

**DEPARTAMENTO
DE
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

GRADO EN BIOLOGÍA

PRÁCTICAS DE ANÁLISIS Y EVALUACIÓN BIOSANITARIA

Curso____/____

APELLIDOS:

NOMBRE:

GRUPO:

Análisis y evaluación biosanitaria (Grado de Biología)

Práctica 1 (Bioquímica)

Determinación de proteinuria por el método de Bradford

INTRODUCCIÓN.

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

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

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

REACTIVOS:

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

RECTA PATRÓN.

A partir del stock de BSA de concentración 25 µg/mL, preparar las muestras de concentración variable (de 0 a 12,5 µg/mL) según se indica en la siguiente tabla:

Tubo	Volumen de BSA 25µg/mL (µL)	µg proteína en ensayo	H ₂ O (µL)	A ₅₉₅
1	0	0	1600	
2	160	4	1440	
3	320	8	1280	
4	480	12	1120	
5	640	16	960	
6	800	20	800	

PROBLEMAS.

Las muestras de orina que se proporcionan estarán 10 o 20 veces diluidas con agua destilada, según se indique. Dispensar los volúmenes que se indican de cada orina diluida. Completar con agua destilada hasta un volumen final de 1600 μL .

Tubo	Identificación de muestra	Volumen de orina diluida (μL)	H ₂ O (μL)	A ₅₉₅
7	Problema 1	50	1550	
8	Problema 1	100	1500	
9	Problema 2	50	1550	
10	Problema 2	100	1500	

PROCEDIMIENTO.

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

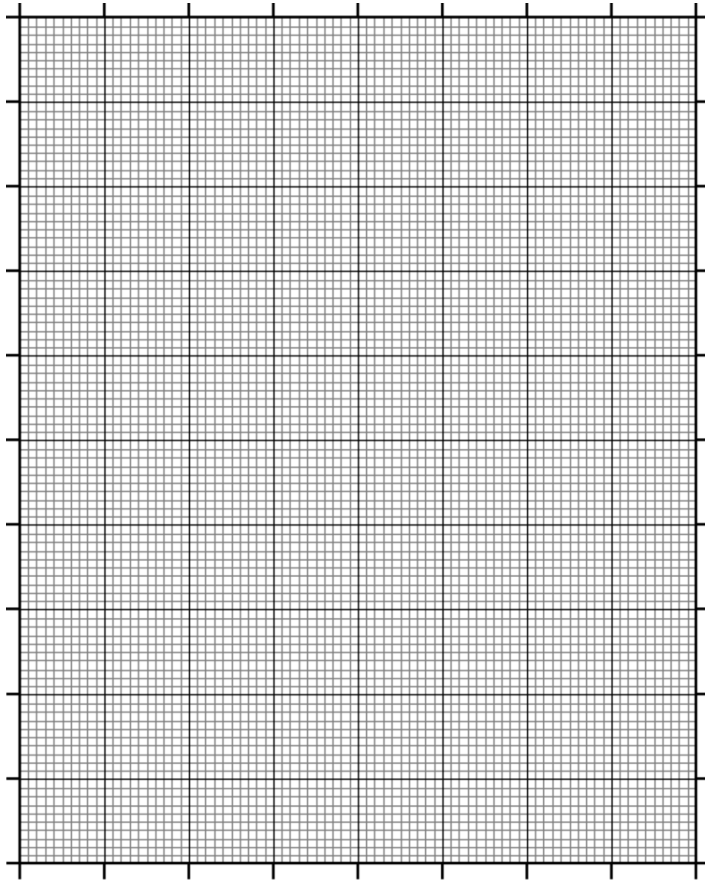
Determinar la A₅₉₅ transfiriendo cada muestra a una cubeta de espectrofotómetro.

RESULTADOS.

a) Datos de la recta patrón:

Tubo	Proteína ensayada (μg)	A ₅₉₅
1	0	
2	4	
3	8	
4	12	
5	16	
6	20	

b) Representar gráficamente los datos de la recta patrón (A_{595} frente a μg proteína).



c) Calcular la concentración de proteína de las orinas problema usando los datos de la recta patrón.

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

d) Indique la normalidad o anormalidad de las orinas que se le han entregado como problemas, así como una valoración de la gravedad de la proteinuria.

Análisis y evaluación biosanitaria (Grado de Biología)

Práctica 2 (Bioquímica)

Determinación de fosfatasa alcalina en suero sanguíneo

INTRODUCCIÓN.

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

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

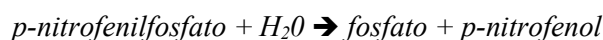
La siguiente tabla indica el rango de valores normales de fosfatasa alcalina en suero medidos a 37 °C.

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

REACTIVOS.

Reactivo de trabajo: se prepara mezclando los reactivos R1 (tampón dietanolamina 1,25 mol/L, pH 10,2; cloruro de magnesio 0,6 mmol/L) y R2 (p-nitrofenilfosfato: 50 mmol/L) en proporción 4:1 (*ya mezclados en el reactivo de trabajo proporcionado para la práctica*).

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



En disolución alcalina, el p-nitrofenol posee un color amarillo que puede ser determinado espectrofotométricamente, de forma que el p-nitrofenol liberado (absorbancia medida a 430 nm) será proporcional a la actividad de la fosfatasa presente.

PROCEDIMIENTO.

Se usarán los espectrofotómetros analíticos Beckman DU 800, Shimadzu UV-199i y Kontron UVIKON 930.

a) Preparación de la reacción.

- Las mezclas de reacción se prepararán en cubetas de 1 mL de capacidad pipeteando los volúmenes que se indican a continuación:

Reactivo/muestra	Cubeta 1 (Blanco)	Cubeta 2 Suero problema	Cubeta 3 Suero problema	Cubeta 4(*) Calibrador
Reactivo de trabajo	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL
Suero o calibrador	-	20 µL	20 µL	20 µL
Agua destilada	20 µL	-	-	-

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

La cubeta 1 actuará como blanco de la reacción y las cubetas 2, 3 y 4 servirán para medir la velocidad de la reacción enzimática. () En la cubeta 4 se medirá la velocidad de reacción con el **estándar interno o calibrador** en lugar de suero problema. Este estándar interno tiene una actividad conocida de fosfatasa alcalina, que se usará como referencia.*

b) Reacción enzimática.

- Transcurridos estos 5 minutos, añadir 20 µL de agua (cubeta 1), suero problema (cubetas 2 y 3) o calibrador (cubetas 4), mezclar por inversión usando un Parafilm y colocar en la cámara del espectrofotómetro. Iniciar la toma de datos para registrar la A₄₃₀ a intervalos de 1 min durante 10 minutos.

RESULTADOS.

- a) Recoger los datos suministrados por los espectrofotómetros [representación gráfica (A₄₃₀ vs. t) y tabla de datos de A₄₃₀].
- b) Determinar la pendiente (Incremento de A₄₃₀/min) de cada reacción.
- c) Calcular las unidades enzimáticas en cada suero (UI/L) comparando la pendiente de cada problema con la del estándar interno:

$$\frac{\Delta A_{430} \text{ suero problema} / \Delta t}{\Delta A_{430} \text{ estándar interno} / \Delta t} \times \text{UI/L estándar interno (calibrador)}$$

- d) Determinar cuáles de los sueros ensayados tienen niveles normales y cuáles niveles patológicos de fosfatasa alcalina.
- e) A partir de la pendiente de cada reacción, determinar la velocidad de la misma (µM de producto generado por minuto de reacción) a partir de la ecuación de Lambert-Beer: A=ε. c. l (ε₄₃₀ del p-nitrofenol es 10.000 M⁻¹. cm⁻¹).

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

Análisis y evaluación biosanitaria (Grado de Biología)

Práctica 3 (Bioquímica)

Electroforesis de proteínas del suero sanguíneo

INTRODUCCIÓN.

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

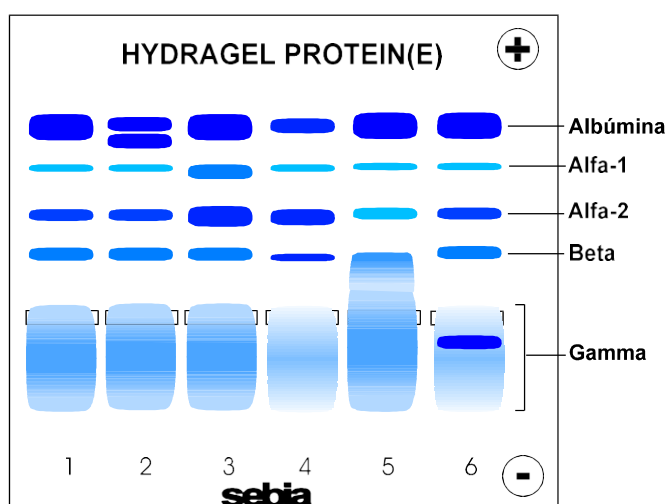
Las proteínas, que son moléculas anfóteras, adquieren en medio alcalino una carga global negativa que hace que emigren desde el polo negativo (cátodo) hacia el polo positivo (ánodo). Debido a ello, la electroforesis de zona es una técnica muy empleada para separar proteínas.

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

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

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

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



1. Suero normal.
2. Suero con bisalbuminemia
3. Síndrome inflamatorio agudo.
4. Síndrome nefrótico.
5. Cirrosis alcohólica con bloqueo β - γ .
6. Suero con hiper gamma globulina monoclonal.

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

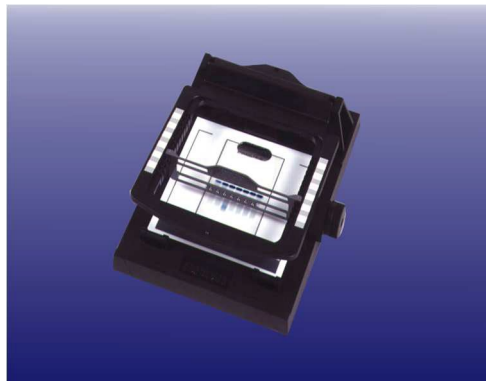
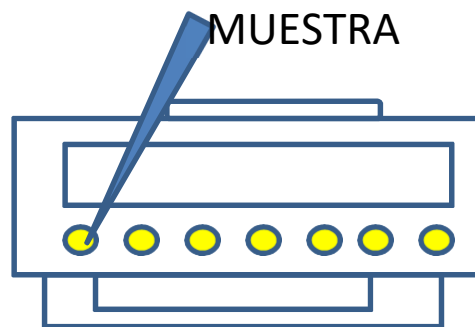
PROCEDIMIENTO.

a) Preparación del tampón de electroforesis.

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

b) Preparación y aplicación de la muestra.

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



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

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

Bajar el soporte para que el aplicador contacte con el gel y **dejarlo en esta posición durante 40 segundos**. Cuando haya pasado ese tiempo, girar la rueda para elevar el aplicador.

