

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.

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°C . Para obtener el extracto enzimático, se va agregar buffer glicina-HCl 0.1 M a pH 3 al estómago y Tris-HCl 30 mM + CaCl_2 12.5 mM 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°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°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 tampón glicina-HCl 0.1 M a pH 2. Se va añadir 5 μL del extracto multienzimático y se incubará durante 5 minutos a 37°C . Para detener la reacción se le adicionará 0.5 mL de ácido tricloro acético (TCA) al 20%. Después se dejará reposar la mezcla de reacción 15 minutos a 4°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 μg 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 tampón 100 mM Tris-HCl + 10 mM CaCl_2 a pH 9. Se le agregará 0.5 mL de caseína, más 0.5 mL de tampón Tris-HCl 100 mM + CaCl_2 10 mM a pH 9 y 10 μL de extracto enzimático, se incubará por 10 minutos a 25°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- α -benzoyl-DL-arginina 4-nitroanilida) al 3.5 mM en buffer Tris-HCl 50 mM + CaCl₂ 10 mM a pH 8, el BAPNA se diluirá previamente en 200 μ l de DMSO. Para iniciar la reacción se mezclará 990 μ l del sustrato con 10 μ l del extracto enzimático y se incubará por 30 minutos a 25 °C. La reacción se detendrá adicionando 250 μ 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 μ mol 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) disuelto en DMSO, como buffer Tris 0.1 M a pH 8. Para iniciar la reacción se agregará en una celda de cuarzo 960 μ l de buffer Tris y 10 μ l de Suc-AAFP-pNA, después de esto se le agregará 20 μ l del extracto, se agitará y medirá su absorbancia en el minuto uno y dos a 405 nm. La actividad se definirá como 1 μ mol de p-nitroanilida hidrolizada entre el minuto uno y dos, usando como coeficiente de extinción molar 8.2 a 405 nm.

6 Peso molecular de reactivos disponibles en el laboratorio

- 1) Tris-HCl: 157.6
- 2) Tris: 121.14
- 3) Glicina-HCl: 111.53
- 4) CaCl₂ · 2H₂O: 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