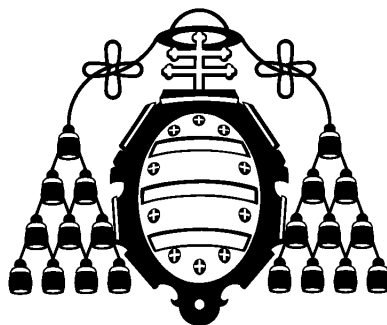


DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

GRADO EN BIOLOGÍA

PRÁCTICAS DE BIOQUÍMICA (1ª parte)

Curso /

NOMBRE Y APELLIDOS:

CURSO Y GRUPO:

Taquilla nº:

5 de julio de 2018
Biol-Bioq-RR
Laboratorio de Prácticas

Normas generales

1. Las prácticas empiezan todos los días a la hora estipulada. Por favor, sea puntual.
2. El uso de la bata es obligatorio (algunos reactivos pueden ser corrosivos).
3. Sea cuidadoso con el material. Compruebe el primer y último día que el material está completo, según la lista que se adjunta. Si falta algo, comuníquelo de inmediato a los profesores de prácticas.
4. Antes de cada práctica, lea cuidadosamente el guión que le corresponde.
5. Al final de cada práctica, lave y guarde en la taquilla todo el material que haya utilizado.
6. Los tubos y pipetas se deben lavar con abundante agua corriente en el grifo, posteriormente aclararlos con agua destilada del frasco lavador, y luego dejarlos escurrir en posición invertida y estable.
7. Cada día se deberá presentar el cuaderno en el que se recojan los procedimientos, resultados y conclusiones de la práctica correspondiente. Complete **todos** los apartados en el laboratorio o en casa.

MATERIAL DE LABORATORIO

Pipetas de 10 o 5 ml	3
Pipetas de 1 o 0,5 ml	3
Probeta de 100 ml	1
Frasco lavador	1
Vasos de precipitado de 250 o 100 ml	2
Tubos Falcon	6
Gradillas	2
Tubos de ensayo	20
Pera para pipeta o propipeta	1
Soporte para pipetas	1

CALENDARIO DE PRÁCTICAS

PRIMER SEMESTRE

Día	Nº	Práctica
1	1	Preparación de tampones fosfato y estudio de la capacidad de tamponamiento
2	2	Efecto del pH sobre la actividad de la fosfatasa
3	3	Determinación de la K_M de la fosfatasa para el <i>p</i> -nitrofenil-fosfato y de la K_i para la inhibición por fosfato
4	3	Continuación: cálculo de la K_M y de la K_i
5	4	Valoración enzimática de la glucosa: curva patrón

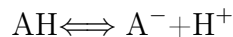
Práctica N^o 1

Preparación de tampones fosfato y estudio de la capacidad de tamponamiento

1.1. Introducción.

Una disolución tampón es aquella que se opone a los cambios de pH cuando se agregan concentraciones relativamente pequeñas de un ácido o una base. En la práctica, las disoluciones tampón consisten generalmente en una mezcla de un ácido o base débil y su sal (ácido débil y base conjugada o base débil y ácido conjugado).

En una disolución de un ácido débil (AH) y de su sal o base conjugada (A^-) los iones H^+ añadidos son neutralizados por los aniones de la sal (A^-), la cual actúa por tanto como una base débil, y a la inversa, los iones OH^- añadidos resultan eliminados por neutralización con el ácido (AH), con lo que el pH de la disolución tampón no varía.



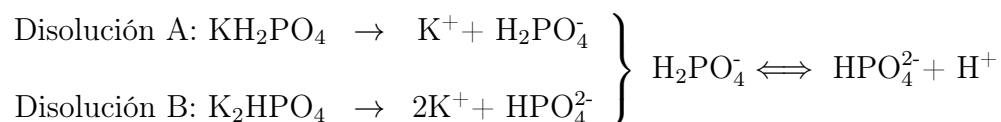
El pH de una disolución tampón se puede calcular mediante la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$pH = pK'_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]}$$

en la que se puede observar que el pH del tampón depende no sólo del valor de pK'_a , sino también de la relación de concentraciones molares entre la base conjugada y el ácido.

La capacidad de tamponamiento, es decir, la resistencia que opone una disolución tampón a que su pH varíe por adición de bases o de ácidos, se mide determinando la concentración de ácido fuerte (HCl) o de base fuerte (NaOH) requeridos para alterar el pH del tampón en una unidad. La capacidad de tamponamiento depende de la concentración total del tampón y es máxima cuando $[base\ conjugada] = [ácido]$, es decir, cuando $pH = pK'_a$.

En esta práctica se prepararán 5 disoluciones de tampón fosfato que tendrán distintos pHs, puesto que están formadas por la base conjugada (HPO_4^{2-}) y el ácido débil ($H_2PO_4^-$) mezclados en diferentes proporciones. Además, se comprobará la capacidad de tamponamiento de dos de las disoluciones tampón preparadas.



1.2. Procedimiento.

Se parte de 100 ml de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 0,2 M (disolución A) y 100 ml de fosfato dipotásico (K_2HPO_4) 0,2 M (disolución B). Las disoluciones de tampón fosfato se forman mezclando las disoluciones ácida y básica citadas anteriormente, siendo el valor de pH dependiente de las proporciones en que intervienen ambas disoluciones.

Preparar los 5 tampones que se indican mezclando las disoluciones A y B en las proporciones siguientes:

Tampón	Solución A (ácida)	Solución B (básica)
1	27,0 ml	3,0 ml
2	15,0 ml	15,0 ml
3	10,0 ml	20,0 ml
4	6,0 ml	24,0 ml
5	3,0 ml	27,0 ml

1. Medir los valores del pH obtenidos para cada una de las disoluciones anteriores en un pH-metro y compararlos con los calculados teóricamente de acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbach, considerando que $\text{pK}'_a = 6,8$.
2. Comprobar la variación en el pH del tampón producida por adición de distintos volúmenes de HCl 0,2 N. Utilizar para ello los tampones 1 y 2 y adicionando a cada uno de ellos **sucesivamente** 0 ml (es decir, medir antes de añadir el HCl), 0,3 ml, 0,2 ml, 1,0 ml y 1,0 ml de HCl 0,2 N, midiendo en el pH-metro el valor del pH resultante después de cada adición. Justifique los resultados obtenidos y compárelos con los resultados calculados teóricamente según la ecuación de Henderson-Hasselbach.

1.3. Resultados.

1. Cálculo del pH teórico de cada tampón:

1

2

3

4

5

Tampón	pH _{teórico}	pH _{experimental}
1		
2		
3		
4		
5		

2. Cálculo teórico del pH del tampón 1 y 2, después de la primera y de la última adición de HCl:

HCl 0,2 N añadido	Tampón 1		Tampón 2	
	pH _{teórico}	pH _{experimental}	pH _{teórico}	pH _{experimental}
0 ml				
0,3 ml				
0,5 ml	—		—	
1,5 ml	—		—	
2,5 ml				

3. ¿Cuál de las dos disoluciones es mejor tampón?

Práctica N^o 2

Efecto del pH sobre la actividad de la fosfatasa

2.1. Introducción.

La mayor parte de los enzimas poseen un pH característico al que su actividad es máxima: por encima y por debajo de ese pH la actividad disminuye. En esta práctica se va a averiguar el pH óptimo al que actúa la fosfatasa, un enzima que cataliza la eliminación de grupos fosfato por hidrólisis de sustratos fosforilados. En este caso mediremos su actividad mediante la reacción siguiente:



2.1.1. Determinación del pH óptimo de la fosfatasa.

Con objeto de averiguar el pH óptimo al que tiene lugar la hidrólisis del *p*-nitrofenil-fosfato catalizada por la fosfatasa, se incuban a 30°C concentraciones fijas de enzima y de sustrato en tubos con tampón a diferentes pHs.

En el tubo cuyo pH sea óptimo para la acción de la fosfatasa, la cantidad de *p*-nitrofenil-fosfato hidrolizado será mayor, y por tanto, el *p*-nitrofenol liberado será más elevado.

2.1.2. Determinación de la actividad de la fosfatasa.

La determinación de la actividad de la fosfatasa se realiza midiendo la concentración o absorbancia de *p*-nitrofenol liberado por acción del enzima durante un período de tiempo determinado, en las condiciones de ensayo empleadas. El *p*-nitrofenol posee un color amarillo característico en disolución alcalina, con un máximo de absorbancia a 400 nm. No obstante, la determinación se hará a 430 nm para evitar interferencias por parte del sustrato, que también absorbe luz de 400 nm de longitud de onda.

2.2. Procedimiento.

Numerar los tubos de ensayo, colocarlos en la gradilla y poner en cada tubo los siguientes reactivos:

Tubo	Tampón a ensayar	Fosfatasa	Agua
1	0,6 ml de pH = 2	0,2 ml de 0,2 mg/ml	—
2	0,6 ml de pH = 3	”	—
3	0,6 ml de pH = 4	”	—
4	0,6 ml de pH = 5	”	—
5	0,6 ml de pH = 6	”	—
6	0,6 ml de pH = 7	”	—
7	0,6 ml de pH = 8	”	—
8	0,6 ml de pH = 9	”	—
Blanco	—	—	0,8 ml

A continuación, introducir la gradilla con los tubos conteniendo el tampón correspondiente y la fosfatasa en un baño graduado a 30°C.

Añadir a todos los tubos, **incluido el blanco**, 0,2 ml de *p*-nitrofenil-fosfato 20 mM con un **intervalo de 30 segundos** entre tubo y tubo. Mezclar bien los componentes con un agitador tras iniciar la reacción en cada tubo. Dejar transcurrir la reacción durante 15 min en estas condiciones.

Detener la reacción con 3 ml de Na₂CO₃ 0,1 M, también con intervalos de 30 segundos, y empezando en el mismo orden que en la etapa anterior.

Sacar la gradilla con los tubos del baño y medir la absorbancia a 430 nm en un colorímetro previamente puesto a cero con el blanco, anotando los datos correspondientes a los distintos pHs ensayados.

Representar gráficamente los resultados, poniendo en abscisas el pH y en ordenadas la absorbancia a 430 nm.

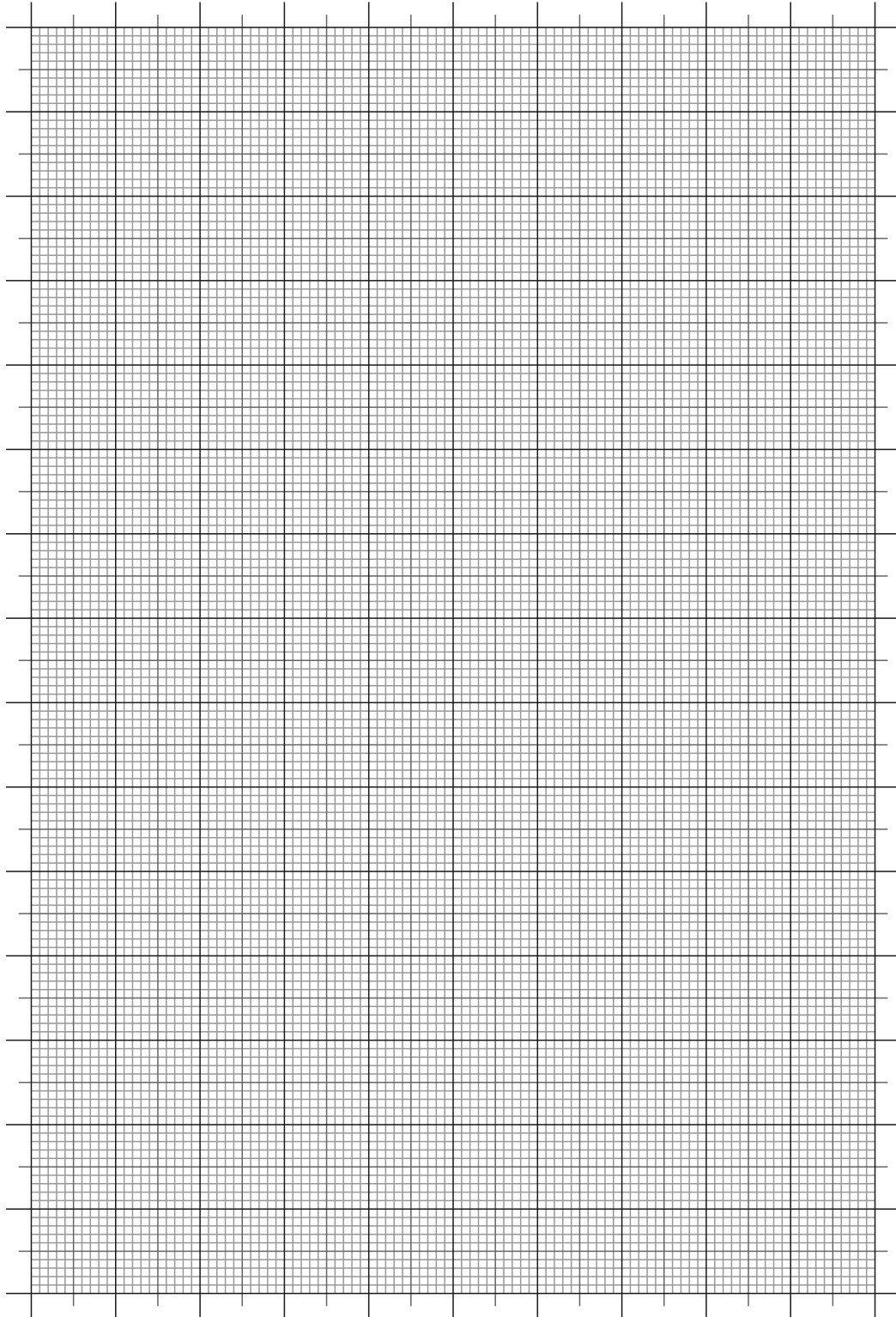
Teniendo en cuenta el valor del coeficiente de extinción molar (ϵ) del *p*-nitrofenol a 430 nm es $\epsilon_{430\text{nm}} = 11000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, calcular los μmoles de *p*-nitrofenol liberados por minuto (unidades de actividad enzimática), cuando el enzima funciona en condiciones óptimas de pH y a temperatura prefijada.

2.3. Resultados.

Tubo	pH	A _{430nm}
1	2	
2	3	
3	4	
4	5	
5	6	
6	7	
7	8	
8	9	

1. Cálculo de los μmoles de p-nitrofenol liberado por minuto para el valor óptimo de pH (unidades de actividad enzimática):

Título:



Práctica N^o 3

Determinación de la K_M de la fosfatasa para el *p*-nitrofenil-fosfato y de la K_i para la inhibición por fosfato

3.1. Introducción.

La actividad enzimática se ve afectada por varios factores, uno de los cuales es la concentración de sustrato.

La constante de Michaelis (K_M) se define como la concentración de sustrato para la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima V_{max} . Sirve pues para conocer la afinidad y saber la concentración mínima de sustrato a la que hay que realizar los ensayos de actividad enzimática.

$$V_o = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

La inhibición se define como la disminución de la velocidad de la reacción catalizada por un enzima, provocada por la presencia de determinadas sustancias denominadas inhibidores.

Los enzimas pueden inhibirse reversiblemente de manera competitiva y no competitiva. En la inhibición competitiva, la unión del sustrato y del inhibidor al enzima son mutuamente excluyentes. La inhibición competitiva se caracteriza porque en presencia del inhibidor cambia la K_M pero no la V_{max} . Por el contrario, los inhibidores no competitivos cambian la V_{max} pero no la K_M .

La constante de inhibición (K_i) se define como:



y mide la afinidad del enzima por el inhibidor.

3.1.1. Determinación de la K_M .

La determinación de la K_M de la fosfatasa ácida para el *p*-nitrofenil-fosfato se realiza llevando a cabo varias reacciones con una cantidad fija de enzima y en las mismas condiciones experimentales (pH óptimo y 30°C), pero con diferentes concentraciones del sustrato *p*-nitrofenilfosfato.

Tras llevar a cabo la reacción se determina la concentración del *p*-nitrofenol liberado en cada caso midiendo la absorbancia a 430 nm en un medio alcalino.

3.1.2. Determinación de la K_i .

La determinación de la K_i para el fosfato se realiza incubando el enzima en las condiciones anteriores y en presencia de una concentración constante del inhibidor fosfato.

3.2. Procedimiento.

Numerar los tubos de ensayo y colocarlos en la gradilla.

Poner en cada tubo los siguientes reactivos:

Tubo	Agua	<i>p</i> -nitrofenil-fosfato	Tampón (*)	
1	575 μ l	25 μ l de 2 mM	200 μ l	
2	550 μ l	50 μ l de 2 mM	200 μ l	
3	500 μ l	100 μ l de 2 mM	200 μ l	
4	400 μ l	200 μ l de 2 mM	200 μ l	
5	200 μ l	400 μ l de 2 mM	200 μ l	
6	550 μ l	50 μ l de 20 mM	200 μ l	
7	500 μ l	100 μ l de 20 mM	200 μ l	
8	400 μ l	200 μ l de 20 mM	200 μ l	
	Agua	<i>p</i> -nitrofenil-fosfato	Tampón (*)	KH ₂ PO ₄ 10 mM
9	375 μ l	25 μ l de 2 mM	200 μ l	200 μ l
10	350 μ l	50 μ l de 2 mM	200 μ l	200 μ l
11	300 μ l	100 μ l de 2 mM	200 μ l	200 μ l
12	200 μ l	200 μ l de 2 mM	200 μ l	200 μ l
13	—	400 μ l de 2 mM	200 μ l	200 μ l
14	350 μ l	50 μ l de 20 mM	200 μ l	200 μ l
15	300 μ l	100 μ l de 20 mM	200 μ l	200 μ l
16	200 μ l	200 μ l de 20 mM	200 μ l	200 μ l
Blanco	600 μ l	200 μ l de 20 mM	200 μ l	—

(*) Tampón acetato 0,2 M pH=5,0 que está en el rango óptimo de actividad del enzima

Seguidamente, introducir la gradilla en un baño graduado a 30°C y añadir a cada uno de los tubos **excepto el blanco**, 200 μ l de la disolución de fosfatasa ácida 0,2 mg/ml (que contienen 0,1 U/ml de actividad enzimática), con un intervalo de 30 segundos entre tubo y tubo.

Incubar durante 15 minutos a 30°C. Detener la reacción con 3 ml de Na₂CO₃ 0,1 M también con intervalos de 30 segundos entre tubo y tubo, y empezando en el mismo orden que en la etapa anterior.

Sacar la gradilla con los tubos del baño y medir la absorbancia a 430 nm en un colorímetro frente al blanco, anotando los datos correspondientes a las distintas concentraciones de *p*-nitrofenil-fosfato ensayadas.

Calcular el porcentaje de inhibición producida por el fosfato para cada concentración de sustrato y escribir la tabla correspondiente.

Representar gráficamente los resultados, poniendo en abscisas las concentraciones mM de *p*-nitrofenil-fosfato en ensayo (es decir, al inicio de la reacción) y en ordenadas la A_{430} , como medida de la velocidad de reacción V_0 en ausencia y en presencia del inhibidor.

Representar gráficamente los inversos de las concentraciones mM de sustrato frente a los inversos de las absorbancias medidas a 430 nm y calcular el valor de K_M y K_i a partir de los puntos de intersección con el eje de abscisas, obtenidos en ausencia y en presencia del inhibidor.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad K_{M_{AP}} = K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

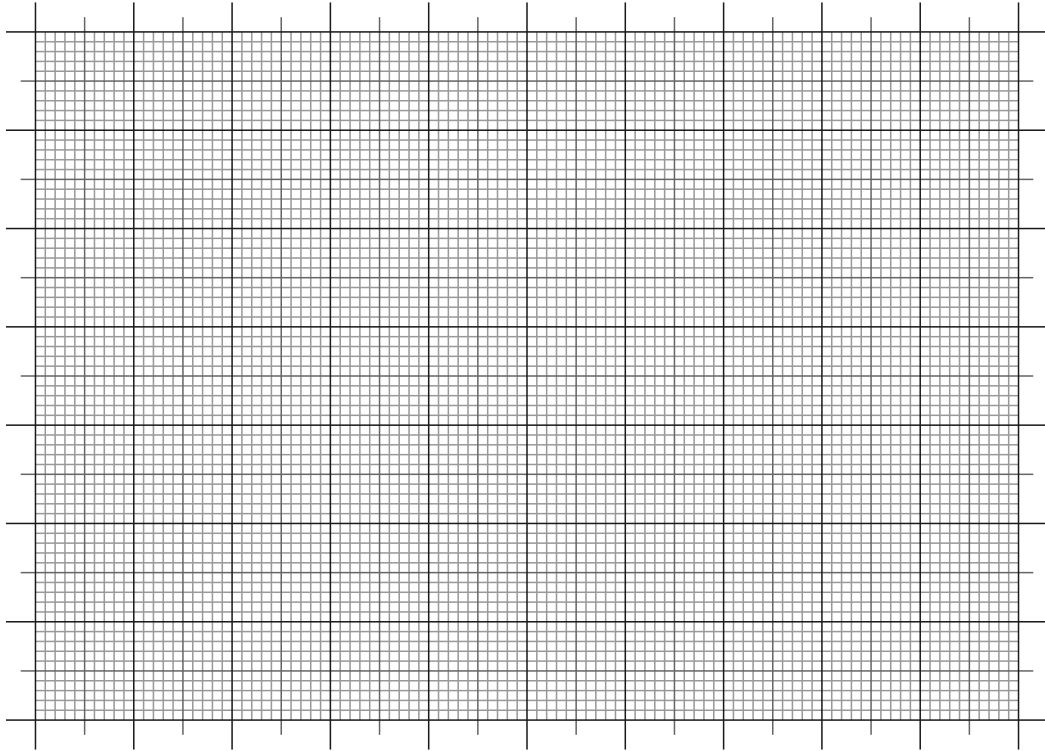
3.3. Resultados.

Tubo	[S ₀]	1/[S ₀]	V ₀ SIN inhibidor		—
	(reacción)	(reacción)	A _{430nm}	1/A _{430nm}	
1					—
2					—
3					—
4					—
5					—
6					—
7					—
8					—
	[S ₀]	1/[S ₀]	V ₀ CON inhibidor		% inhibición
	(reacción)	(reacción)	A _{430nm}	1/A _{430nm}	
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					

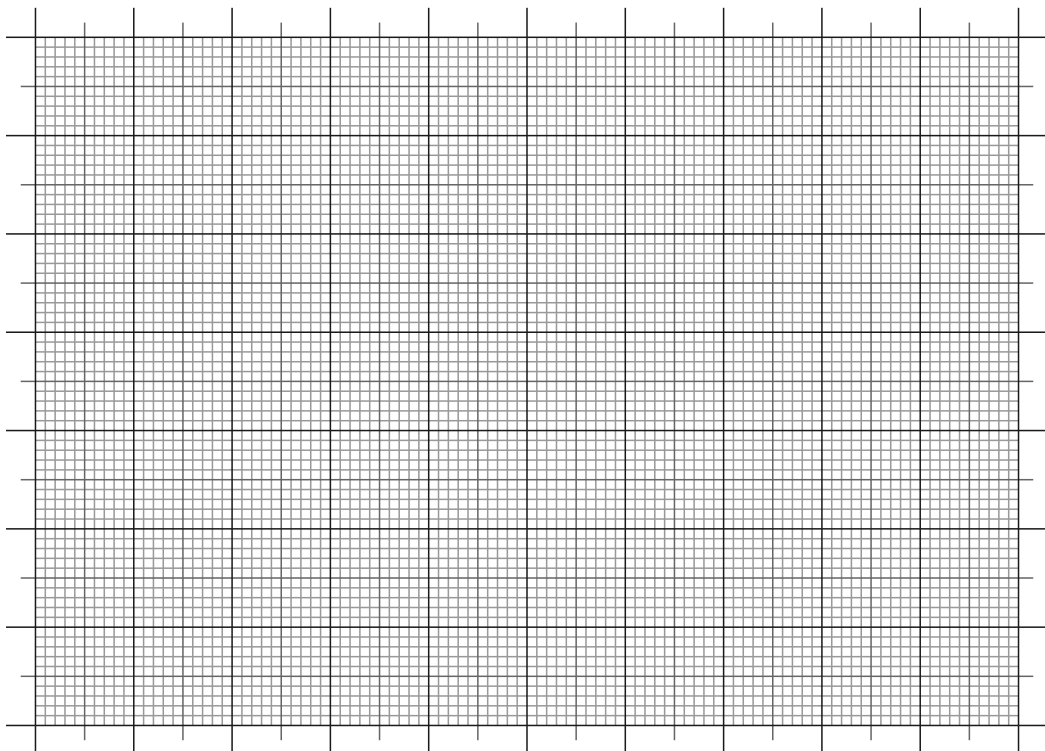
1. K_M (en mM) de la fosfatasa para el *p*-nitrofenil-fosfato:

2. K_i (en mM) de la fosfatasa para el fosfato

Título



Título



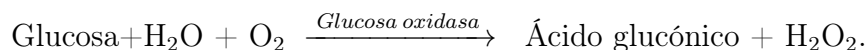
Práctica N^o 4

Valoración enzimática de la glucosa: curva patrón

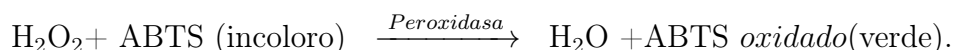
Una de las aplicaciones más frecuentes de la Enzimología en Clínica, consiste en la utilización de enzimas como reactivos para medir la concentración de metabolitos de interés clínico, tales como glucosa, colesterol, etc. En estas condiciones, el metabolito cuya concentración se intenta determinar es el sustrato de una reacción enzimática, mediante la cual se transforma en un producto fácilmente detectable.

Si la reacción enzimática se realiza en unas condiciones (muy baja concentración de sustrato o muy alta concentración de enzima) en las cuales el orden de la misma sea uno, la velocidad de la reacción será directamente proporcional a la concentración del sustrato (metabolito que se intenta determinar) y por tanto midiendo la velocidad ($\mu\text{moles de producto formado/min}$) se puede calcular la concentración de sustrato.

En esta práctica se determina la concentración de glucosa existente en una muestra mediante la reacción enzimática siguiente:



Como ninguno de los productos de la reacción es fácilmente detectable se utiliza un enzima auxiliar, que transforma a uno de ellos en otro fácilmente detectable, de acuerdo con la reacción:



En este sistema acoplado, cada molécula de glucosa que funciona como sustrato del primer enzima da lugar a una molécula de ABTS oxidado, de coloración verdeazulada y con un máximo de absorción a 420 nm. El ABTS o sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) es incoloro hasta que resulta oxidado.

4.1. Procedimiento.

Numerar tubos de 10 ml, colocarlos en la gradilla y poner en cada tubo los reactivos que se indican a continuación:

Tubo	Muestra	Agua
1	50 μ l Glucosa 0,5 mM	200 μ l
2	100 μ l Glucosa 0,5 mM	150 μ l
3	150 μ l Glucosa 0,5 mM	100 μ l
4	200 μ l Glucosa 0,5 mM	50 μ l
5	250 μ l Glucosa 0,5 mM	0 μ l
6	125 μ l Problema	125 μ l
Blanco	—	250 μ l

Introducir la gradilla en un baño termostatzado a 30°C. Comenzar la reacción añadiendo a cada tubo, incluido el blanco, 1 ml del reactivo de glucosa oxidasaperoxidasa-ABTS¹ con intervalos de 30 segundos entre tubo y tubo.

Dejar incubar durante 15 minutos y detener la reacción por adición de 2,5 ml de HCl 0,2 N también con intervalos de 30 segundos y empezando en el mismo orden que al iniciar la reacción. Medir la absorbancia a 420 nm.

Al representar, en ordenadas, la absorbancia a 420 nm de cada tubo conocido y en abscisas la cantidad de glucosa (nmoles) que se adicionó a cada tubo, se obtiene una recta patrón, en la cual por interpolación conociendo la absorbancia del problema se puede calcular la concentración de glucosa en el mismo.

4.2. Resultados.

Tubo	Glucosa (nmoles)	A_{420nm}
1		
2		
3		
4		
5		
6	Problema	

1. Concentración (mM) de glucosa en la disolución problema:

¹Reactivo de glucosa oxidasaperoxidasa-ABTS: disolución de tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7,0 con 1 ml de glucosa oxidasaperoxidasa comercial por litro y 5 mg/l de peroxidasa. En el momento de usar se añaden a cada litro 0,6 g de ABTS.

Título:

