



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

BIOQUÍMICA

MANUAL DE PRÁCTICAS



BIOLOGÍA: PLAN DE ESTUDIOS 2017-2

EDICIÓN 2022-1

Dra. Amelia Portillo López

Dr. Manuel Alejandro Carballo Amador

CONTENIDO

<i>No. de práctica</i>	<i>Nombre de la práctica</i>	<i>No. Página</i>
	<i>Reglas de seguridad en el laboratorio</i>	<i>3</i>
<i>1</i>	<i>Cálculos en bioquímica e introducción al equipo básico en el laboratorio</i>	<i>4</i>
<i>2</i>	<i>Preparación de soluciones: Amortiguadores (Buffers)</i>	<i>5</i>
<i>3</i>	<i>Determinación Cuantitativa de Aminoácidos</i>	<i>7</i>
<i>4</i>	<i>Cromatografía de aminoácidos</i>	<i>8</i>
<i>5</i>	<i>Precipitación de proteínas (albumina de huevo)</i>	<i>11</i>
<i>6</i>	<i>Cuantificación de proteínas</i>	<i>12</i>
<i>7</i>	<i>Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)</i>	<i>14</i>
<i>8</i>	<i>Hidrolisis de almidón por la alfa amilasa</i>	<i>18</i>
<i>9</i>	<i>Reacciones características para la identificación de carbohidratos</i>	<i>19</i>
<i>10</i>	<i>Curva de calibración y determinación de lípidos</i>	<i>21</i>
<i>11</i>	<i>Purificación de ADN bacteriano</i>	<i>24</i>
<i>12</i>	<i>Separación de ADN por electroforesis de agarosa</i>	<i>25</i>
	<i>Literatura</i>	<i>27</i>

REGLAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO



- Localizar todos los equipos de seguridad como extinguidores, lavador de ojos, regaderas, entre otros.
- Proteger los ojos en caso de trabajar con reactivos corrosivos, peligrosos o con luz ultravioleta.
- Usar bata de laboratorio todo el tiempo, es importante para protección del material corrosivo o blanqueadores.
- Nunca pipetee con la boca o pruebe algún reactivo.
- No ingerir alimentos o bebidas en el laboratorio.
- El pelo largo de preferencia recogerlo para evitar accidentes.
- No usar calzado con los pies descubiertos.
- No colocar los libros o cuadernos en el área de trabajo, tampoco el uso de teléfonos celulares durante la sesión.
- Reporte cualquier daño o accidente en el laboratorio.
- Pregunte al maestro cualquier duda en el manejo de reactivos y/o equipos.
- Todos los reactivos pueden ser un riesgo para la salud, trabaje con cuidado.
- La mayoría de las prácticas de este laboratorio usan reactivos cancerígenos o tóxicos, así como agentes potencialmente patógenos, trabaje con seriedad y cuidado.
- En caso de contaminarse con algún reactivo lavarse con agua rápidamente y avisar al maestro.

➤ PRÁCTICA #1

Cálculos en bioquímica e introducción al equipo básico en el laboratorio

Ejercicios

COMPETENCIA: Realizar cálculos aplicables en su curso de bioquímica.

1.- Se necesita preparar un amortiguador TE, que consiste en Tris a 1 mM, EDTA a 10 mM en un volumen de 100 ml a pH 8.0, ¿cómo lo prepararías? Y ¿cómo ajustas el pH?

(Peso Molecular de Tris base: 121.14, EDTA: 292.25)

2.- Se necesita preparar el mismo amortiguador TE (100 ml), pero a partir de soluciones stock de: Tris 1 M y EDTA 0.5 M, ambas soluciones están a pH 8.0. ¿Cuánto se debe añadir de cada solución stock?

3.- Se necesita añadir un anticuerpo a una dilución de 1:1000, ¿cuánto volumen de anticuerpo debo de añadir a 10 ml? _____

4.- Escriba las equivalencias:

10 ml en Litros _____

1 ml en microlitros (μ l) _____

10 mg a gramos _____

1 g en miligramos (mg) _____

200 μ l en ml _____

Un Litro en ml _____

5.- Se requiere de una solución de NaCl a 0.01 % (p/v), ¿cuántos gramos debes de añadir a un volumen de 250 ml?

(Peso molecular de NaCl: 58.44)

6.- Se requiere de la misma solución anterior, pero prepararla a partir de una solución stock de 10 %, ¿cómo la prepararías?

7.- ¿Cuánto debes de poner de una solución stock a 10X para que quede a 1X en un volumen de 500 ml y 300 ml?

➤ PRÁCTICA #2

Preparación de soluciones: Amortiguadores (Buffers)

INTRODUCCION: A investigar por la o el estudiante.

COMPETENCIA: Preparar un amortiguador y utilizar dos métodos para medir el pH y determinar la capacidad de un antiácido para amortiguar un pH.

MATERIAL:

- 1 Globo pequeño
- 1 Pipeta de 10 ml
- 1 Perilla para pipeta
- 1 Vaso de precipitado de 50 ml y 1 de 100 ml
- 1 Matraz Erlenmeyer de 50 ml
- 1 Probeta de 50 o 100 ml
- 1 Espátula
- Papel para pesar
- 1 Pipeta Pasteur con bulbo
- 1 Piseta con agua
- Papel secante suave, (papel sanitario o Kleenex)
- Estándar de pH 7.0 para el potenciómetro
- Solución de HCl diluida 1:3 o 1:4
- Solución de rojo fenol 100X (1 mg/ml)
- Vinagre
- Tris (TRIZMA base)
- 1 Mortero
- 1 Potenciómetro
- 1 Balanza analítica

METODOLOGIA:

Preparación de un amortiguador

1. Calcula cuanto tris base es necesario para preparar 50 ml de una solución 0.01 M
2. Pesa esa cantidad y colócala en un vaso de precipitado de 50 ml.
3. Añadir 45 ml de agua destilada y mezcla para disolver.
4. Añadir una gota de una solución de rojo fenol a 100X (1 mg/ml), mezclar.
5. Calibra el potenciómetro con el estándar de pH 7.0.

6. Enjuaga y seca el electrodo suavemente con una toalla de papel suave y después sumérgelo en la solución tris y registra el pH.
7. Retira el electrodo y añade una gota de HCl 1N a la solución con tris y mezcla; vuelve a medir el pH, repetir el paso 6, hasta que el pH de la solución este a 7.0.
8. A la vez que estas ajustando el pH, registra el cambio del color en tu bitácora de laboratorio, el pH en una columna y el color en otra.
9. Cuando el pH alcance el valor 7.0, vierte la solución a una probeta graduada y ajusta el volumen a 50 ml.

Prueba de un antiácido

1. Colocar 10 ml de vinagre en un matraz Erlenmeyer (50 ml).
2. Medir y registrar su pH inicial.
3. Escoja un antiácido comercial (Alka Seltzer, sal de uvas, etc.), si es pastilla triture hasta hacer polvo en un mortero, después colóquelo en papel de pesar y viértalo sobre el vinagre. Inmediatamente ponga un globo sobre la boca del Erlenmeyer, compare la cantidad de gas entre diferentes antiácidos.
4. Registre el pH final y compare la efectividad de los antiácidos.
5. Registre el contenido del antiácido y escriba la ecuación química de cómo se formó el gas.

PREGUNTAS DE TAREA:

1. ¿Qué es un amortiguador?
2. Escriba en una tabla los diferentes indicadores de pH y su pK.
3. ¿Cuáles son los amortiguadores que funcionan en el cuerpo humano? mencione cada uno de ellos y describa su funcionamiento.
4. Analice un potenciómetro, dibuje sus partes y describa su funcionamiento.
5. ¿Qué pH tiene la sangre? y ¿el estómago humano? ¿Qué hay de los jugos de uva y coca cola?

➤ PRÁCTICA # 3 y 4

Determinación cuantitativa de aminoácidos

INTRODUCCION: A investigar por la o el estudiante.

COMPETENCIA: Determinar aminoácidos cuantitativamente mediante una reacción colorimétrica y su movilidad en un cromatograma determinada por sus características moleculares y solubilidad dependiendo de su cadena radical.

MATERIAL

Primera sesión:

- 1 Gradilla
 - 1 Pipeta de 10 ml
 - 1 Vaso de precipitado de 250 ml
 - 1 Mechero, tripie y tela de alambre
 - 1 Baño María
 - 6 Tubos de ensayo 16 x125
 - Papel milimétrico: 1 hoja para hacer la gráfica de referencia
 - 1 Espectrofotómetro
 - 1 Piseta con agua destilada
- Lápiz
Regla

Segunda sesión:

- 1 Par de guantes para un alumno o alumna del equipo
- 3 Capilares
- 1 Vaso de precipitado de 250 ml
- Papel aluminio
- 1 Varilla de vidrio
- Corta tiras de papel Whatman # 1 (# 4 puede servir también) de 4 cm de ancho y del largo de la cámara que se va a utilizar (medir el alto del vaso de precipitado que servirá como cámara y dejar espacio para enrollar al tubo de vidrio). Maneja con sumo cuidado el papel para no ensuciarlo con huellas dactilares que luego aparecen y que pueden impedir la separación de la mezcla problema.

A. GRÁFICA DE REFERENCIA

Las gráficas de referencia deberán ser elaboradas distribuyendo el trabajo en equipos de manera que cada equipo elabore al menos una de éstas. Habrá en la mesa de reactivos soluciones de aminoácidos para las gráficas de referencia.

1. Coloca en la gradilla 6 tubos de ensayo y numéralos del 0 al 5.
2. Pipetea 5 ml de agua al tubo 0 y 0.5 ml de solución de un aminoácido al tubo 1; 1.0 ml al tubo 2; 1.5 ml al tubo 3 y así sucesivamente. Luego lleva el volumen de todos los tubos a 5 ml con agua destilada.
3. Añade a cada tubo 0.5 ml de ninhidrina al 2%. Coloca los tubos dentro de un vaso de precipitado.
4. Coloca el vaso con los tubos en el baño de agua hirviendo por 2 minutos.
5. Retirar los tubos y esperar a que baje la temperatura. Después, añadir 5 ml de acetona al 75% a cada tubo y leer en el espectrofotómetro a 570 nm. No olvides ajustar a cero la absorbancia con el tubo 0 (blanco).
6. Al terminar, con los valores obtenidos traza una gráfica en papel milimétrico colocando en las ordenadas (Y) la lectura del espectrofotómetro (absorbancia) y en las abscisas (X) la concentración calculada.

Segunda sesión

7. Recorta una tira de papel cromatográfico de 14 cm de largo por 5 cm de ancho, calculando la altura del vaso de precipitado que te servirá como cámara para poner el cromatograma.
8. Con lápiz (no uses tinta) marca una línea horizontal a 2 cm del borde inferior de la tira de papel cromatográfico papel Whatman. Marca sobre esta línea un círculo no mayor 0.5 cm o, si se quiere, dos círculos equidistantes.
9. Aplica una gota de un aminoácido con un capilar en cada centro del círculo que dibujaste en el papel Whatman.
10. La exactitud es crítica para el experimento.
11. Deja que las gotas se sequen completamente.
12. Prepara la cámara añadiendo la mezcla de solventes (n-Butanol-Ac, Acético-Agua [4:1:1]), midiendo que no pase de los 2 cm de altura en el vaso de precipitado. Cubre con aluminio y espera alrededor de 10 min. Coloca las tiras de papel en la cámara cromatográfica previamente saturada con la mezcla de solventes y enrolla la parte superior en un tubo de vidrio.
13. Procura que, al introducir el papel en la cámara, ésta no permanezca mucho tiempo abierta pues puede perderse la saturación.

14. Deja los papeles en la cámara el tiempo necesario para que el eluyente ascienda hasta alcanzar unos dos centímetros del borde superior del papel (30 min a 1 h). Cuando llegue al borde superior marca una línea hasta donde llegó.
15. Retira las tiras y ponlas a secar en la estufa a 37°C por 15 minutos o a temperatura ambiente por un tiempo mayor.
16. Rocía el papel con el revelador de ninhidrina al 0.05% (se sugiere que se ensaye el rociado en una tira de papel de desecho hasta lograr que el rociado no sea muy disperso ni tan cerrado que escurra por el papel).
17. Marca con lápiz el contorno de las manchas que hayan aparecido. Asígnale un centro a cada una de ellas y determina el Rf correspondiente a cada mancha.

$$R_f = \frac{\text{Distancia que recorrió el aminoácido (Y)}}{\text{Distancia que recorrió el disolvente (X)}}$$

Mezcla de solventes: n-Butanol-Ac, Acético-Agua (4:1:1)

	But-ac- agua	Fenol- agua		But- ac- agua	Fenol- agua		But- ac- agua	Fenol- agua
Glicina	0.17	0.5	Alanina	0.28	0.60	Valina	0.45	0.70
Leucina	0.61	0.82	Isoleucina	0.59	0.85	Serina	0.16	0.45
Treonina	0.17	0.44	Fenilalanina	0.53	0.85	Tirosina	0.24	0.64
Triptófano	0.43	0.75	Prolina	0.27	0.84	Histidina	0.10	0.72
Arginina	0.10	0.93	Lisina	0.08	0.87	Aspártico	0.16	0.19
Glutámico	0.17	0.26	Metionina	0.44	0.77	Cisteína	0.05	0.39

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

- Solución de Ninhidrina al 0.05% (100 ml): Mezclar 100 ml de *n*-butanol y 100 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en un embudo de separación. Agitar por unos minutos y dejar reposar hasta que se separen dos capas. Descarta la capa inferior y recoge la superior que es el butanol saturado con fosfatos. Disuelve 50 mg de ninhidrina en 100ml de butanol saturado con fosfatos.
- Solución de Ninhidrina al 2% (300 ml): Se preparan 300 ml de butanol de la manera descrita antes. Disolver 6 g de ninhidrina en esos 300 ml de butanol saturado con fosfatos.

Solución amortiguadora de fosfatos:

- Solución A: Fosfato disódico 0.06 M (500 ml): Pesar 10.74 g de fosfato disódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y aforar con agua destilada hasta 400ml.
- Solución B: Fosfato monopotásico 0.06 M (ml): Pesar 408 mg de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y aforar a 50 ml con agua destilada.

Mezclar 404 ml de la solución A, 46 ml de la solución B y 50 ml de agua destilada.

Soluciones de aminoácidos 50 mM/50ml

L-metionina, L valina, L-leucina, L-Isoleucina, L-fenilalanina

CUESTIONARIO:

1. Mencione cuantos aminoácidos son y escriba su nombre completo y su código de 1 y 3 letras.
2. ¿Cuáles aminoácidos son aromáticos?
3. ¿Cuáles aminoácidos son polares?
4. ¿Cuáles aminoácidos tienen un grupo sulfhidrilo?
5. ¿Cuáles aminoácidos son alifáticos?
6. ¿Cuáles aminoácidos son los más pequeños?
7. ¿Cuáles aminoácidos son los esenciales para la dieta del ser humano?

➤ PRÁCTICA # 5 y 6

Precipitación de proteínas (albumina de huevo)

INTRODUCCIÓN: A investigar por la o el estudiante.

COMPETENCIA: Utilizar uno de los métodos más comunes de precipitación de proteínas a partir de una fuente biológica.

MATERIAL:

PRIMERA SESIÓN

- Dos vasos de precipitados de 100 ml
- Un vaso de precipitado de 1L
- Cuatro tubos de ensaye de 13 x 100
- Un agitador de vidrio
- Una probeta de 50 o 100 ml
- Un embudo
- Matraz Kitazato c/ manguera para vacío
- Una pipeta de 10 ml
- Gasa para doblar en 3 partes
- Un huevo
- Tubo de diálisis
- Un calentador para todo el grupo
- Unas pinzas para todo el grupo

SEGUNDA SESION

- Una gradilla
- 10 tubos de ensaye de 13 x 100
- Dos pipetas de 5 ml
- Dos pipetas de 1 ml

METODOLOGIA:

PRIMERA PARTE:

A. PRECIPITACIÓN POR SALACIÓN

1. Separa la yema de la clara del huevo. Guarda la yema en un recipiente con tapa y vacía la clara a un vaso de precipitado.
2. Agita suavemente la clara para romper las membranas. Evita la agitación violenta para que no se forme demasiada espuma.

3. Filtra a través de gasa triple. Filtra directamente a una probeta para que midas el volumen de la clara.
4. Una vez medido el volumen, toma 5 ml de la clara y colócala en un tubo de ensaye y añádele un volumen igual de solución saturada de sulfato de amonio. Agita suavemente y deja reposar alrededor de 20 minutos.
5. Una vez precipitada la proteína, filtra a través de un filtro de papel Whatman. El precipitado contiene la ovoglobulina y el sobrenadante (filtrado) contiene todavía la ovoalbúmina.
6. Al filtrado, agrégale sulfato de amonio sólido hasta alcanzar el 100% de saturación. Se mide la cantidad de filtrado y se calcula la cantidad de sulfato de amonio que hay que añadir sabiendo que por cada 100 ml hay que añadir 37.5 g. Agita suavemente para que se disuelva bien el sulfato de amonio. Deja reposar 15 minutos; la fracción que ahora precipita es la ovoalbúmina.
7. Filtra a través de un filtro de papel Whatman.
8. Disuelve los precipitados obtenidos en 10 ml de solución de NaCl al 1%.
9. Vacía la solución anterior a una bolsa de diálisis previamente hidratada en agua hirviendo y dializa en 1 L de agua destilada por toda la noche. Al siguiente día coloca la bolsita de diálisis en el congelador porque la usaras en la siguiente sesión para medir la concentración de proteína.
10. En la siguiente sesión de laboratorio, vacía el contenido de las bolsas de diálisis en un vaso de precipitado. De allí se toman las muestras para la prueba de Biuret como se indica en la sección B.

B. REACCIÓN DE BIURET

1. Coloca en la gradilla 10 tubos de ensaye de 13 x 100 y numéralos.
2. Pipetea según el cuadro a continuación.
3. Toma nota de tus observaciones. Si tu muestra está muy concentrada usa una dilución o menor cantidad.

Preparación de una gráfica de referencia para la determinación cuantitativa de proteínas por la reacción de Biuret.

Tubo \ Reactivo	Blanco (0)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Solución Estándar de proteína (ml)	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.5	2.0	0
Solución salina (ml)	2.0	1.9	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.5	-	1.6
Reactivo de Biuret (ml)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Muestra (ml)										0.4

Mezclar bien y dejar reposar durante 30 minutos. Usando el tubo 0 como blanco para ajustar a cero de absorbancia a 550 nm. Graficar en papel milimétrico la densidad óptica contra concentración de proteína en miligramos, sabiendo que la solución estándar está al 1% (p/v).

PREPARACIÓN DE REACTIVOS PRIMERA SESIÓN:

- Sulfato de amonio sólido.
- Solución saturada de sulfato de amonio (100 ml): pesar 38 g de sulfato de amonio y aforar a 100 ml con agua destilada o hasta ver sales precipitadas sin disolverse.
- Cloruro de sodio al 1% (250 ml).

REACTIVOS PARA LA SEGUNDA SESIÓN

- Reactivo de Biuret (1L): Pesar 1.5 g de sulfato de cobre pentahidratado y 6 g de tartrato doble de sodio y potasio. Disolver en 500 ml de agua destilada. Añadir con agitación constante, 300 ml de hidróxido de sodio al 10%. Si es necesario calentar para disolver. Enfriar y aforar a 1L.
- Albúmina de huevo al 0.1% (150 ml).

CUESTIONARIO:

1. ¿Por qué precipitan las proteínas con el sulfato de amonio?
2. Mencione al menos dos métodos de purificación de proteínas.
3. Mencione al menos otros dos métodos de cuantificación de proteínas.
4. ¿Por qué resulta en una coloración la reacción de Biuret?
5. ¿Qué niveles de albumina tiene la sangre humana y qué función tiene?

➤ PRÁCTICA # 7

Electroforesis de proteínas *Gel desnaturizante (SDS PAGE): Método Laemmli*

INTRODUCCIÓN: A investigar por la o el estudiante.

COMPETENCIA: Manejar un equipo de electroforesis, así como obtener experiencia en la preparación de un gel de poliacrilamida, frecuentemente usado en detección y purificación de moléculas proteicas.

MATERIAL: todo es por grupo

2 Vasos de precipitado de 50 ml
3 Vasos de precipitado de 250 ml y uno de 500 ml
3 Frascos con tapa de 200 ml para guardar los buffers y la acrilamida
Ácido clorhídrico concentrado, alrededor de 30 ml
Albumina de huevo como solución estándar al 0.1% (p/v)
Ácido acético
Glicina
Metanol
Tris base
TEMED
Persulfato de amonio
Papel secante y kleenex o papel sanitario.
Alcohol Isopropílico
1 Pisseta con agua destilada
Puntillas para proteínas (puntas finas y largas)
Puntillas 200 µl
Puntillas 1000 µl
2 Pipetas serológicas de 5 ml
2 pipetas serológicas de 2 ml
Perilla o bulbo para pipetas serológicas
3 Pipetas Pasteur con bulbo
2 Probetas de 100 ml
1 Probeta de 500 ml
3 Espátulas
Micropipeta de 20-100 µl
Micropipeta de 200-1000 µl
Potenciómetro y solución estándar de 7.0
Cámara de electroforesis vertical

SOLUCIONES:

Solución TEMED (1:10): 0.5 ml de TEMED y 4.5 ml de agua destilada.

Solución de persulfato de amonio (PSA): 0.04 g en 250 µl de agua destilada (fresco).

Solución acrilamida / bisacrilamida (A/MBA): 30% de acrilamida y 0.86% de bisacrilamida.

BUFFER DE CORRIDO (RGB):

Preparar 100 ml de la siguiente forma:

Mezclar 9.08 g tris base en 80 ml de agua destilada, ajustar el pH a 8.8 con HCl 6 M. Añadir 0.2 g de SDS y aforar a 100 ml con agua destilada.

BUFFER DE APILAMIENTO (SGB):

Preparar 100 ml de la siguiente forma:

Mezclar 3.02 g tris base en 80 ml de agua destilada, ajustar el pH a 6.8 con HCl 6 M. Añadir 0.2 g de SDS y aforar a 100 ml con agua destilada.

BUFFER PARA ELECTROFORESIS (1X):

Añadir los siguiente y aforar a 1 L con agua destilada

Tris base: 3.02 g

Glicina: 14.41 g

SDS: 1 g

BUFFER DE MUESTRA:

SGB: 2.5 ml

Glicerol: 1.0 ml

2-Mercaptoetanol: 0.5 ml

SDS al 10% 3.2 ml

Azul de bromofenol a 0.001% (p/v)

SOLUCION DE TEÑIDO DE GELES:

Azul de Coomassie 0.2 %

Metanol o isopropanol 40%

Ácido acético 10%

Agua 50%

METODOLOGÍA

Preparar los vidrios limpiándolos con agua y después con alcohol.

Montar los vidrios en la cámara.

Primero, preparar el gel de corrido añadiendo uno a uno los reactivos en un vaso de precipitado, mezclar suavemente y a lo último añadir el PSA. Mezclar e inmediatamente llenar la cámara utilizando una pipeta Pasteur, hasta el nivel que se le indicará. Añadir unas gotas de alcohol isopropílico. Dejar polimerizar alrededor de 20 minutos.

GEL DE CORRIDO:

	Gel al 10%
Agua destilada	2.5 ml
RGB	7.5 ml
A/MBA	5.0 ml
TEMED 1:10	50 μ l
PSA	150 μ l

Una vez polimerizado, escurrir el alcohol y enjuagar con 1 ml de agua destilada, escurrir de nuevo sobre papel absorbente (Kleenex). Preparar el gel de apilamiento y añadirlo como el anterior; a lo último colocar rápidamente el peine de muestra. Dejar solidificar alrededor de 20 minutos.

GEL DE APILAMIENTO:

	Gel al 5%
Agua destilada	2.5 ml
SGB	3.75 ml
A/MBA	1.25 ml
TEMED 1:10	25 μ l
PSA	75 μ l

PREPARACION DE LA CÁMARA Y MUESTRAS:

Colocar los vidrios limpios con el gel ya preparado en la cámara de electroforesis y llenar con el buffer de electroforesis 1X.

Las muestras, deberán ser procesadas con buffer de muestra y hervidas a 95 °C por 5 min. Después, centrifugar 1 min a 14,000 rpm.

Cargar en cada pozo individual del gel 10 μ l del sobrenadante de cada muestra, el estándar de proteínas, control y muestras.

Correr la electroforesis a 120 V por 1.5 a 2 h.

Una vez separada las muestras, sacar el gel y colocarlo en un recipiente plano con tapa. Añadir la solución de tinción de Coomassie y dejar toda la noche tiñendo.

Al siguiente día regresar el colorante a su frasco original e iniciar el desteñido, añadiendo la solución de decoloración varias veces hasta que este transparente el gel y se observen claramente las bandas de proteína.

CUESTIONARIO:

1. ¿Por qué se le llama SDS-PAGE?
2. ¿Cómo se lleva a cabo la polimerización de la acrilamida?
3. ¿Para qué se utiliza la electroforesis?
4. ¿Cómo funciona la cámara electroforética y los amortiguadores?
5. ¿Qué función tiene añadir en el amortiguador de muestra el SDS y el beta-mercaptoetanol?

➤ PRÁCTICA # 8

Hidrolisis de almidón por la alfa amilasa

INTRODUCCIÓN: a investigar por la o el estudiante.

COMPETENCIA: Determinar diferentes carbohidratos en base a sus características moleculares para determinar su metabolismo de manera colaborativa.

MATERIAL

1 Gradilla
2 Tubos de ensayo de 16 x 125 ml
1 Pipeta de 5 ml
1 Pipeta de 2 ml
1 Pipeteador
1 Termoplato
1 Vaso de precipitado de 500 ml
1 Vaso de precipitado de 50 ml
1 Piseta con agua destilada
Solución de almidón al 1% (p/v)
Reactivo de Benedict
Saliva

METODOLOGÍA

1. Marcar los tubos de ensayo con el #1 y #2-
2. Al tubo #1 añadirle 5 ml de almidón y 1 ml de saliva.
3. Al tubo #2 añadirle 5 ml de almidón (tubo control).
4. Colocar los dos tubos a incubar a 37 °C durante 60 min.
5. Después de la incubación agregar a cada tubo 5 ml del reactivo Benedict y mezclar.
6. Colocar los tubos a baño de agua hirviendo durante 5 min.
7. Observe los resultados, la aparición de un color rojizo indica el proceso de hidrólisis del almidón por la enzima amilasa.

CUESTIONARIO

1. Mencione que tipo de unión sobre la cual es específica la alfa amilasa.
2. ¿Dónde se produce la amilasa en el ser humano y cuantos tipos hay?
3. Mencione 3 productos de la degradación del almidón.
4. Diga que es una hidrolasa.

➤ PRÁCTICA # 9

Reacciones características para la identificación de carbohidratos

INTRODUCCIÓN: a investigar por la o el estudiante.

COMPETENCIA: Identificar cuales azúcares son reductores mediante una reacción química para determinar su reactividad con responsabilidad.

MATERIAL

- Una gradilla
- Dos pipetas de 5 ml
- Dos pipetas de 1 ml
- Mechero, tripie y tela de alambre
- Un vaso de precipitados de 500 ml
- Un vaso de precipitados de 100 ml
- Una probeta de 50 o 100 ml
- Dos pinzas para tubo de ensaye
- Quince tubos de ensaye de 15 x 150
- Parafilm (suficiente para tapar la boca del vaso de 100 ml)

METODOLOGIA:

Durante la sesión, habrá siete soluciones de azúcares disponibles (correspondientes a la sección de preparación de reactivos).

Reacción de Fehling:

1. Coloca en la gradilla cinco tubos de ensaye y márcalos del 1 al 5. Pipetea 5 ml del azúcar correspondiente para cada tubo. No olvides el tubo control.
2. Agrega 5 ml del reactivo de Fehling a cada uno de los tubos.
3. Coloca los tubos en baño en ebullición por cinco minutos.
4. Observa cuidadosamente la cantidad y el color del precipitado que se forma y anota los resultados en tu libreta de laboratorio. ¿Cuáles azúcares son reductores?

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

Reactivo de Fehling: (1 L)

Solución A: Disolver 34.65 g de sulfato cúprico pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en suficiente agua destilada para preparar 500 ml.

Solución B: Disolver 178 g de tartrato doble de sodio y potasio, 50 g de hidróxido de sodio en suficiente agua destilada para preparar 500 ml.

Antes de usarse, mezcle las soluciones A y B en partes iguales de acuerdo con lo que se vaya a usar. La mezcla es inestable pero las soluciones A y B son estables, entonces no mezcle más de lo que se va a usar ese día.

- Soluciones de azúcares:
 - a) Xilosa 0.1 M
 - b) Glucosa 0.1 M
 - c) Fructosa 0.1 M
 - d) Sacarosa 0.1 M
 - e) Maltosa 0.1 M
 - f) Lactosa 0.1 M
 - g) Galactosa 0.1 M

CUESTIONARIO

1. Mencione los azúcares que son aldehídos.
2. Mencione los azúcares que son cetonas.
3. ¿Cuáles carbohidratos son heteropolisacáridos y cuáles homopolisacáridos?
4. ¿A qué se le denomina azúcar reductor y cuáles de los que hiciste lo son?
5. ¿A qué se le llama hemiacetal y hemicetal?

➤ PRÁCTICA # 10

Curva de calibración y determinación de lípidos

INTRODUCCION: A investigar por la o el estudiante.

COMPETENCIA: Examinar la concentración de lípidos en una muestra biológica mediante reacciones químicas para demostrar su presencia en las células, de una forma responsable.

MATERIAL

- 14 Tubos de ensaye, 16 x 125
- 1 Termoplato
- 2 Vaso de precipitado de 500 ml
- 1 Piseta con agua destilada
- 1 Gradilla
- Papel secante
- 1 Pinza para tubos
- 2 Pipetas de 5 ml
- 1 Micropipeta de 10-100 μ l (puede también ser de 200 μ l) y puntillas
- 1 Pipeteador de perilla para ácido

Reactivos

- a) Reactivo de vainillina: Disolver 494 mg de vainillina en 80 ml de agua destilada (235 mM), y completar hasta un volumen de 250 ml, con ácido fosfórico al 85% (v/v). Almacenar en frío (4 °C).
- b) Aceite de girasol diluido, que se usa como estándar (contiene 0.43 mg de lípido/ml). Para ello se toman 0.5 ml de aceite comercial y se diluye con una mezcla de cloroformo:metanol (2:1) hasta un volumen final de 50 ml.
- c) Muestra: suero de sangre de bovino o puerco (traer el estudiante).

METODOLOGIA:

Preparar las muestras y estándar como la siguiente tabla:

Muestra \ Reactivo	Blanco	1	2	3	4	5	6
Aceite (patrón; μl)	-----	10	20	30	50	100	-----
Muestra (μl)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	200
Agua destilada (μl)	200	190	180	170	150	100	-----
H ₂ SO ₄ concentrado (ml)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

1. Agitar vigorosamente cada muestra con la ayuda de un vortex.
2. Calentar a 100 °C durante 10 min. Esto para que se produzca la hidrólisis de los lípidos. A continuación, enfriar las muestras de ensayo en un baño de agua fría.
3. Tomar de cada tubo, una alícuota de 200 μl y añadir 2 ml del reactivo de vainillina.
4. Mezclar con vortex.
5. Esperar 30 minutos a que se desarrolle la reacción; medir la absorbancia de cada disolución a 530 nm en el espectrofotómetro.
6. Representar gráficamente, las absorbancias obtenidas en cada caso, en función de la cantidad de lípidos incluida en los patrones (tubos de 1-5). De esta manera se obtiene la recta de calibrado, que nos servirá para la determinación de la muestra.

Cálculos numéricos

1. Se representan las absorbancias obtenidas en los tubos 1-5 en función de los mg de lípidos colocados en cada caso obteniéndose así la recta de calibrado.
2. Graficar la absorbancia en el eje de las Y, la concentración de lípido en el eje X.
3. A partir de la absorbancia obtenida en el tubo 6, y apoyándonos en la recta de calibrado, se determina la cantidad de lípido que corresponde a la muestra.
4. Si solo se usa un calibrador se realiza la siguiente operación:

$\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del calibrador}} \times \text{concentración del calibrador} = \text{mg/dl de lípidos totales}$

PREGUNTAS

1. ¿Qué tipos de lípidos encontramos en la sangre (suero)?
2. ¿A qué se encuentran asociados los lípidos sanguíneos?
3. ¿Dónde se sintetizan los lípidos en el organismo humano o animal?
4. ¿Dónde se degradan los lípidos y quien los degrada?
5. ¿Para qué son utilizados los lípidos en el organismo?

PRÁCTICA # 11 y 12

Purificación de ADN bacteriano y

Separación de ADN por electroforesis de agarosa

INTRODUCCION: a investigar por la o el estudiante.

COMPETENCIA: Practicar una metodología de purificación de ADN y entender para que se utiliza cada reactivo.

MATERIAL

- TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) y filtrado por 0.45 μ m
- SDS (sodium dodecyl sulfate) al 10%
- 5 M de NaCl
- CTAB/NaCl solución (Disolver 4.1 g de NaCl en 80 ml de agua destilada y despacio añada 10 g de CTAB mientras mezcla con un agitador. Si es necesario caliente a 65 °C, ajuste a 100 ml.
- Caldo LB (Luria Bertani): 5 g extracto de levadura, 10 g triptona, 10 g NaCl, 1 L de agua destilada.
- Cloroformo
- Isopropanol
- Matraz Erlenmeyer de 125 ml
- Agarosa
- Cámara y kit de electroforesis para agarosa
- Amortiguador de carga
- Amortiguador TAE o TBE

METODOLOGIA

Purificación de ADN

1. Inocular 5 ml de caldo LB con la cepa bacteriana de interés, dejar crecer hasta que sobresature el medio (dejar crecer toda la noche).
2. Tomar 1 ml y colocarlo en un microtubo: centrifugar por 5 min a 6000 rpm, decantar el sobrenadante.
3. Suspender el botón de células en 560 μ l de TE buffer y mezclar con la puntilla.
4. Añadir 30 μ l de SDS al 10%, mezclar por inversión.
5. Añadir 100 μ l de NaCl 5 M y mezclar, **NO VORTEX**.
6. Añadir 80 μ l de solución de CTAB/NaCl, mezclar (NO VORTEX) e incubar

- 30 min a 65 °C.
7. Añadir un volumen aproximadamente igual (0.7 ml) de cloroformo, mezclar vigorosamente 1 min con vortex y centrifugar por 10 min en una microcentrífuga a máxima velocidad.
 8. Remueva el sobrenadante o fase líquida, donde está el ADN a un tubo nuevo, evitando la capa blanca de interface.
 9. Añadir 60% del volumen de isopropanol grado reactivo y mezclar por inversión, observará un precipitado blanco, dejar 5 min y después centrifugar 5 min a máxima velocidad. Después decantar el sobrenadante y escurrir sobre papel secante por 5 min.
 10. Suspender el botón o precipitado en 50 µl de agua libre de ADNAsas o TE buffer.
 11. Almacenar a -20 °C hasta la siguiente práctica.
 12. Medir la concentración de ADN en un espectrofotómetro. Colocar 1 ml de agua destilada en la celda de cuarzo y añadir 5 µl de su muestra, mezclar, leer a 260 y 280 nm, ajustando a cero la absorbancia con agua.

50 µg de ADN tiene una absorbancia de 1 a 260 nm.

La pureza del ADN tiene una relación $Abs_{260}/Abs_{280} > 1.8$

Separación por electroforesis de agarosa

1. Pesar suficiente agarosa para un gel al 1% (p/v) en 50 ml.
2. Mezclar en el matraz Erlenmeyer la agarosa con 50 ml de amortiguador (TAE o TBE).
3. Colocar el matraz en el interior del microondas a temperatura estándar hasta que aparezcan las primeras burbujas de ebullición y mezclar, repetir una vez más.
4. Dejar enfriar hasta que la temperatura sea soportable al tacto.
5. Prepara la cámara de electroforesis, vierte la agarosa y coloca el peine para formar los pocillos.
6. Deja enfriar hasta que termine la polimerización de la agarosa (aproximadamente 20 minutos).
7. Cubrir completamente el gel con suficiente amortiguador de electroforesis (TAE o TBE).
8. Mezclar 5-10 µl de muestra de ADN con amortiguador de carga.
9. Colocar cuidadosamente en el pocillo correspondiente.
10. Una vez colocadas las muestras, correr la electroforesis a 80 V (máximo 100 V) durante aproximadamente 40 min.
11. Cumplido el tiempo, colocar el gel en el fotodocumentador o fuente de luz UV para el análisis.

CUESTIONARIO

1. ¿Para qué sirve cada uno de los reactivos utilizados en la purificación del ADN?
2. ¿De qué tamaño es la molécula de ADN de la bacteria?
3. ¿Por qué se utiliza la longitud de onda de 260 nm y la de 280 nm?
4. ¿Qué tipos de hélices se pueden encontrar en la naturaleza?
5. ¿Cuántos tipos de nucleótidos tienen los ácidos nucleicos?
6. ¿Cuáles tipos de ácidos nucleicos existen en una célula eucariota?
7. ¿Qué otras funciones tienen las bases nucleotídicas?
8. ¿Por qué logramos ver las bandas bajo una luz UV?

LITERATURA

Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics, 2008

Nenad Blau (Editor), Marinus Duran (Editor), K. Michael Gibson (Editor)

Biochemistry Laboratory: Modern Theory and Techniques (2nd Edition) by Rodney F. Boyer (Jan 9, 2011)

QH415.5 Y35 1996

Manual de prácticas de bioquímica
Yañes Avila, Ricardo.

TX545 S35 1995 1995

Manual de prácticas de química y bioquímica de los alimentos
Santos Moreno, Armando

QP 514.2 P73 1989 1989

Prácticas de bioquímica : experimentación y simulación 1a.
Lozano Teruel, José Antonio.