



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD CUAJIMALPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

MATERIAL DIDACTICO

MANUAL DE PRACTICAS DE LABORATORIO DE BIOQUIMICA

AUTORES:

Dra. Claudia Haydée González de la Rosa

Dra. Perla Yolanda López Camacho

Dr. Gerardo Pérez Hernández

Dr. Edgar Vázquez Contreras

Departamento de Ciencias Naturales

ISBN: 978-607-28-0254-4

Septiembre 2014

Manual de prácticas de laboratorio de Bioquímica

ISBN 978-607-28-0254-4

2 de Septiembre del 2014

Licenciatura en Biología Molecular

UEA Laboratorio de Bioquímica

Autores:

Dra. Claudia Haydée González de la Rosa

Dra. Perla Yolanda López Camacho

Dr. Gerardo Pérez Hernández

Dr. Edgar Vázquez Contreras

Adscripción:

Departamento de Ciencias Naturales

División de Ciencias Naturales e Ingeniería

UAM, Unidad Cuajimalpa

Contenido

Presentación del manual.....	2
Seguridad en el laboratorio de Bioquímica.....	4
Reactivos en el laboratorio de Bioquímica.....	5
Equipos en el laboratorio de Bioquímica.....	8
Modalidades de conducción del proceso de enseñanza-aprendizaje.....	13
Práctica 1. Purificación de lactato deshidrogenasa (LDH).....	14
Práctica 2. Medición de actividad enzimática de la LDH.....	23
Práctica 3. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	29
Práctica 4. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes.....	35
Práctica 5. Cromatografía de intercambio iónico.....	45
Práctica 6. Cromatografía de afinidad.....	50
Práctica 7. Cinética enzimática.....	55
Bibliografía.....	59
Anexo A. Rúbricas y lista de cotejo.....	61
Anexo B. Tabla de sulfato de amonio.....	64
Anexo C. Propuestas de organización de las prácticas en el trimestre.....	65

Presentación del manual

Diferentes estudios en el campo de la biología molecular, biotecnología y otras disciplinas científicas requieren de obtener proteínas con cierto grado de pureza, por lo que es indispensable que un licenciado en Biología Molecular y licenciaturas afines desarrollen un procedimiento de purificación de proteínas, así como de los procesos de caracterización bioquímica de proteínas. En la Unidad de Enseñanza y Aprendizaje (UEA) de Laboratorio de Bioquímica se pretende introducir al alumno en el desarrollo de un proceso lógico para purificar una proteína desde el punto de vista experimental, así como reforzar e integrar los conocimientos adquiridos en las UEA. previas de Química, Química Orgánica, Biología Celular, Bioquímica I, Bioinorgánica, Taller de Matemáticas e Introducción al Pensamiento Matemático. También es indispensable haber desarrollado habilidades básicas de procedimientos en el laboratorio, las cuales se revisan en las UEA de Introducción a la Experimentación y Laboratorio de Ciencia Básica.

En el desarrollo de este manual, se realizará la purificación y caracterización bioquímica básica de la lactato deshidrogenasa (LDH) de corazón bovino. Para comprender la lógica de los procedimientos que se plantean realizar a lo largo del trimestre, los alumnos pueden discutir con el profesor las siguientes preguntas:

1. ¿Cuánta proteína objetivo se necesita?
2. ¿La proteína objetivo debe mantener su actividad biológica?
3. ¿Cuál es el grado de pureza requerido?
4. ¿Qué fuente biológica se debe usar para obtener la proteína objetivo?

Tomar en cuenta cada una de las preguntas involucra razonar varios aspectos metodológicos; por ejemplo, la pregunta 1 necesariamente implica considerar factores de escalamiento si se requiere a la proteína objetivo en concentraciones de gramos y por lo tanto implica considerar la fuente biológica y el grado de pureza que se requiere.

Las técnicas para purificar a la proteína objetivo contempladas en el manual son la precipitación con sulfato de amonio, la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de afinidad.

Además, se requieren técnicas analíticas para identificarla, por ejemplo, espectrofotometría para cuantificar su actividad enzimática y determinar sus parámetros cinéticos, para lo cual se determina la concentración de proteína, por medio del método de Bradford. La presencia de la proteína se hará evidente por medio de experimentos de electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

En este manual se presentan los factores más importantes a tener en cuenta durante las prácticas de laboratorio, así como los protocolos para realizar los experimentos que se citaron anteriormente, basándonos principalmente en los descritos por Farrell y Taylor (1). En cada uno de los protocolos, el símbolo  indica acciones recomendadas en situaciones específicas y advierte al usuario cuando deben realizarse cuidados especiales. En todos los casos, los protocolos han sido estandarizados a la infraestructura con que cuenta el laboratorio experimental de docencia de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería.

Seguridad en el laboratorio de Bioquímica

La seguridad de los alumnos que realizan las prácticas de laboratorio es primordial, por lo que se deben seguir las siguientes normas de seguridad e higiene:

- Nunca trabajar sin la supervisión del profesor.
- Colocar fuera de las mesas de trabajo cualquier material ajeno al protocolo a realizar. Limpiar el espacio de trabajo antes y después de utilizarlo. Mantener libres los espacios comunes.
- Dentro del laboratorio no está permitido comer, tomar bebidas o fumar. Debe mantenerse el orden, no correr, empujarse o realizar actividades ajenas al desarrollo de la práctica.
- Siempre usar bata dentro del laboratorio. Usar guantes para las actividades que se indiquen.
- Conocer, mediante una investigación previa, las propiedades, el manejo y el almacenamiento adecuado de todas las sustancias que se van a utilizar en un protocolo antes de iniciarlo.
- Manejar con cuidado todas las sustancias que se utilicen durante el desarrollo del protocolo. En casos necesarios utilizar lentes de protección y guantes apropiados. Manejar los solventes dentro de una campana de extracción. Nunca pipetear con la boca.
- Todas las sustancias que se utilicen, así como las que se preparen, deben estar perfectamente etiquetadas.
- Si tiene contacto directo con alguna sustancia, acudir inmediatamente con el encargado de la seguridad en el laboratorio.
- Informarse y acatar los procedimientos para desechar sustancias químicas y biológicas.
- Tomar precauciones al manejar las fuentes de poder y cámaras de electroforesis para evitar incendios y choques eléctricos.
- Lavar el material utilizado. Guardarlo limpio y seco.

Ante una situación de urgencia, dar aviso inmediatamente a sus profesores. En caso necesario se deberá mantener la calma y abandonar las instalaciones en orden.

Reactivos en el laboratorio de Bioquímica

En todos los experimentos se utilizarán soluciones tampón, soluciones reguladoras o soluciones amortiguadoras de pH (en este texto usaremos este último término), que son la mezcla acuosa de un ácido débil y su base conjugada y tienen la propiedad de mantener estable el pH de una solución frente a la adición de ácidos o bases fuertes. Mantener constante el pH de una solución bioquímica, es de vital importancia, ya que un cambio pequeño en la concentración de hidrogeniones o hidroxilos puede alterar las propiedades de las biomoléculas en solución, en particular las proteínas. En muchos casos estas soluciones amortiguadoras, contienen agentes reductores (para evitar la formación de enlaces S-S no deseados), inhibidores de proteasas (para evitar la proteólisis de la proteína purificada), colorantes (para hacer las determinaciones de la concentración de proteína, así como para teñir los geles), y otros reactivos para determinar la catálisis enzimática.

SUSTANCIAS PELIGROSAS

Dado que la seguridad de los usuarios se asume primariamente como personal, es obligación para los alumnos que realicen las prácticas del laboratorio de bioquímica, investigar las propiedades físicas, químicas, toxicológicas y de adecuado manejo de todos los reactivos a utilizar.

Como una guía rápida, a continuación se enlistan algunas sustancias peligrosas que se utilizan en las prácticas del Laboratorio de Bioquímica.

Ácido bórico. Puede ser peligroso por inhalación, ingestión o absorción por la piel. Utilizar guantes apropiados, lentes de protección y manipular en la campana de extracción.

Ácido acético. Puede ser nocivo si se inhala o se traga. Extremadamente destructivo para los tejidos de las membranas mucosas y las vías respiratorias superiores. Provoca quemaduras en la piel y en los ojos. Evitar respirar los vapores. Retirar todas las fuentes de ignición.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

👁️ **Ácido clorhídrico.** Tóxico por inhalación. Dañino si se ingiere. Corrosivo.

👁️ **Acrilamida.** Potente neurotóxico que se absorbe por la piel (con efecto acumulativo), evitar inhalar el polvo, usar guantes y mascarilla de protección cuando se pesa y preparar las soluciones en campana de extracción. En principio la poliacrilamida no es tóxica pero debe manejarse con precaución ya que puede contener restos de acrilamida no polimerizada.

Azul de bromofenol. Puede ser peligroso por inhalación, ingestión, o absorción por la piel. Utilizar guantes apropiados y lentes de protección y manipular en la campana de extracción.

Azul de Coomassie. Puede ser peligroso por inhalación, ingestión, o absorción por la piel. Utilizar guantes apropiados y lentes de protección y manipular en la campana de extracción.

Ditiotreitol (DTT). Puede ser nocivo si se inhala o es absorbido por la piel. Provoca irritaciones en el tracto respiratorio, piel y ojos. Es tóxico si se ingiere y genera náuseas, dolor de cabeza y vómitos. En general se debe trabajar en un lugar con buena ventilación.

Dodecil sulfato de sodio. Sólido inflamable, es dañino si se ingiere, es tóxico por absorción de la piel, es irritante. Afecta gravemente los pulmones.

Etanol. Puede ser peligroso por inhalación, ingestión o absorción por la piel. Utilizar guantes apropiados y lentes de protección y manipular en la campana de extracción.

👁️ **Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF).** Puede ser nocivo si se inhala. Extremadamente destructivo para los tejidos de las membranas mucosas y las vías respiratorias superiores. Puede ser nocivo si es absorbido por la piel. Provoca quemaduras en la piel y en los ojos. Tóxico si se ingiere. Utilizar guantes apropiados y lentes de protección.

Fosfato de sodio. Puede producir irritación cutánea, así como lesiones oculares graves, su ingestión es tóxica en determinados órganos.

👁️ **β -Mercaptoetanol.** Líquido combustible, tóxico si se inhala, extremadamente destructivo para los tejidos de las membranas mucosas y las vías respiratorias superiores. Rápida absorción a través de la piel, puede provocar una reacción alérgica en ella. Provoca quemaduras en la piel y en los ojos. Puede dañar hígado y corazón por exposición prolongada



Ciencias Naturales

o repetida en caso de ingestión. Puede ser mortal si se absorbe por la piel. Evite respirar los vapores. Llevar guantes y lentes de protección.

Metanol. Líquido inflamable, es tóxico por inhalación, tóxico por ingestión, tóxico por absorción de la piel. Afecta ojos, riñón, hígado, corazón, sistema nervioso central.

NAD. Su ingesta produce irritación en el hígado y los riñones, provoca irritación ocular grave.

Sulfato de amonio. Su ingestión es tóxica.

👁️ **N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED).** Extremadamente destructivo para mucosas y tracto respiratorio superior, ojos y piel. Su inhalación puede ser fatal. El contacto prolongado puede causar severa irritación y quemaduras. Utilizar guantes apropiados y lentes de protección y manipular en campana de extracción. Altamente inflamable, mantener lejos del calor, chispas y flamas.

👁️ **Persulfato de amonio.** Extremadamente destructivo para mucosas y tracto respiratorio superior, ojos y piel. Su inhalación puede ser fatal. El contacto prolongado puede causar severa irritación y quemaduras. Utilizar guantes apropiados y lentes de protección y manipular en campana de extracción.

Reactivo de Bradford. Muy tóxico por inhalación. Tóxico por ingestión. Tóxico por absorción de la piel. Afecta el hígado, la sangre, la médula, los ojos, los riñones, el corazón y el sistema nervioso central.

Equipos en el laboratorio de Bioquímica

Cromatógrafos de baja presión



Se utiliza para la separación, purificación y detección de biomoléculas como proteínas, polipéptidos y polinucleótidos por medio de una cromatografía líquida en la que la velocidad del solvente se controla a través de bombas de flujo continuo y columnas cromatográficas con las que es posible realizar separaciones por intercambio iónico, afinidad, exclusión, etc. Se pueden utilizar diferentes tipos de columnas, dependiendo del tipo de separación requerida. La muestra se introduce a través de un inyector y eluye a través de la columna con el flujo del solvente. La solución resultante de la columna pasa a través de una o más celdas de flujo para medir la concentración de biomoléculas en la solución, utilizando absorción de luz UV. Cuenta además con celdas que miden la conductividad del amortiguador, con lo que es posible monitorear el progreso del gradiente. El cromatógrafo utiliza un *software* con capacidad para manejar los datos obtenidos.

Microcentrífugas



La microcentrífuga es un aparato de uso frecuente para separar las sustancias de diferente densidad o tamaño de partícula, las cuales se encuentran suspendidas en un fluido, al someterlas a fuerzas de aceleración que obligan a las moléculas a migrar al fondo del envase utilizado, separándolas del medio en que se encuentran. La velocidad de sedimentación de las partículas en un fluido es mucho mayor en un campo centrífugo que en un campo gravitacional. En un campo gravitacional las fuerzas de dispersión originadas por el movimiento browniano son mucho mayores que las fuerzas gravitacionales, en una centrífuga las fuerzas centrífugas superan los efectos de las fuerzas de dispersión por lo que la sedimentación es más rápida.

Espectrofotómetros UV-Vis



Un espectrofotómetro UV-visible en general está compuesto por una fuente de luz (lámpara), un selector de longitud de onda (monocromador), una celda y un detector. La fuente de luz es una lámpara o combinación de lámparas que tienen un espectro de emisión entre 190 y 1100 nm. Existen lámparas de deuterio, tungsteno y halógenos (como el xenón). El monocromador permite separar y direccionar un intervalo estrecho de longitudes de onda sobre la muestra. Después de pasar por el monocromador, la luz incide sobre la muestra, que se coloca en una celda que tiene la particularidad de tener al menos dos caras paralelas y pulidas de tal forma que no haya efectos ópticos indeseables; puede ser de plástico, vidrio o cuarzo. La intensidad de la luz transmitida se mide con un detector que convierte el número de fotones que inciden sobre él durante un intervalo de tiempo en una señal eléctrica.

Cámaras verticales para electroforesis



Una molécula con una carga eléctrica neta se desplaza en un campo eléctrico, en un fenómeno conocido como electroforesis. En general, una cámara de electroforesis vertical tiene los siguientes componentes: dos placas de vidrio del mismo grosor y anchura de acuerdo al fabricante (el tamaño de los vidrios es variable dependiendo de la dimensión de la cámara); dos espaciadores que son dos placas largas de iguales dimensiones hechas de un material flexible pero resistente generalmente poliestireno o teflón (la función de los espaciadores es determinar el grosor del gel); un peine, cuyos dientes pueden variar en número, tamaño y grosor (tiene el mismo grosor de los espaciadores y está confeccionado del mismo material, sirve para moldear los pocillos donde se colocarán las muestras); un soporte o base que es un dispositivo que sirve para permitir el ensamblaje de los vidrios con los espaciadores (una serie de prensas que ejercen presión y mantiene fijo todo el sistema); y el tanque de electroforesis, que es el recipiente que contiene el amortiguador de corrida superior e inferior. En algunos sistemas, este tanque contiene electrodos permanentes a lo largo de sus bases, listos para ser conectados. En otras cámaras existe una tapa que contiene los electrodos, de tal manera que el investigador ya no tiene contacto directo con el amortiguador durante el proceso de electroforesis. Es importante señalar que la cámara de electroforesis ya ensamblada deberá estar ubicada sobre una superficie totalmente plana y nivelada. Este paso es importante en el momento en el que se vierte la solución del gel dentro de la cámara, ya que se evita el derrame de la solución y la generación de matriz desnivelada. Esta última podría generar la distorsión del perfil de las bandas de las proteínas al final de la electroforesis.

Fuentes de poder



La fuente de poder es un aparato que tiene por función proveer de energía eléctrica a la cámara de electroforesis. El voltaje, el amperaje y el tiempo, pueden ser regulados de acuerdo a las necesidades del investigador. Esta fuente de poder provee voltaje, corriente o poder constante para la electroforesis (funcionando con el valor especificado para el parámetro constante).

Micropipetas



Las micropipetas son instrumentos que permiten medir pequeños volúmenes de líquidos. Los volúmenes que pueden ser tomados por las micropipetas dependen de la marca, pudiendo ser de volumen fijo o de volumen variable (entre 0.1 y 1000 μL). En todos los casos el principio es a través de pistones que generan vacío, lo que permite que el volumen de líquido deseado ingrese a la punta desechable. El uso correcto de las micropipetas permite medir con exactitud, en forma repetida y tomar de distintas soluciones simplemente cambiando las puntas de plástico, que habitualmente se utilizan en forma estéril. El tipo de puntas empleadas depende del tipo de micropipeta y por lo general se sigue un código de colores entre el instrumento y la punta, siendo de color azul para el rango de 200-1000 μL , de color amarillo para el de 2-200 μL y blancas para el de 0.1 a 10 μL . Como recomendaciones



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

generales de uso se sugiere no mover el ajustador de volumen por arriba o por abajo del intervalo especificado, no usar la micropipeta sin la punta desechable y no invertir la posición de la micropipeta cuando haya líquido en la punta desechable. Para evitar contaminar las soluciones es importante utilizar puntas nuevas y diferentes para cada solución.

Modalidades de conducción del proceso de enseñanza- aprendizaje

En la UAM Cuajimalpa se busca desarrollar en los alumnos una formación del más alto nivel, habilitarlos para la solución de problemas mediante la investigación, fomentar su espíritu crítico con responsabilidad social. Para lograrlo, se requiere el desarrollo de creatividad y el espíritu de iniciativa en un marco de trabajo en equipo. La participación de los alumnos en la UEA Laboratorio de Bioquímica ayuda a reforzar estos puntos.

Para fomentar el uso del lenguaje formal y la capacidad de expresión oral y escrita se realizarán exposiciones orales de los resultados obtenidos después de cada sesión práctica y la elaboración de reportes de laboratorio después de cada práctica.

Es conveniente que para todas las actividades, el alumno conozca la rúbrica que será utilizada para calificarlo, y que tendrá las instrucciones específicas para la elaboración de las mismas (ver anexo A). Además, en algunos casos los alumnos utilizarán listas de cotejo para calificar el trabajo colaborativo de sus compañeros.

En todos los casos, las soluciones necesarias para realizar los experimentos serán provistas por los profesores, para disminuir tanto el tiempo de ejecución como la variabilidad en los resultados experimentales.

Con estas prácticas de laboratorio, buscamos que los alumnos comprendan la relación que existe entre lo teórico y lo experimental, aprendan de la observación, interpreten datos experimentales y adquieran destrezas de laboratorio, es decir que “hagan manos”.

El presente manual se apega a los objetivos y contenido sintético del programa de estudios de la UEA Laboratorio de Bioquímica con clave 4603007, aprobado en el 2010 por Colegio Académico en su sesión 323.

Práctica 1. Purificación de lactato deshidrogenasa (LDH)

OBJETIVOS

1. Explicar esquemas simples de purificación de enzimas.
2. Explicar cómo el *salting out* con sulfato de amonio permite la separación de proteínas.
3. Usar la centrifugación para separar preparaciones biológicas.
4. Explicar cómo la diálisis permite el *desalting*.
5. Purificar la enzima LDH de corazón bovino.

INTRODUCCIÓN

“Generalmente es una pérdida de tiempo realizar estudios detallados de cómo las enzimas catalizan la conversión de una sustancia en otra sino hasta que la enzima de interés es purificada de entre otras enzimas y sustancias que forman parte del extracto crudo de las células. La mezcla de cientos de enzimas liberadas de células de hígado, levaduras o bacterias contienen material diverso, así como el producto de otras enzimas. Únicamente cuando se ha purificado una enzima hasta el punto de que la actividad de otras no interfiere, podemos sentirnos seguros de que sólo es un tipo de enzima la que dirige la conversión de una sustancia A en una sustancia B. Sólo entonces, podemos aprender cómo trabajan las enzimas.” (2)

La caracterización de las propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de proteínas, y en general de otras biomoléculas, depende de que los investigadores tengan la certeza de que lo que están evaluando corresponda a un solo tipo de biomolécula, razón por la cual es necesario que los investigadores establezcan procesos de purificación y para ello, es necesario que la biomolécula objetivo esté claramente definida, de tal manera que se organice una estrategia de los métodos a emplear y el orden en que van a ser utilizados (3).

Para lograr los objetivos que se hayan establecido, la proteína objetivo tiene que ser separada de entre miles de proteínas diferentes, por lo cual se necesita explotar las diferencias de las propiedades fisicoquímicas de las proteínas. La Tabla 1 resume la relación

entre las propiedades fisicoquímicas de proteínas y algunas metodologías básicas que suelen ser usadas para su purificación.

Propiedad	Consideraciones	Metodologías de purificación
Fisicoquímica *		
Solubilidad	Balance de aminoácidos polares y no polares, puentes disulfuro, proteínas solubles, proteínas de membrana.	Uso de ambientes salinos, precipitación diferencial, uso de detergentes, uso de medios reductores u oxidantes. Cromatografía de intercambio hidrofóbico. Diálisis.
Carga	Proporción de aminoácidos cargados, punto isoelectrico, pH del medio, fuerza iónica.	Cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o isoelectroenfoque.
Tamaño	Proteínas globulares, proteínas fibrosas, proteínas estructurales.	Cromatografía de exclusión molecular, diálisis, centrifugación diferencial, centrifugación al equilibrio.
Estabilidad	Termoestabilidad, pH.	Hervir muestras, acidificar o alcalinizar medios.
Unión específica	Unión de ligandos, sustratos, proteínas u otras biomoléculas.	Cromatografía de afinidad, utilización de quelantes, uso de sustratos.

Tabla 1. Resumen de las principales propiedades fisicoquímicas de las proteínas que se ocupan para purificar proteínas. * Las metodologías de purificación suelen considerar más de una propiedad fisicoquímica.

Información bioquímica de la LDH

La LDH es una enzima que se encarga de la transferencia de electrones del NADH para convertir piruvato a ácido láctico durante condiciones bajas de oxígeno en células de

músculos con trabajo activo, como las células del corazón. La LDH también permite la reposición del suministro de NAD^+ facilitando una producción continua de ATP en la ruta de la glicólisis. En el hígado, la LDH lleva a cabo la reacción inversa, convirtiendo el lactato a piruvato, en donde provee una fuente de carbono para la síntesis de la glucosa. Finalmente, la glucosa producida por el hígado repone la fuente de carbohidratos almacenados en las células musculares, completando el ciclo de Cori (Fig. 1).

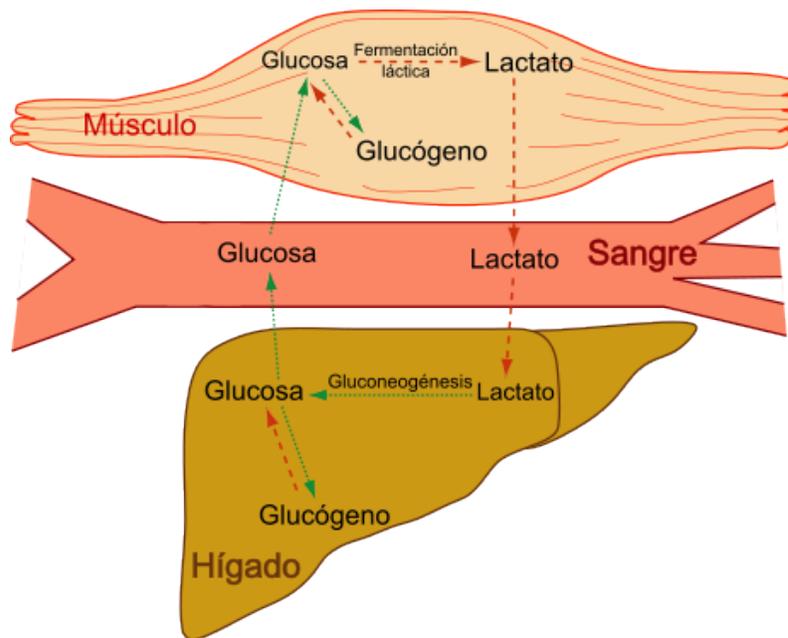


Figura 1. Esquema del ciclo de Cori. Las flechas en rojo muestran el sentido de las reacciones metabólicas que tienen lugar en el ciclo en un estado de esfuerzo físico. Las verdes indican las reacciones que tienen lugar en reposo.

Existen cinco isoenzimas con diferentes puntos isoeléctricos. Las isoenzimas se obtienen de una combinación de subunidades que forman un tetrámero cuya expresión en diferentes tejidos produce distintos conjuntos de isoenzimas. La determinación de la actividad LDH en suero tiene una gran variedad de aplicaciones clínicas. Por ser una enzima intracelular, su elevación es índice de daño tisular con la consecuente liberación de ésta a la circulación. La determinación de la isoenzima predominante en suero posibilita la identificación del órgano comprometido (4).

MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

1 Licuadora	5 Vasos de precipitado (1 de 100 mL, 2 de 250 mL, 1 de 500 mL y 1 de 2,000 mL)
1 Balanza granataria	1 Probeta de 100 mL
1 Parrilla de agitación	1 Liga y cedazo
1 Balanza de 2 platos	1 <i>Rack</i> para micropuntas (200 a 1000 μ L)
1 Contenedor con hielo	1 Micropipeta P-1,000
1 Barra magnética	1 <i>Rack</i> para tubos cónicos de 50 mL
1 Espátula	6 Tubos cónicos de 50 mL
1 Bisturí	6 Microtubos de 1.6 mL
1 Pincel	Fosfato de sodio 0.05 M, pH 7, 4° C
1 Jeringa y filtro de 0.4 μ m	Bicina 0.03 M, pH 8.5, 4° C
1 Membrana de celulosa para diálisis (Spectra/Por [®] MWCO 12-14,000, 16 mm de diámetro)	Agua destilada
2 Pinzas para sellar la membrana de diálisis	Solución <i>stock</i> DTT 1 M
1 Matraz Erlenmeyer de 250 mL	Solución <i>stock</i> PMSF 100 mM
	Solución <i>stock</i> Glicerol al 80% (p/v)
	Sulfato de amonio

PROTOCOLO

- 👁 Utilice bata y guantes en todo momento.
 - 👁 Consiga un corazón bovino. Es primordial que el órgano haya sido extraído el mismo día de la práctica y se haya mantenido a 4° C.
1. Cortar 25 g de músculo cardiaco con ayuda de un bisturí. Agregar 75 ml de amortiguador Fosfato de sodio 0.05 M pH 7, PMSF 1 mM, a 4° C (Fig. 2).
 2. Homogenizar en licuadora a máxima velocidad: 3 ciclos de 1 min con 3 min de descanso en hielo (Fig. 3).
 3. Pasar el homogenizado por un cedazo, con ayuda de una espátula y evitando la formación de burbujas (Fig. 4).

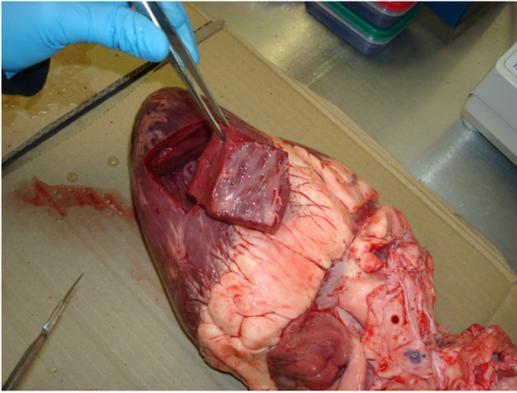


Fig. 2 Obtención del tejido



Fig. 3 Homogenización



Fig. 4 Cribado

4. Medir el volumen y tomar una alícuota de 500 μL (**homogenizado crudo, alícuota 0**).
5. Después de equilibrar los tubos, centrifugar a 17,000 g , 4°C, 20 min (Fig. 5-6).



Fig. 5 Equilibrar

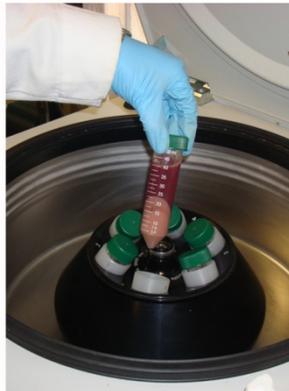


Fig. 6 Centrifugar



Fig. 7 Precipitar

6. Recuperar el sobrenadante, medir su volumen y tomar una alícuota de 500 μL (**homogenizado post-centrifugado, alícuota 1**).
7. Precipitar al 40% de sulfato de amonio (0.242 g/mL). Agregar el reactivo lentamente, estando la muestra en hielo, con agitación ligera (Fig. 7).
8. Incubar 15 min en hielo (sin agitación).
9. Después de equilibrar los tubos, centrifugar a 15,000 g , 4°C, 15 min.
10. Recuperar el sobrenadante, medir su volumen y tomar una alícuota de 500 μL (**sobrenadante del 40%, alícuota 2**) (Fig. 8-10).

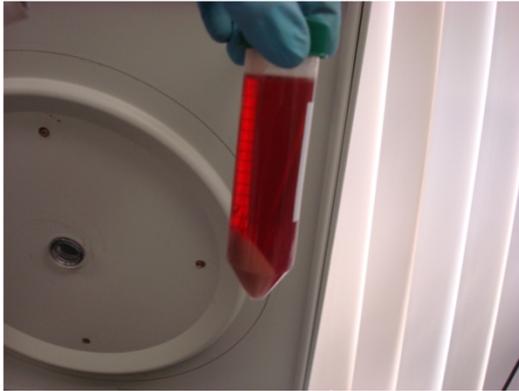


Fig. 8 Recuperar sobrenadante

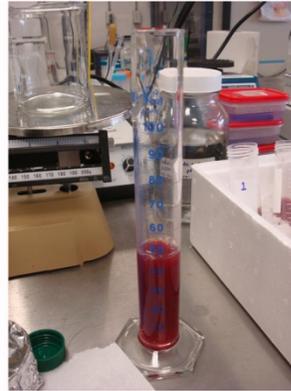


Fig. 9 Medir volumen



Fig. 10 Tomar alícuota

11. Precipitar al 65% de sulfato de amonio (0.166 g/mL). Agregar el reactivo lentamente, estando la muestra en hielo, con agitación ligera.
12. Incubar 15 min en hielo (sin agitación).
- 👁️ Debido a la duración de la clase, habitualmente en este punto se termina la sesión y la muestra se almacena a 4° C hasta su procesamiento posterior.
13. Después de equilibrar los tubos, centrifugar a 15,000 g, 4° C, 15 min.
14. Decantar sobrenadante, medir el volumen y tomar una alícuota de 500 μ L (**sobrenadante del 65%, alícuota 3**) (Fig. 11).
15. Resuspender la pastilla suavemente con 5 mL de amortiguador Bicina 0.03 M, pH 8.5, 4° C, con ayuda de un pincel. Tomar una alícuota de 200 μ L (**pastilla del 65% resuspendida y sin dializar, alícuota 4**). (Fig. 12).
16. Introducir el resto del resuspendido en la bolsa de diálisis, previamente hidratada en agua destilada por al menos 10 min. (Fig. 13).

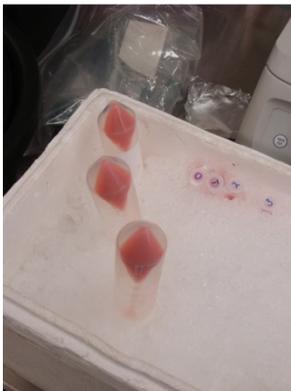


Fig. 11 Recuperar pastilla

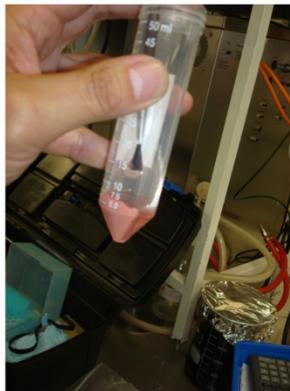


Fig. 12 Resuspender



Fig. 13 Introducir a la bolsa de diálisis

17. Dializar contra 1.5 L de amortiguador Bicina 0.03 M pH 8.5 a 4° C, en agitación. Realizar 2 cambios de amortiguador con intervalos de al menos 1.5 h (Fig. 14)

18. Al día siguiente, recuperar el dializado, agregar DTT a una concentración final de 1 mM y pasarlo por un filtro de 0.4 μ m. Tomar una alícuota de 200 μ L (Pastilla del 65% resuspendida y dializada, alícuota 5). (Fig. 15)

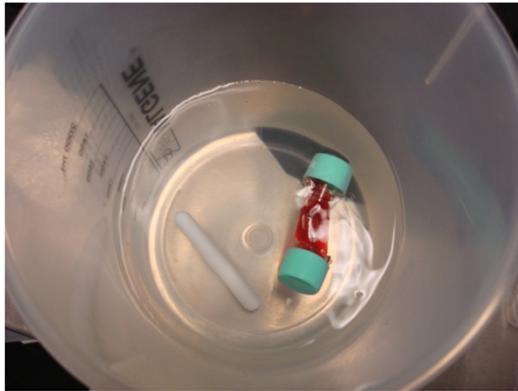


Fig. 14 Dializar



Fig. 15 Filtrar

19. Agregar glicerol a una concentración final de 10% y almacenar a 4° C junto con las alícuotas tomadas durante el procedimiento.

👁 Las alícuotas recolectadas deberían ser evaluadas en busca de actividad enzimática (ver Práctica 2) el mismo día de su obtención, pero debido a la duración de cada clase, este procedimiento se realizará más adelante.

RESULTADOS

Observe y documente los cambios físicos de la muestra durante todo el proceso. Describa la diferencia entre las pastillas obtenidas después de cada centrifugación. Para cada paso de su purificación, proporcione toda la información recolectada (mL del homogenado crudo utilizado, mL de cada sobrenadante obtenido, gramos de sulfato de amonio usado).

CUESTIONARIO

a. Si se sabe que la temperatura óptima de actividad de la LDH bovina es de 37° C, ¿por qué es importante purificarla a 4° C?

- b. Explica por qué se usaron 2 porcentajes de saturación de sulfato de amonio en el experimento.
- c. Explica por qué es importante agregar el sulfato de amonio lentamente.
- d. Explica las interacciones físicas de las moléculas que llevan a las proteínas a precipitar en concentraciones altas de sal.
- e. ¿Cómo se puede determinar la presencia de LDH en cada una de las alícuotas recolectadas durante el procedimiento experimental? ¿Por qué se deberían evaluar las alícuotas el mismo día de su obtención?
- f. Investiga en las bases de datos proporcionadas, la siguiente información sobre la lactato deshidrogenasa: localización biológica, código EC y significado, estructura y grupos funcionales del sustrato, secuencia primaria, peso molecular, pI, porcentaje de aminoácidos polares y no polares, aminoácidos aromáticos, condiciones de actividad óptima: pH, temperatura, fuerza iónica.

Bases de datos:

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>

<http://www.brenda-enzymes.org/>

<http://www.rcsb.org/>

<http://www.worthington-biochem.com/index/manual.html>

SOLUCIONES

- Fosfato de sodio 0.05 M, pH 7 (100 mL)
PM_{Fosfato de sodio} 163.94
Disolver 0.8197 g de Fosfato de sodio en 80 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7 agregando HCl 6 N. Aforar a 100 mL y guardar a 4 °C.
- Bicina 0.03 M pH 8.5 (5 L)
PM_{Bicina} 163.17



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Disolver 24.47 g de Bicina (*N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycine*) en 1 L de agua destilada, ajustar el pH a 8.5 agregando HCl concentrado. Ajustar el volumen a 5 L. Guardar a 4° C.

- Solución *stock* (solución concentrada) DTT 1 M (1 mL)

$PM_{\text{DTT}} 154.25$

Disolver 0.15 g de DTT (*Dithiothreitol*) en 1 mL de agua Milli-Q™. Guardar a -20° C.

- Solución *stock* PMSF 100 mM (1 mL)

$PM_{\text{PMSF}} 174.2$

Disolver 17.42 mg de PMSF (*Phenylmethanesulfonyl fluoride*) en 1 mL de isopropanol.

Guardar a -20° C.

- Solución *stock* Glicerol 80% (p/v) (10 mL)

Mezclar 8 g de Glicerol con 2 mL de agua Milli-Q™. Guardar a temperatura ambiente.

Práctica 2. Espectrofotometría.

Medición de actividad enzimática de la LDH

OBJETIVOS

1. Conocer y manejar correctamente el espectrofotómetro, ajustarlo a diferentes longitudes de onda, fijar la absorbancia en cero y medir la absorbancia de diferentes soluciones.
2. Definir los reactivos que se deben utilizar en los ensayos, así como los que se deben utilizar como blanco.
3. Determinar espectrofotométricamente la actividad enzimática de la LDH.

INTRODUCCIÓN

La espectrofotometría es el estudio de la interacción de la radiación electromagnética con moléculas, átomos y iones. Cuando un haz de energía radiante monocromática (luz con una longitud de onda definida) incide sobre una sustancia, parte de la energía es absorbida y el resto transmitida. La mayoría de los compuestos tienen una o varias longitudes de onda características a las que absorben la luz. Así, una solución puede contener muchos compuestos que absorben a diferentes longitudes de onda, sin embargo, si el compuesto de interés absorbe a una determinada longitud, es posible determinar su concentración aún en mezcla.

La ley de Lambert-Beer expresa la relación entre la transmitancia y la concentración de una sustancia, es decir, explica que la transmitancia disminuye en progresión geométrica cuando la concentración aumenta en progresión aritmética (5):

$$-\log T = ac$$

Donde T es transmitancia, c es la concentración y a la absortividad

La ley de Beer permite calcular la concentración de una sustancia en solución. Uno de los usos más comunes de la espectrofotometría es el ensayo de enzimas, ya sea calculando la cantidad de proteínas presentes en una muestra o midiendo el cambio de concentración de sustratos o productos en una reacción enzimática. La determinación de la actividad de la LDH

se basa en el monitoreo de la aparición de la coenzima reducida NADH, que absorbe luz a 340 nm, y no así la forma oxidada NAD⁺ (Figura 1) (6).

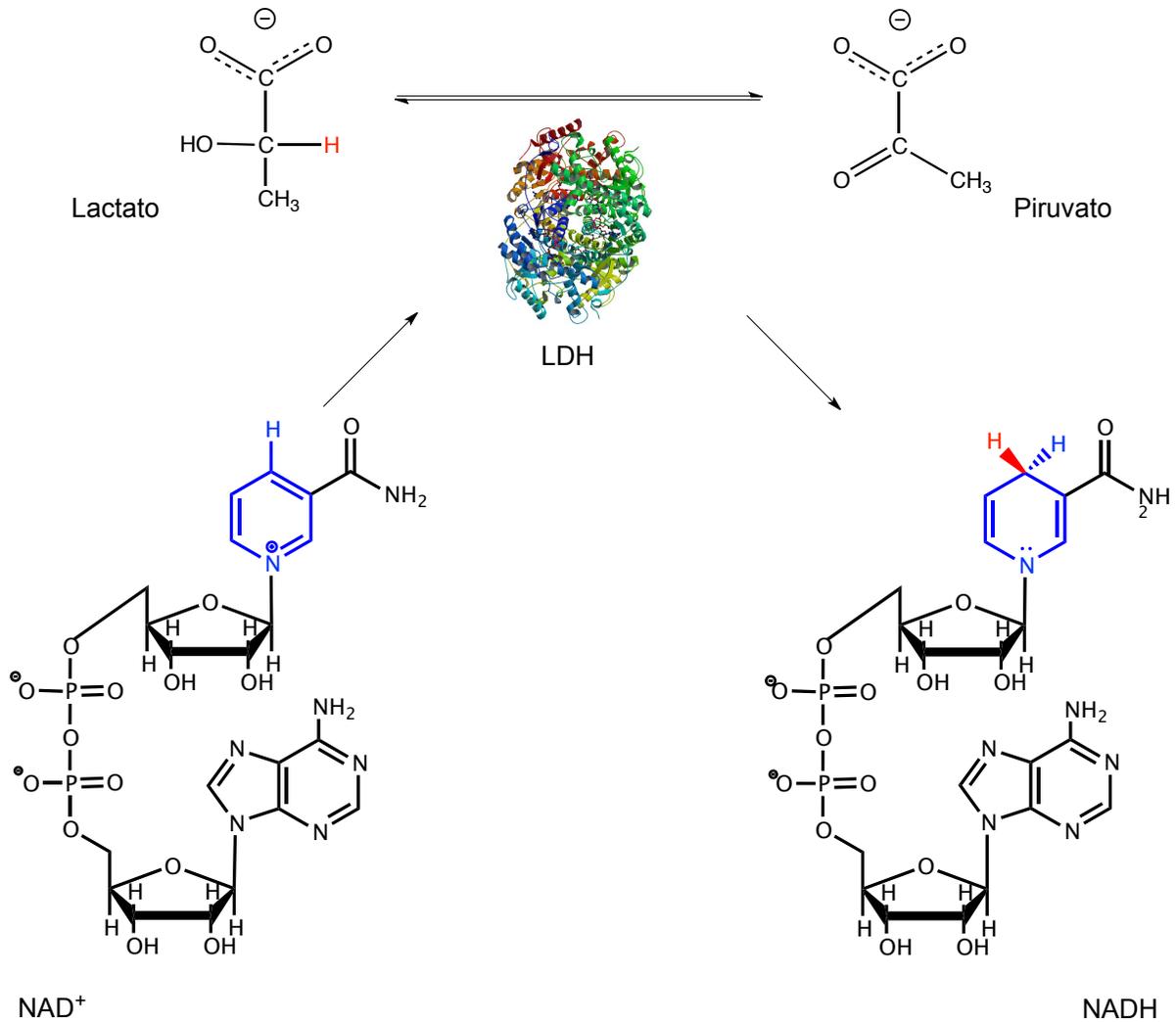


Figura 1. Reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa. PDB: 1I10.

Tras la observación del aumento de la absorbencia y conociendo la velocidad del incremento, es posible calcular cuanta NADH se forma por unidad de tiempo, siendo posible así convertirlo a unidades de actividad enzimática. La actividad enzimática se define como la cantidad de producto catalizado por una enzima en una reacción específica por unidad de tiempo:

$$\text{actividad} = \frac{\text{cantidad de producto}}{\text{tiempo}}$$

Generalmente la actividad enzimática se expresa en micromoles de producto por minuto:

1 unidad de actividad (U) = 1 μmol / min

Es posible, además, conocer la concentración de enzima en una muestra, calculando cuantas unidades de actividad están presentes en un cierto volumen, conocida como actividad relativa y generalmente se mide en unidades por mililitro:

actividad relativa = unidades / mL = U / mL

Por otro lado, la actividad específica describe la relación entre unidades de actividad enzimática y los miligramos de proteína total en la muestra.

actividad específica = U / mg de proteína

Dado que la actividad específica muestra una relación, cualquier cosa que incremente el número de unidades o disminuya el número de miligramos de proteína, la incrementará. En general, la fracción con la mayor actividad específica se considera la más pura (1).

MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

1 Vórtex	1 Tubo cónico de 50 mL
1 Espectrofotómetro	6 Celdas para espectrofotómetro, 10 mm de paso, 1.5 mL de volumen
1 Contenedor con hielo	Alícuotas obtenidas en la Práctica No. 1
2 Racks para micropuntas (20 a 200 μL y 200 a 1000 μL)	CAPS 0.15 M, pH 10
2 Micropipetas (P-1,000 y P-200)	NAD ⁺ 6 mM
1 Rack para tubos cónicos	Lactato 0.3 M

PROTOCOLO

👁 Utilice bata y guantes en todo momento.

1. Hacer una mezcla de reacción a temperatura ambiente en un tubo cónico de 50 mL con las siguientes soluciones (Fig. 2, 3):

CAPS 0.15 M, pH 10 11.4 mL

NAD⁺ 6 mM 3 mL

Lactato 0.3 M 3 mL

2. Colocar 2.8 mL de la mezcla de reacción en 6 celdas para espectrofotómetro (Fig. 4).

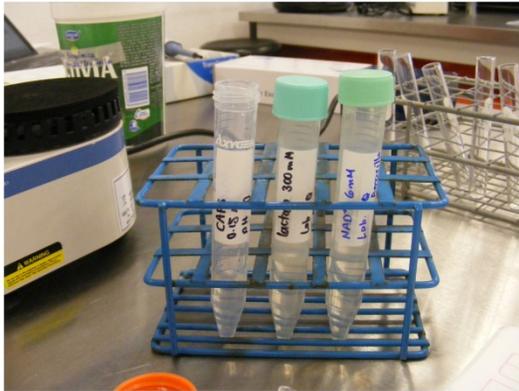


Fig. 2 Soluciones stock



Fig. 3 Mezcla de reacción



Fig. 4 Pipetear en la celda

3. Colocar una de las celdas en el espectrofotómetro y fijar el blanco a 340 nm (Fig. 5).
4. Agregar 200 μL de la alícuota 0 (Fig. 6), obtenida en la práctica previa, mezclar rápidamente por pipeteo y registrar el cambio de absorbancia cada 30 segundos, durante 3 min.



Fig. 5 Fijar la absorbancia en cero



Fig. 6 Agregar la muestra

5. Repetir los puntos 3 y 4 para el resto de las alícuotas obtenidas en la práctica previa.

RESULTADOS

Grafique la absorbancia contra el tiempo. La velocidad inicial de la reacción es el cambio de absorbancia en el primer minuto.

Reporte la actividad de la LDH en las 6 alícuotas en $\mu\text{mol}/\text{min}$ utilizando la siguiente fórmula:

$$U = \frac{(\Delta \text{ absorbancia} / \Delta \text{ min}) \times 10^6 \mu\text{M}/\text{M} \times 0.003 \text{ L}}{6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}(\text{cm})}$$

Calcule las unidades/mL (actividad enzimática relativa) y el total de unidades en cada fracción.

CUESTIONARIO

- Se tomaron 5 μL de una muestra diluida 1:6 y se determinó la actividad enzimática de la LDH presente. Se utilizó una celda con volumen de 3 mL y la actividad mostrada fue de 0.30 U. ¿Cuál es el $\Delta A/\text{min}$ observada? ¿Cuál es la actividad relativa de la muestra original?
- Explica por qué no se debe perder actividad de la LDH cuando se centrifuga una muestra a 20,000 g.
- Una reacción catalizada por una enzima genera un producto que presenta una absorbencia máxima a 412 nm. El coeficiente de absortividad es de $4000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Se hizo una dilución 1:10 de la enzima y 20 μL de esa dilución se colocaron en una celda con 80 μL de agua y 1.9 mL de mezcla de reacción. El cambio de absorbencia por minuto es de 0.05.
¿Cuántas unidades hay en la celda si 1 U = 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$?
¿Cuántas unidades hay en la celda si 1 U = 1 nmol/min ?
¿Cuál es la actividad relativa de la enzima sin diluir (1 U = 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$)?
- Una muestra que contiene una enzima mostró 24 mg de proteína/mL. A partir de esta muestra, 20 μL en un volumen estándar de incubación de 0.1 mL catalizan la incorporación de glucosa en glucógeno a una velocidad de 1.6 nmol/min . Calcula la velocidad de la reacción expresada en los siguientes términos:
Micromoles/minuto
Micromoles/litro/minuto
Micromoles/miligramos de proteína/minuto
Unidades/mililitro
Unidades/miligramos de proteína
- Una muestra que contiene extracto crudo obtenido de la purificación de una enzima tiene una actividad total de 45 U y actividad específica de 29 mU/mg. En el último paso de la purificación, la fracción correspondiente mostró una actividad de 19.5 U y una actividad



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

específica de 775 mU/mg. Calcular la cantidad de proteínas en mg en la fracción y en el extracto crudo.

- f. La enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa cataliza la conversión de gliceraldehído-3-fosfato en 1,3-bisfosfoglicerato. En condiciones óptimas 5 μg de la enzima catalizan dicha reacción. Calcular la actividad específica de la enzima.

SOLUCIONES

- CAPS 0.15 M, pH 10 (200 mL)

$PM_{\text{CAPS}} 221.32$

Disolver 6.64 g de CAPS (*3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid*) en 170 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 10 agregando NaOH 10 N. Aforar a 200 mL y guardar a 4° C.

- NAD^+ 6 mM (20 mL)

$PM_{\text{NAD}^+} 663.43$

Disolver 79.61 mg de NAD^+ (*Nicotinamide adenine dinucleotide*) en 20 mL de agua Milli-Q™. Guardar a 4° C.

- Lactato 0.3 M (20 mL)

$PM_{\text{Lactato}} 90.08$

Disolver 0.54 g de Lactato (L-(+)-ácido láctico) en 20 mL de agua Milli-Q™. Guardar a 4° C.

Práctica 3. Espectrofotometría. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

OBJETIVOS

1. Definir una muestra blanco; decidir qué reactivos deben estar presentes.
2. Construir las curvas de calibración por el método de Bradford y determinar la concentración de proteína de las fracciones enzimáticas a partir de ellas.
3. Decidir cuándo se deben hacer diluciones y hacer las diluciones adecuadas
4. Determinar la actividad específica de las fracciones enzimáticas.

INTRODUCCIÓN

El ensayo de Bradford, es un método colorimétrico para la determinación de la concentración de proteína, se basa en un cambio de absorbencia del colorante Coomassie Azul Brillante G-250 que bajo condiciones ácidas convierte su forma roja en la forma azul que se une a la proteína que se está ensayando. Durante la formación de este complejo, dos tipos de enlaces tienen lugar: la forma roja de Coomassie dona primero su electrón libre a los grupos ionizables en la proteína, lo que provoca una desnaturalización del estado nativo de la proteína, por consiguiente, permite la exposición de las zonas hidrofóbicas. Los residuos de los aminoácidos hidrofóbicos que se exponen en estas condiciones, se unen de forma no covalente a la región no polar del colorante a través de fuerzas de van der Waals. Esta situación permite el reacomodo de los grupos amina que son positivos en proximidad con la carga negativa del colorante. Finalmente se realiza una interacción iónica. La unión con la proteína estabiliza la forma azul del colorante Coomassie, por lo que la cantidad de complejo presente en la solución es una medida de la concentración de proteína, y se puede estimar mediante el uso de una lectura de absorbencia (7).

A la forma unida del colorante a la proteína se le asigna un máximo de absorción de 595 nm. Las formas del colorante, son catiónicas y de color verde o rojo. La unión del colorante a la

proteína estabiliza la forma aniónica azul. El aumento de la absorbencia a 595 nm es proporcional a la cantidad de colorante unido, y por lo tanto a la cantidad de proteína presente en la muestra.

En la Figura 1 se muestra el color del reactivo de Bradford para muestras en ausencia y presencia de proteína. Nótese el cambio de color de café a azul cuando se ha realizado el proceso químico descrito en los párrafos anteriores.

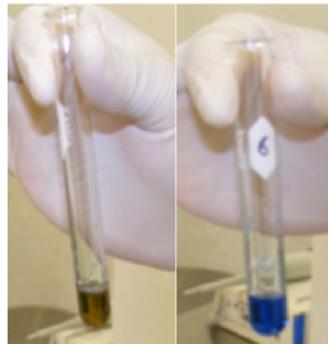


Figura 1. A la izquierda se muestra al reactivo de Bradford, a la derecha se muestra al reactivo de Bradford pero en presencia de 70 μg de albúmina sérica bovina (BSA, del inglés *bovine serum albumine*).

MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

1 Vórtex	13 Celdas para espectrofotómetro, 10 mm
1 Espectrofotómetro	de paso, 1.5 mL de volumen
1 Contenedor con hielo	Alícuotas obtenidas en la Práctica No. 1
3 <i>Racks</i> para micropuntas (1 a 20, 20 a 200 μL y 200 a 1000 μL)	Agua destilada
3 Micropipetas (P-1,000, P-200 y P-20)	BSA 1 mg/mL
1 <i>Rack</i> para tubos de ensayo	Reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich o BioRad)
13 Tubos de ensayo	

PROTOCOLO

👁 Utilice guantes en todo momento

1. Rotular los 13 tubos de ensayo y colocar los volúmenes necesarios en cada uno de ellos, según la siguiente tabla. Primero adiciona el agua, después la BSA o las alícuotas (Fig. 2) y finalmente el reactivo de Bradford (Fig. 3).

👁 Para determinar la concentración proteínica en las alícuotas, se sugiere iniciar con 90 μL de agua y 10 μL de la alícuota. Sin embargo, considere que podría ser necesario realizar diluciones, o bien, utilizar hasta 100 μL de alguna alícuota.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Agua destilada (μL)	100	90	80	60	50	30	20	¿?	¿?	¿?	¿?	¿?	¿?
BSA 1 mg/mL (μL)	0	10	20	40	50	70	80	0	0	0	0	0	0
Alícuota (μL) (del 0 al 5)	0	0	0	0	0	0	0	¿?	¿?	¿?	¿?	¿?	¿?
Bradford (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Volumen final (mL)	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1



Fig. 2 Agregar BSA o muestra



Fig. 3 Agregar reactivo Bradford

2. Agitar en vórtex después de agregar el reactivo de Bradford a cada tubo (Fig. 4)

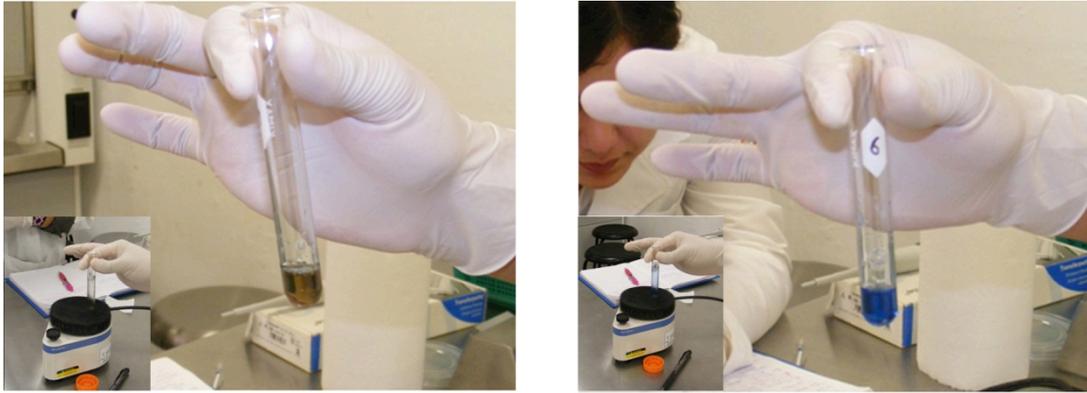


Fig. 4 Mezclar con vórtex

3. Esperar 5 min antes de colocar la muestra en la celda para espectrofotómetro (Fig. 5)
4. Fijar la absorbencia cero a 595 nm con el “blanco” (mezcla en el tubo de ensayo #1). El color es estable hasta por una hora (Fig. 6).
5. Después de registrar la lectura, regresa cada muestra a su tubo de ensayo correspondiente (Fig. 7).



Fig. 5 Colocar en la celda



Fig. 6 Leer a 595 nm



Fig. 7 Regresar al tubo

6. Con los datos obtenidos, primero elabora la curva patrón, graficando cantidad de proteína (μg) contra valores de absorbencia.
7. Después, interpola cada uno de los datos de absorbencia de las alícuotas y realiza los cálculos necesarios para conocer la cantidad de proteína en cada alícuota. No olvides considerar el volumen cuantificado y en su caso, el factor de dilución.

RESULTADOS

Para la correcta determinación de la concentración de la proteína, se debe contar primero con los cálculos de los volúmenes a considerar. Luego es muy importante que la precisión en el pipeteo sea de la mejor calidad, para con esto minimizar los errores. El experimento es muy simple, por lo que depende de que las cuentas y la agregación de los volúmenes que de ellas proviene sean correctas. En todos los casos se debe agregar un volumen de agua, un volumen de la solución muestra, agregar el reactivo de Bradford, incubar, calibrar el espectrofotómetro, cuantificar y calcular las concentraciones de las muestras problema. Para saber la concentración de una muestra problema, se debe realizar una curva patrón a partir de una solución de proteína con una concentración conocida. Los valores de absorbencia a partir de este experimento, se grafican como función de su concentración (previamente conocida a partir de los cálculos realizados para la construcción de la curva patrón). Esos valores deben ser ajustados por una recta (8). A partir de esa información gráfica es posible, después de interpolar los valores de absorbencia de la muestra problema, conocer su concentración.

Debe ser evidente que para la misma solución, agregar más volumen de la muestra proteínica del calculado, resultará en una lectura de absorbencia mayor y viceversa, por lo que se recomienda ser extremadamente cautos a la hora de realizar la cuantificación de la concentración de proteína.

CUESTIONARIO

- a. ¿De qué otras formas se puede obtener la concentración de una solución de proteína? Mencione por lo menos 4.
- b. ¿Qué es un máximo de absorbencia, para qué se usa en bioquímica?

SOLUCIONES

- BSA 1 mg/mL (10 mL)

Disolver 10 mg de BSA (albúmina sérica bovina) en 10 mL de agua. Preparar alícuotas de 1 mL y guardar a 4° C.

- Reactivo de Bradford. Se usará una solución comercial.

Práctica 4. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizantes

Objetivos

1. Preparar un gel de poliacrilamida discontinuo y desnaturizante
2. Manipular muestras proteicas para someterlas a electroforesis
3. Determinar el peso molecular de bandas proteicas
4. Señalar la pureza de las mejores muestras de LDH

Introducción

El término electroforesis se refiere al movimiento de moléculas cargadas en respuesta a un campo eléctrico, lo que causa su separación. Los factores que afectan la electroforesis de proteínas incluyen la fuerza del campo eléctrico, la temperatura del sistema, el pH, el tipo de iones usados y la concentración del amortiguador, así como el tamaño, forma y carga de la proteína.

Cuando la electroforesis se realiza en geles de poliacrilamida (*PAGE, Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), el gel sirve como un tamiz selectivo de tamaño durante la separación. Como las proteínas se mueven a través del gel en respuesta al campo eléctrico, el tamaño del poro del gel permite a las proteínas más pequeñas viajar más rápidamente que las proteínas más grandes, cubriendo un intervalo de 5 a 250 kDa.

Habitualmente, el gel está orientado verticalmente entre 2 cámaras con amortiguador y el único camino eléctrico entre las 2 cámaras es a través del gel. La aplicación del campo eléctrico a través de estos amortiguadores fuerza la migración de proteínas dentro y a través del gel. Pueden usarse 2 tipos de sistemas de amortiguadores, el continuo y el discontinuo. El sistema continuo usa el mismo amortiguador a pH constante en el gel, la muestra y las cámaras. El sistema discontinuo utiliza un gel separado en 2 secciones: un gel concentrador o

stacking gel, de poro grande, en la parte superior de un gel separador o *resolving gel*, de poro pequeño, y diferentes amortiguadores en los geles y cámaras.

En la electroforesis en gel, éste se solidifica con un peine que genera pocillos en los que se aplican las muestras, y las proteínas que están más cercanas al gel entran primero. En un sistema continuo, la separación uniforme de la matriz produce bandas proteicas que son difusas y con pobre resolución, pero en sistemas discontinuos, las proteínas primero migran rápidamente a través del gel concentrador y luego se enlentecen conforme entran al gel separador, permitiendo que se apilen una encima de otra para formar bandas estrechas, con mejor resolución. El sistema discontinuo también usa iones de diferente movilidad electroforética en el amortiguador, que forman una frontera móvil cuando se aplica un voltaje: el ion anterior o *leading* (cloruro) y el ion posterior o *trailing* (glicinato). Las proteínas tienen una movilidad intermedia, por lo que se apilan y concentran en una zona estrecha al inicio de la electroforesis. A medida que la zona se mueve a través del gel, el efecto de tamizado de la matriz del gel hace que las proteínas de diferentes pesos moleculares se muevan a diferentes velocidades. El sistema discontinuo provee mayor resolución que el sistema continuo y es el que emplearemos en esta práctica.

El sistema discontinuo original (9, 10) fue desarrollado para la separación de proteínas séricas de manera que preservaran su conformación nativa y actividad biológica, por lo que las proteínas son preparadas en amortiguador de muestra no desnaturizante ni reductor y la electroforesis se realiza en iguales condiciones. Los datos de PAGE nativos son difíciles de interpretar porque la movilidad proteica es determinada por una compleja combinación de factores, y como la carga nativa está conservada, las proteínas pueden migrar hacia cualquier electrodo, dependiendo de su carga.

Para superar las limitaciones del sistema PAGE nativo, Laemmli (11) incorporó el detergente aniónico SDS dentro del sistema discontinuo, ahora desnaturizante (SDS-PAGE). Cuando las proteínas se someten a electroforesis en presencia de SDS, se encuentran completamente desnaturizadas y disociadas una de otra. Además, el SDS se une no covalentemente a las

proteínas de forma que les confiere una carga negativa global; la carga por unidad de masa es prácticamente constante para todas las proteínas porque el SDS se une a una estequiometría cercana a una molécula de SDS por cada 2 residuos de aminoácidos.

Como resultado, la tasa a la cual la proteína unida al SDS migra en un gel, dependerá principalmente de su tamaño, permitiendo la estimación del peso molecular (Fig. 1). Además del SDS en el amortiguador de muestra, se utilizan agentes reductores de grupos tiol, como el 2-mercaptoetanol, que rompen puentes disulfuro intermoleculares e intramoleculares, para alcanzar un completo desplegamiento proteico y mantener a las proteínas en estado reducido.

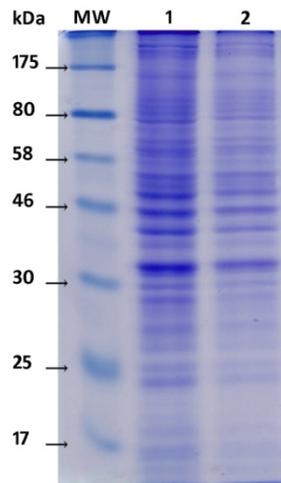


Figura 1. Ejemplo de un gel de poliacrilamida al 10%, teñido con azul de Coomassie, donde las bandas están bien resueltas. En el carril MW se encuentra el marcador de peso molecular (New England BioLabs, no. de catálogo P7708), en el carril 1 se cargaron 30 µg de proteínas totales de células en cultivo, mientras que en el carril 2 se cargaron 15 µg de las mismas proteínas.

La poliacrilamida es un gran polímero de acrilamida con un co-monómero entrecruzante o *cross-linker*, la bisacrilamida. La polimerización se inicia con persulfato de amonio (PSA), que crea radicales libres y empieza la reacción en cadena que unirá a todas las moléculas de acrilamida, mientras que el tetrametiletilenediamino (TEMED) actúa como catalizador, estimulando la formación de radicales libres durante la reacción.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

El porcentaje de poliacrilamida nos da una idea del tamaño de poro y se define como %T (concentración total del monómero en g/100 mL). Un mayor %T significa un mayor radio polímero-agua y por lo tanto, poros más pequeños. En cambio, el *cross-linker* tiene un porcentaje óptimo, el cual está entre el 3 y el 5% del total.

MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

1 Cámara de electroforesis Mini-Protean® Tetra Cell (BioRad)	1 <i>Rack</i> para tubos cónicos Agua destilada
1 Fuente de poder PowerPac™	Marcador de peso molecular para proteínas
1 Módulo de ensamble, peine y vidrios (<i>glass spacer plates with 1.5 mm spacers and glass short plates</i>)	Acilamida/bis-acilamida 30:0.8 Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8
1 Agitador horizontal	Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8
1 Transiluminador de luz blanca	Solución SDS 10% (p/v)
1 Termoblock a 95° C	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED)
1 Tubo cónico de 50 mL	PSA al 10% (p/v)
1 Tubo cónico de 15 mL	Solución Laemmli 2X
1 Charola para tinción	Amortiguador de corrida 1X
1 Contenedor con hielo	Solución de Coomassie
3 <i>Racks</i> para micropuntas (2 a 20 µL, 20 a 200 µL y 200 a 1000 µL)	Solución desteñidora
3 Micropipetas (P-1,000, P-200 y P-20)	Alícuotas obtenidas en la práctica No. 1

PROTOCOLO

👁 Utilice guantes en todo momento

1. Colocar los vidrios en el módulo de ensamble, acomodar el peine y hacer una marca sobre el vidrio a 0.5 cm por debajo de los dientes del peine (Fig. 2)
2. Mezclar en un tubo cónico de 50 mL las siguientes soluciones para preparar el gel separador:

Agua destilada	4.045 mL	
Acrilamida/bis-acrilamida 30:0.8	3.3 mL	(concentración final 10%:0.26%)
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 mL	(concentración final 375 μ M)
Solución SDS 10%	0.1 mL	(concentración final 0.1%)
PSA 10%	50 μ L	(concentración final 0.05%)
TEMED	5 μ L	

👁 Agregar el PSA y el TEMED hasta el final, volver a mezclar y continuar inmediatamente con el siguiente paso.

3. Agregar la mezcla lentamente en el espacio entre los vidrios, hasta la marca previamente realizada (Fig. 3).

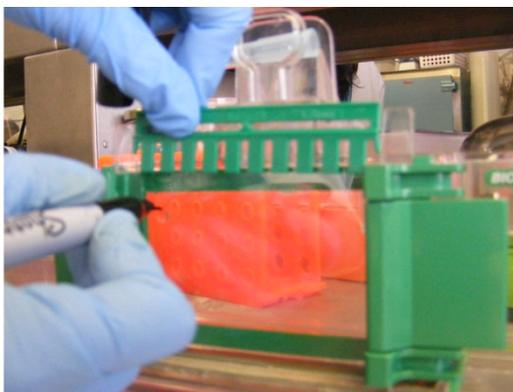


Fig. 2 Ensamblar vidrios y marcar

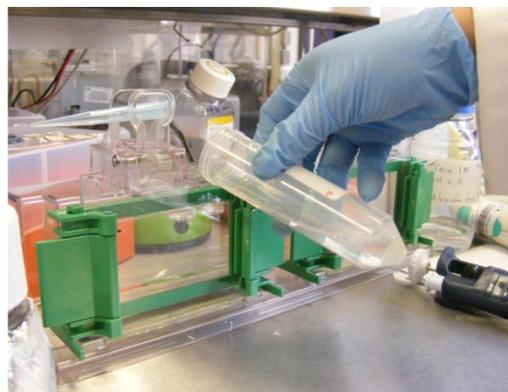


Fig. 3 Vaciar la mezcla

4. Agregar agua destilada con una micropipeta sobre el gel separador, para evitar que la presencia de oxígeno inhiba la polimerización al bloquear los radicales libres.
5. Esperar a que el gel solidifique (aproximadamente 30 min).

6. Secar con papel filtro el agua añadida en el paso 4. Cuida de no dañar el gel.
7. Mezclar en un tubo cónico de 15 mL las siguientes soluciones para preparar el gel concentrador:

Agua destilada	3.02 mL	
Acrilamida/bis-acrilamida 30:0.8	0.65 mL	(concentración final 4%:0.10%)
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.25 mL	(concentración final 375 μ M)
Solución SDS 10%	50 μ L	(concentración final 0.1%)
PSA 10%	25 μ L	(concentración final 0.05%)
TEMED	5 μ L	


 Agregar el PSA y el TEMED hasta el final, volver a mezclar y continuar inmediatamente con el siguiente paso.

8. Agregar la mezcla lentamente en el espacio entre los vidrios, hasta llegar al borde.
9. Colocar el peine cuidando de no atrapar ninguna burbuja, porque provocan distorsión en la superficie del gel.
10. Esperar a que el gel solidifique (aproximadamente 15 min).
11. Colocar el gel en la cámara de electroforesis y agregar amortiguador de corrida a cada compartimiento (Fig. 4).
12. Preparar las muestras con solución Laemmli 2X y hervir por 4 min a 95° C (en cada pozo deberás cargar 10 μ g de proteína y el volumen máximo que le cabe a cada uno es de 50 μ L)

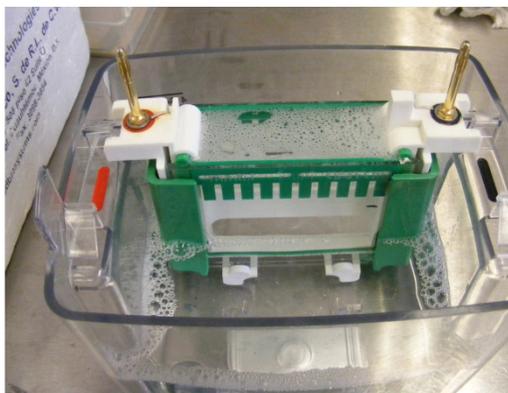


Fig. 4 Agregar *buffer* de corrida



Fig. 5 Cargar muestras

13. Remover cuidadosamente el peine y cargar lentamente el marcador de peso molecular en el pozo #1 y el resto de las muestras en los pozos adyacentes (Fig. 5).

👁 El marcador de peso molecular debe mantenerse en hielo. Su preparación para ser cargado en el gel puede variar dependiendo de la marca, verifica las instrucciones del proveedor.

👁 Evita burbujear con la micropipeta mientras se coloca la muestra para que ésta no se salga del pozo.

14. Cargar 30 μ L de solución Laemmli 2X en los pozos que no tendrán muestras proteicas, o de lo contrario, la muestra adyacente se extenderá lateralmente.

15. Cerrar la cámara de electroforesis y aplicar una corriente de 120 V (si la cámara se coloca adecuadamente, se observará la formación de burbujas en los electrodos, Fig. 6, 7).



Fig. 6 Aplicar corriente eléctrica



Fig. 7 Dejar correr las muestras

16. Apagar la fuente de poder cuando el colorante se encuentre en el borde inferior de los vidrios (tardará aproximadamente 60 min en migrar hasta ahí)

17. Sacar el gel de la cámara y teñirlo con la solución de Coomassie durante 30 min en agitación (usa un volumen suficiente para cubrir el gel)

18. Retirar la solución de Coomassie y cubrir el gel con la solución desteñidora. Después de 30 min en agitación, renovar la solución desteñidora y dejar en agitación por otros 30 min.

19. Retirar la solución desteñidora y cubrir el gel con agua destilada. Visualizar las proteínas en la luz blanca del transiluminador.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

RESULTADOS

Evalúe el gel comparando el patrón de bandas de cada carril de acuerdo a lo esperado para cada alícuota. Describa el efecto del porcentaje de poliacrilamida sobre la separación de bandas en el carril del marcador de peso molecular y relaciónelo con el peso molecular de la proteína LDH. Intente identificar la banda a la cuál podría corresponder la proteína LDH. Discuta si hay alícuotas en las que no se esperaba tener proteína LDH.

CUESTIONARIO

1. ¿Cuánto de cada una de las soluciones *stock* debes mezclar para preparar un gel separador al 15%?
2. ¿Cuáles son las funciones del glicerol y del azul de bromofenol en el amortiguador de carga para proteínas?
3. ¿Cuál es el peso molecular de la enzima LDH bovina?

SOLUCIONES

- Solución *stock* (solución concentrada) SDS 10% (p/v) (10 mL)
Disolver 1 g de SDS en 8 mL de agua destilada y agitar con agitador magnético en un baño de agua a 68° C para favorecer la disolución, en caso de ser necesario ajustar el pH a 7.2 con una solución de HCl, y ajustar el volumen a 10 mL. Guardar a temperatura ambiente. No es necesario esterilizar esta solución.
- Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 (100 mL)
 $PM_{\text{Tris}} 121.14$
Disolver 6.05 g de Tris base en 60 mL de agua destilada. Ajustar a pH de 6.8 agregando HCl 6 N. Dejar enfriar la solución a temperatura ambiente. Ajustar el volumen a 100 mL. Almacenar a 4° C.
- Solución *stock* de azul de bromofenol 0.5% (p/v) (10 mL)
Disolver 0.05 g de azul de bromofenol en 10 mL de agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.

- Acrilamida:bis-acrilamida 30:0.8 (200 mL)
Disolver 60 g de acrilamida y 1.6 g de bis-acrilamida en 120 mL de agua destilada. Aforar a 200 mL. Filtrar con filtro de 0.45 μm y guardar en frasco ámbar a 4 °C.
- Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 (150 mL)
PM_{Tris} 121.14
Disolver 27.23 g de Tris base en 80 mL de agua destilada, ajustar pH a 8.8 con HCl 6N. Aforar a 150 mL y guardar a 4 °C.
- PSA 10% (p/v) (1 mL)
Disolver 100 mg de persulfato de amonio en 1 mL de agua destilada. Preparar justo antes de su uso, no conservar.
- Amortiguador de carga para proteínas
 - Agua Milli-Q™ 3.55 mL
 - Tris/HCl 0.5 M pH 6.8 1.25 mL
 - SDS 10% (p/v) 2.00 mL
 - Glicerol 2.50 mL
 - Azul de bromofenol 0.5 % (p/v) 0.20 mLGuardar a temperatura ambiente. Agregar 50 μL de β -mercaptoetanol a 950 μL del amortiguador de carga justo antes de su uso.
- Amortiguador de corrida: Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M, SDS 0.1% (p/v) (1 L)
 - Tris base 3.025 g
 - Glicina 14.4 g
 - SDS 1 gDisolver en agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.
- Solución de Coomassie. Disolver en 43 mL de agua los siguientes reactivos (almacenar a temperatura ambiente en frasco ámbar):
 - Coomassie 0.25 g
 - Acido acético 7 mL



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

- Metanol 50 mL
- Solución desteñidora. Disolver en 63 mL de agua los siguientes reactivos (almacenar a temperatura ambiente):
 - Ácido acético 7 mL
 - Etanol 30 mL

Práctica 5. Cromatografía de intercambio iónico

OBJETIVOS

1. Explicar cómo funcionan las columnas de intercambio aniónico y catiónico.
2. Describir el manejo del cromatógrafo de baja presión, incluyendo uso apropiado de columnas, lector UV y colector de fracciones.
3. Discutir los resultados obtenidos por UV y predecir la localización de la LDH.
4. Determinar la actividad enzimática de la LDH presente en las fracciones y determinar el porcentaje de recuperación de la columna.

INTRODUCCIÓN

Uno de los métodos más útiles y efectivos para la separación de moléculas que presentan cargas eléctricas es la cromatografía de intercambio iónico, por lo que representa un método ideal para la purificación de proteínas.

La cromatografía de intercambio iónico separa las moléculas con base en la diferencia de sus cargas netas. Este método aprovecha el hecho de que la relación existente entre la superficie neta y el pH es única para cada proteína. En el intercambio iónico las interacciones reversibles entre moléculas cargadas y medios con cargas opuestas se pueden controlar para favorecer ya sea la unión o la elución de moléculas específicas y por lo tanto lograr su separación.

Una proteína que no presenta carga neta a un pH equivalente a su punto isoeléctrico, no tendrá interacción con un medio con carga eléctrica. Así, a un pH por arriba de su punto isoeléctrico, la proteína se unirá a un medio cargado positivamente, es decir un intercambiador aniónico; por su parte, a un pH por debajo de su punto isoeléctrico, la proteína tendrá afinidad por un medio cargado negativamente o intercambiador catiónico (12).

Este tipo de cromatografía utiliza resinas de intercambio iónico como fase estacionaria, constan de una matriz o soporte insoluble en agua con superficies cubiertas por grupos amino o carboxilo, por lo que portan cargas positivas o negativas a pH neutro (1).

Las proteínas de una mezcla portan distintas cargas netas a un pH determinado. Así, cuando la mezcla de proteínas eluye a través de una columna que presente una superficie positiva, sólo las de carga neta negativa se adhieren, las neutras y básicas eluyen sin impedimento. Posteriormente, las proteínas con carga negativa se eluyen selectivamente mediante un gradiente de concentraciones crecientes de una sal a través de la columna (Fig. 1).

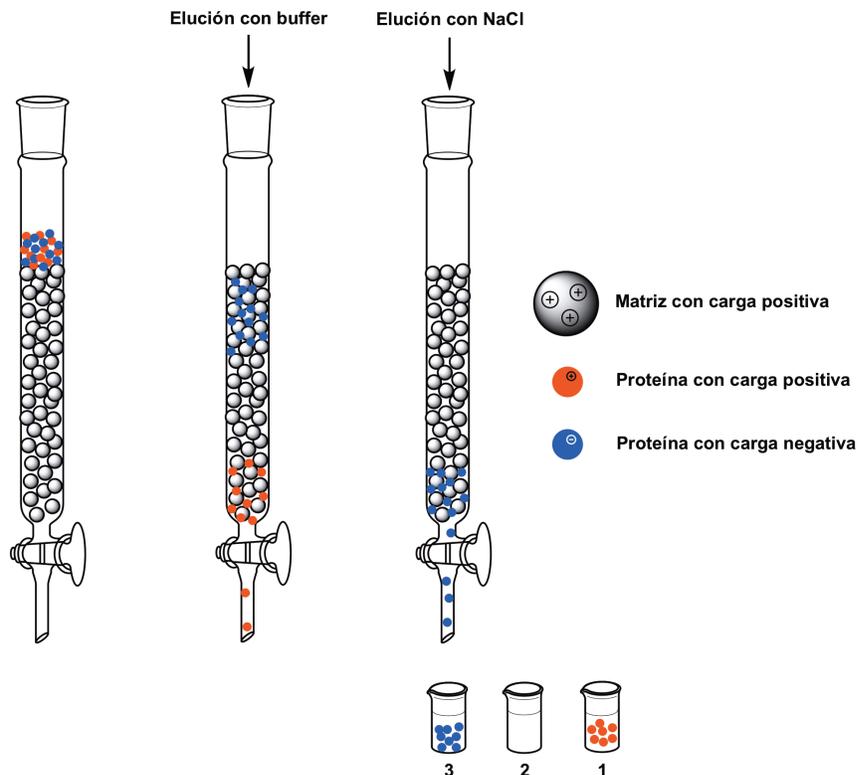


Figura 1. Esquema de la cromatografía de intercambio iónico.

A bajas concentraciones de sal, las proteínas y la resina se encuentran unidas mediante las atracciones generadas por tener cargas opuestas. A concentraciones de sal más elevadas, los iones salinos negativos se unen a la superficie positiva, por lo que las proteínas con cargas negativas son desplazadas. En un gradiente de concentraciones salinas crecientes, las proteínas cargadas débilmente son eluidas primero y las que tienen cargas más grandes pueden ser utilizadas para retener y fraccionar proteínas con carga positiva (13).

MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

1 Cromatógrafo <i>BioLogic LP</i> BioRad	1 Pinza de Hoffman
1 Colector de fracciones	20 tubos de ensayo para el colector
1 Columna (econo-column BioRad, 1.5 x 15 cm) con llave y manguera	1 <i>Rack</i> para micropuntas (200 a 1000 μ L)
1 Propipetero	1 Micropipeta P-1,000
1 Pipeta serológica de 25 mL	<i>Q Sepharose</i> [®] <i>Fast Flow</i> (<i>GE Healthcare</i>)
1 Soporte universal	Bicina 0.03 M, pH 8.5, desgasificado
1 Pinza para bureta con nuez	NaCl 1 M
1 Vaso de precipitado (de 500 mL)	Muestra dializada obtenida en la práctica No. 1

PROTOCOLO

👁 Utilice bata y guantes en todo momento.

1. Marcar la columna hasta un nivel conveniente para visualizar (aproximadamente 3 cm debajo del extremo superior) y verificar que la llave de flujo, ubicada en la parte inferior de la columna, se encuentra cerrada (Fig. 2).
2. Colocar la columna en el soporte universal, utilizando la pinza para bureta con nuez.
3. Tomar 25 mL de *Q Sepharose*[®] con una pipeta serológica de 25 mL y vaciarla en la columna (si es necesario, usar el embudo de llenado, Fig. 3).
4. Dejar asentar la resina por gravedad. Verificar que llegue a la marca realizada en el paso 1 (Fig. 4).



Fig. 2 Columna con llave



Fig. 3 Transvasar la *Q Sepharose*[®]



Fig. 4 Empacar

- Colocar en la manguera una pinza de Hoffman y abrir la llave a un flujo mínimo (usar un vaso de precipitado para coleccionar líquido, Fig. 5).
- Equilibrar con amortiguador Bicina 0.03 M, pH 8.5, desgasificado (usar al menos 5 volúmenes con respecto a la *Q Sepharose*[®] empacada).
- Cerrar la llave de flujo para colocar la columna en el cromatógrafo *BioLogic LP* BioRad y conectarle las mangueras.
- Colocar los tubos de ensayo rotulados en el coleccionador de fracciones.
- Abrir la llave y ajustar el flujo de goteo a 2 mL/min de amortiguador Bicina 0.03 M, pH 8.5, desgasificado.
- Agregar 1 mL de la muestra dializada obtenida en la práctica No. 1 (es muy importante que calcule el número total de Unidades de actividad enzimática que está cargando en la columna, Fig. 6).
- Continuar el flujo de goteo a 2 mL/min de amortiguador Bicina 0.03 M y coleccionar fracciones de 3 mL (Fig. 7).



Fig. 5 Ajustar flujo con pinza de Hoffman



Fig. 6 Aplicar la muestra



Fig. 7 Flujo a 2 ml/min

- Cuando la absorbencia a 280 nm en el cromatograma sea estable, iniciar el gradiente continuo de NaCl de 0 a 1 M en el amortiguador Bicina 0.03 M a 2 mL/min.
- Identificar las fracciones que correspondan a los picos cromatográficos para medirles la actividad enzimática relativa y la actividad enzimática específica.
- Continuar el flujo de NaCl 1 M para regenerar la *Q Sepharose*[®] (hasta que en el cromatograma se aprecie conductividad estable).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

RESULTADOS

Documentar, analizar y discutir el cromatograma obtenido. De acuerdo a los resultados obtenidos, predecir la localización de la LDH.

Determine la actividad enzimática relativa y específica de las fracciones en las que podría estar presente la LDH.

Determine el porcentaje de recuperación de la actividad enzimática de la columna.

CUESTIONARIO

- Una solución que contiene ácido aspártico, glicina, treonina, leucina y lisina, se aplica a una columna de intercambio iónico Dowex 50 a un pH de 3.0. Si los aminoácidos se eluyen con un gradiente de incremento de pH, ¿en qué orden eluirán?
- Explica de qué está compuesta una resina de intercambio iónico y cómo se pueden clasificar.
- ¿Cuál es la relación entre el punto isoeléctrico de la biomolécula y el pH de los amortiguadores que se utilizan en la cromatografía de intercambio iónico?

SOLUCIONES

- Bicina 0.03 M, pH 8.5 (5 L)

$PM_{\text{Bicina}} 163.17$

Disolver 24.47 g de Bicina (*N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycine*) en 1 L de agua destilada, ajustar el pH a 8.5 agregando HCl concentrado. Ajustar el volumen a 5 L. Guardar a 4° C.

Práctica 6. Cromatografía de afinidad

OBJETIVOS

1. Preparar una columna con la resina Cibacron *Blue Sepharose*.
2. Cuantificar la actividad relativa y calcular el número de unidades de la muestra de la LDH que se cargará en la columna del objetivo 1.
3. Inyectar la muestra en la columna, dejarla correr para eluir las proteínas no unidas a la resina, supervisando el flujo de las proteínas a 280 nm utilizando un espectrofotómetro UV.
4. Eluir a la LDH utilizando NaCl, separando las fracciones activas.

INTRODUCCIÓN

La cromatografía de afinidad es un método de separación utilizado en bioquímica y se basa en la interacción altamente específica entre dos tipos de moléculas, como la que existe entre un anticuerpo y su antígeno o la de una enzima con su sustrato, o bien, de un receptor y su ligando (14). La cromatografía de afinidad se puede utilizar para a) purificar y concentrar una sustancia a partir de una mezcla que la contiene; b) reducir la cantidad de una sustancia en una mezcla; c) discernir qué compuestos biológicos se unen a una sustancia en particular y d) purificar y concentrar una solución de enzima.

La fase estacionaria de una cromatografía de afinidad es típicamente una matriz de gel, a menudo de agarosa. Por lo general, el punto de partida para el uso de esta técnica, es un grupo heterogéneo de moléculas en solución, tal como un lisado celular, un medio de crecimiento o un suero sanguíneo. Para utilizar esta técnica, la molécula de interés debe tener una propiedad bien conocida y definida que pueda ser aprovechada durante el proceso de afinidad. El proceso en sí trata de atrapar con la molécula diana a la molécula de interés de tal forma que queda retenida en un medio, una fase sólida o estacionaria. Las otras moléculas que se encuentren en la fase móvil no se quedarán atrapadas, ya que no poseen esa propiedad. Al lavar la matriz, la molécula de interés puede ser eliminada de la mezcla

original, para posteriormente liberarla de la trampa en un proceso conocido como elución, en el cual se agrega una molécula por la que la molécula diana tenga mayor afinidad que por la molécula de interés. En la Figura 1 se muestra el proceso de forma resumida.

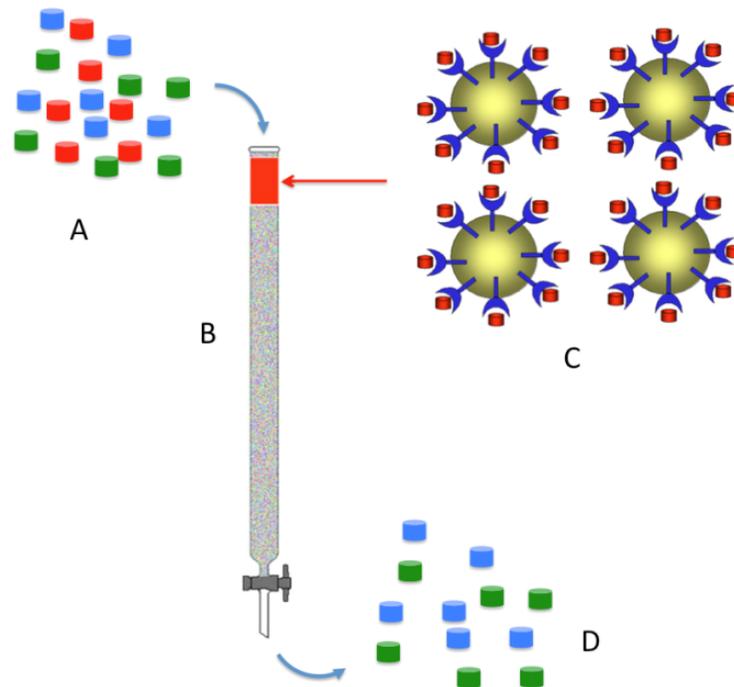


Figura 1. Esquema de la cromatografía de afinidad. En A se muestra la mezcla heterogénea a separar; en B se observa la fase estacionaria del experimento, en este caso en una bureta; en C se observan los componentes del gel, que tienen unida a la molécula diana en la cual se unen las moléculas rojas que son las de interés; en D se muestra la mezcla heterogénea que al pasar por la fase estacionaria, se queda sin la molécula de interés.

La cromatografía de afinidad se basa en la interacción específica de la molécula de interés con un componente de la fase estacionaria. Esta interacción es más específica que una interacción iónica, como la que se utilizó anteriormente en la cromatografía de intercambio iónico.

En este protocolo, la enzima LDH de corazón de res interactúa con una molécula de colorante azul que se une a una resina y se empaca en una columna. La molécula de colorante está diseñada para tener interacciones similares a las coenzimas dinucleótidos con sus enzimas. El colorante Cibacron Blue, es un ejemplo de un compuesto biomimético.

MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

1 Cromatógrafo <i>BioLogic LP</i> BioRad	1 Rack para micropuntas (200 a 1000 μ L)
1 Colector de fracciones	1 Micropipeta P-1,000
1 Columna de 15 cm con llave y manguera	<i>Blue Sepharose® Fast Flow</i> (GE Healthcare)
1 Propipetero	Fosfato de sodio 0.02 M pH 7, desgasificado
1 Pipeta serológica de 25 mL	NaCl 1 M
1 Soporte universal	Fracción con mayor actividad enzimática obtenida en la práctica No. 5 (previamente dializada en Fosfato de sodio pH 7)
1 Pinza para bureta con nuez	
1 Vaso de precipitado (de 500 mL)	
1 Pinza de Hoffman	
20 tubos de ensayo para el colector	

PROTOCOLO

1. Empacar la columna con *Blue Sepharose® Fast Flow* como se describió en la práctica 5.
2. Equilibrar con amortiguador Fosfato de sodio 0.02 M pH 7, desgasificado (usar al menos 5 volúmenes de la *Blue Sepharose®* empacada).
3. Cerrar la llave de flujo para colocar la columna en el cromatógrafo *BioLogic LP* BioRad y conectarle las mangueras.
4. Colocar los tubos de ensayo rotulados en el colector de fracciones.
5. Abrir la llave y ajustar el flujo de goteo a 1 mL/min de amortiguador Fosfato de sodio 0.02 M pH 7, desgasificado.
6. Agregar 1 mL de la fracción con mayor cantidad de unidades enzimáticas obtenida en la práctica previa (es muy importante que la fracción haya sido dializada previamente con amortiguador Fosfato de sodio 0.02 M pH 7).
7. Continuar el flujo de goteo a 0.7 mL/min de amortiguador Fosfato de sodio 0.02 M y coleccionar fracciones de 3 mL.
8. Cuando la absorbencia a 280 nm en el cromatograma sea estable, iniciar el gradiente continuo de NaCl de 0 a 1 M en el amortiguador Fosfato de sodio 0.02 M a 1 mL/min.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

9. Identificar la fracción que corresponda al pico cromatográfico de interés para medirle la actividad enzimática relativa y la actividad enzimática específica. Visualice su pureza con SDS-PAGE.

10. Continuar el flujo de NaCl 1 M para regenerar la *Blue Sepharose® Fast Flow* (hasta que en el cromatograma se aprecie conductividad estable).

RESULTADOS

Aunque antes de agregar el NaCl a la columna se harán evidentes picos cromatográficos, corresponden a las proteínas que no se unieron a la columna, por lo que no contienen a la proteína de interés. No así después de aplicar el gradiente de sal a la columna. En esta parte, deben existir algunas regiones con alta absorbencia a 280 nm. Debe investigar cuál de estas fracciones tiene la mayor actividad de LDH.

Una vez determinadas las fracciones con mayor actividad enzimática, se deben reunir en un solo tubo. No olvide que esta es la enzima purificada, por lo que debe guardar esta muestra adecuadamente, es decir tapada con parafilm® M y almacenada en el refrigerador (nunca congelarse o dejar a temperatura ambiente, transportar en hielo). Verifique su pureza por medio de electroforesis en gel.

En la siguiente práctica de laboratorio se verificarán los parámetros cinéticos de la enzima purificada.

CUESTIONARIO

- a. ¿Cómo funciona el *Cibacron blue*? ¿Por qué se usa para purificar a la LDH bovina?
- b. ¿Qué pasaría si la muestra con mayor actividad enzimática obtenida en la práctica No. 5 fuera cargada en la columna con *Blue Sepharose® Fast Flow* sin ser dializada previamente?
- b. ¿Se podría usar el mismo protocolo para purificar LDH de otras fuentes?, si es así, explique qué cambios tendría que realizar.

SOLUCIONES

- Fosfato de sodio 0.02 M, pH 7 (500 mL)

$PM_{\text{Fosfato de sodio}} 163.94$

Disolver 1.64 g de Fosfato de sodio en 400 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7 agregando HCl 6 N. Aforar a 500 mL y guardar a 4 °C.

Práctica 7. Cinética enzimática

OBJETIVOS

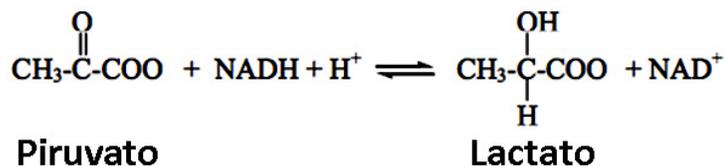
1. Observar y analizar el efecto de la concentración de enzima, el pH, la temperatura y la concentración de sustrato en la actividad de la LDH.
2. Construir una gráfica de velocidad vs [S] y estimar los valores de K_M y $V_{máx}$
3. Construir una gráfica de Lineweaver-Burk y verificar los valores de K_M y $V_{máx}$

INTRODUCCIÓN

La cinética enzimática es el estudio de las reacciones químicas que son catalizadas por las enzimas. Aquí, se determina la velocidad de la reacción y se investigan los efectos de variar diversas condiciones de la reacción (como la temperatura o la concentración de enzima, por ejemplo). Estudiar la cinética de la catálisis de una enzima, puede revelar su mecanismo catalítico, su papel en el metabolismo, cómo se controla su actividad, y cómo un fármaco podría inhibir a esta enzima (15).

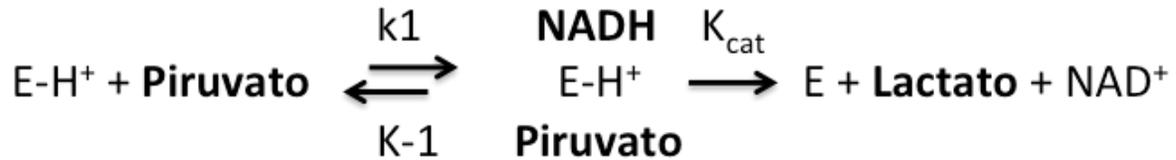
Las enzimas son generalmente moléculas de proteínas que transforman otras moléculas que se denominan como los sustratos de la enzima. Es aceptado que en general dentro del metabolismo, la inmensa mayoría de las enzimas son afines solo por un sustrato, que se une al sitio activo de la enzima y se transforma en el o los productos de su catálisis, a través de una serie de pasos conocidos como el mecanismo enzimático.

En esta actividad se analizarán las propiedades cinéticas de la LDH purificada. La LDH cataliza la siguiente reacción:



A continuación se muestra un esquema de reacción simplificado, que permite describir la cinética que se expresa en la forma de Michaelis-Menten. La concentración de NADH se

mantiene constante (y saturante), mientras que la de piruvato se varía. Como sugiere el esquema, el NADH se une rápidamente a la LDH, de hecho lo hace antes que el piruvato:



MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

1 Vórtex	32 Celdas para espectrofotómetro, 10 mm
1 Espectrofotómetro	de paso, 1.5 mL de volumen
1 Contenedor con hielo	Fracciones obtenidas en la Práctica No. 6
2 Racks para micropuntas (20 a 200 μL y 200 a 1000 μL)	Fosfato de sodio 50 mM, pH 7.5, pH 3.5 y pH 9
2 Micropipetas (P-1,000 y P-200)	NADH 4 mM
1 Rack para tubos cónicos	Piruvato de sodio 30 mM
1 Tubo cónico de 50 mL	

PROTOCOLO

👁 Utilice bata y guantes en todo momento. El tubo que contiene a la enzima debe estar siempre en hielo. Verifica que las celdas para espectrofotómetro estén limpias.

1. Hacer 8 mezclas de reacción en celdas para espectrofotómetro. El volumen final en cada celda debe ser exactamente 1.5 mL; es decir, que si después de agregar el piruvato hace falta un volumen para completar los 1.5 mL finales, deberás agregar amortiguador de fosfato de sodio 50 mM para llegar a esa cantidad. La concentración final de NADH será de 0.13 mM.

Fosfato de sodio 50 mM, pH 7.5	1400 μL
NADH 4 mM	50 μL
Piruvato 30 mM	¿? μL

👁 Debes calcular los μL de la solución de piruvato que debes agregar. Para conocer los parámetros cinéticos de la LDH, la concentración inicial de piruvato en la celda debe variar entre 0.05 mM y 1.0 mM. Aunque se debe abarcar todo este intervalo, los datos útiles para los cálculos están por debajo de 0.2 mM, por lo que no se deberán considerar demasiados puntos por encima de esta concentración.

2. Cubre cada celda con parafilm® M, mezcla bien y colócala en el portaceldas del espectrofotómetro.

3. Cuantifica el cambio en la absorbencia a 340 nm durante un minuto o dos antes de la adición de la enzima, para generar la línea base inicial. En este momento, la absorbencia debe ser muy cercana a uno y constante. Si esto no pasa, lava la celda y repite el protocolo nuevamente.

4. Para iniciar la reacción, agrega 10 μL de la solución de enzima. La reacción termina cuando el cambio en la absorbencia con respecto al tiempo se detiene y se mantiene constante.

👁 A concentraciones bajas de piruvato, los trazos cinéticos pueden ser no lineales y mostrar algo de curvatura; esto se debe al agotamiento del sustrato de la enzima, que es el piruvato. En tales casos, se debe determinar las velocidades iniciales usando sólo los datos lineales en el comienzo de los trazos.

5. Para verificar el efecto del pH ácido en la actividad de la LDH, realiza los pasos del 1 al 4 utilizando amortiguador Fosfato de sodio 50 mM, pH 3.5.

6. Para verificar el efecto del pH básico en la actividad de la LDH, realiza los pasos del 1 al 4 utilizando amortiguador Fosfato de sodio 50 mM, pH 9.5.

7. Para verificar el efecto de la temperatura en la actividad de la LDH, realiza los pasos del 1 al 4 utilizando amortiguador Fosfato de sodio 50 mM, pH 7.5, pero no a temperatura ambiente, sino a 40° C.

RESULTADOS

En esta actividad se debe reportar una gráfica de la velocidad de catálisis de la LDH vs la concentración de piruvato. A partir de esta gráfica se deben estimar los parámetros cinéticos

K_M y $V_{m\acute{a}x}$. Posteriormente, se debe obtener el regráfico de Lineweaver-Burk para rectificar y el valor concreto de los mismos. Así mismo, se debe hacer muy evidente qué es lo que le sucede a la actividad enzimática cuando se modifican los factores ambientales (temperatura y pH).

CUESTIONARIO

- ¿Por qué los datos cinéticos se deben conocer para velocidades iniciales de la reacción enzimática?
- ¿Los valores de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ de todas las isoformas de LDH son iguales?, ¿porqué si o porqué no?
- La LDH funciona con piruvato y con lactato, ¿cuál es la diferencia en los parámetros cinéticos y cuál es la razón metabólica?

SOLUCIONES

- Fosfato de sodio 50 mM, pH 7.5, pH 3.5 y pH 9.5 (100 mL)
 $PM_{\text{Fosfato de sodio}} 163.94$
Disolver 0.82 g de Fosfato de sodio en 80 mL de agua destilada, ajustar el pH agregando HCl 6 N o NaOH 5 M. Aforar a 100 mL.
- NADH 4 mM (20 mL)
 $PM_{\text{NADH}} 663.43$
Disolver 79.61 mg de NADH en 20 mL de agua Milli-Q™. Guardar a 4° C.
- Piruvato de sodio 30 mM (20 mL)
 $PM_{\text{piruvato}} 110.0$
Disolver 0.066 g de Piruvato de sodio en 20 mL de agua Milli-Q™. Guardar a 4° C.

Bibliografía

1. Farrell SO, Taylor LE. Experiments in biochemistry: a hands-on approach: a manual for the undergraduate laboratory. 2a ed. USA: Thomson Brooks/Cole; 2006.
2. Kornber A. Why purify enzymes? In: Deutscher MP, editor. Guide To Protein Purification. USA: Academic Press; 1990.
3. Doonan S. Protein purification protocols. USA: Humana Press Inc.; 1996.
4. Coleman AB. New ideas for an old enzyme: A short, question-based laboratory project for the purification and identification of an unknown LDH isozyme. *Biochem Mol Biol Educ* 2010; 38(4): 253-260.
5. Ayres GH. Análisis Químico Cuantitativo. 2a ed. México: Harla; 1970.
6. Koolman J, Rohm KH. Bioquímica Humana. Texto y atlas. 4a ed. México: Médica Panamericana; 2012.
7. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
8. Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem* 1996; 236: 302-308.
9. Ornstein L. Disc electrophoresis I: background and theory. *Ann NY Acad Sci* 1964; 121: 321-349.
10. Davis BJ. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann NY Acad Sci* 1964; 121: 404-427.
11. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
12. GE Healthcare. Ion Exchange Chromatography and Chromatofocusing. Principles and Methods. Handbook 11-0004-21. 2004. Disponible en:
https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314823637792/litdoc11000421_20130502210222.pdf

13. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, et al. Biología Celular y Molecular. 5a ed. México: Médica Panamericana; 2006.
14. Urh M, Simpson D, Zhao K. Affinity chromatography: general methods. Methods Enzymol 2009; 463: 417-438.
15. Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG. Bioquímica. 3a ed. Madrid: Pearson Educación; 2002.

Anexo A. Rúbricas y lista de cotejo

Rúbrica para evaluar reportes de laboratorio

Requisitos para MB	
Apariencia y organización	Incluye título y nombre de los integrantes del equipo en la portada. Usa títulos y subtítulos para organizar visualmente el material. Todos los elementos requeridos están presentes. Usar letra Times New Roman 12 con interlineado de 1.5 y márgenes de 2.5 cm. Número de página indicado.
Redacción	Sin errores de ortografía, puntuación ni gramática. Utilizar frases cortas, lenguaje formal y claro. Conciso y coherente.
Introducción	Incluye el propósito, exposición general del tema y subdivisiones principales. Incluye varias fuentes de antecedentes, que son usadas y citadas correctamente. Se sugiere redactarlo hasta el final, para que sea acorde con la discusión. Promedio de 2 cuartillas.
Objetivos	Está claramente identificado y presentado. Deberá redactarse en infinitivo. Promedio de ½ cuartilla.
Material y métodos	Los procedimientos y materiales usados se describen con pasos claros y precisos en prosa. Cada paso es una oración completa. Promedio de 2 cuartillas.
Resultados	Representación profesional y precisa de los datos en tablas, gráficas, esquemas, dibujos, etc. Todas éstas están tituladas y descritas y tienen llamado en el texto. Promedio de 2 cuartillas.
Discusión	La relación entre las variables es discutida y las tendencias/patrones analizados lógicamente. Relaciona los resultados con la introducción y el contexto del tema abordado. Promedio de 1 cuartilla.

Conclusiones	Relaciona los resultados con el objetivo. Ubica posibles fuentes de error y posibles soluciones. Promedio de 1 cuartilla.
Perspectivas	Proponer nuevas estrategias que mejoren o complementen los resultados. Promedio de ½ cuartilla.
Cuestionario	Responder clara y concisamente.
Referencias	Enlista todas las fuentes de información en el formato solicitado. Considere que todas las referencias deben tener llamada en el texto. Queda prohibido usar página de internet en la bibliografía.

Rúbrica para evaluar presentaciones orales

Requisitos para MB	
Vocabulario	Lenguaje formal. Las palabras transmiten el mensaje propuesto en forma interesante, natural y precisa.
Contenido	Se enfoca en el tema solicitado y éste es claro.
Estructura	Tiene en orden: introducción, desarrollo y conclusiones. La organización resalta y focaliza la idea o tema central.
Dominio del tema	Entiende el tema, logra conectarlo y explicarlo en sus diferentes aspectos
Material visual	Es coherente con el discurso y es completo y claro
Voz	Buena dicción, volumen adecuado, fluidez y seguridad
Tiempo	Termina en el tiempo acordado
Actitud	Hay porte y hace contacto visual



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Lista de cotejo para co-evaluación de trabajo en equipo

	SI	NO
Asiste con puntualidad y regularidad		
Es solidario con las decisiones del equipo y se adaptó a los cambios del equipo		
Sigue las instrucciones dadas y mantiene el aseo y la higiene		
Ubica los materiales solicitados, sigue las instrucciones, observa y anota la información pertinente		
Siempre entrega el trabajo a tiempo y sin necesidad de darle seguimiento. Las fuentes de información que utiliza son variadas y múltiples. La información que recopila tiene relación con el tema, es relevante y actualizada. Las fuentes son confiables y contribuyen al desarrollo del tema.		
Promueve la cooperación, participación e integración entre los miembros de equipo		
Trata con respeto y amabilidad a sus compañeros y establece lazos de comunicación		
Es cuidadoso en el desarrollo del trabajo y está atento a cualquier evento no previsto		
Participa activamente en la elaboración del trabajo grupal, aportando al logro de los objetivos. Busca y sugiere soluciones a los problemas		
Es receptivo a aceptar críticas y sugerencias de los miembros del equipo y está dispuesto a escuchar las opiniones de sus compañeros de equipo.		

Anexo B. Tabla de sulfato de amonio

Esta tabla permite conocer la cantidad de sulfato de amonio que debe agregarse para obtener un cierto porcentaje de saturación a 0° C.

Concentración inicial de sulfato de amonio (porcentaje de saturación a 0° C)	Porcentaje de saturación deseada a 0° C																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60									0	31	62	95	129	164	201	239	279
65										0	31	63	97	134	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	32	66	101	137	174
80													0	33	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70
95																0	35
100																	0

Anexo C. Propuestas de organización de las prácticas en el trimestre

El manual de prácticas de laboratorio de bioquímica propone realizar 7 prácticas experimentales en un curso trimestral de 11 semanas, como lo establece el calendario UAM. El cómo se distribuyan las prácticas durante este tiempo depende del docente que impartirá el curso.

En este anexo se plantean dos propuestas de cronograma para sesiones de 2 h de teoría y 4 h de práctica en el laboratorio, cubriendo 9 semanas. Las 4 sesiones restantes pueden destinarse a evaluaciones, exposiciones orales, análisis de resultados, entre otras actividades que el docente considere pertinente. En la propuesta A se entra de lleno a la purificación de la LDH, mientras que en la propuesta B se destinan las primeras 4 semanas a adquirir habilidades y metodologías bioquímicas utilizando proteínas de suero de leche.

Propuesta A.

Semana	Teoría (2 h)	Práctica (4 h)
1	Seguridad en un laboratorio de bioquímica, introducción a los procedimientos experimentales en bioquímica.	Introducción a los procedimientos experimentales en bioquímica.
2	Introducción a los procedimientos experimentales en bioquímica.	Purificación de LDH, primera parte. Licuación, separación por centrifugación y precipitación de proteínas con sulfato de amonio.
3	Aplicaciones de soluciones saturadas (<i>salting in</i> y <i>salting out</i>). Aplicaciones de la ósmosis (diálisis).	Purificación de LDH, segunda parte. Diálisis, cuantificación de proteínas.
4	Buen uso y manejo de un espectrofotómetro.	Medición de actividad enzimática.
5	Métodos colorimétricos para la determinación de proteínas.	Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.
6	Principios de electroforesis y sus aplicaciones en el análisis de biomoléculas.	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes.

7	Principios de separación de proteínas por cromatografía líquida: intercambio iónico.	Cromatografía de intercambio iónico.
8	Principios de separación de proteínas por cromatografía líquida: cromatografía de afinidad.	Cromatografía de afinidad.
9	Metodologías para la determinación de la actividad cinética de las enzimas.	Cinética enzimática.

Propuesta B.

Semana	Teoría (2 h)	Práctica (4 h)
1	Seguridad en un laboratorio de bioquímica, introducción a los procedimientos experimentales en bioquímica.	Aplicaciones de soluciones saturadas: <i>salting in</i> y <i>salting out</i> Precipitación y separación de las proteínas de la leche (caseínas)*
2	Aplicaciones de la ósmosis (diálisis), métodos colorimétricos para la determinación de proteínas.	Diálisis y determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford
3	Electroforesis y separación de biomoléculas.	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes.
4	Principios de separación de biomoléculas: Cromatografía líquida.	Purificación de LDH, primera parte. Licuación, separación por centrifugación y precipitación de proteínas con sulfato de amonio.
5	Principios de separación de biomoléculas: Tablas de rendimiento.	Purificación de LDH, segunda parte. Diálisis, cuantificación de proteínas, medición de actividad enzimática.
6	Repaso sobre disoluciones y propagación de errores.	Purificación de LDH, tercera parte. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes.
7	Uso correcto de un equipo de cromatografía. Principios de la cromatografía de intercambio iónico.	Purificación de LDH, cuarta parte. Cromatografía de intercambio iónico.
8	Principios de la cromatografía de afinidad.	Purificación de LDH, quinta parte. Cromatografía de afinidad.

9	Análisis de resultados de la purificación de LDH	Purificación de LDH, sexta parte. Determinación experimental de constantes cinéticas.
---	--	--

***Obtención de caseínas por precipitación ácida**

1. Ajustar el pH a 4 con HCl 2 M a 10 mL de leche líquida.
2. Centrifugar a 5,000 rpm, 20 min.
3. Recuperar 6 mL del sobrenadante y agregar 3 mL de acetato 0.1 M, pH 4.
4. Incubar 15 min a temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 5,000 rpm, 15 min.
6. Pasar el sobrenadante por filtro de 0.45 μm .
7. Almacenar a 4° C.