

PRÁCTICA 2

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Objetivos

- Introducir en la determinación de la concentración de proteínas en plasma sanguíneo.
- Entender y practicar los principios de la espectrofotometría.
- Aprender a manejar pipetas automáticas.
- Familiarizarse con el concepto de actividad enzimática y su utilización en clínica.
- Calcular velocidades de reacción.
- Utilizar métodos gráficos para el cálculo de K_M y velocidad máxima de los enzimas.

1. Introducción a la determinación de proteínas totales

La **sangre** está formada por una solución acuosa que contiene moléculas de tamaño variable y diversos tipos de elementos celulares. Los elementos formes de la sangre se encuentran formando una suspensión en agua denominada **plasma**. Aunque el plasma es el medio natural de las células sanguíneas, la mayoría de las determinaciones químicas se hacen en **suero**. Las proteínas del plasma pueden clasificarse en dos grupos: las que son sintetizadas por el hígado (albúmina) y las inmunoglobulinas (producidas por las células plasmáticas de la médula ósea). El plasma humano tiene una concentración en proteínas de 60-80 g/L (frecuentemente se expresa en g/dL; 6-8 g/dl). Casi la mitad de esta proteína plasmática es **albúmina**, cuyo rango de concentración es 35-45 g/L. La albúmina es una proteína de 62.000 D que actúa como proteína de reserva, además de importante transportador (ácidos grasos, bilirrubina y fármacos) y regulador osmótico. Es producida por el hígado. Su concentración aumenta en casos de deshidratación y disminuye en casos de ascitis/edema y daño hepático severo.

La determinación de la concentración de proteínas en sangre puede ser llevada a cabo por diferentes métodos. En esta práctica vamos a utilizar uno de los métodos que se utilizan con más frecuencia: el método de Biuret. En él la disolución de proteína se mezcla con un reactivo que determina que aparezca o se intensifique un color (azul) que se cuantifica midiendo la absorbancia a una determinada longitud de onda frente a un blanco de reactivo. El color generado es poco estable y depende de las condiciones de reacción, por lo que hay que realizar una curva patrón con soluciones de una proteína de concentración conocida (albúmina bovina).

La base teórica de la aplicación de la espectrofotometría para medir la concentración de una sustancia en solución se explica en la Introducción de este Manual de Practicas.

Materiales

- Soluciones de suero sanguíneo A y B de concentración desconocida.
- Soluciones de proteína patrón (albúmina de suero bovina) de concentraciones conocidas.
- Reactivo de Biuret.
- Pipetas.
- Tubos.
- Agitadores.
- Rotulador.
- Espectrofotómetros (Colorímetros).

Determinación por el método de Biuret

La concentración de proteínas se medirá utilizando el método del Biuret, que se basa en la formación de un complejo coloreado o cromóforo, de color azul-púrpura, entre el ión cobre y los enlaces peptídicos a pH alcalino. Se requiere un mínimo de dos enlaces peptídicos para la formación del complejo coloreado, que se mide a 550 nm. Es un método poco sensible pero muy preciso, ya que la abundancia de grupos peptídicos (por unidad de masa de proteína) es prácticamente la misma en cualquier proteína.

Método

1) Numerar 7 tubos.

2) Añadir al tubo	1	100 µl de agua destilada (tubo "blanco").	
" "	2	100 µl de solución de proteína	20 g/L.
" "	3	" µl " " "	40 g/L.
" "	4	" µl " " "	60 g/L.
" "	5	" µl " " "	80 g/L.
" "	6	" µl " " "	problema A.
" "	7	" µl " " "	problema B.

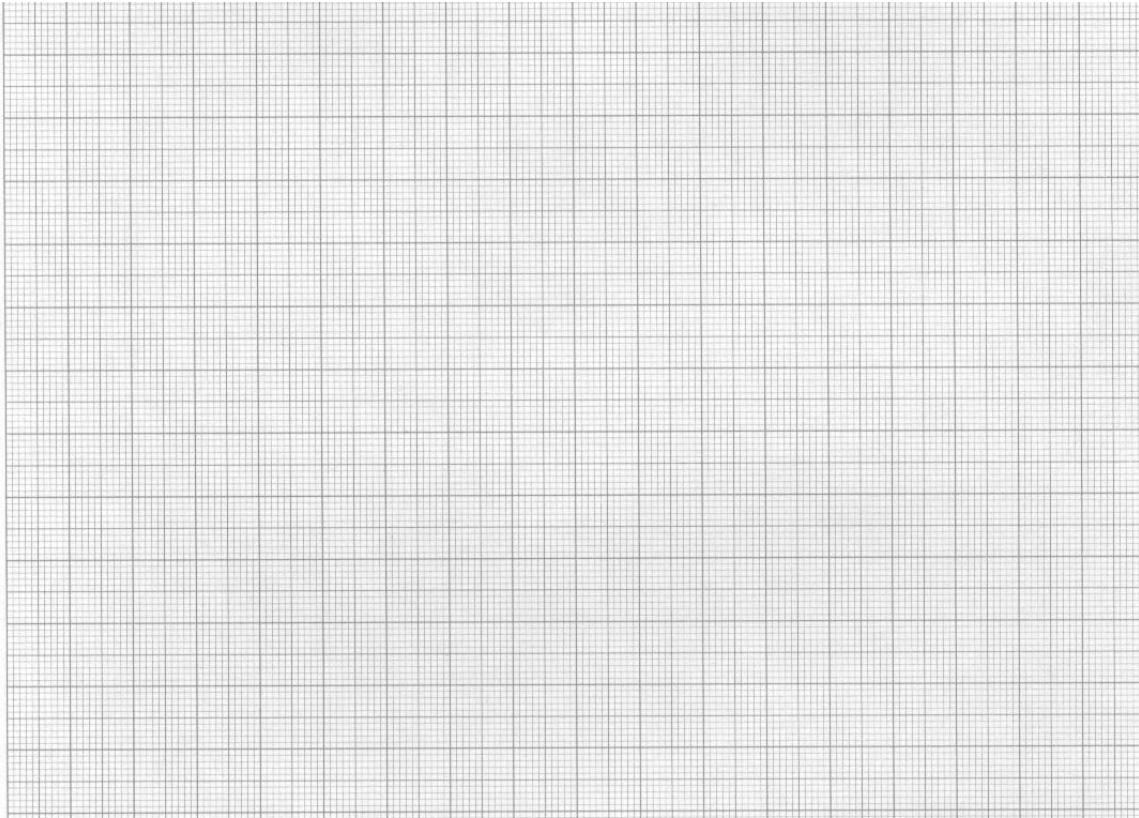
3) Añadir 4 ml de reactivo de Biuret a todos los tubos.

4) Mezclar el contenido de cada tubo.

5) Esperar 5 min. para que se desarrolle el color. Medir la absorbancia a 550 nm ajustando a cero con el tubo 1 (blanco).

Resultados

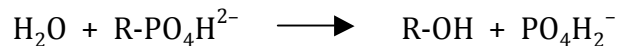
- En una hoja de papel milimetrado construir una gráfica de A550 (eje y) frente a concentración de proteína (eje x) de las soluciones patrón (tubos 2-5). Marcar el eje de las x en g/l de proteína.
- Determinar la concentración de las soluciones problema A y B interpolando en la gráfica patrón los valores de las soluciones problema A y B. Expresarlo en g/L.



2. Introducción al estudio de la cinética enzimática. Fosfatasa Alcalina

Los enzimas son los catalizadores de las reacciones bioquímicas. La medida de la actividad de un enzima y la comprensión de las variables que la afectan es importante no sólo para entender la biología de la célula sino también para el diagnóstico clínico. Cuando se producen lesiones celulares como inflamación o necrosis de los tejidos, ciertas enzimas pasan al plasma y sus niveles en él aumentan. Estos niveles enzimáticos en plasma se analizan para detectar la enfermedad y llegar al diagnóstico diferencial. Una concentración anormalmente alta de una enzima en sangre (reflejada en una alta actividad enzimática) puede ser debida a la destrucción de células de un tejido rico en dicho enzima o al aumento del número de células, como ocurre en los tumores. Por el contrario una baja actividad enzimática puede indicar un trastorno del tejido en cuestión. Los niveles enzimáticos también son útiles para vigilar el curso del tratamiento. Por tanto, la enzimología clínica es un aspecto fundamental del laboratorio clínico.

En esta práctica, emplearemos el enzima fosfatasa alcalina como modelo. Las fosfatasas alcalinas son un grupo de enzimas que presentan su máxima actividad a pH 9-10,5 y catalizan la hidrólisis de ésteres monofosfato. La reacción enzimática general de la fosfatasa alcalina es:

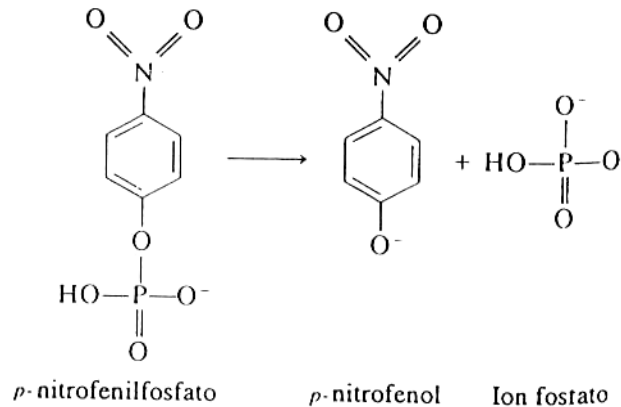


Las distintas fosfatasas alcalinas son isoenzimas, catalizan la misma reacción aunque poseen propiedades diferentes. Se encuentran ampliamente distribuidas en los tejidos humanos tales como hueso, placenta, intestino, bazo y riñón y se desconoce su función biológica precisa. Los niveles de fosfatasa alcalina en plasma son la suma de los isoenzimas procedentes de los distintos órganos. Los valores normales de actividad fosfatasa alcalina en plasma son de 30 a 100U/L ($\mu\text{moles}/\text{min}/\text{L}$ de suero). El aumento de actividad fosfatasa alcalina en plasma se observa en diversas afecciones y su significado clínico se relaciona principalmente con la detección de enfermedades óseas (tumores óseos, osteomalacias) y hepáticas (obstrucción biliar, cáncer).

Además en esta práctica aprenderemos a calcular los dos principales parámetros cinéticos de los enzimas (constante de Michaelis y velocidad máxima) para lo cual se utilizará la representación de dobles recíprocos desarrollada por Lineweaver y Burk.

Descripción de la práctica

En la presente práctica se usará suero como fuente de fosfatasa alcalina. La actividad enzimática se medirá utilizando el p-nitrofenil-fosfato (p-NFF) como sustrato. Por acción del enzima éste se hidroliza a fosfato y p-nitrofenol (pNF) según la siguiente reacción:



El p-nitrofenol (pNF) en solución alcalina es amarillo y su concentración puede ser determinada espectrofotométricamente. La absorbancia de la solución (intensidad del color amarillo) es una medida de la concentración del producto.

La práctica tiene dos partes:

1. *Construcción de la curva patrón del p-nitrofenol.* Se determinará la relación entre absorbancia y concentración del p-nitrofenol.
2. *Efecto de la concentración de sustrato.* Se calculará la K_m y V_{max} de la fosfatasa alcalina.

Materiales

- Tubos y pipetas.
- Agua destilada.
- Tampón Tris 10 mM pH 9,6.
- Soluciones de p-nitrofenol (pNF).
- Soluciones de p-nitrofenil-fosfato (p-NFF).
- NaOH 0,2N.
- Suero humano.
- Espectrofotómetro.
- Baño a 37°C.
- Calculadora.

1. Recta patrón de p-nitrofenol

Preparar los siguientes tubos patrón de p-nitrofenol (pNF, producto):

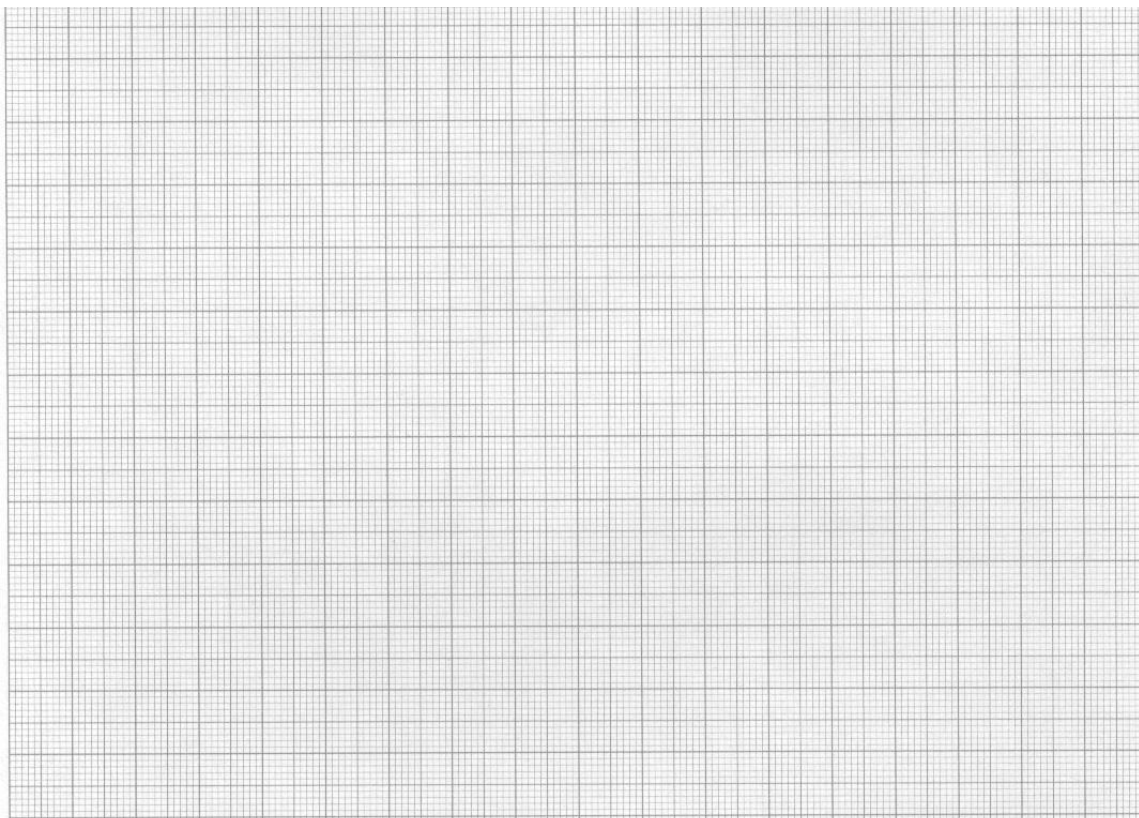
TUBO	Blanco	1	2	3	4
Tris pH 9,6	2,2 ml	2,2 ml	2,2 ml	2,2 ml	2,2 ml
Agua destilada	1 ml				
Soluciones patrón pNF		1ml (15 μ M)	1ml (30 μ M)	1ml (60 μ M)	1ml (90 μ M)

- Mezclar bien.
- Seleccionar en el espectrofotómetro la longitud de onda de 400 nm (máximo de absorción del pNF).
- Ajustar el "cero" de absorbancia con el tubo del blanco.
- Medir la absorbancia de todos los tubos y anotar los valores obtenidos.

Resultados

Representar gráficamente la recta patrón: absorbancias (en ordenadas) frente a concentraciones de p-nitrofenol (en abscisas).

Recta patrón



2. Efecto de la concentración de sustrato y cálculo de la K_m y V_{max}

Preparar 6 tubos marcados convenientemente y añadir lo siguiente:

TUBO	1	2	3	4	5	6	
T Tris pH 9,6	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	(ml)
Agua destilada	1	---	---	---	---	---	"
PNFF *	---	1(2,5)	1(5)	1(7)	1(10)	1(15)	"
Suero	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	"

* Volúmenes en ml. 1(2,5) significa 1 ml de una solución 2,5 mM de p-nitrofenol fosfato

- Mantener los tubos en hielo. Mezclar bien e incubar 5 min a 37°C.
- Añadir 0,3 ml NaOH 0,2N para detener la reacción. Mezclar.
- Ajustar el "cero" del spectronic con el tubo del blanco y medir la A_{400} nm.

Resultados

- Calcular la velocidad inicial (V) en cada tubo expresada en nmoles p-N-fenol/min.
- Representar $1/V$ frente a $1/S$ (representación de Lineweaver-Burk) en la gráfica de la página siguiente.
- Calcular la K_m y V_{max} . ¿Cuáles son sus unidades?

	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
[S]					
A_{400nm}					
[pNF] calculada en la recta patrón					
V_0 (nmoles pNF/min)					
$1/[S]$					
$1/V_0$					

Representación de $1/V$ frente a $1/S$

