

**DEPARTAMENTO DE
BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**GRADO EN MEDICINA
PRÁCTICAS DE BIOQUÍMICA**

Curso: /

Nombre y apellidos:

Grupo:

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,	7
Gradillas,	2
Tubos de ensayo,	20
Pera para pipeta o propipeta	1

CALENDARIO DE PRÁCTICAS

PRIMERA PARTE		
Día	Práctica nº	Título práctica
1	1	Preparación de tampones y medida electrométrica del pH
2	1	Continuación: medida de la capacidad de tamponamiento
3	2	Determinación del espectro de absorción del p-nitrofenol
4	3	Efecto del pH sobre la actividad de una fosfatasa
5	4	Determinación de la Km de la fosfatasa para el p-nitrofenil-fosfato

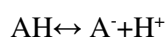
SEGUNDA PARTE		
Día	Práctica nº	Título práctica
1	5	Valoración enzimática de la glucosa
2	6	Purificación DNA plasmídico a partir de células de <i>Escherichia coli</i> .
3	7	Análisis de restricción de un DNA plasmídico
4	8	Estudio de la transcripción de un gen de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
5	9	Continuación: Determinación de proteína y cálculo de la actividad específica

PRÁCTICA N° 1

Preparación de tampones y medida electrométrica del pH

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 significativamente.



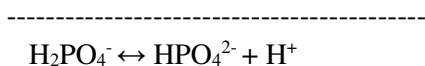
El pH de una disolución tampón se puede calcular mediante la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$pH = pK'_a + \log [A^-]/[AH]$$

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 amortiguación de dos de las disoluciones tampón preparadas y se comparará con la de una disolución 0,2 N de NaCl que no tiene capacidad de amortiguación.



1.2. Procedimiento.

Se preparan 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 ml	3 ml
2	15 ml	15 ml
3	8 ml	22 ml
4	5 ml	25 ml
5	2 ml	28 ml

1. Preparar 50 ml de una disolución 0,2 M de NaCl en agua destilada. Una disolución 0,2 M contiene 0,2 moles de soluto por litro de disolución. El peso molecular del NaCl es 58,44 g/mol.
2. Pipetear 3 ml de cada una de las disoluciones tampón anteriores en tubos de ensayo y conservarlas para su utilización en la práctica siguiente.
3. Medir los valores del pH obtenidos para cada una de las disoluciones anteriores en un pHmetro y compararlos con los calculados teóricamente de acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbach, considerando que $pK'_a = 6,8$.
4. Comprobar la variación en el pH del tampón producida por adición de distintos volúmenes de HCl 0,2 N y compararla con las variaciones observadas cuando esas mismas cantidades de ácido se adicionan a una disolución no tamponada. Utilizar para ello los tampones 1 y 2 y la disolución de NaCl. Medir el pH de cada una antes de hacer ninguna adición. Después, añadir a cada disolución sucesivamente 0,3 ml, 0,2 ml, 1,0 ml y 1,0 ml de HCl 0,2 N, midiendo en el pHmetro 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, además del de la disolución 0,2 M de NaCl, después de la primera y de la última adición de HCl:

HCl 0,2 N añadido (ml)	Tampón 1		Tampón 2		Disolución de NaCl	
	pH teórico	pH experimental	pH teórico	pH experimental	pH teórico	pH experimental
0						
0,3						
0,5	No calcular		No calcular		No calcular	
1,5	No calcular		No calcular		No calcular	
2,5						

3. ¿Cuál de las tres disoluciones es mejor tampón? ¿Por qué?.

Práctica N° 2

Determinación del espectro de absorción del p-nitrofenol

2.1. Introducción.

Algunas sustancias disueltas presentan determinados colores porque absorben luz de ciertas longitudes de onda comprendidas entre 400 nm y 700 nm (región visible del espectro) y dejan pasar luz de otras longitudes de onda. Existen otras sustancias, incoloras a simple vista, que son capaces de absorber la luz ultravioleta de longitud de onda inferior a 400 nm o la luz infrarroja con longitud de onda superior a 700 nm. Cada sustancia absorbe energía radiante de una u otra longitud de onda, siendo ésta una propiedad característica de dicha sustancia, tan invariable como pueden ser los puntos de ebullición o de fusión y que permite por lo tanto su identificación.

Cuando se hace pasar un rayo de luz monocromática (de una determinada longitud de onda) de intensidad inicial I_0 a través de una disolución de una sustancia colocada en un recipiente transparente, parte de la luz es absorbida de manera que la intensidad de la luz transmitida I es menor que I_0 . El grado de absorción de la luz depende de la longitud de onda y de la concentración de soluto en la disolución, de acuerdo con la ley de Lambert-Beer:

$$A = \log I_0/I = \log 1/T = \epsilon c l$$

siendo:

A = Absorbancia;

I_0 = Intensidad de la luz incidente;

I = Intensidad de la luz transmitida;

T = Transmitancia (proporción de la luz incidente que es transmitida);

ϵ = Coeficiente de extinción molar ($M^{-1}cm^{-1}$): absorbancia de una sustancia 1M a un pH y λ determinados;

c = Concentración del soluto (mol/l);

l = Espesor del medio (1 cm).

Para obtener el espectro de absorción de una sustancia se determina la absorbancia de una disolución de dicha sustancia a distintas longitudes de onda.

La absorbancia de una disolución se determina en un aparato denominado espectrofotómetro o colorímetro, que consta esquemáticamente de los componentes que muestra la figura 2.1:

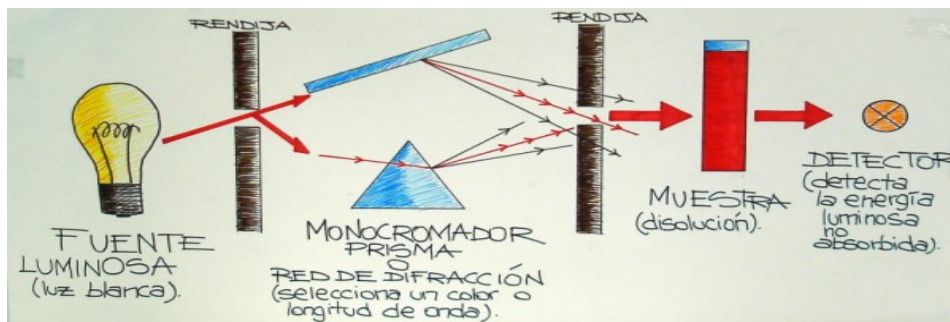
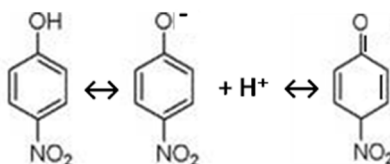


Figura 2.1. Esquema de un colorímetro

El espectro de absorción de una sustancia particular depende de sus propiedades físicas y químicas. La absorbancia máxima o mínima puede variar por modificaciones del pH, por el estado de óxido-reducción, por el solvente utilizado, etc.

En esta práctica, se determina el espectro de absorción del p-nitrofenol. Este compuesto se disocia como se muestra en el esquema siguiente:



La forma no disociada, que está presente en medio ácido, no absorbe en el rango visible mientras que la estructura quinoide, presente en el medio alcalino, sí lo hace.

2.2. Procedimiento.

Se toman los 5 tubos de ensayo que contienen los 3 ml de cada una de las disoluciones tampón preparadas en la práctica anterior y un sexto tubo con 3 ml de Na_2CO_3 0,1 M y a cada uno de ellos se les añaden 0,1 ml de una disolución de p-nitrofenol 0,75 mM.

Con el tubo sexto se determina el espectro de absorción del p-nitrofenol. Para ello se selecciona la longitud de onda de 360 nm en el colorímetro y se comprueba que la aguja de la escala marca ∞ de absorbancia. A continuación, se introduce un tubo del colorímetro conteniendo 3 ml de Na_2CO_3 0,1 M y se ajusta el aparato para asignarle cero de absorbancia. Este tubo actúa como blanco, permitiendo restar para cada longitud de onda la absorbancia correspondiente a todos los componentes excepto el p-nitrofenol. Finalmente, se introduce otro tubo del colorímetro conteniendo la disolución de p-nitrofenol y se anota el valor correspondiente a su absorbancia. Repetir el proceso a 380, 390, 400, 410, 420, 440, 460, 480 y 500 nm.

Representar gráficamente (en la mitad de la hoja) los valores de absorbancia frente a la longitud de onda. Calcular, con el valor máximo de absorbancia obtenido, el coeficiente de extinción molar a ese pH y λ determinada.

Comprobar la influencia del pH del medio en la aparición de color midiendo la absorbancia en los tubos del experimento anterior a la longitud de onda máxima obtenida y ajustando el colorímetro con 3 ml de carbonato sódico 0,1 M. Representar (en la otra mitad de la hoja) dicha absorbancia frente al pH experimental de cada una de las 5 disoluciones tampón.

3.3. Resultados.

1. Determinación del espectro de absorción del p-nitrofenol:

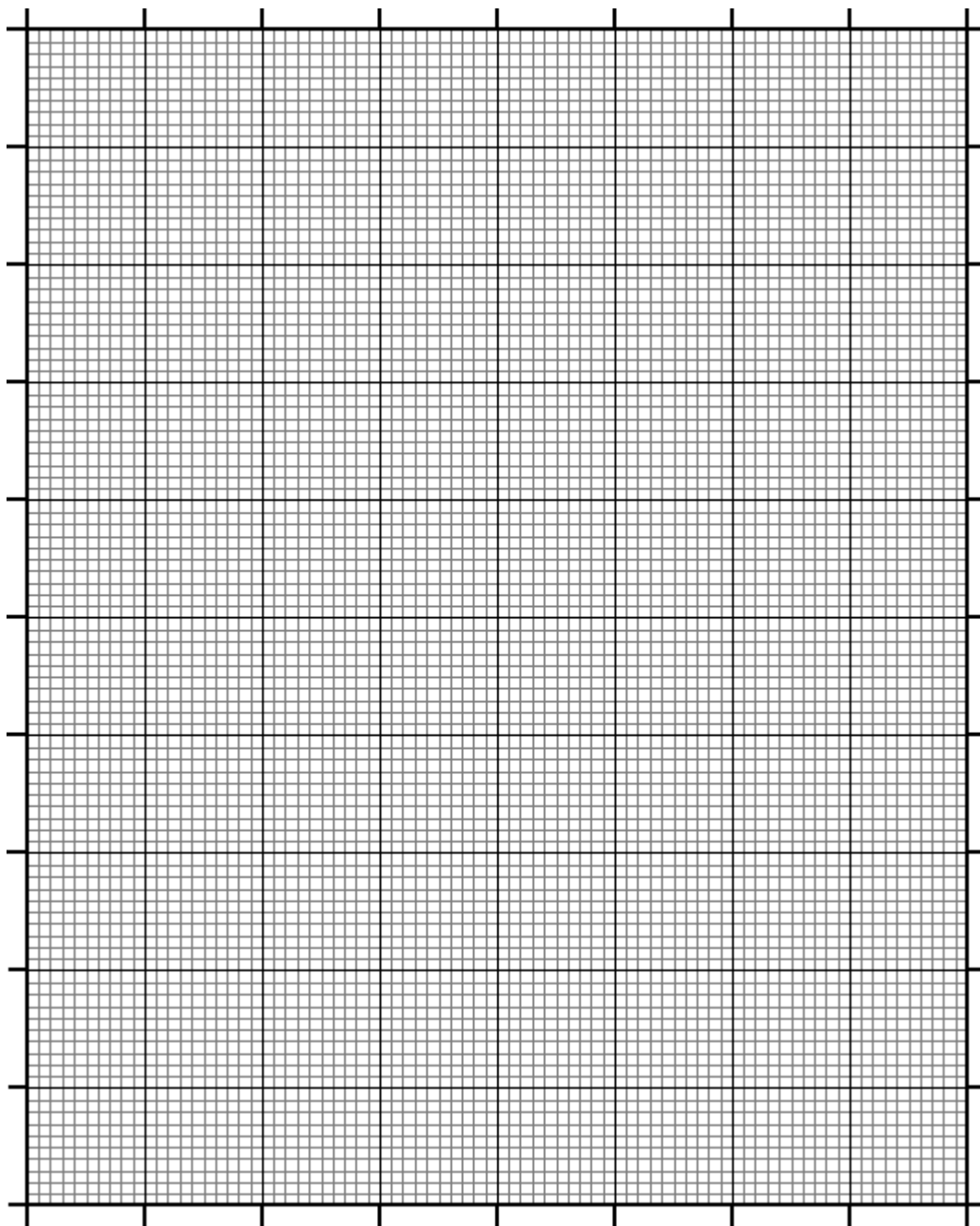
λ (nm)	360	380	390	400	410	420	440	460	480	500
A										

2. Influencia del pH del medio en la aparición de color:

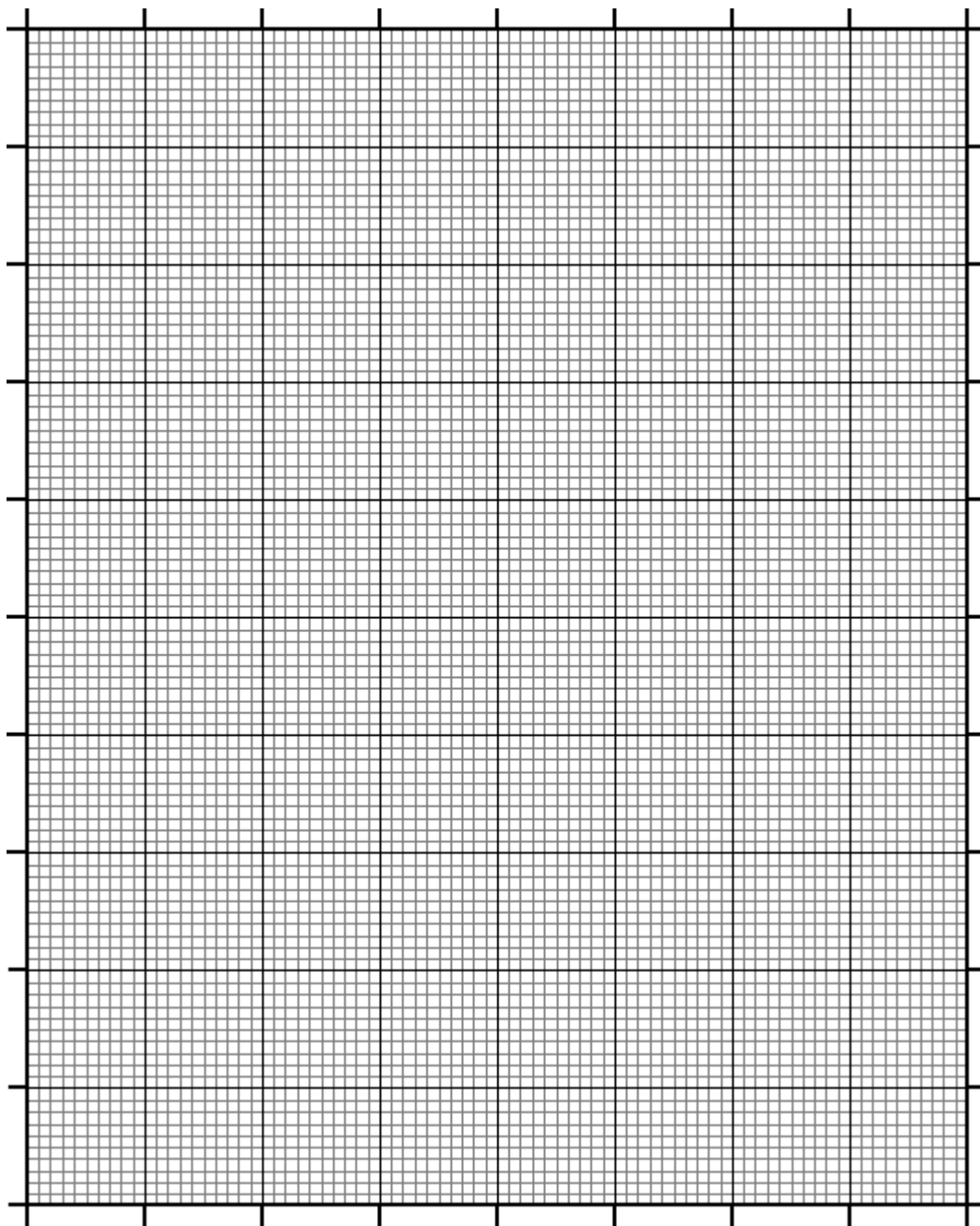
pH					
A (nm)					

3. Cálculo del coeficiente de extinción molar (ϵ) para el máximo de absorbancia:

Título:



Título:

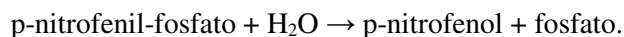


Práctica 3

Efecto del pH sobre la actividad de una 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 una fosfatasa purificada a partir de microorganismos. 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 llevarán a cabo reacciones a la misma temperatura (30 °C), durante el mismo periodo de tiempo (15 minutos) y con 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, la cantidad de p-nitrofenol liberado será también mayor.

3.1.2. Determinación de la actividad de la fosfatasa.

La determinación de la actividad de la fosfatasa se realiza midiendo la concentración 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. 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. A partir de las absorbancias determinadas se puede calcular la concentración del producto de la reacción.

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 0,2 mg/ml	0 ml
2	0,6 ml de pH = 3	Idem	0 ml
3	0,6 ml de pH = 4	Idem	0 ml
4	0,6 ml de pH = 5	Idem	0 ml
5	0,6 ml de pH = 6	Idem	0 ml
6	0,6 ml de pH = 7	Idem	0 ml
7	0,6 ml de pH = 8	Idem	0 ml
8	0,6 ml de pH = 9	Idem	0 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 20 mM con un

intervalo de 30 s entre tubo y tubo. Mezclar bien los componentes con un agitador nada más iniciar la reacción en cada tubo. Dejar transcurrir la reacción durante 15 min en estas condiciones.

Detener la reacción con 3 ml de Na_2CO_3 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 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 430 nm.

Teniendo en cuenta el valor del coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol a 430 nm (ϵ_{430}), calcular los μmoles de p-nitrofenol liberados por minuto (unidades de actividad enzimática), cuando el enzima funciona en condiciones óptimas de pH y a la temperatura prefijada.

3.3. Resultados.

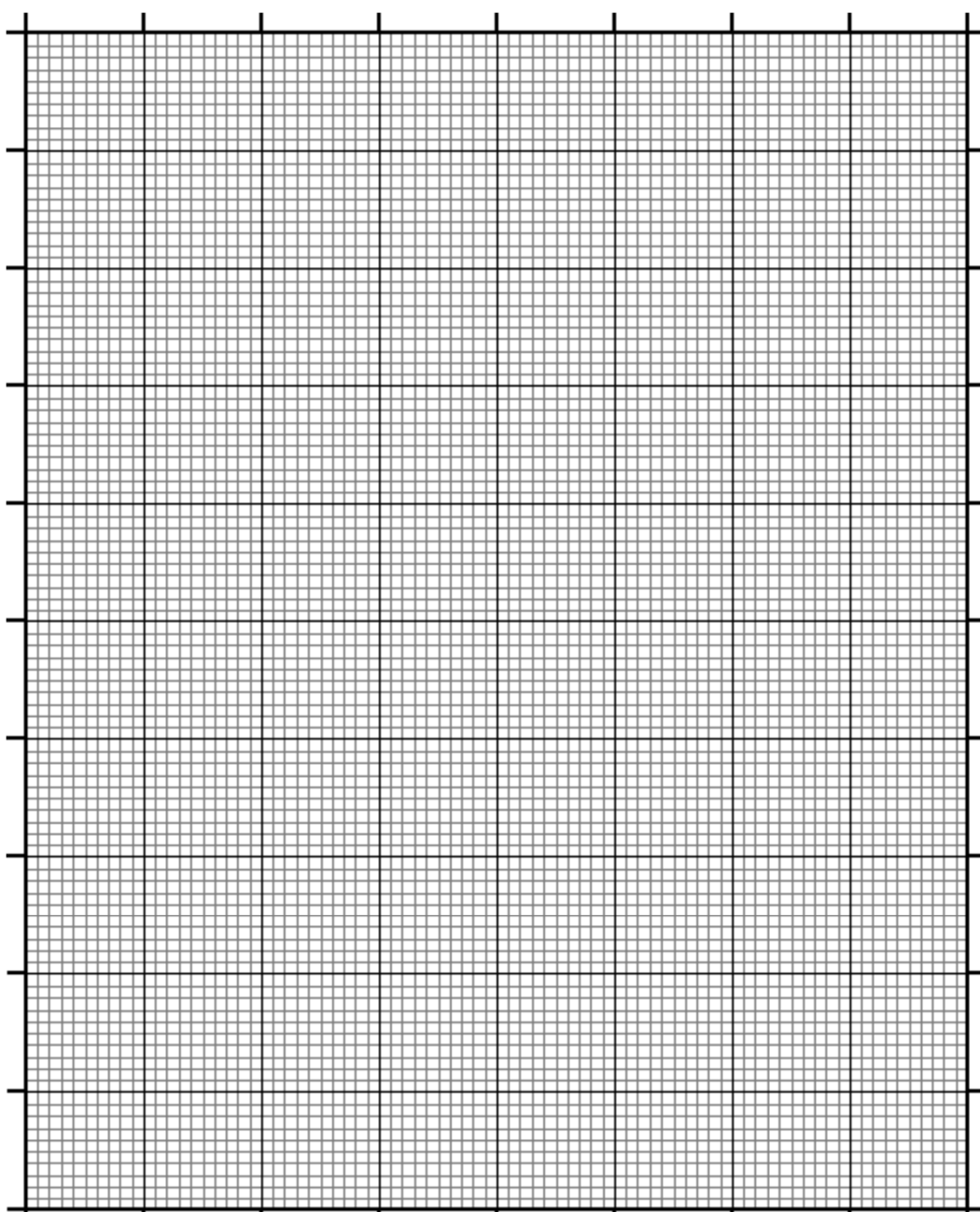
3.3.1. Determinación del pH óptimo.

Tubo	pH	A430nm
1	2	
2	3	
3	4	
4	5	
5	6	
6	7	
7	8	
8	9	

3.3.2. Cuantificación de la actividad enzimática (Unidades internacionales/ml).

A partir de los datos de la tabla anterior calcular los μmoles de p-nitrofenol liberado por minuto para el valor óptimo de pH y referirlos a cada ml de la disolución original de enzima utilizada.

Título:



Práctica 4

Determinación de la K_m de la fosfatasa para el p-nitrofenil 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 determinación de la K_m de la fosfatasa ácida para el p-nitrofenil-fosfato se realiza llevando a cabo varias reacciones con una cantidad constante de enzima y en las mismas condiciones experimentales pero con diferentes concentraciones del sustrato p-nitrofenil fosfato. 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. Aunque el máximo de absorción del p-nitrofenol se encuentra a 400 nm (práctica 2), mediremos a 430 nm para evitar interferencias del p-nitrofenil fosfato, cuyo espectro de absorción solapa con el del p-nitrofenol.

4.2. Procedimiento.

Numerar los tubos de ensayo y colocarlos en la gradilla.

Poner en cada tubo los siguientes reactivos:

Tubo	Agua	p-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
Blanco	400 μ l	400 μ l de 2 mM	200 μ l

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

Seguidamente, introducir la gradilla en un baño graduado a 30°C y añadir a cada uno de los tubos **excepto al blanco**, 200 μ l de la disolución de fosfatasa ácida de 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 Na_2CO_3 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.

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} .

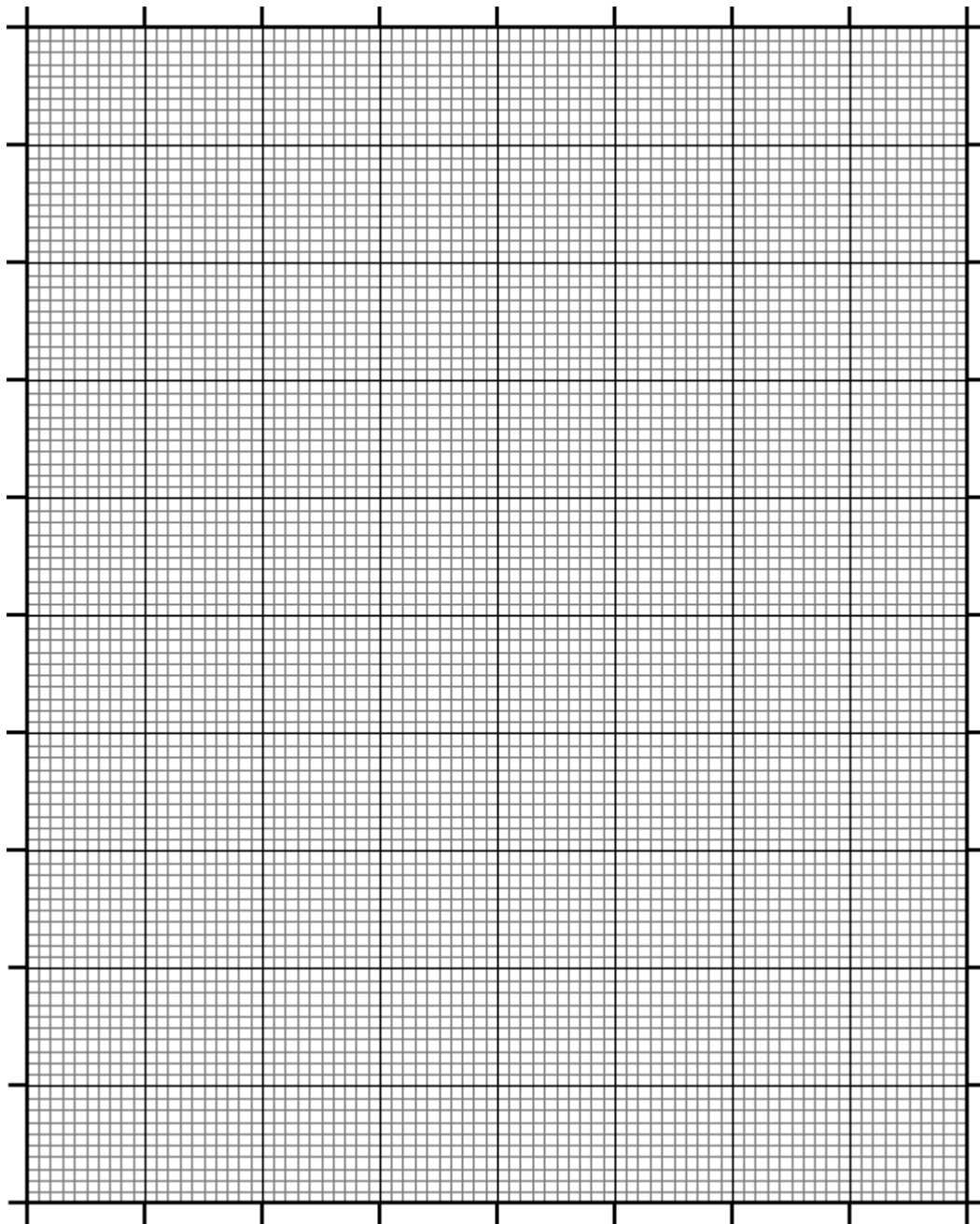
Representar gráficamente los inversos de las concentraciones (mM^{-1}) de sustrato frente a los inversos de las absorbancias medidas a 430 nm y calcular el valor de K_M a partir del punto de intersección con el eje de abscisas.

4.3. Resultados.

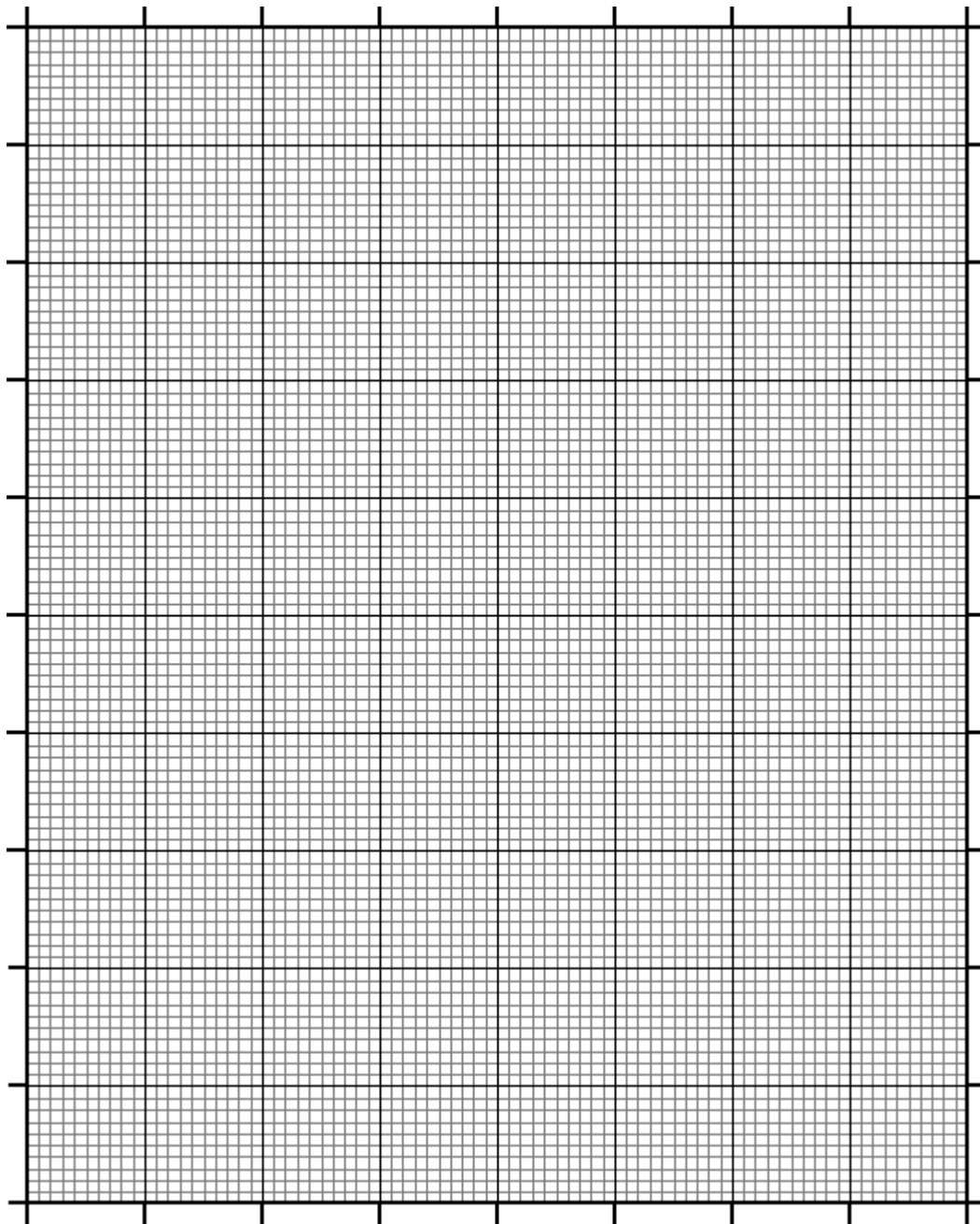
Tubo	[S] inicial	1/[S] inicial	$A_{430 \text{ nm}}$	1/ $A_{430 \text{ nm}}$
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				

1. K_m de la fosfatasa para el p-nitrofenil-fosfato. Expresarla en concentración mM de sustrato:

Título:



Título:



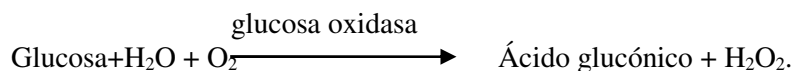
Práctica 5

Valoración enzimática de la glucosa: curva patrón

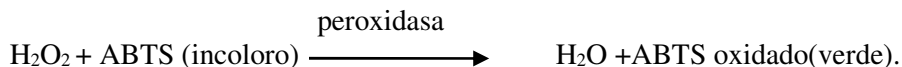
Una de las aplicaciones más frecuentes de la Enzimología en clínica, consiste en la utilización de enzimas como reactivos para medir la concentración de metabolitos de interés clínico, tales como glucosa, colesterol, etc. En estas condiciones, el metabolito cuya concentración se intenta determinar es 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 (mmoles 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 inoloro hasta que resulta oxidado.

5.1. 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 µl Glucosa 0,5 mM	200 µl
2	100 µl Glucosa 0,5 mM	150 µl
3	150 µl Glucosa 0,5 mM	100 µl
4	200 µl Glucosa 0,5 mM	50 µl
5	250 µl Glucosa 0,5 mM	0 µl
6	125 µl disolución problema	125 µl
Blanco	-----	250 µl

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

Mantener la reacción durante 15 minutos y detenerla 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.

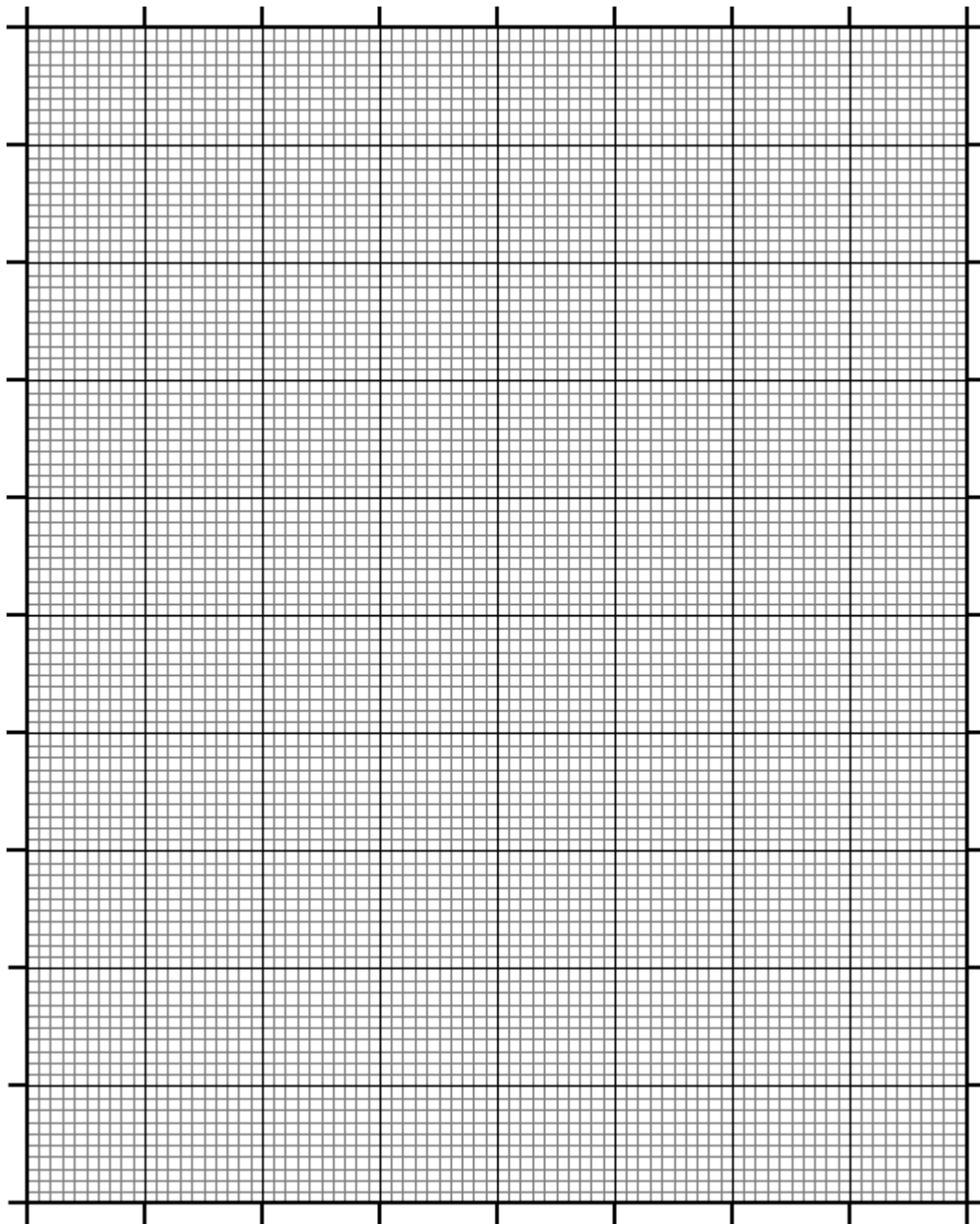
5.2. Resultados.

Tubo	Glucosa (nmoles)	A _{420nm}
1		
2		
3		
4		
5		
6	disolución problema	

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

-
1. Reactivo de glucosa oxidasa-peroxidasa-ABTS: disolución de tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7,0 con 1 ml de glucosa oxidasa 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:



Práctica 6

Purificación de DNA plasmídico a partir de células de *Escherichia coli*.

6.1. Introducción.

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico, circulares y de pequeño tamaño (2-10 Kpdb), que se encuentran en muchas especies bacterianas. A diferencia del DNA cromosómico, estas moléculas no son necesarias para la viabilidad general de la célula, aunque pueden contener genes, como los que confieren resistencia a antibióticos, que contribuyen a la supervivencia en condiciones especiales. Algunas clases de plásmidos poseen además la propiedad conocida como replicación relajada, estando presentes en un gran número de copias por célula, lo que facilita enormemente su aislamiento y purificación, algo esencial en un vector de clonación.

Para ser utilizado como vector de clonación, un plásmido ideal debe poseer la capacidad de replicación autónoma, ser lo más pequeño posible para permitir un fácil aislamiento y manejo y contener secuencias únicas de reconocimiento por parte de los enzimas de restricción y marcadores genéticos selectivos. La mayoría de los plásmidos naturales no cumplen todas estas condiciones, por lo que una de las primeras tareas de la Tecnología del DNA Recombinante consistió en la construcción de plásmidos artificiales, combinando en una molécula pequeña las características útiles procedentes de los plásmidos naturales.

El plásmido pBR322 (Fig. 6.1 en la página siguiente) es uno de los plásmidos artificiales que más popularidad ha alcanzado y es uno de los precursores de la mayoría de los vectores utilizados actualmente.

Las características más importantes de este plásmido son las siguientes:

- Tiene un tamaño de 4,3 kb (pequeño).
- Posee un origen de replicación de tipo relajado.
- Contiene dos genes de resistencia a los antibióticos ampicilina y tetraciclina,
- lo que permite seleccionar las bacterias que portan este plásmido gracias a su
- capacidad de crecer en presencia de dichos antibióticos.
- Tiene sitios únicos de restricción, en donde se pueden insertar fragmentos de
- DNA exógenos.

El objetivo de esta práctica consiste en la purificación del plásmido pBRL7 (Fig. 6.2 en la página siguiente) derivado de pBR322, que está contenido en una cepa de la bacteria *E. coli*.

El método que se llevará a cabo para la purificación del plásmido pBRL7 se denomina lisis alcalina, que se basa en la desnaturalización selectiva del DNA cromosómico mediante alcalinización con NaOH, en condiciones en las que el DNA plasmídico permanece en su estructura nativa. Después de neutralizar, el DNA cromosómico forma un precipitado insoluble y gran parte de las proteínas y el RNA también precipitan por tratamiento con SDS y alta concentración de sales.

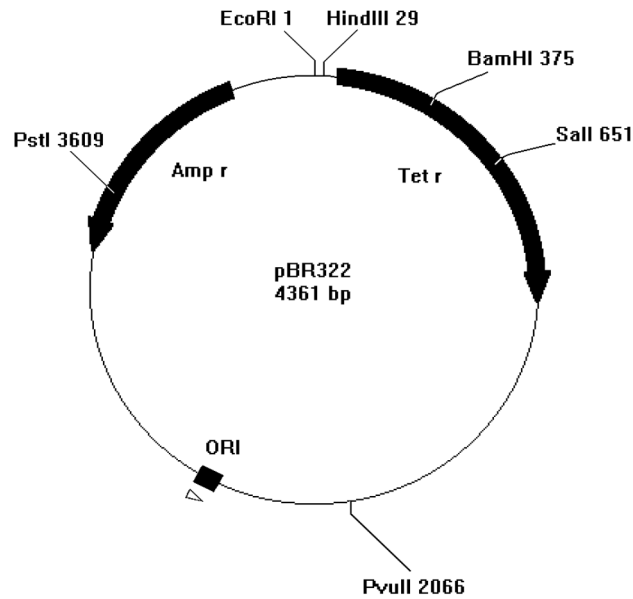


Figura 6.1: Plásmido pBR322.

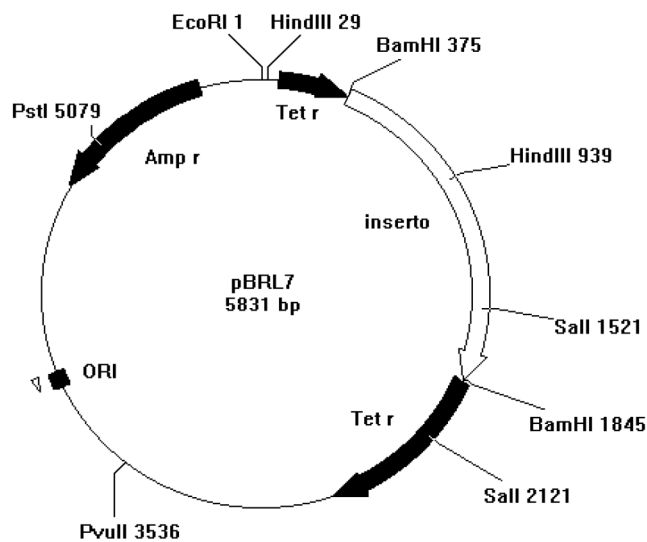


Figura 6.2: Plásmido pBRL7

Las características más importantes del plásmido pBR322 son las siguientes:

- Tiene un tamaño de 4,3 kb (pequeño).
- Posee un origen de replicación de tipo relajado.
- Contiene dos genes de resistencia a los antibióticos ampicilina y tetraciclina, lo que permite seleccionar las bacterias que portan este plásmido gracias a su capacidad de crecer en presencia de dichos antibióticos.

- Tiene sitios únicos de restricción, en donde se pueden insertar fragmentos de DNA exógenos.

6.2. Procedimiento.

El protocolo a seguir para la purificación del plásmido es el siguiente:

1. Poner en un tubo eppendorf 1,5 ml de un cultivo de E. coli que ha sido sembrado el día anterior. Centrifugar dicho tubo 2 min en una microcentrífuga. A continuación, eliminar el sobrenadante, dejando el sedimento de células lo más seco posible.
2. Resuspender el sedimento de células en 100 µl de agua destilada mediante el agitador o con ayuda de una punta de micropipeta¹.
3. Añadir al mismo tubo 200 µl de la disolución alcalina (SDS 1 %, NaOH 0,2 M)², la cual lizará las células. Agitar invirtiendo el tubo. La muestra debe quedar clara y viscosa. Dejarlo incubar 2–3 min a temperatura ambiente. Si se incuba más tiempo, parte del DNA plasmídico se desnaturaliza.
4. Neutralizar con 150 µl de acetato potásico o sódico 3 M, pH 5. Agitar por inversión. Aparecerán agregados blancos al precipitar el DNA cromosómico. Incubar 2–3 min a temperatura ambiente.
5. Centrifugar 5 min en la microcentrífuga.
6. Pasar cuidadosamente utilizando una micropipeta³ el sobrenadante (aproximadamente 400 µl) a otro tubo eppendorf evitando tocar el sedimento. En este sobrenadante se encuentra el DNA plasmídico.
7. Precipitar el DNA añadiendo 1 ml de etanol absoluto frío (–20°C). Mezclar bien por inversión.
8. Centrifugar durante 10 min.
9. Descartar el sobrenadante. Utilizar una micropipeta evitando tocar el fondo. El plásmido se encuentra en el sedimento junto con RNA.
10. Lavar el sedimento con 500 µl de etanol al 70%. Volver a centrifugar como en el punto 8 y descartar el sobrenadante como en el punto 9.
11. Secar los tubos con plásmido al vacío o en una estufa a 60°C durante 15 min. Mientras tanto, si así lo indica el profesor, se preparará el gel que servirá para realizar una electroforesis en la práctica siguiente. La preparación del gel se explica en la sección **7.3.2**.
12. Después de secar la preparación de ácido nucleico, se resuspende en 20 µl de tampón TE conteniendo 0,1 mg/ml de RNAasa.
13. Pasar 10 µl de la suspensión de DNA a un tubo limpio. Añadir los enzimas de restricción correspondientes (sección **7.3.1**) e incubar a 37°C en una estufa hasta el día siguiente.

¹Opcionalmente, si así lo indica el profesor, se puede volver a centrifugar, retirar el sobrenadante y resuspender de nuevo con 100 µl de agua destilada.

²El SDS o dodecilsulfato sódico es un detergente que rompe la membrana bacteriana; el NaOH sirve para desnaturalizar el DNA cromosómico.

³Preferentemente de tipo P200.

Práctica 7

Análisis de restricción de un DNA plasmídico

Digestión de DNA con endonucleasas de restricción y visualización de los fragmentos obtenidos mediante electroforesis

7.1. Introducción.

Las endonucleasas de restricción son enzimas que reconocen secuencias específicas de DNA de doble cadena y cortan ambas hebras de la molécula. Habitualmente el corte se produce dentro de la secuencia de reconocimiento, originando fragmentos con extremos romos o fragmentos con extremos cohesivos (Fig. 7.1). Esta propiedad es muy importante porque permite unir fácilmente dos fragmentos de DNA de orígenes distintos, siempre que hayan sido cortados con un mismo enzima de restricción. Esto se traduce en la práctica, en la formación de moléculas de DNA híbridas, lo que constituye la base de la Tecnología del DNA Recombinante.

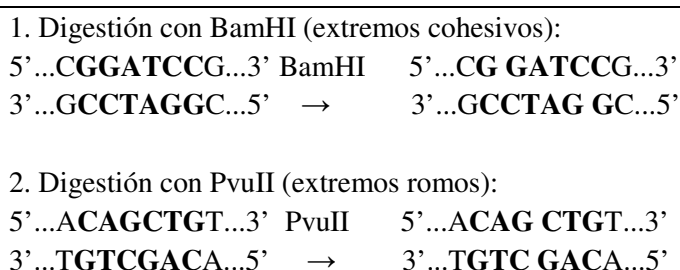


Figura 7.1: Digestiones con endonucleasas de restricción

El análisis de los fragmentos de DNA generados por la digestión con enzimas de restricción se realiza generalmente mediante electroforesis en geles de agarosa.

El método se basa en que, a pH neutro o alcalino, los grupos fosfato del DNA confieren a la molécula carga neta negativa que está uniformemente distribuida. Para moléculas de DNA de la misma conformación, sometidas a unas mismas condiciones electroforéticas, la velocidad de migración depende sólo de su tamaño, puesto que las moléculas mayores tendrán más dificultad para atravesar los poros del gel que las más pequeñas.

Se puede asumir, dentro de ciertos límites, que la movilidad electroforética de un fragmento de DNA es inversamente proporcional al logaritmo de su longitud. Gracias a esto, utilizando unos patrones de tamaños conocidos, se podrán calcular las longitudes de los fragmentos de DNA obtenidos al digerir un plásmido con enzimas de restricción.

7.2. Objetivo.

El objetivo de esta práctica consiste en la digestión con endonucleasas de restricción del plásmido obtenido el día anterior, la separación electroforética de los fragmentos generados y el análisis del tamaño de los mismos para elaborar un mapa de restricción de la molécula de DNA.

7.3. Procedimiento.

7.3.1. Digestión con las endonucleasas de restricción.

La reacción se lleva a cabo en tubos eppendorf. Añadir a un tubo:

- 10 µl de la disolución de DNA plasmídico.
- 10 µl de una mezcla que contiene agua destilada, el tampón adecuado y un enzima de restricción (*EcoRI*, *HindIII* o *BamHI*) en proporción 7:2:1, respectivamente.

Agitar suavemente golpeando el tubo con el dedo e incubar en un baño a 37°C durante al menos dos horas (puede hacerse el día anterior y dejarse incubando durante la noche).

7.3.2. Preparación del gel para la electroforesis.

Limpiar con etanol una navecilla y sellarla por los lados con cinta adhesiva.

Se utiliza agarosa al 0,7% en tampón TBE pH= 8,3. Pesar 1,4 g de agarosa en un erlenmeyer. Añadir 200 ml de tampón TBE, tapar con un erlenmeyer pequeño invertido y fundir en un horno microondas. ¡**ATENCIÓN** porque ahora vamos a añadir bromuro de etidio (0,25 µg /ml final) que es un poderoso **agente mutagénico!**. **USAR GUANTES.**

Verter la mezcla en la navecilla y colocar el peine cerca de uno de los bordes de la misma. Dejar que la agarosa solidifique sin mover la navecilla.

El bromuro de etidio se intercalará entre las bases del DNA y emitirá fluorescencia en el rango visible del espectro electromagnético, tras ser irradiado con luz ultravioleta, permitiendo visualizar fragmentos de DNA.

Una vez solidificado el gel, retirar el peine y observar los pocillos formados. Retirar las cintas adhesivas. Si no se va a utilizar el gel hasta el día siguiente, envolverlo en un plástico y dejarlo en la nevera hasta entonces.

7.3.3. Preparación de la muestra.

Una vez transcurrido el tiempo de digestión de la muestra de DNA, añadir, antes de cargarla en el gel, 5 µl de tampón de la muestra de electroforesis. Esta disolución contiene glicerol (un agente densificante que sirve para que las muestras sedimenten en el fondo de los pocillos) y azul de bromofenol (un colorante de pequeño tamaño molecular que sirve para controlar la migración del frente de la electroforesis).

7.3.4. Electroforesis.

Colocar cuidadosamente cada muestra en un pocillo distinto del gel mediante una micropipeta automática. Reservar un pocillo, para colocar la muestra que contiene los fragmentos de DNA de tamaño conocido (patrones¹). Finalmente, conectar los electrodos del tanque de electroforesis a la fuente de alimentación, aplicando un voltaje constante de 80 V durante 2 a 3 horas.

7.3.5. Visualización y fotografía de los fragmentos de DNA.

Una vez terminada la electroforesis, se coloca el gel sobre un transiluminador que emite radiación ultravioleta (*) de una longitud de onda de 300 nm. Protegidos con una pantalla se puede observar durante unos segundos tras lo cual se puede fotografiar con una cámara Polaroid Land MP4.

(*) **¡ATENCIÓN!**

- El bromuro de etidio es un poderoso **agente mutagénico**. Usar guantes para la manipulación de los geles a partir de este momento.
- No exponerse a la luz ultravioleta sin la pantalla o máscara de protección correspondiente. Se puede sufrir quemaduras muy graves.

7.3.6. Determinación del tamaño de los fragmentos de DNA.

Sobre la fotografía del gel de electroforesis, medir la distancia recorrida por las bandas, desde el centro del pocillo hasta la banda, tanto de la muestra como de los patrones.

Representar gráficamente en papel semilogarítmico el tamaño de los fragmentos de DNA patrón (en pares de bases) frente a las distancias recorridas. Trazada la recta patrón, interpolar las distancias recorridas por los DNAs problema para estimar su tamaño.

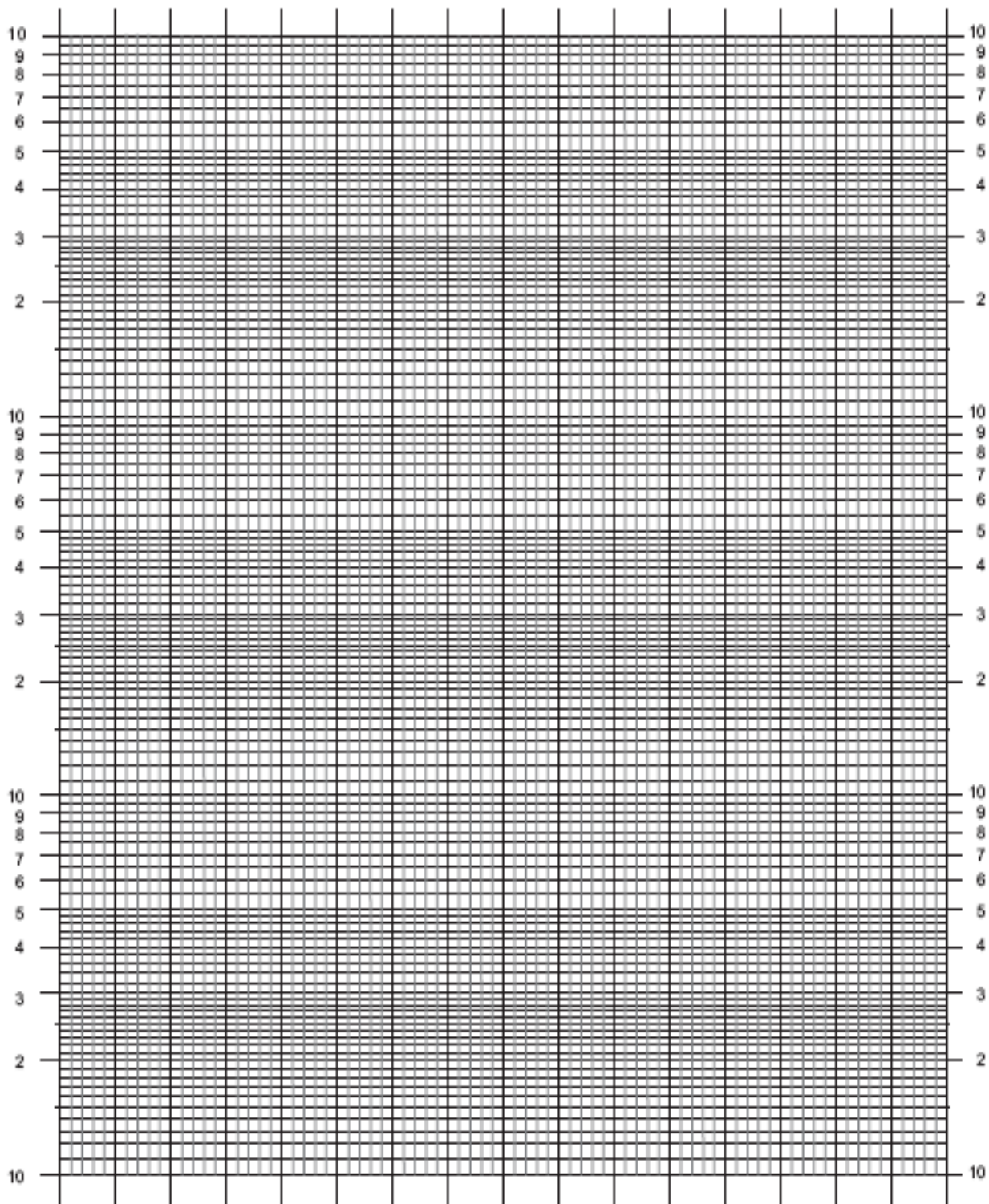
Los tamaños de los fragmentos de DNA patrón (marcadores de tipo III de Boehringer) son: 21226, 5148, 4973 (estos dos últimos aparecen como un doblete), 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831 y 564 pb.

7.4. Resultados.

Endonucleasa	Tamaño DNA teórico	Tamaño DNA observado

(1) Poner 0,3 µg de DNA patrón

Título.



Práctica 8

Estudio de los elementos reguladores de la transcripción de un gen de *Saccharomyces cerevisiae*

8.1. Introducción.

El inicio de la síntesis de RNA mensajero de un gen depende de factores que actúan sobre elementos específicos de su promotor, en respuesta a cambios fisiológicos. Es decir, se requieren dos componentes: elementos que actúan en *cis* y factores que actúan en *trans*. En esta práctica estudiaremos algunos de los elementos necesarios para la regulación transcripcional del gen codificador de la glucoquinasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

En levaduras, los elementos (secuencias) que actúan en *cis*, si exceptuamos la caja TATA, pueden ser agrupados en dos tipos: elementos reguladores positivos y negativos. Los positivos se denominan UAS (upstream activating sequences) y los negativos URS (upstream repressing sequences).

Uno de los procedimientos más útiles para determinar la localización de elementos reguladores que actúan en *cis* es **efectuar deleciones en el promotor** del gen objeto de estudio y construir DNA recombinante que contenga dichas deleciones fusionadas en pauta con la región codificadora de un **gen informador o testigo**. El gen informador suele codificar un enzima del cual carece la célula huésped y que cataliza una reacción cuyo producto puede ser cuantificado fácilmente.

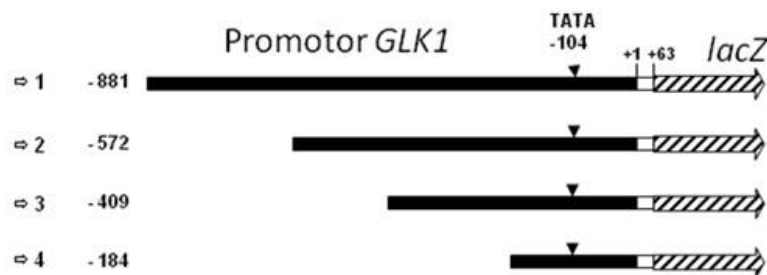


Figura 8.1: Promotor del gen *GLK1*

En el caso que nos ocupa, se parte de dos cultivos de levaduras, cada uno de los cuales, mediante técnicas de DNA recombinante, contiene un fragmento distinto del promotor del gen de la glucoquinasa de levaduras fusionado en pauta con el gen *lacZ*, codificador de la β -galactosidasa de *E. coli*. Después de romper las levaduras para obtener extractos proteicos, se ensaya la actividad específica de ambas proteínas de fusión. La comparación de ambos resultados nos indicará si en alguno de los dos casos existe un elemento regulador de la expresión del gen *GLK1*.

8.2. Procedimiento y resultados.

8.2.1. Ensayo de β -galactosidasa de las fusiones del gen *GLK1* con la región codificadora del gen *lacZ*.

1. Encender los 3 bloques térmicos y ajustarlos a 30°C.
2. Se parte de dos tubos eppendorf rotulados 184 y 409 conteniendo levaduras crecidas en medio rico YPD hasta $A_{600nm} = 1$. Se centrifugan 3 min en la microcentrífuga, se decanta el sobrenadante y el sedimento se resuspende muy bien en 300 μ l de tampón Z (tampón fosfato 100 mM) de pH 7.
3. Se añade a cada tubo un volumen, ya medido, de bolas de vidrio equivalente a 300 μ l. Se agitan a la vez ambos tubos en el agitador a velocidad máxima durante 7 periodos de 30 segundos con intervalos de 30 segundos en hielo.
4. Se centrifuga a velocidad máxima durante 5 minutos. Se pipetea todo el volumen de los sobrenadantes a tubos eppendorf limpios. Dichos sobrenadantes son los extractos celulares o extractos proteicos.
5. Se ponen 100 μ l del sobrenadante 184 y 20 μ l del sobrenadante 409 en tubos de ensayo limpios y rotulados convenientemente (**los 2 tubos con el resto de los sobrenadantes se los entregará al profesor, el cual se los devolverá el día siguiente para que realice el ensayo de proteínas en esos extractos celulares**). Se lleva hasta 800 μ l con tampón Z de pH 7. En un tercer tubo, se pipetean 800 μ l de dicho tampón, el cual nos servirá como blanco de la reacción.
6. Introducir los tubos en un bloque o baño a 30°C y no sacarlos hasta que hayamos detenido la reacción. Añadir 200 μ l de sustrato o-nitrofenil- β -D-galactósido de concentración 4 mg/ml. Contar el tiempo hasta la aparición del color amarillo debido al o-nitrofenol formado. Generalmente serán 5 minutos, pero dicho tiempo dependerá del número de células rotas. Se detiene la reacción con 3 ml de Na_2CO_3 1 M.
7. Medir la absorbancia a 410 nm ajustando el colorímetro a cero con el blanco

8.2.2. Resultados.

Calcular la actividad enzimática en unidades/ml de muestra (U/ml) utilizando el coeficiente de extinción molar (ϵ) del o-nitrofenol que es $4500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, tal como se explica a continuación:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

$$c \text{ (moles/litro)} = A / \epsilon \cdot l$$

siendo $l = 1 \text{ cm}$ el paso de luz

$$U/ml = \text{moles/l} \times \text{vol. ensayo (l)} \times 10^6 \mu\text{mol/mol} \times 1/t(\text{min}) \times 1/\text{vol. Extracto celular (ml)}$$

(Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol de sustrato en 1 minuto en condiciones óptimas de ensayo.)

Cálculos:

Muestra	Actividad (U/ml)
409	
184	

8.2.3. Ensayo de la concentración de proteína en los extractos celulares.

Para poder comparar los datos de actividad β -galactosidásica, es necesario que ambas muestras tengan el mismo número de células y que la rotura haya sido comparable en ambas muestras. Para corregir posibles variaciones se determina la concentración de proteína total en cada muestra y se comparan los datos de actividad específica (U/mg).

Con este fin utilizaremos el método de Lowry:

Práctica 9

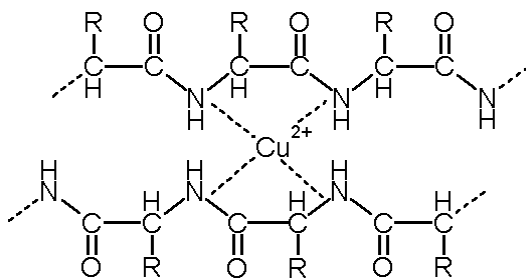
Determinación cuantitativa de proteínas

9.1. Introducción.

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, necesiándose 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.

9.2. Procedimiento.

Se dispone de una disolución de $150 \mu\text{g}/\text{ml}$ de la proteína albúmina de suero bovino (BSA) y de los extractos proteicos (problema) rotulados como 409 y 184.

En dos tubos Eppendorf limpios (rotulados también como 409 y 184) mezclar $50 \mu\text{l}$ de cada uno de los problemas con $100 \mu\text{l}$ de agua destilada (dilución 1:3).

En siete tubos de ensayo numerados se pipetea 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1,0 ml de la disolución de 150 $\mu\text{g/ml}$ de BSA. En el sexto y séptimo usando puntas limpias, 10 μl de la disolución problema 409 y 184 respectivamente. A continuación, se añade a cada uno de los tubos 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,0; 0,99 y 0,99 ml de agua destilada, respectivamente, y se prepara el denominado *tubo blanco* con 1,0 ml de agua (éste servirá para restar la absorbancia intrínseca de los reactivos).

A cada uno de los tubos se le añade 2,5 ml de la Solución C mezclando bien el conjunto. Al cabo de 10 minutos se añade a cada uno de los tubos 0,5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu. Se vuelve a agitar la mezcla y transcurridos 30 minutos se mide la absorbancia a 510 nm después de haber ajustado el colorímetro con el blanco de reacción que no contiene proteína.

Tubo	Disolución albúmina	Agua	Solución C(*)	Folin
1	0,2 ml de 150 $\mu\text{g/ml}$	0,8 ml	2,5 ml	0,5 ml
2	0,4 ml de “	0,6 ml	2,5 ml	0,5 ml
3	0,6 ml de “	0,4 ml	2,5 ml	0,5 ml
4	0,8 ml de “	0,2 ml	2,5 ml	0,5 ml
5	1,0 ml de “	0,0 ml	2,5 ml	0,5 ml
6	10 μl problema 409 (dil. 1:3)	0,99 ml	2,5 ml	0,5 ml
7	10 μl problema 184 (dil. 1:3)	0,99 ml	2,5 ml	0,5 ml
Blanco	-	1,0 ml	2,5 ml	0,5 ml

(*) Solución C: Mezcla de 25 ml de la solución A y 0,25 ml de las soluciones B1 y B2.

Solución A: Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0,1 N.

Solución B1: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1%.

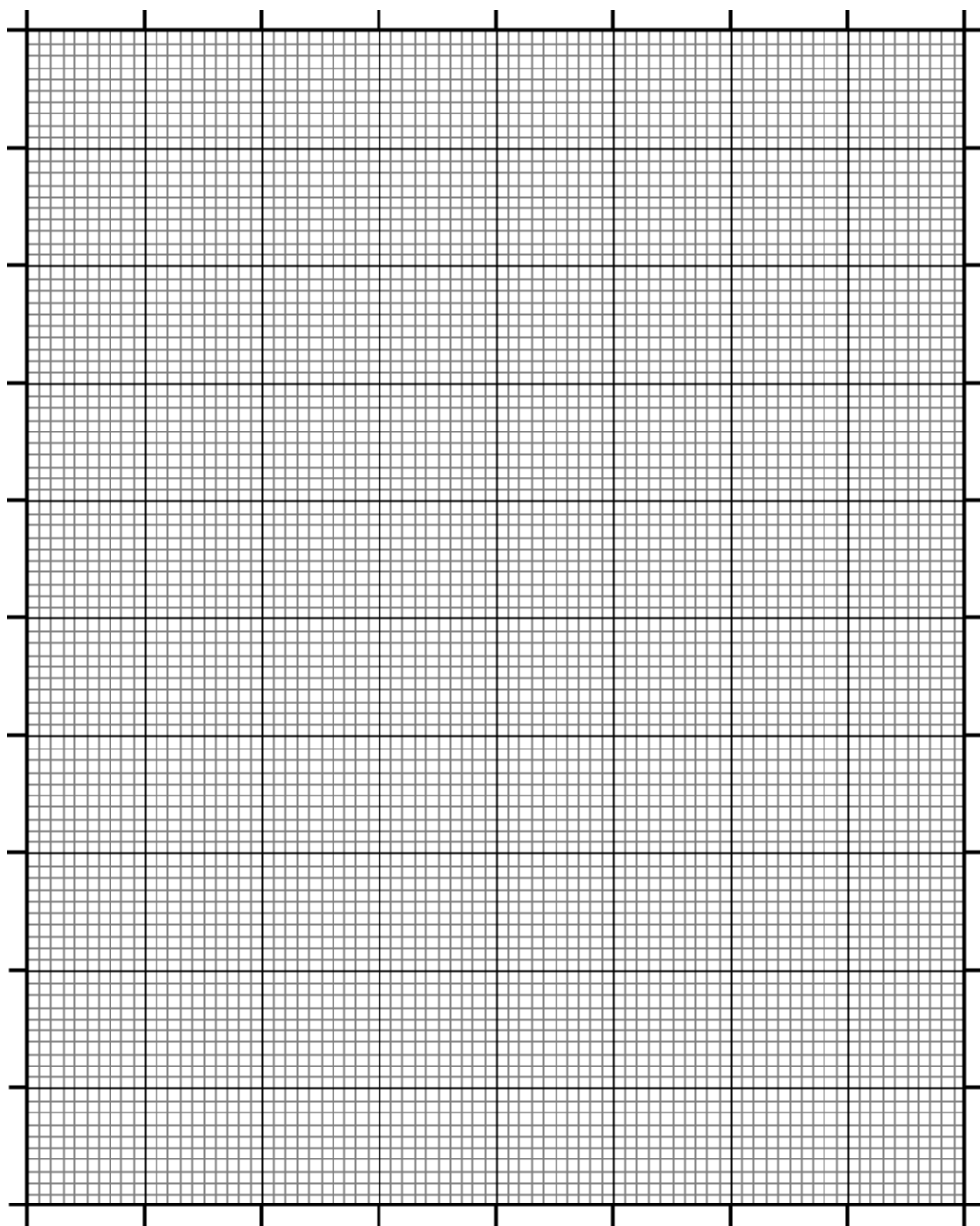
Solución B2: Tartrato sódico-potásico al 2%.

9.3. Resultados.

1. Se obtiene la recta patrón, representando en ordenadas la $A_{510\text{nm}}$ y en abscisas la cantidad de proteína (μg) que contiene cada uno de los tubos de ensayo.

Tubo	Albúmina (μg)	$A_{510\text{nm}}$
1		
2		
3		
4		
5		
6	Problema 409	
7	Problema 184	

Título:



1. Calcular los mg/ ml de proteína que existen en cada extracto proteico.

2. Calcular la actividad específica (U/mg) de la β -galactosidasa en cada extracto proteico.

Muestra	Actividad (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)
409			
184			

3. Deducir si hay algún elemento regulador de la transcripción en alguna de las dos fusiones realizadas.