



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

Campus Irapuato-Salamanca

División Ciencias de la Vida

Manual de Prácticas de Bioquímica

Dr. J. Eleazar Barboza-Corona

Dra. Guadalupe Ortiz

Dr. Rubén Salcedo-Hernández

INTRODUCCION

La mayoría de las técnicas experimentales y conocimientos que se han adquirido en otros cursos son muy valiosas en el laboratorio de Bioquímica. En este laboratorio raramente se aíslan productos en gran escala, mas bien, se trabaja con miligramos o con microgramos. Los conocimientos metodológicos para estudiar las biomoléculas avanza a grandes pasos y en la mayoría de las ocasiones se requieren reactivos y equipos costosos, por lo que es mas que imposible abarcar la extensa gama de conocimientos relacionados con protocolo bioquímicos.

El manual de Bioquímica lo hemos preparado con algunas prácticas sencillas, y representativas, que intentan explicar algunas de las propiedades de la biomoléculas y técnicas para estudiarlas. Se espera que el estudiante adquiriera los conocimientos necesarios para entender cursos posteriores que pudiera tomar durante la licenciatura o bien en algún postgrado dentro del área biológica.

Expresamos nuestro más sincero agradecimiento a los alumnos Tania Amaral Naranjo (Ingeniería en Alimentos) y Euleterio Carrillo Serna (Ingeniería Agrícola), quiénes durante su Servicio Social Universitario colaboraron de manera extraordinaria en la preparación del presente manual. Finalmente, un profundo reconocimiento a las sugerencias hechas por los alumnos quienes han tomado el curso de Bioquímica en nuestro Instituto.

INDICE DEL CONTENIDO

	Página
Introducción	2
Prácticas	
1. Guía breve para el trabajo en el laboratorio de Bioquímica y reporte de prácticas	4-5
2. Determinación del pH y preparación de soluciones amortiguadoras	6-9
3. Separación de plásmidos en geles de agarosa	10-11
4. Determinación del tamaño de un fragmento de DNA clonado en un plásmido	12-13
5. Aislamiento de plásmidos de <i>Escherichia coli</i> mediante minipreparaciones	14-15
6. Propiedades iónicas de los aminoácidos	16-18
7. Identificación de aminoácidos y proteína	19-21
8. Cromatografía en capa fina y/o papel	22-24
9. Solubilidad y desnaturalización de proteínas	25-26
10. Determinación aproximada del punto isoelectrico	27-28
11. Métodos espectrofotométricos y determinación de proteínas	29-31
12. Actividad de la amilasa sobre el almidón	32-34
13. Identificación de carbohidratos	35-38

Práctica No.1

Guía breve para el trabajo en el laboratorio de Bioquímica y reporte de prácticas

Seguridad en el laboratorio

Deben tenerse presente las reglas generales de seguridad. Se debe estar conciente que los reactivos utilizados en el laboratorio son potencialmente tóxicos, irritantes o inflamable. Sin embargo estas sustancias son peligrosas solo cuando no se manipulan correctamente.

Limpieza del material de vidrio

Los resultados de los experimentos, dependen en gran parte, de la limpieza del equipo: 1) muchos reactivos se usan en miligramos o microgramos, por lo tanto cualquier contaminación, podría contribuir a un porcentaje significativo de la muestra experimental total del experimento. 2) Muchas sustancias son sensible a uno o más contaminantes, como iones metálicos, detergentes o residuos orgánicos.

La libreta de laboratorio

Es muy importante hacer un diagrama de flujo antes de iniciar la sesión. Los procedimientos, detalles, observaciones y resultados se deben registrar en una libreta de laboratorio mientras el experimento se esta llevando a cabo.

Guía breve para el reporte de práctica

Introducción

Breve resumen de conceptos y/o importancia del tema. La información debe tener relevancia para la práctica y no debe ser una copia de un libro o de internet. Procurar que no exceda de una cuartilla.

Objetivo

Aquí se debe incluir cual es el objetivo de la práctica, porque lo haces, para que?.

Parte experimental

Materiales y métodos

Se describen los reactivos, materiales y equipo que se utilizan, así como la metodología empleada.

Resultados y discusión

Se describen los resultados obtenidos, se indican los cálculos, tablas, gráficas o figuras, así como una explicación con fundamentos científicos del porqué se obtuvieron esos resultados.

Cuestionario

Se deben contestar las preguntas indicadas, las cuales están relacionadas con los fundamentos, la relevancia, la ampliación o aplicación de los resultados o los métodos utilizados.

Bibliografía

Reportar las fuentes utilizadas con el formato estándar: Para libros: Autor(s), año de publicación, título, editorial y páginas consultadas, en el caso de internet señalar la dirección completa. Para el caso de revistas científicas: Autor(es), año, nombre del artículo, nombre de la revista, volumen, número, páginas.

Práctica No. 2

Determinación del pH y preparación de soluciones amortiguadoras

Objetivo: Aprender el uso correcto del pH metro y preparar soluciones con diferentes valores de pH.

Introducción

El pH de una solución acuosa se define como el logaritmo negativo de la concentración molar de hidrogeniones (H_3O^+). La determinación de pH es muy importante, ya que influencia de manera directa en la carga de la molécula y en su actividad biológica. El producto iónico del agua es la base de la escala del pH propuesta por Sørensen ($K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-] = 10^{-14}$ $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$).

La escala de pH permite expresar la concentración de iones hidronio (protón hidratado) comprendida entre 1M y 1×10^{-14} M, extremos que corresponden a pH 0 y 14, la neutralidad es igual a pH 7.0. La manera mas conveniente y exacta de determinar el pH es usando un electrodo de vidrio. Este electrodo depende del intercambio de iones en las capas hidratadas formadas sobre la superficie del electrodo de vidrio. Generalmente se utiliza vidrio compuesto de aproximadamente 22% de Na_2O , 6% de CaO y 72% de SiO_2 . Este vidrio muestra una especificidad hacia los iones hidrógeno hasta un pH de cerca de 9; a valores mayores de pH, la membrana se vuelve sensible a iones sodio y otros iones alcalinos. Esto se evita empleando membranas construidas con vidrio en que el sodio se reemplaza por litio. El electrodo de vidrio debe mantenerse en agua destilada o en solución de KCl saturada para evitar el crecimiento de microorganismos. En el electrodo de vidrio está presente un electrodo de referencia interno de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl) rodeado por un electrolito de HCl 0.1M. Este electrodo de referencia interno produce un potencial estacionario. El electrodo de vidrio actúa como una batería cuyo voltaje depende la actividad del H^+ de la solución en que está sumergida. En el pHmetro, el electrodo de vidrio y el electrodo de referencia de calomel, están diseñados para que a pH 7 dé un potencial cero. Antes de medirse el pH de una solución desconocida el pHmetro se estandariza con soluciones amortiguadoras de pH conocidos. El voltaje depende de la temperatura, por lo que los potenciómetros tienen un control de ajuste para la temperatura de la solución. Los electrodos de vidrio son frágiles y caros, por lo tanto deben manejarse con cuidado. Si se mide el pH de soluciones de proteínas, se puede formar una capa delgada en el electrodo; puede removerse sumergiendo en HCl 0.1N, y después limpiando con detergente diluido y enjuagando con agua. Por otro lado, las soluciones amortiguadoras ("buffers" o soluciones tampón), son aquellas capaces de mantener el pH dentro de un rango de variación mínima. Están formadas generalmente por un ácido débil y su base conjugada cuando se trabaja a pHs por debajo de 7. En el caso de pHs alcalinos se usa una base débil con su ácido conjugado respectivo. La eficiencia de una solución reguladora está regida por dos factores: (a) La concentración total del regulador (suma de las concentraciones del ácido débil y de la sal). Cuanto más concentrado sea un regulador, más tolerante será a la adición de ácidos o bases fuerte. (b) Por la relación existente entre la base conjugada y el ácido. Cuando

esta relación es igual a 1, la solución reguladora tiene su máxima eficiencia. Este valor se alcanza cuando el pH del regulador es igual al pKa de ácido. La E=ecuación de Henderson y Hasselbalch, es muy útil para la preparación de las soluciones amortiguadoras. ($\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{sal}]}{[\text{Ácido}]}$). El pH mas adecuado para que una solución amortiguadora funcione eficientemente, es cuando se encuentra en un rango de pH igual a su $\text{pKa} \pm 1$

Materiales y métodos

Materiales

Potenciómetro, pipetas pasteur, probetas de 200 ml, vaso de precipitados de 250 ml, piseta con agua, agitador magnéticas, espátula. Muestras para determinar pH: leche, jugo, etc.

Reactivos

KCl saturado; Solución estándar pH 4, pH 7 y pH 10; Solución de ácido bórico 0.1 M; Solución de NaOH 10M, HCl concentrado, ácido acético, acetato de sodio, EDTA, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 .

Métodos

Uso del pH metro y medición del pH

El electrodo del pHmetro siempre debe estar sumergido en una solución de KCl o agua destilada. Enjuagar el electrodo con agua destilada y secar (Fig.1A). Ajustar el pHmetro primero a pH 7, después a 4 y finalmente a 10 con soluciones reguladoras comerciales. Entre cada pH enjuagar con agua destilada (Fig.2B). Determinar el pH de varias muestras como leche, jugos, refrescos, etc,

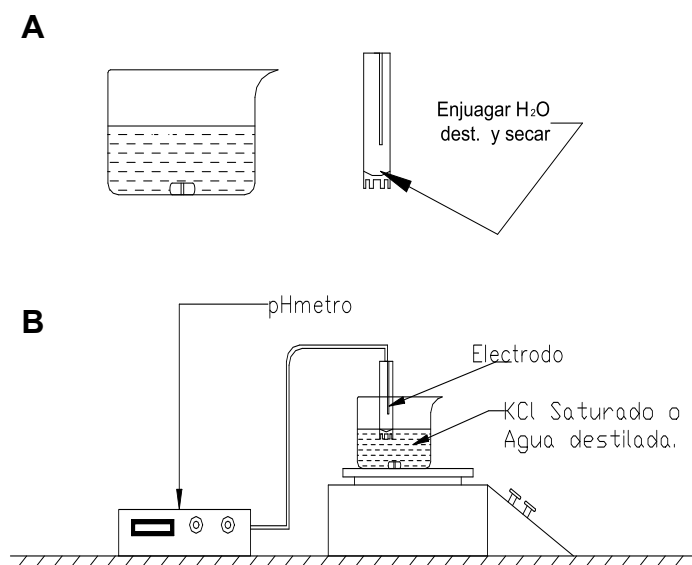


Figura 1. Representación esquemática de un pHmetro.

Preparación de diferentes soluciones

Preparar 200 mL de una solución reguladora de acetato de sodio 50 mM, pH 5.

Para realizar esto, primero debes calcular cuantos gramos de acetato de sodio se necesitan, disolverlos en menos de 200 ml de agua destilada (por ejemplo 170mL) y ajustar el pH a 5 con ácido acético. Usar la formula $M = (m/V) = (m \text{ PM})/V$ (M= molaridad, m=masa en gr, P.M.= peso molecular y V= volumen en litros) para hacerlos cálculos.

Preparar 200 mL de una solución reguladora de fosfatos (de potasio) 100 mM, pH 6.

El H_3PO_4 tiene tres constantes de ionización y por lo tanto tres valores de pKa . Se toman las especies iónicas que tengan un valor de pKa mas cercano a pH 6 ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1} \rightarrow \text{HPO}_4^{-2}$)

Usaremos la siguiente tabla para preparar la solución amortiguadora

Tabla 1. Preparación de solución reguladora de fosfato a pHs entre 5.8 y 6.2

pH	K_2HPO_4 1M (ml)	KH_2PO_4 1M (ml)
5.8	0.85	9.15
6.0	1.32	8.68
6.2	1.92	8.08

Hasta aquí se han preparado 10 ml de una solución 1M, utilizar fórmula $C_1V_1=C_2V_2$ (C=concentración, V=Volumen) para preparar 200mL a 100 mM

Preparar 200 ml de EDTA 0.5 M pH 8

Calcular cuantos gramos de EDTA necesitas, poner en 160 ml, comenzar a disolver con agitador magnetico y tratar de ajustar el pH cercano a 8 (el EDTA comenzará a disolverse) y adicionar poco a poco mas agua. Ajustar a pH 8 y aforar a 200 ml.

Cuestionario

1. ¿Porque el pH del potenciómetro se ajusta primero a pH 7 y no a 4 o 10?
2. ¿Porque el electrodo se tiene que mantener en una solución de KCl saturado? En caso de no contar en el laboratorio con KCl, ¿Que otros compuestos pueden usarse?
3. Si quisieras preparar un buffer de fosfatos de potasio pH 11, que sales seleccionarías?
4. ¿El buffer de acetato de sodio que preparaste está a un pH que se puede considerar adecuado para servir como solución reguladora? .Explica tu respuesta.
5. En la preparación del acetato de sodio, cual es el ácido y cual la base conjugada.

Bibliografía

1. **Wilson**, K., and Walker, J. 2000. Principles and Techniques of practical Biochemistry. Fifth edition. Cambridge University Press.
2. **Robert**, JF., and White B.J. 1990. Biochemical techniques theory and practice. 1st edition. Waveland Press, Inc. USA.
3. **Douglas** A. Skoog and Donald M. West.1971.Principles of Instrumental Analysis. Holt, Rinehart and Winston, Inc.
4. **Rodney** F. Boyer.1986. Modern Experimental Biochemistry. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
5. **Sambrook**, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Práctica No. 3

Separación de plásmidos en geles de agarosa

Objetivo: Separar plásmidos mediante electroforesis en geles de agarosa.

Introducción

La separación de DNA en geles de agarosa representa uno de los “caballitos de batalla” en laboratorios de Biología Molecular o Ingeniería Genética. Cuando la agarosa es fundida y enfriada se forma un gel, la concentración de la agarosa determina el tamaño del poro. La pureza, la degradación del DNA, los fragmentos obtenidos por digestiones con enzimas de restricción, y la búsqueda de ciertas construcciones, entre otros, pueden ser analizados en los geles de agarosa. El DNA se carga de manera negativa con el “buffer” de corrida y se moverá a través del gel bajo la influencia de un campo eléctrico hacia el polo positivo (ánodo). Las moléculas grandes se moverán mas lento que las moléculas pequeñas. Para cargar el DNA en los geles de agarosa se mezcla con una solución conocida como buffer de carga. Este permite incrementar la densidad de la muestra debido a que contiene glicerol, y asegura que el DNA caiga en los pozos. Además de lo anterior, el buffer de carga nos permite darnos una idea a que altura del gel puede encontrarse el DNA problema. El DNA es teñido con bromuro de etidio, el cual permite visualizarlos bajo la luz ultravioleta.

Materiales y métodos

3.3.1 Materiales.

Plásmidos obtenidos mediante una minipreparación, parafilm, horno de microondas, micropipetas, puntas para micropipeta, fuentes de poder, cámaras de electroforesis horizontales, transiluminador de luz ultravioleta (UV). Agarosa de grado molecular.

Métodos

Preparación del buffer de corrida.

Se usará una TAE (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M): Para prepararla, pesar las cantidades requeridas de Tris-base (grado molecular) y EDTA (grado molecular), mezclar a un volumen determinado. Ajustar el pH a 8 con ácido acético y aforar.

Buffer de carga

Este esta formado de azul de bromofenol 0.25%, xilen-cianol 0.25%, glicerol en agua al 30%. Almacenar a 4 °C.

Preparación del gel de agarosa

Preparar un gel de agarosa al 0.8% en solución reguladora de TAE. Para esto, pesar 0.8 gr de agarosa y adicionar 100 ml de TAE. Fundir en horno de microonda, dejar enfriar un poco, adicionar 2.5 µl de bromuro de etidio (stock 10 mg/ml) y mezclar. (IMPORTANTE: Usar guantes ya que el bromuro de etidio es carcinogénico).

Colocar la agarosa en la base de la cámara en la que se ha colocado previamente un peine y ha sido sellada. Después de que el gel se ha gelificado, quitar el peine y colocarlo en la cámara de electroforesis, los pozos deberán estar en el polo negativo.

Separación de los plásmidos

Con una micropipeta de 10 o 20 μ l, en un pedazo de parafilm mezclar la muestra de plásmidos con gotas del buffer de carga. Poner la muestra en los pozos del gel de agarosa (Fig. 2A) y separar las muestras a 100 V, durante un tiempo de 45 minutos a 1 hora (Fig. 2B). Observar el en un transiluminador de luz UV

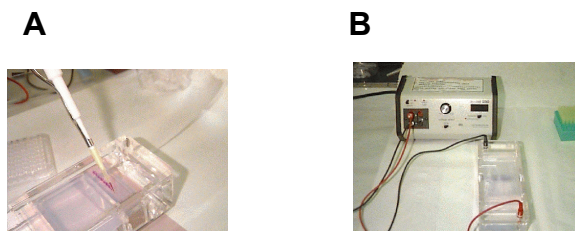


Figura 2. Separación de DNA en geles de agarosa. (A) El DNA mezclado con el buffer de carga es “cargado” en los pozos del gel. (B) La cámara de electroforesis es conectada a una fuente de poder y el DNA es separado.

Cuestionario

1. Cuantas formas del plásmido observaste?. Como se llaman?.
2. Tu muestra de plásmidos está contaminado con RNA?.
3. Que carga le da al DNA el TAE.
4. Con relación al buffer de carga, para que sirve el glicerol?.
5. Quien migra mas rápido y cuantas veces, el azul de bromofenol o el xilen-cianol.
6. Aproximadamente a cuantas Kilobases migra el azul de bromofenol y el xilen-cianol.
7. Como puedes determinar el tamaño de un plásmido?.

Bibliografía

1. **Becker**, J.M., G.A. Caldwell, E.A. Zachgo. 1996. Biotechnology. A laboratory course. Second edition. Academic Press , USA
2. **Sambrook**, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Práctica No. 4

Determinación del tamaño de un fragmento de DNA clonado en un plásmido

Objetivo: Calcular el tamaño de un fragmento de DNA después de su separación en geles de agarosa

Introducción

Es frecuente que Ingeniería genética se clonen fragmentos de DNA de origen procariote o eucariote en plásmidos empleados como vectores. La forma de determinar el tamaño del fragmento clonado es analizando los sitios de corte del vector en los cuales el fragmento fue ligado. Una vez determinado dichos sitios la construcción se somete a un corte con endonucleasas conocidas como enzimas de restricción, por ejemplo *HindIII*, *EcoRI*, *PstI*, *BamHI* y la muestra es separada en geles de agarosa. Para determinar el tamaño del fragmento se compara su migración con un marcador de DNA que tenga tamaños de fragmentos conocidos, los cuales se pueden conseguir en diferentes compañías comerciales. Esto se puede hacer de manera manual o bien mediante programas como el Quantity one (Bio-Rad).

Materiales y métodos

1. Llevar a cabo la siguiente mezcla de reacción. Para esta práctica se emplearan enzimas de la marca Invitrogen.

Muestra de DNA	5 μ l (concentración ~300 ng/ μ l)
Buffer 10X de la enzima	2 μ l
Enzima de restricción	1 μ l
Agua destilada esteril	12 μ l

Incubar por 2 h a la temperatura óptima de actividad enzimática. La mayoría de las enzimas trabajan a 37 °C.

2. Mezclar 10 μ l con buffer de muestras (ver práctica anterior) y separar en un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE. Usar un marcador de tamaños conocidos. En esta práctica emplearemos la escalera de 1 Kb (Invitrogen).

Comparison between 1 Kb Plus DNA Ladder
and 1 Kb DNA Ladder. 0.9% agarose gel
stained with ethidium bromide

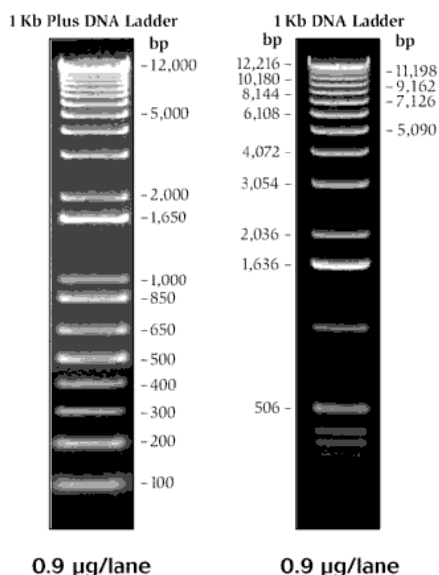


Figure 1. Comparación entre la escalera de 1 Kb plus y de 1 Kb (Invitrogen).

Cuestionario.

1. Como se llaman las secuencias que reconocen las enzimas de restricción.
2. Da 10 ejemplos de enzimas de restricción.
3. Que son los isosquizómeros.
4. Como puedes determinar el tamaño de un cromosoma.

Bibliografía

1. **Becker**, J.M., G.A. Caldwell, E.A. Zachgo. 1996. Biotechnology. A laboratory course. Second edition. Academic Press , USA
2. **Sambrook**, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Práctica No. 5

Aislamiento de plásmidos de *Escherichia coli* mediante minipreparaciones

Objetivo: Aislar plásmidos de *Escherichia coli* mediante minipreparaciones.

Introducción

Un plásmido es un DNA extracromosómico, cerrado y de doble cadena que contienen la información genética para codificar varias proteínas que pueden ser factores de resistencia a antibióticos, ayudar a la fijación de nitrógeno y formación de tumores en plantas; entre otros. Sin embargo, para propósitos prácticos, se han desarrollado mediante Ingeniería Genética varios plásmidos que pueden ser usados como vectores de clonación. Las minipreparaciones son un método rápido para aislar pequeñas cantidades de plásmidos, aproximadamente 1 µg de DNA por ml de cultivo bacteriano. Las minipreparaciones son menos laboriosas y mas rápidas que las maxipreparaciones que se utilizan para aislar miligramos de DNA plasmídico. Las minipreparaciones permiten un rápido escrutinio de las bacterias transformadas y su análisis con enzimas de restricción (endonucleasas que cortan DNA).

Materiales y métodos

Materiales

Cultivo de *Escherichia coli* (de toda la noche) que contenga un plásmido [por ejemplo el pBluescript KS(+)], hielo, tubos eppendorf, micropipetas de diferentes volúmenes; puntas para micropipetas, microcentrífuga, vortex, termoblock.

Métodos

Preparación del TENS

Dependiendo de cuantas minipreparaciones se requieran, preparar un volumen adecuado de TENS de acuerdo a los datos presentados en la tabla 2.

Tabla 2. Cantidades requeridas para preparar diferentes volúmenes de TENS

Reactivos	1 ml	5 ml
Tris-HCl 1M, pH 7-8	10 µl	50
EDTA 0.5 M	2 µl	10
NaOH 10 N	10 µl	50
SDS 10%	50 µl	250
Agua desionizada o destilada estéril	928 µl	4640

Extracción de plásmidos

Centrifugar 1.5 ml de cultivo de toda la noche en la microcentrífuga por 1 min. Decantar casi todo el sobrenadante, de manera que quede de 50 a 100 µl y ahí resuspender la pastilla por agitación en vortex. Agregar 300 µl de TENS y agitar en vortex (solamente 2 o tres pulsos) hasta que la muestra se ponga viscosa (lo cual

ocurre casi inmediatamente). Colocar inmediatamente en hielo para evitar la degradación de DNA cromosomal el cual podría coprecipitar. Agregar 50 μ l de acetato de sodio 3 M, pH 4.8 y mezclar manualmente. Centrifugar en la microcentrífuga por 3 a 6 min para precipitar los restos de células DNA cromosomal. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo, agregar 2 volúmenes de etanol absoluto o 1 volumen de isopropanol frío, y mezclar. Incubar de 5 a 10 min en hielo o a 4 °C (refrigerador). (Si se incubaba a temperaturas mas bajas el acetato de sodio se puede cristalizar y precipitar junto con el DNA). Centrifugar en microcentrífuga por 5 minutos para compactar los plásmidos y el RNA. Decantar el sobrenadante y lavar la pastilla dos veces con etanol al 70% frío. Secar la pastilla a temperatura ambiente o en termoblock a 37 °C. Resuspender la pastilla en un volumen de 60 a 80 μ l de agua desionizada o destilada estéril.

Cuestionario

1. Cuales son los elementos que debe contener un plásmido para ser considerado un vector de clonación.
2. Que función tienen los siguientes reactivos en la extracción de plásmidos: Tris-HCl, EDTA, NaOH, SDS, Acetato de sodio, etanol absoluto, etanol al 70%.
3. ¿Como quitaría el RNA a una muestra de plásmidos contaminados con esa biomolécula?
4. Para que se usa la lizosima.
5. Porqué es importante que las muestras sean manipuladas en frío (hielo).
6. Que son los mini-, maxi-, mega- y giga-preparaciones.

Bibliografía

1. **Becker**, J.M., G.A. Caldwell, E.A. Zachgo. 1996. Biotechnology. A laboratory course. Second edition. Academic Press , USA. pp: 31-36.
2. **QUIAGEN** Plasmid purification Handbook. 2000.
3. **Zhuo**, Ch., Y. Yang and A.Y. Jong. 1990. Mini-prep in ten minutes. BioTechniques, 8(2): 172-173.

Práctica No. 6

Propiedades iónicas de los aminoácidos

Objetivo: Demostrar las propiedades ácido-base de los aminoácidos.

Introducción

Todos los aminoácidos son anfóteros los cuales contienen al menos un grupo funcional ácido (carboxilo) y uno básico (α -amino). Algunos aminoácidos contienen otros grupos que se ionizan fácilmente: grupos amino, carboxilo, p-hidroxifenilo, sulfhidrilo, guanidino e imidazol. El carácter iónico de los polipéptidos y las proteínas es en gran parte debido a estos grupos adicionales ionizables debido a que los grupo α -amino y carboxilo de los aminoácidos participan en los enlaces peptídicos. En esta práctica se estudia la reacción de aminoácidos cuando se adiciona un ácido o una base y se observa el cambio de pH. Además, después de cada adición de ácido o base durante una titulación, los resultados se pueden predecir por el uso de la ecuación general de Henderson-Hasselbalch.

Materiales y métodos

Materiales

Muestras de aminoácidos en polvo, NaOH 1N, HCl 1N, amortiguadores estándar. Balanza analítica, pH metro, barra y agitador magnético, bureta, pinzas para bureta, soporte, espátula, 8 vasos de precipitados de 100 ml, embudo.

Métodos

Titulación del aminoácidos desconocidos

Pesar cerca de 400 mg de muestra y disolverla en 20 ml de H₂O en un vaso de precipitado. Introducir una barra magnética y colocarlo en una placa de agitación, así como el electrodo para medir pH. Titular la muestra disuelta desconocida con HCl 1N, registrando las lecturas de la bureta y el pH a intervalos frecuentes hasta que la solución alcance un pH de 1.0. *Observe y registre la solubilidad de la muestra durante la titulación.* Titular otros 20 ml de agua (blanco) con HCl 1N, gota a gota en las primeras 10 gotas y de dos en dos gotas las siguientes 10 gotas. Finalmente de cuatro en cuatro gotas hasta que la solución alcance pH de 1.0 Registrar el pH y el volumen del ácido después de cada adición. Disolver otra muestra (otra vez aproximadamente 400 mg en 20 ml de agua) y titular la muestra con NaOH 1N de la misma manera que para la titulación con ácido hasta que el pH de la solución llegue a 12. *Observe y registre la solubilidad de la muestra durante la titulación.* También titular a 20 ml de agua (blanco) con NaOH 1N hasta pH 12.0 de manera similar que el primer blanco.

Reporte

1.- Hacer una tabla de resultados para cada titulación:

Muestra con NaOH, Agua con NaOH, Muestra con HCl, Agua con HCl.

2.- Dibujar la curva de titulación verdadera siguiendo el siguiente procedimiento:

Para determinar la curva de titulación verdadera de cualquier sustancia, se debe medir cuánto ácido o base se consume al titular el solvente (agua) en cada pH y entonces restar esta cantidad de la cantidad total de ácido o base consumida para alcanzar ese pH:

Titulación del lado ácido. Construcción de la gráfica

El siguiente ejemplo con el lado ácido de la titulación de un aminoácido ilustra uno de varios de los métodos disponibles para corregir por dilución.

Para la muestra y el blanco de agua, graficar el volumen del ácido adicionado contra el pH alcanzado (Fig. 1). De la gráfica o de los datos originales, preparar una tabla como la Tabla 1. Restar el volumen del ácido requerido para llevar el blanco de agua a cualquier pH del volumen del ácido requerido para llevar la muestra al mismo pH. La diferencia representa la cantidad de ácido consumida en la titulación de la muestra solamente. Usando los datos de su tabla, graficar el pH contra el número de equivalentes de ácido necesario para titular la muestra del aminoácido a cualquier pH (ver Fig. 2).

Titulación del lado básico.

Para corregir por dilución el lado básico de la curva se puede aplicar un método similar.

Preparar una curva de titulación completa y corregida para el aminoácido titulado.

Figura 1

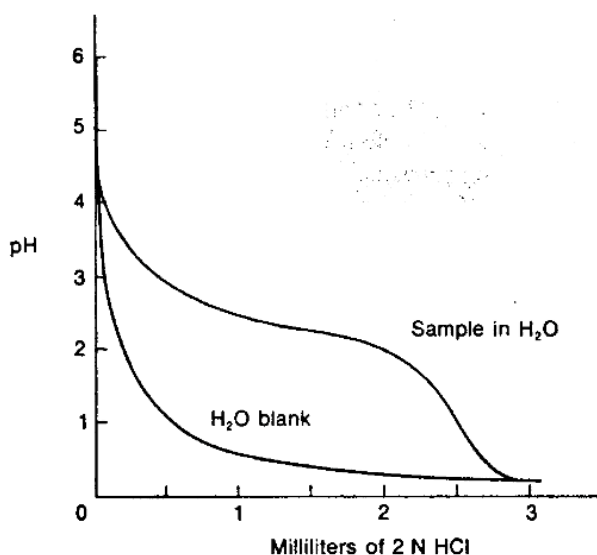


Figura 2

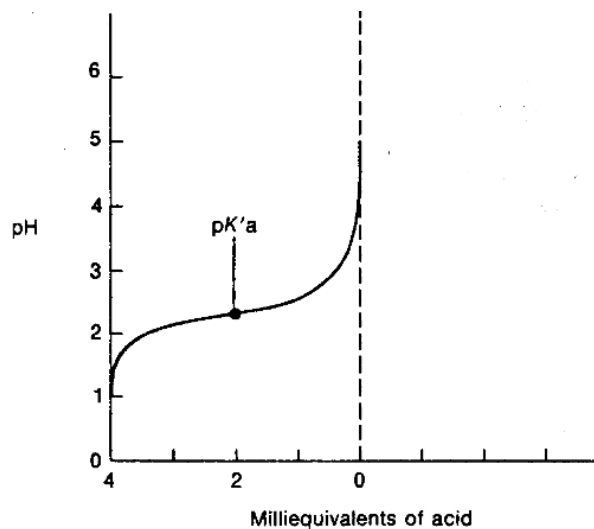


Tabla 1. Ácido requerido para titular la muestra y el blanco*

pH	Volumen (ml) de ácido (2 N HCl)		
	Muestra + agua	agua	Diferencia
3.5	0.103	0.003	0.100
3.0	0.335	0.020	0.315
2.5	0.667	0.032	0.635
2.2	1.063	0.063	1.000
2.0	1.425	0.200	1.225

*Clarck, J.M. Jr. y Switzer R. L. Experimental Biochemistry. WH: Freeman and Company N.Y. 1977.

El número de equivalentes de ácido o base consumidos al pasar a través de la inflexión de una curva, como en la Fig. 2, representa la cantidad de ácido requerida para titular un grupo ionizable en la cantidad del aminoácido que se ha ensayado. El punto final de la titulación se debe reconocer como el punto en que se eleva (o cae) drásticamente el pH con la adición del titulante. Este punto generalmente se determina con más precisión de la curva de titulación del aminoácido con la base.

Cuestionario

1. Usando la ecuación de Henderson –Hasselbalch, calcular el pKa de cada grupo ionizable titulado.
2. ¿Coincide con el pKa reportado en los libros?
3. ¿Como se podría confirmar la identidad del aminoácido?
4. Dibujar la curva que se esperaría en la titulación del ácido aspártico y la que se esperaría en la titulación de la lisina, señalando las especies predominantes en cada región.

5.5 Bibliografía

1. Clark, J.M and R. L. Switzer. 1977. Experimental Biochemistry. W.H. Freeman and Company

Práctica No. 7

Identificación de aminoácidos y proteínas

Objetivo: Identificar diferentes aminoácidos y proteínas.

Introducción

Los aminoácidos tienen tres tipos de reacciones químicas importantes: (1) reacciones debido a la presencia del grupo carboxilo (COO^-), (2) reacciones debidas al grupo amino (NH_2), y (3) reacciones debido al grupo R. Las reacciones debidas al grupo carboxilo y al grupo amino son generales y se dan para todos los aminoácidos. Las reacciones del radical R son reacciones específicas; por ejemplo, cisteína da una reacción para azufre, triptofano da ciertas reacciones de color debido a que su molécula contiene el grupo indol, tirosina da otras reacciones de color debido a su grupo fenólico, etc. Ya que la mayoría de las proteínas contienen uno o más de estos aminoácidos en sus moléculas, algunas de las reacciones de color que son específicas para aminoácidos individuales se usan como reacciones de color generales para proteínas. Sin embargo, también se debe tener cuidado porque pueden existir compuestos que contengan ciertos grupos químicos y pueden dar falsos negativos. Por ejemplo, en la prueba de Hopkins-Cole, el color es debido a la presencia del grupo triptofano, aunque el triptofano puro no da la prueba excepto en presencia de trazas de iones férricos o cúpricos. Los nitratos, cloratos, nitritos o el exceso de cloruro impiden la reacción, y trazas de sulfato de cobre aumentan su sensibilidad. La gelatina no responde a esta prueba. Otra prueba es la reacción de Millon, la cual es debida a la presencia del grupo hidroxifenilo, ($-\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$) en la molécula de proteína. Cualquier compuesto fenólico no sustituido en posición 3,5 como la tirosina, el fenol y el timol dan la reacción. En el caso de las sales de metales pesados, su adición a soluciones de proteínas débilmente alcalinas, produce la precipitación de la proteína, debido a que las proteínas en forma aniónica se neutralizan por los iones de los metales pesados y precipitan. Un exceso de álcali ocasiona la precipitación y un exceso de reactivo puede solubilizar el precipitado, por lo que se debe efectuar cuidadosamente el ensayo.

Por otro lado, las proteínas se caracterizan por el hecho de que contienen nitrógeno, además de carbono, hidrógeno y oxígeno. Una prueba negativa para nitrógeno definitivamente elimina la posibilidad de una proteína. También se caracterizan por la naturaleza coloidal de sus soluciones y por una serie de reacciones de precipitación y de color. Aunque todas las proteínas están compuestas de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos, no todas las proteínas contienen los mismos aminoácidos y por esta razón las diferentes pruebas de color producen reacciones que varían en la intensidad del color de acuerdo a la naturaleza y cantidad de los grupos contenidos en la proteína particular.

Materiales y métodos

Materiales

Ácido nítrico concentrado, hidróxido de sodio 10M, ácido sulfúrico concentrado, cloruro mercuríco 0.2 M (HgCl_2), acetato de plomo 0.2 M ($\text{PbC}_2\text{H}_3\text{O}_2$), ninhidrina al 0.1%, sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), tartrato doble de sodio y potasio ($\text{NaK C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), Hidróxido de sodio 10%, polvo de magnesio, ácido oxálico, ácido acético glacial.

Muestras: solución de aminoácidos y de proteínas. 30 tubos de ensaye de 18 X 150, 6 pipetas de 5 ml, 2 pipetas de 10 ml, 1 mechero, 1 gradilla, 1 pinzas para tubo de ensaye

Preparación de los reactivos

Reactivo de Hopkins-Cole: Colocar 10 g de polvo de magnesio en un matraz erlenmeyer de 1 litro y añadir agua destilada hasta que cubra completamente el magnesio. Agregar lentamente 250 ml de una solución saturada en frío de ácido oxálico, agitar bien enfriando si es necesario. Filtrar y acidificar con ácido acético glacial, diluyendo a 1 litro con agua destilada.

Reactivo de Millón: Disolver 10 g de mercurio en 20 ml de ácido nítrico frío. Cuando la disolución se completa y haya cesado el desprendimiento de humos pardos, adicione 60 ml de agua. Después de varias horas, decantar el líquido sobrenadante y guardar en un frasco oscuro. Preparación alternativa: Prepare una solución v/v de sulfato mercuríco al 15% en ácido sulfúrico al 15%.

Reactivo de Biuret: Disolver 1.5 g de sulfato de cobre y 6 g de tartrato de sodio y potasio en 500 ml de agua en un matraz volumétrico de 1 lt. Adicionar 300 ml de hidróxido de sodio al 10% y aforar a 1l con agua destilada.

Ninhidrina: Disolver 0.1 g de ninhidrina en 100 ml de n-butanol

Métodos

Reacción de ácido glioxílico (Reacción de Hopkins-Cole). Coloque 2 o 3 ml de muestra en un tubo de ensaye y adicione igual volumen de solución de ácido glioxílico, $\text{CHO COOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (reactivo de Hopkins-Cole) y mezclar. Inclinar el tubo y permitir que 5 –6 ml de ácido sulfúrico concentrado resbale lentamente por las paredes del tubo, llegando al fondo y estratificando. Observe el color producido en la zona de contacto entre los dos líquidos. Si el color no aparece después de unos minutos, el tubo puede girarse suavemente para producir un mezclado suave de los líquidos en la interfase.

Prueba de Millón: A 2 ml de la muestra añada 5 gotas de reactivo de Millón, mezcle bien y caliente cuidadosamente durante 30 segundos sobre una pequeña flama. El reactivo produce un precipitado blanco que por la acción del calor se torna un color rosado o rojo ladrillo. Un exceso de reactivo produce un color amarillo que no es una prueba positiva.

Prueba Xantoproteica: Agregue cuidadosamente 1 ml de ácido nítrico concentrado, a 3 ml de cada una de las muestras. Mezcle bien y caliente ligeramente a la llama del mechero, observando el color desarrollado. Enfríe la solución al chorro del agua y cuidadosamente añada gota a gota y con agitación NaOH 10M o NH₄OH conc. hasta que el líquido sea fuertemente alcalino. Observe el color.

Reacción de Biuret: Añada 1 ml del reactivo de Biuret a 5 ml de las muestras y mezcle bien. Anote los colores desarrollados por cada una de las disoluciones.

Reacción de la ninhidrina (*reacción con hidrato de tricetohidrindeno*): En una serie de tubos de ensaye, coloque 3 ml de las muestras y adicione 0.5 ml de la solución de ninhidrina al 0.1%. Mezcle bien y caliente a ebullición directamente a la llama del mechero. Dejar enfriar. Si la prueba es positiva se desarrolla un color azul.

La muestra debe tener un pH entre 5 y 7. Se puede usar unas gotas de pridina o de cristales de acetato de sodio para ajustar el pH.

Precipitación con sales metálicas. (a) Tomar 3 ml de la muestra y alcalinizar ligeramente con NaOH diluido, enseguida agregar 5 gotas de cloruro mercúrico y observar. (b) Tomar 3 ml de la muestra y alcalinizar ligeramente con NaOH diluido, enseguida agregar 5 gotas de acetato de plomo 0.2 M y observar.

Cuestionario

1. Dibujar la estructura de los aminoácidos tirosina, triptofano, fenilalanina, y de los aminoácidos ensayados.
2. Da un ejemplo (usando fórmulas químicas) de la reacción que se lleva a cabo entre uno de los aminoácidos (cualquiera) que usaste y los reactivos que usaste para identificarlos (Prueba de Millón, Reacción de la ninhidrina etc.).
3. Si tienes tres muestras biológicas no etiquetadas, en la cual una de ellas es un carbohidrato, otra un lípido y otra una proteína; cual prueba usarías para identificar rápidamente cual es la proteína?

Bibliografía

1. **Wilson**, K., and Walker, J. 2000. Principles and Techniques of practical Biochemistry. Fifth edition. Cambridge University Press.
2. **Robert**, JF., and White B.J. 1990. Biochemical techniques theory and practice. 1st edition. Waveland Press, Inc. USA.

Práctica No. 8

Cromatografía en capa fina y/o papel

Objetivo. Separar e identificar los aminoácidos presentes en una muestra problema mediante el uso de la cromatografía en placa fina y/o papel.

Introducción

La cromatografía incluye una variedad de métodos que separan solutos por una migración diferencial. La separación diferencial se logra mediante la distribución de los componentes de una mezcla entre una fase fija y otra que se desplaza, llamadas, respectivamente, fase estacionaria y fase móvil. La separación entre dos sustancias empieza cuando una es retenida mas fuertemente por la fase estacionaria que la otra, que tiende a desplazarse mas rápidamente en la fase móvil. En la cromatografía en capa fina la fase estacionario es un sólido como el gel de sílice y la fase móvil un líquido. La separación tiene lugar cuando uno de los componentes de una mezcla se **adsorbe** mas que otro por el sólido. La CCF se basa en la preparación de una capa, uniforme de un adsorbente mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte. El tiempo de separación es menor que en papel y en columna. En este método la fase móvil no es adsorbida (o solo débilmente) por la fase estacionaria y los componentes de la mezcla se separan en zonas. En la cromatografía en papel la fase estacionaria es el agua retenida por el papel que está combinada con los grupos hidroxilo de las moléculas de glucosa de la celulosa. El papel de cromatografía contiene alrededor de 5% de agua, al aire “seco”. En contacto con vapor de agua puede llegar al 20%, de los cuales alrededor del 7% es retenido por fuerzas de vander Waals y el resto como agua superficial. Por esta razón se debe considerar que la fase estacionaria es una solución concentrada de polisacárido. De esta manera un solvente miscible con agua puede ser inmisible con la solución acuosa concentrada del polisacárido que representa el agua en el papel y por lo tanto la cromatografía se lleva a cabo como si se tratara de disolvente no miscibles.

En este método la fase móvil es una mezcla líquida y la separación ocurre cuando un componente es retenido mas fuertemente por la fase estacionaria, es decir se reparte entre el disolvente y la fase estacionaria. En esta cromatografía de reparto sobre papel, tiene lugar algo de cromatografía de intercambio iónico, que puede deberse a la celulosa oxidada y a posibles impurezas del papel.

Por otro lado, algunos conceptos importantes son los siguientes.

Desarrollo, es el proceso que permite al disolvente moverse a lo largo del papel filtro o de la capa fina. R_F , es la relación entre el desplazamiento de la sustancia y el alcanzado por el frente del disolvente, ambos medidos desde el punto de aplicación de la muestra. A menudo después del desarrollo, las manchas son elípticas en vez de circulares y la medida se toma desde el centro de la elipse.

Resolución, es el grado de separación de los compuestos después del desarrollo. La **carga** es la cantidad aplicada como mancha o banda sobre el papel o capa fina.

Materiales y métodos

Materiales

Estufa, bomba de vacío, aspersor, placas de sílica gel y/o tiras de papel para cromatografía, secador para pelo, micropipetas, cuba para cromatografía, regla, lápiz, vaso de precipitados, Ninhidrina, Butanol, ácido acético glacial, aminoácidos tipo.

Métodos

Preparación del disolvente

Mezclar butanol, ácido acético glacial y agua en la siguiente proporción: 60: 15: 25, por volumen.

Preparación del revelador

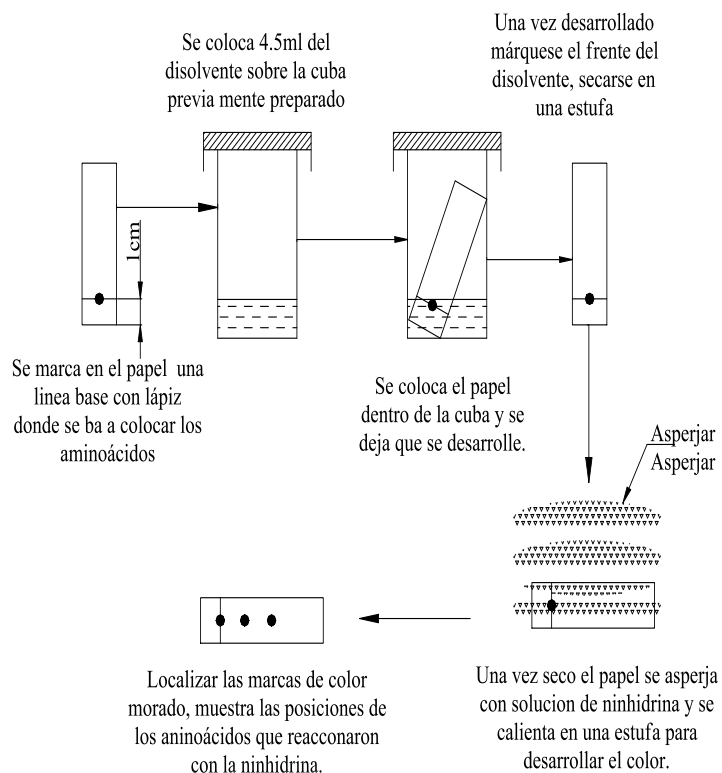
Solución de ninhidrina: disolver 200 mg de ninhidrina en 100 ml de acetona. Se conserva en el refrigerador.

Solubilización de los aminoácidos

Se solubilizan en agua. Algunos aminoácidos será necesario solubilizarlos en soluciones reguladoras que estén a pH alejados del pKa del aminoácido y evitar de esta forma su precipitación.

Preparación del soporte (Papel o sílica gel)

Se marca en el papel o en la placa, la línea base con lápiz y se marcan los puntos donde vaya a colocarse los aminoácidos tipo y la muestra problema, identificándolos con una marca. Se coloca en cada una de las marcas 10 μ l de aminoácido respectivo y 10 μ l de la muestra problema, se seca con una secadora de pelo y se colocan nuevamente 10 μ l de los aminoácidos y de la muestra y se secan. Previo a esta preparación, se colocan 30 ml del disolvente sobre la cuba de cromatografía y se deja que se sature ésta con el disolvente. Una vez saturada se coloca la placa o el papel dentro de la cuba y se deja que se desarrolle el cromatograma (Importante: Dejar el que el solvente suba por capilaridad). Una vez desarrollado márchese el frente del disolvente con lápiz. Séquese en una estufa sin sobrecalentar. Una vez seco el papel o la placa se asperja con solución de ninhidrina y se calienta en una estufa para desarrollar color. Localícense las manchas de color morado, estas representan las posiciones de los aminoácidos que reaccionaron con la ninhidrina.



Informe

- Medir la distancia desde la línea base al centro de las manchas.
- Medir la distancia de la línea base al frente del disolvente
- Calcular los R_f de los aminoácidos tipo y de la muestra problema
- ¿Corresponden los R_f de su muestra con los aminoácidos tipo? Compare con lo obtenidos por sus compañeros.
- Dibujar un esquema del cromatograma obtenido, indicando los nombres de los aa localizados

Cuestionario

- Que tipo de separación se biológica recibió el primer nombre de cromatografía.
- Que otros tipos de cromatografía existen.
- Porque los aminoácidos usados en la práctica muestran diferentes R_f s

Bibliografía

- Wilson**, K., and Walker, J. 2000. Principles and Techniques of practical Biochemistry. Fifth edition. Cambridge University Press.
- Robert**, JF., and White B.J. 1990. Biochemical techniques theory and practice. 1st edition. Waveland Press, Inc. USA.

Práctica No. 9

Solubilidad y desnaturalización de proteínas

Objetivo: Observar la solubilidad y desnaturalización de las proteínas con varios agentes físicos y químicos.

Introducción

La Solubilidad de la mayoría de las proteínas disminuye frente a elevadas concentraciones de sales. Este efecto, llamado desalado ("salting out"), resulta muy útil aunque no este totalmente comprendido. La dependencia de la solubilidad respecto a la concentración salina difiere de una proteínas. Por ejemplo, a una concentración de sulfato 0.8 M, el fibrinógeno precipita, mientras que se requiere una concentración 2.4 M para precipitar la albúmina sérica. El precipitado por salado también resulta útil para concentrar disoluciones diluidas de proteínas.

Por otro lado, la desnaturalización es la pérdida de la estructura de una proteína, con o sin pérdida de la actividad biológica, dependiendo a que nivel de estructura fue la desnaturalización. Para desnaturalizar una proteína existen varios métodos, tanto físicos como químicos. En los primeros encontramos el calor, el pH, bajas temperaturas. En los segundos podemos mencionar a los ácidos fuertes, urea, detergentes como el SDS (dodecil sulfato de sodio), β -mercaptoetanol, ditioneitol, etc.

Materiales y métodos

Materiales

Nueve tubos de ensaye, mechero, pinzas para tubo de ensaye, vaso de precipitados, rejilla de asbesto, H_2SO_4 , HNO_3 , NaOH, Cloruro de Mercurio, Nitrato de Plata, Ácido Pícrico, Ácido Tricloroacético.

Métodos

Desnaturalización de albumina con ácidos y bases fuertes

Prepara 3 ml de H_2SO_4 con un 1ml de Albúmina, igualmente hacerlo con los reactivos HNO_3 y el NaOH. (Ácidos fuertes y alcalinos). Agitar los tubos y observar si se presenta solubilidad.

Desnaturalización de albumina con metales pesados

Preparar 1ml de Cloruro de Mercurio con 2 ml de Albúmina, e igualmente hacerlo con Nitrato de Plata. Agitar los tubos de Ensaye con los reactivos y ver si se solubilizan.

Desnaturalización de albumina con Ácido Pícrico y Tricloroacético

En tubos de Ensaye agregar 1 ml de ácido Pícrico con 2 ml de Albúmina. Hacer lo mismo con el Ácido Tricloroacético. Calentarlos a baño maría por 5 min y después dejarlos enfriar por 5 min más y hacer observaciones de cada tubo. Hacer observaciones.

Adición de limón y ácido clorhídrico a la leche.

Coloca en dos vasos de precipitado un poco de leche. A uno adicionales unas gotas de limón y al otro unas cuantas gotas de HCl concentrado. Anota tus observaciones.

Cuestionario

1. Menciona tres métodos para precipitar proteínas.
2. Cuando una proteína se desnaturalizada, puede seguir actividad biológica?.
3. Porque se forman grumos en la leche cuando adicionas el limón o el HCl?.

Bibliografía

1. **Wilson**, K., and Walker, J. 2000. Principles and Techniques of practical Biochemistry. Fifth edition. Cambridge University Press.
2. **Robert**, JF., and White B.J. 1990. Biochemical techniques theory and practice. 1st edition. Waveland Press, Inc. USA

Práctica No. 10

Determinación aproximada del punto isoeléctrico de una proteína

Objetivo: Determinar alrededor de que pH se encuentra el punto isoeléctrico de la caseína.

Introducción

Las proteínas juegan un papel importante crucial en casi todos los procesos biológicos, tales como catálisis, y transporte, movimiento coordinado, excitabilidad y control de crecimiento y diferenciación, entre otros. La caracterización de las proteínas es importante debido a que el conocimiento de sus propiedades permite, entre otras cosas, poder manipularlas y darles un uso práctico. Existen varias técnicas para caracterizar las proteínas en base a su peso, carga, interacción con otros compuesto. Por ejemplo, el isoelectroenfoque (determinación del punto isoeléctrico) y la cromatografía por intercambio iónico, parte de su principio está basado en la carga de las proteínas. La carga de las proteínas puede ser manipulada por cambios de pH.

El punto isoeléctrico (pI) es el pH en que la carga neta total de una molécula es igual a cero y no migra en un campo eléctrico. Un fenómeno físico importante es que cuando una molécula está en su punto isoeléctrico tiende a precipitarse, el cual representa un principio importante de separación de proteínas. Si se quiere determinar con exactitud el pI de una proteína se usa frecuentemente isoelectroenfoque, en el cual se usa un gradiente de pH creado por anfólinas. Sin embargo, esta técnica resulta costosa y es casi de uso exclusivo para los laboratorios de investigación. Por otro lado, si se conoce la secuencia de una proteína existen programas que permiten conocer el punto isoeléctrico, tales como el EditSeq de DNA star.

Ya que una proteína precipita en su punto isoeléctrico, en esta práctica determinaremos el punto isoeléctrico aproximado de la caseína (proteína mayoritaria en la leche) al colocarlos en soluciones con diferentes valores de pH.

Materiales y métodos

Materiales

Nueve tubos de ensaye, cinco pipetas, una propipeta, pHmetro., ácido acético 0.01N, ácido acético 0.1N, ácido acético 1N, caseína en acetato de sodio 0.1N, leche, limón, ácido clorhídrico.

Métodos

Usar como base la tabla que se muestra en la parte de abajo. Rotular los tubos de ensaye para poder identificar cada una de las soluciones a observar. Agregar agua a cada tubo basándonos en la tabla. Agregar Ac. Acético 0.01N a los tubos 1 y 2. Agrega Ac. Acético 0.1N a los tubos 3 a 8. Al tubo 9 agregar solamente Ac. Acético 1N. A cada uno de los tubos agregar Caseína en acetato de sodio 0.1N. Mezclar cada uno de los tubos agitado suavemente. Anotar las observaciones que se presenta después de mezclar las soluciones. Utilizando el

pHmetro obtener cada uno de los pH de cada solución. Después de tener las observaciones y obtener el pH de cada uno de los tubos determinar el punto isoeléctrico aproximado de la caseína.

Tubo	H ₂ O	Ac. Acético 0.01N (ml)	Ac. Acético 0.1N (ml)	Ac. Acético 1N (ml)	Caseína en acetato de sodio 1N (ml)	pH	Observaciones
1	8.38	0.62			1.0		
2	7.75	1.25			1.0		
3	8.75		0.25		1.0		
4	8.5		0.5		1.0		
5	8.0		1.0		1.0		
6	7.0		2.0		1.0		
7	5.0		4.0		1.0		
8	1.0		8.0		1.0		
9	7.4			1.6	1.0		

Cuestionario

1. Cual es el punto isoeléctrico de la caseína reportado en la literatura?
2. Porque la caseína se precipitó en mas de un tubo?.
3. Que es la proteonómica.
4. Cual es la metodología que sirve como “caballito de batalla” para estudios proteonómicos?.

Bibliografía

1. **Wilson**, K., and Walker, J. 2000. Principles and Techniques of practical Biochemistry. Fifth edition. Cambridge University Press.
2. **Robert**, JF., and White B.J. 1990. Biochemical techniques theory and practice. 1st edition. Waveland Press, Inc. USA

Práctica No. 11

Métodos espectrofotométricos y determinación de proteínas

Objetivo: Aprender el correcto uso del espectrofotómetro para medir la absorbancia de soluciones y cuantificar una proteína.

Introducción

La mayoría de los solutos absorben luz, y entre mas concentrado es el soluto, mas es la luz que se absorbe. Las soluciones coloreadas absorben una parte de la luz blanca complementaria del color que presentan. Por ejemplo una solución de color verde transmite las radiaciones verdes (550 nm) y absorbe las demás, ej. azules (420nm), rojas (640 nm), etc. . Un espectrofotómetro mide cuanta luz absorbe una solución, y se puede usar para medir la concentración de los solutos. El fenómeno es de naturaleza exponencial y depende de la concentración del material absorbente de la luz, del espesor de la capa de solución interpuesta en el trayecto del haz luminoso y de la longitud de onda de la luz empleada en el experimento. Generalmente la longitud de onda de la luz y el espesor de la capa que atraviesa, se mantienen constantes y la intensidad de luz transmitida (I), se compara con la que transmite el solvente puro (I_0), midiéndola en función de la fuerza electromotriz desarrollada que es proporcional a la intensidad de luz que llega a una celda fotoeléctrica.

De acuerdo con la ley de Lambert-Beer, la relación entre la concentración de una solución coloreada y la luz transmitida por la solución se expresa:

$$I = I_0 \cdot 10^{-Ecl} \quad \text{Transmitancia: } T = I/I_0$$

$$I/I_0 = T = 10^{-Ecl}$$

en donde:

- I = intensidad de la luz transmitida por la solución coloreada
- I_0 = intensidad de la luz transmitida por el solvente puro (blancos de reactivos)
- c = concentración de la sustancia colorada en la solución problema
- l = espesor (longitud) de la capa de solución que atraviesa el haz de luz
- E = coeficiente de extinción o de absorbencia

La **Absorbencia : A**, es linealmente proporcional a la concentración:

$$T = 10^{-Ecl}$$

$$-\log T = Ecl = A$$

Las partes esenciales de un espectrofotómetro son: **Fuente de luz:** emite luz blanca (mezcla de todas las longitudes de onda). **Monocromador:** aísla la luz de una longitud de onda. **Tubo para muestra:** Se selecciona la longitud de onda de la luz que la muestra absorba. **Fototubo de medida:** convierte la energía de la luz que llega a él, en corriente eléctrica. **Detector:** registra la fuerza de la corriente eléctrica producida por el fototubo de medida y por lo tanto la cantidad de luz transmitida por la muestra.

Un espectrofotómetro se puede usar para construir un espectro de absorción de una solución. Un espectro de absorción es una gráfica de absorbencia a varias longitudes de onda. Los compuestos tienen diferentes espectros de absorción y se pueden usar para identificar sustancias. De esta manera se puede efectuar un análisis cualitativo en regiones ultravioleta/visible para identificar ciertas clase de compuestos ya sea en estado puro o en mezclas biológicas, como proteínas, ácidos nucleicos, citocromos y clorofila. Se puede aprovechar ciertos cromóforos, por ejemplo, aminoácidos aromáticos de las proteínas y las bases heterocíclicas en los ácidos nucleicos que absorben a longitud de onda específicas. Debido a que muchos solutos absorben muy poca luz, la medida fotométrica de su concentración puede ser difícil, por lo tanto se hace reaccionar el soluto de interés con otra molécula para formar un compuesto coloreado y se usa para estimar la concentración del soluto incoloro.

10.3 Materiales y métodos

Materiales

10.0 ml de solución de albúmina 2.5 mg/ml en KCl 0.5M; 20 ml de KCl 5.0 M; 25 ml de reactivo de Biuret; muestras de proteína de concentración desconocida. Espectrofotómetro o fotómetro, 10 tubos de ensaye, gradilla, 2 pipetas de 5.0 ml, 2 pipetas de 10 ml

Metodología

1. Preparar 7 tubos marcados como se muestra en la Tabla 1. La solución de albúmina contiene 2.5 mg/ml de proteína. Diluyendo volúmenes conocidos de la solución con volúmenes conocidos de KCl, podemos producir diferentes concentraciones de proteína para generar una curva estándar. Los tubos 6 y 7 contiene 5.0 ml de soroalbúmina de concentración desconocida en KCl. En este caso, la albúmina es una proteína extraída de suero de la sangre. La albúmina se ha disuelto en soluciones conocidas que incluyen KCl. Para mantener constante la concentración de KCl se adicionan las cantidades indicadas.

Ingredientes de las soluciones para la determinación de la curva estándar de proteína.

Tubo	Albúmina o muestra desconocida	KCl 0.5M (ml)	Conc. final de proteína
1	0.0	5.0	0
2	1.0 ml albúmina	4.0	0.5
3	2.0 ml albúmina	3.0	
4	3.0 ml albúmina	2.0	
5	4.0 ml albúmina	1.0	
6	5.0 ml de muestra desconocida	0.0	A determinar
7	5.0 ml de muestra desconocida	0.0	A determinar

Adicionar 3.0 ml de reactivo de Biuret a cada tubo y mezclar vigorosamente. Reposar 20 min para que desarrolle el color. El color es estable por al menos 1 hr. Encender el

espectrofotómetro. Fijar la longitud de onda del espectrofotómetro a 540 nm, Calibrar el instrumento usando el tubo 1 como blanco. Registrar los valores de absorbencia.

Reporte

- a) Graficar los valores de absorbencia (eje vertical) contra la concentración de proteína conocida (eje horizontal)
- b) Usando una regla, dibujar una recta a través de los valores de absorbencia
- c) Sobre el eje vertical, dibujar un punto en el valor de absorbencia de la solución desconocida.
- d) Usando una regla, dibujar una línea horizontal desde este punto sobre la línea de absorbencia.
- e) Desde el punto de intersección de la línea horizontal con la línea de absorbencia, dibujar una línea vertical hacia el eje horizontal. El valor en el cual la línea vertical interseca con el eje horizontal, es la concentración de la solución desconocida de proteína. La gráfica de absorbencia vs. concentración se le llama curva estándar.
- f) Usando la computadora, preparar la curva estándar como una gráfica XY graficando absorbencia contra concentración de albúmina. Incluir un título para la gráfica y marcar los ejes, incluyendo unidades.
- g) Usar esta curva estándar para determinar la concentración de proteína de la muestra desconocida.
- h) Registrar el valor de absorbencia y la concentración de proteína de la muestra desconocida, abajo de la gráfica.

Cuestionario

1. Escribir la estructura de 5 aminoácidos y escribir los mismos 5 aminoácidos unidos por un enlace peptídico, circular el enlace peptídico.
2. ¿En qué se diferencian unas proteínas de otras?
3. ¿Cuál es el fundamento de la reacción de Biuret?

Bibliografía

1. **Wilson**, K., and Walker, J. 2000. Principles and Techniques of practical Biochemistry. Fifth edition. Cambridge University Press.
2. **Robert**, JF., and White B.J. 1990. Biochemical techniques theory and practice. 1st edition. Waveland Press, Inc. USA

Práctica No. 12

Actividad de la amilasa sobre el almidón

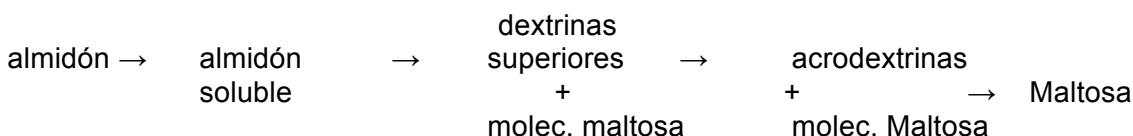
Objetivo: Verificar la actividad de la amilasa sobre el almidón a través de su producto de hidrólisis.

Introducción

El almidón es un polisacárido muy abundante en los vegetales en los cuales se encuentra generalmente en forma de pequeños gránulos microscópicos de estructura cristalina. El grano de almidón está formado por amilosa y amilopectina. La amilopectina se encuentra en la parte exterior del grano, es insoluble en agua y no da coloración con la solución de lugol. La amilosa se encuentra en la parte interna y da coloración violeta en presencia de lugol.

Por otro lado, la amilasa cataliza la hidrólisis del almidón, glucógeno y dextrinas superiores en moléculas cada vez más pequeñas, en un proceso progresivo dando como producto final el disacárido maltosa. La amilasa es una mezcla de enzimas. En el hombre la encontramos en la boca (amilasa salival) y en el intestino (amilasa pancreática). La amilasa pancreática se considera idéntica en su acción a la amilasa salival. El pH óptimo para la amilasa salival es de 6.6. Cuando se encuentra en medios con pH más ácidos o más alcalinos, la actividad de la enzima disminuye o se inhibe por completo. La presencia de sales también modifica la actividad de esta enzima.

En esta práctica, el avance de la hidrólisis del almidón se demostrará siguiendo la formación del complejo con yodo el cual da una coloración violeta con los almidones. A medida que se va efectuando la hidrólisis, el color azul va desapareciendo y aparece un color rojizo (eritrodextrinas) y posteriormente se observa una coloración amarilla, debida únicamente a la solución de yodo, lo que demuestra que el almidón ha sido hidrolizado hasta maltosa.



Materiales y métodos

Materiales

7 Tubos de ensaye, baño maría, placa de porcelana excavada, gradilla, tres pipetas de 1 ml, dos pipetas de 5 ml, dos pipetas de 10 ml, 3 pipeta pasteur, 1 pinzas para tubo. Almidón 1% en regulador de fosfatos 0.02 M, glucógeno 1% en regulador de fosfatos 0.02 M, regulador de fosfatos 0.02 M, solución de NaCl 0.5 N, solución de amilasa pancreática al 1% o amilasa salival, solución de lugol.

Metodología

Prepare una serie de 7 tubos de ensayo debidamente etiquetados de acuerdo a la siguiente tabla, utilizando 5 diluciones diferentes de enzima comercial o saliva:

Tubo No.	1	2	3	4	5	6	7
Almidón al 1% (ml)	1	1	1	1	0	0	0
Agua destilada	0	0	0	0	1	1	1
PREINCUBACIÓN*	Dejar a 37°C por 5 minutos						
Enzima al 1% o saliva concentrada(ml)	Sin diluir	Dil 1:5 0.5	Dil 1:10 0.5	Dil 1:20 0.5	Dil 1:5 0.5	Dil 1:10 0.5	Dil 1:20 0.
NaCl al 5%	Adicionar a cada tubo una gota						
INCUBACIÓN	Incubar a 37°C adiferentes intervalos de tiempo						
Lectura (color)							
2 min							
4 min							
6 min							
8 min							
10 min							
12 min							
Mas tiempo							

Antes de agregar la enzima y a intervalos de 1 minuto después de adicionada, haga la prueba de gota del contenido de cada tubo con solución diluida de yodo (lugol). Transcurridos 10 minutos, haga las determinaciones cada dos minutos hasta que la prueba sea negativa. Hacer las lecturas comparando con el tubo testigo.

ANOTE EL TIEMPO INICIAL Y FINAL DE LA DIGESTIÓN EN CADA TUBO.

En el reporte (Resultados) indique el tiempo necesario para que la reacción sea completa en cada tubo y calcule las Unidades de Amilasa en cada tubo, definiendo una Unidad de amilasa como: “número de mililitros de solución de almidón al 1% que pueden ser hidrolizados en 30 min, por 1 ml de extracto puro, en condiciones de pH y temperatura que se haya trabajado.

Cuestionario

1. Haz los cálculos para determinar las unidades de amilasa.
2. Explique ¿como demostraste que el almidón fue totalmente transformado en sus subproductos al reaccionar con la amilasa?
3. Que son las Unidades (enzimáticas). Todas son iguales o varían con el tipo de sustrato que usas?.
4. Como afecta el NaCl en la actividad de la amilasa?.
5. En el ser humano, donde podemos encontrar amilasa?
6. Cual es el pH en el cual la actividad de la amilasa es óptima?.
7. Haga un esquema de la estructura de amilosa y de amilopectina
8. Describa un método para determinar azúcares reductores.

Bibliografía

1. **Wilson**, K., and Walker, J. 2000. Principles and Techniques of practical Biochemistry. Fifth edition. Cambridge University Press.
2. **Robert**, JF., and White B.J. 1990. Biochemical techniques theory and practice. 1st edition. Waveland Press, Inc. USA.
3. **Voet**, D., and J.G. Voet. 1995. Biochemistry. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A
4. **Mathews**, **C.K.**, van Holde K.E. and Ahern K.G. 2000. Biochemistry. Third edition. Addison Wesley Longman Inc. USA.
5. **Stryer**, L. 1995. Bioquímica. Cuarta edición. Editorial Reverte. Barcelona España.

Práctica No. 13

Identificación de carbohidratos

Objetivo: Observar las propiedades químicas que se utilizan para la identificación de diferentes tipos de carbohidratos.

Introducción

Los carbohidratos, glúcidos o azúcares constituyen una de las más importantes clases de moléculas constituyentes de los organismos.

Los carbohidratos son derivados aldehídicos o cetónicos de alcoholes polioxidrilados y por lo tanto tienen las propiedades características de esos grupos como son la formación de oxina e hidrazonas. Existen diferentes tipos de reacciones químicas que sirven para determinar cualitativamente la presencia de carbohidratos (monosacáridos, disacáridos y polisacáridos) como son las siguientes: **(a) La Prueba de Molish:** Se basa en la acción deshidratante e hidrolizante del ácido sulfúrico concentrado sobre los carbohidratos. En esta prueba el ácido fuerte cataliza la hidrólisis de cualquier enlace glucosídico presente en la muestra, y la deshidratación del mismo a furfural (pentosas) e hidroximetil furfural (hexosas) de los monosacáridos resultantes. Estos furfurales se condensan con naftol y dan un producto colorado. Esta prueba para la identificación de azúcares en general. **(b) Prueba de Lugol:** Se basa en la formación de un complejo entre el ion I_3^- y la molécula de amilosa de almidón, la cual tiene una conformación helicoidal. Al introducirse el ion I_3^- dentro de la hélice se forma una solución color azul o negra dependiendo de la concentración. La amilopectina produce un color púrpura rojizo, y el glucógeno un color pardo rojizo. **(c) Prueba de Barford:** Permite distinguir monosacáridos de disacáridos. Aquí el Cu^{2+} del reactivo (acetato cúprico en ácido acético diluido), es reducido a Cu^{2+} (Cu^+) en solución de ácido débil, en un tiempo de 5 a 7 minutos con los monosacáridos. Los disacáridos reducen el ion Cu^{2+} en un tiempo de 7 a 12 minutos. El Cu_2O es un precipitado de color rojo. Es necesario realizar esta prueba en condiciones de pH y de calentamiento fijas y estrictas.

(d) Prueba de Bial: Es una reacción coloreada específica para pentosas y cierto ácidos urónicos que se descomponen al calentarse con ácidos formando pentonas bajo condiciones cuidadosamente controladas de temperatura, tiempo y concentración de HCl, las pentosas son rápidamente convertidas a furfural, mientras que el hidroximetil furfural se forma a partir de hexosas presentes. EN presencia del ion férrico y orcional (5 metil resorcinol), el furfural se condensa rápidamente para producir un complejo colorado verde. **(e) Prueba del ácido Múscico:** Esta prueba consiste en diferenciar la galactosa de las demás aldohexosas por formación de un ácido sacárico que es el ácido músico. El ácido sacárico cristalino es insoluble en HNO_3 diluido. El HNO_3 concentrado oxida los dos carbonos terminales de las aldohexosas formando los correspondientes ácidos sacáricos. En general, los ácidos sacáricos son solubles en HNO_3 diluido, pero el ácido músico es insoluble en ácido diluido. **(f) Prueba de Selliwanoff:** Es una reacción coloreada que es específica para cetosas. En solución de HCl concentrado, las cetosas sufren una deshidratación

para producir derivados del furfural con más rapidez que como lo hacen las aldosas. Posteriormente los derivados del furfural forman complejos con el resorcinol para producir color. Consecuentemente los grados relativos del color desarrollado en una solución que contiene azúcar, HCl y resorcinol, proporciona evidencia sobre si el azúcar es una aldohexosa o cetosa. Las cetosas generalmente producen un color rojo. En las condiciones que se efectúa la prueba, todas las cetosas que pueden estar unidas en enlace glucosídico quedarán en libertad y originarán reacción positiva. **(g) Formación de osazonas:** Los carbohidratos fructosa y glucosa dan las mismas osazonas por su arreglo especial semejante. La manosa no forma osazonas en solución acuosa, pero en su lugar forma una fenilhidrazona insoluble. Cada osazona tiene un punto de fusión determinado, aunque no es muy útil para su diferenciación pues varía en pocos grados. Algunos cristales presentan una forma lo suficientemente diferenciada para identificar el carbohidrato. El tiempo de formación es diferente para cada carbohidrato. La prueba se basa en que los azúcares reductores se condensan con reactivos como la fenilhidracina en frío formando una fenilhidrazona. A 100 °C y en presencia de un exceso de fenilhidracina se lleva a cabo otro tipo de reacción en donde participan los átomos de carbono número 1 en las cetosas, dando lugar a la formación de osazonas.

Materiales y métodos

Materiales

40 tubos de ensaye, vaso de precipitado, gradilla, mechero, tripié, tela de asbesto, agitador de vidrio, vidrio de reloj, 2 pipetas de 10 ml., 5 portaobjetos, 1 pinza para tubo de ensaye, microscopio, hielo.

Reactivos

Naftol, etanol al 95 %, yodo, yoduro de potasio, acetato de cobre, ácido acético concentrado, orcinol, ácido clorhídrico concentrado, cloruro de fiero, resorcinol, ácido sulfúrico concentrado, ácido nítrico concentrado, clorhidrato de fenilhidracina, acetato de sodio, solución de carbohidratos: glucosa, galactosa, fructosa, sacarosa, lactosa y almidón.

Preparación de reactivos

Reactivos de Molish:

Disolver 10 g de naftol en 100 ml de etanol al 95%

Reactivo de Lugol:

Moler y mezclar finamente en un mortero 50 g de yodo y 100 g de yoduro de potasio. Disolver con agua destilada y aforar hasta un volumen de 1 litro.

Reactivo de Bradford:

Disolver 13.3 g de acetato cúprico con 200 ml de agua y filtrar si es necesario, añadir 1.9 ml de ácido acético concentrado.

Reactivo de Bial:

Disolver 1.5 g de orcinol en 500 ml de HCl concentrado y añadir de 20-30 gotas de una solución acuosa de cloruro férrico al 10%.

Reactivo de Silliwano:

Disolver 0.5 g de resorcinol en 100 ml de HCl diluido 1:2.

Ensayos

Nota. Antes de realizar las pruebas, elabore una tabla de manera que en la primera fila escriba el nombre de las muestras de carbohidratos y en la primera columna el nombre de la prueba a efectuarse, dibuje dos columnas adicionales: una para escribir las observaciones y la otra para resumir el resultado indicando si la prueba fue positiva o negativa.

Prueba de Molish

Prepare una serie de 6 tubos de ensaye en una gradilla, a cada uno añádales 2 ml de las soluciones a prueba. Enseguida adicione 5 gotas del reactivo de Molish y agite. Luego incline cada tubo y deposite cuidadosamente por las paredes del tubo 2 ml de ácido sulfúrico concentrado. La aparición de un anillo rojo violeta en la interfase indica la presencia de carbohidratos en la solución.

Prueba de Lugol.

A una serie de 6 tubos transfiera 2 ml de cada una de las soluciones de prueba. Acidifique las muestras con 5 gotas de HCl 1 M. Luego adicione 1 gota de lugol. La aparición de un anillo rojo violeta en la interfase indica la presencia del carbohidrato en la solución.

Prueba de Barford.

Coloque 5 ml de reactivo de Barford en cada tubo de una serie de 6 tubos de ensaye, adicione 1 ml de los carbohidratos a prueba y caliente a Baño María hirviendo durante 2 minutos, saque los tubos, déjelos reposar y anote sus observaciones.

Prueba de Bial.

Prepare una serie de 6 tubos de ensaye y coloque 5 ml de reactivo de Bial a cada tubo. Adicione 2 ml de la solución de carbohidrato y caliente suavemente las soluciones en un mechero hasta la aparición de un color verde o bien hasta que las primeras burbujas alcancen la superficie. Un color azul verde en la solución a prueba indica un resultado positivo.

Prueba del ácido mícico.

Esta prueba se efectuará solamente con soluciones de galactosa al 3% y de lactosa al 3%. Coloque 5 ml de las soluciones en 2 tubos de ensaye, adicione 2 ml de HNO₃ concentrado, mezcle y caliente los tubos en baño de agua hirviendo durante 60 a 90 minutos con agitación ocasional para eliminar gas amarillo

generado. Finalmente introduzca los tubos en baños de hielo, induciendo la cristalización raspando las paredes internas de los tubos con una varilla de vidrio. Observe los cristales formados y dibújelos.

Prueba de Selliwanoff.

Es una serie de 6 tubos de ensaye coloque 5 ml de una muestra de carbohidrato. Acidifique la solución con 10 gotas de ácido acético glacial y adicione 3 gotas de fenilhidrazina (ó 0.4 g de clorhidrato de fenilhidrazina) y una pequeña porción de acetato de sodio sólido. Disuelva con agitación y caliente en un baño de agua durante 5 minutos. Enfríe los tubos y observe al microscopio los cristales formados.

Resuma sus observaciones en una tabla e interprete los resultados.

Cuestionario

1. Escribe la reacción química que sucede entre el reactivo de Molish y uno de los carbohidratos que usaste.
2. Químicamente que es lo que pasa en la reacción entre el ácido mícico y la galactosa? (Reacción química).
3. Escribe la reacción química que sucede entre el reactivo de Barford y uno de los carbohidratos que usaste?.
4. Que es un azucar reductor y uno no reductor?. Cual es el reactivo que tradicionalmente (mas común) se emplea para saber si es reductor o no reductor?.

Bibliografía

1. **Wilson**, K., and Walker, J. 2000. Principles and Techniques of practical Biochemistry. Fifth edition. Cambridge University Press.
2. **Robert**, JF., and White B.J. 1990. Biochemical techniques theory and practice. 1st edition. Waveland Press, Inc. USA.
3. **Voet**, D., and J.G. Voet. 1995. Biochemistry. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A
4. **Mathews**, C.K., van Holde K.E. and Ahern K.G. 2000. Biochemistry. Third edition. Addison Wesley Longman Inc. USA.
5. **Stryer**, L. 1995. Bioquímica. Cuarta edición. Editorial Reverte. Barcelona España.