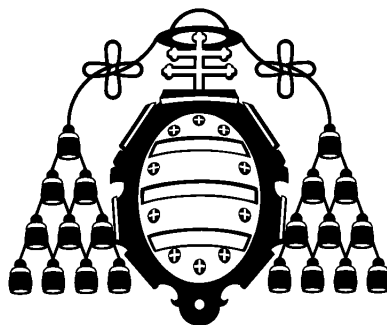


DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

GRADO EN BIOLOGÍA

PRÁCTICAS DE BIOQUÍMICA

Curso /

NOMBRE Y APELLIDOS:

CURSO Y GRUPO:

Taquilla nº:

12 de abril de 2021
Biol-Bioq-RR
Laboratorio de Prácticas

Normas generales

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

MATERIAL DE LABORATORIO

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

CALENDARIO DE PRÁCTICAS

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

SEGUNDO SEMESTRE		
Día	Nº	Práctica
1	5	Determinación de colesterol en suero
2	6	Purificación de DNA plasmídico a partir de células de <i>Escherichia coli</i>
3	6	Análisis de restricción de un DNA plasmídico (continuación de práctica nº 6)
4	7	Estudio de los elementos reguladores de la transcripción de un gen de <i>Sacharomyces cerevisiae</i>
5	8	Determinación cuantitativa de proteínas (continuación de práctica nº 7)

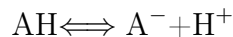
Práctica N^o 1

Preparación de tampones fosfato y estudio de la capacidad de tamponamiento

1.1. Introducción.

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

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



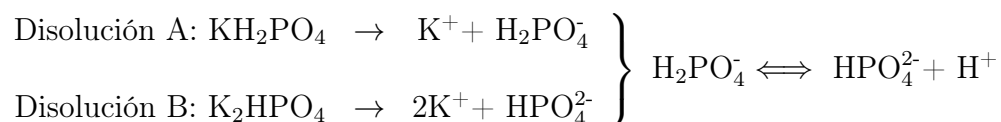
El pH de una disolución tampón se puede calcular mediante la ecuación de Henderson-Hasselbach:

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

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

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

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



1.2. Procedimiento.

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

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

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

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

1.3. Resultados.

1. Cálculo del pH teórico de cada tampón:

1

2

3

4

5

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

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

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

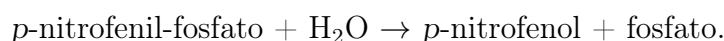
3. ¿Cuál de las dos disoluciones es mejor tampón?

Práctica N^o 2

Efecto del pH sobre la actividad de la fosfatasa

2.1. Introducción.

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



2.1.1. Determinación del pH óptimo de la fosfatasa.

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

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

2.1.2. Determinación de la actividad de la fosfatasa.

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

2.2. Procedimiento.

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

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

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

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

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

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

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

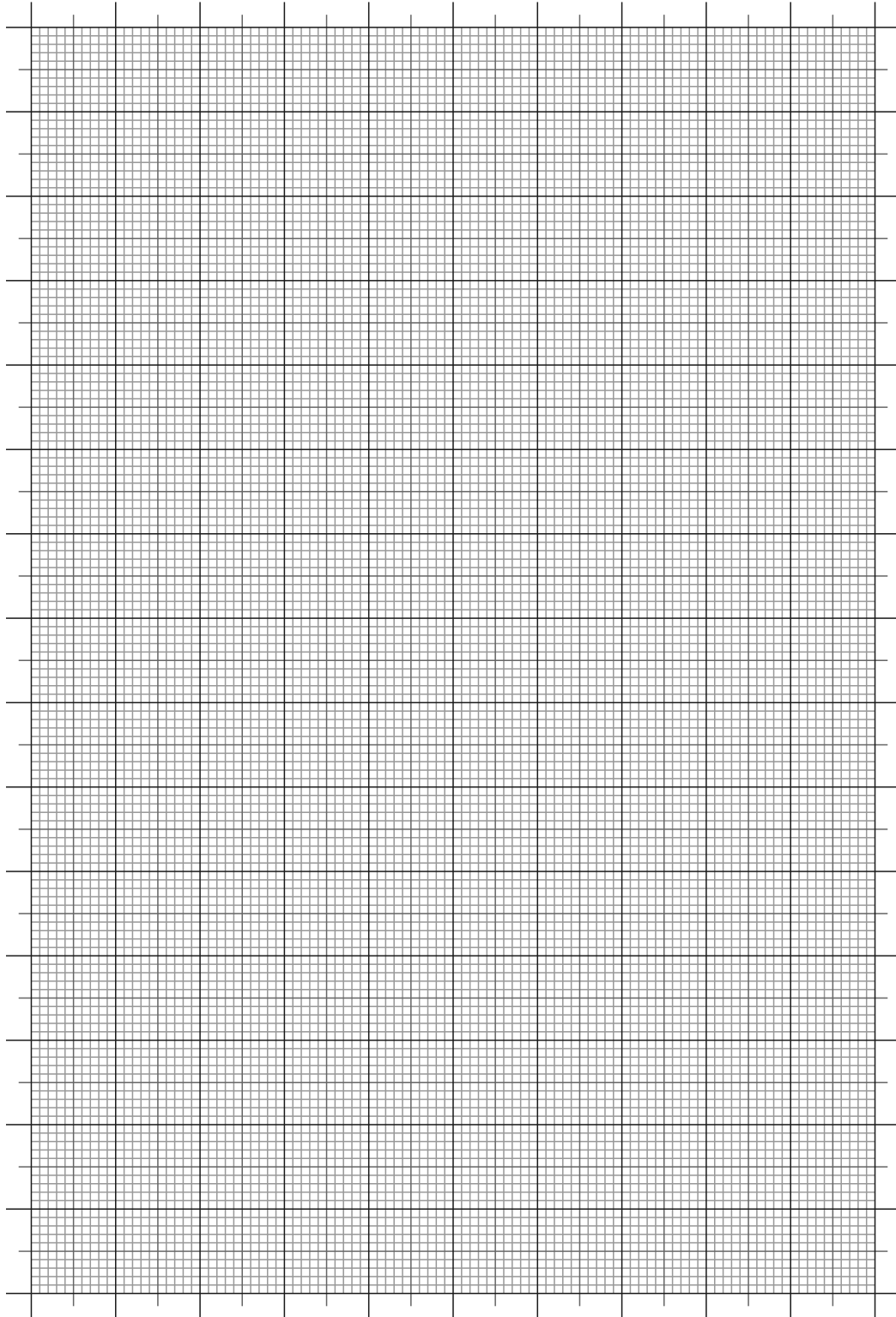
Teniendo en cuenta el valor del coeficiente de extinción molar (ϵ) del *p*-nitrofenol a 430 nm es $\epsilon_{430\text{nm}} = 11000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, calcular los μmoles de *p*-nitrofenol liberados por minuto (unidades de actividad enzimática), cuando el enzima funciona en condiciones óptimas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

2.3. Resultados.

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

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

Título:



Práctica N^o 3

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

3.1. Introducción.

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

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

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

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

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

La constante de inhibición (K_i) se define como:



y mide la afinidad del enzima por el inhibidor.

3.1.1. Determinación de la K_M .

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

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

3.1.2. Determinación de la K_i .

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

3.2. Procedimiento.

Numerar los tubos de ensayo y colocarlos en la gradilla.

Poner en cada tubo los siguientes reactivos:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

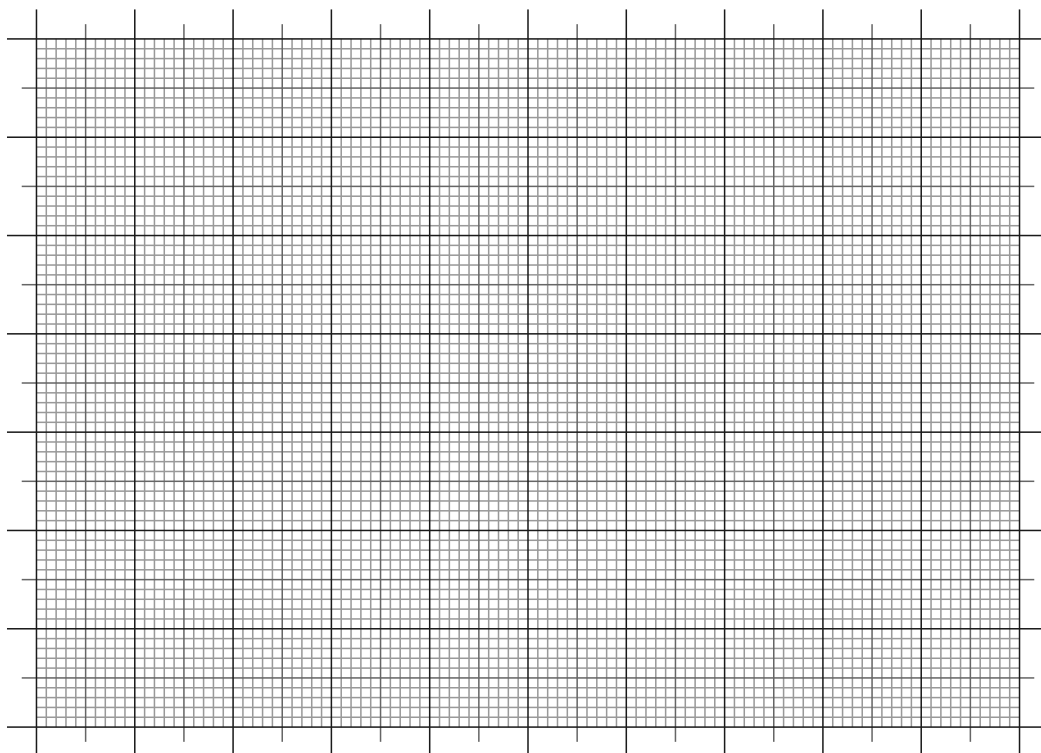
3.3. Resultados.

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

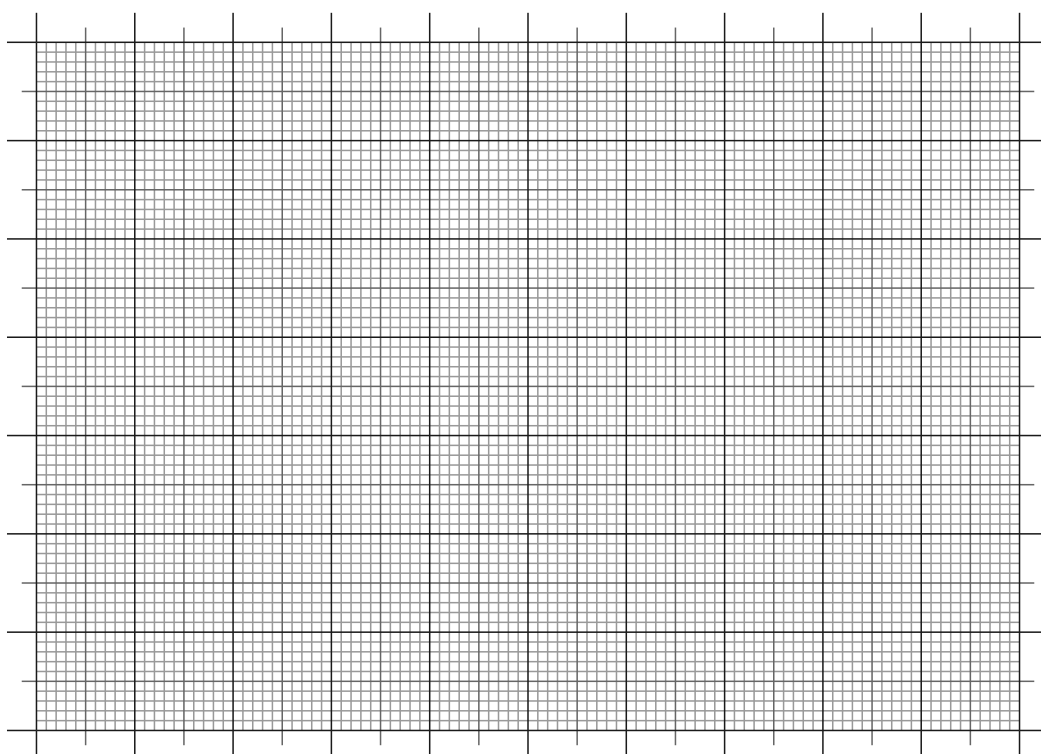
1. K_M (en mM) de la fosfatasa para el *p*-nitrofenil-fosfato:

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

Título



Título



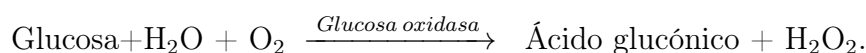
Práctica N^o 4

Valoración enzimática de la glucosa: curva patrón

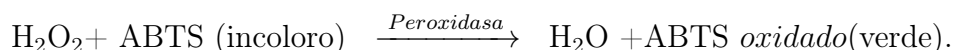
Una de las aplicaciones más frecuentes de la Enzimología en Clínica, consiste en la utilización de enzimas como reactivos para medir la concentración de metabolitos de interés clínico, tales como glucosa, colesterol, etc. En estas condiciones, el metabolito cuya concentración se intenta determinar es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

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

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



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



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

4.1. Procedimiento.

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

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

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

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

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

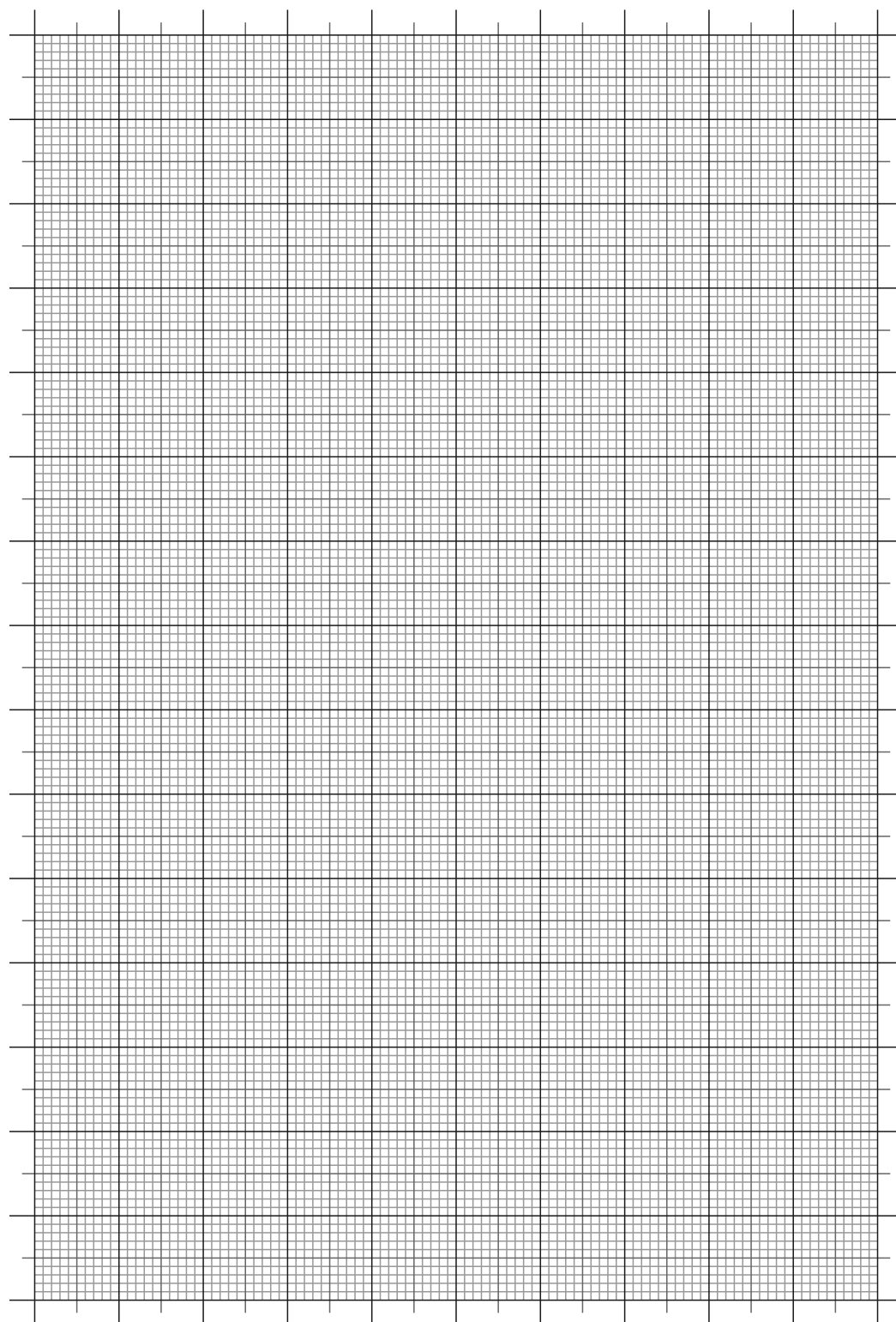
4.2. Resultados.

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

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

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

Título:



Práctica N^o 5

Determinación de colesterol en suero

5.1. 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.

5.2. 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 LDL.

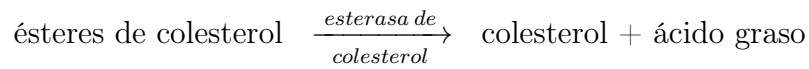
5.3. Fundamento.

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.

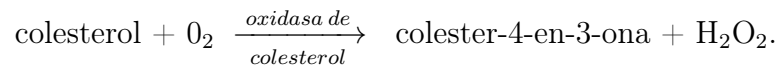
El método que se va a emplear es un método enzimático. La serie de reacciones implicadas en el método de ensayo se describe a continuación¹.

¹Composición 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.

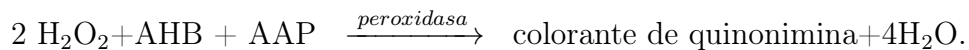
1. Los ésteres de colesterol son hidrolizados enzimáticamente por la esterasa de colesterol hasta colesterol y ácido graso libre:



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:



5.3.1. 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 fosfowolfrámico². Agitar mezclando suavemente.
 - Dejar precipitando en la meseta 8 min.
 - Centrifugar 10 min a 4000 rpm en una microcentrífuga de mesa.
 - Pasar con cuidado (con una micropipeta) 100 μl del sobrenadante al tubo 2 del cuadro 5.1 en la página siguiente. Este sobrenadante contiene las HDL.
2. Determinación del colesterol:
 - Pipetear en siete tubos eppendorf los volúmenes de muestras y de H_2O que se indican en el cuadro 5.1 en la página siguiente. 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 baño o bloque a 30°C durante 10 min.
 - Leer la absorbancia a 500 nm frente al blanco.

²Composición del reactivo: # fosfowolframato de sodio 0,44 mM y # MgCl_2 20mM.

Cuadro 5.1: 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

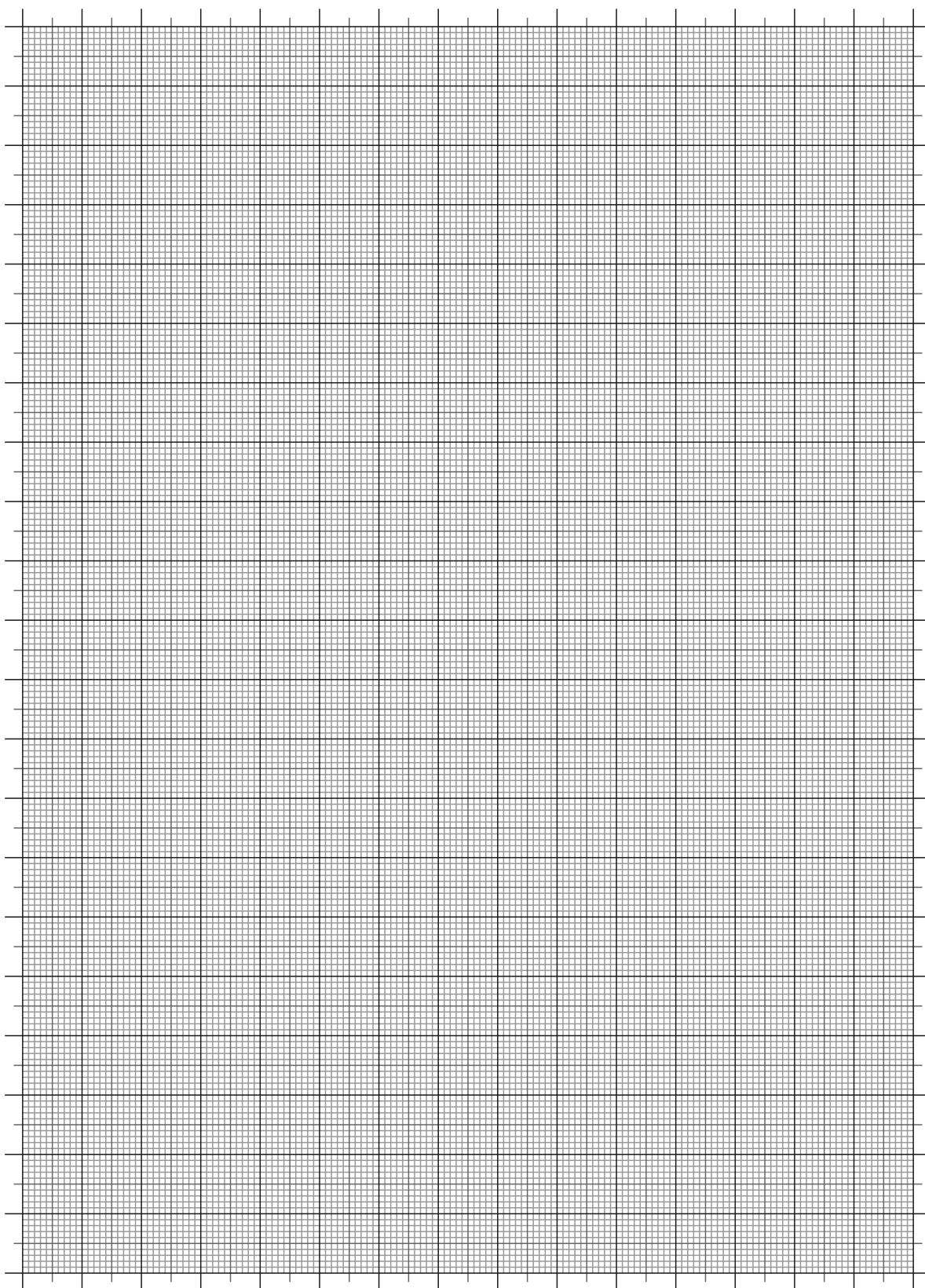
5.4. Cálculos y resultados.

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.

- Colesterol total = HDL + VLDL + LDL
- VLDL = 20 mg/dl

Título:



Práctica N^o 6

Purificación y digestión de ADN con endonucleasas de restricción. Visualización de los fragmentos obtenidos mediante electroforesis

6.1. 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. 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*.

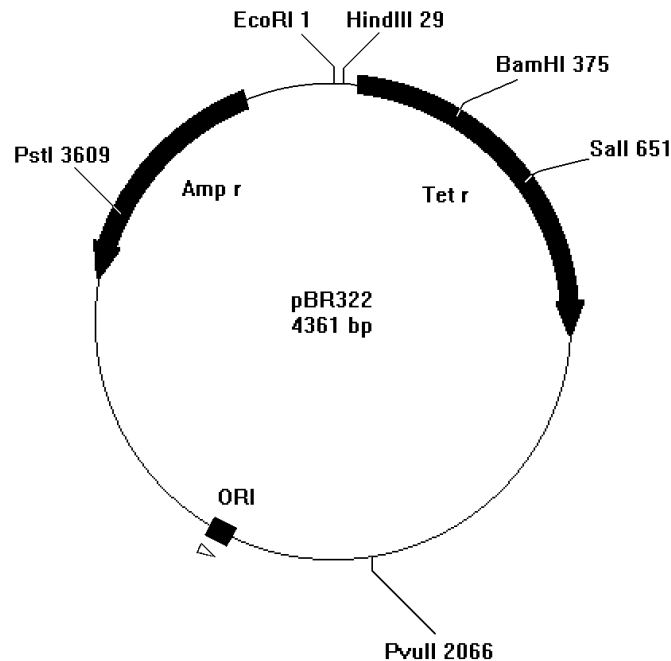


Figura 6.1: Mapa de restricción del plásmido pBR322.

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.

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.

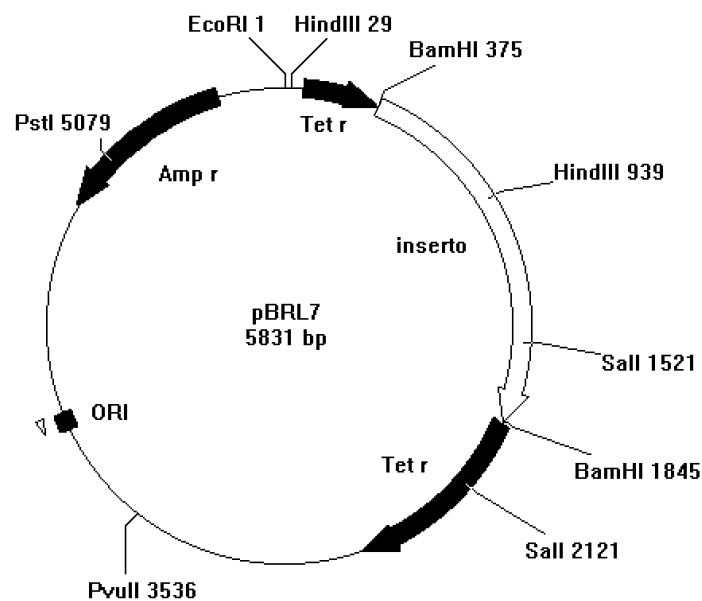


Figura 6.2: Mapa de restricción del plásmido pBRL7

2. Resuspender el sedimento de células en 100 μ l de agua destilada estéril mediante el agitador o con ayuda de una punta de micropipeta.
3. Añadir al mismo tubo 200 μ l de la disolución alcalina (SDS 1 %, NaOH 0,2 M)¹, la cual lisará 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 desnatura.
4. Neutralizar con 150 μ l de acetato potásico 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 micropipeta 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 5 min.
9. Descartar el sobrenadante. Utilizar una micropipeta evitando tocar el fondo. El plásmido se encuentra en el sedimento junto con RNA.

¹El SDS o dodecilsulfato sódico es un detergente que rompe la membrana bacteriana; el NaOH sirve para desnaturar el DNA cromosómico.

10. Lavar el sedimento con 500 μl de etanol al 70 %. Volver a centrifugar como en el punto 9 y descartar el sobrenadante como en el punto 10.
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 6.4.2 en la página siguiente.
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 como se indica en la sección (6.4.1) e incubar a 37°C en una estufa hasta el día siguiente.

6.3. 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. 6.3). 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.

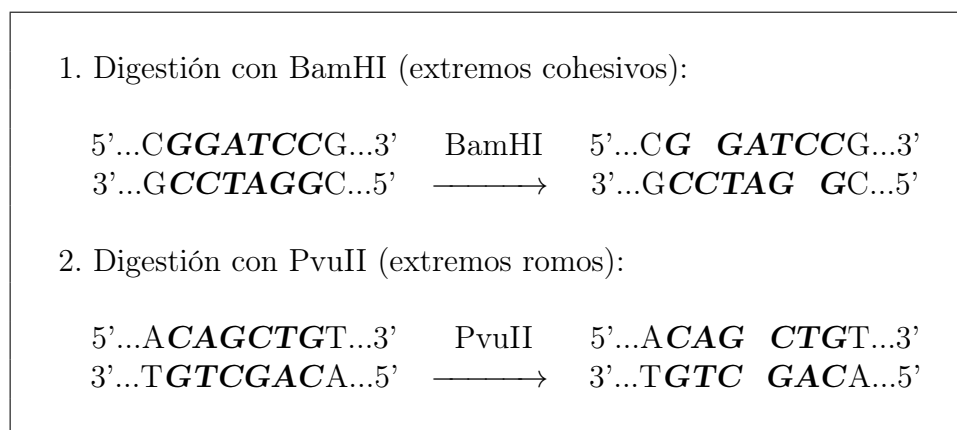


Figura 6.3: Digestiones con enzimas de restricción

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.

6.4. Procedimiento.

6.4.1. 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 el tubo e incubar en una estufa a 37°C durante toda la noche.

6.4.2. 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 0,42 g de agarosa en un erlenmeyer. Añadir 60 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.

6.4.3. 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)

6.4.4. 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 (patrones²). Finalmente, conectar los electrodos del tanque de electroforesis a la fuente de alimentación, aplicando un voltaje constante de 100 V de 1 a 2 horas.

6.4.5. 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.

(*) ¡**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.

6.4.6. 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.

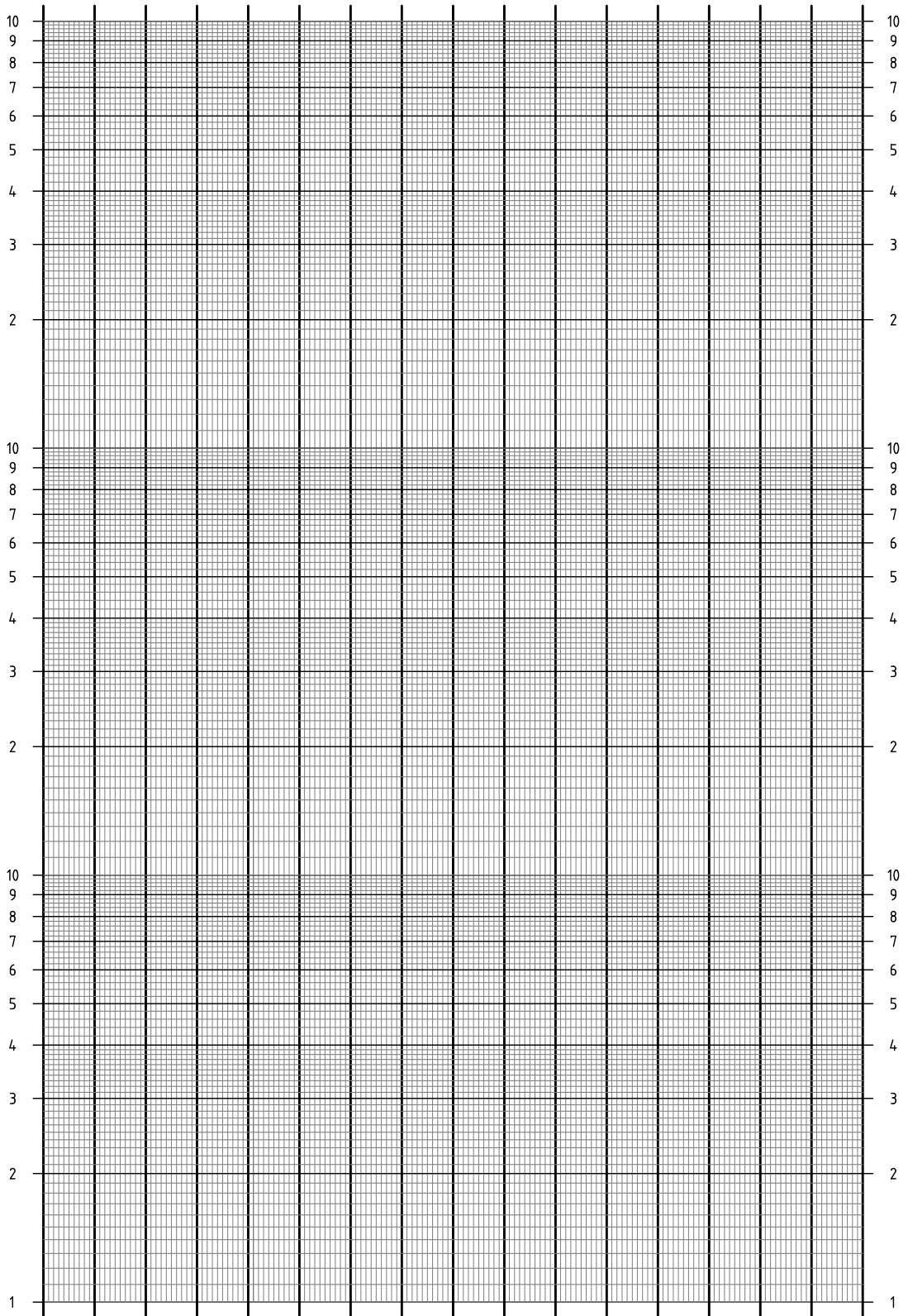
Los tamaños de los fragmentos de DNA patrón (marcadores de tipo III de Boehringer) son: 21226 pb, 5148, 4973 (estos dos últimos aparecen como un doblete), 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564 pb.

²Poner \approx 0,3 μ g de DNA patrón

6.5. Resultados.

Endonucleasa	Tamaño DNA teórico	Tamaño DN

Título:



Práctica N^o 7

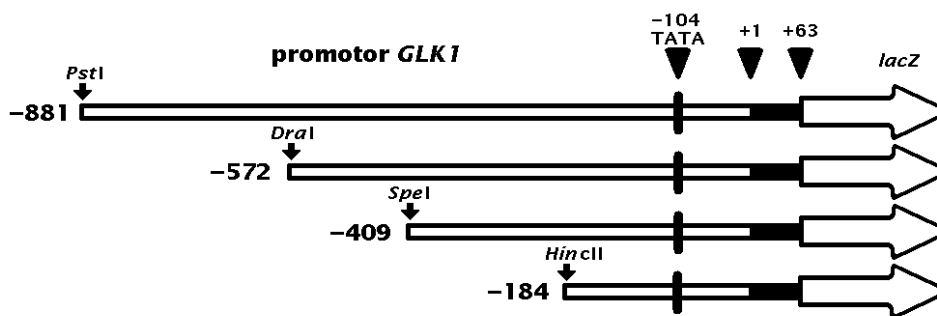
Estudio de los elementos reguladores de la transcripción de un gen de *Sacharomyces cerevisiae*

7.1. 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 (chivato)**. El gen informador suele codificar un enzima del cual carece la célula huésped y que cataliza una reacción cuyo producto puede ser cuantificado fácilmente.



R. S. Cármenes 20/2/2000

Figura 7.1: 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*.

7.2. Procedimiento y resultados.

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

1. Se parte de dos tubos eppendorf rotulados 409 y 184 que contienen las levaduras de las fusiones correspondientes que habían crecido en medio rico YPD hasta $A_{600\text{nm}} = 1$. Se centrifugan 2 min en la microcentrífuga, se decanta el sobrenadante¹ y el sedimento se resuspende muy bien en 350 μl de tampón Z (tampón fosfato 100 mM) de pH 7.
2. Se añade a cada tubo, un volumen, ya medido, de bolas de vidrio equivalente a 300 μl . Se agitan a la vez ambos tubos en el agitador a velocidad máxima durante 1 minuto, al cabo del cual se introducen los tubos inmediatamente en hielo donde se mantienen durante 1 minuto. REPETIR ESTA OPERACIÓN 5 VECES (tener cuidado para no borrar el nombre del tubo).
3. Se centrifuga a velocidad máxima durante 5 minutos. Se pipetea los sobrenadantes a tubos eppendorf limpios. Dichos sobrenadantes son **los extractos celulares (ELC) o extractos proteicos**.
4. Se ponen 10 μl del sobrenadante 409 y 100 μl del sobrenadante 184 (o los volúmenes que indique el profesor) en tubos de ensayo limpios y rotulados convenientemente. Se lleva hasta 800 μl con tampón Z de pH 7. En un tercer tubo, se pipetea 800 μl de dicho tampón, el cual nos servirá como blanco de la reacción.
5. 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.
6. Introducir los tubos en un bloque o baño a 30°C y no sacarlos hasta que hayamos detenido la reacción. Añadir a tiempos 200 μl de sustrato o-nitrofenil- β -D-galactósido de concentración 4 mg/ml. Dejar incubando hasta la aparición del color amarillo correspondiente 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 con el blanco que no contenía el extracto proteico.

¹Opcionalmente pueden facilitarse las células ya decantadas

7.2.2. Resultados.

Calcular, en el apartado 7.2.3, 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:

$$A = \epsilon.c.l,$$

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

$$c = \frac{A}{\epsilon.l} \text{ moles/l}$$

$$\frac{U}{\text{ml}} = \frac{\text{moles}}{\text{litro}} \times \text{vol. final ensayo (litros)} \times$$

$$\frac{10^6 \mu\text{moles}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1}{\text{tiempo (min)}} \times \frac{1}{\text{vol. extracto celular (ml)}}$$

(Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar $1 \mu\text{mol}$ de sustrato en 1 minuto en condiciones óptimas de ensayo.)

7.2.3. Cálculos.

(Una vez realizados los cálculos poner los valores obtenidos en la tabla de la página 35).

Práctica N^o 8

Determinación cuantitativa de proteínas (continuación de práctica n^o 7)

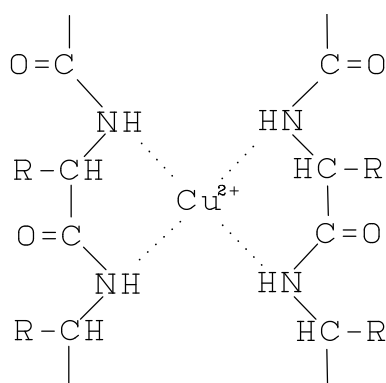
8.1. Introducción.

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).

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.

8.2. 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.

Se pipetea en tubos de ensayo los volúmenes de BSA y de extractos celulares según se indica en la tabla. Se añade agua hasta alcanzar el volumen total de 1 ml y se prepara el blanco con un 1 ml de agua.

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	H ₂ O	Solución C(*)	Folin
1	0,2 ml de 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$	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	20 μl de extracto 409	0,98 ml	2,5 ml	0,5 ml
7	20 μl de extracto 184	0,98 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%.

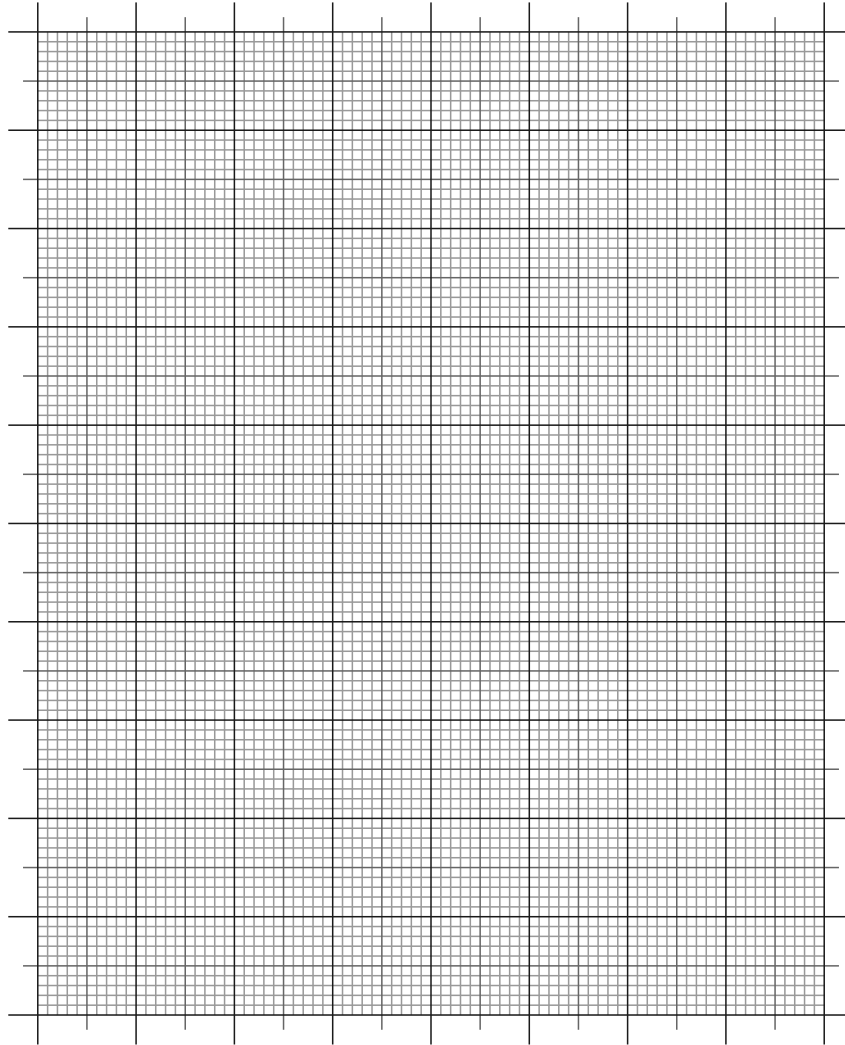
8.3. Cálculos y resultados.

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	

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

Título:



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

Muestra	Actividad (U/ml)	Proteina (mg/ml)	Act. específica (U/mg)
409			
184			

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