



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CIUDAD JUÁREZ

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

MANUAL DE PRÁCTICAS DEL LABORATORIO DE ENZIMOLOGÍA

Revisión 2026-B · Documento Académico Oficial

Revisado y actualizado por:

M.C. Carlos Montejo Dávila

Basado en el manual original de:

Dr. Ángel Gabriel Díaz Sánchez

Revisión histórica (2025): M.C. Priscilla E. Morales Cervantes, M.C. Álvaro Torres Durán, M.C. Edith
Enríquez Gallosa

Ciudad Juárez, Chihuahua, México — 2026

CRÉDITOS ACADÉMICOS Y REVISIÓN INSTITUCIONAL

Universidad Autónoma de Ciudad Juárez

Instituto de Ciencias Biomédicas · Departamento de Ciencias Químico-Biológicas

Programa: Licenciatura en Biotecnología

Asignatura: Laboratorio de Enzimología

Autor del manual original: Dr. Ángel Gabriel Díaz Sánchez

Revisión docente previa (2025): M.C. Priscilla Elizabeth Morales Cervantes, M.C. Álvaro Torres Durán, M.C. Edith Enríquez Gallosa

Revisión, reestructuración y adecuación técnica (2026-B): M.C. Carlos Montejo Dávila

Este documento constituye la versión definitiva corregida y validada para su uso en las sesiones prácticas del laboratorio de Enzimología. Queda prohibida su reproducción parcial o total no autorizada fuera del ámbito académico de la UACJ.

Nota de Bioseguridad Institucional:

El trabajo en el laboratorio de Enzimología se rige bajo el Reglamento General de Laboratorios del ICB y las normas de bioseguridad RPBI (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002). La asistencia a las prácticas requiere el uso obligatorio de bata blanca, lentes de seguridad y bitácora de trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

Práctica 1. Introducción al laboratorio de enzimología.....	3
Práctica 2. Extracción de enzimas de diversas fuentes.....	6
Práctica 3. Factores que afectan la actividad de una enzima.....	9
Práctica 4. Determinación de la velocidad inicial.....	13
Práctica 5. Efecto de la temperatura sobre la velocidad.....	17
Práctica 6. Efecto del pH sobre la velocidad.....	20
Práctica 7. Parámetros cinéticos de una reacción catalizada.....	23
Práctica 8. Estudio de inhibición enzimática.....	26
Práctica 9. Cooperatividad en cinética de saturación.....	30
Práctica 10 y 11. Purificación de una enzima (dos sesiones).....	32
Práctica 12. Sobreexpresión de una enzima recombinante.....	35
Práctica 13. Cromatografía de proteínas.....	38
Práctica 14. Encapsulamiento o inmovilización de una enzima.....	42
Práctica 15. Sensor de concentración de un metabolito.....	44
Práctica 16. Cristalización de una enzima.....	47
Referencias consultadas y Recursos del Interactoma Modular.....	49

Práctica 1. Introducción al laboratorio de enzimología

Propósitos

- Aprender las reglas y dinámica del laboratorio de enzimología
- Aprender a registrar y procesar datos típicos del laboratorio
- Aprender a representar resultados gráficamente y ajustar a modelos matemáticos

Introducción

El laboratorio de enzimología no solo es un espacio para desarrollar conceptos de manera práctica y desarrollar destrezas técnicas, es también un espacio para reforzar competencias de seguridad e higiene y buenas prácticas de laboratorio, tanto en la manera de analizar, presentar y discutir los resultados, en donde se requieren habilidades matemáticas y analíticas.

Requerimientos por equipo

Materiales (por alumno): calculadora científica, bitácora de laboratorio (cuaderno italiano o francés cosido), rotulador de punta fina, acceso a computadora con Excel y software de análisis de datos, paquete de etiquetas, bata, guantes de látex o nitrilo, lentes de seguridad, cubrebocas, toallas desinfectantes, frasco con etanol al 70 %.

Actividad 1. Revisión del reglamento de seguridad e higiene

1. Leer y seguir el reglamento de seguridad e higiene vigente de los laboratorios de la UACJ (disponible en el portal institucional y en la plataforma del curso).
2. Revisar las buenas prácticas de laboratorio de la OCDE.

Actividad 2. Reglas y dinámica del laboratorio

1. El maestro presentará el contenido de prácticas del manual.
2. Presentación de la forma de trabajo: partes en equipo, individual, responsabilidades y manera de calificar.
3. Evaluación por práctica: trabajo técnico, resultados, reportes, bitácoras y/o exámenes o cuestionarios.
4. Calificación aprobatoria por práctica: asistir, realizar la práctica, presentar y acreditar la evaluación.

Actividad 3. Registro de resultados en bitácoras

1. Registrar los resultados de cada práctica en la bitácora designada.
2. Llenado conforme a estándares ISO-9001 cuando sea posible.
3. Seguir las instrucciones del maestro respecto a bitácora, reportes y exámenes.

Actividad 4. Tipo de análisis y ejemplo de datos del laboratorio

1. Ejemplo de unión de ligando a sitio activo (enzima DapE): se varía la concentración de ligando (X) y se mide la intensidad de fluorescencia (IF) (Y).
2. Tres repeticiones independientes (r1, r2, r3) para calcular media, desviación y error estándar.
3. Graficar dispersión X-Y del promedio de IF contra concentración.
4. Ajustar a la ecuación de saturación:

► **REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:**

$$DIF = (B_{max} \cdot [L]) / (K_d + [L])$$

Donde DIF = cambio de fluorescencia, B_{max} = cambio máximo, K_d = constante de disociación, [L] = concentración del ligando.

5. Proponer un método de análisis por ajuste a ecuación y explicar el significado de los parámetros.

Práctica 2. Extracción de enzimas de diversas fuentes

Propósitos

- Aprender un método general de extracción de enzimas de diferentes fuentes
- Aprender una estrategia para identificar la actividad de diversas enzimas

Introducción

Las enzimas son biomacromoléculas universales. Es esencial contar con métodos generales para extraerlas de diversas matrices biológicas y desarrollar habilidades para detectar su actividad con métodos sencillos. Las enzimas son sensibles a condiciones alejadas de las estándar y tienen vida media celular corta; se espera poca actividad en muestras almacenadas por tiempo prolongado y alta en muestras frescas.

Qué se estudia (didáctica)

Las enzimas que buscaremos y cómo las detectamos:

Actividad	Enzima	Fuente principal	Cómo se detecta
Amilasa	α -amilasa	Papa, espinaca, manzana, levadura	Yodo-Lugol: si el almidón se degradó, no se forma el complejo azul-negro → menos color = más actividad
Invertasa	β -fructofuranosidasa	Levadura (Tradipan)	DNS: la hidrólisis de sacarosa libera azúcares reductores → color rojo a 540 nm
Catalasa	Catalasa	Todas (muy abundante en papa y levadura)	Agua oxigenada: la catalasa la descompone en agua + O_2 → burbujas visibles

Cómo funcionan los reactivos:

- **Yodo-Lugol:** el yodo forma un complejo azul-negro con el almidón intacto. Si la amilasa rompió el almidón, el complejo no se forma y el color es más claro. *Menos color = más degradación de almidón = más actividad amilasa.*
- **DNS (ácido dinitrosalicílico):** reacciona con los azúcares reductores (glucosa/fructosa liberadas de la sacarosa) en caliente, produciendo un color rojo/naranja medible a 540 nm. *Más color = más azúcares reductores = más actividad invertasa.*

- **Agua oxigenada (H₂O₂ 6 %):** la catalasa la descompone en agua y oxígeno gaseoso.
Más burbujas = más actividad catalasa.

Resultados esperados por fuente:

Fuente	Amilasa	Invertasa	Catalasa
Papa	Alta	Baja	Alta
Espinaca	Media	Baja	Media
Manzana	Media	Baja	Media
Levadura (Tradipan)	Baja	Alta	Media/alta

◆ NOTA ACADÉMICA

La levadura es la mejor fuente de invertasa (la usa para aprovechar la sacarosa). La papa destaca en amilasa y catalasa. La señal de cada muestra debe compararse contra su **control** (sin extracto).

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
1	Piseta con agua	20 mL	PBS 1x
1	Centrífuga clínica	20 mL	Reactivo Yodo-Lugol
1	Balanza granataria	20 mL	Reactivo de DNS
1	Mortero y pistilo	20 mL	Suspensión de almidón al 2 % (p/V)
8	Tubos de centrifuga de 15 mL con tapa	20 mL	Solución de sacarosa al 2 % (p/V)
8	Pipetas Pasteur de plástico	10 mL	Invertasa 10 mg/L
1	Pipeta de 10 mL	250 mL	Peróxido de hidrógeno al 6 % (conseguir en farmacia; una botella basta para todo el grupo)
1	Micropipeta de 1 mL con puntas	1	Botella de etanol al 70 %

#	Material	#	Reactivo
1	Baño maría a ebullición		
1	Licadora		

Por alumno / para todo el grupo

#	Material
1	Manejo de espinacas
1	Papa cruda
1	Manzana
1	Sobre de levadura Tradipan®
1	Bolsa de hielo (para todo el grupo)
c/n	Toallas húmedas para desinfectar superficies
1	Bata, lentes de seguridad y dos pares de guantes
1	Marcador de punta fina y cinta de masking tape

Procedimiento

Actividad 1. Extracción de enzimas

- 1. Fuentes:** espinaca, papa, manzana y levadura.
- 2. Proporción:** 10 mL de PBS 1x por 5 g de muestra.
- 3.** Pelar la manzana y la papa antes de pesar; picar manzana, papa y espinacas en piezas pequeñas.
- 4.** Colocarlas en el mortero y agregar de poco en poco el PBS 1x, macerando con fuerza, con cuidado de no derramar.
- 5. Levadura:** tibia el PBS a ~37 °C; disolver la levadura y agregar unas pizcas de azúcar para activarla.
- 6.** Vaciar el macerado en tubos de centrifuga.
- 7.** Centrifugar a 3500 rpm por **10 minutos**.
- 8.** Recuperar el sobrenadante (mínimo 10 mL) en un tubo limpio y rotulado con la muestra correspondiente; reservar en hielo.

Actividad 2. Detección de actividad de amilasa (Yodo-Lugol)

1. Preparar una serie de 5 tubos según la tabla:

Tubo	Rótulo	Extracto	Almidón 2 %	PBS 1x
1	Control	—	1.25 mL	1.25 mL
2	Papa	1.25 mL	1.25 mL	—
3	Espinaca	1.25 mL	1.25 mL	—
4	Manzana	1.25 mL	1.25 mL	—
5	Levadura	1.25 mL	1.25 mL	—

2. Mezclar e incubar **10 minutos a 37 °C**.

3. Agregar **3 gotas de Yodo-Lugol** a cada tubo.

4. Observar y registrar los cambios: *menos color azul-negro = más almidón degradado = más actividad amilasa*. El tubo control (sin extracto) debe conservar el color azul intenso.

Actividad 3. Detección de actividad de invertasa (DNS)

1. Preparar una serie de 5 tubos según la tabla:

Tubo	Rótulo	Extracto	Sacarosa 2 %	Agua destilada
1	Control	—	1.0 mL	1.0 mL
2	Papa	1.0 mL	1.0 mL	—
3	Espinaca	1.0 mL	1.0 mL	—
4	Manzana	1.0 mL	1.0 mL	—
5	Levadura	1.0 mL	1.0 mL	—

2. Mezclar e incubar **10 minutos a 37 °C**.

3. Agregar **1 mL de DNS** a cada tubo; mezclar.

4. Incubar **1 a 3 minutos a 100 °C** (baño maría a ebullición), según qué tan rápido cambie de color.

5. Dejar enfriar y leer a **540 nm**, calibrando a cero con el **tubo control** (tubo 1: sin extracto).

6. Observar y comparar las absorbancias.

7. El incremento en la absorbancia o la intensidad del color rojo indica **actividad de invertasa**.

8. Si el color está muy saturado (absorbancia fuera de escala), **diluir la muestra** antes de leer y considerar el factor de dilución.

Actividad 4. Detección de actividad de catalasa

1. Preparar 4 tubos con **5.0 mL de agua oxigenada al 6 %**.
2. Agregar **1.0 mL de extracto** de cada muestra (papa, espinaca, manzana, levadura).
3. Agitar levemente y observar la aparición de **burbujas** por un periodo de 5 minutos.
4. Registrar los tiempos de inicio y fin (si es el caso) de la aparición de burbujas. *Más burbujas y más rápidas = más actividad catalasa.*

Práctica 3. Factores que afectan la actividad de una enzima

Propósitos

- Demostrar la naturaleza química de la mayoría de las enzimas
- Investigar la especificidad por el sustrato de una enzima
- Investigar el efecto de varias temperaturas en la actividad
- Investigar el efecto de la desnaturalización

Introducción

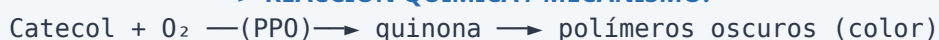
Las reacciones catalizadas por enzimas son sensibles a las condiciones del medio. Todo lo que afecte los choques efectivos, la energía de activación o la integridad de la enzima impacta la velocidad. En esta práctica se experimenta con el sustrato, inhibidores y condiciones desnaturalizantes. La actividad se observa por un cambio de color a rojo intenso (o a color oscuro, según el ensayo).

Qué se estudia (didáctica)

La enzima modelo: polifenol oxidasa (PPO) de la papa

La PPO es la enzima responsable de que la papa (y otras frutas/verduras) se **oscurezcan** al pelarlas o cortarlas. Al quedar expuesta al oxígeno, la PPO oxida compuestos fenólicos (como el **catecol**) formando pigmentos oscuros (melaninas):

► REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:



- **Más color oscuro = más actividad enzimática.**
- El **catecol** es el sustrato modelo que usamos para medir la actividad.
- Si algo **desnaturaliza, precipita o inhibe** la enzima → menos color.

¿Qué detecta cada tratamiento?

Tratamiento	Qué hace	Efecto esperado
Tripsina	Proteasa: degrada proteínas	Inactiva la PPO (demuestra que es proteína)
TCA 5 %	Precipita proteínas	Inactiva la PPO
Feniltiourea	Se une al cobre del sitio activo	Inactiva la PPO (bloquea el centro catalítico)

Tratamiento	Qué hace	Efecto esperado
Isopropanol / Acetona	Desnaturalizan (química)	Inactiva la PPO
Temperatura 70 °C	Desnaturaliza (térmica)	Inactiva la PPO
Hidroquinona / Fenol / Quercetina	Sustratos alternativos	Prueba de especificidad
Etanol	No es sustrato	Control negativo de especificidad (sin reacción)

◆ ASPECTO DIDÁCTICO / PROYECTO INTEGRADO

Alternativa a la feniltiourea: si no está disponible, puede usarse **citrato de sodio o ascorbato de sodio**. Son **agentes reductores** que compiten con el catecol por la oxidación, impidiendo la reacción y, por tanto, reduciendo la formación de color.

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
1	Piseta con agua	20 mL	Solución de catecol 0.01 M (recién preparada; debe ser amarillenta, si es roja no usar)
1	Centrífuga clínica	100 mL	Solución de NaF 0.1 M
1	Balanza granataria	20 mL	Solución de hidroquinona 0.01 M
1	Licuada	20 mL	Fenol 0.01 M (94 mg en 100 mL de agua). Altamente corrosivo
2	Tubos de centrífuga de 15 mL con tapa	20 mL	Ácido tricloroacético (TCA 5 %). Altamente corrosivo
8	Pipetas Pasteur de plástico	1 mL	Tripsina o pepsina al 5 % (p/V)
1	Pipeta de 10 mL	1 g	Feniltiourea (o cristales de citrato de sodio o ascorbato)

#	Material	#	Reactivo
1	Micropipeta de 1 mL con puntas	1 mL	Quercetina 0.01 M
1	Baño maría a 70 °C		
1	Baño maría a 37 °C		
16	Tubos de ensayo		
2	Gradillas para tubos		
2	Vasos de precipitado de 100 mL		
1	Tubo de centrifuga de 50 mL con tapa		

Por alumno / para todo el grupo

#	Material
1	Papa cruda (americana o similar)
1	Colador de cocina de poro pequeño
1	Navaja de bolsillo

Procedimiento

Actividad 1. Extracción de la polifenol oxidasa

1. Requerir una papa mediana-grande.
2. Pelar lo más rápido posible y cortar en cubos de 2-4 cm³.
3. Pesar la papa (se requieren al menos **20 g**).
4. Pasar a la licuadora la papa picada y agregar **NaF 0.1 M** en proporción de **50 mL por cada 100 g de muestra** (para 20 g: 10 mL).
5. Licuar a máxima velocidad por 1 minuto.
6. Colar el homogenizado con un cedazo de poro chico, transfiriendo a un vaso de precipitado.
7. Vaciar el filtrado a tubos de centrifuga de 15 mL y centrifugar a 3500 rpm por 5 minutos.

8. Recuperar el sobrenadante por decantación. Si presenta grumos, volver a centrifugar y recuperar nuevamente.

9. Reservar en hielo.

Actividad 2. Detección de la actividad oxidasa

1. Preparar una serie de 3 tubos según la tabla:

Tubo	Rótulo	Agua destilada	Catecol 0.01 M	Extracto
1	Control negativo	15 gotas	—	15 gotas
2	Sin enzima	15 gotas	15 gotas	—
3	Con enzima	—	15 gotas	15 gotas

2. Agitar rápidamente después de agregar el extracto.

3. Incubar a **37 °C por 25 minutos**, agitando en intervalos de 5 minutos.

4. El cambio a un **color oscuro** determina que hay actividad enzimática (tubo 3). El tubo 2 (sin enzima) y el tubo 1 (control) deben permanecer claros.

Actividad 3. Determinación de la naturaleza proteica de la polifenol oxidasa

1. Preparar una serie de 4 tubos según la tabla:

Tubo	Rótulo	Extracto	Agua destilada	Tratamiento
A	Control	15 gotas	15 gotas	—
B	Tripsina	15 gotas	—	15 gotas de tripsina
C	TCA 5 %	15 gotas	—	15 gotas de TCA
D	Feniltiourea	15 gotas	—	5 cristales

2. Mezclar e incubar **10 minutos a temperatura ambiente**.

3. Agregar a cada tubo **15 gotas de catecol 0.01 M** e incubar a 37 °C por 10 minutos.

4. Observar los cambios entre tubos: la **proteasa** (tripsina) degrada y produce la inactivación de enzimas de naturaleza proteica; el **TCA** precipita selectivamente las proteínas; la **feniltiourea** tiene alta afinidad por el cobre del sitio activo y lo inactiva. Si la enzima es una proteína, los tubos B, C y D presentarán **menos color** que el control A.

Actividad 4. Especificidad por el sustrato

1. Preparar una serie de 4 tubos según la tabla:

Tubo	Rótulo	Extracto	Sustrato/control
A	Hidroquinona	15 gotas	15 gotas de hidroquinona 0.01 M
B	Fenol	15 gotas	15 gotas de fenol 0.01 M
C	Quercetina	15 gotas	15 gotas de quercetina 0.01 M
D	Etanol (control)	15 gotas	15 gotas de etanol 0.01 M

2. Mezclar e incubar **10 minutos a 37 °C**.

3. Observar y registrar las diferencias. El **etanol (tubo D) es el control de especificidad**: al no ser sustrato de la PPO, no debe observarse reacción (esto confirma que el color de los otros tubos se debe a la oxidación enzimática del sustrato, no a un efecto inespecífico).

Actividad 5. Efecto de la desnaturalización de la enzima

Esta actividad combina **desnaturalización térmica** (temperatura) y **desnaturalización química** (solventes orgánicos).

1. Preparar una serie de 6 tubos según la tabla:

Tubo	Extracto	Catecol 0.01 M	Tratamiento
A	15 gotas	15 gotas	0 °C por 10 min
B	15 gotas	15 gotas	37 °C por 10 min
C	15 gotas	15 gotas	70 °C por 10 min
D	15 gotas	15 gotas	Isopropanol (T amb, 10 min)
E	15 gotas	15 gotas	Acetona (T amb, 10 min)
F	15 gotas	—	Agua destilada (T amb, 10 min)

2. Mezclar e incubar a los tiempos y temperaturas indicados.

3. Observar y registrar los cambios.

4. Medir las absorbancias de los tratamientos a **420 nm**, ajustando a cero con el **tubo F**.
5. Discutir los resultados, resaltando las explicaciones de los mecanismos de cómo los diferentes tratamientos afectan la actividad de la enzima (desnaturalización térmica por calor, desnaturalización química por solventes, y el control de referencia).

Práctica 4. Determinación de la velocidad inicial

Propósitos

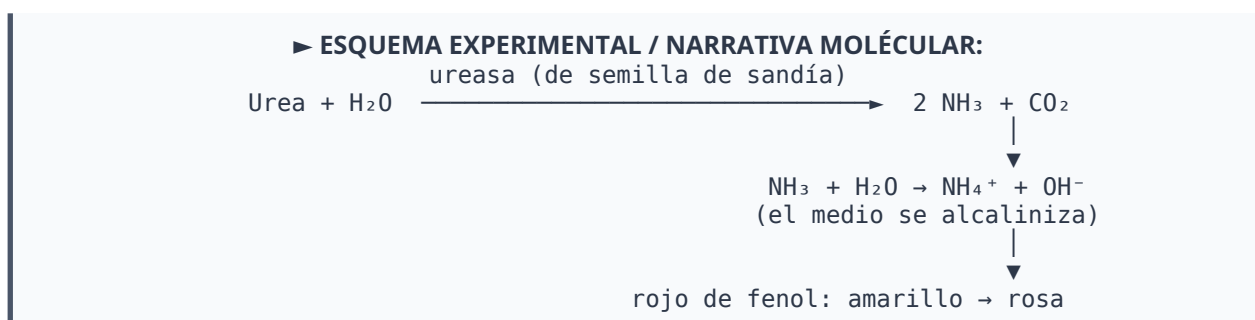
- Aprender a monitorear el curso temporal de una reacción enzimática
- Aprender una estrategia para determinar la velocidad inicial
- Aprender a expresar la actividad en unidades internacionales y actividad específica

Introducción

Las técnicas espectroscópicas permiten monitorear continuamente la reacción y obtener un curso temporal para determinar la velocidad inicial, que sirve para calcular la actividad específica (velocidad inicial en mM/s entre concentración de enzima en mg/mL). La ureasa es un buen modelo con indicador de pH rojo de fenol.

Qué se estudia (didáctica)

El proceso enzimático que estudiaremos:



¿Por qué se mide a 560 nm?

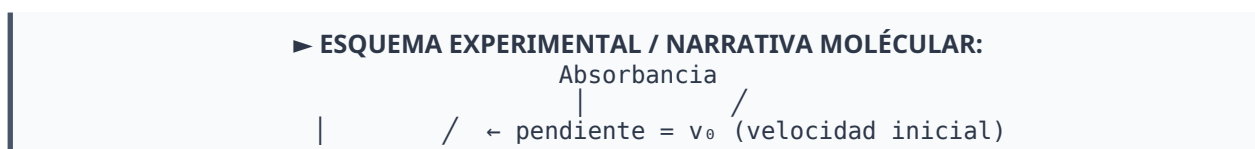
El **rojo de fenol** es un indicador de pH con dos formas de color:

- **Amarillo** a pH neutro/ácido (donde inicia la reacción).
- **Rosa/magenta** a pH básico (cuando se acumula OH^- por la producción de NH_3).

A **560 nm** la absorbancia cambia conforme el color pasa de amarillo a rosa: **más OH^- → más rosa → mayor absorbancia a 560 nm**. El cambio de absorbancia con el tiempo nos "cuenta" cuánta urea se está hidrolizando.

¿Qué es la velocidad inicial (v_0)?

La velocidad inicial es la **pendiente de la parte lineal** del curso temporal (absorbancia vs. tiempo):





◆ ASPECTO DIDÁCTICO / PROYECTO INTEGRADO

¿Por qué la velocidad inicial y no la "media"? Al inicio de la reacción hay mucho sustrato y la velocidad es constante (zona lineal). Conforme pasa el tiempo, el sustrato se agota y la velocidad cae (la curva se aplana). La parte lineal inicial es la que refleja la capacidad real de la enzima.

Cómo calcular v_0 en Excel:

◆ ESTRATEGIA PEDAGÓGICA Y DIAGNÓSTICO DE DATOS (EL JURADO DE DATOS Y EL GANCHITO)

1. Análisis del Curso Temporal y Cálculo Correcto de la Velocidad Inicial (v_0): Para cada celdilla, los alumnos deben graficar Absorbancia vs Tiempo. Identifiquen la fase lineal inicial (típicamente entre los 10 s y 40 s).

- Fórmula de cálculo manual:

$$v_0 = (\text{Absorbancia a los 40 s} - \text{Absorbancia a los 10 s}) / (40 \text{ s} - 10 \text{ s}) = (\text{Abs}_{40\text{s}} - \text{Abs}_{10\text{s}}) / 30 \text{ s}$$

- Uso en Excel: Apliquen la función =PENDIENTE(rango_Abs; rango_Tiempo) sobre el rango continuo de 10 s a 40 s.

⚠ Error común a evitar: NO resten solo 10 segundos (ej. $\text{Abs}_{20\text{s}} - \text{Abs}_{10\text{s}}$ dividiendo entre 10 s). Restar únicamente dos puntos contiguos amplifica enormemente el ruido del espectrofotómetro. Usar la pendiente sobre 30 a 40 segundos estabiliza el cálculo.

2. El "Jurado de Datos": Filtrar y Eliminar Celdillas Saturadas: Al graficar v_0 vs $[S]$ (curva preliminar de Michaelis-Menten), los alumnos deben actuar como un "jurado crítico de sus propios datos". A concentraciones elevadas de sustrato ($[S] > 4 \text{ mM}$), la enzima se satura o sufre inhibición por sustrato/indicador, haciendo que la velocidad deje de subir o incluso caiga. Para calcular los parámetros cinéticos (V_{max} y K_m), es obligatorio ELIMINAR esas celdillas saturadas y realizar la regresión lineal utilizando ÚNICAMENTE los puntos donde la velocidad fue creciendo de manera proporcional.

3. Diagnóstico del Fenómeno del "Ganchito" o Forma en U (Hook Effect): Si los alumnos no eliminan los puntos saturados e incluyen todas las celdillas en las

transformaciones lineales (Lineweaver-Burk o Hanes-Woolf), observarán un comportamiento anómalo: la gráfica se deformará en uno de sus extremos adquiriendo una forma de "U" o "ganchito" (Hook Effect). Esta deformación destruye el ajuste lineal, arrojando un R^2 pésimo e incluso valores negativos o incoherentes de $V_{\max}$ y K_m . Si aparece el ganchito, es el indicador definitivo de que NO han eliminado los puntos saturados. Al eliminarlos, el ganchito desaparece y la recta recupera su linealidad perfecta ($R^2 \approx 0.98$).

4. ¿Por qué Hanes-Woolf ($[S]/v_0$ vs $[S]$) es la transformación ideal? Aunque Lineweaver-Burk ($1/v_0$ vs $1/[S]$) es muy conocido, tiene el defecto estadístico de invertir las concentraciones, amontonando y magnificando los errores a bajas concentraciones. Hanes-Woolf soluciona esto de forma impecable al mantener a $[S]$ directamente en el eje X. Esto distribuye los puntos de manera uniforme a lo largo de la recta y proporciona estimaciones de $V_{\max}$ y K_m mucho más precisas e ideales para reportes de laboratorio.

1. Colocar en la columna A los **tiempos** (0, 30, 60, 90... s) y en la columna B las **absorbancias** de cada celdilla.
2. Seleccionar los datos y crear un **gráfico de dispersión** (X = tiempo, Y = absorbancia).
3. Identificar la **zona lineal** de la curva (los primeros puntos, antes de que se aplane).
4. Usar =PENDIENTE(rango_Y; rango_X) para obtener la pendiente = v_0 .

► **REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:**

=PENDIENTE(B2:B6; A2:A6) → v_0 de esa celdilla

5. Repetir para cada concentración de urea y graficar **v_0 vs. [Urea]** para observar la saturación.

◆ **RECURSO DIGITAL / INTERACTOMA MODULAR**

Material de apoyo: en **Interactoma Modular** (interactomamodular.com) hay simuladores e infografías de cinética enzimática para contrastar tus datos de Excel con los modelos teóricos (Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk). Ver la **guía interactiva de $V_{\max}$ y K_m** : <https://interactomamodular.com/assets/guias/cinetica-vmax-km.html>, y el simulador en *Laboratorio Digital*.

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
1	Piseta con agua	100 mL	Urea 0.2 M (recién preparada; probar: 1 mL urea + 1 mL medio debe dar amarillo; rosa = hidrolizada, no sirve)
5	Tubos de ensayo	100 mL	Medio de reacción: rojo de fenol 0.032 mM, pH 6.8, en bicarbonato de sodio 0.001 %
4	Pipetas de 10 mL	1 mL	Estándar de ovoalbúmina 250 µg/mL
4	Pipetas de 1 mL	10 mL	Reactivo de Bradford 1x
1	Caja de celdas para espectro de 1.5 y 3 mL		
1	Vaso de precipitado de 50 mL		
2	Tubos de centrifuga de 15 mL		
1	Balanza granataria		
1	Vortex		
1	Centrífuga clínica		
1	Juego de tres micropipetas (10, 200 y 1000 µL) y puntas		
1	Hielera pequeña de unicef		

Por alumno / para todo el grupo

#	Material
2 g	Semillas de sandía (solo si no hay en el área de bioquímica)

#	Material
1	Bolsa de hielo
c/n	Etiquetas de rotulación o masking tape

Procedimiento

Actividad 1. Extracción de la ureasa de semilla de sandía

1. Usar semillas de sandía frescas; dejarlas secar y triturar.
2. Pesar 0.5 g (semillas frescas) o 1.0 g (semillas secas/almacenadas previamente en el laboratorio) y agregarlos a 13 mL de agua destilada.
- > 💡 Nota pedagógica sobre la masa de tejido: Extraer 2 g de semilla genera una concentración excesiva de ureasa ("muchísima enzima") que cataliza la reacción a gran velocidad y satura prematuramente la absorbancia en menos de 30 segundos. Reducir la masa a 0.5 g (semilla fresca) o 1.0 g (semilla almacenada) optimiza la actividad enzimática para mantener la reacción en el rango lineal detectable.
3. Homogenizar bien y trasvasar a tubos de centrifugación.
4. Centrifugar 5 minutos a 5000 rpm.
5. Recuperar el sobrenadante, rotular como **ureasa** y reservar en hielo.

Actividad 1.1. Cuantificación de proteína por Bradford

1. Preparar una serie de celdillas con **5 puntos de dilución** tanto para el estándar de albúmina como para el extracto de ureasa, para poder hacer una comparativa:

Celdilla	Estándar de albúmina 250 µg/mL	Muestra (µL)	Agua destilada (µL)	% de dilución
1 (blanco)	0	0	1000	—
2	200	0	800	100 % del estándar
3	160	0	840	80 %
4	120	0	880	60 %
5	80	0	920	40 %
6	40	0	960	20 %
7	—	200	800	Extracto al 100 %

Celdilla	Estándar de albúmina 250 $\mu\text{g/mL}$	Muestra (μL)	Agua destilada (μL)	% de dilución
8	—	160	840	Extracto al 80 %
9	—	120	880	Extracto al 60 %
10	—	80	920	Extracto al 40 %
11	—	40	960	Extracto al 20 %

◆ NOTA ACADÉMICA

Nota: los volúmenes de estándar/muestra se ajustan para mantener el volumen total en 1 mL (1000 μL) al agregar agua. Los 5 puntos del estándar permiten construir la **curva patrón**; los 5 del extracto sirven para interpolar su concentración de proteína y calcular la actividad específica.

2. Agregar **1 mL de reactivo de Bradford 1x** a cada celdilla.
3. Mezclar por resuspensión e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Medir las absorbancias a **595 nm**, calibrando a cero con la celdilla 1 (blanco).
5. Construir la curva estándar (absorbancia vs. μg de albúmina) e interpolar la concentración de proteína del extracto.

Actividad 2. Monitoreo de una reacción en presencia y en ausencia de la enzima

1. Preparar 2 celdillas según la tabla (la celdilla sin enzima es el blanco):
- > ⚠ Nota crítica sobre el medio de reacción (Rojo de Fenol): El medio preparado con rojo de fenol debe observarse de color amarillo claro (pH neutro/ligeramente ácido, $\text{pH} \approx 6.8$). Si el medio presenta una coloración rojiza o rosada antes de agregar la enzima, indica que el indicador está ligeramente alcalinizado o contaminado. Esto dificultará el monitoreo espectrofotométrico a 560 nm debido a una absorbancia basal elevada y un rango dinámico reducido. En tal caso, ajustar el pH con una gota diluida de ácido fino hasta virar a amarillo o preparar medio fresco.

Condición	Urea 0.2 M (mL)	Agua destilada (mL)	Medio de reacción (mL)	Iniciador
Sin enzima (blanco)	0.100	0.800	1.0	0.1 mL de agua desionizada

Condición	Urea 0.2 M (mL)	Agua destilada (mL)	Medio de reacción (mL)	Iniciador
Con enzima	0.100	0.800	1.0	0.1 mL de extracto de enzima

2. La reacción inicia al agregar la enzima o el agua. Calibrar a cero a **560 nm** con la celdilla blanco.

3. Agregar la enzima, resuspender rápidamente y medir la absorbancia cada 10 segundos por 2 minutos (lecturas a los 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 y 120 s).

4. Graficar el cambio de absorbancia vs. tiempo; calcular las velocidades (v_0) y analizar las diferencias.

5. Regraficar las velocidades en columnas para comparar.

Actividad 3. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad

1. Preparar una serie de **9 celdillas** según la tabla. La columna final muestra la concentración de urea resultante (madre 200 mM, volumen total de reacción 1.0 mL):

Celdilla	Urea 200 mM (μ L)	Agua destilada (μ L)	Medio de reacción (μ L)	[Urea] final (mM)
1	0	450	500	0
2	2.5	447.5	500	0.5
3	5	445	500	1.0
4	10	440	500	2.0
5	20	430	500	4.0
6	40	410	500	8.0
7	50	400	500	10.0
8	75	375	500	15.0
9	100	350	500	20.0

2. La reacción inicia con la adición de **50 μ L de extracto de enzima** (volumen distinto al de la Actividad 2, porque aquí se miden 9 celdillas y se optimiza el ensayo). Pipetear

justo en la celdilla dentro del espectrofotómetro, previamente ajustado a cero con la celdilla 1 a 560 nm.

3. Resuspender rápidamente y medir la absorbancia cada 10 segundos por 2 minutos (registrando lecturas a los 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 y 120 s).

4. Graficar el cambio de absorbancia vs. tiempo y calcular la velocidad inicial (v_0) mediante la función =PENDIENTE en Excel sobre los puntos iniciales lineales.

5. Regraficar las velocidades frente a la concentración de sustrato y realizar el análisis gráfico para calcular los parámetros cinéticos (K_m , V_{max}).

Actividad 4. Discusión

1. Proponer un experimento para conocer el coeficiente de extinción molar del producto.
2. Comparar la velocidad de la reacción en ausencia y presencia de enzima.
3. Comparar la diferencia de las velocidades en función del grado de saturación de la enzima.
4. Calcular por métodos de ajuste lineal y no lineal los parámetros cinéticos de la reacción.

Práctica 5. Efecto de la temperatura sobre la velocidad

◆ NOTA ACADÉMICA

Reporte conjunto con la Práctica 6: la Práctica 5 (temperatura) y la Práctica 6 (pH) usan la **misma enzima de papa y el mismo ensayo** (PNPP → 405 nm), variando solo la condición. Pueden **repartirse por mesa** (una mesa mide la serie de temperatura y otra la de pH) y **entregarse en un solo reporte** que compare ambas variables sobre la misma enzima.

Propósitos

- Establecer la relación entre temperatura y velocidad de una reacción catalizada
- Aprender una metodología para determinar la temperatura óptima
- Aprender a determinar la energía de activación

Introducción

La temperatura altera la actividad catalítica mediante tres fenómenos: (1) altera la velocidad promedio de las moléculas (más choques efectivos), (2) aumenta la constante de velocidad, (3) afecta la flexibilidad y estabilidad de la enzima. Cada enzima tiene un perfil característico frente a la temperatura. La **fosfatasa ácida de papa** (una enzima vegetal) es una buena fuente por su disponibilidad y consistencia; su actividad se detecta con el sustrato análogo para-nitrofenil fosfato (PNPP), que al hidrolizarse genera color amarillo.

Qué se estudia (didáctica)

La enzima y el ensayo:

◆ ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y ECOLÓGICOS: ¿POR QUÉ PAPA Y PNPP?

1. ¿Por qué se utiliza PNPP en ambas prácticas? El p-nitrofenil fosfato (PNPP) es un sustrato análogo cromogénico. En la naturaleza, la enzima actúa sobre monoésteres de fosfato (como el fitato o azúcares fosfatados). Medir la liberación de fosfato inorgánico libre (Pi) requeriría reacciones complejas e interferentes. El PNPP soluciona esto de forma elegante: al ser hidrolizado por la fosfatasa, libera p-nitrofenol (pNP). Al agregar KOH al final del ensayo (pH > 12), el pNP se ioniza instantáneamente a p-nitrofenolato, un anión de color amarillo intenso que absorbe fuertemente a 405 nm. La intensidad del color amarillo es directamente proporcional a la actividad enzimática.

2. ¿Por qué la fosfatasa ácida funciona en un rango ligeramente ácido? Fisiológica y ecológicamente, las plantas como la papa (*Solanum tuberosum*) operan en dos frentes ácidos:

- Compartimento vacuolar: La enzima reside en la vacuola celular, cuyo lumen se mantiene ácido (pH 4.5–5.5) gracias a las bombas H^+ -ATPasa.
- Rizosfera y suelo orgánico: La papa secreta fosfatasa ácida hacia el suelo circundante. En suelos orgánicos o fuertemente ácidos, el fósforo se encuentra atrapado en complejos minerales inalcanzables. Acidificar el microambiente permite solubilizar el fosfato inorgánico (Pi) y recuperar este nutriente esencial para la planta.

3. ¿Por qué se obtiene de tubérculos en crecimiento y germinados? Durante el brote de la papa o la germinación de semillas, la planta experimenta una tasa de división y expansión celular masiva. El fósforo está almacenado principalmente en forma de fitato (ácido fítico). Para construir nuevo ADN, ARN, ATP y fosfolípidos de membrana en los brotes, la papa sobreexpresa dramáticamente la fosfatasa ácida para movilizar el fósforo de reserva y alimentar el desarrollo del organismo.

La fosfatasa ácida de papa es una enzima vegetal que, por lógica, funciona mejor en un rango de temperatura moderado. La papa es una fuente ideal: siempre está disponible, no requiere germinación previa, y es la misma enzima que se usa en las Prácticas 8 (inhibición) y 10-11 (purificación) de este manual — así verás la misma enzima en distintos contextos. Hidroliza el sustrato análogo PNPP (para-nitrofenil fosfato, incoloro) liberando para-nitrofenol, que en medio alcalino produce un color amarillo medible a 405 nm:

◆ FUNDAMENTACIÓN MOLECULAR Y ESTRUCTURAL (PDB ID: 1XZW)
¿Cómo explica la estructura tridimensional el efecto de la temperatura? Al analizar la estructura cristalina tridimensional de la fosfatasa ácida vegetal en el Protein Data Bank (PDB ID: 1XZW, accesible en <https://www.rcsb.org/structure/1XZW>), se observa que la cavidad del sitio activo depende de la geometría precisa de su centro bimetalico binuclear (Fe^{3+} - Mn^{2+}) y de la flexibilidad de los bucles proteicos formados por los residuos Asp55, His92, Asp137, Tyr140, Asn201, His276 e His278.

1. En frío (0–10 °C): Las moléculas poseen baja energía cinética. La constante de velocidad k de Arrhenius ($k = A \cdot e^{-E_a/RT}$) disminuye y los bucles del sitio activo en PDB: 1XZW se vuelven rígidos, reduciendo los choques efectivos por segundo y haciendo la velocidad catalítica prácticamente nula.
2. A temperatura óptima (37–50 °C): Se alcanza el equilibrio ideal entre la energía térmica de colisión y la flexibilidad de la cavidad activa. La geometría coordinada del centro Fe^{3+} - Mn^{2+} se mantiene intacta, maximizando los choques efectivos sobre el sustrato PNPP sin

alterar la estructura terciaria.

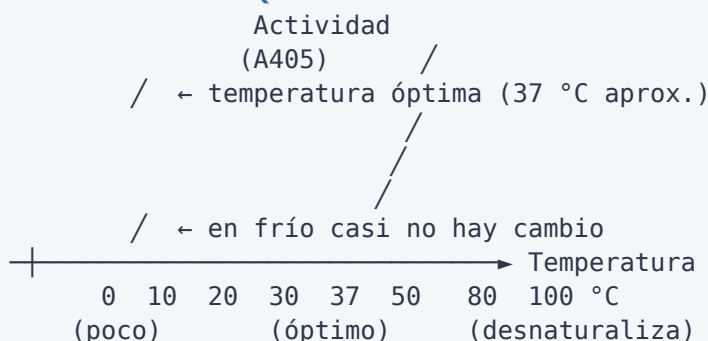
3. A temperaturas elevadas (65–100 °C - Desnaturalización térmica): La energía vibracional térmica supera la energía de los enlaces no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y puentes salinos) que sostienen el plegamiento tridimensional. La cavidad del sitio activo colapsa, perdiendo la coordinación de los iones Fe^{3+} - Mn^{2+} y destruyendo irreversiblemente la actividad enzimática.

► ESQUEMA EXPERIMENTAL / NARRATIVA MOLÉCULAR:



¿Qué esperar de la curva de temperatura?

► REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:



- **En frío (0-10 °C):** prácticamente **no se observa cambio** — las moléculas son lentas y la enzima casi no cataliza.
- **Temperatura óptima (~37 °C):** máxima actividad (choques efectivos máximos sin desnaturalizar la enzima).
- **Temperaturas altas (80-100 °C):** la catálisis que se observe ya no es "enzimática": a esas temperaturas la enzima se **desnaturaliza** y el poco cambio de color se debe más a un **fenómeno físico** que a la actividad de la enzima.

◆ NOTA ACADÉMICA

La idea es ver cómo, a temperaturas muy altas, la catálisis ocurre más por un fenómeno físico (desnaturalización) que por la enzima misma; y que en frío no se nota ningún cambio.

Nota operativa importante: los baños maría

Las temperaturas a usar dependen de los **baños maría disponibles y calibrados** en el laboratorio.

◆ NOTA ACADÉMICA

MUY IMPORTANTE: al inicio de la sesión, **verifiquen cuáles baños están calibrados y encendidos**. Usen solo los que ya están disponibles. **NO muevan, ni enciendan, ni re-calibren ningún baño maría** — eso lo hacen los técnicos académicos, y no deben tocarlos. Si falta alguna temperatura, **avisen a los técnicos**.

Cómo organizar el montaje según los baños disponibles:

Situación	Cómo proceder
Hay varios baños calibrados a distintas temperaturas	Usar el conjunto de temperaturas disponible (p. ej., 0, 10, 20, 37, 50, 80, 100 °C)
Falta alguna temperatura	Avisar a los técnicos; trabajar con las que haya y registrar cuáles se usaron
Solo hay 2-3 baños	Distribuir las series por equipos o rotar: cada equipo mide en una temperatura y se comparten los datos

◆ NOTA ACADÉMICA

En todos los casos, **registren las temperaturas reales** que usaron para poder graficar correctamente.

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
1	Piseta con agua	10 mL	PNPP 20 mM (fresco; si presenta color amarillo intenso, no usar)
16	Tubos de ensayo de tamaño estándar	10 mL	Amortiguador de acetatos 1 M, pH 5.7
2	Pipetas de 10 mL	10 mL	MgCl ₂ 100 mM
2	Pipetas de 1 mL	10 mL	KOH 500 mM

#	Material	#	Reactivo
1	Caja de celdas de 0.5 mL para espectro	200 mL	Amortiguador de acetato de sodio 30 mM, pH 6.0
3	Vasos de precipitado	10 mL	Agua destilada
2	Tubos de centrifuga de 15 mL		
1	Balanza granataria		
1	Vortex		
1	Centrífuga clínica		
1	Juego de micropipetas (200 y 1000 µL) y puntas		
3	Vasos de unicel de 1 L		
1	Cronómetro		
c/n	Baños maría (los que estén calibrados y disponibles)		

Por alumno / para todo el grupo

#	Material
1	Papa cruda (mediana-grande, para todo un grupo)
1	Colador de poro pequeño
1	Paquete de vasos de unicel
1	Paquete de sal (para el baño a 0 °C)
1	Bolsa de hielo

Procedimiento

Actividad 1. Extracción de la fosfatasa

1. Pesar **50 g de papa** pelada y cortada en cubos.
2. Homogenizar en 100 mL de amortiguador de acetato de sodio 30 mM, pH 6.0 (en licuadora o mortero).
3. Colar la mezcla con un colador de poro pequeño y colocar en tubos de centrifuga de 15 mL.
4. Centrifugar 10 minutos a 5000 rpm.
5. Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio, rotularlo como *extracto de fosfatasa* y colocarlo en hielo.

Actividad 2. Monitoreo de la reacción a diferentes temperaturas

💡 Nota didáctica sobre el volumen de enzima (100 μ L vs 500 μ L): En los ensayos cinéticos estándar de laboratorio, es una excelente práctica utilizar 0.1 mL (100 μ L) de extracto de fosfatasa ácida + 0.4 mL de agua destilada (en lugar de 0.5 mL puros de extracto). Esto proporciona tres ventajas clave:

1. Mantiene el volumen total de incubación en exactamente 2.0 mL (y 2.5 mL finales tras agregar KOH).
2. Evita la saturación prematura de la reacción y la turbidez basal aportada por el extracto crudo de papa.
3. Permite que el extracto rinda fácilmente para todas las mesas del grupo.

1. Preparar **una serie de 3 tubos por cada temperatura** a estudiar. Cada serie tiene el mismo montaje:

Tubo	Rótulo	Contenido	Función
Tubo 1	Blanco	Amortiguador de acetatos 1 M 0.5 mL + MgCl_2 0.5 mL + PNPP 0.5 mL + agua 0.5 mL	Blanco (sin enzima, sin extracto)
Tubo 2	Control sin enzima	Amortiguador de acetatos 1 M 0.5 mL + MgCl_2 0.5 mL + PNPP 0.5 mL + amortiguador 0.5 mL	Control (sin extracto)
Tubo 3	Con enzima	Amortiguador de acetatos 1 M 0.5 mL + MgCl_2 0.5 mL + PNPP 0.5 mL + extracto 0.5 mL	Muestra (con enzima)

2. Mezclar e incubar **5 minutos** cada serie a su temperatura correspondiente (usar los baños calibrados disponibles: 0, 10, 20, 30, 37, 50, 80, 100 °C, o los que haya).

3. **Agregar el extracto (tubo 3) en el momento de la medición**, no antes: si se agrega la proteína antes de tiempo, la reacción corre antes de lo que se quiere medir.

◆ ASPECTO DIDÁCTICO / PROYECTO INTEGRADO

Importante — cuándo agregar la enzima: el extracto de fosfatasa se agrega solo al iniciar el ensayo de cada serie (después de la pre-incubación de 5 min). No lo agreguen antes, o la reacción habrá corrido sin control.

4. Incubar nuevamente **5 minutos** a la temperatura correspondiente.

5. **Detener la reacción** agregando **0.5 mL de KOH 500 mM** a cada tubo y agitar. El KOH detiene la reacción (alcaliniza y desnaturaliza la enzima) y a la vez hace que el color amarillo del para-nitrofenol se vea bien.

6. Dejar atemperar los tubos y leer las absorbancias a **405 nm**, calibrando a cero con el **tubo 1** de cada serie (blanco).

◆ NOTA ACADÉMICA

Duda frecuente — ¿medimos toda la cinética o solo el inicio y el final? En esta práctica **solo se mide el inicio (t_0) y el final (5 min)** de cada serie. No se hace un curso temporal completo por cada temperatura: eso alargaría muchísimo la sesión. Con la diferencia de absorbancia en 5 minutos se obtiene la **velocidad relativa** a cada temperatura.

Actividad 3. Procesamiento de los resultados

1. Restar a la absorbancia observada de las muestras con enzima la de sus respectivos blancos (tubo 1).

2. Con el **coeficiente de extinción molar a 405 nm** y la diferencia de absorbancia, calcular la concentración de para-nitrofenóxido producido en las diferentes temperaturas.

3. Obtener las **velocidades relativas** de la reacción dividiendo el cambio de concentración entre 5 minutos.

4. Obtener un gráfico de dispersión de variables para evaluar la tendencia observada y determinar a qué temperatura se observa una mayor velocidad relativa (temperatura óptima).

Práctica 6. Efecto del pH sobre la velocidad

◆ NOTA ACADÉMICA — REPORTE CONJUNTO CON LA PRÁCTICA 5:

La Práctica 5 (temperatura) y la Práctica 6 (pH) utilizan la misma enzima vegetal (fosfatasa ácida de papa) y el mismo ensayo espectrofotométrico (hidrólisis de PNPP $\rightarrow$ 405 nm), evaluando una variable física/química a la vez. Pueden distribuirse entre mesas (una mesa mide la curva de temperatura y otra la serie de pH) y entregarse en un reporte integrado comparativo.

Propósitos

- Aprender un método analítico general y eficiente para estudiar el efecto del pH sobre la velocidad de una reacción catalizada por enzimas.
- Determinar el perfil cinético de actividad frente al pH e identificar el pH óptimo de la fosfatasa ácida de papa.
- Comprender la base molecular y electrostática de la catálisis ácido-base en el sitio activo enzimático.

Introducción

El pH del medio altera el estado de ionización de los residuos de aminoácidos críticos del sitio activo de las enzimas. Estos cambios afectan directamente la afinidad por el sustrato, la activación nucleofílica o electrofílica, la capacidad de transferencia de protones en la catálisis ácido-base y la estabilidad de la estructura terciaria mediante puentes salinos. Cada enzima posee un perfil característico frente al pH, y conocerlo es indispensable para comprender su fisiología y optimizar sus aplicaciones biotecnológicas.

◆ ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y METODOLÓGICOS:

¿Por qué fosfatasa ácida de papa y PNPP?

1. Enzima modelo: La fosfatasa ácida vegetal (EC 3.1.3.2) es abundante en tubérculos y semillas germinadas, donde se sobreexpresa para hidrolizar fitatos y liberar fosfato inorgánico durante el crecimiento celular.
2. Ensayo colorimétrico con PNPP: El p-nitrofenilfosfato (PNPP) es un sustrato sintético análogo incoloro. La fosfatasa hidroliza el enlace fosfoéster liberando p-nitrofenol. Al alcalinizar con KOH, el p-nitrofenol se desprotona formando el anión p-nitrofenóxido, que exhibe un color amarillo intenso medible a 405 nm.

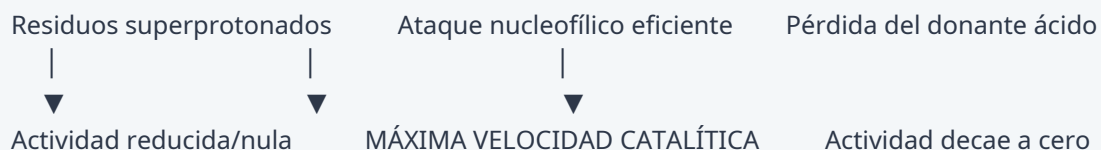
Qué se estudia (didáctica)

¿Por qué el pH afecta a una enzima?

Las enzimas poseen cadenas laterales de aminoácidos ionizables (Asp, Glu, His, Cys, Tyr, Lys, Arg) que deben encontrarse en un estado de protonación específico para llevar a cabo la catálisis. El pH del medio gobierna directamente este equilibrio:

► ESQUEMA EXPERIMENTAL / NARRATIVA MOLECULAR:

pH ácido (< 5.5)	pH óptimo (5.8 - 6.0)	pH alcalino (> 7.5)
Exceso de protones H^+	Ionización catalítica exacta	Desprotonación de residuos clave



Fundamentación molecular y estructural (PDB ID: 1XZW):

La estructura cristalográfica de la fosfatasa ácida vegetal (PDB ID: 1XZW) revela un centro binuclear Fe^{3+} - Mn^{2+} en el sitio activo, coordinado por residuos altamente conservados (Asp55, His92, Asp137, Tyr140, Asn201, His276 e His278):

- **1.** En rango ácido óptimo (pH 5.8 – 6.0): Se mantiene el nucleófilo coordinado (Fe^{3+} -OH⁻) listo para atacar el enlace fosfoéster del PNPP, mientras que la histidina catalítica (His276) permanece protonada como donante ácido general para estabilizar el grupo saliente (p-nitrofenol).
- **2.** Hacia pH neutro y alcalino (pH 6.8 – 9.0): Ocurre la desprotonación de la His276 catalítica (cuyo pKa se ubica en ~6.0–6.5). Al perder su protón, la enzima se vuelve incapaz de protonar el grupo saliente, reduciendo drásticamente la constante de recambio catalítico (kcat) prácticamente a cero.

◆ NOTA CRÍTICA DE LABORATORIO — CALIDAD DE SALES, AJUSTE Y DISEÑO EFICIENTE:

1. **¡SALES DEL BUFFER (NO USAR SAL DE MESA NI SALES TURBIAS)!:** Los amortiguadores de fosfato deben prepararse estrictamente con sales puras de fosfato monobásico (KH_2PO_4 , Bote Ámbar) y fosfato dibásico (K_2HPO_4 , Bote Blanco Hycl). Las soluciones resultantes deben ser 100% transparentes y límpidas. Si una solución se observa turbia, lechosa o con precipitados, significa que la sal está contaminada o se usó una sal insoluble incorrecta; NO DEBE UTILIZARSE.
2. **GUÍA TÉCNICA DE AJUSTE CON NaOH/HCl:** Al disolver las masas de sal en ~150 mL de agua, verificar el pH real con potenciómetro calibrado. Generalmente se requiere agregar unas pocas gotas de NaOH 1 N (o HCl 1 N si estuviera alto) bajo agitación constante para afinar el pH al valor exacto antes de aforar a 200 mL.
3. **SELECCIÓN DE 5 VALORES DE pH EN LA MESA:** Aunque la batería cuenta con 11 amortiguadores (pH 5.8 a 9.0), cada equipo seleccionará preferentemente 5 pH representativos (serie recomendada: pH 5.8, 6.8, 7.2, 8.0 y 9.0, o según asigne el docente) para trazar la curva sin saturar la sesión.
4. **DISEÑO SIMPLIFICADO (SOLO 7 TUBOS TOTALES):** Se monta UN SOLO Blanco General (sin PNPP) para calibrar el cero del espectrofotómetro, UN Control Negativo (sin enzima) y 5 Tubos de Reacción para los 5 pH elegidos. Al no llevar PNPP el Blanco, se evita la absorción de fondo que "se come" la línea base.
5. **VOLUMEN DE CELDILLAS (2.0 mL):** El volumen total de incubación en cada tubo es de 2.0 mL (+ 0.5 mL de KOH = 2.5 mL finales), permitiendo transferir 2.0 mL exactos a la celdilla espectrofotométrica para cubrir perfectamente la altura del haz de luz.

Requerimientos por equipo

#	Material / Equipo	#	Reactivo
1	Mortero con pistilo y colador	5 mL	PNPP 20 mM (incoloro a amarillo muy tenue; se requieren 3.0 mL totales)

7	Tubos de ensayo estándar (1 Blanco, 1 Control, 5 Reacciones)	5 mL	MgCl ₂ 100 mM
2	Pipetas graduadas de 1 y 10 mL	3 mL c/u	Batería de amortiguadores límpidos (se eligen 5 pH por mesa)
1	Balanza granataria y centrífuga clínica	5 mL	KOH 0.5 M (solución de parada y revelado alcalino)
1	Espectrofotómetro y celdillas (capacidad 2.0 mL)	100 mL	Amortiguador de acetato de sodio 30 mM, pH 6.0 (extracción)
1	Gradilla para tubos de ensayo	1	Piseta con agua destilada
1	Juego de micropipetas y puntas (200 y 1000 µL)		
1	Baño maría a 37 °C		

Por alumno / para todo el grupo

#	Material biológico / Insumo
1	Papa mediana a grande (fresca)
1	Bolsa de hielo y hielera

Procedimiento**Actividad 1. Extracción de la fosfatasa de papa**

1. Pesar 50 g de papa (pelada y picada en cubos pequeños) y homogenizar en 100 mL de amortiguador de acetato de sodio 30 mM, pH 6.0 (puede emplearse la licuadora del laboratorio para preparar el homogenizado de todas las mesas).
2. Filtrar el homogenizado a través de un colador o gasa para retirar el material fibroso y repartir en tubos cónicos de 15 mL.
3. Centrifugar 10 minutos a 5000 rpm.
4. Recuperar el sobrenadante transparente en un tubo limpio rotulado como "Extracto de fosfatasa" y conservarlo en baño de hielo durante toda la sesión.

Actividad 2. Preparación técnica de amortiguadores (200 mL) y selección de los 5 pH

◆ **PROTOCOLO DE PREPARACIÓN INSTITUCIONAL DE AMORTIGUADORES (200 mL):**
 GUÍA OFICIAL DE PREPARACIÓN DE BUFFERS DE FOSFATO (PARA TÉCNICOS Y DOCENTES):
 Pesar las masas exactas de Fosfato Dibásico (K₂HPO₄, Bote Blanco Hycl) y Fosfato Monobásico (KH₂PO₄, Bote Ámbar) indicadas en la tabla en un vaso de precipitados.

Disolver en ~150 mL de agua destilada y verificar con potenciómetro calibrado. Ajustar finamente gota a gota con NaOH 1 N (o HCl 1 N) bajo agitación hasta obtener el pH exacto, y finalmente aforar a 200 mL con agua destilada en matraz volumétrico.

pH Nominal	Bote Blanco Hycl (g) (Fosfato Dibásico)	Bote Ámbar (g) (Fosfato Monobásico)	Aforo H ₂ O (mL)	Serie 5 pH Recomendada
pH 5.8	0.2271 g	2.5394 g	200 mL	★ RECOMENDADO (Zona ácida / óptimo)
pH 6.0	0.3492 g	2.4207 g	200 mL	Opcional (Zona ácida)
pH 6.4	0.5253 g	2.2496 g	200 mL	Opcional (Transición ácida)
pH 6.8	1.3912 g	1.4077 g	200 mL	★ RECOMENDADO (Transición)
pH 7.0	1.7319 g	1.0765 g	200 mL	Opcional (Zona neutra)
pH 7.2	2.0442 g	0.7729 g	200 mL	★ RECOMENDADO (Zona neutra)
pH 7.6	2.4701 g	0.3588 g	200 mL	Opcional (Zona básica)
pH 7.8	2.5979 g	0.2346 g	200 mL	Opcional (Zona básica)
pH 8.0	2.6887 g	0.1444 g	200 mL	★ RECOMENDADO (Zona básica)
pH 8.5	2.7824 g	0.0552 g	200 mL	Opcional (Zona alcalina)
pH 9.0	2.8392 g	0.0000 g	200 mL	★ RECOMENDADO (Zona alcalina / inactivación)

Cada equipo de alumnos tomará 3.0 mL de cada uno de los 5 amortiguadores seleccionados para su mesa (p. ej. pH 5.8, 6.8, 7.2, 8.0 y 9.0, o los asignados por el docente) y los colocará en su gradilla.

Actividad 3. Monitoreo de la reacción a los 5 valores de pH (Diseño de 7 tubos)



NOTA DIDÁCTICA SOBRE EL ARMADO EFICIENTE DE TUBOS:

1. Preparación del extracto enzimático: Usar 0.1 mL (100 µL) de extracto crudo + 0.4 mL de agua destilada (o dilución 1:5 previa) para completar los 0.5 mL de enzima por tubo. Esto previene la turbidez basal y la saturación rápida de la señal.
2. Consumo optimizado: Con este esquema de solo 7 tubos en total, el gasto de PNPP 20 mM por equipo es de únicamente 3.0 mL (6 tubos con PNPP × 0.5 mL), eliminando desperdicios y facilitando la organización en la gradilla.

1. Preparación de la gradilla con los 7 tubos de ensayo:

Rotular 7 tubos de ensayo limpios y pipetear los reactivos según la siguiente tabla. Note que el Blanco NO contiene PNPP y el Control Negativo NO contiene enzima:

Tubo	Rótulo y Función	Amortiguador	MgCl ₂ 100 mM	PNPP 20 mM	Agua destilada	Extracto diluido	Vol. Total
Tubo 1	Blanco General (Ajuste a 0)	0.50 mL (pH 7.0 o agua)	0.50 mL	— (NO poner)	1.00 mL	—	2.00 mL
Tubo 2	Control Negativo (Sin enzima)	0.50 mL (pH 7.0)	0.50 mL	0.50 mL	0.50 mL	—	2.00 mL
Tubo 3	Reacción a pH 5.8	0.50 mL (Buffer pH 5.8)	0.50 mL	0.50 mL	—	0.50 mL	2.00 mL
Tubo 4	Reacción a pH 6.8	0.50 mL (Buffer pH 6.8)	0.50 mL	0.50 mL	—	0.50 mL	2.00 mL
Tubo 5	Reacción a pH 7.2	0.50 mL (Buffer pH 7.2)	0.50 mL	0.50 mL	—	0.50 mL	2.00 mL
Tubo 6	Reacción a pH 8.0	0.50 mL (Buffer pH 8.0)	0.50 mL	0.50 mL	—	0.50 mL	2.00 mL
Tubo 7	Reacción a pH 9.0	0.50 mL (Buffer pH 9.0)	0.50 mL	0.50 mL	—	0.50 mL	2.00 mL

2. Pre-aterperación a 37 °C:

Mezclar los componentes de todos los tubos (sin agregar todavía el extracto a los Tubos 3–7) y colocarlos en el baño maría a 37 °C durante 3 a 5 minutos para estabilizar la temperatura.

3. Inicio de la reacción enzimática (t = 0):

Agregar 0.50 mL de extracto enzimático diluido a cada uno de los tubos de reacción (Tubos 3 a 7) en el baño maría a 37 °C, mezclar suavemente por inversión e iniciar el cronómetro.

4. Tiempo de incubación:

Incubar exactamente durante 5 minutos a 37 °C todos los tubos.

5. Parada de la reacción y revelado de color con KOH:

Transcurridos exactamente 5 minutos, detener la reacción agregando 0.50 mL de KOH 0.5 M a cada uno de los 7 tubos (Tubos 1 a 7) y agitar de inmediato (Volumen final = 2.50 mL). El KOH detiene la catálisis por desnaturalización alcalina e ioniza el p-nitrofenol a su anión amarillo brillante (p-nitrofenóxido).

6. Lectura espectrofotométrica a 405 nm:

Dejar atemperar a temperatura ambiente. Transferir 2.0 mL del Tubo 1 (Blanco) a la celdilla para calibrar el cero del espectrofotómetro a 405 nm. A continuación, leer la absorbancia del Tubo 2 (Control Negativo) y de los Tubos 3 a 7 (Reacciones a los 5 pH).

Esquema de referencia del flujo de trabajo:

► FLUJO METODOLÓGICO RESUMIDO (DISEÑO SIMPLIFICADO DE 7 TUBOS):

[Gradilla con 7 tubos totales — Volumen de incubación = 2.0 mL por tubo]

- └─> Tubo 1 (BLANCO GENERAL): 0.50 mL buffer + 0.50 mL $MgCl_2$ + 1.00 mL Agua (¡SIN PNPP!)
- └─> Tubo 2 (CONTROL NEGATIVO): 0.50 mL buffer + 0.50 mL $MgCl_2$ + 0.50 mL PNPP + 0.50 mL Agua
- └─> Tubos 3-7 (REACCIONES pH): 0.50 mL buffer (pH 5.8 a 9.0) + 0.50 mL $MgCl_2$ + 0.50 mL PNPP

Pre-atemperar 3 min a 37 °C

+ 0.50 mL Extracto diluido (¡Inicia cronómetro!)

Incubar 5 min a 37 °C

+ 0.50 mL KOH 0.5 M a TODOS los tubos (Vol. final = 2.5 mL)

1. Ajustar cero con Tubo 1 (Blanco sin PNPP)

2. Leer Tubo 2 (Control) y Tubos 3-7 (Reacciones a 405 nm)

Curva de pH: Máximo en zona ácida (pH 5.8-6.0) → Cae hacia pH 9.0

Actividad 4. Análisis de los datos

1. Verificar que el Tubo 2 (Control Negativo sin enzima) presente una absorbancia cercana a cero ($A_{405} < 0.05$), confirmando que el PNPP no sufrió hidrólisis espontánea.
2. Restar la absorbancia del Control Negativo (o del Blanco) a la absorbancia de cada muestra de reacción: $A_{405, \text{neta}} = A_{\text{muestra}} - A_{\text{control}}$.
3. Utilizando la Ley de Beer-Lambert con el coeficiente de extinción molar del p-nitrofenóxido a 405 nm en medio alcalino ($\epsilon_{405} \approx 18,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} = 0.018 \mu\text{mol}^{-1}\text{mL}^{-1}\text{cm}^{-1}$), calcular la concentración de producto generado ($\mu\text{mol/mL}$) a cada valor de pH.
4. Calcular las velocidades relativas de reacción dividiendo la cantidad de producto obtenido entre el tiempo de incubación (5 minutos).
5. Graficar la velocidad de reacción (o $A_{405, \text{neta}}$) en el eje Y frente al pH en el eje X para construir la curva de perfil de pH.
6. Identificar el pH óptimo de la fosfatasa ácida de papa (se observará máxima actividad en la zona ácida de pH 5.8-6.0 y un decaimiento progresivo hacia la zona neutra y básica de pH 6.8-9.0). Discutir los resultados en función de la ionización de la histidina catalítica (His276).

Práctica 7. Parámetros cinéticos de una reacción catalizada

Propósitos

- Caracterizar una enzima mediante un ensayo enzimático acoplado
- Determinar K_m , V_{max} y la eficiencia catalítica (V_{max}/K_m)
- Evaluar si la reacción sigue una cinética de Michaelis-Menten

Introducción

La hexoquinasa (HK) cataliza la **primera reacción de la glucólisis**: la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato. Es una enzima clave porque:

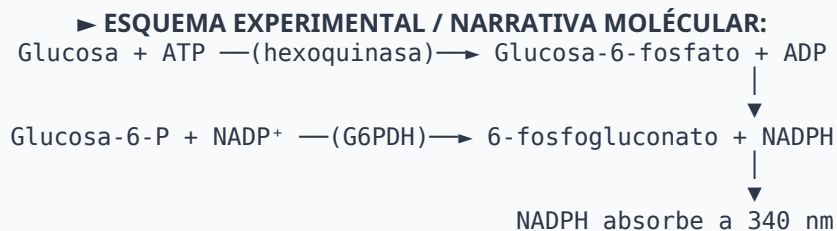
- **Entrada a la glucólisis:** es el primer paso del metabolismo energético de la glucosa.
- **Puente con la vía de las pentosas:** su producto (glucosa-6-P) alimenta la síntesis de nucleótidos (ADN/ARN) y la defensa antioxidante celular a través del NADPH.
- **Estudio de isoenzimas:** la HK presenta isoenzimas específicas por tejido, útiles en investigación metabólica y farmacológica.
- **Aplicación clínica:** importante en el diagnóstico y monitoreo de condiciones como la diabetes.

Para medir su actividad usamos un **ensayo enzimático acoplado** (ver sección didáctica) que produce NADPH, medible espectrofotométricamente a **340 nm**.

Qué se estudia (didáctica)

¿Qué es un ensayo enzimático acoplado y por qué se usa?

La hexoquinasa no se puede seguir directamente (ni su sustrato ni su producto absorben luz visible). Por eso se "acopla" a una segunda enzima cuya reacción sí produce una molécula detectable:



El **NADPH** que aparece es proporcional a la glucosa consumida → su aumento mide la velocidad de la hexoquinasa. Cuanto más NADPH, más rápido trabajó la HK.

Los parámetros que obtendremos:

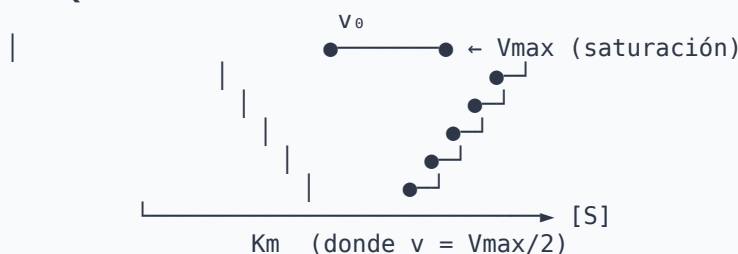
Parámetro	Qué es	Cómo se obtiene
v_0 (velocidad inicial)	Pendiente de la parte lineal del curso temporal ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$)	De cada celdilla, con Excel
V_{max}	Velocidad máxima con la enzima saturada	Asíntota de la curva v_0 vs $[S]$
K_m	Concentración de sustrato al 50 % de V_{max}	De la curva o de Lineweaver-Burk
Eficiencia (V_{max}/K_m)	Índice de eficiencia catalítica	Cociente

La ecuación de Michaelis-Menten (curva hiperbólica):

► REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:

$$v_0 = (V_{\text{max}} \cdot [S]) / (K_m + [S])$$

► ESQUEMA EXPERIMENTAL / NARRATIVA MOLÉCULAR:



Lineweaver-Burk (doble recíproco) — la forma lineal:

► REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:

$$1/v_0 = (K_m/V_{\text{max}}) \cdot (1/[S]) + 1/V_{\text{max}}$$

↑pendiente
↑intercepto

- El **intercepto en el eje Y** = $1/V_{\text{max}}$.
- La **pendiente** = K_m/V_{max} ; de ahí se despeja K_m .

Cómo calcularlo en Excel:

1. Por cada celdilla: graficar **absorbancia vs. tiempo**, usar =PENDIENTE (. . .) para obtener v_0 ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$).
2. Graficar v_0 vs $[S]$ → curva de Michaelis-Menten.
3. Para linealizar: crear columnas $1/v_0$ y $1/[S]$, graficar → la pendiente e intercepto dan K_m y V_{max} .

4. Fórmula de referencia para ajuste: $v = V_{\max} \cdot [S] / (K_m + [S])$ (se puede ajustar con la herramienta Solver de Excel o un ajuste no lineal).

◆ RECURSO DIGITAL / INTERACTOMA MODULAR

Simulador y guía: en **Interactoma Modular** (interactomamodular.com → *Laboratorio Digital* → *Simulador Cinético*) puedes contrastar tus datos de Excel con los modelos de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk. Revisar también la **guía interactiva de $V_{\max}$ y K_m** (<https://interactomamodular.com/assets/guias/cinetica-vmax-km.html>) con las fórmulas automatizadas para Excel.

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
1	Piseta con agua	1	Kit de actividad de hexoquinasa (SPINREACT GLUCOSA-HK)
4	Pipetas Pasteur de plástico	50 mL	Glucosa 50 mM (para todo el grupo)
1	Micropipeta de 1 mL con puntas		
1	Micropipeta de 10 μ L con puntas		
1	Micropipeta de 200 μ L con puntas		
10	Tubos de ensayo		
1	Gradilla para tubos		
2	Vasos de precipitado de 100 mL		
1	Caja de celdas de 1 mL para cinéticas		
1	Espectrofotómetro que mida a 340 nm (UV) — los modelos que no alcanzan 340 nm (p. ej., algunos Génesis) no sirven		

#	Material	#	Reactivo
1	Cronómetro		

Procedimiento

Actividad 1. Cinética de saturación de la hexoquinasa

1. Preparar una serie de **10 celdillas** con distintas concentraciones de glucosa, según la tabla. La columna final muestra la concentración resultante (madre 50 mM, volumen total de reacción 1.0 mL):

Celdilla	Glucosa 50 mM (mL)	Agua (mL)	[Glucosa] final (mM)
1	0	0.500	0
2	0.01	0.490	0.5
3	0.02	0.480	1.0
4	0.04	0.460	2.0
5	0.06	0.440	3.0
6	0.08	0.420	4.0
7	0.10	0.400	5.0
8	0.12	0.380	6.0
9	0.14	0.360	7.0
10	0.16	0.340	8.0

2. Colocar la celdilla 1 en el espectrofotómetro y ajustar la absorbancia a **cero a 340 nm**.

3. Preparar un cronómetro para registrar la absorbancia **cada 10 segundos por 3 minutos**.

4. **Iniciar la reacción** agregando **500 µL del reactivo de actividad** del kit comercial (SPINREACT GLUCOSA-HK), preparado mezclando el contenido del vial R2 sobre el vial R1.

5. Monitorear el curso temporal de la reacción en cada celdilla (una por una).

Actividad 2. Análisis de los datos

1. Graficar los **cursos temporales** de la reacción de los distintos experimentos (absorbancia vs. tiempo por celdilla).
2. Calcular las **velocidades iniciales (v_0)** de las reacciones a las diferentes concentraciones de sustrato (pendiente de la parte lineal, con =PENDIENTE (. . .) en Excel).
3. Graficar **v_0 vs. [Glucosa]** para observar la curva de saturación.
4. Ajustar a la ecuación de Michaelis-Menten (ajuste no lineal) **y/o** usar la transformación de Lineweaver-Burk para obtener **K_m y V_{max}** .
5. Calcular la **eficiencia catalítica (V_{max}/K_m)** y discutir si la curva es hiperbólica (Michaelis-Menten) o si se observa cooperatividad (sigmoidea — en ese caso, comparar con la Práctica 9).

Práctica 8. Estudio de inhibición enzimática

Propósitos

- Aprender una metodología general para estudiar la inhibición enzimática
- Aprender a determinar el mecanismo de inhibición mediante un estudio cinético

Introducción

Los estudios de inhibición enzimática ayudan a elucidar mecanismos de reacción y a obtener información estructural, funcional y dinámica de las enzimas, con gran aplicación biomédica y biotecnológica (muchos fármacos son inhibidores enzimáticos). El mecanismo de inhibición se diagnostica mediante los **patrones de inhibición** observados en gráficos de Lineweaver-Burk, comparando la reacción sin inhibidor contra la reacción en presencia de cada inhibidor.

◆ ASPECTO DIDÁCTICO / PROYECTO INTEGRADO

Disponibilidad: esta práctica usa la **fosfatasa ácida de papa** (misma de las P5 y P6) y el sustrato **PNPP**, que dependen de las **islas del laboratorio y los técnicos**. Si no hay reactivos disponibles, la práctica se **aborda de manera teórica**: se analizan los patrones de Lineweaver-Burk con datos modelo (ver sección didáctica) para identificar el tipo de inhibición.

Qué se estudia (didáctica)

¿Qué es un inhibidor enzimático?

Un **inhibidor** es una molécula que reduce la actividad de una enzima. Aquí usamos la fosfatasa ácida (PNPP → para-nitrofenol amarillo a 405 nm) y comparamos su actividad en tres condiciones:

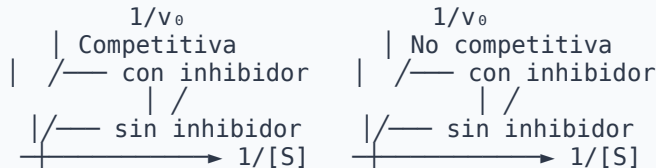
Condición	Qué contiene	Para qué
Sin inhibidor	Sustrato + enzima	Referencia (actividad máxima)
Con fosfato	Sustrato + enzima + fosfato 5 mM	El fosfato es producto de la reacción (inhibición por producto)
Con fluoruro	Sustrato + enzima + fluoruro 5 mM	El fluoruro es un inhibidor clásico de fosfatasas

¿Cómo se ve cada tipo de inhibición en Lineweaver-Burk?

La idea: se mide v_0 a varias concentraciones de sustrato, sin y con inhibidor, y se grafica $1/v_0$ vs $1/[S]$. El patrón de las rectas revela el mecanismo:

Tipo de inhibición	Qué cambia	Patrón en Lineweaver-Burk
Competitiva	K_m aumenta (V_{max} igual)	Las rectas se cruzan en el eje Y (misma $1/V_{max}$)
No competitiva	V_{max} disminuye (K_m igual)	Las rectas se cruzan en el eje X ($-1/K_m$ igual)
Acompetitiva	K_m y V_{max} disminuyen	Rectas paralelas
Mixta	V_{max} disminuye y K_m cambia	Se cruzan fuera de ambos ejes

► **ESQUEMA EXPERIMENTAL / NARRATIVA MOLÉCULAR:**



Interpretación esperada (con base en la literatura):

- El **fosfato** (producto de la reacción) suele dar **inhibición competitiva** — compite con el sustrato por el sitio activo. Así se reporta en fosfatasas ácidas vegetales con sustratos análogos al PNPP.
- El **fluoruro** es un inhibidor conocido de fosfatasas, pero su patrón **varía según la isoforma y el pH**: en fosfatasas vegetales (como la de soja) suele ser **competitivo**; en otras fuentes puede ser **no competitivo** o **acompetitivo**.

◆ **NOTA ACADÉMICA**

Importante para interpretar: no hay un único resultado "correcto". El patrón real depende de la isoforma de la fosfatasa y del pH del ensayo. La meta de la práctica es que **determines experimentalmente** el tipo de inhibición comparando tus rectas de Lineweaver-Burk, y que lo discutas con base en la literatura. Si tus resultados no coinciden exactamente con el patrón "esperado", es un hallazgo válido para discutir — no un error.

◆ **NOTA ACADÉMICA**

Si las rectas con y sin inhibidor **comparten el intercepto en Y**, la V_{max} no cambió → el inhibidor es **competitivo** (solo afecta K_m). Si comparten el intercepto en X, la K_m no cambió → es **no competitivo** (solo afecta V_{max}).

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
1	Balanza granataria	100 mL	Amortiguador de bicarbonato de sodio 10 mM, pH 6.0
3	Vasos de precipitado de 100 mL	10 mL	PNPP 20 mM (fresco)
1	Licuada	30 mL	KOH 0.5 M
4	Tubos de centrífuga de 15 mL	30 mL	Amortiguador de acetato de sodio 1.0 M, pH 5.7
1	Centrífuga clínica	30 mL	MgCl ₂ 0.1 M
30	Tubos de ensayo	10 mL	Fosfatos de sodio monobásico 0.005 M, pH 5.7 (inhibidor)
2	Gradillas	50 mL	Fluoruro de sodio 0.005 M (inhibidor)
1	Micropipeta de 1 mL, de 200 µL y de 100 µL con puntas		
2	Pipetas Pasteur de plástico		
1	Incubadora a 37 °C		
1	Piseta con agua destilada		
1	Caja de celdas de 1 mL de plástico		
1	Espectrofotómetro visible		
1	Colador de poro pequeño + papel filtro		

Por alumno / para todo el grupo

#	Material
1	Papa (para el extracto de fosfatasa ácida)
1	Bolsa de hielo

Procedimiento

Actividad 1. Preparación de la fosfatasa ácida

1. Pesar **25 g de papa** pelada y cortada en cubos.
2. Licuar con 50 mL de bicarbonato de sodio 10 mM, pH 6.0, por 1 minuto a máxima velocidad.
3. Filtrar con colador de poro pequeño y papel filtro; colocar en tubos de centrifuga de 15 mL.
4. Centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos.
5. Recuperar el sobrenadante en tubos limpios rotulados como *extracto de fosfatasa ácida* y reservar en hielo.

Actividad 2. Preparación de estándares de sustrato

1. Preparar una serie de **8 tubos (A-H)** con concentraciones crecientes de 4-NPP/PNPP 20 mM, según la tabla (la columna derecha es la concentración del estándar una vez llevado a 1 mL):

Tubo (estándar)	4-NPP 20 mM (μL)	Agua destilada (μL)	[Sustrato] en el estándar (mM)
A (Est)	0	1000	0
B (Est)	10	990	0.2
C (Est)	20	980	0.4
D (Est)	50	950	1.0
E (Est)	100	900	2.0
F (Est)	200	800	4.0
G (Est)	500	500	10
H (Est)	1000	0	20

2. Estos tubos son los **estándares de concentración del sustrato** que se usan en los experimentos de saturación de la fosfatasa ácida.

Actividad 3. Determinación de los parámetros cinéticos sin inhibidor

1. Preparar una serie de **8 tubos (A-H)** según la tabla. **Cada tubo recibe 0.1 mL del estándar correspondiente** de la Actividad 2 (A=0, B=0.2, C=0.4, D=1.0, E=2.0, F=4.0, G=10, H=20 mM):

Tubo (sin inhibidor)	Acetato 1 M (mL)	MgCl ₂ 0.1 M (mL)	Estándar de sustrato (mL)	Agua destilada (mL)
A	0.1	0.1	0.1 (del estándar A)	1.0
B	0.1	0.1	0.1 (del estándar B)	1.0
C	0.1	0.1	0.1 (del estándar C)	1.0
D	0.1	0.1	0.1 (del estándar D)	1.0
E	0.1	0.1	0.1 (del estándar E)	1.0
F	0.1	0.1	0.1 (del estándar F)	1.0
G	0.1	0.1	0.1 (del estándar G)	1.0
H	0.1	0.1	0.1 (del estándar H)	1.0

2. Mezclar e incubar **5 minutos a 37 °C**.

3. **Iniciar las reacciones** pipeteando a cada tubo **100 µL de extracto de la enzima**.

4. Mezclar e incubar los tubos **5 minutos a 37 °C** y **detener** la reacción agregando **100 µL de KOH 0.5 M**.

5. Medir las absorbancias a **405 nm**, calibrando a cero con el tubo A.

6. La **velocidad inicial** se calcula dividiendo el cambio de absorbancia observado entre 5 minutos ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$), o se corrige con el coeficiente de absorción molar del p-nitrofenol a mM/min.

Actividad 4. Inhibición de la enzima por el fosfato

1. Preparar una serie de **8 tubos (A-H) con fosfato** según la tabla. Igual que la Actividad 3, pero sustituyendo **0.2 mL de agua por 0.2 mL de fosfato de sodio 5 mM**:

Tubo (fosfatos)	Acetato 1 M (mL)	MgCl ₂ 0.1 M (mL)	Estándar de sustrato (mL)	Agua destilada (mL)	Fosfato 5 mM (mL)
A-H	0.1	0.1	0.1 (del estándar correspondiente)	0.8	0.2

2. Mezclar e incubar **5 minutos a 37 °C**.
3. Iniciar con **100 µL de extracto**; incubar 5 minutos a 37 °C.
4. Detener con **100 µL de KOH 0.5 M**.
5. Medir a **405 nm**, calibrando a cero con el tubo A.
6. Calcular la velocidad inicial ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$ o corregir con el coeficiente molar).
7. Este experimento es similar al anterior, pero en presencia de un inhibidor que debe producir una **pérdida de actividad** de la enzima.

Actividad 5. Inhibición de la enzima por el fluoruro

1. Igual que la Actividad 4, pero usando **0.2 mL de fluoruro de sodio 5 mM** como inhibidor en lugar del fosfato.
2. Incubar, iniciar con enzima, detener con KOH y leer a 405 nm (mismos tiempos y volúmenes).

Actividad 6. Análisis de los datos

1. Calcular las **velocidades iniciales** de las reacciones en las diferentes concentraciones y condiciones (sin inhibidor, con fosfato, con fluoruro).
2. Graficar **v vs. [sustrato]** para cada condición.
3. Obtener los **gráficos de Lineweaver-Burk** ($1/v$ vs. $1/[S]$) de los patrones de inhibición.
4. Determinar qué tipo de inhibición se observa con el **fosfato** y con el **fluoruro**, comparando los interceptos y pendientes de las rectas (ver sección didáctica).

Práctica 9. Cooperatividad en cinética de saturación

Propósitos

- Aprender una metodología experimental general para estudiar la cooperatividad
- Medir la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) del suero sanguíneo

Introducción

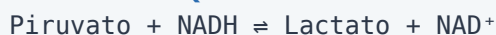
La cooperatividad es fundamental en la regulación eficiente de procesos biológicos. El alosterismo consiste en la comunicación fisicoquímica entre sitios distintos de la enzima: lo que ocurre en un sitio afecta la eficiencia de otros (efectos homotrópicos entre sitios idénticos, heterotrópicos entre sitios distintos; sistemas en K, en V o mixtos V/K). La **lactato deshidrogenasa (LDH)** es una enzima tetramérica cuya cooperatividad por su sustrato es **sensible al pH**: al comparar su perfil de saturación a pH 7.0 y pH 6.0 se observa cómo cambia el grado de cooperatividad.

Qué se estudia (didáctica)

La LDH y por qué es importante:

La lactato deshidrogenasa es una enzima **ubícua** que cataliza la interconversión entre piruvato y lactato usando NADH/NAD⁺ como cofactor:

► REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:



Importancia clínica: la LDH está presente en todos los tejidos; cuando una célula se daña (infarto, hepatitis, daño muscular, hemólisis), la enzima se libera a la sangre. Por eso **medir la actividad de la LDH en el suero es un marcador diagnóstico** de daño tisular. Aquí medimos la LDH del suero de un donante, conectando el laboratorio de enzimología con la práctica clínica.

La enzima viene del suero:

◆ NOTA ACADÉMICA

La fuente de la enzima es el **suero sanguíneo**: se obtiene de un **donante de la clase** (con las mismas condiciones de la P14B) o de **muestras que tengan los técnicos del piso 1** (edificio de microbiología). El **kit clínico de LDH** mide la actividad de la enzima presente en el suero.

La dirección del ensayo (depende del kit):

◆ ASPECTO DIDÁCTICO / PROYECTO INTEGRADO

Importante: los kits clínicos de LDH pueden medir la reacción en cualquiera de las dos direcciones, y eso define si la absorbancia a 340 nm **sube o baja**:

◆ **NOTA ACADÉMICA**

- **Dirección lactato → piruvato (produce NADH):** la absorbancia a **340 nm SUBE** con el tiempo.

◆ **NOTA ACADÉMICA**

- **Dirección piruvato → lactato (consume NADH):** la absorbancia a **340 nm BAJA** con el tiempo.

◆ **NOTA ACADÉMICA**

Revisa el kit que te entregaron en las islas para saber cuál dirección usa. La **pendiente** (positiva o negativa) te da la velocidad; usa el valor absoluto para comparar.

¿Qué es la cooperatividad?

Muchas enzimas (como la LDH) tienen **varias subunidades** con un sitio activo cada una. Cuando el sustrato se une a un sitio, puede facilitar u obstaculizar la unión en los demás:

- **Cooperatividad positiva:** la unión del primer sustrato facilita las siguientes → curva **sigmoidea** (en S).
- **Sin cooperatividad:** cada sitio se une de forma independiente → curva **hiperbólica** (Michaelis-Menten).

► **ESQUEMA EXPERIMENTAL / NARRATIVA MOLÉCULAR:**



El coeficiente de Hill (nH):

- **nH = 1** → sin cooperatividad (hiperbólica).
- **nH > 1** → cooperatividad positiva (sigmoidea). A mayor nH, más abrupta.
- **nH < 1** → cooperatividad negativa.

Se estima ajustando a la ecuación modificada de Michaelis-Menten:

► **REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:**

$$v_0 = (V_{\max} \cdot [S]^n) / (K_{0.5}^n + [S]^n) \quad \text{donde } n = \text{coeficiente de Hill}$$

¿Por qué comparar pH 7.0 y pH 6.0?

La cooperatividad de la LDH es **sensible al pH**: el pH cambia la ionización de residuos clave y altera la comunicación entre subunidades. Al medir la curva de saturación a dos pH se observa cómo cambia la sigmoidicidad (y el nH).

◆ NOTA ACADÉMICA

Cooperatividad condicional: la curva completa de saturación (v_0 vs [sustrato] a pH 7.0 y 6.0) se busca **si los alumnos ejecutaron bien la práctica**. Si el tiempo o la ejecución no lo permiten, se realiza al menos una **medición puntual de la actividad de la LDH del suero** (a una concentración de sustrato y pH definidos) y se discute el valor obtenido.

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
1	Piseta con agua	1	Kit clínico de lactato deshidrogenasa (según disponibilidad en las islas)
4	Pipetas Pasteur de plástico	20 mL	Solución de sustrato del kit (lactato o piruvato, según el kit)
1	Micropipeta de 1 mL con puntas	20 mL	NADH o NAD ⁺ (según la dirección del kit)
1	Micropipeta de 10 µL con puntas	20 mL	PBS 1x
1	Micropipeta de 200 µL con puntas	20 mL	Amortiguador de fosfatos a pH 6.0
10	Tubos de ensayo		
1	Gradilla para tubos		
2	Vasos de precipitado de 100 mL		
1	Caja de celdas de 1 mL		
1	Espectrofotómetro que mida a 340 nm		

#	Material	#	Reactivo
1	Cronómetro		

Por alumno / para todo el grupo

#	Material
1	Muestra de suero sanguíneo (donante de la clase o muestras de los técnicos del piso 1)
1	Bolsa de hielo

◆ NOTA ACADÉMICA

Disponibilidad: si no hay kit o suero disponibles, la práctica se **aborda de manera teórica** (análisis de curvas de saturación modelo, sigmoidea vs. hiperbólica, y estimación del coeficiente de Hill).

Procedimiento

Actividad 1. Obtención del suero (fuente de LDH)

1. Obtener una muestra de **suero sanguíneo**: de un donante de la clase (ayuno o condiciones normales, con las precauciones de la P14B) o de las **muestras disponibles en el piso 1 con los técnicos**.
2. Si la muestra es de sangre completa, centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos para obtener el suero.
3. Reservar el suero en hielo hasta su uso. **El suero es la fuente de la LDH.**

Actividad 2. Cinética de saturación de la LDH del suero

1. Preparar una serie de celdillas con **concentraciones crecientes del sustrato** que use el kit (lactato o piruvato), según las instrucciones del kit.
2. Si el kit no especifica la serie, usar concentraciones crecientes de sustrato (p. ej., 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 mM) para construir la curva de saturación.
3. Colocar cada celda en el espectrofotómetro y ajustar la absorbancia a **cero a 340 nm**.
4. Preparar un cronómetro para registrar la absorbancia **cada 10 segundos por 3 minutos**.

5. **Iniciar la reacción** agregando una alícuota de **suero (fuente de LDH)**, según el volumen indicado por el kit.
6. Monitorear el curso temporal de la reacción en cada celda. **Observa si la absorbancia sube o baja** (depende de la dirección del kit) y usa el valor absoluto de la pendiente como velocidad.
7. **Repetir el experimento** con el amortiguador de fosfatos a **pH 6.0** (misma serie de sustrato), para comparar el efecto del pH sobre la cooperatividad.

Actividad 3. Análisis de los datos

1. Graficar los **cursos temporales** de la reacción (absorbancia vs. tiempo por celdilla).
2. Calcular las **velocidades iniciales (v_0)** de las reacciones (pendiente de la parte lineal, con =PENDIENTE(. . .) en Excel; usar el valor absoluto si la pendiente es negativa).
3. Graficar **v_0 vs. [Sustrato]** para cada pH (7.0 y 6.0) y observar la forma de la curva (hiperbólica vs. sigmoidea).
4. Ajustar a la ecuación de Michaelis-Menten **con coeficiente de Hill** y comparar el **nH** a pH 7.0 y a pH 6.0.
5. Discutir cómo el pH modifica la cooperatividad de la LDH, y relacionar el valor de actividad obtenido con el contexto clínico (marcador de daño tisular).

Práctica 10 y 11. Purificación de una enzima (dos sesiones)

Propósitos

- Aprender una metodología experimental para purificar una enzima a homogeneidad
- Construir una tabla de purificación (actividad específica, factor de purificación, rendimiento)

Introducción

Contar con un método de extracción y purificación es esencial para la caracterización bioquímica y las aplicaciones biotecnológicas. En esta práctica se experimenta con **precipitación por sales** (sulfato de amonio) y **fraccionamiento**, combinables con métodos cromatográficos y electroforéticos hasta lograr homogeneidad. Se purifica la **fosfatasa ácida de papa** — la misma enzima de las Prácticas 5, 6 y 8 — ahora desde el punto de vista de la purificación, lo que refuerza la coherencia del curso.

◆ NOTA ACADÉMICA

Disponibilidad: la papa, el PNPP y el reactivo de Bradford dependen de las **islas del laboratorio y los técnicos**. Si no hay reactivos disponibles, la práctica se **aborda de manera teórica**: se construye la tabla de purificación con **datos modelo** de actividad y proteína.

Qué se estudia (didáctica)

¿Qué significa "purificar una enzima"?

El extracto crudo de papa contiene **muchas proteínas diferentes**, no solo la fosfatasa. Purificar es **separar la enzima de interés de las demás**, y medir cuánto se "limpió" en cada paso. No buscamos recuperar todo: buscamos una fracción **más concentrada en la enzima** (mayor actividad específica).

Los pasos y fracciones (I-VI):

Fracción	Paso	Qué hace en la purificación
I	Extracto crudo	Referencia inicial (toda la proteína soluble)
II	MnCl ₂ + centrifugar	Clarifica: precipita proteínas no deseadas
III	Resuspender el precipitado	Recupera parte de la enzima del paso anterior

Fracción	Paso	Qué hace en la purificación
IV	Sulfato de amonio 35 %	<i>Salting out</i> : precipita proteínas a baja saturación (las que no queremos)
V	Sulfato de amonio 54 % + calor 60 °C	Precipita la fosfatasa; el calor desnaturaliza contaminantes termolábiles
VI	Resuspensión final	Fracción más enriquecida en fosfatasa

El principio del sulfato de amonio (salting out):

Al aumentar la concentración de sal, las proteínas pierden solubilidad y **precipitan**. Las proteínas precipitan a distintas concentraciones de sal según su tamaño y carga. Por eso:

- A **35 %** de saturación precipitan proteínas grandes/contaminantes (se desechan).
- A **54 %** precipita la fosfatasa (se recupera en el precipitado).

La tabla de purificación (lo que se construye en la semana 2):

Concepto	Fórmula	Qué indica
Proteína	Bradford (mg/mL)	Cuánta proteína hay
Actividad	PNPP→405 nm (U/mL)	Cuánta enzima funcional hay
Actividad específica	Actividad / Proteína (U/mg)	Pureza relativa (debe subir al purificar)
Factor de purificación	Act. esp. de la fracción / Act. esp. de la fracción I	Cuántas veces se "limpió"
Rendimiento	Actividad total de la fracción / Actividad total de la fracción I	Cuánto se conservó (%). Baja al purificar

◆ NOTA ACADÉMICA

Interpretación: una buena purificación muestra la **actividad específica aumentando** fracción a fracción (más pura) aunque el **rendimiento disminuya** (se pierde algo de enzima en cada paso). El SDS-PAGE (si hay equipo) confirma visualmente que la fracción final tiene menos bandas de proteína.

Requerimientos por equipo — Semana 1 (Práctica 10)

#	Material	#	Reactivo
1	Balanza granataria	100 mL	Amortiguador de bicarbonato de sodio 10 mM, pH 6.0
3	Vasos de precipitado de 250 mL	30 mL	Acetato de sodio 0.05 M, pH 5.7
1	Licuada y colador	30 mL	MgCl ₂ 0.1 M
4	Tubos de centrifuga de 15 mL	100 g	Sulfato de amonio
1	Centrífuga	20 mL	MnCl ₂ 1 M
10	Microtubos de 1.5 mL		
2	Gradillas de unicel		
1	Micropipeta de 1 mL, de 200 µL y de 100 µL con puntas		
2	Pipetas Pasteur de plástico		
1	Incubadora a 60-70 °C		
1	Piseta con agua destilada		
1	Probeta de 100 mL		
1	Barra magnética		
1	Platina para agitar (no calentar)		
1	Papa (para el extracto)		

Requerimientos por equipo — Semana 2 (Práctica 11)

#	Material	#	Reactivo
1	Caja de celdas de 1 mL de plástico	10 mL	PNPP 20 mM (fresco)

#	Material	#	Reactivo
1	Espectrofotómetro visible	20 mL	Cloruro de manganeso 1 M
1	Micropipeta de 1 mL y puntillas	50 mL	Reactivo de Bradford
1	KOH	1 mL	Albúmina 1 mg/mL (estándar)

Procedimiento

Primera semana (Práctica 10)

Actividad 1. Preparación de la fosfatasa ácida

1. Pesar **25 g de papa fresca**, pelada y cortada en cubos.
2. Colocar en la licuadora y agregar 50 mL de amortiguador de bicarbonato de sodio 10 mM, pH 6.0.
3. Licuar a velocidad máxima por 1 minuto (o hasta obtener un homogenizado).
4. Filtrar el homogenizado en un colador de cocina de poro pequeño.
5. Vaciar en tubos de centrifuga de 15 mL y equilibrar por peso.
6. Centrifugar a 3500 rpm por 5 minutos.
7. Decantar el sobrenadante en una probeta para medir su volumen.
8. Guardar una alícuota de 1 mL del sobrenadante y rotularlo como **Fracción I**. Reservar en hielo.

Actividad 2. Purificación de la fosfatasa

1. Colocar el sobrenadante en un vaso de precipitado de 150 mL y agitar suavemente con una varilla de vidrio, agregando **MnCl₂ 1 M** (1 mL por cada 50 mL de sobrenadante).
2. Vaciar a tubos de centrifuga de 15 mL y equilibrar por peso.
3. Centrifugar a 3500 rpm por 5 minutos.
4. Recuperar el sobrenadante decantando en una probeta para medir su volumen.
5. Guardar una alícuota de 1 mL como **Fracción II**. Reservar en hielo. El volumen restante se puede descartar.
6. Resuspender el precipitado de un solo tubo agregando 15 mL de acetato de sodio 0.05 M, pH 5.7.

7. Centrifugar a 3500 rpm por 5 minutos para remover la proteína no solubilizada.
8. Recuperar el sobrenadante y guardar una alícuota de 1 mL como **Fracción III**. Reservar en hielo.
9. Transferir el sobrenadante anterior a un vaso de precipitado y agitar suavemente, agregando de poco en poco la proporción correcta de **sulfato de amonio (35 g por cada 100 mL)** para producir una saturación del 35 %.
10. La adición se debe realizar en un periodo de 5 a 10 minutos y quedar totalmente disuelto.
11. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
12. Colocar la mezcla en un tubo de centrífuga y equilibrar por peso.
13. Centrifugar a 3500 rpm por 5 minutos.
14. Recuperar el sobrenadante, medir su volumen y guardar una alícuota de 1 mL como **Fracción IV**. Reservar en hielo.
15. Al sobrenadante anterior, agregar la cantidad correcta de **sulfato de amonio (54 g por cada 100 mL)** para producir una saturación del 54 %. Agregar de poco en poco, agitando suavemente.
16. Vaciar a un tubo de centrífuga y equilibrar por peso.
17. Centrifugar a 3500 rpm por 5 minutos.
18. **Desechar el sobrenadante** y resuspender el precipitado en 15 mL de amortiguador de acetatos 0.05 M.
19. **Incubar a 60 °C por 2 minutos** (el calor desnaturaliza contaminantes termolábiles, no la fosfatasa).
20. Retirar de la incubación y enfriar en hielo por 10 minutos.
21. Centrifugar por 5 minutos a 3500 rpm.
22. Recuperar el sobrenadante y guardar una alícuota de 1 mL como **Fracción V**. Reservar en hielo.
23. Resuspender el precipitado obtenido en el tratamiento térmico en 20 mL de agua destilada.
24. Centrifugar 5 minutos a 3500 rpm para eliminar la fracción insoluble.
25. Recuperar el sobrenadante y alicuotar 1 mL como **Fracción VI**.
26. Almacenar las fracciones a **-20 °C** para su posterior análisis.

Segunda semana (Práctica 11)

Actividad 3. Cuantificación de la actividad y la concentración de proteína

1. Preparar una serie de 7 tubos con **PNPP 20 mM 0.1 mL + agua destilada 0.9 mL**, uno por fracción (I-VI) y un séptimo (VII) como blanco:

Tubo	Etapas de la purificación	PNPP 20 mM (mL)	Agua destilada (mL)
I	Fracción I	0.1	0.9
II	Fracción II	0.1	0.9
III	Fracción III	0.1	0.9
IV	Fracción IV	0.1	0.9
V	Fracción V	0.1	0.9
VI	Fracción VI	0.1	0.9
VII	Blanco	0.1	0.9

2. Incubar los tubos a 37 °C por 5 minutos.

3. **Iniciar la reacción** agregando 100 µL de la fracción correspondiente a cada tubo; al tubo VII (blanco) se le agregan 100 µL de agua destilada.

4. Incubar los tubos a 37 °C por 5 minutos.

5. Retirar de la incubación y **detener** la reacción agregando 100 µL de KOH 0.5 M.

6. Medir la absorbancia a **405 nm**.

7. Adicionalmente, medir la **concentración de proteína** de las fracciones por el método de **Bradford** (con curva estándar de albúmina).

Actividad 4. Análisis electroforético (SDS-PAGE)

1. Esta actividad se realiza **solo si está disponible** el aparato de SDS-PAGE Biorad Mini-Protean II (laboratorio V310; el maestro programa la sesión con antelación).

2. Correr las 6 fracciones en un gel SDS-PAGE previamente elaborado por el maestro.

3. En microtubos, pipetear **20 µL de cada fracción + 5 µL de amortiguador de carga 5x**.

4. Calentar en baño maría a ebullición por 5 minutos.

5. Cargar las muestras en carriles del gel.

6. Correr la electroforesis hasta el punto final y colocar en una charola.

7. Fijar los geles con **metanol al 50 %**.

8. Revelar los geles con **reactivo de Bradford** incubado 2 minutos.

9. Retirar el reactivo y agregar agua; incubar en agitación a temperatura ambiente por 10 minutos.

Actividad 5. Análisis de los datos

1. Calcular las **actividades específicas** de las muestras de cada etapa de la purificación (actividad ÷ proteína).
2. Construir una **tabla de purificación** con: concentración de proteína, actividad, actividad específica, veces de purificación y abundancia relativa (rendimiento).
3. Analizar el grado de purificación del **SDS-PAGE** (la fracción final debe mostrar menos bandas).

Práctica 12. Proyecto final: sobreexpresión de la enzima recombinante NaGSTu17 (dos sesiones)

SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

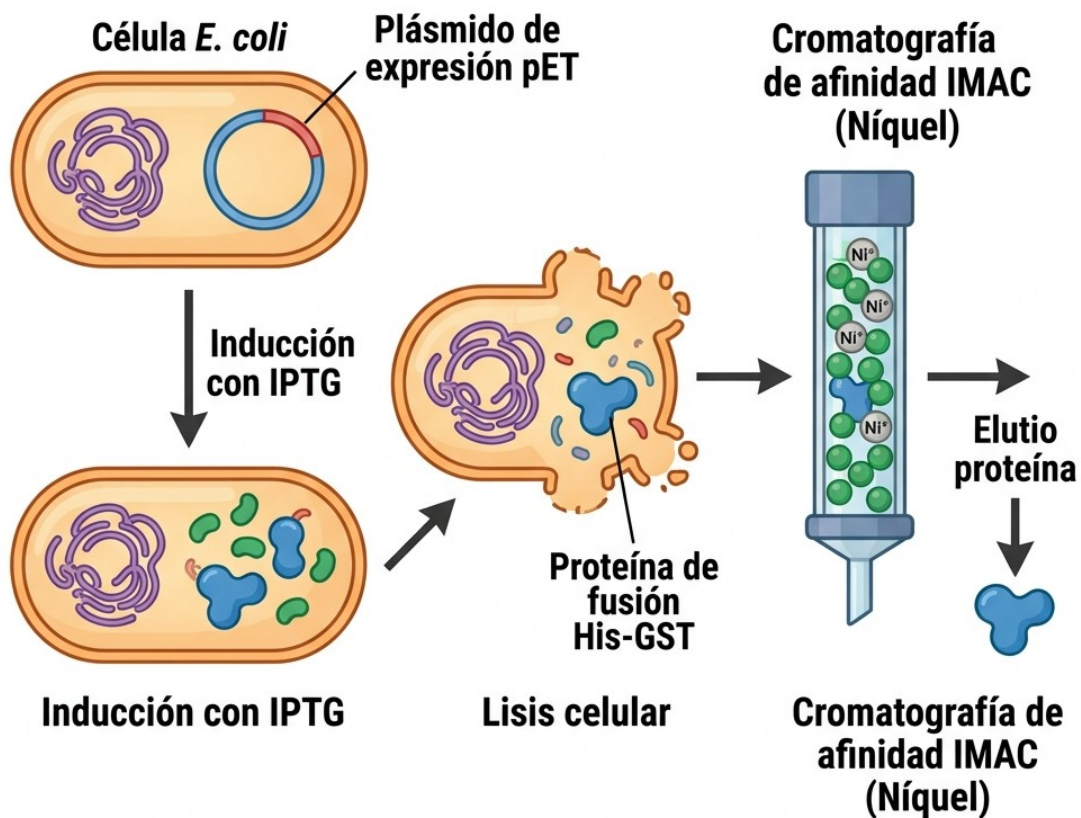


Figura 12.1. Esquema general del flujo de sobreexpresión de la proteína recombinante His-GST en *E. coli* y purificación IMAC.

Propósitos

- Aprender el método de inducción de proteínas recombinantes bajo el control del promotor T7 empleando IPTG
- Comprender la importancia de los cultivos no inducidos como controles de expresión basal
- Realizar el escalamiento de cultivo, la cosecha y la lisis celular por sonicación

- Medir la actividad de la enzima recombinante con el ensayo GST-CDNB

Introducción

La obtención de enzimas recombinantes proporciona numerosas ventajas sobre las fuentes naturales: se pueden producir grandes cantidades de una enzima de interés de forma controlada. En esta práctica se sobreexpresa la **glutación S-transferasa de clase Tau de *Neltuma alba* (mezquite), NaGSTu17** (25.3 kDa), usando el vector **pET-16b** en la cepa **E. coli BL21(DE3)** "Chilanga". El vector añade una **etiqueta de histidinas (His-tag)** y confiere **resistencia a ampicilina**. La expresión se activa con **IPTG** (análogo de la lactosa). Para asegurar que la banda proteica corresponde a la inducción, se usa un **cultivo paralelo sin IPTG** como control de expresión basal. La proteína se libera del interior celular por **sonicación**, y su actividad se mide con el **ensayo GST-CDNB** ($\lambda = 340 \text{ nm}$).

◆ ASPECTO DIDÁCTICO / PROYECTO INTEGRADO

Modalidad proyecto final en paralelo: esta práctica se plantea como **proyecto final** que se desarrolla en paralelo al semestre, para aligerar los días y el tiempo de clase. El docente prepara/enseña el **medio LB**, entrega **una cepa por mesa**, y los equipos realizan el escalado, inducción, cosecha y almacenamiento del pellet; la **sonicación la apoya el docente** (equipo del V310) y el pellet se almacena a **-20 °C** para la siguiente sesión.

◆ NOTA ACADÉMICA

Organización temporal del bloque P11-P15:

◆ NOTA ACADÉMICA

- **P11 y P12 se organizan en paralelo** (purificación clásica de la fosfatasa y sobreexpresión de la GST al mismo tiempo, en días/sesiones distintos).

◆ NOTA ACADÉMICA

- En cuanto el extracto inducido de la **P12 está listo** (misma semana, sesiones 1 y 2, **para que la proteína no se degrade**), se realiza la **P13 (IMAC)**.

◆ NOTA ACADÉMICA

- El **encapsulado (P14)** se hace junto con la medición de la ureasa encapsulada; la P15 (biosensor) se realiza **si es posible**, usando las esferas de la práctica anterior.

◆ NOTA ACADÉMICA

- Este orden evita degradación de la proteína recombinante y aprovecha los tiempos de incubación/cultivo.

◆ RECURSO DIGITAL / INTERACTOMA MODULAR

Disponibilidad: requiere el **laboratorio V310** (sonicador GN-70Pro, incubadora con agitación). Si no hay equipo disponible, la práctica se **aborda de manera teórica** con los datos modelo de la guía de sobreexpresión de Interactoma Modular.

Qué se estudia (didáctica)

¿Qué es la sobreexpresión recombinante?

Clonamos el gen de la GST de mezquite en un plásmido con **promotor T7** (pET-16b). El promotor T7 es silencioso hasta que la bacteria tiene la **ARN polimerasa T7**, que se induce con **IPTG**. Así "encendemos" la producción de la proteína a demanda:

► REACCIÓN QUÍMICA / MECANISMO:

IPTG $\longrightarrow$ ARN polimerasa T7 $\longrightarrow$ transcribe el gen GST $\longrightarrow$ mucha NaGSTu17
(análogo de lactosa) (en el plásmido pET-16b) (His-tag)

¿Por qué un control sin IPTG? El control (cultivo sin inducir) muestra la expresión basal. Al comparar el extracto inducido vs. el no inducido (SDS-PAGE o actividad), confirmamos que la banda/proteína extra es resultado de la inducción, no una proteína propia de la bacteria.

¿Por qué la GST de mezquite? La NaGSTu17 forma parte del **sistema redox del glutatión** de *Neltuma alba*, una planta nativa de zonas áridas. La GST conjuga el glutatión (GSH) a compuestos electrofílicos (como el CDNB) para detoxificarlos — es clave en la resistencia al estrés abiótico. Su sitio G (Ser16) activa el GSH y el sitio H une xenobióticos.

El ensayo GST-CDNB ($\lambda = 340 \text{ nm}$):

► ESQUEMA EXPERIMENTAL / NARRATIVA MOLÉCULAR:

GSH (donador) + CDNB (aceptor) $\xrightarrow{\text{(GST)}}$ GS-DNB (conjugado) + HCl

↓
GS-DNB absorbe a 340 nm ($\epsilon \approx 9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
→ el aumento de absorbancia con el tiempo es
proporcional a la actividad de la GST

- **GSH** (glutatión reducido) = donador
- **CDNB** (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) = aceptor electrofílico

- El conjugado **GS-DNB** se mide a **340 nm**
- Orden de pipeteo: agua → buffer → GSH → CDNB → mezclar → **GST al final** (inicia la reacción)

◆ RECURSO DIGITAL / INTERACTOMA MODULAR

Material de apoyo: en **Interactoma Modular** (interactomamodular.com) está el flujo completo de tu proyecto con calculadoras de IPTG y ampicilina, y los parámetros del sonicador. Ver la **guía de sobreexpresión**: <https://interactomamodular.com/assets/guias/guia-sobreexpresion-enzima-recombinante.pdf>, el **manual IMAC**: <https://interactomamodular.com/assets/guias/manual-imac-purificacion.pdf>, y el *Lab Protocol Suite* → "Flujo Cultivo/Purificación" y "Ensayo GST".

Requerimientos por equipo (Laboratorio V310)

#	Material	#	Reactivo
1	Matraz Erlenmeyer (250 mL)	100 mL	Medio LB estéril
2	Tubos Falcon (50 mL)	1	Ampicilina 100 mg/mL
1	Juego de micropipetas y puntas (10, 200 y 1000 µL)	1	IPTG 1 M
1	Sonicador (GN-70Pro o con micropunta)	1	Búfer de lisis (Tris 50 mM pH 7.2, KCl 50 mM, glicerol 10 %, DTT 2 mM)
1	Incubadora de 37 °C con agitación (225 rpm)	20 mL	PBS 1x
1	Centrífuga refrigerada (6000-10000 rpm)	1 mg	Lisozima liofilizada (opcional)
1	Espectrofotómetro UV-Vis	1 mL	GSH 50 mM
2	Celdas de espectrofotómetro de 1 mL	1 mL	CDNB 50 mM
1	Microcentrífuga de 10000 rpm	1 mL	Búfer base 4x (Tris 50 mM pH 7.2, KCl 50 mM)
2	Vasos de precipitado		

#	Material	#	Reactivo
1	Bolsa de hielo		
c/n	Etiquetas de rotulación o masking tape		
1	Cepa de E. coli BL21(DE3) "Chilanga" con pET-16b-NaGSTu17 (una por mesa)		

◆ NOTA ACADÉMICA

Medio de cultivo: usar **LB** (Luria-Bertani) suplementado con ampicilina 50-100 µg/mL. El docente puede preparar el medio y enseñar a hacerlo; para suprimir la expresión basal del operón lac, se puede complementar con glucosa 0.2 %.

Diagrama de lo general a lo particular

¿Cómo encaja todo? Del sistema redox del mezquite hasta la señal de 340 nm:

► ESQUEMA EXPERIMENTAL / NARRATIVA MOLÉCULAR:

NIVEL 1 · EL SISTEMA (¿por qué esta proteína?)

Neltuma alba (mezquite) vive en zonas áridas → estrés abiótico → sistema redox del glutatión (GSH) para detoxificar y sobrevivir.
Proteínas clave: GPX4 · GST U17 (NaGSTu17) · Tiorredoxina



NIVEL 2 · LA ENZIMA (¿qué hace?)

NaGSTu17 = Glutatión S-transferasa clase Tau (25.3 kDa)
Cataliza: GSH + xenobiótico → conjugado (detoxificación)
Dos sitios:
· SITIO G → une y activa el GSH (residuo catalítico Ser16)
· SITIO H → bolsillo hidrofóbico que une el xenobiótico (p. ej., CDNB; apilamiento π con Phe110)



NIVEL 3 · LA REACCIÓN (¿qué medimos?)

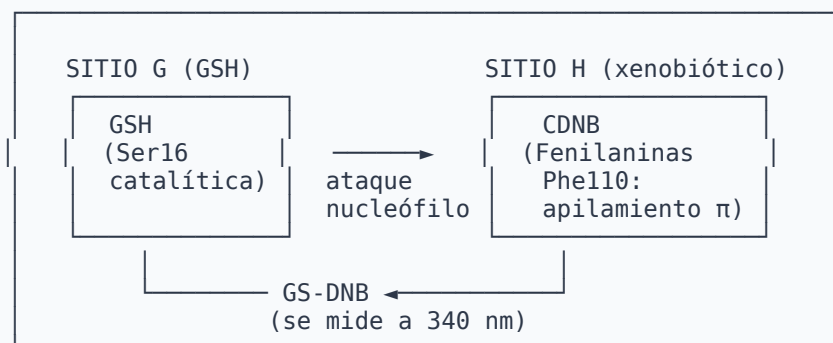
GSH (donador) + CDNB (aceptor) $\xrightarrow{\text{(GST)}}$ GS-DNB + HCl
· El CDNB entra al SITIO H (bolsillo hidrofóbico)
· El GSH activado en el SITIO G ataca al CDNB
· El conjugado GS-DNB absorbe a 340 nm ($\epsilon \approx 9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
→ la pendiente de A_{340} vs tiempo = actividad de la GST

NIVEL 4 · EL EXPERIMENTO (¿cómo la obtenemos?)

Sobreexpresar NaGSTu17 en E. coli (pET-16b, IPTG) →
lisis → ensayo GST-CDNB → actividad inducido vs. control

Cómo se liga el CDNB con el sitio de la enzima (vista molecular):

► **ESQUEMA EXPERIMENTAL / NARRATIVA MOLÉCULAR:**
SITIO ACTIVO de NaGSTu17 (homodímero)



◆ RECURSO DIGITAL / INTERACTOMA MODULAR

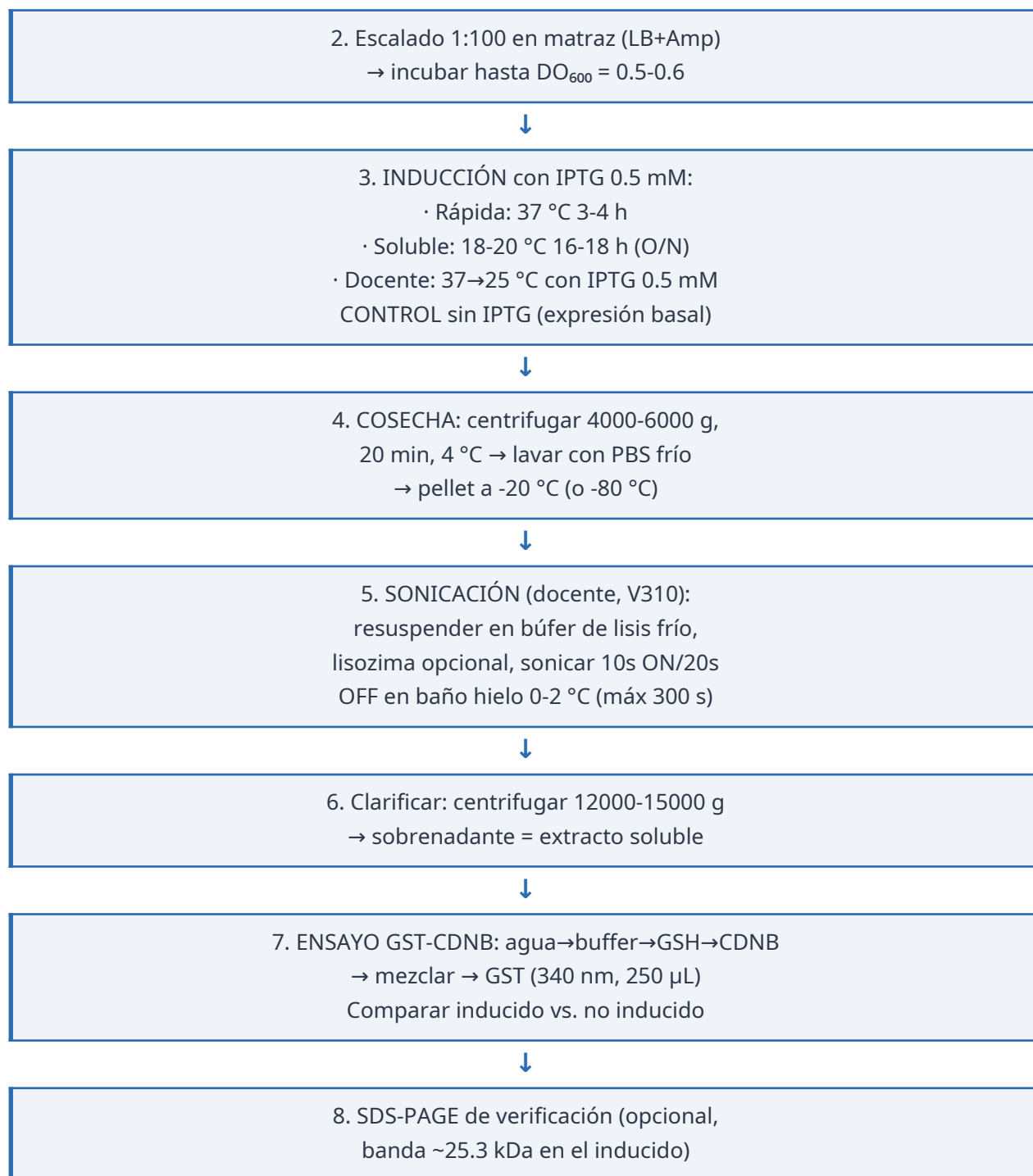
Apoyo con la página web (Interactoma Modular): en interactomamodular.com (sección *Difusión* → **NaGSTu17**) puedes **explorar el modelo 3D interactivo** de la enzima: localizar el residuo catalítico **Ser16** (sitio G), el bolsillo hidrofóbico del **sitio H** (residuos que unen el CDNB y la quercetina), la estructura homodimérica y el **docking** con ligandos (GSH, CDNB, quercetina). También están los parámetros ProtParam (25.3 kDa, pI 5.98), la secuencia y las animaciones ChimeraX. Es el "cerebro" detrás de lo que haces en el laboratorio.

Diagrama de flujo profesional

► **DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO**

P12: PROYECTO SOBREEXPRESIÓN NaGSTu17

1. Pre-inóculo: colonia en 5 mL LB+Amp
(O/N, 37 °C, 220-250 rpm)



Procedimiento

Actividad 1. Escalamiento del cultivo

1. Cultivo inicial: inocular 1 mL de LB+Amp en un tubo con la clona bacteriana (cepa E. coli "Chilanga" con pET-16b-NaGSTu17). Incubar 6-8 h a 37 °C (con agitación o según disponibilidad).

2. Pre-inóculo: escalar a 5 mL en tubo Falcon de 50 mL estéril (LB + ampicilina 50-100 µg/mL). Incubar toda la noche a 37 °C y 220-250 rpm.

3. Escalamiento final: inocular el medio fresco (LB+Amp) a una **dilución 1:100** (p. ej., 2.5 mL de pre-inóculo en 250 mL) en el matraz. Incubar a 37 °C con agitación (225 rpm) hasta alcanzar una **DO₆₀₀ de 0.5 a 0.6** (fase exponencial).

◆ **NOTA ACADÉMICA**

Monitorear el crecimiento midiendo la DO₆₀₀ cada 30-45 min. **Inducir estrictamente en fase exponencial (0.4-0.6)**. Si supera 0.8, baja la expresión y aumenta la agregación en cuerpos de inclusión.

Actividad 2. Inducción con IPTG

1. Dividir el cultivo en dos matraces: **"Inducido"** y **"Control"**.

2. Añadir **IPTG a 0.5 mM** únicamente al matraz "Inducido" (p. ej., 125 µL de IPTG 1 M por 250 mL). El matraz "Control" no recibe inductor.

◆ **NOTA ACADÉMICA**

Condiciones de inducción (se explican ambas, el docente elige):

◆ **NOTA ACADÉMICA**

- **Rápida:** 37 °C por 3-4 h (mayor velocidad, pero más cuerpos de inclusión).

◆ **NOTA ACADÉMICA**

- **Soluble:** 18-20 °C durante la noche (16-18 h) (mejor plegamiento y mayor fracción soluble).

◆ **NOTA ACADÉMICA**

- **Opción del docente:** incubar de **37 → 25 °C** con IPTG 0.5 mM (compromiso entre velocidad y solubilidad).

3. Incubar ambos matraces en las condiciones elegidas, con agitación (225 rpm).

4. Cosechar el cultivo centrifugando a 6000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Retirar el sobrenadante sobre un vaso de precipitados con **hipoclorito de sodio al 4 %** (para eliminar las bacterias). Recuperar el **paquete celular**.

5. Lavar el pellet: resuspender suavemente en 10-20 mL de PBS 1x frío, volver a centrifugar y descartar el sobrenadante.

6. Almacenar el pellet seco y cerrado a **-20 °C** (o -80 °C si está disponible) hasta la sonicación. *Si el tiempo de clase no alcanza, aquí se detiene y se retoma la siguiente sesión.*

Actividad 3. Lisis por sonicación (apoyo del docente, V310)

1. Resuspender el pellet celular descongelado en **5 mL de búfer de lisis frío** (Tris 50 mM pH 7.2, KCl 50 mM, glicerol 10 %, DTT 2 mM). Mantener en hielo. *Resuspender bien, sin grumos, para una sonicación homogénea.*

2. (Opcional) Agregar **lisozima** (hasta 1 mg/mL) e incubar en hielo 15-30 min antes de sonicar, para facilitar la lisis.

3. Sonicar con el equipo GN-70Pro (80 W, 40 kHz): ciclo **10 s ON / 20 s OFF**, en **baño de hielo+agua (0-2 °C)**, máximo 300 s activos por sesión, con descansos. *Nunca sonicar con la punta al aire; mantenerla sumergida.*

4. Clarificar: centrifugar el lisado a 12000-15000 g por 20-30 min a 4 °C.

5. Recuperar el **sobrenadante (extracto soluble libre de células)** en tubos limpios, rotulados como *inducido* o *control*. Reservar en hielo. (El pellet contiene cuerpos de inclusión y restos; descartar o conservar si se sospecha proteína insoluble.)

Actividad 4. Determinación de la actividad de la GST (ensayo GST-CDNB)

1. En celdas o pocillos de microplaca, pipetear en este orden (volumen final 250 µL):

Paso	Componente	Volumen (µL)
1	Agua destilada (c.b.p.)	167.5
2	Búfer base 4x (dilución a 1x)	62.5
3	GSH	5.0
4	CDNB	5.0
—	Mezclar / resuspender	—
5	GST (extracto, al final — inicia la reacción)	10.0

2. Colocar la celda en el espectrofotómetro y ajustar la absorbancia a **cero a 340 nm**.

3. Iniciar la reacción agregando el extracto de GST (inducido o control) al final y agitar suavemente.

4. Registrar la absorbancia **cada 10 segundos por 3 minutos** (el aumento de A_{340} refleja la formación del conjugado GS-DNB).

5. Comparar la velocidad del extracto **inducido vs. no inducido**: el inducido debe mostrar una pendiente claramente mayor.

Actividad 5. Análisis de los datos y verificación

1. Calcular la **velocidad inicial (v_0)** de cada muestra con =PENDIENTE (. . .) en Excel ($\Delta A_{340}/\text{min}$).

2. Convertir a **actividad** usando el coeficiente de extinción molar del GS-DNB ($\epsilon \approx 9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y la longitud de paso.

3. Comparar la actividad específica del extracto inducido vs. el control (debe haber diferencia clara, demostrando la sobreexpresión).

4. (Opcional) SDS-PAGE: verificar la aparición de una banda de $\sim 25.3 \text{ kDa}$ en el extracto inducido que no está en el control. Correr con marcador de peso molecular y revelar con azul de Coomassie o Bradford.

Actividad 6. Discusión

1. Explicar por qué el control sin IPTG no presenta la banda/actividad de la GST.

2. Discutir el papel de la GST de *Neltuma alba* en el sistema redox del glutatión (detoxificación de xenobióticos y tolerancia al estrés abiótico).

3. Relacionar este proyecto con la Práctica 13 (purificación IMAC de la His-GST) y con las cinéticas del semestre.

Práctica 13. Proyecto final: purificación de la His-GST por IMAC (dos sesiones)

Propósitos

- Purificar la enzima recombinante His-GST (NaGSTu17) mediante cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC)
- Comprender el papel del imidazol en la elución por competencia estructural
- Evaluar la actividad catalítica de la GST purificada con el ensayo CDNB

Introducción

La cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (**IMAC**) es una de las técnicas más empleadas para purificar proteínas recombinantes con **etiqueta de histidinas (His-tag)**. La separación se logra por la afinidad entre la polihistidina y los iones **Ni²⁺** inmovilizados en la resina. El **imidazol** (análogo estructural de la histidina) permite lavar contaminantes a baja concentración y **eluir la proteína de interés a concentraciones altas** (350-500 mM). Esta práctica usa el **extracto sobreexpresado de la Práctica 12** (NaGSTu17 con His-tag) y continúa con la **tabla de purificación** aprendida en la Práctica 11.

◆ ASPECTO DIDÁCTICO / PROYECTO INTEGRADO

Proyecto integrado P11-P12-P13: la Práctica 11 enseñó a construir la tabla de purificación (actividad específica, factor, rendimiento); la Práctica 12 sobreexpresó la NaGSTu17 recombinante; esta Práctica 13 **purifica la proteína por IMAC** y aplica la tabla de purificación. Las tres forman un **proyecto final integrado**.

◆ NOTA ACADÉMICA

Ubicación y montaje: esta práctica se realiza **en el salón de clases (H1, segundo piso)**, no en el V310 (la sobreexpresión de la P12 sí usa el V310). La purificación IMAC se puede hacer de dos formas:

◆ NOTA ACADÉMICA

- **Montaje didáctico/rústico: resina de Ni²⁺ en jeringas o tubos grandes** (columna de gravedad), como lo hace el docente — la química IMAC (His₆ ↔ Ni²⁺ ↔ imidazol) se conserva aunque cambie el soporte físico.

◆ NOTA ACADÉMICA

- **Resina ya lista:** la **resina pre-empacada que proporcionan los técnicos** para esta clase.

◆ **NOTA ACADÉMICA**

Importante: la resina **nunca debe secarse**; mantenerla siempre húmeda.

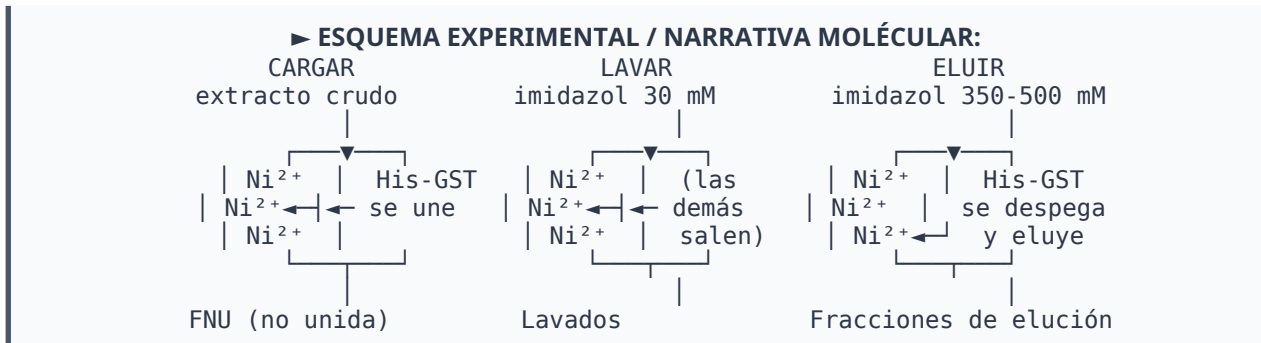
◆ **NOTA ACADÉMICA**

Disponibilidad: si no hay resina de Ni^{2+} disponible en las islas, la práctica se **aborda de manera teórica** con los datos modelo del cromatograma y la tabla de purificación.

Qué se estudia (didáctica)

¿Qué es IMAC?

La His-tag de la proteína (6 histidinas) tiene alta afinidad por el Ni^{2+} de la resina. Al pasar el extracto por la columna, la His-GST **se une**, mientras las demás proteínas (sin His-tag) salen:

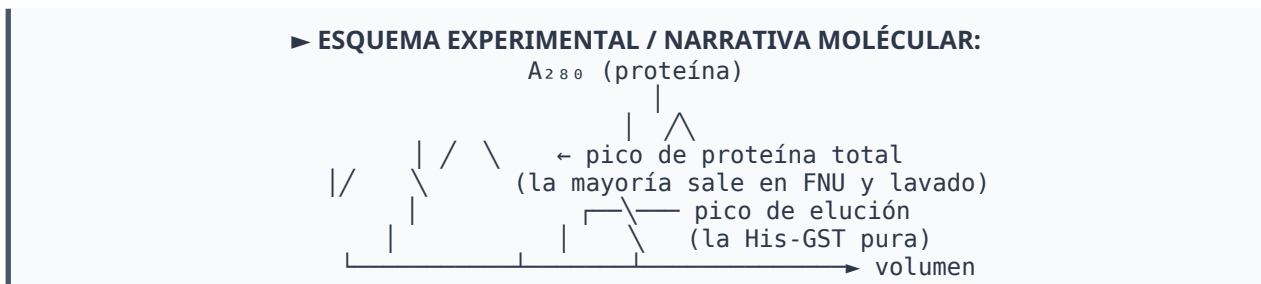


¿Por qué el imidazol?

El imidazol es un **análogo de la histidina**: compite con la His-tag por el sitio del Ni^{2+} .

- A **30 mM**: desplaza solo las proteínas que se unieron débilmente (contaminantes) → **lavado**.
- A **350-500 mM**: desplaza la His-GST (unión fuerte) → **elución** de la proteína pura.

El cromatograma (lo que se grafica):



CARGAR LAVADO ELUCIÓN
imidazol → 30 mM 350-500 mM

◆ NOTA ACADÉMICA

La mayor parte de la proteína (contaminantes) sale en la **carga y el lavado**; la His-GST sale como un **pico pequeño pero limpio** en la elución. Al medir actividad GST-CDNB, el pico de actividad debe coincidir con el pico de elución.

La tabla de purificación (de la P11, aplicada aquí):

Fracción	Proteína (Bradford)	Actividad (CDNB)	Actividad específica	Factor de purificación
Extracto crudo (P12)	Alta	Baja (mezclada)	Baja	1×
Fracción no unida (FNU)	Alta	Baja	Baja	~1×
Lavado	Media	Muy baja	—	—
Elución (IMAC)	Baja	Alta	Alta	3-7×

◆ NOTA ACADÉMICA

Una buena purificación muestra **más actividad específica** en la elución (aunque haya menos proteína total) — se concentró la enzima de interés.

◆ RECURSO DIGITAL / INTERACTOMA MODULAR

Material de apoyo: en **Interactoma Modular** (interactomamodular.com → *Lab Protocol Suite* → "Purificación IMAC") está el flujo completo con la calculadora de volúmenes (CV), el cromatograma interactivo, el stripping/recarga de Ni²⁺ y el almacenamiento (EtOH 20 %). Ver el **manual IMAC**: <https://interactomamodular.com/assets/guias/manual-imac-purificacion.pdf> y la **guía de densitometría SDS-PAGE**: <https://interactomamodular.com/assets/guias/densitometria-sds-page.html>.

Requerimientos por equipo

Para la purificación IMAC (en el salón H1):

#	Material	#	Reactivo
1	Columna IMAC (1 mL, HisTrap) • jeringa de 5 mL con resina de Ni ²⁺ • tubos grandes con resina (montaje didáctico)	1	Extracto crudo (Práctica 12, inducido)
2	Jeringas estériles de 5 mL	20 mL	Búfer de equilibrio: Tris 50 mM pH 7.2, KCl 50 mM, imidazol 30 mM, glicerol 10 %
1	Espectrofotómetro UV-Vis	20 mL	Búfer de lavado: Tris 50 mM pH 7.2, KCl 50 mM, imidazol 50 mM, glicerol 10 %
1	Celdillas de cuarzo (1 mL)	20 mL	Búfer de elución: Tris 50 mM pH 7.2, KCl 50 mM, imidazol 350-500 mM, glicerol 10 %
8	Microtubos Eppendorf (1.5 mL)	1 mL	GSH 50 mM (glutación reducido)
1	Juego de micropipetas y puntas (10, 200, 1000 µL)	1 mL	CDNB 50 mM
2	Gradillas para microtubos	20 mL	Búfer base 1x para ensayo de actividad
1	Balanza granataria	10 mL	Reactivo de Bradford 1x
1	Piseta con agua destilada	1 mL	Albúmina 1 mg/mL (estándar)
2	Vasos de precipitado de 100 mL		
1	Equipo de venoclisis		
1	Bolsa de hielo		

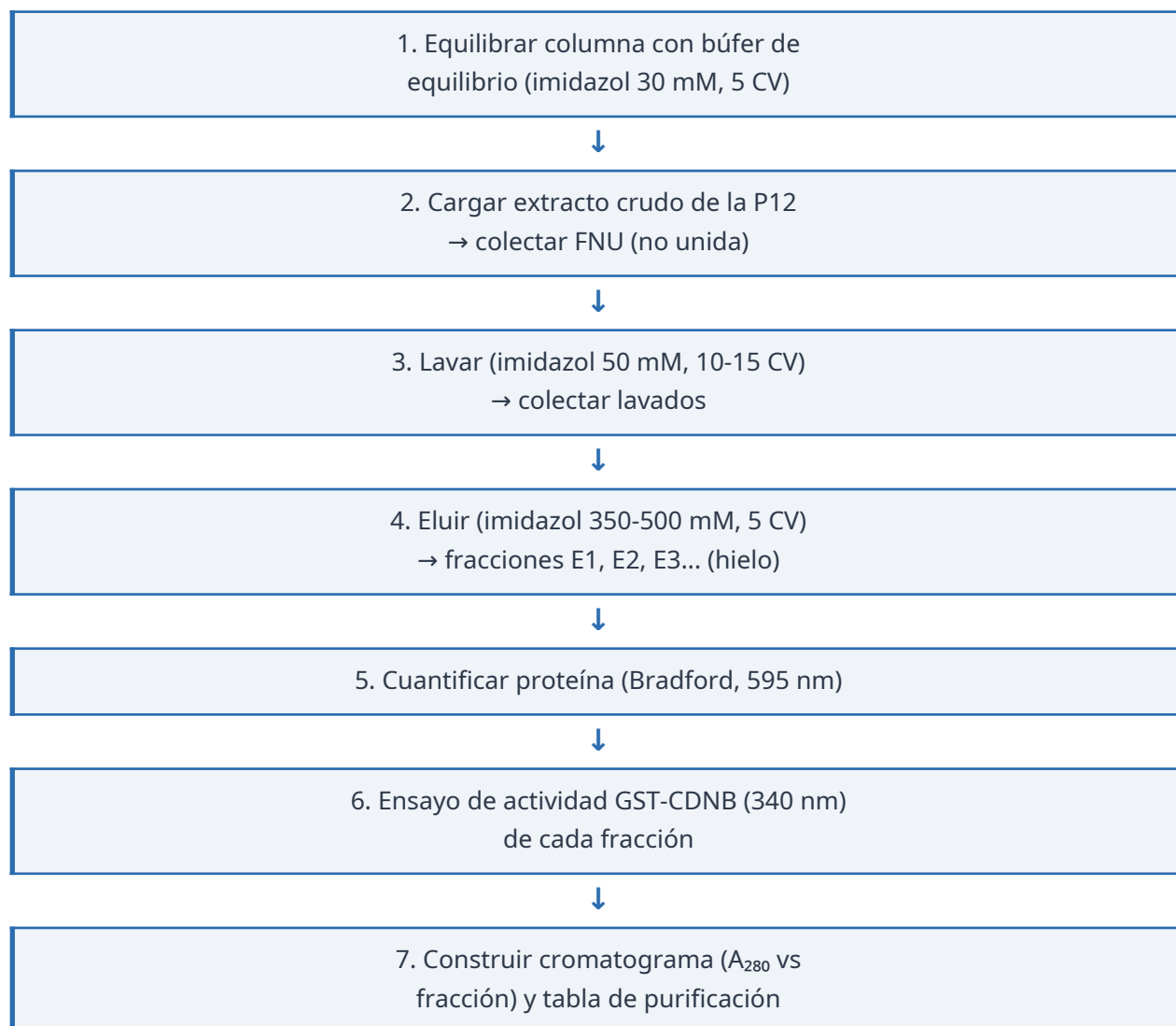
#	Material	#	Reactivo
c/n	Resina de Ni ²⁺ -Sefarosa (la proporcionan los técnicos para la clase)		

Para el SDS-PAGE (verificación):

#	Material	#	Reactivo
1	Equipo de electroforesis (minigel + fuente)	c/n	Acrilamida/bis-acrilamida 30 % (29:1)
1	Placas y peines para gel	c/n	Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 y Tris-HCl 0.5 M pH 6.8
1	Baño o termobloque a 95-100 °C	c/n	SDS 10 %
c/n	Micropipetas y puntas	c/n	APS 10 %
		c/n	TEMED
		c/n	Búfer de carga Laemmli 4x (SDS + β-ME/DTT)
		c/n	Búfer de corrida (Tris-glicina-SDS)
		c/n	Azul de Coomassie R-250 y solución destiñidora
		1	Marcador de peso molecular (10-250 kDa)

(El docente apoya en la preparación de los geles y el montaje de la electroforesis.)

Diagrama de flujo profesional**► DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO****P13: PURIFICACIÓN IMAC DE LA His-GST**



Procedimiento

Actividad 1. Preparación de la columna IMAC

◆ NOTA ACADÉMICA

Montaje: se puede usar una **columna HisTrap**, una **jeringa de 5 mL con la resina** (con un círculo de material poroso en el fondo y manguera de venoclisis para controlar el flujo), o **tubos grandes** con la resina en modo batch. Todos funcionan por **gravedad**; la química IMAC (His₆ ↔ Ni²⁺ ↔ imidazol) es la misma. **La resina nunca debe secarse.**

◆ NOTA ACADÉMICA

Recomendación: es preferible **optar por las resinas ya preparadas del laboratorio H1** (donde

se toma clase) para **no gastar recursos del V310**. En el H1 las tienen disponibles; solo hace falta **regenerarlas** (stripping con EDTA para despojar el Ni^{2+} y recarga con $\text{NiSO}_4/\text{NiCl}_2$ 0.1 M) como indica el manual de IMAC / la bitácora, antes de equilibrar con el búfer de unión.

- 1. Equilibrar** la columna con **5 mL de búfer de equilibrio** (imidazol 30 mM). Permitir que fluya por gravedad y desechar el flujo de salida.
- 2. Cargar** el extracto crudo soluble obtenido en la Práctica 12 (inducido) lentamente sobre la columna.
- 3. Colectar el flujo de salida** en un tubo limpio y rotularlo como **fracción no unida (FNU)**.
- 4. Lavar** la columna con **15 mL de búfer de lavado** (imidazol 50 mM), colectando alícuotas de 1-2 mL en tubos rotulados con números ascendentes (Lavado 1, 2, 3...).
- 5. Eluir** la proteína unida con **5 mL de búfer de elución** (imidazol 350-500 mM). Fraccionar en microtubos Eppendorf de 0.5 mL, rotulados como **fracciones eluidas** con números ascendentes (E1, E2, E3...).
- 6. Reservar todas las fracciones en hielo** hasta su análisis.

◆ **NOTA ACADÉMICA**

Volúmenes (CV = volumen de columna de 1 mL): agua 3-5 CV → equilibrar ≥ 5 CV → lavar 10-15 CV → eluir ≥ 5 CV. Flujo óptimo ~ 1 mL/min. *Ajustar el pH de la muestra a 7.4 antes de cargar.*

Actividad 2. Cuantificación de proteína por Bradford

- 1.** Preparar una serie de celdillas con estándar de albúmina 1 mg/mL y muestras:

Celdilla	Estándar de albúmina (μL)	Muestra (μL)	Agua destilada (μL)
1 (blanco)	0	0	1000
2	5	0	995
3	25	0	975
4	50	0	950
5	0	5	995
6	0	10	990
7	0	20	980

2. Pipetear **1 mL de reactivo de Bradford 1x** a cada celdilla; mezclar por resuspensión.
3. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente y medir absorbancia a **595 nm**, calibrando a cero con la celdilla 1.
4. Calcular la concentración de proteína de cada fracción **interpolando en la curva estándar**.

Actividad 3. Ensayo de actividad GST-CDNB

1. Pipetear los siguientes componentes en celdas de espectrofotómetro (volumen final 1000 μ L), en el orden indicado:

Componente	Volumen (μ L)
Búfer base 1x	800
GSH 50 mM	20
CDNB 50 mM	20
Fracción de enzima	10-50
Agua destilada (c.b.p.)	a 1000 μ L

◆ NOTA ACADÉMICA

GSH y CDBN en exceso para asegurar la medición de la velocidad inicial. Realizar el ensayo para **cada fracción** (FNU, lavados, eluciones) y para el **extracto crudo** (comparación).

2. Colocar la celdilla en el espectrofotómetro y ajustar la absorbancia a **cero a 340 nm**.
3. **Iniciar la reacción** añadiendo la fracción de enzima (al final). Agitar rápidamente con la punta y medir **Δ Abs a 340 nm cada 10 segundos por 3 minutos**.
4. Calcular la **velocidad inicial (Δ Abs/min)** con =PENDIENTE (. . .) para identificar las fracciones activas.
5. Graficar el cambio de absorbancia vs. tiempo y calcular la velocidad inicial de cada fracción.

Actividad 4. Análisis de los resultados (cromatograma y tabla de purificación)

1. Elaborar una **tabla de purificación** con: concentración de proteína, actividad, actividad específica (actividad $\div$ proteína), unidades totales, veces de purificación y abundancia relativa (rendimiento) de cada fracción.
2. Elaborar un **gráfico de dos ejes Y**: en uno la concentración de proteína por fracción y en el otro la actividad enzimática observada (**cromatograma**).

3. Juntar las fracciones de elución con actividad catalítica y preparar las muestras para el SDS-PAGE.

4. Comparar los parámetros de la tabla de purificación (factor de purificación esperado 3-7×) y discutir el resultado.

Actividad 5. Verificación por SDS-PAGE (se prepara en el salón; el docente apoya)

◆ NOTA ACADÉMICA

Dato clave de la proteína: la **NaGSTu17** tiene un peso molecular monomérico de **25.34 kDa** (229 aminoácidos + His-tag C-terminal; pI 5.98). Por eso, en el carril del extracto **inducido** y en la **elución IMAC** debe observarse una **banda de ~25.3 kDa** que **no aparece** en el control sin inducir. En condiciones nativas la enzima es un **homodímero** (~50 kDa), pero el SDS-PAGE desnatura y separa los monómeros (~25.3 kDa).

Preparación de las muestras:

1. En microtubos, mezclar **20 µL de cada muestra** (extracto crudo inducido, extracto crudo control, FNU, lavado y elución) con **5 µL de búfer de carga Laemmli 4x** (SDS + β-mercaptoetanol o DTT).

2. **Desnaturalizar** a 95-100 °C por 5-10 minutos.

3. Centrifugar brevemente antes de cargar.

Receta del gel (12 % separador — según la bitácora DCQB / Interactoma):

Gel separador al 12 %	Volumen
Agua destilada	~3.3 mL
Acrilamida/bis-acrilamida 30 % (29:1)	~4.0 mL
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	~2.5 mL
SDS 10 %	~0.1 mL
APS 10 %	~0.1 mL
TEMED	~0.004 mL (4 µL)

Gel concentrador al 4-5 %	Volumen
Agua destilada	~2.1 mL
Acrilamida/bis-acrilamida 30 %	~0.5 mL
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	~0.38 mL

Gel concentrador al 4-5 %	Volumen
SDS 10 %	~0.03 mL
APS 10 %	~0.03 mL
TEMED	~0.005 mL (5 µL)

(El APS y el TEMED se agregan al final, justo antes de verter el gel, porque polimerizan la acrilamida. El docente apoya en la preparación.)

Carriles recomendados:

Carril	Muestra	Banda esperada
1	Marcador de peso molecular (10-250 kDa)	Referencia
2	Extracto crudo inducido (P12)	Banda ~25.3 kDa (sobreexpresión)
3	Extracto crudo control (sin IPTG)	Sin banda o muy débil
4	Fracción no unida (FNU)	Sin banda (o débil)
5	Lavado	Sin banda
6	Elución IMAC	Banda ~25.3 kDa (pura)
7	(opcional) Control positivo (GST comercial)	Banda ~25.3 kDa

Revelado:

1. Correr la electroforesis hasta el punto final.
2. Fijar con metanol al 50 % (o solución fijadora estándar).
3. Teñir con **azul de Coomassie R-250** (o Bradford coloidal) durante ~30-60 min con agitación.
4. Destiñir hasta ver las bandas claramente.
5. Fotografíar y comparar: la **banda de 25.3 kDa** debe aparecer en el inducido y en la elución, confirmando la sobreexpresión y purificación de la NaGSTu17.

◆ NOTA ACADÉMICA

Densitometría (opcional): cuantificar la pureza relativa con ImageJ/Fiji si se desea (una banda

única >95 % en la elución indica buena purificación).

Práctica 14. Encapsulamiento o inmovilización de una enzima

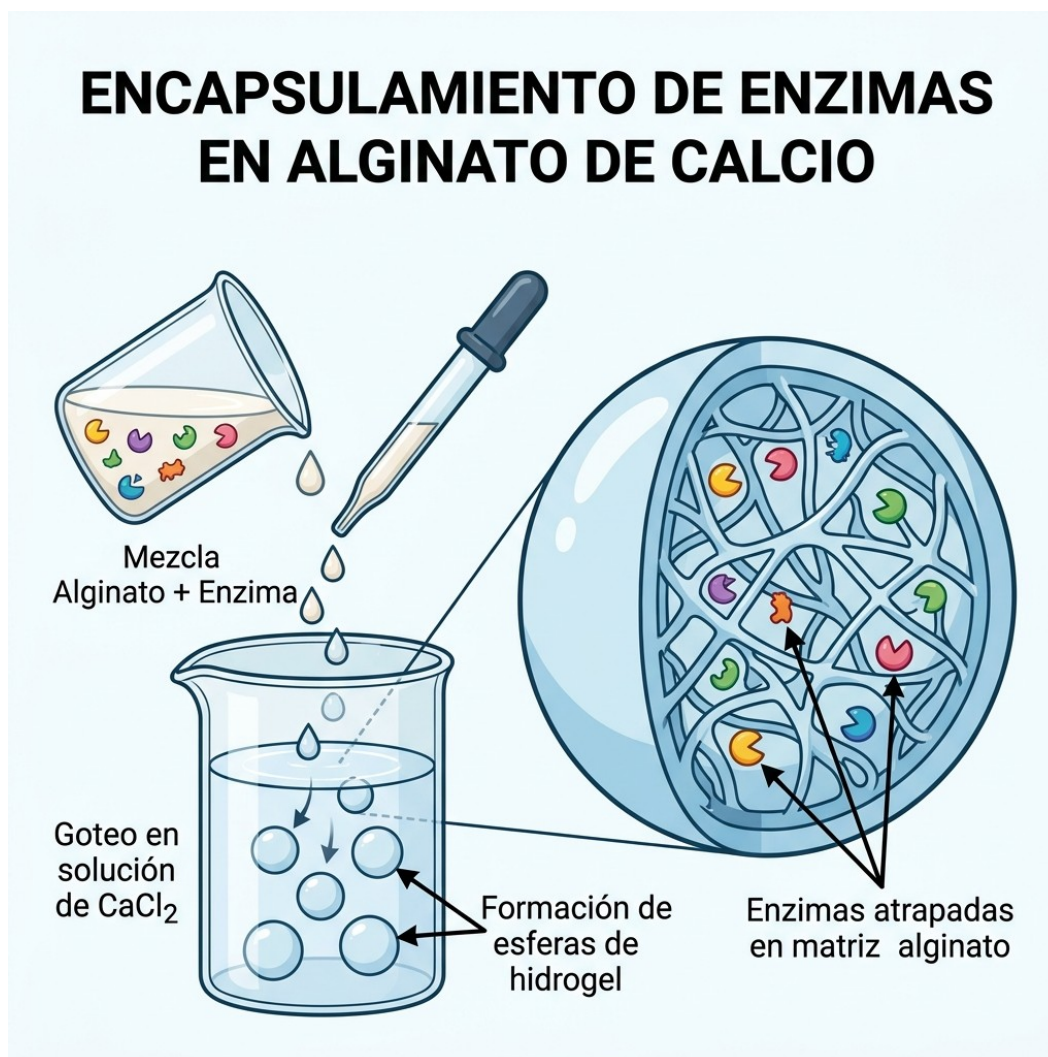


Figura 14.1. Mecanismo de encapsulamiento e inmovilización de enzimas en esferas de hidrogel de alginato de calcio.

Propósitos

- Aprender un método general para inmovilizar enzimas y monitorear su actividad

Introducción

La inmovilización es la mezcla de un biocatalizador con un soporte insoluble. Cinco métodos: adsorción, unión covalente, atrapamiento electrostático, encapsulamiento y entrecruzamiento. El **alginato de sodio** se polimeriza al contacto con CaCl_2 , encapsulando la enzima en esferas. En esta práctica se encapsula la **ureasa** (de semilla de sandía o melón) en esferas de alginato de calcio, que servirán como **biosensor en la Práctica 15**.

◆ NOTA ACADÉMICA

Organización: el encapsulado (P14) se realiza junto con la medición de la ureasa encapsulada (P15) — se hacen en la misma sesión **si es posible**, para aprovechar las esferas recién preparadas y que la enzima no se degrade. La P15 usa las esferas como biosensor.

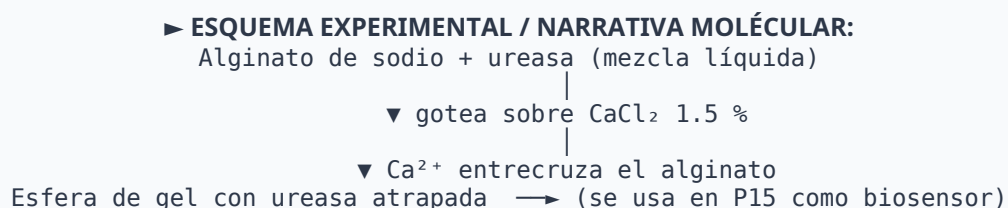
Qué se estudia (didáctica)

¿Por qué inmovilizar una enzima?

Ventaja	Qué logra
Reutilización	La enzima se recupera del medio (las esferas se separan fácilmente)
Estabilidad	La enzima queda protegida dentro del gel
Biosensor	Las esferas con ureasa se usan en la P15 para detectar urea

¿Cómo se forma la esfera?

El **alginato de sodio** es un polímero soluble en agua. Cuando una gota de alginato (con la enzima) toca una solución de **CaCl₂**, los iones **Ca²⁺** entrecruzan las cadenas del polímero formando un **gel insoluble**: la esfera. La enzima queda **atrapada** dentro:



El goteo (paso clave):

◆ NOTA ACADÉMICA

La mezcla alginato-ureasa se deja caer **gota a gota** sobre la solución de CaCl₂ en agitación. El método más **fácil, barato e igual de efectivo** es usar una **pipeta Pasteur** para dejar caer las gotas; también puede usarse una **jeringa con manguera de venoclisis** si se prefiere controlar mejor el flujo. Las gotas deben ser de **tamaño uniforme** (~2-3 mm) para que las esferas sean comparables en el análisis.

◆ RECURSO DIGITAL / INTERACTOMA MODULAR

Material de apoyo: en **Interactoma Modular** está la **guía de encapsulamiento y actividad de la ureasa** (inmovilización en esferas de alginato de calcio, evaluación del rendimiento y cinética comparativa): <https://interactomamodular.com/assets/guias/encapsulamiento-actividad-ureasa.pdf>.

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
1	Piseta con agua	100 mL	PBS 1x filtrado
1	Micropipeta y puntas	20 mL	CaCl ₂ 1.5 % (m/V)
2	Vasos de precipitado de 100 mL	10 mL	Extracto de ureasa (P4/P15)
1	Soporte universal	0.5 g	Alginato de sodio
2	Pinzas de nuez para soporte	10 mL	Reactivo de Bradford 1x
1	Barra magnética pequeña		
2	Tubos cónicos de 15 mL		
1	Platina para agitar (no calentar)		
2	Pipetas de 10 mL con pro-pipeta		
1	Microscopio de campo claro con porta/cubreobjetos		
1	Navaja de un filo		
1	Centrífuga clínica		
1	Balanza granataria		

Por alumno / para todo el grupo

#	Material
2	Jeringas estériles de 5 mL (o pipetas Pasteur para el goteo)
1	Equipo de venoclisis
1	Semillas de sandía o de melón molidas (para el extracto de ureasa)
1	Bolsa de hielo

Procedimiento

Actividad 1. Extracción de la ureasa de semilla de sandía (o de melón)

◆ NOTA ACADÉMICA

Fuente de la enzima: la ureasa se puede obtener de **semillas de sandía** (fuente clásica) o de **semillas de melón** (alternativa igual de válida); ambas son fuentes vegetales de ureasa con actividad suficiente para el ensayo. Usar la que esté disponible.

1. Pesar **2.0 g de semilla** (de sandía o de melón) seca y molida; resuspender en **13 mL de agua destilada**.
2. Centrifugar a 3500-6000 rpm por 5 minutos (equilibrar por peso).
3. Recuperar el sobrenadante, rotularlo como **ureasa** y reservar en hielo.

Actividad 2. Preparación de la mezcla de alginato y enzima

1. Preparar un **coloide de alginato**: mezclar **0.5 g de alginato de sodio** en **12.5 mL de agua destilada**.
2. Mezclar hasta lograr homogeneidad, calentando a 60 °C si es necesario.
3. Permitir que la mezcla se atempere al ambiente.
4. **Mezclar el coloide de alginato con un volumen igual de ureasa** (proporción 1:1, p. ej., 10 mL de alginato + 10 mL de ureasa; ajustar según el volumen de coloide preparado).
5. Reservar en hielo hasta su uso.

Actividad 3. Preparación de las esferas de alginato-ureasa

1. En un vaso, colocar **5 mL de solución de CaCl₂ al 1.5 %** frío.
2. Agitar con una barra magnética en una platina a **muy baja velocidad**.

- 3. Goteo:** cargar la mezcla alginato-ureasa en una **pipeta Pasteur** (método recomendado: fácil, barato y efectivo) o en una **jeringa** colocada en un soporte universal con manguera de venoclisis y regulador de flujo.
- 4.** Dejar caer las gotas sobre la solución de CaCl_2 en agitación. **Las gotas deben ser del mismo tamaño aproximadamente (~2-3 mm);** el diámetro de la esfera depende del volumen de la gota.
- 5.** Una vez obtenidas todas las esferas, con la ayuda de un colador de cocina, **enjuagarlas con 5 mL de PBS cinco veces.**
- 6. Almacenar las esferas en 10 mL de PBS** y reservar para la **Práctica 15** (biosensor de urea).

Actividad 4. Análisis de los resultados

- 1.** Tomar **5 esferas** y pesarlas.
- 2.** Con un software para calcular dimensiones o con una regla, **medir el diámetro** de las esferas.
- 3.** Analizar las esferas en el **microscopio de campo claro** con diferentes objetivos.
- 4. Teñir** las esferas con el reactivo de Bradford por 2 minutos y después colocar en agua para eliminar el exceso del reactivo (la tinción revela dónde está la proteína/enzima).
- 5.** Analizar nuevamente las esferas y, si es necesario, **cortar una con la navaja** para observar los puntos donde se encuentra inmovilizada la enzima.



¿Por qué la orina se diluye más que el suero?

La orina está **mucho más concentrada** en urea que el suero (es el producto de excreción). Si se mide directo, su velocidad cae fuera de la curva patrón. Por eso la orina se **diluye** (p. ej., 1:100) para que su velocidad quede dentro del rango de la recta, mientras que el suero con menos dilución (1:2, 1:5).

Comparación con la P4 (ureasa libre vs. inmovilizada):

◆ NOTA ACADÉMICA

En la Práctica 4 la ureasa estaba **libre** (en solución); aquí está **inmovilizada** (en las esferas). La inmovilizada puede mostrar una **actividad aparente menor** porque el sustrato debe **difundir** hacia el interior de la esfera para llegar a la enzima (limitación de difusión). A cambio, es **reutilizable** y más **estable**. Comparar ambos resultados es didáctico: muestra las ventajas y limitaciones de la inmovilización.

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
1	Piseta con agua	100 mL	Urea 0.2 M (recién preparada; probar que no esté hidrolizada)
15	Tubos de ensayo	100 mL	Medio de reacción: rojo de fenol 0.032 mM, pH 6.8, en bicarbonato de sodio 0.001 %
4	Pipetas de 10 mL		
4	Pipetas de 1 mL		
1	Caja de celdas para espectro de 1.5 y 3 mL		
1	Vaso de precipitado de 50 mL		
2	Tubos de centrifuga de 15 mL		
1	Balanza granataria		

#	Material	#	Reactivo
1	Vortex		
1	Centrífuga clínica		
1	Juego de tres micropipetas (10, 200 y 1000 µL) y puntas		
1	Hielera pequeña de unicel		

Por alumno / para todo el grupo

#	Material
1	Esferas de enzima inmovilizada (de la Práctica 14)
1	Muestra de suero sanguíneo
1	Muestra de orina
1	Bolsa de hielo

◆ NOTA ACADÉMICA

El **reactivo de Bradford** no se usa en esta práctica: se empleó en la P14 para **teñir los puntos de proteína dentro de las esferas** (observación en microscopio/estereoscopio). Aquí solo se mide la actividad a 560 nm.

Procedimiento

Actividad 1. Monitoreo de la ureasa inmovilizada (curva patrón)

1. Pipetear en celdillas de espectrofotómetro las siguientes concentraciones de urea (madre 200 mM; agua hasta completar 0.9 mL; medio de reacción 1.0 mL; volumen total de reacción 1.9 mL):

Celdilla	Urea 200 mM (µL)	Agua (mL)	Medio (mL)	[Urea] final (mM)
1	0	0.9	1.0	0

Celdilla	Urea 200 mM (μL)	Agua (mL)	Medio (mL)	[Urea] final (mM)
2	5	0.895	1.0	0.5
3	10	0.890	1.0	1
4	20	0.880	1.0	2
5	40	0.860	1.0	4
6	80	0.820	1.0	8
7	100	0.800	1.0	10
8	150	0.750	1.0	15
9	200	0.700	1.0	20

2. Ajustar a **cero a 560 nm** con la celdilla 1 (blanco, sin urea).

3. **Iniciar la reacción** agregando **5 esferas de enzima inmovilizada** a cada celdilla, justo antes de medir.

4. Medir la absorbancia **cada 30 segundos por 2 minutos**.

5. Graficar la **velocidad inicial** frente a la concentración de urea y construir la **curva patrón**.

Actividad 2. Determinación de la concentración de urea en muestras biológicas

1. Obtener una muestra de **orina** y una de **sangre periférica** (centrifugar 3000 rpm por 5 minutos para obtener el suero).

2. Preparar **diluciones** de las muestras en amortiguador de fosfatos: el suero a **1:2 y 1:5**; la orina a **1:5 y 1:100** (porque está más concentrada en urea).

3. Pipetear en celdillas: **0.1 mL de la dilución + 0.9 mL de agua destilada + 1.0 mL de medio de reacción**.

4. Ajustar a cero a **560 nm** con un blanco (sin esferas o sin muestra).

5. **Iniciar la reacción** agregando **5 esferas de enzima inmovilizada**; medir la absorbancia cada 30 s por 2 minutos.

6. Calcular la **velocidad inicial** de cada muestra y dilución.

7. **Interpolar** las velocidades en la recta patrón para determinar su contenido de urea. Descartar las diluciones que queden fuera de la recta y considerar el factor de dilución.

Actividad 3. Análisis de los resultados

1. Obtener los **parámetros cinéticos** de los experimentos de la Actividad 1 (curva patrón).
2. **Comparar** con los de la Práctica 4 (ureasa libre): discutir cómo la inmovilización modifica la actividad aparente (limitación de difusión vs. estabilidad/reutilización).
3. **Comparar** las concentraciones de urea entre las muestras (suero vs. orina) y entre los equipos.

Práctica 16. Cristalización de una enzima

CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS (GOTA COLGANTE)

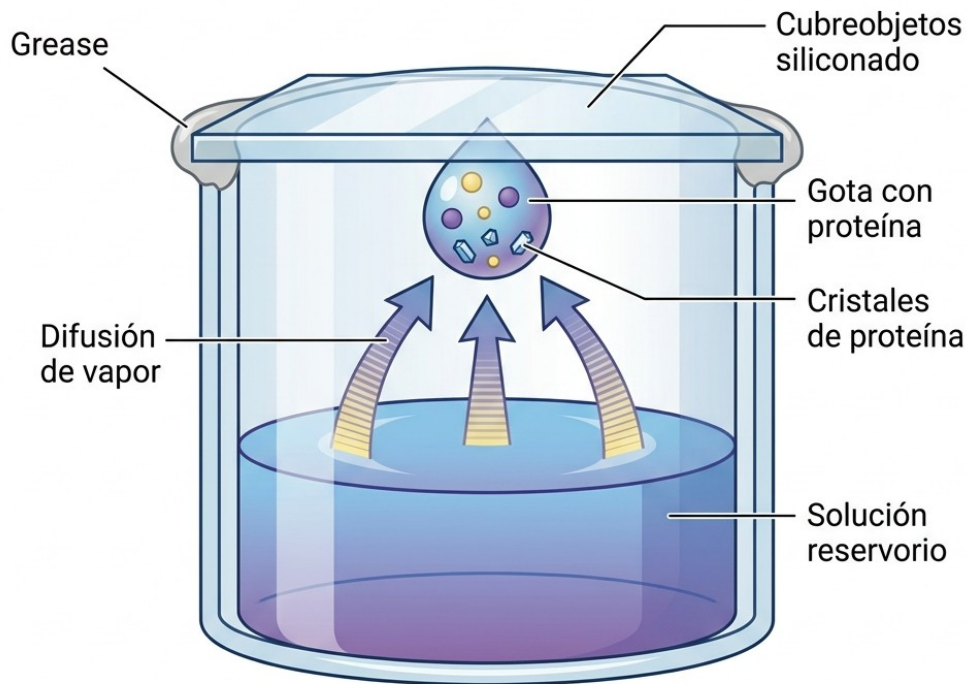


Figura 16.1. Esquema del método de difusión de vapor en gota colgante para la cristalización de proteínas.

Propósitos

- Aprender un método general para cristalizar una enzima
- Comprender para qué sirve la cristalización de proteínas (determinación de estructura por difracción de rayos X)

Introducción

La cristalización de una proteína consiste en lograr que las moléculas se ordenen en un **crystal** de tamaño suficiente para estudiarlo por **difracción de rayos X**, lo que permite conocer su estructura tridimensional. En esta práctica se usa la **lisozima** (una proteína modelo que cristaliza con relativa facilidad) mediante la técnica de **gota colgante** (difusión

de vapor), variando la concentración de NaCl y de proteína para observar en qué condiciones se forman cristales y en cuáles solo precipitado.

◆ ASPECTO DIDÁCTICO / PROYECTO INTEGRADO

Organización del proyecto final: el proyecto conjunto **P11-P12-P13** (purificación clásica, sobreexpresión recombinante e IMAC) se programa **casi al final del semestre**, para que todas las etapas estén **al unísono** y se dé **impacto y valor** al trabajo integrado. Esta práctica de cristalización puede aprovechar ese cierre.

Qué se estudia (didáctica)

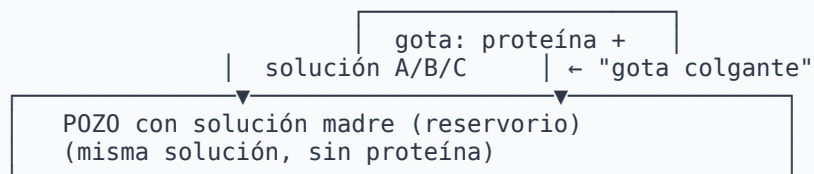
¿Para qué cristalizar una proteína?

Los cristales de proteína son necesarios para la **difracción de rayos X**: al hacer pasar rayos X por un cristal, el patrón de difracción resultante permite reconstruir la **estructura 3D** de la proteína (dónde están sus aminoácidos, su sitio activo, cómo se pliega). Es la base de la **cristalografía estructural** — como la que se usó para modelar la NaGSTu17 del proyecto.

La técnica de gota colgante (difusión de vapor):

► ESQUEMA EXPERIMENTAL / NARRATIVA MOLÉCULAR:

Cubreobjetos (con la gota)



La gota (proteína + solución) se suspende sobre un pozo con la **solución madre** (sin proteína, más concentrada). El agua **evapora** de la gota hacia el reservorio → la proteína se concentra lentamente → puede **nuclearse** y crecer un cristal.

Nucleación vs. precipitación:

Resultado	Qué significa
Cristal	La proteína se ordenó en red cristalina (éxito). Formas definidas, con aristas/ángulos ; brillan al mover la luz (birrefringencia)
Precipitado	La proteína se agregó sin orden (concentración/sal demasiado alta). Granos sin forma definida

Resultado	Qué significa
"Pasta" amorfa	Precipitado denso y pegajoso: sobresaturación extrema (demasiada proteína o demasiada sal)
Gota clara	No hubo suficiente concentración o tiempo

Cómo diferenciarlos a simple vista (en el estereoscopio):

- **Cristal:** formas geométricas regulares (placas, agujas, rombos), bordes rectos, brillo característico (birrefringencia). Al mover el foco, las aristas se distinguen claramente.
- **Precipitado:** gránulos irregulares y opacos, sin geometría.
- **Pasta amorfa:** aspecto denso, pegajoso, "lechoso" o como sedimento turbio — señal de que la proteína precipitó en masa.
- **Gota clara:** nada visible (aún no nucleó).

◆ NOTA ACADÉMICA

Proporción de la gota — no mezclar 1:1: para que se formen cristales, la proteína debe ir **diluida** en la gota. Si se mezcla **proporciones iguales** de solución concentrada y de lisozima concentrada (1:1), la gota queda **sobresaturada** y se forma una **"pasta rara"** (precipitado amorfo), no cristales. Usar **menor volumen de proteína** (o proteína diluida) frente a la solución, según se indique.

◆ ASPECTO DIDÁCTICO / PROYECTO INTEGRADO

Otras proteínas además de la lisozima: la **lisozima cristaliza rápido** — en una sesión (p. ej., de lunes a miércoles) ya se observa claramente la cristalización. Si sobra proteína del proyecto (p. ej., la **GST purificada de la P13**), puede usarse en **otra condición/pocillo** para comparar su comportamiento. Las proteínas deben **refrigerarse previamente** (conservación en frío) y montarse frías para evitar su degradación antes de la cristalización.

◆ RECURSO DIGITAL / INTERACTOMA MODULAR

Material de apoyo: en **Interactoma Modular** está la **guía de cristalización de proteínas** (métodos, precipitantes y técnicas de difusión de vapor):

<https://interactomamodular.com/assets/guias/cristalizacion-proteinas.pdf>.

Requerimientos por equipo

#	Material	#	Reactivo
1	Piseta con agua	20 mL	NaCl 2.5 M en agua desionizada (filtrado)
6	Tubos de ensayo	20 mL	Acetato de sodio (AcNa) 0.3 M, pH 4.6 (filtrado)
1	Vaso de precipitado de 50 mL	1 mL	Lisozima a 30 mg/mL (maestro)
1	Micropipeta de 10 μ L con puntas	1 mL	Lisozima a 40 mg/mL (maestro)
1	Micropipeta de 200 μ L con puntas	1 mL	Lisozima a 50 mg/mL (maestro)
1	Hielera de unicel con tapa	(opc.)	GST purificada del proyecto (P13), refrigerada previamente
1	Placa de cristalización (9 pozos, 3×3)		
9	Cubreobjetos siliconados		
1	Jeringa para grasa de vacío		
1	Microscopio estereoscopio		

Procedimiento

Actividad 1. Preparación de las condiciones de cristalización

1. Pipetear los siguientes componentes en tubos de ensayo previamente rotulados (3 condiciones de NaCl):

Condición	[NaCl final] (M)	NaCl 2.5 M (mL)	AcNa 0.3 M (mL)	Agua (mL)
A	1.00	0.80	0.66	0.54
B	1.10	0.88	0.66	0.46

Condición	[NaCl final] (M)	NaCl 2.5 M (mL)	AcNa 0.3 M (mL)	Agua (mL)
C	1.20	0.96	0.66	0.38

2. Preparar la placa de cristalización, poniendo **grasa de vacío** en el borde de cada pozo a emplear con la ayuda de una jeringa.
3. Pipetear en la **primera fila** tres pozos con 500 μ L de la solución A, en la **segunda fila** tres con la solución B y en la **tercera fila** tres con la solución C.
4. Acomodar sobre una superficie firme y seca nueve **cubreobjetos siliconados**, de forma similar a como están pipeteadas las soluciones en la placa.
5. Tomar **3 μ L de solución del pozo** (según corresponda al orden) y pipetear en el centro del cubreobjetos, de manera que se deposite en una sola gota.
6. Agregar **1-2 μ L de lisozima** sobre la gota y mezclar con la punta de la pipeta con precaución. **La proteína va diluida (menor volumen que la solución): no usar proporción 1:1**, o se formará una pasta amorfa en lugar de cristales.
7. Tomar con cuidado el cubreobjetos y voltearlo de forma que la mezcla en la gota quede **colgando**.
8. Colocar el cubreobjetos invertido (gota hacia adentro) sobre el borde del pozo correspondiente; con una punta de 1 mL presionar para **sellar** el pozo.
9. **Columna 1:** lisozima a **30 mg/mL** (condiciones A1, B1, C1).
10. **Columna 2:** lisozima a **40 mg/mL** (condiciones A2, B2, C2).
11. **Columna 3:** lisozima a **50 mg/mL** (condiciones A3, B3, C3).
12. Visualizar en el **microscopio estereoscopio** cada una de las gotas.
13. Incubar a temperatura ambiente **30 minutos** y visualizar de nuevo.
14. Incubar a temperatura ambiente **dos días** y visualizar nuevamente.

◆ NOTA ACADÉMICA

Tiempo esperado: con la lisozima, la cristalización suele verse **claramente en una sesión** (p. ej., entre lunes y miércoles), sin esperar semanas. Registrar fotografías en cada visualización para seguir el avance (gota clara $\rightarrow$ núcleos $\rightarrow$ cristales, o precipitado/pasta si hubo sobresaturación).

◆ ASPECTO DIDÁCTICO / PROYECTO INTEGRADO

Condición adicional (opcional): si sobra **GST purificada** del proyecto (P13), prepararla refrigerada y montar un pocillo extra para comparar su cristalización con la lisozima.

Actividad 2. Análisis de los resultados

1. Documentar con **fotografías** de los campos en el microscopio el aspecto de las distintas condiciones a los diferentes tiempos de visualización indicados.
2. Discutir en qué condiciones se observa un **precipitado** y en cuáles se formaron **cristales** de la enzima.

Referencias

1. Segel, I. H. (1993). *Enzyme kinetics: Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. John Wiley & Sons.
2. Fersht, A. (1999). *Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding*. W. H. Freeman and Company.
3. Copeland, R. A. (2000). *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis* (2nd ed.). Wiley-VCH.
4. Cornish-Bowden, A. (2012). *Fundamentals of enzyme kinetics* (4th ed.). Wiley-Blackwell.
5. Bisswanger, H. (2014). *Enzyme kinetics: Principles and methods* (3rd ed.). Wiley-VCH.
6. Leskovac, V. (2003). *Comprehensive enzyme kinetics*. Kluwer Academic / Plenum Publishers. <https://doi.org/10.1007/b115433>
7. Purich, D. L. (2010). *Enzyme kinetics: Catalysis, regulation, and effectors*. Elsevier / Academic Press.
8. Cleland, W. W. (1963). The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: I. Nomenclature and rate equations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 67, 104–137. [https://doi.org/10.1016/0926-6585\(63\)90211-6](https://doi.org/10.1016/0926-6585(63)90211-6)
9. Chou, T. C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 621–681. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>
10. Montejo Dávila, C. (2026). *Interactoma Modular: Simuladores cinéticos y guías digitales de caracterización enzimática*. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. <https://interactomamodular.com/assets/guias/cinetica-vmax-km.html>
11. Elansary, A., Abdi, S., Aishah, M., & Nasser, A. (2011). *Experimental enzymology (BCH 322) lab manual*. King Saud University.
12. HiMedia Laboratories. (2014). *HiPer® yeast cell immobilization teaching kit — Manual de usuario*.
13. Spinreact. (2013). *Urea-UV: Quantitative determination of urea*.
14. Spinreact. (2017). *Glucose-HK: Quantitative determination of glucose*.
15. Jena Bioscience. (2015). *Manual JBS kit de iniciación a la cristalización de proteínas* (pp. 1–7).
16. Montejo Dávila, C. (2026). *Guía — Sobreexpresión de una enzima recombinante* [Documento de apoyo]. Interactoma Modular. <https://interactomamodular.com/assets/guias/guia-sobreexpresion-enzima-recombinante.pdf>

17. Montejo Dávila, C. (2026). *Manual IMAC — Purificación de proteínas recombinantes* [Documento de apoyo]. Interactoma Modular.

<https://interactomamodular.com/assets/guias/manual-imac-purificacion.pdf>

18. Montejo Dávila, C. (2026). *Guía — Cristalización de proteínas* [Documento de apoyo]. Interactoma Modular.

<https://interactomamodular.com/assets/guias/cristalizacion-proteinas.pdf>

19. Montejo Dávila, C. (2026). *Guía interactiva — Densitometría digital en SDS-PAGE* [Documento de apoyo]. Interactoma Modular.

<https://interactomamodular.com/assets/guias/densitometria-sds-page.html>

20. Montejo Dávila, C. (2026). *Guía — Encapsulamiento y actividad de la ureasa* [Documento de apoyo]. Interactoma Modular.

<https://interactomamodular.com/assets/guias/encapsulamiento-actividad-ureasa.pdf>