



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA
FACULTAT DE VETERINÀRIA
BÉLLATERRA (Barcelona)

ADREÇA POSTAL: Bellaterra - Barcelona - Tels. 692 02 00 - 692 11 66 Telex 52040

PRACTICAS
(1983 - 1984)

PRACTICA N° 1

(A) DETERMINACION DE GLUCOSA

1. Introducción

La determinación de glucosa es de gran interés en un gran n° de importantes enfermedades tales como: diabetes mellitus , acromegalia , síndrome de Cushing , feocromocitoma , stress , enfermedades hepáticas , enfermedades de almacenamiento de glucógeno , etc .

2. Valores normales

La concentración normal de glucosa en plasma o suero es de 3.57-6.05 mmol/L (65-110 mg/dL) .

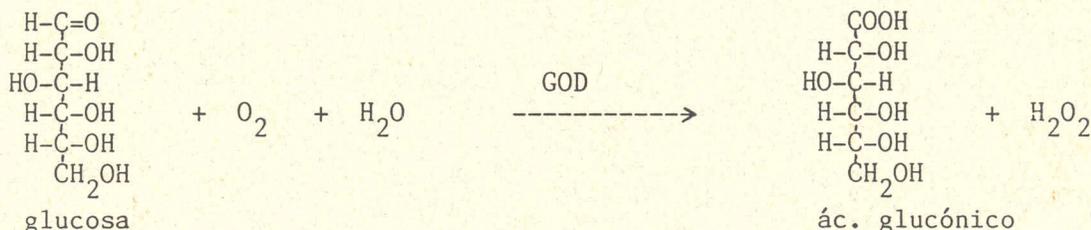
3. Técnicas determinativas

Se han desarrollado un gran n° de técnicas para la determinación de glucosa en fluidos corporales , basadas todas ellas en medidas espectrofotométricas . En esta práctica determinaremos este metabolito mediante un método enzimático colorimétrico : METODO DE LA GLUCOSA OXIDASA .

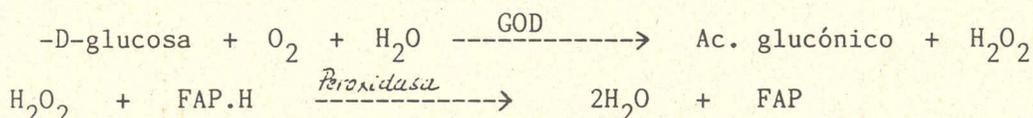
3.1. Fundamento del método de la Glucosa Oxidasa

La glucosa oxidasa es un enzima que cataliza la oxidación de la glucosa a ácido gluconico y peróxido de hidrógeno.

Este enzima es altamente específico para la beta-D-glucosa. La introducción del enzima peroxidasa y de un cromógeno aceptor de oxígeno , tal como fenol-aminopirona (FAP) , forma un derivado coloreado .



El compuesto quinoide rojo resultante es proporcional a la concentración de beta-D-glucosa presente en la muestra ensayada .



3.2. Reactivos

-GOD-FAP . Contiene un vial de mezcla enzimática y un vial de fenol . Concentración final/ensayo : Glucosa oxidasa 9,000 U/L ; Peroxidasa 1,100 U/L ; Ampirona 0.8 mmol/L ; Fenol 5 mmol/L ; Tampón fosfatos 100 mmol/L , pH 7.0 .

-Control de glucosa (100 mg/dL) 5.5 mmol/L

3.3. Material necesario

-Pipetas de 5.0 mL y 20 uL

-Matraces aforados de 250 mL

-Fotómetro espectral o de filtros . Lectura a 510 nm (+ 10 nm)

3.4. Muestras

Suero y soluciones estandar de glucosa .

3.5. Reconstitución de los reactivos

-Solución enzimática pH 6.9 . Transferir el polvo de un vial de mezcla enzimática a un matraz aforado de 250 mL . Disolver por rotación suave en unos 150 mL de agua destilada. Enrasar y mezclar por inversión repetida . Estable dos meses a 2°C-8°C .

-Fenol 10 mmol/L . Con la ayuda de un embudo verter el contenido completo de un vial de fenol 0.5 mol/L a un matraz aforado de 250 mL . Completar con agua destilada . Mezclar. Estable 1 año de 2-8°C

Reactivo de trabajo : Mezclar volúmenes iguales de cada una de las soluciones anteriores
El monorreactivo , es estable 2 semanas en nevera .

3.6. Técnica determinativa

Trabajando en la longitud de onda que posee la máxima absorción efectuar las lecturas de diferentes concentraciones del patrón y del problema (suero) . En primer lugar realizar 5 diluciones del patrón con las que construiremos una recta de calibración (A en ordenadas y concentración en abcisas) mediante la cual se interpolará el valor de A del problema , para hallar su concentración .

Para ello debemos pipetear en tubos de ensayo :

	BLANCO	PROBLEMA	PATRONES
Problema	-	0.04mL	-
Patrones	-	-	0.04 mL
Monorreactivo	3.0 mL	5.0 mL	5.0 mL

(Se prepararan tantos tubos patrón como diluciones se hayan realizado)

Mezclar e incubar los tubos 10 minutos a 37°C o a temperatura ambiente (18-20°C) durante 30 minutos .

Empleando el blanco de reactivos , ajustar el aparato a 0 y efectuar la lectura de las extinciones (A) de los tubos patrón y problema a 510 nm . El color es estable durante 60 min como mínimo .

3.7. Cálculos

- calcular la concentración del problema mediante la recta de calibración construida con las soluciones standar .
- calcular la concentración del problema matemáticamente expresándola en moles/L .

(B) DETERMINACION DE UREA

1. Introducción

Se conocen cerca de 15 compuestos nitrogenados no proteicos (NPN) en el suero de importancia clínica . Pero solo algunos de ellos son determinados clínicamente en el laboratorio . El más importante es la urea que constituye el 45% del NPN total , seguido en importancia por los aminoácidos , creatinina , creatina y amonio .

2. Significación clínica

Los niveles de urea y ácido úrico nos dan idea del funcionalismo renal.

La urea es el producto final del metabolismo proteico .

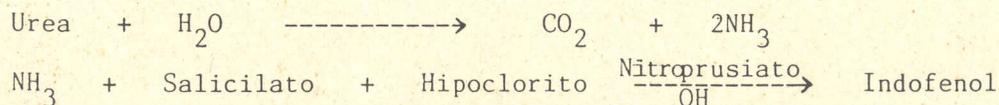
Los valores normales en humanos son 3.3-7.5 mmol/L (20-45 mg/dL) . Se observan valores altos (Uremias) en la insuficiencia renal , destrucción aumentada de tejidos (neumonía , escarlátina, etc) , en la insuficiencia suprarrenal ; y pequeños aumentos después del trabajo muscular , por el hambre y por excitación del simpático . Se observan pequeños descensos en la insuficiencia hepática aguda y a veces en nefrosis lipoideas puras.

3. Técnicas determinativas

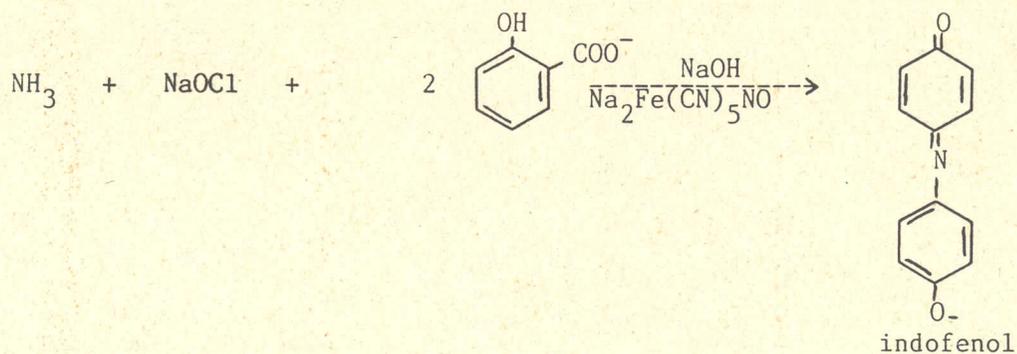
Realizaremos la determinación en suero . La técnica que emplearemos es colorimétrica (método de Berthelot-Searcy)

3.1. Fundamento

La ureasa escinde la urea presente en la muestra formando anhídrido carbónico y amoníaco . El amoníaco reacciona con salicilato e hipoclorito , en presencia del catalizador nitroprusiato , para formar un indofenol verde . La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de urea en la muestra ensayada .



Esta última reacción de una forma más detallada :



3.2. Muestras problema

Suero, plasma u orina

La urea en suero o plasma se conserva al menos 5 días a 2°-10°C

3.3. Reactivos

- Solución que contiene Ureasa y Salicilato
- Hipoclorito alcalino
- Patrón de Urea (50 mg/100 mL)

3.4. Técnica

Pipetear en tubos de ensayo :

TUBOS	Blanco	Problema	Patrón
Muestra	-	0.02 mL	-
Patrón	-	-	0.02 mL
Ureasa-salicilato	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL

Mezclar e incubar los tubos 10 minutos a temperatura ambiente . Después añadir :

Hipoclorito alcalino	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
----------------------	--------	--------	--------

Mezclar e incubar los tubos 10 minutos a temperatura ambiente .

Empleando el Blanco ajustar el aparato a cero y efectuar las lecturas de las extinciones de los tubos patrón y problema a 600 nm . (El color es estable 2 horas) .

3.5. Calculos

Calcular la concentración del problema en mmol/L y en mg/dL . (p.m. de la urea = 60.06)
El ensayo es lineal hasta 300 mg/100 mL .

3.6. Valores normales

Suero y plasma : 18-40 mg/mL (3.0-6.7 mmol/L) .

PRACTICA N° 2
PROTEINAS SERICAS

(A) FRACCIONAMIENTO ELECTROFORETICO DE LAS PROTEINAS SERICAS .

Una mezcla de proteínas que difieran en su carga neta pueden ser separadas en fracciones por un campo eléctrico .

Las proteínas séricas son separadas corrientemente mediante electroforesis utilizándose como soporte tiras de acetato de celulosa , las cuales tienen poros suficientemente anchos para que las moléculas proteicas puedan moverse libremente . Este medio tiene una estructura uniforme y permite un fraccionamiento rápido y definido ; además puede ser transparentado lo que permite una mejor exploración .

Los buffers de Barbitol (veronal) a pH 8.8 son estándares para las electroforesis de rutina de proteínas séricas . Si se añade lactato cálcico , se obtienen un total de siete bandas con sangre fresca (prealbumina , albumina , α_1 , α_2 , β_1 , β_2 y γ) .

Se han descrito muchos colorantes diferentes para teñir las las bandas de proteína , uno de los más utilizados es el Negro Amido .

Solo 15 proteínas están presentes en suero normal en una concentración suficiente para influir en el patrón electroforético después de la tinción para proteínas o grasas. Debido a que muchas de estas proteínas tienen movilidades semejantes , aparecen sólo 6 bandas claras cuando se tiñen las tiras de acetato de celulosa con colorantes proteicos. La banda β_2 sólo aparece claramente separada de la β_1 cuando el buffer contiene Ca^{2+} , y se ve únicamente en suero fresco . La banda de prealbumina se puede detectar únicamente mediante luz transmitida . Por tanto , en nuestra separación electroforética de las proteínas séricas detectaremos solo las bandas correspondientes a : albumina , α_1 , α_2 , β y γ . Sin embargo , este modelo electroforético puede verse alterado en diferentes enfermedades .

1. Reactivos

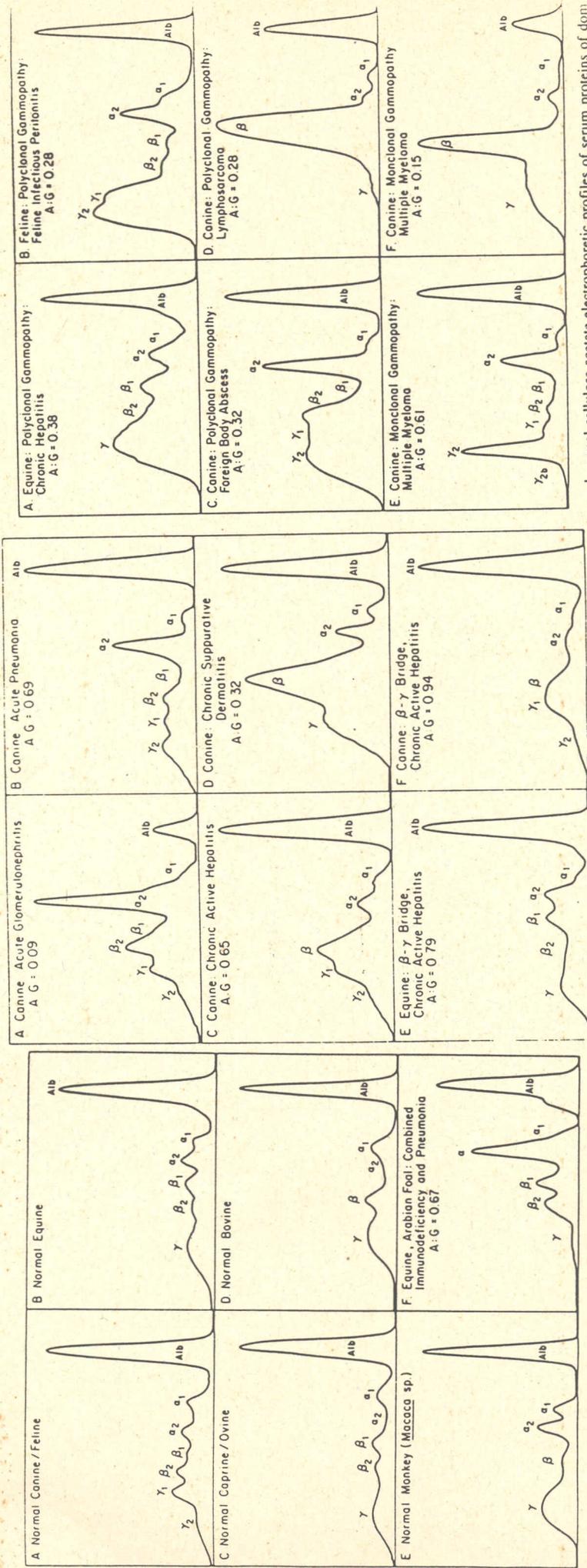
- Tampón de cubetas : Veronal sódico 0.04 M
- Solución de colorante Amidoschwartz (Negro Amido)
- Solución decolorante : Metanol 50% : Acético 10% : H₂O 40%

2. Material

- Alimentador de corriente continua
- Cubeta de electroforesis
- Tiras de Cellogel (Acetato de celulosa)

3. Técnica

- Introducir la solución tampón en la cámara electroforética , procurando que quede al mismo nivel en ambos lados de la cámara .
- Sumergir la tira de acetato de celulosa en la solución tampón durante 10 minutos . Al cabo de los cuales se saca la tira y se elimina el exceso de tampón secándola entre dos papeles de filtro .
- Colocar la tira sobre el puente de la cámara electroforética , cuidando que la superficie penetrable (opaca) queda dirigida hacia arriba. La tira debe quedar tesa y plana.
- Aplicar el suero problema a unos 2 cm del borde catódico con ayuda del aplicador.
- Introducir el puente en la cámara , taparla y conectarla a la fuente alimentadora regulando la corriente a 200 voltios .
- Esperar 30 minutos .
- Al cabo de este tiempo , desconectar la fuente , y después de sacar la tira del puente introducirla en un baño de la disolución colorante 2 minutos , agitando suavemente . Luego introducirla en los sucesivos baños de disolución decolorante hasta eliminar el exceso de colorante .
- Una vez eliminado el exceso de colorante podremos observar la presencia de cinco bandas .



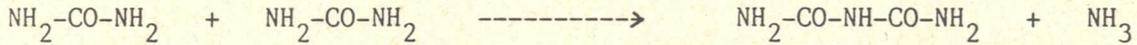
Normal and abnormal cellulose acetate electrophoretic profiles of serum proteins

Abnormal cellulose acetate electrophoretic profiles of serum proteins of domestic

ome abnormal cellulose acetate electrophoretic profiles of serum proteins of dom

(B) DETERMINACION DE LAS PROTEINAS SERICAS TOTALES (Método del Biuret)1. Fundamento

Las sustancias que contienen dos o más uniones peptídicas forman un complejo de color púrpura con las sales de cobre en solución alcalina. La sustancia que da nombre a la reacción, el biuret, es un dímero de la urea formado con pérdida de una molécula de amoníaco.



La coloración que aparece se debe a la formación de complejos cúpricos de coordinación. La intensidad de la coloración está en función de la cantidad de proteína total presente en la muestra ensayada.

La reacción del biuret para la determinación de proteínas fue uno de los primeros métodos desarrollados para el análisis colorimétrico de proteínas y todavía goza de un extenso uso hoy en día. Se emplea con más frecuencia en aplicaciones que requieren rapidez, no elevada exactitud y con una concentración elevada de proteína.

2. Material

- Pipetas de 1mL, 5 mL, 100 uL
- Tubos
- Patrón de albumina : 10 mg/ mL
- Colorímetro . Lectura a 550 nm (\pm 10 nm)

3. Muestra problema

Suero exento de hemólisis. Realizaremos una dilución 1:10 de la muestra y determinaremos su concentración proteica.

4. Técnica

CURVA PATRON : Partiendo de un patrón de albumina de 10mg/mL, poner en 5 tubos las cantidades necesarias del mismo para un volumen total de 1 mL con el fin de realizar una curva patrón en que las concentraciones de proteína oscilen entre 1 y 10 mg/mL.

PROBLEMA : se tratará de la dilución del suero realizada previamente (1mL)

BLANCO: Poner 1 mL de agua en un tubo de ensayo.

Una vez preparados los tubos de la curva patrón, problema y blanco se añaden a cada uno de ellos 4 mL de reactivo de biuret, se agita y se deja durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se determina la densidad óptica a 550 nm.

5. Cálculos

Representar graficamente la curva patrón y calcular sobre ella la concentración de proteína del suero problema en mg/mL.

PRACTICA Nº 3 : CROMATOGRAFIACROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE AMINOACIDOSFundamento

La cromatografía es una técnica de separación de sustancias que aprovecha la distribución de dichas sustancias entre una fase móvil i una estacionaria.

La cromatografía en capa fina es una cromatografía de reparto líquido-líquido en la que son muy importantes las interacciones por adsorción. Utiliza como soporte gel de sílice, celulosa, poliaminas, gel de óxido de aluminio, gel de silicato magnésico. El gel se extiende sobre una placa rígida, produciendo una capa fina cuyo espesor puede ajustarse a conveniencia. El agua retenida en la capa fina actúa como fase estacionaria y diversas mezclas de disolventes orgánicos actúan como fase móvil. La cromatografía en capa fina se aplica a la separación de azúcares, aminoácidos, péptidos, lípidos, esteroides, nucleótidos y en general a las sustancias de interés biológico de bajo peso molecular. La cromatografía en capa fina suele realizarse de forma ascendente y puede realizarse en dos dimensiones, combinando dos sistemas diferentes de disolventes. Las sustancias se localizan en la placa, una vez desarrollada, mediante su color, absorción ultravioleta o el revelado específico con un reactivo que produzca un compuesto coloreado. Las sustancias una vez separadas en la placa pueden eluirse raspando el soporte y extrayéndolas con los disolventes adecuados.

Aplicación de la muestra:

Sobre una placa de silicagel de 20 x 20 cm (cuidando de no tocar con los dedos ni con ningún otro objeto su superficie y a unos 2 cm de uno de los bordes) se hace la aplicación de una muestra de aminoácidos utilizando un capilar y ayudándose de un secador. Se hace un pequeño toque del capilar en la placa y se seca rápidamente con el secador. Se repite el proceso sucesivamente hasta haber aplicado el contenido del tubo capilar (unos 3 ul). Se ha de procurar que la mancha de la muestra sea lo más reducida posible (diámetro inferior a 5 mm)

Desarrollo

Las placas se introducen en una cámara de cromatografía preparada previamente (equilibrada durante 30 min con los solventes). La mezcla de solventes a utilizar es propanol:agua (70:30). Se ha de procurar que las placas queden verticales y que el líquido que las moje forme una línea horizontal.

Se deja correr el solvente durante el tiempo suficiente como para que llegue a 2cm del límite superior de la placa. Al cabo de este tiempo se sacan las placas de la cámara marcando con una raya el frente del solvente. Se secan con ayuda de un secador hasta la desaparición total del olor del solvente.

Revelado

Una vez secas, se visualizan las manchas pulverizando las placas con ninhidrina que forma compuestos coloreados con los aminoácidos después de tratamiento con calor en una estufa a 70°C (10 min).

Calculos

Calcular el Rf de cada aminoácido en las condiciones experimentales descritas.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el aminoácido en cuestión}}{\text{Distancia recorrida por el frente}}$$

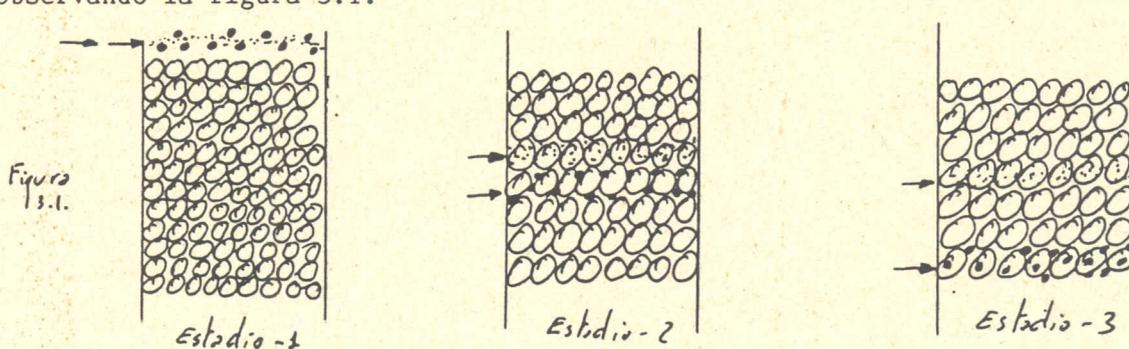
Identificar cada uno de los aminoácidos presentes en la mezcla con la ayuda de los patrones que se suministran.

PRACTICA 3. GEL FILTRACIÓN (CROMATOGRAFIA DE PENETRABILIDAD)

Este tipo de cromatografía separa las moléculas en función de las propiedades físicas, forma y tamaño molecular. La fase estacionaria es un gel, polímero o anhidro fuertemente hidrofílico, que se hincha al sumergirlo en agua o disoluciones electrolíticas, y la fase móvil es agua o cualquier disolución electrolítica. La separación de las moléculas (elución) es independiente del tipo de fase móvil utilizada (eluyente), de sus características de pH y fuerza iónica, y sólo es función de la forma, del tamaño molecular y de las dimensiones de los poros del gel.

Uno de los tipos de geles más utilizados es el Sephadex. El Sephadex es un gel de dextrano, polímero ramificado de glucosa. Existen distintos tipos de geles, dependiendo del contenido de dextrano y del grado de porosidad, lo que da la posibilidad de separar moléculas de tamaños muy diferentes.

El mecanismo de separación de la cromatografía de penetrabilidad puede comprenderse observando la figura 3.1.



Sobre el lecho del gel se aplica la muestra con dos tipos de moléculas de distinto tamaño molecular. Al añadir el eluyente, las moléculas con un radio hidrodinámico tal que no puedan penetrar en el gel pasan por los espacios intersticiales o "huecos" que dejan entre sí los granos del gel, mientras las moléculas con radios hidrodinámicos pequeños, además de recorrer los espacios intersticiales penetran en el grano de gel, recorriendo un camino más largo, por lo que su elución se producirá más tarde que las de las moléculas de peso molecular superior. De esta manera, en la cromatografía de penetrabilidad la elución se produce en orden decreciente de pesos moleculares. Esta técnica ha adquirido un amplio uso en el laboratorio para la purificación de enzimas, proteínas en general, determinación aproximada de pesos moleculares y como criterio de pureza para algunas sustancias de origen biológico. También puede utilizarse para separar las sales acompañantes de una sustancia de elevado peso molecular. En la industria se utilizan a gran escala para aislar productos de disoluciones complejas.

CALIBRACION: Colocar en la parte superior de una columna de Sephadex G-25 (límite de exclusión 5.000) previamente hinchado, manteniendo cerrada la salida, 0.5 ml de una mezcla de azul dextrano ($PM\ 2 \times 10^6$) y cromato potásico ($PM\ 194$). La mezcla presenta un color verde intenso por superposición del azul dextrano y del amarillo de cromato. Dejar que la solución penetre en la columna, a continuación añadir agua hasta que se consiga la elución de ambos compuestos, que deben hacerlo en bandas separadas. Finalmente lavar la columna con un volumen de agua igual al del lecho.

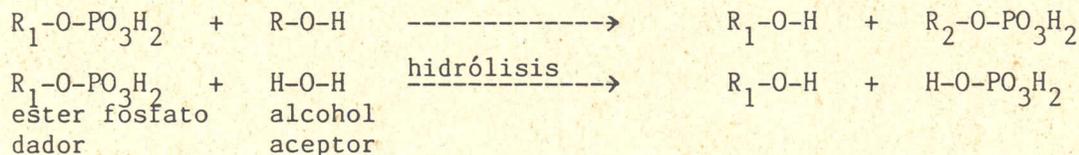
Calculos: Calcular el volumen de exclusión (V_0) o volumen de agua de los espacios interpartículas, es decir ml de agua recogidos antes de empezar a eluirse el azul dextrano. Calcular el volumen total de la columna o volumen (V_t) en ml hasta que empieza a eluirse el color amarillo.

PRACTICA N° 4
DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA EN SUERO

1. Introducción

Las fosfatasas constituyen un grupo de hidrolasas de baja especificidad caracterizadas por su capacidad de hidrolizar una amplia variedad de esteres fosfato orgánicos .

La reacción catalizada por las fosfatasas consiste en la transferencia de un grupo fosfato desde un compuesto dador a un compuesto aceptor conteniendo un grupo -OH . Si el aceptor es H₂O el efecto neto observado es una hidrólisis .

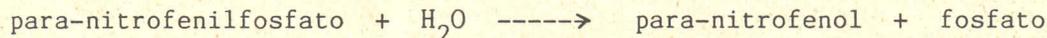


1.1. Fosfatasa alcalina en suero

Este grupo de enzimas se caracterizan porque presentan la actividad máxima a un pH alrededor de 10 ; variando dicho pH óptimo según la naturaleza y concentración del sustrato , tipo de tampón empleado , tipo de aceptor de fosfato , composición de isoenzimas presentes en suero , etc ,se han detectado hasta ocho isoenzimas diferentes , pero en un suero normal raramente se encuentran mas de tres o cuatro . La forma enzimática presente en el suero de adultos normales proviene principalmente del hígado , del tracto biliar y también existe una pequeña cantidad procedente del hueso . La fosfatasa alcalina sérica se denatura rápidamente a 56°C pero es relativamente estable a menor temperatura . La significación clínica de la medida de la actividad fosfatasa alcalina viene dada precisamente por su interés en el diagnóstico de a) enfermedades hepatobiliarias y b) enfermedades óseas asociadas a un aumento de la actividad osteoblástica .

2. Medida de la actividad fosfatasa alcalina . Fundamento del método

Las fosfatasas alcalinas catalizan la hidrólisis del para-nitrofenilfosfato a pH 10.5 de acuerdo con la reacción siguiente :



La cantidad de para-nitrofenol liberado , determinada colorimétricamente (405 nm) en medio alcalino (color amarillo) , es directamente proporcional a la actividad enzimática ensayada.

3. Muestras

Suero o plasma heparinizado exento de hemólisis

4. Reactivos

- Tampón de glicina 50 mmol/L , pH 10.5 ; MgCl₂ 0.5 mmol/L
- para-Nitrofenilfosfato sódico 5.5 mmol/L
- control de para-Nitrofenol , 2 mmol/L
- NaOH 0.02 M

5. Procedimiento

Disponer en tubos de ensayo los volúmenes siguientes :

	Blanco	Problema	Control
Sustrato tamponado	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
Preincubar aproximadamente 5 min a 37°C			
Suero	-	0.05 mL	-
Control 2 mmol/L	-	-	0.05 mL
Mezclar e incubar exactamente 20 minutos			
NaOH 0.02 N	5 mL	5 mL	5 mL
Mezclar y leer			

Empleando el blanco de reactivos ajustar el aparato a 0 y efectuar las lecturas de las extinciones (E) de los tubos control y problema a 405 nm . El color es estable durante 60 minutos .

6. Cálculos

El control 2 mmol/L , empleando esta técnica , equivale a 6 unidades Bessey (UB) .
Aplicar :

$$\frac{E \text{ del problema}}{E \text{ del control}} \times 6 = \text{UB/mL}$$

El color es lineal hasta las 10 U.B. . Para valores superiores , diluir la muestra al 1:10 con solución salina y repetir el ensayo multiplicando el resultado obtenido multiplicando por 10 .

7. Unidades

- La unidad Bessey-Lowry , conocida también como unidad mili-molar , corresponde a la cantidad de enzima que , en las condiciones del ensayo , libera por hidrólisis : 1 mmol/L dep-nitrofenol/hora/litro (37°C) .
- La unidad internacional (UI) es la cantidad de enzima que convierte 1 umol de sustrato por minuto (25°C) . La actividad se expresa en unidades por litro de suero (U/L) . Para convertir las U.B. a U.I. , multiplicarlas por el factor 16.67 .

8. Valores normales

Niños (hasta 15 años)	2.3-8.3 UB/mL	(38-138 U/L)
Adultos	0.8-3.0 UB/mL	(13-50 U/L)
Embarazo (último trimes.)	1.5-7.2 UB/mL	(25-120 U/L)

9. Causas de error

- No haber determinado la actividad en el mismo día . Si no se ha de congelar el suero .
- Material de vidrio sucio.
- Tiempos de incubación irregulares .
- Instrumento desajustado o longitud de onda errónea .