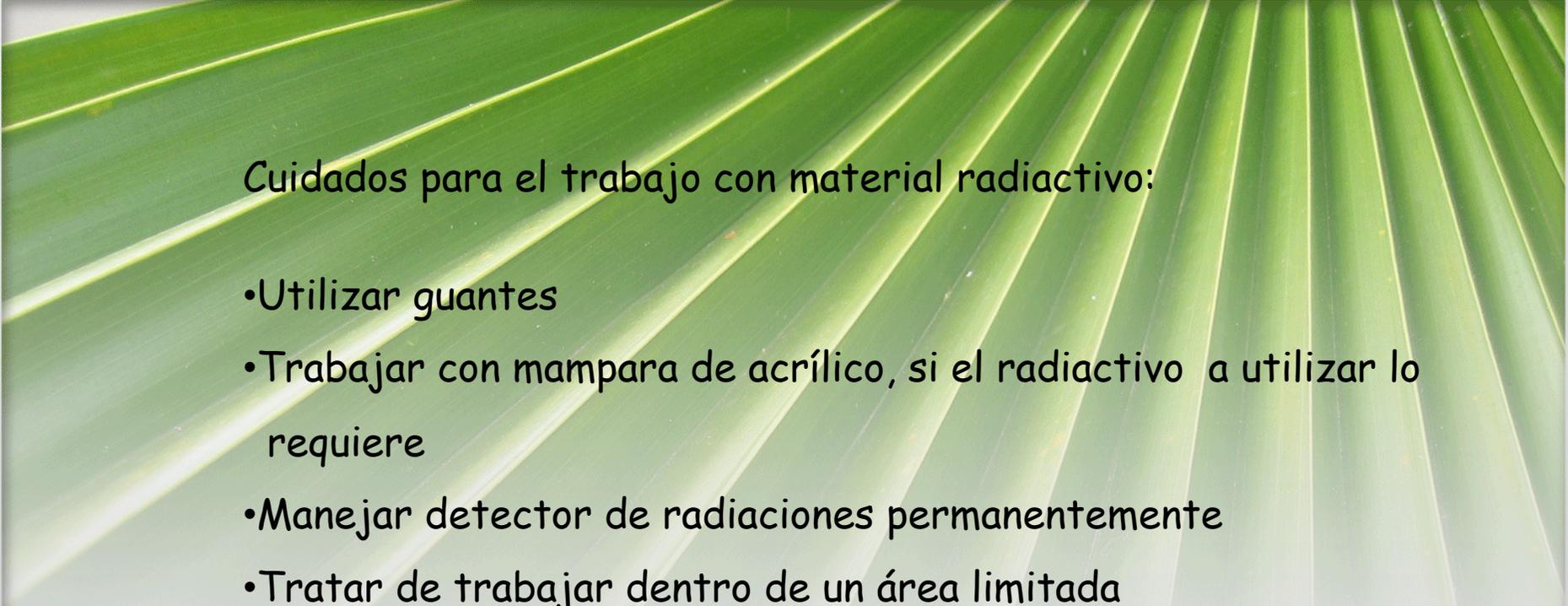
Solvente I:  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{COCH}_3/\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$  (40:15:14:12:7, v/v) y solvente II:  $\text{CHCl}_3/\text{Piridina}/\text{COOH}$  (35:30:7, v/v).

A) Células de aleurona controles B) Células de aleurona estimuladas con  $5\mu\text{M}$  de ABA durante 30 min.

# Efecto de GA sobre las actividades de PI 3 y PI 4-k

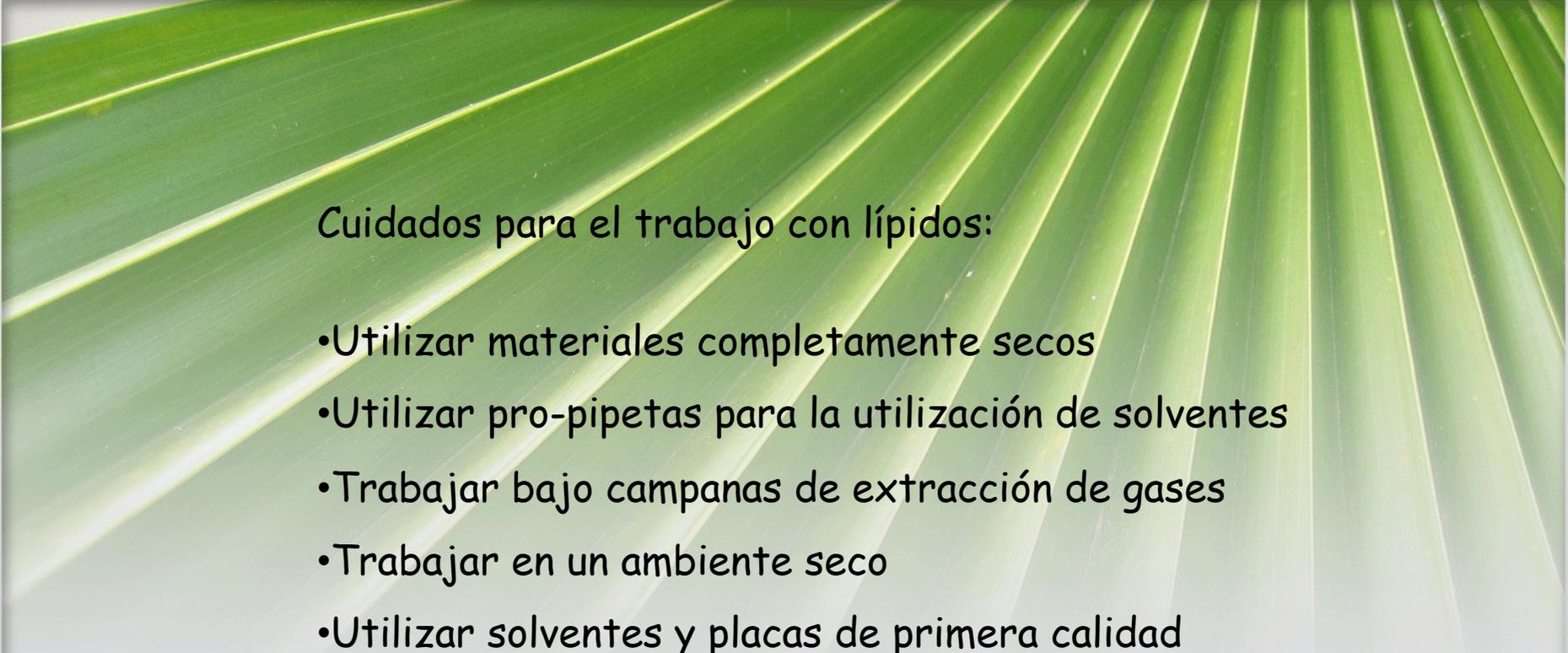


**Solvente: cloroformo/ác. bórico/piridina/metanol/agua/ác. fórmico/antioxidantes (BHT y etoxiquina)**



## Cuidados para el trabajo con material radiactivo:

- Utilizar guantes
- Trabajar con mampara de acrílico, si el radiactivo a utilizar lo requiere
- Manejar detector de radiaciones permanentemente
- Tratar de trabajar dentro de un área limitada
- Evitar en lo posible la movilización de material radiactivo
- Si debe hacerlo utilizar protección (mampara, cajas, etc.)
- Conocer las Normas de Bioseguridad
- Contar con la tranquilidad necesaria en accidentes
- Trabajar con respeto pero sin miedo



Cuidados para el trabajo con lípidos:

- Utilizar materiales completamente secos
- Utilizar pro-pipetas para la utilización de solventes
- Trabajar bajo campanas de extracción de gases
- Trabajar en un ambiente seco
- Utilizar solventes y placas de primera calidad

En el caso de determinación de enzimas:

- Trabajar siempre en frío
- Evitar la desnaturalización de las mismas
- En condiciones necesarias para el dosaje de las mismas  
(pH, temperatura, etc.)