

GUÍA PARA LA PRESENTACIÓN ESCRITA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS TRABAJOS PRÁCTICOS.

La comunicación en forma escrita de los resultados de una experimentación es una vía importante en la construcción y transmisión del conocimiento científico.

En Química Biológica I, la comunicación de los resultados de los experimentos realizados en un Trabajo Práctico se hará mediante la elaboración de un Informe.

El informe del trabajo práctico deberá constar de las cuatro secciones que tradicionalmente conforman un Trabajo científico. Estas son:

- **Introducción**
- **Materiales y Métodos**
- **Resultados**
- **Discusión.**

Esto se diferencia en algunas oportunidades de algunas publicaciones científicas, en las cuales suelen presentarse algunas otras secciones como por ejemplo, el Resumen y la Bibliografía; o pueden unificarse algunas secciones como por ejemplo los Resultados con la Discusión.

En términos generales un trabajo científico y/o un Informe debe contar qué actividades se realizaron para conocer algún aspecto del tema en cuestión, qué resultados se obtuvieron y a qué conclusiones se llegaron.

La manera de comunicar esta investigación debe hacerse de forma tal que otro investigador pueda, a través del documento escrito, reproducir dicha experiencia. Generalmente la redacción se hace en pasado y de forma impersonal. (ejemplo: se debe decir: “...se cortaron tres hojas por planta, se pesaron y se homogenizaron en...” y no se debe decir: “... corto tres hojas, las peso y las homogenizo en..”)

A continuación se describen los contenidos que no deben faltar en cada una de las secciones.

Introducción

-Debe incluir el conocimiento previo del tema, se refiere a toda aquella información directamente relacionada al tema surgida de investigaciones previas que ya se encuentra documentada en bibliografía.

-Planteo del problema general a investigar

-Planteo del objetivo, éste puede enunciarse como objetivo general y puede ser discriminado también, en objetivos particulares. El objetivo puede estar planteado alternativamente en forma de Hipótesis.

Materiales y Métodos

Debe informar cómo se realizó la experimentación y de esta forma, permitir evaluar la validez de los resultados obtenidos. Para ello se debe describir:

- **Material utilizado:** biológico, químico, equipamiento, etc, indicando siempre las cantidades.

- **Métodos:** esta sección incluye los protocolos de los experimentos realizados, debe ser conciso y preciso para que no surjan ambigüedades en los procedimientos y los mismos puedan ser

repetidos por el lector. Si la técnica realizada es exactamente igual a alguna ya publicada se puede citar dicha publicación y no describirla nuevamente. En un informe de QBI se puede evitar describir algunos protocolos citando la Guía de Trabajos Prácticos.

Resultados

Los resultados experimentales obtenidos se deben presentar en forma de tablas o figuras, y texto. Deben presentarse en un orden que siga una línea de razonamiento coherente. Los resultados deben mostrarse de la manera más clara posible (se muestran una sola vez y de una única manera o tabla o figura) y esta forma debe incluir el título (el cual debe ser explicativo) y referencias de los ejes, filas columnas, etc, de forma tal que la figura o tabla se entienda por sí misma. También puede contener una referencia general de la figura la cual informe de otros datos necesarios para la comprensión de la misma. En el texto se debe incluir el objetivo particular del experimento (no confundir con el objetivo general del trabajo) y no se debe incluir toda la información de la figura o tabla sino solo la más relevante y de la cual se puedan extraer las conclusiones de ese experimento. Ejemplo: “...Con el fin de estimar el punto isoeléctrico de la hemoglobina se sometió a la misma a dos cromatografía de intercambio aniónico, una a pH 4 (figura 1) y otra a pH 8 (figura 2). Los resultados mostrados en la figura 1 indican que la hemoglobina eluyó en la lavada de la columna. Por lo tanto se puede concluir que la misma se encuentra cargada positivamente a pH 4. Por otro lado, en la figura 2...”

Discusión

En esta sección se debe explicar el significado de los resultados poniéndolos en el contexto del conocimiento existente. Esto significa que se deben comparar los resultados obtenidos en la propia experimentación con los obtenidos por investigaciones previas. Además es importante que el autor sugiera explicaciones que vayan más allá del resultado concreto, es decir que proponga y justifique posibles conclusiones que se desprendan de los resultados obtenidos. Ejemplo: si el resultado obtenido muestra que la cantidad de glucógeno hepático disminuyó en un porcentaje mayor que las proteínas hepáticas en un ratón a 20 horas de ayuno; entonces el autor puede proponer en la discusión que el glucógeno sería la principal fuente de energía utilizada por el hígado frente a un estrés por ayuno. El planteo de las proposiciones o sugerencias realizadas suele redactarse en un tiempo condicional y no en presente como una aseveración absoluta.

Formulario a completar por los alumnos para la realización de los trabajos prácticos de laboratorio:

.....

Constancia para la cátedra

Yo,..... declaro haber leído y aceptado las normas de trabajo en el laboratorio de trabajos prácticos.

Fecha y Lugar:

Firma y DNI

.....

TRABAJO PRACTICO N° 1

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

- Objetivos:** * Conocer métodos de extracción de proteínas de diferentes tejidos.
* Analizar y comparar distintos métodos de cuantificación de proteínas.

Materiales:

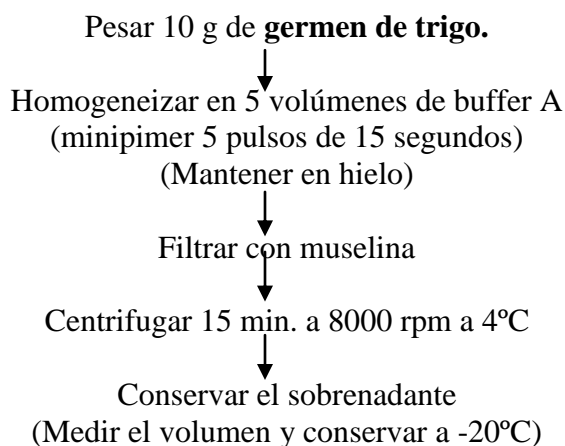
- Hígados de ratón (de ratones normal y ayunado)
- Germen de trigo
- Buffer A: Tris-HCl 100 mM pH 7,5
- muselina.
- Minipimer
- Homogenizador por dispersión IKA T10
- Reactivo de μ Biuret: 1,3 g de $\text{SO}_4\text{Cu } 5\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de H_2O + 173 gr de citrato trisódico y 100 g Na_2CO_3 (disolver en agua con calor). Llevar todo a 1litro.
- NaOH 3%
- Reactivo de Bradford 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 en 50 ml de etanol 95 % (disolver bien). Agregar 100ml de PO_4H_3 y llevar a 1litro.
- Solución Patrón de seroalbúmina bovina (BSA) 10 mg/ml en H_2O .

Primer día:

Preparación de homogenatos

- a) germen de trigo
- b) hígado de ratón normal
- c) hígado de ratón ayunado

a)

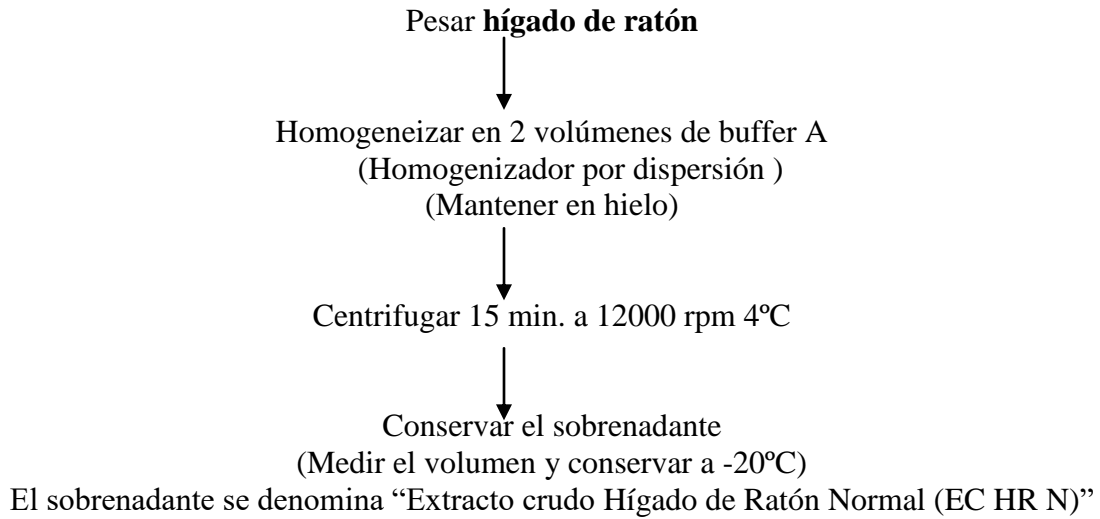


El sobrenadante se denomina “Extracto crudo Germen de trigo (EC GT)”.

b)

Matar el ratón por dislocación cervical.

Extraer el hígado y colocarlo en un recipiente con buffer A. Limpiarlo.



c)

Idem procedimiento b)

El sobrenadante se denomina “Extracto crudo Hígado de Ratón Ayunado (EC HR Ay)”

NOTA: En todos los casos los homogenatos se guardarán alicuotados, para ser usados en posteriores trabajos prácticos.

Segundo día

Cada grupo cuantificará proteínas por dos métodos colorimétricos

Método de μ Biuret:

Tubo (eppendorf)	H ₂ O (μ l)	BSA 10 mg/ml (μ l)	Muestra (μ l)	NaOH 3% (μ l)	Reactivo (μ l)
B	600	--	--	2400	150
1	580	20	--	2400	150
2	570	30	--	2400	150
3	540	60	--	2400	150
4	480	120	--	2400	150
5	360	240	--	2400	150
6 EC GT	540	--	60	2400	150
7 EC GT	540	--	60(1/10)	2400	150
8 EC GT	540	--	60(1/20)	2400	150
9 EC HR N	540	--	60	2400	150
10 EC HR N	540	--	60(1/10)	2400	150
11 EC HR N	540	--	60(1/100)	2400	150
9 EC HR Ay	540	--	60	2400	150
10 EC HR Ay	540	--	60(1/10)	2400	150
11 EC HR Ay	540	--	60(1/100)	2400	150

Incubar durante 15 min. a temperatura ambiente. Leer Abs. A 330 nm.

Método de Bradford

Tubo	H ₂ O (μ l)	BSA 10 mg/ml (1:100) (μ l)	Muestra (μ l)	Reactivo (ml)
B	300	--	--	3
1	250	50	--	3
2	200	100	--	3
3	150	150	--	3
4	100	200	--	3
5	--	300	--	3
6 EC GT	250	--	50	3
7 EC GT	250	--	50 (1/100)	3
8 EC GT	250	--	50 (1/200)	3
9 EC HR N	250	--	50	3
10 EC HR N	250	--	50 (1/100)	3
11 EC HR N	250	--	50 (1/500)	3
9 EC HR Ay	250	--	50	3
10 EC HR Ay	250	--	50 (1/100)	3
11 EC HR Ay	250	--	50 (1/500)	3

Mezclar bien y leer abs. A 595 nm.

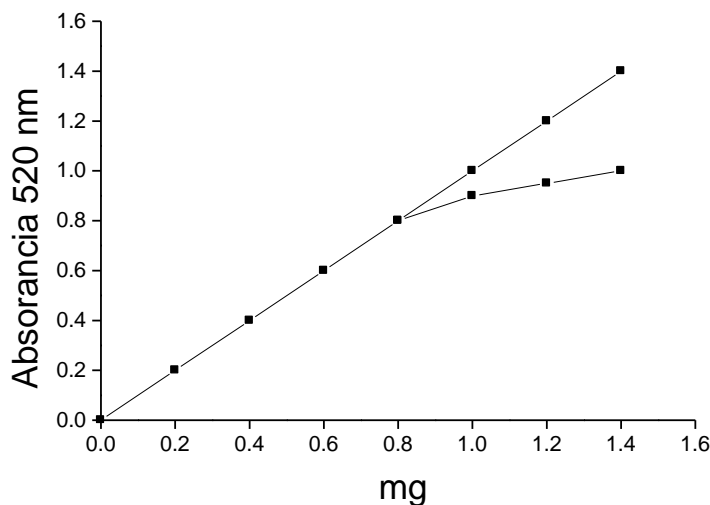
Resultados:

Construya la curva estándar (en papel milimetrado) y complete la tabla para cada uno de los homogenatos.

Método	Vol. Homg	Conc. de Proteínas	
		(mg/ml)	(mg/g tejido)
μBiuret EC			
Bradford EC			

Cuestionario (sea breve)

- 1) ¿Qué importancia tiene el tipo de buffer y la velocidad de centrifugación en la extracción de proteínas?
- 2) ¿Existen diferencias en los valores de concentración de proteínas obtenidos con los distintos métodos de cuantificación? Justifique.
- 3) Se desea determinar la concentración de proteínas de una muestra utilizando la curva estándar (método colorimétrico X) que se muestra a continuación:



Utilizando el mismo método colorimétrico se determina que 100 μl de la muestra dan una absorbancia de 1,2 (restado el blanco).

Conteste si las siguientes afirmaciones son verdaderas o falsas. Justifique cada una de ellas.

- a) Se puede determinar la concentración de proteínas de la muestra diluyendo la reacción colorimétrica a la mitad para obtener una absorbancia de 0,6, valor que se encuentra en la zona lineal de la curva.
- b) Se puede determinar la concentración de proteínas de la muestra repitiendo la colorimetría con un volumen, por ejemplo 20 μl.
- c) Se puede determinar la concentración de proteínas de la muestra repitiendo la colorimetría con 100 μl de la muestra diluida por ejemplo 1/5.
- d) Se puede determinar la concentración de proteínas de la muestra prolongando la curva estándar hasta 1,2 por la línea de puntos indicada en el gráfico.

TRABAJO PRÁCTICO N° 2: CROMATOGRAFÍA

Objetivos:

- Conocer e interpretar los principios de separación de cromatografías en columna de filtración en gel y de intercambio iónico.
- Purificar parcialmente la fosfatasa ácida de germen de trigo.

Materiales disponibles:

- Columna de filtración en gel Sephadex G-25 (rango de separación 1000 -5000 Da).
- Columna DEAE-celulosa (DE-52)
- Solución de azul dextrano (PM: 2000000 Da, 5 mg/ml) y Cloruro de Cobalto (237.93 g/mol (hexahidrato), 10 mg/ml)
- Extracto de germen de trigo obtenido en el TP N ° 1
- Buffer A: Tris-HCl 50 mM pH 8
- Buffer B: NaCl 0.5 M en buffer A.
- Buffer C: Acetato de Na 50 mM pH 4.
- Buffer D: Acetato de Na 50 mM pH 4 + 0.5 M NaCl.
- Buffer acetato de sodio 0.2 M pH 5
- Sustrato de la fosfatasa acida: para-nitro fenol fosfato (pNPP) 25 mM
- KOH 0,1 N
- Tubos de ensayo, placas de ELISA

Preparación de las columnas:

Antes de comenzar el TP se deberá equilibrar la columna en buffer y regular el flujo de la misma hasta alcanzar 1 ml/min aproximadamente.

Buffer A para filtración en gel, buffers A y C para los intercambiadores iónicos

-Determinar en las fracciones recogidas si tiene (+) o no (-) actividad enzimática. Proceder como sigue:

En una placa de ELISA colocar en cada pocillo:

20 μ l de la fracción (fracción por medio) + 20 μ l de buffer acetato pH 5 + 20 μ l de pNPP (diluido 1/5)

-Incubar a 37 °C durante 30-45 min. Una vez finalizado el tiempo de incubación agregar a cada pocillo: 140 μ l de KOH 0.1 N.

Anotar el resultado: Reacción (+): amarillo intenso. Reacción (-): incolora o amarillo suave. Realizar un “pool” reuniendo los tubos correspondientes a las fracciones en los que se detecto actividad de fosfatasa acida y conservarlos a -20 °C.

Nota: el pNPP agregado está previamente diluido 1/5. Antes de incubar a temperatura indicada, asegurarse que los volúmenes se hallan mezclado bien en cada pocillo. Respetar el orden de adición de los reactivos según la reacción.

Resultados:

-Graficar Abs. 280 nm versus volumen de lo obtenido en cada grupo. En el mismo gráfico indique la actividad de la fosfatasa ácida. Indicar el lavado y la elusión.

Cuestionario:

1. ¿Qué sucede cuando se agrega el buffer B o D?
2. Analice los resultados obtenidos para las proteínas del extracto de germen de trigo y particularmente para la fosfatasa ácida respecto de las condiciones experimentales utilizadas. Si tuviera que repetir el protocolo ensayado ¿qué modificaciones introduciría?.
3. ¿De qué modo puede mejorar la elusión de las proteínas retenidas en la matriz? Fundamente.

2) Cromatografía de filtración en gel

- 1- Sembrar 0,2 ml de solución de azul dextrano y cloruro de cobalto en la columna de filtración en gel G25. Calcular el volumen de matriz.
- 2- Eluir con buffer A, registrando visualmente el avance del color de las muestras sembradas.
- 3- Registrar el volumen en que eluye el azul dextrano (V_o)
- 4- Registrar el volumen en que eluye el cloruro de cobalto (V_t), comparar con el volumen calculado para la matriz.

Estimación del PM de un compuesto por cromatografía de filtración en gel

-Confección de la curva de calibración de la columna con estándares de Peso Molecular:

Una mezcla de azul dextrano (PM 2.000.000) y cloruro de cobalto se cromatografiaron en la matriz de filtración G-75 (rango de separación 3.000–80.000) en gel y los compuestos eluyeron a los 9,5 ml y 27 ml respectivamente.

En un ensayo similar al realizado con azul dextrano y cloruro de cobalto se sembró en la misma columna una mezcla de 0.2 ml de Lisozima (PM 14.000 Da) y 0,2 ml de BSA (PM 66.000 Da). Los volúmenes registrados para los máximos de Abs a 280 nm fueron: 23 y 13 ml respectivamente. En otra corrida posterior se sembraron 0.2 ml de ovoalbumina (PM 43.000 Da) que eluyó a los 17 ml.

$K_{av} = \frac{\text{Volumen de elución (proteínas estándares)} - V_0}{V_t - V_0}$

Kav lisoz.=

Kav BSA=

Kav ovoal.=

Confeccione el gráfico de calibración Kav vs log PM

Estime el PM de una proteína cuyo volumen de elución en G-75 es: $V_e = 15$ ml.

Cuestionario:

- Explique brevemente las aplicaciones posibles de las columnas de filtración en gel.
- ¿Por qué se utiliza el azul dextrano para determinar el V_0 y el cloruro de cobalto para el V_t ? Justifique.
- En una filtración en gel Sephadex G-50 (rango de separación 1500-30000). ¿Podría haberse tomado como referencia la ovoalbúmina para confeccionar la curva de calibración de la columna? Justifique.
- ¿Por que se realiza el cálculo del Kav en lugar de emplear directamente el volumen de elusión?
- Dibuje el perfil que se obtendría al cromatografiar en una columna de rango 500-30.000, la mezcla de compuestos utilizadas en el punto **b**. Indique V_0 , V_t y el/los componentes de cada pico.

TRABAJO PRÁCTICO N° 3

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS y WESTERN BLOT

Objetivos

Fraccionar y analizar el comportamiento electroforético de las mezclas de proteínas extraídas en el primer y segundo TP

Identificar la presencia de proteínas específicas en las muestras analizadas mediante la detección con anticuerpos.

Materiales

Homogenatos de germen de trigo y de hígado de ratón.

Geles de poliacrilamida (12%) con SDS

Buffer de muestra: (SB) glicerol, beta-mercaptoetanol, bromofenol blue, SDS, buffer Tris-HCl 0,2 M pH 6,8

Buffer se corrida: Tris HCl, glicina, SDS. pH 8,8

Solución de tinción: Coomassie Blue, metanol, ácido acético

Destaining: metanol, ácido acético

Cuba de electroforesis, vidrios, separadores, peines, fuentes de poder

Solución de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% v/v metanol, pH 8.3)

Membrana de nitrocelulosa, Papel de filtro

Semy-dry transfer BIORAD

Soluciones de bloqueo (3% de leche descremada en PBS) y lavados (PBS, PBS 0.1% Tween 20)

Anticuerpo primario Anti-ubiquitina (preparado en conejos) en solución

Anticuerpo secundario unido a fosfatasa alcalina anti-Inmunoglobulinas de conejo

Reactivos de revelado de western blot (NBT, BCIP)

Métodos

Electroforesis

1- Preparación del gel (a cargo de la cátedra)

<u>a) Gel de separación 12 %</u>		Acrilamida 30/08%	1,3 ml
		H ₂ O	6,1 ml
		0,5M TrisHCl pH6,8	2,5 ml
Acrilamida-bis 30/08%	4 ml	SDS 10%	100 ul
H ₂ O	3.5 ml	TEMED	5 ul
1.5M Tris-HCl pH8.8	2.5 ml	APS 10 %	50 ul
SDS 10%	100 ul		
TEMED	5ul		
APS 10 %	50ul		

b) Gel de concentración

Agregar inmediatamente sobre el gel de separación y colocar el peine. Una vez que gelifique montar el gel en la cuba y agregar el buffer de corrida.

2- Preparación de las muestras

En cada gel se sembrarán muestras provenientes del homogenato de hígado y de germen de trigo (práctico de extracción de proteínas). En este último caso, se sembrará además la fracción de las columnas de intercambio iónico que presentaron actividad de fosfatasa ácida (práctico de cromatografía).

Calles del gel:

- | | |
|----|--|
| 1) | Marcador de peso molecular (7 μ l) |
| 2) | Homogenato de germen de trigo (20 μ l del homogenato puro + 5 μ l de Sample Buffer) |
| 3) | Dilución 1/5 del homogenato de germen de trigo (20 μ l de la dilución 1/5 del homogenato + 5 μ l de Sample Buffer) |
| 4) | Dilución 1/20 del homogenato de germen de trigo (20 μ l de la dilución 1/20 del homogenato + 5 μ l de Sample Buffer) |
| 5) | Fracciones con actividad de fosfatasa ácida (30 μ l de la fracción + 7,5 de Sample Buffer) |
| 6) | Homogenato de hígado (20 μ l del homogenato puro + 5 μ l de Sample Buffer) |
| 7) | Dilución 1/5 del homogenato de germen de hígado (20 μ l de la dilución 1/5 del homogenato + 5 μ l de Sample Buffer) |
| 8) | Dilución 1/20 del homogenato de hígado (20 μ l de la dilución 1/20 del homogenato + 5 μ l de Sample Buffer) |

Antes de sembrar las muestras, calentar las mismas durante 3 minutos a 100 °C.

3- Condiciones de corrida y tinción

Una vez sembradas las muestras realizar la corrida electroforética a 20 mA constantes por cada gel hasta que el frente (bromofenol blue) llegue hasta 5 mm del borde inferior del gel. Finalizada la corrida desmontar el gel y sumergirlo en la solución de tinción por aprox. una hora y luego cambiarlo a la solución de desteñido (destaining).

Western blot

(Será realizado por la Cátedra y se mostrarán los resultados a los alumnos en el TP)

La técnica de inmunotransferencia (immunoblotting o Western blot) es un sistema rápido y muy sensible para la detección y caracterización de proteínas que se basa en la especificidad de reconocimiento entre antígeno y anticuerpo. Implica la separación de los polipeptidos de una mezcla compleja por electroforesis por el sistema SDS-PAGE y una transferencia cuantitativa e irreversible a una membrana de nitrocelulosa o PVDF. Trabajar con las proteínas fijadas sobre una membrana tiene ventajas sobre el emplearlas dentro del propio gel: Son más rápidas de teñir y desteñir, se reduce el consumo de reactivos y anticuerpos, se detectan cantidades menores de proteínas pues se concentran en la superficie y no se diluyen en todo el espesor del gel, el 'blot'

es un registro conveniente y cómodo de manipular del gel, las membranas son mucho más fáciles de manipular que el propio gel.

Todo procedimiento de 'blotting' consta de 5 etapas:

- Inmovilización de proteínas sobre la membrana ya sea mediante transferencia (electroforetica, aspiración, presión) o mediante aplicación directa.
- Saturación de todos los lugares de unión de proteínas de la membrana no ocupados para evitar la unión no específica de anticuerpos, que son proteínas (bloqueo)
- Incubación del 'blot' con anticuerpo primarios contra la/s proteína/s de interés.
- Incubación del 'blot' con anticuerpos secundarios, o reactivos que actúan de ligando del anticuerpo primario unidos a enzimas u otros marcadores.
- Las bandas de proteínas marcadas con enzimas se hacen visibles por incubación con los sustratos apropiados para formar productos coloreados insolubles en el lugar donde se encuentran las bandas de proteína.

Habitualmente se emplean además técnicas de tinción de proteínas sobre la membrana recién transferida, antes de ser bloqueada, como control de la transferencia. Estas tinciones, como el Ponceau S son reversibles, y pueden ser lavadas para la posterior incubación con anticuerpos.

Se utilizará un gel en el que se encuentran sembradas muestras similares a las utilizadas por los alumnos (Germen de trigo, hígado de raton normal, hígado de ratón ayunado).

El gel se retirará del cassette y se colocará de manera armar un sándwich con la membrana de nitro celulosa y los papeles de filtro (previamente equilibrados en el buffer de transferencia) en el siguiente orden:

papel filtro/membrana/gel/papel filtro

el sandwich armado se coloca en el SemiDry transfer Blot y se lo embebe en buffer de transferencia. La superficie donde se coloca el sándwich (anodo) y la superficie de la tapa que aplasta al sandwich (catodo) son los electrodos del sistema de electrotransferencia. Se coloca la tapa del SemiDry transfer Blot, se conecta a la fuente de poder y se setean las condiciones de tiempo y voltaje de transferencia (30- 60 minutos, 10V constante)

Una vez terminado el tiempo de transferencia, se desconecta de la fuente de poder, se desarma el transblot y se recupera del sándwich la membrana transferida y el gel. La membrana se coloca en solución de bloqueo por 30 minutos. La membrana puede ser teñida para chequear la efectividad de la transferencia.

Una vez bloqueada la membrana puede ser utilizada en los pasos de incubación con la solución conteniendo el anticuerpo primario y posteriormente el anticuerpo secundario. Luego de las incubaciones con los anticuerpos primario y secundario se deben realizar pasos de lavado. Tanto las incubaciones como los lavados se realizan en agitación constante. Las condiciones de incubación (tiempo y temperatura) en general son optimizadas para cada anticuerpo.

Incubaciones:

Anticuerpo primario (ON 4°C)

Lavados (3x10 min TA)

Anticuerpo secundario unido a PA (2 hs TA)

Lavados (3x10 min TA)

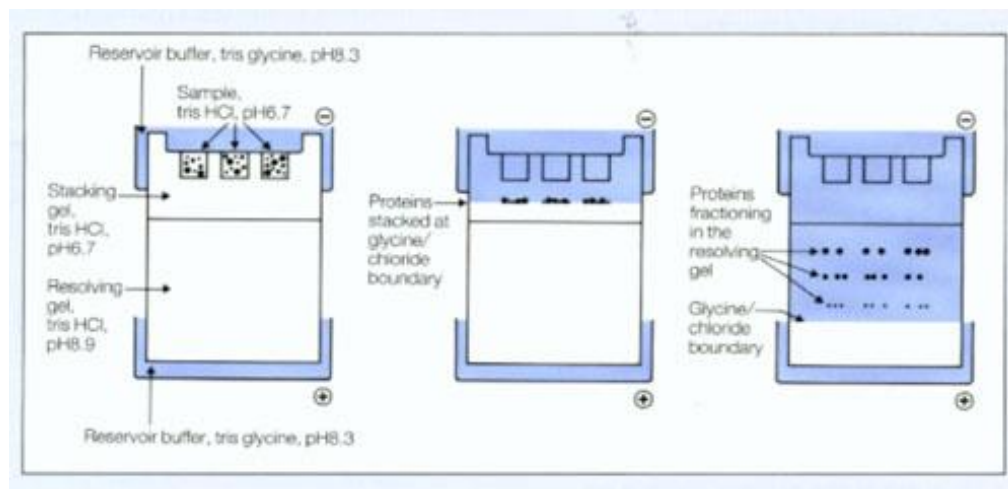
Revelado. Incubación en Solución revelado hasta que desarrolle color. La reacción se detiene con una solución que altera el pH, desfavoreciendo la actividad de la PA.

El anticuerpo secundario utilizado está ligado a una fosfatasa alcalina (PA). Durante la incubación, el anticuerpo secundario es capaz de unirse al anticuerpo primario. Posteriormente, en el revelado se realiza una reacción que genera un producto coloreado que precipita sobre la membrana, revelando así la posición de la proteína de interés. Uno de los sustratos colorimétricos más usados de la fosfatasa alcalina es el Bromocloroindolil fosfato / nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT). Forma un precipitado azul-púrpura. Es el resultado de la desfosforilación y posterior oxidación de BCIP a índigo, acoplada a la reacción de NBT a diformazon. La reacción es progresiva lo que facilita el control de la misma ajustando el tiempo de desarrollo.

Informe: Realizar un informe conteniendo solamente **resultados y discusión** del TP. Para ello incluya en el texto las respuestas (sin discriminar por número) del siguiente cuestionario guía.

Cuestionario guía:

- 1- Describa los resultados obtenidos en el gel de manera cuanti y cualitativa. Haga referencia a la Figura (fotografía del gel, confeccionar título y leyenda).
- 2- ¿Describa en particular algunas de las diferencias halladas entre el patrón de proteínas de hígado y de germen de trigo
- 3- Analice los resultados obtenidos para las proteínas vegetales de manera conjunta con los obtenidos en el TP de cromatografía. Podría inferir algún resultado acerca del PM de las proteínas con actividad de FA?



TRABAJO PRACTICO N° 4: CINETICA ENZIMATICA

Introducción:

A temperaturas fisiológicas pocas o casi ninguna de las reacciones del metabolismo intermediario podrían ocurrir a una velocidad suficiente como para permitir el mantenimiento y crecimiento celular. Para que las moléculas reaccionen es necesario entregarles cierta energía adicional, llamada energía de activación (E_a). Una manera de incrementar la velocidad de reacción es disminuyendo la E_a . Las enzimas son catalizadores biológicos que selectivamente disminuyen la E_a de reacciones químicas vitales.

El paso esencial en el estudio de una enzima es seguir la variación en el tiempo de la concentración de un reactivo (sustrato) o de un producto (medida de la velocidad). Los métodos analíticos que se usan dependen de la naturaleza de los sustratos y productos.

Métodos directos: En las reacciones biológicas existen frecuentemente diferencias espectrofotométricas medibles entre reactivos y productos por lo que pueden detectarse por este medio variaciones en la concentración de uno de ellos sin que el otro interfiera.

Métodos indirectos: Cuando el reactivo o el producto no absorben ni emiten luz se los puede hacer reaccionar con otra molécula tal que el producto sea espectrofotométricamente o fluorométricamente activo. Para cuantificar fluorescencia se mide la emisión de luz por moléculas excitadas.

Métodos de titulación: En muchas reacciones enzimáticas se consumen o liberan protones, por lo tanto, un procedimiento general para seguir el transcurso de una reacción química es medir la cantidad de ácido o de base requerida para mantener constante el pH.

Todas estas mediciones se pueden hacer en forma continua o discontinua en el tiempo. En este último caso, se toman alícuotas a distintos tiempos y se detiene rápidamente la reacción por inactivación de la enzima en condiciones que no alteren las concentraciones de sustrato y producto.

Objetivos:

- 1) Verificar experimentalmente algunas propiedades de las reacciones enzimáticas
- 2) Adquirir nociones de trabajo en enzimología

Reactivos:

- Homogenato GT con actividad de fosfatasa acida: El extracto enzimático se obtuvo en el TP1 de la siguiente manera: 10 g de germen de trigo se homogeneizaron en 50 ml de buffer Tris-HCl 100 mM pH 7,5 (en Minipimer). El homogenato se filtró con muselina y se centrifugó a 8.000 g durante 10 minutos, descartando luego el precipitado. Se realizó una segunda centrifugación a 12.000g por 10 minutos y se conserva a - 20 °C.

-Buffer acetato 0,2 M pH 5,0-KOH 0,1 M

-pNPP 25 mM en acetato 0,2 M pH 5

-pNP 0.24 mM en KOH 0.1 N

-fosfato de sodio (NaH_2PO_4) 100 mM pH 5,0

PLAN DE TRABAJO

1° Día:

- Confección de la curva de calibración para la detección espectrofotométrica del producto.
- Realización de curvas de tiempo para distintas concentraciones de enzima.

Curva de Calibración

Tubo n°	0,24 mM pNP en OH ⁻ (ml)	H ₂ O (ml)	0,1 N KOH (ml)
1	-	3	3
2	0,1	3	2,9
3	0,25	3	2,75
4	0,5	3	2,5
5	1	3	2
6	1,5	3	1,5
7	2	3	1

Mezclar bien y leer absorbancia a 410 nm. Graficar la curva de calibración.

Curvas de tiempo

Se determinará la dilución adecuada de la preparación enzimática que permita obtener liberación de pNP en forma lineal con el tiempo. Se ensayarán 4 tiempos (0, 10, 20 y 30 minutos) de reacción para las 3 concentraciones distintas de extracto enzimático.

Importante: Antes de largar las reacciones, tener preparados 16 tubos con 3 ml de KOH (0,1 N) + 2,5 ml de H₂O (debidamente rotulados).

La reacción se realizará, en cada tubo, de la siguiente manera:

- colocar el tubo con los reactivos en baño a 37 °C y esperar unos minutos
- iniciar la reacción con el agregado del extracto (a cada tubo la cantidad correspondiente)
- a los tiempos fijados (0, 10, 20 y 30 min) tomar 0,5 ml de la mezcla de incubación (tubos 1-4) y transferirlos a un tubo con KOH.
- medir A410 nm.

Tubo n°	Enzima (ml)	buffer acetato 0,2 M (ml)	pNPP 25 mM (ml)	H ₂ O (ml)
	Agregar al final			
1	0	1,1	0,2	1,7
2	0,1	1,1	0,2	1,6
3	0,3	1,1	0,2	1,4
4	0,9	1,1	0,2	0,8

#Nota: consultar la dilución de la enzima.

Dilución de enzima a utilizar: 1/10

Resultados

- Confeccionar la curva de calibración
- Calcular la masa de pNP formada en cada reacción (*ojo a las diluciones!!*)
- Determinar las condiciones de reacción de cada ensayo: concentración de sustrato, de buffer y dilución de la enzima.
- Graficar el producto formado en función de la dilución de enzima para cada tiempo.
- Determinar la dilución de enzima adecuada para obtener formación de producto en forma lineal con el tiempo.

2º Día

- Determinación de la actividad enzimática a diferentes concentraciones de sustrato.
- Efecto del fosfato inorgánico.

Determinación de la actividad enzimática a diferentes concentraciones de sustrato. Efecto del fosfato inorgánico.

El objetivo de esta parte del trabajo práctico es estudiar el efecto de un inhibidor (fosfato inorgánico) sobre una actividad enzimática dada, en este caso la fosfatasa ácida de germen de trigo.

La preparación enzimática diluida adecuadamente (según se determinó en la primera parte de este trabajo práctico) se incubará con distintas concentraciones de sustrato (0,5; 0,75; 1,5; 4 y 8 mM de pNPP) (solución madre 25 mM) en presencia y ausencia de fosfato de sodio 10 mM (solución madre 100 mM).

En base a estos datos confeccionar el correspondiente protocolo para el desarrollo del trabajo práctico. El volumen final será de 3 ml.

Para cada concentración de sustrato \pm fosfato se realizará una pequeña curva de tiempo (0, 10 y 20 min) manteniendo las mismas condiciones del ensayo anterior.

Los distintos grupos de cada turno trabajarán con todas las concentraciones de sustrato por duplicado, realizando algunos grupos las mediciones en presencia de inhibidor y otros en ausencia del mismo.

Una vez realizadas las reacciones y medida la Abs 410 calcular la masa de producto formada.

Resultados

Graficar las curvas de tiempo y en base a ellas, calcular la actividad (μ moles pNP formados/min/ml de dilución enzimática) para cada concentración de sustrato \pm fosfato. Con los datos de los demás grupos, confeccionar un gráfico de Lineweaver-Burk ($v-1 = f([S]-1)$) y determinar gráficamente K_m y V_m , en presencia y ausencia de fosfato inorgánico.

Cuestionario

- 1- ¿Por qué se utilizaron distintas diluciones de extracto enzimático para realizar las curvas de tiempo?
- 2- Si con las tres diluciones enzimáticas ensayadas se obtiene formación de producto en forma lineal con el tiempo, ¿cuál de ellas utilizaría? ¿Por qué?
- 3- ¿Cuál es el efecto del fosfato inorgánico en la reacción catalizada por la fosfatasa? Es posible calcular su K_i ? Justifique.