

## Hoja de ejercicios

El ejercicio consiste en determinar la cantidad de cada reactivo que se debe de preparar para realizar las técnicas de análisis enzimático que se describen a continuación:

### Un poco de contexto

Supongamos que muy pronto finalizará un experimento que tiene por objetivo determinar la influencia de la salinidad (3, 15, y 35 g/L) en la fisiología digestiva del robalo blanco *Centropomus undecimalis*. Por lo tanto, se necesita medir la actividad enzimática del estómago, ciego e intestino (ver figura 1).

### Análisis de actividad enzimática

#### 1 Preparación de homogenizados

Se tomarán nueve organismos por cada tratamiento (tres por replica), después de proceder con la eutanasia se va retirar el estómago, ciego e intestino, los cuales se van a triturar en nitrógeno líquido y se almacenará en tubos de 10 mL a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para obtener el extracto enzimático, se va agregar buffer 0.1 M glicina-HCl a pH 3 al estómago y 30 mM Tris-HCl + 12.5 mM  $\text{CaCl}_2$  a pH 7.5 al ciego e intestino en una dilución de 1:5 y 1:2 respectivamente (suponga que utilizará dos gramos de tejido).

Después de agregar el buffer los extractos se homogenizarán con un ULTRA TURRAX® IKA T18 Basic durante 15 segundos en cada muestra, siempre en frío. Posteriormente se va a centrifugar a 12,000 rpm a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos, al final se va retirar el sobrenadante y colocar en microtubos de 1.5 mL, los cuales se van a congelar en nitrógeno líquido y almacenar a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriormente ser utilizados.

#### 2 Proteasas ácidas

Para determinar la actividad se utilizará la técnica de Anson (1938), en 1 mL de hemoglobina al 1 % en buffer 0.1 M glicina-HCl a pH 2. Se va añadir 5  $\mu\text{L}$  del extracto multitienzimático y se incubará durante 5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Para detener la reacción se le adicionará 0.5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20 %. Después se dejará reposar la mezcla de reacción 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , posteriormente se va centrifugar a 12,000 rpm durante 5 minutos, y se retirará el sobrenadante para medir la actividad. La actividad se definirá como 1  $\mu\text{g}$  de tirosina hidrolizada por minuto. Usando como coeficiente de extinción molar de 0.008 a 280 nm.

#### 3 Proteasas alcalinas

Se utilizará el método de Kunitz (1947) modificado por Walker (1984), usando como sustrato caseína al 1 % en buffer 100 mM Tris-HCl + 10 mM  $\text{CaCl}_2$  a pH 9. Se le agregará 0.5 mL de caseína, más 0.5 mL de buffer 100 mM Tris-HCl + 10 mM  $\text{CaCl}_2$  a pH 9 y 10  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático, se incubará por 10 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ , posteriormente la reacción se detendrá con 0.5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20 %, se centrifugará a 12,000 rpm por 5 minutos, la actividad se definirá de acuerdo al apartado anterior.

#### 4 Tripsina

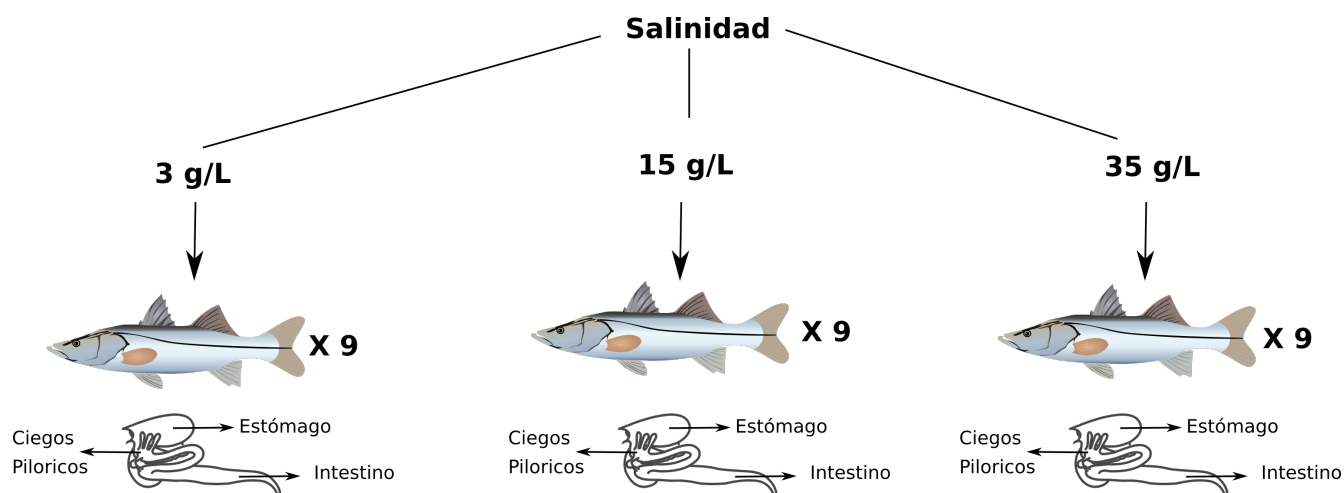
Se utilizará el método de Erlanger et al. (1961), usando como sustrato BAPNA (N- $\alpha$ -benzoyl-DL-arginina 4-nitroanilida) al 3.5 mM en buffer 50 mM Tris-HCl + 10 mM  $\text{CaCl}_2$  a pH 8, el BAPNA se diluirá previamente en 200  $\mu\text{L}$  de DMSO. Para iniciar la reacción se mezclará 990  $\mu\text{L}$  del sustrato con 10  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático y se incubará por 30 minutos a 25 °C. La reacción se detendrá adicionando 250  $\mu\text{L}$  de TCA al 20 %, se centrifugará a 12,000 rpm por 5 minutos. La actividad se definirá de acuerdo a Dimes et al. (1994), como 1  $\mu\text{M}$  de p-nitroanilida hidrolizada por minuto, usando como coeficiente de extinción molar 8.2 a 410 nm.

#### 5 Quimotripsina

Se determinará por el método de Lainé et al. (1993), utilizando como sustrato Suc-AAFP-pNA (N-succinyl-alanine-alanine-proline-phenylalanine-p-nitroanilide) al 1 mM disuelto en DMSO. Para iniciar la reacción se agregará en una celda de cuarzo 960  $\mu\text{L}$  de buffer 0.1 M Tris a pH 8 y 10  $\mu\text{L}$  de Suc-AAFP-pNA, después de esto se le agregará 20  $\mu\text{L}$  del extracto, se agitará y medirá su absorbancia en el minuto uno y dos a 405 nm. La actividad se definirá como 1  $\mu\text{M}$  de p-nitroanilida hidrolizada entre el minuto uno y dos, usando como coeficiente de extinción molar 8.2 a 405 nm.

#### 6 Peso molecular (g/M) de reactivos disponibles en el laboratorio

- 1) Tris-HCl: 157.6
- 2) Tris: 121.14
- 3) Glicina-HCl: 111.53
- 4)  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 147.01
- 5) Hemoglobina: 54,500
- 6) TCA: 163.39
- 7) Caseína: 23,983
- 8) BAPNA: 434.88
- 9) Suc-AAFP-pNA: 451.43
- 10) DMSO (es un solvente): 78.13
- 11) Agua: 18.02



#### Homogenizados (x organismo)

	Cantidad (g)	Dilución	Volumen (mL)	Buffer
Estómago	2	1:5	10	0.1 M Glicina-HCl a pH 3
Ciegos pilóricos	2	1:2	4	30 mM Tris-HCl +
Intestino	2	1:2	4	12.5 mM CaCl <sub>2</sub>

#### Actividad enzimática (x organismo)

		Volumen (mL)	Reactivo
Estómago	Proteasas ácidas	1	Hemoglobina al 1% en buffer 0.1 M glicina-HCl a pH 2
		0.5	TCA al 20%
Ciegos pilóricos e intestino	Proteasas alcalinas	0.5	Caseína al 1% en buffer 100 mM Tris-HCl + 10 mM CaCl <sub>2</sub> a pH 9
		0.5	Buffer 100 mM Tris-HCl + 10 mM CaCl <sub>2</sub> a pH 9
		0.5	TCA al 20%
		0.5	TCA al 20%
	Tripsina	0.99	3.5 mM BAPNA en buffer 50 mM Tris-HCl + 10 mM CaCl <sub>2</sub> a pH 8, el BAPNA se diluirá previamente en 200 µl de DMSO
		0.25	TCA al 20%
	Quimotripsina	0.01	1mM Suc-AAFP-pNA al disuelto en DMSO
		0.96	0.1 M Tris

Figura 1: Diagrama del análisis de actividad enzimática del robalo blanco *Centropomus undecimalis* cultivados en salinidades de 3, 15, y 35 g/L.