BIOKIMIKA

LABORATEGIKO PRAKTIKAK:

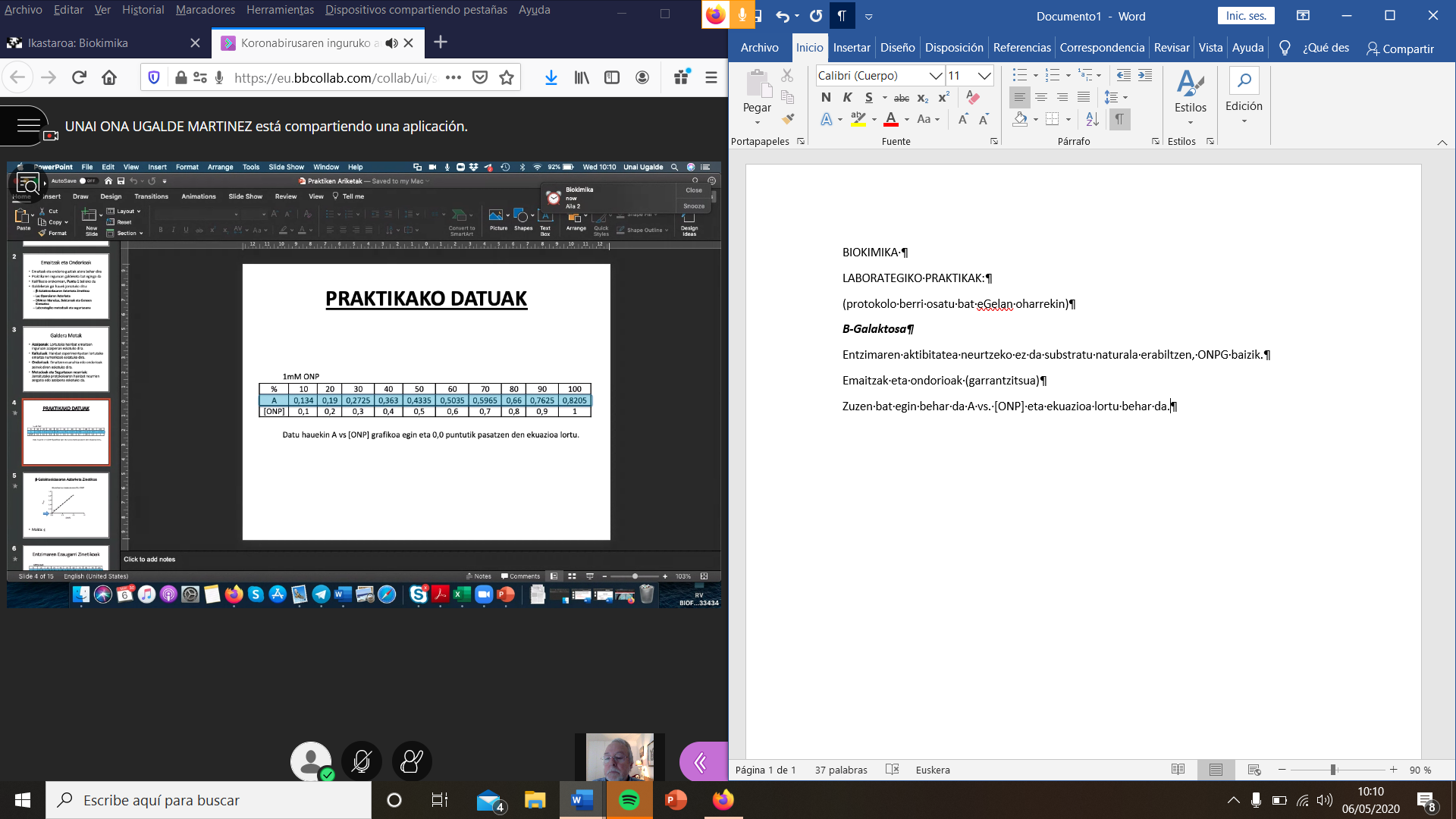
(protokolo berri osatu bat eGelan oharrekin)

***Β-Galaktosa***

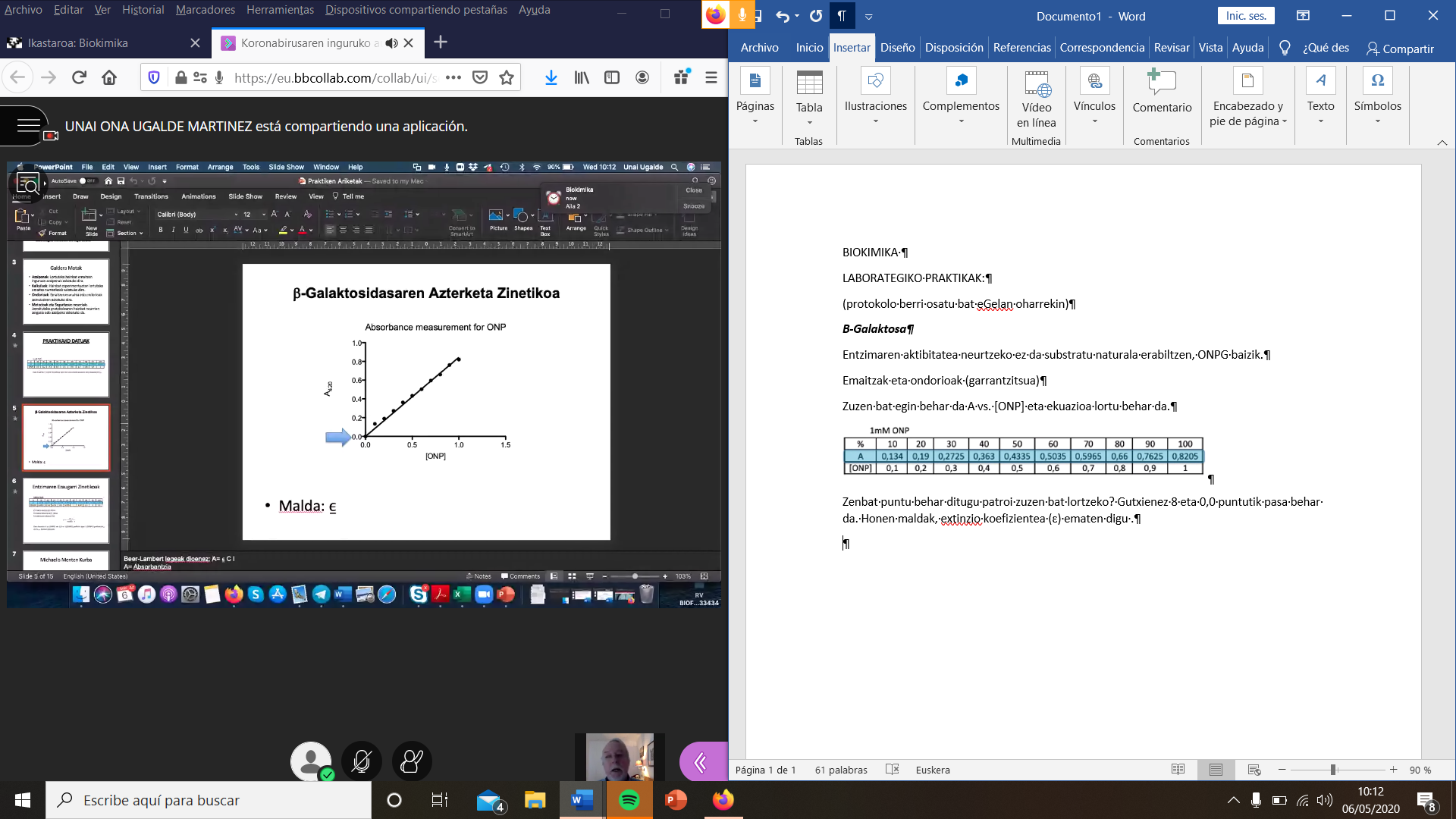
Entzimaren aktibitatea neurtzeko ez da substratu naturala erabiltzen, ONPG baizik.

Emaitzak eta ondorioak (garrantzitsua)

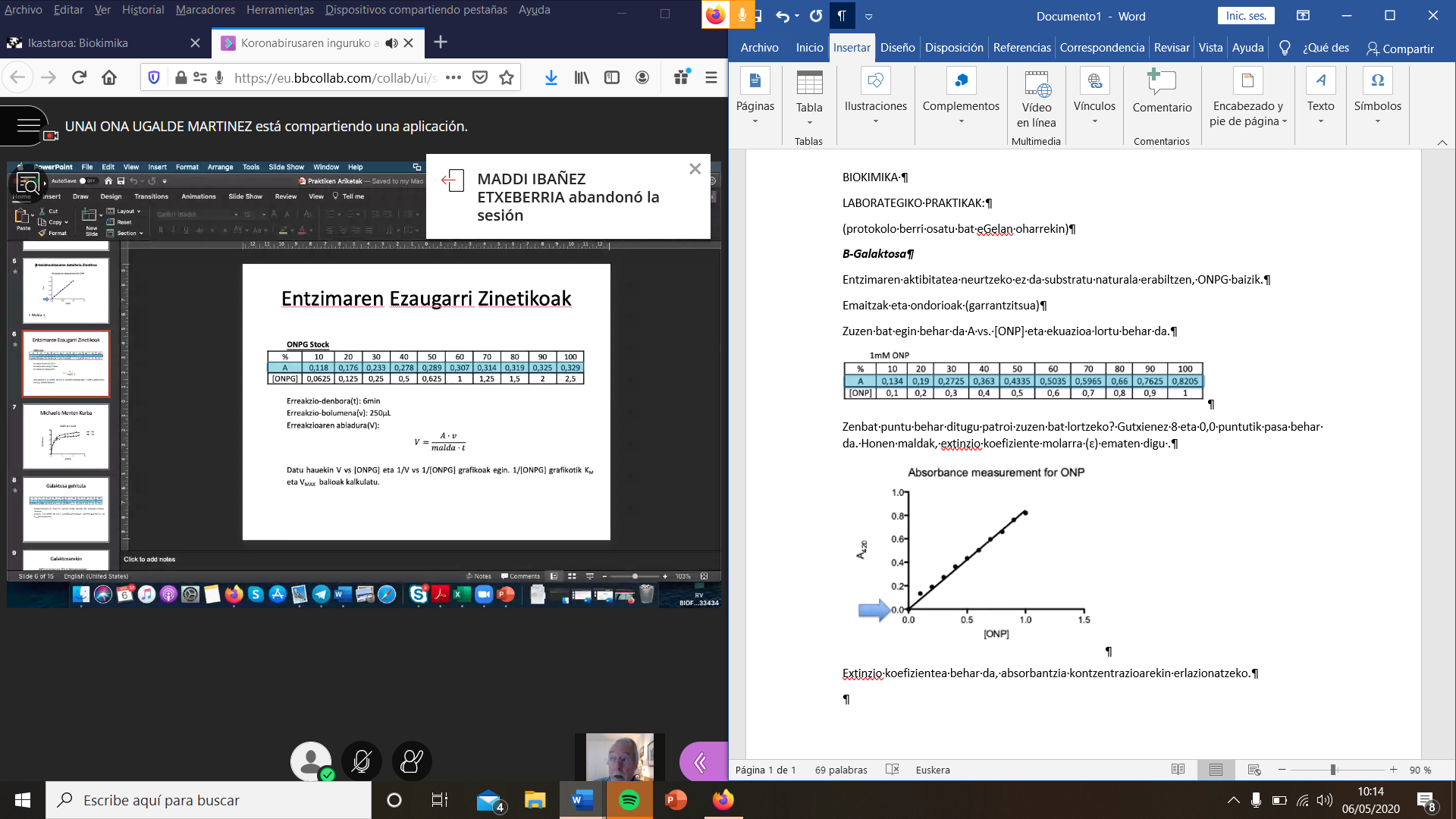
Zuzen bat egin behar da A vs. [ONP] eta ekuazioa lortu behar da.



Zenbat puntu behar ditugu patroi zuzen bat lortzeko? Gutxienez 8 eta 0,0 puntutik pasa behar da. Honen maldak, extinzio koefiziente molarra (ԑ) ematen digu .

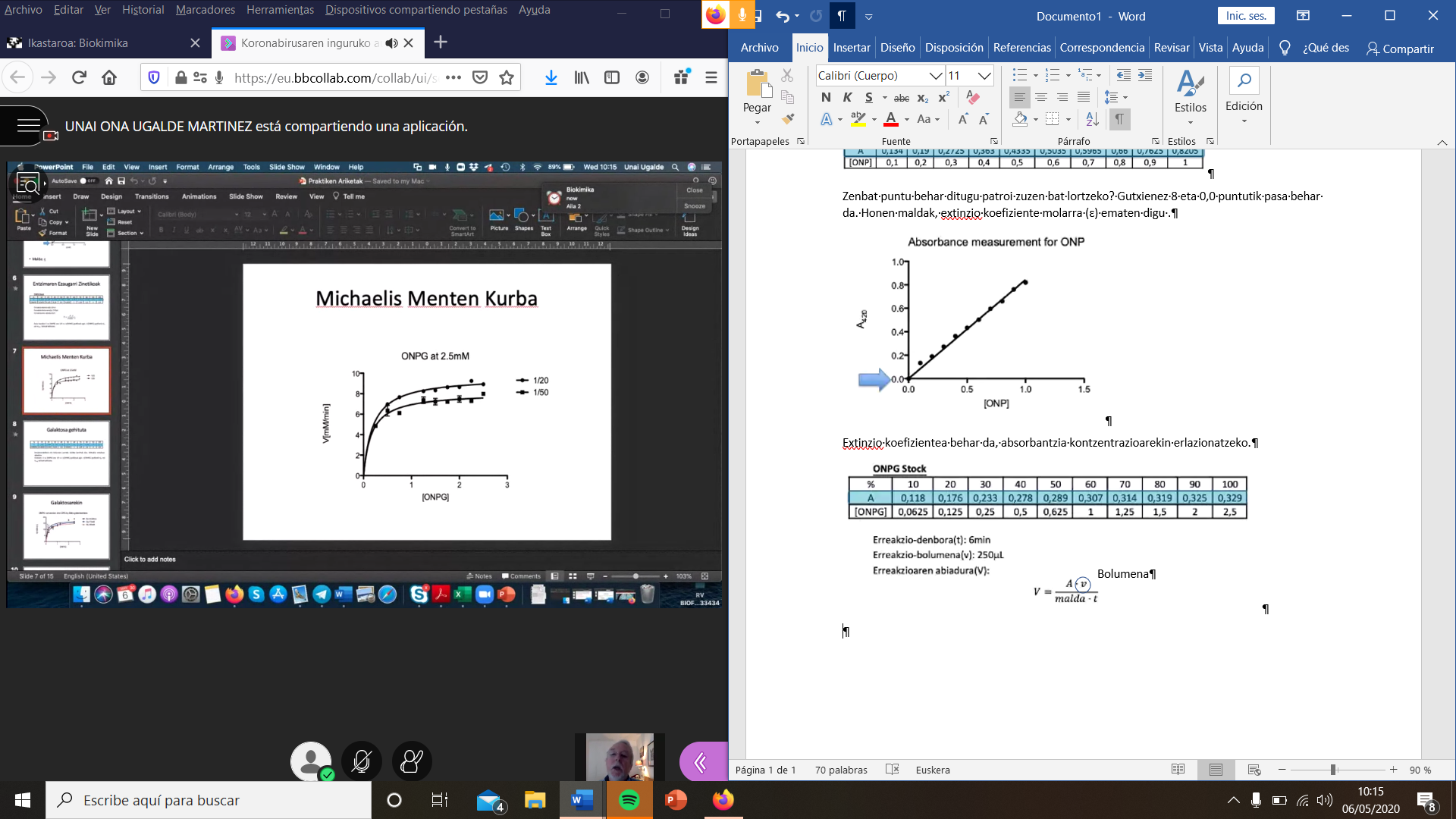


Extinzio koefizientea behar da, absorbantzia kontzentrazioarekin erlazionatzeko.



Bolumena

Irudikapena egitean, Michaelis-Menten irudikapena lortu beharko genuke, hala bada ondo egongo da erantzuna.



ONP-rekin egindako berdina egiten da galaktosarekin eta Lineweaver-Burk irudikatzen da, erreakzioaren K eta Vm lortzeko.

***Lac Operoiaren azterketa***

Praktika honen helburua b-Galaktosidasa zelularen barnean nola sortzen den ikustea. Hau hautazko entzima bat da, laktosa dagoenean bakarri beharrezkoa delako. Hortaz, sistema bat dago hau sortzeko. Lac Z B-galaktosidasaren genea da.

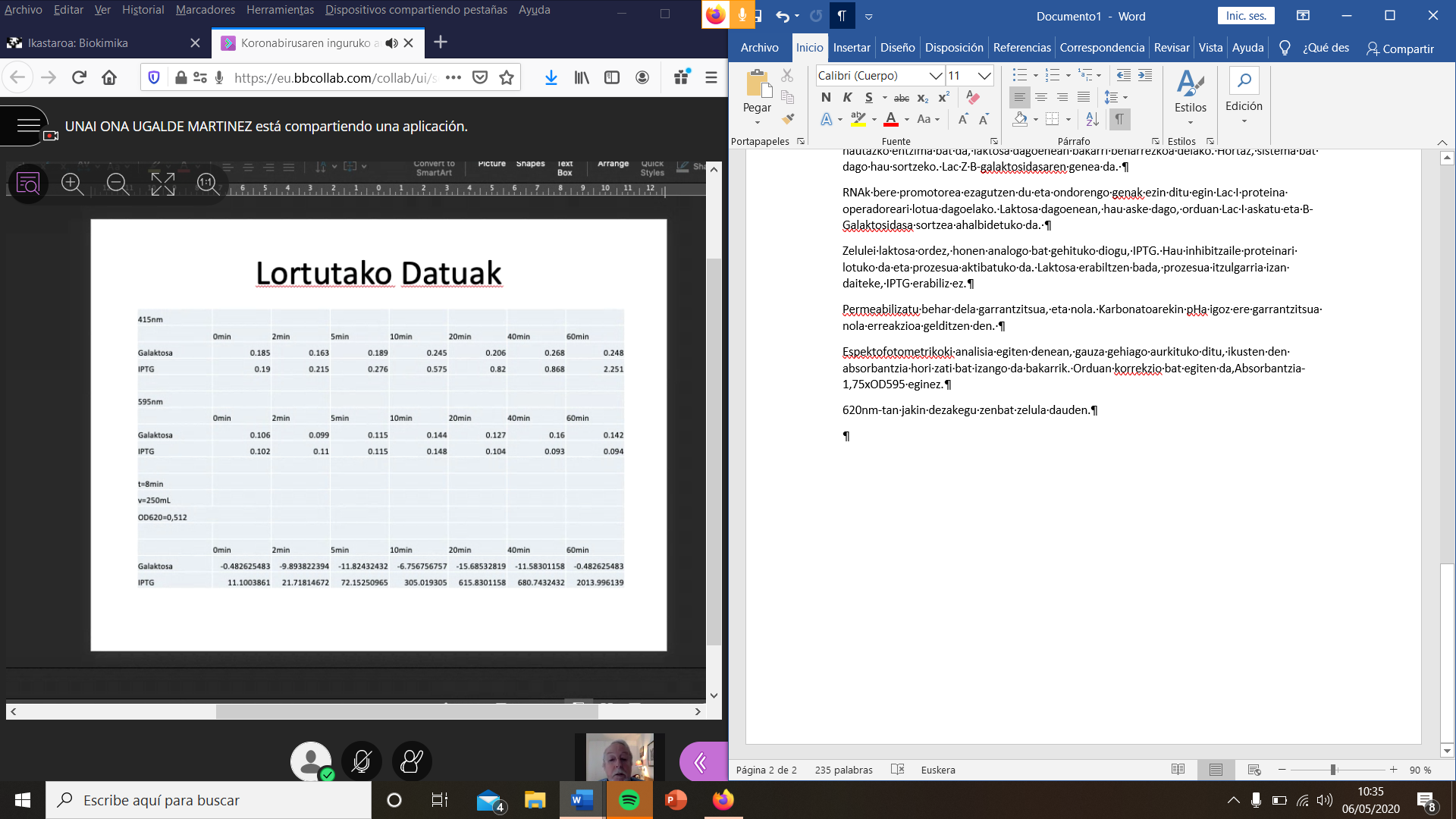
RNAk bere promotorea ezagutzen du eta ondorengo genak ezin ditu egin Lac I proteina operadoreari lotua dagoelako. Laktosa dagoenean, hau aske dago, orduan Lac I askatu eta B-Galaktosidasa sortzea ahalbidetuko da.

Zelulei laktosa ordez, honen analogo bat gehituko diogu, IPTG. Hau inhibitzaile proteinari lotuko da eta prozesua aktibatuko da. Laktosa erabiltzen bada, prozesua itzulgarria izan daiteke, IPTG erabiliz ez.

Permeabilizatu behar dela garrantzitsua, eta nola. Karbonatoarekin pHa igoz ere garrantzitsua nola erreakzioa gelditzen den.

Espektofotometrikoki analisia egiten denean, gauza gehiago aurkituko ditu, ikusten den absorbantzia hori zati bat izango da bakarrik. Orduan korrekzio bat egiten da,Absorbantzia-1,75xOD595 eginez.

620nm-tan jakin dezakegu zenbat zelula dauden.



***DNAren maneiua***

Bakterioak bere kromosomaz gain DNA satelitea dute; Plasmidoa.

Plasmidorik ez duenak, egoera berrien aurrean hil egingo da.

MCS Lac Z genearen barnean aurkitzen da, hau irekitzen badegu eta gure gena sartzen badegu, B-galaktosidasa ez da sortuko. Baino genea sartu ez den plasmidoak B-Galaktosidasa aktibo bat sortuko du.

Lehen markadorea anplizidinaren genea

Bigarren markadorea B-galaktosidasa.

x-Gal hidrolizatzen dute, dimerizatzean urdin bihurtzen da, genea jaso ez dutenak.

Puntu zuriak, guri interesatzen zaizkigunak dira, B-galaktosidasa inaktibo bat izango dutenak, entzimaren egitura aldatzen delako gene berria sartzearekin.

Bektore kargatua goi aldean egongo dira, plasmido handiagoa dutenak, zuriak, gutxiago mugituko dira gelean. Urdinak berriz, DNA txikiagoa izango dute eta gehiago mugituko dira gelean.

(Miller ekuazioa/michaelis-menten ekuazioa)