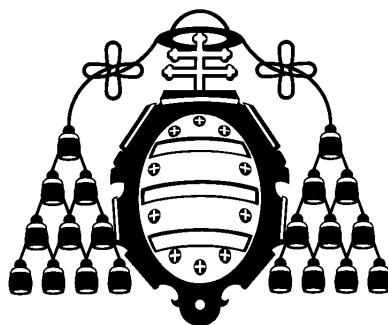


DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

GRADO EN QUÍMICA

PRÁCTICAS DE BIOQUÍMICA

Curso /

NOMBRE Y APELLIDOS:

CURSO Y GRUPO:

Taquilla nº:

19 de febrero de 2015
Qui-Bioq-jmpf
Laboratorio de Prácticas

Normas generales

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

MATERIAL DE LABORATORIO

Pipetas de 10 o 5 ml	3
Pipetas de 1 o 0,5 ml	3
Probeta de 100 ml	1
Frasco lavador	1
Vasos de precipitado de 250 o 100 ml	2
Tubos Falcon	7
Gradillas	2
Tubos de ensayo	20
Pera para pipeta o propipeta	1

Índice general

1. Efecto del pH sobre la actividad de la fosfatasa	1
2. Determinación de la K_m y de la K_i de la fosfatasa	5
3. Purificación del DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	9
4. Digestión de DNA y visualización mediante electroforesis	13

Práctica N^o 1

Efecto del pH sobre la actividad de la fosfatasa

1.1. Introducción.

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



1.1.1. Determinación del pH óptimo de la fosfatasa.

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

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

1.1.2. Determinación de la actividad de la fosfatasa.

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

1.2. Procedimiento.

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

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

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

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

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

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

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

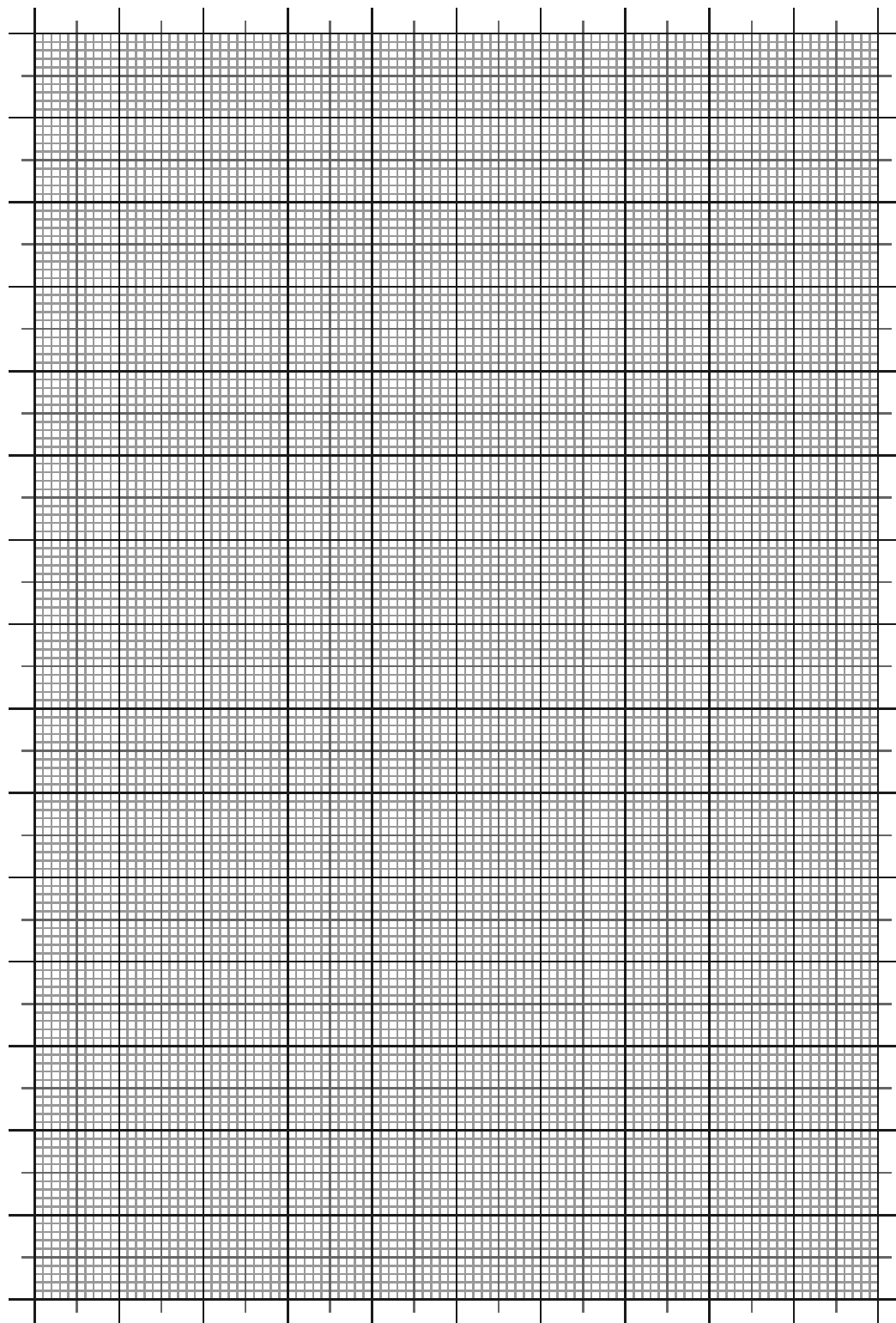
Teniendo en cuenta el valor del coeficiente de extinción molar (ϵ) del *p*-nitrofenol a 430 nm es $\epsilon_{430\text{nm}} = 11000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, calcular los μmoles de *p*-nitrofenol liberados por minuto (unidades de actividad enzimática), cuando el enzima funciona en condiciones óptimas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

1.3. Resultados.

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

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

Título:



Práctica N^o 2

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

2.1. Introducción.

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

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

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

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

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

La constante de inhibición (K_i) se define como:



y mide la afinidad del enzima por el inhibidor.

2.1.1. Determinación de la K_M .

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

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

2.1.2. 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.

2.2. Procedimiento.

Numerar los tubos de ensayo y colocarlos en la gradilla.

Poner en cada tubo los siguientes reactivos:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

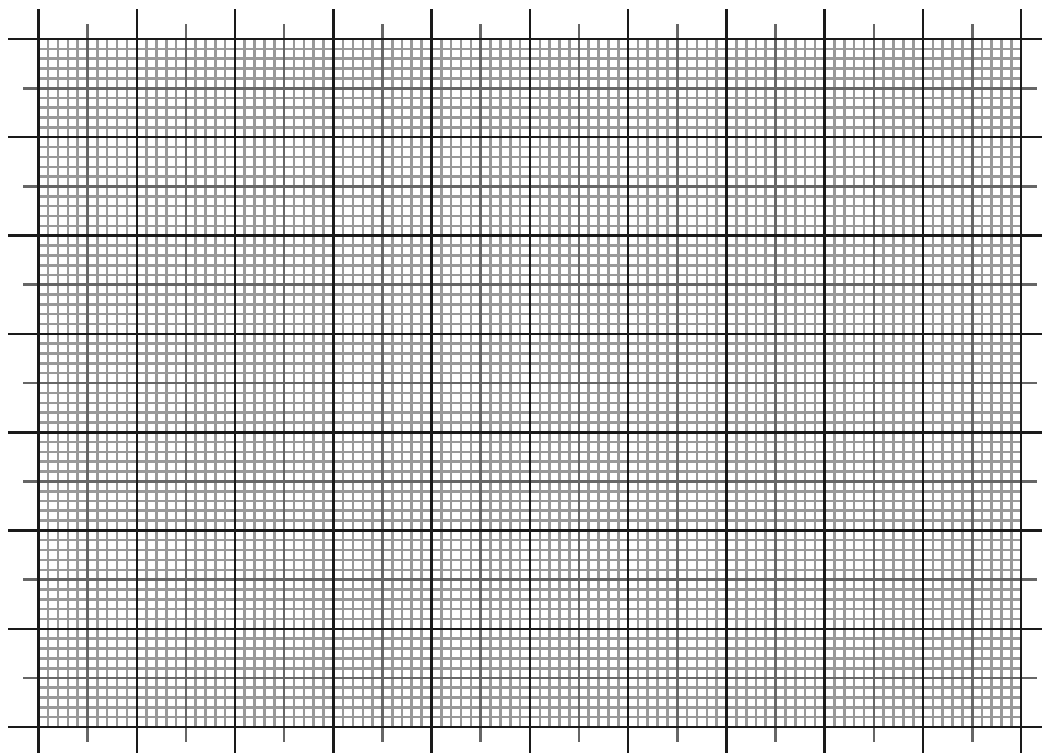
2.3. Resultados.

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

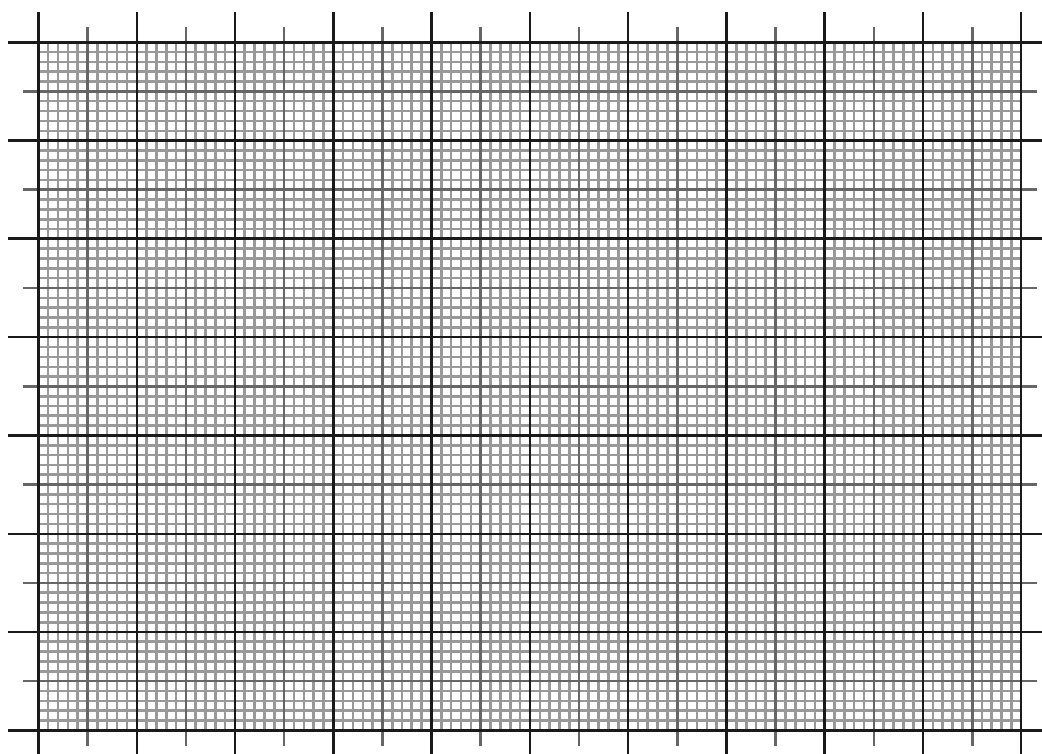
1. K_M (en mM) de la fosfatasa para el *p*-nitrofenil-fosfato:

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

Título



Título



Práctica N^o 3

Purificación del DNA plasmídico de *Escherichia coli*

3.1. Introducción.

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico, circulares y de pequeño tamaño, 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. 3.1 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. 3.2 en la página 11) derivado de pBR322, que está contenido en una cepa de la bacteria *E. coli*.

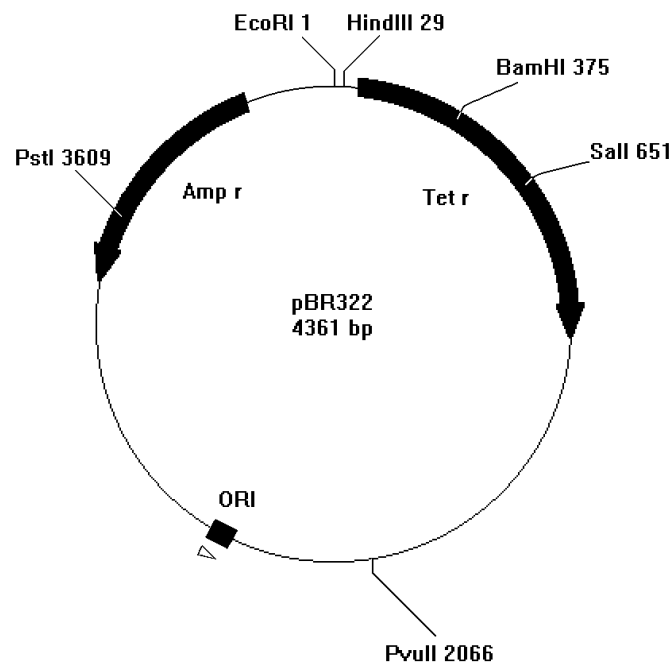


Figura 3.1: Plásmido pBR322.

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.

3.2. 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 μ l de agua destilada mediante el agitador o con ayuda de una punta de micropipeta¹.

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

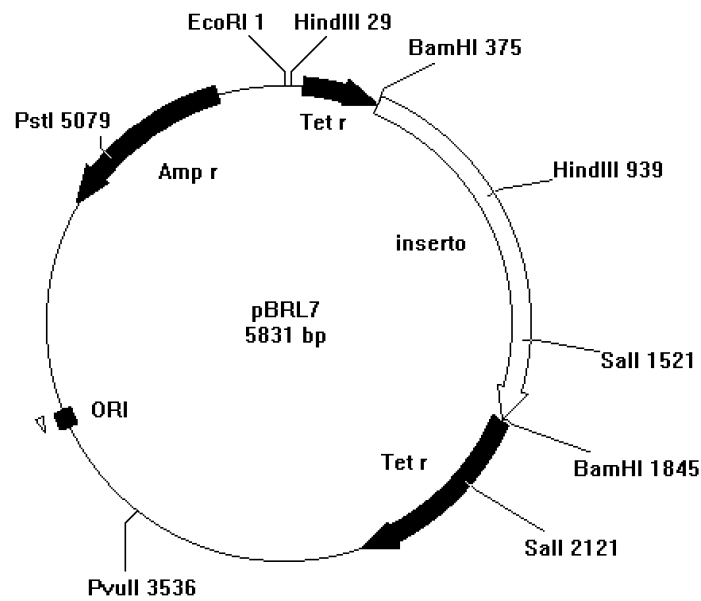


Figura 3.2: Plásmido pBRL7

3. Añadir al mismo tubo 200 μ l 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 incubaba más tiempo, parte del DNA plasmídico se desnaturaliza.
4. Neutralizar con 150 μ l 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 μ l) 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.

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.

10. 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 [4.2.2 en la página 14](#)
11. Después de secar la preparación de ácido nucleico, se resuspende en 20 µl de tampón TE conteniendo 0,1 mg/ml de RNAasa.

3.2.0.1. Digestión del plásmico con enzimas de restricción.

Opcionalmente, si así lo indica el profesor, la digestión se inicia como se indica en la sección [4.2.1 en la página 14](#) y se deja incubar en una estufa a 37°C hasta el día siguiente.

Continúa en la práctica nº 4

Práctica N^o 4

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

4.1. 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. 4.1). 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.

1. Digestión con BamHI (extremos cohesivos):



2. Digestión con PvuII (extremos romos):

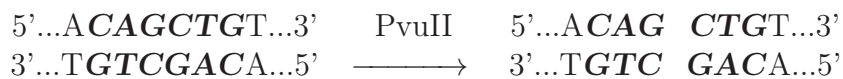


Figura 4.1: Digestiones con enzimas de restricción

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.

El objetivo de esta práctica consiste en la digestión con endonucleasas de restricción del plásmido obtenido el día anterior y el análisis electroforético de los fragmentos generados.

4.2. Procedimiento.

4.2.1. Digestión con las endonucleasas de restricción.

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

- 10 μ l de la disolución de DNA plasmídico.
- 10 μ l 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*).

4.2.2. 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. 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 ($\approx 0,25 \mu\text{g/ml}$ final) que es un poderoso MUTÁGENO!. **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.

4.2.3. Preparación de la muestra.

Una vez transcurrido el tiempo de digestión de la muestra de DNA, añadir, antes de cargarla en el gel, 5 μ l 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)

4.2.4. 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 de 2 a 3 horas.

4.2.5. 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!:

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

4.2.6. 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 las distancias migradas por las bandas patrón frente al logaritmo de su tamaño (en pares de bases). Trazada la recta patrón, interpolar las distancias migradas por los DNAs problema para estimar su tamaño.

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

¹Poner \approx 0,3 μ g de DNA patrón

4.3. Resultados.

Título:

