

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR III

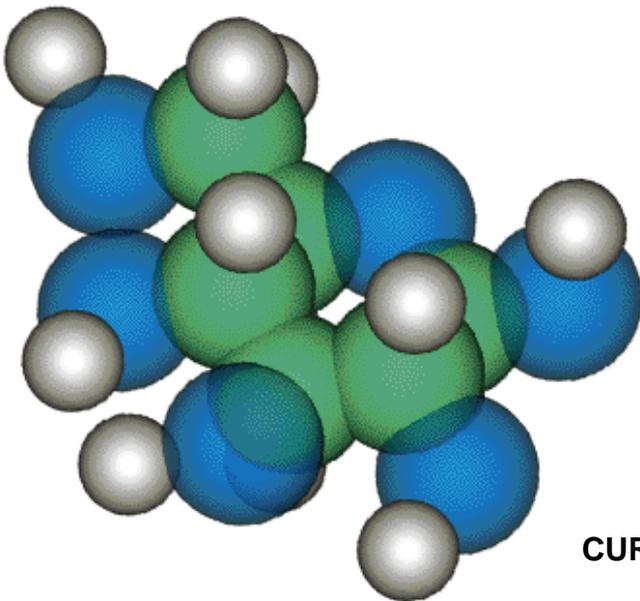
FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CUADERNO DE PRÁCTICAS

BIOQUÍMICA BÁSICA

Grado en Medicina



CURSO ACADÉMICO 2018/2019

INDICE

PRACTICA #1: INTRODUCCIÓN AL MANEJO DEL MATERIAL Y APARATOS DE LABORATORIO/ PREPARACIÓN DE SOLUCIONES TAMPÓN

PRACTICA #2: ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE UN COLORANTE Y DE DOS INDICADORES ÁCIDO-BASE

PRACTICA #3: CINÉTICA ENZIMÁTICA I : CÁLCULO DE K_M Y V_{max}

PRACTICA #4: CINÉTICA ENZIMÁTICA II: INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

PRACTICA #5: DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES FOSFATASA ALCALINA Y GAMMA GLUTAMIL TRANSFERASA

INTRODUCCIÓN AL MANEJO DEL MATERIAL Y APARATOS DE LABORATORIO /PREPARACIÓN DE SOLUCIONES TAMPÓN

1. MATERIAL COMUNMENTE UTILIZADO EN EL LABORATORIO

1.1. MATERIAL DE VIDRIO

- * Vasos de precipitados
 - * Matraces para vacío (kitasatos)
 - * Matraces Erlenmeyer (10-2000 mL)
 - * Probetas graduadas (5 - 2000 mL)
 - * Matraces aforados (1 - 5000 mL)
 - * Tubos de ensayo sin graduar
 - * Tubos de ensayo graduados
 - * Tubos de centrifuga
 - * Tubos de vidrio para Espectrofotómetro
 - * Vidrios de reloj
 - * Pipetas graduadas (0,5 - 50 mL)
 - * Pipetas Pasteur
 - * Varillas de agitación
- * **Pipetear:** uso de la pipeta adecuada para el volumen que se desea pipetear.
- Usar una pipeta para cada reactivo.
- No pipetear de los stocks

1.2. OTRO MATERIAL

- * Pipetas automáticas
- * Puntas de pipeta desechables
- * Tubos eppendorf
- * Auxiliares de pipeteado: peras de goma, auxiliar de pipeteado, etc.
- * Gradillas para tubos de ensayo
- * Chupetes para pipetas Pasteur

2. APARATOS DE USO FRECUENTE

2.1. BALANZAS

* Balanzas de precisión: Suelen pesar un máximo de 300 g con una precisión entre 0,001g y 0,0001 g.

* Granatarios: son balanzas que permiten pesar cantidades hasta unos 3.000 g con una precisión entre 0,1 g y 0,01 g.

Ambos tipos permiten tarar el recipiente que se emplea para la pesada.

2.2. AGITADORES

* Agitadores de tubos (vortex): sirven para homogeneizar mezclas en tubos de ensayo.

* Agitadores magnéticos: se utilizan para homogeneizar mezclas en vasos de precipitado o erlenmeyer con ayuda de una varilla agitadora magnética.

* Agitador horizontal: permite homogeneizar mezclas en vasos de precipitados o erlenmeyer sin el empleo de varillas agitadoras magnéticas

2.3. CENTRÍFUGAS

En el laboratorio de Bioquímica se pueden encontrar diversos tipos de centrífugas, desde aquellas denominadas *Centrífugas de mesa*, para la simple preparación de material precipitado, hasta las más complejas *Ultracentrífugas*, para la separación de biopolímeros y orgánulos subcelulares. Las primeras alcanzan campos centrífugos con velocidades de giro de unas 5.000 rpm, mientras que las segundas pueden alcanzar hasta 100.000 rpm.

Las centrífugas pueden tener diversos tipos de rotores (angular, basculante) donde se disponen los tubos. Es esencial que la distribución del peso en la centrífuga sea equilibrada. Han de **enfrentarse tubos de igual peso** (no siempre coincide con igual volumen).

2.4. pHmetro:

Sistema medidor de la concentración de hidrogeniones (H^+) de las disoluciones que más frecuentemente se utilizan en el laboratorio de Bioquímica.

Fundamentalmente consisten en un electrodo sensible a la concentración de H^+ . Las variaciones de la misma se convierten en una señal eléctrica que se recoge en una escala graduada. El electrodo más frecuentemente utilizado es el de vidrio, que consta de un bulbo de vidrio de paredes muy finas que actúan como una membrana semipermeable a través de la cual pasan los H^+ . Dentro del bulbo se dispone un electrodo de $Ag/AgCl_{(s)}$ y una disolución de HCl, y además el pHmetro lleva un electrodo de calomelanos de referencia. Los electrodos de referencia de calomelanos $[Cl^- | Hg_2Cl_2 (s) | Hg(I)]$ se pueden preparar con un voltaje predecible y reproducible de 0,280 V. Cuando el electrodo de vidrio se introduce en una disolución de una acidez determinada, dependiendo de la diferencia de concentración de H^+ a uno y otro lado del bulbo de vidrio, así será el potencial del electrodo, y en consonancia, la fuerza electromotriz detectada.

Calibrado del pHmetro: Como paso previo a determinar el pH de una disolución ha de calibrarse el pHmetro con una disolución de pH conocido o disolución estándar.

TEORIA DE TAMPONES

Tampones (también llamados amortiguadores o buffer) son aquellas disoluciones formadas por un ácido débil y una sal de este ácido con una base fuerte, cuya concentración de hidrogeniones apenas varía al añadir ácidos o bases fuertes.

La utilidad de los tampones o mezclas amortiguadores se explica por la posibilidad que presentan de mantener la concentración de iones hidrógeno dentro de límites tan estrechos que con razón puede considerarse como invariable.

En toda disolución amortiguadora existe una proporcionalidad entre la concentración de H^+ y las concentraciones relativas de los dos componentes del sistema: el ácido y la sal, dado que el pH de la mezcla amortiguadora sigue la **ecuación de Henderson-Hasselbach** :

$$pH = pK + \log \frac{[sal]}{[ácido]}$$

Propiedades de los tampones:

1. El pH de una disolución tampón depende de la naturaleza del ácido débil que la integra, de modo que para cantidades equimoleculares de sal y de ácido, el pH es justamente el pK de este ácido.
2. El pH del sistema amortiguador depende de la proporción relativa entre la sal y el ácido, pero no de las concentraciones absolutas de ellos.
3. Cuando se añaden ácidos o bases fuertes a la disolución tampón, se produce una reacción química de neutralización que afecta a las proporciones de sal y ácido del amortiguador, bien en el sentido de eliminar el ácido añadido neutralizándolo con la sal del tampón o bien de neutralizar la base con el ácido del tampón. Así, en el primer caso disminuiría la concentración de la sal y en el segundo, la del ácido. Como el pH varía con el logaritmo del cociente sal/ácido (según la ecuación de Henderson-Hasselbach), *la modificación del pH resulta exigua hasta que uno de los dos componentes está próximo a agotarse.*

La capacidad de un tampón de resistir los cambios de pH se conoce como "capacidad de tamponamiento" y hay dos formas de definirla: o el número de moles por litro de H^+ u OH^- que se requieren para producir un cambio de pH, por ejemplo de una unidad, o bien el cambio de pH que se produce cuando se añade al tampón una cantidad dada de H^+ u OH^- (por ejemplo 1 mol/L)

Mientras más alta sea su capacidad de tamponamiento, mayor será la resistencia del amortiguador para variar de pH y por tanto los cambios de pH que experimenta la solución tampón cuando se añade un ácido o una base serán mínimos.

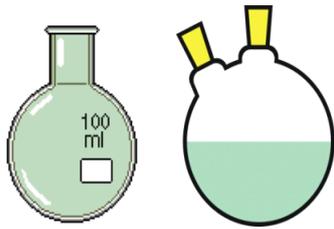
Entre los tampones que con más frecuencia se utilizan en un laboratorio de bioquímica destacamos el tampón Tris, que mantiene un intervalo de pH entre 7,9 y 8,4 ó el tampón fosfato, que tampona alrededor de 7,2; y el tampón HEPES, alrededor de 7,5.

3. PARTE EXPERIMENTAL

PREPARACIÓN DE UNA DISOLUCIÓN TAMPON DE FOSFATO. **AJUSTE DEL pH**

Se va a preparar 500 mL de tampón fosfato potásico 45 mM y pH 7,2 a partir de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y fosfato dipotásico (K_2HPO_4). Se pesan 15 mmoles (2,64 g) de K_2HPO_4 (sal) y 7,50 mmoles (1,02 g) de KH_2PO_4 (ácido). Se mezclan, se disuelven con agua destilada y, por último, se enrasan hasta 500 mL con agua destilada.

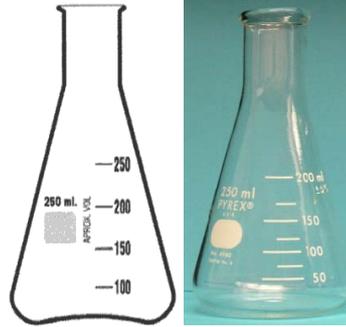
A continuación se mide el pH en el pHmetro y se ajusta hasta 7,2; bien acidificando (si el pH inicial es superior a 7,2) con una disolución 1 N de HCl, bien alcalinizando (si el pH inicial es inferior a 7,2) con una disolución 1 N de KOH.



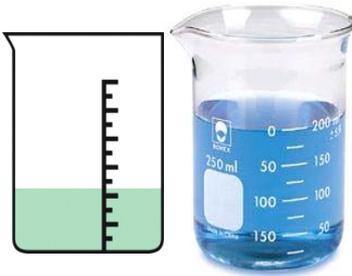
Matraz esférico



Matraz aforado



Matraz Erlenmeyer



Vaso precipitado



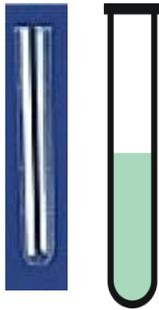
Matraz kitasato



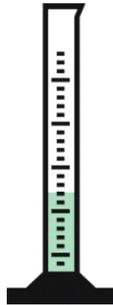
Embudo decantación



Bureta



Tubos ensayo



Probetas graduadas



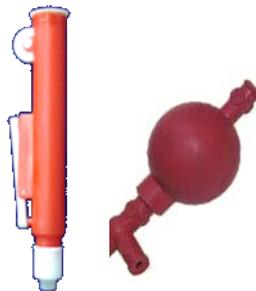
Tubo eppendorf



Pipetas automáticas



Pipetas graduadas



Pera de goma



Puntas pipeta automática

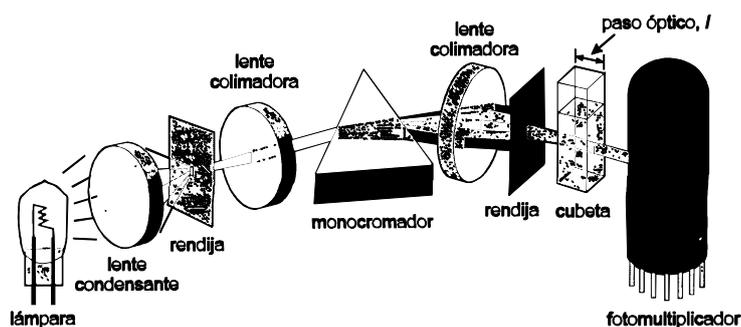
ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE UN COLORANTE Y DE DOS INDICADORES ÁCIDO-BASE

1. ESPECTROFOTÓMETRO

Las moléculas en disolución absorben luz. Las longitudes de onda (λ) a las que absorben y la eficiencia con que se absorben dependen tanto de la estructura de la molécula como del medio en el que se halla ésta.

Los compuestos desconocidos pueden ser identificados por su **espectro de absorción**. Se denomina espectro de absorción de una sustancia a la cantidad de luz que absorbe a distintas longitudes de onda. Dicho espectro es una característica intrínseca del compuesto porque depende de sus propiedades físicas y químicas. Por otro lado, las concentraciones de compuestos conocidos en disolución pueden determinarse midiendo su absorción de luz a una o más longitudes de onda.

Un **espectrofotómetro** es un aparato utilizado para medir la cantidad de luz de una determinada longitud de onda que es absorbida por una muestra. Los componentes de un espectrofotómetro se muestran en el esquema siguiente.



Esquema de los componentes básicos de un espectrofotómetro

Si el espectrofotómetro únicamente permite realizar mediciones en la región visible (400 a 800 nm) del espectro electromagnético se denomina **colorímetro**.

La fracción de luz incidente que es absorbida por una disolución depende del espesor de la muestra, de la concentración del compuesto absorbente en la disolución y de la naturaleza química del mismo. Las relaciones entre concentración, espesor de la muestra y la luz absorbida quedan reflejadas en la **ley de Lambert-Beer**. Esta ley establece que la cantidad de luz absorbida por una sustancia a una determinada longitud de onda es directamente proporcional a su concentración. La cantidad de luz absorbida se mide en unidades de absorbancia (A) o densidad óptica (DO):

$$A = \lambda c l$$

λ = coeficiente de extinción molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), es la absorbancia de una disolución 1 M de una sustancia dada, a una longitud de onda determinada, en una cubeta de 1 cm.

c = concentración (mol/L)

l = espesor de la cubeta (cm)

- ✓ Deducir las unidades de la Absorbancia

La ley de Lambert-Beer es aplicable a disoluciones diluidas

La longitud de onda escogida para trabajar con un compuesto es aquella(s) en la que éste presenta la máxima absorción.

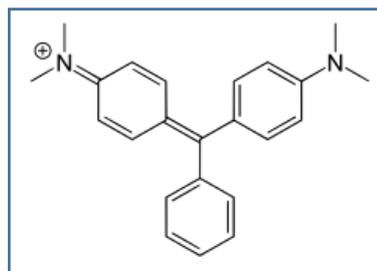
Todas las mediciones de absorción de luz deber ser hechas respecto de una *disolución de referencia* (blanco) que contiene todos los componentes del ensayo excepto aquel que se desea medir.

2. PARTE EXPERIMENTAL: DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO DE ABSORCIÓN EN LA REGIÓN VISIBLE DE SOLUCIONES DE INDICADORES ÁCIDO-BASE Y COLORANTES

Se utilizarán dos indicadores ácido-base y un colorante:

- Verde malaquita:** es un colorante que en disolución acuosa tiene color verde.
- Rojo fenol:** a pH ácido es amarillo y a pH básico es rojo-violeta
- Azul de bromofenol:** a pH básico es azul.

a) Verde malaquita (1 mM).



Preparar 4 tubos de ensayo según la siguiente tabla:

TUBO	AGUA MILLI-Ro	VERDE MALAQUITA (1 mM)	concentración final VERDE MALAQUITA
1	10 ml	5 μ l	
2	10 ml	15 μ l	
3	10 ml	25 μ l	
4	10 ml	35 μ l	

- Agitar
- Transferir a un tubo de colorímetro
- Blanco = agua destilada

- ✓ Medir la absorbancia desde 540 nm a 660 nm de 20 en 20 nm

Cada vez que se cambie de longitud de onda es necesario ajustar a cero el colorímetro con el blanco.

Registrar las medidas de absorbancia en el siguiente cuadro:

ABSORBANCIA							
longitud de onda (λ)							
TUBO	540 nm	560 nm	580 nm	600 nm	620 nm	640 nm	660 nm
1							
2							
3							
4							

REPRESENTACIÓN

Representar en papel milimetrado los valores de:

- Absorbancia en el eje de ordenadas frente a longitud de onda en el eje de abscisas e indicar a qué longitud de onda tiene el máximo de absorción el compuesto utilizado.
- Absorbancia en el eje de ordenadas frente a concentración en el eje de abscisas, a la longitud de onda que se obtuvo el mínimo de absorbancia.
- Absorbancia en el eje de ordenadas frente a concentración en el eje de abscisas, a la longitud de onda que se obtuvo el máximo de absorbancia.

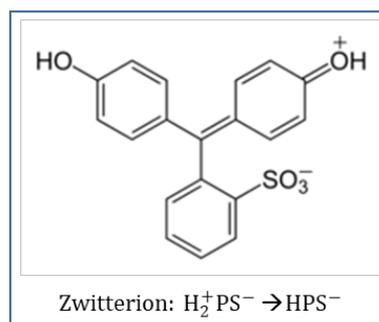
COMENTARIOS:

- ✓ Comprobar la relación entre la absorbancia y la concentración de la muestra que establece la ley de Lambert-Beer y deducir el significado del coeficiente de extinción molar.
- ✓ Deducir por qué la ley de Lambert-Beer no es aplicable cuando la muestra está muy concentrada.

b) Rojo fenol (2,8 mM)

❖ pH ácido (A)

Preparar 2 tubos según la siguiente tabla:



TUBO	AGUA MILLI-Ro	HCl 1N	ROJO FENOL (2,8 mM)
A	10 ml	150 μl	150 μl
BLANCO A	10 ml	150 μl	--

- Agitar
- Transferir a un tubo de colorímetro
- Transferir el blanco A también a otro tubo de colorímetro

- ✓ Rojo fenol pH ácido desde 360 nm a 520 nm según la tabla posterior.

Cada vez que se cambie de longitud de onda es necesario ajustar a cero el colorímetro con el blanco.

❖ **pH básico**

Preparar 2 tubos según la siguiente tabla:

TUBO	AGUA MILLI-Ro	NaOH 3N	ROJO FENOL (2,8 mM)
B	10 ml	50 µl	50 µl
BLANCO B	10 ml	50 µl	--

- Agitar
- Transferir a un tubo de colorímetro
- Transferir el blanco B también a otro tubo de colorímetro

- ✓ Rojo fenol pH básico desde 460 nm a 610 nm según la tabla posterior.

Cada vez que se cambie de longitud de onda es necesario ajustar a cero el colorímetro con el blanco.

Registrar las medidas de absorbancia en el siguiente cuadro:

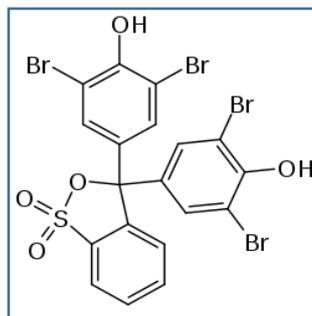
ABSORBANCIA								
longitud de onda (λ)								
TUBO	360 nm	380 nm	400 nm	420 nm	430 nm	440 nm	480 nm	520 nm
A								
longitud de onda (λ)								
	460 nm	480 nm	500 nm	520 nm	540 nm	560 nm	580 nm	610 nm
B								

REPRESENTACIÓN

Representar en papel milimetrado: absorbancia en el eje de ordenadas frente a longitud de onda en el eje de abscisas, e indicar a qué longitud de onda tiene el máximo de absorción el compuesto utilizado, en función del pH.

- ✓ **Deducir los cambios en la estructura del rojo fenol en función del pH.**

c) Azul de bromofenol (1,5 mM)



Preparar 2 tubos según la siguiente tabla:

TUBO	AGUA MILLI-Ro	NaOH 3N	AZUL BROMOFENOL (2,8 mM)
1	10 ml	150 μ l	150 μ l
BLANCO	10 ml	150 μ l	--

- Agitar
- Transferir a un tubo de colorímetro
- Transferir el blanco B también a otro tubo de colorímetro

✓ Intervalo de longitudes de onda: desde 530 nm a 610 nm de 20 en 20 nm.

Cada vez que se cambie de longitud de onda es necesario ajustar a cero el colorímetro con el blanco.

Registrar las medidas de absorbancia en el siguiente cuadro:

ABSORBANCIA						
longitud de onda (λ)						
TUBO	530 nm	550 nm	570 nm	590 nm	610 nm	630 nm
1						

REPRESENTACIÓN

Representar en papel milimetrado: absorbancia en el eje de ordenadas frente a longitud de onda en el eje de abscisas, e indicar a que longitud de onda tiene el máximo de absorción el compuesto utilizado.

✓ ¿Por qué el azul de bromofenol NO es un indicador de pH?

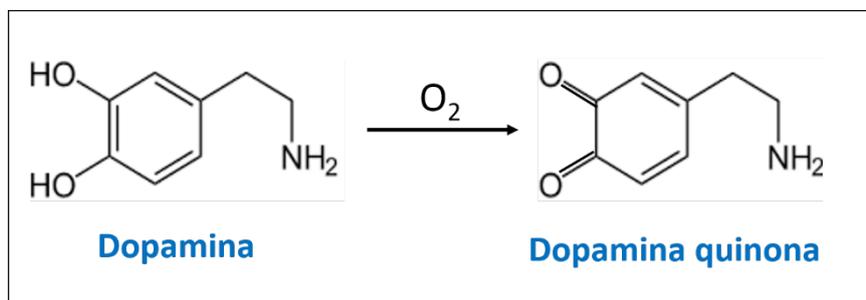
CINÉTICA ENZIMÁTICA I : CÁLCULO DE K_M Y V_{max}

FUNDAMENTO

La tirosinasa es el enzima responsable del proceso de melanización en animales y del pardeo en vegetales. Cataliza la hidroxilación de monofenoles a o-difenoles con oxígeno molecular (actividad monofenolasa) y también es capaz de oxidar los o-difenoles a o-quinonas (actividad difenolasa).

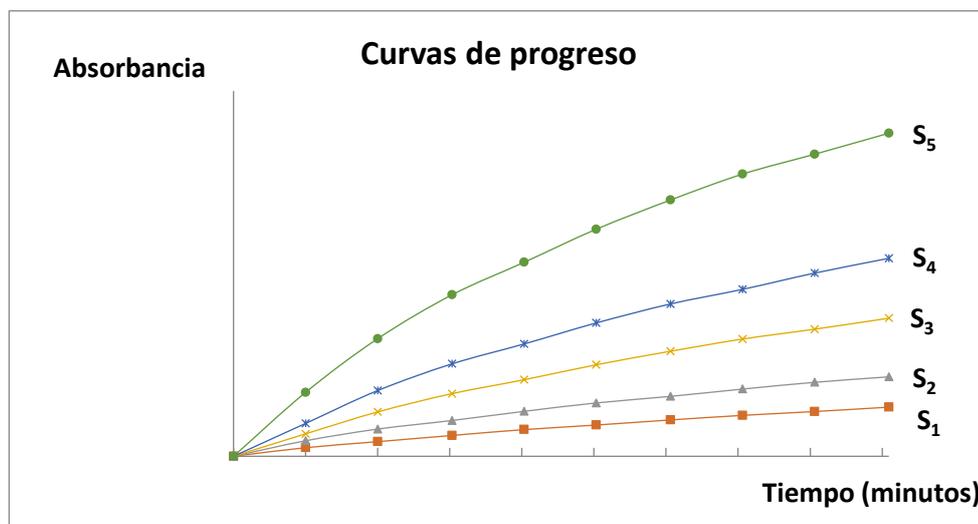
En mamíferos, se encuentra localizada en su mayor parte, en los melanocitos de la piel, asociada a las fracciones subcelulares correspondientes a los melanosomas y al retículo endoplasmático. La tirosinasa es la responsable de la pigmentación de la piel y su ausencia se relaciona, normalmente, con el albinismo.

En esta práctica se medirá la actividad difenolasa, utilizando como sustrato dopamina, y valorando la velocidad de aparición de producto (coloreado) midiendo la absorbancia a 503 nm. Esto permitirá calcular K_M y V_m .



Para la valoración espectrofotométrica de la aparición de la dopamina-quinona es necesario usar **MBTH** (3-Metil-2-benzotiazolinona hidrazona), un potente nucleófilo que se une a esta quinona, generando un aducto soluble y estable que aumenta considerablemente la sensibilidad del método espectrofotométrico (1, 2).

Para el cálculo de K_M y V_m se necesita medir la velocidad inicial de la reacción a distintas concentraciones de sustrato, utilizando una concentración constante y adecuada de enzima. Para ello, se realizan primero varias curvas de progreso (absorbancia frente a tiempo) utilizando distintas concentraciones de sustrato.



La pendiente de la tangente a la curva de progreso para $t=0$ es la velocidad inicial (v_0). Si la primera parte de la curva es lineal, no es necesario trazar la tangente en el origen y basta calcular la pendiente en esa zona lineal:

$$V_0 = \frac{\Delta Abs}{\Delta t}$$

Con los datos de velocidad inicial para cada una de las concentraciones de sustrato ya se puede calcular K_M y V_m . Se suele realizar gráficamente mediante la representación de Lineweaver-Burk:

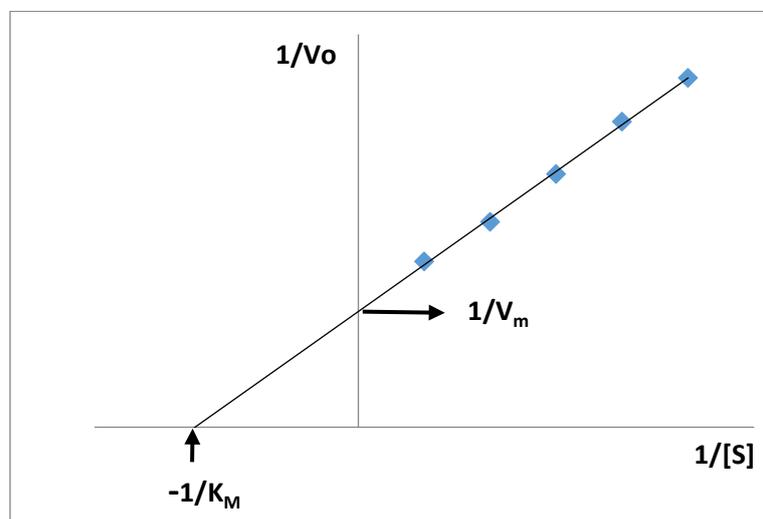
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

En el punto de corte con el eje de ordenadas :

$$\frac{1}{[S]} = 0 ; \frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_m}$$

En el punto de corte con el eje de abscisas:

$$\frac{1}{V_0} = 0 ; \frac{1}{[S]} = \frac{1}{K_M}$$



Utilidad de determinar los parámetros K_M y V_m de una enzima

La K_M establece un valor aproximado para el nivel intracelular de sustrato. Es poco probable que este nivel sea apreciablemente mayor o menor que K_M . Si $[s]_i \ll K_M$, la velocidad será muy sensible a cambios de $[s]_i$, pero no se utilizará todo el potencial catalítico de la enzima, pues la velocidad siempre será menor que V_m . Por otro lado, si $[s]_i \gg K_M$, la velocidad será insensible a pequeñas diferencias de $[s]_i$. En esas condiciones, la diferencia entre la velocidad correspondiente a $[s]_i = K_M$ y la correspondiente a $[s]_i \gg K_M$ sería sólo el doble.

Midiendo los efectos de diferentes compuestos sobre K_M y V_m , se pueden identificar inhibidores enzimáticos y el tipo de inhibición que producen.

La K_M indica la afinidad relativa de los distintos compuestos que pueden ser sustratos de una determinada enzima. Conociendo K_M se pueden ajustar las condiciones de ensayo, de manera que $[s] \gg K_M$ y así determinar V_m , que es proporcional a la cantidad total de enzima $\{V_m = K_2 [E]_t\}$. Esto tiene aplicación en la determinación de las actividades séricas de enzimas que se utilizan en clínica como marcadores de ciertas patologías (fosfatasas, transaminasas, lactato DH, etc...)

REACTIVOS

- Tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7
- Dopamina 3.33 mM (en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7)
- MBTH 40mM (en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7)

TÉCNICA

1.- Obtención del extracto enzimático

Después de lavar con agua destilada, se pesan y trocean unos 10 g de champiñones. Se homogenizan en 30 mL de tampón fosfato 100 mM, pH 7, con un homogeneizador de aspas.

El homogenado se centrifuga durante 15 min a 10.000 rpm Si es necesario, el sobrenadante obtenido se filtra (filtro de pliegues) hasta la obtención de un extracto claro. El filtrado es el extracto enzimático concentrado.

El extracto anterior se separa en fracciones, que se congelan. Antes de realizar cada ensayo, se descongelan las fracciones necesarias. No se debe volver a congelar lo que sobra. Asimismo, aunque la primera experiencia vaya a llevarse a cabo inmediatamente después de la obtención del extracto, se debe congelar previamente éste.

2.- Determinación de la concentración óptima de enzima

Se preparan diluciones del extracto enzimático concentrado (1/5, 1/10, 1/20, 1/25...) y se realiza un ensayo enzimático con cada una de ellas (extractos enzimáticos diluidos), según el siguiente esquema operativo:

Compuesto	Concentración inicial	Volumen
Dopamina	3,33mM	750 μ l
MBTH	40mM	50 μ l

1. En un tubo eppendorf se mezclan la dopamina y el MBTH, se mezcla en el vortex y se transvasa a una cubeta de espectrofotómetro. Se ajusta el valor de absorbancia a 503 nm a cero.
2. Se deja la cubeta dentro del espectrofotómetro e **inmediatamente después de haber ajustado el cero**, se añaden **200 μ l del extracto enzimático** elegido, a la vez que se empieza a contar el tiempo.
3. Se realizan lecturas cada 20 segundos durante 3-4 minutos.

Se considera óptima la dilución que permite una relativa estabilización de la absorbancia en 8-12 medidas, sin superar las 0,8 unidades de absorbancia.

3.- Determinación de K_M y V_m

Se utiliza la dilución de enzima considerada óptima en el apartado 2 (dilución 1:20 en tampón fosfato) y se realizan ensayos enzimáticos variando la concentración de sustrato, según el siguiente esquema operativo:

[S] (mM) (dopamina)	T. Fosfato	Dopamina	MBTH 40 mM
0,1	720 μ l	30 μ l	50 μ l
0,2	690 μ l	60 μ l	50 μ l
0,5	600 μ l	150 μ l	50 μ l
1	450 μ l	300 μ l	50 μ l
2	150 μ l	600 μ l	50 μ l

1. Se rotulan los tubos eppendorf correspondientes a cada punto.
2. En cada tubo eppendorf se mezclan el tampón fosfato y la dopamina correspondientes. Se mezcla en el vortex.
3. En el primero de los tubos se añade el MBTH, se mezcla y se transvasa a una cubeta de espectrofotómetro. Se ajusta el valor de absorbancia a 503 nm a cero.
4. **Inmediatamente después de haber ajustado el cero**, se añaden **200 μ l del extracto enzimático** (mezclar), a la vez que se empieza a contar el tiempo y se introduce en el espectrofotómetro(*)
5. Se realizan lecturas cada 20 segundos, durante 3 minutos.
6. Anotar los resultados en la tabla del apartado 4.
7. Se repite el mismo ensayo, del punto 3 al 6, con el resto de los tubos
8. Lavar las cubetas inmediatamente después de acabar y antes de realizar los cálculos

(*) La dopamina es sensible a la luz y al oxígeno del aire, por lo que sufre una oxidación espontánea a temperatura ambiente y en ausencia de enzima alguno. El producto de esta oxidación espontánea reacciona también con el MBTH de la mezcla, por lo que las muestras, antes de ser expuestas al enzima, ya tiene algo de color rosado. Este es el motivo por el que es necesario que cada muestra sea su propio blanco, justo en el momento inmediatamente anterior a que el enzima sea añadido.

- Una vez que se ha lavado el material, se procede a calcular K_M y V_m , de acuerdo con el siguiente protocolo:

4.- Tratamiento de los datos.

tiempo	Dopamina 0,1 mM	Dopamina 0,2 mM	Dopamina 0,5 mM	Dopamina 1 mM	Dopamina 2 mM
20 s					
40 s					
1 min					
1 min 20 s					
1 min 40 s					
2 min					
2 min 20 s					
2 min 40 s					
3 min					

- Dibujar la curva de progreso de la reacción (Absorbancia/tiempo) para las distintas concentraciones de dopamina.
- Calcular las velocidades iniciales de la reacción para cada concentración de sustrato.

Rellenar la siguiente tabla:

[S] = [dopamina]	V_0	1/[s]	1/ V_0
0,1 mM			
0,2 mM			
0,5 mM			
1,0 mM			
2,0 mM			

- Representar Lineweaver-Burk ($1/V_0$ frente a $1/[S]$). Calcular la K_M y la V_m .

CUESTIONES

- Expresar V_m en unidades de concentración, sabiendo que $\epsilon_{503} = 42500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el aducto MBTH-dopamina quinona.
- ¿Qué ocurriría si la reacción se ensayara a 4°C , en lugar de a temperatura ambiente?
- Si se empleara una dilución distinta del extracto enzimático, ¿qué le ocurriría a K_M y a V_m ?

BIBLIOGRAFÍA

- Espín JC, Varón R, Fenoll LG, Gilabert MA, García-Ruiz PA, Tudela J, García-Cánovas F. (2000) Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. Eur J Biochem. 267(5), 1270-1279.
- Winder AJ, Harris H. (1991) New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase. Eur J Biochem. 198(2), 317-26.

CINÉTICA ENZIMÁTICA II: INHIBICIÓN ENZIMÁTICA (CÁLCULO DE K_i)

1. FUNDAMENTO

Los inhibidores enzimáticos son moléculas químicas, en general de pequeño tamaño molecular, en cuya presencia se produce una reducción de la actividad enzimática. Desde el punto de vista de su mecanismo de acción, los inhibidores enzimáticos pueden unirse al centro activo del enzima (inhibidores competitivos) o a otra zona específica (inhibidores no competitivos).

La cinética de la inhibición competitiva responde a la siguiente ecuación:

$$V_o = \frac{V_m [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

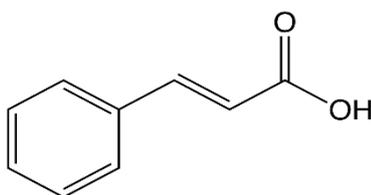
En esta ecuación, K_i es la constante de inhibición, característica para cada par de enzima-inhibidor. Existen distintos tipos de representaciones gráficas para el cálculo de la K_i . En clase de teoría se habrá estudiado la representación de Lineweaver-Burk, que es válida para el cálculo de la K_i de los tres tipos principales de inhibición (competitiva, no competitiva y acompetitiva)

Representación de Lineweaver-Burk : ($1/V_o$ versus $1/[S_o]$)

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_M}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{1}{[S_o]} + \frac{1}{V_m}$$

2. PROCEDIMIENTO

Se pretende estudiar la cinética de la inhibición del ácido cinámico (β -fenil-acrílico) sobre la actividad de la tirosinasa de champiñón, cuyos parámetros en ausencia de inhibidor de han caracterizado en la práctica *Cinética Enzimática I*.



Ácido cinámico

Para la caracterización de este inhibidor habrá que calcular la velocidad inicial a diferentes dosis de sustrato en presencia una concentración fija de inhibidor (0.5 mM)

3. REACTIVOS

- Tampón fosfato sódico 100 mM pH 7.0
- Dopamina 3.33 mM (en tampón fosfato sódico 100 mM pH 7.0)
- Ácido Cinámico 4 mM (en tampón fosfato sódico 100 mM pH 7.0)
- Extracto enzimático ya diluido a la concentración de uso

4. TÉCNICA

A- Determinación de K_M y V_m

Según el siguiente esquema operativo:

[S] (mM) (dopamina)	T. Fosfato	Dopamina	MBTH 40 mM	Cinámico
0,1	595 μ l	30 μ l	50 μ l	125 μ l
0,2	565 μ l	60 μ l	50 μ l	125 μ l
0,5	475 μ l	150 μ l	50 μ l	125 μ l
1	325 μ l	300 μ l	50 μ l	125 μ l
2	25 μ l	600 μ l	50 μ l	125 μ l

1. Se rotulan los tubos eppendorf correspondientes a cada punto.
2. En cada tubo eppendorf se mezclan el tampón fosfato, la dopamina y el cinámico correspondientes. Se mezcla en el vortex.
3. En el primero de los tubos se añade el MBTH, se mezcla y se transvasa a una cubeta de espectrofotómetro. Se ajusta el valor de absorbancia a 503 nm a cero.
4. **Inmediatamente después de haber ajustado el cero**, se añaden **200 μ l del extracto enzimático** (mezclar), a la vez que se empieza a contar el tiempo y se introduce en el espectrofotómetro(*)
5. Se realizan una lectura a los 20 segundos y otra a los 40 segundos.
6. Anotar los resultados en la tabla del apartado B.
7. Se repite el mismo ensayo, del punto 3 al 6, con el resto de los tubos
8. Lavar las cubetas inmediatamente después de acabar y antes de realizar los cálculos

(*) La dopamina es sensible a la luz y al oxígeno del aire, por lo que sufre una oxidación espontánea a temperatura ambiente y en ausencia de enzima alguno. El producto de esta oxidación espontánea reacciona también con el MBTH de la mezcla, por lo que las muestras, antes de ser expuestas al enzima, ya tiene algo de color rosado. Este es el motivo por el que es necesario que cada muestra sea su propio blanco, justo en el momento inmediatamente anterior a que el enzima sea añadido.

- Una vez que se ha lavado el material, se procede a calcular K_M y V_m , de acuerdo con el siguiente protocolo:

B.- Tratamiento de los datos.

tiempo	Dopamina 0,1 mM	Dopamina 0,2 mM	Dopamina 0,5 mM	Dopamina 1 mM	Dopamina 2 mM
20 s					
40 s					

- Calcular las velocidades iniciales de la reacción para cada concentración de sustrato

	Dopamina 0,1 mM	Dopamina 0,2 mM	Dopamina 0,5 mM	Dopamina 1 mM	Dopamina 2 mM
Velocidad (Abs/min)					

Rellenar la siguiente tabla:

[S] = [dopamina]	V_0	1/[s]	1/ V_0
0,1 mM			
0,2 mM			
0,5 mM			
1,0 mM			
2,0 mM			

- Representar según Lineweaver-Burk ($1/V_0$ frente a $1/[S]$).
- **REPRESENTAR EN LA MISMA GRÁFICA LA RECTA DE LA CINÉTICA I Y LA OBTENIDA EN PRESENCIA DEL INHIBIDOR. Calcular su K_M y la V_m . DETERMINAR CON ESOS DATOS DE QUÉ TIPO DE INHIBIDOR SE TRATA**

CUESTIONES

1. Hacer una interpretación de los valores obtenidos para la K_M y la V_m
2. Según los resultados obtenidos, definir qué tipo de inhibidor es el ácido cinámico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Espín JC, Varón R, Fenoll LG, Gilabert MA, García-Ruiz PA, Tudela J, García-Cánovas F. (2000) Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. Eur J Biochem. 267(5), 1270-1279.
2. Winder AJ, Harris H. (1991) New assays for the tyrosine hydroxylase and DOPA oxidase activities of tyrosinase. Eur J Biochem. 198(2), 317-26.

DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES FOSFATASA ALCALINA Y GAMMA GLUTAMIL TRANSFERASA

La alteración de la concentración sérica de una enzima determinada orienta sobre los tejidos que probablemente estén afectados, aunque son raras las enzimas exclusivas de un tejido. En el caso del diagnóstico de enfermedad hepática en un principio se realiza una historia clínica detallada, una buena exploración física (ictericia, hinchazón abdominal, prurito, fatiga...) y una serie de pruebas de laboratorio que reflejan una posible alteración en la función de este órgano. Frecuentemente es necesario el análisis de dos o más enzimas séricas para la aproximación a un diagnóstico fiable.

1. FOSFATASA ALCALINA

La fosfatasa alcalina es una enzima, implicada en el transporte de metabolitos a través de las membranas celulares, que hidroliza el enlace éster fosfórico entre un grupo fosfato y un radical orgánico a pH básico liberando fosfato inorgánico. Se encuentra presente en casi todos los tejidos del organismo, siendo particularmente alta en huesos, hígado, placenta, intestinos y riñón. Se han descrito distintas isoenzimas de la fosfatasa alcalina, con leves diferencias en su estructura. La concentración de esta enzima en suero varía en función de la edad:

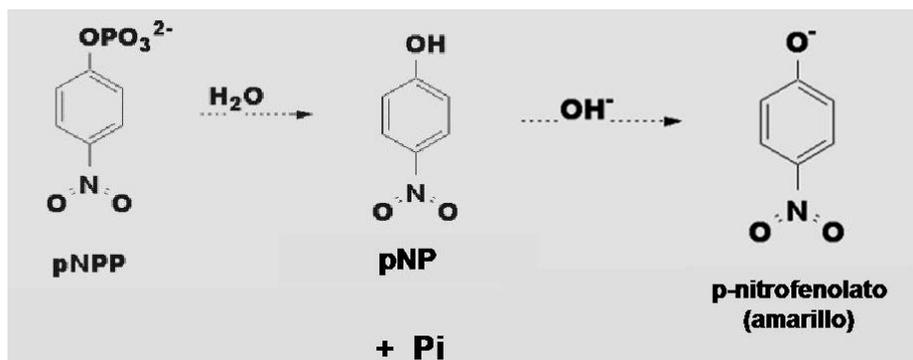
Adultos	40 a 140 U/L
Niños menores de 2 años	85-235 U/L
Niños entre 2 y 8 años	65-120 U/L
Niños entre 9 y 15 años	60-300 U/L
Adolescente 16-21 años	30-200 U/L

1.1. Importancia clínica

Las causas más probables del aumento de los niveles de concentración de la fosfatasa alcalina son por consumo abusivo de alcohol, anemia, cáncer de huesos, cáncer de próstata, colestasis, enfermedades de huesos, enfermedades de hígado, enfermedades renales, por la enfermedad de Paget. Pueden observarse elevaciones moderadas debido a la presencia de fracturas óseas o debido a una hepatitis infecciosa. Mientras que las causas más probables de la disminución de los niveles de esta enzima son el cretinismo y el déficit de vitamina C.

1.2. Determinación de la fosfatasa alcalina

Se utiliza como sustrato el p-nitrofenilfosfato (pNPP). La fosfatasa alcalina cataliza la hidrólisis del pNPP a p-nitrofenol (pNP) y fosfato, en un medio básico. La reacción se detiene con NaOH y la absorbancia del pNP se puede medir en un espectrofotómetro a 405 nm.



Material:

- Cubeta de colorímetro
- Colorímetro

Reactivos:

- Tampón carbonato 0,1M, pH 10,2.
- p-nitrofenilfosfato 10 mM.
- D-Manitol 200 mM.
- MgCl₂ 3 mM.
- p-Nitrofenol 1 mM.
- NaOH 3 N.

Procedimiento experimental:

- Pipetear en cada uno de los tubos las cantidades indicadas y agitar en vortex.

DETERMINACIÓN DE LA FOSFATASA ALCALINA										
Tubo	Tampón Carbonato 0.1M pH 10.2	Manitol 200 mM	Cl ₂ Mg 3 mM	pNP (1 mM) Producto	pNPP (10mM) Sustrato	Muestra	Reacción	NaOH 3N	Abs 405 nm	CONC
Blanco	800 µl	100 µl	100 µl	---	---	---	Volumen final = 1000 µl Incubar a 30°C 15 min	Parar la reacción con 1000 µl		0 µmol/L
1	790 µl	100 µl	100 µl	10 µl	---	---				10 µmol/L
2	775 µl	100 µl	100 µl	25 µl	---	---				25 µmol/L
3	750 µl	100 µl	100 µl	50 µl	---	---				50 µmol/L
4	700 µl	100 µl	100 µl	100 µl	---	---				100 µmol/L
5	600 µl	100 µl	100 µl	200 µl	---	---				200 µmol/L
Muestra	650 µl	100 µl	100 µl	---	100 µl	50 µl				

- Se incuban los tubos durante 15 minutos a 30° C.
- Detener la reacción con 1000 µL /tubo de NaOH 3N.
- Leer Absorbancia a 405 nm.

Cuestiones:

1. Representar la concentración de pNitrofenol (µM) frente a la absorbancia.
2. Interpolar los valores de absorbancia obtenidos en el ensayo enzimático.
3. Expresar los resultados obtenidos como U/L (µmol/min/L).

2. GAMMA GLUTAMIL TRANSFERASA

La gamma glutamil transferasa (γ -GT) es una enzima que regula el transporte de aminoácidos a través de la membrana celular, catalizando la transferencia de un grupo glutamilo desde el glutatión a aminoácidos libres. Esta enzima se encuentra en la mayoría de los órganos corporales, excepto los músculos. La actividad que se registra en el plasma sanguíneo se la atribuye fundamentalmente a la isoenzima hepática.

En los hombres adultos sanos la concentración de la enzima es menor de 38 U/L mientras que en las mujeres adultas sanas es menor de 25 U/L, cuando el análisis se realiza a 30° C.

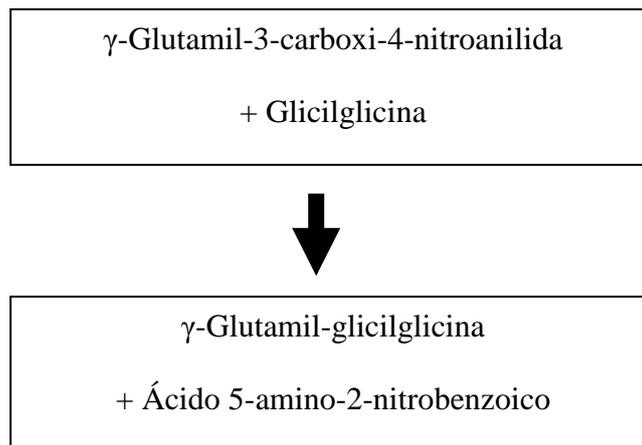
Importancia clínica

La determinación de los niveles de esta enzima es el método más útil para el diagnóstico de las enfermedades hepatobiliares como obstrucción hepática, la cirrosis o los tumores. La actividad elevada persistente de γ -GT se asocia con alcoholismo crónico y diversas formas de enfermedades hepáticas producidas por el alcohol. El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta el resultado de un único ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

Hay que tener en cuenta además que ciertos medicamentos pueden alterar sus valores: el alcohol, el fenobarbital y la fenitoína los eleva, mientras que los anticonceptivos orales los puede disminuir.

Determinación de gamma glutamil transferasa

Se utiliza un sustrato sintético de la gamma glutamil transferasa, que en este caso es γ -glutamilo-3-carboxi-4-nitroanilida. Esta enzima cataliza la transferencia del grupo γ -glutamilo a la glicilglicina, quedando 5-amino-2-nitrobenzoico que presenta su máximo de absorción de luz a una longitud de onda de 405 nm.



Material:

- Cubeta de colorímetro
- Colorímetro

Reactivos:

- Tampón Tris 100 mM pH 8,25.
- γ -glutamyl-3-carboxi-4-nitranilida 3mM y glicilglicina 100 mM.

Muestra:

- Suero

Procedimiento experimental:

1. Pipetear en cada uno de los tubos las cantidades indicadas y agitar en vórtex.
2. Ajustar el espectrofotómetro a cero con el blanco y leer las absorbancias a 405 nm cada dos minutos durante 10 minutos.

				tiempo (minutos)				
Tubo	H ₂ O	Sustrato	Suero	2	4	6	8	10
Blanco	2,1 mL	-----	-----	---	---	---	---	---
1	1 mL	1 mL	0.1 mL					

Cuestiones:

1. Hallar la concentración de la actividad enzimática [AE] en U/L ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$) de la gamma glutamil transferasa:

$$\frac{\Delta\text{Abs}}{\Delta t (\text{min})} = \varepsilon \times l \times [\text{AE}]$$

[AE]= concentración de la actividad enzimática (mol/min/L)

ΔAbs = Variación de absorbancia

$l = 1 \text{ cm}$ sección de la cubeta

$\varepsilon = 9,25 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \times \text{L} \times \text{cm}^{-1}$ (coeficiente de extinción molar del 5-amino-2-nitrobenzoato)

2. Discutir los resultados obtenidos con las dos enzimas analizadas.

