FIAD : Ingeniería en Nanotecnología

Bioquímica

Dra. Graciela Guerra Rivas

Dra. Claudia M Gómez Gutiérrez

ELABORADO EN 2010 : 2016-2 ÚLTIMA ACTUALIZACIÓN

Dra. Graciela Guerra Rivas
Dra. Claudia M Gómez Gutiérrez

COMPETENCIA DEL CURSO

Reconocer las posibilidades de uso de enzimas, metabolitos y procesos metabólicos para la producción y diseño de dispositivos biomédicos, materias primas para empresas y procesos de fabricación en tecnologías limpias mediante el análisis de la función catalítica y la integración de procesos bioquímicos, con un enfoque de aplicación en problemas relacionados con la Nanoingeniería y una disposición al trabajo colaborativo en equipos multidisciplinarios.

PRÁCTICAS

1. ANÁLISIS DE UN REPORTE CIENTÍFICO
2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES
3. CURVAS DE TITULACIÓN: AMINOÁCIDOS
4. CURVAS DE CALIBRACIÓN (Proteínas)
5. DETERMINACION DE PROTEINAS EN DIFERENTES TEJIDOS
6. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA
7. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA VELOCIDAD ENZIMÁTICA
8. DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS DE UN PAR ENZIMÁTICO
9. HIDRÓLISIS DE ATP (Calibración del método)
10. HIDRÓLISIS DE ATP (Medición de ATPasa en tejidos)

PARTES DE UN REPORTE DE LABORATORIO y/o TALLER DE BIOQUÍMICA

		Puntaje
1	Nombre de la práctica y/o taller. Fecha en que se realizó	2
2	Breve introducción en la que: a. Se establezcan principios básicos sobre lo que se hizo en la práctica y/o taller. b. Se justifique la necesidad de la práctica y/o taller. c. Se establezcan hipótesis en el caso de las prácticas.	10
3	Objetivo de la práctica. Concreto, preciso, breve, exacto, un solo verbo	3
4	Diagrama de flujo. En los bloques señalar el método o técnica	10
5	Resultados crudos. Tal cual se tomaron en el laboratorio, pero ordenados	15
6	Tratamiento de datos y tablas y/o gráficas finales	15
7	Discusión. Comparación, interpretación, evaluación de resultados	20
8	Conclusiones. Concretas, precisas, breves	10
9	Bibliografía citada en formato APA http://normasapa.net/normas-apa-2016/	5
10	Resumen a. Extensión: lo equivalente a media hoja tamaño carta. b. Contenido: Breve introducción, metodología, resultados, conclusiones.	10

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

REQUERIMIENTOS PARA REALIZACION DE PRÁCTICAS EDUCATIVAS EN LABORATORIOS DE LA FIAD

NOMBRE DE LA MATERIA	BIOQUIMICA	**CLAVE**	13183
NOMBRE DE LA PRÁCTICA	ANÁLISIS DE UN REPORTE CIENTÍFICO	**PRÁCTICA NÚMERO**	1
PROGRAMA EDUCATIVO	INGENIERÍA EN NANOTECNOLOGÍA	**PLAN DE ESTUDIO**	2010-1

EQUIPO-HERRAMIENTA REQUERIDO	CANTIDAD

MATERIAL-REACTIVO REQUERIDO	CANTIDAD

SOFTWARE REQUERIDO
No aplica
OBSERVACIONES-COMENTARIOS

NOMBRE Y FIRMA DEL PROFESOR QUE ELABORÓ	NOMBRE Y FIRMA DEL COORDINADOR DE PROGRAMA EDUCATIVO
MIEMBRO DE ACADEMIA	**MIEMBRO DE ACADEMIA**

ANALISIS DE UN REPORTE CIENTIFICO

Todo trabajo científico culmina con alguna conclusión que es más o menos importante para la disciplina que se profesa. Esta conclusión, producto del esfuerzo en la planeación y ejecución de una metodología para generar conocimiento sobre los procesos naturales, debe ser comunicada de alguna manera. Ya sea en congresos, revistas, reportes técnicos, etc. ; de forma oral o escrita; directa o indirectamente, la meta alcanzada es difundida para que sirva de base para futuras investigaciones sobre el tema. La utilidad de la comunicación es innegable: cualquier actividad del ser humano se desarrolla mejor cada vez si se basa en la experiencia de otros que ya realizaron avances previos, aún cuando sea solamente un intento fallido por alcanzar una meta. El aprovechamiento de las experiencias previas depende fuertemente de la forma en que se transmite el suceso; de aquí que sea muy cuidadoso en la forma en que se comunica y el exhaustivo en su búsqueda de la verdad y rechazar toda información que no presente suficiente evidencia, todo profesional de la ciencia debe ser honesto en la transmisión de resultados y claro en la forma de exponerlos. Una práctica saludable en la preparación para el ejercicio de la ciencia es la lectura periódica de literatura científica, con mentalidad de análisis y sentido crítico de lo que otros científicos reportan. En esta sesión de laboratorio trabajaremos con este objetivo. Se te proporcionará una lectura para que la analices, tomando como base el cuestionario que se te adjunta. Lee cuidadosamente y contesta lo que se te pregunta.

1.- ¿Cuál es el objetivo del trabajo?

2.- ¿Qué aspectos maneja el autor en la introducción?

3.- ¿Qué secciones tiene el reporte?

4.- ¿Qué métodos analíticos se usan y con qué finalidad?

5.- ¿Consideras que los conceptos que maneja el autor en la introducción son suficientes para ubicar al lector en el tema? EXPLICA.

6.- ¿Consideras que los conceptos que maneja el autor son suficientes para justificar una investigación de este tipo?

7.- Analiza el resumen… ¿qué aspectos se manejan en él? Es decir, ¿qué tipo de información contiene?

8.- Señala las que a tu juicio sean las tres referencias bibliográficas más importantes para el artículo. EXPLICA POR QUÉ.

9.- ¿En qué se basa la discusión? ¿Qué conclusiones se obtienen?

10.- Critica el reporte… ¿qué harías para que fuera mejor? En una escala del 1 al 10, ¿qué grado le asignarías? Justifica tu evaluación.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

REQUERIMIENTOS PARA REALIZACION DE PRÁCTICAS EDUCATIVAS EN LABORATORIOS DE LA FIAD

NOMBRE DE LA MATERIA	BIOQUIMICA	**CLAVE**	13183
NOMBRE DE LA PRÁCTICA	PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	**PRÁCTICA NÚMERO**	2
PROGRAMA EDUCATIVO	INGENIERÍA EN NANOTECNOLOGÍA	**PLAN DE ESTUDIO**	2010-1

EQUIPO-HERRAMIENTA REQUERIDO	CANTIDAD
Estufa	1
Potenciómetro (pH-metro)	1

MATERIAL-REACTIVO REQUERIDO	CANTIDAD
EDTA sal disódica	
Sulfato de cobre pentahidratado	
NaOH	
HCl	
Tubo de ensayo	5
Matraz de aforación de 500 mL	1
Matraz de aforación de 250 mL	1
Matraz de aforación de 100 mL	1
Vaso de precipitado 100 mL	3
Piceta	1
Pipetador	2
Escobillón	2
Navecillas de plástico	4
Espátula	1

SOFTWARE REQUERIDO
No aplica
OBSERVACIONES-COMENTARIOS

NOMBRE Y FIRMA DEL PROFESOR QUE ELABORÓ	NOMBRE Y FIRMA DEL COORDINADOR DE PROGRAMA EDUCATIVO
MIEMBRO DE ACADEMIA	**MIEMBRO DE ACADEMIA**

Dra. Graciela Guerra Rivas
Dra. Claudia M Gómez Gutiérrez

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Para facilitar el trabajo dentro de cualquier laboratorio, se prefiere realizar las reacciones necesarias en estado líquido, ya que se evita el tratar de mezclar sólidos y las experiencias con gases requerirían de una gran cantidad de equipo costoso. Por lo tanto, se buscan líquidos capaces de disolver a los sólidos o gases participantes, y que se conocen, entonces, como disolventes, mientras que las fases disueltas en éstos se les llamará solutos; el conjunto de disolvente y soluto es una solución.

En el caso de que desee conocerse la cantidad de soluto disuelto por unidad de volumen del disolvente es necesario incorporar un parámetro conocido como concentración que se expresa en unidades como: molaridad, normalidad, molalidad, por ciento en peso o partes por millón (ppm). Es así, como a partir de soluciones preparadas de concentración conocida podemos obtener otras con una concentración menor mediante un factor de conversión que se conoce como “factor de dilución”. Familiarizarse con el manejo de cálculos para la preparación de soluciones de uso frecuente.

En esta práctica se aplicará el concepto de factor de dilución con el fin de preparar soluciones de diferentes concentraciones a partir de una solución stock y el alumno se familiarizará con el manejo de cálculos para la preparación de soluciones de uso frecuente.

MÉTODOS

I.- PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

1. Prepara las siguientes soluciones con los reactivos especificados en la siguiente tabla. Todas las soluciones serán utilizadas en las prácticas siguientes por lo que deben guardarse de acuerdo a las indicaciones del instructor, no olvides etiquetar cada solución con tu nombre, fecha,reactivos y concentraciones.

Reactivo	Concentración	Volumen
NaOH	5 moL/L	100 mL
HCl	0.5 N	250 mL
BIURET	1.9 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 3.35 g de Na_2EDTA. Adiciona lentamente 100 mL de NaOH 5 mol/L. Afora a 500 mL	

2. Si aplicas un factor de dilución de 3 para la solución de NaOH en un volumen final de 100 mL. Cuál sería la concentración final?
3. Si pipeteas 10 mL de la solución anterior y completas a un volumen final de 15 mL.¿Cuál es el factor de dilución?. ¿Cuál es la concentración final?
4. Calcula la concentración de sulfato de cobre en la solución de Biuret.
5. Calcula la concentración de NaOH en la solución de Biuret.

***EN TODOS LOS CASOS DEBES INCLUIR CÁLCULOS ***

II. CONTESTA LO SIGUIENTE:

1. Definición de las diferentes unidades de concentración: molaridad y submúltiplos, normalidad, molalidad, por ciento en volumen, por ciento en peso, partes por millón, osmolaridad.
2. ¿Cuáles son las unidades de concentración y de volumen de uso más frecuente en Bioquímica?
3. ¿Por qué se requiere en Bioquímica el trabajo con soluciones diluidas?
4. Define factor de dilución.

BIBLIOGRAFÍA

* Benson, Sidney (1992) Cálculos químicos. 1a edición. Editorial Limusa, S. A., de C. V., México.
* Day R., Underwood. (1989) Química analítica cuantitativa. 5a. edición. Prentice- Hall Hispanoamericana, S. A., México.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA ENSENADA

REQUERIMIENTOS PARA REALIZACION DE PRÁCTICAS EDUCATIVAS EN LABORATORIOS DE LA FIAD

NOMBRE DE LA MATERIA	BIOQUIMICA	**CLAVE**	11791
NOMBRE DE LA PRÁCTICA	CURVAS DE TITULACIÓN: Aminoácidos	**PRÁCTICA NÚMERO**	2
PROGRAMA EDUCATIVO	BIOINGENIERIA	**PLAN DE ESTUDIO**	2009-2
NOMBRE DEL PROFESOR/A		**NÚMERO DE EMPLEADO**	
LABORATORIO		**FECHA**	

EQUIPO-HERRAMIENTA REQUERIDO	CANTIDAD
Estufa	1
Potenciómetro (pH-metro)	1
Plancha con agitación	1

MATERIAL-REACTIVO REQUERIDO	CANTIDAD
Probeta 50 mL	1
Pipeta de 5 mL	2
Vaso de precipitado 100 mL	1
Vaso de precipitado 150 mL	3
Piceta	1
Pipetador	1
Escobillón	1
Bureta de 25 mL	1
Soporte universal con pinzas para bureta	1
Magneto	1
Aminoácidos	
NaOH 0.4 N	
HCl 0.5 N	

SOFTWARE REQUERIDO	
No aplica	
OBSERVACIONES-COMENTARIOS	
Cantidad por equipo	
NOMBRE Y FIRMA DEL PROFESOR	**NOMBRE Y FIRMA DEL COORDINADOR DE PROGRAMA EDUCATIVO**

Dra. Graciela Guerra Rivas
Dra. Claudia M Gómez Gutiérrez

CURVAS DE TITULACIÓN: Aminoácidos

Un aminoácido es cualquier molécula orgánica que posee por lo menos un grupo carboxilo (un ácido orgánico) y un grupo amino (una base orgánica). De acuerdo con esta definición, en las células de las plantas y animales existen cientos de aminoácidos distintos; sin embargo, son 20 los se codifican genéticamente para incorporarse a las proteínas (Boyer, 2000). Este grupo de aminoácidos comparten una estructura general que consta de un carbon central (carbon alfa) rodeado de un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y una cadena lateral R (fig. 1). La naturaleza de la cadena lateral puede variar desde un simple átomo de hidrógeno hasta un complejo sistema de anillos, y es la que determina la reactividad química y biológica que distingue a cada aminoácido.

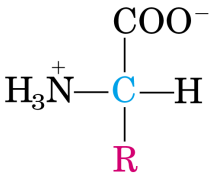


Fig. 1. Estructura general de los aminoácidos. Tomada de Nelson y Cox, 2002.

A pH fisiológico (7.4 aproximadamente), los aminoácidos existen como especies iónicas dipolares; es decir, en la misma molécula existen una carga positiva y una carga negativa. Estas formas se conocen como zwitteriones. El grupo carboxilo se encuentra protonada a pH ácido y pierde un protón a pH neutro (con la aparición de una carga negativa) de acuerdo con la ecuación siguiente (fig. 2).

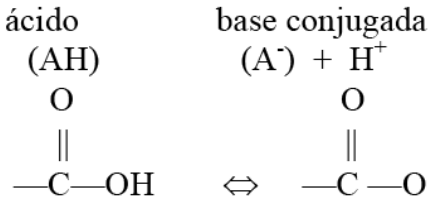


Fig. 2. Función ácido y base conjugada de los aminoácidos

Esta función química está caracterizada por su constante de ionización (Ka), es decir, la constante de equilibrio de la reacción de ionización.

$$Ka_1 = \frac{(A^-)\ (H^+)}{(AH)}$$

Si sabemos que : pKa = -log Ka y pH = -log(H^+)

podemos decir que:

$$pKa = pH - \log \frac{(A^-)}{(AH)}$$

En la práctica una ionización se define por el valor de pKa, que corresponde al valor de pH en el cual la concentración de (A^-) y de (AH) sean iguales, es decir, 50% de cada uno. El pKa de un carboxilo tiene en general un valor entre 2.0 y 4.5. El pKa de un grupo amino se encuentra generalmente entre 8.0 y 11.0.

En esta práctica se titulará con NaOH y HCl diferentes aminoácidos con la finalidad de determinar el número de grupos ionizables, el valor de pKa de cada grupo y de esta forma identificar los diferentes aminoácidos.

MÉTODOS

I.- CURVA DE TITULACIÓN

1. Coloca 20 mL de la solución problema (aminoácido) en un vaso de precipitado.
2. Adiciona HCl hasta alcanzar un valor de pH de 1.2. *Toma en cuenta el volumen que adicionaste de ácido y anótalo en tu libreta.
3. Con el electrodo sumergido en la solución, agrega 1.5 mL de NaOH y anota el valor de pH final. *La solución debe agitarse continuamente.
4. Continua agregando NaOH en alicuotas de 1.5 mL de NaOH, anota el valor de pH cada vez.
5. Cuando el valor de pH sea cercanoa 13 y no cambie aún cuando adiciones NaOH la titulación se considera terminada.
6. Realiza el mismo procedimiento con la base, titulando con ácido hasta alcanzar el valor inicial.
7. Repite los pasos anteriores con todas las muestra problema.

II. TRATAMIENTO DE DATOS

1. Grafica en papel milimétrico. Coloca los valores de pH en las ordenadas y los miliequivalentes (meq) de NaOH o HCl en las abscisas.
2. Determina el valor de pKa y pI de cada aminoácido problema.
3. Determina que aminoácidos son.
4. Obtén la ecuación de la regression lineal y escríbela sobre la gráfica.

III. CONTESTA LO SIGUIENTE:

1. Calcula la concentración: molar, normal y porcentual de una solución de L-lisina que se preparó al pesar 20 mg y se disolvió en 50 mL de agua.
2. Si el pH de una solución 0.01 M de un ácido HA es 3.8. Calcula el pK del ácido.
3. La Treonina tiene un Pka1= 2.1 y un pKa2= 9.1. Utiliza la ecuación de Henderson-Hasselbalch para calcular la proporción de formas protonadas y desprotonadas a pH=1.5 y pH=10.0.

BIBLIOGRAFÍA

Boyer, R. (2000) Conceptos de Bioquímica.International Thomson editores, S.A. de C. V.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA ENSENADA

REQUERIMIENTOS PARA REALIZACION DE PRÁCTICAS EDUCATIVAS EN LABORATORIOS DE LA FIAD

NOMBRE DE LA MATERIA	BIOQUIMICA	**CLAVE**	13183
NOMBRE DE LA PRÁCTICA	CURVAS DE CALIBRACIÓN (Proteínas)	**PRÁCTICA NÚMERO**	4
PROGRAMA EDUCATIVO	INGENIERÍA EN NANOTECNOLOGÍA	**PLAN DE ESTUDIO**	2010-1

EQUIPO-HERRAMIENTA REQUERIDO	CANTIDAD
Estufa	1
Espectrofotómetro	1

MATERIAL-REACTIVO REQUERIDO	CANTIDAD
Tubos de ensayo 16 x 150 mm	35
Pipeta de 1 mL	2
Pipeta de 5 mL	2
Vaso de precipitado 150 mL	3
Piceta	1
Pipetador	2
Escobillón	2
BIURET	
Albúmina 10mg/mL	

SOFTWARE REQUERIDO	
No aplica	
OBSERVACIONES-COMENTARIOS	
NOMBRE Y FIRMA DEL PROFESOR QUE ELABORÓ	**NOMBRE Y FIRMA DEL COORDINADOR DE PROGRAMA EDUCATIVO**
MIEMBRO DE ACADEMIA	**MIEMBRO DE ACADEMIA**

Dra. Graciela Guerra Rivas
Dra. Claudia M Gómez Gutiérrez

CURVAS DE CALIBRACIÓN (Poteínas)

La medición de especies químicas por métodos espectofotométricos implica la elaboración de curvas de calibración que se basan en la propiedad de las sustancias absorbentes de seguir la ley de Beer-Lambert. De acuerdo con esta ley, cuando incide la luz de una determinada longitud de onda sobre una especie absorbente, la absorción depende de:

1. El coeficiente de extinción molar de la especie química.
2. El espesor del recipiente que la contiene.
3. La concentración de la especie en la solución.

Como el coeficiente de extinción molar es constante para una especie química, si se miden soluciones de distinta concentración usando el mismo recipiente, la absorbancia depende exclusivamente de la concentración de la especie.

De esta forma, si se grafica la absorbancia en función de la concentración se obtiene una línea recta, a la que se denomina “curva de calibración”. La utilidad de estas gráficas radica en que a partir de de ellas se puede determinar la concentración de una especie química en una solución.

En esta práctica se hará una curva de calibración que se utilizará en práctica siguiente. Por lo tanto, el cuidado en la elaboración de esta curva, desde el momento en que se prepara el material de vidrio hasta que se construye la gráfica es determinante en la calidad de los resultados de las primeras dos prácticas.

MÉTODOS

I.- CURVA DE CALIBRACIÓN PARA PROTEÍNAS

(Adaptación del Método de Biuret)

1. Prepara y etiqueta 11 tubos por triplicado:

Originales	Blanco	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Réplica a	Blanco	1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a	8a	9a	10a
Réplica b	Blanco	1b	2b	3b	4b	5b	6b	7b	8b	9b	10b

2. Añade los reactivos según la Tabla I.

3. Después de añadir todos los reactivos, agita los tubos cuidadosamente.

4. Deja transcurrir la reacción durante 30 minutos y lee Abs a 450 nm.

Tabla I. Adiciones para curva de calibración para proteínas (método de Biuret)

Tubo	H_2O (mL)	Estándar (mL)	Biuret (mL)
Blanco	1.0	0.0	5.0
1	0.9	0.1	5.0
2	0.8	0.2	5.0
3	0.7	0.3	5.0
4	0.6	0.4	5.0
5	0.5	0.5	5.0
6	0.4	0.6	5.0
7	0.3	0.7	5.0
8	0.2	0.8	5.0
9	0.1	0.9	5.0
10	0.0	1.0	5.0

II. TRATAMIENTO DE DATOS

1. Calcula la absorbancia promedio de las lecturas de cada original y sus réplicas.

2. Calcula la concentración de albúmina en cada tubo, tomando como base la concentración de la solución estándar que usaste y la cantidad de mililitros que agregaste a cada tubo.

3. Grafica en papel milimétrico y en Excel colocando las absorbancias en las ordenadas y las concentraciones en las abscisas.

4. Obtén la ecuación de la regresión lineal y escríbela sobre la gráfica.

NOTA:
Guarda una copia de tu curva de calibración y de la ecuación de regresión lineal, ya que las necesitarás para elaborar el reporte de tu próxima práctica.

BIBLIOGRAFÍA

Cooper, T. G. (1977) The tools of biochemistry. Willey & Sons Interscience Publication. N.Y.

Rendina, G. (1971) Experimental methods in modern biochemistry. W. B. Saunder Co. Philadelphia.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

REQUERIMIENTOS PARA REALIZACION DE PRÁCTICAS EDUCATIVAS EN LABORATORIOS DE LA FIAD

NOMBRE DE LA MATERIA	BIOQUIMICA	**CLAVE**	13183
NOMBRE DE LA PRÁCTICA	DETERMINACION DE PROTEINAS EN DIFERENTES TEJIDOS	**PRÁCTICA NÚMERO**	5
PROGRAMA EDUCATIVO	INGENIERÍA EN NANOTECNOLOGÍA	**PLAN DE ESTUDIO**	2010-1

EQUIPO-HERRAMIENTA REQUERIDO	CANTIDAD
Estufa	1
Espectrofotómetro	1
Balanza	1
Homogenizador	1

MATERIAL-REACTIVO REQUERIDO	CANTIDAD
Caja Petri	1
Tubos de vidrio	8
Tubo de plastico con tapa	2
Pipeta 1 mL	2
Pipeta de 5 mL	1
Vaso de precipitado 100 mL	3
Bisturí	1
Pinzas	1
Piceta	1
Pipetador	1
Escobillón	1
Celdas de cuarzo	4

SOFTWARE REQUERIDO
No aplica
OBSERVACIONES-COMENTARIOS

NOMBRE Y FIRMA DEL PROFESOR QUE ELABORÓ	NOMBRE Y FIRMA DEL COORDINADOR DE PROGRAMA EDUCATIVO
MIEMBRO DE ACADEMIA	**MIEMBRO DE ACADEMIA**

Dra. Graciela Guerra Rivas
Dra. Claudia M Gómez Gutiérrez

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN DIFERENTES TEJIDOS

Desde los primeros estudios que se realizaron sobre las proteínas y se pensó en tal nombre para este tipo de compuestos, se sospechaba que podrían ser las sustancias biológicas más importantes. Algunos autores hasta la fecha, han señalado que las proteínas están involucradas en todos los procesos celulares. De entre la gran variedad de funciones en las que participan, podemos señalar su papel como agentes catalíticos, la actividad como anticuerpos, su función como transportadores, como hormonas, en la defensa mecánica, agentes anticongelantes, soportes corporales, etc. Esta lista podría extenderse casi indefinidamente, razón por la cual es conveniente conocer metodologías que contribuyan al estudio de las proteínas.

El método de Biuret es uno de los dos más utilizados para cuantificar proteínas tejidos biológicos. Se fundamente en la propiedad que poseen las proteínas para formar complejos de color azul violeta con el ión cuproso, gracias a que poseen enlaces peptídicos, reacción que se conoce con el nombre de “Biuret”. Se mide posteriormente la absorbancia y se calcula la concentración de proteína en base a una curva de calibración previamente elaborada usando un estándar.

En la práctica anterior se obtuvo la curva de calibración. Ahora aprenderemos a extraer las proteínas por medio de la preparación de homogenados, método que se utiliza para solubilizar las proteínas de tejidos y facilitar su determinación cuantitativa. Posteriormente, aprovecharemos la curva de calibración para calcular la cantidad de proteína presente en los homogenados de dichos tejidos.

MÉTODOS

I.- PREPARACIÓN DE HOMOGENADOS.

1. Pesa y corta el tejido (hígado de pollo, hígado de res) en pequeños trozos con una navaja, bisturí o tijeras manteniendo el tejido en el hielo.
2. Transfiere el tejido finamente picado al tubo del homogenizador con ayuda de la solución de HEPES-sacarosa (fría), usando una proporción de 1 ml por cada 0.2 g de tejido.

3. Homogeniza el tejido dando al tubo movimientos verticales.
4. Una vez preparados los homogenados, realiza la medición de una proteína conforme a la sección II.

II. MEDICIÓN DE PROTEÍNA

En tubos de 18 X 150 (duplicado):

1. Coloca 0.2 ml de cada homogenado.
2. Agrega 0.8 ml de agua destilada.
3. Añade 5.0 ml de solución de Biuret. Agita. Deja reposa 30 min y lee a 450 nm. Calcula la concentración de proteínas a partir de la curva de calibración previamente preparada (práctica anterior).

TRATAMIENTO DE DATOS

1. Calcula la concentración de proteína soluble en el homogenado que preparaste; para ello, aplica los siguientes métodos:

    a. Por medio de la ecuación de regresión lineal.
    b. A partir de la gráfica.
    c. Con ayuda de la ecuación de Beer-Lambert.

2. Calcula el contenido de proteína soluble presente en cada gramo de tejido. Toma en cuenta que usaste 0.2 ml de homogenado y que cada ml de éste contiene 0.2 g de tejido.

NOTAS

1. Incluye en este reporte tu curva de calibración la ecuación de regresión lineal obtenida en tu experimento anterior.
2. No olvides escribir las unidades sobre los ejes correspondientes de las gráficas.

BIBLIOGRAFÍA

Las fuentes de la práctica anterior son de utilidad.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

REQUERIMIENTOS PARA REALIZACION DE PRÁCTICAS EDUCATIVAS EN LABORATORIOS DE LA FIAD

NOMBRE DE LA MATERIA	BIOQUIMICA	**CLAVE**	13183
NOMBRE DE LA PRÁCTICA	ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA	**PRÁCTICA NÚMERO**	6
PROGRAMA EDUCATIVO	INGENIERÍA EN NANOTECNOLOGÍA	**PLAN DE ESTUDIO**	2009-2

EQUIPO-HERRAMIENTA REQUERIDO	CANTIDAD
Vortex	1
Cámara de electroforesis	1
Fuente de poder	1

MATERIAL-REACTIVO REQUERIDO	CANTIDAD
Pipeta automática 1000 μL	1
Pipeta automática 200 μL	1
Pipeta automática 10 μL	1
Matraz Erlenmeyer 50 mL	3
Vaso de precipitado 100 mL	3
Piceta	1
Puntas para pipeta (volumen variable)	
Guantes de latex/acetonitrilo	
Pipetas Pasteur	
Solución de acrilamida/bis-acrilamida 30%	
Amotiguador separador Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	
Amortiguador concentrador Tris-Hcl 0.5 M pH 6.8	
SDS al 10% (W/V)	
Persulfato de amonio (APS) al 10%	
Gel separador al 13% de acrilamida en amortiguador Tris HCl 0.375 M pH 8.8	
Gel concentrador al 3% de acrilamida en amortiguador Tris-HCl 0.125 M pH 6.8	
Amortiguador de la muestra	
Amortiguador de electroforesis Tris-Glicina pH 8.3	
Solución de tinción azul de Coomassie	
Solución desteñidora	

SOFTWARE REQUERIDO
No aplica
OBSERVACIONES-COMENTARIOS

NOMBRE Y FIRMA DEL PROFESOR QUE ELABORÓ	NOMBRE Y FIRMA DEL COORDINADOR DE PROGRAMA EDUCATIVO

Dra. Graciela Guerra Rivas
Dra. Claudia M Gómez Gutiérrez

MIEMBRO DE ACADEMIA	MIEMBRO DE ACADEMIA

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis en geles de poliacrilamida es uno de los métodos más utilizados para la purificación, análisis y caracterización de proteínas. La técnica permite separar moléculas cargadas y explota diferencias en movilidad cuando se les somete a la acción de un campo eléctrico. La electroforesis se lleva a cabo sobre un soporte inerte, generalmente sobre geles de poliacrilamida (PAGE). En la electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE), como su propio nombre indica, se utilizan agentes desnaturalizantes de proteínas, como pueden ser: detergentes (p.e. SDS), caótropos (p.e. urea) y agentes reductores (2- mercaptoetanol, DTT). Para la visualización de las proteínas se utilizan diferentes métodos de tinción, siendo el más habitual el azul de coomassie. En la SDS-PAGE, la separación es función del tamaño (masa molecular), lo que permite determinar el peso molecular de las proteínas. Para ello se compara la movilidad electroforética (Rf) de la proteína de peso molecular desconocido con el de proteínas de referencia de peso molecular conocido.

La SDS-PAGE se utiliza para determinar el peso molecular de proteínas. Para ello se compara el Rf de la proteína problema con el de proteínas de referencia cuyo peso molecular se conoce. Recordemos que el Rf es el parámetro experimental asociado a esta técnica, y se define como:

$$Rf = \frac{\text{Distancia que migra una determinada proteína}}{\text{Distancia que migra el frente del gel}}$$

El frente del gel se determina por la posición de un compuesto de referencia de movilidad máxima, como puede ser el colorante azul de bromofenol.

OBJETIVO

Que el alumno comprenda el fundamento teórico de la técnica de electroforesis.

Que el alumno determine el peso molecular de una muestra desconocida

METODOLOGÍA

I.- PREPARACIÓN DE GEL SEPARADOR AL 13%

1. Mezcla en un matraz lo siguiente en el orden que se indica en el anexo.
2. Con una pipeta Pasteur añade la mezcla anterior al molde hasta una altura aproximada de 2 cm del borde superior de la placa mayor, de forma que quede suficiente espacio para el gel concentrador.
3. Con una pipeta limpia cubre la superficie del gel con agua destilada para prevenir el contacto del oxígeno con el gel.

II. PREPARACIÓN DE GEL CONCENTRADOR

1. Elimina el agua que cubre el gel separador y lava la parte superior del gel 2-3 veces con agua destilada para eliminar cualquier residuo de acrilamida no polimerizada.
2. Mezcla en un matraz los componentes en el orden indicado en el anexo.

NOTA: La polimerización comienza al adicionar el TEMED, por lo tanto se debe trabajar con rapidez a partir de este momento

3. Utilizando una pipeta Pasteur, coloca la solución sobre la superficie del gel separador. Inmediatamente inserta el peine en la solución concentradora con cuidado para evitar que se formen burbujas de aire.
4. Espera a que el gel haya polimerizado (30 minutos aprox).
5. Retira el peine cuidadosamente. Enjuaga los pocillos 2-3 veces con agua destilada.

III. ELECTROFORESIS

1. Coloca las placas con los geles polimerizados en la unidad de electroforesis.
2. Añade el amortiguador de electroforesis en la cámara de electroforesis.

3. Aplica las muestras en los pocillos (15 μL).
4. Conecta los electrodos y corre la electroforesis a 200V.
5. Una vez que termine. Saca los geles de acrilamida del molde, separando cuidadosamente los cristales.

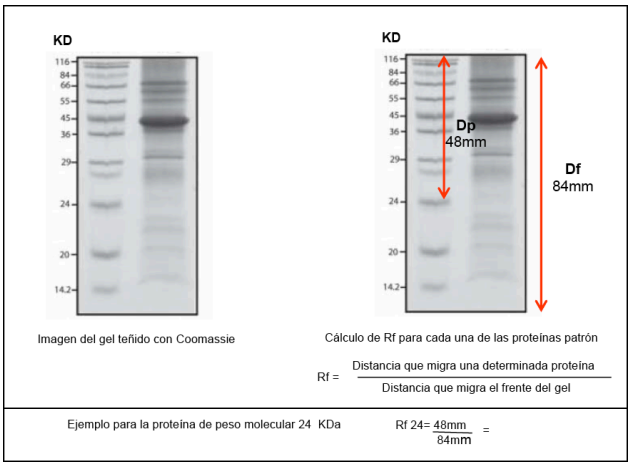
IV. TINCIÓN

1. Transfiere el gel a un recipiente que contenga la solución de tinción. Deja el gel durante 1 h.
2. Elimina la solución de tinción y añade la solución desteñidora. Incuba hasta que se comiencen a ver la proteínas.

TRATAMIENTO DE DATOS

1. Representa en una figura los resultados obtenidos

EJEMPLO



2. Mide y anota la distancia recorrida por el frente del gel (Df) y por cada una de las proteínas estándar (Dp). Calcula el Rf para cada una de ellas y anótalo en una tabla.
3. Representa los valores del logaritmo del peso molecular de las proteínas estándar frente a su movilidad relativa.
4. Calcula el PM de la proteína(s) problema.

BIBLIOGRAFÍA

- Hames BD, Ricwood D (2002): “Gel Electrophoresis of Proteins. A Practical Approach”, 3ª ed. Oxford University Press. Excelente libro que explica en detalle desde un punto de vista práctico los protocolos de separación electroforéticas de proteínas.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685. Descripción del método SDS-PAGE.
- Nelson DL, Cox MM (2001). “Principios de Bioquímica”, 3ª ed. Omega (Barcelona, España). Libro básico de bioquímica.
- Westermeier R (2001): “Electrophoresis in Practise”, 3ª ed. WILEY-VCH Verlag GmbH (Weinheim, Alemania). Explica en detalle los métodos de separación electroforéticas. Consultar los capítulos que hacen referencia a SDS-PAGE de proteínas. Sambrook, J., Russell, D. W. 2001. Molecular Clonig: A Laboratory Manual. 3a ed. Cold Spring Harbor Laboratories. Nueva York. 2344 pp.

ANEXO

A. Gel separador al 13% de acrilamida en amortiguador Tris-HCl 0.375 M, pH 8.8

Reactivo	10 mL (g)
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 mL
SDS 10%	0.1 mL
Acrilamida/bisacrilamida 30%	4.3 mL
APS 10%	0.05 mL
TEMED	0.005 mL
Agua destilada	3.0 mL

B. Gel concentrador al 3% de acrilamida en amortiguador Tris-HCl 0.125 M pH 6.8

Reactivo	10 mL (g)
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	2.5 mL
SDS 10%	0.1 mL
Acrilamida/bisacrilamida 30%	1.0 mL
APS 10%	0.1mL
TEMED	0.005 mL
Agua destilada	6.2 mL

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

REQUERIMIENTOS PARA REALIZACION DE PRÁCTICAS EDUCATIVAS EN LABORATORIOS DE LA FIAD

NOMBRE DE LA MATERIA	BIOQUIMICA	**CLAVE**	13183
NOMBRE DE LA PRÁCTICA	EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA VELOCIDAD ENZIMÁTICA	**PRÁCTICA NÚMERO**	7
PROGRAMA EDUCATIVO	INGENIERÍA EN NANOTECNOLOGÍA	**PLAN DE ESTUDIO**	2009-2

EQUIPO-HERRAMIENTA REQUERIDO	CANTIDAD
Vortex	1
Balanza	1
Espectrofotométro	1
Baño de temperatura	1
Plancha de calentamiento	1

MATERIAL-REACTIVO REQUERIDO	CANTIDAD
Pipeta 1 mL	2
Pipeta 5 mL	2
Vaso de precipitado de 1 L	1
Vaso de precipitado 150 mL	3
Piceta	1
Papel filtro	2
Tubos de ensayo	20
Embudo filtración	1
Hielo	

SOFTWARE REQUERIDO
No aplica
OBSERVACIONES-COMENTARIOS

NOMBRE Y FIRMA DEL PROFESOR QUE ELABORÓ	NOMBRE Y FIRMA DEL COORDINADOR DE PROGRAMA EDUCATIVO
MIEMBRO DE ACADEMIA	**MIEMBRO DE ACADEMIA**

Dra. Graciela Guerra Rivas
Dra. Claudia M Gómez Gutiérrez

EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCIÓN ENZIMÁTICA

Las reacciones químicas transcurren a mayor velocidad al aumentar la temperatura. Para las reacciones catalizadas enzimáticamente, esto es válido sólo hasta unos 50º C en general. Por encima de esta temperatura, la inactividad de las enzimas por desnaturalización se convierte en un factor más importante que el aumento de la velocidad, y en la mayoría de los casos la velocidad disminuye y cesa en el intervalo de 70-80 º C.

Para observar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática, usaremos un extracto que contendrá carbohidrasas.

METODOLOGÍA

I.- PREPARACIÓN DE EXTRACTO.

1. Es necesario que un miembro de tu equipo realice lo siguiente:
   * Enjuaga tu boca con abundante agua.
   * Mastica un trozo de papel filtro para estimular la salivación.
   * Colecta una muestra de saliva, la cual se irá pasando por un embudo con un flitro humedecido colocado sobre un tubo de ensayo. Es necesario que colectes por lo menos 6 mL aprox. **UTILIZA GUANTES EN TODO MOMENTO!**
2. Diluye la muestra 10 veces. Esta muestra contiene la enzima para tu práctica.

En este experimento se probarán **5 temperaturas diferentes**, manteniendo fijas las condiciones de concentración de sustrato, de concentración de enzima, tiempo y pH. Usa el extracto obtenido en la sección 1 de este experimento y la solución de almidón, ambos diluidos 10 veces con el buffer de succinatos de pH 5 para la realización de **la sección II**.

II.- MEDICIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA

1. Coloca en 5 tubos por duplicado el sustrato (solución de almidón) y el extracto, de acuerdo a la Tabla I:

   Tabla I. Procedimiento para observar el efecto de la temperatura

	TUBOS				
	1	2	3	4	5
Sustrato (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Extracto (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Temperatura (°C)	0	15	30	40	60

2. Incuba todos los tubos a las temperaturas señaladas durante 30 minutos, al cabo de los cuales, agrega 0.5 ml del reactivo I de Nelson, el que debe ser recientemente preparado (12.5 ml de **reactivo A** con 0.5 ml de **reactivo B**).

3. Trata todos los tubos de acuerdo al procedimiento de la sección **III**, "Determinación de azúcares reductores y curva de calibración".

III. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES Y CURVA DE CALIBRACIÓN.

Los 10 tubos trabajados en la sección anterior se usarán ahora para la determinación de azúcares reductores formados por la acción de la enzima, al mismo tiempo que se corre una curva de calibración con solución estándar de glucosa. En **Tabla II** los 10 tubos son mencionados solamente como "tubos problema", mientras que los de la curva de calibración con concentraciones crecientes de glucosa serán etiquetados desde 1 hasta 6. Lee la absorbancia a 520 nm después de agitar perfectamente.

	TUBOS						
	PROBLEMA*	1	2	3	4	5	6
Reactivo I (mL)	0.5**	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Sol. Std. (mL)	0	0	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
INCUBAR 20 MINUNTOS EN BAÑO DE AGUA HIRVIENDO							
Reactivo II (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Agua (mL)	8.0	9.0	8.9	8.7	8.5	8.3	8.1

*Recuerda que el tubo **PROBLEMA** representa el tratamiento para todos los tubos de la Tabla I.
** Este reactivo no se agrega, pues se le agregó en el paso 3 de la sección II.

TRATAMIENTO DE DATOS:

1. Construye una curva de calibración para la determinación de azúcares reductores. Toma en cuenta la concentración de la solución estándar de glucosa para el cálculo de concentraciones de cada mezcla de reacción de la **Tabla II**.

2. Calcula la velocidad de reacción enzimática en cada tubo de la **Tabla I**. Para ello, sigue estos pasos:

    a. Calcula la cantidad de glucosa que se produjo en cada tubo durante los 30 min de incubación. Para esto, usa tu curva de calibración.

    b. Determina la cantidad e glucosa que se produjo cada minuto en cada tubo.

3. Elabora una gráfica de velocidad de reacción en función de la temperatura. Esta gráfica expresa el perfil de actividad de carbohidrasas del organismo que estudiaste.

INVESTIGA:

1. ¿Qué es una enzima?
2. ¿Qué reacción cataliza la carbohidrasa?. Escribe la reacción completa
3. Identifica el sustrato, el producto e indica si son necesarios coenzimas o cofactores.
4. ¿Cuál es el pH y la temperatura óptimas de esta enzima?

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

REQUERIMIENTOS PARA REALIZACION DE PRÁCTICAS EDUCATIVAS EN LABORATORIOS DE LA FIAD

NOMBRE DE LA MATERIA	BIOQUIMICA	**CLAVE**	13183
NOMBRE DE LA PRÁCTICA	DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS DE UN PAR ENZIMÁTICO	**PRÁCTICA NÚMERO**	8
PROGRAMA EDUCATIVO	INGENIERIA EN NANOTECNOLOGÍA	**PLAN DE ESTUDIO**	2009-2

EQUIPO-HERRAMIENTA REQUERIDO	CANTIDAD
Balanza	1
Baño de temperatura	1

MATERIAL-REACTIVO REQUERIDO	CANTIDAD
Pipeta 1 mL	2
Pipeta 5 mL	2
Matraz erlenmeyer	5
Vaso de precipitado 150 mL	3
Bureta	1
Soporte universal	1
Pinzas para bureta	1
Piceta	1
Hielo	
Urea 0.1 M	
Ureasa	

SOFTWARE REQUERIDO
No aplica
OBSERVACIONES-COMENTARIOS

NOMBRE Y FIRMA DEL PROFESOR QUE ELABORÓ	NOMBRE Y FIRMA DEL COORDINADOR DE PROGRAMA EDUCATIVO
MIEMBRO DE ACADEMIA	**MIEMBRO DE ACADEMIA**

Dra. Graciela Guerra Rivas
Dra. Claudia M Gómez Gutiérrez

DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS DE UN PAR ENZIMÁTICO

La teoría fundamental de la catálisis enzimática se basa en la medición de velocidades iniciales de reacción durante la acción de las enzimas (se define como velocidad inicial o V_0 a la que se observa cuando la concentración de producto es casi cero).

Para una reacción de un solo sustrato, la curva que resulta de graficar la V_0 en función de la concentración de sustrato es una hipérbola que se aproxima asintóticamente a un valor máximo. Este valor se presenta como V_{max} y es la máxima velocidad que puede obtenerse sin aumentar la concentración de la enzima. Cuando la velocidad inicial es igual a la $V_{max,}$ es decir, cuando:

$$V_0 = ½\ V_{max}$$

se tiene una concentración de sustrato que se denomina constante de Michaelis y se representa como K_m.

En este experimento se determinará el valor de K_m de la ureasa actuando sobre su sustrato:

$$(NH_2)_2CO + H_2O \rightarrow CO_2 + 2NH_3$$

En esta reacción se observa que la urea es hidrolizada por la enzima, produciéndose dióxido de carbono y amoníaco. El amoníaco producido se disuelve en el medio acuoso y se transforma en hidróxido de amonio, el que se utiliza para seguir el curso de la reacción. Para medir la velocidad de la reacción (velocidad inicial) de cada concentración de sustrato, mediremos el amoníaco producido en cada matraz calculando la cantidad de equivalente de º HCl usado para neutralizar la mezcla después de suspendida la acción.

METODOLOGÍA

1. Prepara un baño de temperatura a 37 ºC.

2. En 5 matraces de 50 ml prepara una serie creciente de concentraciones de sustrato, como se indica en la Tabla I.

3. Coloca los matraces en el baño de temperatura y permite que alcancen la temperatura del mismo ANTES de añadir la enzima.
   Cinco minutos es suficiente.

4. Manteniendo los matraces dentro del baño de temperatura, agrega a cada matraz 1 ml de suspensión de ureasa recién preparada (25 mg/ml de agua).

5. Deja que la acción de la enzima transcurra durante 10 min exactamente medidos. Suspende la reacción por inmersión en hielo.

6. Con los matraces dentro del baño de hielo, agrega a cada uno 3 gotas de fenolftaleína y titula con HCl 0.1 N.

Tabla I. Mezclas de reacción para la medición de la actividad de Ureasa sobre urea

Matraz	Urea 0.1 M (mL)	H2O (mL)	Ureasa 25 mg/ mL (mL)	Volumen de HCl 0.1 N (mL)
1	0	24	1	
2	5	19	1	
3	10	14	1	
4	15	9	1	
5	20	4	1	

NOTA

El primer matraz es un blanco y sirve para corregir las lecturas.

TRATAMIENTO DE DATOS

1. Calcula la velocidad de reacción enzimática y exprésala en miliequivalentes de amoníaco producido por minuto.

2. Calcula la concentración de sustrato en términos de molaridad.

3. Con tus datos construye:

a. Una gráfica de Michaelis-Menten.
b. Una gráfica de Lineweaver-Burk.

4. Determina los valores de Km y Vmax por medio de los siguientes métodos:

a. Con ayuda de tu gráfica de Michaelis-Menten.
b. Usando la gráfica Lineweaver-Burk.
c. Por medio de la ecuación de Michaelis.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

REQUERIMIENTOS PARA REALIZACION DE PRÁCTICAS EDUCATIVAS EN LABORATORIOS DE LA FIAD

NOMBRE DE LA MATERIA	BIOQUIMICA	**CLAVE**	13183
NOMBRE DE LA PRÁCTICA	HIDRÓLISIS DE ATP (Calibración del método)	**PRÁCTICA NÚMERO**	9
PROGRAMA EDUCATIVO	INGENIERÍA EN NANOTECNOLOGÍA	**PLAN DE ESTUDIO**	2010-1

EQUIPO-HERRAMIENTA REQUERIDO	CANTIDAD
Espectrofotómetro	1

MATERIAL-REACTIVO REQUERIDO	CANTIDAD
Pipeta 1 mL	2
Pipeta 5 mL	2
Vaso de precipitado 150 mL	4
Tubos de ensayo	25
Piceta	1

SOFTWARE REQUERIDO
No aplica
OBSERVACIONES-COMENTARIOS

NOMBRE Y FIRMA DEL PROFESOR QUE ELABORÓ	NOMBRE Y FIRMA DEL COORDINADOR DE PROGRAMA EDUCATIVO
MIEMBRO DE ACADEMIA	**MIEMBRO DE ACADEMIA**

Dra. Graciela Guerra Rivas
Dra. Claudia M Gómez Gutiérrez

HIDRÓLISIS DE ATP (Calibración del método)

Todo el trabajo que los organismos realizan requiere energía, la que obtienen de reacciones químicas que se desarrollan en sus células y tejidos, o bien, en sus fluidos corporales. La estrategia básica para este fin consiste en la oxidación de nutrientes (proceso exergónico) y la producción concomitante de adenosintrifosfato o ATP (proceso endergónico), el que posteriormente es utilizado por hidrólisis como fuente de energía según los requerimientos de gasto energético.

El papel del ATP es clave para la realización y ocurrencia de actividades vitales que se sustentan en procesos bioquímicos, como la biosíntesis, la contracción muscular, transmisión de impulsos nerviosos, transporte de iones a través de la membrana, movimientos de cilios y flagelos, etc.

Cuando se realiza el estudio de algún mecanismo bioquímico que implica el consumo o producción de ATP, se puede utilizar el nivel se fosfato como “medidor” del proceso, para lo que el método de Fiske-Subarow resulta muy útil. En esta práctica se elaborará una curva de calibración que servirá de base en la siguiente, en la cual se medirá la hidrólisis de ATP en tejidos biológicos.

METODOLOGÍA

I.- CURVA DE CALIBRACIÓN DE FOSFATOS

(Adaptación del Método de Fiske-Subarow)

1. Lava perfectamente todo tu material de vidrio con jabón libre de fosfatos.

2. Prepara 11 tubos (por duplicado) con las siguientes etiquetas:

   Originales: B, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
   Réplicas: B’, 1’, 2’, 3’, 4’, 5’, 6’, 7’, 8’, 9’, 10’

3. Añade los reactivos según la Tabla I.

4. Después de añadir todos los reactivos, agita perfectamente cada tubo.

5. Deja transcurrir la reacción durante 20 min y lee la absorbancia a 660 nm.

Tabla I. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA FOSFATOS. Las adiciones son en mL. observa que la adición inicial de agua es para diluir el estándar.

Tubo	H_2O	STD. PO_4	H_2SO_4 10 N	Molib. Amonio 2.5%	Reactivo reductor	H_2O	Abs	Abs
B	4.0	0.0	0.5	1.0	1.0	3.5		
1	3.9	0.1	0.5	1.0	1.0	3.5		
2	3.8	0.2	0.5	1.0	1.0	3.5		
3	3.7	0.3	0.5	1.0	1.0	3.5		
4	3.6	0.4	0.5	1.0	1.0	3.5		
5	3.5	0.5	0.5	1.0	1.0	3.5		
6	3.4	0.6	0.5	1.0	1.0	3.5		
7	3.3	0.7	0.5	1.0	1.0	3.5		
8	3.2	0.8	0.5	1.0	1.0	3.5		
9	3.1	0.9	0.5	1.0	1.0	3.5		
10	3.0	1.0	0.5	1.0	1.0	3.5		

TRATAMIENTO DE DATOS

1. Construye tu curva de calibración colocando la concentración en el eje de abscisas y la absorbancia en el de las ordenadas. Toma en cuenta que la solución estándar de fosfatos (KH_2PO_4) tiene una concentración de 136 g/L, lo que es equivalente a 1 mM.

2. Obtén la ecuación de la regresión lineal e inclúyela en tu reporte.

INVESTIGA:

1. ¿Cuál es la importancia del ATP para los seres vivos?
2. ¿En qué se basa el método de Fiske-Subarow?

BIBLIOGRAFÍA

- Cooper, T.G.(1977) The tools of biochemistry. Wiley & Sons Interscience Publication. N. Y.

• Rendina, G. (1971) Experimental methods in modern biochemistry. W. B. Saunder Co. Philadelphia.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

REQUERIMIENTOS PARA REALIZACION DE PRÁCTICAS EDUCATIVAS EN LABORATORIOS DE LA FIAD

NOMBRE DE LA MATERIA	BIOQUIMICA	**CLAVE**	13183
NOMBRE DE LA PRÁCTICA	HIDRÓLISIS DE ATP (Medición de ATPasa en tejidos)	**PRÁCTICA NÚMERO**	10
PROGRAMA EDUCATIVO	INGENIERÍA EN NANOTECNOLOGÍA	**PLAN DE ESTUDIO**	2010-1

EQUIPO-HERRAMIENTA REQUERIDO	CANTIDAD
Espectrofotómetro	1

MATERIAL-REACTIVO REQUERIDO	CANTIDAD
Pipeta 1 mL	2
Pipeta 5 mL	2
Vaso de precipitado 150 mL	4
Tubos de ensayo	20
Piceta	1
Gradilla	1

SOFTWARE REQUERIDO
No aplica
OBSERVACIONES-COMENTARIOS

NOMBRE Y FIRMA DEL PROFESOR QUE ELABORÓ	NOMBRE Y FIRMA DEL COORDINADOR DE PROGRAMA EDUCATIVO
MIEMBRO DE ACADEMIA	**MIEMBRO DE ACADEMIA**

Dra. Graciela Guerra Rivas
Dra. Claudia M Gómez Gutiérrez

HIDRÓLISIS DE ATP (Medición de ATPasa en tejidos)

En este experimento se hará la medición de la actividad de ATPasa en dos tejidos diferentes. Las ATPasas son enzimas que aprovechan la energía liberada por la hidrólisis de ATP para realizar diferentes funciones. Un ejemplo de este tipo de enzimas es la adenosintrifosfatasa dependiente de sodio y potasio (Na^+ K^+ ATPasa), que actúa en el bombeo de iones (sodio potasio) a través de membranas, por lo que se conoce también como bomba de sodio y potasio. Su importancia biológica radica en la regulación que ejerce sobre el flujo de electrolitos entre una célula y su entorno.

METODOLOGÍA

I.- TEJIDOS

Para realizar esta práctica debes comprar un hígado de pollo y un camarón. Debes de congelarlos y mantenerlos en hielo hasta que realices tu práctica.

II.- PREPARACIÓN DE HOMOGENADOS Y ENSAYO ENZIMÁTICO

1. Prepara un baño de temperatura a 37 º C.

2. Prepara los siguientes tubos por duplicado. Usa tubos de centrífuga.

REACTIVO	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
Buffer (mL)	0.7	1.0	0.7	1.0
MgSO4 (mL)	0.3	0.3	0.3	0.3
KCl (mL)	0.3	0.3	0.3	0.3
ATP (mL)	0.3	-	0.3	-

3. En la bandeja de plástico coloca suficiente hielo picado para sumergir la solución de HEPES-sacarosa y dos vasos de precipitado en los que se colocará el tejido después de extirpado.

4. Coloca dos tejidos diferentes (hígado de dos animales diferentes) inmediatamente en sus respectivos vasos, los que deben estar dentro del hielo.

5. Pesa y corta cada tejido en pequeños trozos con una navaja, bisturí o tijeras manteniendo el tejido en todo momento en el baño de hielo.

6. Transfiere el tejido finamente picado al tubo del homogenizador con ayuda de la solución de HEPES-sacarosa (fría), usando una proporción de 1 ml por cada 0.2 g de tejido.

7. Homogeniza el tejido dando al tubo movimientos verticales, manteniéndolo dentro del baño de hielo.

8. Una vez preparados los homogenados, agrega, 0.4 ml del primero a los tubos 1 y 2 y 0.4 ml del segundo a los tubos 3 y 4.

9. Agita todos los tubos e incuba durante 30 minutos a 37 ºC en baño de temperatura constante (ver nota 1).

10. Suspende la reacción con 1.0 ml de ácido tricloroacético al 5 %, centrifuga por 10 min a 2300 RPM. Usa 1 ml de sobrenadante para determinar el contenido de Pi de la siguiente manera:

    Coloca en tubos de 18 X 150:

    1.0 ml de sobrenadante
    3.0 ml de agua
    0.5 ml de ácido sulfúrico 10 M
    1.0 ml de reactivo de molibdato de amonio al 2.5 %
    1.0 ml de reactivo reductor

11. Agita, espera 15 min, agrega 3.5 ml de agua y lee absorbancia a 660 nm.

NOTA 1

Mientras ocurre la reacción enzimática, determina el contenido de proteína en cada tejido, según la sección II.

II.- MEDICIÓN DE PROTEÍNA

En tubos de 18 X 150 (duplicado):

1. Coloca 0.2 ml de cada homogenado.

2. Agrega 0.8 ml de agua destilada.

3. Añade 5.0 ml de solución de Biuret. Agita. Deja reposar 30 min y lee a 450 nm.

NOTAS

1. A los tubos 2 y 4 no se les agrega ATP; sin embargo, sí hay producción de fósforo debido al ATP contenido en el tejido (ATP endógeno). Además, el tejido también contiene Pi libre desde antes de la incubación. Por lo tanto, para obtener Pi producido por cada tejido, durante la incubación, hay que restar la lectura del tubo 2 al tubo 1 y la del tubo 4 al tubo 3.

2. Recuerda que el contenido de proteína es la base para expresar la actividad enzimática.

TRATAMIENTO DE DATOS

1. Calcula la concentración de proteína en cada tejido con ayuda de tu curva de calibración del Experimento No. 1.

2. Calcula la actividad de la enzima y exprésala en mg de fósforo producido por minuto por mg de proteína (mg Pi min^{-1} mg^{-1}).

INVESTIGA

1. ¿Qué reacción cataliza la ATPasa?. Escribe la reacción completa indicando sustrato, producto, cofactores o coenzimas.
2. ¿Cuál es el pH y la temperatura óptimos?
3. ¿Cuál es el cambio de energía libre estándar para la hidrólisis de ATP?
4. Determina la constante de equilibrio.