



# Prácticas de BIOMOLÉCULAS

**Primera práctica:**

Determinación cuantitativa de proteínas

**Segunda práctica:**

Aislamiento y determinación de ácidos nucleicos

**Tercera práctica:**

Extracción y cuantificación de pigmentos vegetales

Alumno: \_\_\_\_\_

## PRIMERA PRÁCTICA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE PROTEÍNAS

### Fundamento teórico

Existen diversos métodos que permiten la cuantificación de proteínas en muestras biológicas, tres de los más usados, que se basan en diferentes propiedades de las proteínas, son:

- Método del Folin-fenol (Lowry).
- Método del Coomassie (Bradford).
- Método espectrofotométrico.

#### a) Método de Folin-fenol o de Lowry

Basado en la formación de un complejo coloreado entre el  $\text{Cu}^{++}$  y los nitrógenos de los enlaces peptídicos (reacción de Biuret, figura 1). Para resaltar el color formado en esta reacción y aumentar la sensibilidad, se hace reaccionar posteriormente con el reactivo de Folin que al ser reducido por los residuos de aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano da un color azulado.

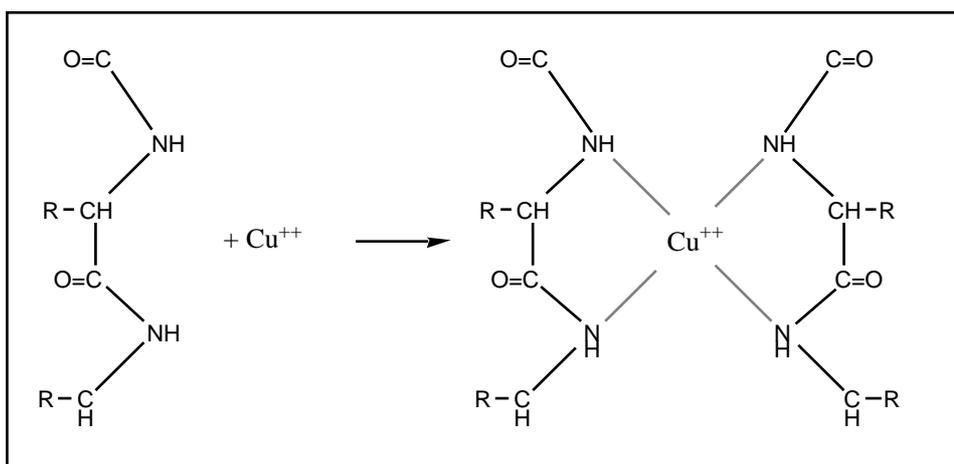


Figura 1. Reacción de Biuret implicada en el método de Lowry. Mediante la reacción de Biuret se forma un complejo entre el ion  $\text{Cu}^{++}$  y los nitrógenos de los enlaces peptídicos. Por otra parte los residuos aromáticos de la proteína reaccionan con el reactivo de Folin reduciéndolo

#### b) Método de Coomassie o de Bradford

Basado en la unión directa del colorante azul de Coomassie a la estructura terciaria de las proteínas y aminoácidos específicos. El colorante cambia de color de marrón a azul al unirse a proteínas.

#### c) Método espectrofotométrico

Desarrollado en múltiples variantes, aunque la más recomendada es la de Scopes. Se basa en la propiedad de las proteínas de tener un máximo de absorción a 280 nm debido al contenido en los aminoácidos tirosina y triptófano. La variabilidad

en estos aminoácidos en diferentes proteínas obliga a añadir un factor de corrección aportado por la absorbancia del enlace peptídico a 205 nm. La concentración se puede obtener aplicando la siguiente expresión:

$$[Prot](mg/mL) = \frac{A_{205}}{27 + 120 \frac{A_{280}}{A_{205}}}$$

No existe un sistema totalmente satisfactorio para determinar la concentración proteica de una muestra. La elección de un método u otro se basa en la naturaleza de la proteína y del resto de componentes de la muestra y en la sensibilidad y precisión requeridos. Un breve resumen de las principales ventajas de los tres métodos anteriores y sus aplicaciones más recomendadas lo vemos en la siguiente tabla:

	Ventajas	Aplicaciones
<b>Lowry</b>	Color estable. Alta precisión/exactitud.	Es el más usado, se toma como estándar. Bueno para proteínas de membrana.
<b>Bradford</b>	Bajo límite de detección. Compatible con agentes reductores. Rapidez.	Cuando se necesita rapidez. Para muestras con agentes reductores.
<b>espectrofotométrico</b>	Alta sensibilidad. No hay pérdida de muestra.	Para muestras muy escasas y valiosas.

## Objetivo

El objetivo de la práctica es el cálculo de la concentración de una muestra de proteína, de concentración desconocida, por los métodos de Lowry, Bradford y espectrofotométrico.

## Materiales y reactivos

- Tubos de ensayo de plástico.
- Cubetas de plástico y de cuarzo.
- Espectrofotómetro.
- Reactivo A: Carbonato sódico al 2% en NaOH 0,1 N.
- Reactivo B: Sulfato de cobre pentahidratado al 0,5% en tartrato sódico al 1%. (Forma sedimento insoluble).

- Solución alcalina de cobre: mezcla de los reactivos A y B en una proporción 55:1. *NOTA: este reactivo es poco estable, por lo que es preferible su preparación extemporánea y en la cantidad que se vaya a necesitar.*
- Reactivo de Folin diluido 1/2.  
Ditiotreitol (DTT) 20 mM
- Disolución de albúmina bovina patrón a 0,5 mg/mL.

## Realización

### a) Determinación de la concentración de albúmina bovina (BSA) por el método de Lowry

1. Se prepara la curva patrón tal como se indica en la siguiente tabla:

Solución	Tubo (volúmenes en mL)								
	B	1	2	3	4	5	1/100 6	1/50 7	1/25 9
Agua destilada	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	--	--	--
Albúmina patrón (0,5 mg/mL)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	--	--	--
Alb.problema diluida	--	--	--	--	--	--	1	1	1
[Prot] (µg/mL)							?	?	?

2. Hacer 3 diluciones de la muestra problema: 1/25, 1/50 y 1/100.
3. Pasar 1 mL de cada dilución un a un tubo nuevo (tubos 6, 7 y 8).
4. Añadir 5 mL del reactivo (C) a cada uno de los tubos.
5. Agitar y dejar incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Añadir 0,5 mL del reactivo de Folin diluido 1/2 y mezclar inmediatamente.
7. Incubar 3 minutos a temperatura ambiente y añadir 0,1 mL de DTT 20 mM.
8. Leer absorbancia a 700 nm frente al blanco.

### b) Determinación de la [BSA] problema por el método espectrofotométrico

1. Hacer dos diluciones de la muestra problema:
  - (A) 1/300
  - (B) 1/20
2. Medir la absorbancia de (A) a 205 nm, y la absorbancia de (B) a 280 nm en cubeta de cuarzo frente a un blanco con agua.
3. Corregir los valores de absorbancia con las respectivas diluciones (multiplicando por el factor de dilución).

4. Calcular la [BSA] de acuerdo a la expresión:

$$[Prot](mg/mL) = \frac{A_{205}}{27 + 120 \frac{A_{280}}{A_{205}}}$$

### Cuestiones

1. Representar gráficamente (en papel milimetrado) los valores de concentración de proteína frente a la absorbancia a 700 nm y calcular la concentración de proteínas en la muestra problema.
2. Sabiendo que la concentración de la albúmina problema era de 5 mg/mL, ¿qué método se ha demostrado más eficaz para determinarla, y por qué?.
- 3.Cuál de los métodos de medida de proteína elegirías en los siguientes casos:
  - a) Una muestra de proteínas compleja procedente de la lisis celular por detergentes iónicos.
  - b) Una muestra de proteínas parcialmente purificada en un tampón que contiene agentes reductores.
  - c) Una muestra de proteína pura y en cantidades muy pequeñas.

### Bibliografía

- Clark J.M. 1997. *Experimental Biochemistry*. Editorial Freeman.
- Peterson G.L. 1983. *Determination of total protein*. *Methods Enzymol.*, 91: 95-119.
- Plummer D.T. 1978. *Introduction to Practical Biochemistry*. Editorial McGraw-Hill.
- Scopes, R.K. 1993. *Protein Purification: Principles and Practice*. Springer-Verlag.
- Larson E., Howlett B. y Jagendorf A. *Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination*. 1986. *Anal. Biochem.*, 155: 243-248.

## SEGUNDA PRÁCTICA

### AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

#### Fundamento teórico

Las células eucariotas presentan un contenido en DNA mucho mayor que las células procariotas. Las moléculas de DNA en eucariotas se combinan con proteínas y se organizan en fibras de cromatina en el núcleo.

Las principales funciones del DNA son:

- Almacenar la información genética completa, necesaria para determinar la estructura de todas las proteínas y RNAs de cada especie.
- Programar en el tiempo y espacio ordenadamente la biosíntesis de las células y los componentes de los tejidos.
- Determinar las actividades de un organismo a través de su ciclo de vida.
- Determinar la individualidad de un organismo dado.

Los RNAs, aun siendo mucho más cortos que los DNAs, son mucho más abundantes en la mayoría de las células. Tanto en células eucariotas como procariotas las tres clases mayoritarias de RNAs son: mensajero (mRNA), ribosomal (rRNA) y transferente (tRNA). Cada uno consta de una cadena simple de ribonucleótidos con un determinado peso molecular, secuencia de nucleótidos y función biológica (ver bibliografía).

La cantidad y pureza de los ácidos nucleicos en una preparación puede estimarse mediante espectrofotometría. La absorción a 260 nm permite calcular su concentración: 1 unidad de absorbancia (UA) corresponde aproximadamente a 50  $\mu\text{g/mL}$  para DNA de cadena doble y 40  $\mu\text{g/mL}$  para DNA de cadena simple y RNA. El cociente  $A_{260}/A_{280}$  da una estimación de la pureza de los ácidos nucleicos: una preparación pura de DNA y RNA tiene un valor de  $A_{260}/A_{280}$  de 1,8 y 2,0 respectivamente. Valores significativamente menores indican contaminación con proteínas o fenol, y, por consiguiente, no será posible cuantificar con precisión la cantidad de ácidos nucleicos.

#### Objetivos

El objetivo de esta práctica es aislar ácidos nucleicos (fundamentalmente DNA) a partir de un tejido animal, el hígado de ternera.

## **Materiales y reactivos**

- Tejido animal (hígado de ternera).
- Tubos de ensayo (de vidrio y de plástico) y tubos Falcon de 15 mL.
- Varilla de vidrio.
- Cubetas de cuarzo.
- Centrífuga de mesa.
- Espectrofotómetro.
- Tampón + detergente: NaCl 0,14 M, acetato magnésico 1,5 mM, KCl 5 mM, dodecil sulfato sódico (SDS) al 1%.
- Fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1).
- Acetato sódico 3 M pH 5,2.
- Etanol absoluto.
- Tampón Tris-EDTA: Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5.

## **Realización**

### **a) Obtención de los ácidos nucleicos**

1. En un tubo de vidrio de fondo redondo, tomar 0,1-0,2 g de un hígado de ternera, pesarlo y anotar su peso húmedo.
2. Desmenuzarlo tanto como sea posible con una varilla de vidrio y añadirle 10 veces el peso húmedo (e mL) de tampón salino más detergente.
3. Transferirlo a un tubo Falcon de 15 mL (tubo de plástico con tapón rojo).
4. Añadir el mismo volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico que se haya añadido de tampón salino con detergente.
5. Agitar vigorosamente.
6. Centrifugar a 3.500 rpm (en centrífuga de mesa) durante 5 minutos y separar con cuidado la fase acuosa (fase superior).
7. Añadir 1/10 del volumen, de fase acuosa recuperada, de acetato sódico 3 M pH 5,2, y mezclar bien.
8. Añadir, gota a gota, 2,5 volúmenes, de fase acuosa recuperada, de etanol absoluto.
9. Al añadir el etanol el DNA precipita en forma de un ovillo. Si no aparece el ovillo de DNA de forma clara, incubar 5 minutos en hielo (o en el congelador de la nevera). Centrifugar a 3.500 rpm 5 minutos y resuspender el precipitado de ácidos nucleicos en 2 mL de tampón Tris/EDTA pH 7,5. Si el ovillo se ve claramente, se puede "pescar" el DNA con la pipeta Pasteur, escurrir el exceso de etanol y transferirlo a un tubo limpio que contenga 2 mL de Tris/EDTA 1 pH 7,5.

### **b) Determinación del espectro de absorción de la disolución de ácidos nucleicos**

Preparar 3 mL de una dilución 1/10 de la solución de DNA obtenida en el paso anterior y determinar el espectro de absorción de la muestra entre 300 y 200 nm. Anotar las absorbancias a 260 y 280 nm.

### **Cuestiones**

1. Valorar la pureza de la preparación de ácidos nucleicos obtenida y calcular su concentración y la cantidad de ácidos nucleicos por gramo de tejido. Comentar el resultado.
2. ¿Por qué las proteínas tienen un máximo de absorción a 280 nm?
3. ¿Qué tipo de detergente es el SDS, y cómo actúa frente a las membranas y proteínas?
4. ¿Por qué al extraer con fenol los ácidos nucleicos van a la fase acuosa y no al fenol?

### **Bibliografía**

- Cantoni G.L. y Davies D.R. 1971. *Procedures in Nucleic Acids Research*. Vol. 2 Harper y Row Publishers.
- Lehninger A. 1982. *Principles of Biochemistry*. Worth.
- Maniatis T., Fitch E.F. y Sambrook J. 1982. *Molecular Cloning. A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.

## TERCERA PRÁCTICA

### EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PIGMENTOS VEGETALES

#### Fundamento teórico

Los pigmentos presentes en las plantas tienen diferentes funciones biológicas como la captación de luz, protección contra procesos oxidativos o simplemente confieren una tonalidad característica al tejido u órgano de la planta. Desde el punto de vista cuantitativo, la clorofila es el pigmento más importante en las plantas superiores. La clorofila se encuentra en las membranas tilacoidales de los cloroplastos y es responsable de la captación de luz en la fotosíntesis. La clorofila presenta en su estructura un anillo tetrapirrólico que es responsable de la absorción de la luz en la zona azul y roja del espectro, por lo que los tejidos donde este pigmento es muy abundante son de color verde (figura 1).

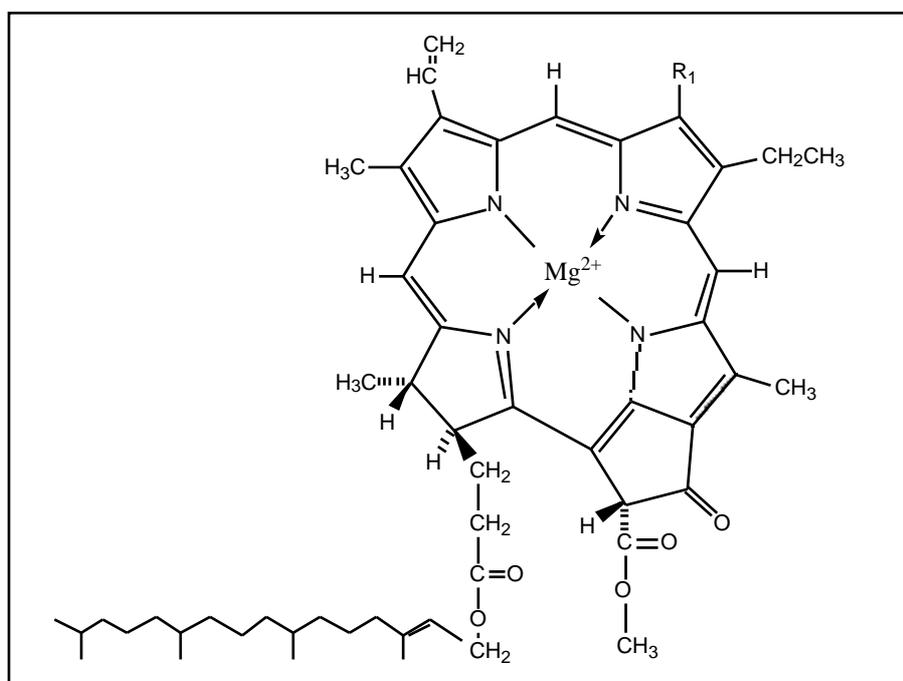


Figura 1. Estructura de las moléculas de clorofila a y b. El radical R1 es un -CH3 en la clorofila a y un -CHO en la clorofila b

Los carotenoides representan un grupo muy importante de pigmentos vegetales que cumplen diversas funciones biológicas. Estos pigmentos derivan del isopentenil pirofosfato y son de color amarillo o naranja según el grado de oxidación de la molécula. Uno de los carotenoides más llamativos es el licopeno (figura 2), responsable del color rojo de los frutos de tomate y que se acumula en el interior del cloroplasto durante la maduración de los frutos.

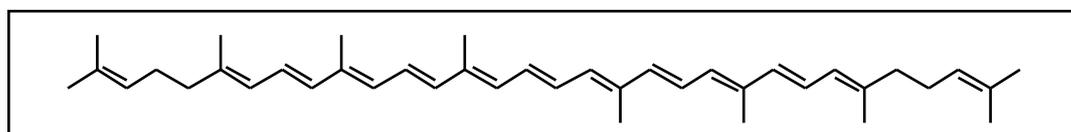


Figura 2. Estructura de la molécula de licopeno.

Estos pigmentos se han empleado como marcadores del grado de maduración de los frutos, proceso en el que tiene lugar la diferenciación del cloroplasto a cromoplasto, y asociado a ella, la degradación de la clorofila y la síntesis y acumulación de licopeno en el interior del plasto.

## **Objetivos**

En esta práctica se va a realizar la extracción y cuantificación de clorofila y licopeno de frutos de tomate y la determinación de sus espectros de absorción.

## **Materiales y reactivos**

- Tubos Falcon de 15 mL.
- Cubetas de vidrio.
- Centrífuga de mesa.
- Espectrofotómetro.
- Hexano : acetona (3:2).
- Acetona.

## **Realización**

1. Tomar aproximadamente 2 g de pericarpo de tomate y disgregarlo con la varilla de vidrio en el interior de un tubo Falcon de 15 mL. Anotar los pesos.
2. Por cada gramo de pericarpo, añadir 2 mL de la mezcla de disolventes orgánicos (hexano:acetona, 3:2). Tapar los tubos rápidamente, los disolventes son muy volátiles.
3. Agitar vigorosamente hasta completar la extracción de los pigmentos.
4. Centrifugar durante 5 minutos a 4.000 rpm.
4. Recuperar la fase orgánica superior, que contiene los pigmentos, con pipeta Pasteur y pasarlo a otro tubo. Anotar los volúmenes.
5. Recoger los espectros de absorción de ambos pigmentos entre 700 y 400 nm y anotar la absorbancia a 502, 650 y 665 nm.

**Cuestiones**

1. Calcular la cantidad de pigmentos extraídos de acuerdo a las siguientes expresiones:

$$[\text{Licopeno}](\mu\text{g} / \text{mL}) = A_{502} / 0,32$$
$$[\text{Clorofila}](\mu\text{g} / \text{mL}) = (6,45 A_{665}) + (17,72 A_{650})$$

comentar el resultado.

2. Calcular la cantidad de pigmentos extraída por gramo de tejido.
3. Esquematizar los espectros de absorción de la clorofila y el licopeno y razonar, en base a ellos, sus propiedades.

**Bibliografía**

- Lehninger A. 1982. *Principles of Biochemistry*. Editorial Worth.
- Goodwin T.W. y Mercer E. I. 1983. *Introduction to Plant Biochemistry*. Pergamon Press.
- Seymour G. B., Taylor J.E. y Tucker G.A. 1993. *Biochemistry of Fruit Ripening*. Editorial Chapman & Hall.