

PRÁCTICA 1:

DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE UNA PROTEÍNA MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDAS-SDS.

El objetivo es poder determinar el peso molecular de proteínas cuando se someten a un campo eléctrico y se hacen pasar a través de una matriz de tamaño de poro conocido (gel de poliacrilamida).

La formación del gel se realiza siguiendo la siguiente tabla, donde gracias a la solución de Acrilamida obtenemos el entramado matriz. Dicho entramado se obtiene por la utilización del catalizador TEMED; que inicialmente está inactivo y es activado por el persulfato amónico.

	Gel Separador 15%	Gel Compactador 4%
Sol. Acrilamida 30%	10 ml	2ml
1,5 M Tris pH 8,8	5ml	–
0.5 M Tris pH 6.8	–	2.5ml
DdH2O	4.2ml	5ml
10% SDS	200 (micro litros)	100(micro litros)
Vacio durante 5 min.		
10% APS	200 (micro litros)	100 (micro litros)
TEMED	40 (micro litros)	25 (micro litros)

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

	1	2	3	4	5
Tampón + (2-ME x 4)	–	4 micro litros	–	4 micro litros	–
Tampón – (2-ME x 4)	–		4 micro litros	–	4 micro litros
Muestra 1 (15 micro g)	–	12 micro litros	12 micro litros	–	–
Muestra 2 (15 micro g)	–	–	–	12 micro litros	12 micro litros
Patrones	10 micro litros	–	–	–	–

DESARROLLO DE LA ELECTROFORESIS.

1– Una vez obtenido el gel solidificado con sus pocillos, lavamos éstos con agua estéril. Colocamos el gel en la cubeta, rellenando el tanque y los pocillos con Tampón de Desarrollo.

2– Colocamos la muestra en el pocillo utilizando una microjeringa.

3– Desarrollamos la electroforesis durante una hora a 20 mA y a 20 °C, para seguir la electroforesis utilizamos un marcador coloreado(azul de bromofenol)

TINCIÓN.

Retiramos el gel del sandwich y lo llevamos a una cubeta que contiene una solución de tinte. La tinción se realiza durante 30 min. a 50 °C.

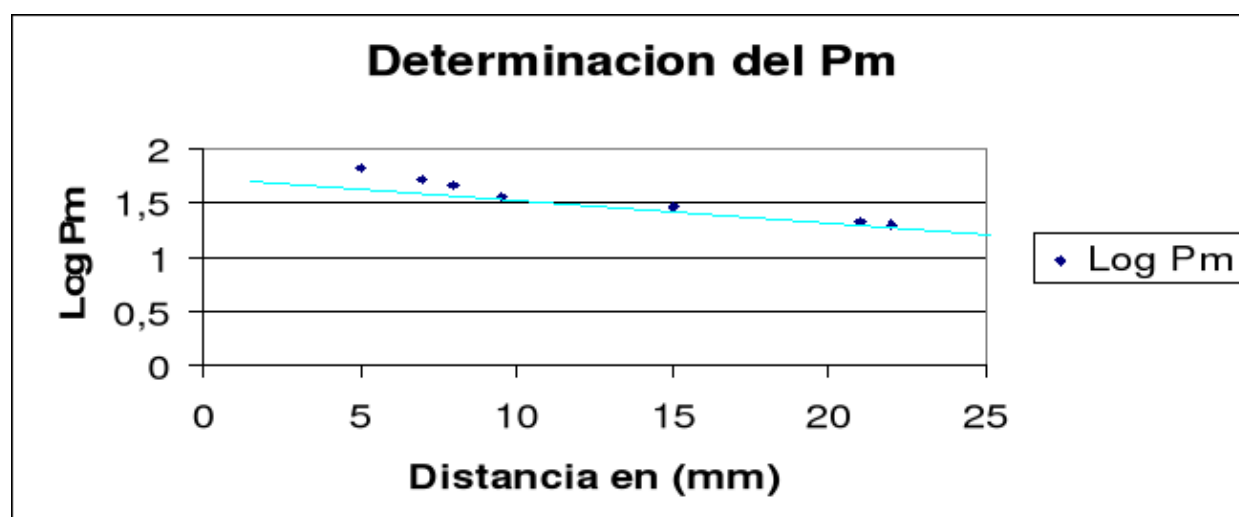
El gel se destiñe en otra solución durante 1 hora a 50 °C.

DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR.

Medimos la movilidad electroforética de la proteína en mm. Esta distancia se toma desde el pocillo hasta la banda longitudinal del gel. Sabiendo que la distancia es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular, realizamos una recta patrón con las proteínas de peso molecular conocido.

Los datos obtenidos en las mediciones quedan plasmados en la siguiente tabla, y representados en la correspondiente gráfica:

	PM (KD)	Log PM	mm
BSA	68	1.831	5
GDH	54	1.73	7
ADH	37	1.56	9.5
Anh. Carbonica	29	1.46	15
Inh. Tripsina	20	1.30	22
Muestra 1 - 2-ME	59.66	1.775	5
Muestra 1 + 2-ME	36.61	1.563	15
Muestra 2 - 2-ME	27.84	1.44	16
Muestra 2 - 2-ME			



ASPECTOS A TENER EN CUENTA.

–El Azul de Bromofenol es un compuesto de muy bajo peso molecular en comparación con el de las proteínas, por esto avanza más rápido por el gel y no influye en la determinación del Pm de las proteínas.

–La electroforesis la detenemos cuando el Azul de Bromofenol llega al borde inferior del gel.

PRÁCTICA 2 :

GEL DE AGAROSA.

El objetivo es identificar y purificar fragmentos de DNA .

Las moléculas de DNA migran a través de una matriz de gel de agarosa de tamaño de poro conocido desde el polo positivo al polo negativo en función de su peso molecular en presencia de un campo eléctrico.

CARACTERÍSTICAS DEL GEL:

- El rango de separación de este gel oscila entre 100 pb y 60 Kb.
- El tamaño de poro depende del porcentaje de agarosa utilizado en la formación del gel.

DESARROLLO DE LA ELECTROFORESIS.

Con la utilización de un peine obtenemos unos pocillos sobre los cuales vamos a introducir la muestra.

Rellenamos los pocillos y los dos tanques de la cubeta con disolución tampón.

A continuación conectamos la cubeta a la fuente de alimentación de tal manera que en el polo negativo estén situados los pocillos del gel y el polo positivo al final del gel. Después de pinchar las muestras lo dejamos correr durante dos horas a 70 V.

Transferimos el gel a un recipiente donde lo teñimos con una disolución tampón+ Bromuro de Etidio, la cual nos permite la visualización de los fragmentos de DNA con luz UV (254 nm.).

DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR.

Medimos las distancias recorridas por los fragmentos de DNA en mm y como sabemos que la movilidad electroforética es inversamente proporcional al logaritmo del número de pares de bases de los fragmentos de DNA podemos elaborar la siguiente tabla:

	Pm	Log Pm	Distancias (mm)
P1	21.2	1.32	11
P2	5.1	0.7	19
P3	4.9	0.69	20
P4	4.3	0.63	22
P5	3.5	0.54	29
P6	2.0	0.3	30
P7	1.9	0.28	32
P8	1.6	0.2	34
P9	1.4	0.156	38
P10	0.95	-0.022	40
P11	0.83	-0.08	42
M1	4.58	0.661	21
M2	1.88	0.276	32
M3	0.9	-0.039	41

PRATICA 3

DETERMINACIÓN ENZIMÁTICA DEL CONTENIDO EN GLUCOSA EN LOS MOSTOS COMERCIALES.

Las soluciones que vamos a utilizar en esta práctica son :

1-Tampón /MgSO₄

2-ATP 150mM /NADP 12mM

3-Ácido perclórico 0,33M

4-Mezcla de enzimas

5-KOH 3 M / Imidazol 0,5 M

6- Glucosa 5 M

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se toma 1 ml de zumo en un tubo eppendorf, y se cetrifuga a 1300 rpm durante 10 min; para poder eliminar las partículas en suspensión. Después se recupera el sobrenadante y se reparte unos 500 microlitros en dos tubos. A continuación para poder desproteínizar las disoluciones añadimos 1 ml de Pca 0,33 N a cada una y volvemos a centrifugar en las mismas condiciones que antes. Recogemos el sobrenadante y lo neutralizamos añadiendo la solución KOH / Imidazol.

RECTA PATRÓN

La reacción enzimática tendrá lugar en las cubetas donde hemos pipeteado todos los componentes y mediante el espectrofotómetro determinaremos la absorbancia en cada una de las disoluciones.

Las absorbancias medidas en las muestras y en los patrones son:

	Absorbancias (Y)	Concentracion (X)
Blanco	–	–
P1	0.628	0.166
P2	0.517	0.125
P3	0.1	0.083
P4	0.082	0.042
P5	–0.019	0.021
P6	–0.0108	0.010
M1	0.412	0.01
M2	0.143	0.005
M3	0.074	0.0025

Representamos graficamente los datos de la Absorbancia con la concentración de los patrones con el fin de obtener una recta. Con la cual podamos determinar la concentracion de las mustras.

	Concentracion (X)	Absorbancias (Y)
P1	0.166	0.628
P2	0.125	0.517
P3	0.083	0.1
P4	0.042	0.082
P5	0.021	–0.019
P6	0.01	–0.0108
	0.15	0.5837

		0	-0.085
M1	0.01	0.412	
M2	0.005	0.143	
M3	0.0025	0.074	
La recta de ajuste es: $Y = 4,458 X - 0.085$			

Ahora con los valores de la absorbancia de las muestras y la recta de ajuste realizada obtendremos los valores de las concentraciones.

La recta de ajuste es: $Y = 4.458 X - 0.085$

Determinacion de la concentración 1:

Determinación de la Concentración 2:

Determinación de la Concentración 3:

La Media es:

PRACTICA 4

VALORACION ENZIMATICA

Las soluciones que vamos a utilizar son:

1-Tampón

2-Ácido perclórico 0,33 N

3-50 mg de NAD 12mM disueltos en 3 ml de agua destilada

4-Patrones de etanol de 100 mM, 50 mM, 25 mM, 12 mM, 6 mM, y 3 mM

5-KOH 3 M, Imidazol 0,5 M

PREPARACION DE LA MUESTRA

Tomamos una muestra de 200 microlitros de vino y la centrifugamos a 1300 rpm durante 5 min, y luego recogemos unos 100 microlitros de sobrenadante. A continuación añadimos 1 ml de ácido perclórico para desproteinizar la disolución y después de mezclarlo bien en el vortex ya está preparado para centrifugarlo por segunda vez en las mismas condiciones que antes. Se recoge el sobrenadante y se neutraliza con la disolución número 5.

REACCION:

La reacción enzimática se realiza en las cubetas después de haber añadido los componentes. Llevamos éstas al espectrofotómetro para medir los distintos valores de absorbancias y así representar la recta patrón. Luego se determina la concentración del etanol en las muestras interpolando los valores obtenidos.

	1	2	3	4	5	6	7	8
Tampon	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml

Agua	200	200m*l	200m*l	200m*l	200m*l	200m*l	200m*l	200m*l
NAD	200m*l	200m*l	200m*l	200m*l	200m*l	200m*l	200m*l	200m*l
Pat.1	–	–	–	–	–	–	–	–
Pat.2	–	5m*l	–	–	–	–	–	–
Pat.3	–	–	5m*l	–	–	–	–	–
Pat.4	–	–	–	5m*l	–	–	–	–
Pat.5	–	–	–	–	5m*l	–	–	–
Pat.6	–	–	–	–	–	5m*l	–	–
M 1/20	–	–	–	–	–	–	5m*l	–
M 1/40	–	–	–	–	–	–	–	5m*l
Añadimos 2 m*l de enzima alcohol deshidrogenasa								
Agitamos suavemente								
Incubar a 25°C durante 70 min								
Medimos la absorbancia a 340nm								

La tabla correspondiente a las absorbancias de los patrones y muestras son:

	Abs 340nm	Abs – blanco (Y)	Concentracion	Conc Tubo
1	–0.107			
2	0.554	0.661	100	0.3405
3	0.509	0.616	50	0.1702
4	–0.046	0.061	25	0.0851
5	–0.073	0.034	12	0.0425
6	–0.048	0.059	6	0.0212
7	0.725	0.832	1/20	
8	0.513	0.620	1/40	

La recta de ajuste es: $Y = a + bX$

Donde Y es la absorbancia y X es la Concentración. Como sabemos las absorbancias de las muestras, calculamos las concentraciones.

Para la muestra 1 tenemos:

Para la muestra 2 tenemos:

Este es el procedimiento a realizar para el calculo de etanol en la muestra de vino. Siendo el V1 y V2 el % en volumen.

PRÁCTICA 5:

AMILASA DE HARINA DE TRIGO: EXTRACCIÓN, VALORACIÓN Y ESTUDIO CINÉTICO.

OBJETIVO:

Determinar las condiciones óptimas y los parámetros cinéticos de un enzima.

Para valorar la actividad enzimática se utiliza el ácido 3,5–dinitrosalicílico que se reduce a ácido nitroaminosalicílico en presencia de maltosa, y adquiere un color rojo. Mediante la intensidad del color se puede calcular la velocidad de reacción.

Esta práctica se divide en dos partes:

1.– Determinación de la concentración de proteínas en los extractos.

Se pesan 2 g. de harina y después de añadir 20 ml. de tampón se realiza la extracción a temperatura ambiente. Se centrifuga a 3000 rpm durante 5 min. y se recoge el sobrenadante.

La concentración del enzima en el extracto será proporcional a la concentración de proteínas totales las cuales se usan como base de referencia al hacer diluciones del extracto.

Las proteínas se determinan por el método de Biuret.

TUBO	P2	P4	P8	H1	H2	B
BSA(10 mg/ml)	0.2	0.4	0.8	–	–	–
Extracto de harina	–	–	–	1	2	–
Agua destilada	1.8	1.6	1.2	1	–	2
Reactivo de Biuret	4	4	4	4	4	4

Se mide con el fotocolorímetro la absorbancia de cada tubo y lo representamos

frente a su contenido en proteínas. Por interpolación calculamos el contenido de proteínas de los tubos H1 y H2.

	Mg BSA	Absorbancia (540 nm)	Absorbancia (540 nm)
PATRÓN 1	1.2	0.117	0.092
PATRÓN 2	2.4	0.222	0.197
PATRÓN 3	4.8	0.39	0.365
MUESTRA 1	1.2	0.128	0.103
MUESTRA 2	1.7	0.186	0.161
BLANCO			0.025

La ecuación de la recta patrón es:

$$Y = 0.075 X - 0.017 \quad r = 0.998$$

El resultado medio es: 1.45 mg/ml.

2.– Estudio de la velocidad de la reacción en función de la concentración de sustrato. Determinar la velocidad máxima.

Es necesario realizar la práctica siguiendo la siguiente tabla:

- Ensayo de actividad.

1	2	3	4	5	B1	B2	B3	B4
---	---	---	---	---	----	----	----	----