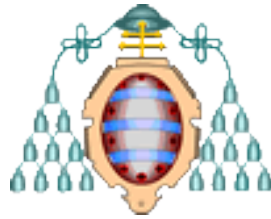


**DEPARTAMENTO
DE
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

GRADO EN BIOLOGÍA

PRÁCTICAS DE ANÁLISIS Y EVALUACIÓN BIOSANITARIA

Curso ____/____

APELLIDOS:

NOMBRE:

GRUPO:

Análisis y evaluación biosanitaria (Grado de Biología)

Práctica 1 (Bioquímica)

Determinación de proteína total en orina por el método de Bradford

INTRODUCCIÓN.

Se llama proteinuria a la condición en la que aparecen proteínas en la orina. La membrana basal de la estructura de filtración glomerular está constituida por proteínas y proteoglicanos, caracterizándose por la gran cantidad de cargas negativas que presenta, por lo que es un filtro que impide el paso de moléculas mayores de 2 nm o de 40 kDa. Solo una pequeña parte de las proteínas de bajo peso molecular se filtra en el glomérulo y la mayor parte de éstas se reabsorbe en los túbulos por endocitosis. De esta forma, la excreción urinaria de proteínas en individuos sanos es inferior a 50 mg/día, de los cuales unos 10 mg/día corresponden a albúmina. Esto hace que la concentración de proteínas en orina en condiciones normales sea inferior a 0,1 mg/mL.

Puede presentarse proteinuria fisiológica tras el ejercicio físico, estrés o fiebre. Este tipo de proteinuria desaparece una vez que ha pasado la situación que la ha originado. Existen diversos tipos de proteinuria que ponen de manifiesto una situación patológica. Según su origen y el tipo de proteínas que aparecen en la orina son: glomerular, tubular, pre-renal y post-renal.

En esta práctica se determinará la concentración de proteína total en muestras de orina para contrastar las diferencias entre orinas normales y patológicas.

REACTIVOS:

1. Biorad Protein Assay Dye. Reactivo comercial. Almacenar a 4 °C.
2. Albúmina sérica bovina (BSA). 1.00 mg/mL, Almacenar a -20 °C. Antes de empezar el ensayo preparar 4 mL de una disolución que contenga 25µg/mL por dilución con agua destilada.

RECTA PATRÓN. A partir del stock de BSA de 25µg/mL de concentración preparar las muestras de concentración variable (de 0 a 10 µg/mL) que se indica en la siguiente tabla

Volumen de 25µg/ml (µL)	µg proteína en ensayo	H ₂ O (µL)	A ₅₉₅
0	0	1600	
160	4	1440	
320	8	1280	
480	12	1120	
640	16	960	
800	20	800	

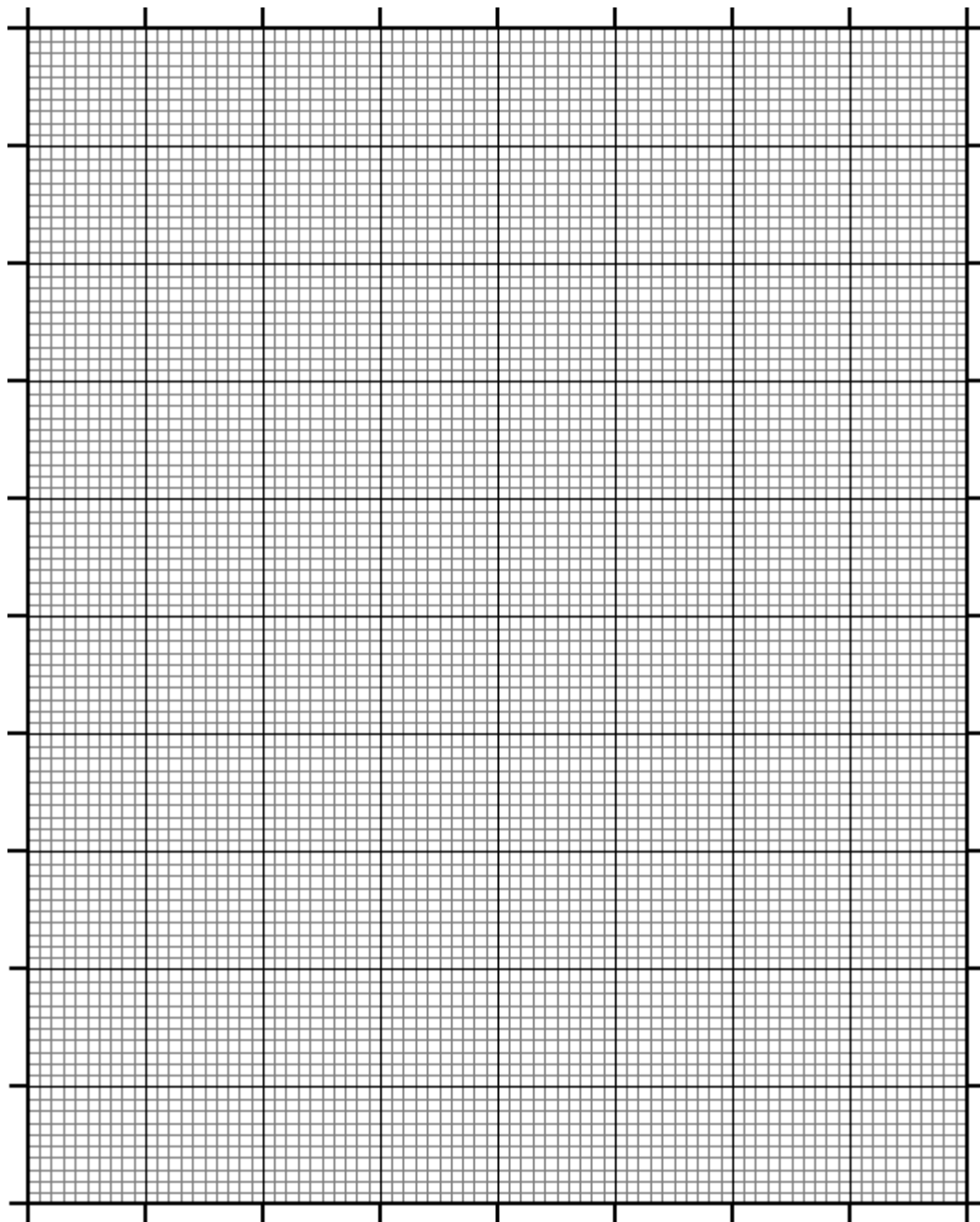
PROBLEMAS. Diluir las muestras de orina 10 o 20 veces con agua destilada según se indique. Dispensar dos volúmenes distintos (por ejemplo, 40 y 80 µL) de cada orina diluida. Completar con agua destilada hasta un volumen final de 1600 µL.

PROCEDIMIENTO.

Preparar en tubos de 5 mL de capacidad las mezclas de reacción con los patrones de BSA y los problemas. Esperar 5 minutos y añadir a cada tubo 400 µL del reactivo de Bradford. Mezclar bien con el agitador mecánico y esperar 15 minutos. Determinar la A₅₉₅ transfiriendo cada muestra a una cubeta del espectrofotómetro.

RESULTADOS.

- a) Representar gráficamente los datos de la recta patrón.



b) Calcular la concentración de proteína del problema usando los datos de la recta patrón.

Muestra	Volumen usado (μL)	Dilución	A_{595}	μg proteína	Concentración proteína en orina ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

Análisis y evaluación biosanitaria (Grado de Biología)

Práctica 2 (Bioquímica)

Determinación de fosfatasa alcalina en suero sanguíneo

INTRODUCCIÓN.

La fosfatasa alcalina consta de cuatro genotipos estructurales en suero: el tipo hígado-huesos-riñones, el tipo intestinal, el tipo placentario y la variante de las células germinales. La fosfatasa alcalina se encuentra en los osteoblastos, los hepatocitos, los riñones, el bazo, la placenta, la próstata, los leucocitos y en el intestino delgado. El tipo hígado-huesos-riñones es de particular importancia.

La actividad de la fosfatasa alcalina aumenta en todas las formas de la colestasis, sobre todo en la ictericia obstructiva. Su actividad también se incrementa por enfermedades del esqueleto tales como la enfermedad de Paget, el hiperparatiroidismo, el raquitismo y la osteomalacia, en fracturas y tumores malignos. En niños y adolescentes se observa frecuentemente un fuerte incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina, pues cuando el crecimiento óseo se acelera, la actividad de los osteoblastos aumenta.

La siguiente tabla indica el rango de valores normales de fosfatasa alcalina en suero medidos a 37 °C.

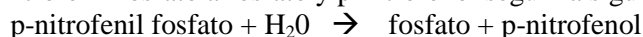
Individuo	Fosfatasa (UI/L)
Hombres	40-130
Mujeres	35-104
Niños (7-12 años)	< 300

REACTIVOS.

Reactivo 1. 2-amino-2-metil-1-propanol: 1,12 mol/L, pH 10,44 (30 °C); acetato de magnesio: 2,49 mmol/L; sulfato de zinc: 0,50 mmol/L; ácido N-(2-hidroxi-etil) etilendiamino tetraacético (EDTA): 2,49 mmol/L

Reactivo 2. p-nitrofenilfosfato: 99,5 mmol/L, pH 8,5.

Principio del ensayo. En presencia de iones de magnesio y de cinc, las fosfatasas hidrolizan el p-nitrofenil fosfato a fosfato y p-nitrofenol según la siguiente reacción:



El p-nitrofenol liberado (que se mide espectrofotométricamente) es proporcional a la actividad de la fosfatasa presente.

PROCEDIMIENTO.

Se usarán los espectrofotómetros analítico Beckman DU 800 y Kontron UVIKON 930. Tres grupos de dos alumnos prepararán en cubetas de 1 mL de capacidad de las mezclas de reacción que se indican a continuación. La cubeta 1 actuará como blanco de la reacción y las cubetas 2, 3 y 4 servirán para medir la velocidad de la reacción enzimática.

	Cubeta 1 (Blanco)	Cubeta 2 Suero problema	Cubeta 3 Suero problema	Cubeta 4 Calibrador
Reactivo 1	900 µL	900 µL	900 µL	900 µL
Suero ó calibrador (*)	-	40 µL	40 µL	40 µL
Agua destilada	40 µL	-	-	-
Reactivo 2	180 µL	-	-	-

(*) En la cubeta 4 se medirá la velocidad de reacción con el **estándar interno ó calibrador** en lugar de suero problema. Este estándar interno tiene una actividad conocida de fosfatasa alcalina, que se usará como referencia.

Mezclar e incubar 5 minutos a 37 °C en la cámara termostatzada del espectrofotómetro. Usando la cubeta Blanco, ajustar la absorbancia a 0 durante esta incubación.

Transcurridos estos 5 minutos añadir a las cubetas 2, 3 y 4 180 µL de reactivo 2, mezclar y colocar en la cámara del espectrofotómetro. Iniciar la toma de datos para registrar la A_{430} a intervalos de 1 min durante 10 minutos.

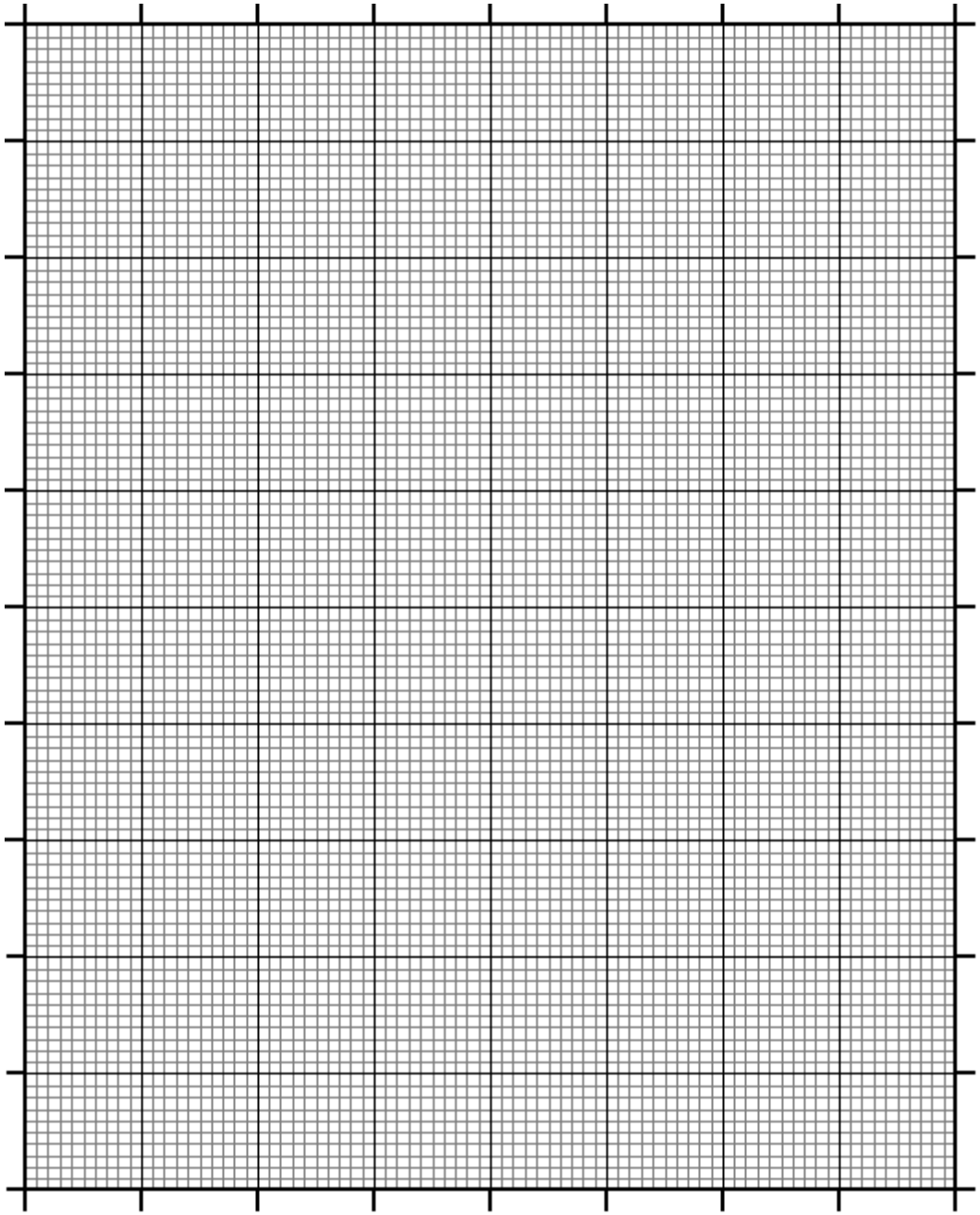
RESULTADOS.

- a) Representar gráficamente los datos de A_{430} frente a tiempo.
- b) A partir de la pendiente de cada reacción, determinar la velocidad de la misma (μM de producto generado por minuto de reacción) teniendo en cuenta que el ϵ_{430} del p-nitrofenol es $10.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.
(Ecuación de Lambert-Beer: $A = \epsilon \cdot c \cdot l$)
- c) Calcular las unidades enzimáticas en cada suero (UI/L) comparando la velocidad de cada problema con la del estándar interno:

$$\frac{\text{Velocidad suero problema}}{\text{Velocidad estándar interno}} \times \text{UI/L estándar interno}$$

Definición de unidad de actividad enzimática: es aquella cantidad de enzima capaz de catalizar la transformación de 1 µmol de sustrato por minuto de reacción.

- d) Determinar cuáles de los sueros ensayados tienen niveles normales y cuáles niveles patológicos de fosfatasa alcalina.



Análisis y evaluación biosanitaria (Grado de Biología)

Práctica 3 (Bioquímica)

Electroforesis de proteínas del suero sanguíneo

INTRODUCCIÓN.

Muchas moléculas biológicas poseen carga eléctrica cuya magnitud depende de la naturaleza de las mismas, del pH y de la composición del medio en el que se encuentren. Si a una disolución que contiene moléculas cargadas se le aplica un campo eléctrico, las moléculas emigran hacia el polo de carga opuesta. Este principio se usa en la electroforesis para separar moléculas que posean cargas diferentes.

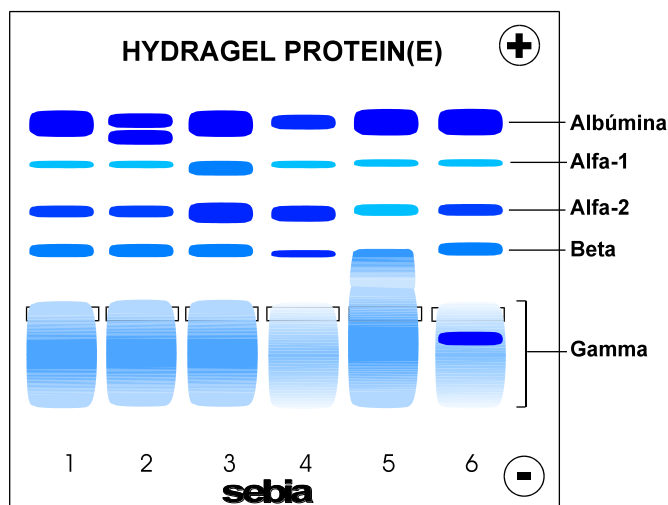
Las proteínas, que son moléculas anfóteras, adquieren en medio alcalino una carga global negativa que hace que emigren desde el polo negativo (cátodo) hacia el polo positivo (ánodo). Debido a ello, la electroforesis de zona es una técnica muy empleada para separar proteínas.

La velocidad de migración electroforética depende del equilibrio entre la fuerza impulsora del campo eléctrico sobre los iones cargados de la muestra y las fuerzas de fricción entre las moléculas que se mueven y el medio circundante. Manteniendo constante el voltaje, la velocidad de migración electroforética es directamente proporcional a la carga de la molécula e inversamente proporcional a su tamaño.

Para que tenga lugar la electroforesis es necesario que la muestra esté disuelta en una disolución tampón y que sea colocada sobre un medio de soporte que debe de estar saturado con tampón para conducir la corriente.

Como medio de soporte se emplean materiales relativamente inertes, tales como el papel, acetato de celulosa, geles de almidón, geles de poliacrilamida, etc. La práctica se realizará usando un soporte de gel de agarosa (HYDRAGEL K20[®]) que permite una nítida separación de las bandas proteicas, de necesitarse cantidades mínimas de muestra y de permitir una separación muy rápida.

En esta práctica se pretende llevar a cabo la separación electroforética de las proteínas del suero, obteniéndose habitualmente 5 fracciones con cargas negativas decrecientes: albúmina, α_1 -globulinas, α_2 -globulinas, β -globulinas y γ -globulinas. Esta técnica es muy utilizada en bioquímica clínica para medir cambios en las proteínas séricas causados por diversas enfermedades (ver esquema siguiente)



1. Suero normal.
2. Suero con bisalbuminemia
3. Síndrome inflamatorio agudo.

4. Síndrome nefrótico. 5. Cirrosis alcohólica con bloqueo β - γ . 6. Suero con inmunoglobulina.

VALORES NORMALES: Albúmina: 55-69%; Alfa-1: 1.5-4%; Alfa-2: 8-13%.
Beta: 7-15%; Gamma: 9-18%.

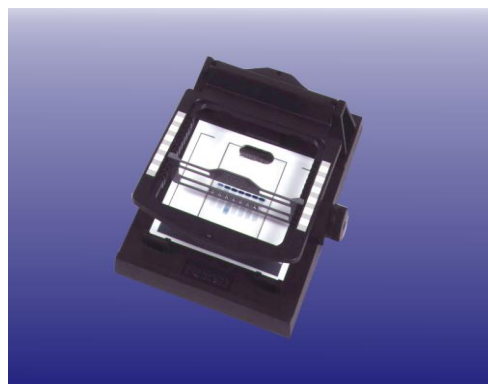
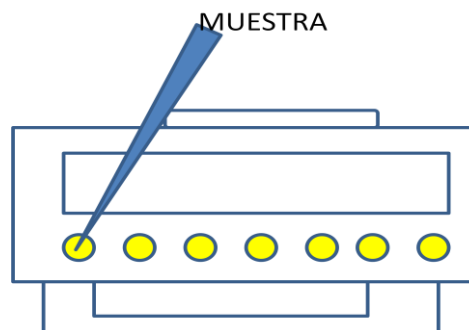
PROCEDIMIENTO.

a) Preparación del tampón de electroforesis.

El tampón para la electroforesis es un tampón barbital de pH= 8,6. Se prepararán 300 ml por dilución de un stock 10x que se repartirán entre los dos receptáculos (+ : rojo; - : negro) del tanque de electroforesis.

b) Preparación y aplicación de la muestra.

1. Muestras: usar muestras de suero frescas sin diluir. No usar muestras hemolizadas (la hemólisis aumenta las fracciones α_2 y β). No usar muestras de plasma.
2. Dispensar 120 μ L de agua destilada o desionizada en el tercio inferior del marco impreso en el soporte del aplicador K 20.
3. Sacar el gel de agarosa de su envoltorio y secar el exceso de tampón con un papel de filtro fino.
4. Colocar el soporte hydragel apoyando su base contra el tope situado en la base del marco impreso. Hacer que el gel contacte con el agua de forma que quede colocado en la base.
5. Aplicar las muestras: se aplican 10 μ l de suero sin diluir en los pocillos del aplicador.



Una vez se han cargado las muestras dejar transcurrir 3 minutos antes de poner en contacto el aplicador con el gel

Colocar el aplicador en la posición n° 7 de su soporte.

Bajar el soporte para que el aplicador contacte con el gel y déjelo en esta posición

durante 40 segundos. Cuando haya pasado ese tiempo, girar la rueda para elevar el aplicador.

6. Colocar el gel en el tanque de electroforesis. La agarosa debe estar orientada hacia abajo (cara cóncava del montaje)

7. Migración: condiciones de migración.

Voltaje: 90 V

Tiempo: 22 minutos

Corriente inicial (1 gel): 12 ± 3 mA

8. Fijación:

Fijar el gel con aire caliente o con solución fijadora. Se recomienda secar con aire caliente.

IMPORTANTE: Asegurarse de que el gel está completamente seco y dejar que se enfríe antes de teñirlo.

9. Tinción y decoloración:

a) **TINCIÓN** durante 4 minutos. Para preparar el colorante, diluir 1 vial de 20 mL de colorante en solución diluyente (60 mL) y añadir 200 mL de agua.

b) **DECOLORACIÓN**. La solución de decoloración se prepara diluyendo 1 mL de stock en 1 L de agua. Repartir en 3 baños de decolorante. Pasar el gel sucesivamente por los tres baños hasta que las bandas queden nítidas.

c) **SECADO** del gel con aire caliente.

d) Limpiar la cara opuesta a la que está el gel en el montaje de cualquier partícula de polvo o colorante.

10. Lectura: Leer el gel a 570 nm en el escáner Epson 700. Colocar el gel boca abajo en el marco que se provee al respecto y aplicar el programa Phoresis diseñado para cuantificar las bandas que aparecen en el gel.