

PRÁCTICA 1: MÉTODOS DE RUPTURA CELULAR

FUNDAMENTO TEÓRICO

Para estudiar la estructura y/o función de un orgánulo celular determinado, lo primero que hay que hacer es purificarlo, es decir, separarlo del resto de los orgánulos celulares. Para ello es necesario **romper la membrana plasmática**. Este proceso se denomina **homogeneización** y la disolución resultante es un **homogenado celular** o **extracto crudo**. A partir del extracto crudo, combinando diversas **técnicas de separación** como la centrifugación y la cromatografía, se puede purificar el orgánulo o la macromolécula deseada.

Existen varios métodos para romper la membrana plasmática y su eficacia relativa depende del tipo de célula que se está investigando. Los **métodos físicos** más utilizados son el **choque osmótico**, los **ultrasonidos** y la **trituration mecánica**. Estos procedimientos rompen la mayoría de las membranas celulares (membrana plasmática y membranas del retículo endoplasmático) en fragmentos que se cierran inmediatamente sobre sí mismos formando pequeñas vesículas cerradas denominadas **microsomos**. El proceso de homogeneización debe hacerse a baja temperatura (4°C), utilizando medios tamponados que mantengan constante el pH intracelular. De este modo, los orgánulos celulares (núcleo, mitocondria, aparato de Golgi, lisosomas, peroxisomas, etc.) permanecen intactos y mantienen la mayoría de sus propiedades bioquímicas originales.

Cuando las células tienen pared, como en el caso de células vegetales o bacterianas, se pueden utilizar **métodos enzimáticos** para romperla. El procedimiento más utilizado consiste en tratar las células con **lisozima**. Esta enzima hidroliza el enlace β -glicosídico entre el C-1 del ácido N-acetilmurámico y el C-4 de la N-acetilglucosamina del polisacárido de la pared celular. Una vez hidrolizada la pared, la membrana celular puede romperse fácilmente, ya que carece de un soporte rígido externo que la proteja del choque osmótico.

En esta práctica se van a utilizar dos tipos de célula (eritrocitos de carnero y *Micrococcus lysodeiticus*) y se van a utilizar dos métodos de ruptura celular (choque osmótico y tratamiento enzimático con lisozima). El **objetivo** consiste en comparar la eficacia de estos tratamientos en cada tipo celular.

La eficacia de cada método de ruptura se va a determinar midiendo la cantidad de proteínas citosólicas que se liberan al medio externo. En caso de que no haya ruptura celular, las proteínas citosólicas permanecerán en el interior de la célula. El método que se va a utilizar para cuantificar las proteínas es el **ensayo de Bradford** (modalidad de microensayo).

MATERIALES Y MÉTODOS

- Eritrocitos (RBC, de *red blood cells*) de sangre de carnero
- Suspensión de células de *Micrococcus lysodeiticus*
- Tampón A: Tris-HCl 20 mM; NaCl 150 mM, pH 7.6
- Tampón B: Tris-HCl 10 mM, pH 7.6
- Lisozima (10 mg/ml en tampón A)

- Reactivo Bradford (BioRad) (el reactivo original se diluye con agua 1:4)
- Seroalbúmina bovina o BSA (100 µg/ml)
- Tijeras, pinzas, pipetas Pasteur, guantes, cubeta con hielo
- Centrífuga, espectrofotómetro

PROCEDIMIENTO

1.- Obtención de suspensiones celulares en medio libre de proteínas (lavados)

Cuando tenemos células en suspensión es muy probable que algunas estén rotas y sus contenidos se hayan liberado al medio. Como en esta práctica se va a determinar la eficacia de los métodos de ruptura midiendo la liberación de proteínas citosólicas es necesario obtener suspensiones con células intactas en medios libres de proteínas. Esto se consigue realizando uno o varios “**lavados**” de las suspensiones celulares.

El lavado consiste en **centrifugar** brevemente las células a una velocidad suficiente como para que, al final de la centrifugación, las células intactas formen un sedimento compacto en el fondo del tubo. Este sedimento también se denomina “*pellet*”, una palabra inglesa que se puede traducir como “pastilla”. La disolución que queda por encima del *pellet* es el sobrenadante, que lo desecharemos por decantación, teniendo cuidado de no perturbar el *pellet*. De este modo eliminamos todas las proteínas procedentes de las células rotas. A continuación **se resuspende el *pellet* en un medio fresco** libre de proteínas. Este paso hay que hacerlo con la mayor suavidad posible para evitar que se rompan las células intactas y que liberen proteínas que puedan interferir con los resultados del experimento. En muchos casos se hace más de un lavado para garantizar la eliminación total de las proteínas pero, en esta práctica, un lavado será suficiente.

En el caso de *Micrococcus lysodeiticus*, el lavado se hará a 12.500 rpm y a 4 °C durante 5 minutos, mientras que en el caso de los eritrocitos de carnero (que son células más grandes, pero más delicadas), la centrifugación se llevará a cabo a 2.500 rpm y a 4 °C durante 5 minutos.

2.- Tratamiento de las suspensiones celulares con lisozima

Micrococcus lysodeiticus

Cada grupo debe llenar **2 tubos Eppendorf** con 1 ml de la suspensión inicial de las bacterias. El **lavado** de la suspensión inicial de *Micrococcus lysodeiticus* se hace a 12.500 rpm y a 4 °C durante 5 minutos. Tras el “lavado”, se descarta el sobrenadante (por decantación, o con una pipeta automática) y se resuspende el *pellet* cuidadosamente en 1 ml de tampón A.

Uno de los tubos será sometido a tratamiento enzimático con lisozima y el otro no, de modo que los marcaremos **L⁺** y **L⁻**, respectivamente. Prepararemos **un tercer tubo Eppendorf**, al que se le añadirá 1 ml del tampón A. Este tercer tubo se marca con la letra **C** porque es un **control** que nos permitirá saber hasta qué punto la lisozima (que también es una proteína) afecta a la medida del Bradford.

Al tubo L⁺ se le añaden 15 µl de la disolución de **lisozima** (10 mg/ml en tampón A), mientras que al tubo L⁻ se le añaden 15 µl de tampón A (sin enzima). Al tubo C también se le añaden 15 µl de la disolución de lisozima.

Se incuban los 3 tubos a 37 °C durante 30 minutos y, a continuación, de cada uno de ellos **retiramos una alícuota de 50 µl** para el ensayo de Bradford. La cantidad de proteína presente en estas muestras es una medida del máximo de proteína que se puede liberar (100%) en cada caso.

A continuación **se centrifugan** los 3 tubos a 12.500 rpm y a 4 °C durante 10 minutos y de cada tubo **se recoge una alícuota de 50 µl del sobrenadante** con cuidado de no arrastrar material del *pellet*. Posteriormente, se determinará por el método de Bradford cuánta proteína se ha liberado al medio externo en cada caso. Comparando este dato con el 100% se puede determinar el porcentaje de ruptura obtenido tras el tratamiento enzimático con lisozima.

Eritrocitos de carnero

Cada grupo debe llenar **2 tubos Eppendorf** con 1 ml de la suspensión inicial de eritrocitos de carnero. El **lavado** de esta suspensión inicial se hace a 2.500 rpm y a 4 °C durante 5 minutos. Tras el “lavado”, se descarta el sobrenadante y se resuspende el *pellet* cuidadosamente con 1 ml de tampón A. Uno de los tubos será sometido a tratamiento enzimático con lisozima y el otro no, de modo que los marcaremos L⁺ y L⁻, respectivamente. En este caso **no hace falta preparar un tercer tubo Eppendorf**, ya que nos sirve el tubo C preparado en el apartado anterior.

Al tubo L⁺ se le añaden 15 µl de la disolución de **lisozima** (10 mg/ml en tampón A), mientras que al tubo L⁻ se le añaden 15 µl de tampón A (no recibe tratamiento enzimático).

Se incuban los 2 tubos a 37 °C durante 30 minutos y, de cada uno de ellos **retiramos una alícuota de 50 µl** para el ensayo de Bradford. La cantidad de proteína así obtenida es una medida del máximo de proteína que se puede liberar (100%) en cada caso.

A continuación **se centrifugan** los 2 tubos a 2.500 rpm y a 4 °C durante 10 minutos y de cada tubo **se recoge una alícuota de 50 µl del sobrenadante** con cuidado de no arrastrar material del *pellet*. Posteriormente, se determinará por el método de Bradford cuánta proteína se ha liberado al medio externo en cada caso. Comparando este dato con el 100% se puede determinar el porcentaje de ruptura obtenido tras el tratamiento enzimático con lisozima.

3.- Tratamiento de las suspensiones celulares mediante choque osmótico

Micrococcus lysodeiticus

Cada grupo debe llenar **2 tubos Eppendorf** con 1 ml de la suspensión inicial de las bacterias. Uno de los tubos será sometido a choque osmótico y el otro no, de modo que los marcaremos C⁺ y C⁻, respectivamente. El **lavado** de la suspensión inicial de *Micrococcus lysodeiticus* se hace a 12.500 rpm y a 4 °C durante 5 minutos. Tras el “lavado”, se descartan los sobrenadantes. El *pellet* del tubo C⁻ **se resuspende cuidadosamente en 1 ml**

de **tampón A**, mientras que el *pellet* del tubo **C⁺** **se resuspende** cuidadosamente **en 1 ml de tampón B**, que es hipotónico respecto al tampón A, ya que no tiene sal. De cada tubo **retiramos una alícuota de 50 µl** para el ensayo de Bradford. La cantidad de proteína así obtenida es una medida del máximo de proteína que se puede liberar (100%) en cada caso.

A continuación **se centrifugan** los dos tubos a 12.500 rpm y a 4 °C durante 10 minutos y de cada tubo **se recoge una alícuota de 50 µl del sobrenadante** con cuidado de no arrastrar material del *pellet*. Posteriormente, se determinará por el método de Bradford cuánta proteína se ha liberado al medio externo en cada caso. Comparando este dato con el 100% se puede determinar el porcentaje de ruptura obtenido tras el tratamiento por choque osmótico.

Eritrocitos de carnero

Cada grupo debe llenar **2 tubos Eppendorf** con 1 ml de la suspensión inicial de eritrocitos de carnero. Uno de los tubos será sometido a choque osmótico y el otro no, de modo que los marcaremos **C⁺** y **C⁻**, respectivamente. El **lavado** de la suspensión inicial de eritrocitos de carnero se hace a 2.500 rpm y a 4 °C durante 5 minutos. Tras el “lavado”, se descartan los sobrenadantes. El *pellet* del tubo **C⁻** **se resuspende** cuidadosamente **en 1 ml de tampón A**, mientras que el *pellet* del tubo **C⁺** **se resuspende** cuidadosamente **en 1 ml de tampón B**, que es hipotónico respecto al tampón A, ya que no tiene sal. De cada tubo **retiramos una alícuota de 50 µl** para el ensayo de Bradford. La cantidad de proteína así obtenida es una medida del máximo de proteína que se puede liberar (100%) en cada caso.

A continuación **se centrifugan** los dos tubos a 2.500 rpm y a 4 °C durante 10 minutos y de cada tubo **se recoge una alícuota de 50 µl del sobrenadante** con cuidado de no arrastrar material del *pellet*. Posteriormente, se determinará por el método de Bradford cuánta proteína se ha liberado al medio externo en cada caso. Comparando este dato con el 100% se puede determinar el porcentaje de ruptura obtenido tras el tratamiento por choque osmótico.

4.- Determinación de la concentración de proteína: método de Bradford

El **método Bradford** permite cuantificar la cantidad de proteína que hay en una muestra biológica. Se basa en el hecho de que el máximo de absorbancia de una solución ácida del colorante azul de Coomassie se desplaza de 465 nm a 595 nm cuando se combina con proteína. Este cambio es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra. Es un método rápido y fiable.

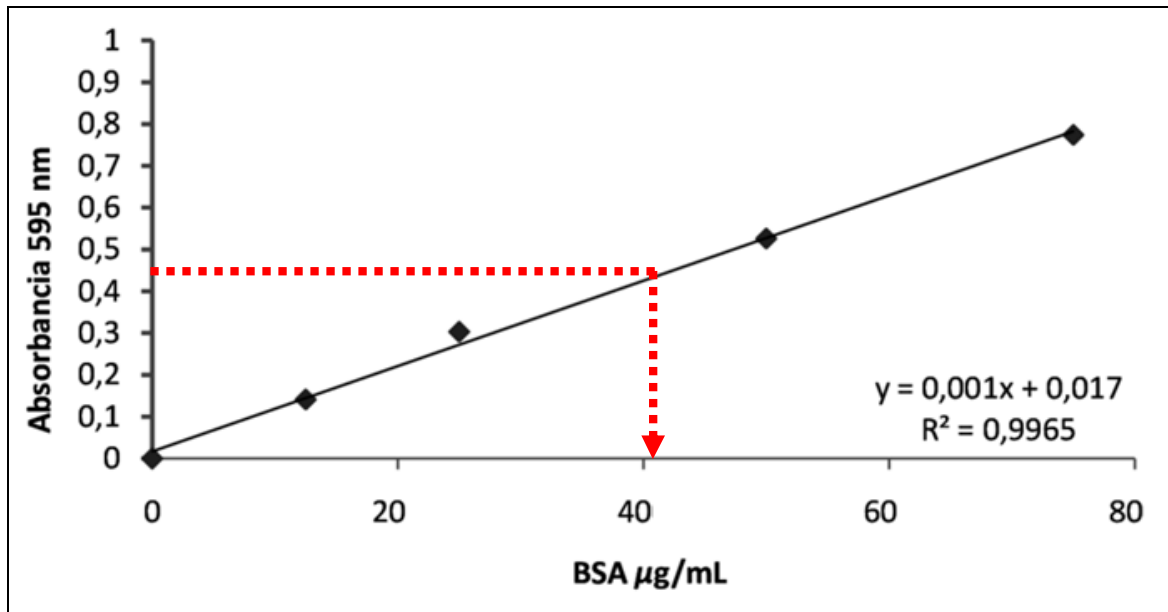
Existen **dos modalidades** de ensayo que se diferencian por su sensibilidad. El **protocolo estándar** se utiliza cuando la concentración de proteína que se va a cuantificar oscila entre 125 y 1.000 µg/ml. El **microensayo** se utiliza cuando la concentración de proteína que se va a cuantificar oscila entre 1,25 y 20 µg/ml. En nuestro caso, la modalidad que se va a utilizar es el microensayo.

Para poder convertir los valores de absorbancia del colorante azul de Coomassie en valores de concentración de proteína es necesario hacer una **recta patrón**. Para ello, se

preparan varias disoluciones de una proteína estándar (seroalbúmina bovina, BSA) con concentraciones distintas, pero conocidas. A continuación, se añade a cada tubo 0,8 ml del reactivo de Bradford previamente diluido (1:4), y al cabo de cinco minutos se mide la absorbancia a 595. Se anotan los valores de A_{595} .

Tubo	μl stock BSA (0,1 mg/ml)	μl H ₂ O	μl Bradford diluido (1:4)	μg [BSA]	A_{595}
0	0	200	800	0	
1	30	170	800	3	
2	60	140	800	6	
3	90	110	800	9	
4	120	80	800	12	
5	150	50	800	15	

Representando el valor medio de A_{595} en función de la concentración de BSA se obtiene la recta patrón. **Por interpolación**, la recta patrón nos permite convertir los valores de A_{595} de una muestra problema en una concentración de proteína. Así, si una muestra de concentración desconocida tiene una A_{595} de 0,45 (línea roja de la figura inferior), la concentración de proteína será de 41 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Determinación de la proteína liberada en cada caso: eficacia de la ruptura.

Para medir la cantidad de proteína presente en cada muestra utilizaremos el microensayo de Bradford. Los resultados obtenidos se anotan en la tabla que aparece más abajo. La concentración de proteína que hay en cada sobrenadante se determina **interpolando** el valor de A_{595} obtenido mediante el ensayo de Bradford en la recta patrón que hemos preparado con anterioridad.

La eficacia de la ruptura celular se calcula dividiendo la cantidad de proteína medida en el sobrenadante de cada tubo sometido a tratamiento entre la cantidad de proteína presente antes de centrifugar (100%).

ANTES	<i>Micrococcus lysodeiteticus</i>				Control lisozima	Eritrocitos de carnero				
	Tubo	C ⁺	C ⁻	L ⁺		L ⁻	C	C ⁺	C ⁻	L ⁺
µl sobrenadante	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
µl H ₂ O	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
µl Bradford diluído (1:4)	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800
A ₅₉₅										
µg proteína (100%)										

DESPUÉS	<i>Micrococcus lysodeiteticus</i>				Control lisozima	Eritrocitos de carnero				
	Tubo	C ⁺	C ⁻	L ⁺		L ⁻	C	C ⁺	C ⁻	L ⁺
µl sobrenadante	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
µl H ₂ O	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
µl Bradford diluído (1:4)	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800
A ₅₉₅										
µg proteína										
Eficacia de la ruptura (antes/después) (%)					---					

Comentar los resultados obtenidos en ambos tipos de célula, prestando especial atención al efecto de la presencia de pared celular.

NOTA: No olvidar corregir los valores obtenidos en los tubos L⁺ con el valor C (control lisozima).