



UACJ

Manual de prácticas del laboratorio de enzimología

PROGRAMA DE BIOTECNOLOGÍA DE LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CIUDAD JUÁREZ

ÁNGEL GABRIEL DÍAZ SÁNCHEZ

Tabla de contenido

<i>Introducción</i>	<i>2</i>
<i>Practica 1. Introducción al laboratorio de enzimología.....</i>	<i>3</i>
<i>Practica 2. Extracción de enzimas de diversas fuentes a partir de muestras biológicas.....</i>	<i>6</i>
<i>Practica 3. Factores que afectan la actividad de una enzima.....</i>	<i>9</i>
<i>Practica 4. Determinación de la velocidad inicial de una reacción enzimática.....</i>	<i>13</i>
<i>Práctica 5. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de una reacción catalizada</i>	<i>17</i>
<i>Práctica 6. Efecto del pH sobre la velocidad de una reacción catalizada</i>	<i>20</i>
<i>Practica 7. Determinación de los parámetros cinéticos de una reacción catalizada.....</i>	<i>23</i>
<i>Practica 8. Estudio de Inhibición enzimática.....</i>	<i>26</i>
<i>Practica 9. Cooperatividad en cinética de saturación de una enzima</i>	<i>30</i>
<i>Practica 10 y 11. Purificación de una enzima (esta práctica se hace en dos semanas).....</i>	<i>32</i>
<i>Practica 12. Sobreexpresión de una enzima recombinante</i>	<i>35</i>
<i>Practica 13. Cromatografía de proteínas.....</i>	<i>38</i>
<i>Practica 14. Encapsulamiento o inmovilización de una enzima</i>	<i>42</i>
<i>Practica 15. Uso de una enzima como sensor de la concentración de un metabolito en muestras biológicas.....</i>	<i>44</i>
<i>Practica 16. Cristalización de una enzima</i>	<i>47</i>
<i>Referencias consultadas para generar y adaptar el manual.....</i>	<i>49</i>

Introducción

La enzimología experimental es esencial en la formación de los alumnos de biotecnología. El presente manual de prácticas de laboratorio está asociado a la materia de enzimología del programa de Licenciatura en Biotecnología de la UACJ. Consta de los protocolos para realizar las prácticas de laboratorio y excluye la mayoría de los detalles teóricos porque estos últimos se abordan en la parte de teoría del curso. Cada una de las prácticas y sus actividades fue cuidadosamente seleccionada en base a los objetivos de aprendizaje de cada una de las unidades y sus contenidos. Las primeras prácticas tienen el propósito de propiciar el desarrollo de destrezas y habilidades fundamentales en el campo de la enzimología, como extraer enzimas de diversas fuentes, detectar la actividad catalítica y valorar el efecto de diversas condiciones de reacción. Después las practicas se enfocan la parte de la cinética enzimática y cómo ésta ayuda en la elucidación de los mecanismos de acción de la catálisis. Finalmente se enfoca en las aplicaciones de la enzimología y en la investigación.

Documento revisado, modificado y actualizado por:

M. en C. Priscilla Elizabeth Morales Cervantes

M. en C. Álvaro Torres Durán

M. en C. Edith Enríquez Gallosa

Docentes y Técnicos Académicos del edificio H1 2 piso

Ciudad Juárez, Chihuahua

Revisión 2025

Practica 1. Introducción al laboratorio de enzimología	
Propósitos	• Aprender las reglas y dinámica del laboratorio de enzimología • Aprender a registrar y procesar datos típicos generados en el laboratorio de enzimología • Aprender a representar resultados de manera gráfica y hacer ajustes a modelos matemáticos.
Introducción	El laboratorio de enzimología no sólo es un espacio para desarrollar conceptos de manera práctica y desarrollar destrezas técnicas, es también un espacio para reforzar ciertas competencias de seguridad e higiene. También se fomentan buenas prácticas de laboratorio, no sólo de forma práctica, sino en la manera de analizar, presentar y discutir los resultados, en donde se requieren y se fomentan ciertas habilidades matemáticas y analíticas.

Requerimientos por equipo

Materiales por parte del alumno para todo el curso		Reactivos	
1	Calculadora científica		
1	Bitácora de laboratorio, Cuaderno italiano o francés cocido.		
1	Rotulador o marcador de punta fina para todo el curso		
1	Acceso a computadora con Excel y posibilidad de instalar un software para análisis de datos		
1	Paquete de etiquetas pequeñas		
1	Bata de laboratorio		
1	Par de guantes de látex o nitrilo		
1	Lentes de seguridad		
1	Cubrebocas		
1	Paquete con toallas desinfectantes		
1	Frasco con etanol al 70 %		

Actividad 1: Revisión del reglamento de seguridad e higiene

1. Las reglas de seguridad vigentes de los laboratorios de la UACJ se encuentran en la siguiente página electrónica:
https://www.dropbox.com/s/qy7vdkdev9ygzi8/toaz.info-reglamento-de-seguridad-e-higiene-para-laboratorio-del-instituto-de-ciencias-bio-pr_74643eb94dd296d4c2564409a6cb1780.pdf?dl=0

2. El alumno debe leer y seguir el reglamento en todo momento en las instalaciones de la UACJ.
3. Adicionalmente debe leer y considerar las buenas prácticas de laboratorio de la siguiente liga: <https://www.unido.org/sites/default/files/files/2018-04/Buenas-Pra%CC%81cticas-de-Laboratorio-de-La-OCDE.pdf>

Actividad 2: Reglas y dinámica del laboratorio de enzimología

1. El maestro presentará a los alumnos el contenido de prácticas del presente manual.
2. Presentación de la forma de trabajo, las partes que son en equipo, individual, las responsabilidades y la manera de calificar.
3. Las evaluaciones se realizan por práctica y se deben considerar el trabajo técnico en la práctica, los resultados obtenidos, la presentación de reportes, bitácoras y/o exámenes o cuestionarios.
4. El alumno para tener una calificación aprobatoria en cada practica debe haber asistido, realizar la práctica, presentar y acreditar la evaluación correspondiente que el maestro determine.

Actividad 3: Registro de resultados en bitácoras

1. Los registros de los resultados de cada práctica deben llenarse en una bitácora de laboratorio designada para el laboratorio de enzimología. Alternativamente, se puede usar el espacio en blanco de la bitácora de otra materia cursada previamente. O seguir las instrucciones del maestro del laboratorio.
2. El llenado de la bitácora de manera deseable debe ser de acuerdo con los estándares internacional ISO-9001, tomar en consideración las recomendaciones del siguiente documento: <https://www.lamalditatis.org/post/fundamentos-para-redactar-tu-bitacora-de-laboratorio> .
3. Tomar en consideración el ejemplo presentado en la clase: <https://www.dropbox.com/s/yjuw4wk2vl9dgwz/Enzimolog%C3%ADa.introcurs-o-lab.pdf?dl=0> .
4. Seguir todas las instrucciones del maestro del laboratorio respecto a la bitácora, elaboración de repotes de prácticas y exámenes.

Actividad 4: Tipo de análisis y ejemplo del tipo de datos generado en el laboratorio de enzimología.

El siguiente constituye un ejemplo del tipo de experimentos que se suelen hacer en el laboratorio de enzimología:

1. Se midió la unión al equilibrio de una molécula, aquí llamada ligando, en el sitio activo de una enzima conocida como DapE.
2. En el experimento se varió la concentración del ligando (variable independiente, X) y se midió el efecto sobre la intensidad de fluorescencia (IF) (variable dependiente, Y) de los residuos de triptófano presentes en la enzima.
3. El experimento consiste en un diseño de cuadro latino en donde se mide el grado de saturación de la enzima por efecto de la concentración de ligando suministrada en el ensayo.
4. Los siguientes datos son las coordenadas de la variable X ([ligando]) y Y(IF):

	Intensidad de fluorescencia en Unidades arbitrarias: IF (UA)		
[ligando] (μM)	r1	r2	r3
0	6037	6078	5934
50	3287	4878	4773
100	2343	2655	2750
150	2210	2114	2137
250	1581	1552	1572
350	1278	1286	1304
450	1116	1233	1284
500	2414	1140	1159
550	910	964	1002
600	1029	1010	1022

5. R1, 2 y 3 son tres repeticiones independientes y se pueden usar para calcular las medidas de tendencia central clásicas, como media, desviación o error estándar.
6. Existen distintas maneras en las que los siguientes datos se pueden procesar para obtener información de los parámetros fisicoquímicos de unión del ligando a la enzima.
7. Obtener un gráfico tipo dispersión X, Y, del promedio de la intensidad de fluorescencia contra la concentración de ligando usado y comparar con un gráfico del cambio de fluorescencia contra la concentración. El gráfico del cambio de la intensidad se obtiene al restar al valor inicial de fluorescencia obtenido a cero de ligando, el valor observado en cada concentración de ligando:
Se puede usar la siguiente ecuación en un software para análisis de datos y ajustes no lineales:

$$DIF = \frac{B_{max} \cdot [L]}{K_d + [L]}$$

En donde DIF es la variable dependiente y es igual a la intensidad de fluorescencia a cada concentración de ligando menos la observada sin ligando; B_{max} es el cambio de fluorescencia máximo y está relacionado con el cambio conformacional de la enzima después de la unión de su ligando; K_d es la constante de disociación que es el inverso de la constante de afinidad, entre más pequeña significa que la enzima es más afín por su ligando y [L] es la concentración del ligando

8. Proponer un método de análisis de los datos por medio de ajustes a una ecuación que se ajuste a la tendencia de los datos observados.
9. Proponer el significado de los parámetros o zonas de la gráfica observada y decir si se parece a lo esperado en otros experimentos de unión de ligandos en enzimas.

Practica 2. Extracción de enzimas de diversas fuentes a partir de muestras biológicas

Propósitos	• Aprender un método general de extracción de diversas enzimas a partir de diferentes fuentes. • Aprender una estrategia metodológica para identificar la actividad de diversas enzimas.
Introducción	Las enzimas son biomacromoléculas universales en los sistemas vivos. Es esencial contar con métodos generales para la extracción de diversas enzimas de distintas matrices biológicas, así como desarrollar habilidades para la detección de su actividad con métodos sencillos y que se puedan usar de forma rutinaria. Las enzimas son moléculas sensibles a condiciones ambientales alejadas de las estándar-bioquímicas y también tienen una vida media celular relativamente corta. La extracción de enzimas activas se observa maximizada con la etapa o las condiciones de los tejidos de donde se obtienen. Por tanto, es de esperar que no se observen actividades enzimáticas en muestras que han sido almacenadas por tiempos prolongados como muestra de vegetales secos, pero alta en muestras frescas.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
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	Reactivo de Benedict
8	Tubos para centrifuga (15 mL, con tapa)	20 mL	Suspensión de almidón al 2 % (p/V)
8	Pipetas Pasteur de plástico	20 mL	Solución de sacarosa, grado reactivo al 2 % (p/V)
1	Pipeta de 10 mL	10 mL	Invertasa 10 mg/L
1	Micropipeta de 1 mL con puntas	Materiales por parte de los alumnos	
1	Baño maría a ebullición	10 g	Manejo de espinacas, 1 papa cruda, 1 manzana y 1 sobre de levadura Tradipan®.
32	Tubos de ensayo	250 mL	Peróxido de hidrogeno al 6 % (conseguir en una farmacia, una botella es suficiente para todo el grupo)
2	Gradillas para tubos	1	Botella de etanol al 70 %

2	Vasos de precipitado de 100 mL	1	Toallas húmedas para desinfectar superficies
1	licuadora	1	Bata de laboratorio, lentes de seguridad y dos pares de guantes de látex o nitrilo.
		1	Marcador de punta fina para rotular y 1 cinta de masking tape.
		1	Bolsa de hielo para todo el grupo

Actividad 1: Extracción de las enzimas a partir de diversas fuentes

1. Fuentes: espinaca, papa, manzana y levadura (Tradipan®).
2. Material adicional: cuchillo, tabla para picar, pelador y agua oxigenada.
3. Proporción para la extracción: 10 mL de PBS 1X para 5 gr de muestra.
4. Pesar las hojas de espinaca, la papa, manzana y levadura. La manzana y la papa se deben pelar antes de pesar.
5. Picar la manzana, papa y hojas de espinacas en piezas pequeñas.
6. Colocarlas en el mortero y agregar de poco en poco el volumen de PBS 1X e ir macerando con fuerza, pero con cuidado de no derramar la muestra.
7. Para la levadura; se recomienda tibia el PBS aproximadamente a 37 °C. después de disolver la levadura, agregar unas piscas de azúcar para activarla.
8. Una vez obtenido el macerado correcto, vaciar en tubos para centrífuga.
9. Centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos.
10. Recuperar el sobrenadante (por decantación) y colocarlo en un tubo limpio y rotulado con la muestra correspondiente. Mínimo un volumen de 10 mL.
11. Reservar los tubos en hielo hasta su uso en las siguientes actividades.

Actividad 2: Detección de la actividad de amilasa

1. Preparar dos series de tubos como se muestra a continuación:

Tubo	1 (control)	2 (papa)	3 (espinaca)	4 (manzana)	5 (levadura)
Extracto	-----	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL
Almidón 2%	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL
PBS 1X	1.25 mL	-----	-----	-----	-----

Tubo	1 (control)	2 (papa)	3 (espinaca)	4 (manzana)	5 (levadura)
Extracto	-----	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL
Agua destilada	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL
PBS 1X	1.25 mL	-----	-----	-----	-----

2. Mezclar e incubar 10 min a 37 °C.
3. Retirar de la incubación y agregar 3 gotas del reactivo Yodo-Lugol a cada tubo.
4. Mezclar, observar y registrar los cambios.

Actividad 3: Detección de la actividad de invertasa

1. Preparar dos series de tubos como se muestra a continuación:

Tubo	1 (control)	2 (papa)	3 (espinaca)	4 (manzana)	5 (levadura)
Extracto	-----	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
Sacarosa 2%	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
Agua destilada	1.0 mL	-----	-----	-----	-----

Tubo	1 (control)	2 (papa)	3 (espinaca)	4 (manzana)	5 (levadura)
Extracto	-----	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
Agua destilada	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
Invertasa 10 mg/mL	1.0 mL	-----	-----	-----	-----

2. Mezclar e incubar 10 min a 37 °C.
3. Retirar y agregar 1 mL de DNS a cada tubo
4. Mezclar e incubar de 1 a 3 min (dependiendo que tan rápido cambie de color) a 100 °C
5. Dejar enfriar y leer los tubos a 540 nm calibrando a cero con el tubo control de la serie 2.
6. Observar los cambios y comparar las absorbancias.
7. El incremento en la absorbancia o intensidad de color rojo es indicativo de actividad de la invertasa. Si no se observan cambios es porque las matrices vegetales presentan una alta concentración de azúcares reductores y en ese caso es necesario hacer dilución para medir la absorbancia)

Actividad 4: Detección de la actividad catalasa

1. Preparar una serie de tubos como se muestra a continuación agregando primero el peróxido de hidrógeno al 6% (agua oxigenada):

Tubo	1 (papa)	2 (espinaca)	3 (manzana)	4 (levadura)
Agua oxigenada	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL
Extracto	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL

2. Agitar levemente y observar la aparición de burbujas por un periodo de 5 min.
3. Registra los tiempos de inicio y fin (si es el caso) de la aparición de burbujas.

Practica 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 de una enzima. • Investigar el efecto de la desnaturalización de una enzima sobre su reacción catalizada.
Introducción	Las reacciones catalizadas por enzimas son sensibles a las condiciones del medio de reacción. Todas las condiciones que afecten la probabilidad de choques efectivos entre moléculas reactantes, la energía de activación o la integridad de la enzima tendrán un impacto sobre la velocidad de reacción y por tanto sobre la actividad. En esta práctica se experimentará con cambios en el sustrato empleado, la presencia de inhibidores y condiciones desnaturalizantes. La actividad de la enzima se observa por un cambio en el color del medio de reacción a rojo intenso. La disminución de la intensidad de color significa una menor actividad.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
1	Piseta con agua	20 mL	Solución de catecol 0.01 M es esencial que este recién preparada y debe tener un color amarillento, si es de color rojo 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	licuadora	20 mL	Fenol 0.01M: 94 mg de fenol en 100 mL de agua. Precaución, altamente corrosivo
2	Tubos para centrifuga (15 mL, con tapa)	20 mL	Ácido tricloroacético (TCA 5%). Precaución, altamente corrosivo
8	Pipetas Pasteur de plástico	1 mL	Tripsina o pepsina al 5 % (p/V)
1	Pipeta de 10 mL	1 g	Feniltiourea. En caso de que no esté disponible la feniltiourea usar cristales de citrato de sodio o de ascorbato
1	Micropipeta de 1 mL con puntas	1 mL	Quercetina 0.01 M
1	Baño maría a 70 °C	Materiales por parte de los alumnos	
1	Baño maría a 37 °C	1	Papa cruda americana.
		1	Colador para cocina de poro pequeño

16	Tubos de ensaye	1	Navaja de bolsillo
2	Gradillas para tubos		
2	Vasos de precipitado de 100 mL		
1	Tubos para centrifuga (50 mL, con tapa)		

Actividad 1: Extracción de las enzimas polifenol oxidasa

1. Se requiere de una pieza de papa americana de mediana a grande.
2. Pelar lo más rápido posible y cortarla en cubos pequeños de 2 – 4 cm³.
3. Pesar la papa (se requieren al menos 20 gr).
4. Pasar a la licuadora la papa picada y agregar en proporción 50 mL de NaF 0.1M por cada 100 gr de muestra.
5. Licuar a máxima velocidad por 1 minuto
6. Colar el homogenizado con un cedazo de poro chico mientras se transfiere a un vaso de precipitado.
7. Vaciar el filtrado a tubos para centrífuga de 15 mL y centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos
8. Recuperar el sobrenadante por decantación.
9. Si el sobrenadante presenta grumos volver a centrifugar y nuevamente recuperar el sobrenadante.
10. Reservar en hielo.

Actividad 2: Detección de la actividad oxidasa

1. Prepare una serie de tubos como se muestra a continuación:

Tubo	1 (control negativo)	2 (sin enzima)	3 (con enzima)
Agua destilada	15 gotas	15 gotas	-----
Catecol 0.01 M	-----	15 gotas	15 gotas
Extracto	15 gotas	-----	15 otas

2. Agitar rápidamente después de agregar el extracto.
3. Incubar a 37 °C por 25 minutos.
4. Agitar los tubos en intervalos de 5 minutos y registrar los cambios observados hasta finalizar el periodo de los 25 minutos.
5. El cambio a un color oscuro determina que hay actividad enzimática.

Actividad 3: Determinación de la naturaleza proteica del polifenol oxidasa

1. Prepare una serie de tubos como se muestra a continuación:

Tubo	A	B	C	D
Extracto	15 gotas	15 gotas	15 gotas	15 gotas
Agua destilada	15 gotas	-----	-----	-----
Tripsina	-----	15 gotas	-----	-----
TCA 5%	-----	-----	15 gotas	-----
Feniltiurea	-----	-----	-----	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. Retirar y observar los cambios observados en la diferencia entre tubos.

La proteasa degrada y por tanto produce la inactivación de enzimas de naturaleza proteica; el ácido tricloroacético es un agente que precipita selectivamente a las proteínas y la feniltiurea, es un compuesto con alta afinidad por el metal cobre que se encuentra presente en la enzima y que al interaccionar con éste la inactiva.

Actividad 4: Especificidad por el sustrato

1. Prepare una serie de tubos como se muestra a continuación:

Tubo	A	B	C	D
Extracto	15 gotas	15 gotas	15 gotas	15 gotas
Hidroquinona 0.01M	15 gotas	-----	-----	-----
Fenol 0.01 M	-----	15 gotas	-----	-----
Quercetina 0.01 M	-----	-----	15 gotas	-----
Etanol 0.01 M	-----	-----	-----	15 otas

2. Mezclar e incubar 10 minutos a 37 °C por 10 minutos.
3. Observar y registrar las diferencias.

Actividad 5: Efecto de desnaturalización de la enzima

1. Prepare una serie de tubos como se muestra a continuación:

Tubo	A	B	C	D	E	F
Extracto	15 gotas	15 gotas	15 gotas	15 gotas	15 gotas	15 gotas
Catecol 0.01 M	15 gotas	15 gotas	15 gotas	15 gotas	15 gotas	-----
Isopropanol	-----	-----	-----	15 gotas		-----
Acetona	-----	-----	-----	-----	15 gotas	-----
Agua destilada	-----	-----	-----	-----	-----	15 gotas
Tratamiento	0 °C por 10 minutos	37 °C por 10 minutos	70 °C por 10 minutos	T° amb por 10 minutos	T° amb por 10 minutos	T° amb por 10 minutos

2. Mezclar e incubar a los tiempos y temperatura indicados en la tabla.
3. Observar y registrar los cambios.
4. Medir absorbancias de los tratamientos a 420 nm ajustando a cero con el tubo F.

Realizar una discusión de los resultados resaltando las explicaciones de los mecanismos de cómo los diferentes tratamientos efectuados afectan a la actividad de la enzima

Practica 4. Determinación de la velocidad inicial de una reacción enzimática

Propósitos	• Aprender a monitorear el curso temporal de una reacción enzimática. • Aprender una estrategia metodológica para determinar la velocidad inicial de las reacciones. • Aprender a expresar la actividad de las enzimas en unidades internacionales y actividad específica.
Introducción	La detección de la actividad catalítica de las enzimas es esencial para conocer detalles de su mecanismo de acción, papel fisiológico y su manipulación para lograr resolver problemas. Las técnicas espectroscópicas son las más deseables ya que se pueden aplicar para el monitoreo continuo de la reacción y obtener un curso temporal con buena resolución, que sirve para determinar la velocidad inicial de la reacción. Ésta sirve para calcular la actividad específica de la reacción, que se obtiene tras dividir la velocidad inicial en unidades de mM por segundo entre la concentración de la enzima aplicada en el medio de reacción en mg por mL. La reacción catalizada por la ureasa es un buen modelo de la aplicación de un método espectroscópico-acopado que permite el monitoreo del cambio de color del indicador de pH rojo de fenol. El cambio es en función de la producción de amoníaco durante la reacción que se convierte en ion amonio de forma espontánea al tomar un protón del agua y con la concomitante generación de ion hidróxido.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
1	Piseta con agua	100 mL	Urea 0.2 M (recién preparada) para todo el grupo. Hacer una prueba mezclando 1 mL de la solución con 1 mL del medio de reacción, si cambia de color amarillo a rosa significa que la urea esta hidrolizada y no funcionará.
2	Gr de semillas de sandia molida (área bioquímica) si no está disponible en el área los alumnos deben de llevarlas y estas no deben haber sido calendas o expuestas al sol. Se preparan moliéndolas en licuadora o molino de café)	100 mL	Medio de reacción: Solución de rojo de fenol 0.032 mM, pH 6.8 en bicarbonato de sodio 0.001%, para todo el grupo

5	tubos de ensayo	1 mL	Estándar de ovoalbúmina de 250 μ /mL
4	4 pipetas de 10 mL	10 mL	Reactivo de Bradford 1x
4	4 pipetas de 1 mL	10 mL	Reactivo de Bradford 1x
1	Caja de celdas para espectro de 1.5 mL y de 3 mL. De las que son para cinética, de las que usan menos volumen.		
1	1 vaso de pp de 50 mL		
2	2 tubos para centrifuga de 15 mL	Alumnos	
1	Balanza granataria	2 g	De semilla de sandia (sólo si no hay en el área de bioquímica)
1	vortex	1	Etiquetas de rotulación o masking tape (alumnos)
1	centrifuga clínica	1	Bolsa de hielo
1	Juego de tres micropipetas (10, 200 y 1000 μ L) y puntas		
1	Hielera pequeña de unicel		

Actividad 1: Extracción de la ureasa de semilla de sandia

1. Se utilizarán semillas de sandía, que sean frescas. Estas se deben dejar secar y triturar.
2. Pesar 2 gramos y agregarlos a 13 mL de agua destilada.
3. Homogenizar bien y trasvasar a tubos de centrifugación.
4. Centrifugar 5 minutos a 5000 rpm.
5. Recuperar el sobrenadante y etiquetarlo como ureasa.
6. Reservar en hielo hasta su uso.

Cuantificación de proteína por el método Bradford

1. Se prepara una serie de celdillas como se muestra a continuación: (se trabaja directamente sobre las celdillas)

Celdilla	Estándar de albumina 250 μ /mL	Muestra (μ L)	Agua destilada (μ L)
1	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 del reactivo de Bradford 1X a cada una de las celdillas.
3. Mezclar por resuspensión cada celdilla.
4. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

5. Medir absorbancias a 595 nm calibrando a cero con la celdilla 1.

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

1. Preparar 1 serie de celdillas como se muestra a continuación: (se trabaja directamente sobre las celdillas)

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

2. La reacción inicia al agregar la enzima o el agua.
3. Se debe pipetear hasta que esté la celdilla en el espectrofotómetro previamente ajustado a cero a 560 nm.
4. Agregar la enzima y resuspender rápidamente, medir la absorbancia cada 30 segundos por un periodo de 5 minutos.
5. Graficar el cambio de absorbancia con respecto al tiempo de reacción.
6. Calcular las velocidades obtenidas y analizar las diferencias.
7. Regraficar las velocidades obtenidas en columnas y analizar las diferencias.

Actividad 3: efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción

1. Preparar una serie de 9 celdillas como se muestra a continuación: (se trabaja directamente sobre la celdilla)

Celda	Urea 200 mM (μL)	Agua destilada (μL)	Medio de reacción (μL)
1	0	450	500
2	2.5	447.5	500
3	5	445	500
4	10	440	500
5	20	430	500
6	40	410	500
7	50	400	500
8	75	375	500
9	100	350	500

2. La reacción inicia con la adición de 50 μL de extracto de enzima y se debe 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 30 segundos por un periodo de 2 minutos.
4. Graficar el cambio de absorbancia con respecto al tiempo de reacción y calcular la velocidad inicial de la reacción.
5. Regraficar las velocidades obtenidas frente a la concentración de sustrato y realizar el análisis gráfico correspondiente para calcular los parámetros cinéticos de la reacción.

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 de una reacción catalizada

Propósitos	• Establecer la relación entre la temperatura y la velocidad de una reacción catalizada. • Aprender una metodología para determinar la temperatura que propicia una reacción más optima en determinadas condiciones. • Aprender a determinar la energía de activación de una reacción catalizada y determinar el efecto de la temperatura sobre sus parámetros cinéticos
Introducción	La temperatura altera la actividad de las reacciones catalíticas mediante tres fenómenos. (1) altera la velocidad promedio de las moléculas de enzima y sustratos, haciendo que sea más probable un choque infectivo entre ellas; (2) también está relacionado con el valor de la constante de velocidad, a mayor temperatura la constante de velocidad de la reacción es más alto y (3) se relaciona con la flexibilidad y estabilidad de la enzima, factor que es crítico para alcanzar los puntos determinantes en el poder catalítico de éstas. Cada enzima tiene un perfil característico frente a la temperatura y es esencial conocerlo para interpretar los resultados de ensayos bioquímicos y extenderlos a las circunstancias fisiológicas o tecnológicas. La fosfatasa ácida se encuentra sobre expresada en condiciones de desarrollo, como en el caso de los germinados. La actividad de la enzima se detecta usando un sustrato análogo que se llama para-nitrofenil fosfato (PNPP) que cuando se hidroliza genera un color amarillo.

Requerimientos por equipo

Materiales			
1	Piseta con agua	1	Probeta 100 mL
50	gr de germinado de trigo fresco (alumnos) puede ser otro tipo de germinado, pero no debe de tener color verde u otro, ya que éste interfiere con el resultado.	1	Mortero con pistilo
16	Tubos de ensayo de tamaño estándar	1	Colador
2	4 pipetas de 10 mL		Sal
2	4 pipetas de 1 mL		

1	Caja de celdas de 0.5 mL para espectro (para hacer cinética)	Reactivos	
3	vaso de pp	10 mL	Solución de para-nitrofenil fosfato 20 mM en agua, por equipo. Debe ser fresca y si presenta un color amarillo intenso no usar.
2	2 tubos para centrifuga de 15 mL	10 mL	Amortiguados de acetatos 1 M a pH de 5.7. Se prepara una solución 1 M de acetato de sodio y se le baja el pH con ácido acético 1 M (por equipo).
1	Balanza granataria	10 mL	100 mM de solución de $MgCl_2$, por equipo.
1	vortex	10 mL	500 mM de solución de hidróxido de sodio, por equipo.
1	centrifuga clínica	200 mL	Amortiguador acetato de Sodio 30 mM pH 6.0
1	Juego de tres micropipetas (200 y 1000 μ L) y puntas	10 mL	Hidróxido de potasio 500 mM
3	Vasos de unicel de 1 L (Alumnos)	Alumnos	
1	Etiquetas de rotulación o masking tape (alumnos)	1	Bolsa de hielo
1	Cronometro (alumnos)	1	Bolsa de semillas de girasol (para todo un grupo)
1	Baño a 0, 10, 20, 37, 55, 80 y otro a 100 °C, ver tabla de preparación)	1	Paquete de vasos de unicel
		1	Paquete de sal

Actividad 1: Extracción de la fosfatasa

1. Pesar 50 gr de semillas de girasol fresco y sin cáscara, homogenizar en 100 mL de amortiguador de acetatos de sodio 30 mm pH: 6.0.
2. Colar la mezcla y colocar en tubos de centrifuga de 15 mL.
3. Centrifugar 10 minutos a 5000 rpm
4. Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio, etiquetarlo como extracto de fosfatasa y colocarlo en hielo.

Actividad 2: Monitoreo de una reacción catalizada a diferentes temperaturas

1. Prepare ocho series de 3 tubos como se muestra a continuación:

Reactivo	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
Amortiguador de acetatos 1 M	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
Cloruro de magnesio 100 mM	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
PNPP 20 mM	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
Agua destilada	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL

2. Mezclar e incubar 5 minutos las 8 series de tubos a cada una de las diferentes temperaturas como se muestra a continuación:

Temperatura (°C)	Método de preparación	Material
0	Hielo con un poco de agua corriente y sal de mesa sobre el hielo (mucho más hielo que agua).	Vaso de unicel
10	Agua corriente con hielo (más agua que hielo)	Vaso de unicel
20	Agua a temperatura ambiente	Vaso de unicel
30	Baño controlado o incubadora	Baño maría o incubadora con controlador eléctrico
37	Baño controlado o incubadora	Baño maría o incubadora con controlador eléctrico
50	Baño controlado o incubadora	Baño maría o incubadora con controlador eléctrico
80	Baño controlado o incubadora	Baño maría o incubadora con controlador eléctrico
100	Agua hirviendo	Vaso de precipitados en parrilla eléctrica o platina.

3. Retirar de la incubación y agregar lo siguiente a cada serie de tubos como se muestra a continuación:

Reactivo	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
Agua destilada	0.5 mL	-----	-----
Amortiguador de acetatos de sodio 30 mM	-----	0.5 mL	-----
Extracto de fosfatasa	-----	-----	0.5 mL

4. Mezclar e incubar nuevamente 5 minutos a la temperatura correspondiente a cada serie de tubos.
5. Retirar los tubos y detener la reacción agregando **0.5 mL de KOH 500 mM** a cada tubo y agitar.

6. Dejar temperar los tubos y leer las absorbancias del tubo 2 y 3 de cada serie a 405 nm calibrando a cero con el tubo 1 de cada serie respectivamente.

Actividad 5: procesamiento de los resultados de la actividad fosfatasa

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

Práctica 6. Efecto del pH sobre la velocidad de una reacción catalizada

Propósitos	Aprender un método general para estudiar el efecto del pH sobre la velocidad de una reacción catalizada por una enzima.
Introducción	El pH del medio de reacción afecta la velocidad de reacción catalizada por un enzima y es vital al igual que en el caso de la temperatura de reacción, conocer el perfil de actividad catalítica en función del pH. El pH altera el grado de ionización de residuos críticos ionizables de las cavidades y sitios de las enzimas, por tanto pueden cambiar las afinidades por los sustratos, coenzimas o cofactores. También puede cambiar la eficiencia de transferencia de protones o en la activación de residuos críticos en los pasos de catálisis ácido base o bien en los pasos de estabilización electrostática.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
1	Piseta con agua	50 mL	Solución A: fosfato de sodio dibásica ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ FW = 178.05 g/ml)
4	Pipetas Pasteur de plástico	50 mL	Solución B: fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ FW = 138.01 g/ml)
1	Pipeta de 10 mL	1	Kit para medir actividad ureasa. Este kit lo debe manipular el maestro y él debe indicar como se mezclan los componentes y se usa. Se debe emplear justo la cantidad necesaria por equipo. Una vez repartido lo correspondiente regresar el kit al área de técnicos)
1	Micropipeta de 1 mL con puntas	50 mL	Urea 100 mM fresca no hidrolizada
1	Micropipeta de 200 mL con puntas	Alumnos	
15	Tubos de ensayo	1	Bolsa de hielo
2	Gradillas para tubos		
2	Vasos de precipitado		
1	Caja de celdas de 500 microL		
1	Propipeta de 5-10 mL		

Actividad 1: Preparación de los amortiguadores

1. Prepara una serie de 11 tubos como se muestra a continuación y rotula cada tubo con los pHs estudiados. Estos tubos serán los diferentes medios de reacción para la práctica.

Estándar de pH	Solución A (mL)	Solución B (mL)
5.8	0.080	0.920
6.0	0.123	0.877
6.4	0.185	0.815
6.8	0.490	0.510
7.0	0.610	0.390
7.2	0.720	0.280
7.6	0.870	0.130
7.8	0.915	0.085
8.0	0.947	0.0523
8.5	0.980	0.020
9.0	1.000	0.000

Actividad 2: Determinación de la actividad del glutamato deshidrogenasa

1. El maestro(a) preparará la alícuota de reactivos utilizando un kit comercial SPINREACT UREA-LQ. La proporción es de 4 mL del R1 con 1 mL del R2.
2. El maestro(a) mostrará como realizar las reacciones en una celdilla de 1 mL pipeteando lo siguiente:

Amortiguador a pH 7.0 (μ L)	Reactivo mezclado (μ L)
100	400

3. Se coloca la celdilla en el equipo y se ajusta la absorbancia a cero a 340 nm.
4. Con un cronómetro registrar los valores de absorbancia cada 10 segundos por un periodo de 3 minutos.
5. Iniciar la reacción agregando **50 μ L de urea 100 mM**
6. Monitorear el curso temporal como se indicó anteriormente.
7. Con este paso se registra el tubo pH 7.0 de la siguiente actividad

Actividad 3: Estudio del efecto del pH sobre la velocidad inicial del glutamato deshidrogenasa

1. Preparar una serie de 10 celdillas como se muestra a continuación:

Número	pH del amortiguador	Amortiguador (μL)	Reactivos (R1 y R2) (μL)
1	5.8	100	400
2	6.0	100	400
3	6.4	100	400
4	6.8	100	400
5	7.0	100	400
6	7.2	100	400
*7	7.6	100	400
8	7.8	100	400
9	8.0	100	400
10	8.5	100	400
11	9.0	100	400

*Este tubo ya se cuantificó en el ejercicio con el maestro(a)

2. Se debe medir el tiempo de reacción celdilla por celdilla, así como se les mostró en el ejercicio anterior.
3. Colocar la celdilla en el equipo y ajustar la absorbancia a cero a 340 nm.
4. Prepare el cronómetro e inicie la reacción agregando **50 μL de urea 100 mM**
5. Monitorear el curso temporal de la reacción como se indicó en cada una de las celdillas.

Actividad 4: Análisis de los datos

1. Graficar los cursos temporales de la reacción de los distintos experimentos.
2. Calcular las velocidades iniciales de las reacciones a los diferentes pHs
3. Graficar las velocidades frente a los pHs
4. Ajustar a un modelo matemático apropiado o realizar el procedimiento de análisis de los datos linealizados.

Practica 7. Determinación de los parámetros cinéticos de una reacción catalizada

Propósitos	• Aprender un método general para caracterizar una enzima empleando un ensayo enzimático acoplado. • Determinar si una reacción enzimática posee co-operatividad.
Introducción	Las reacciones catalizadas por enzimas requieren de un mínimo de dos pasos para completar las transformaciones. El primero es la unión de los sustratos a sitio activo y el segundo consta de la transformación catalítica de éstos en productos. Estas reacciones siguen los principios fisicoquímicos de todas las reacciones y por tanto se pueden caracterizar en términos cinéticos y termodinámicos. Los experimentos conocidos como cinéticas de saturación por sustratos proporcionan los datos de la reacción necesarios para determinar por métodos analítico-matemáticos los parámetros bioquímicos de las reacciones. Éstos incluyen la velocidad máxima ($V_{\max}$) que es la velocidad inicial de la reacción cuando la enzima se encuentra completamente saturada es decir cuando cada sitio activo presente en las moléculas contenidas en el medio de reacción se encuentran simultáneamente catalizando una reacción; la constante de Michaelis-Menten (K_m) o $S_{0.5}$, que representa la concentración de sustrato que produce un 50 % de saturación para enzimas con saturación hiperbólico o sigmoidea, respectivamente. El cociente $V_{\max}/K_m$ corresponde a un parámetro de especificidad por el sustrato y en ciertas concentraciones de sustratos es un parámetro de la eficiencia. Para obtener estos parámetros existen diversos métodos gráficos de análisis que incluyen ajustes no lineales a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec-MM) cuando la saturación sigue una tendencia hiperbólica rectangular que sale del origen: $v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$ Si la tendencia en el perfil de saturación es sigmoidal se usa la Ec-MM modificada con el coeficiente de Hill, parámetro que representa el grado de cooperatividad: $v = \frac{V_{\max} [S]^n}{K_{0.5}^n + [S]^n}$ El ajuste no lineal se puede realizar en un software con la capacidad de realizar iteraciones estadísticas como el software GraphPad Prism® o Micracal Origin®. El método de análisis por transformación lineal corresponde al método de Lineweaver-Burk y consta de graficar el recíproco de la velocidad inicial frente al recíproco de la concentración de sustrato: $\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$

	Donde la pendiente de la línea obtenida corresponde al inverso de la constante de especificidad y el intercepto en las ordenadas es el inverso de la $V_{\max}$. Los parámetros reales se obtienen al regresar el recíproco del valor correspondiente y la K_m se puede calcular mediante un despeje sencillo del valor del cociente $K_m/V_{\max}$ y la $V_{\max}$. La actividad de la hexoquinasa se mide empleando un ensayo acoplado a una deshidrogenasa que produce NADPH en cuál absorbe a 340 nm. La actividad se sigue monitoreando el cambio de absorbancia a 340 nm con respecto al tiempo de reacción a diferentes concentraciones de sustrato.
--	--

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
1	Piseta con agua	1	Kit de la actividad Hexoquinasa
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	Espectrómetro único® que pueda medir a 340 nm. Los espectrofotómetros génesis no sirven para medir a 340 nm		

Actividad 1: cinética de saturación de la hexoquinasa

1. Prepare una serie de 10 celdillas como se muestra a continuación:

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

- a. Colocar la celdilla 1 en el espectrofotómetro y ajustar la absorbancia a cero a 340 nm.
- b. Prepare un cronómetro para registrar los valores de absorbancia cada 10 segundos por un periodo de 3 minutos.
- c. Iniciar la reacción agregando **500 μ L del reactivo de actividad del kit comercial SPINREACT GLUCOSA-HK**, que se prepara mezclando el contenido del R2 sobre un frasco del vial R1.
- d. Monitorear el curso temporal de la reacción como se indicó en cada una de las celdillas.

Actividad 4: Análisis de los datos

1. Graficar los cursos temporales de la reacción de los distintos experimentos.
2. Calcular las velocidades iniciales de las reacciones a las diferentes concentraciones de sustrato.
3. Graficar las velocidades frente a las concentraciones usadas.
4. Ajustar a un modelo matemático apropiado o realizar el procedimiento de análisis de los datos linealizados y no linealizados.

Practica 8. Estudio de Inhibición enzimática

Propósitos	• Aprender una metodología experimental general para realizar un estudio de inhibición enzimática. • Aprender a determinar el mecanismo de inhibición enzimática mediante un estudio cinético.
Introducción	Los estudios de inhibición enzimática son una herramienta para elucidar los mecanismos de reacción y para obtener información estructural, funcional y dinámica de las enzimas. También tiene una gran aplicación biomédica y biotecnológica y por tanto esta práctica es esencial para la formación en el campo de la enzimología. Son diversos los mecanismos de inhibición y éstos dependen de cada inhibidor y de cada enzima específica. Es necesario aprender metodologías para realizar estudios de inhibición que incluyen el diagnóstico del tipo de inhibición y también la determinación de los parámetros de inhibición. Los mecanismos se diagnostican de forma operativa mediante los patrones de inhibición obtenidos por medio de gráficos de Lineweaver-Burk en donde se analiza la saturación de la enzima por sus sustratos a concentraciones fijas variables del inhibidor. Los parámetros de inhibición se obtienen tras el análisis de los re-gráficos de los parámetros obtenidos a cada concentración del inhibidor o bien mediante un ajuste no-lineal empleando la ecuación de inhibición según el modelo diagnosticado.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
1	Balanza granataria	100 mL	Amortiguador de bicarbonato de sodio 10 mM a pH de 6.0
3	Vasos de precipitados de 100 mL	10 mL	para-nitrofenil fosfato 20 mM (preparar fresco)
1	Licuada	30 mL	KOH 0.5 M
4	Tubos para centrifuga de 15 mL	30 mL	Amortiguador de acetato de sodio 1.0 M a pH de 5.7
1	Centrifuga clínica	30 mL	Cloruro de magnesio 0.1 M
30	Tubos de ensayo	10 mL	Fosfatos de sodio monobásico 0.005M a pH 5.7
2	Gradillas	50 mL	Fluoruro de sodio 0.005M
1	micropipeta de 1 mL y de 200 0 100 µL y sus 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 para espectrofotómetro		

1	Espectrofotómetro visible		
---	---------------------------	--	--

Actividad 1: Preparación de la fosfatasa ácida.

1. Pesar 25 gr de una papa pelada y cortada en cubos.
2. Colocarla en una licuadora con 50 mL de amortiguador de bicarbonato de sodio 10 mM pH 6.0.
3. Licuar por un minuto a máxima velocidad, asegurándose que se forme un homogenizado.
4. Vaciar el contenido en un vaso de precipitado a través de un colador de poro pequeño.
5. Filtrar con papel filtro el vaciado obtenido y colocarlo en tubos para centrífuga de 15 mL.
6. Centrifugar los tubos a 3500 rpm por 10 minutos.
7. Recuperar el sobrenadante en tubos limpios previamente rotulados como extracto de fosfatasa ácida y colocarlos en hielo hasta su uso.

Actividad 2: Preparación de estándares de sustrato.

1. Prepare una serie de 8 tubos rotulándolo con letras consecutivas como se muestra a continuación:

Tubo (estándar)	4-NFF 20 mM (μ L)	Agua destilada (μ L)	Concentración final de sustrato en la dilución [mM]
A (Est)	0	1	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 servirán para realizar los experimentos de saturación de la fosfatasa ácida.

Actividad 3: Determinación de los parámetros cinéticos de la reacción de hidrólisis del 4-nitrofenil fosfato en ausencia de inhibidores.

1. Prepare una serie de 7 tubos como se muestra a continuación, rotulando los tubos con letras de la A a la H sin inhibidor.

Tubo (sin inhibidor)	Amortiguador de acetato de sodio 1M (mL)	MgCl ₂ 0.1 M (mL)	Estándar de sustrato (mL)	Agua destilada (mL)
A (sin I)	0.1	0.1	0.1	1.0
B (sin I)	0.1	0.1	0.1	1.0
C (sin I)	0.1	0.1	0.1	1.0
D (sin I)	0.1	0.1	0.1	1.0
E (sin I)	0.1	0.1	0.1	1.0

F (sin I)	0.1	0.1	0.1	1.0
G (sin I)	0.1	0.1	0.1	1.0
H (sin I)	0.1	0.1	0.1	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 absorbancias observado entre 5 minutos. Se puede usar como $\Delta\text{abs}/\text{min}$ o bien se puede usar el coeficiente de absorción molar del p-nitrofenil y corregir a mM/min.

Actividad4: Inhibición de la enzima por el fosfato.

1. Prepare una serie de tubos 7 como se muestra a continuación, rotulando los tubos con letras de la A a la H con fosfato.

Tubo (fosfatos)	Amortiguador de acetatos de sodio 1M (mL)	MgCl ₂ 0.1 M (mL)	Estándar de sustrato (mL)	Agua destilada (mL)	Fosfato de sodio 5 mM (mL)
A (fosfatos)	0.1	0.1	0.1	0.8	0.2
B (fosfatos)	0.1	0.1	0.1	0.8	0.2
C (fosfatos)	0.1	0.1	0.1	0.8	0.2
D (fosfatos)	0.1	0.1	0.1	0.8	0.2
E (fosfatos)	0.1	0.1	0.1	0.8	0.2
F (fosfatos)	0.1	0.1	0.1	0.8	0.2
G (fosfatos)	0.1	0.1	0.1	0.8	0.2
H (fosfatos)	0.1	0.1	0.1	0.8	0.2

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 absorbancias observado entre 5 minutos. Se puede usar como $\Delta\text{abs}/\text{min}$ o bien se puede usar el coeficiente de absorción molar del p-nitrofenil y corregir a mM/min.
7. Este experimento es similar al anterior solo que 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. Prepare una serie de 7 tubos como se muestra a continuación, rotulando los tubos con las letras de la A a la H con fluoruro.

Tubo (fluoruro)	Amortiguador de acetatos de sodio 1M (mL)	MgCl ₂ 0.1 M (mL)	Estándar de sustrato (mL)	Agua destilada (mL)	Fluorur sodio 5 mM (mL)
A (fluoruro)	0.1	0.1	0.1	0.8	0.2
B (fluoruro)	0.1	0.1	0.1	0.8	0.2
C (fluoruro)	0.1	0.1	0.1	0.8	0.2
D (fluoruro)	0.1	0.1	0.1	0.8	0.2
E (fluoruro)	0.1	0.1	0.1	0.8	0.2
F (fluoruro)	0.1	0.1	0.1	0.8	0.2
G (fluoruro)	0.1	0.1	0.1	0.8	0.2
H (fluoruro)	0.1	0.1	0.1	0.8	0.2

- Mezclar e incubar 5 minutos a 37 °C.
- Iniciar las reacciones pipeteando a cada tubo 100 µL de extracto de la enzima.
- Mezclar e incubar los tubos 5 minutos a 37 °C y detener la reacción agregando 100 µL de KOH 0.5 M.
- Medir las absorbancias a 405 nm calibrando a cero con el tubo A.
- La velocidad inicial se calcula dividiendo el cambio de absorbancias observado entre 5 minutos. Se puede usar como $\Delta\text{abs}/\text{min}$ o bien se puede usar el coeficiente de absorción molar del p-nitrofenil y corregir a mM/min

Actividad 6: Análisis de los datos

- Calcular las velocidades iniciales de las reacciones en las diferentes concentraciones y condiciones.
- Graficar las velocidades frente a las respectivas concentraciones.
- Obtener gráficos de Lineweaver-Burk de los patrones de inhibición.
- Determinar qué tipo de inhibición se observa con el fosfato y el fluoruro.

Practica 9. Cooperatividad en cinética de saturación de una enzima

Propósitos	• Aprender una metodología experimental general para realizar un estudio de co-operatividad.
Introducción	El fenómeno de cooperatividad en los sistemas biológicos es fundamental para que las funciones y su regulación se den de forma eficiente y en las escalas biológicas críticas. No todas las maquinas moleculares presentan el fenómeno, pero se ha encontrado una relación entre el índice de la capacidad reguladora de procesos globales y la cooperatividad. Existen diversos mecanismos que dan cuenta con la cooperatividad y el alosterismo es el más estudiado. Consiste en la comunicación fisicoquímica entre sitios distintos produciendo una marcada dependencia entre ellos. Lo que ocurre en un sitio afecta la eficiencia de otros. Los efectos pueden ser entre sitios idénticos presentes en diferentes subunidades o dominios (efectos homotrópicos) o bien entre sitios estructuralmente distintos localizados en la misma o en diferentes subunidades o dominios (efectos hetrotópicos). También el efecto puede ser sobre la afinidad por los sustratos (sistema en K), por la velocidad máxima (sistema en V) o bien pueden ser mixtos (sistema V/K). el tipo y grado de cooperatividad se analiza por medio de experimentos de cinéticas de saturación en distintas condiciones o en presencia de distintos inhibidores o activadores (moduladores alistéricos) a concentraciones fijo-variables y empleando modelos alostéricos correspondientes, como el modelo de Monod o de Koshland. La enzima Lactato deshidrogenasa es un ejemplo de enzimas alostéricas y su cooperatividad por el sustrato es sensible al pH.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
1	Piseta con agua	1	Kit para el lactato dehidrogenasa
4	Pipetas Pasteur de plástico	50 mL	Glucosa 50 mM, para todo el grupo
1	Micropipeta de 1 mL con puntas	20 mL	De PBS 1X
1	Micropipeta de 10 microL con puntas	20 mL	Amortiguador de fosfatos a pH 6.0
1	Micropipeta de 200 microL con puntas		
10	Tubos de ensayo		
1	Gradilla para tubos		
2	Vasos de precipitado de 100 mL		
1	Caja de celdas de 1 mL		

1	Espectrómetro unico® que pueda medir a 340 nm		
---	---	--	--

Actividad 1: cinética de saturación de lactato deshidrogenasa

1. Pipetear en celdas de espectrofotómetro, previamente rotuladas, los siguientes componentes:

Celdas	[piruvato] (mM)	piruvato 100 mM (mL)	NADH 5 mM (mL)	PBS 2X (mL)	Agua (mL)
1	0	0	0.01	0.25	0.24
2	0.5	0.0025	0.01	0.25	0.24
3	1.0	0.005	0.01	0.25	0.24
4	2.5	0.0125	0.01	0.25	0.23
5	5.0	0.025	0.01	0.25	0.22
6	10.0	0.05	0.01	0.25	0.19
7	15.0	0.075	0.01	0.25	0.17
8	20.0	0.1	0.01	0.25	0.14
9	25.0	0.125	0.01	0.25	0.12
10	30.0	0.15	0.01	0.25	0.09

2. Estas celdas no presentan reacción aún, se usan para para seguir la reacción temporal de una por una en los siguientes pasos.
3. Colocar de una por una las celdas de una en una en el espectrofotómetro y ajustar la absorbancia a 340 nm a cero.
4. Prepararse con un cronometro para registrar los valores de absorbancia cada 10 segundos por un periodo de tres minutos.
5. Iniciar la reacción agregando 100 μ L de la enzima lactato deshidrogenasa.
6. Monitorear el curso temporal de la reacción como se indicó en cada una de las celdas.
7. Repetir el experimento, pero ahora empleando un amortiguador de fosfatos a pH de 6.0.

Actividad 2: Análisis de los datos

1. Graficar los cursos temporales de la reacción de los distintos experimentos.
2. Calcular las velocidades iniciales de las reacciones a las diferentes concentraciones de sustrato.
3. Graficar las velocidades frente a las concentraciones usadas.
4. Ajustar a un modelo matemático apropiado o realizar el procedimiento de análisis de los datos linealizados y no linealizados.

Practica 10 y 11. Purificación de una enzima (esta práctica se hace en dos sesiones)

Propósitos	Aprender una metodología experimental para purificar una enzima.
Introducción	Contar con un método de extracción y posterior purificación a homogeneidad de una enzima es esencial para su caracterización bioquímica, su extrapolación fisiológica y sus potenciales aplicaciones biotecnológicas. Son numerosos los métodos de purificación de enzimas y cada una en particular requiere de una estandarización minuciosa del método óptimo. En esta práctica se experimenta con el método general de precipitación por medio de sales y fraccionamiento en diferentes condiciones. Aunque una de las fracciones obtenidas presenta una pureza relativamente alta, se recomienda que se combinen estos métodos con los cromatógrafos, electroforéticos u otros hasta lograr la homogeneidad deseada u óptima.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
1	Balanza granataria	100 mL	Amortiguador de bicarbonato de sodio 10 mM a pH de 6.0
3	Vasos de precipitados de 250 mL	30 mL	KOH 0.5 M
1	Licuada y colador	30 mL	Amortiguador de acetato de sodio 0.05 M a pH de 5.7
4	Tubos para centrifuga de 15 mL	30 mL	Cloruro de magnesio 0.1 M
1	Centrifuga clínica	100 g	De sulfato de amonio
10	Microtubos de 1.5 mL	20 mL	Cloruro de manganeso 1 M
2	Gradillas de unicel.		
1	micropipeta de 1 mL y de 200 0 100 uL y sus puntas		
2	Pipetas Pasteur de plástico		
1	Incubadora a 60-70 °C		
1	piseta con agua destilada		
1	Probetas de 100 mL		
1	Barra magnética		
1	Platica para agitar		
Para la segunda semana			
1	Caja de celdas de 1 ml de plástico para espectrofotómetro	10 mL	para-nitrofenil fosfato 20 mM (preparar fresco)
1	Espectrofotómetro visible	20 mL	Cloruro de manganeso 1 M
1	Micropipeta 1 mL y puntillas	50 mL	Reactivo de Bradford
20 mL	KOH	1 mL	albumina 1 mg/mL

Primera semana: Práctica 10**Actividad 1: Preparación de la fosfatasa ácida.**

1. Pesar 25 gr 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 para centrífuga de 15 mL y equilibrar por peso en la centrífuga.
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 antes obtenido en un vaso de precipitado de 150 mL y agitar suavemente con una varilla de vidrio mientras se agregan al vaso 1 mL de MnCl_2 1M por cada 50 mL de sobrenadante.
2. Vaciar a tubos para centrífuga 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 del sobrenadante y rotularlo 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. Centrifugue a 3500 rpm durante 5 minutos para remover la proteína no solubilizada.
8. Recuperar el sobrenadante y guardar una alícuota de 1 mL rotulándola como **Fracción III**. Reservar en hielo.
9. Transfiera el sobrenadante anterior en un vaso de precipitado y agite gentilmente mientras agrega de poco en poco la proporción correcta de sulfato de amonio (35 gr por cada 100 mL de sobrenadante) 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. Dejar incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
12. Colocar la mezcla en un tubo para 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 rotulándola como **Fracción IV**. Reservar en hielo.
15. El sobrenadante obtenido del paso anterior colocarlo en un vaso de precipitado y agregar la cantidad correcta de sulfato de amonio (54 gr por cada 100 mL de sobrenadante) para producir una saturación del 54%. La adición del reactivo deberá ser de poco en poco mientras se agita gentilmente con una varilla de vidrio hasta que se disuelva correctamente.
16. Vaciar a un tubo para centrífuga y calibrar 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.
20. Retirar de la incubación y enfriarlo en hielo por 10 minutos.
21. Una vez enfriado se lleva a centrifugar por 5 minutos a 3500 rpm.
22. Recuperar el sobrenadante y guarda una alícuota de 1 mL rotulándola como **Fracción V**. Reservar en hielo. El sobrenadante restante se puede desechar.
23. Resuspenda el precipitado obtenido en el tratamiento térmico en 20 mL de agua destilada.
24. Centrifugue 5 minutos a 3500 rpm para eliminar la fracción insoluble.
25. Recuperar el sobrenadante y alicuotar 1 mL rotulándolo como **Fracción VI**.
26. Almacene sus fracciones a -20 °C para su posterior análisis.

Segunda semana: Práctica 11

Actividad 3: Cuantificación de la actividad y concentración de proteína

1. Prepare una serie de 6 tubos como se muestran a continuación:

Tubo (etapa de la purificación)	4-NFF 20 mM (mL)	Agua destilada (mL)
I	0.1	0.9
II	0.1	0.9
III	0.1	0.9
IV	0.1	0.9
V	0.1	0.9
VI	0.1	0.9
VII	0.1	0.9

2. Incubar los tubos a 37 °C por 5 minutos.
3. Iniciar la reacción agregando 100 µL de la fracción de enzima correspondiente a cada tubo y al tubo de la fracción VII solo se le agrega 100 µL de agua destilada para calibrar a cero.
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 medio de un ensayo por Bradford.

Actividad 3: Análisis electroforético de las fracciones

1. Esta actividad se realiza sólo si está disponible el aparato de SDS-PAGE de Biorad miniprotein II. Ésta se puede realizar en el laboratorio V310, sólo es necesario que el maestro programe la sesión con tiempo de antelación en el V310.
2. Correr las 6 fracciones obtenidas en un gel SDS-PAGE, previamente elaborado por el maestro.
3. En microtubos pipetear 20 µL de cada una de las fracciones y 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 pequeña o en un tupper.
7. Fijar los geles con metanol al 50 %.
8. Revelar los geles con reactivo de Bradford, incubado 2 minutos.
9. Retirar el reactivo de Bradford y agregar agua.
10. 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.
2. Construir una tabla de purificación.
3. Analizar el grado de purificación del SDS-PAGE.

Practica 12. Sobreexpresión de una enzima recombinante (para realizarse en dos sesiones)	
Propósitos	• Aprender un método general de sobreexpresión de una enzima recombinante, usando un inductor. • Aprender una estrategia metodológica para extraer las fracciones proteicas de un cultivo de bacterias. • Aprender una estrategia metodológica para determinar la actividad de la enzima recombinante.
Introducción	La obtención de enzimas recombinantes proporciona numerosas ventajas sobre la obtención de las mismas de sus fuentes naturales. La sobreexpresión de las enzimas se puede hacer de forma controlada y el uso de la ingeniería genética para agregar etiquetas moleculares que faciliten su detección, extracción, purificación y caracterización ha producido en gran avance en el campo de la enzimología. En esta práctica se emplea una estrategia de las más utilizada en la investigación y en la industria, que consiste en el uso de la cepa B121 de <i>E. coli</i> y el sistema de vectores de clonación pET. Por su complicación la práctica no se realiza completamente por parte de los alumnos y requiere de una elaboración previa de un pre-inoculo y de un cultivo para la expresión que se encuentre a una densidad óptica a 600 nm de entre 0.4 a 0.7. la inducción se realiza con el análogo de la lactosa el IPTG y su análisis por medio de la cuantificación de la actividad catalítica de la enzima en cuestión y mediante un desarrollo electroforético SDS-PAGE.

Requerimientos por equipo (esta práctica se realizará en el Laboratorio V310)

Materiales		Reactivos	
1	Piseta con agua	20 mL	PBS 1x
		1 mL	NADP ⁺ 10 mM
4	Cuatro microtubos de 1.5 mL	2 mL	glutamato 100 mM a pH 8.0
1	Juego de micropipetas y puntas		
2	Vasos de precipitado		
1	Espectrofotómetro UV-Vis		
2	Celdas de espectrofotómetro de 1 mL		
		Materiales localizados en el V310	
		1	Sonicador con micropunta
		1	Incubadora de 37 °C con agitación
		1	Microcentrífuga de 10000 rpm

		15 mL	Un cultivo de <i>E. coli</i> BI-21-DE3 en LB líquido-kanamicina (30 µg/mL), a 0.5 D.O _{600nm} de una clona transformada con el vector pET28b-EcGDH (glutamato deshidrogenasa de <i>E. coli</i>), en tubo de 50 mL. Esto se proporciona en el V310
		1 mg	Lisozima liofilizada
		0.010 mL	IPTG 1 M

Actividad 1: Sobreexpresión de la enzima recombinante

1. Preparar un día antes de la práctica un pre-inoculo de 10 mL (para todo el grupo) de un cultivo de *E. coli* BI-21-DE3 en LB líquido-kanamicina (30 µg/mL), de una clona transformada con el vector pET28b-EcGDH, en tubo de 50 mL estéril.
2. Incubar toda la noche a 37 °C con agitación a 225 rpm.
3. A la mañana siguiente escalar 500 µL de cultivo en 15 mL de cultivo LB-kanamicina estéril y fresco.
4. Incubar a 37 °C con agitación a 225 rpm por un periodo de 2 horas o hasta que se alcance una densidad óptica a 600 nm de 0.5.
5. Agregar al cultivo IPTG a una concentración final de 100 µM, 1.5 µL al cultivo de 15 mL.
6. Incubar a 37 °C con agitación a 225 rpm por un periodo de 4 horas, el cultivo resultante después de esta incubación, es el que se usará el día y hora de la práctica.
7. Colocar otro tubo en el que no se agrega IPTG, para comparar con el tubo en donde si se sobre expresa la enzima.
8. De manera alternativa el maestro puede preparar los cultivos de estos tratamientos y conservarlos en forma de paquete celular y almacenarlos a -20 °C hasta su uso. La manera de generar los paquetes es siguiendo los pasos 1 y 2 de la actividad 2, reservando los precipitados obtenidos. Si se usa esta alternativa el alumno debe continuar en el paso 3 de la actividad 2.

Actividad 2: Cosecha y lisis de las células

1. Centrifugar a 6,000rpm por 15 minutos los tubos que contienen los 15 mL de cultivo de la actividad anterior (con IPTG y sin IPTG).
2. Retirar el sobrenadante sobre un vaso de precipitados conteniendo una solución de hipoclorito de sodio al 4 %, para eliminar las bacterias que quedan en este.
3. Resuspender el precipitado (células) en 500 µL de PBS.
4. Agregar 0.5 mg de lisozima a la suspensión celular e incubar el tubo en hielo por 15 minutos, con agitación.
5. Sonicar la suspensión celular 1 minuto a máxima potencia.
6. Centrifugar a 10,000 rpm por 25 minutos.
7. Recuperar el sobrenadante en tubos limpios y rotulados como extracto soluble libre de células.
8. Reservar en hielera hasta su uso en la siguiente actividad.

Actividad 3: Determinación de la actividad enzimática del lactato deshidrogenasa.

1. Pipetear los siguientes componentes en celdas de espectrofotómetro:

Celda	glutamato 100 mM (μ L)	NADP+ 10 mM (μ L)	MEDIO DE REACCIÓN μ L
1	20	30	550
2	20	30	550

2. La reacción se inicia con la adición de 50microL de extracto de enzima y ésta debe pipetear una vez que este colocada la celda en el espectrofotómetro, con su blanco previamente ajustado.
3. Agregar la enzima, agitar con la punta rápidamente y medir la absorbancia a 340 nm cada 5 segundos por 5 minutos.
4. Graficar el cambio de absorbancia con respecto el tiempo de reacción y calcular la velocidad inicial de la reacción.

Actividad 4: Discusión

1. Comparar la velocidad de la reacción en ausencia y presencia del inductor.
2. Comparar la diferencia de unidades totales en las dos muestras.

Practica 13. Cromatografía de proteínas (para realizar en dos sesiones)

Propósitos	Aprender un método general para la purificación de una enzima por cromatografía de intercambio aniónico.
Introducción	La cromatografía de intercambio iónico constituye una de las técnicas más socorridas para la purificación de enzimas. La separación de las diferentes se logra por la diferencia de carga de las moléculas de las enzimas que interaccionan con diferente afinidad con la fase estacionario que presenta una carga formal. Las proteínas unidas a la matriz se eluyen empleando un con una alta concentración de un ion aplicando electrolitos fuertes como el NaCl o el KCl mediante gradientes lineales o escalonados y fraccionando el volumen de elución se logran separar las proteínas con diferentes cargas. El perfil obtenido se llama cronograma y se analiza midiendo la concentración de proteína y/o su actividad enzimática. Las fracciones de interés se mezclan y se analiza su grado de pureza. Muy amenudeo una cromatografía de intercambio iónico no será suficiente para lograr la pureza deseada y se suelen emplean otras técnicas cromatográficas subsecuentemente, como una filtración en gel o una cromatografía de afinidad.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
1	Piseta con agua	100 mL	PBS 1x Filtrado
4	Cuatro microtubos de 1.5 mL	50 mL	PBS con 500 mM de NaCl Filtrado
1	Juego de micropipetas y puntas	50 mL	de NaCl 1 M Filtrado
2	Vasos de precipitado	100 mL	urea 0.2 M (recién preparada) para todo el grupo. Hacer una prueba mezclando 1 mL de la solución con 1 mL del medio de reacción, si cambia de color amarillo a rosa significa que la urea esta hidrolizada y no funcionará.
1	Espectrofotómetro Uv-Vis	100 mL	Medio de reacción: Solución de rojo de fenol 0.032 mM, pH 6.8 en bicarbonato de sodio 0.001%, para todo el grupo
2	Celdas de espectrofotómetro de 1 mL	5 mL	Resina DEAE-Sepharose o celulosa
20	Tubos de ensaye	2	gr de semillas de sandia molida (área bioquímica) si no esta

			disponible en el área los alumnos deben de llevarlas y estas no deben haber sido calendas o expuestas al sol. Se preparan moliéndolas en licuadora o molino de café)
2	Gradillas	Materiales por parte de los alumnos	
1	Centrifuga clínica	2	Jeringas estériles de 5 mL
		1	Equipo de venoclisis 
1	Balanza granataria		

Actividad 1: preparación de la columna de cromatografía

1. Cortar un círculo de material poroso del tamaño del embolo de la jeringa de 5 mL. Se puede usar el embolo para dibujar con un lápiz el círculo y después cortarlo.
2. Colocar el filtro cortado en el interior de la jeringa.
3. Pesar 1 g de resina de DEAE-Sepharose e hidratarla con PBS 1x. es necesario tener precaución de no agitar o maltratar las perlitas de la resina porque estas son susceptibles a romperse.
4. Verter poco a poco y con precaución por decantación la resina adentro de la jeringa que tiene previamente colocado el filtro circular.
5. Agregar 3 mL de PBS-NACL 1 M, antes de que se pase todo el volumen a través de la resina agregar otros 3 mL.
6. Agregar 3 mL de PBS 1X, después repetir el paso otras 5 veces. Este proceso se llama equilibrado de la columna.
7. En la punta de la jeringa colocar una manguera del equipo de venoclisis de unos 5 cm y doblar para cerrar o abrir el flujo.
8. La columna ya está lista para la siguiente actividad

Actividad 2: extracción de la ureasa de semilla

1. Prender los espectrofotómetros.
2. Pesar 2.0 g de semilla de sandia seca y molida, colocar en un vaso de precipitado y resuspender con 13 mL de agua destilada y transferir a tubo de centrifuga de plástico de 15 mL. No hacer este paso en el tubo ya que se tapaná.
3. Centrifugar la muestra a 3500-6,000 rpm por un periodo de 5 minutos (equilibrar los tubos por peso). No agitar el tubo para evitar que se resuspenda el precipitado.
4. Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio, previamente rotulado como extracto de ureasa y colocar en hielo.

5. Cuantificar la concentración de proteína por el método de Bradford. Se recomienda que dos integrantes del equipo realicen la cuantificación y el resto prosiga con lo siguiente.

a. En siete celdas de plástico colocar los siguientes componentes:

celda	Estándar de albumina 250 $\mu\text{g/mL}$ (μL)	Muestra (μL)	Agua destilada (μL)
1	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

- b. Poner un rotulo con masking-tape a cada celda para que no se cofundan a la hora de leer.
- c. Pipetear 1 mL de reactivo de Bradford 1x a cada una de las celdas
- d. Mezclar en el vortex por 30 segundos, con precaución.
- e. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente y medir absorbancia a 595 nm (prender el espectro 20 minutos antes)
- f. La celda 1 es el blanco.
- g. En caso de no poder realizar la cuantificación de la proteína prosiga con el resto de la práctica.

Actividad 3: Cromatografía del lactato deshidrogenasa

1. Inyectar o pasar el sobrenadante del extracto de ureasa por la columna. La fracción que sale de la columna es llamada fracción no unida (FNU) y debe ser colectada en un tubo limpio, seco y previamente rotulado como FNU.
2. Hacer un lavado de la columna con 30 mL amortiguador PBS-pH 6.5 y colectar las fracciones de lavado en tubos de 5 mL previamente rotulados como lavados y con números ascendentes como corresponda.
3. Eluir la proteína unida con amortiguador PBS-pH 6.5, conteniendo 400 mM de KCl y colectar las fracciones de elución en tubos de 1 mL rotulados como fracciones eluidas con números ascendentes como corresponda.
4. Cuantificar la concentración de proteína de cada una de las fracciones obtenidas y medir la actividad catalítica:
5. En celdas de espectrofotómetro pipetear lo que se indica en la tabla, excepto el iniciador de la reacción, este debe agregarse una vez que la celda está en el espectrofotómetro.

Urea 0.2 M (mL)	Agua destilada (mL)	MEDIO DE REACCIÓN (mL)	Iniciador de la reacción
0.100	0.800	1.0	0.1 mL de extracto de la enzima

6. La reacción se inicia con la adición de 50 μL de extracto de enzima o agua, según corresponda y ésta debe pipetear una vez que este colocado la celda en el espectrofotómetro, con su blanco previamente ajustado.
7. Agregar la enzima, o el agua destilada y agitar con la punta rápidamente y medir la absorbancia a 560 nm cada 30 segundos por 5 minutos.
8. En la bitácora construir una tabla con los tiempos 0, 30, 60, 90, etc., en una columna y en otras dos columnas anotar el valor de las absorbancias. Para realizar esta actividad se requieren dos o tres integrantes de cada equipo.
9. En casa, graficar el cambio de absorbancia con respecto el tiempo de reacción y calcular la velocidad inicial de la reacción.
10. Regraficar las velocidades obtenidas en columnas y analizar las diferencias.

Actividad 3: Análisis de los resultados

1. Elaborar una tabla de purificación con la concentración de proteína de cada fracción, así como la actividad específica, las unidades de actividad totales, las veces de purificación y la abundancia relativa de la enzima de interés.
2. Elaborar un gráfico de dos ejes Y, en uno graficar las concentraciones de proteína de cada fracción y en el otro la actividad observada.
3. Juntar las fracciones de elución con actividad catalítica y reservar para la próxima práctica.

Practica 14. Encapsulamiento o inmovilización de una enzima

Propósitos	Aprender un método general para inmovilizar enzimas y monitorear su actividad.
Introducción	La inmovilización de enzimas es la mezcla de un biocatalizador con un soporte insoluble que produce la unión de las moléculas de la enzima en la fase insoluble. La matriz insoluble es usualmente un polímero de alto peso molecular como la quitina, quitosano, celulosa, acrilamida, almidón o alginato. La inmovilización de enzimas presenta ventajas en la estabilidad y en ocasiones la eficiencia de las enzimas, además, al estar dentro de una matriz insoluble, se pueden recuperar las capsulas y reusar en una mezcla de reacción nueva. Existen cinco métodos generales para inmovilizar enzimas: (1) adsorción, (2) unión covalente, (3) atrapamiento electrostático, (4) encapsulamiento y (5) entrecruzamiento. El alginato es un polímero relativamente soluble en medios acuosos, por lo que se puede mezclar de forma inocua con enzimas e incluso con células y después del contacto con una solución de CaCl_2 se polimeriza. Este efecto sirve para encapsular moléculas de enzimas dentro de esferas en donde las enzimas quedan atrapadas entre las fibras del polímero agregado.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
1	Piseta con agua	100 mL	PBS 1x Filtrado
1	Juego de micropipetas y puntas	20 mL	CaCl_2 1.5 % (m/V)
2	Vasos de precipitado de 100 mL	10 mL	Extracto de ureasa
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 para calentar	Materiales por parte de los alumnos	
2	Pipetas de 10 ml con pro-pipeta	2	Jeringas estériles de 5 mL
1	Vasos de precipitado de 100 mL	1	Equipo de venoclisis
			
1	Microscopio de campo claro con portaobjetos y cubre objetos	1	Navaja de un filo

1	gr de semillas de sandia molida (bioquímica)		
1	centrifuga clinica		
1	Balanza granataria		
2	tubos para centrifuga de 15 mL		

Actividad 1: Extracción de la ureasa de semilla de sandia

1. Pesar 4.0 gr de semilla de sandia seca y molida, colocar en un vaso de precipitados y resuspender con 13 mL de agua destilada.
2. Centrifugar la muestra a 3500-6,000 rpm por un periodo de 5 minutos (equilibrar los tubos por peso). No agitar el tubo para evitar que se resuspenda el precipitado.
3. Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio, previamente rotulado como extracto de ureasa y colocar en hielo.

Actividad 2: preparación la mezcla de alginato y la enzima

1. Preparar un coloide de alginato mezclando 0.5 g de alginato de sodio en 12.5 mL de agua destilada.
2. Mezclar hasta lograr homogeneidad, calentando la mezcla a 60 °C si es necesario.
3. Permitir que la mezcla se atempere al ambiente.
4. Mezclar el 10 mL de alginato con 10 mL de ureasa.
5. Reservar en hielo hasta su uso.

Actividad 3: preparación de las esferas de alginato-ureasa

1. En un vaso de 10 mL colocar 5 mL de solución de CaCl_2 al 1.5 % frio.
2. Agitar con una barra magnética en una platina a muy baja velocidad.
3. Colocar la jeringa sujeta sobre un soporte universal.
4. En la punta de la jeringa colocar un pedazo de tubería de 10 cm de venoclisis.
5. Colocar el regulador de flujo en la manguera.
6. Quitar el embolo de jeringa y verter la mezcla de alginato y ureasa
7. Abrir el regulador del flujo de tal manera que caiga una pequeña gota sobre la solución de CaCl_2 que se encuentra en agitación.
8. Las gotas deben ser del mismo tamaño aproximadamente y el tamaño de la esfera de alginato polimerizado depende del volumen de la gota.
9. Una vez obtenidas todas las esferas, con la ayuda de un colador de cocina enjuagarlas con 5 mL de PBS cinco veces.
10. Almacenar las esferas en 10 mL de PBS y reservar para la próxima práctica.

Actividad 4: Análisis de los resultados

1. Tomar cinco esferas y pesarlas.
2. Con la ayuda de 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.
5. Analizar nuevamente las esferas y si es necesario cortar con una navaja una de ellas para observar los puntos donde se encuentra inmovilizada la enzima.

Practica 15. Uso de una enzima como sensor de la concentración de un metabolito en muestras biológicas

Propósitos	• Aprender un método general para detectar y cuantificar metabolitos en muestras biológicas.
Introducción	Las enzimas son empleadas en una gran variedad de ensayos para cuantificar la concentración de moléculas en muestras de origen biológico, como de sangre, suero y orina. En un ensayo típico de estos se emplea una cantidad conocida de enzima y todas las condiciones óptimas de operación de la enzima excepto el sustrato que se desea cuantificar, que lo aporta la muestra biológica y por tanto la actividad específica observada depende de la concentración de la molécula de interés en la muestra. para calcular con precisión la concentración de la molécula de interés se realiza una serie de ensayos con un estándar del sustrato y a menudo también se ensaya un control negativo.

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
1	Piseta con agua	100 mL	urea 0.2 M (recién preparada) para todo el grupo
1	gr de semillas de sandia molida (bioquímica)	100 mL	Solución de rojo de fenol 0.032 mM, pH 6.8 en bicarbonato de sodio 0.001%, para todo el grupo
15	15 tubos de ensayo	1 mL	Estándar de ovoalbúmina de 250 µg/mL
4	4 pipetas de 10 mL	10 mL	Reactivo de Bradford 1x
4	4 pipetas de 1 mL		
1	Caja de celdas para espectro de 1.5 mL y de 3 mL		
1	1 vaso de pp de 50 mL	Alumnos	
2	2 tubos para centrifuga de 15 mL	1	Perlas de enzima inmovilizada obtenidas en la práctica anterior
1	Balanza granataria	1	Muestra de suero sanguíneo
1	vortex	1	Muestra de orina
1	centrifuga clínica		
1	Juego de tres micropipetas (10, 200 y 1000 µL) y puntas		
1	Hielera pequeña de unicel		
1	Etiquetas de rotulación o masking tape (alumnos)		

Actividad 1: Monitoreo de la reacción de la ureasa inmovilizada

1. Pipetear los siguientes componentes en celdas de espectrofotómetro:

Celda	Urea [mM]	Urea 200 mM (μL)	Agua destilada (mL)	MEDIO DE REACCIÓN mL
1	0	0	0.9	1.0
2	0.5	5	0.895	1.0
3	1	10	0.890	1.0
4	2	20	0.880	1.0
5	4	40	0.860	1.0
6	8	80	0.820	1.0
7	10	100	0.800	1.0
8	15	150	0.750	1.0
9	20	200	0.700	1.0

2. La reacción se inicia con la adición de 5 esferas de enzima inmovilizada y ésta debe pipetear una vez que este colocada la celda en el espectrofotómetro, con su blanco previamente ajustado.
3. Agregar la enzima, agitar con la punta rápidamente y medir la absorbancia a 560 nm cada 30 segundos por 2 minutos.
4. Graficar el cambio de absorbancia con respecto el tiempo de reacción y calcular la velocidad inicial de la reacción.
5. Regraficar las velocidades obtenidas frente a la concentración de sustrato y realizar el análisis grafico correspondiente para calcular los parámetros cinéticos de la reacción.

Actividad 2: Monitoreo de la concentración de urea en suero y orina con la enzima inmovilizada

1. Obtener una muestra de orina humana en un tubo de centrifuga con tapa o en un recipiente para contener orina.
2. Obtener una muestra de 5 mL de sangre periférica humana y posteriormente centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos para obtener el suero siguiendo los protocolos de obtención de muestras clínicas.
3. Pipetear los siguientes componentes en dos celdas de espectrofotómetro:

Celda	Muestra	mL de muestra	Agua destilada (mL)	MEDIO DE REACCIÓN mL
1	suero	0.1	0.9	1.0
2	orina	0.1	0.9	1.0

4. La reacción se inicia con la adición de 5 esferas de enzima inmovilizada y ésta debe pipetear una vez que este colocada la celda en el espectrofotómetro, con su blanco previamente ajustado.
5. Agregar la enzima, agitar con la punta rápidamente y medir la absorbancia a 560 nm cada 30 segundos por 2 minutos.

6. Con el patrón de velocidad obtenido en la actividad 1, calcular por interpolación la concentración de la urea en las muestras. Si es necesario repetir el procedimiento diluyendo la muestra.

Actividad 3: Análisis de los resultados

1. Obtener los parámetros cinéticos obtenidos de los experimentos de la actividad 1.
2. Comparar los parámetros de reacción los de la práctica 4.
3. Comparar las concentraciones de urea en las diferentes muestras y con los valores que se obtuvieron en los otros equipos.

Practica 16. Cristalización de una enzima

Propósitos	Aprender un método general para cristalizar una enzima
Introducción	

Requerimientos por equipo

Materiales		Reactivos	
1	Piseta con agua	20 mL	NaCl con agua desionizada 2.5 M filtrado
6	tubos de ensayo	20 mL	Acetato de sodio (acNa) con agua desionizada 0.3 M pH 4.6 filtrado
1	1 vaso de pp de 50 mL	1 mL	Lisozima a 30 mg/mL (maestro)
1	Juego de tres micropipetas (10, 200 y 1000 μ L) y puntas	1 mL	Lisozima a 40 mg/mL (maestro)
1	Hielera de unicel con tapa	1 mL	Lisozima a 50 mg/mL (maestro)
1	Placa de Elisa de 6 columnas x 4 fi		

Actividad 1: preparación de las condiciones de cristalización

- Pipetear los siguientes componentes tubos de ensayo previamente roturados:

Condición	[NaCl final] mM	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
C	1.20	0.96	0.66	0.38

- Preparar una placa de cristalización, poniendo en el borde de cada pozo a emplear grasa de vacío con la ayuda de una jeringa.
- Pipetear en la primera línea tres pozos con 500 μ L de la solución A, en la segunda tres con la solución B y en la tercera tres con la solución C.
- Acomodar sobre una superficie firme y seca nueve cubre objetos siliconados de forma similar a como están pipeteadas las soluciones en la placa.
- Tomar 3 μ L de solución del pozo según corresponda al orden y pipetear en el centro sobre la superficie del cubreobjetos de manera que se deposite en una sola gota.
- Agregar 3 μ L de lisozima a 30 mg/mL sobre la gota y mezclar con la ayuda de la punta de la pipeta con precaución.
- Tomar con cuidado con la punta de los dedos el cubreobjetos y voltearlo de forma que la mezcla en la gota quede colgando.

8. Colocar el cubreobjetos invertido, la gota hacia adentro sobre el borde del pozo que le corresponde y con la ayuda de una punta de 1 mL presionar para que se selle el pozo con el cubreobjetos.
9. Repetir el procedimiento en toda la columna de la placa (B1 y C1).
10. Repetir el procedimiento en la segunda columna sólo que ahora pipetear 3 μ L de lisozima a 40 mg/mL en la condición correspondiente (A2, B2 y C2).
11. Repetir el procedimiento en la segunda columna sólo que ahora pipetear 3 μ L de lisozima a 50 mg/mL en la condición correspondiente (A3, B3 y C3).
12. Visualizar en microscopio estereoscópico cada una de las gotas.
13. Incubar a temperatura ambiente x 30 minutos y visualizar de nuevo.
14. Incubar a temperatura ambiente x dos días y visualizar nuevamente.

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 los cristales de la enzima.

Referencias consultadas para generar y adaptar el manual.

- [1] A. Elansary, S. Abdi, M. Aishah, A. Nasser, 2011 EXPERIMENTAL ENZYMOLOGY (BCH 322) Lab Manual (2011).
- [2] H. Laboratories, Manual de usuario “HiPer® Yeast Cell Immobilization Teaching Kit,” 2014.
- [3] Spinreact, Urea-UV UREA-UV Quantitative determination of urea, 2013.
- [4] Spinreact, Glucose-HK “Quantitative determination of glucose,” 2017.
- [5] J. Bioscience, Manual JBS Kit de Iniciación a la Cristalización de Proteínas, (2015) 1–7.