

# EJERCICIOS Y PREGUNTAS SOBRE LOS TEMAS QUE CUBRE LA ASIGNATURA CLAVE 0141 BIOQUÍMICA EXPERIMENTAL

## ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE PROTEÍNAS

1. Sobre la determinación de proteínas. Llena la tabla

Característica	Método		
	Lowry	Bradford	A280 nm
Aminoácidos o enlaces que reconoce			
Sensibilidad			
Compuestos que interfieren			
Destruye la muestra			
Compuesto empleado para la detección de la proteína			

2. **Calcula:** Se maceraron 2g de hojas de jitomate con 3 ml de una solución amortiguadora de fosfatos, el extracto proteico se diluyo 1:5 para determinar la concentración de proteína por el método de Bradford. Calcula la cantidad de proteína/ g de tejido usando los siguientes datos.

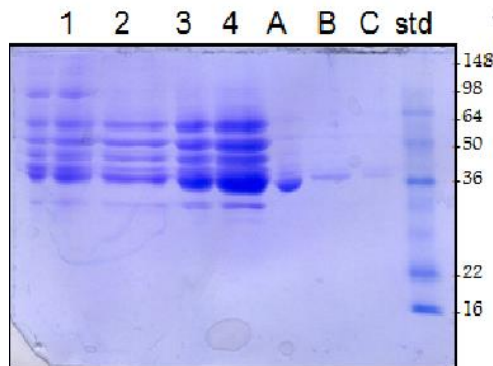
	BSA (ug)	Abs
Curva estándar	0	0
	0.5	0,041
	2.5	0,284
	5	0,595
	10	1,079
Muestra diluida 1:5	5 uL	0,32
	10 uL	0,673
	15 uL	0,981

3. **Respecto a los estándares de peso molecular,**

A. ¿cuál es la banda de alto peso molecular y cual la de bajo peso molecular?

B) De acuerdo a lo que sabes de electroforesis el pI de la proteína estará por arriba o por debajo de 8.9.

C) Calcula el peso molecular de la banda purificada.



## PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

Tienes un muestra de lisado crudo (LC) que contiene una mezcla de 6 proteínas (1,2, 3, 4, 5,  $\beta$ -galactosidasa) y tienes como meta purificar a la  $\beta$ -galactosidasa. Algunas características de las proteínas en la mezcla se encuentran en la tabla:

Proteína	$[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ para pp	PM (kDa)	pI
1	45 %	38	3.7
2	80 %	22	4.8
3	65 %	4	5.3
4	20 %	75	6.8
5	30 %	55	9.5
$\beta$ -galactosidasa	45 %	115	5.3

Comienzas la purificación con una precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  desde ahora llamado SA. Añades la concentración adecuada de SA a tu LC e incubas toda la noche para generar el sobrenadante (SA-S) y el botón (SA-B)

- Qué concentración de SA usas para pp a la  $\beta$ -galactosidasa? \_\_\_\_\_
- Después de la adición de SA y la centrifugación, cuáles proteínas tienes en el sobrenadante?  
\_\_\_\_\_
- ¿Cuáles proteínas tienen en el botón? \_\_\_\_\_
- Después de resuspender SA-B con amortiguador, cuál es el procedimiento que se debe realizar antes de continuar con los pasos cromatográficos \_\_\_\_\_ y ¿por qué?
- Se te ocurre continuar con la purificación de la  $\beta$ -galactosidasa basado en el peso molecular de la proteína, entonces ¿qué columna usarías con este fin?  
\_\_\_\_\_
- Cuáles de las proteínas de la mezcla eluirían primero de este tipo de columna \_\_\_\_\_
- Te das cuenta de que no tienes ese tipo de columna, entonces se te ocurre usar cromatografía de intercambio iónico, hay de dos tipos cuál usarías \_\_\_\_\_, que carga deben tener las proteínas para que se una a esta columna  
\_\_\_\_\_
- Qué pH usarías para que se produjera esta carga \_\_\_\_\_
- Cuáles proteínas se unirían a la columna \_\_\_\_\_
- y cuáles saldrían de la columna \_\_\_\_\_
- ¿Necesitas algún paso adicional para purificar a tu proteína?, si es así recuerda que solo tienes columnas de intercambio iónico. Explica que harías
- Cuáles son los tipos de eluyentes que se pueden usar comúnmente para separar a las proteínas de

## EJERCICIO CONSTRUCCIÓN DE UNA TABLA DE PURIFICACIÓN:

Paso	Volumen (ml)	Actividad Total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Enriquecimiento (%)	Veces purificación
EC (1)	500	3,000	15,000		100	1
SA (2)	100	2,400	4,000			
CII (3)	45	1,440	500			
FG (4)	50	1,000	125		33	

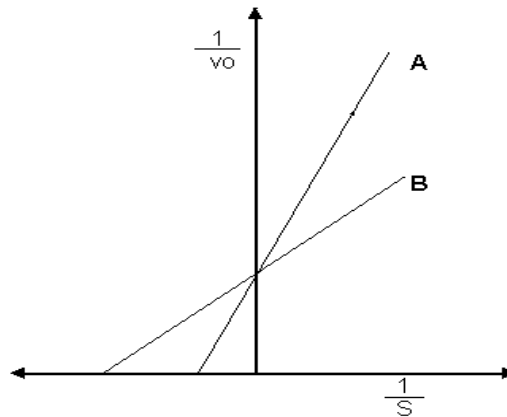
Pasos: (1) Extracto Crudo; (2) fraccionamiento con sulfato de amonio; (3) Cromatografía de intercambio iónico; (4) filtración en gel.

### RESPONDE LO SIGUIENTE:

- A. ¿A qué se refiere la tabla con actividad expresada en U?
- B. ¿Cómo determinas la actividad específica si solo conoces los valores que se te presentan en la tabla?
- C. ¿En qué unidades se encuentra?
- D. Calcula la actividad específica y llena la tabla que se te proporciona
- E. ¿Qué significa el rendimiento de la purificación?
- F. En que unidades está expresado
- G. ¿Cómo lo calculas?
- H. Llena la tabla con el rendimiento obtenido
- I. A que nos referimos cuando decimos veces de purificación
- J. ¿En qué unidades se expresa?
- K. Calcula y coloca en la tabla los valores de veces de purificación que hacen falta
- L.Cuál es el paso de purificación en donde se obtiene la mayor purificación, justifica tú respuesta en base a los valores de la tabla.
- M. Si en dos pasos de purificación hubieras tenido el mismo valor de veces de purificación, que te dice respecto a la eficiencia de los dos métodos utilizados

### EJERCICIOS DE CINÉTICA 1.

Un científico trabajando con un sistema de fermentación observo un tipo de inhibición de su enzima al convertir el sustrato en producto. El observo con cuidado las gráficas que se le produjeron en condiciones estándar e inhibidas (ver Figura). Responde lo siguiente y resuelve el misterio.



1. ¿Qué tipo de gráfico se está representando?
  - A) Michaelis-Menten
  - B) Dobles recíprocos
  - C) Hanes
  - D) Sigmoide
2. ¿Cuál de las dos curvas representa el efecto del inhibidor sobre la actividad de la enzima?
  - A) La curva A
  - B) La curva B
  - C) Ambas curvas
  - D) Ninguna
3. El inhibidor presente en el fermentador produce una inhibición de tipo:
  - A) Irreversible
  - B) Competitivo
  - C) No competitivo
  - D) Mixto
4. ¿Cuál es el efecto del inhibidor sobre la  $V_{max}$  de la reacción?
  - A) Incrementarla
  - B) Disminuirla

- C) Ninguno  
D) Datos insuficientes
5. ¿Cuál es el efecto del inhibidor sobre la  $K_m$  de la reacción?  
A) Incrementarla  
B) Disminuirla  
C) Ninguno  
D) Datos insuficientes
6. ¿Cómo puede el investigador resolver su problema de inhibición en su fermentador?  
A) Disminuyendo la concentración de sustrato  
B) Manteniendo la concentración de sustrato  
C) Incrementando la concentración de sustrato  
D) Datos insuficientes
7. Se midió la actividad de la LDH utilizando 10  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:500 de un extracto que tiene una concentración de 4.5  $\text{mg/mL}$ . El medio de ensayo incluyó piruvato, amortiguador a pH 7.0 y NADH, para un volumen final con todo y enzima de 800  $\mu\text{L}$ . Usando los siguientes datos calcula la actividad de la enzima.

Tiempo (min)	Absorbancia 340 nm
0.5	1.114
1	1.006
1.5	0.855
2	0.770
2.5	0.647
3	0.538
3.5	0.422
4	0.336
4.5	0.330
5	0.143

Con los datos que se presentan en la tabla determina el valor de  $V_{\text{max}}$ .

[S] ( $\mu\text{M}$ )	$V_0$ sin inhibidor ( $\mu\text{mol/min}$ )	$V_0$ con inhibidor ( $\mu\text{mol/min}$ )
3	10.4	4.1
5	14.5	6.4
10	22.5	11.3
30	33.8	22.6
90	40.5	33.8

8. ¿Cuál es la  $K_m$   
9. ¿Cuál es el tipo de inhibición?

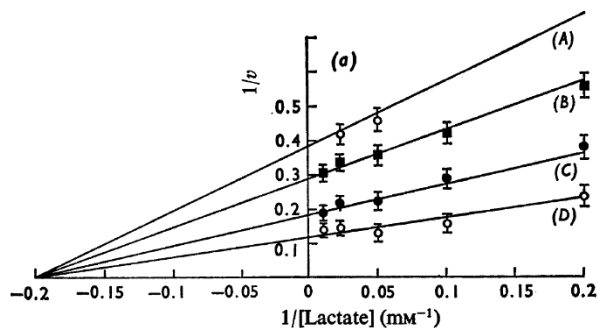
La siguiente tabla representa el número de recambio o bien la capacidad de una enzima de llevar a cabo una reacción enzimática.

10. ¿Cuál de las 6 enzimas presenta la mayor eficiencia catalítica?  
11. e indica qué columna de valores te sirvió para responder esto  
12. Y ¿Cuál es la enzima con la menor eficiencia de reacción?

Enzima	Velocidad en ausencia de enzima	Velocidad de reacción catalizada	$\frac{\text{Vel con enzima}}{\text{Vel sin enzima}}$
Anhidrasa carbónica	$1.3 \times 10^{-1}$	$1.0 \times 10^6$	$7.7 \times 10^6$
Corismato mutasa	$2.6 \times 10^{-5}$	50	$1.9 \times 10^6$
<b>Triosafosfato isomerasa</b>	$4.3 \times 10^{-6}$	4300	$1.0 \times 10^9$
Carboxipeptidasa A	$3.0 \times 10^{-9}$	578	$1.9 \times 10^{11}$
AMP nucleosidasa	$1.0 \times 10^{-11}$	60	$6.0 \times 10^{12}$
Nucleasa estafilococal	$1.7 \times 10^{-13}$	95	$5.6 \times 10^{14}$

## EJERCICIOS DE CINÉTICA 2.

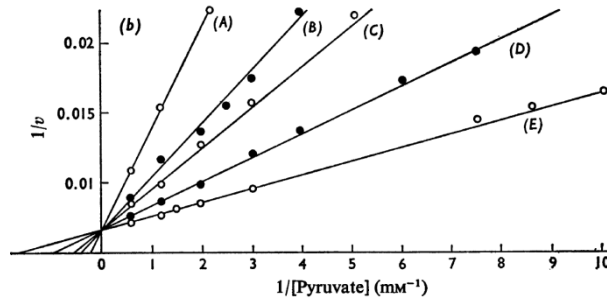
Se midió la cinética de actividad de la lactato deshidrogenasa en los dos sentidos posibles de la reacción, en presencia de diferentes concentraciones de oxamato, las gráficas que se produjeron se encuentran adelante, contesta lo que se te solicita para cada una de las gráficas.



1. Escribe la reacción que cataliza la enzima
2. Para la determinación de las constantes cinéticas son varios los gráficos que se pueden hacer, como se llama el que se presenta en la Figura de arriba.
3. ¿Cuál curva describe el comportamiento sin inhibidor?
  - a. A
  - b. B
  - c. C
  - d. D
4. ¿Qué tipo de inhibición se presenta?
  - a. Acompetitiva
  - b. Competitiva
  - c. No competitiva Pura
  - d. No competitiva Mixta
5. ¿Cuál es el efecto del inhibidor sobre la  $V_{max}$  de la reacción?
  - a. No hay cambio
  - b. Disminuye
  - c. Se incrementa
  - d. Los datos no son suficientes
6. ¿Cuál es el efecto del inhibidor sobre la  $K_m$  de la reacción?
  - a. No hay cambio
  - b. Disminuye
  - c. Se incrementa
  - d. Los datos no son suficientes

7. ¿Cuál es la  $K_m$  para el sustrato?
8. ¿Cuál es la  $V_{max}$  de la enzima sin inhibidor?

Para la gráfica b.



Oxamato
0
0.1
0.3
0.5
1

9. Escribe la reacción que cataliza la enzima
10. ¿Cuál curva describe el comportamiento sin inhibidor?
  - a. A
  - b. B
  - c. C
  - d. E
11. ¿Qué tipo de inhibición se presenta?
  - a. Acompetitiva
  - b. Competitiva
  - c. No competitiva Pura
  - d. No competitiva Mixta
12. ¿Cuál es el efecto del inhibidor sobre la  $V_{max}$  de la reacción?
  - a. No hay cambio
  - b. Disminuye
  - c. Se incrementa
  - d. Los datos no son suficientes
13. ¿Cuál es el efecto del inhibidor sobre la  $K_m$  de la reacción?
  - a. No hay cambio
  - b. Disminuye
  - c. Se incrementa
  - d. Los datos no son suficientes
14. ¿Cuál es la  $K_m$  para el sustrato?
15. ¿Cuál es la  $V_{max}$  de la enzima sin inhibidor?
16. Si comparas las dos Figuras sobre la actividad de la LDH, encuentras algunas diferencias en cuanto a la inhibición que el oxamato causa en la enzima. ¿qué propones que está sucediendo con la enzima para que presente una inhibición distinta contra el oxamato, pese a que es la misma enzima?
17. Define  $K_m$
18. Las unidades de la  $K_m$  son
19. Define  $V_{max}$
20. Las unidades de la  $V_{max}$  son
21. ¿Qué significado tiene el índice  $V_{max}/K_m$ ?

## CLONACIÓN E IDENTIFICACIÓN POR RESTRICCIÓN

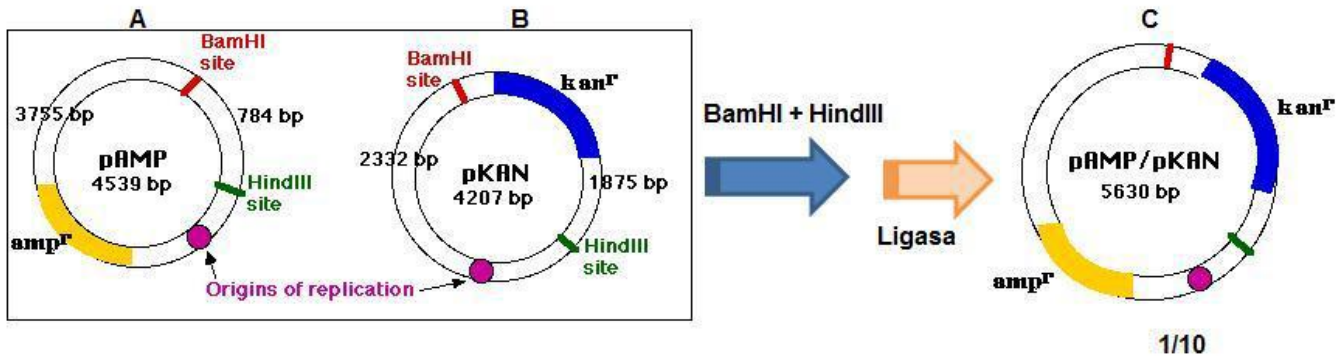
- Un DNA recombinante es un DNA que es creado artificialmente, en donde DNA de dos o más fuentes es usado para crear una sola molécula distinta. Por ejemplo en el ejercicio que se te presenta en la figura, se tienen dos plásmidos que presentan entre otras características resistencia distinta a los antibióticos, una es resistente a ampicilina (pAMP) y el otro es resistente a Kanamicina (pKAN); sin embargo, ambos tienen secuencias de DNA que pueden ser reconocidas por las mismas enzimas de restricción BamHI y HindIII, hecho que facilitará la formación de un DNA a partir de estos dos plásmidos, aunque la posibilidad de que se forme el DNA deseado es de 1/10.

A) Explica por qué la probabilidad es baja ¿cuáles serán los otros productos?

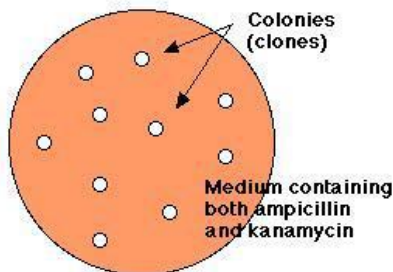
Después de la transformación del producto de restricción y ligación se realiza la selección en el medio o medios apropiados, se extrae el DNA y se obtiene el gel que se te presenta.

B) Di en cuál de las clonas se tiene el plásmido que se muestra en C, fundamenta tu respuesta.

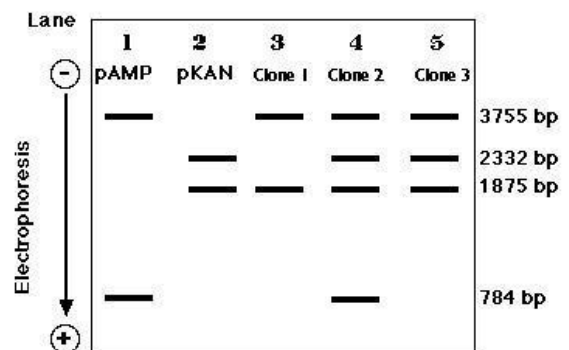
### Restricción y ligación para obtener el vector recombinante de interés



### Transformación y selección de colonias por fenotipo



### Determinación del genotipo



- Respecto a la desnaturalización del DNA

A) Menciona dos técnicas por las cuales puedes desnaturalizar al DNA

B) Menciona cómo y con qué reactivos llevas a cabo la desnaturalización-renaturalización del DNA durante la práctica de obtención del plásmido

C) Si lees espectrofotométricamente la absorbancia de los ácidos nucleicos que  $\lambda$  lees y porqué:

3. Indica que tipo de corte producen las siguientes enzimas

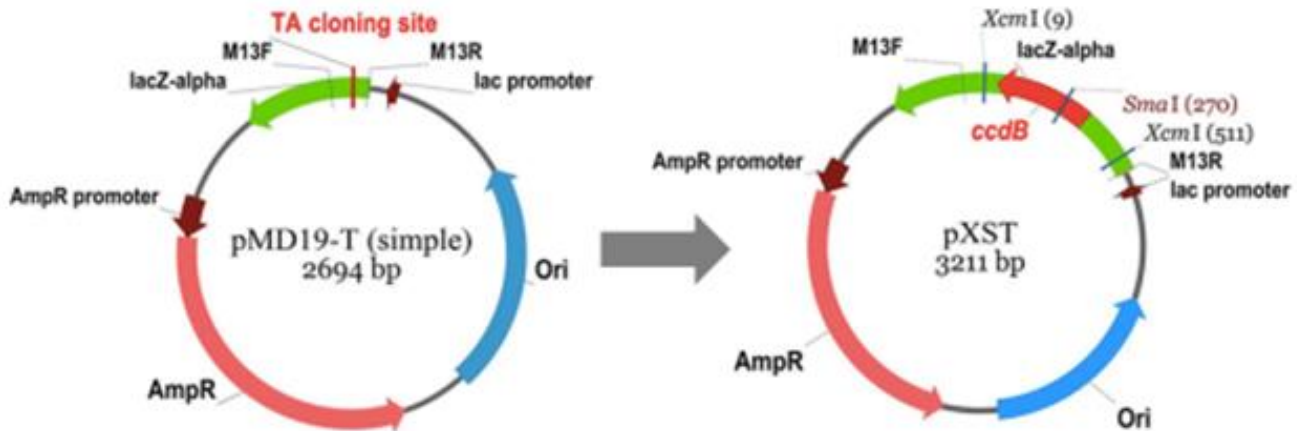


4. Si realizas la electroforesis de ácidos nucleicos.

- A) De que está hecho el gel \_\_\_\_\_
- B)Cuál es la carga de la molécula que se separa en el gel \_\_\_\_\_
- C) Qué reactivo usas para teñir la molécula que estás separando en el gel \_\_\_\_\_
- D) Las moléculas de bajo peso molecular salen más pronto o tardan más en avanzar en el gel \_\_\_\_\_

### OPERÓN LAC

1. ¿Qué es un operón? Menciona las proteínas reguladoras de la expresión y la región a la que se unen dentro de la secuencia del operón.
2. Observa los siguientes vectores.



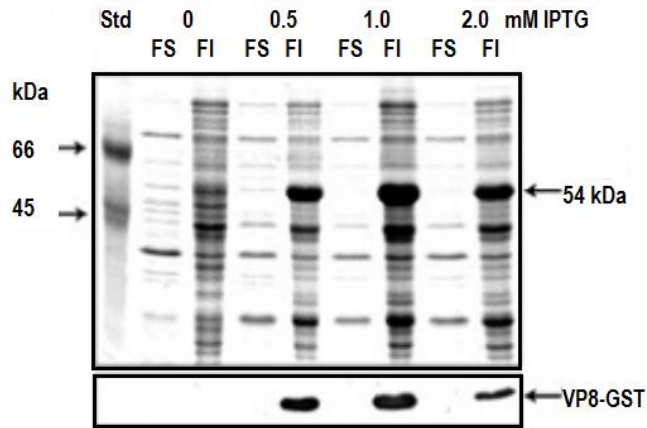
Menciona cómo podrías diferenciar entre una cepa de *E. coli* transformada con el vector pMD19-T de una transformada con pXST.

3. ¿Cuál vector produce  $\beta$ -galactosidasa y cuál produce la proteína recombinante?

### INDUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

1. Menciona el nombre de la molécula que se usó para la inducción de la producción de proteína recombinante y da el nombre de otra molécula que se puede usar.
2. Da el fundamento de la inducción de la proteína recombinante.
3. En la siguiente figura se te muestra un gel en el que se corrieron muestras de la inducción de una proteína recombinante, se confirmó, su presencia haciendo un western y detectando a la proteína con el anticuerpo específico para la proteína (VP8-GST). Después de lisar las células se centrifugo y se obtuvo la Fracción soluble (FS) y la fracción insoluble (FI). ¿En que fracción y con qué concentración de IPTG se obtiene más proteína?





4. Menciona al menos tres condiciones experimentales que puedes cambiar para optimizar la producción de proteína recombinante.
  
5. Para llenar la vacante en una compañía se les pide a los aspirantes que propongan la construcción de un vector que lleve a producir una proteína recombinante de manera constitutiva. Que elementos son indispensables que tenga el vector para que esto ocurra. ¿Hay elementos que no se necesitan o que se pueden mutar? Menciona el elemento y junto a él coloca la razón de usarlo, si te es más fácil dibuja el vector y describe porqué necesitas todos esos elementos.