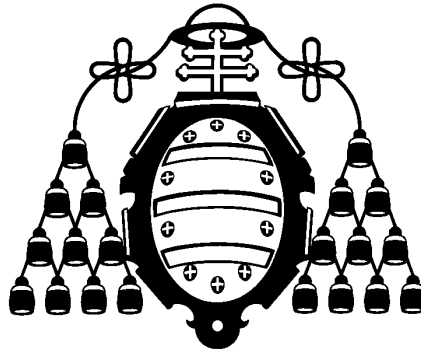


**DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

EXPERIMENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA-2

Curso 2016/2017

NOMBRE Y APELLIDOS:

CURSO Y GRUPO:

Taquilla n^o:

ÍNDICE GENERAL

1. PRÁCTICA N^o 1: Determinación de colesterol en suero.	1
1.1. Introducción general.	1
1.2. Esquema general de la práctica.	1
1.2.1. Fundamento.	1
1.2.2. Procedimiento.	2
1.3. Resultados.	3
2. PRÁCTICA N^o 2: Preparación y utilización de un enzima inmovilizado.	5
2.1. Introducción.	5
2.1.1. Fundamento de la inmovilización con alginato sódico.	5
2.2. Materiales.	6
2.3. Procedimiento.	6
2.3.1. Preparación de la disolución de cloruro cálcico.	6
2.3.2. Preparación de la disolución de β -galactosidasa.	6
2.3.3. Inmovilización del enzima.	6
2.3.4. Carga y utilización de la minicolumna.	7
2.4. Conclusiones.	7
3. PRÁCTICA N^o 3: Efecto del pH sobre la actividad de la fosfatasa.	8
3.1. Introducción.	8
3.1.1. Determinación del pH óptimo de la fosfatasa.	8
3.1.2. Determinación de la actividad de la fosfatasa.	8
3.2. Procedimiento.	8
3.3. Resultados.	9
4. PRÁCTICA N^o 4: 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.	11
4.1. Introducción.	11

4.1.1. Determinación de la K_m.	11
4.1.2. Determinación de la K_i.	11
4.2. Procedimiento.	12
4.3. Resultados.	13
5. PRÁCTICA N^o 5: Estudio de la respuesta a la temperatura de la fosfatasa ácida.	15
5.1. Introducción.	15
5.2. Materiales.	16
5.3. Procedimiento.	16
5.3.1. Estudio de la cinética de inactivación térmica.	16
5.3.2. Estudio de la energía de activación.	16
6. PRÁCTICA N^o 6: Obtención de extractos libres de células y determinación cuantitativa de proteínas.	18
6.1. Obtención de extractos libres de células .	18
6.2. Determinación cuantitativa de proteínas.	18
6.3. Procedimiento del ensayo de proteína.	19
6.4. Resultados.	20
7. PRÁCTICA N^o 7: Determinación de la invertasa (sacarasa).	22
7.1. Fundamento.	22
7.2. Procedimiento del ensayo.	22
7.3. Resultados.	23
8. PRÁCTICA N^o 8: Determinación de la hexoquinasa.	25
8.1. Fundamento.	25
8.2. Procedimiento.	26
8.3. Cálculo de la relación de fosforilación fructosa/glucosa en cada muestra.	26

PRÁCTICA Nº 1

Determinación de colesterol en suero

1.1. Introducción general.

El colesterol es un esteroide con un grupo hidroxilo secundario en la posición C₃. Se sintetiza en muchos tejidos, pero especialmente en el hígado. Aproximadamente tres cuartos del colesterol se forman por síntesis endógena y una cuarta parte se ingiere con la dieta.

Dada la naturaleza insoluble del colesterol, en el suero se encuentra formando parte de lipoproteínas que permiten su solubilización y transporte. Estas lipoproteínas se diferencian entre sí tanto en la composición lipídica como en la proteica y se clasifican en varios grupos de acuerdo a su densidad (quilomicrones, VLDL, LDL y HDL). Dos terceras partes del colesterol circulante está en forma esterificada y el resto en forma libre.

1.2. Esquema general de la práctica.

En esta práctica se van a determinar experimentalmente el colesterol unido a HDLs y el colesterol total en una muestra de suero de cerdo.

1. Purificación de HDL;
2. Cuantificación del colesterol total y del colesterol-HDL;
3. Cálculos teóricos de la concentración de VLDL y de LDL.

1.2.1. Fundamento.

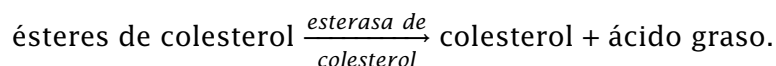
La adición de ácido fosfotúngstico e iones magnesio a una muestra de suero provoca la precipitación de los quilomicrones, VLDL y LDL. El sobrenadante después de centrifugar contiene las HDL. La determinación del colesterol en la muestra de suero directamente (antes de la precipitación) permite conocer la concentración del colesterol total y su determinación en el sobrenadante que contiene las HDL permite conocer la concentración del colesterol presente en estas lipoproteínas.

El método que se va a emplear es un método enzimático. La serie de reacciones implicadas en el método de ensayo se describe a continuación¹.

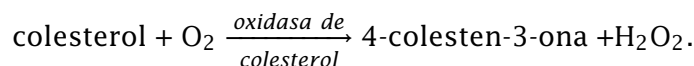
¹ Composición del reactivo:

- oxidasa de colesterol 100 U/l,
- esterasa de colesterol 1250 U/l,
- peroxidasa 800 U/l,
- 4-aminoantipirina (AAP) 0,25 mM y
- ácido hidroxibenzoico (AHB) 10 mM pH 6,6.

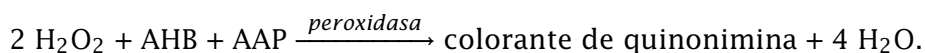
1. Los ésteres de colesterol son hidrolizados enzimáticamente por la esterasa de colesterol hasta colesterol y ácido graso libre:



2. El colesterol libre, incluyendo el presente originalmente en el suero, es oxidado por la oxidasa de colesterol:



3. El peróxido de hidrógeno se combina con el ácido hidroxibenzoico (AHB) y con la 4-aminoantipirina (AAP) en presencia de peroxidasa para formar un cromóforo que puede ser cuantificado a 500 nm:



1.2.2. Procedimiento.

1. Precipitación del colesterol unido a lipoproteínas diferentes de HDL:

- Pipetear en un tubo eppendorf 100 μl de suero y 250 μl del reactivo de ácido fosfotúngstico². Agitar mezclando suavemente.
- Dejar precipitando en la meseta 10 min.
- Centrifugar 10 min a 4000 rpm en una microcentrífuga de mesa.
- Pasar con cuidado (con una P1000) 250 μl del sobrenadante a otro tubo eppendorf limpio. Este sobrenadante contiene las HDL.

2. Determinación del colesterol:

- Pipetear en seis tubos eppendorf los volúmenes de muestras y de H₂O que se indican en la tabla 1.1. Como muestras se utilizan el suero problema, el sobrenadante con HDL, o volúmenes variables de un suero patrón que contiene una concentración de colesterol de 200 mg/dl. Estos volúmenes variables servirán para construir una **curva de calibración**.
- Iniciar la reacción añadiendo 1000 μl del reactivo de ensayo de colesterol a cada uno de los tubos. Agitar.
- Incubar las muestras de reacción en un bloque térmico a 30°C durante 15 min.
- Leer la absorbancia a 500 nm frente a un *blanco* que contiene 100 μl de H₂O y 1000 μl de reactivo.

² Composición del reactivo:

- fosfotungstato de sodio 0,44 mM y
- MgCl₂ 20mM.

Tabla 1.1. Resumen de los reactivos a pipetear para la determinación del colesterol.

Tubo	Muestra	volumen (μ l)	H ₂ O (μ l)	Reactivo (ml)
1	Suero problema	50	50	1,0
2	Sobrenadante con HDL 100		—	1,0
3	Suero patrón	20	80	1,0
4	Suero patrón	40	60	1,0
5	Suero patrón	60	40	1,0
6	Suero patrón	80	20	1,0
7	Blanco	—	100	1,0

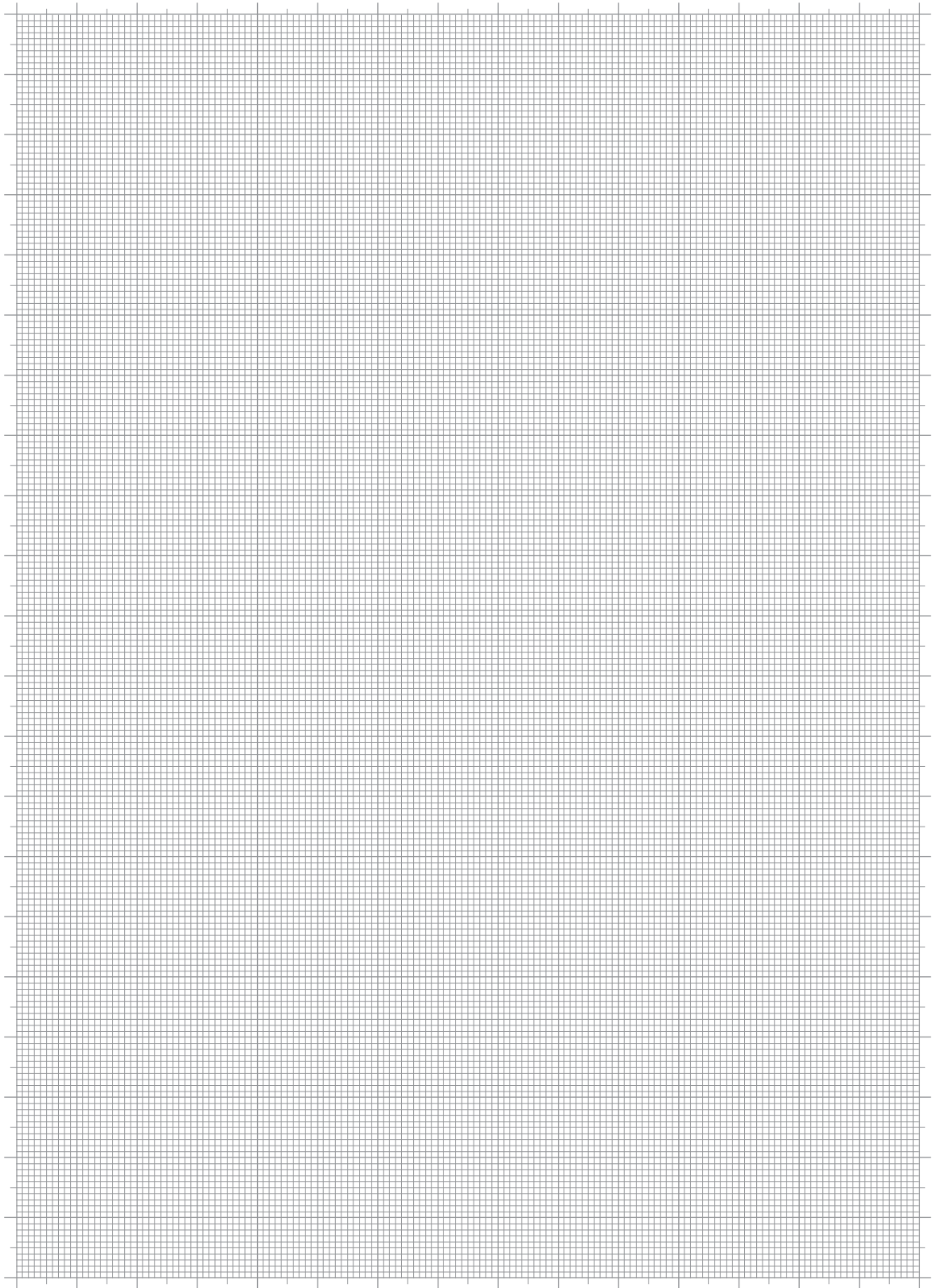
1.3. Resultados.

Muestra	(μ l)	A 500 nm	μ g colesterol	mg/dl
Suero problema	50			
Sobrenadante con HDL 100				

A partir de los datos obtenidos, calcular la concentración de LDL sabiendo que la concentración de triacilgliceroles es 300 mg/dl.

- Colesterol total = HDL + VLDL + LDL
- VLDL = Triacilgliceroles/5

Título:



PRÁCTICA Nº 2

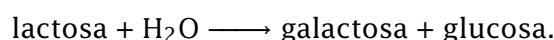
Preparación y utilización de un enzima inmovilizado

2.1. Introducción.

La inmovilización de los enzimas consiste en fijarlos de alguna manera a algún soporte sólido sin que se vean afectadas sus propiedades catalíticas de forma relevante. Existen numerosas maneras de inmovilizar enzimas, y la elección depende, principalmente, del uso al que están destinados.

Para muchas aplicaciones prácticas, los enzimas inmovilizados presentan ventajas frente a las preparaciones en disolución. Generalmente, son más estables que en disolución, lo que permite mantenerlos activos durante más tiempo y en condiciones más adversas. Al estar fijados a soportes sólidos son fácilmente separables de los componentes solubles, lo que facilita su recuperación y evita impurificar otros materiales.

En esta práctica, se inmovilizará un enzima mezclándolo con alginato sódico, un polímero capaz de formar entramados en los que quedan atrapadas las macromoléculas, pero dejando poros suficientemente grandes para permitir el paso de los substratos y de los productos. El enzima utilizado será la β -D-galactósido galactohidrolasa (EC3.2.1.23, nombre común β -galactosidasa), una hidrolasa que cataliza la escisión de la galactosa terminal de diversos galactósidos, siendo el más relevante la lactosa, el azúcar de la leche, por lo que también se le conoce como *lactasa*:



Se verificará su utilidad haciendo pasar muestras de leche, preferiblemente pasteurizada, por minicolumnas cargadas con el enzima inmovilizando, y comprobando la presencia o ausencia de glucosa antes y después del tratamiento con el enzima inmovilizado.

2.1.1. Fundamento de la inmovilización con alginato sódico.

Los alginatos son polisacáridos procedentes de algas pardas marinas, son muy utilizados en la industria alimentaria como sustancias gelificantes aptas para el consumo humano. Son mezclas de polímeros lineales del ácido D-manurónico (poli-M), del ácido α -L-gulurónico (poli-G), o de ambos alternados (poli-GM), unidos mediante enlaces 1-4.

Los dos monómeros son derivados ácidos de hexosas que adoptan la conformación de anillos piranosa con un grupo carboxilo en posición ecuatorial. Mientras que el ácido algínico es insoluble, sus sales de metales alcalinos (por

ejemplo, el alginato sódico) sí son solubles en el agua. En presencia de Ca^{2+} gelifican rápidamente gracias a la formación de complejos entre pares de cadena adyacentes de poli-G entre las que se intercalan los iones calcio a razón de uno entre cuatro restos de L-guluronato.

2.2. Materiales.

1. Alginato de sodio.
2. CaCl_2 .
3. Tampón acetato sódico 10 mM pH 5.
4. β -galactosidasa.
5. Disolución de glucosa 5 mM (patrón).
6. Tiras reactivas para el análisis rápido de glucosa.
7. Disolución de HCl 0,2 N (en caso de análisis cuantitativo de glucosa).
8. Una minicolumna para filtración (jeringa de 5 o 10 ml), lana de vidrio, trípode con pinzas de sujeción.
9. Vasos de precipitados de 50–100 ml, tubos, pipetas, gradillas, etc.

2.3. Procedimiento.

Cada equipo experimentador preparará una de las disoluciones de partida que compartirá con los compañeros. Después, cada uno preparará y utilizará el enzima inmovilizado a partir de esas disoluciones.

2.3.1. Preparación de la disolución de cloruro cálcico.

Cada experimentador necesitará 100 ml de una disolución de CaCl_2 al 1,5% (p/v). Calcular la cantidad necesaria y prepararla disolviendo el CaCl_2 en agua destilada.

2.3.2. Preparación de la disolución de β -galactosidasa.

Cada experimentador necesitará 1 ml de una disolución con, aproximadamente, 2000 U de β -galactosidasa disuelta en tampón fosfato sódico 10 mM pH 6 o de tampón acetato sódico 10 mM pH 5.

2.3.3. Inmovilización del enzima.

Añadir 1 ml de la disolución de β -galactosidasa a 8 ml de disolución de alginato sódico y mezclar por inversión.

Disponer 100 ml de CaCl_2 en un vaso de precipitados. Con una pipeta automática de 1 ml, añadir gota a gota la mezcla de alginato-enzima sin que la punta de la pipeta entre en contacto con la disolución de CaCl_2 .

Dejar reposar unos minutos las perlas gelificadas con el enzima inmovilizado que se habrán formado, y recuperarlas utilizando un filtro y un embudo.

2.3.4. Carga y utilización de la minicolumna.

Lavar la columna con varios mililitros del tampón utilizado para disolver el enzima.

Una vez cargada, la minicolumna puede utilizarse para hidrolizar lactosa. Para ello, se añadirá leche (preferiblemente pasteurizada) con una pipeta sobre la parte superior, se dejará que atraviese la columna por gravedad y se recogerá por el otro extremo. Se comprobará la hidrólisis de la lactosa analizando la presencia de glucosa en la leche antes y después de atravesar la columna.

La presencia de glucosa se detectará rápidamente utilizando tiras reactivas específicas, cuyo resultado es solo aproximado.

2.4. Conclusiones.

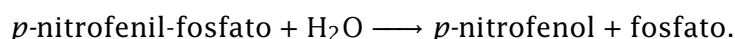
Comparar la concentración de glucosa (aunque sea aproximada con las tiras) de muestras de leche antes y después de tratarlas con el enzima inmovilizado. ¿Qué significa el resultado obtenido? ¿Por qué piensa que se recomendaba utilizar preferentemente leche pasteurizada para realizar el experimento?

PRÁCTICA Nº 3

Efecto del pH sobre la actividad de la fosfatasa

3.1. 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. Este enzima cataliza la reacción siguiente:



3.1.1. 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 diferentes tubos 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.

3.1.2. 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. El *p*-nitrofenol posee un color amarillo característico en disolución alcalina, con un máximo de absorbancia a 400 nm.

3.2. 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 0,05 mg/ml	—
2	0,6 ml de pH = 3	0,2 ml	—
3	0,6 ml de pH = 4	0,2 ml	—
4	0,6 ml de pH = 5	0,2 ml	—
5	0,6 ml de pH = 6	0,2 ml	—
6	0,6 ml de pH = 7	0,2 ml	—
7	0,6 ml de pH = 8	0,2 ml	—
8	0,6 ml de pH = 9	0,2 ml	—
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 50 mM con un **intervalo de 30 s** 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 400 nm en un colorímetro frente al 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 400 nm. ¿Qué otra representación interesa hacer, y qué información proporciona?

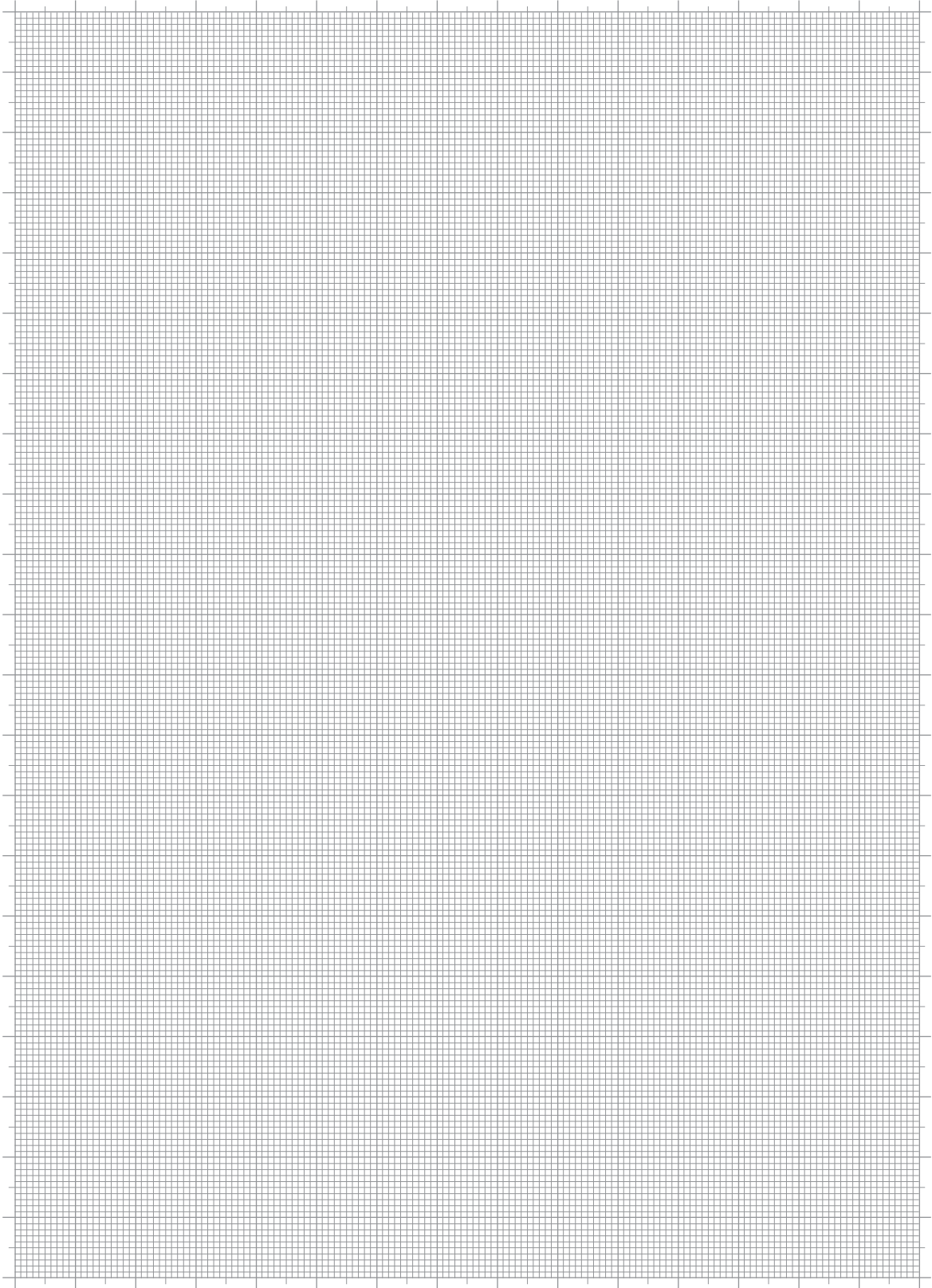
Teniendo en cuenta que el valor del coeficiente de extinción molar (ϵ) del *p*-nitrofenol a 400 nm es $\epsilon_{400\text{nm}}=16600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, calcular los μmoles de *p*-nitrofenol liberados por minuto (unidades de actividad enzimática), cuando el enzima funciona en condiciones óptimas de pH y a temperatura prefijada.

3.3. Resultados.

Tubo	pH	A _{400nm}
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 Nº 4

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

4.1. 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. Sirve pues, para saber la concentración mínima de sustrato a la que hay que realizar los ensayos de actividad enzimática.

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 según varios mecanismos. En el más común, 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_m . Por el contrario, los inhibidores no competitivos cambian la V_m pero no la K_m .

La constante de inhibición (K_i) se define como:



y mide la afinidad del enzima por el inhibidor.

4.1.1. Determinación de la K_m .

La determinación de la K_m de la fosfatasa ácida para el *p*-nitrofenil-fosfato se realiza incubando el enzima con diferentes concentraciones del sustrato *p*-nitrofenil-fosfato y midiendo la concentración o absorbancia del *p*-nitrofenol liberado en cada caso.

4.1.2. 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.

4.2. Procedimiento.

Numerar los tubos de ensayo y colocarlos en la gradilla.

Poner en cada tubo los siguientes reactivos:

Tubo	Tampón	<i>p</i> -nitrofenil-fosfato	Agua
1	550 μ l	50 μ l de 8 mM	200 μ l
2	500 μ l	100 μ l de 8 mM	200 μ l
3	400 μ l	200 μ l de 8 mM	200 μ l
4	300 μ l	300 μ l de 8 mM	200 μ l
5	550 μ l	50 μ l de 80 mM	200 μ l
6	500 μ l	100 μ l de 80 mM	200 μ l
7	400 μ l	200 μ l de 80 mM	200 μ l
8	300 μ l	300 μ l de 80 mM	200 μ l
	Tampón	<i>p</i> -nitrofenil-fosfato	KH ₂ PO ₄ 50 mM
9	550 μ l	50 μ l de 8 mM	200 μ l
10	500 μ l	100 μ l de 8 mM	200 μ l
11	400 μ l	200 μ l de 8 mM	200 μ l
12	300 μ l	300 μ l de 8 mM	200 μ l
13	550 μ l	50 μ l de 80 mM	200 μ l
14	500 μ l	100 μ l de 80 mM	200 μ l
15	400 μ l	200 μ l de 80 mM	200 μ l
16	300 μ l	300 μ l de 80 mM	200 μ l
Blanco	950 μ l	50 μ l de 80 mM	—

Seguidamente, introducir la gradilla en un baño graduado a 30°C y añadir a cada uno de los tubos **excepto el blanco**, 0,2 ml de la disolución de fosfatasa ácida 0,05 mg/ml, 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 400 nm en un colorímetro frente al blanco, anotando los datos correspondientes a las distintas concentraciones de *p*-nitrofenil-fosfato ensayadas.

Representar gráficamente los resultados de forma que permita calcular la K_m para el *p*-nitrofenil-fosfato y la K_i para el inhibidor. Calcúlelos también con ayuda de Matlab o de R.

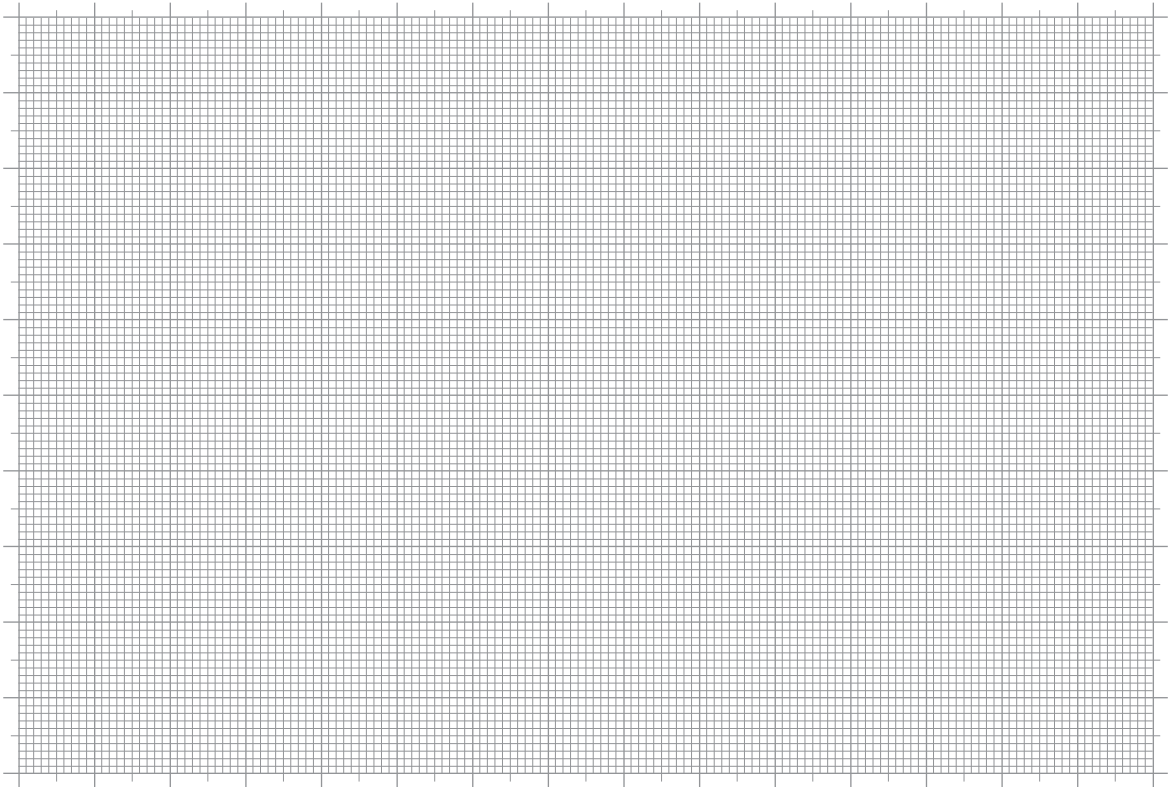
4.3. Resultados.

Tubo	[S ₀] (reacción)	v ₀ SIN inhibidor A _{400nm}	—
1			/////
2			/////
3			/////
4			/////
5			/////
6			/////
7			/////
8			/////
	[S ₀] (reacción)	v ₀ CON inhibidor A _{400nm}	—
9			/////
10			/////
11			/////
12			/////
13			/////
14			/////
15			/////
16			/////

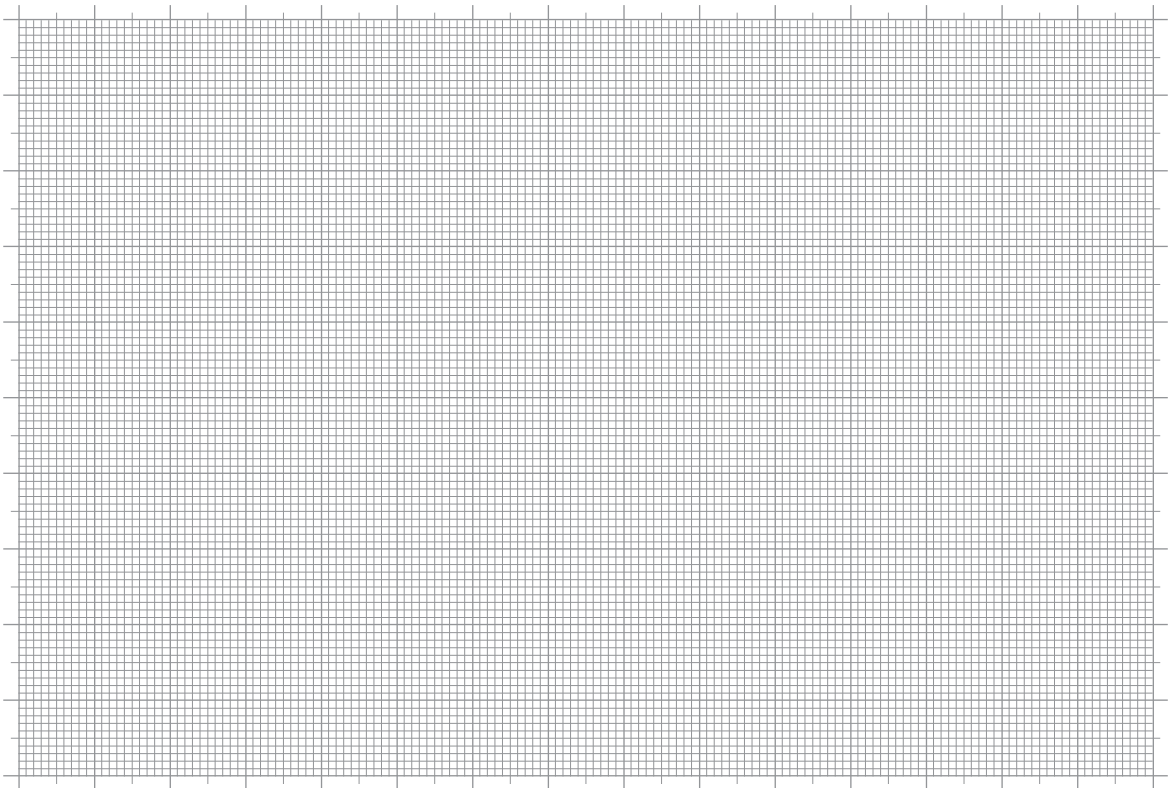
1. K_m (en mM) de la fosfatasa para el *p*-nitrofenil-fosfato:

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

Título:



Título:



PRÁCTICA Nº 5

Estudio de la respuesta a la temperatura de la fosfatasa ácida

5.1. Introducción.

En esta práctica, se estudiará el efecto del calor sobre la actividad de la fosfatasa ácida, lo que nos permitirá conocer la energía de activación y la cinética de inactivación térmica del enzima, y determinar los parámetros cinéticos correspondientes.

Recuérdese que la velocidad de una reacción elemental depende de la temperatura de acuerdo con la *ecuación de Arrhenius*:

$$k = Ae^{-Ea/RT},$$

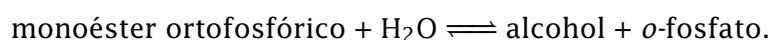
donde k es la constante de velocidad de la reacción, A la constante preexponencial de Arrhenius, $R=8,31441\text{J K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ la constante universal de los gases, T la temperatura absoluta, y Ea la energía de activación.

Por otro lado, la inactivación térmica se comporta, frecuentemente, como una reacción de primer orden,

$$E_t = E_0 e^{-k_T t},$$

donde E_0 es la actividad original (a *tiempo cero*), E_t es la obtenida después de un tiempo t , y k_T es la constante de velocidad de inactivación a la temperatura T .

La fosfatasa ácida (*EC3.1.3.2*, también denominada *fosfomonoesterasa*) cataliza la siguiente reacción de hidrólisis (la especificidad de sustrato es muy amplia en este enzima):



Para la valoración de la actividad, el sustrato que utilizaremos será el *p*-nitrofenilfosfato. Éste es un sustrato artificial, sin función biológica, y que incluso puede ser tóxico si se utiliza *in vivo* en sustitución de los sustratos naturales. Se utiliza frecuentemente en el laboratorio para estudiar la actividad de fosfatasas *in vitro* debido a la facilidad de manipulación, a su elevada solubilidad y a que puede medirse con sensibilidad y precisión su hidrólisis. La hidrólisis del *p*-nitrofenilfosfato por acción de la fosfatasa da lugar a la liberación de *o*-fosfato y de *p*-nitrofenol. Este último compuesto tiene un máximo de absorción de la luz a 410 nm ($\epsilon_{410} = 16600$), gracias al cual podemos medir fácilmente su concentración.

5.2. Materiales.

1. Disolución de fosfatasa de germen de trigo con *aproximadamente* 40 U/l.
2. Tampón acetato 0,05 M pH 4,8.
3. *p*-Nitrofenilfosfato 50 mM.
4. Carbonato de sodio 0,1 M.
5. Baños termostatizados a varias temperaturas.
6. Recipientes con hielo picado.
7. Tubos, pipetas, gradillas, reloj y un colorímetro.

5.3. Procedimiento.

5.3.1. Estudio de la cinética de inactivación térmica.

Diseñe y realice un experimento que sirva para comprobar si la inactivación térmica de la fosfatasa discurre siguiendo una cinética de primer orden. La temperatura de inactivación será de 55°C, para lo que habrá un baño a esa temperatura en el laboratorio. Para diseñar el experimento, asumiremos que el enzima es estable a 0°C, motivo por el que el enzima se les proporcionará en una bandeja con hielo picado.

Para el diseño de este experimento:

1. No prolongue la acción desnaturadora del calor a 55°C más allá de 20 o 30 minutos.
2. Asumiremos que las moléculas de este enzima no son capaces de renaturalizarse una vez desnaturizadas por acción del calor, incluso aunque volvamos a poner la disolución a 0°C.
3. El ensayo de la actividad enzimática se realizará exactamente igual que en las dos prácticas precedentes, aunque con un único tampón (el de pH óptimo), y una única concentración de substrato considerada como cercana a saturante y adecuada para el ensayo.
4. Los reactivos se proporcionan todos ya preparados.

Una vez realizado el experimento, represente gráficamente los resultados de alguna manera que permita verificar si el orden de reacción es el esperado, y en su caso, calcular de manera aproximada la constante de velocidad de inactivación.

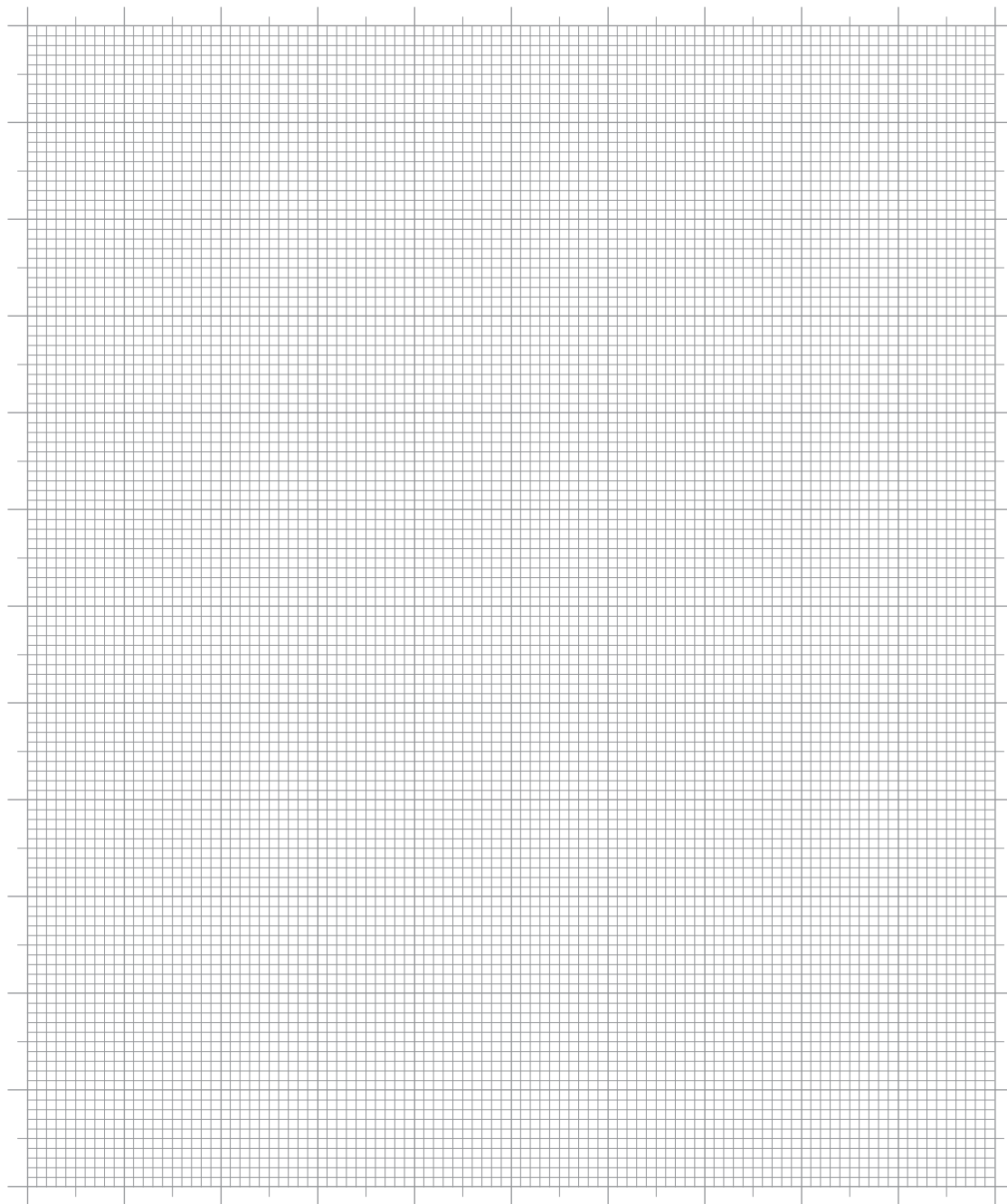
5.3.2. Estudio de la energía de activación.

Diseñe y realice un experimento que sirva para comprobar si la dependencia de la velocidad de la reacción catalizada por la fosfatasa respecto de la temperatura cumple lo previsto por ecuación de Arrhenius, y en su caso, determinar el valor de la energía de activación.

Para el diseño de este experimento, se sugiere:

1. Como rango de temperaturas a las que estudiar la velocidad de la reacción, se sugiere el de 0° a 60°C . Para eso se dispondrá en el laboratorio de una serie de baños regulados a 0°C (hielo fundente), 10, 20, 30, 40, 50 y 60°C .
2. Se dispondrá de los mismos reactivos que para el experimento anterior.

Una vez realizado el experimento, represente gráficamente los resultados de alguna manera que permita verificar si se cumple en todo o en parte lo previsto según Arrhenius, y en su caso, calcular de manera aproximada la energía de activación.



PRÁCTICA Nº 6

Obtención de extractos libres de células y determinación cuantitativa de proteínas

6.1. Obtención de extractos libres de células .

Para determinar las concentraciones proteicas *intracelulares*, es necesario obtener *extractos libres de células*.

Cada grupo parte de células recogidas por centrifugación de 10 ml de cultivo de cada una de las cepas: silvestre (DBY 1315), y mutante en una hexoquinasa (DBY 2052), que les serán suministrados por los profesores al comienzo de la práctica.

1. LAVAR las células para eliminar los restos del medio de cultivo. Para ello, se añaden a cada sedimento de células 3 ml de agua destilada y se resuspenden agitando en el *vortex* a velocidad máxima.
2. RECOGER las células CENTRIFUGANDO a máxima velocidad durante unos 2 minutos. DECANTAR rápidamente el *sobrenadante* sin perder el *sedimento* (células).
3. ROMPER las células. Para ello se añaden a los sedimentos obtenidos en el paso anterior aproximadamente 0,5 g de perlas de vidrio, y se agitan vigorosamente en el *vortex* a máxima velocidad durante 1 minuto, al cabo del cual se introducen los tubos inmediatamente en hielo donde se mantienen durante 1 minuto. REPETIR ESTA OPERACIÓN 3 VECES.
4. AÑADIR 1 ml de tampón fosfato potásico 20 mM pH 7,0 a cada muestra y mezclar agitando en el *vortex*.
5. DECANTAR las células rotas en un tubo de microcentrífuga, de forma que las bolas de vidrio queden en el tubo inicial.
6. CENTRIFUGAR el lisado celular en una microcentrífuga durante 10 minutos a velocidad máxima.
7. RECOGER EL SOBRENADANTE con una micropipeta en un tubo de microcentrífuga. La muestra así obtenida es el extracto libre de células, donde se encuentran los enzimas que se ensayarán.
8. GUARDAR LOS EXTRACTOS para la siguiente práctica.

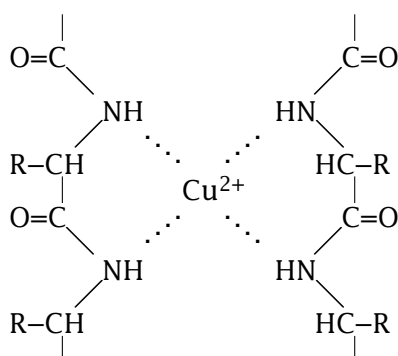
6.2. Determinación cuantitativa de proteínas.

Uno de los métodos más utilizados para la determinación cuantitativa de proteína total es el propuesto por Lowry y colaboradores en 1951. El proceso en

sí tiene notable interés por su aplicación directa y como referencia en métodos de laboratorio o de diagnóstico clínico.

El color azul desarrollado es el resultado de la reacción de la proteína con los iones Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret) y de la reacción del ácido fosfomolibdico-fosfowolfrámico (reactivo de Folin) con los aminoácidos tirosina y triptófano existentes en la proteína.

El biuret ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) es un compuesto que se obtiene al calentar la urea y contiene en su molécula dos enlaces amida sucesivos, análogos a los existentes en las proteínas. El biuret, en medio alcalino, forma unos complejos de coordinación con el cobre de color azul-morado característico.



Los enlaces peptídicos de las proteínas forman con el Cu^{2+} complejos similares a éste, permitiendo la determinación cuantitativa de la proteína. Ahora bien, esta reacción es poco sensible, necesitándose cantidades de proteína del orden de miligramos para que el color desarrollado sea aparente.

En el método de Lowry este inconveniente se supera mediante la utilización del reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual intensifica el color de los complejos cúpricos formados en la reacción de Biuret y además reacciona con los residuos de tirosina y triptófano de la proteína, produciendo coloración azulada.

Mediante el uso de una disolución de proteína de concentración conocida de la que se añaden volúmenes crecientes a los tubos de ensayo, se puede elaborar una recta patrón, relacionando la cantidad de proteína añadida con su correspondiente absorbancia. La recta patrón sirve después para deducir la cantidad de proteína presente en el tubo problema, la cual nos permitirá calcular la concentración original.

6.3. Procedimiento del ensayo de proteína.

1. Pipetear en un tubo de ensayo muestra + H_2O hasta un volumen de 1 ml;
2. Añadir 2,5 ml de reactivo del cobre alcalino³ (Na_2CO_3 2% en NaOH 0,1 N; CuSO_4 1%; tartrato sódico potásico 2%; 100:1:1);

³ Preparación del reactivo del cobre alcalino: mezclar

- 50 ml de Na_2CO_3 2% en NaOH 0,1 N,
- 0,5 ml de CuSO_4 1%, y
- 0,5 ml de tartrato sódico potásico 2%.

3. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente;
4. Añadir 0,5 ml de reactivo Folin utilizando una pipeta de vidrio;
5. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente;
6. Leer a 500 nm, ajustando el aparato previamente con el *blanco*.

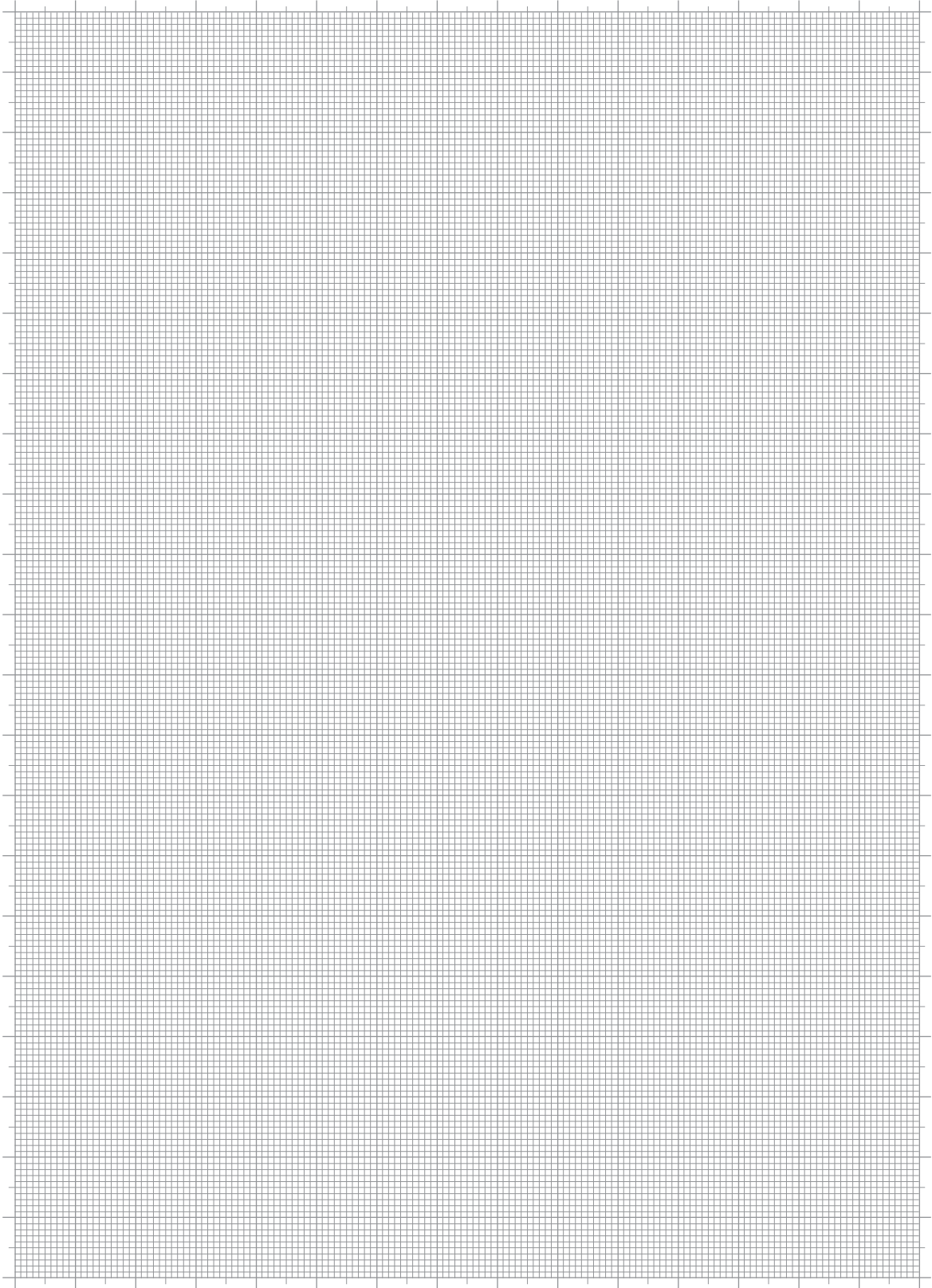
Hacer una CURVA DE CALIBRACIÓN con 50, 100, 200, 300, 400 y 500 μ l de una disolución de seroalbúmina bovina de 0,2 mg/ml.

Hacer un BLANCO con 1 ml de H₂O destilada sin muestra.

6.4. Resultados.

Muestra (μ l)	A 500 nm	μ g Proteína	mg/ml
Silvestre 10			
Silvestre 20			
Mutante 10			
Mutante 20			

Título:

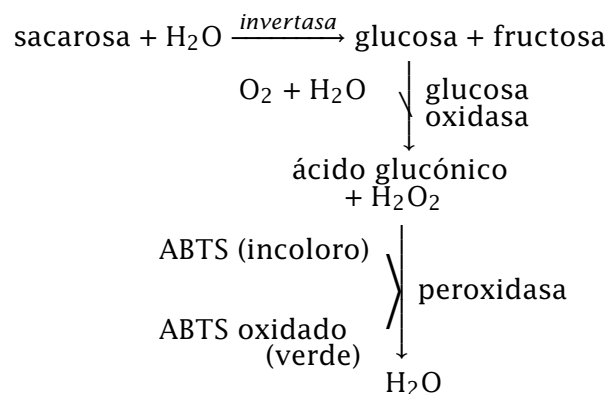


PRÁCTICA Nº 7

Determinación de la invertasa (sacarasa)

7.1. Fundamento.

La β -fructofuranosidasa (EC3.2.1.26, nombre común *invertasa*) cataliza *in vivo* la hidrólisis de la sacarosa. La reacción *in vitro* utiliza igualmente la sacarosa como sustrato que es hidrolizado por el enzima existente en las muestras obteniéndose glucosa y fructosa como producto de la reacción. Ninguno de estos azúcares es detectable directamente por lo que se añaden a la mezcla de reacción glucosa oxidasa, peroxidasa y ABTS [sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)], que mediante reacciones acopladas utilizando como sustrato la glucosa, oxida una molécula de ABTS por cada molécula de glucosa formada en la reacción de la invertasa.



El ABTS oxidado, producto de la reacción de la peroxidasa, en medio ácido es de una coloración verdosa que tiene un máximo de absorción a 420 nm. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de glucosa presente, y ésta dependerá de la cantidad de INVERTASA existente en las muestras.

7.2. Procedimiento del ensayo.

1. Se utilizan los extractos libres de células obtenidos en la práctica 6.1 (pág. 18).
2. Pipetear en tubos de ensayo (tabla 7.1) 10 y 50 μl del extracto de la cepa silvestre diluida 1:10, y 10 y 50 μl de la cepa mutante diluida 1:40;
3. Añadir tampón acetato 0,1 M pH 5 hasta completar los volúmenes a 200 μl ;
4. Meter los tubos en un baño a 30°C;

5. Iniciar la reacción añadiendo (A TIEMPOS) 50 μ l de sacarosa 0,5 M (sustrato);
6. Incubar 10 minutos en el baño a 30°C;
7. Detener la reacción y valorar la glucosa formada: añadir (A TIEMPOS) 1 ml de una mezcla de glucosa oxidasa/peroxidasa/ABTS en tampón fosfato 0,1 M pH 7 (véase la composición completa de la mezcla en la nota al pie de esta página⁴);
8. Incubar 15 minutos a 30°C;
9. Detener la reacción añadiendo (A TIEMPOS) 2,5 ml de HCl 0,2 N;
10. Leer la absorbancia a 420 nm;

Tabla 7.1. Resumen de los reactivos a pipetear para la determinación de la invertasa.

Tubo N ^o	Muestra	volumen (μ l)	Tampón (μ l)	Sacarosa (μ l)	Gluc.oxid. (ml)	HCl 0,2 N (ml)
1	Cepa silvestre [†]	10	190	50	1,0	2,5
2	Cepa silvestre [†]	50	150	50	1,0	2,5
3	Cepa mutante [‡]	10	190	50	1,0	2,5
4	Cepa mutante [‡]	50	150	50	1,0	2,5
5	Glucosa 1 mM	20	180	50	1,0	2,5
6	Glucosa 1 mM	40	160	50	1,0	2,5
7	Glucosa 1 mM	60	140	50	1,0	2,5
8	Glucosa 1 mM	80	120	50	1,0	2,5
9	Glucosa 1 mM	100	100	50	1,0	2,5
Blanco	—	—	200	50	1,0	2,5

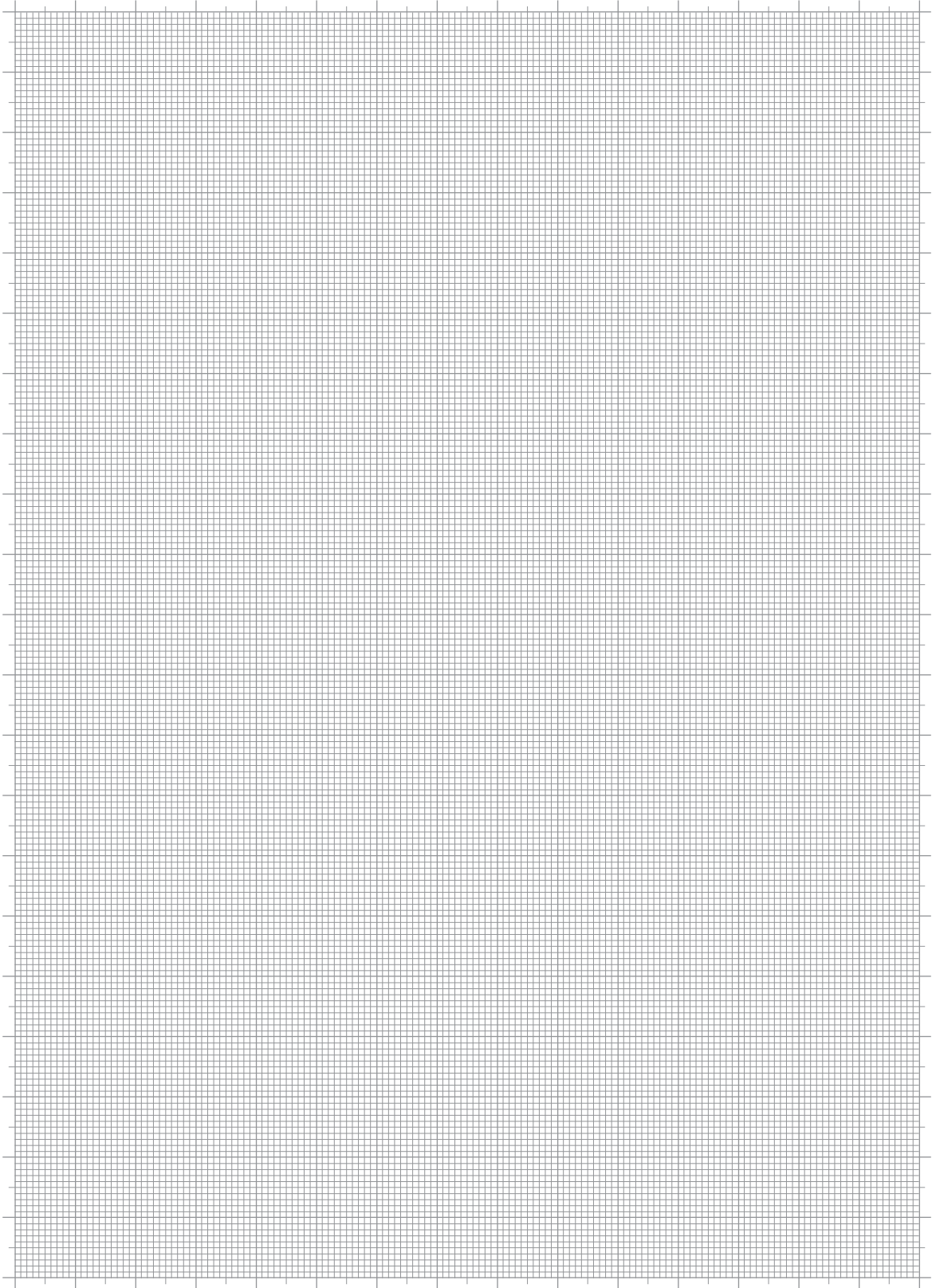
† = cepa silvestre diluida 10 veces, ‡ = mutante diluida 40 veces

7.3. Resultados.

Muestra	A 420 nm	nmoles gluc.	nmoles/min	mU/ml	mU/mg
Silvestre					
Silvestre					
Mutante					
Mutante					

⁴ Composición del reactivo: glucosa oxidasa 1000 U/l, peroxidasa 5 mg/l, ABTS 0,6 g/l en tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7. Para preparar la mezcla, añadir a 1 l de tampón: 1 ml de glucosa oxidasa comercial y 5 mg de peroxidasa. En el momento de usar se añaden 0,6 g de ABTS.

Título:



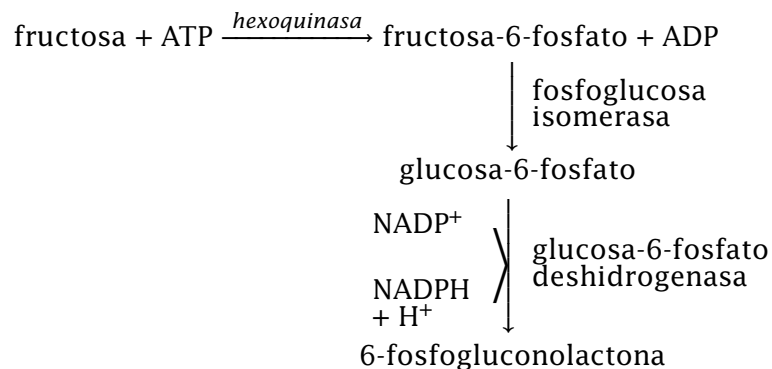
PRÁCTICA Nº 8

Determinación de la hexoquinasa

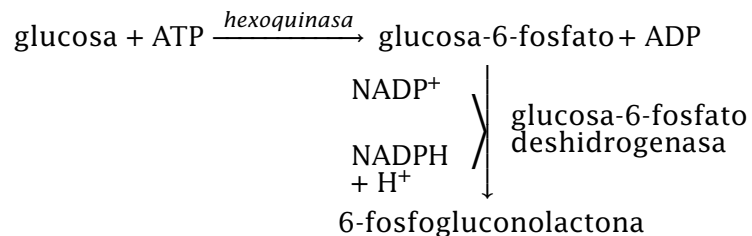
8.1. Fundamento.

La hexoquinasa cataliza *in vivo* la fosforilación de hexosas (glucosa y fructosa), siendo el ATP el donador de los grupos fosforilos. Para determinar la actividad *in vitro* distinguiremos dos casos, según cuál sea el sustrato utilizado:

1. Con fructosa como sustrato. El producto de la reacción es fructosa-6-P cuya concentración en la mezcla de reacción se determina indirectamente por medio de reacciones acopladas catalizadas por la fosfoglucosa isomerasa que cataliza la formación de una molécula de glucosa-6-P a partir de una de fructosa-6-P. La glucosa-6-P por acción de la glucosa-6-P deshidrogenasa en presencia de NADP^+ se oxida de forma que por cada molécula de glucosa-6-P oxidada se formará una de NADPH. La velocidad de formación de este compuesto nos permite determinar la concentración de hexoquinasa existente en la muestra.



2. Con glucosa como sustrato



A 340 nm se mide el incremento de absorbancia debido a la aparición de NADPH, de forma que por cada mol de glucosa, o de fructosa, que se consume por acción de la hexoquinasa, aparece un mol de NADPH. El coeficiente de extinción molar del NADPH a 340 nm es $6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

8.2. Procedimiento.

1. Preparar 10 ml de cada mezcla de reacción⁵ mezclando en dos tubos:
 - en uno de los tubos (para medir la fosforilación de la glucosa), 9 ml de glucosa 10 mM MgCl₂ 7,5 mM en Tris/HCl 20 mM pH 7,5,
 - en el otro tubo (para medir la fosforilación de la fructosa), 9 ml de fructosa 10 mM MgCl₂ 7,5 mM en Tris/HCl 20 mM pH 7,5,
 - 200 µl de NADP⁺ 30 mM,
 - 500 µl de ATP 15 mM, y
 - 200 µl de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (100 U/ml).
 - en el tubo para medir la fosforilación de la fructosa, se añaden además 100 µl de fosfoglucosa isomerasa (400 U/ml).
2. Pipetear en la cubeta del espectrofotómetro, termostata a 25°C, 1 ml de mezcla de reacción;
3. Comenzar la reacción añadiendo **10 µl** de extracto en el caso de la **cepa silvestre** y **50 µl** en el de la **cepa mutante**;
4. Seguir la reacción en el registrador, midiendo incrementos de absorbancia a 340 nm.

8.3. Cálculo de la relación de fosforilación fructosa/glucosa en cada muestra.

Cepa	Medio	$\Delta A_{340}/\text{min}$	U/ml	U/mg
Silvestre	Glucosa			
Silvestre	Fructosa			
Mutante	Glucosa			
Mutante	Fructosa			

⁵ Composición de la mezcla de reacción: NADP⁺ 0,48 mM, ATP 0,65 mM, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 0,7 U/ml, glucosa o fructosa 10 mM y fosfoglucosa isomerasa 4 U/ml si el sustrato es fructosa.