



Facultad de Química

Departamento de Bioquímica

Manual de prácticas de Bioquímica experimental (0141)

**Elaborado por la Dra. Sobeida Sánchez Nieto
con la aportación y colaboración de la coordinadora del laboratorio de
Bioquímica experimental la M. en C. Luz del Carmen Castellanos**

**Editora:
Dra. Nahieli Greaves Fernández**

Se agradece también a los siguientes profesores por su contribución a los protocolos

Luz Del Carmen Castellanos

Maestra en Ciencias Químicas, especialidad Bioquímica, Facultad de Química, UNAM. Coordinadora del laboratorio de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM. Profesora del curso Bioquímica experimental.

Alicia Cervantes Peredo

Maestra en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, UNAM. Investigadora del Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga, México, DF. Profesora del curso Introducción a la Genómica.

Marisol López López

Doctora en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, UNAM. Profesora de la UAM Xochimilco. Profesora del curso Introducción a la Genómica.

Carmina Montiel

Doctora en Ciencias Químicas, Facultad de Química, UNAM. Profesora del curso Bioquímica experimental.

María del Carmen Parra González

Maestra en Ciencias Químicas, especialidad Bioquímica, Facultad de Química, UNAM. Profesora del curso Bioquímica experimental.

Sobeida Sánchez Nieto

Doctora en Ciencias Químicas, especialidad Bioquímica, Facultad de Química, UNAM. Profesor-investigador de la Facultad de Química, UNAM. Profesora del curso de Bioquímica Experimental.

Lilian González Segura

Doctora en Ciencias Químicas, especialidad Bioquímica, Facultad de Química, UNAM. Profesor-investigador de la Facultad de Química, UNAM. Profesora del curso de Bioquímica Experimental.

Diana Sánchez Rangel

Doctora en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM. Profesora del curso Bioquímica experimental.

CONTENIDO

- Sección I** Introducción al laboratorio de Bioquímica
 Parte I: Reporte científico
 Parte II: Revisión de métodos espectroscópicos y elaboración de curva estándar de proteínas
- Sección II** Estructura y propiedades de proteínas: Purificación de la enzima lactato deshidrogenasa de músculo esquelético de pollo
 Parte I. Extracción y precipitación por salado.
 Parte II. Purificación por cromatografía de intercambio iónico y de afinidad
 Parte III. Monitoreo del proceso de purificación. A. Determinación de concentración de proteínas.
 Monitoreo del proceso de purificación. B. Separación por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
- Sección III** Actividad enzimática usando la lactato deshidrogenasa
 Parte I. Curvas temporales de actividad enzimática de la lactato deshidrogenasa de músculo esquelético de pollo.
 Parte II. Factores que modifican la actividad de las enzimas: Efecto de la concentración de sustrato y de un inhibidor sobre la actividad de la lactato deshidrogenasa de músculo de pollo.
- Actividad enzimática usando la fosfatasa alcalina de leche
 A. Curva patrón de p-nitrofenol fosfato
 B. Progreso de la reacción enzimática
 C. Determinación del efecto del pH
 D. Determinación del efecto de la temperatura
 E. Efecto de la concentración de sustrato
 F. Efecto de la concentración de un inhibidor
- Sección IV** Estructura, propiedades y función de ácidos nucleicos
 Transferencia de material genético I. Conjugación
 Transferencia de material genético II: Transformación
 ➤ Aislamiento de plásmidos
 ➤ Ensayos de restricción de plásmido
 ➤ Inducción de proteína recombinante
- Sección V** Regulación genética en el operón lac
- Sección VI** Relación Fenotipo-Genotipo

1. INTRODUCCIÓN AL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

PARTE I: REPORTE CIENTÍFICO

Objetivos

- Conocer la importancia de realizar un reporte científico.
- Conocer las características y partes de un reporte científico: Introducción, hipótesis, objetivo, métodos, resultados, discusión y conclusiones y referencias.
- Conocer cómo se formulan las hipótesis.
- Aprender a plantear hipótesis.
- Aprender a realizar un reporte científico.

Actividades sugeridas

1. El profesor proporcionará al menos un artículo de investigación para que los alumnos identifiquen y analicen en éste las partes de un reporte. Cada equipo deberá presentar qué secciones tiene su artículo y si éstas cumplen con las características indicadas en el texto. Los alumnos deben encontrar la hipótesis aunque ésta no esté planteada con la estructura descrita aquí, sino como una pregunta de investigación. Se puede sugerir a los alumnos que, con base en la información presentada en el artículo y la pregunta de investigación, planteen la hipótesis de la forma como se sugiere en este manual.
2. Asignar un problema a resolver por equipo o solicitar que los estudiantes elijan el problema a solucionar. Permitir que los estudiantes formulen hipótesis y diseñen un experimento para comprobarla. Se podrán realizar al menos dos formas diferentes de reporte: La primera podría ser un reporte oral al final de la sesión (simulando un congreso) y la segunda un reporte escrito para la siguiente sesión.

Cuestionario

1. ¿Qué finalidad persigue el científico al escribir y publicar un artículo científico?
2. Investiga cómo se lleva a cabo el **diseño** de un experimento e incluye ¿qué son las variables independientes, las dependientes y las del control?
3. ¿Qué estructura debe tener una hipótesis?
4. ¿Cuáles son las secciones de un reporte científico?
5. ¿Qué diferencia(s) hay entre la sección de resultados y la discusión?
6. ¿Qué información bibliográfica deben contener las referencias, si son libros, artículos o catálogos o páginas de internet?

Referencias

- Day, Robert A. *How to Write and Publish a Scientific Paper*. 4th edition. Phoenix, AZ: Oryx Press, 1994.
- Williams, Joseph M. *Style: Ten Lessons in Clarity and Grace*. 6th edition. New York: Longman, 2000.

PARTE II: REVISIÓN DE MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS Y ELABORACIÓN DE CURVA ESTÁNDAR DE PROTEÍNA

Objetivos

- Conocer el manejo de micropipetas y espectrofotómetros.
- Aplicar un método espectrofotométrico para medir la concentración de una proteína.
- Construir curvas de calibración y comprender su importancia.
- Determinar el intervalo de sensibilidad de una curva estándar.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Material y equipo

Celdas de metacrilato grado UV para espectrofotómetro

Tubos de microfuga

1 gradilla para tubos de microfuga

1 caja con puntas de 200 μL (amarillas) para micropipeta.

1 caja con puntas de 1000 μL (azules) para micropipeta.

1 Micropipeta 10 μL

1 Micropipeta 20-200 μL

1 Micropipeta 200-1000 μL

Vórtex

Espectrofotómetro (por grupo)

Reactivos

- Albúmina de suero bovino (**BSA**) a una concentración de **1 mg/mL**.
- Solución problema de proteínas (los profesores la proporcionarán)
- Solución de carbonato-tartrato-cobre (CTC; 10% Na_2CO_3 , 0.1 % CuSO_4 y 0.2 % de tartrato de Na^+ y K^+)
- 10% Dodecilsulfato de sodio (SDS)
- 0.8 N NaOH
- **Reactivo A.** Se prepara inmediatamente antes de usarse con partes iguales de CTC, 10% SDS, 0.8 N NaOH y H_2O destilada.
- **Reactivo B.** Dilución del reactivo de Folin-Ciocalteu. 1 volumen de reactivo + 5 volúmenes de H_2O . Guardar en frasco ámbar. Preparar preferentemente poco antes de usarse.

Desarrollo experimental

Determinación de proteínas por el método de Lowry.

1. Rotular los tubos de microfuga y adicionar los reactivos en el orden que se indica en la Tabla 1.2. **Recuerda:** debes mezclar con el vórtex después de añadir cada una de las soluciones.

Tabla 1.1. Reactivos y cantidades a añadir para realizar una curva patrón de BSA y la determinación de la concentración de proteínas de una muestra problema, utilizando el método de Lowry para su determinación.

| Tubo | H ₂ O | BSA (1mg/mL) | Reactivo A | Reactivo B | Incubar a temperatura ambiente por 30 min | A _{750nm} | |
|------|------------------|----------------------|------------|------------|---|--------------------|-------------------------------|
| 1 | 450 µL | — | 500 µL | 250 µL | | | |
| 2 | 445 µL | 5 µL | 500 µL | 250 µL | | | |
| 3 | 440 µL | 10 µL | 500 µL | 250 µL | | | |
| 4 | 435 µL | 15 µL | 500 µL | 250 µL | | | |
| 5 | 430 µL | 20 µL | 500 µL | 250 µL | | | |
| 6 | 425 µL | 25 µL | 500 µL | 250 µL | | | |
| 7 | 420 µL | 30 µL | 500 µL | 250 µL | | | |
| 8 | 415 µL | 35 µL | 500 µL | 250 µL | | | |
| Tubo | H ₂ O | Muestra Problema* | Reactivo A | Reactivo B | | A _{750nm} | **Cantidad de Proteína(µg) |
| 9 | 425 µL | 25 µL | 500 µL | 250 µL | | | |
| 10 | 400 µL | 50 µL | 500 µL | 250 µL | | | |

* La muestra problema la prepararán y entregarán los profesores.

** Calcular la cantidad de proteína que contiene cada tubo de acuerdo a los µL que se añadieron del estándar de BSA. En el caso de la muestra problema, calcular la cantidad de proteína utilizando los datos de la regresión de la curva estándar generada.

2. Incubar las muestras a temperatura ambiente durante 30 min.
3. Encender el espectrofotómetro y seleccionar la λ de 750 nm.
4. Colocar la mezcla en cada celda, pueden usar una celda y leer en orden creciente de concentración o bien usar celdas distintas para cada estándar (se les proporcionarán 6 celdas por equipo)
5. Ajustar el espectrofotómetro con la disolución del primer tubo de la tabla (sin BSA).
6. Realizar las lecturas.
7. Llenar la tabla con los datos de absorbancia.
8. Construir la gráfica de absorbancia vs. cantidad de proteína (µg).
9. Con los datos de regresión lineal y la alícuota de proteína añadida al ensayo, calcular la concentración de la proteína en la muestra (µg/µL o mg/mL).

Cuestionario

1. Investiga qué factores contribuyen en la desviación de la línea recta al graficar la absorbancia contra concentración (desviaciones a la ley de Beer).
2. ¿Cuáles son los principales métodos colorimétricos usados en la determinación de proteínas?
3. ¿Qué sustancias pueden interferir con la determinación de proteínas por el método de Lowry?
4. Investiga cuál de los siguientes métodos es más sensible y menos costoso para determinar la concentración de proteínas de una muestra: Lowry, Absorbancias 280 nm y Bradford.
5. De acuerdo con tus resultados, ¿cuál es el intervalo en el que se podría determinar la concentración de una proteína en una muestra utilizando la curva estándar de determinación de proteínas por Lowry? Da una explicación.
6. ¿Cuáles son las aplicaciones de una curva de calibración o estándar?

Referencias

- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. 1982. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Springs Harbor, NY.
- Stoscheck CM. Quantitation of Protein. 1990. *Methods in Enzymology* 182, 50-69.
- Peterson GL. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 83, 346-356.
- Wang Y, Wade H, Wong E-T, Li YC, Rodewald LW, Wahl GM 2007. Quantitative analyses reveal the importance of regulated Hdmx degradation for P53 activation. *PNAS* 104 (30), 12365-12370.

2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE PROTEÍNAS.

PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA LACTATO DESHIDROGENASA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE POLLO.

PARTE I. EXTRACCIÓN Y PRECIPITACIÓN POR SALADO.

Objetivos

- Conocer las propiedades fisicoquímicas de las proteínas: carga, punto isoeléctrico, masa molecular y afinidad.
- Conocer las diferentes estrategias utilizadas para aislar proteínas a partir de diferentes fuentes celulares.
- Relacionar las propiedades fisicoquímicas de las proteínas con el fundamento de las técnicas utilizadas en la purificación de proteínas: Centrifugación diferencial, precipitación por salado, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad.
- Aplicar las técnicas de centrifugación y precipitación por salado como técnicas iniciales de purificación de una proteína.

DISEÑO EXPERIMENTAL

En esta práctica se purificará la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) de músculo de pollo. En la **primera parte** del protocolo de purificación se realizará la clarificación de la muestra mediante filtración y centrifugación y posteriormente se llevarán a cabo dos pasos secuenciales de precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. En la **siguiente sesión** se realizará el desalado de la muestra mediante filtración en gel, para al final purificarla mediante una columna de intercambio iónico o de afinidad. Posteriormente, en la **tercera parte** del protocolo se evaluará el rendimiento al determinar la cantidad total de proteína y por último, en la **cuarta parte** del protocolo, se determinará su pureza al realizar la separación de las muestras proteicas y visualización en un gel de poliacrilamida-SDS.

PRIMERA PARTE

Información necesaria para realizar la purificación

Para iniciar el proceso de purificación de una proteína primero se deben conocer las características de esta, en este caso en particular las propiedades de la lactato deshidrogenasa de pollo, por lo que se te solicita lo siguiente:

- Investiga cuáles son las propiedades de la lactato deshidrogenasa de pollo (lactate dehydrogenase from *Gallus gallus* cualquiera de las dos isoformas la A o la B), como la localización subcelular, su secuencia primaria de aminoácidos, su pI (punto isoeléctrico), el número de residuos cargados positivamente y negativamente la actividad enzimática que cataliza, peso molecular, estructura terciaria y/o cuaternaria.

Para lograrlo debes obtener la secuencia de la proteína de preferencia en formato FASTA. La secuencia en FASTA comienza con una línea de descripción seguida por líneas de datos de secuencia de nucleótidos o aminoácidos. La línea de descripción comienza con el símbolo >.

Se sugieren las siguientes ligas para encontrar la información que se te solicita:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (buscar nucleotide sequence o protein)

<http://www.uniprot.org/uniprot/P00340>

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

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

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

Para determinar el pI y el número de residuos de aminoácidos cargados

http://web.expasy.org/compute_pi/

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Material biológico

80 g de carne de pechuga de pollo por grupo.

Materiales y equipo para la extracción de la enzima (por grupo)

1 tijeras

1 espátula

1 recipiente para hielo

1 par de guantes de látex

Gasa

1 vaso de precipitados de 1L

1 probeta de 250 mL

1 probeta de 100 mL

4 botellas de centrifuga

Licuada

Balanza granataria

Balanza de dos platos

Materiales y equipo para la precipitación con sulfato de amonio

2 tubos para centrifuga con capacidad para 50 mL

1 recipiente para hielo

2 vasos de precipitados de 100 mL

1 espátula

Tubos para microfuga de 1.5 mL

1 gradilla para tubos de microfuga

1 caja con puntas de 200 μ L (amarillas) para micropipeta.

1 caja con puntas de 1000 μ L (azules) para micropipeta.

1 micropipeta 20-200 μ L

1 micropipeta 200-1000 μ L

1 bandeja pequeña

1 barra magnética

1 agitador magnético

Centrífuga (por grupo)

Balanza (por grupo)

Caja para almacenar tubos de microfuga en el congelador (por grupo)

Reactivos

- Amortiguador **A**: 20 mM Tris **pH 8.6**, 1 mM PMSF, 0.5 mM 2 β -mercaptoetanol
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido.

Desarrollo experimental

Importante. Todo el procedimiento deberá realizarse en frío (4°C). Mantener las soluciones y suspensión proteica en baño de hielo. **Después de cada paso de purificación se tomará una muestra para analizar posteriormente (en el protocolo de purificación se indica cuándo tomar las alícuotas).** Anotar en su libreta el peso del tejido utilizado, así como el volumen de la solución de homogeneización y los volúmenes resultantes después de cada uno de los pasos de purificación (Figura 2.1). **Estos valores son necesarios para calcular el rendimiento, contenido de proteína y actividad enzimática.**

A. Extracción. Esta primera parte la realizará el profesor con ayuda de un par de voluntarios y se distribuirá el homogeneizado a todos los equipos.

1. Cortar en trozos pequeños 80 g de tejido (eliminar el tejido conectivo y graso que acompaña a la carne) y colocarlos en un vaso de licuadora previamente enfriado (mantener el vaso en el cuarto frío hasta su uso).
2. Agregar 3 volúmenes de amortiguador A frío por cada g de tejido (240 mL) y licuar brevemente, hacerlo en pulsos de 3 seg/3 a 6 veces para evitar que la licuadora se caliente. Si se hace necesario añadir más volumen de amortiguador.
3. Filtrar la mezcla sobre dos capas de gasa grandes (previamente humedecidas con agua destilada). Exprimir **suavemente** sobre la pared de un embudo y recolectar el filtrado en un vaso de precipitados de 1L. **NOTA.** Puede tomarse una alícuota de esta fracción y denominarla **Fracción 0, sin embargo, la alta cantidad de colágeno gelatiniza esta fracción, por lo que es difícil obtener su determinación de proteínas.**
4. Distribuir el filtrado en botellas de centrifuga y centrifugar a 7,000 rpm a 4°C durante 10 min. Decantar con cuidado el sobrenadante en un vaso de precipitados de 1 L. Al sobrenadante lo denominamos homogeneizado total (**Fracción 1**). Apartar 1 mL de la fracción 1 en un tubos de microfuga y almacenar a -20°C para su posterior uso.

Nota: Tirar el contenido de la gasa en el recipiente preparado para su deshecho.

B. Precipitación con sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) por equipo.

5. El profesor distribuirá 15 mL de la fracción 1 por cada equipo
6. Colocar los 15 mL de F1 en un vaso de precipitados que contiene una barra magnética. Se recomienda colocar el vaso de precipitados en una bandeja pequeña con hielo sobre la parrilla de agitación para evitar que la solución se caliente.
7. Agitar el sobrenadante de manera continua y suave con un agitador magnético, mientras se añade lentamente sulfato de amonio sólido (4.89 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por 15 mL del sobrenadante). La agitación debe ser lo suficientemente vigorosa para evitar la formación de cúmulos de sal no disueltos, pero no demasiado fuerte porque se puede producir espuma. En **ningún momento** utilizar varilla de vidrio o espátula para disolver los grumos, ya que se pierde proteína en estos utensilios.
8. Cuando toda la sal se ha disuelto la solución se encuentra a una saturación del 55 % con sulfato de amonio.

9. La mezcla que ahora se encuentra turbia se vacía a un tubo de centrífuga de 50 mL y se centrifuga a 10,000 rpm a 4°C por 10 min.
10. Recolectar el sobrenadante (**Fracción 2**) en una probeta y registrar el volumen. Descartar el botón. Tomar 1 mL de la fracción 2 y almacenarla en un tubo de microfuga a -20°C para su posterior uso.
11. Calcular el peso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para obtener una solución al **75 %** de saturación, (0.125 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por cada mL del sobrenadante obtenido). Agitar como se describió anteriormente.
12. Una vez disuelto el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, colocar la mezcla turbia en un tubo de centrífuga. Centrifugar a 10,000 rpm a 4°C por 10 min y descartar el sobrenadante.
13. Resuspender el botón en 1 mL de agua. El volumen final es de aproximadamente 1.8 mL.
14. Distribuir en 3 tubos de microfuga y etiquetar como **Fracción 3**. Uno de los tubos debe contener 1000 μL , ese volumen se usará en el siguiente protocolo experimental. (Distribuir el restante en los otros dos tubos). Almacenar a -20°C.

SUGERENCIAS:

1. Para evitar la congelación y descongelación innecesaria de las muestras es conveniente que al final de esta sesión se almacenen las muestras en alícuotas y que se etiqueten apropiadamente.
2. Se recomienda sólo descongelar la alícuota una sola vez y después desecharla.

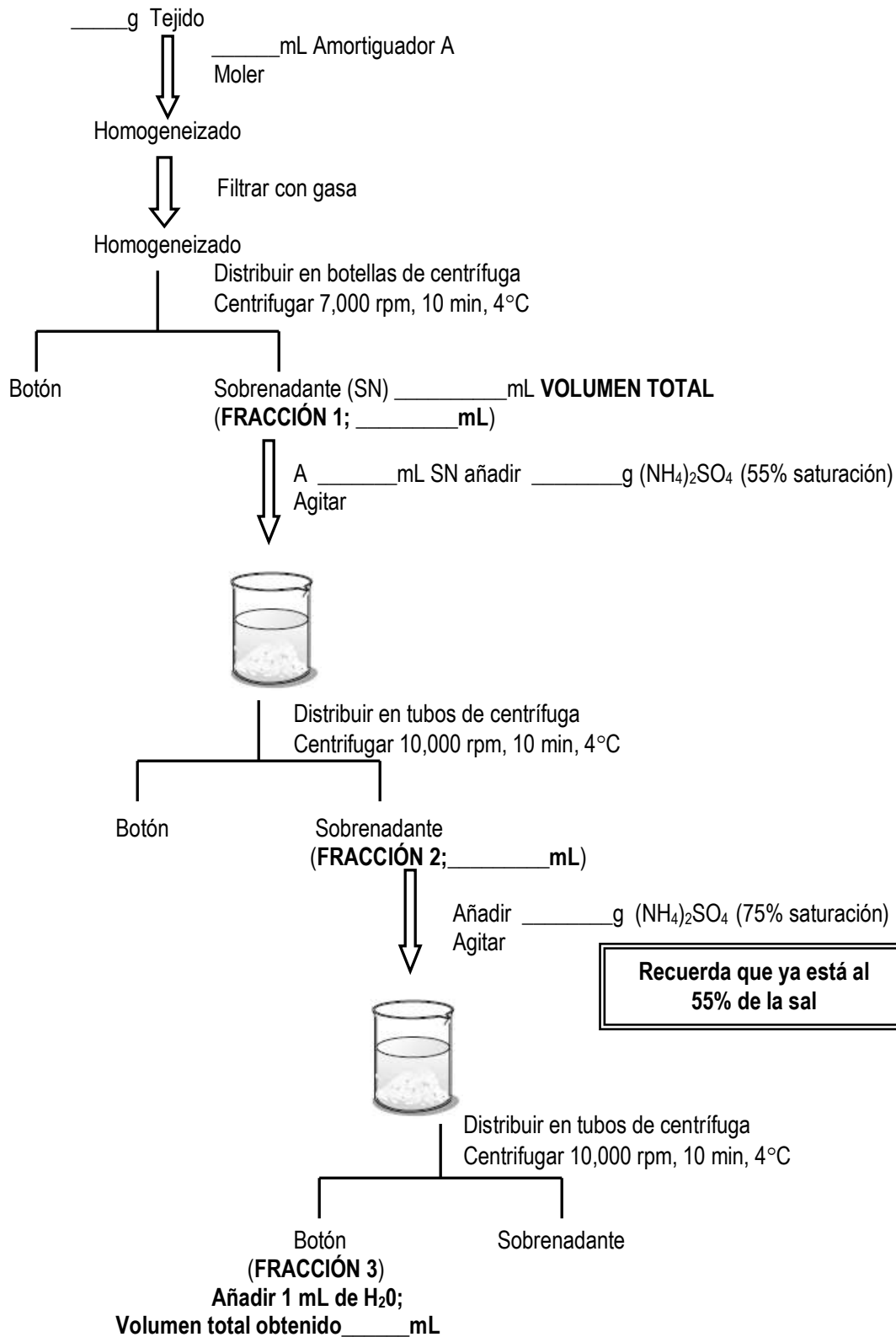


Figura 2.1 Esquema de purificación de la lactato deshidrogenasa mediante precipitaciones sucesivas con sulfato de amonio. Se sugiere llenar los espacios vacíos con las cantidades solicitadas.

Cuestionario

1. Menciona cuatro usos que se les puede dar a las proteínas purificadas
2. Dentro de la guía para purificar a una proteína se plantea que es importante establecer cuál va a ser el uso final de la proteína purificada. Explica por qué.
3. ¿Qué propiedades de la lactato deshidrogenasa se aprovecharán en cada paso de su purificación? (Ejemplos: carga, peso, solubilidad y unión a ligantes)
4. ¿Por qué es importante mantener la mezcla de proteínas a 4°C?
5. De acuerdo con la reacción que cataliza y su función en el organismo, ¿por qué crees que se seleccionó el músculo esquelético de pollo para aislar la lactato deshidrogenasa?
6. ¿Qué tipo de columna y eluyente recomiendas para su purificación y por qué?
7. Existen varios métodos en la literatura para purificar a la lactato deshidrogenasa, ¿por qué existe esa variedad si todos purifican a la misma proteína?
8. Menciona al menos dos proteínas que tienen actualmente un uso farmacéutico o médico y cuál es la fuente biológica de la que se obtienen.

Referencias

- Allen T, Mark W. 2004. Desalting, Concentration, and Buffer Exchange by dialysis and ultrafiltration. Current protocols in protein science 4.4.1-4.4.15. John Wiley & Sons Inc, New York, USA.
- Castle DJ. 2004. Overview of cell fractionation. Current protocols in protein science 4.1.1-4.1.9. John Wiley & Sons Inc, New York, USA.
- Devlin TM. Textbook of biochemistry with clinical correlations. Cuarta edición. 1997. John Wiley & Sons Inc, New York, USA. Pp 69-85. Localización **QP514.T4**
- Lehninger, A.L. 2005. Principios de Bioquímica. 4ª edición. Editorial Omega. Barcelona. pp. 191-237.
- Protein purification Handbook. 1999. Amhersham Pharmacia Biotech AB. Uppsala, Sweden. Code number 18-1132-29 Pp 94.
- Salem J. 2001. Enzymes: purification. Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons Ltd. Pp 1-7. Consultar la página www.els.net
- Sheehan D, O'Sullivan S. 2001. Ion exchange chromatography. Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons Ltd. Pp 1-4. Consultar la página www.els.net
- Voet D, Voet JG. Biochemistry. Segunda edición. 1995. John Wiley & Sons Inc, New York, USA. Pp 71-104
- Sitio del que se tomo parte de la metodología para la extracción de la lactato deshidrogenasa de pollo http://www.acad.carleton.edu/curricular/BIOL/classes/bio380/lab_protocol.html autor: John Tymoczko y actualizada por Rebecca Bryant

Sitios recomendados para

1. aprender sobre las características y propiedades de las proteínas <http://depa.pquim.unam.mx/proteinas/estructura/index.html> página desarrollada por el Dr. Rogelio Rodríguez Sotres.
2. calcular la concentración de sulfato de amonio a añadir a una muestra. <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>
<http://www.proteinchemist.com/cgi-bin/s2.pl>
3. calcular la fuerza centrífuga de un rotor. Convierte rpm a Xg o viceversa. <http://www.gmi-inc.com/archivedpages/Rotor%20RCF%20Calculator.htm>
4. Macro-Prep Ion Exchange Supports. Instruction manual (2000). Biorad www.bio-rad.com

PARTE II. PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO Y DE AFINIDAD

Objetivos

- Aplicar la cromatografía en filtración en gel como una de las técnicas para el desalado y cambio de la solución amortiguadora de extractos proteicos.
- Aplicar los métodos de cromatografía de intercambio iónico y de afinidad para purificar una proteína

Información previa

De acuerdo con el pI que encuentre para la lactato deshidrogenasa, predice si ¿su carga eléctrica será positiva o negativa cuando la proteína se encuentre en un amortiguador a pH 6.5 ¿Y cuándo se encuentre en un amortiguador a pH 8.6?

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Material biológico

Fracción 3 obtenida en la sección anterior

Material y equipo

- 1 columna de cromatografía vacía
- 1 columna de Sephadex G-25 empacada con 2.5 mL de resina
- 1 probeta de 50 mL

Tubos para microfuga de 1.5 mL

- 1 recipiente para hielo
- 1 soporte universal
- 1 pinzas de tres dedos de sujeción con nuez
- 1 micropipeta de 1000 μ L
- 1 micropipeta de 200 μ L
- 1 caja de puntas de 1000 μ L para micropipeta
- 1 caja de puntas de 200 μ L para micropipeta

Centrífuga (por grupo)

Balanza (por grupo)

Reactivos

Desalado

- **2.5 % Sephadex-G25** (p/V). La columna contiene 2.5 mL de volumen de cama de Sephadex, preparado según se indica en el Apéndice. Se entrega empacada para su uso inmediato.
- **Amortiguador A o de equilibrio para quienes realizaran la cromatografía de afinidad.** Contiene 20 mM de Tris/HCl **pH 8.6**, 0.5 mM β -Mercaptoetanol y 1 mM PMSF (“phenylmethylsulfonyl fluoride”, inhibidor de serin y cisteín proteasas, viene disuelto en etanol y se añade justo antes de usarse, **preguntar a que concentración se encuentra la solución stock**).

- **Amortiguador C o de equilibrio para quienes realizaran la cromatografía de intercambio iónico.** Contiene 20 mM de Tris/HCl pH 6.5 y 0.5 mM β -Mercaptoetanol y 1 mM PMSF.
- Agua destilada estéril para el lavado de las columnas.

Purificación por cromatografía de afinidad

- **Matriz para purificación por afinidad.** DEAE affi-gel blue gel (ver Apéndice).
- **Amortiguador A.** El mismo que para el desalado. Para equilibrar la columna
- **Amortiguador B.** Amortiguador A adicionado con 1 mM NADH.

Purificación por cromatografía de intercambio iónico y elución por gradiente de NaCl

- **Matriz para intercambio CATIÓNICO**, Macro-prep High S de BIORAD (ver Apéndice).
- **Amortiguador C.** Para equilibrar la columna
- **Amortiguador D.** Contiene 20 mM de Tris/HCl pH 6.5 y 0.5 mM β -Mercaptoetanol, 1 mM PMSF y 1 M de NaCl.

Purificación por cromatografía de intercambio iónico y elución por pH

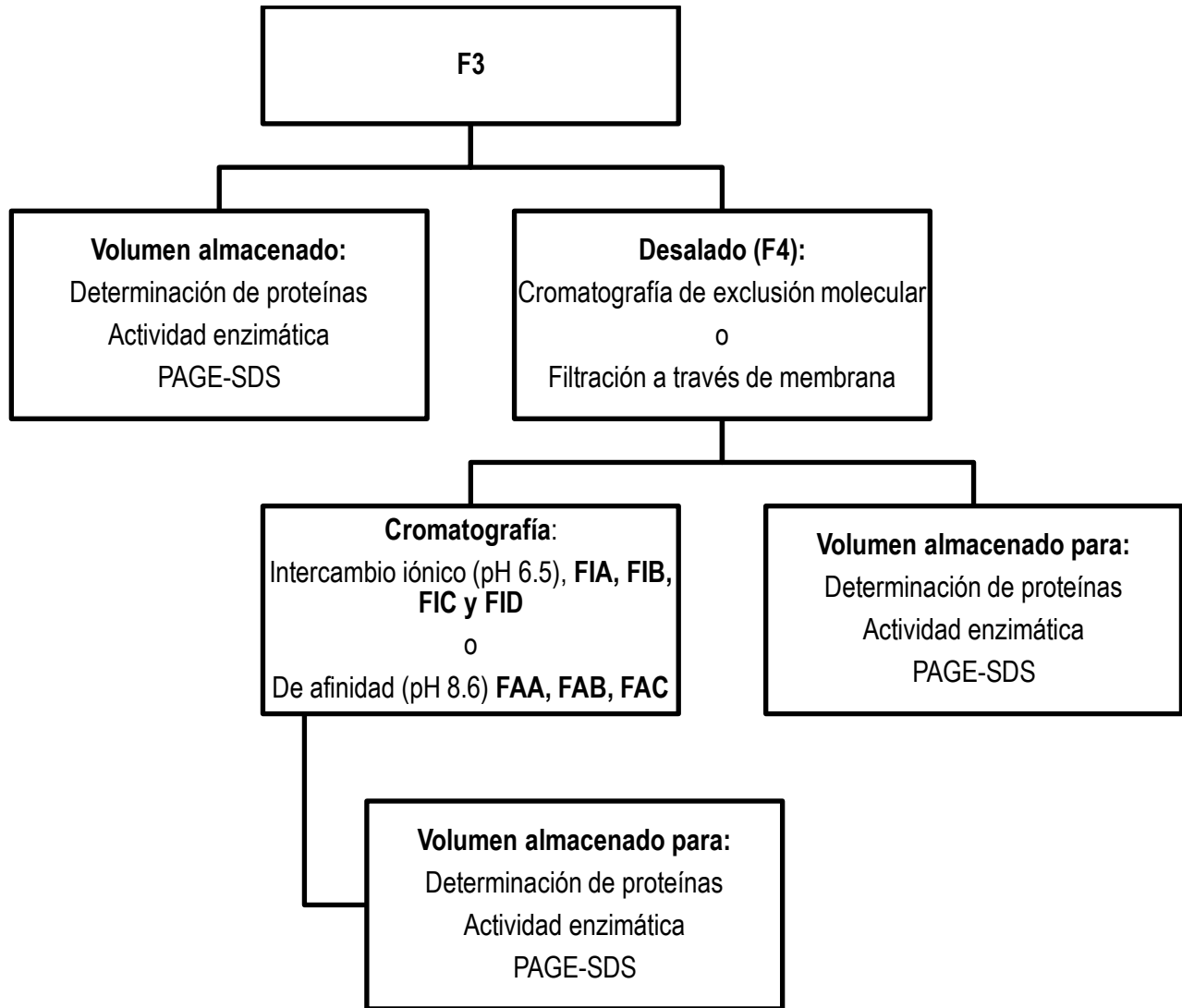
- **Matriz para intercambio CATIÓNICO**, Macro-prep High S de BIORAD (ver Apéndice).
 - Amortiguador : TRIS 20 mM pH 7, PMSF 1 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM
 - Amortiguador trizma 50 mM pH 7
 - Amortiguador trizma 50 mM pH 8
 - Amortiguador trizma 50 mM pH 8.5
 - Amortiguador trizma 50 mM pH 9
 - Amortiguador trizma 50 mM pH 9.5

Diseño experimental

A continuación se presenta el diseño experimental para la purificación de la lactato deshidrogenasa mediante cromatografías. Debido a la variedad de metodologías que se pueden usar, se deja a discreción de los profesores el uso de las diferentes metodologías propuestas.

El laboratorio proporcionará algunas de estas. El desalado de las muestras se podrá realizar mediante cromatografía de exclusión molecular o si el profesor proporciona otras herramientas como los dispositivos de ultrafiltración, estos tendrán el mismo propósito. Para la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico, la elución se podrá realizar mediante el uso de un gradiente de NaCl o bien mediante diferentes pasos de cambio de pH.

Revisar los reactivos que se proporcionan para la correcta purificación de la lactato deshidrogenasa.



Desarrollo experimental

El desalado de la suspensión de proteínas en F3 se puede realizar por varias técnicas, aquí se te presentan dos.

Desalado A: Mediante cromatografía de exclusión molecular

1. Sujetar a un soporte universal la columna de sefadex (la columna tiene un volumen de cama aproximado de 2.5 mL), como se muestra en la Figura 2.2.
2. Añadirle a la columna 3 mL de **amortiguador de equilibrio de acuerdo con el tipo de cromatografía que se realizará**, centrifugar a baja velocidad o esperar a que por gravedad salga todo el amortiguador.
3. Adicionar a la columna poco a poco 800 μL de la fracción 3 y esperar a que entre a la columna por gravedad (aproximadamente 1 minuto o menos), si tarda más, centrifugar a baja velocidad.
4. Añadir 2 mL de amortiguador de equilibrio a la columna, desechar el primer mL que eluye de la columna (correspondiente al **volumen vacío**).
5. Agregar a la columna 1 mL de amortiguador y recolectar en un tubo de microfuga frío el segundo mL. Esta fracción contiene a la LDH (**Fracción 4**). Se guardan 100 μL para

llevar a cabo la medición de actividad y determinación de la concentración de proteína. El resto de la muestra (700 μL) se utilizará en el siguiente paso. Todas las muestras se almacenan a -20°C en la caja de almacenamiento destinada para el grupo.

NOTAS.

1. Al terminar de utilizar la columna, lavarla con 10 mL de agua destilada estéril, en el último lavado dejar al menos 1mL de agua en la columna y taparla para mantenerla hidratada, entregarla al profesor.
2. No es necesario realizar la operación en condiciones de esterilidad, pero el usar agua estéril ayuda a disminuir una posible contaminación de la columna para el uso posterior de otro grupo de estudiantes.

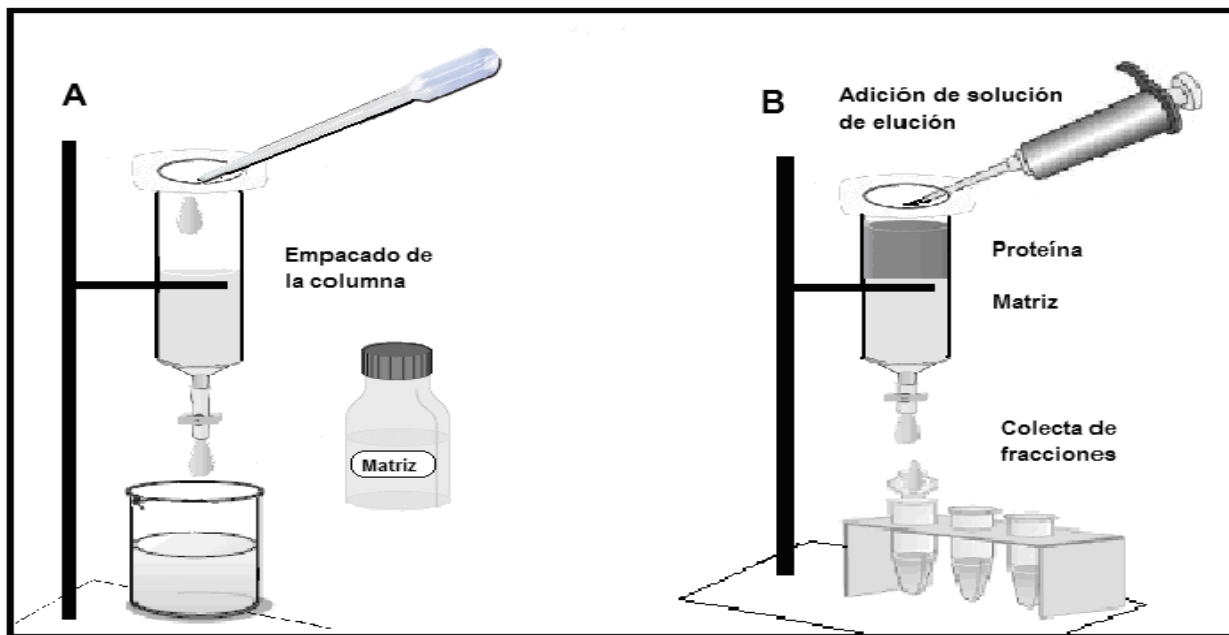


Figura 2.2. Purificación de proteínas por cromatografía líquida. **A.** Empacado de la columna y **B.** Colecta de fracciones de proteína después de añadir la solución de elución.

Desalado B: Mediante ultrafiltración en Membrana Ultracel de celulosa regenerada tipo Amicon (Millipore).

1. Adicionar en la parte superior del tubo Amicon (10K) 700 μL de la fracción 3 y añadir amortiguador A (pH 8.6) para quienes realizaran la cromatografía de afinidad o amortiguador C (pH 6.5) si realizaran la cromatografía de intercambio iónico c.b.p. 4 mL.
2. Cubrir con un parafilm la boca del tubo y mezclar por inversión.
3. Quitar parafilm y colocar la tapa del tubo y centrifugar a 4000 rpm por 40 min a 4°C . Al término de la centrifugación debe de haberse reducido el volumen de la muestra que se encuentra en el interior del tubo Amicon, **NO EN EL TUBO FALCÓN**.
4. Volver a centrifugar bajo las mismas condiciones anteriores si el volumen es mayor a 1 mL, para no diluir la muestra. Se tiene que mantener un volumen de 700 μL , si es necesario completar con amortiguador de equilibrio.

Purificación por cromatografía de intercambio iónico o de afinidad.

La mitad del grupo realizará la purificación por cromatografía de intercambio iónico y la otra parte del grupo se enfocará en la purificación de la LDH por columna de afinidad. Ambas secciones del grupo comenzarán su purificación a partir de la fracción 4.

A. Empacado de la columna para la fase 3 de la purificación.

Se les proporcionará una columna vacía y a ésta se le adicionará alguna de las dos matrices que el profesor les proporcionará para realizar intercambio catiónico o de afinidad. Se colocará resina poco a poco, 1 mL cada vez para obtener al final un empacado de resina de 1.5 mL (cromatografía de intercambio iónico) o 0.5 mL (cromatografía de afinidad). Cada que coloques un volumen de 1 mL deja drenar. **Es importante revisar que no se hayan producido burbujas en la columna para que el flujo del líquido sea constante.** Eliminar el eluato (volumen de líquido que eluyó).

B. Purificación por cromatografía de afinidad.

1. Equilibra la columna empacada con 0.5 mL de DEAE Affi-gel Blue adicionando 10 mL de amortiguador A (preguntar al profesor cuanto se usará). El volumen que drena se desecha. Para acelerar el proceso de paso de las soluciones en la columna se puede centrifugar a 3000 rpm por 5 min a 4°C.
2. Enseguida se adicionan poco a poco 700 µL de la **Fracción 4**. Se centrifuga a 3000 rpm por 5 min a 4°C o se deja drenar y se elimina la fracción no adsorbida (aproximadamente 700 µL, éste es el volumen muerto, y no contiene proteína).
3. Lavar la columna con al menos 10 mL del amortiguador de equilibrio para eliminar las proteínas no unidas a la columna. Esperar a que todo el líquido drene.
4. Para despegar a la LDH de la columna se adicionan 3 mL de amortiguador de elución A y se recolectan tres fracciones en tubos de microfuga fríos (**Fracciones de la cromatografía de afinidad, FAA, FAB y FAC**).

NOTA. Al finalizar, lavar la columna con al menos 10 mL del agua estéril, y entregar la columna lavada al profesor. La columna puede ser utilizada nuevamente por otro grupo.

Investiga:

¿Cuál es la diferencia entre absorción y adsorción?

Recuerda:

La resina Macrorep high S (BIORAD) es un fuerte intercambiador catiónico, por lo que la LDH la debes mantener a pH debajo de su pI para que se encuentre cargada positivamente.

Además, hay que considerar que la forma B de la LDH es estable a pHs entre 6.0 y 10.0.

B. Purificación por cromatografía de intercambio iónico en columna y elución por gradiente de NaCl.

1. Utilizar una columna con 1.5 ml de la matriz de intercambio iónico. Equilibrar la columna adicionando poco a poco en la parte superior de la columna 3 mL de amortiguador C. Es **MUY IMPORTANTE** adicionar el amortiguador lentamente, de

manera que el flujo de salida sea gota a gota. Si la columna está muy empacada y el flujo es muy lento se recomienda aplicar vacío.

2. Cuando la última gota del amortiguador de equilibrio haya salido, tapar la salida de la columna con parafilm y adicionar los 700 μL de la **fracción 4**. Posteriormente tapar la parte superior de la columna con parafilm y agitar por inversión de **5 a 10 veces (cromatografía en batch)**. **Dejar incubando en el hielo por 10 min.**
3. Destapar la salida y dejar que pase el líquido por la columna desechando este volumen. Éste es el **volumen muerto** y no contiene proteína. Nuevamente, se puede acelerar el proceso aplicando vacío.
4. Realizar un lavado con 4 mL de amortiguador C (para eliminar la unión no específica de proteínas a la columna). Volver a aplicar vacío para eliminar el amortiguador.
5. Para la elución de la proteína hay diferentes metodologías de acuerdo a lo que los profesores consideren se pueden aplicar gradiente de NaCl o cambios de pH de la solución de elución.

GRADIENTE DE NaCl

Para aplicar un gradiente de NaCl adicionar 500 μL de 0.5 M NaCl en amortiguador, dejar drenar y colectar todo el volumen en un tubo de microfuga. Después añadir a la columna 500 μL de amortiguador adicionado de 0.75 M de NaCl colectar todo el volumen en un tubo de microfuga y por último añadir 500 μL de amortiguador 1 M de NaCl (amortiguador D) volver a colectar todo lo que sale de la columna en un tubo de microfuga (Figura 2.2B), a las que denominamos **Fracción purificada FIA, FIB, FIC y FID** respectivamente. A cada fracción colectada agregarle glicerol para una concentración final de 20%.

Tabla 2.1 Preparación de amortiguadores para la elución de la LDH en gradiente de NaCl

| Soluciones para gradiente | Amortiguador D | Amortiguador C |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|
| 0.25 M NaCl en amortiguador | 125 μL | 375 μL |
| 0.5 M NaCl en amortiguador | 250 μL | 250 μL |
| 0.75 M NaCl en amortiguador | 375 μL | 125 μL |
| 1 M NaCl en amortiguador | 500 μL | --- |

6. Estas fracciones se usarán posteriormente para la determinación de proteína, actividad enzimática y para realizar el corrimiento electroforético. Proporcionar todas las fracciones al profesor para que las almacene a -20°C .

NOTA. Al finalizar, lavar la columna con al menos 10 mL de agua estéril y entregar al profesor. La columna lavada puede ser reutilizada por otro grupo de estudiantes.

C. Cromatografía de intercambio catiónico con gradiente de pH

1. A una columna de Macrorep de 1.5 mL equilibrada con 3 mL de amortiguador Trizma 50 mM pH 7 se cargan 150 μL de la fracción Desalada con mayor actividad (porción colorida). Colectar el volumen muerto (VM). **Medir el pH inicial con tira reactiva.**
2. Se lava con 1.5 mL de amortiguador trizma 50 mM pH 7, colectando todo el volumen como una sola fracción, etiquetar. **Medir el pH final.**

3. Cuando el nivel del amortiguador alcance el borde de la resina, agregar **lentamente** 1.5 mL de amortiguador trizma 50 mM pH 8 colectando todo el volumen como una sola fracción, etiquetar. **Medir el pH final.**
4. Cuando el nivel del amortiguador alcance el borde de la resina, agregar **lentamente** 1.5 mL de amortiguador trizma 50 mM pH 8.5 y colectar todo el volumen como una sola fracción. (etiquetar). **Medir el pH final.**
5. Cuando el nivel del amortiguador alcance el borde de la resina, agregar **lentamente** 1.5 mL de amortiguador trizma 50 mM pH 9 y colectar todo el volumen como una sola fracción, etiquetar. **Medir el pH final**
6. Cuando el nivel del amortiguador alcance el borde de la resina, agregar **lentamente** 1.5 mL de amortiguador trizma 50 mM pH 9.5 y colectar todo el volumen como una sola fracción, etiquetar. **Medir el pH final.**
7. **Medir la actividad de todas las fracciones.**
8. **Determinar a cada fracción concentración de proteínas.**

Cuestionario

1. ¿Por qué es necesario llevar a cabo el proceso de desalado de la o las fracciones con alto contenido de sal en protocolo experimental antes de someterla a cromatografía de afinidad o de intercambio iónico?
2. ¿Cuáles otros usos tiene la cromatografía de exclusión molecular que no sea la de ayudar a desalar una suspensión de proteínas?
3. ¿Qué intervalo de fraccionamiento de moléculas tiene el Sephadex-G25 y que aplicaciones tiene?
4. ¿Qué es el volumen vacío en una columna de filtración en gel?
5. ¿A qué se refiere el término volumen muerto en una columna cromatográfica?
6. Investiga la composición de la matriz de intercambio iónico que se usó para purificar a la LDH.
7. De acuerdo con pI de la LDH, si contaras con una columna de intercambio aniónico como DEAE-celulosa, ¿a qué pH mantendrías a tu proteína y a qué pH mantendrías el amortiguador para eluir a la proteína de la columna? Fundamenta tu respuesta.
8. ¿Qué propiedad de la proteína se utiliza para purificar a la proteína mediante una columna de intercambio catiónico?
9. ¿Qué debe contener el eluyente para la purificación de la LDH en la cromatografía de intercambio iónico que se propone en este protocolo y por qué?
10. ¿Qué propiedad de la proteína estás utilizando para purificarla por cromatografía de afinidad y cuál es el componente clave para la purificación de la LDH en esta columna?

Referencias

- Devlin TM. Textbook of biochemistry with clinical correlations. Cuarta edición. 1997. John Wiley & Sons Inc, New York, USA. Pp 69-85. Localización **QP514.T4**
- Protein purification Handbook. 1999. Amherstham Pharmacia Biotech AB. Uppsala, Sweden. Catálogo 18-1132-29 Pp 94.
- Salem J. 2001. Enzymes: purification. Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons Ltd. Pp 1-7. Consultar la página www.els.net

- Sheehan D, O'Sullivan S. 2001. Ion exchange chromatography. Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons Ltd. Pp 1-4. Consultar la página www.els.net
- Voet D, Voet JG. Biochemistry. Segunda edición. 1995. John Wiley & Sons Inc, New York, USA. Pp 71-104.
- Macro-Prep Ion Exchange Supports Instruction manual. 2000. BIORAD www.bio-rad.com

Sitios recomendados para

1. Aprender sobre cromatografía

- <http://www.ub.es/biodel/wbc/tecnicas/cromatografia.htm>

2. Realizar una autoevaluación sobre los fundamentos de la cromatografía

- http://www4.ujaen.es/~acarrera/TBQ_HotPot/T3_TBQ_VF/T3_TBQ_VF.htm

Parte III. Monitoreo del proceso de purificación.

A. Determinación de la concentración de proteínas

Objetivos

- Conocer los métodos que se utilizan para monitorear el proceso de purificación de una proteína.
- Adquirir la habilidad para analizar el progreso de la purificación de una proteína.
- Aplicar un método espectrofotométrico para medir la concentración de una proteína.
- Determinar la concentración mediante la detección de la absorbancia a 280nm.
- Determinar la concentración de una proteína utilizando un método colorimétrico: Determinación de proteínas por Bradford.
- Analizar el progreso de la purificación de una proteína.
- Conocer algunos parámetros que se determinan durante la purificación de una proteína: rendimiento y pureza.
- Aplicar el conocimiento adquirido para elaborar esquemas de purificación de proteínas.

Para monitorear el proceso de purificación y su eficiencia se debe determinar la concentración de proteínas de cada una de las fracciones del proceso de purificación de la proteína en estudio. En esta práctica se realizarán dos métodos de determinación de proteínas la medición de la absorbancia intrínseca de la proteína en el rango del UV y por el método colorimétrico de Bradford.

Protocolo experimental

Material biológico

Fracciones obtenidas durante el proceso de la purificación de la LDH

Material y equipo

1 Recipiente para hielo
 Celdas metacrilato grado UV para espectrofotómetro
 Celdas de polipropileno para espectrofotómetro
 Tubos para microfuga de 1.5 mL
 1 vórtex
 Micropipeta de 200-1000 μL
 Micropipeta de 20-200 μL
 Micropipeta de 5 a 10 μL
 1 caja de puntas de 1000 μL para micropipeta
 1 caja de puntas de 200 μL para micropipeta
 1 piseta con etanol y una con agua bidestilada.
 1 gradilla para tubos de microfuga
 Espectrofotómetro

Reactivos

- Reactivo de Bradford (Solución en ácido fosfórico de azul de Coomassie® Brilliant Blue G-250)
- Solución estándar de albúmina de suero bovino (BSA) **0.1mg/mL**.

Desarrollo experimental

Determinación colorimétrica de proteínas por el método de Bradford. Se utilizará una curva estándar de BSA y las muestras (fracciones) se harán por duplicado, utilizando tubos de microfuga para hacer las mezclas del ensayo.

Para la curva estándar:

1. Etiquetar los tubos de microfuga según se indica en la tabla 2.2. Después añadir los reactivos en el orden mostrado, agitando después de cada adición. **¡Precaución, maneja con cuidado el reactivo de Bradford, ya que contiene H_3PO_4 !**
2. Entre agua y proteína el volumen total es de 800 μL .
3. **Importante:** incubar a temperatura ambiente por al menos 5 min. Registrar la absorbancia a 595 nm. La absorbancia se incrementará con el tiempo, por lo que las muestras **no** deben incubarse por más de 1 h a temperatura ambiente.

Tabla 2.2 Orden de adición de reactivos para la determinación de proteínas del estándar de BSA

| Tubo | B | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| H_2O (μL) | 800 | 770 | 760 | 740 | 720 | 700 |
| BSA (μL) | 0 | 30 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| Reactivo Bradford (μL) | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |
| Absorbancia | | | | | | |

4. Graficar absorbancia del estándar vs. cantidad de proteína (μg) y obtener los parámetros de regresión.

Para las muestras:

5. Descongelar sólo las alícuotas de las fracciones de proteína destinadas para este protocolo y que fueron recolectadas durante la purificación de la lactato deshidrogenasa.
6. Mantener las fracciones en un recipiente con hielo durante todo el experimento.
7. Hacer las diluciones de cada una de las fracciones, según indicaciones de su profesor. **Cada muestra diluida se determinará por duplicado. Anotar la dilución empleada en la Tabla 2.2**
8. Numerar los tubos según se indica en la Tabla 2.3 y dependiendo de los volúmenes de proteína indicado por el profesor, registrarlos en la tabla.
9. **El volumen total (volumen de muestra más volumen de agua) debe ser de 800 μL , por tanto calcular el volumen de agua a añadir y completar la tabla.**
10. Añadir los reactivos según lo indicado en la Tabla 2.3.
11. Para leer las muestras una vez que se desarrolla el color usar **el tubo B del estándar como blanco.**

Tabla 2.3. Determinación de la concentración de proteína de las fracciones obtenidas durante los diferentes pasos de la purificación de la LDH de músculo esquelético de pollo. **F** corresponde a Fracción y **conc** a que la muestra se usará concentrada. Los espacios vacíos se dejaron para colocar el volumen usado de agua o fracción. A todas las fracciones se les determinará la concentración de proteína por duplicado

| Tubo | H ₂ O (μL) c.b.p. 800 μL | F1 dil____ (μL) | F2 dil____ (μL) | F3 dil____ (μL) | F4 dil____ (μL) | FPA conc (μL) | FPB conc (μL) | FPB conc (μL) | Reactivo Bradford (μL) | Absorbancia 595 nm |
|------|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------------------|-----------------------|
| 1 | | | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | 200 | |
| 2 | | | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | 200 | |
| 3 | | ---- | | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | 200 | |
| 4 | | ---- | | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | 200 | |
| 5 | | ---- | ---- | | ---- | ---- | ---- | ---- | 200 | |
| 6 | | ---- | ---- | | ---- | ---- | ---- | ---- | 200 | |
| 7 | | ---- | ---- | ---- | | ---- | ---- | ---- | 200 | |
| 8 | | ---- | ---- | ---- | | ---- | ---- | ---- | 200 | |
| 9 | | ---- | ---- | ---- | | ---- | ---- | ---- | 200 | |
| 10 | | ---- | ---- | ---- | | ---- | ---- | ---- | 200 | |
| 11 | | ---- | ---- | ---- | | ---- | ---- | ---- | 200 | |
| 12 | | ---- | ---- | ---- | | ---- | ---- | ---- | 200 | |
| 13 | | ---- | ---- | ---- | | ---- | ---- | ---- | 200 | |
| 14 | | ---- | ---- | ---- | | ---- | ---- | ---- | 200 | |

12. Utilizar los parámetros de regresión obtenidos de la curva estándar para calcular el contenido de proteína de cada una de las muestras de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de proteína } (\mu\text{g}) = \left(\frac{\text{Abs}_{\lambda 595\text{nm}} - b}{m} \right) * F$$

Donde, **b** es la ordenada al origen,

m la pendiente y

F es el factor de dilución de cada muestra (recuerda el factor de dilución es adimensional y si hiciste dilución el valor es mayor a 1 y corresponde al número de veces que diluiste)

13. Dividir el valor de contenido de proteína entre el volumen de muestra que utilizaron en el ensayo para obtener la concentración de proteína expresada en **μg/μL**.
14. Posteriormente realizar los promedios por muestra (recuerda que tienes duplicados para cada fracción).
15. Determinar la cantidad de proteína total que se obtuvo de cada una de las fracciones de los diferentes pasos de purificación. Para ello multiplicar el volumen total de la fracción por el promedio obtenido en el punto 7. Con los datos llenen la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Rendimiento proteico durante las diferentes fases de la purificación de la LDH

| Fracción | Promedio (μg proteína/ μL) | Volumen total en la fracción (μL) | Proteína total en la fracción (μg o mg) |
|----------|---|--|---|
| 1 | | | |
| 2 | | | |
| 3 | | | |
| 4 | | | |
| FA | | | |
| FB | | | |
| FC | | | |

Cuestionario

1. Compara ambos métodos de cuantificación de proteínas utilizados en la práctica y enlista sus diferencias. Considera tanto el fundamento de las técnicas como la metodología para llevarlas a cabo.
2. Compara los resultados de concentración que obtuviste con los dos métodos empleados en la práctica.
3. ¿Qué desventajas tiene determinar la concentración de proteína por Abs 280 con respecto al método de Bradford en muestras que tienen una cantidad variable de proteínas, como en nuestras fracciones de la purificación de la lactato deshidrogenasa?
4. ¿Puedes usar otra proteína que no sea BSA como estándar? Si es así ¿cuál y por qué?
5. ¿Qué sustancias pueden interferir en cada uno de los métodos empleados y si se puede, cómo evitas su interferencia?
6. Investiga el intervalo de concentración de proteínas que detecta cada uno de los métodos.
7. ¿Por qué es necesario construir una curva de calibración en la determinación colorimétrica de proteínas por el método de Bradford?
8. Investiga qué otro método existe para cuantificar proteínas y explica su fundamento.

Referencias

- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. 1982. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Springs Harbor, NY.
- Stoscheck CM. Quantitation of Protein. 1990. *Methods in Enzymology* 182, 50-69.

Página web para consultar métodos para determinar proteínas:

<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/protcurve.html>

Parte III. Monitoreo del proceso de purificación.

B. Separación de las proteínas en gel de poliacrilamida-SDS

Objetivos

- Conocer los métodos que se utilizan para monitorear el proceso de purificación de una proteína.
- Aplicar la electroforesis como una herramienta para monitorear la pureza de una proteína.
- Analizar el progreso de la purificación de una proteína.
- Conocer algunos parámetros que se determinan durante la purificación de una proteína: rendimiento y pureza.
- Aplicar el conocimiento adquirido para elaborar esquemas de purificación de proteínas.

El método más común para monitorear el proceso de purificación de una proteína es su visualización en un gel de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS). El peso molecular y la intensidad de la banda de proteína en el gel permitirán evaluar la eficiencia del proceso de purificación de la LDH.

Material biológico

Fraciones obtenidas durante el proceso de purificación de la LDH

Material y equipo

2 vasos de precipitados 25 mL

1 pipeta Pasteur con bulbo

Tubos para microfuga de 0.5 mL

1 recipiente para hielo

1 micropipeta de 2-10 μ L

1 micropipeta de 20-200 μ L

1 caja de puntas de 200 μ L para micropipeta

1 recipiente de plástico/gel para la tinción.

1 equipo completo para electroforesis de proteínas marca BIORAD (incluye: reservorio con electrodos, placas de vidrio, peines, sujetadores de las placas de vidrio y módulo para preparar el gel)

1 fuente de poder

Reactivos

- Acrilamida. Mezcla de 30% acrilamida y 0.8% N'N'metilen-bisacrilamida.
- 2 M Tris /HCl pH 8.8
- 0.5 M Tris/HCl pH 6.8
- 20% SDS
- TEMED
- 10% Persulfato de amonio
- Agua destilada
- Isopropanol o butanol
- Mezcla de estándares de peso molecular de proteínas.

- Amortiguador de muestra. Stock generalmente preparado a 2X y contiene 350 mM Tris base, 0.8% SDS, 160 mM DTT (ditiotreitól, agente reductor de proteínas con puentes disulfuros, se puede usar en su lugar β -mercaptoetanol), 7.5% Glicerol.
- Amortiguador de corrida (0.05 M Tris Base, 0.38 M Glicina, 0.1 % SDS)
- Solución teñidora tiempo largo [0.125% (p/v) azul de Coomassie Blue R250 en **50% (v/v) metanol**, y 10% (v/v) ácido acético]. Tinción que se logra después de 2 h.
- Solución desteñidora para tinción tiempo largo (**45% Metanol**, 10% ácido acético)

Desarrollo experimental

Preparación del gel de poliacrilamida-SDS.

1. Lavar perfectamente las placas de vidrio. Ensamblar las dos placas de vidrio con los separadores. Hay que asegurarse de que las placas queden bien niveladas y fijas con las pinzas.
2. Hacer una marca a los 2/3 de la capacidad de los vidrios (ver Figura 2.3).
3. Mezclar los componentes del gel separador que se indican en la Tabla 2.5, añadiendo al final el persulfato de amonio y el TEMED. Agitar cuidadosamente la solución (**USAR GUANTES MIENTRAS SE MANIPULE LA ACRILAMIDA**).

Tabla 2.5. Minigel en placa al 12 % de acrilamida con SDS.

| Reactivos | Gel separador | Gel concentrador |
|-------------------------------------|---------------|------------------|
| 30% Acrilamida + 0.8% Bisacrilamida | 2 mL | 0.66 mL |
| 2 M Tris/HCl pH 8.8 | 1 mL | — |
| 0.5 M Tris/HCl pH 6.8 | — | 0.6 mL |
| 10% SDS | 50 μ L | 50 μ L |
| H ₂ O | 1.94 mL | 3.67 mL |
| TEMED* | 5 μ L | 10 μ L |
| 10% Persulfato de amonio* | 40 μ L | 80 μ L |
| Volumen total | 5 mL | 5 mL |

*Añadir justo antes de vaciar entre las placas de vidrio.

4. Añadir inmediatamente la mezcla anterior en el espacio entre las dos placas de vidrio.
5. Agregar poco a poco, con la ayuda de una pipeta Pasteur, isopropanol o n-butanol con la finalidad de disminuir la tensión superficial y que no se forme un menisco en la parte superior del gel.
6. Esperar a que polimerice la acrilamida, no más de 20 min.
7. Decantar el isopropanol o butanol y lavar con agua bidestilada. Eliminar el exceso de agua con papel absorbente cuidando de no tocar el gel
8. Preparar la mezcla del gel concentrador similar al punto 3. Añadir todos los componentes del gel concentrador y justo antes de añadir entre las placas de vidrio añadir los volúmenes indicados de TEMED y persulfato.
9. Añadir el gel concentrador entre las placas de vidrio e inmediatamente insertar el peine en la parte superior para formar los depósitos en los que colocaremos la muestra.
10. Esperar a que se forme este segundo gel, el cual tarda aproximadamente 20 min.
11. Remover con cuidado el peine y fijar el gel con las placas de vidrio a la cámara de electroforesis.

12. Añadir el amortiguador de corrida en ambos reservorios.

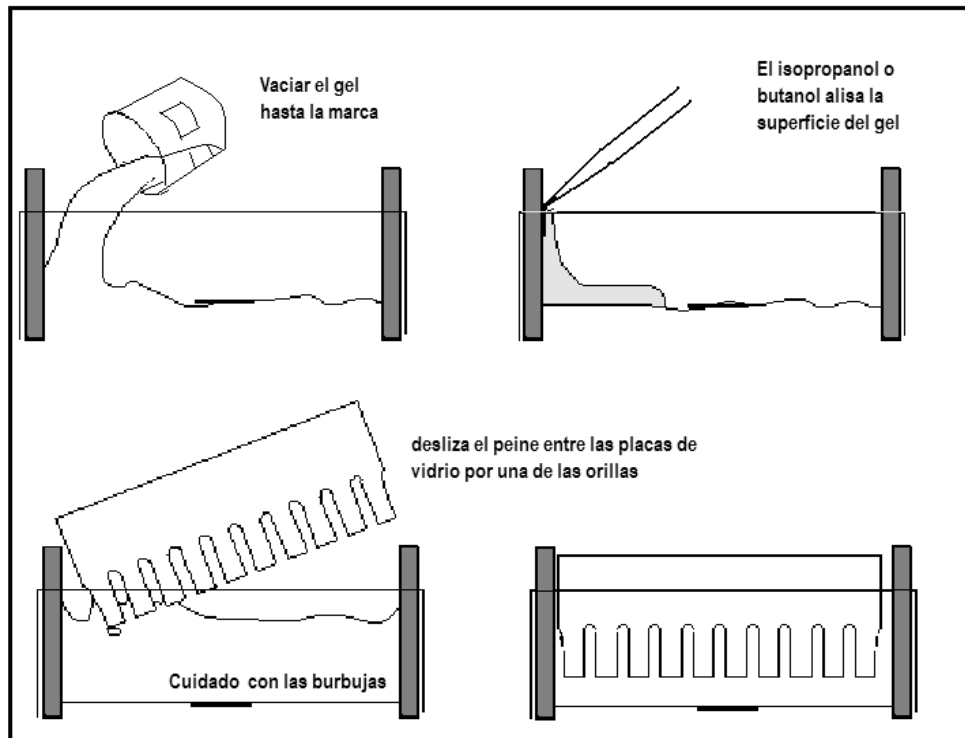


Figura 2.3. Pasos a seguir para la preparación de un gel de poliacrilamida-SDS.

Preparación de muestras

13. Calcular cuál es el volumen necesario para tener 20 μg de proteína utilizando los datos de concentración de proteína obtenidos en la Parte II de la práctica (en μg proteína/ μL). Con los datos llenar la tabla 2.6.

Tabla 2.6. Preparación de muestras para su corrimiento electroforético.

| Fracción | Concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) | μL para 20 μg | Amortiguador de muestra (μL) | Estándar (μL) |
|----------|---|-------------------------------------|---|----------------------------|
| 1 | | | | — |
| 2 | | | | — |
| 3 | | | | — |
| 4 | | | | — |
| FA | | | | — |
| FB | | | | — |
| FC | | | | — |
| Estándar | — | — | 13 | 7 |

14. Descongelar las muestras, colocar el volumen que se calculó en un tubo de microfuga y a ese volumen añadirle amortiguador de muestra. Generalmente al preparar la muestra para correr en geles de poliacrilamida-SDS se mezcla un volumen de muestra proteica con 1 volumen de amortiguador de muestra. Si los volúmenes resultantes son muy diferentes entre las diferentes muestras ya mezcladas con el amortiguador de muestra, es recomendable ajustar todas a un volumen total similar usando amortiguador de muestra. **Recuerda:** sólo ajustamos los volúmenes con amortiguador de muestra por lo que la cantidad de proteína en cada carril no cambia, lo que hacemos es uniformar el volumen en el carril para que la difusión entre carriles se minimice o sea homogénea. Cabe señalar que los pozos del gel tienen una **capacidad máxima de 30 μL** por lo que la mezcla proteína: amortiguador de muestra no debe exceder ese volumen.
15. Realizar también una mezcla de estándares de peso molecular ver la tabla 2.6.

Aplicación de muestras y corrida

16. Aplicar las muestras en los pozos del gel concentrador en el orden en el que se obtuvieron las fracciones y colocar el estándar en el último pozo (Figura 2.4). **PREGUNTAR A SU PROFESOR LOS PESOS MOLECULARES DE LOS ESTÁNDARES.**
17. Iniciar la electroforesis de 10 a 15 mA hasta que el frente haya entrado en el gel separador. Después incrementar el amperaje a 25 mA, siempre y cuando no se caliente el gel.
18. Terminar la corrida una vez que el frente haya alcanzado el borde inferior del gel o según se desee.
19. Enseguida desprender el gel de las placas y realizar una tinción depositando el gel en una charola que contenga solución teñidora y colocando la bandeja en agitación constante.

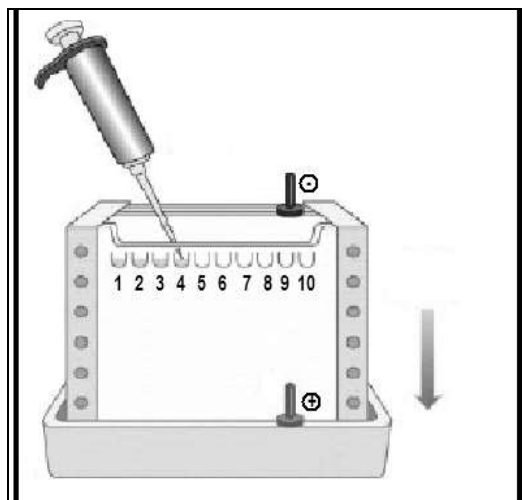


Figura 2.4 Aplicación de las muestras en los carriles de un gel de poliacrilamida-SDS.

20. Decantar la solución teñidora, lavar el exceso con H_2O destilada y añadir la solución desteñidora. Poner a agitar suavemente.

21. Tomar una foto al gel teñido.
22. De acuerdo con los resultados, señalar el o los pasos de purificación en donde se produjo el mayor enriquecimiento en la proteína de interés, la lactato deshidrogenasa.
23. Con la información de los pesos moleculares utilizados en la electroforesis, realizar la curva de log peso molecular del estándar vs Rf.
24. Determinar el Rf y la distancia en la que se espera se encuentre la lactato deshidrogenasa (utilizando el peso molecular esperado para esta proteína).
25. Señalar en la foto del gel en dónde se localizaría la LDH.

Cuestionario

1. ¿En cuál de los pasos de la purificación se obtuvo una mayor cantidad de LDH?
2. ¿Cuál de los dos métodos de purificación cromatográfica produce una mayor cantidad de LDH, la cromatografía de afinidad o la de intercambio iónico?
3. Usualmente, en una purificación se utilizan la cromatografía de intercambio iónico y la de afinidad como pasos secuenciales, una después de otra, pero por costos hemos utilizado sólo una de ellas. Con los resultados que obtuvo tu equipo y los otros equipos, predice cuál sería el resultado si primero se realizara la cromatografía de intercambio catiónico y luego la cromatografía de afinidad.
4. ¿Cuántos contaminantes se tienen en la mezcla de proteínas obtenida en el proceso cromatográfico final?
5. Elabora un esquema de purificación o diagrama de flujo del protocolo de purificación para una de las proteínas que se encuentran en el programa virtual: <http://www.wcer.wisc.edu/archive/cl1/ilt/case/madison/creatingLE.htm>
6. Fundamenta el porqué de cada paso de purificación, indicando en cada paso en dónde está la proteína. Recuerda que tiene características muy distintas a la lactato deshidrogenasa por lo que no necesariamente se tienen que usar los pasos de purificación usados en este protocolo experimental.

Recuerda que para cada tipo de proteína el protocolo de purificación puede variar.

Referencias

- Bradley JSCO, Markwell J. 2007. Assay for determination of protein concentration. Current protocols in protein science 3.4.1-3.4.29.
- Devlin TM. Textbook of biochemistry with clinical correlations. Cuarta edición. 1997. John Wiley & Sons Inc, New York, USA. Pp 69-85. Localización **QP514.T4**
- Reiner W. 2005. Gel electrophoresis. John Wiley & sons, Ltd. www.els.net
- Voet D, Voet JG. Biochemistry. Segunda edición. 1995. John Wiley & Sons Inc, New York, USA. Pp 71-104

Problemas resueltos de purificación de proteínas

<http://depa.pquim.unam.mx/proteinas/webprobs/solucion.html>

3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

PARTE I: CURVAS TEMPORALES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA LACTATO DESHIDROGENASA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE POLLO.

Objetivos

- Conocer las características generales de las enzimas como catalizadores biológicos.
- Adquirir la habilidad para medir la actividad de una enzima utilizando un método espectrofotométrico.
- Relacionar los distintos parámetros asociados a la medición de la actividad enzimática que permiten seguir y evaluar la purificación de una enzima (actividad específica, rendimiento y grado de pureza o enriquecimiento).

Información previa.

Uno de los métodos para seguir el proceso de purificación de una proteína es la detección de su función, en la práctica se determinará la actividad de la LDH de músculo esquelético de pollo. En esta parte del protocolo se medirá la reacción en el sentido de piruvato a lactato a diferentes tiempos, utilizando como fuente de enzima las fracciones obtenidas durante el protocolo de purificación de la LDH de la sección II del manual.

El ensayo de actividad está basado en la detección del cambio de absorción del NADH y el NAD⁺. El NADH es una molécula que absorbe a 340 nm, mientras que el NAD⁺ no absorbe radiación a esta longitud de onda. Entonces, la actividad de la enzima en las muestras se detectará como una disminución en la absorbancia a 340 nm, debido a que durante la reacción el NADH es convertido a su forma oxidada, el NAD⁺.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Material biológico

Fracciones obtenidas durante la purificación de la LDH (sección II del manual)

Material y equipo

Celdas de plástico

Tubos de microfuga

Parafilm

1 recipiente para hielo

1 micropipeta de 200-1000 μ L

1 micropipeta de 20-200 μ L

1 micropipeta de 2-10 μ L

1 caja de puntas de 1000 μ L para micropipeta

1 caja de puntas de 200 μ L para micropipeta

1 vórtex

Espectrofotómetro (por grupo)

Reactivos

- 100 mM amortiguador de fosfatos pH 7.0
- 10 mM piruvato de sodio

- 4 mM NADH. **Reactivo que debe prepararse justo antes de usarlo, puede usarse el amortiguador de fosfatos para su disolución.** Verificar que la absorbancia a 340 nm sea mayor de 1.0, si no es así volver a pesar y medir. El NADH **no** se puede almacenar disuelto, por lo que al final la sesión experimental se desecha el reactivo.

Desarrollo experimental.

Curvas temporales de actividad de lactato deshidrogenasa.

Se sugiere que todos los equipos midan primero la curva temporal de actividad a la fracción 3, que es la fracción que usarán para obtener los parámetros cinéticos de la enzima. Para obtener las curvas de actividad se determinará la dilución óptima de enzima para realizar los ensayos (ver abajo). Diluciones sugeridas **F1** 1:50, **F2** 1:25, **F3** 1:100, **F4** 1:25; intentar las fracciones **FA**; **FB** y **FC** sin diluir.

Una vez que concluyan con esa fracción y dependiendo del tiempo que hayan consumido de la sesión, realizar posteriormente las curvas temporales de actividad de las fracciones restantes.

Ensayo de actividad enzimática:

1. Descongelar la proteína y mantenerla a 4°C en un recipiente con hielo.
2. Etiquetar 7 celdas. Realizar las mezclas de reacción directamente en las celdas de plástico y a temperatura ambiente. Utilizar agua para ajustar a 0 el espectrofotómetro.
3. Añadir a cada una de las celdas los siguientes componentes:

| | |
|--------|---------------------------------|
| 600 µL | 100 mM amortiguador de fosfatos |
| 36 µL | 10 mM piruvato |
| 291 µL | Agua |

4. Adicionar a **una** de las celdas preparadas previamente 63 µL de 4 mM NADH tapar la celda con parafilm y agitar por inversión, leer la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm y registrar.
5. Inmediatamente después de leer la absorbancia de esta solución, agregar **10 µL** de la muestra de la enzima diluida o **la cantidad indicada por los profesores.**
6. Tapar la celda con parafilm, agitar por inversión dos veces y leer inmediatamente la absorbancia.

Consideraciones: si la primera absorbancia leída una vez que se añadió enzima es menor de 0.4, es posible que la actividad de la enzima sea muy alta, por lo que se recomienda repetir el ensayo en una de las celdas ya preparadas, añadir NADH y luego la enzima más diluida.

7. Dejar la celda dentro del espectrofotómetro y registrar los valores de la absorbancia, preguntar a los profesores el tiempo en que se leerán las celdas. Se sugiere que sea cada 30 segundos durante 5 min (Tabla 3.1). Aunque se puede registrar la actividad a tiempos menores de 30 seg, por ejemplo cada 15 seg durante 3 min. Esto reduce el tiempo de uso del espectrofotómetro y aún se tiene un buen número de puntos para construir una curva y obtener la pendiente.
8. Realizar gráficas de absorbancia vs. tiempo (min) para cada una de las diluciones de todas las fracciones y obtener las pendientes de las rectas. Se sugiere colocar la información de todas las fracciones en una misma gráfica para poder compararlas.
9. Con los datos de la pendiente de las gráficas del punto 8 de esta sección y los volúmenes y concentración de proteína obtenidos en la práctica de purificación de proteínas, construir la tabla de purificación de la LDH (llenar la Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Tabla de purificación de la LDH de músculo esquelético de pollo.

| Procedimiento | Proteína total en la fracción (mg) | Actividad total mmolmin ⁻¹ | Actividad enzimática específica (mmol min ⁻¹ mg ⁻¹) | Grado de pureza o veces de purificación | Rendimiento |
|---|------------------------------------|---------------------------------------|--|---|-------------|
| Homogeneizado (F) | | | | 1 | 100 |
| Sobrenadante de la precipitación con sulfato de amonio 45% (F2) | | | | | |
| Botón obtenido de la pp con sulfato de amonio 70% (F3) | | | | | |
| Primera fracción que salió de la cromatografía* (FPA) | | | | | |
| Segunda fracción que salió de la cromatografía* (FPB) | | | | | |
| Tercera fracción que salió de la cromatografía* (FPC) | | | | | |
| Cuarta fracción que salió de la cromatografía* (FPD) | | | | | |

*Anotar el tipo de cromatografía que realizaste intercambio iónico o de afinidad.

Para calcular la **actividad total** de la enzima se realizan los siguientes tres pasos:

- A. Utilizar la pendiente de la curva de la gráfica de absorbancia vs. tiempo y sustituir los valores en la siguiente ecuación

$$Actividad = \frac{m \left(\frac{Abs}{min} \right)}{\varepsilon (M^{-1} cm^{-1}) * b (cm)} = mmol \text{ min}^{-1} mL^{-1}$$

Donde:

m: es la pendiente de la recta ($\Delta Abs/\Delta t$) en unidades de abs / min

ε : es el coeficiente de extinción molar para el NADH, $6.22 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$.

b: es la distancia de la celda, que corresponde a 1 cm

- B. Para considerar la cantidad de enzima añadida en la celda de reacción y su dilución realizar lo siguiente

$$\text{Actividad} = \frac{\text{Actividad} * \text{volumen reacción} * \text{Factor de dilución}}{\text{volumen añadido de enzima}} = \text{mmol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$$

- C. En vista de que se tienen diferentes fracciones de un proceso de purificación de proteínas, se tienen volúmenes distintos de cada fracción entonces hay que multiplicar el valor obtenido en el paso anterior por el volumen de la fracción lo cual nos da la **actividad enzimática total en unidades de mmol min⁻¹**.

Para obtener el valor de la **actividad específica**, cuyas unidades son **mmol min⁻¹ mg⁻¹** divide la actividad total dada en mmol min⁻¹ entre la cantidad de proteína total de la fracción (mg).

El **valor de grado de pureza** también llamado veces de purificación se obtiene al dividir la **actividad enzimática específica** de la fracción entre la actividad específica de la fracción inicial en este caso la F1. Se espera que conforme se pierdan proteínas contaminantes el grado de pureza se vaya incrementando.

Para la obtención del **rendimiento** en cada paso de purificación se considera que la **actividad total** recuperada en la fracción inicial es el 100%, así que se divide la actividad total obtenida después del paso de purificación que corresponda entre la actividad total obtenida antes de empezar a purificar (en este caso F1) y se multiplica por 100.

Cuestionario

1. ¿Qué solución se usó como blanco para calibrar el espectrofotómetro en la práctica?
¿Por qué?
2. Realiza el análisis dimensional de la fórmula que se propone para calcular la actividad de la enzima.
3. Define actividad específica y katal.
4. Propón un protocolo para determinar la actividad de la enzima que no sea el de realizar una curva temporal de aparición de productos.
5. Analizando los resultados que se encuentran en la tabla 3.2 menciona cuál fue el paso en el que la proteína se enriqueció más. ¿A qué crees que se debe?
6. Al analizar en conjunto los datos obtenidos en la electroforesis y los de actividad ¿en qué pasos de la purificación se eliminan más contaminantes?
7. ¿Cuál es la utilidad de realizar una tabla de purificación en la que se toma en cuenta la actividad de la enzima?

Referencias

- Devlin TM. 1992. Textbook of biochemistry with clinical correlations. Ed. Wiley- Liss, pp. 135-190. Localización **QP514.2**
- Kopperschläger G, Kirchberger J. 1996. Methods for separation of lactate dehydrogenases and clinical significance of the enzyme. Journal of chromatography B, 684, 25-49.
- Mathews C. 1992. Bioquímica, 2da edición, Ed. McGraw-Hill pp. 398-433. Localización **QP514.2**

- Nelson D. Principles of Biochemistry. 2004, 4a edition Ed. Freeman and company, pp. 202-233. **QH345 L43**
- Pardo-Vázquez JP. Cap 10. Cinética enzimática. En Bioquímica de Laguna. El Manual Moderno, SA de CV., 2002, pP185
- Voet D, Voet JG. 1992. Bioquímica. Ed. Omega S. A. pp. 342-378. Localización **QP514.2**

PARTE II. FACTORES QUE MODIFICAN LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO Y DE UN INHIBIDOR.

Objetivos:

- Determinar la concentración de sustrato en la cual la enzima alcanza su velocidad máxima.
- Entender el significado de los parámetros cinéticos V_{max} y K_m .
- Calcular los parámetros cinéticos de la reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa utilizando diferentes gráficos de la ecuación linealizada de Michaelis-Menten.
- Determinar el efecto de un inhibidor en la actividad de la lactato deshidrogenasa
- Analizar el efecto de un inhibidor sobre los parámetros cinéticos de la enzima.

Información previa

En la práctica se determinarán las constantes cinéticas, K_m y V_{max} , de la lactato deshidrogenasa de músculo de pollo, para la reacción en el sentido de piruvato a lactato, manteniendo constante la concentración de enzima, el pH y la temperatura de reacción. También se determinará el tipo de inhibición que el oxamato (un ácido carboxílico) produce en la actividad de la enzima (Figura 3.5). Para la determinación de las constantes se medirá la actividad de la enzima a diferentes concentraciones de sustrato y a una sola concentración de inhibidor. A través del análisis del efecto del inhibidor en los parámetros cinéticos de la enzima se determinará el tipo de inhibición que produce el oxamato.

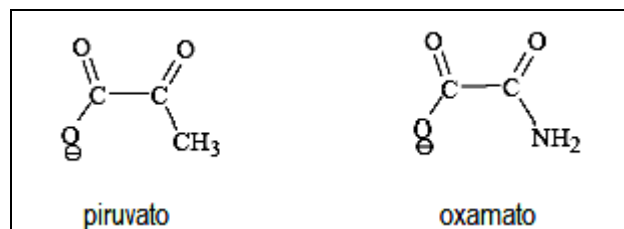


Figura 3.1 Estructuras del piruvato y el inhibidor que se usará en la práctica, el oxamato.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Material biológico

Fracción 3 obtenida en la práctica de purificación.

Materiales y equipo

- 10 celdas de plástico
- Tubos para microfuga
- 1 recipiente para hielo
- 1 vaso de precipitados de 25 mL
- 3 tubos de ensayo 13x100mm
- 1 micropipeta de 1000 μL
- 1 micropipeta de 200 μL
- 1 micropipeta de 10 μL
- 1 micropipeta de 50 μL

Puntas para micropipeta de diferentes capacidades
Parafilm
Espectrómetro (por grupo)

Reactivos

- 100 mM amortiguador de fosfatos pH 7.0
- 10 mM piruvato de sodio
- 10 mM oxamato de sodio
- 4 mM NADH.

Desarrollo experimental

Efecto de la concentración de sustrato.

1. Numerar las celdas.
2. En una celda de plástico adicionar el amortiguador de fosfatos, el agua y el piruvato de acuerdo a lo que se indica en la Tabla 3.3. Mantener a temperatura ambiente.

Tabla 3.3. Efecto de la concentración de sustrato.

| Solución | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| *Concentración final de piruvato (mM) | 0.06* | 0.09* | 0.15* | 0.25* | 0.36* | 0.5* | 0.75 |
| 100 mM Amortiguador de fosfatos pH 7.0 (µL) | 600 | 600 | 600 | 600 | 600 | 600 | 600 |
| H ₂ O c.b.p. 1000 µL (µL) | 321 | 318 | 312 | 302 | 291 | 277 | 252 |
| 10 mM Piruvato (µL) | 6 | 9 | 15 | 25 | 36 | 50 | 75 |
| 4 mM NADH (µL) | 63 | 63 | 63 | 63 | 63 | 63 | 63 |
| Enzima (diluida**) (µL) | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |

**Usar la dilución apropiada de enzima, preguntar a su profesor.

3. Preparar la dilución de la enzima. El volumen preparado debe ser suficiente para que alcance para la determinación del efecto de la concentración de sustrato y para la del efecto del inhibidor.
4. Justo antes de medir en el espectrómetro añadir a la celda **63 µL** de NADH 4 mM, tapar con parafilm y mezclar por inversión. Registrar la lectura. Este paso se realiza para asegurarse de que la mezcla de reacción contiene NADH.
5. Posteriormente añadir a la celda 10 µL de la muestra de la enzima diluida, fracción 3 obtenida en la práctica de purificación. Tapar la celda con parafilm y agitar 2 veces por inversión.
6. Ajustar el espectrofotómetro con agua y leer la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 340 nm.

Tabla 3.4. Lecturas de absorbancia de la actividad de la LDH a diferentes concentraciones de sustrato.

| Tiempo (min) | Piruvato (mM) | | | | | | |
|-----------------|---------------|------|------|------|------|-----|------|
| | 0.06 | 0.09 | 0.15 | 0.25 | 0.36 | 0.5 | 0.75 |
| 0 | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

7. Los valores de la absorbancia se registran cada 30 seg durante 3 min (Tabla 3.4).
Sugerencia: Se puede registrar la actividad a tiempos menores de 30 seg, por ejemplo cada 15 seg por 3 min, reduce el tiempo de uso del espectrofotómetro y aún se tiene un buen número de puntos para construir una curva y obtener la pendiente.
8. Obtener la pendiente y calcular la actividad, según la siguiente fórmula:

$$Actividad = \frac{m \left(\frac{Abs}{min} \right) * Vol\ reacción}{\epsilon (M^{-1} cm^{-1}) * b (cm) * cantidad\ de\ enzima (mg)} = mmol\ min^{-1} mg^{-1}$$

Donde:

m: es la pendiente de la recta ($\Delta Abs/\Delta t$) en unidades de abs / min

ϵ : es el coeficiente de extinción molecular para el NADH, $6.22 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$.

b: es la distancia de la celda, que corresponde a 1 cm

Cantidad de enzima: En vista de que **no** se comparará la actividad de la enzima de un proceso de purificación, hay que calcular la cantidad de enzima que se añade al medio de reacción tomando en cuenta la

concentración de proteína de la muestra, la dilución y el volumen que se tomó para el ensayo de esta dilución.

Por ejemplo, si la concentración de la enzima F3 es 22 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e hiciste una dilución 1:300 de la fracción y de ésta tomaste 10 μL , entonces la cantidad de enzima que añadiste a la celda fue de $7.33 \times 10^{-4} \text{ mg}$ de acuerdo a la siguiente operación:

$$\frac{22 \text{ mg/mL}}{300} * 0.01 \text{ mL} = 7.33 \times 10^{-4} \text{ mg}$$

9. Posteriormente se grafican:

- A) Actividad vs. concentración de sustrato (gráfica de Michaelis-Menten)
- B) La actividad de acuerdo a la ecuación de Lineweaver-Burk.
- C) La actividad de acuerdo a la ecuación de Hanes o Eadie-Hosftie

10. Calcular las constantes cinéticas **Km** y **Vmax** con los datos obtenidos de los tres gráficos anteriores y tabular los datos en una sola tabla.

11. Analizar los valores de las constantes cinéticas de la lactato deshidrogenasa.

Efecto de un inhibidor en la actividad de la LDH.

Al igual que en la sección anterior se mide la actividad de la lactato deshidrogenasa a diferentes concentraciones de piruvato, pero ahora se adiciona el oxamato de sodio, compuesto que inhibe la actividad de la LDH (Tabla 3.5).

1. Adicionar en una celda de plástico los reactivos de acuerdo a los volúmenes y el orden indicados en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Composición de medio de reacción para medir el efecto del oxamato en la actividad de la lactato deshidrogenasa.

| Solución | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| *Concentración final de piruvato (mM) | 0.06* | 0.09* | 0.15* | 0.25* | 0.36* | 0.5* | 0.75* |
| 100 mM Amortiguador de fosfatos pH 7.0 | 600 | 600 | 600 | 600 | 600 | 600 | 600 |
| H ₂ O c.b.p. 1000 μL | 287 | 284 | 278 | 268 | 257 | 243 | 218 |
| 10 mM Oxamato (μL) | 34 | 34 | 34 | 34 | 34 | 34 | 34 |
| 10 mM Piruvato (μL) | 6 | 9 | 15 | 25 | 36 | 50 | 75 |
| 4 mM NADH (μL) | 63 | 63 | 63 | 63 | 63 | 63 | 63 |
| Enzima (diluida) (μL) | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |

2. Registrar los valores de la absorbancia cada 30 segundos durante 3 min (Tabla 3.6).

Cuestionario

1. ¿Por qué es importante determinar los valores de K_m y V_{max} de una enzima?
2. Diseña un protocolo diferente al presentado en esta sección para determinar la actividad de la lactato deshidrogenasa.
3. ¿Cuál fue el blanco de la reacción?
4. ¿En qué intervalo de concentración la reacción de la LDH muestra un comportamiento de primer orden?
5. ¿En qué intervalo de concentración la reacción de la LDH muestra un comportamiento de orden cero?
6. ¿En qué intervalo de concentración la reacción de la LDH muestra un comportamiento de orden cero y en cuál será de orden mixto?
7. Define K_m e indica qué unidades tiene.
8. Define V_{max} e indica qué unidades tiene.
9. Compara los valores de K_m y V_{max} obtenidos en las tres diferentes gráficas que realizaste.
10. ¿Qué tipo de inhibidor es el oxamato? Fundamenta tu respuesta.
11. ¿Cuáles son los inhibidores **naturales** de la LDH de músculo?
12. ¿En el humano, cuáles tejidos contienen LDH?
13. ¿Qué es el ciclo de Cori y cómo participa la LDH en él?

Referencias

- Mathews C. 1992. Bioquímica, 2da edición, Ed. McGraw-Hill pp. 398-433. Localización **QP514.2**
- Nelson D. 2004. Principles of Biochemistry. 2004, 4a edition Ed. Freeman and company, pp. 202-233. **QH345 L43**
- Voet D, Voet JG. 1992. Bioquímica. Ed. Omega S.A. pp. 342-378. Localización **QP514.2**
- Bennett NG, Gutfreund H. 1973. The Kinetics of the interconversion of intermediates of the reaction of pig muscle lactate dehydrogenase with oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide and lactate. Biochemistry Journal 135, 81-85.

Sitios recomendados para

1. aprender utilizar los conceptos de K_m , V_{max}
 - <http://csm.jmu.edu/biology/courses/bio220/aotw3.html> en la página pulsar la tecla [kinetics_model.xls](#), después regresa a la página inicial y contesta las preguntas que se te hacen.
 - http://www.mhhe.com/biosci/genbio/biolink/j_explorations/ch07expl.htm

CINÉTICA ENZIMÁTICA DE LA FOSFATASA ALCALINA

OBJETIVOS

- Realizar una curva patrón de p-nitrofenol.
- Determinar experimentalmente el progreso de la reacción enzimática.
- Determinar experimentalmente el pH óptimo para la actividad de la enzima.
- Determinar experimentalmente la temperatura óptima del ensayo de la actividad de la enzima.
- Determinar el efecto de la concentración de sustrato en la velocidad de la enzima.
- Estudiar el efecto de un inhibidor.
- Calcular los valores de Energía de activación, V_{max} y K_m .
- Determinar el tipo de inhibición y el efecto sobre la V_{max} y la K_m .

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Materiales y equipos

Tubos de vidrio de 13 x 100 mm
Celdas de plástico
Espectrofotómetro
Cronómetro
Micropipetas de 200 y 1 000 μL
Vórtex
Baños de incubación

Reactivos

Suero de leche como fuente de enzima.

2×10^{-4} M p-nitrofenol

2×10^{-3} M p-nitrofenilfosfato de sodio

NaOH 0.25 M

Molibdato de sodio 50 mM

0.6 M TRIS pH 7.0, 0.6 M TRIS pH 8.0; 0.6 M TRIS pH 9.0; 0.06 M Glicina pH 9.0, 0.06 M Glicina pH 9.6, 0.06 M Glicina pH 10, 0.06 M Glicina 10.4, 0.6 M Carbonatos pH 10.4, 0.6 M Carbonatos pH 10.8, 0.6 M Carbonatos pH 11.5.

Sugerencias

Mantener el material libre de detergentes.

Mantener los reactivos en frío, en especial la enzima para evitar su inactivación.

Ser preciso en los tiempos de incubación.

Desarrollo experimental

A. Curva patrón

1. Realizar una curva patrón de p-nitrofenol con los reactivos y volúmenes indicados en la tabla:

| Reactivos | Blanco | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| p-nitrofenol 2×10^{-4} M (μL) | 0 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 300 |
| H ₂ O (μL) | 500 | 450 | 400 | 350 | 300 | 250 | 200 |
| Glicina 0.06 M | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 |
| pH 10 (μL) | | | | | | | |
| NaOH 0.25 M (μL) | 750 | 750 | 750 | 750 | 750 | 750 | 750 |

2. Leer la absorbencia a una longitud de onda 415 nm
3. Graficar la curva patrón Absorbencia vs concentración de p-nitrofenol.

¿Por qué se hace una curva patrón de p-nitrofenol?

B. Progreso de la reacción enzimática

1. Para obtener la curva temporal de reacción, colocar los reactivos en el orden que se indican en la tabla siguiente, al añadir la enzima mezclar e incubar a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación añadir NaOH.
2. Después se lee la absorbencia en un espectrofotómetro a 415 nm.

| Tubos | Blanco | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--|--------|-----|-----|-----|-----|-----|
| p-nitrofenil fosfato (μL) | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 |
| H ₂ O (μL) | 230 | 230 | 230 | 230 | 230 | 230 |
| Glicina 0.06 M pH 10 (μL) | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 |
| PREINCUBAR A 37 °C 2 MIN | | | | | | |
| Enzima (μL) | - | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| INCUBAR A 37 °C | | | | | | |
| Tiempo min | 5 | 5 | 10 | 15 | 20 | 30 |
| NaOH 0.25 M (μL) | 750 | 750 | 750 | 750 | 750 | 750 |
| Enzima (μL) | 20 | - | - | - | - | - |

3. Contesta lo que se te pide:

¿Por qué se utiliza sosa?

¿Qué utilidad tiene un ensayo temporal de actividad?

¿Qué tipo de gráfico se podría realizar con estos datos?

¿Cómo se calcula la velocidad enzimática?

Cinéticamente cómo explicaría el comportamiento observado

Con base a sus resultados ¿qué tiempo sería el más adecuado para realizar los siguientes ensayos? ¿Por qué?

C. Determinación del efecto del pH

Para determinar el efecto del pH en la actividad enzimática se realizaran usando diferentes amortiguadores, utilizando como blancos glicina pH 9, Tris pH 7, carbonatos pH 10.4. **Construya su tabla para realizar los ensayos de actividad.**

| Amortiguador | pH |
|--------------|------|
| Glicina | 9 |
| Glicina | 9.6 |
| Glicina | 10 |
| Glicina | 10.4 |
| TRIS | 7 |
| TRIS | 8 |
| TRIS | 9 |
| Carbonatos | 10.4 |
| Carbonatos | 10.8 |
| Carbonatos | 11.5 |

1. ¿Cuál es el propósito determinar el efecto del pH en la actividad de la fosfatasa alcalina?
2. ¿Por qué se utilizan diferentes blancos? ¿Qué tubos deben leerse con los diferentes blancos?
3. Grafique la actividad enzimática vs pH
4. ¿Cuál es el valor de pH del ensayo al cual la enzima presenta la mayor velocidad?
5. ¿Hay diferencia entre los distintos amortiguadores con respecto a su efecto en la velocidad de esta enzima?

D. Efecto de la temperatura

1. Realizar ensayos de actividad enzimática a diferentes temperaturas con el tiempo y el amortiguador elegido en el ensayo anterior. Siguiendo las indicaciones de la siguiente tabla
2. Leer a la absorbencia en un espectrofotómetro a 415 nm
3. Resuelve lo siguiente

¿Por qué se preincuba la mezcla de reacción?

Graficar actividad enzimática (v) vs T

Describe el comportamiento de la velocidad enzimática en función de la temperatura

Calcule la energía de activación

| Tubos | Blanco | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| p-nitrofenil fosfato (μL) | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 |
| H ₂ O (μL) | 230 | 230 | 230 | 230 | 230 | 230 | 230 | 230 |
| Amortiguador(μL) | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 |
| PREINCUBAR A LA TEMPERATURA DE CADA ENSAYO 2 MIN | | | | | | | | |
| Enzima (μL) | - | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| INCUBAR A LAS TEMPERATURAS INDICADAS | | | | | | | | |
| Temp. ($^{\circ}\text{C}$) | 4 | 4 | 20 | 30 | 37 | 45 | 50 | 60 |
| NaOH 0.25 M (μL) | 750 | 750 | 750 | 750 | 750 | 750 | 750 | 750 |
| Enzima (μL) | 20 | - | - | - | - | - | - | - |

E. Efecto de la concentración de sustrato

- Realizar ensayos de actividad enzimática a diferentes concentraciones de sustrato, con el tiempo, el amortiguador y la temperatura elegidos en los ensayos anteriores. Seguir las indicaciones de la siguiente tabla:

| Tubos | Blanco | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|--|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| p-nitrofenil fosfato (μL) | 0 | 50 | 75 | 100 | 250 | 300 | 400 | 450 |
| H ₂ O (μL) | 520 | 480 | 455 | 430 | 280 | 230 | 130 | 80 |
| Amortiguador(μL) | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 |
| PREINCUBAR A LA TEMPERATURA ELEGIDA 2 MIN | | | | | | | | |
| Enzima (μL) | - | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| INCUBAR A LA TEMPERATURA ELEGIDA | | | | | | | | |
| NaOH 0.25 M (μL) | 750 | 750 | 750 | 750 | 750 | 750 | 750 | 750 |
| Enzima (μL) | 20 | - | - | - | - | - | - | - |

- Describe el comportamiento de la velocidad enzimática en función de la [S]
- Graficar los dobles recíprocos de la gráfica anterior
- Calcule la V_{max} y la K_m

F. Efecto de un inhibidor

- Realizar el experimento planteado en la siguiente tabla, en donde a una curva de diferentes concentraciones de sustrato se le añade una concentración de un inhibidor.
- Al final leer la absorbancia en un espectrofotómetro a 415 nm.

2. Leer la absorbancia en un espectrofotómetro a 415 nm.
3. Graficar: v vs [S]

| Tubos | Blanco | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|--|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| p-nitrofenil fosfato (μL) | 0 | 50 | 75 | 100 | 250 | 300 | 400 | 450 |
| H ₂ O (μL) | 480 | 430 | 405 | 380 | 220 | 180 | 80 | 30 |
| Amortiguador (μL) | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 |
| Inhibidor (μL) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| PREINCUBAR A LA TEMPERATURA ELEGIDA 2 MIN | | | | | | | | |
| Enzima (μL) | - | 20 | 205 | 205 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| INCUBAR A LA TEMPERATURA ELEGIDA | | | | | | | | |
| NaOH 0.25 M (μL) | 750 | 750 | 750 | 750 | 750 | 750 | 750 | 750 |
| Enzima (μL) | 20 | - | - | - | - | - | - | - |

3. Resuelve lo siguiente:

Grafique v vs $[S]$ en la misma gráfica del experimento anterior.

Describe el comportamiento de la velocidad enzimática en función de la presencia de un inhibidor.

Grafique los dobles recíprocos de la gráfica anterior en la gráfica del experimento de $1/v$ vs $1/[S]$

Calcule la V_{max} y la k_m aparentes

¿Qué tipo de inhibición presenta?

4. ESTRUCTURA, PROPIEDADES Y FUNCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO I: CONJUGACIÓN

Objetivos

- Identificar al DNA como portador de la información genética
- Conocer los mecanismos por los que una bacteria puede adquirir un plásmido.
- Reconocer a la conjugación bacteriana como un fenómeno de transferencia horizontal de material genético.
- Entender el mecanismo por el cual se realiza la conjugación bacteriana.

Protocolo experimental

Material biológico

Cultivo de *E. coli* JM1452Str^R (cepa receptora), cultivada por una noche en caldo Luria a 37°C.

Cultivo de *E. coli* W3110/F'KmTn3 (cepa donadora), cultivada por una noche en caldo Luria a 37°C.

Materiales y equipo

- 1 microtubo con 600 µL de caldo Luria estéril
- 5 cajas Petri con medio Luria-agar-2% estreptomicina (25 µg/mL)
- 2 cajas Petri con medio Luria-agar-2% sulfato de kanamicina (30 µg/mL)
- 100 palillos de madera estériles
- 1 asa bacteriológica
- 1 propipeta
- 1 mechero
- Incubadora a 37°C
- Baño María a 37°C
- Refrigerador a 4°C

Por grupo para controles de las cepas

- 1 caja Petri con medio Luria-agar 2%-estreptomicina (25 µg/mL)
- 1 caja Petri con medio Luria-agar-2% sulfato de kanamicina (30 µg/mL)

Desarrollo de la práctica

1. En condiciones estériles tomar el tubo de microfuga con 600 µL de caldo Luria estéril y hacer la siguiente mezcla de conjugación: 300 µL del cultivo de *E. coli* JM1452Str más 120 µL del cultivo *E. coli* W3110/F'KmTn3 (Figura 4.1).
2. Incubar el tubo a 37°C **SIN AGITACIÓN** durante 1.5 h.
3. Dividir una caja Petri con medio Luria-agar 2% sulfato de estreptomicina en 3 partes. Marcar la zona 1 como “bacteria receptora”, la zona 2 como “conjugación” y la zona 3 como “bacteria donadora”. **Sembrar por estría cada cultivo.**
4. Incubar a 37°C durante 24 h o hasta que aparezca crecimiento en la zona de conjugación. Refrigerar a 4°C.
5. **Testigo por grupo:** Dividir una caja petri con Luria-agar 2% sulfato de estreptomicina y una caja petri con Luria-agar-2% sulfato de kanamicina. Sembrar por estría las cepas

donadora y receptora en cada mitad de las cajas respectivamente. Incubar a 37°C durante 24 h. Al observar crecimiento refrigerar las cajas.

- Después del tiempo de incubación trabajar con la caja del paso 3. De las colonias aisladas, *parchar* colonias de cada caja en una caja Petri con Luria-agar-2% sulfato de estreptomina y 50 colonias en otra de Luria-agar 2%-estreptomina y después la réplica en la caja de Luria-agar-2% sulfato de kanamicina.

Parchar consiste en transferir una colonia aislada de una caja a otra caja petri. En la práctica se transferirá una misma colonia a 2 cajas petri, esto al picar con un palillo la colonia de bacterias aislada, transferirla picando la caja Petri que contiene Luria-agar con el antibiótico estreptomina y ese mismo palillo pica después a la caja Petri que contiene Luria-agar y kanamicina, así las dos cajas habrán sido picadas con la misma colonia. Al final se tiene una réplica de colonias. Para facilitar y agilizar el parchado, marcar divisiones por la parte de atrás de las cuatro cajas o bien pegar una hoja cuadrículada en el exterior y por debajo de la caja y numerar cada uno de los cuadros (ver figura 4.1).

- Incubar ambas cajas a 37°C durante 24 h o hasta que aparezca crecimiento. Observar y analizar los resultados. Refrigerar a 4°C las cajas.
- Reportar el porcentaje de colonias transconjugantes, es decir aquellas que presentaron la resistencia a ambos antibióticos.

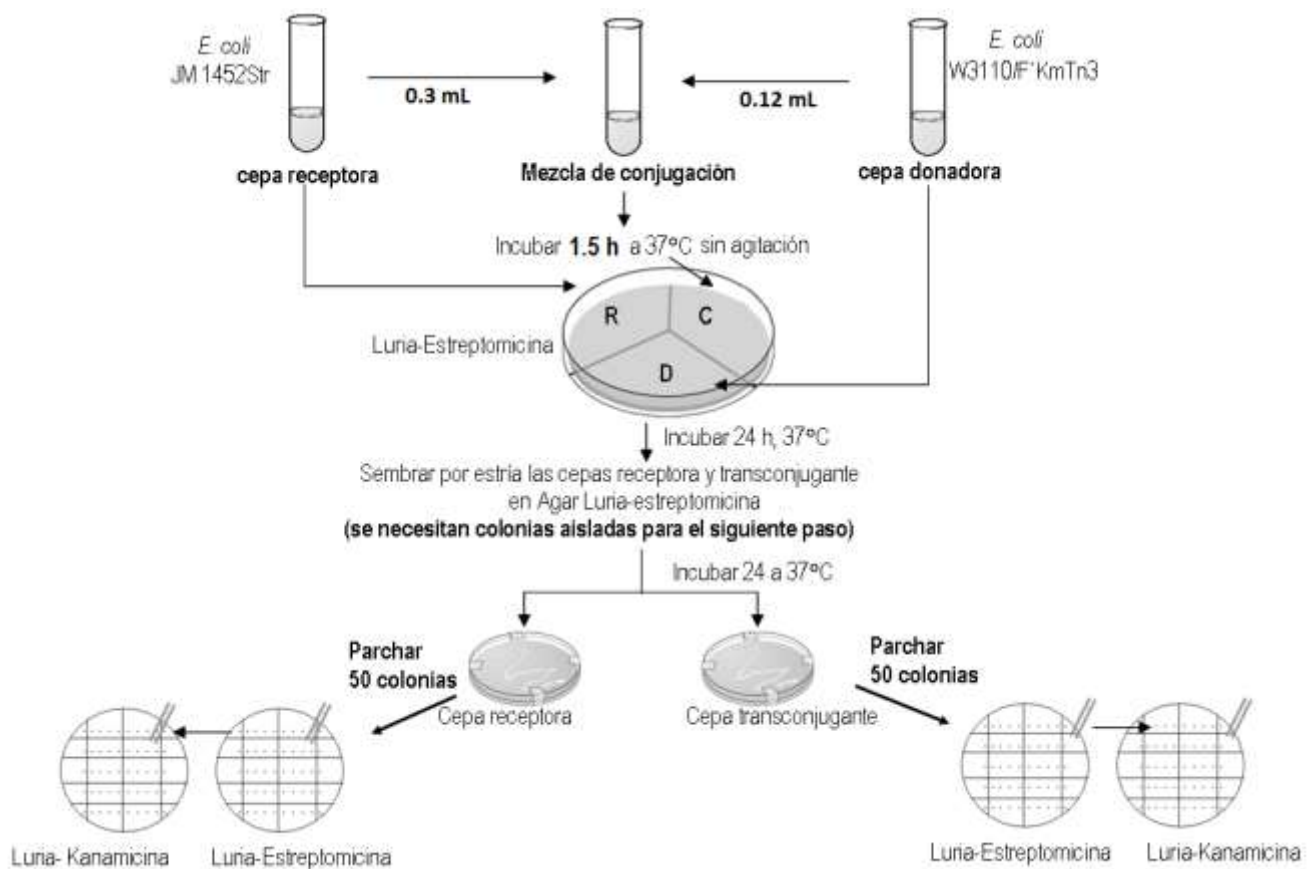


Figura 4.1. Esquema experimental de conjugación bacteriana. Producción de una cepa transconjugante a partir de una cepa receptora resistente a estreptomina, con una cepa que es capaz de proporcionar la información genética para la resistencia a kanamicina. **No olvidar hacer los testigos.**

Cuestionario

1. ¿Qué es un plásmido?
2. ¿Cuáles son los mecanismos de transferencia horizontal de material genético en bacterias?
3. ¿Qué es la conjugación?
4. ¿Qué diferencia existe entre la conjugación y los otros mecanismos de transferencia horizontal de material genético?
5. ¿Cuáles son las principales características del plásmido F y qué genes contiene?
6. ¿Cuáles son los genes del plásmido F necesarios para la transferencia de material genético por conjugación y para qué codifican?
7. De acuerdo al plásmido F ¿cuántos tipos de cepas bacterianas se conocen? y ¿qué diferencia existe entre ellas?
8. Señale qué tipo de transconjugantes se obtienen en cada una de las siguientes "cruzas":
 - a) $F^+ \times F^-$
 - b) $F' \times F^-$
 - c) $Hfr \times F^-$
9. ¿Qué características tienen las cepas empleadas en la práctica?
10. ¿Por qué tanto la cepa donadora como la receptora tienen un marcador de selección?
11. ¿Hubo crecimiento de las cepas empleadas en la práctica en las cajas controles con antibióticos? ¿Por qué son importantes estas cajas control?
12. ¿Por qué se parchan la cepa receptora y la transconjugante tanto en medio con estreptomicina como kanamicina? ¿Qué resultados se obtuvieron en esas cajas?
13. ¿Cómo se comprobó la conjugación en la práctica? ¿Qué porcentaje de bacterias transconjugantes se obtuvo?
14. ¿Cuál es el genotipo de la cepa transconjugante obtenida en la práctica?
15. ¿Qué diferencias existen entre un plásmido conjugativo y uno movilizable?
16. ¿La conjugación puede realizarse entre las bacterias Gram positivas o sólo ocurre en las bacterias Gram negativas?
17. ¿Con qué frecuencia y dónde se realiza la conjugación en forma natural?
18. ¿Cuál es la importancia biológica de la conjugación?
19. Indique los mecanismos por los que se da la resistencia de las bacterias a los antibióticos utilizados en la práctica.
20. ¿Qué aplicaciones tienen en su práctica profesional o en su vida cotidiana los conceptos adquiridos al realizar esta práctica?

Referencias

- Brown T.A. *Genetics. A Molecular Approach*. 2nd ed. Chapman & Hall. USA. 1992. pp 467.
- Lewin B. *Genes V*. Oxford University Press. USA. 1994. pp 1272.
- Genética General, Manual de prácticas de laboratorio. Regulación genética en el operón lac. Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria. México, 2002.

TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO II: TRANSFORMACIÓN

Objetivos

- Conocer el fundamento para transformar células bacterianas.
- Realizar la técnica de transformación bacteriana.
- Aprender a identificar células transformantes mediante su fenotipo.
- Conocer la definición de organismo transgénico.
- Conocer las aplicaciones de la transformación bacteriana: beneficios y riesgos.

Información que el laboratorio o los profesores proveerán

Tipo de vector recombinante o plásmido a usar. Generalmente se tienen disponibles dos:

- Plásmido pBSII KS (2961 pb) que tiene un inserto de 1100 pb y que es posible digerirlo con EcoRI. El vector confiere la resistencia a Ampicilina
- el plásmido pET- TEM-1 (6500 pb) que libera un inserto de 1100 pb al restringirlo con NdeI y BamHI. El vector confiere la resistencia a Kanamicina.

Material biológico

- 1 tubo de microcentrifuga con 100 μ L células competentes de *E. coli* por equipo **mantenerlas congeladas hasta su uso.**
- Plásmido. El plásmido se sugiere que se extraiga utilizando un kit comercial para evitar la contaminación por RNA que se produce cuando se obtiene el plásmido mediante el método de lisis alcalina.

Materiales y equipo

2 cajas Petri con medio LB/antibiótico (Ampicilina o Kanamicina 30 μ g/mL)

Tubos de microfuga de 1.5 mL

Varilla de vidrio en forma de L

Recipiente para hielo

Mechero Bunsen

Micropipeta de 100-1000 μ L

Micropipeta de 10-100 μ L

Caja de puntas para micropipeta con capacidad de 10 μ L estériles

Caja de puntas para micropipeta con capacidad de 200 μ L estériles

Caja de puntas para micropipeta con capacidad de 1000 μ L estériles

Material por grupo

Baño de incubación a 42°C

Incubadora con agitación a 37°C

Reactivos

- Medio SOC (“**S**uper **O**ptimal broth with **C**atabolite repression”). Medio que se prepara utilizando el medio Luria adicionado con 20 mM Glucosa.

Desarrollo experimental

Las células competentes se proporcionarán congeladas. Al final de este protocolo experimental se describe la técnica para su preparación.

Preparativos

1. Revisar y/o equilibrar el baño de incubación a 42°C.
2. Colocar el medio SOC a temperatura ambiente.
3. Se sugiere colocar las placas de Agar-LB-Kanamicina en la incubadora a 37°C por 30 min antes del plaqueo.

Transformación de células competentes con el vector PET-TEM-1 por el método de choque térmico.

1. Tomar un tubo de células competentes del congelador de -80°C y colocarlas directamente en el hielo. Descongelar las células competentes en el hielo (las células competentes son muy sensibles a los cambios de temperatura).
2. Añadir 1 a 5 μL (1 a 50 ηg) del plásmido a un microtubo que contiene 100 μL de células competentes. **NOTA. Los profesores te indicarán el volumen de DNA a usar y su concentración.**
3. Mezclar invirtiendo el tubo.
4. Dejar en hielo por 30 min.
5. Dar choque térmico a 42°C durante 45 segundos. **NO AGITAR.**
6. Agregar 450 μL de medio SOC e incubar por 60 min a 37°C con agitación (225 a 250 rpm).
7. Si la turbidez del medio es escasa, concentrar las células por centrifugación a 14,000 rpm por 1 min. Eliminar el sobrenadante y resuspender el paquete celular en 100 μL de medio SOC.
8. Esparcir los 100 μL de las bacterias transformadas en las cajas con el medio de selección (Agar-LB-kanamicina), ayudados con una varilla de vidrio.
9. Incubar a 37°C por 24 h. Observar crecimiento y guardar la caja a 4°C.
10. Como control negativo incubar 100 μL de células competentes en una caja con LB-kanamicina por 24 h a 37°C.
11. Calcular la eficiencia de la transformación, para lo cual se necesita conocer la concentración del DNA usado para la transformación, el volumen añadido a la mezcla de transformación, el volumen usado para el plaqueo y el número de colonias obtenidas.

Cuestionario

1. ¿Qué es un organismo transgénico?
2. ¿Qué es un vector de clonación?
3. ¿Cuáles son los requisitos que debe cumplir un vector de clonación para ser utilizado para transformar a un organismo?
4. Da dos ejemplos de tipos de vectores que son usados para la clonación de fragmentos de DNA de alto peso molecular
5. ¿Qué tipo de vector de clonación es el pET24?
6. ¿Cuál es el método de transformación que se utilizará en la práctica?
7. Describe al menos otros dos métodos para transformar células, ya sea de animales, hongos o plantas.
8. Para realizar la transformación de células, además del vector de clonación se necesitan las células receptoras, ¿qué tipo de células receptoras son las *E. coli* DH5 α y las células *E. coli* BL21?

9. ¿Cuál es el marcador de selección de las cepas transformantes y dónde se encuentra codificado?
10. Después de obtener un organismo transgénico, ¿cuáles son los cuidados que se deben tener para su manipulación o almacenamiento?

Referencias

- Devlin T. Biochemistry. 1992 Ed. Wiley- Liss, pp. 768-773. Localización **QP514.2**
- Micklos DA, Freyer GA y Crotty DA. 2003 DNA Science. A first course. 2nd edition. Cold spring Harbor Laboratory Press, CSH, New York, USA. Localización **QH442**.
- Nelson D. Principles of Biochemistry. 2004, 4a edition Ed. Freeman and company, pp. 279-317. **QH345 L43**
- Seidman C, Brent R. 1998. Introduction of plasmid DNA into cells. Current protocols in protein science. A.4D.1-A.4D.2.
- Sosa-Peinado A. Mustafi D, Makinen MW. 2000. Overexpression and biosynthetic deuterium enrichment of TEM-1 beta-lactamase for structural characterization by magnetic resonance methods. Protein Expression & Purification 19: 235-45.
- Stryer L. Bioquímica, 2004, Ed. Reverté, pp.745-773.
- <http://www.colvema.org/PDF/amg1.pdf>
- <http://www.revista.unam.mx/vol.1/num3/art3/>
- <http://es.geocities.com/picodelobo/transgenesis.html>
- http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes
- <http://www.sciencegateway.org/tools/transform.htm> (determinación de eficiencia de la transformación)

**Técnica para preparar 200 μ L de las células competentes
(protocolo de la M. en C. Luz del Carmen Castellanos)**

- Inocular 3 mL de medio Luria con *E. coli* BL21 y se deja crecer en agitación toda la noche a 37°C.
- Tomar 0.2 mL del precultivo y agregárselo a 10 mL de medio Luria. Las bacterias se dejan crecer hasta llegar a una absorbencia de 0.6 a 0.8 (lectura a 600 nm).
- Centrifugar la suspensión de células a 5000 rpm durante 5 min a 4°C. Descartar sobrenadante.
- Resuspender el paquete celular muy bien en 3 mL en solución 10 mM NaCl frío.
- Centrifugar a 5000 rpm durante 5 min a 4°C. Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 5 mL de 30 mM CaCl₂ frío.
- Dejar incubando en hielo por 20 min con agitación ocasional suave y centrifugar a 2500 rpm por 7 min. El precipitado debe ser de forma anular.
- Resuspender el precipitado en 0.5 mL de 30 mM CaCl₂ frío. Tomar 0.2 mL y pasarlo a un tubo microfuga.
- Almacenar a -80°C hasta su uso.

TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO II: AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS

Objetivos

- Conocer los fundamentos para la purificación del DNA plasmídico y su separación del DNA genómico.
- Realizar el aislamiento del DNA plasmídico.

Material biológico

Células de *E. coli* transformante obtenidas en la práctica anterior.

Materiales y equipo

Tubos para microfuga

Recipiente para hielo

Microcentrífuga

Micropipeta de 100-1000 μL

Micropipeta de 20-200 μL

Micropipeta de 0.5-10 μL

Caja de puntas para micropipeta con capacidad de 10 μL

Caja de puntas para micropipeta con capacidad de 200 μL

Caja de puntas para micropipeta con capacidad de 1000 μL

Reactivos

- Tubo de ensayo de 16X150 mm con al menos **6 mL** de medio Luria-Kanamicina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o bien un matraz o tubo falcón con 50 mL para el grupo completo.
- Solución GTE: 50 mM Glucosa, 25 mM Tris/HCl pH 8.0 y EDTA 10 mM pH 8.0.
- 3 M Acetato de potasio pH 4.8
- 70% Etanol
- Isopropanol
- 10 N NaOH
- 10% SDS
- Para preparar 500 μL de solución de lisis (0.2 N NaOH y 1% SDS p/v), tomar 10 μL de 10 N NaOH y 50 μL 10% SDS, aforar con agua destilada. De preferencia cada equipo deberá prepararla justo antes de usarla.

Desarrollo experimental (Figura 4.3)

Trabajo previo

1. Inocular una colonia de las células transformadas en **6 mL** de medio Luria que contenga kanamicina a una concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e incubar a 37°C por 12 h con agitación horizontal constante. Colocar los tubos de preferencia en forma diagonal para que se agiten bien las células y haya buen crecimiento.

Obtención de plásmido por el método de lisis alcalina

2. Tomar 1.5 mL del cultivo, colocarlo en 1 tubo de microfuga de 1.5 mL y centrifugar a 10,000 rpm por 1 min a 4°C. Descartar el sobrenadante eliminando totalmente el

- medio Luria. Repetir este paso en el mismo tubo **hasta que el cultivo se acabe**. De tal manera que el paquete celular de los 6 mL quede en un solo microtubo.
3. Resuspender el paquete celular en 300 μL de solución GTE fría, agitando en el vórtex. Incubar a temperatura ambiente por 5 min, preparar la solución de lisis durante este tiempo de incubación.
 4. Adicionar 300 μL de la solución de lisis. Mezclar suavemente por inversión del tubo. **IMPORTANTE:** no agitar en el vórtex. Incubar en hielo por 5 min.
 5. Agregar 300 μL de la solución fría de acetato de potasio 3 M, pH 4.8 y mezclar suavemente por inversión del tubo. Incubar en hielo por 5 min.
 6. Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 min. a 4°C.
 7. Colocar el **sobrenadante** en un tubo limpio y adicionarle un volumen igual de isopropanol frío.
 8. Incubar por 20 min a -20°C.
 9. Centrifugar a 12,000 rpm por 5 min, a 4°C.
 10. Eliminar el sobrenadante y para lavar el DNA añadir 1 mL de etanol al 70% y centrifugar a 12,000 rpm durante 5 min.
 11. Remover el sobrenadante por decantación y eliminar el etanol residual por evaporación a temperatura ambiente (aproximadamente 5 a 10 min).
 12. Resuspender el DNA en 30 μL de agua estéril, guardar a -20°C.

Nota. Usualmente, en investigación se recomienda cuantificar el DNA por su absorbancia a 260 nm, para obtener los $\mu\text{g/mL}$ considerando que una unidad de A_{260} nm de DNA de doble cadena es igual a 50 $\mu\text{g/mL}$.

Investiga:

El fundamento de la determinación espectroscópica a 260 nm de la concentración de ácidos nucleicos.

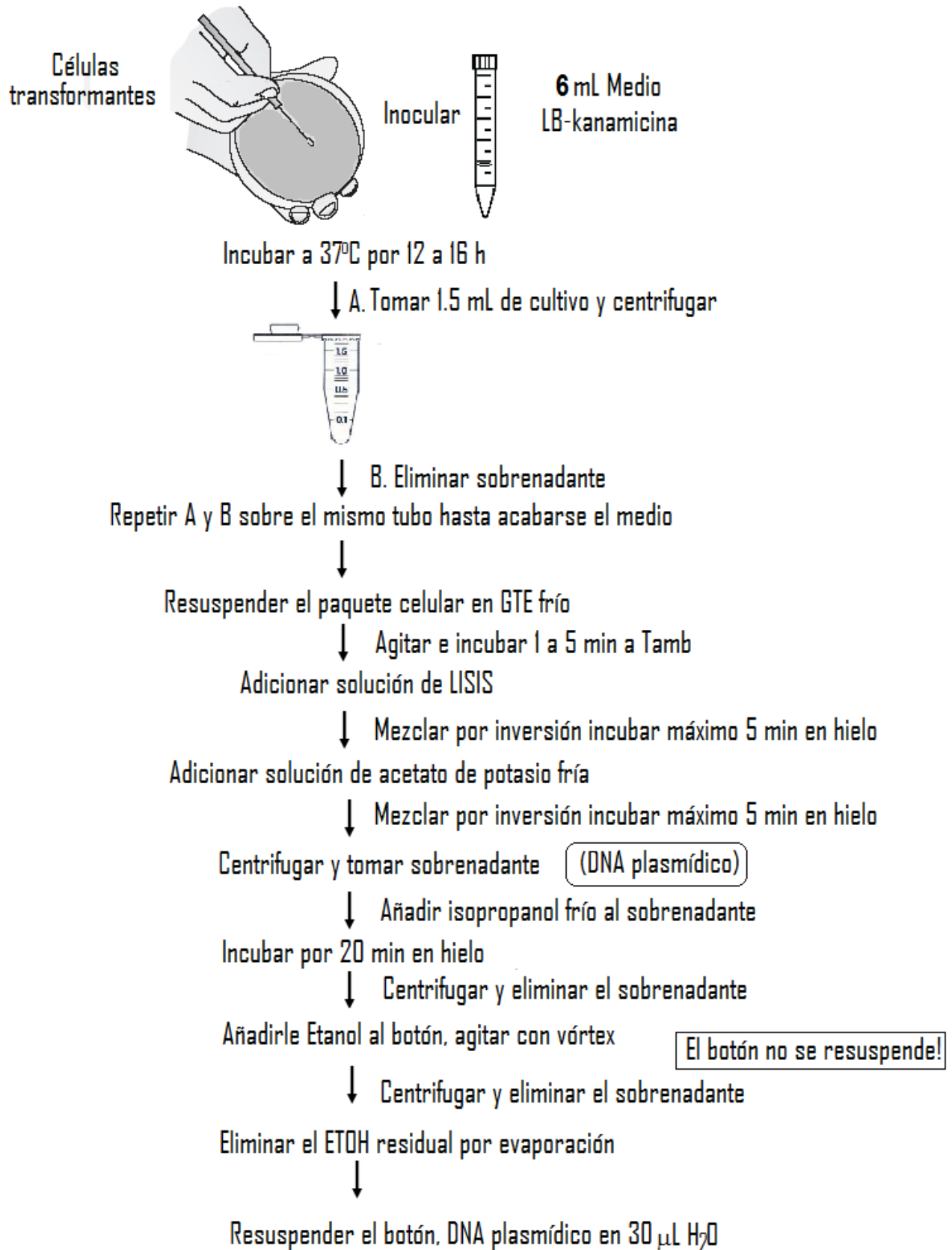


Figura 4.3. Protocolo de obtención de DNA plasmídico a partir de las células transformantes que se obtuvieron en la práctica anterior.

Cuestionario

1. ¿Cuáles son las propiedades del DNA plasmídico que nos permiten separarlos del DNA cromosomal o genómico?
2. Explica por qué se usa NaOH y SDS, acetato de potasio y etanol en la purificación de plásmidos.
3. ¿Cuáles son los principales contaminantes de una preparación de plásmidos?
4. ¿Cómo los eliminas?
5. ¿Cuáles son los usos que se le dan a los plásmidos una vez purificados?
6. ¿Cuáles son los métodos utilizados para cuantificar los ácidos nucleicos?
7. ¿Qué experimento realizarías para determinar si el plásmido que obtuviste se encuentra puro?
8. ¿Porqué a veces es necesario utilizar RNAasa para visualizar el DNA plasmídico?
9. Busca el factor de conversión de pares de bases a número de aminoácidos y de número de aminoácidos a peso molecular de proteína en kDa.

Referencias

- Tümmler B. y Mekus F. Genomic DNA: Purification. Encyclopedia of life sciences & 2005, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net.
- Stryer L. Bioquímica, 2004, Ed.Reverté, pp.745-773.
- Watson JD, Gilman M, Witkowski JA, Zoller M. Recombinant DNA. Segunda edición, WH Freeman.

TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO II: ENSAYOS DE RESTRICCIÓN DE PLÁSMIDO

Objetivos

- Conocer el principio de separación y detección de ácidos nucleicos en geles de agarosa.
- Emplear la electroforesis en geles de agarosa para visualizar ácidos nucleicos.
- Determinar el tamaño de fragmentos de ácidos nucleicos separados en geles de agarosa.
- Conocer la utilidad de las enzimas de restricción en la transformación genética y la biotecnología.

En la práctica se utilizarán dos enzimas de restricción en una mezcla. Esto se debe a que el vector utilizado en la transformación (Figuras 4.3 y 4.4) tiene dos sitios de restricción para enzimas diferentes, de manera que sólo se podrá liberar el fragmento de DNA de interés al cortar por los extremos con las dos enzimas que reconocen dichos sitios.

Material biológico

DNA plasmídico purificado de la práctica anterior.

Materiales y equipo

Recipiente para hielo

Tubos para microfuga
Gradilla para tubos de microfuga
Recipientes para teñir el gel.
Micropipeta de 100-1000 μL
Micropipeta de 20-200 μL
Micropipeta de 0.5-10 μL
Caja de puntas para micropipeta con capacidad de 10 μL estériles
Caja de puntas para micropipeta con capacidad de 200 μL estériles
Caja de puntas para micropipeta con capacidad de 1000 μL estériles
Cámara de electroforesis horizontal
Fuente de poder
Vórtex
Horno de microondas
Microfuga
Baño de incubación a 37°C
Baño de incubación o bloque de calentamiento a 100°C
Transiluminador
Pantalla de acrílico
Cámara fotográfica

Reactivos

- *NdeI*. Solicitar al profesor justo antes de usarse. Se almacenan a -20°C .
 - *BamHI*. Solicitar al profesor justo antes de usarse. Se almacenan a -20°C .
- NOTA. Las enzimas de restricción son muy sensibles a la temperatura, mantenerlas en frío durante su manipulación.**
- Amortiguador TANGO de restricción viene con la enzima de restricción. Reactivo que es proporcionado por el proveedor junto con la enzima *NdeI*. Recordar que este es un amortiguador universal, por lo que la eficiencia de la restricción no es del 100 %.
 - TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA). Para preparar TAE 50X pesar 24.2 g Tris base, 5.71 mL ácido acético glacial y 1 mL de 0.5 M de EDTA (pH 8) y se afora con agua a 100 mL; se diluye a 1X justo antes de usar.
 - Agarosa
 - Amortiguador de muestra para ácidos nucleicos (0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilencianol FF y 3% de glicerol; se almacena 4°C)
 - Estándar de peso molecular. Proporcionado por el laboratorio, se utilizará de acuerdo a las instrucciones del proveedor.
 - Bromuro de etidio 10 mg/mL (GIBCO BRL)
 - RNAasa

Desarrollo experimental

Ensayo de restricción

1. Etiquetar dos tubos de microfuga.
2. Colocar en cada tubo los siguientes reactivos: 10 μL de Plásmido y 1 μL de Amortiguador Tango10X
3. Incubar a 100°C por 5 min.
4. Transferir al recipiente con hielo e incubar por 5 min.

5. Pasado el tiempo de incubación, añadir al tubo 1 únicamente una de las dos enzimas de restricción que fueron proporcionadas, se sugiere que un par de equipos coloque 1 μL *Bam*HI y otro par de equipos 1 μL *Nde*I. Mezclar suavemente después de añadir la enzima.
6. Al tubo 2 añadir 1 μL de *Bam*HI y 1 μL de *Nde*I. Mezclar suavemente con ligeros golpes al tubo de microfuga.
7. Centrifugar los dos tubos de microfuga por 5 segundos, para que todo el líquido se deposite en el fondo.
8. Incubar a 37°C por 1.5 h.
9. Se sugiere añadir 0.5 μl de una solución de RNasa (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubar 30 min a 37°C, o incluir la RNAasa durante el tiempo de la restricción. Este procedimiento eliminará el RNA y facilitará la visualización de los productos de la restricción en el gel. Otra opción para la eliminación del RNA es añadir 2 μl de la solución de RNasa a los 35 mL de gel poco antes de vaciarlo a la cámara de electroforesis, cuando esté tibio.
10. Al término de la incubación colocar los tubos en hielo.
11. Se recomienda que para visualizar más nítidamente los fragmentos de la restricción, tomar todo el volumen usado en el ensayo de restricción de cada tubo para correr en un gel de agarosa.

Preparación del gel

- Se sugiere utilizar 1 gel por cada 2 equipos y utilizar el peine para hacer 8 pozos o carriles en el gel.
- Colocar la bandeja de acrílico para hacer el gel dentro de la cámara y colocar el peine.
- Preparar un gel de agarosa al 1%. Pesar 0.35 g agarosa en un matraz Erlenmeyer, añadir 35 mL de amortiguador TAE 1X, tapar con algodón o una servitoalla. Se calienta la mezcla en microondas por 1 a 3 min o hasta que la agarosa se disuelva bien.
- Esperar a que la temperatura baje hasta 45-60°C, añadir entonces 2 μL bromuro de etidio (**MANEJAR CON GUANTES, REACTIVO MUTAGÉNICO**) para obtener una concentración final de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, agitar el matraz para mezclar. O bien añadir el reactivo SyBRGreen (se recomienda usar 1 μL de 10,000 SYBR Green I por cada 10 mL de gel).
- Depositar el gel en la bandeja de la cámara (Figura 4.7), evitando la formación de burbujas. Se deja enfriar hasta que polimerice (aproximadamente 20 min).
- Quitar los acrílicos que hacen la bandeja y colocar el gel en la cámara de electroforesis.
- Añadir el amortiguador TAE en la cámara. La cámara de electroforesis se llena con aproximadamente 275 mL de TAE 1X o hasta que se cubran los pozos.

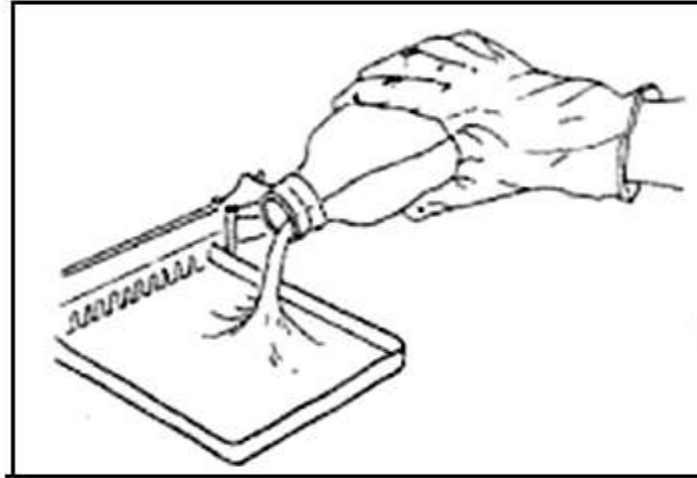


Figura 4.4. Preparación de un gel de agarosa. Adición de la agarosa disuelta en TAE.

Preparación y cargado de las muestras.

1. Tomar los tubos de microfuga que fueron usados en la restricción y etiquetarlos R1, R2. Además marcar dos tubos más uno como E de estándar y otro como P de plásmido sin digerir.
2. Añadir los reactivos como se indica en la tabla 4.1. Usar una punta de micropipeta distinta para cada tubo, de esta manera se evita la contaminación cruzada.

Tabla 4.1. Preparación de muestras para aplicar en el gel de agarosa.

| Reactivos | Estándar* (E) | Plásmido sin digerir (P) | Plásmido digerido con una enzima (R1) | Plásmido digerido con dos enzimas (R2) |
|-------------------------|--|--------------------------------|---|--|
| Muestra | 1 μL DNA λ -HindIII | 10 μL | 12 μL ** | 13 μL ** |
| H ₂ O | 9 μL | – | – | |
| Amortiguador de muestra | 2 μL (Stop Mix) | 3 μL | 3 μL | 3 μL |

*El estándar que se usa en el laboratorio lambda DNA digerido con HindIII puede calentarse a 65°C por 10 min para separar las bandas de 23130 y 4361. Los pesos moleculares que deben encontrarse en el carril del estándar son 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027 y 564 pb.

** Volumen que quedo después de realizar el ensayo de restricción.

3. Centrifugar por 3 segundos en microfuga, para que se mezcle y deposite el líquido en el fondo.
4. Retirar el peine de la bandeja. **Muy importante:** los pozos del gel tienen que estar orientados hacia el cátodo, generalmente el electrodo se presenta de color negro.
5. Tomar el volumen total de cada uno de los tubos de microfuga preparados según la tabla 4.1 y colocar en los pozos como se muestra en la Figura 4.8.

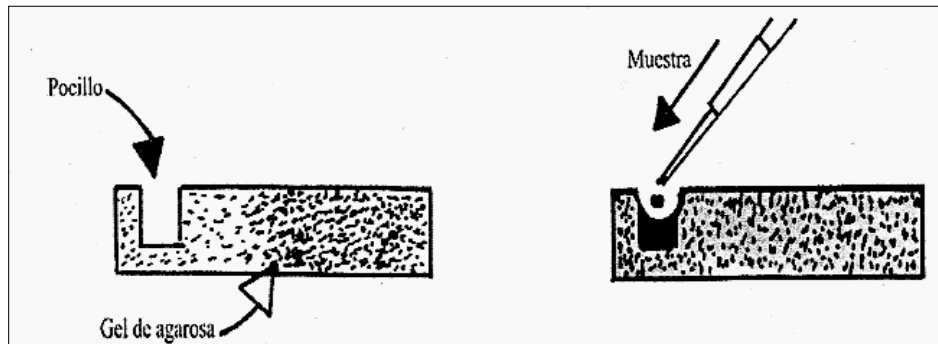


Figura 4.5. Cargado de la muestras en los pozos del gel de agarosa.

6. Una vez depositadas las muestras, colocar la tapa con los electrodos (rojo con rojo y negro con negro) y conectar a la corriente. Aplicar 80 V por 30 a 40 min. Verificar que las muestras migren hacia el lado positivo de la cámara.
7. Al concluir la electroforesis desconectar el equipo y retirar la bandeja para la observación de DNA (**USAR GANTES**). El gel puede ser inmediatamente colocado sobre una lámpara de luz UV para visualizar las bandas de DNA. La radiación ultravioleta es peligrosa, **usar lentes especiales o colocar una pantalla de acrílico entre el observador y la fuente de luz UV**.
8. Tomar la foto del gel. Posteriormente desechar el gel en el recipiente colocado para ese propósito, los geles serán incinerados, junto con los guantes y puntas si es que estuvieron en contacto con el bromuro de etidio.
Utilizando la foto, medir la distancia desde el centro del pozo hasta cada una de las bandas de DNA detectadas. Construir la curva de estándares de peso molecular y Estimar el tamaño aproximado de cada uno de los fragmentos de DNA así como del vector sin restringir, utilizar para ello los **valores del estándar de peso molecular** que se encuentran en la parte inferior de la tabla 4.1.
9. Analizar los resultados.

Cuestionario

1. ¿Qué parte de la molécula de DNA le confiere la carga negativa?
2. ¿Cuál es el papel de cada componente del amortiguador de carga, en particular de los dos colorantes que contiene?
3. ¿Por qué el bromuro de etidio es un reactivo mutagénico?
4. ¿A que se le denomina topoisómeros?
5. ¿En la práctica se pudieron observar topoisómeros?
6. ¿Qué peso molecular tienen los topoisómeros?
7. ¿Qué tipo de extremos producen las enzimas utilizadas en la práctica, romos o cohesivos?
8. ¿Cuántos fragmentos de DNA o restricción se obtuvieron al utilizar las dos enzimas *NdeI* y *BamH1*?
9. ¿Cuántos fragmentos se obtuvieron al utilizar sólo una de las enzimas de restricción?
¿Por qué?
10. ¿Cuál fue el peso molecular del DNA liberado y del plásmido o vector?
11. ¿Cuáles son las aplicaciones de rutina de las enzimas de restricción?

Referencias

- Devlin T. Biochemistry. 1992 Ed. Wiley- Liss, pp. 768-773. **QP514.2**
- Kenneth D. Digestion of DNA with Restriction Endonucleases. *Current Protocols in Protein Science* (1998) A.4I.1-A.4I.3.
- Mitsis P, Exonucleases. Encyclopedia of life sciences © 2001, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net.
- Micklos DA, Freyer GA y Crotty DA. 2003. DNA Science. A first course. 2nd edition. Cold spring Harbor Laboratory Press, CSH, New York, USA. Localización **QH442**
- Nelson D. Principles of Biochemistry. 2004, 4a edition Ed. Freeman and company, pp. 279-317. Localización **QH345 L43**
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory. CSH, New Harbor Laboratory. CSH. New York, USA.
- Voet y JG Voet. Biochemistry. Energy metabolism: Integration and organ specialization. 2da. Ed. John Willey & Sons, INC. 1995. Pp848-914.

TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO II: INDUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE.

Objetivos

- Conocer el fundamento de la inducción de la síntesis de proteínas recombinantes en *E. coli*
- Realizar la inducción de una proteína recombinante (β -lactamasa)
- Obtener la curva temporal de inducción de una proteína recombinante
- Interpretar el patrón electroforético de producción de una proteína recombinante
- Conocer las aplicaciones biotecnológicas de las proteínas recombinantes

En la práctica se llevará a cabo el monitoreo de la inducción de la β -lactamasa en células completas de *E. coli* transformadas con el vector pET-TEM-1-ompA β -lactamasa (Figura 4.4), vector que fue producido a partir del vector pET-24a-d(+) que se mostró en la Figura 4.3.

Material biológico por grupo

1 tubo Falcón con 15 mL cultivo líquido saturado de células transformadas de *E. coli* (crecidas por 12 a 16 horas con agitación vigorosa).

Material y equipo

1 mechero
 1 recipiente para hielo
 Tubos para microfuga de 0.5 mL
 Micropipeta de 2 a 10 μ L
 Micropipeta de 20 a 200 μ L
 Micropipeta de 200 a 1000 μ L
 1 caja de puntas de 10 μ L para micropipeta
 1 caja de puntas de 200 μ L para micropipeta

1 caja de puntas de 1000 μ L para micropipeta
 Placas de vidrio
 Peine
 Separadores
 Pinzas para sujetar las placas
 Cámara para electroforesis
 2 vasos de precipitados 25 mL
 1 pipeta Pasteur con bulbo
 Recipiente de plástico con tapa de cierre hermético para la tinción.
 1 equipo completo para electroforesis de proteínas marca BIORAD (incluye: reservorio con electrodos, placas de vidrio, peines, sujetadores de las placas de vidrio y módulo para preparar el gel)
 Fuente de poder
 Vórtex
 Incubadora a 37°C con agitación
 Cámara fotográfica

Reactivos

- 1 tubo de 50 mL con 15 mL de medio LB-kanamicina (30 μ g/mL)
- 100 mM IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido, análogo no hidrolizable de la alolactosa, inductor de la expresión de proteínas recombinantes)
- Estándar de peso molecular de proteínas
- Reactivos para preparación de geles de poliacrilamida-SDS, corrimiento y tinción (ver sección II del manual)
- 1 mL de LB para ajustar a cero el espectrofotómetro

Desarrollo experimental

Inducción de proteína recombinante, β -lactamasa (Figura 4.6).

1. Tomar 2.5 mL de un cultivo saturado de células de *E. coli* transformadas con el vector PET-TEM-1-ompA β -lactamasa, y añadirlos a 15 mL de medio LB-kanamicina.
2. Tomar una alícuota de 1 mL de la mezcla del paso 1 y leerla en el espectrofotómetro a 600 nm contra un blanco de medio Luria (la absorbancia debe ser menor a 0.3). Registrar la absorbancia.
3. Incubar los tubos con agitación vigorosa a 37°C (colocarlos en posición diagonal para que se mezcle bien el medio). El cultivo celular debe llegar a una absorbancia entre 0.6 a 0.8.
4. Para verificar que se llegó a la absorbancia indicada, tomar una alícuota de 1 mL y leerla en el espectrofotómetro a 600 nm contra un blanco de medio Luria. Si aún no llega volver a incubar el matraz con agitación vigorosa.
5. Al llegar a la absorbancia apropiada, tomar una alícuota a la que llamaremos **tiempo 0** (mantener en hielo el tubo de microfuga).
6. **INICIO DE LA INDUCCIÓN.** Agregar el IPTG para tener una concentración final en el tubo de 1 mM. El volumen del medio con células puede variar, dependiendo del número de alícuotas que se hayan tomado para determinar que la absorbancia corresponde a 0.6-0.8. Hacer el cálculo tomando en cuenta el volumen final de medio con células.

7. Incubar nuevamente a 37°C con agitación horizontal y tomar alícuotas de 20 μ L cada 20 min por 1 h o cada 30 min por 1.5 h.
8. Cada alícuota se coloca en un tubo de microfuga perfectamente etiquetado.
9. A cada alícuota añadirle 20 μ L de amortiguador de muestra para proteínas.
10. Guardar todas las alícuotas a 4°C.

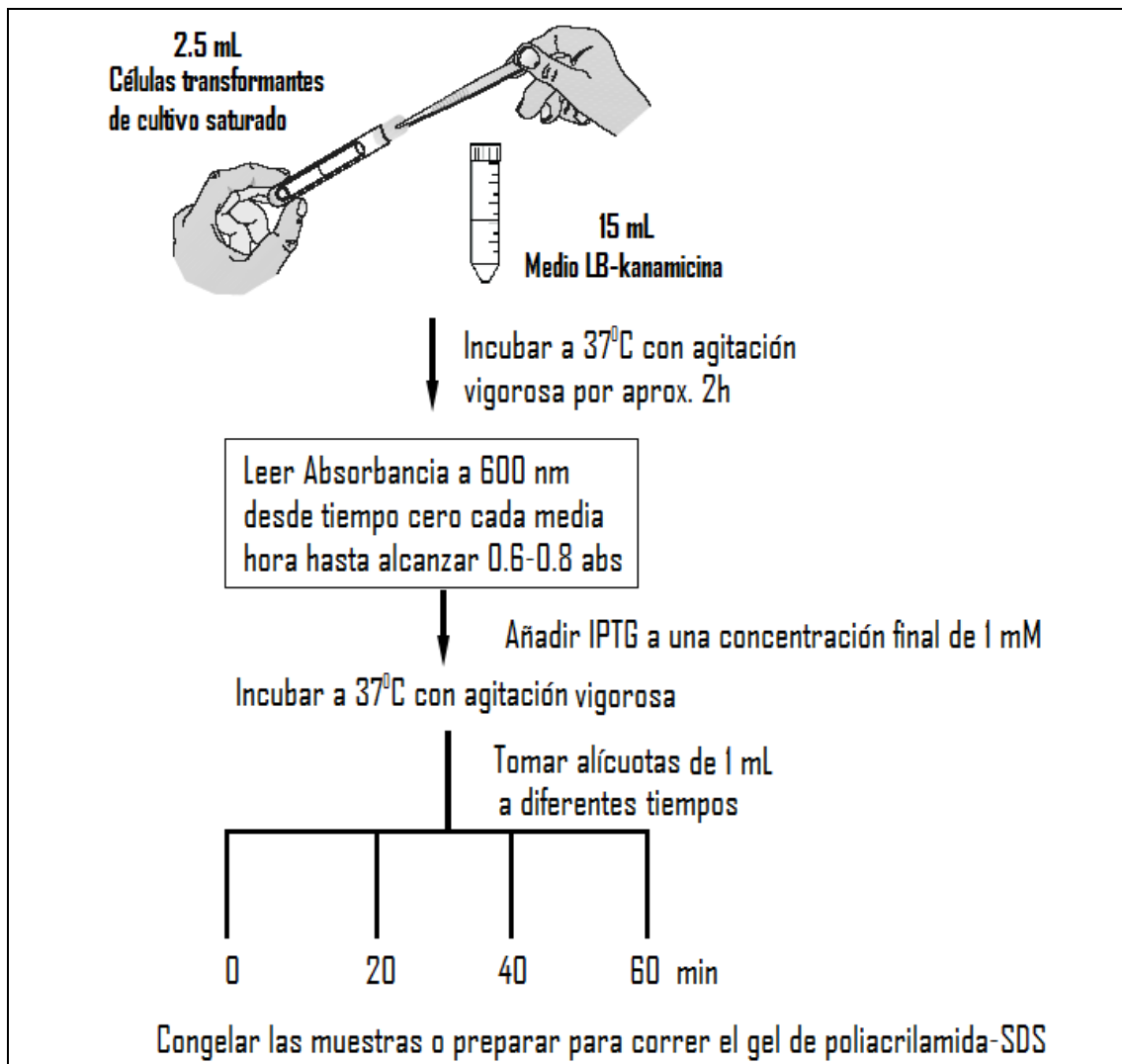


Figura 4.6. Proceso de inducción de proteína recombinante en *E. coli*.

Preparación de un gel de poliacrilamida-SDS

Durante el tiempo de incubación e inducción de la proteína recombinante, preparar un gel de poliacrilamida-SDS por cada dos equipos, utilizar un peine que genera 10 carriles o pozos. Las instrucciones de elaboración se encuentran en la sección II, parte III del manual. O bien realizar los gels y la corrida de las muestras en otra sesión de laboratorio.

Preparación de las muestras y separación en un gel de poliacrilamida-SDS

1. Hacer una mezcla apropiada de estándares de peso molecular (se sugiere 7 μ L de los estándares de peso molecular más 18 μ L de amortiguador de muestra).

2. Ensamblar el gel en la cámara de electroforesis.
3. Aplicar 20 o 25 μL de cada muestra en el gel.
4. Iniciar la electroforesis aplicando una corriente de 10 a 15 mA y hasta que el frente del colorante haya entrado en el gel separador. Después incrementar el amperaje a 25 mA, siempre y cuando no se caliente el gel.
5. Terminar la corrida una vez que el frente haya alcanzado el borde inferior del gel.
6. Enseguida desprender el gel de las placas y realizar la tinción depositando el gel en una charola que contenga solución teñidora y colocando la bandeja en agitación constante. El colorante sugerido aquí es el mismo que se utilizó en la primera parte del curso y tiñe a las proteínas después de 2 h. Aunque hay otros colorantes que pueden teñir a estas en menor tiempo su sensibilidad es menor.
7. Decantar la solución teñidora, lavar el exceso con H_2O destilada y añadir la solución desteñidora. Poner a agitar suavemente.
8. Tomar la foto del gel.
9. Analizar los resultados. La proteína tiene un peso molecular aproximado de 32 kDa si tiene el péptido señal de la proteína ompA y de 29 kDa sin péptido señal.

Cuestionario

1. Menciona las diferencias entre las células de *E. coli* DH5 α y las células *E. coli* BL21
2. ¿Qué es una proteína recombinante?
3. ¿Por qué el cultivo de células debe de llegar a una densidad óptica de 0.6 a 0.8 antes de comenzar el proceso de inducción de la proteína recombinante?
4. ¿Cuál fue el tiempo en el que produjo la máxima cantidad de proteína recombinante?
5. ¿Qué otros parámetros se podrían modificar para obtener el mayor rendimiento de la proteína?
6. ¿Qué son los cuerpos de inclusión?
7. ¿Qué experimento realizarías para determinar si la proteína se encuentra en forma soluble o en forma agregada?
8. ¿Qué método propondrías para purificar a la proteína recombinante obtenida?
9. Describe tres ejemplos de proteínas recombinantes que se producen actualmente de manera comercial, explicando sus usos.

Referencias

- Ghayeb J, Kimura H, Takahara M, Hsiung H, Masui Y, Inouye M. 1984. Secretion cloning vectors in *Escherichia coli*. The EMBO Journal 3, 2437-2442.
- Hammlev D, Madden D, Nørby S, Turner J. Unit 2. DNA profiling. European initiative for biotechnology education 1995. <http://www.reading.ac.uk/NCBE>.
- LaVallie E. 1995. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Current Protocols in Protein Science 5.1.1-5.1.8.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory. CSH, New Harbor Laboratory. CSH. New York, USA.
- Sosa-Peinado A, Mustafi D, Makinen MW. 2000. Overexpression and biosynthetic deuterium enrichment of TEM-1 beta-lactamase for structural characterization by magnetic resonance methods. Protein Expression & Purification 19: 235-45.
- Voet y JG Voet. Biochemistry. Energy metabolism: Integration and organ specialization. 2da. Ed. John Willey & Sons, INC. 1995. Pp906-914.

5. REGULACIÓN DEL METABOLISMO

PARTE I: REGULACIÓN GENÉTICA EN EL OPERÓN *lac*

Objetivos

- Comprender la importancia de la regulación genética como mecanismo para controlar los niveles de enzimas en la célula.
- Conocer los elementos que integran el operón de la lactosa.
- Entender el funcionamiento del operón de la lactosa en presencia y ausencia de este carbohidrato.
- Conocer el concepto de represión catabólica y cómo se lleva a cabo.

Material biológico

Cultivo de *E. coli* W3110 en medio M9-glicerol.

Material y equipo de laboratorio

5 Tubos para microfuga de 1.5 mL (estériles)

1 gradilla para microtubos

1 mechero

1 Micropipeta con capacidad de 200-1000 μ L

1 Micropipeta con capacidad de 50-200 μ L

1 Micropipeta con capacidad de 10 a 50 μ L

1 Caja de puntas para micropipeta de 200 μ L

1 Caja de puntas para micropipeta de 1000 μ L

Centrífuga clínica

Incubadora a 37°C

Reactivos

- 1 tubo con medio M9-glicerol estéril. El medio M-9 glicerol contiene una mezcla de sales y glicerol: 0.3 % Na_2HPO_4 , 0.5 % KH_2PO_4 , 0.5 % NaCl , 0.1 % NH_4Cl , 1 mM MgSO_4 , 0.1mM CaCl_2 y 0.2 % glicerol.
- Solución de glucosa al 2% estéril
- Solución de lactosa al 2% estéril
- Solución de glucosa 2% + lactosa 2% estéril
- Amortiguador Z (60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mM KCl , 1mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mM β -mercaptoetanol, pH 7.0).
- Reactivo ONPG (0.1%Orto-Nitrofenil Galactosa disuelto en amortiguador Z). **El reactivo es incoloro y debe prepararse justo antes de usarse para mejores resultados.**
- SDS al 0.1%
- Na_2CO_3 1M
- Cloroformo

Desarrollo de la práctica (Figura 5.2)

Sólo los pasos 1 al 4 requieren condiciones de esterilidad.

1. Colocar 1 mL del cultivo de *E.coli* W3110 en cada uno de los 4 microtubos estériles y rotularlos de la A a la D. El tubo E no contendrá células, sino 1 mL de medio M9-glicerol como E (blanco).
2. Añadir a cada tubo lo siguiente:

Tubo A 250 μ L de glucosa 2%

Tubo B 250 μ L de lactosa 2%

Tubo C 250 μ L de glucosa 2% + lactosa 2%

Tubo D 250 μ L de glucosa 2%

Tubo E 250 μ L de glucosa 2% + lactosa 2%

3. Incubar los tubos durante 15 min a 37°C con agitación ocasional. A los 7.5 min de incubación añadir, únicamente al tubo D, 250 μ L de lactosa 2% y reintegrarlo a la incubadora a 37°C.
4. Cuando hayan transcurrido los 15 min de incubación, centrifugar los tubos en la microfuga a 10,000 rpm durante 1 minuto.
5. Decantar y resuspender cada paquete celular en 250 μ L de amortiguador Z.
6. Añadir a cada tubo 25 μ L de cloroformo y 12.5 μ L de SDS 0.1%. Agitar durante 10 segundos.
7. Añadir a cada tubo 50 μ L de reactivo ONPG y agitar.
8. Incubar a temperatura ambiente durante 2 min o hasta el desarrollo de color amarillo.
Nota: monitorear la aparición del color amarillo y no dejar que el color se iguale en todos los tubos, parar la reacción una vez que se vean diferencias de color entre los diferentes tubos.
9. Parar la reacción con 125 μ L de Na_2CO_3 1M.
10. Anotar cuáles tubos desarrollan color amarillo y con qué intensidad (se pueden utilizar cruces, por ejemplo + para un tubo con poca intensidad de color y ++++ para el tubo con mayor intensidad).
11. Para un resultado cuantitativo se puede leer la absorbencia de la solución a 420 nm.
12. Analizar y reportar los resultados obtenidos.

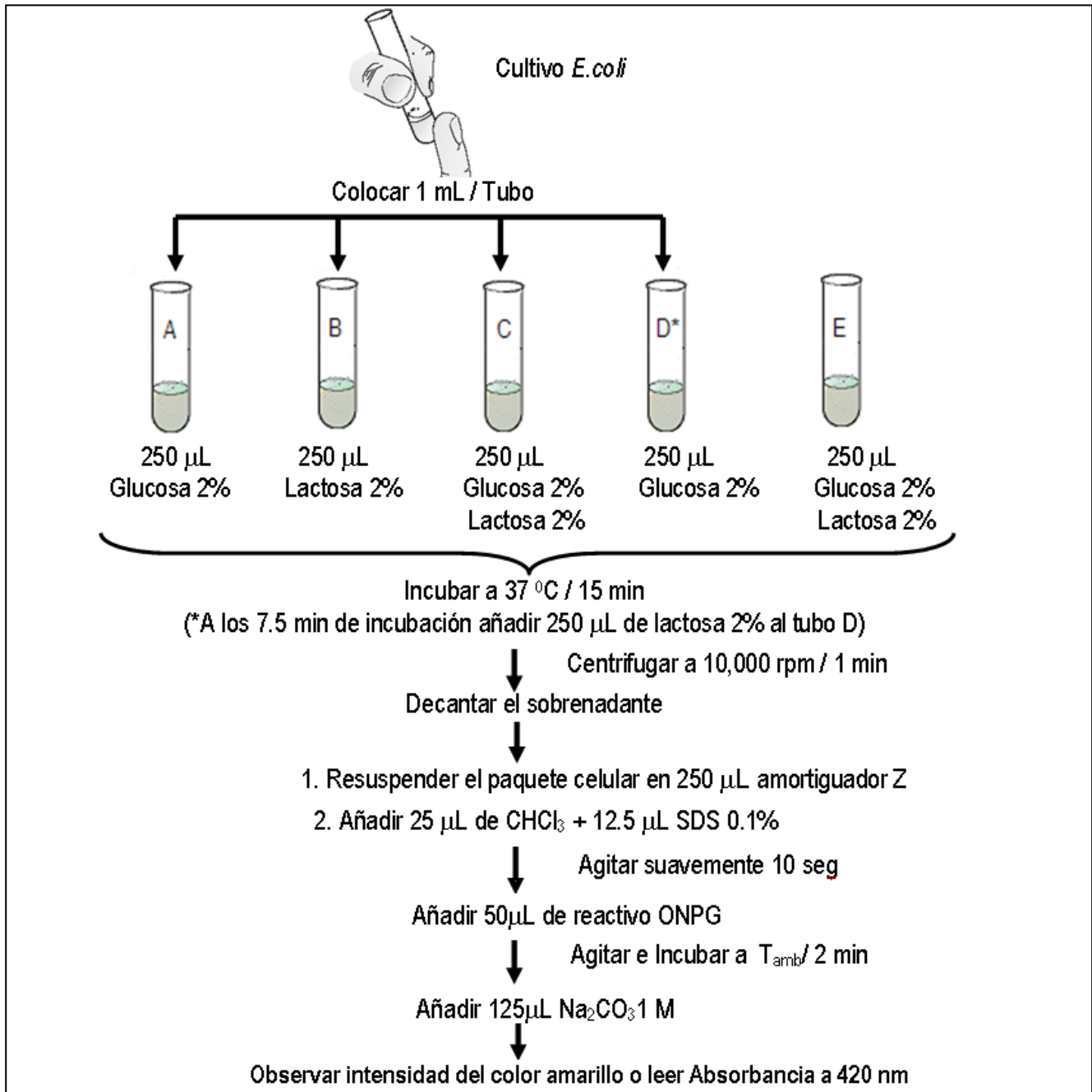


Figura 5.2. Protocolo de inducción de expresión de los genes involucrados en la utilización de lactosa

Cuestionario

1. ¿Qué es la regulación genética?
2. ¿Cuáles son las diferencias entre la expresión genética constitutiva, la inducible y la represible?
3. ¿Cómo funcionan los mecanismos de control positivos de la expresión genética?
4. ¿Cómo funcionan los mecanismos de control negativos de la expresión genética?
5. Investiga qué reacciones catalizan las enzimas del operón de la lactosa.
6. ¿Qué son un activador y un inductor?
7. ¿Qué son un represor y un co-represor?
8. ¿Qué es un operón y cuáles son sus componentes?
9. ¿Cuál es la estructura del operón de lactosa de *E.coli*?
10. ¿Cómo funciona este operón en ausencia y en presencia de lactosa?
11. ¿Qué es la represión catabólica y cómo se ejerce este proceso sobre el operón de lactosa?
12. ¿Por qué la bacteria utilizada en la práctica fue cultivada inicialmente en medio M9-glicerol?
13. ¿Para qué se utiliza cada reactivo de la práctica?
14. Explica qué ocurre en los tubos A-E en la práctica.
15. ¿Qué reacción es responsable del color amarillo observado en los tubos?
16. ¿Qué ocurriría si a los tubos B y C se agregara ATP?
17. ¿Cuál será el fenotipo en ausencia y en presencia de lactosa de cada uno de los siguientes mutantes del operón *lac*: i^- , f^- , z^- , y^- , a^- , p^- , y o^c ? Explica por qué.
18. ¿Qué diferencias existen en la regulación de una vía metabólica como la de la degradación de la lactosa y una vía anabólica, como la de la síntesis de triptófano?
19. ¿Qué importancia tiene la regulación de la expresión genética en procariontes?
20. ¿Cuáles son las principales diferencias en la regulación genética entre procariontes y eucariontes?

Referencias

- Devlin TM. Textbook of biochemistry with clinical correlations. Regulation of gene expression. Ed John Wiley & Sons, INC, New York, 1997. Pp. 20-52. Localización **QP514.2**
- Gardner JE. Garder E. Principios de genética. 1998, 4a edition Ed. Limusa, pp. 390-407. Localización **QH581.2 M 65**
- Genética General. Manual de prácticas de laboratorio. Regulación genética en el operón *lac*. Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria. México, 2002.
- Klug SW, Cummings RM. Conceptos de genética. Ed. Prentice Hall. Madrid 1999. Pp. 51-71.
- Lodish H, Molecular Cell Biology, 2003, Ed. Freeman and company, pp. 115-125. Localización **QH581.2 M 65**
- Stryer L. Bioquímica, 2004, Ed.Reverté, pp.868-873.

Estudio de la relación genotipo-fenotipo

La percepción del sabor de la difeniltiocarbamida

Objetivos

- Aislar DNA de voluntarios.
- Amplificar los fragmentos de DNA deseados mediante PCR.
- Comprobar la presencia del gen amplificado mediante geles de agarosa.
- Encontrar la relación fenotipo-genotipo entre los individuos estudiados.
- Determinar la relación fenotipo-genotipo de voluntarios de acuerdo a su capacidad de percibir el sabor amargo de la PTC

Protocolo experimental

Aislamiento de TAS2R38 por PCR

▪ Materiales y reactivos

- Vasos de plástico
- Microtubos y tubos para PCR estériles
- Agua purificada estéril.
- Solución salina al 0.5% (p/v)
- Suspensión de Chelex ® al 10%
- Reactivos para PCR (ver cuadro)
- Termociclador.
- Microfuga.
- Bloques de calentamiento.
- Micropipetas exclusivas para PCR

• Antes de comenzar

Encender el Termobloque y calentarlo a 100°C.

Preparar una solución de Chelex al 10 % (p/v) con agua estéril.

Hacer que los estudiantes se identifiquen con número de equipo y número de integrante en lugar de usar su nombre o iniciales, para mantener la privacidad de los resultados.

• Toma de muestra

1.- Recordar a los estudiantes que deben haber pasado por lo menos 30 minutos de que ingirieron algún alimento o bebida y de haberse lavado los dientes.

2.- Tomar un poco de agua purificada en un vaso, y enjuagarse la boca (el agua puede ingerirse).

3.- Colocar 10 mL de solución salina al 0.5% (p/v), enjuagarse la boca vigorosamente con esta solución por 1 minuto, después escupirla en el mismo vaso.

4.- Tomar 1.5 mL de la solución anterior en un microtubo, centrifugar a 10 000 rpm por un minuto, y desechar el sobrenadante. **Se debe tener cuidado para no perder el botón de células; si es difícil desechar el sobrenadante, ayudarse con una micropipeta.**

• Aislamiento y amplificación del DNA.

5.- **Cuidar que el botón celular no supere un volumen aproximadamente de 100 µL, si esto sucede no procesar el volumen sobrante de la muestra.** Agregar al botón de

células 1.5 mL de la solución anterior, centrifugar a 10 000 rpm por un minuto, decantar el sobrenadante, conservando aproximadamente 100 µL para ayudar en la resuspensión del botón celular.

6.- Resuspender el botón de células mediante agitación con vórtex.

7.- De la suspensión anterior, transferir 30 µL a otro microtubo, y añadirle 100 µL de la suspensión de Chelex® al 10%.

⚠ **Agitar la suspensión de Chelex® CADA VEZ que se tome el volumen, ya que éste sedimenta rápidamente.**

8.- Poner los microtubos del paso 7 en el Termobloque (que ya debe estar en 100°C) por 10 minutos.

⚠ **Vigilar los microtubos mientras se encuentran en el Termobloque, cuidando que no se abran. USAR LENTES DE SEGURIDAD Y GUANTES PROTECTORES DE CALOR.**

9.- Sacar los microtubos del Termobloque y agitarlos vigorosamente por 5 segundos en vórtex.

10.- Centrifugar los microtubos a 12 000 rpm por 2 minutos.

11.- Con una micropipeta, transferir el sobrenadante a otro microtubo (aproximadamente 70 µL).

⚠ **El Chelex inhibe la reacción de PCR, por lo que el sobrenadante separado no debe tener restos de éste.**

⚠ **Para preparar la reacción de PCR usar micropipetas especiales y puntas nuevas, con el fin de evitar la contaminación de los reactivos con DNA humano o amplicones de reacciones de PCR anteriores. Preparar el MASTER MIX en la campana de flujo laminar.**

12.- Preparar el MASTER MIX por grupo como se muestra en la siguiente tabla. Esta mezcla contiene los reactivos necesarios para que la reacción de amplificación se lleve a cabo. **Mantener en hielo los reactivos, y guardarlos en cuanto sean utilizados. La master mix también debe mantenerse en hielo hasta que todo el grupo esté listo para correr la PCR.**

| Reactivo | Volumen para una reacción (µl) | Volumen necesario (multiplicar por el # de muestras*) |
|-------------------------|--------------------------------|---|
| Agua libre de nucleasas | 16.25 | |
| Amortiguador de PCR 10x | 2.5 | |
| MgCl ₂ | 1.5 | |
| Oligo Mix 25X | 1 | |
| Taq Pol 5U/ µL | 0.25 | |
| dNTPs | 0.5 | |
| TOTAL | 22 | |

*El número de muestras también debe tomar en cuenta el control positivo y el control negativo, así como un 2.5% más.

13. En tubos para PCR, colocar 22 μL de MASTER MIX y agregar 3 μL del sobrenadante obtenido en el paso 11, preparar en las mismas condiciones el control positivo y el control negativo.

14. Correr la PCR de la siguiente manera:

95°C por 5 minutos

30 veces las siguientes condiciones:

95°C por 30 segundos

64°C por 45 segundos

72 °C por 45 segundos

(Tiempo total de reacción: Aproximadamente 1.5 horas)

Estas condiciones se encuentran predeterminadas en el termociclador, en la carpeta **TAS2R38**.

En este paso experimental, la muestra puede congelarse para procesarse más tarde.

- **Digestión de los productos de la PCR**

15.- Transferir 10 μL de la reacción de PCR a un microtubo, y agregar 0.5 μL de *HaeIII* (mezclar SUAVEMENTE). Incubar por 1 hora a 37°C. No olvide guardar la muestra amplificada sobrante (15 μL).

16.- Una vez pasado el tiempo de incubación, correr en un gel de agarosa el producto de la PCR digerido (paso 15), el producto de la PCR sin digerir, el marcador de peso molecular, y los controles positivo y negativo.

Las muestras para la electroforesis se preparan como se describe a continuación:

7 μL de muestra + 1.4 μL de amortiguador (Gel Loading Dye Blue 6X).

Marcador: 1 μL de marcador de peso molecular (2-Log DNA ladder) + 1.4 μL de amortiguador + 6 μL de agua.

⚠ Correr el gel por aproximadamente dos tercios, con TBE 0.5X, a 120 V / 26mA. Ver apartado siguiente para las instrucciones de preparación del gel.

17. Teñir el gel con bromuro de etidio por 5 minutos, y visualizarlo con el transiluminador de luz ultravioleta.

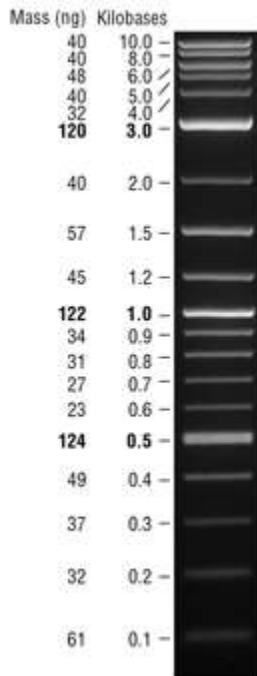


Imagen 1. Marcador de peso molecular 2-Log DNA ladder.

- **Preparación de geles**

Preparar geles de agarosa al 2% (p/v) de la siguiente manera: pesar 0.7 g de agarosa, disolverla con 35 mL de TBE 0.5X calentando con agitación hasta que quede translúcida, vaciar en la caja de electroforesis (antes ajustar separadores y peine de 16 pozos), verificando que no existan burbujas.

- **INFORMACIÓN ADICIONAL**

El gen TAS2R38 es de aproximadamente 1 000 pb, sin embargo, el fragmento amplificado es de 221 pb.

Las secuencias de los primers utilizados en la práctica son:

Forward:

5`-CCTTCGTTTTCTTGGTGAATTTTTGGGATGTAGTGAAGAGGCGG-3`

Cebador Reverse:

5'-AGGTTGGCTTGGTTTGCAATCATC-3'

Secuencia del alelo dominante:

“Homo sapiens PTC bitter taste receptor (PTC) gene, PTC-taster allele, complete cds”,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/?term=AY258597>

Secuencia del alelo recesivo

“Homo sapiens PTC bitter taste receptor (PTC) gene, PTC-non-taster allele, complete cds”
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/?term=AY258598>