



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

BIOQUIMICA

MANUAL DE PRÁCTICAS



BIOLOGIA: PLAN DE ESTUDIOS 2017-2

EDICION 2017

Dra. Amelia Portillo López

CONTENIDO

| <i>No. de práctica</i> | <i>Nombre de la práctica</i> | <i>No. Página</i> |
|--|---|-------------------|
| <i>Reglas de seguridad en el laboratorio</i> | | |
| 1 | <i>Cálculos en bioquímica</i> | 4 |
| 2 | <i>Amortiguadores (Buffers)</i> | 5 |
| 3 | <i>Determinación Cuantitativa de Aminoácidos</i> | 7 |
| 4 | <i>Cromatografía de aminoácidos</i> | 8 |
| 5 | <i>Precipitación de Proteínas (albumina de huevo)</i> | 11 |
| 6 | <i>Cuantificación de proteínas</i> | 12 |
| 7 | <i>Electroforesis de proteínas (SDS-page)</i> | 14 |
| 8 | <i>Amilasa en saliva</i> | 18 |
| 9 | <i>Reacciones Características para la Identificación de Carbohidratos</i> | 19 |
| 10 | <i>Determinación de Glucosa</i> | 21 |
| 11 | <i>Curva de Calibración y Determinación de Lípidos totales</i> | 23 |
| 12 | <i>Cromatografía de lípidos</i> | 26 |
| 13 | <i>Proteasas- Extracción de Papaína</i> | 28 |
| 14 | <i>Purificación de DNA bacteriano</i> | 30 |
| <i>Literatura</i> | | |

REGLAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO



- Localizar todos los equipos de seguridad como extinguidores, lavador de ojos, regaderas, etc.
- Proteger los ojos si trabajará con reactivos corrosivos, peligrosos o con luz ultravioleta.
- Usar bata de laboratorio, lo protegerá del material corrosivo o blanqueadores.
- Nunca pipetee con la boca o pruebe algún reactivo.
- No fumar, comer o beber en el laboratorio.
- El pelo largo de preferencia recogerlo.
- No usar sandalias con los pies descubiertos.
- No colocar los libros o cuadernos en el área de trabajo.
- 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.

➤ PRACTICA #1

Cálculos en bioquímica

Ejercicios

COMPETENCIA: Realizar cálculos aplicables en su curso de bioquímica

1.- Se necesita preparar una solución de Tris a 1 mM, EDTA a 10 mM en un volumen de 100 ml a pH 8.0. Peso Molecular de Tris base = 121.14, EDTA= 292.25. ¿Cómo lo prepararías?

2.- Se necesita preparar la misma solución anterior, pero a partir de soluciones stock de: Tris 1 M y EDTA 0.5 M, ambas soluciones están ya a pH 8.0. ¿Cuánto se debe poner de cada solución stock?

3.- Se necesita añadir un anticuerpo a una dilución de 1:1000 cuanto volumen de anticuerpo debo de añadir a 10 mL para que quede a esa concentración? _____

4.- Escriba a cuanto equivalen las siguientes:

10 mL en Litros _____

1 mL en microlitros (μ L) _____

10 mg a gramos _____

1 gr en miligramos (mg) _____

200 μ L en mL _____

Un Litro en mL _____

5.- Se requiere de una solución de NaCl a 0.01 %, Cuantos gramos debes de poner de NaCl a un volumen de 250 mL?

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

7.- Cuanto debes de poner de una solución stock a 10x para que quede a 1X en un volumen de 500 mL y 300 mL

➤ PRACTICA #2

Amortiguadores (Buffers)

INTRODUCCION: A investigar por el estudiante

COMPETENCIA: Realizar 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 erlenmeyer de 50 mL
- 1 probeta de 50 ó 100 mL
- 1 espátula
- Papel para pesar
- 1 pipeta Pasteur con bulbo
- 1 pizeta con agua
- Papel secante suave, (papel sanitario o Kleenex)
- Estándar de pH 7.0 para el potenciómetro
- Sol de HCl diluida 1:3 ó 1:4
- Sol de rojo fenol 100 X (1mg/ml)
- Vinagre
- Tris (TRIZMA base)
- 1 mortero
- 1 potenciómetro
- 1 balanza analítica

METODOLOGIA:

Preparación de un amortiguador

1. Calcula cuanto trizma base es necesario para preparar 25 ml de una solución 0.01M
2. Pesa esa cantidad y colócala en un vaso de precipitado de 50 ml
3. Añadir 20 ml de agua destilada y mezcla para disolver
4. Añadir una gota de una solución de rojo fenol a 100X (1mg/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 y vuelve a medir el pH, repetir el paso 6, hasta que el pH de la solución este a pH 7.0
8. A la vez que estas ajustando el pH, registra el cambio del rojo fenol en tu cuaderno, el pH en una columna y el color en otra.
9. Cuando el pH sea de 7.0, vierte la solución a una probeta graduada y ajusta el volumen a 25 ml.

Prueba de un antiácido

1. Colocar 10 ml de vinagre en un Erlenmeyer de 50 ml,
2. Medir su pH
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 y compare la efectividad de diferentes antiácidos.
5. Registre el contenido del antiácido y escriba la ecuación química de cómo se formó el gas.

PREGUNTAS DE TAREA:

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

➤ PRACTICA # 3 y 4

Determinación Cuantitativa de Aminoácidos

INTRODUCCION: A investigar por 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 pizeta con agua destilada
- Lápiz
Regla

Segunda sesión:

- 1 par de guantes para un alumno del equipo
- 3 capilares
- 1 vaso de precipitado de 250 ml
- 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 usar (medir el alto del vaso de precipitado que servirá como cámara y dejar espacio para enrollar el tubo de vidrio) Maneja con sumo cuidado el papel para no ensuciarlo con huellas dactilares que luego aparecen y que pueden impedir el libre corrimiento 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 0.5 ml de agua al tubo 0 y 0.5 ml 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 dentro del baño de agua hirviendo por 2 minutos.
5. Sacar los tubos y esperar a enfriar, añadir 5 ml de Acetona al 75% a cada tubo y leer en el colorímetro a 570nm, 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.

2da Sesión

7. Recorta una tira de papel cromatografico 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, tapa con aluminio y espera unos 15 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 hr). Cuando llegue al borde superior marca una línea hasta donde llegó.
15. Saca 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% (100ml): 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% (300ml): 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 0.06M (500ml): Pesar 10.74g 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 0.06M (ml): Pesar 408 mg de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y aforar a 50ml 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 50mM/100ml

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

CUESTIONARIO:

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

➤ *PRACTICA # 5 y 6*

Precipitación de Proteínas

INTRODUCCIÓN: A investigar por 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 ó 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
- 1 calentador para todo el grupo
- 1 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. Rompe un huevo y separa la yema de la clara. 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. Ya 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 pon 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 vasos de precipitado. De allí se toman las muestras para la prueba de Biuret como se indica en la sección B.
11. 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 0 (blanco) | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 3 | Tubo 4 | Tubo 5 | Tubo 6 | Tubo7 | Tubo8 | Tubo9 |
|--------------------------------|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|
| Sol. Estándar de proteína (mL) | 0 | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 | 1.5 | 2.0 | 0 |
| Sol. 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 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 ó hasta ver sales precipitadas sin disolverse.
- Cloruro de sodio al 1% (250 mL)

REACTIVOS PARA LA SEGUNDA SESIÓN

- Reactivo de Biuret (1L): Pesar 1.5g de sulfato de cobre pentahidratado y 6g 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. Porque 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. Porque dá un color la reacción de Biuret?
5. Que cantidad normal de Albumina tiene la sangre humana y que función tiene?

➤ PRACTICA # 7

Electroforesis de proteínas
Gel desnaturalizante (SDS PAGE): Método Laemmli

INTRODUCCIÓN: A investigar por 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
HCl concentrado ~30 ml
ALBUMINA DE HUEVO como estándar solución 0.1%
Ácido acético
Glicina
Metanol
TRIS Base
TEMED
Persulfato de amonio
Papel secante y kleenex o papel sanitario.
Alcohol Isopropilico
1 Pizeta con agua destilada
Puntillas para proteínas (puntas finas y largas)
Puntillas 200µL
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 espatulas
Micropipeta de 20-100 µl
Micropipeta de 200-1000 µl
POTENCIOMETRO y estándar de 7.0
CAMARA DE ELECTROFORESIS VERTICAL

SOLUCIONES:

SOL. TEMED 1:10 0.5 ml de TEMED y 4.5 ml de agua destilada

SOL. PERSULFATO DE AMONIO (PSA): 0.04 gr en 250 µl de agua destilada (fresco)

SOL. ACRILAMIDA / BISACRILAMIDA (A/MBA): 30% de acrilamida y 0.86% de bisacrilamida

BUFFER DE CORRIDO (RGB):

Preparar 100 ml de la siguiente forma:

9.08 gr Tris Base en 80 ml de agua destilada, ajustar el pH a 8.8 con HCl 6M, añadir 0.2 gr de SDS y aforar a 100 ml con agua destilada.

BUFFER DE SEPARACION (SGB):

Preparar 100 ml de la siguiente forma:

3.02 gr Tris Base en 80 ml de agua destilada, ajustar el pH a 6.8 con HCl 6M, añadir 0.2 gr de SDS y aforar a 100 ml con agua destilada.

BUFFER PARA ELECTROFORESIS (1X):

Añadir los siguiente y aforar a 1000 ml con agua destilada

Tris Base: 3.02 gr

Glicina: 14.41 gr

SDS: 1 gr

BUFFER DE MUESTRA:

SGB: 2.5 ml

Glicerol: 1.0 ml

2-Mercapto etanol (2-ME): 0.5 ml

SDS al 10% 3.2 ml

Azul de bromofenol 0.001%

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,

Preparar primero 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 transfer, hasta el nivel que se le indicará. Añadir unas gotas de alcohol isopropílico. Dejar solidificar media hora.

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 solidificado, escurrir el alcohol y enjuagar con 1 ml de agua destilada, escurrir de nuevo sobre papel absorbente (Kleenex) y Preparar el gel de separación y añadirlo como el anterior, y a lo último colocar rápidamente el peine de muestra. Dejar solidificar 30 min.

GEL DE SEPARACION:

| | 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 CAMARA 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 haber sido tratadas con SB y hervidas a 95°C por 5 min., después de ello 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 hrs.

Una vez corrida las muestras, sacar el gel y colocar en un recipiente plano con tapa y añadirle 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 sol de decoloración varias veces hasta que este transparente el gel y se observen claramente las bandas de proteína.

CUESTIONARIO:

1. Porque se le llama SDS-page?
2. Como se lleva a cabo la polimerización de la acrilamida
3. Para que se utiliza la electroforesis
4. Cómo funciona la cámara electroforética y los amortiguadores
5. Que función tiene añadir en el amortiguador de muestra el SDS y el mercaptoetanol?

➤ PRACTICA # 8

Hidrolisis de almidón por la alfa amilasa

INTRODUCCIÓN: a investigar por el estudiante

COMPETENCIA: Determinar diferentes carbohidratos en base a sus características moleculares

MATERIAL:

1 gradilla
2 tubos de ensaye 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 pizeta con agua destilada
Solución de Almidón al 1%
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. Poner 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
8. Del almidón por la enzima amilasa

CUESTIONARIO

1. Mencione que tipo de unión sobre la cual es especifica 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

➤ PRACTICA # 9

Reacciones Características para la Identificación de Carbohidratos

INTRODUCCIÓN: a investigar por el estudiante

COMPETENCIA: Determinar diferentes carbohidratos en base a sus características moleculares

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 ó 100 ml
- Dos pinzas para tubo de ensaye
- Quince tubos de ensaye de 15 x 150
- Parafilm (suficiente para tapan la boca del vaso de 100 ml)

METODOLOGIA:

Habrá siete soluciones de azúcares marcadas de la a a la g. (los azúcares correspondientes aparecen en la sección de preparación de reactivos)

Reacción de Feheling:

1. Coloca en la gradilla cinco tubos de ensaye y márcalos del 1 al 5. Pipetea 5 ml del azúcar marcada b al tubo 1; 5.0 ml de la marcada c al tubo 2; 5.0 ml de la marcada d al tubo 3; 5.0 ml de la e al tubo 4 y 5.0 ml de la f al tubo 5.
2. Agrega 5 ml del reactivo de Feheling 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 azucares son reductores?

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

Reactivo de Feheling: (1 litro)

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 hacer 500 ml.

Solución B: Disolver 178 g de tartrato doble de sodio y potasio y 50 g de hidróxido de sodio en suficiente agua destilada para hacer 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 y como se le llama
2. Mencione los azúcares que son cetonas y como se les llama
3. Cuales carbohidratos son heteropolisacáridos y cuales homopolisacáridos
4. ¿A qué se le denomina azúcar reductor y cuáles de los que hiciste lo son?
5. A que se le llama hemiacetal y hemicetal

➤ PRACTICA # 10

Determinación de Glucosa por el método de la Ortotoluidina

INTRODUCCION: A investigar por el estudiante.-

COMPETENCIA: Determinar glucosa en suero

MATERIAL:

- 6 Tubos de ensaye, 13 x 100
- 1 termoplato
- 1 vaso de precipitado de 500 ml
- 1 pizeta con agua destilada
- 1 gradilla
- Papel secante
- Parafilm
- 1 micropipeta de 10-100 uL o de 20-200 uL y puntillas
- 1 pipetas de 5 ml
- 1 pipeteador
- 1 micropipeta de 100 microlitros (o puede también ser de 200 microlitros) y puntillas
- Espectrofotómetro y cubetas
- Solución patrón o estándar de glucosa: 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.25%, 0.3%
- Una muestra de suero

METODOLOGIA:

1.- Añadir a cada tubo 1.5 ml del reactivo previamente hidratado y mezclado por inversión

| tubo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------------------|----------------|---------------|---------------|----------------|---------------|------|
| estándar (µL) | 100 (0.05%) | 100 (0.1%) | 100 (0.2%) | 100 (0.25%) | 100 (0.3%) | |
| Muestra (µL) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 100 |
| Reactivo de Ortotoluidina (mL) | 5 mL | 5 mL | 5 mL | 5 mL | 5 mL | 5 mL |

2.- mezclar cada tubo tapado con parafilm

3.- Colocar los tubos en agua hirviendo por 5 min

4.- Dejar enfriar y leer las absorbancias a 630 nm, primeramente, ajustar a cero (0) el espectrofotómetro con agua destilada, colocar agua destilada en la cubeta.

5) Medir las absorbancias del resto, enjuagando con agua destilada entre cada una y escurriendo la cubeta sobre papel absorbente (Kleenex)

Representar gráficamente en papel milimétrico, las absorbancias obtenidas en cada caso, en función de la cantidad de glucosa en los estándares (tubos de 1-4) y así se obtiene la recta de calibrado, que nos servirá para la determinación de la muestra.

Cálculos numéricos

Realizar una curva de concentraciones vs absorbancia

Y también hacer los cálculos con la siguiente fórmula

$$\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia de una sol patrón}} \times 100 = \text{mg de glucosa por 100 mL (dL) de muestra}$$

Graficar la absorbancia en el eje de las Y, graficar la concentración en el eje X

A partir de la curva y apoyándonos en la recta de calibrado, se determina la cantidad de glucosa que hay en la muestra.

PREGUNTAS:

1. Cómo reacciona el reactivo con la glucosa
2. Haga un diagrama de la ruta del glicolisis
3. Que niveles de glucosa son normales para el ser humano en ayunas
4. Describa como se lleva a cabo la determinación de glucosa usando la enzima glucosa oxidasa

➤ PRACTICA # 11

Curva de Calibración y Determinación de Lípidos

INTRODUCCION: A investigar por el estudiante.-

COMPETENCIA: Cuantificar lípidos totales en una muestra

MATERIAL:

- 14 Tubos de ensaye, 16 x 125
- 1 termoplato
- 2 vaso de precipitado de 500 ml
- 1 pizeta con agua destilada
- 1 gradilla
- Papel secante
- 1 pinza para tubos
- 2 pipetas de 5 ml
- 1 micropipeteador de 10-100 microL y puntillas
- 1 pipeteador de perilla para ácido
- 1 micropipeta de 100 microlitros (o puede también ser de 200 microlitros) y puntillas

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 diluído, que se usa como estándar, y 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:

| | blanco | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| (patrón) Aceite (μL) | ----- | 10 | 20 | 30 | 50 | 100 | ----- |
| Muestra (μL) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 200 |
| Agua destilada | 200 | 190 | 180 | 170 | 150 | 100 | |
| H2SO4 concentrado (ml) | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |

Agitar vigorosamente cada muestra de ensayo, vortex.

Calentar a 100 °C, durante 10 min, para que se produzca la hidrólisis de los lípidos. A continuación enfriar las muestras de ensayo en un baño de agua fría .

Tomar de cada tubo, una alícuota de 200 microL y añadir 2 ml del reactivo de vainillina.

Mezclar con vortex

Esperar 30 min a que se desarrolle la reacción y medir la absorbancia de cada disolución, a 530 nm.

Representar gráficamente, las absorbancias obtenidas en cada caso, en función de la cantidad de lípidos incluida en los patrones (tubos de 1-5) y así se obtiene la recta de calibrado, que nos servirá para la determinación de la muestra.

Cálculos numéricos

Se representan las absorbancias obtenidas en los tubos 1-5 en función de los mg de lípidos puestos en cada caso obteniéndose así la recta de calibrado.

Graficar la absorbancia en el eje de las Y, graficar la concentración de lípido en el eje X

A partir de las absorbancias obtenidas en los tubos 6 y apoyándonos en la recta de calibrado, se determina la cantidad de lípido que corresponde a la muestra.

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.- Que tipos de lípidos encontramos en la sangre (suero).
- 2.- A que se encuentran asociados los lípidos sanguíneos
- 3.- Donde se sintetizan los lípidos en el organismo humano o animal
- 4.- Donde se degradan los lípidos y quien los degrada.
- 5.- Para que son utilizados los lípidos en el organismo.

➤ PRACTICA # 12

Cromatografía en Capa Fina de Lípidos

INTRODUCCIÓN: A investigar por el estudiante

COMPETENCIA: Realizar una cromatografía de lípidos a fin de determinar su peso molecular

MATERIAL:

- Tres vasos de precipitados de 250 ml
- Tres capilares
- Seis portaobjetos con Silice
- Dos tubos de ensaye de 13 x 100
- Una pipeta de 5 ml
- Papel aluminio suficiente para cubrir la boca del vaso.

METODOLOGIA:

1. Pipetea 5.0 ml de cloroformo en un tubo de ensaye y disuelve un poco de lecitina (alrededor de 1 g)
2. Vacía la mezcla de éter de petróleo-éter etílico- ácido acético a cada uno de los tres vasos de precipitados hasta una altura de medio centímetro y tapa los vasos lo más herméticamente posible con el papel aluminio.
3. Se prepararán dos muestras en cada portaobjetos. Mentalmente divide la anchura del portaobjetos de manera que coloques una muestra en cada mitad de manera simétrica alrededor de un centímetro de cada borde de la sílica gel.
4. Con un capilar para cada muestra, coloca una pequeña gota de muestra de las sustancias escogidas para la práctica, una de ellas será lecitina. Escoge muestras de las sustancias que quieras.
5. Anota en tu libreta los nombres de las sustancias que hayas escogido y el portaobjetos donde las colocaste, para que te sea sencillo identificar las manchas más adelante.
6. Introduce los portaobjetos, uno cada vez, en los vasos ya preparados con la mezcla de solventes, de manera que no se agite ésta y cuidando que el portaobjetos no quede en un ángulo muy inclinado al recargarse en la pared del vaso. Este paso debe hacerse con mucho cuidado.

7. Observa el ascenso del solvente, que es muy rápido, y cuando falte aproximadamente medio centímetro para que alcance el borde superior, sácalos y déjalos secar al aire libre. Con un lápiz marca hasta donde haya llegado el solvente, no importa que la punta del lápiz haga un surco en la sílice.
8. Lleva los portaobjetos a la estufa de aire caliente a 110° C por 15 minutos o lo que sea necesario para que aparezcan las manchas oscuras correspondientes a los lípidos carbonizados.
9. Mide las distancias necesarias para calcular los Rf de tus muestras.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

- Mezcla de solventes: Éter de petróleo-éter etílico- ácido acético (90:10:1) Éter de petróleo 450 ml; éter etílico, 50 ml; ácido acético glacial, 1.0 ml
- Muestras de lípidos diversos: aceites de maíz, oliva, cártamo, algodón, ajonjolí y coco.

Se preparan en soluciones al 5% v/v en cloroformo. Bastan 0.5 ml de cada aceite disuelto en 10 ml de cloroformo en tubo de ensayo.

CUESTIONARIO:

1. Cuales ácidos grasos son esenciales para el ser humano
2. Que significa Cis y Trans en las grasas
3. Cuales ácidos grasos son más comunes en las plantas?
4. Porque son importantes los ácidos grasos en la naturaleza?
5. Porque son altamente energéticos los ácidos grasos?

➤ PRACTICA # 13

Proteasas- Extracción de Papaína

INTRODUCCION: A investigar por el estudiante

OBJETIVO: Purificar la enzima papaína y determinar su actividad

MATERIAL:

1 gradilla
7 tubos de ensaye
1 mechero
1 vaso de precipitado
1 tripie con tela
1 termómetro
1 cuba
1 vaso de precipitados 25 mL
Pipetas de 5 mL
1 pipeteador
Papaína
Tripsina
Ácido clorhídrico
Ácido tricloro acético 30%
Caseína 0.1%
Sol amortiguadora de fosfatos pH 7.0
Leche
Espectrofotómetro

METODOLOGIA:

Extracción y procesamiento del látex

1. Usando guantes, sostener la papaya verde sobre un vaso de precipitados limpio y hacer cortes con una navaja de 2 mm de espesor.
2. Dejar que el látex escurra en el vaso de precipitados, hasta que pare de gotear.
3. Introducir inmediatamente al horno a 50°C en una caja Petri abierta para que seque rápidamente.
4. Esperar hasta que se vean grumos blancos y deshidratados (aproximadamente 4 horas).
5. Con un mortero pulverizar los grumos.
6. Guardar el polvo blanco en un recipiente color ámbar con una etiqueta que tenga el nombre de la enzima, fecha de procesamiento, nombre de la materia en la que se extrajo, indicaciones de conservación y el nombre de un responsable.
7. Guardar a 4°C.

Experimento 1

1. Numerar dos tubos de ensaye
2. Colocar cortes de huevo cocido en cada tubo de ensaye
3. Agregar soluciones de tripsina a cada uno, cada tubo con una concentración diferente.
4. Incubar a 37° C por 12 horas
5. Observar el digerido

Experimento 2

1. Etiquete los tubos del 1 al 3.
2. Agregar 5 ml de solución de caseína a cada uno
3. Colocarlos a baño maría hasta 30° C.
4. Agregar 1 ml de soluciones de papaína, una concentración diferente por tubo
5. Incubar a 30° C por 30 min.
6. Precipitar las proteínas con ácido tricloroacético agregando 6 ml
7. Filtrar la mezcla.
8. Medir en el espectro el filtrado a 280 nm

Experimento 3

1. Etiquete los tubos del 1 al 3.
2. Agregar 5 ml de leche a cada uno
3. Colocarlos a baño maría hasta que la leche alcance 30° C.
4. Agregar 2 ml de soluciones de papaína una concentración diferente por tubo
5. Incubar a 30° C hasta observar un cambio.
6. Notar el tiempo en que se forman coágulos.

Soluciones

Buffer de fosfatos 0.05N pH 7

Tripsina 0.1%

Tripsina 0.2%

Caseína 0.1%

Papaína 0.0025

Papaína 0.005

Papaína 0.01

Ácido tricloro acético 30%

CUESTIONARIO:

1. Como funciona la papaína sobre una proteína
2. Que tamaño molecular tiene la papaína
3. Porque las enzimas tienes que trabajarlas en hielo?
4. De ejemplos de proteasas

PRACTICA # 14*Purificación de DNA de bacteria*

INTRODUCCION: a investigar por el estudiante

COMPETENCIA: Practicar una metodología de purificación de DNA 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 gr de NaCl en 80 ml de agua destilada y despacio añada 10 gr de CTAB mientras mezcla con un agitador. Si es necesario caliente a 65°C, ajuste a 100 ml.
- ✓ Caldo LB (Luria Bertani): 5 gr Extracto de levadura, 10 gr Triptona, 10 gr NaCl, 1 L de agua destilada.
- ✓ Cloroformo
- ✓ Isopropanol

METODOLOGIA:

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 1.0 ml y colocarlos en un microtubo y centrifugar 5 min a 6000 rpm, decantar el sobrenadante
3. Resuspender 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 10 min en una microcentrifuga a máxima velocidad.
8. Remueva el sobrenadante o fase líquida, donde está el DNA 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 y después decantar el sobrenadante y escurrir sobre papel secante 5 min.

10. Resuspender el botón o precipitado en 50 μ l de agua libre de DNAsas o TE buffer.
11. Almacenar a -20° C hasta la siguiente práctica.
12. Medir la concentración de DNA en un espectrofotómetro. Colocar 1 ml de agua destilada en la celda de cuarzo y añadir 5 μ L de su muestra, mezclar, leer a 260 y 280 nm, ajustando a cero la absorbancia con agua, 50 μ g de DNA tiene una absorbancia de 1 a 260 nm.
La pureza del DNA tiene una relación $Abs_{260}/Abs_{280} > 1.8$

CUESTIONARIO:

1. Para qué sirve cada uno de los reactivos utilizados en la purificación del DNA
2. De qué tamaño es la molécula de DNA de la bacteria
3. Porque se utiliza la longitud de onda de 260 nm y la de 280 nm?
4. Que tipos de hélices se pueden encontrar en la naturaleza
5. Cuantos tipos de nucleótidos tienen los ácidos nucleicos
6. Cuales tipos de ácidos nucleicos existen en una células eucariota?
7. Que otras funciones tienen las bases nucleotidicas

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.