

Nombre:

Grupo:

## Práctico 4 complemento presencial: Cloroplastos

### Parte A: Obtención de un fracción enriquecida en cloroplastos

---

#### Materiales:

- Mortero
- heladerita con hielo
- 1 hoja de espinaca
- Buffer Tris 0.02, M pH 7.2, NaCl 0.35M
- gasa
- vaso de bohemia
- centrífuga
- tubos Falcon de 15 mL

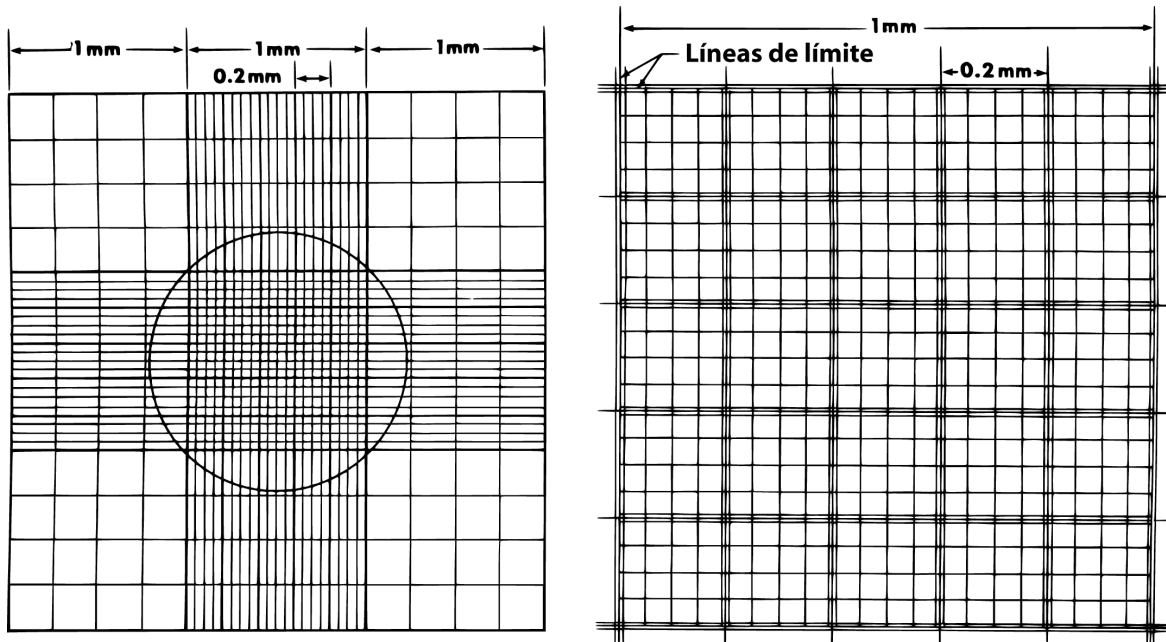
#### Procedimiento

1. Colocar el mortero en hielo
2. Triturar una hoja de espinaca con 10 mL de buffer Tris-HCl/NaCl.
3. Colocar el vaso de bohemia en hielo y filtrar la suspensión obtenida en el mortero a través de gasa.
4. Colocar la suspensión que se encuentra en el vaso de bohemia en un tubo Falcon de 15 mL. Equilibrar con la preparación de otro grupo.
5. Centrifugar a 400 xg a 4 °C por 1 min.
6. Recuperar el sobrenadante con pipeta colocándolo en un tubo Falcon de 15 mL, equilibrar en balanza. Equilibrar con la preparación de otro grupo.
7. Centrifugar a 1000 xg a 4 °C por 5 min.
8. Descartar el sobrenadante con pipeta. Resuspender el pellet con 10 mL de buffer Tris-HCl/NaCl.

## Parte B: Determinación de la concentración de cloroplastos en la suspensión

### Procedimiento

1. Colocar en un tubo de ensayo 4,75 mL de buffer Tris-HCl/NaCl y agregar 0,25 mL de la fracción enriquecida en cloroplastos obtenida en la PARTE A. Mezclar asegurando la resuspensión de los cloroplastos.
2. Tomar el hemocitómetro o cámara de Neubauer y colocar el cubreobjetos. Tomar una pequeña fracción de la suspensión de cloroplastos con una pipeta Pasteur de punta fina y cargar el hemocitómetro. Para ello se permite que la gota de la punta de la pipeta se deslice entre porta y cubre por capilaridad, cuidando que no se sobrecargue y fluya hacia el espacio entre el cubre y los surcos a los lados de la cámara. El volumen de conteo es de 0,1  $\mu$ L.
3. Contar el número de cloroplastos en el cuadrado central de la cámara de conteo (el que está separado por un borde triple y que está dividido en 25 grupos de 16 cuadraditos (ver figura)).



Esquema de la grilla del hemocitómetro o cámara de conteo.

4. Calcular la concentración de cloroplastos en la suspensión diluida (se contaron cloroplastos en  $10^{-4}$  mL, así que multiplicando el número por  $10^4$  se obtiene el número de cloroplastos/mL).

[cloroplastos]<sub>d</sub> =

5. Calcular la concentración de cloroplastos en la suspensión concentrada (fracción).

[cloroplastos]<sub>c</sub> =

## Parte C: Reacción de Hill

---

### Materiales

- Buffer Tris 0.02, M pH 7.2, NaCl 0.35M
- DCPIP\*  $4 \times 10^{-4}$  M
- DCMU\*\*  $2 \times 10^{-4}$  M
- Agua destilada
- tubos Falcon de 15mL
- cubetas de espectrofotómetro

\* DCPIP: Aceptor artificial de electrones

\*\* DCMU: El herbicida DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) inhibe la fotosíntesis al bloquear el sitio de unión de la plastoquinona al fotosistema II, por lo tanto bloquea el transporte de electrones y la fotofosforilación.

### Procedimiento

1. Rotular 4 tubos y agregar las soluciones correspondientes en cada uno según el siguiente cuadro:

Tubo	Buffer pH 7,2 Tris 0,02M NaCl 0,35M	DCPIP $4 \times 10^{-4}$ M	DCMU $2 \times 10^{-4}$ M	Agua
1	3,5 mL	0,5 mL	-	0,5 mL
2	3,5 mL	0,5 mL	-	0,5 mL
3	3,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	-
B	3,5 mL	-	-	1 mL

2. Ajustar la longitud de onda del espectrofotómetro a 600 nm.

3. Agregar 0,5 mL de la suspensión de cloroplastos al tubo B, tapar y agitar. Colocar en el espectrofotómetro y ajustar a 0.

4. Envolver el tubo 1 en papel aluminio, agregar la misma cantidad de cloroplastos que al blanco, agitar y medir inmediatamente la absorbancia. Este tubo oficiará de control no iluminado.

5. La reacción se desencadena al agregar los cloroplastos y con la exposición a la luz. Agregar 0.5 mL de fracción de cloroplastos al tubo 2, mezclar rápidamente y medir en el espectrofotómetro inmediatamente. Realizar el mismo procedimiento con el tubo 3.

6. Seguir la reacción midiendo la absorbancia de los tubos 2 y 3 a intervalos de 1 minuto. Entre estas medidas, mantener los tubos bien iluminados y en agitación manualmente.

7. Registrar los valores en la siguiente tabla:

min tubo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1											
2											
3											

8. Graficar los valores de absorbancia en función del tiempo.

9. Discutir los resultados.