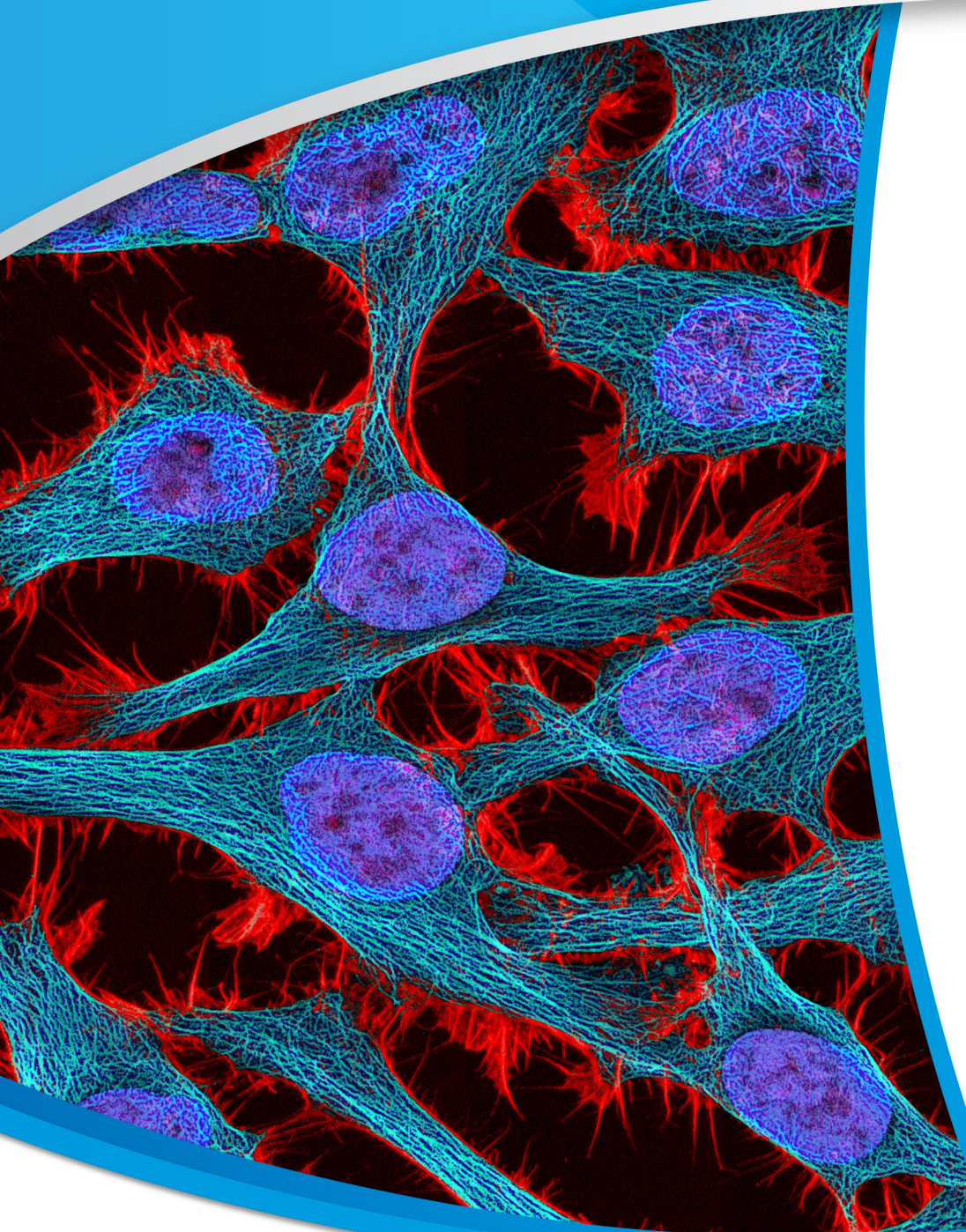




Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Estructura y Función Celular I



Irma Jiménez Morales

Leonor Rodríguez Cruz



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Dr. Salvador Vega y León
Rector General

Mtro. Norberto Manjarrez Álvarez
Secretario General

UNIDAD IZTAPALAPA

Dr. José Octavio Nateras Domínguez
Rector de Unidad

Dr. Miguel Ángel Gómez Fonseca
Secretario de Unidad

Dra. Edith Ponce Alquicira
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Dra. Milagros Huerta Coria
Coordinadora de Extensión Universitaria

Lic. Adrián Felipe Valencia Llamas
Jefe de la Sección de Producción Editorial

Primera Impresión 2015
ISBN: 978-607-28-0238-4

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina,
Del. Iztapalapa, C.P 09340, México D.F. Tel.: 5804 4600

Impreso y hecho en México/*Printed in Mexico*

Índice

El Laboratorio	7
Manejo del Microscopio de Campo Claro	17
Células Animales y Vegetales	25
Aislamiento de ADN	31
Extracción y separación de proteínas y lípidos	35
Cuantificación de lípidos y proteínas	39
Identificación Cualitativa de Carbohidratos	45
Hidrólisis de almidón: Actividad de la amilasa	51
Actividad catalítica de la Tirosinasa	55
Coacervados	61
Identificación morfológica de células representativas de cada uno de los cinco reinos	65
Función de los peroxisomas: Actividad enzimática de las peroxidasas	71

Presentación

Este manual de prácticas de laboratorio está diseñado de acuerdo al programa de la Unidad de Enseñanza Aprendizaje (UEA) de Estructura y Función Celular I, que forma parte del tronco básico profesional incluido en el nuevo Plan de Estudios de las Licenciaturas de Biología, Biología Experimental, Hidrobiología, que se imparte en el trimestre III en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Las prácticas de laboratorio propuestas en este manual, están diseñadas de manera que despierten el interés de los alumnos, y tratando de relacionar la estructura celular y su función. Son resultado de los años de experiencia que tienen las autoras impartiendo las UEA de Bioquímica y Biología Celular, que por los nuevos planes de estudio desaparecen; de cierta forma, para dar paso a dos UEA de Estructura y Función Celular I y II. Estas UEAS abordan los temas de manera en que pueda relacionarse la estructura de las biomoléculas con la función de cada uno de los organelos que forman parte de la célula.

Con esto se pretende que el alumno adquiera un conocimiento de manera conjunta y no fragmentado como sucedía al abordar la estructura de las biomoléculas, la estructura y función de los organelos celulares de forma separada. Cabe señalar que este Manual es producto de un proyecto apoyado por un acuerdo del Rector General (12/2007) que inició en septiembre de 2007 y culminó en noviembre del 2009.

El presente manual incluye en cada una de las prácticas, una breve introducción del tema y el fundamento del procedimiento a realizar. La introducción debe ser complementada por el alumno con las clases de teoría o con información recabada de los textos relacionados con la UEA. También cuenta con un apartado de material y reactivos que van a utilizar y una descripción detallada para la realización de cada desarrollo experimental. Al final de cada práctica se incluye una serie de preguntas con las cuales se pretende que el alumno logre una integración del conocimiento práctico con el teórico. Las preguntas están diseñadas de tal forma que pueden responderse al momento de la práctica o posterior a la misma, con la finalidad de que les permita desarrollar un mayor interés y comprensión de un método, técnica o tema en particular.

Además, las prácticas propuestas permiten familiarizar al alumno en el conocimiento y manejo de algunas técnicas y aparatos de uso común en un laboratorio de Bioquímica y Biología Celular. Para ello se ha determinado utilizar material biológico de fácil acceso, aprender el uso y manejo correcto del microscopio para la identificación de tipos celulares. También presenta un esquema de prácticas que permitirá al alumno realizar extracciones y determinaciones cuantitativas y cualitativas de moléculas biológicas que forman parte de la estructura de la célula. Con la finalidad de que el alumno aprenda a utilizar un espectrofotómetro, realizar una curva patrón e interpretar los resultados obtenidos. Asimismo aprenderá a desarrollar un ensayo de actividad enzimática y a evaluarla mediante determinaciones espectrofotométricas.

El tiempo para el desarrollo de cada una de las prácticas fue probado directamente con los alumnos durante la vigencia de proyecto mencionado previamente, por lo que están diseñadas para realizarse en 3 horas, tiempo estipulado para la sesión práctica de la UEA. El uso eficiente del tiempo dentro de las sesiones prácticas dependerá en gran medida de la habilidad del profesor para organizar a los alumnos, así como que ellos comprendan los procedimientos a realizar. Finalmente, es importante que el estudiante mantenga un registro completo de sus experimentos; por lo que las autoras recomiendan el uso de una bitácora en el laboratorio. El objetivo de una bitácora es que el alumno conozca y aprenda la forma en la que realizó el desarrollo experimental. En ésta, los alumnos deben escribir los resultados, cálculos, conclusiones, etc. Este registro se hace al momento en que se realiza la práctica y debe estar escrito de manera clara para que cualquiera pueda entender cómo se realizó la práctica y cuáles fueron los resultados obtenidos.

El Manual de Estructura y Función Celular I lo hemos preparado con prácticas sencillas, ya que como dijo Albert Einstein *“La ciencia debe ser lo más sencilla posible, pero no más simple”*. Por lo que se incluyen algunos micrométodos pretendiendo presentar a los alumnos herramientas ampliamente utilizadas en los laboratorios de investigación como es el uso de las micropipetas. También son prácticas representativas que intentan explicar algunas de las propiedades de la biomoléculas, técnicas para estudiarlas, así como evaluar algunos procesos celulares. Se espera que el estudiante adquiera los conocimientos básicos y necesarios que le permitan proseguir con los cursos posteriores en el transcurso de cada Licenciatura en cuestión.

Agradecimientos

Expresamos nuestro más sincero agradecimiento a los alumnos, quienes nos ayudaron a estandarizar estas prácticas durante sus cursos de las UEA de Bioquímica I y Biología Celular de la UAM-Iztapalapa. A las técnicas de laboratorio: María de la Luz Luna y Ma. Graciela García, quienes durante la estandarización de las prácticas nos apoyaron de manera extraordinaria. Finalmente agradecemos a la Dra. Carolina Campos por incitarnos a participar en este proyecto.

También agradecemos a los revisores su valiosa aportación para mejorar el contenido de este manual.

Irma Jiménez Morales
Leonor Rodríguez Cruz

El Laboratorio

El Laboratorio es el espacio destinado para que los alumnos realicen las actividades experimentales señaladas por el profesor. El Laboratorio constituye el lugar de trabajo para la investigación y la enseñanza en las escuelas. En este lugar se evalúan diversos aspectos, como la capacidad para observar, descubrir y participar en una investigación, así como para adquirir hábitos de orden, limpieza y organización en el trabajo.

Normas de seguridad

Toda actividad que implique el manejo de fuentes de energía calorífica y eléctrica, así como el de sustancias corrosivas o tóxicas, exige tener cuidado y seguir una serie de recomendaciones y normas de seguridad que permiten adquirir confianza y destreza en la utilización de toda clase de equipos y sustancias empleados en las prácticas.

Algunas reglas de seguridad para los alumnos son:

Utilizar una bata de algodón para las actividades prácticas a fin de proteger la ropa y el cuerpo de alguna sustancia inflamable o de sufrir alguna quemadura.

No manipular equipo o sustancias hasta no recibir indicaciones pertinentes.

Realizar la limpieza de los materiales, equipos y área de trabajo antes y después de la práctica.

Los solventes inflamables (alcohol, éter, etc.) se utilizan frecuentemente en el laboratorio. Los vapores, sobre todo del éter, pueden inflamarse y en ciertas circunstancias explotar. Por lo que se recomienda que antes de abrir un frasco de cualquier solvente inflamable, verificar que no se encuentre ningún mechero prendido cerca. Los solventes inflamables no deben usarse en lugares cerrados en donde los vapores pueden acumularse hasta formar con el aire mezclas explosivas. Las soluciones que contengan solventes inflamables nunca deben calentarse sobre mechero Bunsen, deben utilizarse los baños de agua.

Los ácidos fuertes (sulfúrico, clorhídrico, nítrico, etc.), son sustancias que destruyen rápidamente los tejidos. Los accidentes más frecuentes son las salpicaduras sobre las manos, ojos y cara, y las quemaduras en la boca al pipetear directamente desde la botella (lo cual NUNCA debe hacerse). La mejor opción para transferir ácidos fuertes consiste en emplear alguna de las distintas bombas de plástico (pro pipetas). Al diluir ácido con agua, se produce calor, sobre todo en el caso del ácido sulfúrico, si se mezcla gran cantidad de este ácido con una pequeña cantidad de agua puede generarse suficiente calor para producir una explosión. Por lo tanto al diluir ácidos, **agregar lentamente el ácido al agua**, para evitar que salte violentamente, además, manejar este tipo de sustancias SIEMPRE dentro de una campana de extracción. De ser necesario, el ácido diluido se enfriará antes de añadir más. Finalmente, debe limpiarse cuidadosamente cualquier líquido derramado al exterior de los frascos o sobre la mesa. La pipetas utilizadas para medir el ácido deben ser inmediatamente lavadas.

Las bases fuertes (hidróxidos) en su forma sólida o en solución concentrada, pueden lesionar profundamente los tejidos, en especial a nivel de las mucosas de la boca. Al disolverse los hidróxidos sólidos en agua, se produce una gran cantidad de calor. Para hacer soluciones de bases fuertes, deben tomarse las mismas precauciones que para los ácidos fuertes. Cuando se emplean hidróxidos de sodio o potasio en lentejas, es indispensable una agitación constante para evitar que se acumulen en un mismo lugar y se produzca un calentamiento local intenso.

Algunos compuestos como el peróxido de hidrógeno, dicromato de potasio y el ácido crómico, pueden dañar la piel y los ojos, por lo cual deben aplicarse las precauciones necesarias.

En algunos casos la ventilación en un laboratorio puede ser aceptable para el trabajo ordinario, pero no basta para remover completamente los vapores tóxicos. Lo mejor es que cualquier manipulación que produzca un vapor tóxico se realice bajo la campana de extracción. Los estudiantes no siempre se dan cuenta de que los vapores de acetona, cloroformo, éter, tetracloruro de carbono y alcohol metílico pueden ser muy peligrosos. Todas las manipulaciones de estos solventes deben llevarse a cabo bajo la campana.

Tener cuidado al manejar las fuentes de energía calorífica y eléctrica: mechero, parrilla, estufa, contactos. Las parrillas de calentamiento eléctricas deben colocarse en forma de evitar lo más posible el contacto accidental de las manos, de los brazos, etc. Con las superficies calientes.

También es de gran importancia rotular correctamente todos los frascos y recipientes en el laboratorio, para evitar confusiones.

Medición de la masa

Para medir la masa se utiliza la balanza, existen balanzas con las que se determina la masa de los objetos con precisión de un microgramo. La elección de cuál balanza utilizar depende de la precisión necesaria y de la cantidad del material a medir. En la figura 1 se muestran dos tipos de balanzas.

Unidades de masa más utilizadas

Unidades métricas	Símbolo	Equivalentes en gramos	Potencia de 10 equivalente
Kilogramo	Kg	1000	10^3 g
gramo	g	1	10^0 g
miligramo	mg	0.001	10^{-3} g
microgramo	μ g	0.000001	10^{-6} g
nanogramo	ng	0.000000001	10^{-9} g

Por lo tanto es importante tener en cuenta que:

$$1\text{g} = 1000\text{mg}$$

$$1\text{mg} = 1000\mu\text{g}$$



FIGURA 1. Dos tipos de balanzas utilizadas ampliamente en el laboratorio. Izquierda: Balanza de un platillo superior, cuya precisión es de 0.001g (mg), derecha: Balanza analítica electrónica digital con precisión de 0.0001g.

Medición del volumen

La unidad de volumen en el sistema métrico es el metro cúbico (m^3), la cual es demasiado grande como unidad para el trabajo normal de laboratorio, de modo que se emplea decímetros cúbicos (dm^3) o centímetros cúbicos (cm^3). Sin embargo, el litro y el mililitro (que se abrevian L y mL, respectivamente) son unidades normales de volumen que se emplean en la mayoría de los laboratorios, ya que la mayor parte del material de vidrio de laboratorio está calibrado en litros o mililitros.

Los instrumentos y equipos más usados para medir líquidos son el matraz aforado, la probeta, la bureta y la pipeta (Figura 2). Estos instrumentos se fabrican casi siempre, de vidrio o de plástico y se consiguen de diferentes tamaños.

Unidades de volumen más utilizadas

Unidades métricas	Símbolo	Equivalentes en Litros	Potencia de 10 equivalente
Litro	L	1	10^0 L
Mililitro	mL	0.001	10^{-3} L
Micro litro	μ L	0.000001	10^{-6} L

Es importante recordar que:

$$1 \text{ L} = 1000 \text{ mL} = 1000 \text{ cm}^3$$

$$1 \text{ mL} = 1000 \mu\text{L}$$

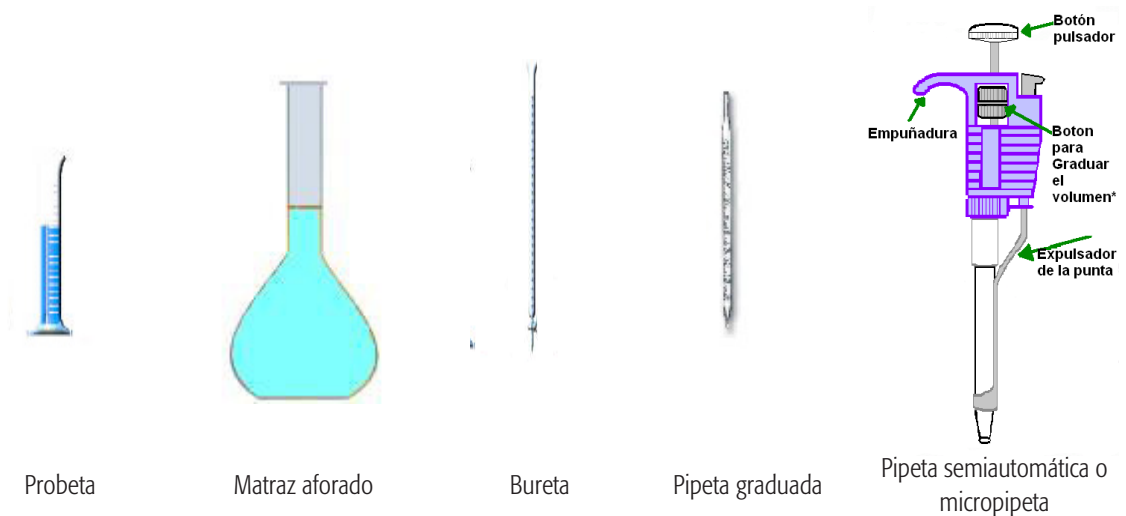
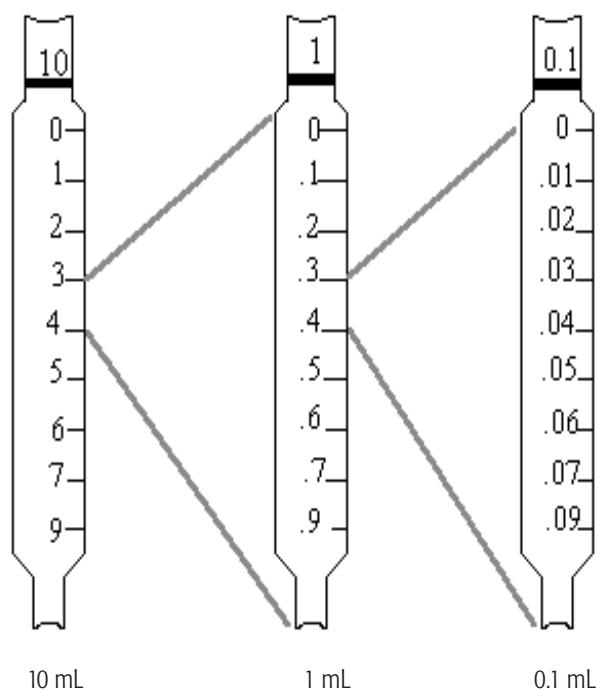


Figura 2. Instrumentos principalmente utilizados para medir el volumen de los líquidos.

Las pipetas, el material volumétrico que se emplea más frecuentemente, juegan un papel crucial en la determinación del grado de exactitud y precisión en un gran número de análisis realizados en el laboratorio. Si se emplean las pipetas en el laboratorio, deben seleccionarse adecuadamente y emplearse con cuidado.



Las pipetas presentan ciertas características que hacen posible distinguir fácilmente el volumen que pueden medir. Primero, siempre tienen marcado en el extremo superior de la pipeta (cerca del sitio por donde se succiona) el volumen en mililitros (10, 5, 2 etc.). Además, también tienen un código de colores, es decir, dependiendo del volumen es el color que presentan las pipetas (una franja de color también en el extremo superior de la pipeta).

Volumen	Color	Escala	Graduación (mL)
1 mL	Marrón	1/10 en 1/100	0.1, 0.2, 0.3...
1 mL	Carmin	1/10	0.1, 0.2, 0.3...
2 mL	Negro	2/10 en 1/100	0.02, 0.04, 0.06...
2 mL	Verde	1/10	0.2, 0.4, 0.6...
5 mL	Azul	1/10	1, 2, 3...
10 mL	Naranja	1/10	1, 2, 3...

I. Método para el empleo de pipetas.

Muchas ocasiones se da como hecho el que todos los alumnos en el laboratorio saben cómo pipetear correctamente, sin embargo, pueden haber desarrollado malos hábitos o haberse hecho descuidados o impacientes en el momento de hacerlo. Tales hábitos y actitudes pueden conducir a un pipeteo incorrecto. La precisión en el laboratorio se puede mejorar si todos los alumnos se adhieren a un proceso uniforme y cuidadoso. Se recomienda el siguiente proceso de pipeteo, ya que es fundamental una buena técnica en el manejo de las pipetas:

1. Se examina la pipeta. ¿Es el tamaño correcto? ¿Está limpia? ¿Está libre de gotas de agua? ¿Está libre de grietas o punta rota? Si la respuesta a cualquiera de estas preguntas es NO, no se emplea.
2. El tallo de la pipeta se sujeta con el pulgar y el dedo medio.

3. Se introduce la pipeta unos 5 centímetros en el líquido que se va a medir para que se puede aspirar el volumen necesario sin aire y se succiona. Se introduce el líquido lentamente con aspiración suave en la pipeta hasta un centímetro por encima de la marca de calibración, se cierra la pieza de la boca con el dedo índice. La pipeta no debe introducirse directamente en el reactivo o en las botellas patronas. La disolución debe verterse en un recipiente limpio, de tamaño adecuado y el pipeteo debe hacerse a partir de este recipiente. De otra manera, una pipeta sucia podría contaminar el reactivo o patrón y no podría detectarse. Una succión lenta del líquido es importante porque pueden quedar atrapadas burbujas de aire en la columna si el líquido se introduce rápidamente en la pipeta.
4. Se mantiene la pipeta en posición vertical, se deja que el nivel del líquido baje hasta la marca de calibración moviendo con suavidad el índice sobre la pieza de la boca. El dedo no debe retirarse. Se vacía la pipeta lentamente hasta que la parte inferior del menisco está en línea con la marca, la cual debe estar al nivel del ojo. La mayoría de las inexactitudes se producen en el momento en que la parte inferior del menisco alcanza la marca. El líquido debe vaciarse muy lentamente hasta que la parte inferior del menisco **toca justamente** la marca, el menisco nunca debe atravesar la marca. Se mantiene cerrado el extremo donde se succionó (o bien mantener firme la pro pipeta).
5. Ahora la pipeta se pasa al recipiente de recepción, colocando su punta contra el y se vierte el líquido contenido en el recipiente de vidrio adecuado. Hay cuatro puntos importantes a recordar durante este paso:
 1. Se mantiene la pipeta tan verticalmente como sea posible, la cantidad correcta se vierte sólo cuando la pipeta está en posición vertical.
 2. Se deja fluir el líquido, no se fuerza a que salga el líquido de la pipeta para terminar más rápido, no se debe colocar la pipeta en el recipiente de vidrio con obstrucción del flujo libre.
 3. Cuando el nivel del líquido alcanza el tubo inferior de la pipeta, se toca con la punta de la pipeta la pared del recipiente receptor hasta que el flujo está finalizado. Si no ocurre así, la última gota del líquido podría quedar colgando en la punta de la pipeta.
 4. Al final del vertido, no se deja la punta de la pipeta en contacto con el líquido, este podría ascender por la pipeta por acción capilar.

Las pipetas graduadas siguen utilizándose como una herramienta muy importante de los laboratorios, sin embargo poco a poco van siendo desplazadas por la micropipetas. Las micropipetas en los laboratorios de investigación son totalmente indispensables y en los laboratorios de docencia comienzan a ser utilizadas, es decepcionante que existan alumnos que cursan el último año de sus estudios universitarios y no conozcan esta herramienta. Por lo tanto, consideramos de suma importancia iniciar a conocer y aprender el adecuado manejo de las micropipetas.

II. Pipetas semiautomáticas o micropipetas.

La micropipeta es un instrumento de laboratorio empleado para medir pequeños volúmenes de líquidos y permitir su manejo en las distintas técnicas científicas. Los volúmenes utilizados para cada una de las pipetas es variable según el modelo. Con estos instrumentos se pueden medir diferentes líquidos empleando puntas desechables

Manejo correcto de la micropipeta

Las micropipetas son útiles para medir volúmenes que van desde 0.5 μl hasta 1 mL. Actualmente existen pipetas automáticas de 5 mL, que ya no es un volumen pequeño pero permite medir estos volúmenes con mayor precisión que las pipetas graduadas y sin necesidad de una propipeta.

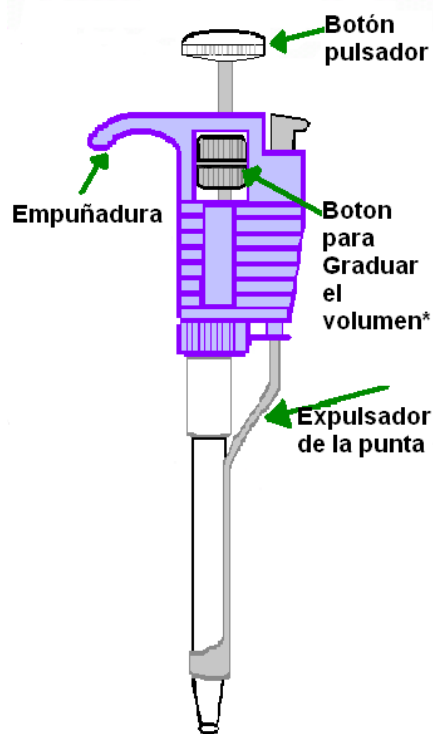


Figura 3. Esquema general de las primeras micropipetas que comenzaron a utilizarse.

A continuación se describen las instrucciones generales para el correcto manejo de las micropipetas, este puede variar ligeramente de acuerdo a la marca de micropipeta que se tenga disponible (Figura 3).

1. El primer paso es seleccionar la micropipeta a utilizar según el volumen requerido.
 2. Tomar la micropipeta cuidadosamente con una mano e identificar el volumen máximo que puede medir.
 3. La mayoría de la micropipetas indican en el botón pulsador el intervalo o volumen máximo que pueden pipetear.
 4. Oprimir el botón pulsador para familiarizarse con la presión que debe ejercerse sobre él.
 5. Es importante "sentir" que este botón tiene tres posiciones: la inicial en la cual se encuentra cuando no se ejerce presión sobre el botón, la primera posición en la cual se ejerce presión con el dedo sobre el botón y este muestra cierta rigidez y la segunda posición en la cual se ejerce aún más presión sobre el botón hasta llegar al "tope" de este.
 6. Una vez reconocidos las diferentes posiciones del botón pulsador o pistón, proceder a seleccionar el volumen que se pretende medir.
 7. Localizar el indicador de volumen, compuesto de tres dígitos que se deben leer de arriba hacia abajo.
 8. Es muy importante que para prevenir un daño en el mecanismo interno de la micropipeta no sobrepasar el volumen máximo para cada micropipeta.
 9. Colocar la punta adecuada de acuerdo al volumen de la pipeta, para insertar la punta de forma correcta y evitar que esta se desprenda, es necesario ejercer una fuerte presión.
- NOTA:** Jamás utilizar la pipeta sin colocar previamente la punta.
10. Tener localizados y cerca el recipiente que contiene la solución que se va a tomar y el recipiente donde se colocará el volumen de solución tomada.
 11. Para absorber el líquido, presionar el botón hasta la primera posición, con la pipeta en posición vertical, introducir la punta aproximadamente 1 cm en el líquido y después, lentamente, permitir que el pistón vuelva a la posición original.

12. Esto permite tomar el volumen correspondiente. Es muy importante no soltar el botón pulsador ya que esto permite la entrada de aire en la punta y esto provoca la toma de volúmenes incorrectos.
13. Colocar la parte inferior de la punta contra la pared interior del recipiente donde se va a depositar el líquido.
14. Apretar el botón pulsador suavemente hasta la primera posición. Apretar el botón pulsador hasta el segundo tope para vaciar el resto del líquido.
15. Mantener apretado el botón pulsador en el segundo tope hasta sacar la punta del recipiente.
16. Soltar el botón pulsador.
17. Apretar el botón del expulsador de la punta para que esta sea liberada.

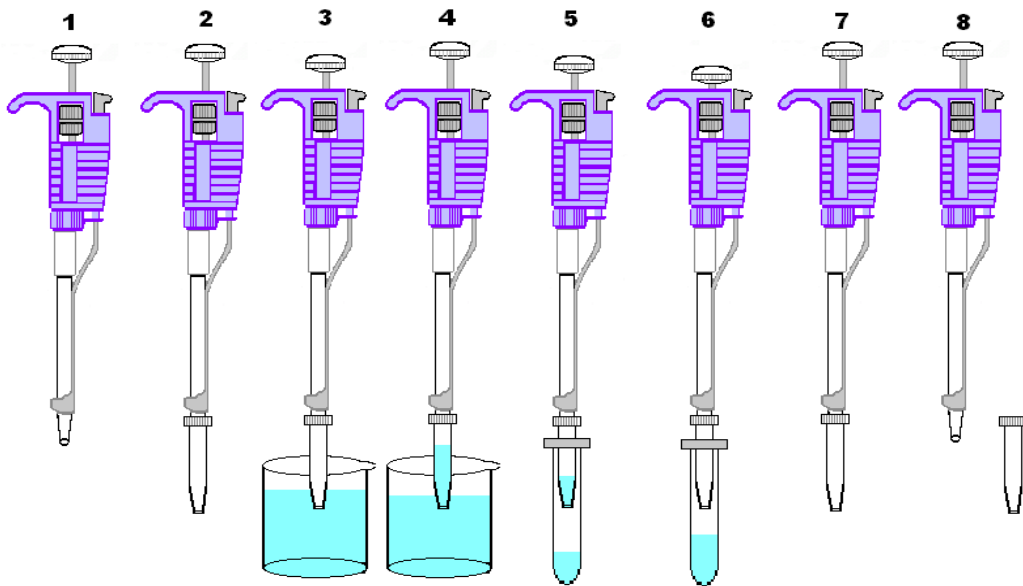





Figura 4. Posiciones de la micropipeta para su uso de forma correcta cuando se necesita medir un volumen específico.

Este instrumento de laboratorio es sumamente sensible y delicado, por lo que se deben tener ciertos cuidados para no dañar el sistema interno de pistones que posee la micropipeta:

1. Lo primero que se debe conocer es el tipo de pipeta que se está utilizando y antes de hacer cualquier movimiento de sus partes preguntar la forma correcta de ajustar el volumen, ya que algunos modelos presentan un botón que evita que la perilla de ajuste de volumen se mueva y de hacerlo sin oprimir el botón provocará graves daños a la micropipeta.
2. Los líquidos nunca deben entrar en contacto con el cono de la micropipeta.
3. Nunca voltear la micropipeta con la parte de la empuñadura hacia abajo.
4. Jamás colocar la micropipeta en forma horizontal si la punta tiene líquido.
5. NO ajustar el volumen fuera del intervalo (menor y mayor volumen) de la micropipeta.
6. Colocar la micropipeta en un parte segura de la mesa para que no se caiga, aparentemente cuándo caen no les pasa nada (sí es que no se rompió alguna parte) pero el mecanismo interno es muy sensible y puede sufrir daños que tal vez no sean visibles pero que provocarán que cuándo se utilice esa pipeta, está ya no tome los volúmenes correctos.

Bibliografía

-  González, L. Bioquímica para técnica de laboratorio. Editorial Marbán. Madrid, España, 1988.
-  Hein M., Arena S. Fundamentos de Química. International Thomson Editores, México, 1997.
-  Murali D. Control de Calidad en los Laboratorios. Editorial Reverté. España, 1982.

Manejo del Microscopio de Campo Claro

Introducción

En las ciencias biológicas el uso del microscopio es muy importante, en particular en las áreas de la biología, histología, microbiología y biología celular. Por esto resulta conveniente que el estudiante se familiarice con el manejo de este instrumento. Por tal motivo es de gran utilidad, el conocimiento y función de todas sus partes y como cada una de ellas contribuye a facilitar la observación.

Fundamento

En los microscopios de luz se pueden distinguir tres sistemas que permiten una buena observación (Figura 1). Los microscopios están constituidos por un **sistema óptico** que consta de dos lentes principales: una cercana a la preparación llamado **objetivo** y otra cercana al ojo del observador llamada **ocular**. También cuenta con una fuente de luz (**sistema luminoso**) en su base que envía los rayos luminosos a través de un condensador, que sirve para concentrar la mayor cantidad de luz en un punto y la hace pasar a través de la preparación. Finalmente el **sistema mecánico** que proporciona la estructura y soporte de los dos sistemas anteriores (Figura 2).

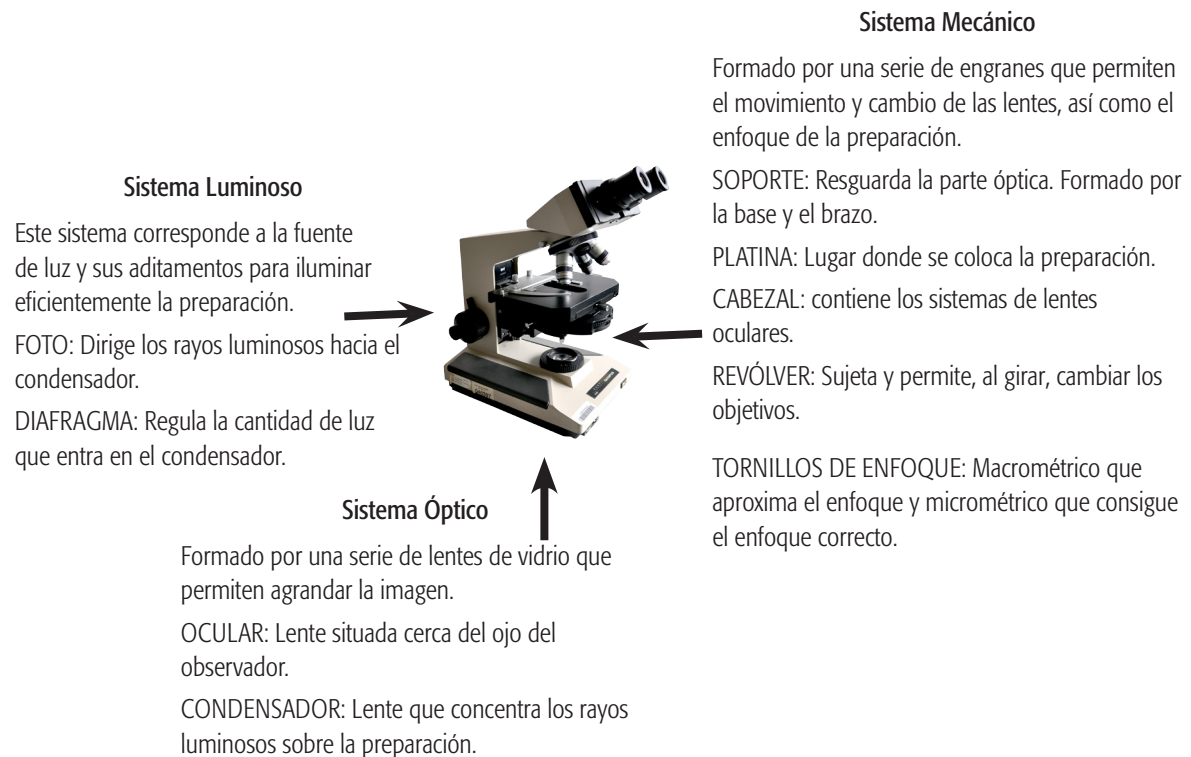


Figura 1. Sistemas que integran un microscopio.

La **base** además de sostener todo el peso del microscopio, le da solidez y estabilidad al aparato. En un gran número de modelos de microscopios en esta parte se encuentra integrada la fuente de luz. El **brazo** sirve de asa para sujetar y transportar el microscopio. En el brazo del microscopio se encuentran los **tornillos macrométrico** y **micrométrico** que son los que elevan y descienden la **platina**, la cual está sostenida en el brazo, también se apoyan el soporte del **condensador**, **diafragma** y los tornillos que regulan su movimiento.

NOTA: El microscopio es un aparato de empleo delicado hay que manejarlo con mucho cuidado, además de tomar el microscopio del brazo con una mano se recomienda tomar la base con la otra.

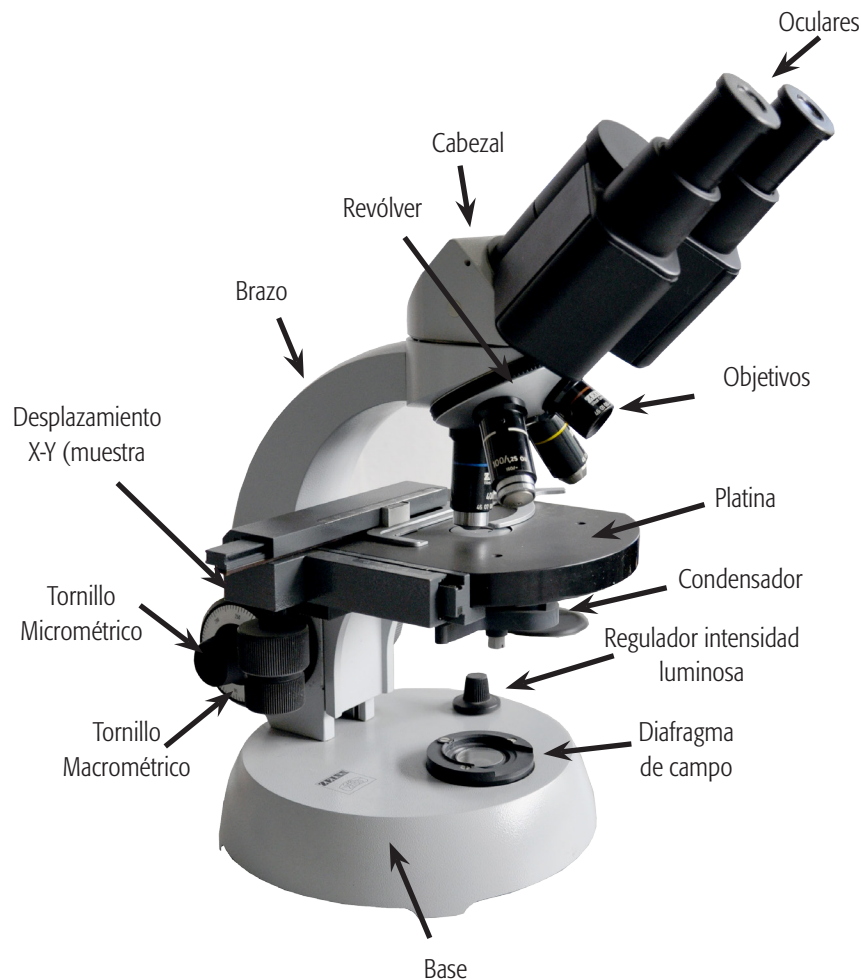


Figura 2. Partes del microscopio de campo claro.

Para el uso correcto del microscopio de campo claro es imprescindible que al inicio de cualquier observación se realice la **iluminación de Köhler**, técnica que consiste básicamente en centrar el haz de luz, alineando el condensador con respecto a los objetivos, su finalidad es obtener una iluminación óptima de la muestra.

Existen diferentes métodos para observar células o tejidos en el microscopio, observación de células en fresco, es decir, células o tejidos obtenidos del organismo inmediatamente antes de la observación al microscopio. El otro método es realizando la fijación de las células o tejidos para preservar su morfología.

Existen agentes químicos y físicos que evitan la descomposición de las células, estos son **los fijadores**. Los fijadores tienen como finalidad preservar la morfología y la composición química de los distintos componentes citológicos, de modo que lo que uno observa en el microscopio corresponda a lo que existía cuando las células formaban parte del organismo completo.

El uso más importante de los fijadores es preservar la morfología celular. Los fijadores sirven para proteger la muestra del ataque bacteriano, evitar autólisis de las células, evitar distorsiones y retracciones y finalmente preparar las diversas estructuras para que cuando se tiñan reaccionen más intensamente con los colorantes y de esta manera es más fácil su identificación.

Los fijadores son soluciones que actúan sobre las proteínas de las células (principales constituyentes de las estructuras celulares y las responsables de todos los procesos metabólicos) y por consiguiente los fijadores detienen el metabolismo y con esto la autólisis.

La mayoría de las células son incoloras, por lo que deben teñirse para facilitar su observación al microscopio y poder diferenciar algunos organelos celulares. Para teñir una célula por lo general suelen utilizarse dos **colorantes**: uno ácido y otro básico. Entre los colorantes más empleados se encuentran la hematoxilina-eosina, colorante básico y ácido respectivamente. Los componentes de la célula con un pH ácido se tiñen con colorantes básicos (basófilos), como el núcleo de la célula y los componentes celulares que tienen un pH básico, reaccionan con colorantes ácidos (acidófilos), como el citoplasma.

Objetivos

- Conocer las partes que componen un microscopio fotónico de campo claro.
- Aprender el manejo y cuidado que deben tener los microscopios.
- Descubrir las diferencias entre observar una muestra en fresco y una fija.

Material

Material por equipo	Reactivos
Portaobjetos	Ácido acético
Cubreobjetos	Cloruro de Sodio (NaCl)
Micropipetas	Soluciones
Puntas para micropipetas	Solución isotónica de NaCl al 0.9%
Lanceta estéril	Colorante de Wright
2 pipetas pasteur	Ácido acético al 2%
Piceta con agua destilada	Material Biológico proporcionado por los alumnos
Tubos de plástico (1.5 mL) bisturí	Jitomate
Equipo	Pétalos de clavel o bugambilia de color claro
Microscopio de campo claro	Sangre

Desarrollo

I. Manejo inicial del microscopio

Coloque el microscopio óptico de campo claro sobre la mesa de trabajo, de forma que sea de fácil acceso a todos los integrantes del equipo y no haya necesidad de moverlo constantemente. La base del microscopio debe permanecer a una distancia no menor de 10 cm del borde de la mesa, la cual deberá ser lisa, firme y no inclinada. Para una adecuada visualización de las muestras se requiere realizar la iluminación de Köhler:

Este procedimiento sólo puede hacerse en algunos microscopios, generalmente los anticuados.

1. Cerrar el diafragma del condensador (con la palanca colocada en el borde derecho del mismo).
2. Girar el tornillo del condensador para subir el portacondensador hasta el tope.
3. Encender la lámpara (mantener la luz tenue para evitar lastimar los ojos).
4. Enfocar con el tornillo macrométrico el filamento del foco y centrarlo, esto se logra moviendo las perillas laterales que están sobre el extremo posterior de la lámpara.
5. Cerrar el diafragma de la lámpara

6. Centrar el halo luminoso (en forma de hexágono) que se aprecia en el campo visual.
7. Abrir el diafragma hasta que aparezcan los bordes oscuros de éste.

NOTA: No se debe hacer girar el revólver tomando los objetivos, sino colocando la yema de los dedos pulgar e índice sobre el borde de la placa dentada circular del revólver en dirección de las manecillas del reloj.

Manejo y uso del microscopio óptico

1. Después de realizar la iluminación de forma correcta.
2. Colocar el objetivo de menor aumento (objetivo de 5x o 10x según sea el caso) en posición de empleo y bajar la platina completamente.
3. Colocar la preparación sobre la platina sujetándola con las pinzas metálicas.
4. Realizar el enfoque desde el tope de arriba y bajando para enfocar. Acercar al máximo la lente del objetivo a la preparación, empleando el tornillo macrométrico. Esto debe hacerse mirando directo a la preparación y no a través del ocular (se corre riesgo de golpear el objetivo con la preparación pudiendo dañar alguno de ellos o ambos).
5. Mirando a través de los oculares, separar lentamente el objetivo de la preparación con el tornillo macrométrico y, cuando se observe con nitidez la muestra, girar el tornillo micrométrico hasta obtener un enfoque fino.
6. Pasar al siguiente objetivo (objetivo de 20x o 40x según sea el caso). La imagen debería estar ya casi enfocada y suele ser suficiente con mover un poco el tornillo micrométrico para lograr el enfoque fino.

Empleo del objetivo de inmersión.

1. Bajar totalmente la platina, subir totalmente el condensador para ver claramente el círculo de luz que nos indica la zona que se va a visualizar y donde habrá que echar el aceite.
2. Girar el revólver hacia el objetivo de inmersión (100x) dejándolo a medio camino entre éste y el de 40x. Colocar una gota mínima de aceite de inmersión sobre el círculo de luz. Terminar de girar suavemente el revólver hasta la posición del objetivo de inmersión, es decir, la lente del objetivo deberá quedar inmersa en el aceite.
3. Subir la platina lentamente hasta que la lente toca la gota de aceite, enfocar cuidadosamente con el tornillo micrométrico.
4. Una vez finalizada la observación de la preparación se baja la platina y se coloca el objetivo de menor aumento girando el revólver. Al terminar absorba el aceite de la lente usando papel seda. En este momento ya se puede retirar la preparación de la platina. Nunca se debe retirar con el objetivo de inmersión en posición de observación.

NOTA: Una vez se haya puesto aceite de inmersión sobre la preparación, ya no se puede volver a usar el objetivo 40x sobre esa zona, pues se mancharía de aceite. Limpiar el objetivo de inmersión con cuidado empleando papel seda.

I. Preparaciones en fresco

Observación de pulpa de jitomate

1. Utilizando una navaja cortar a la mitad el jitomate.
2. Cortar un trozo de pulpa de jitomate de unos 2mm de grosor.
3. Depositarlo en el centro de un portaobjetos.
4. Colocar un cubreobjetos y aplastar suavemente con los dedos hasta obtener una capa muy fina del fragmento de pulpa de jitomate.
5. Colocar la preparación en la platina del microscopio y realizar la observación a 10X. Seleccionar un grupo de células que se aprecien bien y observar a 40X y 100X.
6. Dibujar las observaciones.

Observación de células de pétalos de clavel o bugambilia

1. Desprenda un fragmento de pétalo de clavel o bugambilia.
2. Deposítelo en un portaobjetos cuidando que quede completamente extendido.
3. Adicionar una gota de agua.
4. Colocar un cubreobjetos y observar al microscopio de campo claro.
5. Anote sus observaciones.

Observación de células de sangre

- A. Observación de eritrocitos.
1. Picar la yema del dedo meñique con una lanceta.
 2. Colocar una gota de sangre sobre un portaobjetos.
 3. Agregar una gota de solución de NaCl al 0.9%.
 4. Colocar el cubreobjetos.
 5. Observar al microscopio a 10X, 40X y 100X.
 6. Anotar sus observaciones.

NOTA: Evitar que la muestra se seque agregando, en caso necesario, una gota de NaCl al 0.9% por los bordes del cubreobjetos.

- B. Observación de leucocitos
1. En un tubo de 1.5 mL colocar 10 μ l de sangre o bien una gota con una pipeta pasteur.
 2. Adicionar 190 μ l de solución de ácido acético al 2% (dilución 1:20), mezclar muy bien y observar a 10X y 40X. Si no se tiene la micropipeta entonces adicionar 19 gotas con una pipeta pasteur.
 3. Anotar las diferencias entre estas células con las observadas en el punto A.

II. Preparaciones Fijas

Observación de células sanguíneas

1. Colocar una gota de sangre en un extremo de un portaobjetos libre de grasa.
2. Colocar otro portaobjetos en un ángulo de 45 tocando la gota de sangre (Figura 3).
3. Permitir que la sangre se extienda a lo largo del segundo portaobjetos, empuje la sangre hacia delante, después en un solo movimiento regrese el portaobjetos inclinado hasta el otro extremo del portaobjetos.
4. Permitir que el frotis seque a temperatura ambiente.
5. Colocar el frotis en posición horizontal sobre papel adsorbente (sanitas) y adicionar con una pipeta de pasteur cuidadosamente el colorante de Wright hasta cubrir totalmente la superficie del portaobjetos, evitando que el colorante se derrame por los bordes, dejar durante 5 minutos. Este proceso debe realizarse cerca de las tarjas que se encuentran en el laboratorio.
6. Sin eliminar el colorante concentrado, adicionar con una pipeta pasteur 2-3 volúmenes de agua destilada, mezclando el colorante con el agua. En este punto no importa que el colorante pudiera derramarse por los bordes del portaobjetos, sin embargo hay que ser cuidadosos para no mancharse las manos.
7. Dejar el colorante diluido en contacto con el frotis 10 minutos.
8. Lavar la preparación al chorro de agua durante un minuto y dejar secar a temperatura ambiente.
9. Observar al microscopio a 40X. Anotar sus observaciones.

NOTA: En esta preparación, las células fueron fijadas por lo que se pueden mantener por largo tiempo. Cuidadosamente con una cinta adhesiva fijar el portaobjetos sobre el frotis teñido (no es lo adecuado pero sirve para evitar rayar el frotis y con esto perder las células) y guardarlo para la práctica de los cinco reinos.

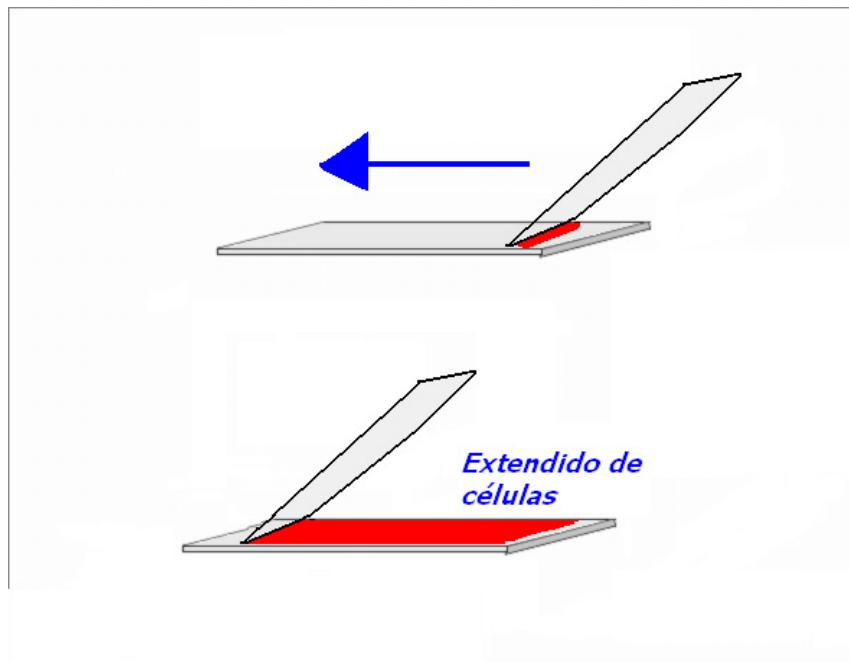


Figura 3. Frotis sanguíneo. Colocar una gota en el extremo del portaobjetos. Poner en contacto, en un ángulo de 45 grados, un portaobjetos limpio con la gota de sangre, de forma que ésta se extienda a todo lo largo del portaobjetos. En un movimiento rápido en dirección de la flecha extender la sangre tratando de formar una capa muy delgada de células

III. Mantenimiento y precauciones

1. Al finalizar el trabajo, hay que dejar puesto el objetivo de menor aumento en posición de observación.
2. Nunca hay que tocar las lentes con las manos. Si se ensucian, limpiarlas muy suavemente con papel seda.
3. No dejar el portaobjetos puesto sobre la platina si no se está utilizando el microscopio.
4. No forzar nunca los tornillos giratorios del microscopio (macrométrico, micrométrico, platina, revólver y condensador).
5. El cambio de objetivo se hace girando el revólver y dirigiendo siempre la mirada a la preparación para prevenir el roce de la lente con la muestra.
6. Mantener seca y limpia la platina del microscopio.




Resultados

- a) Esquematizar cada una de sus observaciones.
- b) Resaltar claramente las diferencias entre la observación en el microscopio de campo claro de preparaciones frescas y fijas.
- c) Al observar al microscopio la sangre del punto II se observará principalmente los eritrocitos teñidos de color rojo. Los leucocitos se identifican fácilmente por la presencia de núcleo, teñido de morado.

Cuestionario

- a) Mencionar los cuidados que se deben tener con el microscopio cuando se utiliza aceite de inmersión.
- b) Explicar las diferencias observadas cuando las preparaciones fueron frescas y cuando fueron fijadas.
- c) ¿Qué ventajas o desventajas piensa pueda tener el fijar o no las células?

Bibliografía

-  Anzaldúa Arce S., Tolosa Sánchez J. Manual de prácticas de histología veterinaria. 3ª edición. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2003.
-  Barrera Escorcía H., Cárdenas Reygadas R. El microscopio. Primera edición. Plaza y Valdés, S. A. de C. V. México, 1997.
-  Brown A. B. Hematology: Principles and Procedures. Sixth Edition. Philadelphia, 1993. p101

Células Animales y Vegetales

Introducción

El descubrimiento de las células y el papel que juegan en la formación de los tejidos animales y vegetales, fue posible a partir de la invención del microscopio, ya que su tamaño escapa al poder de resolución del ojo humano.

La Biología Celular aborda el estudio de la organización estructural y funcional de la célula, como unidad constituyente de los seres vivos. Los biólogos utilizan diversos instrumentos para lograr el conocimiento de las células. Obtienen información de sus formas, tamaños y componentes, que les sirve para comprender además las funciones que en ellas se realizan. Desde hace más de 300 años se inició la observación de las células a través del microscopio, conforme el paso del tiempo las técnicas y los aparatos se han perfeccionado. Debido al pequeño tamaño de las células, el uso del microscopio es de enorme valor en la investigación biológica. En la actualidad, los biólogos utilizan dos tipos básicos de microscopio: los ópticos y los electrónicos.

El microscopio óptico es un aparato capaz de modular la energía luminosa. Debido a sus lentes puede agrandar muchas veces la imagen de un objeto.

Fundamento

Los microscopios ópticos están constituidos de un sistema óptico que consta de dos lentes principales: una cercana a la preparación llamado **objetivo** y otra cercana al ojo del observador llamada **ocular**. El microscopio también cuenta con una **fente de luz** en su base, que envía los rayos luminosos a través de un condensador, esto sirve para concentrar la mayor cantidad de luz en un punto y la hace pasar a través de la preparación.

El microscopio de campo claro ha sido en esta área un instrumento de gran importancia en el estudio de las células. La mayoría de las células son incoloras, por lo que para poder ser observadas en el microscopio de campo claro, deben teñirse para facilitar su observación y poder diferenciar algunos organelos celulares.

Para el uso correcto del microscopio de campo claro es necesario realizar la iluminación de Köhler, técnica que consiste en centrar el haz de luz, alineando el condensador con respecto a los objetivos, su finalidad es obtener una iluminación óptima de la muestra. Los microscopios actuales ya presentan este tipo de iluminación.

El microscopio de contraste de fases (Figura 1) permite ver con bastante detalle y buen contraste, objetos muy transparentes que con la luz ordinaria son prácticamente invisibles, sirve también para detectar diferencias muy pequeñas de grosor y densidad del objeto sin necesidad de fijar o por teñir, de manera que se pueden observar células en su estado natural.

El principio de este microscopio se basa en que la luz transmitida tiene dos componentes que al interferir entre sí permiten que se logre una imagen muy contrastada; para lograr este efecto se requiere luz monocromática y estos microscopios requieren de un filtro de color verde colocado en el condensador para seleccionar una sola longitud de onda. El condensador cuenta además con un dispositivo para formar un cono de luz hueco en el centro, tiene un sistema óptico que descompone la luz en dos partes, una de ellas llega a una velocidad normal al ocular y la otra llega retrasada con un cuarto de longitud de onda respecto a la primera.

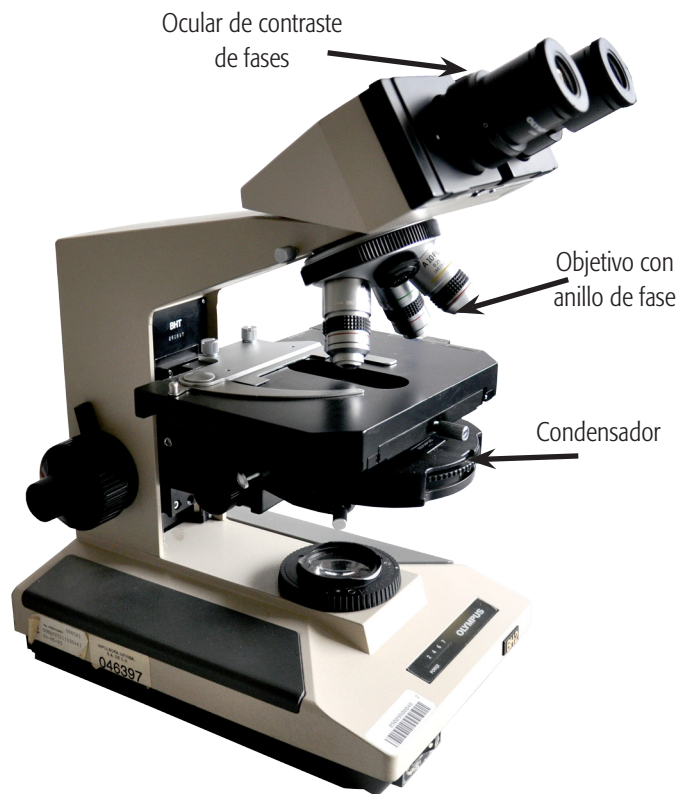


Figura 1. Microscopio de contraste de fases con su condensador.

Para lograr este retardo se requiere de un objetivo especial, que tiene grabado las letras Ph junto con un número que puede ser 1 o 2 según sea de 40X o de 100X. Para lograr este efecto de contraste es necesario centrar el anillo luminoso del condensador con el anillo de fase del objetivo y esto se logra por medio de unos tornillos laterales colocados en el portacondensador y con la ayuda de un ocular especial que se sustituye momentáneamente en el microscopio, llamado lente auxiliar (ocular de Amici_Bertrand), que sirve para poder observar y centrar los anillos, una vez centrados los anillos se vuelve a cambiar la lente auxiliar por el ocular normal para poder realizar la observación de la muestra.

Objetivos

- Conocer dos tipos de microscopio de luz: microscopio de campo claro y microscopio de contraste de fases.
- Identificar las partes de los dos tipos de microscopios, así como semejanzas y diferencias entre estos.
- Observar las diferencias entre una muestra visualizada en el microscopio de campo claro y el de contraste de fases.
- Observar las diferencias entre células animales y vegetales.

Material

Material por equipo	Reactivos
Portaobjetos	Etanol
Cubreobjetos	Cloruro de Sodio (NaCl)
Lanceta estéril	Aceite de inmersión
Piceta con agua destilada	Soluciones
Equipo	Solución isotónica de NaCl al 0.9%
Microscopio de campo claro	Azul de metileno al 0.2%
Microscopio de contraste de fases	Material Biológico proporcionado por los alumnos
Lente auxiliar	Pétalos de clavel o bugambilia de color claro
	Sangre

Desarrollo

Colocar el microscopio de campo claro y el de contraste de fases al mismo lado de la mesa a una distancia no mayor de 50 cm entre ellos y que permita que dos persona al mismo tiempo puedan hacer sus observaciones al microscopio.

Para el microscopio de contraste de fases es necesario realizar el ajuste correcto de la siguiente forma:

1. Realizar la iluminación de Kohler (ver nota)
2. Colocar el condensador en el número que se encuentra en rojo después de la inicial Ph en el objetivo que se vaya a utilizar:

Condensador	Objetivo
2	Ph 2 (40X)
3	Ph 3 (100X)

3. Cambiar un ocular por la lente auxiliar. Enfocar los dos círculos (anillo de fases y diafragma anular) separando las partes que componen la lente auxiliar.
4. Centrar los dos círculos, utilizando los tornillos situados en la parte frontal y lateral del condensador (Figura 2).
5. Apretar el tornillo lateral.
6. Retirar la lente auxiliar, colocar nuevamente el ocular y afinar el enfoque.
7. Cada vez que cambie el objetivo (10X, 40X y 100X) debe cambiar el condensador al número correspondiente. El objetivo de 10X no es para contraste de fases, por lo tanto cuando se use el condensador deberá estar en J (campo claro).



Figura 2. Condensador de fases, diferencia básica con el microscopio de campo claro.

NOTA: Iluminación de Kohler. Este procedimiento sólo puede hacerse en algunos microscopios, generalmente los anticuados.

Cerrar el diafragma del condensador (con la palanca colocada en el borde derecho del mismo). Girar el tornillo del condensador para subir el portacondensador hasta el tope. Encender la lámpara (mantener la luz tenue para evitar lastimar los ojos). Enfocar con el tornillo macrométrico el filamento del foco y centrarlo, esto se logra moviendo las perillas laterales que están sobre el extremo posterior de la lámpara. Cerrar el diafragma de la lámpara. Centrar el halo luminoso que se aprecia en el campo visual. Abrir el diafragma hasta que aparezcan los bordes oscuros de éste.

I. Observación de células epiteliales

1. Con dos hisopos raspar la superficie interna de la mejilla.
2. Frotarlos sobre dos portaobjetos perfectamente limpios.
3. En uno agregar una gota de azul de metileno al 0.2% (microscopio de campo claro).
4. En el segundo agregar una gota de solución de NaCl al 0.9% (microscopio de contraste de fases).
5. Colocar los cubreobjetos y observar en el microscopio respectivo con el objetivo de 10X, 40X y 100X.

II. Observación de células de pétalos de clavel o bugambilia

1. Desprender dos fragmentos de pétalos de clavel o bugambilia.
2. Depositarlos en dos portaobjetos cuidando que queden completamente extendidos.
3. A uno agregar una gota de azul de metileno al 0.2%.
4. Al otro adicionar una gota de agua.
5. Colocar ambos cubreobjetos sobre cada uno de los portaobjetos.
6. Observar el que se tiñó con colorante en el microscopio de campo claro.
7. El que tiene agua en el de contraste de fases, ambos con el objetivo de 10X y 40X.
8. Anotar sus observaciones.

III. Observación de células sanguíneas

1. Picar la yema del dedo meñique con una lanceta estéril.
2. Colocar una gota de sangre sobre un portaobjetos.
3. Agregar una gota de solución de NaCl al 0.9%.
4. Colocar el cubreobjetos.
5. Observe al microscopio a 10X, 40X y 100X (campo claro y contraste de fases).
6. Anotar sus observaciones.

NOTAS: a) cada vez que haga una observación con el objetivo de 100X, deberá colocar sobre el cubreobjetos de la preparación una pequeña gota de aceite de inmersión, es decir, la lente del objetivo deberá quedar inmersa en el aceite. Al terminar limpiar el aceite de la lente usando papel seda. b) Evitar que la muestra se seque agregando, en caso necesario, una gota de la solución correspondiente, por los bordes del cubreobjetos.




Resultados

- a) Esquematizar cada una de las observaciones.
- b) Resaltar las diferencias entre la observación en el microscopio de campo claro y el de contraste de fases.
- c) Destacar las diferencias entre la estructura de las células vegetales y células animales.

Cuestionario

- a) Describir las diferencias y semejanzas entre sus observaciones de células animales y células vegetales.
- b) De acuerdo con lo realizado en esta práctica, ¿Qué diferencias se observan al utilizar el microscopio de campo claro y el de contraste de fases?
- c) ¿Qué ventajas o desventajas puede mencionar al utilizar estos dos tipos de microscopio?

Bibliografía

-  Anzaldúa Arce S., Tolosa Sánchez J. Manual de prácticas de histología veterinaria. 3ª edición. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2003.
-  Barrera Escorcía H., Cárdenas Reygadas R. El microscopio. Primera edición. Plaza y Valdés, S. A. de C. V. México, 1997.
-  Ducolomb Y., Fierro R., González C., Ortiz R., Rodríguez E. Manual de prácticas de laboratorio de Biología celular. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México, 2012.

Aislamiento de ADN

Introducción

Desde hace más de cien años Gregor Mendel desarrollo reglas que trataban sobre los patrones de herencia que observó en plantas de guisante, él concluyo que la información hereditaria se transmitía en forma de unidades diferenciadas llamadas genes, los cuales consisten en secuencias de ADN (ácido desoxirribonucleico). El ADN contiene la información genética de la mayor parte de los organismos vivos (una excepción son algunos virus, denominados retrovirus, que utilizan el ARN o ácido ribonucleico para guardar su información genética).

El ADN. Está compuesto de nucleótidos (unidades monoméricas de los ácidos nucleicos), que a su vez están formados por bases nitrogenadas [adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T)], una molécula de azúcar de cinco átomos de carbono (desoxirribosa) que se une a una molécula de fosfato. Desde el punto de vista químico, el ADN es un polímero de nucleótidos, es decir, un polinucleótido. Lo que distingue a un nucleótido de otro es la base nitrogenada, por ello la secuencia del ADN se especifica nombrando la secuencia de sus bases. El ADN se presenta como una doble cadena de nucleótidos, en la que las dos hebras están unidas por puentes de hidrógeno. Una doble cadena de ADN mide de 22 a 26 angstroms (2,2 a 2,6 nanómetros) de ancho. Aunque cada unidad individual que se repite es muy pequeña, los polímeros de ADN pueden ser moléculas enormes que contienen millones de nucleótidos. Por ejemplo, el cromosoma humano más largo, el cromosoma número 1, tiene aproximadamente 220 millones de pares de bases. Las dos cadenas de ADN se enroscan sobre sí mismas formando una especie de escalera de caracol, denominada doble hélice.

El modelo de estructura en doble hélice fue propuesto en 1953 por James Watson y Francis Crick. La importancia de este modelo radicaba en su consistencia con las propiedades físicas y químicas del ADN. La conformación que adopta el ADN depende de su secuencia, la cantidad y dirección de superenrollamiento que presenta, la presencia de modificaciones químicas en las bases y las condiciones de la solución, tales como la concentración de iones de metales y poliaminas.

Fundamento

Se ha demostrado que existe una relación lineal entre el contenido en G+C y la densidad del ADN determinada en un gradiente de densidad. Es decir a mayor contenido en G+C mayor densidad posee el ADN. Por otro lado, la proporción A+T/C+G está relacionada con la estabilidad de la molécula de ADN de doble hélice. Cuanto mayor es el contenido en G+C mayor cantidad de calor se debe suministrar a un ADN de doble hélice para desnaturalizarlo. El estado físico de los ácidos nucleicos está relacionado con su capacidad de absorción de la luz ultravioleta (UV) a 2.600 Å. El menor grado de absorción se produce en estado de doble hélice, la absorción aumenta cuando se produce la desnaturalización pasando a estado de hélice sencilla, si degradamos este ADN de hélice sencilla a nivel de nucleótidos libres, de nuevo aumenta la absorbancia.

El ADN se puede obtener de cualquier célula que posea núcleo. Una gota de sangre, un trozo de hoja o un cabello aunque no tenga raíz. La extracción se realiza mediante la aplicación de diversas técnicas, en función de la calidad y cantidad de éste. Se requiere de romper la membrana plasmática para liberar el contenido de ADN de la célula.

Objetivos

- Utilizar las propiedades químicas de la molécula de ADN para aislarlo de las células.
- Determinar el espectro de absorción de esta macromolécula.

Material

Material por equipo	Reactivos
1 Vaso de precipitados de 100 mL	Tris
2 Tubos para centrifuga de 50 mL	Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
Micropipetas y puntas de diferente volumen	Cloruro de Sodio (NaCl)
Celdas para espectrofotómetro	Cloroformo-alcohol isoamílico, Etanol
1 Varilla de vidrio	Dodecil sulfato de Sodio (SDS)
2 Tubos de ensayo	Citrato de sodio
1 embudo de vidrio	Soluciones
1 Mortero	Tris/EDTA/NaCl (50mM:20mM: 0.3g)
2 pipeta de 10mL	Solución saturada de NaCl
1 pipeta de Pasteur	Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1)
	Solución salina de citratos (Citrato de sodio 0.15M, NaCl 0.15M)
	SDS al 10%
Equipo	Material proporcionado por los alumnos
Centrifuga	1 guayaba grande
Espectrofotómetro	1 paquete de gasas

Desarrollo

I. Obtención del ADN

1. Colocar 30 mL de etanol en un vaso de precipitados de 100 mL. Meter el vaso con el alcohol en un refrigerador para que esté frío cuando sea requerido.
2. Colocar 15 gr de guayaba en un mortero.
3. Adicionar 5.0 mL de la solución Tris/EDTA/NaCl (50mM:20mM: 0.3g).
4. Triturar durante 5 min.
5. Agregar 10 µL de una solución saturada de NaCl y 5 mL de SDS al 10%.
6. Continuar macerando durante 5 min más.
7. Filtrar el macerado a través de varias capas de gasa previamente colocadas en un embudo de vidrio, NO exprimir las gasas con el fin de obtener mayor volumen.
8. Recuperar el filtrado en un tubo de centrifuga de 50 mL.
9. Adicionar 15 mL de la mezcla cloroformo-alcohol isoamílico (24:1).
10. Tapar el tubo y agitar vigorosamente por 1 min.
11. Centrifugar a 4000 rpm durante 10 min.
12. Sacar el vaso con el etanol frío.
13. Con una pipeta Pasteur recuperar cuidadosamente el sobrenadante, evitando tocar el precipitado.
14. Verter el sobrenadante lentamente al vaso de precipitados que contiene los 30 mL de etanol frío.
15. Se observará la formación de hebras en el etanol.

II. Medición del Espectro de absorción del ADN

1. Con una varilla de vidrio recuperar estas hebras (ADN).
2. Dejar escurrir el etanol y colocar la varilla de vidrio en la cual se enrolló el ADN en un tubo de ensayo.
3. Adicionar al tubo, escurriendo por la varilla, 2 mL de la solución salina de citratos.
4. Preparar 1 mL de una dilución 1:10 con la solución salina de citratos.
5. Encender el espectrofotómetro y ajustar la longitud de onda a 200 nm.
6. Colocar en una celda para espectrofotómetro 1 mL de la solución salina de citratos. Esta solución será utilizada como blanco, es decir con este tubo ajustar el espectrofotómetro a una absorbancia de cero.
7. Hacer lecturas de absorbancia a intervalos de 10 nm hasta llegar a una longitud de onda de 350 nm.
8. Es importante recordar que cada vez que se cambie la longitud de onda se necesita ajustar a cero de absorbancia con el blanco.

Resultados







- a) Anotar en la tabla los valores de absorbancia.
- b) Elaborar una gráfica de longitud de onda (eje x) contra absorbancia (eje y), marcar el pico máximo de absorción del ADN que obtuvieron.

Longitud de Onda (nm)	Absorbancia
200	
210	
220	
230	
240	
250	
260	
270	
280	
290	
300	
310	
320	
330	
340	
350	

Cuestionario

- a) ¿Cuál fue la longitud de onda donde el ADN extraído de células de guayaba?
- b) ¿Describir la estructura de los nucleótidos que forman el ADN?

Bibliografía

-  Berg J. M., Stryer L., Tymoczko J. L. Bioquímica. 6ª edición. Editorial Reverté, España. 2008.
-  Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M. Principios de Bioquímica. 4ª edición. Editorial Omega, España. 2005.
-  Watson J., Crick F. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 171 (4356): 737–738.
-  Mandelkern M., Elias J., Eden D., Crothers D. (1981). The dimensions of DNA in solution. J Mol Biol 152 (1): 153–161.
-  Gregory S. (2006). The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. Nature 441 (7091): 315–321.
-  Huret J. L. ADN: Estructura molecular. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2006.

Extracción y separación de proteínas y lípidos

Introducción

Las proteínas y los lípidos son fundamentales, tanto para la estructura como para la función de las células. Los lípidos son compuestos orgánicos químicamente heterogéneos entre sí. Se puede definir como lípido a aquellos compuestos que son insolubles en agua, pero solubles en solventes orgánicos como el etanol, éter, acetona, etc. Lo cual indica la naturaleza no polar de los lípidos, esto debido a la presencia de las cadenas hidrocarbonadas en la estructura de estas moléculas. Los componentes principales de las membranas celulares son los fosfolípidos, que además de estar compuestos de una cadena hidrocarbonada apolar, presentan otros grupos con carga negativa.

Las proteínas son macromoléculas formadas por monómeros conocidos como aminoácidos. Las proteínas son las biomoléculas más abundantes en los seres vivos y las que presentan gran diversidad de funciones.

La yema que contiene el huevo tiene un peso aproximado de 10 g, contiene un 50% de agua, 17% de proteínas y 33% de lípidos; entre los cuáles los fosfolípidos (lípidos que contienen fósforo) representan un tercio de la masa lipídica y se componen esencialmente de lecitinas (70%) y cefalinas (25%).

Fundamento

En esta práctica se inicia al alumno en las técnicas de aislamiento de diferentes biomoléculas (proteínas y lípidos) a partir de materiales biológicos, lo cual es de especial interés en numerosos tipos de estudios bioquímicos. Además de la extracción de la proteína albúmina, se extraen y separan dos grupos de fosfolípidos: lecitinas y cefalinas.

Los compuestos químicos, de origen biológico, que son solubles en disolventes orgánicos (acetona, éter, cloroformo, etc.), se consideran como los componentes de la fracción lipídica. Dicha fracción, está formada por moléculas muy diversas, cuyas estructuras sólo tienen en común que son solubles en disolventes orgánicos, por lo tanto poco solubles o insolubles en agua.

La propiedad de solubilidad de los lípidos en compuestos orgánicos, se puede aprovechar como un método de extracción de éstos a partir de tejidos de origen animal o vegetal. Los disolventes más comunes para la extracción total de los lípidos son etanol, metanol, cloroformo, éter, éter de petróleo, hexano, o bien mezclas de ellos. La extracción se incrementa cuando estos disolventes están calientes.

Objetivos

- Extraer fosfolípidos y proteínas de la yema de huevo.
- Conocer las diferencias químicas de las proteínas y los lípidos, las cuales permiten aislarlos de la misma muestra.
- Obtener dichas biomoléculas por medio de su solubilidad en varios disolventes.

Material

Material por equipo

2 vasos de precipitados de 100 mL
 3 pipetas de 10 mL
 1 pipeta de 5 mL
 4 Tubos para centrifuga
 papel filtro
 1 probeta de 100 mL
 1 varilla de vidrio
 1 embudo de vidrio
 2 tubos de ensayo
 2 matraces erlenmeyer de 100 mL
 1 cristizador
 1 matraz erlenmeyer de 250 mL

Equipo

Parrilla de calentamiento
 Centrifuga

Reactivos

etanol
 Sulfato de Amonio anhidro $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
 PM 132.14 g/mol.
 éter
 acetona

Soluciones

Sulfato de amonio al 60% a pH 11

Material Biológico proporcionado por los alumnos

1 huevo
 2 frascos de 20 mL con tapa

Desarrollo

1. Pesar un vaso de precipitados de 50 mL y una probeta de 100 mL.
2. Hacer una pequeña perforación a un huevo de manera que permita la salida de la clara. Colocar la clara en la probeta, cuidar que la yema no se rompa.
3. Pesar la probeta con la clara para determinar su peso.
4. Romper el cascaron para colocar la yema en el vaso de precipitados de 50 mL previamente pesado.
5. Pesar el vaso de precipitados que contiene la yema para calcular el peso de ésta.

I. Extracción y separación de fosfolípidos (lecitina y cefalina)

1. Colocar el vaso de precipitados con la yema dentro de la campana de extracción. En caso de que no haya una en el área de trabajo abrir ventanas para permitir circule el aire.
2. Agregar al vaso de precipitados que contiene la yema de huevo, éter hasta cubrir totalmente la yema.
3. Agitar con una varilla de vidrio para homogenizar bien.
4. Agregar lentamente y sin dejar de agitar, un volumen de acetona igual al del éter.
5. Dejar en reposo 5 minutos. Mientras preparar un embudo de vidrio con papel filtro.
6. Filtrar, desechar el líquido que sale del embudo. La lecitina y cefalina se encuentran en el papel filtro.
7. Colocar un tubo de ensayo limpio abajo del tallo del embudo. Lavar el precipitado (papel filtro) con etanol frío.
8. El filtrado recibido en el tubo de ensayo es la lecitina, que es más soluble en el alcohol frío. En el papel filtro queda la cefalina.
9. Para obtener la lecitina, evaporar el etanol lentamente en baño maría.
10. Deje secar los precipitados y pesarlos.
11. Guardar los frascos con las muestras para la práctica de determinación de lípidos.

II. Aislamiento de proteínas de la clara de huevo (albúminas)

1. Pasar la clara que se encuentra en la probeta a un matraz de 250 mL.
2. Adicionar un volumen igual al de la clara de agua destilada, agitar con una varilla de vidrio.
3. Adicionar 30 mL de sulfato de amonio al 60%, mezclar perfectamente con una varilla de vidrio.
4. Permitir reposar 10 minutos colocar la mezcla de clara y sulfato en tubos para que centrifuga y centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos.
5. Separar el sobrenadante en un tubo y recuperar el precipitado.
6. Pesar el precipitado y guardarlo para la próxima práctica. Guardar 1 mL de sobrenadante también para la práctica de cuantificación.

Resultados

- a. Calcule la cantidad de lípidos obtenidos:
 $a = \text{peso en gramos del frasco}$
 $b = \text{peso del frasco con la muestra}$
 $\text{Lípidos} = b - a = \text{g de lípidos / peso en g de la yema}$
- b. Observe la muestra y especifique su aspecto
- c. Una vez seca la proteína pesarla.
- d. Elaborar la siguiente tabla:




Muestra	Cantidad obtenida (gr)
Cefalina	
Lecitina	
Proteínas	

NOTA: Guardar las 3 muestras para la práctica de cuantificación de proteínas y lípidos.

Cuestionario

- a) ¿Qué importancia biológica tienen los fosfolípidos?
- b) ¿Qué diferencia estructural existe entre las lecitinas y cefalinas?
- c) Investigar el contenido de lípidos y proteínas en el huevo de gallina.

Bibliografía

-  Goodsell D., Olson A. J. (1993). Soluble proteins: size, shape, and function. *Trens Biochem Sci.* 18: 65-68.
-  Hernández L. R. *Bioquímica Experimental*. Editorial Limusa. México, 1979.
-  Voet D, Voet J. *Bioquímica*. Ediciones Omega. España, 1992.

Cuantificación de lípidos y proteínas

Introducción

Determinar la concentración de proteínas en una muestra biológica, es una técnica de rutina básica cuando se aborda un esquema de purificación de una proteína concreta, cuando se quiere conocer la actividad específica de una enzima, en el diagnóstico de enfermedades o para cuantificar el contenido de una proteína de interés en un extracto biológico, entre otros propósitos.

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas, los cuales se basan en:

- Propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el UV.
- Formación de derivados químicos.
- Capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes.

En general, no hay método completamente satisfactorio para medir la concentración de proteínas en una muestra. La elección del método depende del tipo de proteína, de los otros componentes en la muestra, así como de la rapidez y sensibilidad deseada (Tabla 1).

Tabla 1. Principales métodos para la cuantificación de proteínas

Método	Ventajas	Desventajas
Métodos de Absorción		
<i>Ultra Violeta (UV)</i>	No se pierden las muestras	Interfieren varios compuestos que absorben en UV.
Métodos Colorimétricos		
<i>Biuret</i>	Muy específico para proteínas Poca interferencia Es barato	Tiene poca sensibilidad.
<i>Lowry</i>	Tiene mayor sensibilidad	No todas las proteínas reaccionan igual. Presenta interferencias con detergentes no iónicos, sulfato amónico etc.
<i>Bradford</i>	Muy sensible	Muestra interferencias con detergentes.
<i>Ácido Bicinconínico (BCA)</i>	Es el método más sensible Es el que muestra menos interferencias	
Métodos Fluorimétricos		
<i>o-ftalaldehído</i>	Muy sensible	La interferencia de aminas contaminantes en la muestra. No todas las proteínas reaccionan igual.

Fundamento

Método de Bradford

Se basa en la unión de un colorante, Comassie Blue G-250 a las proteínas. El colorante en solución ácida existe en dos formas, una azul y otra anaranjada. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este ensayo es muy reproducible y rápido, ya que el proceso de unión del colorante a la proteína se realiza en un tiempo no mayor de 2 minutos a temperatura ambiente. La estabilidad del color es de aproximadamente 1 hora. Este método es sensible (1-15 µg), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas.

En relación a los fosfolípidos, el método para la determinación cuantitativa de los fosfolípidos obtenidos de la yema de huevo, se basa en la determinación cuantitativa del fósforo presente en los fosfolípidos mediante el método modificado por Bartlett. Este método se basa en la reacción del fósforo inorgánico con el molibdato de amonio en disolución ácida para formar ácido fosfomolibdico. Posteriormente al adicionar un agente reductor, este reduce al molibdeno produciendo una coloración azul que puede ser medida en un espectrofotómetro.

Objetivos

- Realizar una curva patrón o estándar cada proteína y otra para lípidos.
- Determinar la concentración de fosfolípidos de la muestra problema.
- Determinar la concentración de proteínas de la muestra problema.

Material

Material por equipo

30 Tubos de ensayo 10 mL
 Celdas para espectrofotómetro
 5 pipetas graduadas de 1 mL
 5 pipetas graduadas de 5 mL
 10 tubos de ensayo
 1 gradilla
 vaso de precipitado de 1 litro
 Pro-pipeta
 Micropipetas (100 µL y 1000 µL)
 Puntas para micro pipetas
 Piceta con agua destilada
 Termómetro

Equipo

Espectrofotómetro
 Parrilla de calentamiento
 Pipeta con agua destilada

Material Biológico

Muestra de fosfolípidos (Lecitina y Cefalina), obtenidas en la práctica anterior.
 Muestra de proteínas obtenidas en la práctica anterior.

Reactivos

Éter
 Reactivo de Bradford
 Acetona

Soluciones

Patrón de albúmina de suero bovino (BSA) 0.5 mg/mL
 Muestra de proteína: diluciones 1:10 M1 y 1:20 M2
 H_2SO_4 ION
 ácido sulfúrico 10 N
 Molibdato de Amonio 6.6 % en H_2SO_4
 Sulfato Ferroso al 10 %
 Solución de NaCl al 0.15 M

Desarrollo

I. Determinación de fosfolípidos

1. Adicionar a la lecitina y cefalina, de la práctica de separación de fosfolípidos, 2 mL de éter y mezclar perfectamente.
2. Marcar dos tubos de ensayo con los números 5 y 6 (para la muestra de lecitina) y con los números 7 y 8 (para la muestra de cefalina).
3. Colocar 0.5 mL de cada muestra en el tubo correspondiente.
4. Colocar los cuatro tubos en un baño de agua caliente (aproximadamente 40 °C) para evaporar totalmente el éter.

NOTA: Es muy importante que antes de tomar cualquier volumen de H_2SO_4 las pipetas o cualquier material del vidrio que vaya a tener contacto con este ácido esté perfectamente seco para lo cual es necesario "darles un baño" con acetona.

5. Adicionar cuidadosamente resbalando por las paredes del tubo 0.5 mL de ácido sulfúrico 10 N.
6. Colocar los tubos en baño maría a aproximadamente 70 °C.
7. Incubar durante 20 minutos o bien hasta que la solución se observe transparente.
8. Mientras comenzar a preparar la curva patrón de fosfato de potasio (Punto II).
9. Retirar los tubos del baño maría, colocarlos en la gradilla para permitir que se enfríen.
10. Adicionar lentamente 2 mL de agua destilada.
11. Nuevamente colocar los tubos en el baño maría a 70 °C durante 10 minutos.

II. Identificación de fosfolípidos

1. Marcar cuatro tubos, recordar que los otros cuatro se están incubando en baño maría. Adicionar los reactivos indicados de acuerdo a la siguiente tabla:

Reactivo	Tubo							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	mL							
KH_2PO_4	0	0.1	0.2	0.4				
H_2O	1	0.9	0.8	0.6				
H_2SO_4	0.25	0.25	0.25	0.25				
Lecitina					1.0	1.0		
Cefalina							1.0	1.0

1. Los tubos 5-8 serán preparados una vez concluido el punto I.
2. Ya con los 8 tubos preparados de acuerdo a la tabla, proceder a adicionar 1 mL de molibdato de amonio a todos los tubos y agitar.
3. Añadir 1 mL de sulfato ferroso, agitar y permitir incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Mientras encender el espectrofotómetro y ajustar la longitud de onda a 660 nm.
5. Al terminar los 10 minutos leer la absorbencia de cada tubo.
6. Anotar sus resultados en la tabla de resultados.

III. Cuantificación de Proteínas

Preparación de la Muestra

De la muestra de Albúmina obtenida en la práctica anterior, tomar la cantidad necesaria para tener una dilución de 1:10 y 1:20. Es decir, se toman 0.1 mL de la solución de albúmina y se agregan 0.9 mL de NaCl al 0.15 M (dilución 1:10).

Para determinar la concentración de proteínas de la muestra problema, se construye una curva patrón o de calibrado a partir de una solución patrón de albúmina sérica bovina (BSA) (0.5 mg/mL). La concentración que tienen las muestras problema se determina por interpolación de los valores de absorbancia en la curva patrón. El tubo número 0, que contiene agua destilada y los reactivos, sirve de blanco para el ajuste del espectrofotómetro a cero de absorbancia. De esta forma sólo se mide el color producido por las proteínas, puesto que se resta el color debido a los reactivos.

Método de Bradford

- Marcar seis tubos y su duplicado, añadir las cantidades indicadas en la tabla 2 y agitar.
- Añadir 5 mL del reactivo de Bradford a todos los tubos preparados como se indica en la Tabla 2 y agitar.
- Dejar a temperatura ambiente 5 minutos y leer Absorbancia a 595 nm (A_{595}) ajustando a cero con el tubo blanco. El color es estable 1 hora.










Tabla 2. Protocolo tipo para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Tubos	REACTIVOS			RESULTADOS	
	BSA (0.5mg/mL)	NaCl 0.15 M	Reactivo Bradford	A_{595} nm	[proteína]
Blanco	0 μ l	500 μ l	5 mL		
1	25 μ l	475 μ l	5 mL		
2	50 μ l	450 μ l	5 mL		
3	75 μ l	425 μ l	5 mL		
4	100 μ l	400 μ l	5 mL		
M1 (1:10)	-	500 μ l	5 mL		
M2 (1:20)	-	500 μ l	5 mL		

Resultados

- a) Realizar una curva estándar y determinar la concentración de fosfolípidos y de proteínas.
- b) Graficar cada una de las curvas.
NOTA: Debe ajustar la escala matemáticamente si es necesario.
- c) Calcular la concentración de la muestra problema.
- d) Comparar los resultados que obtuvo en las concentraciones de proteínas por interpolación como por la Ley de Lambert y Beer.
- e) Comparar los resultados que obtuvo en las concentraciones de proteínas y lípidos y verificar si corresponde a lo esperado en teoría.

Bibliografía

-  Bartlett G. R. (1959). Colorimetric Assay Methods for Free and Phosphorylated Glyceric Acids. *J. Biol. Chem.* 234:469-471.
-  Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
-  Bucio L., González E., Cortés E., Konigsberg M., Bonilla H., Souza V. Manual de Bioquímica II. 1ª impresión. Editado por la Universidad Autónoma Metropolitana. México, 2009.
-  Clark J. M. Bioquímica Experimental. Editorial Acribia. España, 1966.
-  Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85.
-  Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
-  Martin D. W., Mayes P. A., Rodwell V. W. Harper's Review of Biochemistry. 18ª Ed. Langer Medical Publication, USA., 1981. pp20-21
-  Suelter C. H. A Practical guide to enzymology. Editorial, John Wiley & Sons, New York, 1985.
-  Voet D. Voet J. Bioquímica. Ediciones Omega. España., 1992. pp. 81-82.

Identificación Cualitativa de Carbohidratos

Introducción

Los carbohidratos o hidratos de carbono constituyen compuestos químicos formados principalmente por carbono, hidrógeno y oxígeno, elementos que se conjugan para formar diversos tipos. Por su estructura química son aldehídos polihidroxilados o cetonas polihidroxiladas. Los carbohidratos están ampliamente distribuidos tanto en tejidos animales como vegetales.

Los carbohidratos pueden ser monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Los disacáridos y los polisacáridos se pueden hidrolizar para producir monosacáridos. **Los monosacáridos** son los azúcares más sencillos, son compuestos químicos que dependiendo del número de carbonos se clasifican como triosas, tetrosas, pentosas, hexosas y heptosas. Los más importantes biológicamente son los que tienen 3, 5 y 6 átomos de C. Estos contienen un grupo aldehído (aldosas) o cetona (cetosas) y nos son hidrolizables, todos son reductores. Es decir, el carbono anomérico se encuentra libre. Entre los principales monosacáridos se encuentra la **glucosa** (azúcar en el cual se convierten todos los demás carbohidratos antes de ser oxidados en el organismo) y la **fructosa** (se produce junto con la glucosa durante la degradación de la sacarosa).

Entre los principales **oligosacáridos** se encuentran los disacáridos que son dos moléculas de monosacáridos unidas por un átomo de oxígeno, con la consiguiente eliminación de una molécula de agua. Los más importantes son la **sacarosa** (glucosa-fructosa), la **lactosa** (glucosa-galactosa) y la **maltosa** (glucosa-glucosa).

Los **polisacáridos** son enormes cadenas formadas por uno o varios tipos de monosacáridos. La **celulosa** (componente principal de la pared celular de los vegetales) y **almidón** (reserva en las plantas) está formado por unidades de glucosa combinadas entre sí, por uniones glicosídicas.

Fundamento

Existen diferentes pruebas que permiten identificar el tipo de carbohidratos presente en una muestra. En particular los azúcares que dan resultados positivos con las soluciones de Benedict ó Fehling se conocen como azúcares reductores. Los carbohidratos que no dan pruebas positivas con estas soluciones se llaman azúcares no reductores.

La **reacción de Fehling** se basa en el carácter reductor de los monosacáridos, en esta el Cu^{++} reacciona con los carbohidratos reductores. En este caso se oxidará dando lugar a la reducción del sulfato de cobre (II), de color azul, a óxido de cobre (I) de color rojo-anaranjado. La **reacción de Bial** permite reconocer pentosas (carbohidratos de 5 carbonos) y sustancias que las contengan. Se basa en la formación de un compuesto furfúrico que se condensa con la orcina del reactivo.

Todos los carbohidratos al entrar en contacto con ácido sulfúrico concentrado se deshidratan formando compuestos furfúricos (las pentosas dan furfural y las hexosas dan hidroximetilfurfural). Estos compuestos furfúricos reaccionan positivamente con el **reactivo de Molish** (solución alcohólica de alfa-naftol). La **reacción del Lugol** (disolución de yodo y yoduro potásico) se utiliza para identificar polisacáridos. El color que dan los polisacáridos con el lugol se debe a que el yodo ocupa espacios vacíos en las hélices de la cadena de unidades de glucosa. Esta unión del yodo a la cadena es reversible, y por calentamiento desaparece el color, que al enfriarse reaparece. El lugol da con el almidón color azul y con el glucógeno color rojo caoba.

Objetivos

- Utilizar diferentes reacciones para identificar los distintos tipos de carbohidratos en muestras problema.
- Identificar el tipo de carbohidrato de acuerdo a la detección cualitativa de diferentes muestras.
- Realizar la hidrólisis del enlace glicosídico de un disacárido.

Material

Material por equipo	Reactivos
Tubos de ensaye	Ácido sulfúrico concentrado
Puntas para micropipetas	Bicarbonato de sodio
1 Vaso de pp de 250 ml	Ácido clorhídrico concentrado
1 Espátula	Soluciones
Gradilla	NaOH al 5%
Micropipetas	Hidróxido de amonio 5%
3 pipetas pasteur	Reactivo A de Fehling
Piceta con agua destilada	Reactivo B de Fehling
1 Pinzas para tubo de ensaye	Reactivo de Benedict
1 Matraz Erlenmeyer 125 ml	Reactivo de Seliwanoff
	Reactivo de Barfoed
	HCl al 10%
	Lugol
	Reactivo de Bial

Equipo	
Parrilla de calentamiento mechero de bousen	
Muestras de carbohidratos	
Glucosa al 1%	Ribosa al 1%
Lactosa al 1%	Sacarosa al 1%
Fructosa al 1%	Caseína 1% (o alguna otra proteína)
Almidón (1mg/mL)	

Desarrollo

Proporcionar a los alumnos muestras de diferentes carbohidratos etiquetados con números de 1-7 (el profesor deberá conocer cuál muestra: carbohidrato y proteína corresponde a cada número). Con estas muestras problema realizar cada una de las siguientes reacciones de carbohidratos.

I. Reacción de Fehling (Identifica carbohidratos reductores)

- Colocar en un tubo de ensayo 500 μL de solución A y 500 μL de solución B del reactivo de Fehling.
- A este tubo se le agregan 100 μL de la muestra problema.
- Colocar en baño maría a ebullición durante 3 minutos y dejar enfriar.
- La formación de precipitado rojo, con decoloración de la solución indica prueba positiva.

NOTA: La reacción será positiva (indicando la presencia de azúcares como: glucosa, maltosa y lactosa) si la muestra se vuelve de color rojo-ladrillo. La reacción será negativa si la muestra queda azul, o cambia a un tono azul-verdoso.

II. Reacción de Barfoed (diferencia entre un monosacárido y un disacárido)

- Colocar en un tubo 750 μL del reactivo de Barfoed.
- Adiciona 250 μL de la muestra problema.

- c) Colocar el tubo en baño maría.
- d) Anotar el tiempo que tarda en aparecer un precipitado rojo de óxido cuproso.

III. Reacción de Bial (Prueba positiva para pentosas)

- a) En un tubo de ensayo colocar 250 μL del reactivo de Bial con mucho cuidado.
- b) Agregar 250 μL de la muestra problema.
- c) Calentar los tubos en baño maría hasta que se inicie la ebullición.
- d) Agitar los tubos, dejar reposar durante 5 minutos.
- e) Observar.

IV. Reacción de Seliwanoff (Diferencia entre aldosas y cetosas)

- a) Colocar en un tubo de ensayo 200 μL de la muestra problema.
- b) Adicionar 100 μL del reactivo de Seliwanoff y calentar a baño de ebullición 1 minuto.
- c) Anotar los resultados y continuar calentando y observando cambios de color a intervalos de 1 minuto durante 5 minutos.
- d) Las cetosas dan coloración rojo intenso y las aldosas muy débil y más lentamente.

V. Reacción de Lugol (Identificación de polisacáridos)

- a) Colocar en un tubo de ensayo 200 μL de solución cada muestra problema.
- b) Adicionar de 2 gotas de lugol.
- c) Anotar el color producido en cada uno de los tubos.
- d) Si la disolución del tubo de ensayo se torna de color azul-violeta, la reacción es positiva.

VI. Prueba de Benedict (Identificación de monosacáridos)

- a) Colocar en un tubo de ensayo 200 μL del reactivo de Benedict.
- b) 100 μL de la solución del azúcar.
- c) Caliente a ebullición y deje enfriar a temperatura ambiente.
- d) Un precipitado cuya coloración varía desde amarillo hasta rojo, con decoloración de la solución, indica prueba positiva.

NOTA: La solución de Benedict se utiliza en la determinación cuantitativa de glucosa en la sangre.

VII. Hidrólisis de Carbohidratos (opcional)

I. Hidrólisis de Sacarosa

- a) Colocar una muestra de sacarosa en un tubo.
- b) Añadir con una pipeta pasteur 10 gotas de ácido clorhídrico al 10%.
- c) Calentar a la llama del mechero durante 2 minutos.
- d) Dejar enfriar y neutralizar con bicarbonato.
- e) Realizar la Prueba de Fehling, observar el resultado.

NOTA: La reacción positiva indica que se rompió el enlace O-glicosídico de la sacarosa. Se recomienda antes de aplicar la reacción de Fehling, neutralizar con bicarbonato.

Resultados

a) Anote los resultados de sus observaciones en las siguientes tablas:

TABLA 1. Resultados de las pruebas positivas para cada una de las muestras

Muestra	Reacción					
	Fehling	Benedict	Barfoed	Bial	Seliwanoff	Lugol
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						

b) De acuerdo al tipo de reacción que dio positiva en cada una de las muestras, coloque el número que considere corresponde a cada uno de las muestras problema.

Tabla 2. Identificación del tipo de carbohidrato





Muestra	Número de muestra que considera le corresponde
Sacarosa	
Fructosa	
Almidón	
Ribosa	
Glucosa	
Proteína	
Lactosa	

c) De acuerdo a los resultados de hidrólisis de carbohidratos, concluir si se llevó a cabo la hidrólisis de las muestras:

Tabla 3. Hidrólisis de disacáridos.

Muestra hidrolizada	Fehling	Benedict	¿Se realizó la hidrólisis?	Productos de hidrólisis
Sacarosa				

Bibliografía

-  Hernández L. R. Bioquímica Experimental. Editorial Limusa. México, 1979.
-  Jacobs T. L., Truce W. E., Ross G. R. Laboratory Practice of Organic Chemistry 5ª. Ed. MacMillan Pub. Co. Inc. USA, 1974.
-  Hudlicky M. Laboratory Experiments in Organic Chemistry 3ª. Ed. Avery Publishing Group Inc. USA, 1985.
-  Domínguez, X. A. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. México, 1973.

Hidrólisis de almidón: Actividad de la amilasa

Introducción

Cuando doce o más monosacáridos se encuentran unidos mediante enlaces glicosídicos, el producto que resulta de esta unión es un polisacárido. Los polisacáridos sirven como elementos estructurales y de almacenaje de energía y carbono tanto en plantas como en animales. El almidón es la principal fuente de carbohidratos de reserva de las plantas. Las plantas verdes producen almidón como producto final de la fotosíntesis, los cereales (trigo, arroz, maíz y sorgo) contienen alto contenido de almidón en sus semillas.

El almidón es un homopolisacárido de reserva o almacenamiento, formado por dos tipos de estructuras: la amilosa y la amilopectina. La amilosa es un polímero lineal que tiene enlaces glicosídicos α (1 \rightarrow 4), con un extremo no reductor y uno reductor, es decir que tiene su carbono anomérico libre. La amilopectina es un polisacárido ramificado formado por cadenas cortas de glucosa unidas por enlaces α (1 \rightarrow 4) y presenta ramificaciones en las que se presenta una unión de la ramificación con la cadena lineal α (1 \rightarrow 6) cada 30 residuos de glucosa.

El almidón puede ser hidrolizado en un medio ácido o bien por acción de las enzimas amilasas y desramificadoras. La α -amilasa presente en animales y plantas, la β -amilasa presente en tubérculos y semillas de algunas plantas. Tanto la α -amilasa como la β -amilasa; ambas hidrolizan la amilosa en los enlaces α (1 \rightarrow 4), pero lo hacen de forma diferente, la α -amilasa rompe de manera aleatoria y la acción de la β -amilasa es más ordenada.

Fundamento

La enzima α amilasa hidroliza la cadena lineal de la amilosa rompiendo los enlaces α (1 \rightarrow 4) al azar a lo largo de la cadena para producir una mezcla de glucosa y maltosa (disacárido formado por dos glucosas unidas). La β -amilasa es una enzima encontrada en las plantas, rompe la molécula de amilosa en el extremo no reductor para producir moléculas de maltosa. Por otro lado, la amilopectina también es hidrolizada por estas dos enzimas, pero los enlaces glicosídicos α (1 \rightarrow 4) cercanos al punto de ramificación de la amilopectina y el mismo enlace α (1 \rightarrow 6) no son hidrolizados por ellas. Esta función la realiza una enzima desramificante, la α (1 \rightarrow 6) glucosidasa, hidroliza el enlace en el punto de ramificación. Finalmente, la acción combinada de la α -amilasa y la α (1 \rightarrow 6) glucosidasa hidrolizaran a la amilopectina hasta una mezcla de glucosa y maltosa. La **reacción del Lugol** (disolución de yodo y yoduro potásico) se utiliza para identificar polisacáridos. El color que dan los polisacáridos con el lugol se debe a que el iodo ocupa espacios vacíos en las hélices de la cadena de unidades de glucosa. Esta unión del iodo a la cadena es reversible, y por calentamiento desaparece el color, que al enfriarse reaparece. El lugol da con el almidón color azul y con el glucógeno color rojo caoba.

Objetivos

- Comprobar que las semillas en germinación producen amilasa.
- Determinar la hidrólisis del almidón por la acción enzimática de la amilasa.

Material

Material por equipo

Porta objetos
 Espatula
 Cubreobjetos
 Termómetro
 2 pipetas de 5 mL
 1 pipeta de 1 mL
 1 pipeta de 0.5 mL
 Cajas de petri de 5 cm
 Mechero
 Matraz erlenmeyer de 1000 mL
 3 tubos de ensayo
 Vaso de precipitado de 100 mL, 50 ml
 Piceta con agua destilada
 Pinzas de disección

Reactivos

Agar-agar
 Lugol
 Ácido clorhídrico

Soluciones

Almidón al 1%
 Azul de metileno al 0.2%
 Hipoclorito de sodio (clorox o cloralex) [1%]

Equipo

Olla de presión o autoclave
 Estufa incubadora
 Potenciómetro

Material Biológico proporcionado por los alumnos

Almidón
 Semillas del maíz

Desarrollo

I. Inducción de la síntesis de amilasa

En esta parte de la práctica es suficiente con la participación de un miembro de cada uno de los equipos.

1. Una semana antes de la realización de la práctica es necesario poner las semillas de maíz a germinar.
2. Seleccionar 15 semillas de maíz de acuerdo a sus características de tamaño y color. Se realizan tres grupos - grp. I corresponde a semillas con 5 días de germinación, grp. II corresponde a semillas con 3 días de germinación y grp. III: semillas sin germinación.
3. Colocar 15 semillas en un vaso de precipitados de 50 mL y cubrirlas totalmente con hipoclorito de sodio al 1% durante 5 minutos. Con esto se desinfectan las semillas.
4. Lavar las semillas con agua estéril para eliminar totalmente el cloro.
5. Colocar 1 semilla sobre una hoja de papel adsorbente (sanitas), enrollar la semilla y colocar otra semilla y enrollarla nuevamente.
6. Realizar este proceso hasta colocar en una sanita 5 semillas. Enrollar papel aluminio sobre "el taco" del papel que contiene las semillas de tal forma que los extremos puedan abrirse para poder humedecer las semillas.
7. Adicionar agua a las semillas diariamente sólo humedeciendo el papel adsorbente en el cuál se encuentran envueltas (grupo I).
8. Realizar el mismo proceso 3 días antes de la práctica con otras 5 semillas (grupo II).
9. Guardar las 5 semillas que restan, que fueron seleccionadas al principio, como control de semillas sin germinar (grupo III).

II. Preparación el sustrato de la amilasa (almidón)

1. Una semana antes de la práctica preparar gel de agar-almidón.
2. Pesar 2 gr de almidón, 20 gr de agar-agar y disolverlos en 1000 mL de agua destilada, ajustar a pH 7.2.
3. Esterilizar en autoclave (olla de presión) durante 30 minutos.
4. Esperar a que disminuya la temperatura.
5. Repartir en placas de Petri estériles de 5 cm, se requieren 3 placas por equipo. Las placas pueden guardarse en el refrigerador hasta su uso.

NOTA: El proceso de esterilización puede hacerse en un horno de microondas dando pulsos de 3 minutos durante un tiempo total de 15 minutos.

III. Hidrólisis de almidón

1. Un día antes de la práctica tomar las semillas del grupo I.
2. Seleccionar tres de ellas.
3. Cortar a la mitad las semillas.
4. Poner una de las mitades de cada semilla sobre una placa de almidón, alineadas al centro de la caja de petri.
5. Hacer lo mismo para las semillas del grupo II y grupo III (se guardaron de la semana anterior).
6. Colocar las cajas de petri con las semillas en una estufa a 25 °c o bien puede dejarse a temperatura ambiente.

IV. Evaluación cualitativa de la actividad enzimática de la amilasa

1. El día de la práctica retirar las mitades de las semillas de la placa de almidón.
2. Cubrir totalmente la placa con lugol. Esperar 5 minutos y retirar el lugol.
3. Observar lo sucedido en cada placa.

V. Hidrólisis no enzimática del almidón



1. Colocar en un tubo de ensayo 3 mL de almidón al 1%.
2. Adicionar 1 mL de lugol. Observar que sucede.
3. Calentar el tubo aproximadamente a 70 °C dejar enfriar y observar lo sucedido.
4. Colocar en un vaso de precipitados de 50 mL, 10 mL de almidón al 1%. Adicionar cuidadosamente y dentro de la campana de extracción, 1 mL de HCL concentrado. Poner el vaso en un baño de agua a una temperatura aproximada de 100 °C. A los 5 minutos tomar 0.5 mL del almidón que se encuentra en el baño de agua, colocarlos en un tubo de ensayo.
5. Repetir este proceso cada 5 minutos durante media hora. Cuando estén listos 6 tubos dejar enfriar y adicionar dos gotas de lugol.
6. Anotar sus observaciones.

NOTA: Alternativamente puede realizarse el método de Benedict (práctica de identificación cualitativa de carbohidratos).

Resultados

- a) Observar la presencia de un halo transparente en el sitio dónde se encontraban las semillas.
- b) Medir el diametro de los halos que indican la hidrólisis del almidón mediante la amilasa.
- c) El tamaño del halo es proporcional a la cantidad de amilasa que se produce en las semillas de maíz a diferentes tiempos de germinación.
- d) Indicar la coloración de los tubos conforme transcurrió el tiempo de hidrólisis no enzimática.

Bibliografía

-  Horton R., Moran L., Scrigueur K., Perry M., Rawn D. Principios de Bioquímica. 4ª edición. Editorial Pearson Educación. México, 2008.
-  Melo V., Cuamatzi O. Bioquímica de los procesos metabólicos. 2ª edición. Editorial Reverté. México, 2008.

Actividad catalítica de la Tirosinasa

Introducción

Las enzimas son catalizadores macromoleculares con la propiedad característica de acelerar y regular una variedad de reacciones químicas sobre las cuales se basan todas las formas de vida. La actividad metabólica de las células depende de que las enzimas actúen en forma ordenada y progresiva, en algunos casos las enzimas actúan en cooperación, elaborando un sustrato sobre el cual la enzima actúa. Estos mecanismos aseguran la continuidad en las rutas metabólicas, ejemplifican no sólo la especificidad de la reacción enzimática catalizada, si no también el número de enzimas que deben intervenir en el funcionamiento y la preservación del organismo.

El pardeamiento enzimático es una reacción de oxidación en la que interviene como sustrato el oxígeno molecular, es catalizada por un tipo de enzima que se puede encontrar en todos los seres vivos. La enzima responsable de este proceso recibe el nombre de polifenoloxidasas, fenolasa o tirosinasa; es una enzima cuprífera presente en tejidos de plantas y animales, en el hombre es la responsable de la formación de pigmentos del pelo y de la piel. En los cefalópodos produce el pigmento de la tinta, y en los artrópodos participa en el endurecimiento de las cutículas del caparazón al formar quinonas que reaccionan con las proteínas. En los vegetales, es la enzima que produce el ennegrecimiento de diferentes frutas como las manzanas, peras, duraznos, ciruelas, uvas, aguacates y papas, así como en diferentes especies de hongos. Las tirosinasas de diferentes especies son distintas en términos de sus propiedades estructurales, distribución de tejido y ubicación celular. Las enzimas encontradas en plantas, animales y tejidos de hongos frecuentemente difieren respecto a su estructura primaria, tamaño, patrón de glicosilación y características de activación. Sin embargo, todas las tirosinasas tienen en común un centro de cobre en su sitio activo.

Fundamento

La polifenoloxidasas tiene dos actividades enzimáticas, una hidroxilando monofenoles (cresolasa) y otra oxidando difenoles a quinonas (catecolasa). Dependiendo de la fuente, la actividad cresolasa es mayor o menor e incluso inexistente en algunos casos. Sin embargo, la enzima siempre tiene actividad de catecolasa. La tirosinasa lleva a cabo la oxidación de fenoles como la tirosina y el catecol usando dioxígeno (O_2). En presencia de catecol, se forma benzoquinona. Los hidrógenos extraídos del catecol se combinan con el oxígeno para formar agua.

Reacción de pardeamiento enzimático

El pardeamiento enzimático es un conjunto complejo de reacciones, La reacción se inicia cuando el sustrato presente es un monofenol, que es transformado en difenol. La segunda reacción, es la transformación del difenol en quinona. En el caso de la tirosina (monofenol) se forma primeramente la DOPA (difenol) y luego la dopaquinona (quinona). A partir de la formación de la quinona, la reacción progresa de forma espontánea. Las quinonas se pueden convertir en trifenoles y posteriormente se oxidan a hidroxiquinonas. Todas estas sustancias son muy reactivas, dando lugar a la formación de polímeros que reaccionan con otras sustancias presentes en el alimento, especialmente proteínas. Los productos finales, llamados melaninas, son de color oscuro, o negro, e insolubles en agua. Estos polímeros tienen propiedades antimicrobianas, por lo que podrían ser un mecanismo de defensa de los vegetales contra infecciones.

La tirosina es el sustrato principal de la polifenoloxidasas en los crustáceos, y en vegetales como la lechuga y los champiñones. En los vegetales, el sustrato más importante es el ácido clorogénico, donde el grupo fenólico está unido a un azúcar y se encuentra en manzanas, peras, ciruelas, uvas, aguacates y papas. En algunos vegetales se encuentran DOPA, dopamina, p-cresol, ácido cafeico y otros fenoles.

Objetivos

- Preparación del extracto de Champiñón y/o Manzana.
- Determinar el efecto de la concentración de la enzima sobre la actividad enzimática.
- Evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.
- Determinar el efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad enzimática.

Material

Material de Laboratorio por equipo

1 Mortero	10 Celdas de 1 cm (ml)
5 Tubos de ensaye	3 Pipetas de 5, 1 y 0,1 mL
1 Gradilla	Homogenizador
1 Matraz kitasato	Termómetro
1 Embudo de Buchner	Micropipetas (20, 100 y 1000 μ L)
2 Probetas (una de 100 y 50 mL)	Baño de hielo
Vasos de precipitado (100, 500 mL)	Cronómetro
Pipetas pasteur de plástico	Papel de filtro
Tubos de centrifuga 50 mL	Parrilla de calentamiento

Material Proporcionado por el alumno

<i>Material biológico</i>	Rotulador para vidrio
10g de Champiñones	Guantes de látex
10g de Manzana	Toallas de papel

Equipo

	Soluciones
	Manzana
Centrifuga	Fosfato de sodio 100 mM, pH 7.2 (Amortiguador-1)
Espectrofotómetro	Fosfato de sodio 100 mM, pH 6.0 (Amortiguador-2)
	L-DOPA (dihidroxifenilalanina) 20 mM (sustrato)
Balanza Granatária	
	Fosfato de sodio 50 mM, pH = 7
Potenciómetro	L-DOPA 3 mM
Vórtex	
Baño de agua	

Desarrollo

I. Extracción de la enzima

La extracción de la enzima se realiza mediante la fragmentación del material biológico y posterior centrifugación.

1. Aislamiento de la enzima tirosinasa de manzana.
 - a) Colocar 10 g de manzana en un mortero previamente enfriado en hielo.
 - b) Agregar 50 ml de amortiguador de fosfato de sodio 0.1M, pH 7.2 frío y triturar cuidadosamente la manzana hasta que la mezcla adquiera una consistencia pastosa.
 - c) Filtrar al vacío en un embudo de Büchner conectado a un kitasato, humedecer el papel de filtro con amortiguador para que se adhiera perfectamente en el embudo.
 - d) Centrifugar a 3500 rpm. durante 5 minutos a 4 °C.
 - e) Recuperar el sobrenadante, fuente de la enzima y colocarlo rápidamente en un baño de hielo.

NOTA: El extracto tiene un color marrón oscuro característico, que se vuelve más oscuro con el paso del tiempo.

2. Aislamiento de la enzima tirosinasa de champiñón

- En un mortero previamente frío, se trituran 10 g de champiñón durante 10 minutos.
- Añadir 30 mL de amortiguador de fosfato de sodio 50 mM pH 7.0 y homogenizar durante 10 minutos.
- Filtrar al vacío en un embudo de Büchner conectado a un matraz kitasato. Humedecer el papel filtro con amortiguador para que se adhiera perfectamente al embudo.
- Centrifugar la mezcla a 10,000 X g durante 20 minutos.
- Recuperar el sobrenadante y colocar rápidamente en un baño de hielo (el sobrenadante es la fuente de enzima, almacenar a 4° C).

II. Cuantificación de la actividad enzimática

La actividad de la tirosinasa puede ser determinada colorimétricamente midiendo el aumento de Absorbancia a 475 nm debido a la conversión de la DOPA en DOPA-cromo (color rojo).

1. Efecto de la cantidad de enzima:

- Etiquetar y adicionar a una serie de cuatro tubos los siguientes reactivos (ml):

TUBO	1	2	3	4
Amortiguador - 1	1.5	1.4	1.3	1.1
Dopa 20 mM/3 mM	1.5	1.5	1.5	1.5
Extracto de tirosinasa*	-	0.1	0.2	0.4

***Importante:** El amortiguador de fosfato y el de L-dopa pueden mezclarse con anticipación. Sin embargo, la tirosinasa debe adicionarse al final cuando todo esté preparado para leer en el espectrofotómetro.

- Traspasar el contenido del tubo 1 a una celda para espectrofotómetro. Ajustar a cero de absorbancia a la longitud de onda de 475 nm. Sacar la celda y devolver su contenido al tubo 1 por si fuera necesario ajustar el cero de nuevo.
- Añadir el volumen indicado de tirosinasa al tubo 2. Agitar, (tiempo 0 de reacción) y verter el contenido del tubo a la celda. Introducir la celda en el espectrofotómetro lo más rápido posible y anotar la absorbancia a los 30 y 90 segundos de iniciada la reacción. La diferencia entre las dos lecturas coincidirá con el incremento de absorbancia/minuto (Abs/min).

NOTA: Comenzar a cronometrar rápidamente. Medir la absorbancia a 475 nm, inclusive sin sacar el tubo del espectrofotómetro.

- Devolver el contenido de la celda al tubo 2, y operar de la misma forma con los tubos 3 y 4. Con los valores calculados, representar la velocidad de aparición de dopacromo frente a la cantidad de enzima.

NOTA: Dejar a temperatura ambiente los tubos con las mezclas de reacción hasta el final de la sesión. Observar entonces la aparición de pigmentos melánicos insolubles.

2. Efecto de la concentración

- Pipetear en un tubo del espectrofotómetro: 0.2 mL de extracto 2.8 mL de amortiguador de fosfato de sodio 0.1M, pH 6.0. La reacción se inicia al agregar 1 mL de DOPA 20 mM (en el caso del champiñón es 3 mM).

3. Efecto de la temperatura.

- Pipetear 2 ml del extracto en un tubo de ensayo.
- Calentar en un baño de agua a 50 y 100 °C durante 10 minutos.
- Enfriar y pipetear en un tubo de ensayo las siguientes cantidades:

0,4 ml del extracto	2,6 ml de amrtiguador - 2	1 ml de DOPA
---------------------	---------------------------	--------------

- Medir la actividad enzimática como en el apartado anterior.

4. Efecto de la concentración de sustrato

Repetir el experimento usando 0,4 ml del extracto enzimático y variando la concentración de DOPA (5 concentraciones distintas). Medir la absorbancia cada 2 minutos durante 10 minutos.

	A	B	C	D	E
Extracto (ml)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Amortiguador 2(ml)	2.6	2.1	1.6	1.1	0.6
DOPA (ml)	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0

Resultados

1. Efecto de la Concentración de la Enzima.

a. Completar la siguiente tabla con valores de absorbancia a 475 nm obtenidos en los tiempos indicados.

Tiempo (min)	Concentración extracto			Temperatura		
	0.2 mL	0.4 mL	0.6 mL	25 °C	50 °C	100 °C
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

b. Elaborar una grafica que represente la absorbancia en función del tiempo.

2. Efecto de la concentración del sustrato.

a. Hacer una tabla con los valores de las absorbancias a 475 nm obtenidos en los diferentes tiempos indicados.









Tiempo (min)	Concentración Sustrato				
	1.0 mL	1.5 mL	2.0 mL	2.5 mL	3.0 mL
2					
4					
6					
8					
10					

3. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.

a. Representar los valores de actividad frente a la temperatura de ensayo. Indicar el valor de temperatura óptima.

En todos los casos estudiados, dar una respuesta razonada por qué de las variaciones de la velocidad de la reacción (actividad enzimática) observadas cuando cambiamos la cantidad de extracto añadido, pH, temperatura y concentración de sustrato.

Bibliografía

-  Bohinski R. C. Bioquímica. 5ª edición. Addison Wesley Iberoamericana. EUA, 1991.
-  Flurkey W. H., Ingebritsen J. (1989). Polyphenol oxidase activity and enzymatic browning in mushrooms, in Quality Factors of Fruits and Vegetables: Chemistry and Technology (Jen, J.J., ed.) American Chemical Society. Washington, 44-54.
-  Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M. Principios de Bioquímica. Ediciones Omega. Barcelona, 1993.
-  Lehninger A. L. Bioquímica. Ediciones Omega. España, 1980.
-  Marshall M. R., Kim J., Wei C. I. (2000). Enzymatic Browning in Fruits, Vegetables and Seafoods. FAO.
-  Nicolas J. J., Richard-Forget F. C., Goupy P. M., Amiot M. J., Aubert S. Y. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple product. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 34, 109-158.
-  Rendina G. Técnicas de Bioquímica Aplicada. Nueva Editorial Interamericana, S.A., México.
-  Voet D., Voet J. G. Bioquímica. Editorial Omega. Barcelona, España. 1992

Coacervados

Introducción

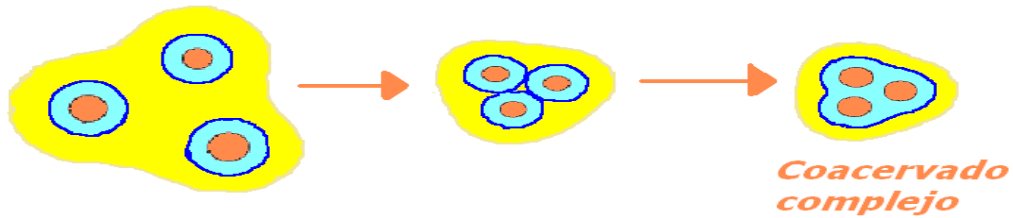
Muchas teorías modernas del origen de la vida aún toman las ideas de Oparin como punto de partida. Oparin propone una teoría quimiosintética en la que una "sopa primitiva" de moléculas orgánicas se pudo haber generado en una atmósfera sin oxígeno a través de la acción de la luz solar. Éstas se combinarían de una forma cada vez más compleja hasta quedar disueltas en una gotita de coacervado. Estas gotitas crecerían por fusión con otras y se reproducirían mediante fisión en gotitas hijas, y de ese modo podrían haber obtenido un metabolismo primitivo en el que estos factores asegurarían la supervivencia de la "integridad celular" de aquellas que no acabaran extinguiéndose.

Los coacervados son estructuras esféricas constituidas por una membrana que rodea un interior acuoso que puede estar formado por ciertos coloides o mezclas de coloides. Fueron sugeridos como un modelo del citoplasma por el químico holandés, B. de Jong, quien demostró que mezclando dos soluciones diluidas de compuestos de alto peso molecular, como proteínas y carbohidratos, se podían obtener gotitas microscópicas donde las macromoléculas tendían a agregarse como resultado de cargas eléctricas opuestas. Oparin estudió las propiedades de los coacervados, proponiéndolos como un modelo de evolución prebiológica. Demostró, que en diversos tipos de coacervados, formados a partir de sustancias como proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y otras más, ocurrían una serie de procesos físicos y de reacciones químicas de relativa complejidad. Demostró que en el interior de un coacervado pueden ocurrir reacciones químicas que llevan a la formación de polímeros, debido a que un coacervado está cambiando materia y energía con el medio ambiente.

Actualmente se ha demostrado que algunos coacervados tienen la tendencia a incluir en su interior enzimas que pueden catalizar ciertas reacciones cuando el sustrato adecuado es añadido al medio externo. El crecimiento y división de los coacervados cuando llegan a cierto tamaño también proporciona un modelo simple de división celular.

Fundamento

Debido a que los coacervados se pueden formar aun en soluciones extremadamente diluidas, y que una vez formados pueden seguir aumentando de tamaño hasta alcanzar estados de equilibrio con la matriz líquida, es posible estudiar en ellos procesos abióticos de crecimiento. A menudo ocurre que los coacervados crecen tanto que se vuelven inestables, rompiéndose en gotitas más pequeñas las cuales, a su vez, pueden ir aumentando de tamaño al absorber moléculas presentes en la mezcla de las mencionadas soluciones. No todos los coacervados que se forman en una misma solución son idénticos, sino que presentan diferencias importantes en su estructura interna; más aún, dentro de un mismo coacervado ocurren procesos de diferenciación, ya que las moléculas que los forman tienden a distribuirse en forma desigual en su interior, como los ácidos nucleicos, en tanto que otros compuestos más sencillos como los azúcares y los mononucleótidos se distribuyen en forma más o menos homogénea.



Objetivos

- Desarrollar en el laboratorio un modelo de coacervado.
- Observar su comportamiento a diferentes condiciones de pH, así como su división.

Material

MATERIAL	EQUIPO
1 Tubo de ensayo	1 microscopio
2 pipetas de 5 mL	Pro-pipeta
3 Portaobjetos	Vórtex
3 cubreobjetos	Parrilla
Baño maría	Papel pH
SOLUCIONES	Gotero o pipeta Pasteur
Grenetina (solución al 1%)	Goma arábica (solución 6.7%)
Solución de HCl al 0.1M	Azul de metileno

Desarrollo

1. En un tubo de ensayo mezclar 5 mL de la solución de grenetina, añadir 3 ml de solución de goma arábica, mezclar vigorosamente y medir el pH de la solución con el papel pH.
2. Colocar una gota de la preparación sobre un portaobjeto y observar al microscopio. Esquematiza tus observaciones.
3. A la mezcla anterior, agrega lentamente 4 o 2 gotas de HCl agitando continuamente hasta que la mezcla se ponga turbia y medir el pH.

4. Realizar una preparación y observar al microscopio. Esquematizar tus observaciones.

Nota si se hace turbia la solución colócala en baño maría unos minutos y mide el pH.

5. Al tubo anterior, adicionar una gota de azul de metileno, agitar vigorosamente y observar al microscopio.







Resultados

- a) Esquematizar la primera observación (al mezclar de soluciones de gelatina y goma arábica).
- b) Dibujar la segunda observación, cuándo la solución se torna turbia al adicionar HCl 0.1M.
- c) Esquematizar la última fase de observación, cuándo la solución se torna transparente al adicionar el HCl 0.1M.

Cuestionario

- ¿A qué pH se formaron los coacervados, explica el efecto del pH para su formación?
- ¿El azul de metileno penetra al coacervado?, ¿a que se debe esto?, explica.
- ¿Por qué se emplean grenetina y goma arábica?
- ¿Qué semejanza observaron entre los agregados moleculares y las células vivas?
- Investigue qué otros modelos pre-celulares se han propuesto.
- Anota las condiciones de la atmósfera primitiva de la tierra, que pudieron contribuir a la formación de compuestos orgánicos.

Bibliografía

-  Alberts B., Watson, J., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. Biología Molecular de la Célula. 3ª Edición. Ediciones Omega S.A. Barcelona, 1996.
-  Lazcano A., Stanley L., Miller. (1996). The Origin and Early Evolution Review of Life: Prebiotic Chemistry, the Pre-RNA World, and Time. Cell, 85: 793–798.
-  De Robertis E., Hib J. Fundamentos de Biología celular y molecular. Editorial El Ateneo. 1998.
-  Dyson F. J. Los orígenes de la vida. Cambridge University Press, 1999.
-  Karp G. Biología celular y molecular. Interamericana. McGraw-Hill. México, 2009.
-  Martin M. H., Jack W S. (2004). Replicating vesicles as models of primitive cell growth and division. Curr. Opin. Chem. Biol., 8:660-664.

Identificación morfológica de células representativas de los cinco reinos

Introducción

Las células se pueden dividir en dos grupos: células procariotas y eucariotas. Los dos tipos celulares comparten algunas características como son: código genético, enzimas y membranas plasmáticas que son muy semejantes.

Lynn Margulis propuso que los organelos de las células eucariotas, principalmente mitocondria y cloroplasto, evolucionaron de pequeñas células procariotas que se integraron al citoplasma de células huésped. Esto se conoce como la teoría endosimbiótica. Clasificar a los organismos vivos en dos categorías, procariota y eucariota, muestra diferencias básicas en la estructura de ambas células, sin embargo no refleja una relación evolutiva de los mismos.

Inicialmente Carlos Linneo dividió a los organismos en tres reinos: mineral, vegetal y animal. En el año 1866, Ernst Haeckel incluye a los organismos microscópicos unicelulares en un nuevo reino: el de los Protistas. Posteriormente, en 1969, Whittaker propone una clasificación de los seres vivos en cinco reinos, en los cuáles los organismos procariotas fueron incluidos en el reino Monera y los eucariotas en los cuatro reinos restantes.

Finalmente el sistema de clasificación ampliamente aceptado en la actualidad por la comunidad científica, fue propuesto por Carl Woese y colaboradores los cuáles realizaron estudios de evolución molecular. Sus investigaciones apoyan la teoría de que los procariotas pudieron dividirse en dos linajes relacionados. En 1989 se elaboró un árbol filogenético actualizado que muestra tres dominios.

- Dominio ARCHAEA o Arquea (arqueobacterias): son procariotas con membrana plasmática atípica.
- Dominio BACTERIA (eubacterias): son las bacterias, procariotas con pared celular de peptidoglicano o mureína como componente principal.
- Dominio EUCARYIA o eucariota: organismos eucariotas, es decir, formados por células que tienen el material genético formando un núcleo delimitado por una envoltura nuclear.

Cada dominio puede dividirse en uno o más reinos (tabla 1). Dentro de estos dominios, gracias a los avances de la ciencia que permitió aportar nuevos conocimientos, se propone el sistema de los 5 reinos: animalia (metazoos), plantae (vegetales), fungi (hongos superiores), protista o protoctista (protozoos, algas eucariotas y hongos inferiores) y monera (bacterias y algas procariotas) (Figura 1).



Figura 1. Cinco reinos en los que encuentran divididos los seres vivos actualmente.

En la siguiente tabla se presentan los tres dominios en los que actualmente se clasifican a los seres vivos, los reinos que se incluyen en cada uno de estos dominios; del mismo modo se mencionan solamente algunas características representativas de cada uno de los reinos y finalmente algunos ejemplos de organismos incluidos en alguno de los cinco reinos.

Dominio	Reino	Algunas características	Ejemplos
Arquea	Monera	Organismos unicelulares formados de células procarionotas.	Arqueobacterias, Bacterias
Bacteria	Protoctista	Organismos simples, mayoritariamente unicelulares, formados por células eucariotas,	Algas, protozoarios
Eucariota	Fungi (hongos)	Organismos unicelulares o multicelulares formados por células eucariotas. Presentan pared celular.	Hongos, Levaduras
	Plantas (Plantae, Metafita)	Organismos multicelulares formados de células eucariotas. Las células están organizadas en tejidos y tienen pared celular formada de celulosa. Son organismos heterótrofos, es decir fabrican sus propios nutrimentos, los cuales se obtienen por fotosíntesis.	Árboles, plantas con flores, musgos, helechos.
	Animal (Animalia)	Organismos multicelulares formados de células eucariotas. Las células están organizadas en tejidos y no presentan pared celular. Son organismos heterótrofos, es decir que obtienen los nutrimentos principalmente por ingestión.	Moluscos, peces, aves, insectos y vertebrados.

Objetivos

- Entender la necesidad de clasificar a los seres vivos de acuerdo a ciertas características y similitudes.
- Señalar las características generales de los reinos monera, protoctista, fungi, Plantae y animalia.
- Identificar las diferencias morfológicas de algunas células para ser incluidas en alguno de los cinco reinos.

Material

Material por equipo	Soluciones
Mechero bunsen	Solución isotónica de NaCl al 0.9%
1 caja pétri	Azul de metileno al 1% y 0.2 %
Piceta con agua destilada	
5 pipeta Pasteur	
Cubreobjetos	
Portaobjetos	
Equipo	Material Biológico proporcionado por los alumnos
Microscopio de campo claro	Yogurt natural
	Yakutl
	1 sobre de Levadura (preferente tradi-pan)
	Hojas de Elodea
	Clavel
	Agua estancada (ver punto II, preparar 2 días previos a la práctica).

Desarrollo

I. Observación de Lactobacilos (Reino Monera)

1. Con una pipeta Pasteur colocar una gota de agua destilada en un extremo de un portaobjetos perfectamente limpio.
2. Colocar una gota de yogurt con una pipeta Pasteur de tal forma que se mezcle con la gota de agua destilada, que se había colocado previamente en el portaobjetos. Mezclar cuidadosamente.
3. Extender la mezcla con la ayuda de otro portaobjetos.
4. Para fijar la preparación es necesario sujetar el portaobjetos por uno de sus extremos y pasarlo cuidadosamente a través de la llama de un mechero para permitir que seque. Es importante que el lado dónde se colocaron las células quede en el lado opuesto a la flama y que el calor no sea excesivo.
5. Coloca el portaobjetos en una cámara de tinción, cubrir totalmente el portaobjetos que contiene la muestra con azul de metileno durante 5 minutos.
6. Desechar el colorante y para eliminar el exceso lavar la preparación con agua destilada. Eliminar el exceso de agua y dejar secar al aire.
7. Colocar un cubreobjetos y con papel adsorbente secar la parte de abajo de la preparación. Colocar la preparación en la platina del microscopio y hacer observaciones a 10X, 40X y 100X.
8. Esquematizar y anotar las observaciones.

NOTA: para la caja de tinción se puede utilizar un recipiente de plástico sobre el cuál se colocan dos varillas de vidrio de forma paralela una con otra con una separación de 5 centímetros. Colocar los portaobjetos de forma transversal sobre las dos varillas.

II. Observación de protozoarios (Reino protocista)

1. Para llevar a cabo la observación de protozoarios es necesario preparar dos materiales distintos con al menos 48 horas de antelación.
2. En dos frascos perfectamente limpios colocar el volumen equivalente a una tasa de agua de la llave. En uno de los frascos colocar una cucharada (cafetera) de granos de trigo. En el otro frasco colocar una cucharadita (cafetera) de tierra de jardín o bien puede ser de una maceta.
3. Dejar los dos frascos destapados al menos dos días antes de realizar la práctica.
4. Colocar una gota del agua donde se encuentran las semillas de trigo sobre un portaobjetos perfectamente limpio. Colocar el cubre objetos y observar al microscopio a 10X, 40X y 100X.
5. Anotar y esquematizar sus observaciones.
6. En otro portaobjetos limpio colocar una gota de agua del frasco con tierra. Colocar el cubre objetos y observar al microscopio a 10X, 40X y 100X.
7. Anotar y esquematizar sus observaciones.

Preparaciones fijas de protozoarios

1. Colocar una gota del agua donde se encuentran las semillas de trigo o la tierra sobre un portaobjetos perfectamente limpio.
2. Sujetar el portaobjetos por uno de sus extremos y pasarlo cuidadosamente a través de la llama de un mechero para permitir que seque. Verificar que el lado dónde se colocaron las células quede en el lado opuesto a la flama y que el calor no sea excesivo.
3. Colocar el portaobjetos en una cámara de tinción, cubrir totalmente el portaobjetos que contiene la muestra con azul de metileno durante 5 minutos.

4. Desechar el colorante y para eliminar el exceso lavar la preparación con agua destilada. Eliminar el exceso de agua y dejar secar al aire.
5. Colocar un cubreobjetos y con papel adsorbente secar la parte de abajo de la preparación. Colocar la preparación en la platina del microscopio y hacer observaciones a 10X, 40X y 100X.
6. Esquematizar y anotar las observaciones.

III. Observación de células de Levaduras (Reino fungi)

1. Colocar 2 mL de agua destilada en un tubo de ensayo.
2. Pesar 100 mg de levadura y adicionarlos al tubo con agua. Cubrir el tubo de ensayo con parafilm y agitar vigorosamente para lograr una suspensión celular.
3. Sobre un portaobjetos perfectamente limpio y seco, colocar con una pipeta pasteur una gota de la suspensión de levaduras en el extremo del portaobjetos.
4. Extender con la ayuda de otro portaobjetos la suspensión celular (Figura 2).
5. Sujetar el portaobjetos por uno de sus extremos y pasarlo cuidadosamente a través de la llama de un mechero para permitir que seque. Verificar que el lado dónde se colocaron las células quede en el lado opuesto a la flama y que el calor no sea excesivo.
6. Colocar el portaobjetos en una cámara de tinción, cubrir totalmente el portaobjetos que contiene la muestra con azul de metileno durante 5 minutos.
7. Desechar el colorante y para eliminar el exceso lavar la preparación con agua destilada. Eliminar el exceso de agua y dejar secar al aire.
8. Colocar un cubreobjetos y con papel adsorbente secar la parte de abajo de la preparación. Colocar la preparación en la platina del microscopio y hacer observaciones a 10X, 40X y 100X.
9. Anotar y esquematizar las observaciones.

IV. Observación de células de vegetales (Reino Plantae)

1. Colocar sobre un portaobjetos limpio una hoja de Elodia y adicionar una gota de agua destilada.
2. Colocar un cubreobjetos y con papel adsorbente secar la parte de abajo de la preparación. Colocar la preparación en la platina del microscopio y hacer observaciones a 10X, 40X y 100X.
3. Anotar y esquematizar las observaciones.
4. Repetir los pasos 1 a 3 para un pequeño fragmento de pétalo de clavel.





V. Observación de células animales (Reino Animalia)

1. Puede utilizarse el frotis de sangre teñido con colorante de wright de la práctica de manejo del microscopio ya que ahí es posible distinguir diferentes tipos de células animales. O bien observar células de la mucosa bucal.
2. Con un hisopo raspar la superficie interna de la mejilla.
3. Frotar el hisopo sobre un portaobjetos perfectamente limpio.
4. Agregar una gota de azul de metileno al 0.2%.
5. Colocar el cubreobjetos y observar en el microscopio con el objetivo de 10X, 40X y 100X.
6. Anotar sus observaciones.

Resultados

Anotar y esquematizar los resultados de sus observaciones.

Bibliografía

-  Karp G. *Biología celular y Molecular*. 5ª edición. Editorial Mc Graw Hill. China, 2009.
-  Whittaker R.H. (1969). New concepts of kingdoms of organisms. *Science* 163: pp. 150–160.
-  Woese C.R., Balch W.E., Magrum L.J., Fox G.E., Wolfe R.S. (1977). An ancient divergence among the bacteria. *J. Molecular Evolution* 9: 305–311.
-  Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L. (1990). Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (12): 4576-4579.

Función de los peroxisomas: Actividad enzimática de las peroxidasas

Introducción

Los peroxisomas son organelos encontrados en células eucariotas, tienen forma generalmente esférica y diámetro de 0.2 a 1.5 μm . Están delimitados por una sola membrana, en cuyo interior se encuentra una matriz densa de naturaleza proteica. Se descubrieron a partir de células de riñón de ratón. Los peroxisomas se encuentran en abundancia en diferentes tejidos animales, su composición enzimática y en consecuencia su fisiología, son diferentes según el tejido donde se encuentran. En particular, la constitución enzimática de los peroxisomas vegetales es más variada que la de los animales, ya que además de oxidasas contienen aminotransferasas que participan en el ciclo glioxílico (glioxisomas) entre otras enzimas.

De manera general, estos organelos están implicados con funciones oxidativas, es decir se presentan reacciones de oxidoreducción muy diversas. Se caracterizan por dos tipos de enzimas: las oxidasas flavínicas, que consumen O_2 y las peroxidasas, estas últimas destruyen el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido por las primeras, o bien lo utilizan en reacciones de oxidación de compuestos como alcoholes o ácidos.

Específicamente, la peroxidasa es una hemoproteína con actividad enzimática que cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno.



Particularmente la peroxidasa de rábano (HRP) es una enzima muy utilizada en diferentes determinaciones. Tiene un peso de 40 kDa y su pH óptimo de acción se encuentra entre 5 y 7.

Fundamento

Las peroxidasas utilizan como sustrato compuestos con grupos fenólicos que, con ayuda del H_2O_2 , son oxidados. La determinación de su actividad enzimática se puede llevar a cabo de manera relativamente sencilla y es posible cuantificarla utilizando como sustrato guayacol. Esta molécula tiene una estructura parecida a la de los sustratos endógenos. Existen otros sustratos para la peroxidasa, sustratos cromogénicos, los cuales son ampliamente utilizados y proporcionan un método de detección sencillo; cuando la enzima reacciona con estos sustratos, los últimos son transformados en productos coloridos que precipitan sobre la membrana y esto permite visualizar directamente la actividad de la enzima. Otros sustratos utilizados para medir la actividad de la peroxidasa son: el 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (TMB), el tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) y el 4-cloro-1-naftol (4-CN). Estos sustratos son potencialmente dañinos, sin embargo, existe una alternativa que es el 2,2'-ácido azino-bis (3 etilbenzotiazolina-6-sulfónico ac (ABTS), este producto no contiene componentes dañinos y permite observar una reacción colorida que depende de la actividad de la peroxidasa (Figura 1).

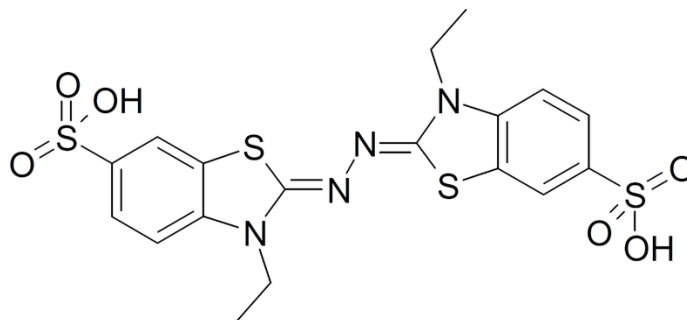


Figura 1. Estructura del ABTS. Esta molécula tiene un peso molecular de 514.62 g/mol. Cuando reacciona con la peroxidasa de rábano (HPR) produce un color verde.

Objetivos

- Medir la actividad enzimática de las peroxidasas de células vegetales.
- Evaluar la actividad enzimática de las peroxidasas en función del tiempo.
- Determinar el efecto de la temperatura en la actividad de la peroxidasa.
- Evaluar cualitativamente el efecto de la temperatura en la actividad enzimática.

Material

Material por equipo

Homogenizador o mortero pequeño
 2 Tubos para centrifuga
 Micropipetas y puntas de diferente volumen
 2 vasos de precipitado 2.5 ml
 1 probeta 100 ml
 Pipeta 1ml
 Pipeta de 5 ml
 Propipeta
 Espatula
 Celdas para espectrofotómetro
 3 Tubos de ensayo
 1 Caja de Petri
 Pinzas de disección
 1 vidrio de reloj

Equipo

Centrifuga
 Espectrofotómetro
 Parrilla de calentamiento
 1 Termómetro
 1 vortex

Reactivos

Fosfato de sodio monobásico
 Fosfato de sodio dibásico anhidro

Soluciones

Amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 6.6
 Amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.6
 Amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 8.5

Material proporcionado por los alumnos

Peróxido de hidrógeno
 3 Rábanos de cambray frescos
 Guayacol (ampolleta de solución inyectable de 100 mg de Guayacol)
 Una hoja para bisturí nueva o cortador de precisión ("cutter")
 1 hoja de bisturí

Desarrollo

I. Obtención de la enzima

1. Cortar 1 gr de rábano sin cáscara.
2. En un homogenizador o mortero pequeño macerar el tejido con 5.0 mL del amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 6.6 frío.
3. Colocar el macerado en un tubo de centrifuga. Recordar que es muy importante equilibrar con un tubo con agua.
4. Centrifugar durante 20 minutos, si es posible a 4°C, a 4000 rpm.
5. Tomar el sobrenadante y colocarlo en un tubo de ensayo, guardar en hielo.

NOTA: Mientras transcurre este tiempo preparar el siguiente punto.

II. Medición de la actividad enzimática

1. Encender el espectrofotómetro y ajustar la longitud de onda a 475 nm.
2. Colocar en una celda para espectrofotómetro 1 mL del amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 6.6. Esta solución será utilizada como blanco, es decir con este tubo ajustar el espectrofotómetro a una absorbancia de cero.
3. Adicionar a un tubo de ensayo 4.5 mL del amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 6.6, 5 mL de la solución de guayacol y 50 μ L del extracto enzimático (sobrenadante). Agitar en vórtex.
4. Colocar esta mezcla en una celda para espectrofotómetro.
5. Adicionar 50 μ L de peróxido de hidrógeno al 3 %. Mezclar rápidamente y leer inmediatamente la absorbancia. Este es el tiempo cero.
6. Medir durante 5 minutos la absorbancia anotando los valores registrados cada 30 segundos.

III. Efecto del pH en la actividad enzimática

1. Colocar en una celda para espectrofotómetro 1 ml del amortiguador de fosfatos 50 mm a pH 8.5. Esta solución será utilizada como blanco, es decir con este tubo ajustar el espectrofotómetro a una absorbancia de cero.
2. Adicionar a un tubo de ensayo 4.5 mL del amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 8.5, 5 μ L de la solución de guayacol y 50 μ L del extracto enzimático (sobrenadante). Agitar en vórtex.
3. Colocar esta mezcla en una celda para espectrofotómetro.
4. Adicionar 50 μ L de peróxido de hidrógeno al 3 %. Mezclar rápidamente y leer inmediatamente la absorbancia. Este es el tiempo cero.
5. Medir durante 5 minutos la absorbancia anotando los valores registrados cada 20 segundos.

IV. Efecto de la temperatura en la actividad de la peroxidasa.

1. Cortar tres cuadros del rábano sin cáscara de aproximadamente 1 cm por lado y con un grosor de aproximadamente 0.5 cm, ser cuidadosos con la navaja.
2. Adicionar en 3 tubos de ensayo 2.5 mL del amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 6.6.
3. Colocar a cada uno de los tubos un cuadro del rábano.
4. Colocar un tubo de ensayo con el amortiguador y el rábano en un vaso de precipitados con agua a 40 °C durante 5 minutos.
5. Poner otro tubo en baño de hielo durante 5 minutos, anotar la temperatura.
6. Dejar el otro tubo a temperatura ambiente durante 5 minutos.
7. Transcurrido el tiempo sacar con unas pinzas los cuadros de rábano y colocarlos sobre una caja de petri, cuidar que quede bien identificadas cada una de las muestras. Cortar con mucho cuidado un fragmento muy delgado de cada uno de los cuadros de rábano (si se pretende realizar el siguiente punto).
8. Adicionar cuidadosamente a cada una de las muestras de rábano 0.5 mL de peróxido de hidrógeno.
9. Anotar sus observaciones.

V. Visualización del efecto de la temperatura en la actividad de la peroxidasa.

1. Colocar los tres cortes delgados (punto IV-7) sobre un portaobjetos, marcar perfectamente la temperatura a la que se encontraban.
2. Adicionar sobre cada corte 50 μ L de ABTS. Esperar 5 minutos y observar al microscopio.
3. Anotar sus observaciones.

Resultados

- Calcular la concentración del sustrato (guayacol).
- Completar la tabla con los valores obtenidos:





Tiempo (seg)	Absorbancia (475 nm)	
	Amortiguador pH 6.6	Amortiguador pH 8.5
0		
20		
40		
60		
80		
100		
120		
140		
160		
180		
200		
220		
240		
260		
280		
300		

- Elaborar una gráfica con los datos de la tabla. Variable independiente tiempo, variable dependiente absorbancia.
- Describir la acción de la peroxidasa de rábano después de colocar fragmentos de este a diferentes temperaturas.

Cuestionario

- a) ¿Mencionar tres enzimas contenidas en los peroxisomas?
- b) ¿Describir la reacción de alguna de estas enzimas?
- c) Investigar que tejidos animales contienen gran cantidad de peroxisomas y describir la función de alguno en el organismo.

Bibliografía

-  Ross C. W., Salisbury F. B. Fisiología de las plantas 2: Bioquímica Vegetal. 1ª Edición. Editorial Thomson Paraninfo. Madrid, 2000.
-  Callen J. C. Biología celular: de las moléculas a los organismos. 1ª edición. Editorial CECSA. México, 2000.
-  Mathews C., Van Holde K., Ahern K. Bioquímica. 3ª edición. Editorial Addison Wesley. España, 2002.
-  M. en C. Elvira González Soto (comunicación personal).

Estructura y Función Celular I

Se terminó de imprimir en agosto de 2015,
con un tiraje de 200 ejemplares, más sobrantes para reposición.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Av. San Rafael Atlixco No.186, Col. Vicentina,
C.P. 09340, Del. Iztapalapa, México D.F.
Tel.: (01) 58044600