



# **CURSO DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

## **Guías de Trabajos Prácticos**

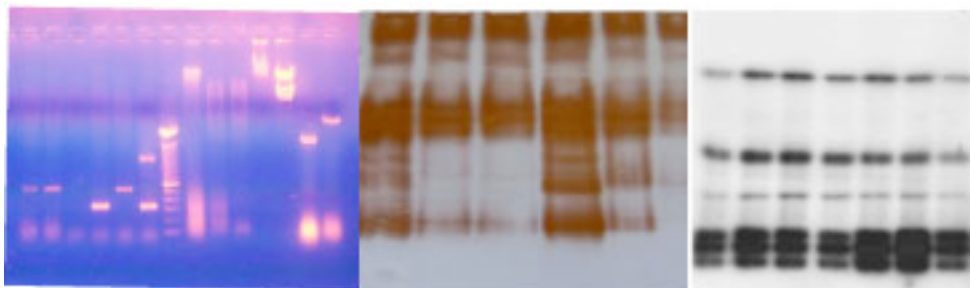
1 al 5 de Octubre de 2012

### **Docentes**

Dra. María Inés Medina  
Dra. Elizabeth Agostini  
Dra. Gloria Lucchesi  
Dra. Graciela Racagni  
Dra. Estela Machado

### **Colaboradoras**

Dra. Melina Talano  
Dra. Ana Laura Villasuso



## CURSO DE POSGRADO

### Trabajos prácticos

- TP N° 1. *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Electroforesis horizontal de ADN en geles de agarosa.*
- TP N° 2. *Electroforesis monodimensional de proteínas, en geles de poliacrilamida, en condiciones nativas.*
- TP N° 3. *Transducción de señales: participación de fosfolípidos en la respuesta al estrés salino y osmótico*

### Cronograma de actividades

	LUNES	MARTES	MIERCOLES	JUEVES	VIERNES
AM	INAUGURACION TEORICO	TP N° 1 TP N° 2	TEORICO	TEORICO	TEORICO Continuación TP N° 3
PM	TEORICO	TEORICO Continuación TP N° 1	TEORICO	TP N° 3	

## TRABAJO PRÁCTICO N° 1: Evaluación de naturaleza transgénica de cultivos de raíces transformadas.

### Objetivos generales:

-Verificación de la presencia de genes *tpx1* y *tpx2* por amplificación de la construcción 35S-*tpx1* y 35S-*tpx2* en plantas transgénicas y raíces transformadas derivadas de ellas.

-Verificación de la naturaleza transgénica de los cultivos de raíces transformadas mediante amplificación del gen *rol C*, que se encuentra en el T-ADN del plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes*.

### Objetivos específicos:

-Realizar una reacción de PCR de genes *tpx1*, *tpx2* a partir del ADN de plantas transgénicas y raíces transformadas transgénicas y evaluar la presencia del gen *rol C* a partir de ADN de raíces transformadas.

### Introducción

Para obtener la sobreexpresión de un gen en plantas transgénicas se suele realizar una construcción que comprende la secuencia de un promotor fuerte. Entre ellos, el 35S CaMV (que dirige la síntesis de RNA de 35S del virus del mosaico del coliflor) y el promotor *nos* (que codifica la nopalina sintetasa), son muy utilizados. Una vez desarrollado el proceso de transformación de plantas, para comprobar la naturaleza transgénica de las mismas, se suele emplear la técnica de PCR para corroborar la presencia del gen foráneo a partir del DNA de individuos transformantes. Para ello se utilizan cebadores específicos diseñados especialmente de una región del gen foráneo y/o incluyendo un cebador que hibride con el promotor utilizado en la construcción.

La naturaleza transformante de cultivos de Raíces transformadas obtenidas por infección con *Agrobacterium rhizogenes* se puede realizar a través de la detección por PCR del gen *rol C* propio de la región T-DNA del plásmido Ri.

### 1. Amplificación de DNA por PCR, Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

*La reacción en cadena de la polimerasa es un método de amplificación in vitro de los ácidos nucleicos. El principio básico es la utilización de una DNA polimerasa termoestable que actúa copiando una hebra de DNA, permitiendo así una gran amplificación.*

*La enzima Taq DNA polimerasa (identificada y aislada por primera vez de *Thermus aquaticus*), al igual que otras DNA polimerasas sintetiza una hebra de DNA en dirección 5'→3', necesitando para ello la presencia de DNA molde, un cebador con 3'-OH libre, los cuatro dNTPs y Mg<sup>2+</sup>.*

*La capacidad de amplificar de forma selectiva un DNA específico, se consigue por el diseño de los cebadores. Estos son segmentos de DNA de cadena simple sintetizados en el laboratorio y diseñados de manera tal que permitan definir los límites del tramo de ADN que se desea replicar.*

Los componentes básicos de un protocolo para PCR usando Taq polimerasa son:

- 0,2 mM de cada uno de los dNTPs, (dATP, dGTP, dCTP y dTTP)
- 0,1-1,0 μM de cada cebador
- 2-2,5 unidades de la DNA polimerasa termoestable.
- 1,5- 3 μg ADN molde
- 10-50 mM Buffer Tris-HCl, pH 7,5-9
- 1,5-5,0 mM MgCl<sub>2</sub>

### Protocolo

Concentraciones finales de reactivos:

- 0,2 mM de cada uno de los dNTPs
- 0,2-0,4 μM de cada cebador
- 1,25 unidades (0,5μl) de Taq DNA polimerasa.
- 1,5- 3 μg ADN molde
- 1 X Buffer de reacción
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- Agua bidestilada estéril

Las secuencias de los oligonucleótidos a utilizar son:

35S	5´AATCCCACTATCCTTCGC 3´	Tm: 59 °C
X11 (tpx1)	5´GATCCATCACAAACCCTGACAAAGCA 3´	Tm: 64,8 °C
Ole5 (tpx2)	5´ACTCGAGCTCTTAACTATTACAG 3´	Tm: 68 °C
Rol C1	5´-ATGGCTGAAGACGACCTGTGT-3´	Tm: 64° C
Rol C2	5´-GCCGATTGCAAACCTTGCACTC-3´	Tm: 64° C

Volumen final en el tubo de PCR: 25 µl

Reactivos Stock	Gen Rol C (547 pb)	Genes TPX1/TPX2
dNTPs (1mM)	5 µl	5 µl
Mg Cl <sub>2</sub> (10 mM)	3.75 µl	3.75 µl
Buffer de reacción (10X)	2,5 µl	2,5 µl
Oligo 35S (4µM)	—	5 µl
Oligo X11 (4µM)	—	2,5 µl
Oligo Ole5 (4µM)	—	2,5 µl
Oligo RolC1 (2µM)	2.5 µl	—
Oligo RolC2 (2µM)	2.5 µl	—
DNA	....µl	.....µl
H <sub>2</sub> O	.....µl	.....µl
Taq Polimerasa	0,5 µl	0,5 µl

Se lleva a cabo el siguiente programa de PCR:

Primera etapa: 1 ciclo de 5 minutos a 94 °C para la desnaturalización del ADN.

Segunda etapa: 30 ciclos idénticos de:

Fase 1: 1 minuto a 94 °C

Fase 2: 1 minuto a 56 °C

Fase 3: 2 minutos a 72 °C

Tercera etapa: 1 ciclo de 7 minutos a 72 °C para la polimerización del ADN.

## 2. Electroforesis horizontal de ADN en geles de agarosa

La electroforesis horizontal de ADN es la metodología más usada para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. Las diferencias en el tamaño y forma de las moléculas son la base de la separación. El tamaño de una determinada molécula se calcula por comparación con moléculas de ADN de tamaño conocido que migran en la misma electroforesis. El tamaño del poro del gel utilizado depende de las moléculas que se pretende separar.

Para la electroforesis de ácidos nucleicos, la agarosa más utilizada funde a 90 -100 °C y solidifica a 37 °C en unos minutos. Los buffers más usados para separación de ADN son el TBE (Tris, Borato, EDTA) y el TAE (Tris, Acetato y EDTA). Esta técnica fue descrita por Sambrook y col. (1989).

### 2.1. Preparación de un gel de agarosa al 1% (P/V)

- Reconocer las partes de un equipo para electroforesis de ácidos nucleicos (Figura 1)

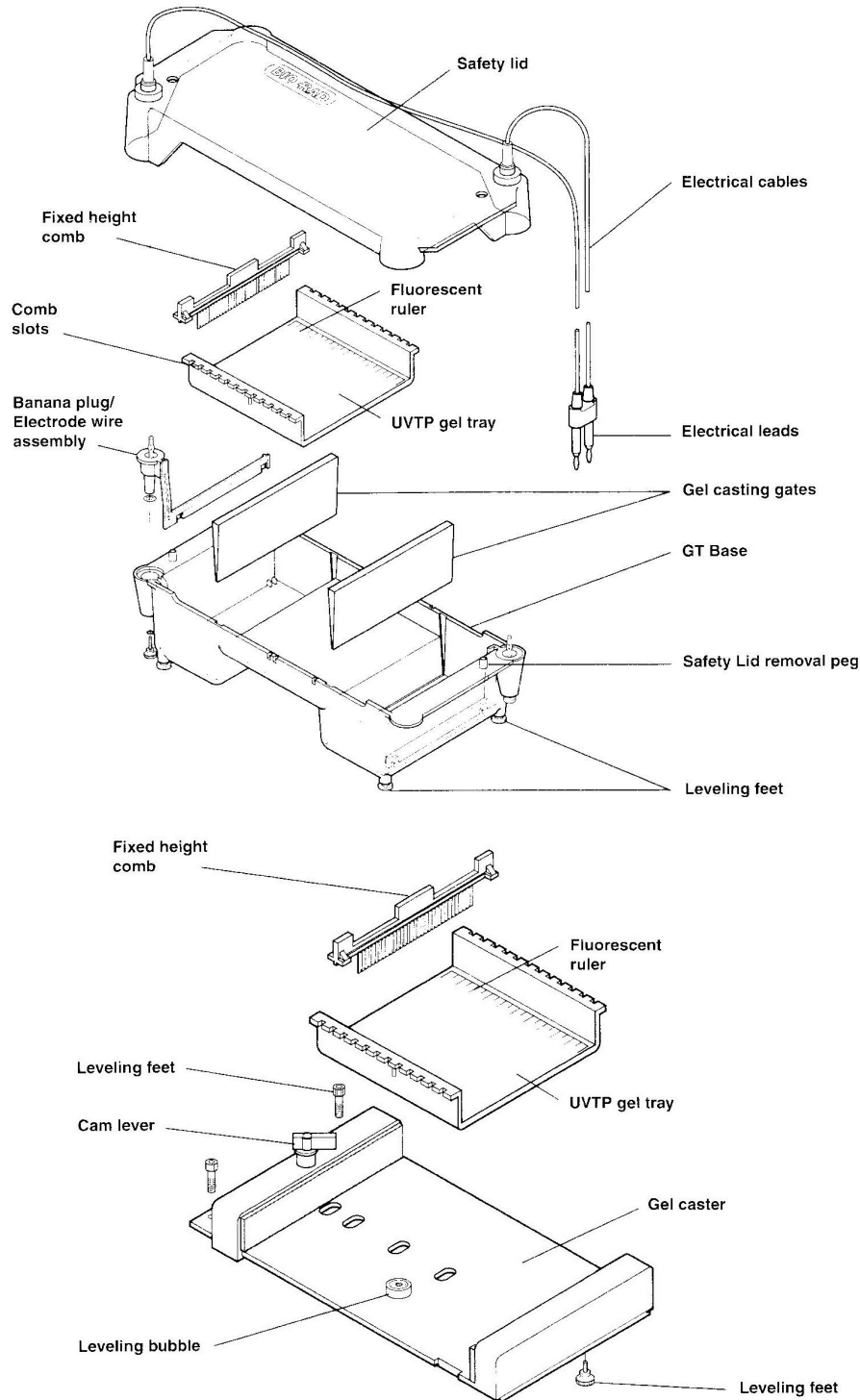


Figura 1) Esquema de las partes que componen un equipo para electroforesis horizontal de ácidos nucleicos

- Nivelar el soporte ó bandeja donde se preparará el gel y colocar el peine adecuado.
- Pesar 1,2 g de agarosa y colocarla en un Erlenmeyer.
- Agregar 120 ml de buffer TAE 1X y fundir utilizando el horno microondas. Calentar 1 min., homogeneizar y repetir la operación hasta obtener una solución bien homogénea.
- Cuando la temperatura baje hasta que el Erlenmeyer no quemé la mano (aprox. 60 °C), agregar 70  $\mu$ l del stock de 1 mg ml<sup>-1</sup> bromuro de etidio (concentración final de 0,6  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) y homogeneizar
- Volcar en la cubeta nivelada y esperar que gelifique, a medida que ello ocurre la opacidad del gel aumenta.
- Introducir con cuidado el gel de agarosa en la cuba de electroforesis y cubrir con buffer TAE 1X. Orientar correctamente el gel según los electrodos, los pocillos del peine deben quedar cerca del electrodo negativo.

### 2.2. Siembra de las muestras y electroforesis

La concentración de ADN (muestras o patrones) a sembrar no debe sobrepasar los  $500 \text{ mg ml}^{-1}$  ni ser inferior a  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ . Lo óptimo es entre  $5-50 \text{ mg ml}^{-1}$ . El marcador de PM a utilizar depende del tamaño de las muestras a analizar. El buffer de carga se coloca justo antes de realizar la siembra.

- Añadir el buffer de carga a cada una de las muestras, a una concentración final 1X (Ej:  $2,5 \mu\text{l}$  para un volumen final de muestra de  $25 \mu\text{l}$ ). Sembrar las muestras por inmersión.
- Sembrar  $2 \mu\text{l}$  de Marcador de Peso Molecular en una de las calles.
- Colocar la tapa de la cuba y conectar los cables correctamente. Realizar la electroforesis a 80-100 V.

### 2.3. Visualización de las bandas

- Colocar el gel en el transiluminador UV e iluminar a  $254_{\text{nm}}$ . Fotografíar.

### Apéndice

Buffer TAE 1X: 40 mM Tris-HCl, 20 mM Ácido acético glacial, 1 mM EDTA pH 8

Stock de bromuro de etidio  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  en agua bidestilada estéril.

Buffer de carga para electroforesis de ADN 5X (alternativo al comercial): 0,25% azul de bromofenol; 0,25% xylene cianol FF; 15% Ficoll en agua.

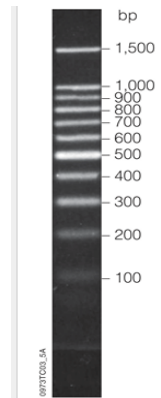


Figura 2) Marcador de ADN, 100bp DNA ladder (Promega), en gel de agarosa al 2 %.

### Referencias

- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989). *Molecular Cloning. A laboratory Manual* CSHL. Press. N.Y.

### Anotaciones

**TRABAJO PRÁCTICO N° 2. Electroforesis monodimensional de proteínas, en geles de poliacrilamida, en condiciones nativas (PAGE). Electroforesis CATIONICA.**

**Objetivo general**

-Evaluar la expresión de las proteínas TPX1 y TPX2 en Extractos crudos totales de tejido de raíces transformadas y plantas salvajes y transgénicas.

**Objetivo específico**

-Realizar geles de Electroforesis de poliacrilamida catiónica para observar y comparar los perfiles de peroxidasas básicas presentes en los tejidos vegetales antes mencionados.

**Introducción**

Además de evaluar a las plantas transgénicas y otros tejidos vegetales transgénicos a través de la presencia de los genes foráneos se puede comprobar la expresión de la proteína para la cual codifica el gen introducido. Ello puede hacerse en este caso evaluando y comparando los perfiles de proteínas en geles de poliacrilamida y revelando los geles por actividad enzimática (actividad peroxidasa).

La electroforesis de proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida (PAGE, “polyacrilamide gel electrophoresis”) es, sin duda, una de las técnicas más ampliamente usadas para caracterizar mezclas complejas de proteínas. La electroforesis consiste en la migración de proteínas por acción de un campo eléctrico y es el método más utilizado en el control de pureza de una proteína como consecuencia de su simplicidad, sensibilidad y bajo costo, ya que se requieren sólo cantidades del orden de microgramos de proteína.

Si la extracción de proteínas se ha realizado con sales, éstas se deben eliminar de las muestras antes de realizar la electroforesis. Dicho proceso se puede realizar por diálisis o mediante el uso de resinas de filtración molecular.

En la figura 3 se muestran las partes de un equipo de electroforesis de BioRad (MiniProtean III).

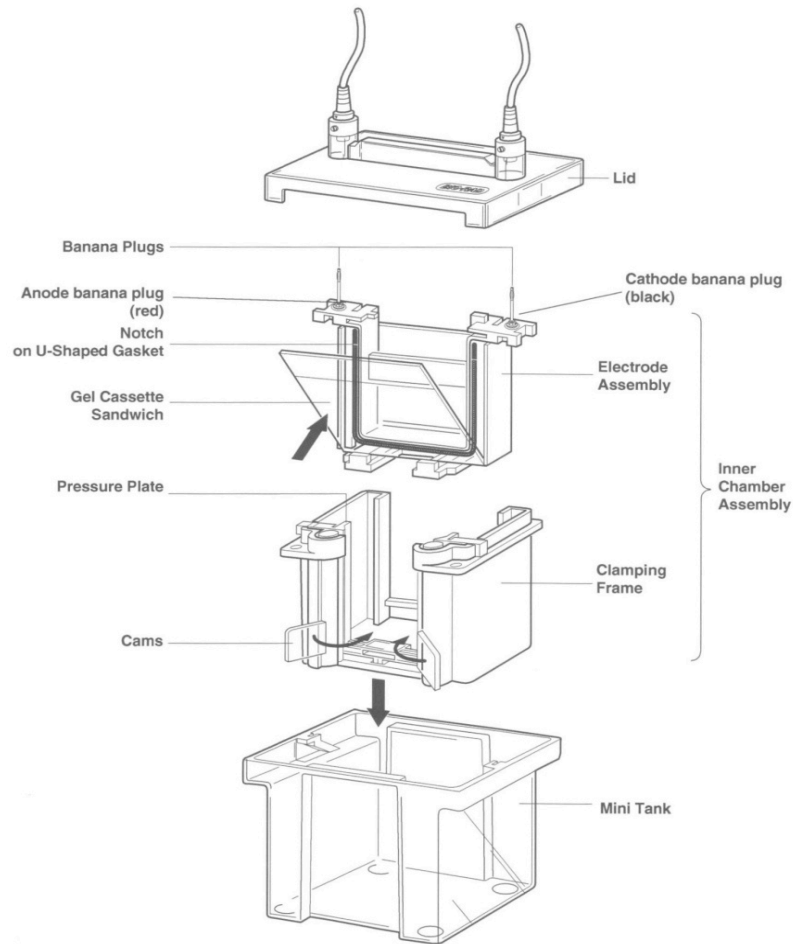


Figura 3) Esquema de las partes que componen un equipo para electroforesis de proteínas.

### 1. Preparación de las soluciones para geles de poliacrilamida CATIONICA

Para armar los geles de poliacrilamida se deben preparar previamente las soluciones que se detallan a continuación:

Soluciones para preparar geles de poliacrilamida catiónico

<b>Solución A</b>	<b>Solución B</b>	<b>Solución C</b>
48 ml de KOH 1N	48 ml de KOH 1N	30 g Acrilamida
17,2 ml de AcH glacial	2,87 ml de AcH glacial	0,8 g Bis acrilamida
4 ml TEMED	0,46 ml de TEMED	Agua destilada c.s.p. 100 ml
Agua destilada c.s.p. 100 ml	Agua destilada c.s.p. 100 ml	

**ATENCIÓN** *La acrilamida y la bis-acrilamida son tóxicas y cancerígenas, por lo tanto se las debe pesar con precaución, usando guantes y barbijo. El TEMED es neurotóxico. Las soluciones stock pueden almacenarse en la heladera, hasta dos meses después de su preparación.*

### 2. Preparación del buffer de corrida

El buffer de corrida se debe preparar como una solución stock, que se diluye 1/10 (con agua destilada) en el momento de efectuar la electroforesis. Su composición varía según se trate de una electroforesis aniónica o catiónica. Se describe a continuación la composición del buffer de corrida para electroforesis catiónica:



<b>Buffer 10X para electroforesis catiónica</b>
3,12 g de $\beta$ alanina
0,8 ml de AcH glacial
Agua destilada c.s.p. 100 ml
pH 4

### 3. Preparación de geles de poliacrilamida catiónicos al 7,5%

- Armar el soporte según las instrucciones que se detallan a continuación (ver Figura 3).

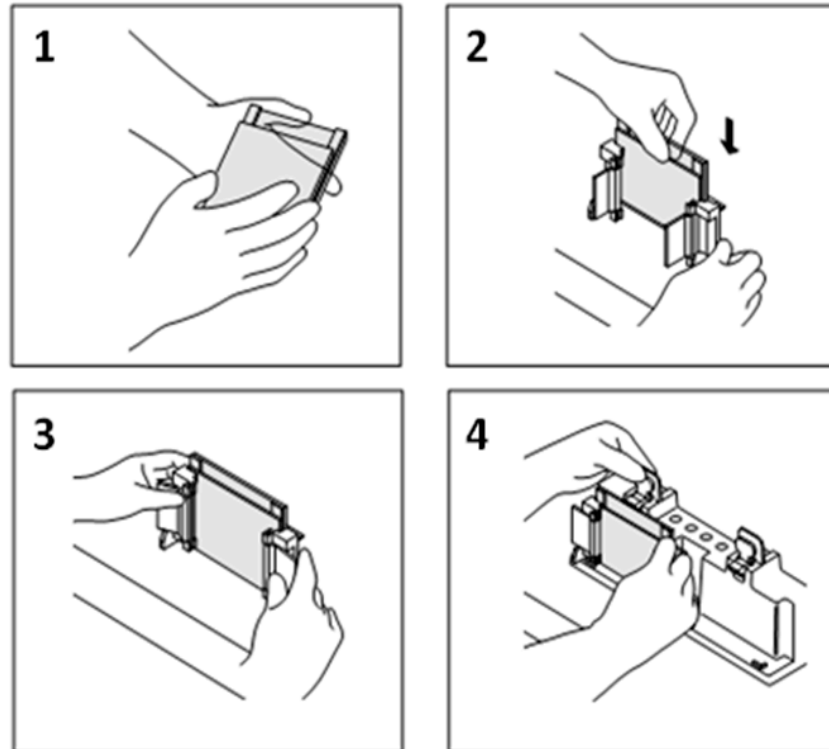


Figura 4) Preparación del molde para obtener un gel de poliacrilamida en el equipo Mini Protean III (BioRad).

- En un tubo de vidrio limpio preparar la solución para obtener el gel de resolución (poro fino o running gel).
- Colocar la mezcla en el soporte calculando de dejar un espacio libre de aproximadamente 1,5 cm para completar con el poro grueso.
- Dejar expuesto a la luz y en ambiente templado hasta que el gel polimerice. Cuando haya polimerizado, preparar la solución para el gel de separación (poro grueso o stacking gel).
- Colocar la mezcla y el peine. Dejar polimerizar en presencia de luz y en ambiente templado.

*Las soluciones de persulfato de amonio (PSA) se deben preparar en el momento de usar y sólo pueden conservarse por uno a dos días en la heladera.*

#### **Poros fino (running gel)**

<b>Componentes gel catiónico</b>	<b>Volumen</b>
Agua destilada	3,1 ml
Solución "A" catiónica	0,625 ml
TEMED	3,75 $\mu$ l
PSA 14% P/V	30 $\mu$ l
Solución "C" catiónica	1,25 ml

#### **Poros grueso (stacking gel)**

<b>Componentes gel catiónico</b>	<b>Volumen</b>
Agua destilada	1,2 ml
Solución "B" catiónica	0,3 ml
TEMED	1,5 $\mu$ l
PSA 14% P/V	30 $\mu$ l
Solución "C" catiónica	0,4 ml

### 3.1. Preparación de las muestras con sacarosa

Una vez que las muestras se desalaron es necesario aumentar la densidad de las mismas. Para ello, colocar unos granos de sacarosa o una gota de glicerol en un tubo Eppendorf y luego agregar el volumen de muestra a sembrar.

### 3.2. Siembra de las muestras y corrida del gel

- Retirar el molde de vidrio con el gel, del dispositivo que lo contiene y colocarlo en la cuba de electroforesis, tal como se esquematiza en la Figura 5.

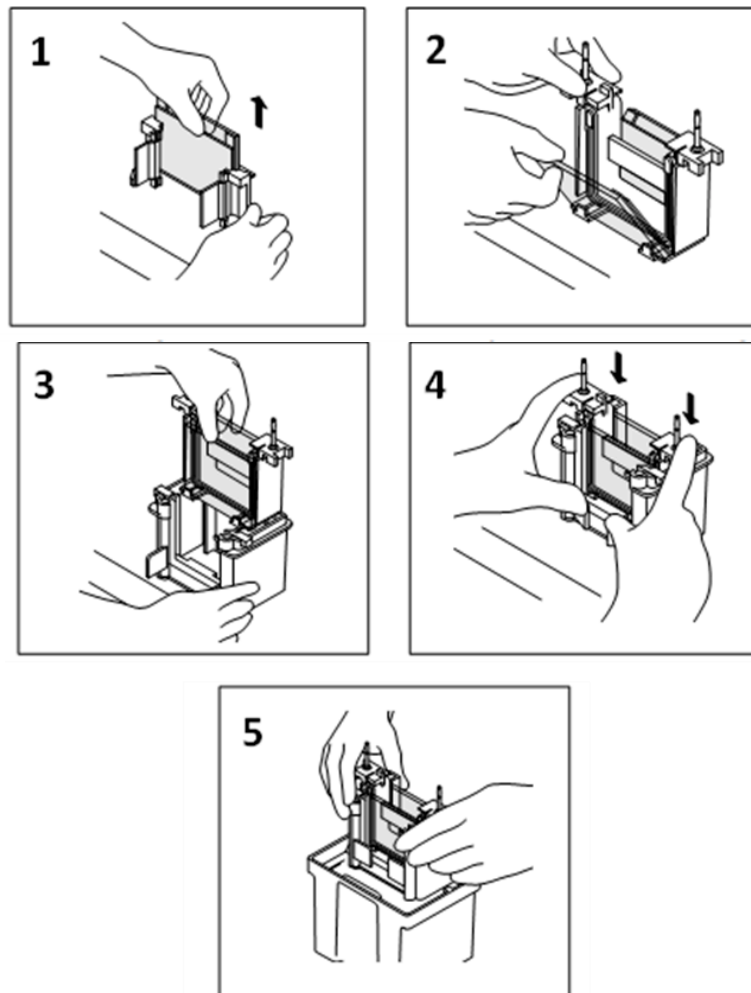


Figura 5) Secuencia de operaciones a seguir para colocar el gel de poliacrilamida dentro de la cuba electroforética.

- Sembrar las muestras. Completar el volumen de cada pocillo con gotas de verde de metilo al  $1 \cdot 10^{-4}$  %, disuelto en el buffer de corrida. Esto se realiza para poder seguir el frente de corrida, ya que dicho colorante tiene una alta movilidad electroforética y migra con el frente de solvente.
- Llenar la cuba con el buffer de corrida catiónico, previamente preparado y diluido 1/10 con agua.

- Conectar los electrodos a la fuente de poder (chequear cuidadosamente los electrodos y el sentido de la conexión) y hacer pasar una corriente constante de 2-3 mA por pocillo, cuidando de no superar los 300 V. Dejar correr hasta que el frente del colorante llegue al borde inferior del gel.
- **Si se desea detectar la actividad biológica de las muestras, es necesario efectuar la corrida en la heladera.**

*Recordar que no se debe tocar el aparato, bajo ningún concepto, sin haber desenchufado previamente la fuente de poder.*

#### 4. Técnicas de tinción

Para evitar que al interrumpir la corriente eléctrica, por un tiempo prolongado, las bandas difundan, el reactivo de tinción, se debe preparar cuando la corrida electroforética está por finalizar.

- Una vez finalizada la corrida electroforética, cortar la corriente, abrir la cuba y retirar el molde de vidrio en el cual está contenido el gel.
- Separar el gel con ayuda de una espátula o agregando agua destilada con una piseta, tratando de no dañarlo.
- Efectuar una marca en el gel, como referencia y colocarlo dentro de una placa de Petri.
- Agregar la mezcla necesaria para el revelado de isoenzimas de peroxidasa por actividad enzimática (Tinción de Bencidina).

##### 4.1. Tinción con bencidina para detectar actividad peroxidasa

En el trabajo práctico se detectará actividad peroxidasa. Para ello se utilizará bencidina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustratos (De Forchetti y Tigier, 1990).

- Preparar la mezcla de reacción se preparará de acuerdo al siguiente protocolo:

Componentes	Volumen
Solución de Bencidina *	8,25 ml
Buffer AcNa/AcH, 0.5 M, pH 4,5	15 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 µl

*\*La solución de bencidina se prepara disolviendo 0,1842 g/ de este sustrato en 50 ml de alcohol. Posteriormente se agrega agua c.s.p. 100 ml.*

- Sumergir el gel en esta mezcla y agitar hasta aparición de bandas color azul.
- Desechar la solución y lavar el gel con agua destilada.

#### 5. Secado de geles

Para la conservación de los geles preparar la siguiente mezcla:

Componentes	Volumen
Glicerol	5 ml
Metanol	25 ml
H <sub>2</sub> O	70 ml

- Impregnar un trozo de papel celofán con la mezcla mencionada.
- Extenderlo sobre una superficie lisa (ej: vidrio, azulejo).
- Colocar el gel y cubrir nuevamente con papel celofán.
- Quitar burbujas que pudieran quedar entre el gel y el papel.
- Colocar pinzas a su alrededor y dejar secar a temperatura ambiente hasta su total secado.

#### Referencias

- Davis BJ (1964). Disk Electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. Ann.N.Y. Ac.Sci.121: 404-427.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Reisfeld RA y col. (1962). Disk Electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. Nature 195: 281-3.

**Anotaciones**

### **TRABAJO PRÁCTICO N° 3. Transducción de Señales: "Participación de fosfolípidos en la respuesta al estrés salino y osmótico en plántulas de cebada".**

#### **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 lípidos 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.

#### **Material biológico**

Se utilizarán plántulas preparadas a partir de semillas de cebada (*Hordeum vulgare* cv. Carla INTA). Las semillas se esterilizarán superficialmente con NaOCl 2% durante 45 min., luego serán enjuagadas con agua estéril y se neutralizarán con HCl 0.05 N durante 10 min. Las semillas serán embebidas en condiciones estériles; en oscuridad, a temperatura ambiente por el término de cuatro días (Meringer y col., 2011). Condiciones de estrés: Las semillas se hicieron germinar en placas de Petri sobre papel de filtro humedecido con soluciones estériles de NaCl (100), manitol (200 mM) en condiciones de oscuridad y a 25 °C durante 4 días.

#### **Ruptura y homogenización del tejido**

Los tejidos obtenidos se congelarán en nitrógeno líquido, se triturarán hasta obtener un polvo fino y se homogenizarán en homogenizador de vidrio, embolo de teflón con el amortiguador (HEPES 50 mM, pH 7.2, sacarosa 0.25M, KCl 5 mM, EDTA 1 mM) e inhibidores de proteasas (leupeptina 1µg/ml, PMSF 1 mM y aprotinina 1µg/ml), en relación 1/10, P/V (Villasuso y col., 2003).

#### **Obtención de membranas**

Para la obtención de las membranas, el homogenato será centrifugado a 1000 xg por 15 min y 105.000 xg por 60 min, a 4°C. El primer precipitado será descartado después de lavar una vez con la solución de homogenización y el de 105.000 xg será resuspendido en un volumen mínimo de Hepes 50 mM pH 7,4. Las fracciones de membranas obtenidas se utilizarán como fuente enzimática (Villasuso y col., 2003).

#### **Determinación de proteínas**

Para la determinación de proteínas se utilizará el método de Bradford (1976), con el empleo de albúmina bovina de concentración 1 mg/ml como testigo.

#### **Determinación de las lípido quinasa.**

La actividad de las diferentes quinasa se medirá por la incorporación de fosfato desde el [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP a su sustrato endógeno. La fosforilación se llevará a cabo en 100 µl de mezcla de reacción que contendrá amortiguador Hepes 50 mM pH 7,4; EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgATP 1 mM, vanadato sódico 0,2 mM, DTE 0,5 mM y [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (actividad específica: 300 cpm/pmol). La mezcla se incubará 5 min a 30° C y la reacción se detendrá con el agregado de 1,5 ml de cloroformo/metanol frío (1:2, v/v) de acuerdo a Villasuso y col., 2003).

#### **Extracción lipídica**

Luego de la fosforilación la extracción lipídica se efectuará de acuerdo al método de Stubbs y col. (1988), modificado por Racagni-Di Palma y col. (2002). A las muestras que contendrán aproximadamente 60 µg de proteínas (en 100 µl de mezcla de reacción), se agregarán 1.5 ml de cloroformo metanol (1/2, v/v) (punto anterior), más 0.5 ml de HCl 2.4 N, más 0.5 ml de cloroformo. Se agitará durante 30" y se espera que separen ambas fases. La fase inferior será transferida a otro tubo y la fase superior se extraerá nuevamente con 1 ml de cloroformo. Se agita nuevamente durante 1 min, para separar las fases. Ambas fases inferiores se juntan y se extraen finalmente con el agregado de 2 ml de metanol/HCl 1N (1:1, v/v), se agita durante un minuto para favorecer la separación. Los lípidos contenidos en la fase inferior resultante se secarán en atmósfera de nitrógeno, se resuspenden en el mínimo volumen posible de cloroformo/metanol (9:1, v/v) y se analizarán por cromatografía en capa delgada (TLC).

### **Separación y cuantificación de fosfolípidos**

Los fosfolípidos se resolverán por TLC, en placas de sílica gel impregnadas con oxalato de potasio 1%, EDTA 2 mM en metanol/agua (2:3, v/v) activadas a 110°C durante 40 min previo a su utilización.

Para el desarrollo de los cromatogramas se emplearán diferentes sistemas de solventes:

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

II) cloroformo/ piridina/ ácido fórmico (35:30:7, v/v), para cuando se necesite hacer una cromatografía en dos dimensiones..

Los diferentes fosfolípidos se identificarán por comparación de sus  $R_f$  con los correspondientes testigos y se visualizarán por exposición de la placa cromatográfica a vapores de yodo o solución fosfomolibdica.

La posición de los fosfolípidos radioactivos se determinarán por autoradiografía sobre película Kodak o NEN™ (Life Science Products). Posteriormente serán extraídos de la placa y la radioactividad se medirá en un contador de centelleo líquido Beckman LS 6500 de acuerdo a Racagni y col. (1992).

### **Análisis estadísticos de los datos**

Para el análisis de los resultados obtenidos, se utilizará un software de tratamientos estadísticos Sigma Stat.

### **Bibliografía**

- Meringer MV, Villasuso AL, Pasquaré SJ, Giusto NM, Machado EE, Racagni GE. (2012) Comparative phytohormone profiles, lipid kinase and lipid phosphatase activities in barley aleurone, coleoptile, and root tissues. *Plant Physiol Biochem. Sep*;58:83-8.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive methods for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Racagni G., M. García de Lema, C. Domenech and E. E. Machado de Domenech (1992) Phospholipids in *Trypanosoma cruzi*: Phosphoinositide composition and turnover. *Lipids*, 27: 275-278.
- Racagni-Di Palma, G., Brito-Argaez, L. and Hernández-Sotomayor, S.M.T. (2002) Phosphorylation of signaling phospholipids in *Coffea arabica* L. cells. *Plant Physiol Biochem* 40: 899-906.
- Stubbs E.B. Jr., J.A. Kelleher and G.Y. Sun, (1988) Phosphatidylinositol kinase, phosphatidylinositol-4-phosphate kinase and diacylglycerol kinase activities in rat brain subcellular fractions. *Biochim. Biophys. Acta* 958:247-254.
- Villasuso A. L., Molas M.L., Racagni G., Abdala G., y Machado Domenech E.E. (2003). Gibberellin signal in barley aleurone: early activation of PLC by G protein mediates amylase secretion. *Plant Growth Regulation* 41: 197-205.

**Anexo:**

**Obtención de membranas microsomales**

- a- Pulverizar el tejido con 3 ml de buffer y 30  $\mu$ l de inhibidores de proteasas
- b- Homogenizar el homogenato (homogenizar punto 3, 20 stroker)
- c- Centrifugar a 1000 rpm 15 min
- d- Lavar el pellet con 500  $\mu$ l de buffer de homogenización
- e- Centrifugar el sobrenadante a 33000 rpm durante 45 min
- f- Resuspender el pellet en 100  $\mu$ l de buffer Hepes 50 mM
- g- Hacer una dilución (1/5) y determinar la concentración de proteínas. Tomar 10  $\mu$ l de homogenato y agregar 40  $\mu$ l de agua bidest.

**Determinación de proteínas**

	BSA ( $\mu$ l)	Muestra ( $\mu$ l)	Agua ( $\mu$ l)	Bradford
Blanco	-	-	100	1 ml
Testigo (BSA 1mg/ml)	5	-	95	
Control	-	5	95	
NaCl	-	5	95	
Manitol	-	5	95	

**Resultados**

	DO 595 nm	$\mu$ g de proteína	x 5 ( Fac.dil.)	Vol. p/ 60 $\mu$ g
Testigo (BSA 1mg/ml)				
Control				
NaCl				
Manitol				

**Tubos de fosforilación**

Tubo	Prot (vol p/60 $\mu$ g)	Mix	I. de proteasa	Hepes 50 mM c.s.p. 100 $\mu$ l
1-control		60 $\mu$ l	10 $\mu$ l	30
2-NaCl				
3-Manitol				

**Preparación de la mezcla de fosforilación (mix)**

	Volumen ( $\mu$ l)
Hepes 200 $\mu$ M	332,4
Vanadato 10 mM	27,2
EDTA 200 mM	6,72
Cl <sub>2</sub> Mg 2,4 M	8,48
DTE 50 mM	13,28
Mg-ATP	13,28
ATP*	3,3
Agua did. c.s.p. 800 $\mu$ l	395,34

**Calculo de la cantidad ATP radiactivo :**

1,6 x 10<sup>6</sup> pmoles      1000µl  
1,28 x 10<sup>6</sup> pmoles      800µl

750 cpm      1 pmol  
9,6 x 10<sup>8</sup>      1,28 x 10<sup>6</sup> pmol

2,2 x 10<sup>10</sup> cpm      70 µl  
9,6 x 10<sup>8</sup> cpm      3 µl

3 µl      90 %  
3,3 µl      100 %

**Control de la actividad especifica de la mix:**

2 µl  
800 µl      x1

x1      1,28 x 10<sup>6</sup> pmoles  
x2 (750 cpm)      1 pmol