

# ANNEXES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLEMENTATION OF STABLE ISOTOPES LIPOPROTEIN KINETIC STUDIES: EFFECTS ON HDL METABOLISM OF A MEDITERRANEAN TYPE DIET RICH  
IN MUFAS FROM VIRGIN OLIVE OIL.  
Autor: Katia Uliaque Cugat  
ISBN: 978-84-690-6746-8 / DL: T.1183-2007

## INDEX

### Annexes

Annexe I	I
Annexe II	XIII
Annexe III	XVIII
Annexe IV	XXIII
Annexe V	XXIX
Annexe VI	XXXII
Annexe VII	XXXVI
Annexe VIII	XL
Annexe IX	XLII
Annexe X	XLVI
Annexe XI	XLIX
Annexe XII	LIV
Annexe XIII	LVI
Annexe XIV	LVIII
Annexe XV	LX
Annexe XVI	LXIV

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
IMPLEMENTATION OF STABLE ISOTOPES LIPOPROTEIN KINETIC STUDIES: EFFECTS ON HDL METABOLISM OF A MEDITERRANEAN TYPE DIET RICH  
IN MUFAS FROM VIRGIN OLIVE OIL.  
Autor: Katia Uliague Cugat  
ISBN: 978-84-690-6746-8 / DL: T.1183-2007

## ANNEXE I

<b>Facultat de Medicina i Ciències de la Salut</b>	<b>Revisió: 1</b>
<b>Unitat de Recerca de Lípids (URL)</b>	<b>Data: 22/02/06</b>
<b>PROCEDIMENT PER A REALITZAR ESTUDIS CINÈTICS AMB ISÒTOPS ESTABLES DE LIPOPROTEÏNES</b>	<b>Pàg. 1 de 12</b>

### 1. Fonament i objectiu del procediment

El coneixement dels processos metabòlics es basa en el coneixement de la termodinàmica (la cinètica de les reaccions i les concentracions *in vivo* de metabòlits rellevants) de les diferents rutes metabòliques. Aquest conjunt de dades analitzades poden donar-nos una idea detallada de la via metabòlica a estudi. Tradicionalment, per caracteritzar els desordres en el metabolisme de les lipoproteïnes, s'han fet servir les concentracions de lípids i lipoproteïnes plasmàtics. Les mesures puntuals en el temps no donen informació sobre les concentracions anormals de lipoproteïnes en plasma (que poden ser degudes a alteracions en les taxes de producció i/o de degradació). Els estudis metabòlics que utilitzen molècules traçadores (com ara isòtops estables) aplicant models mecanístics permeten obtenir un major coneixement de la dinàmica dels processos metabòlics, els seus desordres i els efectes dels seus tractaments.

### 2. Espècimen

Plasma fresc i/o prèviament congelat (millor si és amb algun conservant tipus BHT, sacarosa, etc).

### 3. Reactius i materials

Veure PNTs per a les tècniques.

#### - D<sub>3</sub>- L- Leucina

L- Leucina-5,5,5 d3 min 99 ATOM %      ref. 486825  
(ISOTEC, Sigma Aldrich)  
Campro Scientific BV (The Netherlands)  
Tf. +31-318 529437  
Fax +31-318 542181  
Persona contacte: Chris van Wakeren (wakeren@campro.nl)

- tubs EDTA K3E (3ml) (BD Vacutainer)      ref. 368857
- tubs EDTA K3E (10ml) (BD Vacutainer)      ref. 366643
- tubs EDTA K3E (10ml) (Vacutainer)      ref. VT-100STK
- filtres Posidyne NEO (Pall)      ref. NEO96E
- kits per determinacions al COBAS MIRA (Roche)
  - Free cholesterol*      (Wako)      ref. 279-47106
  - ApoA2-HA*      (Wako)      ref. 416-27301
  - PhospholipidsB*      (Wako)      ref. 999-54006

<i>Apolipoprotein calibrator</i>	(Wako)	ref. 411-27591	
<i>TG 2x300 for Synchron®Systems</i>	(Beckman Coulter)	ref. 445850	
<i>Apo B-100-100100 for Synchron LX®Systems</i>	(Beckman Coulter)		ref. 467905
<i>ApoA100 for Synchron®Systems</i>	(Beckman Coulter)	ref. 467900	
<i>Cholesterol 300 for Synchron®Systems</i>	(Beckman Coulter)	ref. 467825	

- test de LAL (*Limulus ameobocyte lysate* (LAL) test)

Fontlab2000 SL

Tf. 93 8446495

fontlab2000@teleline.es

Persona de contacte: Marta Pérez

- anàlisi de les mostres per GC-MS i obtenció de resultats amb el programa SAAM II

Dr. Muriel Caslake

Vascular Biochemistry Section

Division of Cardiovascular & Medical Sciences

4th floor, University Block, QEB,

Glasgow Royal Infirmary

G31 2ER

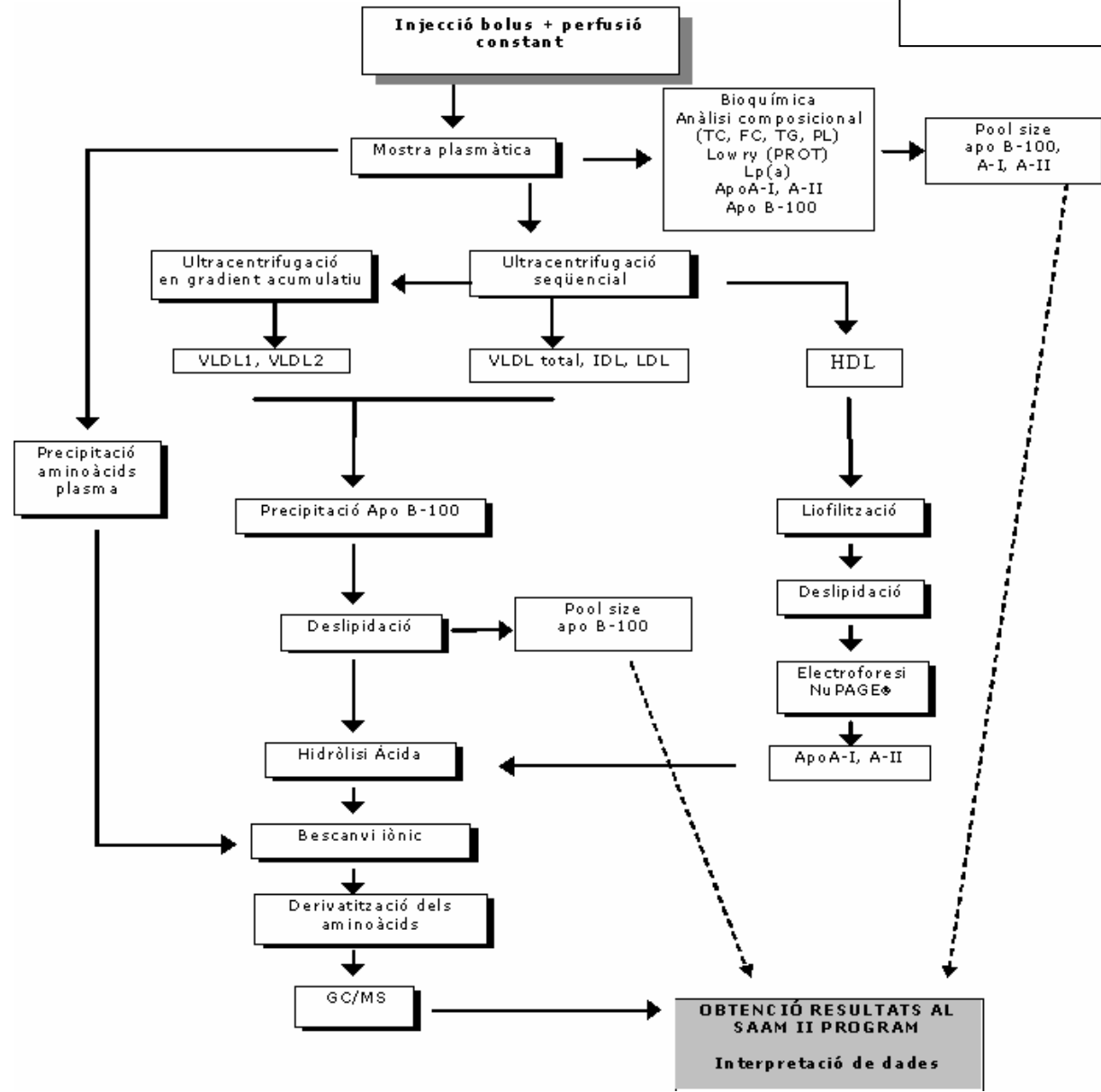
Glasgow

#### **4. Instrumentació**

Veure PNTs per a les tècniques i aparells.

#### **5. Procediment**

Esquema del procediment metodològic per a dur a terme un estudi de cinètiques de lipoproteïnes



## 5.1 Protocol d'intervenció clínica

### 5.1.1 Preparació de la solució de D<sub>3</sub>-L-Leucina per a l'estudi cinètic

#### 5.1.1.1 Preparar una solució de treball de D<sub>3</sub>-L-leucina a una concentració de 10 mg/ml

$$(100 \text{ ml totals} \times 10 \text{ mg/ml}) \times 1 \text{ g} / 1000 \text{ mg} = 1 \text{ g D}_3\text{-L-leucina}$$

\* preparació de la solució de treball (treballar sempre en una campana de cultius!!)

- tindre preparats 3 flascons de sèrum fisiològic de 100 ml
- obrir un flascó amb pinces i tisores (autoclavades!) i buidar-lo
- obrir un segon flascó, agafar 50 ml amb una pipeta de plàstic (estèril i lliure de pirògens) i posar-los en el flascó buit
- pesar el flascó amb els 50 ml de sèrum en una balança analítica (dins la campana, equilibrada), tarar i pesar, fent servir una espàtula (autoclavada), 1g de D<sub>3</sub>-L-leucina (guardar a la nevera fins el moment de fer servir)
- sacsejar lleugerament el flascó per disoldre la D<sub>3</sub>-L-leucina
- acabar d'omplir el flascó fins 100 ml de la solució de treball
- tapar el flascó amb parafilm i guardar a la nevera fins el seu ús

5.1.1.2 A partir de la solució de treball, realitzar els càlculs per obtenir les solucions administrades tenint en compte el pes corporal de cada subjecte:

#### 5.1.1.2.1 La injecció puntual o bolus, a una concentració de 0,7 mg/kg

$$(\text{pes (kg)} \times 0,7 \text{ mg D}_3\text{-L-leucina}) \times 1\text{ml}/10\text{mg} = \text{ml solució de bolus}$$

#### 5.1.1.2.2 La solució per la perfusió o infusió constant, a una concetració de 0,7 mg/kg/h

$$\text{pes (kg)} \times 0,7 \text{ mg D}_3\text{-L-leucina} \times 16\text{h infusió} = \text{mg leucina}$$

$$\text{mg leucina} \times 1\text{ml}/10 \text{ mg} = \text{ml solució de perfusió}$$

$$\text{volum final de la perfusió} = 12 \text{ ml/h} \times 16\text{h} = 192 \text{ ml totals}$$

$$192 \text{ ml totals} - \text{ml solució de perfusió} = \text{ml sèrum fisiològic}$$

\* preparació de la solució de perfusió (treballar sempre a una campana de cultius!!)

- obrir el tercer flascó de sèrum fisiològic de 100 ml
- buidar els ml de sèrum fisiològic amb una xeringa de 10 ml (estèril i lliure de pirògens) fins tindre el volum necessari per a preparar la solució de perfusió
- agafar la solució de treball i extreure el volum necessari per a preparar la solució de perfusió amb una segona xeringa de 10 ml (estèril i lliure de pirògens)



- introduir el volum de solució de treball al tercer flascó
- barrejar lleugerament la solució de perfusió, tapar amb parafilm i guardar a la nevera fins que es faci servir

5.1.1.3 Pel control d'endotoxines en el producte final, enviar a un laboratori extern mostres de la solució de treball per que es realitzi la quantificació d'endotoxines bacterianes (pirògens) o test de LAL.

\* preparació de les mostres pel test de LAL (treballar sempre a una campana de cultius!!)

- obrir flascons de mostreig
- agafar la solució de treball i extreure amb una xeringa de 5 ml (estèril i lliure de pirògens) de 2 a 4,5 ml
- omplir els flascons de mostreig i guardar a la nevera fins el seu enviament
- al enviar les mostres, adjuntar una fulla complimentada amb nom del producte i número de lot, a més dels càlculs realitzats per preparar la solució de treball i de perfusió
- enviar vist-i-plau dels resultats del test un cop confirmats

#### 5.1.2 Obtenció de mostres el dia de la cinètica

- els subjectes d'estudi han de restar en dejú 10h abans d'iniciar l'estudi cinètic. Són citats a l'Hospital de San Joan a primera hora del matí. Se'ls hi col·loca una via d'entrada amb la solució de perfusió i el *bolus* en un braç i una via d'extracció de sang en l'altre braç.
- se'ls realitzen dues extraccions de sang a temps basal (tubs d'EDTA).
- se'ls injecta el *bolus* de solució D<sub>3</sub>-L-leucina a una concentració de 0,7 mg/kg.
- seguidament es realitza la perfusió de forma constant de la mateixa solució de D<sub>3</sub>-L-leucina a una concetració de 0,7 mg/kg/h durante 16 h, restant ingressats a l'Hospital. Per la perfusió es fan servir, per major seguretat, filtres especials estèrils (*Posidyne NEOFILTER*).

##### 5.1.2.1 Obtenció de mostres per determinacions bioquímiques

A cada subjecte se li realitzen una sèrie de determinacions :

- paràmetres clínics i lipídics generals a les 0h del dia de l'estudi cinètic (colesterol, triglicèrids, etc).
  - paràmetres lipídics (colesterol total i lliure, triglicèrids, fosfolípids, apo B-100-100, apoA-I, apoA-II) en mostres de plasma per cada subjecte (**Veure PNT Cobas**)
  - anàlisi composicional (colesterol total i lliure, triglicèrids, fosfolípids, apo B-100-100, apoA-I, apoA-II) en mostres de *pools* per cadascuna de les fraccions lipoproteiques (VLDL1, VLDL2, IDL, LDL i HDL) aïllades per cada subjecte (**Veure PNT Cobas**)

- determinació de proteïnes totals mitjançant mètode de Lowry per l'anàlisi composicional en mostres de *pools* per cadascuna de les fraccions lipoproteiques (VLDL1, VLDL2, IDL, LDL i HDL) aïllades per cada subjecte (**Veure PNT Lowry**)

#### 5.1.2.2 Obtenció de mostres per a la determinació de l'enriquiment isotòpic

Una vegada iniciada la perfusió constant de la solució de D<sub>3</sub>-L-leucina, es realitzen una sèrie d'extraccions sanguínies (tubs amb EDTA) a diferents temps i fins un total de 48h (veure Taula). Volum total de les extraccions aprox 375 ml de sang total.

El procediment per a l'obtenció de mostres és:

- centrifugar les mostres de sang a 25.000, 10 minutos a 4°C
- preparar les alíquotes de plasma corresponents a cada temps d'extracció de la cinètica.

Els volums d'alíquotes de les mostres de plasma per cada temps d'extracció de la cinètica segons el seu posterior processament són:

- \* 2 x 1ml (eppendorf de 1,5 ml) per la precipitació d'aminoàcids del plasma o *plasma method* i per reserva
- \* 2 x 2 ml per la ultracentrifugació seqüencial preparativa (criotubs de 3,5 ml) i per reserva
- \* 2 ml de reserva (en cas que no es puguin fer els volums anteriors de reserva, guardar un mínim de 2 ml de plasma)

A partir de 0.2-0.5 ml de plasma de cada mostra pels diferents temps de la cinètica es preparen *pools* o barreges dels plasmes (per triplicat: *pool* 1, *pool* 2, *pool* 3). Els volums d'alíquotes de les mostres de *pools* són:

- \* 14 ml totals de la barreja de plasmes repartits en
  - \* P1, P2, P3 cadascun de 2 ml per la ultracentrifugació seqüencial preparativa
  - \* P1, P2, P3 cadascun de 2 ml per reserva

No s'ha de pipetejar exacte, sinó s'ha d'agafar una mica més de volum per evitar errors de pipeteig (ex. 1,2 ml o 2,2 ml)!!

- les alíquotes de plasma es poden emmagatzemar a - 70°C fins el seu posterior processament seguint el procediment metodològic.

<b>DIA (HORA)</b>	<b>VOLUM DE SANG</b>	<b>PLASMA METHOD</b>	<b>ULTRACENTRÍFUGA</b>	<b>ANÀLISI</b> <b>VLDL1, VLDL2,IDL,LDL,HDL</b>
0 h (8:00)	30 ml	1 ml	2 X 2 ml	Lípids / bioquímica / enriquiment isotòpic
1 min (8:01)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic
2 min (8:02)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic
5 min (8:05)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic
10 min (8:10)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic
15 min (8:15)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic
20 min (8:20)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic
30 min (8:30)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic
45 min (8:45)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic
1 h (9:00)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic
1.5 h (9:30)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic
2 h (10:00)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic
3 h (11:00)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic
3.5 h (11:30)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic
4 h (12:00)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic
5 h (13:00)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic
6 h (14:00)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic

8 h (16:00)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic
10 h (18:00)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic
11 h (19:00)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic
14 h (22:00)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic
16 h (24:00)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic
24 h (8:00)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic
48 h (8:00)	15 ml	1 ml	2 ml	enriquiment isotòpic

POOLS or PLASMA MIX (x3)	
ULTRACENTRÍFUGA	ANÀLISI
2 ml	VLDL1, VLDL2, IDL, LDL bioquímica

## 5.2 Protocol pel procediment metodològic d'anàlisi de mostres

### 5.2.1 Obtenció de les diferents fraccions lipoproteiques

#### 5.2.1.1 Ultracentrifugació seqüencial preparativa

De cadascuna de les extraccions sanguínies realitzades (0h fins 48h a més de P1, P2 i P3), s'aïllen les diferents fraccions lipoproteiques (VLDL, IDL, LDL, HDL) per ultracentrifugació seqüencial preparativa (**Veure PNT Ultracentrifugació Seqüencial Preparativa i PNT Ultracentrífuges**).

#### 5.2.1.2 Ultracentrifugació en gradient acumulatiu o swing out

De cadascuna de les extraccions realitzades (0h fins 48h a més de P1, P2 i P3) s'aïllen, a partir de las VLDL totals les subfraccions VLDL1 i VLDL2 per ultracentrifugació en gradient acumulatiu (**Veure PNT Ultracentrifugació en gradient acumulatiu o Swingout i PNT Ultracentrífuges**).

## 5.2.2 Obtenció de l'apo B-100-100

### 5.2.2.1 Precipitació amb isopropanol

Per obtenir l'apo B-100-100 aïllada de les diferents fraccions lipoproteiques (VLDL1, VLDL2, IDL i LDL) per les diferents mostres (0h fins 48h a més de P2 i P3) es fa servir el mètode de precipitació amb isopropanol descrit per Egusa et al. (**Veure PNT Precipitació i deslipidació de l'apo B-100-100**).

### 5.2.2.2 Deslipidació de l'apo B-100-100 amb etanol: èter

Per deslipidar l'apo B-100-100 obtinguda de les diferents fraccions lipoproteiques (VLDL1, VLDL2, IDL i LDL) per les diferents mostres (0h fins 48h a més de P2 i P3) es fa servir el mètode clàssic amb disolvents orgànics (**Veure PNT Precipitació i deslipidació de l'apo B-100-100**).

## 5.2.3 Obtenció de l'apoA-I i A-II

### 5.2.3.1 Desalació de les HDL per cromatografia de filtració en gel

Les HDL per les diferents mostres (0h fins 48h) són desalades per cromatografia de filtració en gel fent servir col·lumnes comercials (**Veure PNT Desalació per cromatografia de filtració en gel**).

### 5.2.3.2 Liofilització de les HDL

Una vegada desalades les HDL, es liofilitzen (**Veure PNT Liofilitzador i Deslipidació d' HDL**).

### 5.2.3.3 Deslipidació de les HDL

El procés de deslipidació de les HDL per les diferents mostres (0h fins 48h) es basa en el mateix principi que la deslipidació de les fraccions lipoproteiques riques en apo B-100-100 però amb una barreja de disolvents específica (**Veure PNT Deslipidació d' HDL**).

### 5.2.3.4 Aïllament de l'apoA-I i A-II

Per separar específicament l'apoA-I i A-II d'altres apoproteïnes característiques de les HDL per les diferents mostres (0h fins 48h) es fa servir una variant del mètode d'electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants o SDS-PAGE (**Veure PNT Aïllament de l'apoproteïna AI i A-II per electroforesi desnaturalitzant SDS-PAGE**).

## 5.2.4 Hidròlisi àcida de les mostres

### 5.2.4.1 Hidròlisi àcida de l'apo B-100-100

Per obtenir els aminoàcids que formen part de les apolipoproteïnes i que, finalment, seran analitzats en un GC-MS, es duu a terme la hidròlisi amb àcid clorhídric de l'apo B-100-100 obtinguda de les diferents fraccions lipoproteiques (VLDL1, VLDL2, IDL i LDL) per les diferents mostres (0h fins 48h a més de P2 i P3) (**Veure PNT Hidròlisi àcida de proteïnes**).

#### 5.2.4.2 Hidròlisi àcida de l'apoA-I i A-II

Per purificar els aminoàcids d'una proteïna separada per electroforesi en gels de poliacrilmida és necessari tallar les bandes corresponents a l'apoA-I i A-II obtingudes de HDL per les diferents mostres (0h fins 48h) i dur a terme la seva hidròlisi àcida (**Veure PNT Hidròlisi àcida de proteïnes**).

##### 5.2.4.2.1 Cromatografia de bescanvi iònic

En aquest mètode s'han de purificar els aminoàcids obtinguts de la hidròlisi àcida per cromatografia bescanvi iònic per eliminar possibles restes de poliacrilmida, que podrien interferir en les posteriors determinacions (**Veure PNT Purificació d'amoniàcids per cromatografia de bescanvi iònic, VacElut o sistema d'elució de col·lumnes per buit**).

#### 5.2.5 Obtenció dels aminoàcids lliures del plasma o *plasma method*

L'obtenció dels aminoàcids lliures en plasma per les diferents mostres (0h fins 48h) es fa per precipitació amb disolvents orgànics o altres compostos com ara l'àcid tricloracètic (TCA) (**Veure PNT Obtenció dels aminoàcids del plasma o *Plasma method*, Purificació d'amoniàcids per cromatografia de bescanvi iònic, VacElut o sistema d'elució de col·lumnes per buit**).

#### 5.2.6 Evaporació per centrifugació al buit

Una vegada finalitzada la hidròlisi àcida de les mostres per totes les fraccions lipoproteïques s'ha d'evaporar el disolvent àcid per continuar el processament dels aminoàcids.

Igualment, finalitzada l'obtenció d'aminoàcids lliures en plasma un cop obtinguts per cromatografia de bescanvi iònic en hidròxid d'amoni és necessària la seva evaporació (**Veure PNT Evaporació al buit de mostres en solució, Evaporador de buit**).

#### 5.2.7 Derivatització d'aminoàcids pel seu anàlisi en un GC-MS

El procés de derivatització de les mostres d'apo B-100-100, apoA-I i apoA-II té lloc un cop finalitzada l'evaporació dels aminoàcids obtinguts per hidròlisi àcida.

Aquest pas és realitzat al laboratori de la Dr. Muriel Caslake, Vascular Biochemistry Section, Division of Cardiovascular & Medical Sciences, Royal Infirmary, Glasgow.

#### 5.2.8 Anàlisi d'aminoàcids derivatitzats en un GC-MS i obtenció de resultats amb el programa SAAM II

El procés d'obtenció de dades de les mostres processades a partir del seu anàlisi en un GC-MS també es realitza al laboratori de la Dr. Muriel Caslake, Vascular Biochemistry Section, Division of Cardiovascular & Medical Sciences, Royal Infirmary, Glasgow.

##### 5.2.8.1 Anàlisi de resultats cinètics mitjançant l'aplicació de models compartimentals

Aquest pas és realitzat al laboratori de la Dr. Muriel Caslake, Dep. Pathological Biochemistry, University of Glasgow (**Veure full de dades Excel de la carpeta Cinètiques**).

Per introduir les dades cinètiques al SAAM II program s'han de calcular a part una sèrie de dades (**Veure full de dades Excel de la carpeta Cinètiques**):

- càlcul de la massa o concentració total o *pool size* de apo B-100-100, apoA-I i A-II en les diferents fraccions en mostres de *pools* per cadascuna de les fraccions lipoproteiques (VLDL1, VLDL2, IDL, LDL i HDL) aïllades per cada subjecte
- càlcul de la massa o concentració de leucina o *leucine mass* injectada en cada subjecte

#### 5.2.9 Tècniques complementàries en l'estudi de cinètiques de lipoproteïnes

##### 5.2.9.1 Determinació de proteïnes pel mètode de *Lowry*

Per calcular la concentració total o *pool size* d'apo B-100-100 en les fraccions lipoproteiques VLDL1, VLDL2, IDL i LDL es fa servir el mètode de determinació de proteïnes de *Lowry*. Aquesta determinació es realitza a dues mostres de *pools* de plasma (P2, P3) a partir de les quals s'aïllen per ultracentrifugació les diferents fraccions lipoproteiques. Després de la seva deslipidació, es determina per *Lowry* (**Veure PNT *Lowry***):

- el precipitat d'apo B-100-100
- les proteïnes que puguin quedar en el sobrenadant d'isopropanol. Compte de guardar el volum d'isopropanol després de la precipitació de l'apo B-100-100.

##### 5.2.9.1.1 Determinació de mostres aquoses

Després de la precipitació de l'apo B-100-100 amb isopropanol de les dues mostres de *pools* per VLDL1, VLDL2, IDL i LDL, es determina per *Lowry* el sobrenadant d'isopropanol (**Veure PNT *Lowry***).

##### 5.2.9.1.2 Determinació de mostres precipitades

Després de la deslipidació de l'apo B-100-100 amb etanol:èter de les dues mostres de *pools* per VLDL1, VLDL2, IDL i LDL, es determina per *Lowry* el precipitat d'apo B-100-100 (**Veure PNT *Lowry***).

##### 5.2.9.2 Determinació de proteïnes pel mètode de *Bradford*

Per calcular el contingut de proteïna total de les HDL després de desalar-les es fa servir el mètode de *Bradford* (**Veure PNT *Bradford***).

##### 5.2.9.3 Anàlisi composicional de lipoproteïnes

Es realitza l'anàlisi composicional:

- en VLDL1, VLDL2, IDL, LDL i HDL obtingudes a partir d'una mostra de *pool* (P1)
- una mostra de plasma a temps inicial (0h)

Es calcula la concentració de colesterol total, colesterol esterificat i lliure, triglicèrids, fosfolípids, apo B-100-100, apoA-I i A-II fent servir un autoanalitzador Cobas Mira (**Veure PNT Cobas Mira**).  
Per calcular la concentració total de proteïnes es fa servir el mètode de *Lowry* (modificació amb SDS) (**Veure PNT Lowry**). Aquests valors de proteïnes totals dels P1 també es fan servir pel càlcul del *pool size* d'apo B-100-100.  
També es determina la concentració de Lp(a) en les mostres de plasma inicial (pel posterior càlcul del *pool size* d'apo B-100 s'han de corregir els valors de colesterol total per les concentracions de Lp(a) dels voluntaris).

## 6. Bibliografia

Veure referències bibliogràfies de cada metodologia en el seu corresponent PNT.

Demant T, Packard CJ. et al. Sensitive methods to study human apo B-100-100 metabolism using stable isotope-labeled amino acids. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 1996. 270: 1022-36.

Hugh P, Barrett R, Foster DM. Design and analysis of lipid tracer kinetic studies. Curr Opin Lipidol. 1996. 7; 3: 143-8.

Cobelli C, Foster DM. Compartmental models: theory and practice using the SAAM II software system. Adv Exp Med Biol. 1998. 445: 79-101.

Packard CJ, Demant T et al. Apolipoprotein B metabolism and the distribution of VLDL and LDL subfractions. J Lipid Res. 2000. 41; 2: 305-18.



## ANNEXE II

<b>Facultat de Medicina i Ciències de la Salut</b>	<b>Revisió: 1</b>
<b>Unitat de Recerca de Lípids (URL)</b>	<b>Data: 17/07/04</b>
<b>MESURA DE DENSITAT DE LÍQUIDS: REFRACTÒMETRES I PICNÒMETRES</b>	<b>Pàg. 1 de 5</b>

Picnòmetre 5324/25 Afora	Codi inventari URV:
Refractòmetre AO Model 10406/15	Codi inventari URV: 012419
Refractòmetre Comecta Model C-1	Codi inventari URV:

### Fabricant:

Afora  
American Optical Company, USA  
Comecta, SA

### Funcions:

Mesurar la densitat o contingut de sal de diverses solucions líquides fent servir:

- picnòmetre, recipient calibrat que permet pesar un volum de líquid amb molta precisió
- refractòmetre, aparell que permet mesurar l'índex de refracció d'una substància

### Instal·lació:

El refractòmetre AO s'ha de connectar al corrent elèctric.

### Instruccions d'ús:

Existeix un manual d'usuari proporcionat per la casa comercial Comecta que es troba en la carpeta Manuals d'Aparells.

#### 1. Mesurar la densitat de diverses solucions:

##### 1.1 Fent servir el picnòmetre

- 1.1.1 Pesar en una balança de precisió el picnòmetre, prèviament netejat i assecat, juntament amb el seu tap (veure Annex). Fer servir una balança analítica  $\pm 0.001g$  si es vol ser molt acurat.
- 1.1.2 Registrar el pes en sec (Po).
- 1.1.3 Omplir el picnòmetre amb aigua destil·lada, evitant de fer bombolles.

- 1.1.4 Col·locar el tap del picnòmetre i assegurar-se que el líquid puja pel capil·lar intern.
- 1.1.5 Eixugar la part externa del picnòmetre de les possibles restes de líquid que hagin sobreixit.
- 1.1.6 Pesar el picnòmetre. Registrar el pes ple ( $P_H$ ).
- 1.1.7 Buidar el picnòmetre i assecar bé.
- 1.1.8 Omplir el picnòmetre amb la solució problema que volem mesurar i seguir el passos 1.1.3-1.1.5.
- 1.1.9 Pesar el picnòmetre. Registrar el pes ple ( $P_p$ ).
- 1.1.10 Calcular la densitat de la solució problema amb la fórmula:

$$\text{Densitat (g/ml)} = (P_p - P_o) / (P_H - P_o)$$

- 1.1.11 Un cop acabat de fer servir, netejar, assecar bé i guardar.

## 1.2 Fent servir el refractòmetre Comecta

- 1.2.1 Enfocar el refractòmetre sota un focus de llum i ajustar les diòptries de l'operari amb l'anell de diòptries.
- 1.2.2 Obrir la tapa i deixar caure 1 o 2 gotes de la solució problema. en la superfície del prisma (veure Annex).
- 1.2.3 Tancar la tapa.
- 1.2.4 Fer la lectura corresponent a la línia de posició que limita la zona de clar/fosc que informa del percentatge de sal (%) o densitat (g/ml) de la solució problema (veure Annex).
- 1.2.5 Per repetir la lectura, netejar el prisma amb aigua destil·lada i assecar bé.
- 1.2.6 Un cop acabat de fer servir, netejar, assecar bé i guardar el refractòmetre al seu estoig.

## 1.3 Fent servir el refractòmetre AO

- 1.3.1 Connectar el refractòmetre al corrent elèctric i encendre el botó de la llum.
- 1.3.2 Enfocar el refractòmetre cap el focus de llum i ajustar les diòptries de l'operari amb l'anell de diòptries.

- 1.3.2 Deixar caure 1 o 2 gotes de la solució problema. en la superfície del prisma (veure Annex).
- 1.3.2 Tancar la tapa. Al no tenir tapa pròpia, s'ha de fer servir la tapa del refractòmetre Comecta.
- 1.3.3 Fer la lectura corresponent a la línia de posició que limita la zona de clar/fosc que informa del percentatge de sal (%) o densitat (g/ml) de la solució problema (veure Annex).
- 1.3.4 Per calcular la densitat es fa servir la fórmula:  
$$\text{Densitat (g/ml)} = (\text{lectura refractòmetre} \times 5.391) - 6.185$$
- 1.3.5 Per repetir la lectura, netejar el prisma amb aigua destil·lada i assecar bé.
- 1.3.6 Un cop acabat de fer servir, netejar, assecar bé i guardar el refractòmetre.

**Manteniment Intern:**

Cap en especial.

**Manteniment extern:**

Cap en especial.

**Reparacions:**

Avisar al Servei de Manteniment.

## ANNEX

Fig.1. Imatge i esquema d'un picnòmetre.

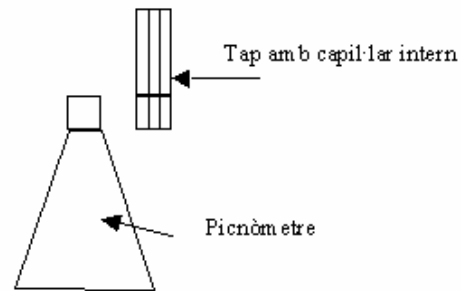


Fig.2. Imatge d'un refractòmetre AO.

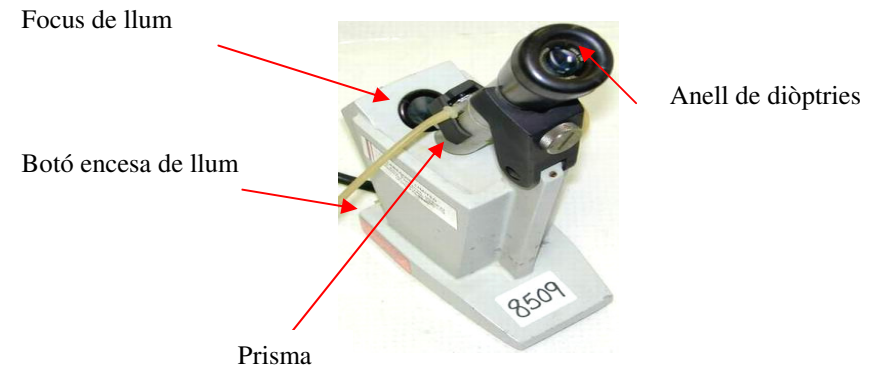


Fig.3. Imatge d'un refractòmetre Comecta.

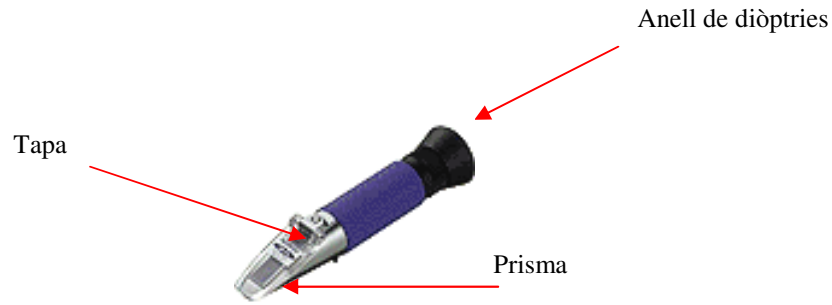
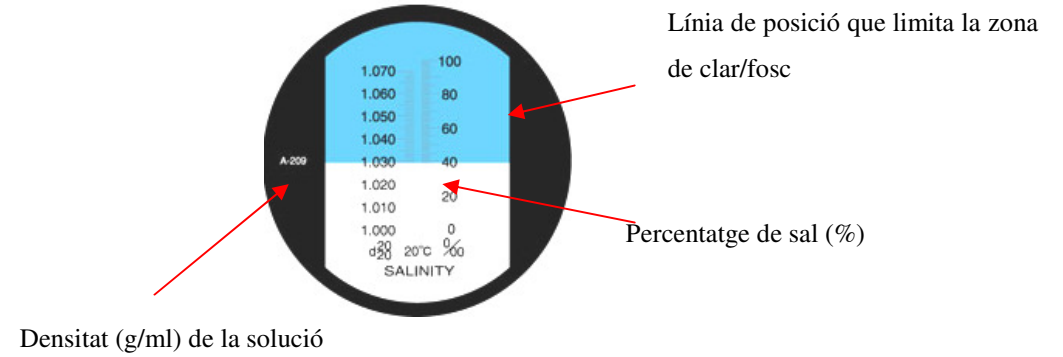


Fig.4. Esquema de lectura de la densitat de diverses solucions



### ANNEXE III

<b>Facultat de Medicina i Ciències de la Salut</b>	<b>Revisió: 1</b>
<b>Unitat de Recerca de Lípids (URL)</b>	<b>Data: 17/07/04</b>
<b>Ultracentrífugues</b>	<b>Pàg. 1 de 5</b>

Centrikon T-1055

Centrikon T-1075

Codi inventari URV: 012581

Codi inventari URV:012580

#### **Fabricant:**

Kontron Instruments, Italy.

#### **Funcions:**

Centrifugar mostres a elevades revolucions.

#### **Instal·lació:**

Connectar al corrent elèctric i mantenir-les en un ambient d'una temperatura poc elevada.

#### **Instruccions d'ús:**

Manual d'usuari i d'accessoris proporcionat per la casa comercial que es troba en la carpeta Manuals d'Aparells.

#### 1. Per posar en marxa

- 1.1 Encendre l'aparell amb els botó ON/OFF situats a la part davantera de l'aparell, en la part inferior dreta.
- 1.2 Obrir la tapa situada a la part superior esquerra per col·locar el rotor. Anar amb compte degut al considerable pes del rotor. Assegurar-se que queda ben col·locat.
- 1.3 Tancar la tapa.
- 1.4 Programar la ultracentrífuga (veure Annex).
  - 1.4.1 Programar la temperatura: prémer el botó Parameter/Temp del panell de control inferior i marcar la temperatura amb els dígitos situats a la dreta del panell de control. Després prémer Enter. Per esborrar, prémer Clear i tornar a programar la temperatura. La temperatura programada apareix en el panell superior ROTOR TEMP.

- 1.4.2 Programar el temps: prémer el botó Parameter/Time del panell de control inferior i marcar els temps amb els dígit situats a la dreta del panell de control. Després prémer Enter. Per esborrar, prémer Clear i tornar a programar el temps. Per programar hores prémer el dígit i Enter; per programar hores i minuts prémer dígit per hora, prémer • , prémer dígit per minuts i Enter. Per programar minuts, prémer zero, prémer • , prémer dígit per minuts i Enter. La temperatura programada apareix en el panell superior ELAPSED TIME.
  - 1.4.3 Programar les revolucions: prémer el botó Parameter/Speed del panell de control inferior i marcar les rpm amb els dígit situats a la dreta del panell de control. Després prémer Enter. Per esborrar, prémer Clear i tornar a programar el temps. Només permet programar números sencers (ex:39000 rpm, 20000 rpm). La temperatura programada apareix en el panell superior ROTOR SPEED.
  - 1.4.4 Programar delayed: prémer el botó Parameter/Delayed Start del panell de control inferior i marcar el temps de delayed amb els dígit situats a la dreta del panell de control. Després prémer Enter. Per eliminar el delayed, prémer zero i Enter. Comprobar que un cop fet START s'encengui el llum STATUS/DELAYED START del panell de control superior. El comptador de temps de delayed apareix en el panell superior ELAPSED TIME.
- 1.5 Prémer el botó START del panell de control inferior.
  - 1.6 Apuntar a la llibreta d'incidències les condicions del programa de la ultra i l'operador.
  - 1.7 Esperar fins que la ultracentrífuga estigui rodant a 4000 rpm. Comprovar que no s'encenguin els llums vermells del panell ERROR o STATUS s'encenen per assegurar que tot va bé.

## 2. Per desconnectar l'aparell

- 2.1 Quan la ultracentrífuga hagi acabat de rodar, prémer el botó STOP i esperar a què es desfaci el buit. Mirar el panell inferior VACUUM.
- 2.2 Obrir la tapa i treure el rotor. Col·locar-lo en el seu suport específic perquè no es faci malbé el codi de barres identificat per la ultracentrífuga.
- 2.3 Netejar el compartiment del rotor de les possibles restes d'oli amb paper i apuntar a la llibreta les revolucions finals corregudes per la ultra. Mirar les rpm totals en el comptador del panell superior.
- 2.4 Apagar l'aparell prement els botons ON/OFF.

## **Instruccions d'ús abreujades:**

### 1. Encesa de la ultracentrífuga

- 1.1 Encendre l'aparell amb el botó ON/OFF.
- 1.2 Obrir la tapa i col·locar el rotor.
- 1.3 Tancar la tapa i programar la ultracentrífuga.
- 1.4 Prémer el botó START.

## 2. Desconnexió de l'aparell

- 2.1 Prémer el botó STOP i esperar a què es desfaci el buit.
- 2.2 Obrir la tapa i treure el rotor amb les mostres.
- 2.3 Apagar l'aparell prement el botó ON/OFF.



**ANNEX**

Fig.1. Imatge i esquema d'una ultracentrífuga.

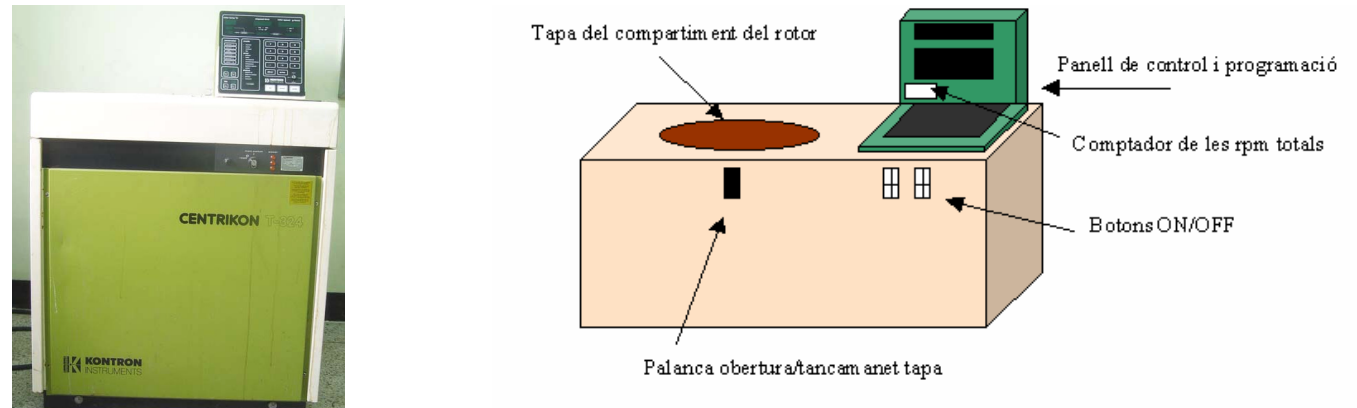


Fig.2. Imatge i esquema dels panells de control.

2a. Panell superior

Rotor temp	Elapsed time	Rotor speed
°C	hrs.min.	rpm

Mode	Error	Status
normal	start failure	power on
vertical	instrument failure	program runs
zonal	water cooling	rotor runs
precool	rotor/door	unload
	diffusion pump	open door
<b>Vacuum</b>	drive	delayed start
	rotor unloaded	brake on
low	vacuum	run interrupted
medium	overspeed	
high	rotor temp	

2b. Panell inferior

<b>Mode</b>	<b>Parameter</b>	7	8	9	
normal/ zonal	temp/ rotor code	4	5	6	<b>START</b>
vertical/precool	time/ delayed start	1	2	3	
	speed/ zonal speed	•	∞	0	<b>STOP</b>
		clear		enter	

## ANNEXE IV

<b>Facultat de Medicina i Ciències de la Salut</b>	<b>Revisió: 1</b>
<b>Unitat de Recerca de Lípids (URL)</b>	<b>Data: 17/07/04</b>
<b>ULTRACENTRIFUGACIÓ EN GRADIENT ACUMULATIU O SWING OUT</b>	<b>Pàg. 1 de 6</b>

### 1. Fonament i objectiu de la prova

La ultracentrifugació en gradient acumulatiu o *swing out* permet la separació de les diferents fraccions lipoproteiques segons la seva densitat i constant de flotació (Sf) en un gradient de solucions de diferent densitat.

### 2. Espècimen

Plasma.

### 3. Reactius, controls i altres materials

#### 3.1. Solucions de densitat

- Veure Annex 1.

#### 3.2. Material

- Coated Ultra-Clear Tubes (Beckman, ref. 344060)
- pipetes Pasteur de vidre (Normax, ref. 5426015)
- matraus aforats de diferents volums

### 4. Instrumentació

- centrífuga *Centricon 75* (Kontron Instruments, Italy)
- rotor pendular Kontron TST 41.14, 41000 rpm (Kontron Instruments, Italy)
- balança electrònica (FX-400, AND Electronic Balance)
- agitador magnètic (HC1202, Bibby)

### 5. Procediment

#### 5.1 Preparació de les mostres

5.1.1 Preparar vials de plàstic petits, ben identificats i afegir-hi 0,341 g de NaCl.

5.1.2 Afegir als vials 2 ml de plasma o 2 ml de VLDL (veure PNT ultracentrifugació seqüencial preparativa), resuspendre suaument i deixar a temperatura ambient un temps fins que es dissolgui. Si només s'afegeix 1 ml de plasma o de VLDL, corregir amb 1 ml de solució de densitat 1,006 g/ml.

- 5.1.3 Preparar els tubs Beckman ben identificats en un rac i afegir-hi 0.5 ml de la solució de densitat 1.182 g/ml.
- 5.1.4 A continuació, afegir el volum de plasma o VLDL dissolts en NaCl i el volum de les diferents solucions de densitat segons l'ordre d'*over layer* (veure Annex 2).
- 5.1.5 Posar els tubs dins del caputxons del rotor. Identificar cada mostra amb el número de cada caputxó ja que durant tot el procés els tubs no es podran extreure. Les mostres no s'equilibren a la balança; cada caputxó i el seu tap ja estan equilibrats entre ells i les mostres i solucions s'afegeixen fent servir una pipeta automàtica (calibrar anteriorment).
- 5.1.6 Afegir una mica de greix als taps i tancar els caputxons. Mirar que aquests estiguin equilibrats, que encaixin bé en la seva posició en el rotor i col·locar aquest en la ultracentrífuga de forma correcta. Tornar a repassar que els caputxons estiguin ben col·locats (veure Annex 3).

## 5.2 Extracció de les diferents fraccions lipoproteiques

### 5.2.1 Extracció de VLDL1 (Sf 60-400)

5.2.1.1 Centrifugar les mostres preparades a partir de 2 ml de plasma o VLDL a 39000 rpm, 23°C, 1.38 hores i desacceleració zero.

5.2.1.2 Extreure 1 ml de la fracció VLDL1. Extreure amb una pipeta Pasteur de vidre i enrasant en un matrau aforat de 1 ml la fracció que queda en la part superior del tub, sense extreure dels caputxons.

### 5.2.2 Extracció de VLDL2 (Sf20-60)

5.2.2.1 Afegir en *over layer* 1 ml de la solució 6 (veure Annex 2).

5.2.2.2 Centrifugar a les condicions adequades (veure Annex 3).

5.2.2.3 Extreure 0.5 ml de la fracció VLDL2. Extreure amb una pipeta Pasteur de vidre i enrasant en un matrau aforat de 0.5 ml la fracció que queda en la part superior del tub, sense extreure dels caputxons.

### 5.2.3 Extracció de IDL (Sf 12-20) i LDL (Sf 0-12)

5.2.3.1 Centrifugar a les condicions adequades (veure Annex 3).

5.2.3.2 Extreure 0.5 ml de la fracció IDL. Extreure amb una pipeta Pasteur de vidre i enrasant en un matrau aforat de 0.5ml la fracció que queda en la part superior del tub, sense extreure dels caputxons.

5.2.3.3 Extreure 1 ml de la fracció LDL. Extreure amb una pipeta Pasteur de vidre i enrasant en un matrau aforat de 1 ml la fracció que queda en la part superior del tub, sense extreure dels caputxons.

## 6. Bibliografia

Lingren et al. Blood lipids and lipoproteins: quantitation, composition and metabolism. Wiley-Interscience, New York, 1972, p221-245.

## ANNEX 1 : SOLUCIONS DE DENSITAT

### Material:

- NaCl (JT Baker, ref. 0278)
- EDTA Na<sub>2</sub> (Panreac, ref. 131669)
- NaOH (Fluka, ref. 71690)
- NaBr (Panreac, ref. 121646)

### Solucions de densitat:

- Densitat 1.006 g/ml  
22.8 g NaCl, 0.2 g EDTA Na<sub>2</sub>, 2 ml NaOH 1 N (1M), 2 l H<sub>2</sub>O destil·lada (veure PNT ultracentrifugació seqüencial preparativa). Dissoldre el NaCl i l'EDTA en 2 l H<sub>2</sub>O destil·lada i afegir el NaOH. Mirar la densitat en el densitòmetre (veure PNT Densitòmetre) i ajustar-la si és necessari amb NaCl.
- Densitat 1.182 g/ml  
249.80 g NaBr, 1 l sol. 1.006 g/ml. Dissoldre el NaBr a poc a poc per què no precipiti. Mirar la densitat en el densitòmetre (veure PNT Densitòmetre) i ajustar-la si és necessari amb NaBr.
- Altres solucions de densitat es preparen a partir d'una barreja de les dues solucions anteriors (veure Taula 1). Mirar la densitat en el densitòmetre (veure PNT Densitòmetre) i ajustar-la si és necessari amb una o altra solució.

Taula 1. Altres solucions de densitat.

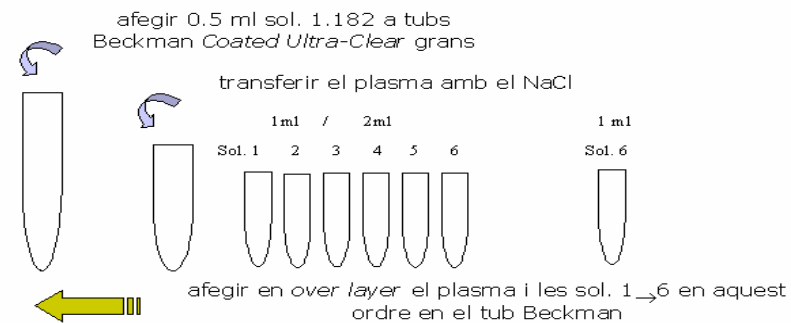
Sol.	Densitat g/ml	ml sol. 1.006	ml sol. 1.182
1	1.0988	25/50	27.89/55.78
2	1.0860	25/50	20.83/41.66
3	1.0790	25/75	17.72/53.16
4	1.0722	25/75	15.05/46.50
5	1.0641	25/75	12.31/36.93
6	1.0588	25/100	10.73/42.92

## ANNEX 2 : PREPARACIÓ DE LA MOSTRA

Taula 2. Preparació de la mostra: *over layer* de les diferents solucions de densitat.

Ordre	Solució	Densitat g/ml	Volum ml
1º		1.182	0.5
2º		plasma	2
3º	1	1.0988	1
4º	2	1.0860	1
5º	3	1.0790	2
6º	4	1.0722	2
7º	5	1.0641	2
8º	6	1.0588	2

Figure 2. Preparació de la mostra: *over layer* de les diferents solucions de densitat.



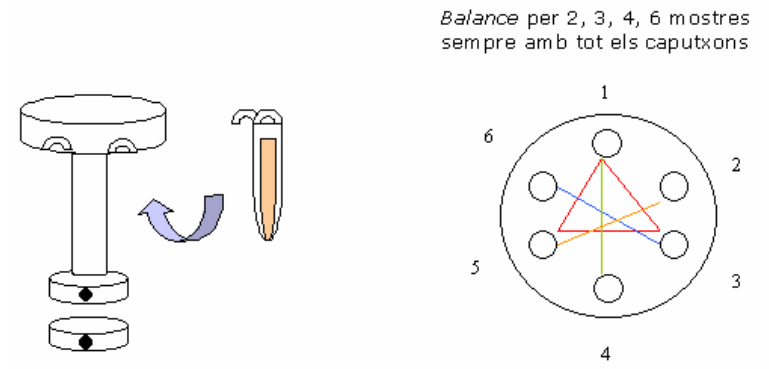
### ANNEX 3 : CENTRIFUGACIÓ DE LES MOSTRES

Taula 3. Condicions de centrifugació.

<b>VLDL1 (9.81 <math>\omega^2t</math>)*</b>	<b>VLDL2 (2.12 <math>\omega^2t</math>)</b>	<b>IDL (1.55 <math>\omega^2t</math>)</b>	<b>LDL (7.52 <math>\omega^2t</math>)</b>
<b>1.38 h 39.000 rpm</b>	15.41h 18.500 rpm	2.35h 39.000 rpm	21.10h 30.000 rpm
	12.03h 21.100 rpm	3.12h 35.000 rpm	17.30h 33.000 rpm
	17.31h 17.500 rpm	3.24h 34.000 rpm	16.29h 34.000 rpm
	18.08h 17.200 rpm	3.50h 32.000 rpm	18.36h 32.000 rpm
	<b>14.52h 19.000 rpm</b>		18.02h 32.500 rpm
	16.34h 18.000 rpm		19.12h 31.500 rpm
	20.58h 16.000 rpm		

$$*\omega^2t = [(2 \times 3.1416 \times \text{rpm}) / 60 \text{ s}]^2 \times \text{temps (s)}$$

Figure 3. Condicions de centrifugació.





## ANNEXE V

<b>Facultat de Medicina i Ciències de la Salut</b>	<b>Revisió: 0</b>
<b>Unitat de Recerca de Lípids (URL)</b>	<b>Data: 10/07/04</b>
<b>PRECIPITACIÓ I DESLIPIDACIÓ DE L' APOPROTEÏNA B</b>	<b>Pàg. 1 de 3</b>

### 1. Fonament i objectiu de la prova

El procés de deslipidació permet eliminar els lípids de les partícules de lipoproteïnes i obtindre les apoproteïnes per posteriors determinacions, evitant-se així possibles interferències. Per deslipidar lipoproteïnes es fan servir dissolvents polars com ara barreges d'alcohols i/o cloroform.

La precipitació amb isopropanol de l'apo B-100 i posterior deslipidació amb dissolvents orgànics permet obtindre la major part d'apo B-100 present en les fraccions lipoproteiques VLDL, IDL i/o LDL.

### 2. Espècimen

Fraccions lipoproteiques riques en apo B-100 aïllades per ultracentrifugació seqüencial o en gradient.

### 3. Reactius i materials

#### 3.1. Solucions de precipitació i deslipidació

- isopropanol (Merk, ref. 1.00993.1000)
- etanol (Merk, ref.1.11727.1000)
- èter (Merk, ref.1.11727.1000)
- àcid nítric HNO<sub>3</sub> 60% (Panreac, ref. 131036)

#### 3.2. Material

- tubs de vidre (Schott Duran®, n° ref. 26 135 11 55)
- pipetes Pasteur de vidre (Normax, ref. 5426015)

### 4. Instrumentació

- campana d'extraccions (F+, Vallés)
- font de llum directa
- vòrtex (D-051, Dinko)
- pipetus automàtic (Bibbyjet, Bibby)
- dispensador de volums (Dispensette, ref. 4700140; Brand, ref.4700130)
- centrífuga (H-103 R S, Kokusan)

## 5. Procediment

### 5.1 Preparació de les mostres

5.1.1 Afegir un volum de mostra determinat als tubs de vidre correctament rotulats i identificats. En cas de mostres a analitzar posteriorment en un GC/MS, rentar prèviament els tubs amb àcid nítric -aigua, aigua, aigua destil·lada i deixar-los assecar.

### 5.2 Precipitació de l'apo B-100 amb isopropanol

5.2.1 Afegir isopropanol en una relació 1:1 respecte al volum de mostra, agitar amb vòrtex i deixar a 4°C O/N (overnight). Guardar l'isopropanol a temperatura ambient. En cas de mostres analitzades posteriorment en un GC/MS, apuntar en cada rac el procés que s'ha realitzat per cada fracció lipoproteica.

5.2.1.1 Volums a afegir segons el tipus de mostra:

1 ml	VLDL1	+	1 ml	isopropanol
0.5 ml	VLDL2	+	0.5 ml	isopropanol
2 ml	IDL	+	2 ml	isopropanol
1 ml	LDL	+	1 ml	isopropanol

5.2.2 Centrifugar les mostres amb *brake off* a 3.000 rpm, 30 minuts, 4°C. Anar amb compte perquè en alguns casos el precipitat pot ser molt inestable.

5.2.3 Eliminar el sobrenadant d'isopropanol, amb compte de no agafar restes de precipitat flotant, amb una pipeta Pasteur de vidre. Mirar a contrallum d'una font de llum directa. Treure el màxim d'isopropanol possible sense arrossegar gaire precipitat (no cal treure'l tot). Tenir en compte que en alguns casos el precipitat pot ser molt inestable. En cas de mostres analitzades posteriorment en un GC/MS, com en estudis cinètics d'apoproteïnes, aquest procés es realitza també per les mostres de pools (per duplicat). En aquest cas, no es tira el sobrenadant d'isopropanol, sinó que es guarda per mesurar la proteïna pel mètode de *Lowry* (veure protocol *Lowry*).

### 5.3 Deslipidació de l'apo B-100 amb etanol:èter

5.3.1 Un cop extret el sobrenadant d'isopropanol dels tubs, afegir 3 ml d'etanol:èter (3:1), agitar amb vòrtex i deixar a 4°C O/N. Mirar que el precipitat es desfaci bé i que no es quedi per les parets del tub. L'etanol:èter (3:1) es guarda a 4°C. A les fraccions IDL i LDL s'hi poden afegir 6 ml al tenir més component lipídic. També es poden deixar les mostres a 4°C durant 2 dies seguits si cal.

5.3.1 Centrifugar amb *brake off* a 3.000 rpm, 30 minuts, 4°C i eliminar el sobrenadant. Mirar a contrallum d'una font de llum directa. Treure el màxim de sobrenadant possible sense arrossegar gaire precipitat (no cal treure'l tot). Tenir en compte que en alguns casos el precipitat pot ser molt inestable.

5.3.2 En cas que sigui necessari deslipidar més, repetir els passos 5.3.1 i 5.3.2. En aquests casos, tant el sobrenadant com el precipitat presenten un color grogós, no blanc, degut al component lipídic.

5.3.3 En cas que la deslipidació sigui completa (pellet blanc), un cop extret el sobrenadant, afegir 3 ml èter, agitar amb vòrtex i deixar 4°C O/N. Mirar que el precipitat es desfaci bé i que no es quedi per les parets del tub. L'èter es guarda a 4°C.

5.3.4 Centrifugar amb *brake off* a 3.000 rpm, 30 minuts, 4°C i eliminar el màxim de sobrenadant. Mirar a contrallum d'una font de llum directa. Treure el màxim

de sobrenadant possible sense arrossegar gaire precipitat (no cal treure'l tot). Tenir en compte que en alguns casos el precipitat pot ser molt inestable.

5.3.5 Assecar els tubs sota una campana d'extraccions per eliminar del tot les restes de dissolvents.

5.3.6 Tapar els tubs de vidre, posar-hi parafilm i guardar-los a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## 6. Bibliografia

Bloor WR. A method for the determination of fat in small amounts of blood. J Biol Chem. 1914.17;377.

Egusa G, Brady DW. et al. Isopropanol precipitation method for the determination of apo B-100 specific activity and plasma concentrations during metabolic studies of the VLDL and LDL apo B-100. Lipid Res. 1983.24:1261-67.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem. 1957.226;497-509.

<http://www.cyberlipid.org/extract/extr0002.htm#>

## ANNEXE VI

<b>Facultat de Medicina i Ciències de la Salut</b>	<b>Revisió: 0</b>
<b>Unitat de Recerca de Lípids (URL)</b>	<b>Data: 10/07/04</b>
<b>DESALACIÓ PER CROMATOGRÀFIA DE FILTRACIÓ EN GEL</b>	<b>Pàg. 1 de 4</b>

### 1. Fonament i objectiu de la prova

La cromatografia en filtració en gel o d'exclusió per tamany es basa en la separació de barreges de compostos segons la seva mida o pes molecular a mida que aquests travessen una fase estacionària amb una determinada mida de porus.

Les mostres dissoltes en solucions amb elevades concentracions de compostos hidrofílics, com ara sals o sacarosa, poden ser desalades per cromatografia de filtració en gel. Això permet eliminar les restes de solvents que, en alguns casos, poden interferir en posteriors determinacions de les mostres.

### 2. Espècimen

Mostres dissoltes en solucions amb elevades concentracions de sals, com ara la fracció lipoproteica HDL aïllada per ultracentrifugació seqüencial.

### 3. Reactius i materials

#### 3.1. Solucions de desalació

- NaCl (JT Baker, ref. 0278)
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fluka, ref. 71500)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fluka, ref. 71638)
- HCl (Carlo Erba, ref. 403871)
- aigua destil·lada

#### 3.2. Material

- tubs de plàstic de 5 ml (Sarstedt, ref. 55.475)
- pipetes Pasterur de plàstic (Sarstedt, ref. 86.1171)
- col·lumnes PD-10 (Amersham Pharmacia Biotech, ref. 17-0851-01)

### 4. Instrumentació

- pHmetre (micropH2001, Crison)
- balança electrònica (FX-400, AND Electronic Balance)

### 5. Procediment

#### 5.1 Desalació de mostres

- 5.1.1 Col·locar les col·lumnes en posició vertical en un suport (veure Annex).

- 5.1.2 Equilibrar les col·lumnes afegint-hi 25 ml H<sub>2</sub>O destil·lada (veure Annex).
- 5.1.3 Empaquetar-les afegint 3 ml de PBS. Per preparar PBS : 9.4 g/l NaCl + 1.2 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1.8 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.4).
- 5.1.4 Afegir 2 ml de mostra i 1 ml de PBS per fer-la baixar.
- 5.1.5 Afegir 2 ml PBS per poder recollir la mostra en un tub de plàstic. En cas de mostres HDL analitzades posteriorment en un GC/MS, es mesura la proteïna total pel mètode de Bradford (veure PNT *Bradford*) per utilitzar-ne 800 µg. En aquest cas, el volum corresponent s'afegeix a tubs de vidre de 10 ml prèviament rentats amb àcid nítric-aigua. Guardar les mostres a 4°C fins el seu posterior processament. Les col·lumnes es poden reutilitzar fins a tres vegades. Perquè es mantinguin bé, no deixar-les assecar (omplir-les amb una mica de H<sub>2</sub>O destil·lada o PBS abans de guardar-les tapades).

## 6. Bibliografia

- Ausubel FM. et al. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, Inc.1994. Vol.2.
- Segrest, JP, Albers JJ. Methods in Enzymology. Academic Press, Inc. 1986. Vol 128.
- <http://www.chromatography.amershambiosciences.com>

## ANNEX

### Instructions

## PD-10 Desalting column

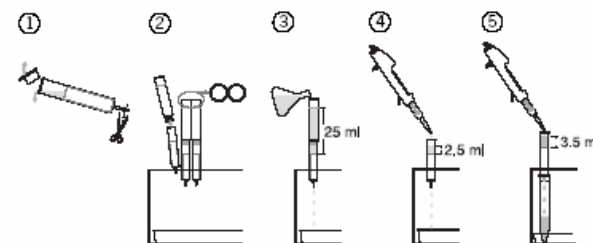
Amersham Biosciences PD-10 Desalting columns are prepacked, disposable columns containing Sephadex™ G-25 Medium for group separation of high ( $M_r > 5000$ ) from low molecular weight substances ( $M_r < 1000$ ) by desalting and buffer exchange. Columns are delivered in a package which can be converted into a convenient desalting stand – the PD-10 Desalting Workmate.

**Table 1.** PD-10 Desalting column characteristics.

Matrix	Sephadex G-25 Medium
Particle size range	85–260 $\mu\text{m}$
Bed volume:	8.3 ml
Bed height:	5 cm
Rec. sample volume	2.5 ml
Exclusion limit	$M_r 5000$
Chemical stability	All commonly used buffers
Working pH range	2–13
Storage temperature	+4 to +30°C
Supplied in	Distilled water containing 0.15% Kathon™ CG/ICP Biocide

### PD-10 Desalting Workmate and LabMate Buffer Reservoir

PD-10 Desalting Workmate is designed to fulfil the needs of a column stand for PD-10 Desalting columns. The packaging has been used to construct a simple stand with a plastic tray. The plastic tray is used for collecting waste liquid and holding tubes. If tubes with diameters less than that of the tray holes are used, cover the holes with tape and cut new holes to size. To simplify the use of PD-10 columns, use LabMate™ Buffer Reservoirs (Code No. 18-3216-03).



1. Cut off bottom cap, remove top cap and pour off excess liquid.
2. If available mount the LabMate Buffer Reservoir on top of the PD-10 column and place the columns in the PD-10 Desalting Workmate.
3. Equilibrate the column with approximately 25 ml elution buffer. Discard the flow-through (you can use the plastic tray to collect the flow-through)
4. Add sample of a total volume of 2.5 ml. If the sample is less than 2.5 ml, then add buffer until the total volume of 2.5 ml is achieved. Discard the flow-through.
5. Elute with 3.5 ml buffer and collect the flow-through. A typical chromatogram is showed in Figure 1.

### **Operation**

A typical chromatogram obtained is shown in Figure 1.

### **Yield and purity**

Using the method described in the sub-section "Operation", protein yield is typically greater than 95% with less than 4% salt (low molecular weight) contamination.

Note that the dilution factor is only 1.4.

**Note** Small air bubbles along the plastic wall of the column and on the bottom filter may occur. This does not affect the performance of the column.

## ANNEXE VII

<b>Facultat de Medicina i Ciències de la Salut</b>	<b>Revisió: 0</b>
<b>Unitat de Recerca de Lípids (URL)</b>	<b>Data: 10/07/04</b>
<b>Liofilitzador</b>	<b>Pàg. 1 de 4</b>

Freeze Dryer ALPHA 1-4

Codi inventari URV: 012395

### **Fabricant:**

Martin Christ

### **Funcions:**

Liofilitzar mostres a temperatura i pressió controlades.

### **Instal·lació:**

Cal connectar-lo al corrent elèctric i a una bomba de buit.

### **Instruccions d'ús:**

Manual d'accessoris que es troba en la carpeta Manuals d'Aparells.

<http://www.martinchrist.de>.

#### 1. Per posar en marxa

- 1.2 Encendre l'aparell amb el botó situat darrera l'aparell, en la part inferior esquerra (veure Annex).
- 1.3 Posar la tapa.
- 1.4 Encendre la bomba de buit. Deixar funcionant una bona estona perquè s'escalfi i faci millor el buit. Tancar la vàlvula d'entrada-sortida d'aire perquè no es formin gasos (veure Annex).
- 1.5 Prèmer el botó *KM1/RM1* del panell frontal de control. Esperar que la temperatura baixi fins uns  $-29^{\circ}\text{C}$  (panell de control *Temperature*  $^{\circ}\text{C}$ ). La temperatura tarda un parell d'hores fins arribar als  $-29^{\circ}\text{C}$ .
- 1.5 Fer forats al tub o *ependorf* que contingui la mostra (prèviament congelada a  $-70^{\circ}\text{C}$ ). Tapar el tub que contingui la mostra amb parafilm, fer-hi foradets perquè es pugui evaporar l'aigua. Si la mostra està en un tub *ependorf*, fer uns foradets al tap.
- 1.6 Col·locar les mostres en un suport dins l'aparell.



1.7 Tapar l'aparell. Assegurar-se que la clau de sortida de l'aire, situada darrera del liofilitzador, està tancada (veure Annex).

1.8 Per fer el buit dins el liofilitzador, prémer el botó *Vak pompe/Vac pompe* i *MV Druck/ MV Pr.con* del panell frontal de control i fer pressió a la tapa perquè tanqui l'aparell. Pot costar bastant fer el buit i és necessari fer força a la tapa. Assegurar que l'aparell fa el buit mirant l'indicador *Vakuüm mbar* del panell de control (pressió de buit <1).

1.9 Deixar liofilitzar les mostres durant 24h o més segons sigui necessari.

## 2. Per desconnectar l'aparell

2.5 Desfer el buit, girant lentament la clau de sortida d'aire del liofilitzador.

2.6 Obrir la tapa i treure les mostres.

2.7 Apagar l'aparell i la bomba del buit.

2.8 Si queden restes d'aigua dins el liofilitzador, eixugar amb paper absorbent suau.

## **Instruccions d'ús abreujades**

### 1. Encesa del liofilitzador

1.1 Encendre l'aparell prement el botó *ON/OFF*.

1.2 Connectar la bomba de buit, amb la clau de sortida d'aire tancada.

1.3 Prémer el botó *KM1/RM1* perquè baixi la temperatura del liofilitzador.

1.4 Quan la temperatura sigui de -29°C, col·locar les mostres i posar la tapa.

1.5 Prémer el botó *Vak pompe/Vac pompe* i *MV Druck/ MV Pr.con* perquè l'aparell faci el buit.

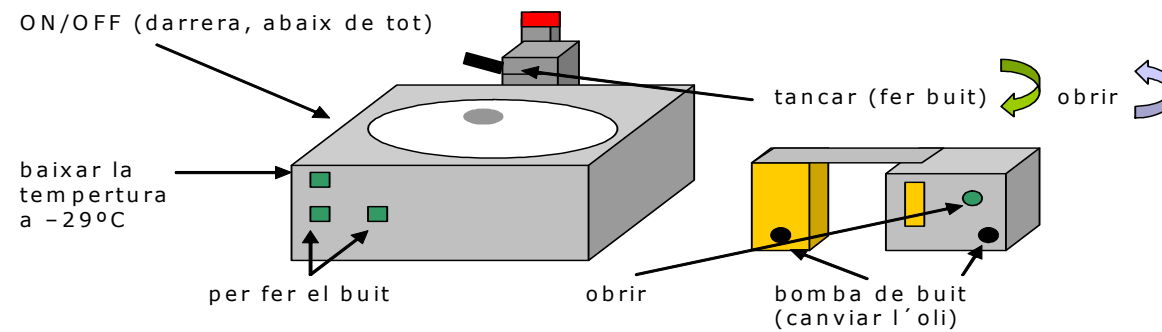
### 2. Desconnexió de l'aparell

2.1 Desfer el buit girant la clau de sortida de l'aire del liofilitzador.

2.2 Treure les mostres i apagar l'aparell i la bomba de buit.

## **ANNEX**

Fig.1. Imatge i esquema del liofilitzador.



## **Annex Bomba de buit**

Model: RZ-2

Fabricant: Vacuubrand

Instal·lació: connectar al corrent elèctric.

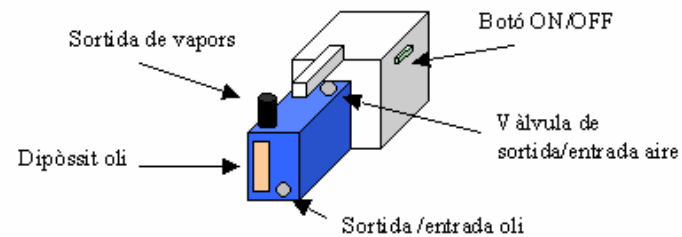
Instruccions d'ús: existeix un manual d'usuari proporcionat per la casa comercial que es troba en la carpeta Manuals d'Aparells.

[http:// www.vacuubrand.de](http://www.vacuubrand.de)

Breus instruccions d'ús:

1. Per posar en marxa
  - 1.1 Prèmer el botó ON/OFF situat al costat dret de l'aparell.
2. Per apagar l'aparell
  - 2.1 Prèmer el botó ON/OFF.

Fig.1. Esquema i imatge de l'aparell.



Manteniment Intern: per canviar l'oli, seguir les indicacions del manual d'usuari (Vaccumbrad, ref. 687010).

## ANNEXE VIII

<b>Facultat de Medicina i Ciències de la Salut</b>	<b>Revisió: 0</b>
<b>Unitat de Recerca de Lípids (URL)</b>	<b>Data: 10/07/04</b>
<b>DESLIPIDACIÓ D´HDL</b>	<b>Pàg. 1 de 2</b>

### 1. Fonament i objectiu de la prova

El procés de deslipidació permet eliminar els lípids de les partícules de lipoproteïnes i obtenir les apoproteïnes per posteriors determinacions, evitant-se així interferències. Per deslipidar lipoproteïnes es fan servir dissolvents polars com ara barreges d´alcohols i/o cloroform.

En el cas de les HDL un primer procés de liofilització afavoreix la seva posterior deslipidació. D´aquesta manera s´obté un precipitat amb les apoproteïnes característiques de les HDL lliures del component lipídic.

### 2. Espècimen

Fracció lipoproteica HDL aïllada per ultracentrifugació seqüencial.

### 3. Reactius i materials

#### 3.1. Solucions de deslipidació

- metanol (Carlo Erba, ref. 412383 / Merck, ref. 1.06007.2500)
- cloroform (Carlo Erba, ref. 438601)
- àcid nítric (HNO<sub>3</sub> 60%, Panreac, ref. 131036)

#### 3.2. Material

- tubs de vidre de 8 ml (Sarstedt, ref. 55.467)
- parafilm (Parafilm®, ref. PM-996)
- pipetes Pasteur de vidre (Normax, ref. 5426015)
- pipetes calibrades de vidre de diferents volums

### 4. Instrumentació

- campana d´extraccions (F+, Vallés)
- evaporador de N<sub>2</sub> (g) (Liebisch)
- font de llum directa
- vòrtex (D-051, Dinko)
- pipetus automàtic (Bibbyjet, Bibby)
- dispensador de volums (Dispensette, Brand, ref. 4700140, ref. 4700130)
- centrífuga (H-103R S, Kokusan)

## 5. Procediment

### 5.1 Preparació de les mostres

- 5.1.1 Les HDL desalades es guarden a  $-70^{\circ}\text{C}$ , en tubs de vidre de 10 ml, sense tap i tapades amb parafilm. En cas de mostres per anàlisi posteriorment en un GC/MS, es mesura la proteïna total de les HDL dialitzades pel mètode de *Bradford* (veure PNT *Bradford*) per liofilitzar-ne 800  $\mu\text{g}$ . En aquest cas, el volum corresponent s'afegeix a tubs de vidre de 10 ml prèviament rentats amb àcid nítric-aigua.
- 5.1.2 Quan les mostres estiguin congelades, es treuen els tubs i es fan un parell forats al parafilm amb ajut d'una agulla. Posar al liofilitzador durant unes 24 hores (veure PNT liofilitzador). Si les mostres no s'han liofilitzat bé, tornar a resuspendre-les amb aprox. 1 ml de PBS, congelar a  $-70^{\circ}\text{C}$  i tornar a liofilitzar més temps.

### 5.2 Deslipidació d' HDL amb cloroform:metanol

- 5.2.1 Afegir a les mostres liofilitzades 2 ml de cloroform:metanol (3:1). Mirar que el precipitat es desfaci bé i que no es quedi per les parets del tub. El cloroform:metanol (3:1) es guarda a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- 5.2.2 Agitar amb vòrtex i deixar 1 h a  $4^{\circ}\text{C}$ . Millor si es barreja de tant en tant.
- 5.2.3 Afegir 5 ml de metanol, agitar amb vòrtex i deixar 30 minuts a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- 5.2.4 Centrifugar les mostres amb *brake off* a 2.500 rpm, 10 minuts,  $4^{\circ}\text{C}$ .
- 5.2.5 Treure el sobrenadant, amb compte de no agafar restes del precipitat flotant, amb una pipeta Pasteur de vidre. Mirar a contrallum d'una font de llum directa. Treure el màxim de sobrenadant possible sense arrossegar gaire precipitat (no cal treure 'l tot). Tenir en compte que en alguns casos el precipitat pot ser molt inestable.
- 5.2.6 Assecar els tubs sota una campana d'extraccions amb  $\text{N}_2$  (g) per eliminar del tot les restes de dissolvents (veure PNT Evaporació amb nitrogen gas).
- 5.2.7 Tapar els tubs i guardar-los amb parafilm a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## 6. Bibliografia

Bloor WR. A method for the determination of fat in small amounts of blood. J Biol Chem. 1914.17;377.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem. 1957.226;497-509.

Segrest, JP, Albers JJ. Methods in Enzymology. Academic Press, Inc. 1986. Vol 128.

<http://www.cyberlipid.org/extract/extr0002.htm#>

## ANNEXE IX

<b>Facultat de Medicina i Ciències de la Salut</b>	<b>Revisió: 0</b>
<b>Unitat de Recerca de Lípids (URL)</b>	<b>Data: 10/07/04</b>
<b>AÏLLAMENT DE L' APOPROTEÏNA A-I i A-II PER ELECTROFORESI DESNATURALITZANT SDS-PAGE AMB GELS NuPAGE®</b>	<b>Pàg. 1 de 4</b>

### 1. Fonament i objectiu de la prova

La separació de proteïnes en electroforesis SDS-PAGE es basa en l'acció del SDS sobre aquestes proteïnes. El SDS és un detergent que desnaturalitza les proteïnes, unint-se a elles i conferint-ne una càrrega negativa homogènia. Segons els requisits, també s'hi pot afegir 2- $\beta$ -mercaptoetanol o ditiotreitòl per reduir els ponts disulfur. Les proteïnes tractades es desplacen per un gel al aplicar-hi un camp elèctric i es separen segons el seu pes molecular. Finalment, poden ser visualitzades al tenyir-se amb colorants que s'uneixen a proteïnes.

Per separar específicament l'apoA-I i A-II de la resta d'apoproteïnes característiques de l'HDL es fa servir aquest mètode d'electroforesi. Així es poden obtenir de forma ràpida y sencilla les apoproteïnes desitjades al ser separades segons el seu pes molecular.

### 2. Espècimen

Fracció lipoproteica HDL aïllada per ultracentrifugació seqüencial, un cop desalades i deslipidades.

### 3. Reactius i materials

#### 3.1. Solucions

- ApoA-I (Sigma-Aldrich, ref. A-0722)
- ApoA-II (Sigma-Aldrich, ref. A-0972)
- Marcador de pes molecular de proteïnes (Bio-Rad Laboratories, ref. 161-0304)
- Tris o trizma (Sigma-Aldrich, ref. T-1503)
- Glicerol (Sigma-Aldrich, ref. G-5516)
- SDS o lauril sulfat (Sigma-Aldrich, ref. L-3771)
- Bromofenol Blue (BioRad Laboratories, ref. 161-0404)
- SDS Running Buffer (NuPAGE®, Invitrogen, MES X 20, ref. NP0002)
- aigua destil·lada

#### 3.2. Material

- gel
- pipetes Pasteur de vidre (Normax, ref. 5426015)
- pipetes automàtiques per dispensar diferents volums (Eppendorf Research, Eppendorf)
- puntes de pipeta (Eppendorf)
- eppendorfs de 1.5 ml (Sarstedt)
- tubs de vidre de 10 ml
- gels NuPAGE 10% (NuPAGE® Bis-Tris Gel, Invitrogen, ref. NP0302)
- solució colorant per tenyir proteïnes (GelCode Blue Stain Reagent, Pierce, ref. 24592)

#### 4. Instrumentació

- tanc d'electroforesi (XCell SureLock™ Mini-Cell, Invitrogen)
- font d'electroforesi (Electrophoretic Power Supply EPS3500, AmershamPharmaciaBiotech)
- bany d'aigua (Heater Unitronic 320 OR, Selecta)
- centrífuga (H-103R S, Kokusan)
- centrífuga (EBA 12R, Hettich Zentrifugen)
- balança electrònica (FX-400, AND Electronic Balance)

#### 5. Procediment

##### 5.1 Preparació de les mostres

5.1.1 Col·locar les mostres HDL deslipidades en gel. És important tenir en compte la gran labilitat de les proteïnes i evitar al màxim la seva possible degradació.

5.1.2 Afegir-hi 100 µl de Sample Buffer i agitar una mica el tub. Per poder aïllar el dímer d'apoA-II es treballa en condicions no reductores, sense β-mercaptoetanol. Assegurar-se que el precipitat estigui ben resuspès i sempre en contacte amb gel. Fer alíqüotes de 500µl i guardar-les a -20°C.

SAMPLE BUFFER 8 ml total		
Tris-HCl 0.5M (pH 6.8)	1 ml →	Tris-HCl 62.5 mM
Glicerol	800 µl →	Glicerol 10%
SDS 10%	1.6 ml →	SDS 2%
<i>Bromofenol Blue</i>	poquíssim (cop espàtula)	
H2O des.	fins a 8 ml	

5.1.3 Escalfar les mostres en un bany d'aigua a 95°C, 5 minuts. Destapar una mica els tubs, sempre ben identificats. Tenir en compte que el vapor pot esborrar el permanent.

5.1.4 Col·locar immediatament les mostres en gel i donar als tubs un cop de centrífuga a 4°C.

5.1.5 Recollir les mostres dissoltes en el Sample Buffer amb una pipeta Pasteur de vidre i trasferir-les a eppendorfs de 0.5 µl correctament identificats. A partir de que la mostra està desnaturalitzada no cal treballar en gel.

5.1.6 Les mostres es guarden a 4°C. Les mostres també es conserven bé a temperatura ambient o bé emmagatzemades a -20°C.

## 5.2 Preparació dels gels i condicions de l'electroforesi

- 5.2.1 Preparar els gels i montar-los en el tanc d'electroforesi (veure Annex). Treure els gels NuPAGE de l'interior de les bosses de plàstic i rentar-los amb aigua destil·lada. Treure amb compte les pintes i rentar també els pous amb aigua destil·lada. Treure la cinta adhesiva de la part inferior dels gels perquè hi pugui passar el corrent.
- 5.2.2 Preparar el SDS Running Buffer i omplir el tanc per la part exterior i interior. Preparar 400 ml totals de MES x1. Omplir primer el tanc interior entre els dos gels (fins que quedin coberts els pous) i després l'exterior (fins que quedi cobert l'elèctrode).
- 5.2.3 Carregar les mostres en els gels. Calcular el volum de mostra a carregar. En cas de mostres a analitzar posteriorment en un GC/MS, carregar 100 µg de proteïna total per mostra i pou (12.5 µl). En cas que no es conegui la banda de proteïna d'interès, fer servir una marcador de pes molecular conegut com a referència. Apuntar quin és l'ordre de càrrega de les mostres respecte a la numeració dels pous (1 a 12).
- 5.2.4 Posar la tapa al tanc d'electroforesi i connectar-lo a la font d'electroforesi Pharmacia (veure PNT Fonts d'electroforesis). Anar amb compte de col·locar els gels i els elèctrodes en la posició correcta segons la seva polaritat.
- 5.2.5 Programar la font a 80V, 80 mA, 8W (X2 gels) i deixar córrer l'electroforesi durant 3h 30 min. Vigilar en tot moment les condicions de carrera, la compactació de les bandes, etc perquè la electroforesi es desenvolupi adequadament i les proteïnes es separin bé. Per córrer un gel programar a 80V, 43 mA, 3W. Tot i així, el mA i els W es poden variar si el V no arriba a 80.
- 5.2.6 Un cop acabada la carrera, desmontar els gels del tanc d'electroforesi i treure els gels. Es trenca el suport de plàstic dels gels fent palanca per tots els cantons amb una pala.
- 5.2.7 Hidratar els gels durant 20 minuts amb H<sub>2</sub>O destil·lada. Els gels es poden rentar més temps si és necessari (un màxim de 30 minuts).
- 5.2.8 Tenyir els gels durant 1h amb el colorant per proteïnes. És millor si abans de fer-lo servir es deixa el *Code Blue Stain Reagent* a temperatura ambient durant una estona. Afegir-hi uns 80 ml per cada 2 gels. Els gels es poden tenyir més temps si és necessari (un màxim de O/N).
- 5.2.9 Deixar destenyir els gels un parell de dies amb H<sub>2</sub>O destil·lada (anar canviant freqüentment) fins que es vegin bé les bandes d'apoA-I i A-II (veure Annex).

## 6. Bibliografia

Ausubel FM et al. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, Inc.1994. Vol.2.

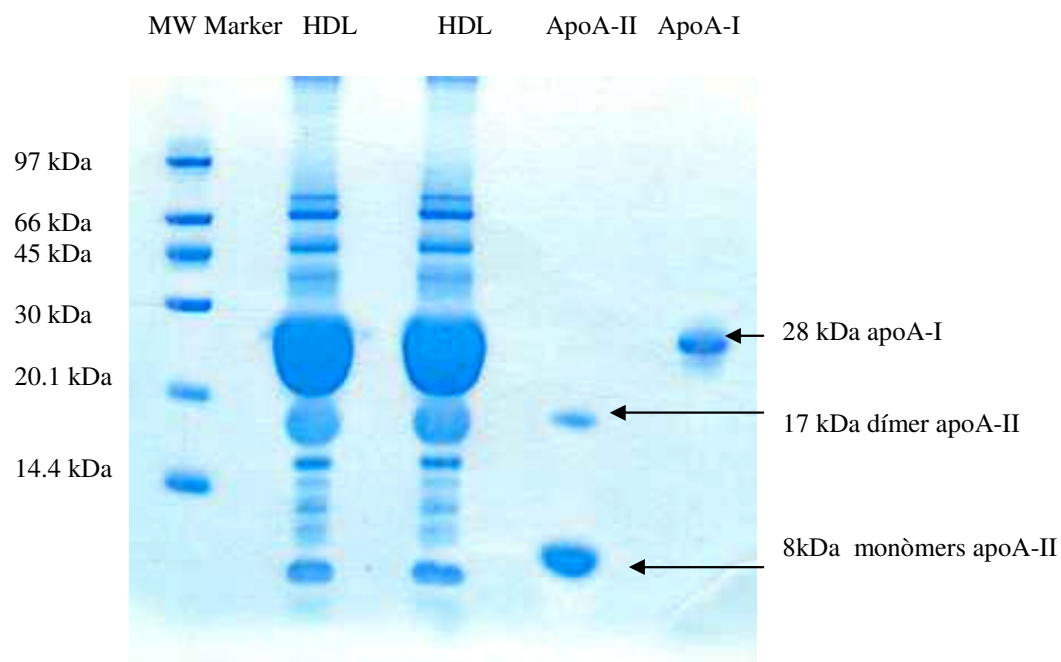
Segrest JP, Albers JJ. Methods in Enzymology. Academic Press, Inc. 1986. Vol 128.

<http://www.invitrogen.com>



**ANNEX**

Figure 1. Gel NuPAGE® tenyit amb Code Blue Stain Reagent: separació d'apoA-I i A-II.



QUICK  
REFERENCE  
CARD

**NuPAGE® Novex Bis-Tris Gels**

Instructions are provided below for electrophoresis of NuPAGE® Novex Bis-Tris Gels using the XCell SureLock™ Mini-Cell. For detailed instructions, refer to the NuPAGE® Technical Guide available at [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com) or contact Technical Service.

Prepare Samples	Reagent	Reduced Sample	Non-reduced Sample
	Sample	x µl	x µl
	NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)	2.5 µl	2.5 µl
	NuPAGE® Reducing Agent (10X)	1 µl	--
	Deionized Water	to 6.5 µl	to 7.5 µl
	Total Volume	10 µl	10 µl

Heat samples at 70°C for 10 minutes.

**Prepare 1X Running Buffer** Prepare 1X SDS Running Buffer by adding 50 ml 20X NuPAGE® MES or MOPS SDS Running Buffer to 950 ml of deionized water.

**Load Sample** Load the appropriate concentration of your protein sample on the gel.

**Load Buffer** Fill the Upper Buffer Chamber with 200 ml 1X NuPAGE® SDS Running Buffer. For reduced samples, use 200 ml 1X NuPAGE® SDS Running Buffer containing 500 µl NuPAGE® Antioxidant. Fill the Lower Buffer Chamber with 600 ml 1X NuPAGE® SDS Running Buffer.

**Run Conditions** Voltage: 200 V constant  
 Run Time: 35 minutes (MES Buffer), 50 minutes (MOPS Buffer)  
 Expected Current: 100-125 mA/gel (start); 60-80 mA/gel (end)

1600 Faraday Avenue • Carlsbad • CA 92008  
 Toll Free: 800 955 6288 • F: 760 602 6500  
[tech\\_service@Invitrogen.com](mailto:tech_service@Invitrogen.com)



Contact Information for Other Countries:  
 See our website [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)

## ANNEXE X

<b>Facultat de Medicina i Ciències de la Salut</b>	<b>Revisió: 0</b>
<b>Unitat de Recerca de Lípids (URL)</b>	<b>Data: 10/07/04</b>
<b>HIDRÒLISI ÀCIDA DE PROTEÏNES</b>	<b>Pàg. 1 de 3</b>

### 1. Fonament i objectiu de la prova

La hidròlisi àcida mitjançant HCl de proteïnes és el primer pas per la obtenció de cadascun del seus aminoàcids característics per la posterior determinació i/o anàlisi d'aquests per tot un seguit de tècniques, com ara l'espectrofotometria de masses.

### 2. Espècimen

Tot tipus de proteïnes, com ara l'apo B-100 (obtinguda a partir de les fraccions lipoproteiques VLDL, IDL i LDL) i/o l'apoA-I i A-II (obtingudes a partir de la fracció lipoproteica HDL).

### 3. Reactius i materials

#### 3.1. Solucions

- HCl 37% (Merck, ref. 100317.1000)
- àcid nítric HNO<sub>3</sub> 60% (Panreac, ref. 131036)
- etanol (Panreac, ref.121086)
- aigua bidestil·lada

#### 3.2. Material

- pipetes calibrades de vidre
- pipetes Pasteur de vidre (Normax, ref. 5426015)
- tubs de vidre (Schott Duran®, n° ref. 26 135 11 55)
- tubs de vidre de 10 ml
- bisturí
- pinces

### 4. Instrumentació

- campana d'extraccions (F+, Vallés)
- vòrtex (D-051, Dinko)
- pipetus automàtic (Bibbyjet, Bibby)
- dispensador de volums (Dispensette, Brand, ref. 4700140, ref. 4700130)
- bloc de temperatura (Multiplaces, Selecta)
- termòmetre
- transil·luminador (UVT-20M/W, Herolab)

## 5. Procediment

### 5.1 Hidròlisi àcida de l'apo B-100

- 5.1.1 Afegir 1 ml d'HCl 6N als precipitats de les mostres. En cas de mostres analitzades posteriorment en un GC/MS, preparar la dilució 1/2 d'àcid en una ampolla rentada amb àcid nítric- aigua, aigua i aigua destil·lada. Per fer la dilució fer servir aigua bidestil·lada fresca del dia. Rentar un parell de pipetes de vidre de 5-10 ml amb àcid nítric- aigua per dispensar el volum d'àcid.
- 5.1.2 Tapar bé els tubs i agitar amb vòrtex.
- 5.1.3 Deixar les mostres 24h en un bloc a 110°C. Encendre el bloc una estona abans per que arribi a 110°C, controlant la temperatura amb un termòmetre. Treballar sempre a la campana d'extraccions. Vigilar que els tubs estiguin ben tapats, sense cap cop o esberla que faci que es puguin trencar al moment de posar-los al bloc.
- 5.1.4 Les mostres queden llestes per ser evaporades. Les mostres es poden guardar a 4°C.

### 5.2 Hidròlisi àcida de l'apoA-I i l'apoA-II

- 5.2.1 En un transil·luminador, tallar les bandes dels gels corresponents a l'apoA-I i l'apoA-II per cada mostra (veure PNT aïllament d'apoA-I i A-II per electroforesi desnaturalitzant SDS-PAGE) i col·locar-les en tubs Schott. En cas de mostres a analitzar posteriorment en un GC/MS, rentar prèviament els tubs amb àcid nítric-aigua, aigua, aigua destil·lada i deixar-los assecar. Rentar també la superfície del transil·luminador, bisturí i pinces amb etanol. Utilitzar guants de làtex i netejar-los també amb etanol.
- 5.2.2 Afegir 1 ml de HCl 6N a les mostres i tapar bé els tubs. En cas de mostres a analitzar posteriorment en un GC/MS, preparar la dilució 1/2 d'àcid en una ampolla rentada amb àcid nítric-aigua, aigua i aigua destil·lada. Per fer la dilució fer servir aigua bidestil·lada fresca del dia. Rentar un parell de pipetes de vidre de 5-10 ml amb àcid nítric-aigua per dispensar el volum d'àcid. Comprovar que les bandes queden al fons del tub, ben cobertes per l'àcid.
- 5.2.3 Deixar les mostres 24h en un bloc a 110°C. Encendre el bloc una estona abans per què arribi a 110°C, controlant la temperatura amb un termòmetre. Treballar sempre a la campana d'extraccions. Vigilar que els tubs estiguin ben tapats, sense cap cop o esberla que faci que es puguin trencar al moment de posar-los al bloc.
- 5.2.4 Col·locar les mostres en un rac i deixar-les 20 minuts a -20°C.
- 5.2.5 Centrifugar amb brake off a 3.000 rpm, 5 minuts, 4°C.
- 5.2.6 Recollir el sobrenadant amb pipetes Pasteur de vidre i traspasa a tubs de vidre de 10 ml. Mirar a contrallum d'una font de llum directa. Treure el màxim de sobrenadant possible sense arrossegar gaire precipitat. Compte que en alguns casos el precipitat de poliactil·lamida pot ser inestable. En cas de mostres a analitzar posteriorment en un GC/MS, rentar prèviament els tubs amb àcid nítric-aigua, aigua, aigua destil·lada i deixar-los assecar.
- 5.2.7 Les mostres queden llestes per la purificació dels aminoàcids per bescanvi iònic. Les mostres es poden guardar a 4°C.

## **6. Bibliografia**

Ausubel FM. et al. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, Inc.1994. Vol.2.

Segrest JP, Albers JJ. Methods in Enzymology. Academic Press, Inc. 1986. Vol 182.

## ANNEXE XI

<b>Facultat de Medicina i Ciències de la Salut</b>	<b>Revisió: 0</b>
<b>Unitat de Recerca de Lípids (URL)</b>	<b>Data: 10/07/04</b>
<b>PURIFICACIÓ D' AMINOÀCIDS PER BESCANVI IÒNIC</b>	<b>Pàg. 1 de 5</b>

### 1. Fonament i objectiu de la prova

La cromatografia de bescanvi iònic és una tècnica que permet la separació de barreges de compostos al fer-los passar dissolts en una fase mòbil i interaccionar amb una fase estacionària. En la fase estacionària s'hi troben grups amb càrrega que interaccionen amb els diferents compostos a separar al presentar càrrega oposada.

Els aminoàcids obtinguts després de la precipitació de les proteïnes del plasma o bé a partir de gels de poliacrilamida es purifiquen per cromatografia de bescanvi iònic per evitar possibles interferències amb altres determinacions.

### 2. Espècimen

Aminoàcids obtinguts de la precipitació amb àcid triclor acètic (TCA) o hidrolitzats de proteïnes aïllades de gels de poliacrilamida, com el cas de l' apoA-I i l' apoA-II.

### 3. Reactius i materials

#### 3.1. Solucions

- HCl (Carlo Erba, ref. 403871)
- NH<sub>4</sub>OH 25% (Fluka, ref. 09860)
- HNO<sub>3</sub> 60% (Panreac, ref. 131036)
- aigua bidestil·lada

#### 3.2. Material

- xeringues de 20ml
- paper Whatman
- reïna AG®50W-X8 (BioRad, ref. 142-1441)
- paper de pH (Lyphan®)
- empty reservoir and frits (Varian, Inc, ref. 1213-1014)
- tubs de vidre de 10-15 ml
- tubs de plàstic 8 ml (Sarstedt, ref. 55.467)
- gots de precipitat de diferents volums
- pipetes Pasteur de plàstic (Sarstedt, ref. 86.1171)
- pipetes de vidre calibrades
- parafilm (Parafilm®, PM-996)
- espàtula
- iman

#### 4. Instrumentació

- pipetes automàtiques de diferents volums (Eppendorf Research, Eppendorf)
- puntes de pipeta (Eppendorf)
- Vac-Elut™ 20 manifold (Varian, Inc, ref. 1223-4103)
- Agitador magnètic (HC1202, Bibby)

#### 5. Procediment

##### 5.1 Preparació de la reïna de bescanvi iònic

- 5.1.1 Preparar el sistema de filtrat de la reïna (veure Annex). Agafar 2 xeringues de 20ml per filtrar la reïna. Tallar per cada xeringa 7 cercles de 2 cm de diàmetre de paper Whatman per què facin de filtre. Col·locar-los un per un amb compte amb ajut de l'èmbol.
- 5.1.2 Afegir en un got de precipitat la reïna i hidratar-la una mica amb aigua bidestil·lada. Utilitzar 2 ml de reïna per columna. Fer servir aigua bidestil·lada fresca del dia.
- 5.1.3 Remenar-ho tot bé amb una pipeta Pasteur de plàstic fins obtenir una pasta homogènia i abocar-ho a les xeringues.
- 5.1.4 Rentar la reïna per filtrat.
  - 5.1.4.1 Col·locar les xeringues en el VacElut (veure PNT VacElut). Recollir l'aigua filtrada de la reïna en un tub de plàstic de 8-10 ml. Mantenir el buit fins que la reïna quedi eixuta del tot.
  - 5.1.4.2 Desconnectar el Vac Elut (veure PNT VacElut). Quan s'hagi filtrat tota l'aigua de la reïna, desfer el buit amb compte.
  - 5.1.4.3 Mesurar el pH de l'aigua filtrada de la reïna. Tornar a hidratar la reïna i repetir els rentats (pas 5.1.4) tantes vegades com faci falta fins que el pH sigui neutre.
- 5.1.5 Treure la reïna deshidratada de les xeringues amb ajut d'una espàtula. Intentar recuperar el màxim de reïna possible.
- 5.1.6 Tornar-la al got de precipitat i hidratar-la de nou amb una mica d'aigua.

##### 5.2 Preparació de les columnes de bescanvi iònic

- 5.2.1 Col·locar un filtre en cada columna. Ajudar-se d'una vareta de vidre.
- 5.2.2 Agitar la reïna hidratada amb un iman i deixar-ho remenar una estona fins tenir una barreja homogènia.
- 5.2.3 Preparar les columnes, afegint-hi 2 ml de reïna (veure Annex). La reïna queda a uns 2 cm d'altura de la xeringa. Afegir un altre filtre i compactar-ho tot amb ajuda d'una vareta de vidre. Afegir a les columnes aigua bidestil·lada. Deixar gotejar l'aigua i anar-hi afegint per què no s'assequi la reïna.

5.2.4 Equilibrar el pH de les columnes amb HCl 1N. Preparar una dilució 1/12 de HCl, afegir-hi 2 ml a cada columna i mirar que el pH=1. Rentar les columnes amb aigua destil·lada tantes vegades com sigui necessari fins que el pH torni a ser neutre.

5.2.5 Guardar les columnes a temperatura ambient, tapades amb parafilm per la part inferior i superior fins que es facin servir. Millor preparar-les d' un dia per l' altre. Descartar pel seu ús les columnes que gotegin molt a poc a poc o no gens.

### 5.3 Purificació d' aminoàcids per bescanvi iònic

5.3.1 Acondicionar les columnes de bescanvi iònic. Preparar les columnes en un rac, treure el tap i deixar eluir l' aigua destil·lada. Descartar les que no elueixin bé.

5.3.2 Afegir a les columnes els aminoàcids recollits en solució.

5.3.3 Quan ja no s' elueixi res, rentar les columnes x3 amb aigua destil·lada.

5.3.4 Eluir els aminoàcids units a la columna. Afegir 3 ml de NH<sub>4</sub>OH 4M a les columnes i deixar eluir, recollir en tubs de vidre. En cas de mostres a analitzar posteriorment en un GC/MS, rentar prèviament els tubs amb àcid nítric -aigua, aigua, aigua destil·lada i deixar-los assecar. Preparar en el moment de fer servir el NH<sub>4</sub>OH en una ampolla rentada amb àcid nítric- aigua. Rentar amb àcid nítric- aigua un parell de pipetes de vidre de 5-10 ml. Per preparar la dilució 1/1.625 d' NH<sub>4</sub>OH fer servir aigua bidestil·lada fresca del dia. Anar amb compte amb mostres dissoltes en àcids forts (l' àcid pot reaccionar amb la reïna i fer que aquesta perdi la seva estructura).

5.3.5 Col·locar les columnes al sistema de buit VacElut per eluir les restes de aminoàcids. Posar dins el sistema de buit els tubs de vidre de 10 ml, on s' acaben de recollir les restes d' aminoàcids de les columnes. Quan s' hagi eluït tot el volum, fer el buit i esperar a què la reïna quedi ben eixuta (veure PNT VacElut). La reïna es pot reutilitzar fins a 3 vegades (es pot guardar durant períodes llargs una mica hidratada amb etanol o antibacterià). Les columnes i els filtres també es reutilitzen.

5.3.6 Guardar les mostres a 4°C.

## 6. Bibliografia

Ausubel FM et al. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, Inc.1994. Vol.2.

Segrest JP, Albers JJ. Methods in Enzymology. Academic Press, Inc. 1986. Vol 128.

[www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)

[http://www.ls.huji.ac.il/~purification/PDF/IonExchange/AMERSHAM\\_ion\\_exchangeManual.pdf](http://www.ls.huji.ac.il/~purification/PDF/IonExchange/AMERSHAM_ion_exchangeManual.pdf)

## ANNEX

### AG<sup>®</sup> 50W and AG MP-50 Cation Exchange Resins

#### Instruction Manual



Table 2. Summary of the Properties of AG 50  
and AG MP 50 Resins

Active Group (X8 Resin)	Thermal Stability	Solvent Stability	Resistance to Oxidizing Agents	Resistance to Reducing
R-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Good to 150 °C	Very good	Slowly oxidizes in hot 15% HNO <sub>3</sub>	Very good

#### Section 5 Instructions for Use

### 5.2 Column Method

The column method involves pouring a column with the resin and passing the sample through to achieve the separation. Particle size will determine the flow rate, which will affect the separation. The resin should be in the correct ionic form and equilibrated prior to adding the sample.

1. Calculate the amount of resin required based on the expected resin capacity and sample concentration. If the sample ionic concentration is unknown, begin with 5 grams of resin for 100 ml of sample, and then optimize the volumes after obtaining the results.
2. Insure that the resin is in the ionic form which will allow the sample ions to be exchanged onto the resin. If conversion of the resin into another ionic form is necessary, use the guidelines described above for resin conversion (see Table 5).
3. Prepare the initial buffer, so that the pH and ionic concentration will allow the sample ions to be exchanged onto the column. For unknown solutions, use deionized water.



4. Slurry and pour the resin into the column. Equilibrate the resin in the initial buffer using 3 bed volumes of buffer. Poorly equilibrated resin will not give reproducible results. Alternatively, equilibration can be done by the batch technique, prior to pouring the column. First, convert the resin to the appropriate form, then suspend it in the starting buffer. Check the pH with a pH meter while stirring continuously. Adjust the pH by adding acid or base dropwise to the buffer until the desired pH is obtained. Then transfer the resin to the column, and pass 1 bed volume of the starting buffer through the column.
5. Add the initial buffer and allow excess buffer to pass through the column, leaving enough buffer to just cover the top of the resin bed.
6. Apply the sample dropwise to the top of the column without disturbing the resin bed. Drain the sample into the top of the bed and apply several small portions of starting eluant, being very careful to rinse down the sides of the column and to avoid stirring up the bed. Drain each portion to the level of the resin bed before the next portion is added. Never allow the liquid level to drain below the top of the resin bed.
7. The actual flow rate that is used will depend upon the application, the resin, and the column cross section. To obtain flow rates for any given size column, multiply the suggested flow rates in Table 6 by the column cross-sectional area. Table 6 gives typical flow rates of analytical grade resins.
8. If a cation-free solution is the goal, collect the effluent. If the concentrated cations are of interest, allow all of the sample to pass through the column, then elute the metals with a solution containing a counterion of higher selectivity than the bound cation.

## ANNEXE XII

<b>Facultat de Medicina i Ciències de la Salut</b>	<b>Revisió: 0</b>
<b>Unitat de Recerca de Lípids (URL)</b>	<b>Data: 10/07/04</b>
<b>VacElut o sistema d'elució de col·lumnes per buit</b>	<b>Pàg. 1 de 2</b>

Vac-Elut 20 Manifold, Varian Inc

Codi inventari URV:

### **Fabricant:**

Varian Inc.

### **Funcions:**

Sistema per fer el buit aplicat a col·lumnes

### **Instal·lació:**

Connectar a una font de sortida-entrada d'aigua per fer el buit

### **Instruccions d'ús:**

Veure <http://www.varianinc.com>

#### 1. Per posar en marxa

1.1 Col·locar les col·lumnes en el Vac Elut.

1.1.1 Connectar la col·lumna a la connexió del manifold i fer el buit (veure Annex). Per fer el buit, obrir la clau de pas de l'aigua (3). Arribar a una pressió 5-10 (2). Girar la clau de la connexió a la xeringa per obrir-la.

#### 2. Per desconnectar l'aparell

2.1 Treure les col·lumnes del Vac Elut.

2.1.1 Desconnectar el Vac Elut (veure Annex) Tancar la clau de connexió del VacElut. Per desfer el buit, tancar la clau de pas de l'aigua (3) i aixecar la goma (1) que fa el buit al mateix temps.

**ANNEX**

Figura 1. Preparació de la reïna. Sistema de buit VacElut.

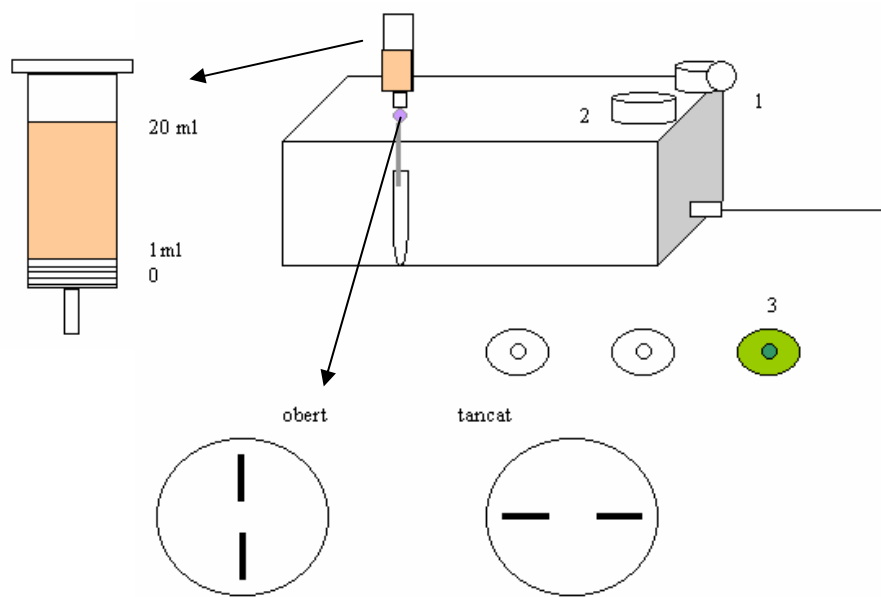
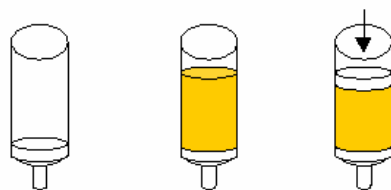


Figura 2. Preparació de les col·lumnes.



## ANNEXE XIII

<b>Facultat de Medicina i Ciències de la Salut</b>	<b>Revisió: 0</b>
<b>Unitat de Recerca de Lípids (URL)</b>	<b>Data: 10/07/04</b>
<b>OBTENCIÓ DELS AMINOÀCIDS DEL PLASMA O PLASMA METHOD</b>	<b>Pàg. 1 de 2</b>

### 1. Fonament i objectiu de la prova

Afegint determinats compostos a les solucions aquoses de proteïnes es pot aconseguir que les molècules d'aigua s'allunyin dels grups polars de les proteïnes, afavorint la seva precipitació. La utilització de TCA (àcid triclor acètic) permet la precipitació de les proteïnes i altres components del plasma per obtenir els aminoàcids que s'hi troben de forma lliure.

### 2. Espècimen

Plasma.

### 3. Reactius i materials

#### 3.1. Solucions

- TCA (Merck, ref. 1.00807.0100)
- aigua bidestil·lada

#### 3.2. Material

- tubs de plàstic de 5ml (Sarstedt, ref. 55.475.005)
- pipetes Pasteur de plàstic (Sarstedt, ref. 86.1171)
- pipetes automàtiques de diferents volums (Eppendorf Research, Eppendorf)
- puntes de pipeta (Eppendorf)

### 4. Instrumentació

- vòrtex (D-051, Dinko)
- centrífuga (H-103R S, Kokusan)

### 5. Procediment

#### 5.1 Desproteïnització de mostres de plasma

- 5.1.1 Afegir a 1 ml de plasma, 1 ml de TCA 10%. Descongelar les mostres de plasma una estona abans. Preparar les solucions de treball en al moment de fer-les servir.
- 5.1.2 Agitar amb vòrtex i deixar reposar 15-30 minuts a temperatura ambient.

5.1.3 Centrifugar a 3.000 rpm, 30min, 4°C.

5.1.4 Recollir el sobrenadant en tubs de plàstic. Les mostres es poden guardar a 4°C.

## **6. Bibliografia**

Segrest JP, Albers JJ. Methods in Enzymology. Academic Press, Inc. 1986. Vol 182.

## ANNEXE XIV

<b>Facultat de Medicina i Ciències de la Salut</b>	<b>Revisió: 0</b>
<b>Unitat de Recerca de Lípids (URL)</b>	<b>Data: 10/07/04</b>
<b>Evaporació al buit de mostres en solució</b>	<b>Pàg. 1 de 2</b>

### 1. Fonament i objectiu de la prova

Les centrífugues d'evaporació al buit són una manera ràpida i eficient d'eliminar els dissolvents de les mostres. Per la evaporació de mostres en solució són necessaris sistemes que incloguin bombes de buit eficaces, condensadors a molt baixes temperatures i trampes per àcids o bases per evitar que aquests solvents facin malbé el sistema.

### 2. Espècimen

Mostres en solució com ara hidrolitzats de proteïnes, com els aminoàcids obtinguts de l'apo B-100 resuspesos en àcid o de l'apoA-I i apoA-II resuspesos en bases.

### 3. Reactius i materials

#### 3.2. Material

- vials Chromacol (Supelco-Sigma, ref. 27333)
- taps (SnapCap, Supelco-Sigma, ref. 508357)
- pipetes Parteur de plàstic (Sarstedt, ref. 86.1171)

### 4. Instrumentació

- bomba de buit (RZ-2, Vacuubrand)
- filtre d'àcids i/o bases (Jouan)
- condensador (Jouan RCT 90)
- centrífuga evaporadora (Jouan RC 10.09)

### 5. Procediment

#### 5.1 Evaporació de mostres

5.1.1 Encendre el sistema d'evaporació (veure PNT Evaporador de buit).

5.1.2 Deixar les mostres a temperatura ambient durant una estona abans de col·locar-les al rotor de l'evaporador. Equilibrar els tubs entre si. Fer servir el rotor per a tubs de 10-15 ml. Si els tubs són massa estrets, només omplir la part interior del rotor.

5.1.3 Evaporar les mostres els temps necessari segons el seu volum.

**5.1.3.1 En cas de mostres analitzades posteriorment en un GC/MS, quan el volum dels tubs s' hagi evaporat fins uns 0.5 µl, trasbassar aquest volum a vials**

**Chromacol.** En cas de mostres a analitzar posteriorment en un GC/MS, els vials s' han de rotular amb el nom del pacient, fracció lipoproteica i número de vial (escriure en una llista a quina mostra correspon cada nº de vial, veure Annex). Guardar els tubs originals de vidre juntament amb les pipetes Pasteur fins que no s' acabi tot el procés (per si s' ha de recuperar mostra). Les mostres es poden guardar tapades a 4°C per continuar evaporant-se el dia següent si és necessari. Em cas que el volum s' evapori del tot abans de ser transferit al vials Chromacol, es pot tornar a resuspendre el precipitat amb la mateixa solució en la que estaven resuspesos.

**5.1.3 Continuar evaporar les mostres fins la seva evaporació total.** Posar les mostres en el rotor pels vials. Les mostres es poden guardar tapades a 4°C per continuar evaporant-se el dia següent si és necessari.

**5.1.4 Un cop evaporat tot el volum, tapar els vials i guardar-los a temperatura ambient.**

**5.1.5 Apagar el sistema de evaporació (veure PNT Evaporador de buit).**

## **6.- Bibliografia**

Segrest, J.P., Albers J.J. Methods in Enzymology. Academic Press, Inc. 1986. Vol 182.

## ANNEXE XV

<b>Facultat de Medicina i Ciències de la Salut</b>	<b>Revisió: 0</b>
<b>Unitat de Recerca de Lípids (URL)</b>	<b>Data: 17/02/06</b>
<b>Evaporador de buit</b>	<b>Pàg. 1 de 4</b>

Bomba de buit RZ-2 Vacuubrand  
Condensador Jouan RCT 90  
Evaporador de buit Jouan RC 10.09  
Campana d'extracció de gasos Valles F+

Codi inventari URV:

### **Fabricant:**

Jouan

### **Funcions:**

Evaporar mostres dissoltes en solucions àcides i/o bàsiques, com ara les solucions d'aminoàcids de l'apo B-100-100, apoAI i/o apoAII.

### **Instal·lació:**

Connectar el sistema al corrent elèctric.

### **Instruccions d'ús:**

Manuais d'instruccions proporcionats per la casa comercial que es troben en la carpeta Manuals d'Aparells.

<http://www.jouaninc.com>

#### 1. Per posar en marxa

- 1.1 Primer de tot, tancar la connexió (2) i deixar-la així durant tot el procés (veure Annex).
- 1.2 Encendre la bomba de buit i el condensador. Després, encendre la centrífuga i deixar que es vagi escalfant a 60°C.
- 1.3 Obrir la vàlvula de la bomba de buit per què entri aire (veure Annex). Deixar la bomba en funcionament una estona per eliminar vapors i netejar l'oli de possibles impureses
- 1.4 Encendre la campana d'extraccions. Per eliminar vapors.
- 1.5 Deixar en funcionament la bomba una bona estona fins que estigui molt calenta. Funcionant al màxim farà molt millor el buit .



- 1.6 Esperar que s'encengui el llum verd del condensador per què aquest funcioni al màxim. La temperatura de treball és d'uns  $-90^{\circ}\text{C}$ .
- 1.7 Tancar la vàlvula de la bomba de buit per què no entri més aire.
- 1.8 Col·locar les mostres balancejades al rotor.
- 1.9 Abaixar la tapa de la centrífuga i col·locar-la bé per què faci el buit.
- 1.10 Tancar la connexió (1) i comprovar que es fa correctament el buit.
- 1.11 Deixar rodar els tubs el temps necessari per què s'evapori el contingut.

## 2. Per desconnectar l'aparell

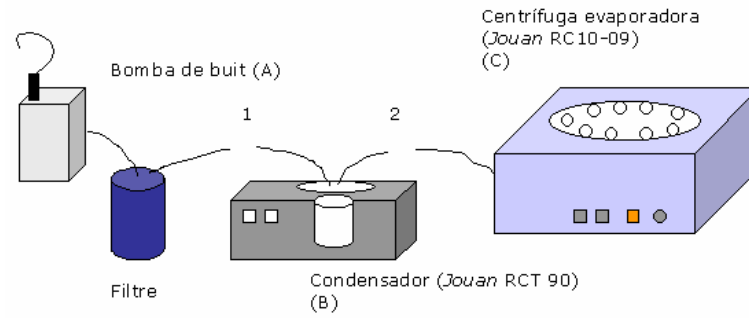
- 2.1 Per aturar la centrífuga, primer treure el buit desconnectant la connexió (1). Després, premer botó STOP de la centrífuga
- 2.2 Obrir la tapa i treure les mostres.
- 2.3 Apagar la bomba del buit, el condensador, l'evaporador i la campana d'extraccions.
- 2.4 Netejar tot el sistema.

## 3. Per netejar tot el sistema

- 3.1 Col·locar un parell de tubs de vidre plens d'aigua destil·lada en el rotor i deixar l'aparell funcionant durant 1h o més, segons el temps que s'hagi fet servir anteriorment. (veure passos 1 i 2)
- 3.2 Obrir la tapa i treure les mostres.
- 3.3 Un cop apagat tot, netejar els rotors que s'hagin fet servir amb aigua destil·lada i deixar assecar. Passar una mica d'etanol si queden restes de sals.
- 3.4 Buidar l'ampolla de vidre del condensador. Amb molt de compte, omplir-la amb aigua, netejar l'interior i tirar el contingut. Eixugar-la una mica i tornar-la a col·locar. Eixugar també la malla de coure.
- 3.5 Treure la peça on va ajustat el rotor amb una clau. Posar una mica d'oli a la part inferior de la peça.
- 3.6 Netejar amb metanol l'interior i exterior de l'evaporador.
- 3.7 Tornar a muntar-ho tot (veure manual d'instruccions).

## ANNEX: EVAPORADOR DE BUIT

Figura 1. Imatge i esquema del sistema d'evaporació per buit.



## **ANNEX BOMBA DE BUIT**

Model: RZ-2

Fabricant: Vacuubrand

Instal·lació: connectar al corrent elèctric.

Instruccions d'ús: manual d'instruccions proporcionat per la casa comercial.  
[www.vacuubrand.de](http://www.vacuubrand.de).

Breus instruccions d'ús:

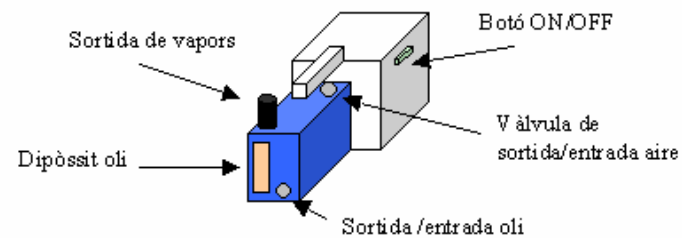
### 1 Per posar en marxa

1.1 Prémer el botó ON/OFF situat al costat dret de l'aparell.

### 2. Per apagar l'aparell

2.1 Prémer el botó ON/OFF.

Fig.1. Esquema i imatge de l'aparell.



Manteniment Intern: per canviar l'oli, seguir les indicacions del manual d'usuari (Vaccumbrad, ref. 687010).

## ANNEXE XVI

<b>Facultat de Medicina i Ciències de la Salut</b>	<b>Revisió: 0</b>
<b>Unitat de Recerca de Lípids (URL)</b>	<b>Data: 17/02/06</b>
<b>DETERMINACIÓ DE PROTEÏNES PEL MÈTODE DE LOWRY</b>	<b>Pàg. 1 de 6</b>

### 1. Fonament i objectiu de la prova

La determinació de proteïnes pel mètode de Lowry és efectiu per mostres solubles en aigua. La formació de color depèn principalment de la reducció del reactiu de *Folin-Ciocalteu* per proteïnes, unides al coure. La reacció de reducció es realitza en dos passos diferents. En el primer, la mostra de proteïna es barreja amb ions de coure en medi alcalí. En el segon pas, el reactiu de *Folin-Ciocalteu* (fosfomolibdat fosfotúngstic) és reduït per les proteïnes unides al coure.

### 2. Espècimen

Proteïnes totals d'una mostra (diferents fraccions lipoproteïques, extractes cel·lulars, precipitats de proteïna, etc).

### 3. Reactius i materials

#### 3.1. Solucions

- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Panreac, ref.131638)
- NaOH (Fluka, ref.71690)
- CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (Probus, ref. 2381)
- Folin Ciocalteu's phenol solution (Merck, ref.1090010100)
- NaK Tartrat (Panreac, ref. 131729)
- albúmina liofilitzada (Sigma, ref. P-7656)
- SDS o lauril sulfat (Sigma, ref. L-3771)
- aigua destil·lada

#### 3.2. Material

- tubs de plàstic de 5ml (Sarstedt, ref. 55.475)
- pipetes automàtiques per dispensar diferents volums (Eppendorf Research, Eppendorf)
- puntes de pipeta (Eppendorf)
- cubetes espectrofotòmetre 3 ml, 1cm pas de lum (Afora, ref.KA2940)

### 4. Instrumentació

- espectrofotòmetre (Kontron)
- vòrtex

## 5. Controls

La corba de calibració no cal que es faci sencera en cada determinació (està grabada en l'espectrofotòmetre Kontron). S'ha de comprovar afegint dos punts de la mateixa, que es llegeixen amb les mostres.

Com a control en mesures de lipoproteïnes es fa servir un *pool* de LDL. Es fan 10 determinacions per calcular la mitjana i la desviació estàndard. Es guarden alíquotes a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Aquest control es referencia amb la determinació d'apo B-100-100 per immunoturbidimetria en un autoanalitzador (Cobas-Mira). S'ha d'afegir un control en cada assaig.

Com a control en la resta de mesures es fa servir una solució d' albúmina sèrica bovina (BSA) de concentració coneguda.

## 6. Procediment

### 6.1 Per determinar proteïnes totals en fraccions lipoproteïques:

Preparar sempre mostres, blancs, controls i standars per duplicat com a mínim.

#### 6.1.1 Solucions de treball

- solució A (preparar al moment de fer servir): 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.1M NaOH (2g+0.4g/100ml)
- solució B: 1%  $\text{Cu SO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1g/100ml)
- solució C: 1 % NaK Tartrat (1 g/100ml)

**NOTA: protocol per cinètiques!** solució C: 2 % NaK Tartrat (2 g/100ml)

- solució alcalina de coure per lipoproteïnes: barrejar les solucions A, B, C en una proporció 100:1:1
- solució de Folin (preparar al moment de fer servir): barrejar el reactiu de Folin amb  $\text{H}_2\text{O}$  destil·lada en una proporció 1:1 (calcular la quantitat que es necessita segons el nombre de mostres)

#### 6.1.2 Preparació de la corba estàndard

Preparar una solució stock d' albúmina sèrica bovina (BSA) a  $500\mu\text{g/ml}$  (diluir el liofilizat amb  $\text{H}_2\text{O}$  destil·lada).

##### 6.1.2.1 Corba estàndard per lipoproteïnes

Pipetejar els següents volums en tubs de plàstic de 5 ml. Afegir primer l' $\text{H}_2\text{O}$  destil·lada.

	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6
Sol. Stock	10 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	150 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{O}$	190 $\mu\text{l}$	180 $\mu\text{l}$	150 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	0 $\mu\text{l}$
Conc. $\mu\text{g}$	5 $\mu\text{g}$	10 $\mu\text{g}$	25 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{g}$	75 $\mu\text{g}$	100 $\mu\text{g}$

A continuació segueixen el mateix processament que les mostres.

#### 6.1.3 Blancs:

Es preparen dos blancs: pipetejar 200µl de H<sub>2</sub>O destil·lada en un tub de plàstic de 5ml.

A continuació segueixen el mateix processament que les mostres.

#### 6.1.4 Volums de mostra

Qm = 200µl  
VLDL= 200µl  
IDL = 50 µl  
LDL = 20µl  
HDL = 20µl

#### **NOTA: Per mesurar proteïnes en mostres amb triglicèrids (ex: VLDL)!**

Les mostres amb triglicèrids molt alts s'han de deslipidar (la turbidesa deguda als lípids pot falsejar el resultat). En aquest cas s'ha d'introduir aquesta modificació al protocol estàndard de Lowry per poder fer una mesura correcta.

##### 6.1.4.1 Procediment per deslipidar :

- trasvassar els 2,4ml finals que tenim en tubs de 5ml en tubs de vidre de 10ml.
- afegir 2ml de cloroform
- agitar enèrgicament
- centrifugar 5 minuts a 2000 rpm
- agafar el sobrenadant per fer la lectura de l'absorbència

##### 6.1.4.2 Procediment per deslipidar (estudis cinètics) :

- modificar la solució alcalina de coure per lipoproteïnes

afegir 1 ml de SDS 10% a la solució alcalina de coure o reactiu de Biuret (100 ml sol. A : 1 ml sol. B : 1 ml sol. C).  
seguir el protocol de processament de mostres, controls, blancs i corba sense afegir més modificacions.

#### 6.1.5 Processament de les mostres, blancs, controls i corba estàndard

- pipetejar el volum corresponent de cada fracció lipoproteica en tubs de 5 ml
- afegir H<sub>2</sub>O, en cas que sigui necessari com en las fracciones IDL, LDL i HDL, fins un volum final de 200µl
- afegir 2ml de la solució alcalina de coure

- barrejar amb vòrtex
- deixar 10 minuts a temperatura ambient
- afegir 200µl de la solució de Folin (1:1) immediatament als tubs en agitació en un vòrtex
- deixar a temperatura ambient mínim 30 minuts (en lloc fosc)
- llegir a 650 nm (trasvassar el contingut dels tubs a una cubeta de plàstic)

**NOTA: protocol per cinètiques!** Llegir a 750 nm (trasvassar el contingut dels tubs a una cubeta de plàstic)

- insertar en la corba de calibració les absorvàncies de les mostres. Els resultats es donen en mg/dl (s'ha de tenir en compte els µl que s'han agafat de cada fracció i multiplicar cadascuna d'elles pel factor de dilució corresponent).

## **6.2 Per determinar proteïnes totals en extractes cel·lulars:**

Preparar sempre mostres, blancs, controls i estàndards per duplicat com a mínim.

### 6.2.1 Solucions de treball

- solució A (preparar al moment de fer servir): 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2g/100ml)
- solució B: 1% CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (1g/100ml)
- solució C: 1% NaK Tartrat (1g/100ml)
- solució alcalina de coure per lipoproteïnes: barrejar les solucions A, B, C en una proporció 100:1:1
- solució de Folin (preparar al moment de fer servir): barrejar el reactiu de Folin amb H<sub>2</sub>O destil·lada en una proporció 1:1 (calcular la quantitat que es necessita segons el nombre de mostres).

### 6.2.2 Preparació de la corba estàndard

Preparar una solució stock d'albumina sèrica bovina (BSA) a 500µg/ml (diluir el liofilizat amb H<sub>2</sub>O).

#### **6.2.2.1 Corba estàndard per extractes cel·lulars**

Pipetejar els següents volums en tubs de plàstic de 5 ml.

	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6
Sol. Stock	10µl	20µl	50µl	100µl	150µl	200µl
H <sub>2</sub> O	490µl	480µl	450µl	400µl	350µl	300µl
Conc. µg	5µg	10µg	25µg	50µg	75µg	100µg

A continuació segueixen el mateix processament que les mostres.

**Important: afegir la solució alcalina de coure que té NaOH (apartat 6.1.1).**

6.2.3 Blancs:

Es preparen dos blancs: pipetejar 500µl de H<sub>2</sub>O destil·lada en un tub de plàstic de 5ml. A continuació segueixen el mateix processament que les mostres però afegint 2 ml de la solució alcalina de coure amb NaOH (apartat 6.1.1).

6.2.4 Volums de mostra

- pipetear 500µl d'extracte cel·lular (ja té NaOH propi) en un tub de 5ml de plàstic
- afegir 2ml de la solució alcalina de coure per extractes (sense NaOH)
- barrejar amb vòrtex
- deixar reposar 10 minuts a temperatura ambient
- afegir 200µl de la solució de Folin (1:1) immediatament als tubs en agitació en un vòrtex
- deixar a temperatura ambient mínim 30 minuts en un lloc fosc.
- deixar a temperatura ambient mínim 30 minuts (en lloc fosc)
- llegir a 650 nm (trasvassar el contingut dels tubs a una cubeta de plàstic)
- insertar en la corba de calibració les absorvàncies de les mostres. Els resultats es donen en mg/dl (s'ha de tenir en compte els µl que s'han agafat de cada fracció i multiplicar cadascuna d'elles pel factor de dilució corresponent).

**6.3 Per determinar proteïnes totals dissoltes en dissolvents orgànics (tipus isopropanol):**

Preparar sempre mostres, blancs, controls i estàndards per duplicat com a mínim.

6.3.1 Solucions de treball

- solució A (preparar al moment de fer servir): 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1M NaOH (2g+0.4g/100ml)
- solució B: 1% Cu SO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (2g/100ml)
- solució C: 2% NaK Tartrat (2g/100ml)
  
- solució alcalina de coure per lipoproteïnes: barrejar les solucions A, B, C en una proporció 100:1:1
- solució de Folin (preparar al moment de fer servir): barrejar el reactiu de Folin amb H<sub>2</sub>O destil·lada en una proporció 1:1 (calcular la quantitat que es necessita segons el nombre de mostres).

6.3.2 Preparació de la corba estàndard

Seguir el procediment apartat 6.1.2. Preparar la corba estàndard cada vegada que es mesurin mostres.



### 6.3.3 Blancs:

Seguir el procediment apartat 6.1.3.

### 6.3.4 Volums de mostra

Afegir als tubs 200µl de mostra.

### 6.3.5 Processament de les mostres, blancs, controls i corba estàndard

- pipetejar 200µl de mostra en tubs de 5 ml
- afegir 2ml de la solució alcalina de coure
- barrejar amb vòrtex
- deixar 10 minuts a temperatura ambient
- afegir 200µl de la solució de Folin (1:1) immediatament als tubs en agitació en un vòrtex
- deixar a temperatura ambient mínim 30 minuts (en lloc fosc)
- llegir a 750 nm (trasvassar el contingut dels tubs a una cubeta de plàstic)
- insertar en la corba de calibració les absòrvàncies de les mostres. Els resultats es donen en mg/dl (s'ha de tenir en compte els µl que s'han agafat de cada fracció i multiplicar cadascuna d'elles pel factor de dilució corresponent).

## **6.4 Per determinar proteïnes totals en precipitats de proteïna (precipitat d'apo B-100 deslipidada):**

Preparar sempre mostres, blancs, controls i estàndards per duplicat com a mínim.

### 6.4.1 Solucions de treball

Seguir el procediment apartat 6.3.1.

### 6.4.2 Preparació de la corba estàndard

Seguir el procediment apartat 6.1.2.

### 6.4.3 Blancs

Seguir el procediment apartat 6.1.3.

### 6.4.4 Volums de mostra

Afegir 1 ml de NaOH 0.5 N als precipitats de proteïna (como ara d'apo B-100) i deixar que es dissolguin a 4°C.  
Afegir als tubs on es prepararà la reacció de Lowry 200µl de mostra.

#### 6.4.5 Procesament de les mostres, blancs, controls i corba estàndard

Seguir el procediment apartat 6.3.5 però ajustant el volum de la solució alcalina de coure a afegir a les mostres (les mostres ja porten NaOH propi).

##### 6.4.5.1 Mostres precipitat apo B-100

Volum de mostra $\mu\text{l}$ (resuspés NaOH 0.5 N)		Volum NaOH 0.1 N $\mu\text{l}$ (solució alcalina de coure)	Volum H <sub>2</sub> O des. $\mu\text{l}$
VLDL1	200	968	1032
VLDL2	200	968	1032
IDL	200	968	1032
LDL	200	968	1032

## 7. Bibliografia

- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A. L., Randall R. J. J Biol. Chem. 1951.193; 265.