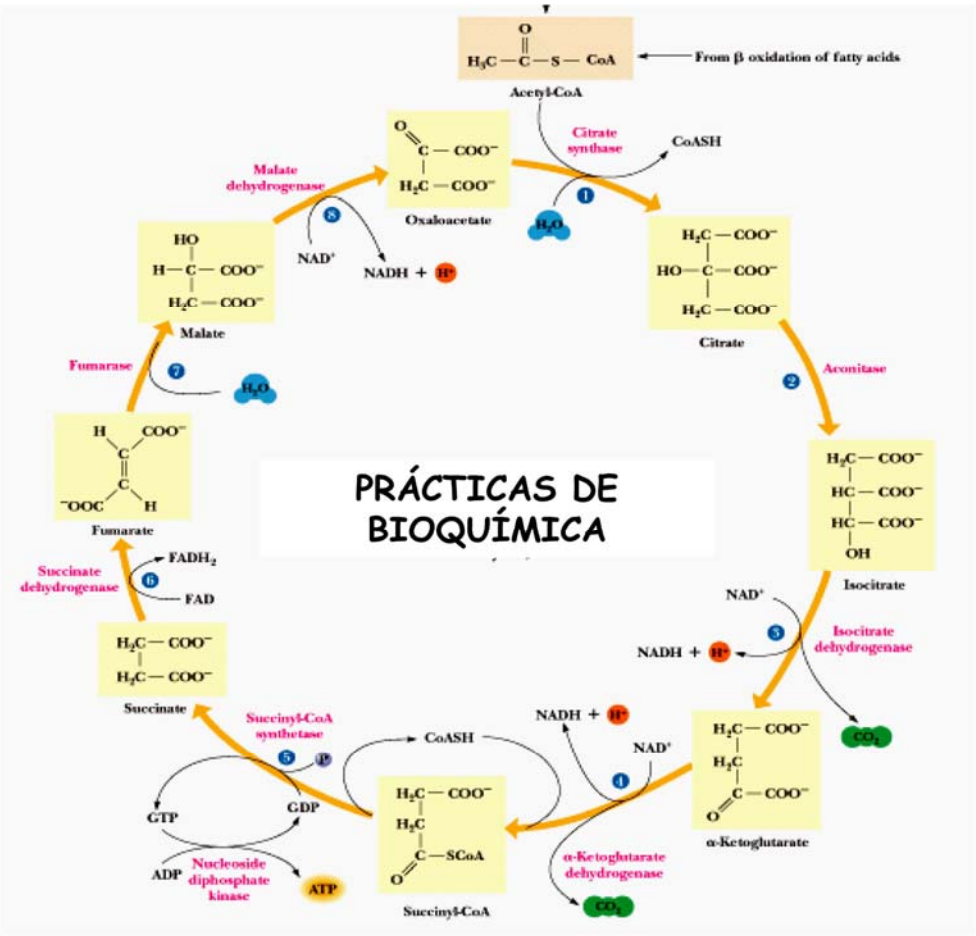


Departamento de Biología Molecular
Facultad de Medicina
Universidad de Cantabria

Alumno:_____

ÍNDICE

		Página
Las prácticas de Bioquímica. Modo de trabajo en el laboratorio		3
Notas sobre espectrofotometría		4
Uso del espectrofotómetro/colorímetro SPECTRONIC 20		6
P.1	Medida del pH. Titulaciones de un aminoácido. Preparación de tampones. Modelización molecular	7
P.2	Determinación cuantitativa de proteínas por métodos espectrofotométrico	13
P.3	Actividad enzimática. Fosfatasa alcalina	18
P.4.	Extracción de DNA plasmídico y digestión con endonucleasas de restricció	25
P.5	Valoración de la diabetes: determinación de la glucemia y hemoglobinas glicosiladas	31
P.6	Estudio de una ruta metabólica. El ciclo de la urea	39

LAS PRACTICAS DE BIOQUIMICA. MODO DE TRABAJO EN EL LABORATORIO

Las prácticas de Bioquímica son una parte esencial en la formación de un alumno en esta materia. Para el buen aprovechamiento de las mismas es necesario leer con atención estas notas y en particular, cada práctica **antes de entrar en el laboratorio**. Al final de cada práctica se reserva un espacio dónde el alumno anotará sus observaciones, cálculos, representaciones gráficas, etc. Asimismo, deberá contestar a las preguntas que se efectúen a lo largo del guión.

Normas generales y de seguridad

- No se puede fumar, comer ni beber en el laboratorio.
- La bata de laboratorio es ante todo un elemento de protección. Es obligatoria la utilización de bata. Mantener en todo momento las batas y vestidos abrochados. En ningún caso se utilizará la ropa del laboratorio fuera de éste (en la cafetería, biblioteca, etc.).
- Cuando lo indique el profesor, se utilizarán guantes, mascarillas y/o gafas de seguridad.
- Los cabellos deben llevarse recogidos, y no deben llevarse pulseras, colgantes ni mangas anchas durante la realización de las prácticas
- No oler ni aspirar las sustancias en ningún caso.
- Nunca efectuar pipeteos con la boca.
- Asegurarse del enfriamiento de los materiales antes de aplicar directamente las manos para cogerlos.
- No manejar aparatos eléctricos con las manos mojadas o cuando se está sobre superficies húmedas.
- Tener especial cuidado en no eliminar por el desagüe, aunque sea en pequeñas cantidades, productos que reaccionan violentamente con el agua, muy tóxicos, inflamables, pestilentes, lacrimógenos, no biodegradables y cancerígenos.
- Es muy importante que el alumno aprenda a trabajar en el laboratorio con orden y limpieza. Para ello las siguientes deben seguirse las siguientes recomendaciones:
- Debe evitarse acumular objetos como prendas de ropa, carteras, mochilas, etc. en las áreas de trabajo.
- Si se cae algún reactivo sobre uno mismo, especialmente en los ojos, lavarse inmediatamente. Si se cae accidentalmente cualquier líquido o reactivo sólido en la mesa y especialmente sobre cualquier instrumento, debe limpiarse inmediatamente.
- Al finalizar la práctica, recoger materiales, reactivos, equipos, etc., evitando las acumulaciones innecesarias. Una vez terminado el trabajo dejar las mesas limpias y las botellas de reactivos ordenadas en los estantes de las mesas.
- Deben lavarse las manos después de terminar las prácticas o en los descansos si implican la salida del laboratorio.

Material o productos peligrosos

- **Manejo de material de vidrio**: examinar siempre el material de vidrio antes de usarlo. Ocasionalmente podemos encontrarnos con material roto que puede causar cortes en las manos. Una vez usado el material de vidrio debe ser aclarado con agua y colocado en las bandejas de material sucio.
- **Sustancias tóxicas y corrosivas**. El manejo de productos químicos tóxicos o corrosivos tales como sosa, ácidos fuertes, etc. debe de llevarse a cabo con gran cuidado.¡ESTÁ PROHIBIDO PIPETEAR PRODUCTOS CON LA BOCA!
- **Solventes inflamables.** El riesgo de producir fuego en el laboratorio debe ser tenido en cuenta siempre que se utilicen solventes inflamables como alcohol, éter, acetona, etc. Cuando se trabaja con ellos hay que hacerlo lejos de los aparatos eléctricos o de la llama.
- **Centrífugas.** Cuando se utilicen centrífugas hay que asegurarse de que los tubos están equilibrados.
- **Uso de material biológico.** Para la medida de volúmenes de sangre o suero hay que utilizar siempre pipetas automáticas. Todos los tejidos animales empleados deben ser asimismo manejados con cuidado. Pueden presentar riesgo inmunológico.

NOTAS SOBRE ESPECTROFOTOMETRIA

La medida de la absorción de la luz por una sustancia en solución es un método importante en el análisis bioquímico. La cantidad de luz absorbida es proporcional a la concentración de la sustancia en solución. La absorción varía con la longitud de onda de la luz, debiendo efectuarse la medida usando luz de longitud de onda de máxima absorción λmax), que es característica de cada sustancia. Las sustancias coloreadas tienen una λmax en la región visible del espectro. Otras sustancias absorben luz de otras regiones del espectro (por ejemplo los ácidos nucleicos absorben luz ultravioleta) y no son detectadas por el ojo humano.

Para conocer la concentración de una sustancia coloreada en solución se podría comparar visualmente la intensidad de color de dicha solución frente a una o varias soluciones de concentración conocida. Sin embargo resulta más preciso utilizar un aparato, el espectrofotómetro, que mide la cantidad de luz que atraviesa una solución.

Ley de Lambert-Beer

La fracción de luz incidente absorbida por una solución a una longitud de onda determinada es proporcional al espesor de la capa absorbente (paso óptico) y a la concentración de sustancia absorbente. Estos dos parámetros están combinados en la ley de Lambert-Beer:

$\log Io/I = \varepsilon cl$

Io: intensidad de la luz incidente.
I: intensidad de la luz transmitida.
ε: coeficiente de absorción molar (en unidades de litros/mol x cm).
c: concentración de la sustancia absorbente (en moles/l).
l: paso óptico de la muestra que absorbe luz (en cm).

La expresión log Io/I se denomina absorbancia y se designa por A. Es una medida de la cantidad de luz absorbida por la solución. El porcentaje de transmitancia (%T = I/Io x 100) es una medida la cantidad de luz que atraviesa la solución.

La ley de Lambert-Beer se cumple si la luz incidente es paralela y monocromática y si las moléculas de soluto y disolvente están orientadas al azar. Con una capa absorbente de paso óptico fijo la absorbancia es directamente proporcional a la concentración del soluto absorbente.

El coeficiente de absorción molar es una constante física que representa la absorbancia de una sustancia cuando el espesor de la capa absorbente es 1 cm y la concentración de la sustancia absorbente es 1 mol/l. El coeficiente de absorción molar varía con la naturaleza del compuesto absorbente, el disolvente y la longitud de onda de la radiación.

El espectrofotómetro

El espectrofotómetro es un aparato que mide la cantidad de luz que pasa a través de una solución. Está compuesto por las siguientes partes:

FUENTE DE ENERGIA: lámpara que emite un haz luminoso que contiene un rango de longitudes de onda.

MONOCROMADOR: se llama también selector de longitud de onda. Consiste en una red de difracción que separa las diferentes radiaciones procedentes de la fuente y selecciona la longitud de onda requerida.

RENDIJA: es un dispositivo que sirve para seleccionar un haz fino de radiación que será el que incida sobre la muestra, evitando que la atraviese la luz difusa.

COMPARTIMENTO DE MUESTRA: en él se coloca la solución problema, que va a absorber un haz fino de luz monocromática.

DETECTOR: es un sistema que transforma la energía luminosa que atraviesa la muestra en energía eléctrica. Posee además un amplificador de la señal eléctrica recibida que posibilita su medición posterior.

MEDIDOR: traslada la energía eléctrica producida en el paso anterior hasta un galvanómetro de aguja dónde figuran dos escalas graduadas; una mide la absorbancia y la otra el tanto por ciento de transmitancia. Cuando se mide la concentración de una solución se usa la escala de absorbancia. Los espectrofotómetros más modernos dan una lectura digital y algunos incluso pueden transformarla en concentración.

En la figura 1 se representa un esquema de un espectrofotómetro básico.

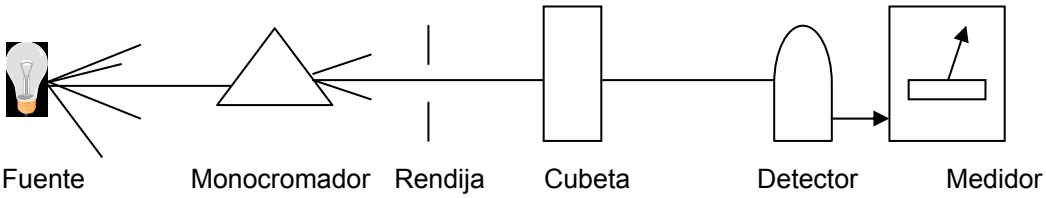


Fig. 1. Esquema de un espectrofotómetro

USO DEL ESPECTROFOTOMETRO/FOTOCOLORIMETRO SPECTRONIC 20

(1) Enchufar el aparato.

(2) Encender con el mando izquierdo frontal (ON-OFF).Dejar encendido hasta que se acabe de utilizar el aparato.

(3) Seleccionar la longitud de onda haciendo rotar el monocromador. Si se van a hacer lecturas por encima de 650 nm. cambiar el fototubo azul en el interior por el rojo e insertar el filtro rojo.

(4) El aparato tarda unos 15 minutos en calentarse. Cuando se ha calentado ajustar la aguja en la escala de absorbancia a infinito (transmitancia a 0) con el mando frontal izquierdo.

(5) Insertar el "blanco" en el lugar de la muestra y cerrar la tapa.

(6) Ajustar la aguja a 0 de absorbancia con el mando frontal derecho.

(7).Sin cambiar los mandos, quitar el blanco y sustituirlo por la muestra cerrando la tapa.

(8).Leer la absorbancia ó el %T.

(9).Sacar la muestra.

(10).Repetir los pasos 4-9 para otras muestras o de 7-9 si los ajustes del "blanco" no cambian.

Práctica 1.
Medida del pH. Titulación de un aminoácido. Preparación de tampones. Modelización molecular.

Objetivos

- Aprender a preparar tampones y a medir el pH.
- Estudiar experimentalmente las propiedades ácido-base de los aminoácidos.
- Conocer la estructura tridimensional de aminoácidos y péptidos.

1. Calibración del pHmetro. Medida del pH

Calibrar el pHmetro con los tampones pH 7.02 y pH 4, siguiendo las instrucciones del profesor. Tener en cuenta que:

- el electrodo del pHmetro se conserva **siempre sumergido** en la solución de conservación.
- lavar y secar el electrodo **cada vez** que se cambia la solución en la que se sumerge.
- **no debe dejarse el electrodo en seco más de 5 minutos.**
- el bulbo del electrodo debe quedar sumergido **completamente** y no tocar las paredes o el fondo del vaso.

2.Titulación de una solución de un aminoácido (figura 2)

- Lavar la bureta con agua destilada. Llenarla con HCl 1 M hasta el cero de la bureta.

- Añadir a un vaso de precipitados pequeño, 30 ml de la solución de aminoácido. Medir el pH inicial de la solución.

- Llevar a cabo la titulación añadiendo HCl desde la bureta en fracciones de 0.5 ml. Agitar con una varilla de vidrio después de cada adición de HCl.

- Anotar en una tabla el pH y el volumen de ácido correspondiente. Añadir ácido hasta llegar a pH 1.5 aproximadamente.

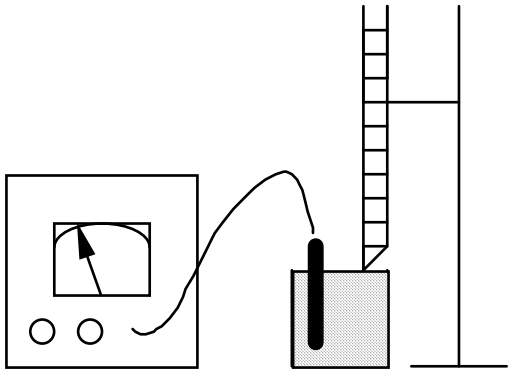
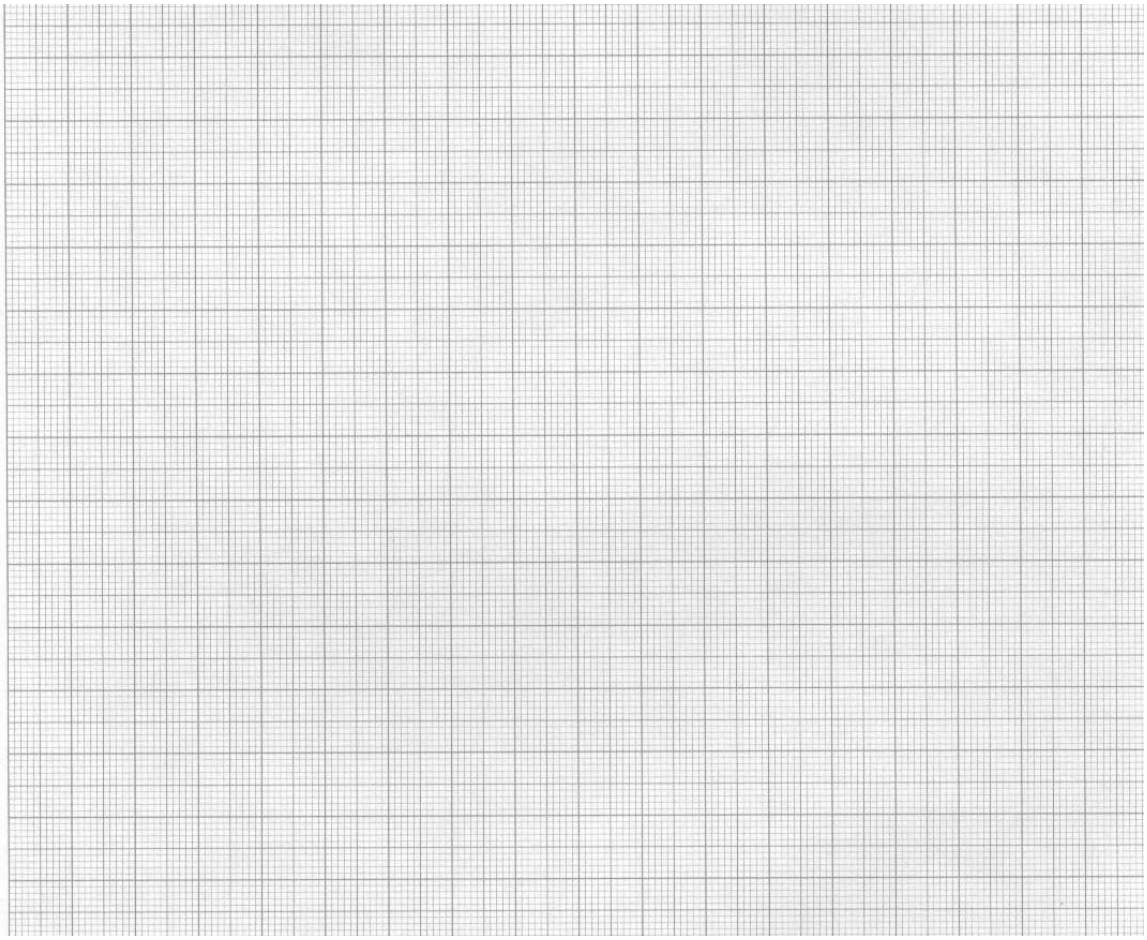


Fig. 2. Esquema de la titulación de una solución

Curva de titulación de la glicina:

pH **ml HCl**



Resultados

1.- Representar los valores de pH (eje de ordenadas) frente al volumen de ácido añadido (eje de abscisas) en la titulación del aminoácido.

2.- A partir de la representación gráfica, obtener los valores aproximados de pKa del aminoácido y el punto isoeléctrico (pI).

3.- Indicar cual pKa corresponde al grupo amino y cual al carboxílico.

4.- Escribir las formas de disociación de la glicina (las estructuras) e indicar qué carga presentará el aminoácido al pH inicial de la titulación, al pH igual al pI y al pH final.

3. Preparación de soluciones tampón

3.1. Partiendo de soluciones 0,1 M de ácido y base, calcular los volúmenes que tienen que mezclarse para preparar los siguientes tampones:

50 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,68 (pKa2 = 7,2)

50 ml de tampón acetato sódico 0,1 M pH 5,45 (pKa=4,75)

3.2.- Preparar los tampones según los cálculos anteriores: para cada tampón, medir con la probeta los volúmenes calculados de ácido y base, mezclarlos en un vaso de precipitados, agitar y medir el pH en el pHmetro.

3.3.- Comparar los valores de pH teóricos con los obtenidos experimentalmente.

4. Modelizacion molecular de aminoacidos

Enlaces

Los elementos constituyentes de los aminoácidos están unidos por enlaces covalentes. Para representar estos enlaces se usarán varillas de color verde.

Elementos		Color
Hidrógeno	H	BLANCO
Carbono	C	NEGRO
Nitrógeno	N	AZUL
Oxígeno	O	ROJO
Azufre	S	AMARILLO

Longitudes de enlace

La escala que se utiliza es 100 picometros =3 cm.

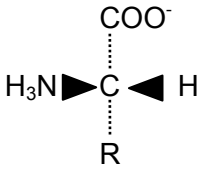
C - H, O - H , N - H	2.0 cm	———
C = O	2.5 cm	———
C = C	3.0 cm	———
C - C, C - N , C - O	3.5 cm	———

Formas D o L

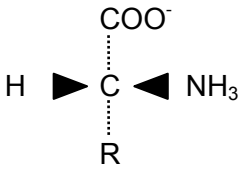
Busca el Cα asimétrico, con el H hacia ti
Mira el orden de los sustituyentes en el sentido de las agujas del reloj:

COO^--R-NH_3^+.....forma L
COO^--NH_3^+-R.....forma D

Fórmulas de perspectiva

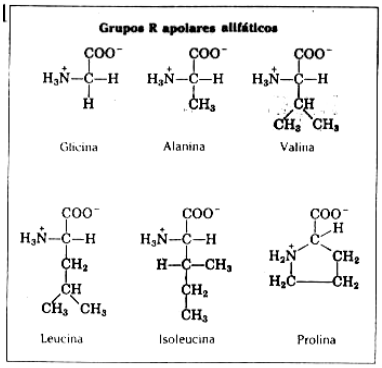


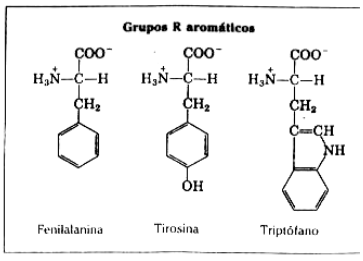
forma L

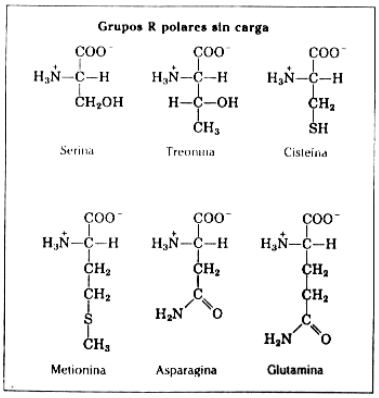


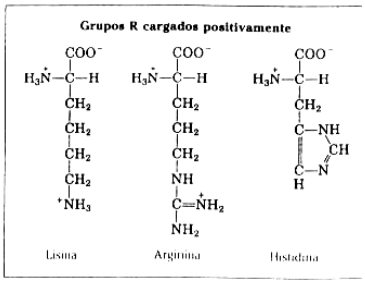
forma D

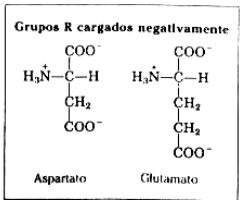
Aminoácidos estándar











Resultados

1. Identificación de aminoácidos:

Nombre, forma D o L, dibujar la estructura (con el estado de ionización), indicar a que pH se encuentra (al del pI, por encima o por debajo)

2. Construir un aminoácido. Cada pareja hará el mismo aminoácido, uno el D y otro el L, y comparará los enantiómeros.

Práctica 2. Determinación cuantitativa de proteínas por métodos espectrofotométricos.

Objetivos

- Introducir en la determinación de la concentración de proteínas en plasma sanguíneo.
- Entender y practicar los principios de la espectrofotometria.
- Aprender a manejar pipetas automáticas

Introducción

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 en suspensión en una solución acuosa 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. 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 dos de los métodos que se utilizan con mas frecuencia: Biuret y Bradford. Los dos métodos tienen en común que la disolución de proteína se mezcla con algún 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 espectrofotometria para medir la concentración de una sustancia en solución y las instrucciones para el uso del Espectrofotómetro Spectronic se encuentra en la Introducción de este Manual de Practicas (páginas 5-7)

Materiales

-Soluciones de suero sanguíneo A y B de concentración desconocida.
-Soluciones de proteína patrón (albúmina de suero bovina) de concentraciones conocidas
-Reactivo de Bradford
-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 compuesto coloreado o cromóforo, de color azul-púrpura, debido a la formación de un complejo 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.

4) 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 A_{550} (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. USAR LA MITAD SUPERIOR DE LA HOJA, DEJANDO LA OTRA MITAD PARA LA PARTE DE BRADFORD

- 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

Determinación de proteínas por el método de Bradford

Se trata de otro método colorimétrico para la determinación de proteínas. Se basa en que el colorante Azul Coomassie puede existir en dos formas, roja y azul. La forma roja cambia a azul cuando se une a una proteína, con un cambio en la longitud de onda del máximo de absorción de 465 nm a 595 nm.

Es un método mucho más sensible que el del Biuret , por ello hay que utilizar tanto soluciones patrón como problema diluidas 200 veces.

Método

Diluir las soluciones patrón y problema 200 veces. Para ello:

1) Añadir 4 ml de agua destilada a seis tubos

2) Tomar 20 µl de cada solución patrón (20-80 g/L) y problema (A y B) y pasarlos a los tubos con 4 ml de agua. Mezclar bien. Así quedan diluidos 200 veces. Marcar los nuevos tubos así: 20 g/l (1:200), 40 g/l (1:200) etc.

Reacción de Bradford:

3) Numerar 7 tubos limpios

4) Añadir al tubo	1	100 µl de agua destilada (tubo "blanco")
"	2	100 µl de solución de proteína 20 g/L diluida 1:200
"	3	" µl " " " 40 g/L diluida 1:200
"	4	" µl " " " 60 g/L diluida 1:200
"	5	" µl " " " 80 g/L diluida 1:200
"	6	" µl " " " problema A diluida 1:200
"	7	" µl " " " problema B diluida 1:200

5) Añadir 3 ml de reactivo de Bradford a los siete tubos. Mezclar.

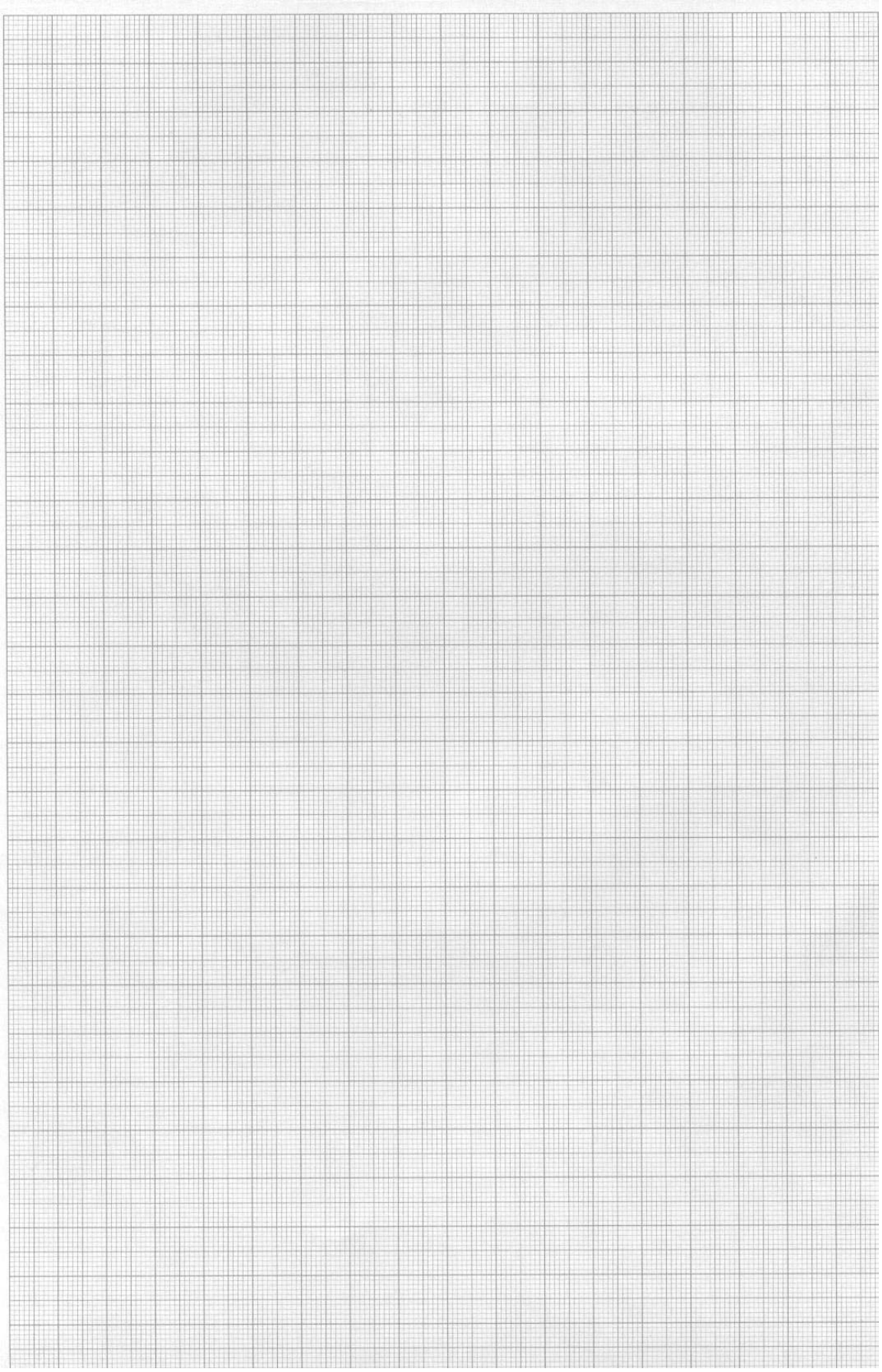
6) Esperar 5 min para que se desarrolle el color. Medir la absorbancia de cada tubo a 595 nm, ajustando a cero con el tubo 1.

Resultados

- En el papel milimetrado representar gráficamente la absorbancia a 595 nm de las soluciones patrón frente a la concentración de proteína, como en el caso anterior.

- Calcular por interpolación las concentraciones de las soluciones problema A y B y expresarla en g/L.

- Comparar los resultados obtenidos con ambos métodos.

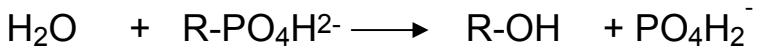


Práctica 3.
Actividad enzimática: Fosfatasa alcalina.

Introducción

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 de células como ocurre en 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.

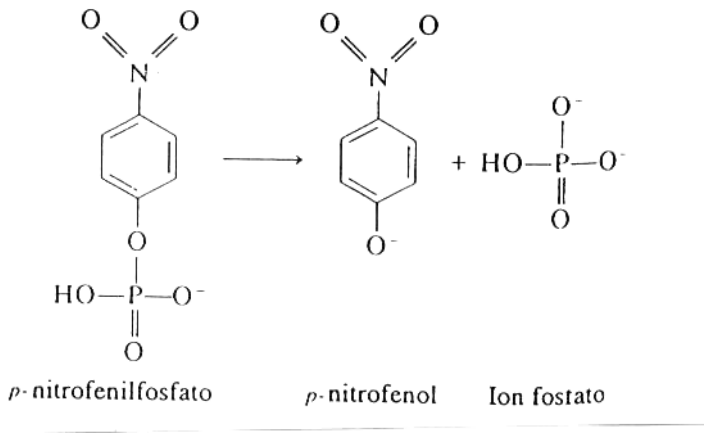
En esta práctica, emplearemos el enzima fosfatasa alcalina como modelo. Las fosfatasas alcalinas son un grupo de enzimas que presentan su máxima actividad a pH 9-10,5 y catalizan la hidrólisis de ésteres monofosfatos. La reacción enzimática general de la fosfatasa alcalina es:



Las fosfatasas alcalinas son isoenzimas que catalizan la misma reacción aunque poseen propiedades diferentes. Se encuentran ampliamente distribuidas en los tejidos humanos tales cono 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 (µmoles/min/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)

Descripción de la práctica

En la presente práctica se usará suero humano 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 tres partes:

1. Curva patrón del p-nitrofenol. Se determinará la relación entre absorbancia y concentración del p-nitrofenol.

2. Efecto de la concentración de enzima. Se trata de comprobar que la velocidad de la reacción es directamente proporcional a la concentración de enzima. Se calculará también la actividad enzimática en suero.

3. Efecto de la concentración de sustrato. Se calculará la Km y Vmax 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
- Spectronic
- Baño a 37º C
- Calculadora

1. Recta patrón de p-nitrofenol

Preparar las soluciones de p-nitrofenol (pNF, producto) en 5 tubos marcados convenientemente:

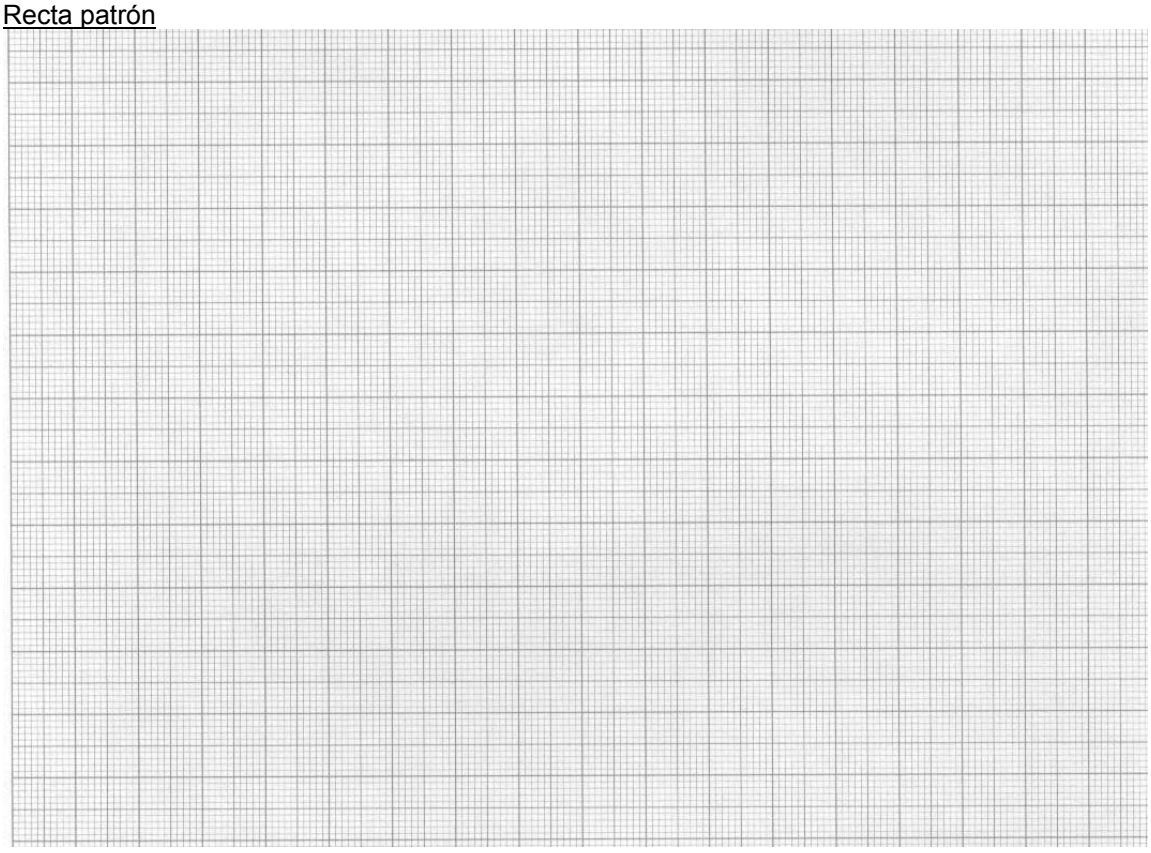
- Añadir 2,2 ml de solución tampón Tris pH 9,6 a cada uno de los 5 tubos.
- Añadir 1 ml de agua destilada al tubo 1 (blanco).
- Añadir al resto de los tubos, 1 ml de las soluciones de pNF de concentración 30, 60, 90 y 120 μM que se suministran.
- Mezclar bien.
- Seleccionar en el spectronic la longitud 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

1.- Calcular la cantidad de p-nitrofenol en nmoles presente en cada tubo y representarlos en la gráfica.

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

Recta patrón



2.- Efecto de la concentración del enzima.

- Pipetear en 5 tubos los siguientes volúmenes

TUBO	1	2	3	4	5	
Tampón pH 9,6	2	2	2	2	2	(ml)
p-NFF	1	1	1	1	1	(ml)
Agua	200	150	100	50	0	(µl)
Suero	0	50	100	150	200	(µl)

- Al añadir el suero (que contiene la enzima), poner los tubos en un baño de hielo.

- Mezclar bien e incubar 5 min a 37º C.

- Añadir 0,3 ml NaOH 0,2N para parar la reacción.

- Volver a mezclar para homogeneizar. Secar los tubos por fuera.

- Ajustar el "cero" del spectronic con el tubo 1 y medir la A_{400} en todos los tubos, anotando los valores obtenidos.

Resultados (completar la tabla de la página siguiente)

5.- Calcular la cantidad (nmoles) de pNF formado en cada tubo a partir de la recta de calibrado del apartado anterior.

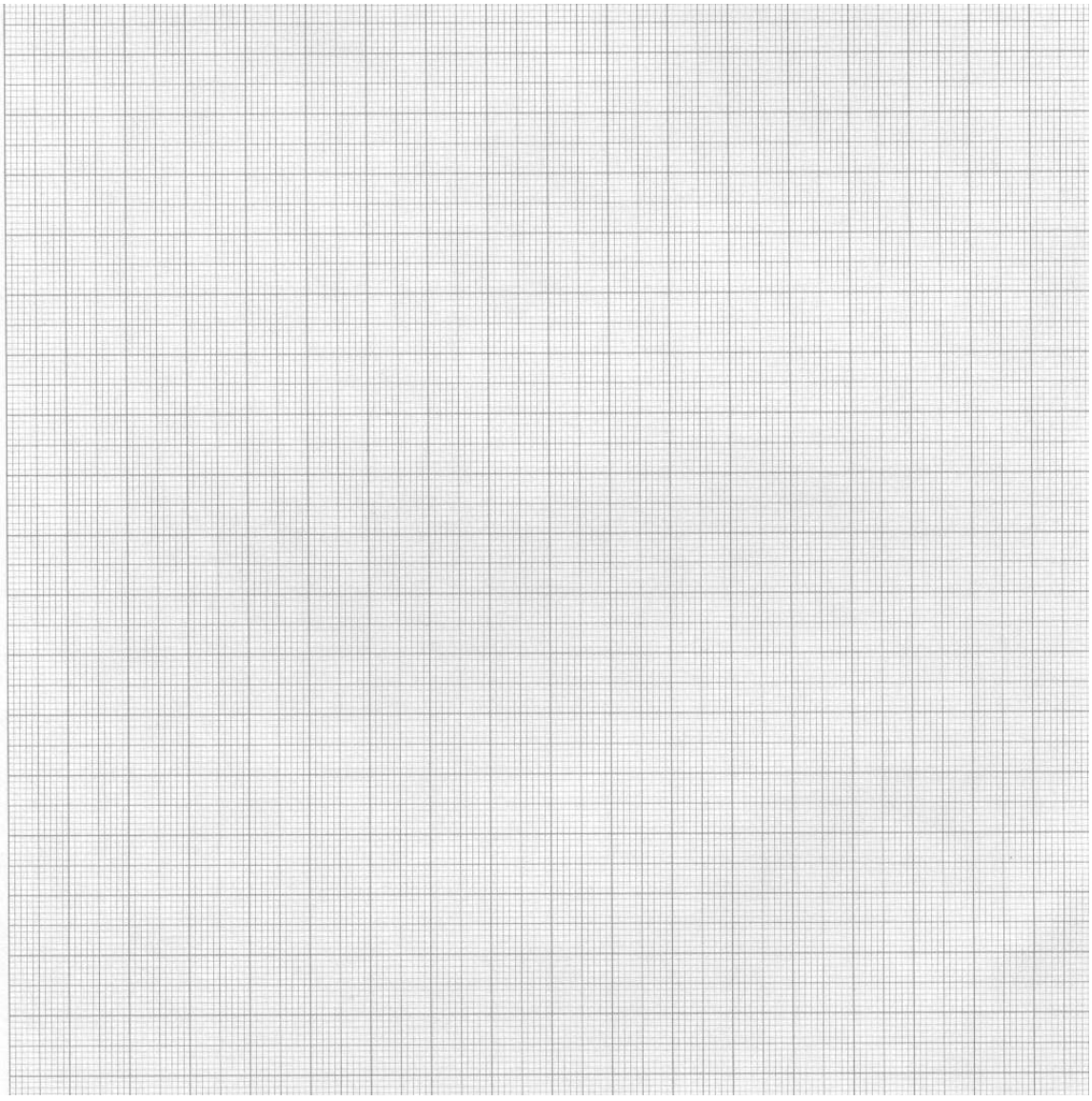
6.- Calcular la velocidad inicial de reacción en cada tubo: nmoles de pNF formado/min. (tiempo de reacción = 5 min.).

7.- Representar gráficamente la velocidad (nmoles/min.) (ordenadas) frente al volumen de enzima (µl de suero) (abscisas).

8.- Calcular la actividad del enzima por ml de suero: nmoles/min./ml de suero = µmoles/min./L de suero = U/L.

	50	100	150	200 µl
A_{400nm}				
nmoles pNF				
(V) nmoles/min				
nmoles/min./ml= = U/L				

Representación de Velocidad frente a volúmen de enzima



3. Efecto de la concentración de sustrato y cálculo de la Km y Vmax

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	---	---	---	---	---	"
PNFP (conc. mM)	---	1(1)	1(2,5)	1(5,0)	1(7,0)	1(10)	"
Suero	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	"

- Mantener los tubos en hielo. Mezclar bien e incubar 5 min a 37ºC.

- Añadir 0,3 ml NaOH 0,2N para parar la reacción. Mezclar.

- Ajustar el "cero" del spectronic con el tubo del blanco y medir la A_{400nm}

Resultados.

9.- Calcular la velocidad inicial (V) en cada tubo en nmoles p-N-fenol/min.

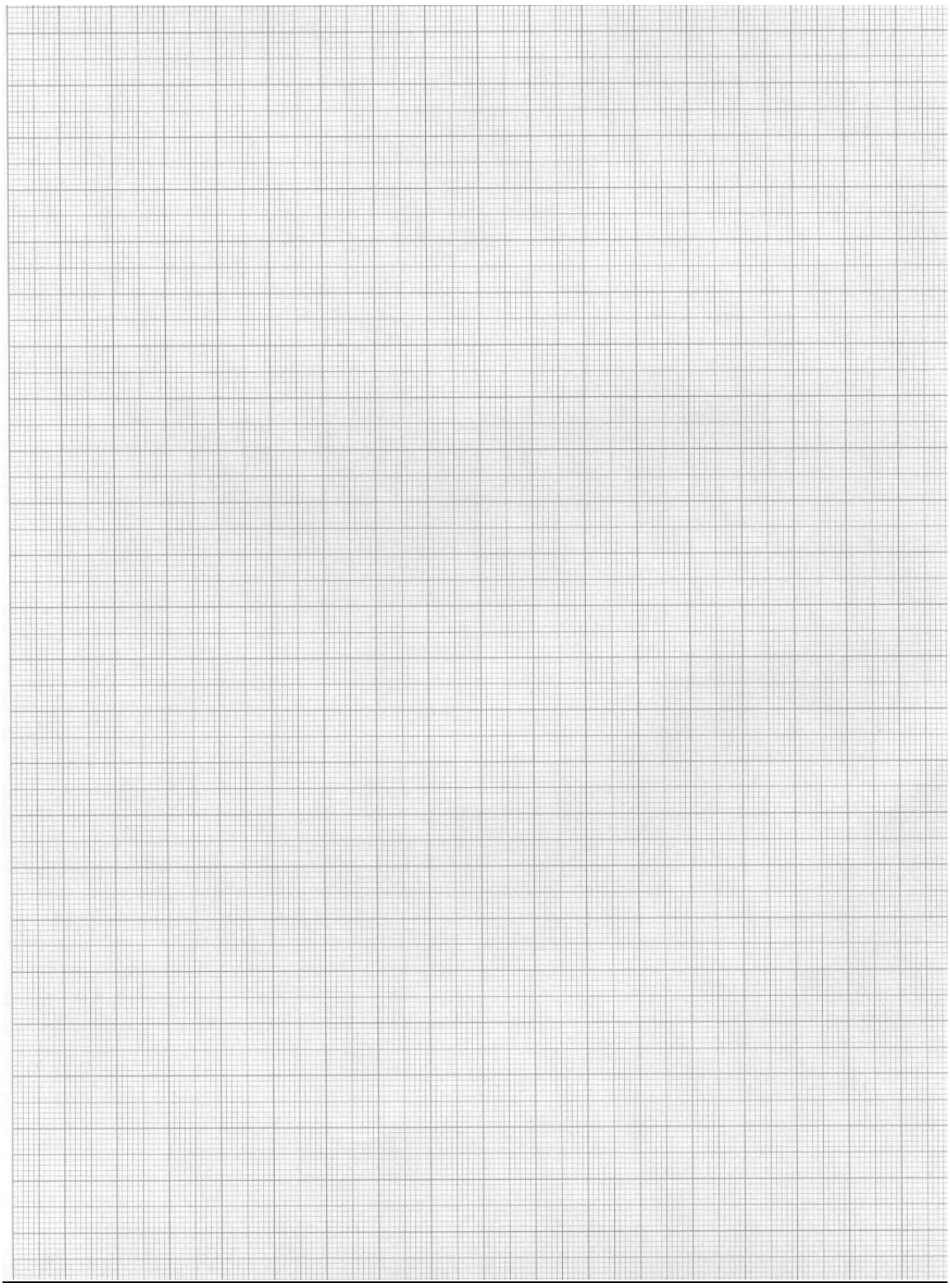
10.- Representar velocidad (ordenadas) frente a concentración de sustrato (abscisas).

11.- Representar 1/V frente a 1/S (representación de Lineweaver-Burk).

12.- Calcular la Km y Vmax. ¿Cuáles son sus unidades?

[S]	1	2,5	5	7	10 mM
A_{400nm}					
nmoles pNF					
V (nmoles/min.)					
1/S					
1/V					

Representaciones de V frente a S y 1/V frente a 1/S



Práctica 4.
Extracción de DNA plasmídico y digestión con enonucleasas de restricción.

Introducción

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos que se encuentran en muchas bacterias. En general son capaces de replicar por sí mismos, sin precisar de las funciones de replicación cromosómicas. Muchos de ellos contienen genes que confieren a la bacteria propiedades que aumentan sus posibilidades de supervivencia (resistencia a antibióticos, degradación de sustancias orgánicas, toxinas, etc.)

Los plásmidos naturales han sido adaptados para ser utilizados como vectores de clonaje en Ingenieria Genética. Hoy en día se conocen varios métodos para la obtención de DNA plasmídico de gran pureza. Un método estándar rápido comprende cuatro etapas:

(a) Cultivo bacteriano. Este se lleva a cabo a partir de una estirpe bacteriana que contiene un plásmido de resistencia a antibióticos cultivándolo en un medio rico suplementado con los antibióticos frente a los que el plásmido confiere resistencia.

(b) Lisis celular. Tras recoger las bacterias por centrifugación estas se tratan con lisozima que digiere la pared celular formando protoplastos. Los protoplastos se lisan con un detergente iónico, como el SDS, que libera principalmente el DNA plasmídico y también parte del DNA cromosómico, quedando la mayor parte de este unido a la membrana celular. Durante este proceso el DNA cromosómico es fragmentado mientras que el DNA plasmídico permanece intacto debido a su pequeño tamaño. El detergente SDS forma también complejos con las proteínas presentes en el extracto.

(c) Desnaturalización del DNA. Generalmente la etapa del SDS se lleva a cabo en presencia de concentraciones de NaOH suficientemente altas para llevar el pH a 12,0-12,5.En estas condiciones las largas moléculas lineales de DNA se desnaturalizan de modo irreversible, debido a los pKs de los grupos cargados implicados en la formación de enlaces de hidrógeno de la doble hélice, dando lugar a DNA de cadena sencilla. Por otra parte, el DNA plasmídico se desnaturaliza solo parcialmente debido a su forma circular, manteniéndose las dos cadenas juntas.

(d) Renaturalización del DNA. Si el pH desciende a pH 5,0 con alta concentración de acetato sódico, el DNA cromosómico se renaturaliza al azar dando lugar a un precipitado insoluble. El plásmido se renaturaliza también, pero en este caso ambas cadenas se complementan adecuadamente manteniéndose el plásmido soluble. Al mismo tiempo, la elevada concentración de acetato sódico precipita el DNA cromosómico unido a la membrana celular, los complejos SDS-proteína y el RNA de elevado peso molecular. Tras la centrifugación, solo el DNA plasmídico y el RNA de bajo peso molecular permanecen en el sobrenadante (hay que precisar que una pequeña cantidad de DNA cromosómico permanecerá siempre en el sobrenadante). El RNA contaminante se elimina fácilmente por digestión con RNAsa.

Finalmente el plásmido se analiza por electroforesis en agarosa, en paralelo con un standard de marcadores de peso molecular. Esta etapa permite determinar la pureza y la cantidad de plásmido obtenido en base a la relación de intensidades de fluorescencia debidas al bromuro de etidio, entre el DNA plasmídico obtenido y el standard de peso molecular. El bromuro de etidio es un colorante específico de los ácidos nucleicos que se intercala entre sus bases apareadas.

Materiales

Plásmidos y bacterias. Los plásmidos utilizados en esta práctica se denominan pUC19 y pUC19-choB.Los dos contienen un gen de resistencia a ampicilina y sitios de restricción únicos para las endonucleasas EcoR1 y HindIII. Los dos plásmidos se propagan en la estirpe de E.coli DH5α.

Medio de cultivo Se utiliza el medio L-broth (triptona 1%,extracto de levadura 0.5%;ClNa 1% ajustado a pH 7,0 con NaOH). Este medio se suplementa con ampicilina (50µg/ml) tras ser autoclavado

Reactivos

- Solución de Lisis I: glucosa 50 mM, Tris-ClH pH 8.0 25 mM EDTA,10 mM, lisozima 2 mg/ml.

- Solución de Lisis II: NaOH 0.2 M,SDS 1%.

- Solución de lisis III: acetato potásico 3 M pH=5.5.

- TE buffer:10 mM Tris-ClH pH 8.0 conteniendo 1 mM EDTA.

- Tampón de electroforesis (TBE):89 mM Tris, pH 8.3, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA.

- Tampón de carga: 0.25% azul de bromofenol,0.25% cyanol xileno,30% glicerol en 6X TBE.

- Tampones de restricción : Tampón M (10X): 500 mM NaCl, 100 mM Cl_2Mg, 100mM Tris-ClH, pH 8.0,10 mM ditiothreitol. Tampón H (10X): 1M NaCl,100 mM $MgCl_2$,500 mM Tris-ClH pH 8.0,10 mM ditiothreitol.

Todas estas soluciones deben ser autoclavadas durante 20 min. a 120ºC.

-RNAsa: RNAsaA a concentración 10 mg/ml en Tris-ClH 10 mM pH 8.0 conteniendo 100 mM NaCl. Hervir 10 min. a 100ºC y enfriar a temperatura ambiente para destruir la actividad DNAsa contaminante.

Método

(a) Lisis celular

- Resuspender el precipitado de bacterias del tubo Eppendorff en 200 μl de solución de lísis I y ponerlo en hielo 5 minutos.

(b) Desnaturalización del DNA

- Añadir 400 μl de solución de lisis II, mezclar bien y dejar en hielo 5 min.

- Añadir 300 μl de solución de lisis III, mezclar bien y dejar en hielo 5 min.

- Centrifugar 5 min. a 14.000 rpm. Recoger el sobrenadante en un tubo nuevo. En este sobrenadante se encuentra el DNA plasmídico y parte del tRNA.

(c) Precipitación del DNA

- Recoger en un tubo limpio 800 μl del líquido sobrenadante.

- Añadir 0.5 ml de isopropanol, mezclar y dejar precipitar 2 min. a temperatura ambiente.

- Centrifugar 5 min. a 14.000 rpm. Tirar el sobrenadante.

- Dejar secar el precipitado

- Resuspender en 50 μl de TE (o TE con RNAsa).

- Pipetear en un tubo: 10 μl agua + 5 μl DNA + 5 μl tampón de carga. (Muestra A)

(d) Digestión de DNA con endonucleasas de restricción

- Pipetear en un tubo: 15 μl de agua + 2μl de tampón de reacción + 3 μl de DNA + l μl de EcoRI.

Condiciones de reacción: 1 h a 37ºC.

Cuando termine la reacción añadir 5 μl de tampón de carga. (Muestra B).

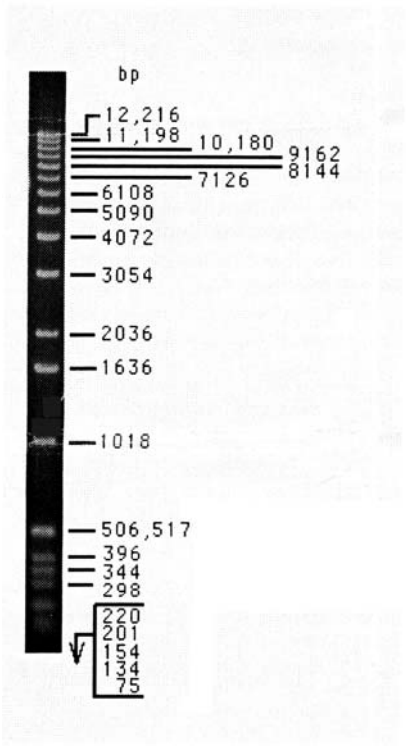
(e) Análisis por electroforesis del DNA plasmídico.

- Preparar un gel de agarosa al 0.8% en buffer de electroforesis + bromuro de etidio (usar guantes, pues el bromuro de etidio es un potente mutágeno).

- Cargar en el gel las muestras A, B y un marcador de Pm.

- Correr la electroforesis a 80 V hasta que el frente de azul de bromofenol alcance el extremo inferior del gel. El DNA se visualizará colocando el gel encima de un transiluminador de radiación U.V. Medir la distancia desde el pocillo de colocación de la muestra hasta la parte superior de cada banda.

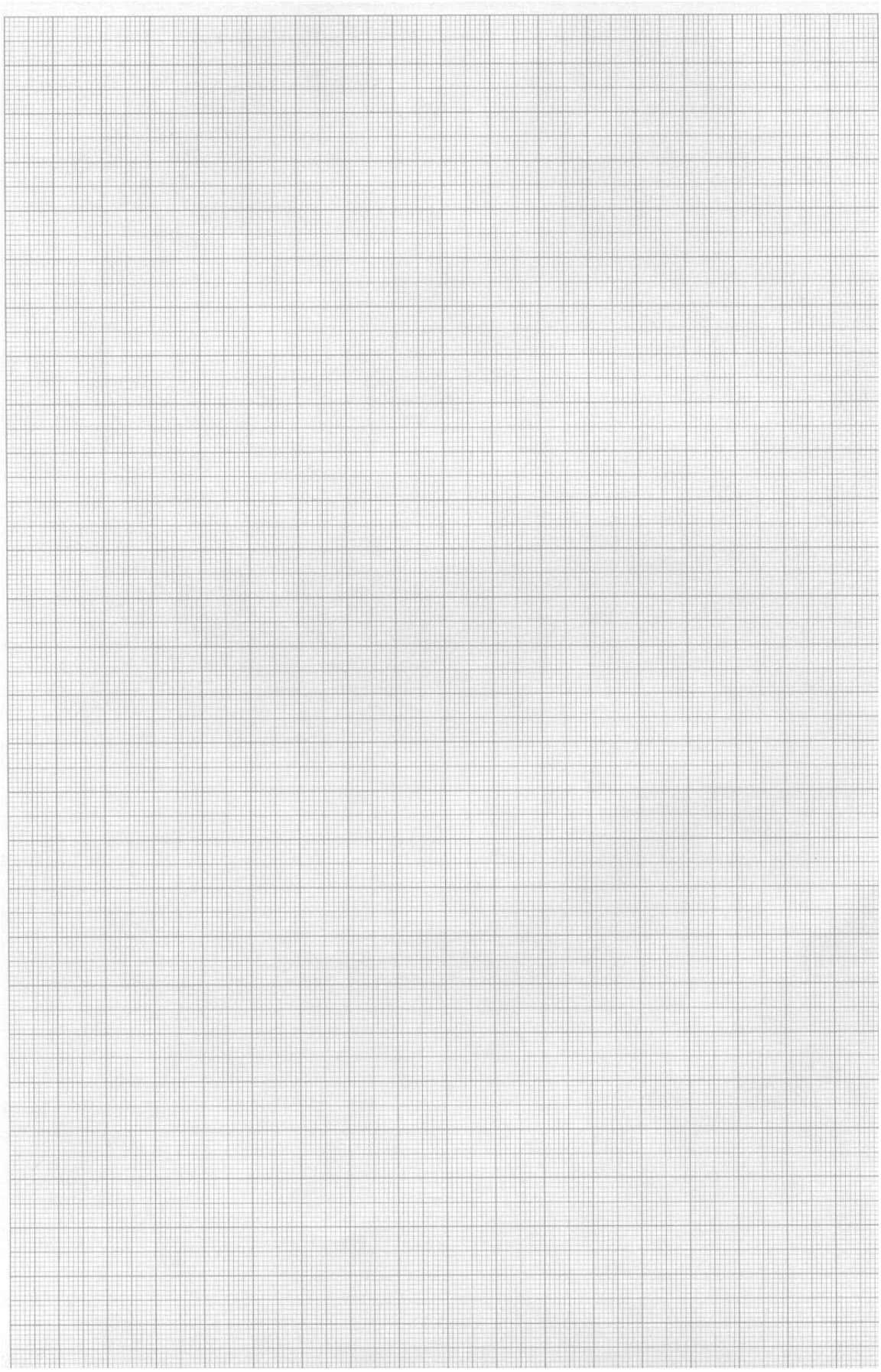
Marcadores de peso molecular: ESCALERA DE DNA DE 1 Kb.



Resultados

1.- Obtener una fotografía del gel mostrando los patrones de Pm, el DNA plasmídico sin digerir y digerido con EcoRI.

2.- A partir de la fotografía anterior calcular y señalar el tamaño molecular de los fragmentos de restricción.



Práctica 5.
VALORACIÓN DE LA DIABETES: DETERMINACIÓN DE LA GLUCEMIA Y HEMOGLOBINAS GLUCOSILADAS

Introducción general

El mantenimiento de la glucemia, o concentración plasmática de glucosa, en los organismos superiores es fundamental para el funcionamiento de todos los órganos, al ser la glucosa un metabolito energético principal. La coordinación de los procesos metabólicos implicados en este cometido se lleva a cabo por la relación insulina/glucagón. La ingestión de glucosa va seguida, en las personas sanas, por un aumento de la glucosa en sangre. Este aumento origina la puesta en marcha del mecanismo regulador: aumento de la utilización de glucosa, aceleración de la glucogenogénesis y disminución de la glucogenólisis; todo ello ocurre principalmente mediante la secreción de insulina, hormona pancreática de tipo polipeptídico. En el caso de que la producción de insulina esté disminuida, la glucosa no puede ser utilizada por las células, lo cual ocasiona niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglucemia); así ocurre en las personas que sufren diabetes del tipo denominado "dependiente de insulina" o "tipo 1".

El diagnóstico de la diabetes dependiente de insulina se basa en antecedentes, síntomas clínicos y comprobación de una hiperglucemia significativa. Los valores de referencia en humanos son de 60-110 mg/dl de glucosa en plasma en individuos sanos. Las determinaciones de glucemia basal permiten el diagnóstico de la diabetes, pero constituyen valores puntuales y aislados en el tiempo que no reflejan los niveles medios de glucemia ni la duración de la misma. Por lo tanto, es necesario disponer de pruebas que indiquen el grado del control metabólico de la enfermedad a corto y medio plazo. Estas pruebas están basadas en el fenómeno de unión de la glucosa a diversas proteínas albúmina, colágeno, hemoglobina, etc. Esta glucosilación tiene lugar por una reacción no enzimática. La intensidad de la glucosilación depende de varios factores, siendo los más importantes los niveles medios de glucemia, la duración de la hiperglucemia, la vida media de las proteínas y la concentración de éstas. Como consecuencia, la medida de la glucosilación proteica constituye un buen marcador bioquímico del grado de compensación del enfermo diabético.

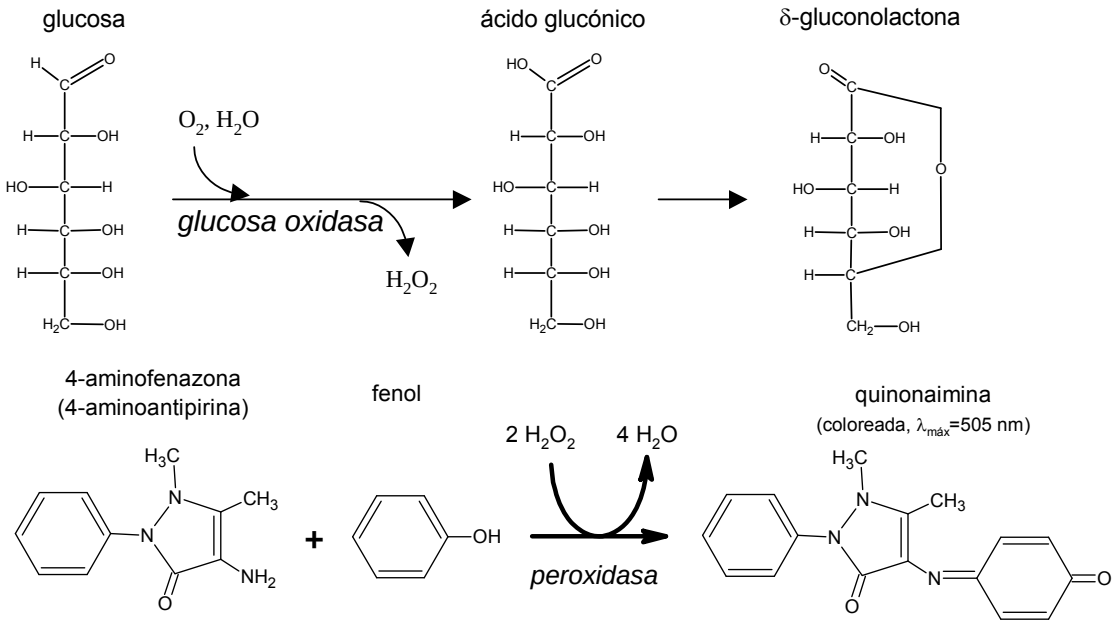
El objetivo de esta práctica es la valoración de la diabetes mediante la determinación de los niveles de glucosa en plasma y de hemoglobinas glucosiladas. Como modelo se emplearán ratas diabéticas, en comparación con ratas control. La diabetes en la rata se provoca mediante una única inyección intraperitoneal de estreptozotocina (45 mg/Kg de peso). La estreptozotocina actúa provocando la destrucción de los islotes β del páncreas, por lo que ocasiona una diabetes de tipo 1 o dependiente de insulina.

Parte A
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN PLASMA

Descripción de la práctica

En esta práctica se utilizará el método de la glucosa oxidasa y peroxidasa (GOD-POD) para medir los niveles de glucosa sanguínea de ratas diabéticas y controles. En el método GOD-POD, en un primer paso la *glucosa oxidasa* cataliza la oxidación de la D-glucosa a ácido D-glucónico con formación de peróxido de hidrógeno. Éste es utilizado por la *peroxidasa* para oxidar a la 4-aminofenazona y al fenol, dando lugar a una quinonaimina coloreada. La intensidad de color será proporcional a la concentración de glucosa presente inicialmente.

El esquema de la reacción es el siguiente:



Materiales

- 6 tubos de ensayo
- Pipetas automáticas
- Colorímetro
- Disolución patrón de glucosa 0,4 μg/μl
- Disolución de coloración que contiene:
  - Glucosa oxidasa
  - Peroxidasa
  - 4-Aminofenazona
  - Fenol
  - Tampón Tris pH 7,4
- Plasma de ratas normales y/o diabéticas

Procedimiento experimental

1.- Preparar la recta patrón con la disolución patrón de glucosa y el correspondiente volumen de agua hasta un total de 200 µl, como se indica en la tabla.
2.- En otro tubo mezclar 10µl de plasma + 190µl de agua (tabla).

Tubo nº	Patrón Glucosa (0,4 µg/µl)	Agua destilada	Solución GOD-POD	Absorbancia 505nm	µg de Glucosa
1	0 µl	200 µl	2 ml		
2	25 µl	175 µl	2 ml		
3	50 µl	150 µl	2 ml		
4	100 µl	100 µl	2 ml		
5	200 µl	0 µl	2 ml		

Tubo nº	Plasma	Agua	Solución GOD-POD	Absorb. 505nm	µg de Glucosa	Conc.Glucosa µg/µl plasma	Conc.Glucosa mg/dl plasma
6	10 µl	190µl	2ml				

3.- Añadir 2 ml de disolución de coloración de glucosa oxidasa-peroxidasa (reactivo GOD-POD) a los 6 tubos.

4.- Mezclar el contenido de los tubos e incubarlos 10 minutos en el baño a 37ºC.

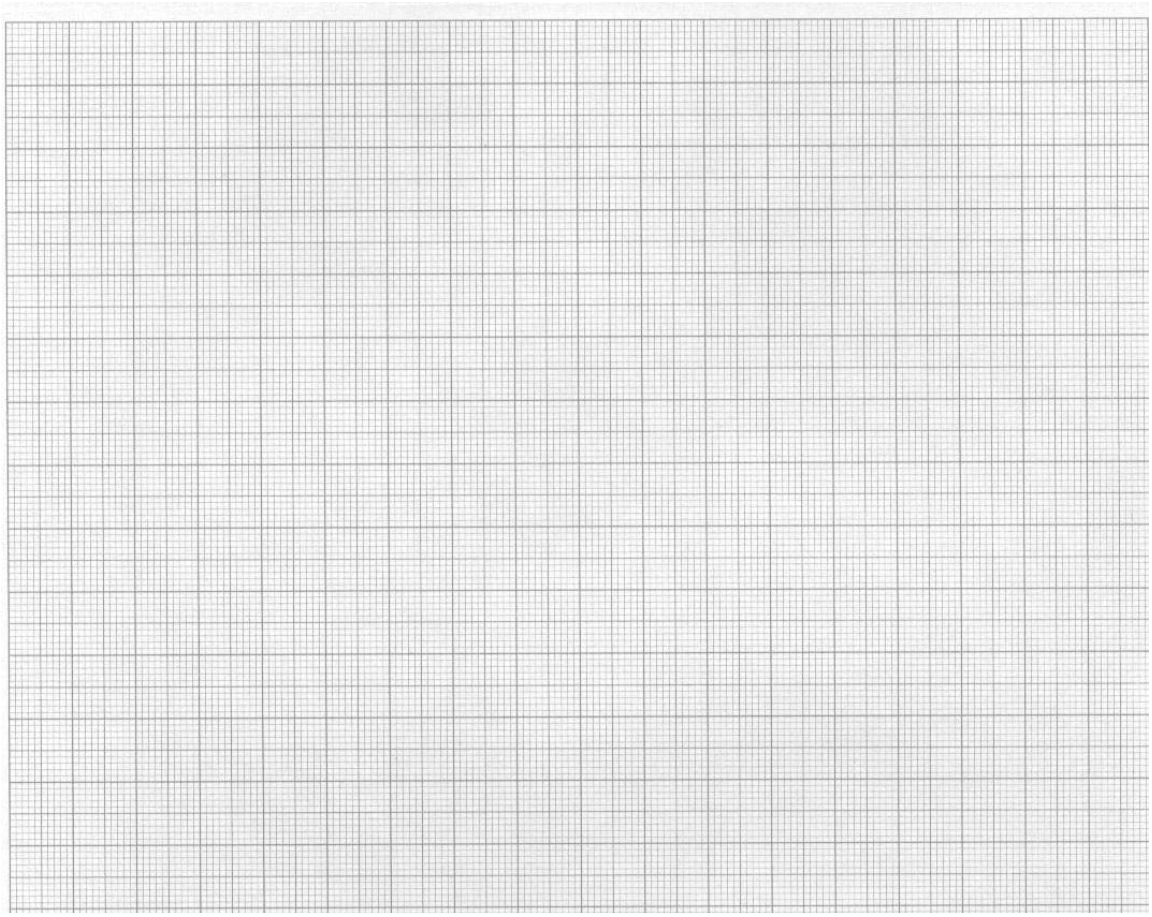
5.- Secar bien los tubos. Leer las absorbancias de los patrones y de la muestra a 505nm utilizando como blanco el tubo nº 1.

6.- Construir la recta de calibrado representando en el papel milimetrado las absorbancias a 505nm frente a los µg de glucosa.

7. Extrapolando en la recta de calibrado, calcular los µg de glucosa en el tubo problema. Calcular los µg de glucosa/ µl de plasma.

8.-Calcular la concentración de glucosa del plasma problema. Expresarla en **mg/dl.**
Comparar los resultados de glucemia obtenidos con los de los otros compañeros. Identificar los valores de glucemia normales y de diabéticos.

Representación: A_{505nm} (ordenadas) frente a μg de glucosa (abcisas)



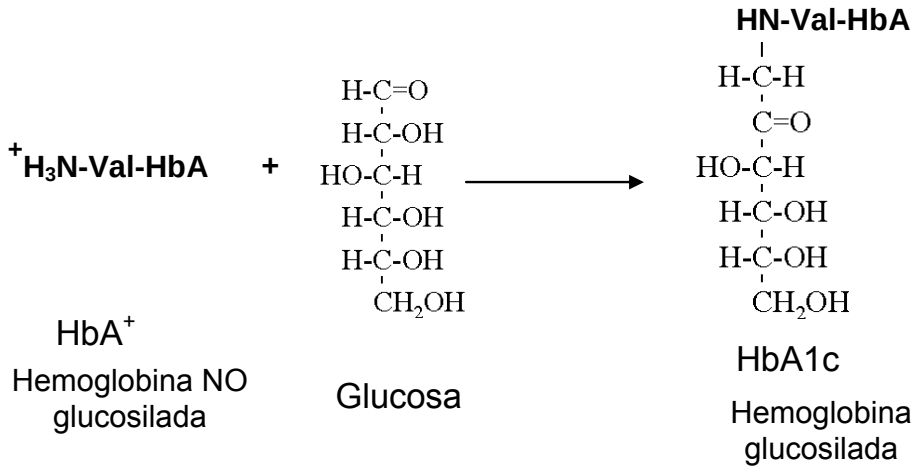
Parte B
DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINAS GLUCOSILADAS

Descripción de la práctica

El control de la diabetes no se valora solamente por el control glucémico, sino que hay otra serie de parámetros, como la Hemoglobina Glucosilada (Hb A1c), que indican el grado de control que, a largo plazo, ha mantenido el paciente diabético.

La hemoglobina (Hb) de los seres humanos adultos está constituida principalmente por: Hb A (97% del total), Hb A_2 (2,5%) y Hb F (0,5%). La Hb A está constituida por 4 cadenas polipeptídicas: 2 globinas α y 2 globinas β. La hemoglobina glucosilada es una fracción de la hemoglobina A normal del adulto, que tiene la propiedad de unir, de forma irreversible, cantidades de glucosa proporcionales a la concentración glucémica. Al conjunto de todas ellas se les denomina hemoglobina A1 o "hemoglobina glucosilada". Dentro de la hemoglobina A1 se pueden separar varias fracciones, HbA1a, HbA1b y Hb A1c, siendo la de mayor interés y la que se encuentra en un porcentaje más elevado la Hb A1c, que es la que se encuentra unida a la glucosa de manera más específica.

La Hb A1c es el resultado de la glucosilación de la hemoglobina normal (Hb A), como consecuencia de la reacción no enzimática entre la glucosa presente en el plasma y los grupos amino de la hemoglobina, como se muestra en la figura. La unión de glucosa a la valina N-terminal de las cadenas β de la HbA da lugar a la Hb A1c, que es la más abundante de las HbA1 (aproximadamente el 80%).



La cantidad de hemoglobina glucosilada es proporcional a la concentración de glucosa en sangre, por lo que en la diabetes hay mayor proporción de Hb A1c de lo normal. Los valores de referencia en humanos oscilan de 5,5-8,5 % en individuos sanos y del 12-20 % en diabéticos no controlados. Entre los factores que condicionan la intensidad de la glucosilación podemos destacar: la concentración de glucosa sanguínea, el tiempo que se mantiene esa cantidad de glucosa y la vida media de la proteína. En el caso de la hemoglobina, y teniendo en cuenta que la vida media del glóbulo rojo es aproximadamente de 120 días, su determinación nos servirá para evaluar el control de las cifras medias de glucosa en sangre que ha mantenido un diabético durante los 2 a 3 meses precedentes. Cuanto menor sea el nivel de hemoglobina glucosilada, mejor es el control del diabético, y mejor se podrán prevenir las posibles complicaciones a largo plazo de la diabetes. Además los valores de hemoglobina glucosilada no están influidos por las fluctuaciones diarias de glucosa sanguínea ni tampoco, por el ejercicio ni por la ingesta reciente de alimentos.

En esta práctica separaremos la fracción de hemoglobina glucosilada HbA1c mediante cromatografía en una microcolumna que contiene una resina de intercambio catiónico. Mediante la cromatografía de intercambio iónico, se logra la separación de las fracciones de hemoglobina en

base a las diferencia en sus cargas eléctricas. Al tener su grupo amino sustituido con glucosa (-NH-R), la hemoglobina Hb A1c posee menos carga positiva que la Hb A no glucosilada, cuyo grupo $-NH_2$ intacto se puede protonar a $-NH_3^+$; como consecuencia, la HbA1c es menos retenida que la Hb A y eluye con la disolución de lavado (Tampón fosfato). Empleando después un medio de mayor fuerza iónica (NaCl) se consigue liberar la interacción de la resina con la Hb A y así se recupera ésta.

Materiales

- 3 tubos de ensayo largos de vidrio (para soportar las columnas y recoger los eluatos)
- Pipetas automáticas
- Columna con resina de intercambio catiónico (polímero acrílico con grupos carboxilato)
- Colorímetro
- Disolución hemolizante
    - Biftalato potásico 50mmol/L y detergente, pH 5.0
- Disolución de lavado
    - Tampón fosfato 72 mmol/L pH 6.4
- Disolución de elución
    - Cloruro sódico 1 M
- Sangre completa de ratas normales o diabéticas (con heparina o EDTA)

Procedimiento experimental

1. Preparación del hemolizado (nota: este hemolizado se proporciona ya preparado al alumno)

Se prepara un hemolizado (ruptura de los hematíes) mezclando la sangre total con la disolución hemolizante:

SANGRE	DISOLUCIÓN HEMOLIZANTE
50 μl sangre normal	200 μl
50 μl sangre de diabético	200 μl

Agitar y dejar a temperatura ambiente durante 10-15 minutos para que se produzca la lisis. Este hemolizado se pasará por una microcolumna en donde las hemoglobinas son retenidas por una resina de intercambio catiónico.

2. Preparación de las columnas:

- Dar vuelta a las columnas y mantenerlas con el tapón hacia abajo durante 10 minutos
- Colocar la columna sobre un tubo largo de vidrio
- Retirar los tapones superior e inferior de la columna. Bajar el disco superior hasta el nivel de la resina, evitando comprimirla, con ayuda del extremo plano de una pipeta. Dejar gotear justo hasta que veamos desaparecer el líquido en la parte superior de la columna (alcanza la superficie de la resina) desechando el eluido.
- No dejar que se seque la columna

3. Fraccionamiento de las hemoglobinas

- Aplicar cuidadosamente sobre la columna 50 µL del hemolizado y dejar que el líquido sea absorbido completamente (desaparece por la parte superior).
- Añadir a la columna 200 μl de la **solución de lavado** para arrastrar los posibles restos del hemolizado y dejar que penetren en la columna (desaparece, por la parte superior).
- Desechar el eluído.
- Se necesitan 2 tubos de vidrio para recoger la hemoglobina glucosilada (HbA1c) y la normal (HbA). Rotular convenientemente los tubos para no confundirlos como tubo1 y tubo 2.

3.1. Separación de la hemoglobina glucosilada **HbA1c**

- Colocar bajo la columna el tubo de vidrio rotulado como tubo 1 para recoger la fracción de HbA1c
- Añadir a la columna 2 ml de **solución de lavado (tampón fosfato)** y dejar que todo el líquido salga de la columna. Una vez que desaparezca el líquido por la parte superior, retirar el tubo 1.

3.2. Elución de la hemoglobina no glucosilada **HbA**

- Colocar bajo la columna el tubo de vidrio rotulado como tubo 2 para recoger la fracción de HbA
- Añadir a la columna 2 mL de la **solución de elución (NaCl)** y recoger todo el líquido eluído de la columna, hasta que desaparezca por la parte superior.

4. Medida de las hemoglobinas (Absorbancia a 415 nm, pico de absorción de la hemoglobina)

- Preparar tres tubos de ensayo limpios.
- En un tubo de ensayo añadir 2 mL de agua destilada (blanco)
- Pasar el contenido del tubo 1 a un tubo de ensayo. Medir su absorbancia a 415nm frente al agua destilada (fracción de hemoglobinas glucosiladas, HbA1c)
- La absorbancia del tubo dos es muy alta, por lo que hay que diluir, añadiendo 4 ml de agua destilada (dilución 1:3). Agitar y pasar 2 ml de la dilución a un tubo de ensayo. Medir la absorbancia frente a agua destilada a 415nm (fracción de hemoglobinas no glucosiladas, HbA) y multiplicar el valor de absorbancia obtenida por tres.

5. Resultados

Cálculo del porcentaje de hemoglobina glucosilada frente a hemoglobina total:

A_{415} HbA1c =

A_{415} HbA =

A_{415} Hb total (HbA+ HbA1) =

$$\frac{A_{415}\ \text{HbA1c}}{A_{415}\ \text{Hb total}} \quad X\ 100 = \%\ \text{HbA1c}$$

Comparar los resultados de hemoglobinas glucosiladas con los de los otros compañeros.
Identificar los valores de hemoglobinas glucosiladas de muestras normales y de diabéticos.

6. Completar:

Se ha realizado un cromatografía de …….utilizando una resina con grupos con carga……

En el tubo 1 se ha recogido la hemoglobina ……(Hb……), que al tener carga ……..…

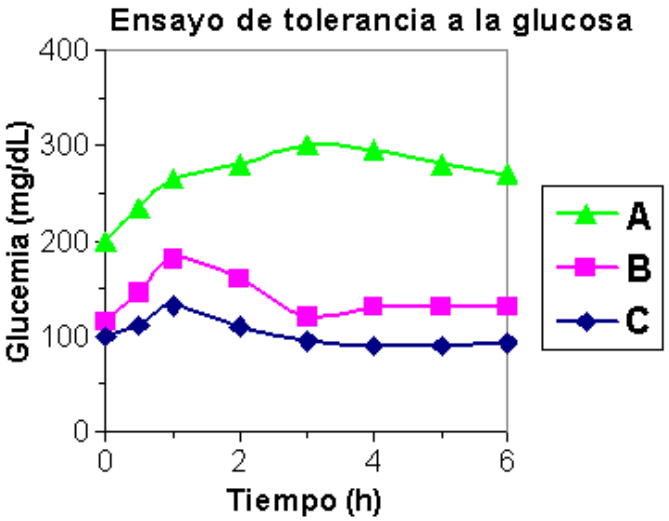
no ha quedado retenida en la columna. Esta carga…… se debe a la unión de la

…….al grupo N-terminal de la …….

En el tubo 2 se ha recogido la hemoglobina ……..……(Hb…..), que al tener carga ……. quedó retenida en la columna.

Con la solución de elución (…….) hemos desplazado a la hemoglobina……..de la resina.

La absorbancia a 415 nm es debida a ……..……



Se realiza un ensayo de tolerancia a la glucosa (o curva de glucemia) a 3 personas diferentes, midiendo la glucemia en diferentes momentos tras la toma oral de 100 g de glucosa disuelta en agua.
Asigna las curvas obtenidas (A, B y C) a las siguientes situaciones:
paciente sano, diabetes leve, diabetes grave

Práctica 6.
Estudio de una ruta metabólica. El ciclo de la urea.

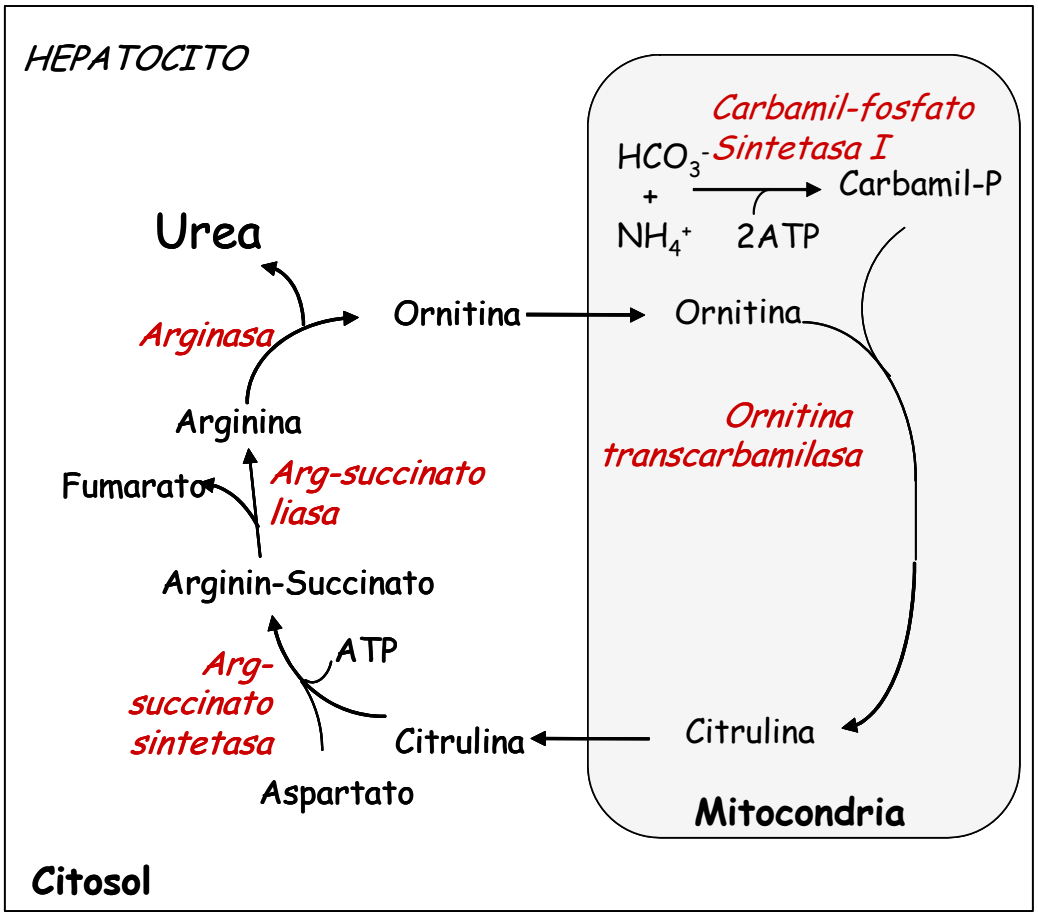
Objetivos

El alumno debe familiarizarse con los procesos experimentales utilizados para la elucidación de las rutas metabólicas. Estos procesos se aplicarán al estudio del ciclo de la urea.

Introducción

La urea, $CO(NH_2)_2$, es el compuesto mediante el cual los mamíferos excretan la mayoría del ión amonio producido por el catabolismo de los aminoácidos. En la síntesis de urea, que tiene lugar en el hígado, las fuentes inmediatas de los átomos de nitrógeno son el carbamil fosfato y el ácido aspártico. El carbamil fosfato se sintetiza en la matriz mitocondrial a partir de anhídrido carbónico y amoníaco en una reacción que requiere ATP. El ácido aspártico se forma por una transaminación en la que el oxalacetato es el receptor de un grupo amino.

Como puede verse en el esquema de abajo, la formación de urea es un proceso cíclico en el que que la ornitina tiene un papel análogo al oxalacetato en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, pero a diferencia del mismo, no se decaboxila en cada ciclo, de modo que la molécula de la ornitina cicla una y otra vez. El hígado de una persona con dieta normal produce en promedio 25-30 g de urea al dia, aunque puede variar dependiendo de la abundacia en proteían de la dieta. La uremia es alrededor de 30 mg/dl.



En esta práctica el alumno llevará a cabo varios ensayos para tratar de comprobar determinados aspectos del ciclo de la urea.

Determinación de urea
Para cuantificar el efecto de los cambios experimentales sobre la actividad del ciclo, se utilizará un método de medida de la cantidad de urea basado en la reacción coloreada de la urea en presencia de ortoftalaldehido (Reactivo 1) en medio ácido (ácido bórico, Reactivo 2). La mezcla incubada durante 15 minutos a 37º C da una coloración roja con un máximo de absorción a una longitud de onda de 510 nm. Se determinará también la concentración de urea en orina humana.

Recta patrón y medida de urea en orina.

1. Hacer las mezclas en los tubos patrones y el tubo con orina (volumen final 1,5 ml).

TUBO			**A 510 nm**	**µmoles urea**
1	Blanco	0 ml 10 mM urea + 1.5 ml tampón Tris		
2	Patrón 1	0.1 ml 10 mM urea + 1.4 ml tampón Tris		
3	Patrón 2	0.2 ml 10 mM urea + 1.3 ml tampón Tris		
4	Patrón 3	0.3 ml 10 mM urea + 1.2 ml tampón Tris		
5	Patrón 4	0.5 ml 10 mM urea + 1 ml tampón Tris		
6	Orina diluida 1:10 en agua	0.1 ml orina diluida + 1.4 ml tampón Tris		

2. Añadir 1 ml de Reactivo 1 y 1 ml de Reactivo 2 a todos los tubos (incluido el Blanco)

3. Incubar los tubos durante 5 minutos a 37ºC para que tenga lugar reacción de los Reactivos 1 y 2 con la urea (producto de color rojo).

4. Meter los tubos en hielo 1 min aproximadamente y medir la absorbancia a 510 nm. Dejar el tubo blanco en hielo después de ajustar el blanco del colorímetro

5. Representar una recta patrón de absorbancias (en eje de ordenadas) frente a µmoles de urea totales en cada tubo (en abcisas)

6. Determinar los µmoles de urea presentes en la muestra de orina interpolando en la recta

Ciclo de la urea. Cuestiones previas

1. Para llevar a cabo estos estudios se debe reproducir el proceso en un tubo de ensayo ¿Crees que sería necesario mantener intacta la estructura celular para que el ciclo se lleve a cabo?
2. ¿Qué tendríamos que añadir a un tubo que contenga homogenado de hígado de rata para que tengan lugar las reacciones del ciclo? (TUBO PROBLEMA 1)
3. ¿Qué controles has de poner para poder decir que la urea que se mide en el tubo 1 es debida a la generada por la actividad del ciclo y no la previamente presente en el homogenado de hígado? (TUBO PROBLEMA 2)
4. El ciclo de la urea es un proceso enzimático. Diseña un tubo para probar esta afirmación (TUBO PROBLEMA 3)
5. ¿Cómo podrías demostrar que la arginina es el precursor inmediato de la urea? (TUBO PROBLEMA 4)

Ciclo de la urea. Práctica
Preparar los tubos problema 1 a 4, con volumen final 1,5 ml. Los compuestos se utilizarán en las siguientes concentraciones y volúmenes:

Agua: 0,7, 0,2 o 0,4 ml
Tris 0,1M pH 7,4: 0,6 ml
Ornitina 0,05 M: 0,1 ml
Carbamil fosfato 0,05M: 0,2 ml
Aspartato 0,2 M: 0,2 ml
ATP 0,1 M: 0,2 ml
Arginina 0,05 M: 0,3 ml
Homogenado de hígado: 0,2 ml

	TUBO PROBLEMA 1	**TUBO PROBLEMA 2**	**TUBO PROBLEMA 3**	**TUBO PROBLEMA 4**
Tris pH 7.4				
Ornitina 0.05 M				
CarbamilP 0.05M				
Aspartato 0.2 M				
ATP 0.05 M				
Arginina 0.05 M				
Homogenado higado.				
Agua destilada				
A_{510} nm				
µmoles de urea				

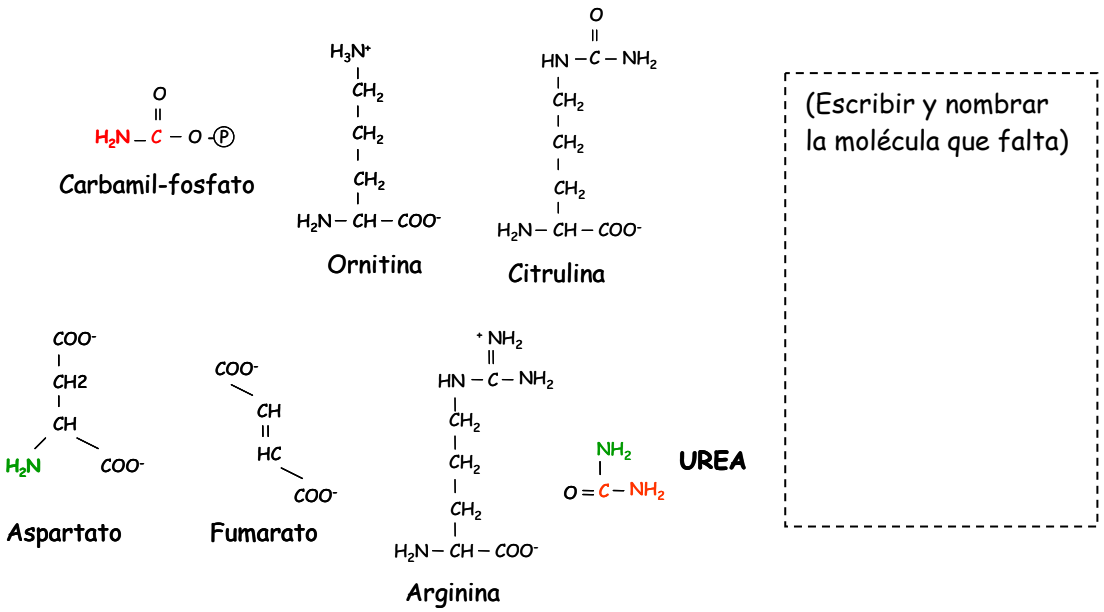
1. Incubar los tubos durante 5 minutos a 37ºC para que tenga lugar las reacciones enzimáticas de síntesis de urea en los tubos problema.2. Añadir los Reactivos 1 y 2 (1 ml de cada uno).

3. Incubar 5 min a 37ºC para que tenga lugar la reacción coloreada en presencia de urea.

4. Enfriar los tubos para parar la reacción (1 min en hielo) y medir la Absorbancia a 510 nm (Secar los tubos antes de meterlos en el espectrofotómetro). SI es necesario usar el Tubo 1 (blanco) de la primera parte para hacer el blanco del colorímetro

5. Interpolar en la recta patrón y expresar la cantidad de µmoles de urea producidos en cada tubo

Preguntas

1. ¿Cuál es la concentración de urea en la muestra de orina analizada? (tener en cuenta que se ha usado 0.1 ml de orina diluída 1/10)
2. ¿Cuál es la cantidad de urea presente en el tubo que tiene todos los componentes necesarios para que se lleve a cabo el ciclo? ¿Qué metabolitos del ciclo NO has añadido?
3. ¿Hay urea en el homogenado de hígado?
4. ¿La generación de urea es un proceso enzimático?
5. ¿Es la arginina precursora directa de la urea?

ESTRUCTURAS