



Facultad de Química

Departamento de Bioquímica

Material de apoyo para los estudiantes del curso

Bioquímica experimental (0141)

Elaborado por: Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Editora: Dra. Nahieli Greaves Fernández

INTRODUCCIÓN

El material que aquí se presenta está dirigido a los estudiantes de licenciatura, en especial aquellos que buscan introducirse en la bioquímica y como material de apoyo para los estudiantes del curso Bioquímica experimental (0141) de la Facultad de Química.

Se presenta de manera sencilla y resumida las técnicas de mayor uso en la bioquímica y la biología molecular. Comenzando con las partes del método científico y como realizar un reporte, tarea que aunque los alumnos han ido llevando a lo largo de sus cursos en la Facultad de Química, es distinta, en el curso de la Bioquímica experimental se les introduce al manejo y presentación de la información que obtendrán de un experimento de manera similar a como se hace en los artículos científicos.

Después se avanza sobre los conocimientos básicos de bioquímica, como por ejemplo la introducción en el uso de la espectroscopía y la curva patrón para determinar biomoléculas. Se presenta una guía para realizar la purificación mediante el seguimiento secuencial de varios pasos de purificación como la precipitación por salado, desalado, cromatografía de intercambio iónico y de afinidad. Para reconocer si el proceso de purificación fue óptimo se les introduce sobre los conceptos de pureza y rendimiento, los cuáles son el resultado del monitoreo del proceso de purificación el cual proviene de la determinación de proteínas, el corrimiento electroforético de las diferentes fracciones de la purificación y la medición de la actividad enzimática de estas fracciones. Adicionalmente, los alumnos contarán con la información mínima necesaria para determinar los parámetros cinéticos de una enzima y la influencia de los inhibidores. Es pues, que en esta primera parte se presentan los conceptos sobre la estructura, propiedades y función de las proteínas.

El contenido en la segunda parte es igualmente rico, se presenta la estructura, propiedades y función de los ácidos nucleicos. Existe abundante información respecto a la secuenciación de genomas y las posibilidades de obtener proteínas recombinantes u organismo genéticamente modificados. Es por ello que los alumnos recibirán de manera concisa los fundamentos de las técnicas más utilizadas en biología molecular. En esta sección se les presentan dos formas distintas de transferencia horizontal: la conjugación y la transformación. Se describen las

técnicas de monitoreo fenotípico (resistencia a antibióticos, producción de proteína recombinante), genotipo (obtención del plásmido y restricción).

Por último, encontrarán que la expresión genética se modifica por varias circunstancias, en particular se revisa el caso del operón lac.

Si bien existen numerosos y excelentes libros en los que los estudiantes pueden encontrar esta información, la mayor parte de los libros están escritos para especialistas en el campo, en este escrito se presentan aquellos aspectos que llevarán al estudiante a comprender como en la práctica se realiza la purificación de proteínas o bien la introducción de un transgen a un organismo como *E. coli*.

Sobeida Sánchez Nieto

CONTENIDO

Sección	Nombre
I	Introducción al laboratorio de Bioquímica Parte I: Reporte científico Parte II: Revisión de métodos espectroscópicos y elaboración de curva estándar de proteínas
II	Estructura y propiedades de proteínas: Purificación de la enzima lactato deshidrogenasa de músculo esquelético de pollo Parte I. Extracción y precipitación por salado. Parte II. Purificación por cromatografía de intercambio iónico y de afinidad Parte III. Monitoreo del proceso de purificación. A. Determinación de concentración de proteínas. Monitoreo del proceso de purificación. B. Separación por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
III	Actividad enzimática Parte I. Curvas temporales de actividad enzimática de la lactato deshidrogenasa de músculo esquelético de bovino. Parte II. Factores que modifican la actividad de las enzimas: Efecto de la concentración de sustrato y de un inhibidor. Anexo I. Deducción de la ecuación de Michaelis-Menten.
IV	Estructura, propiedades y función de ácidos nucleicos Transferencia de material genético I. Conjugación Transferencia de material genético II: Transformación <ul style="list-style-type: none">➤ Aislamiento de plásmidos➤ Ensayos de restricción de plásmido➤ Inducción de proteína recombinante
V	Regulación del metabolismo Parte I: Regulación genética en el operón lac Parte II. Regulación del metabolismo de carbono

1. INTRODUCCIÓN AL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

PARTE I: REPORTE CIENTÍFICO

Introducción

Tanto en la Universidad como fuera de ella, sin importar el tema, es importante que expreses tus ideas o argumentos de manera clara y fácil de seguir, tanto en forma oral como escrita. Actualmente, tanto las empresas como las instituciones educativas y de investigación buscan que su personal tenga habilidades adecuadas de comunicación.

Reflexiona:

- ¿Cómo utilizas diariamente tus habilidades para comunicarte?
- ¿Cómo se te facilita más comunicarte con los demás, de manera oral o escrita?
- ¿Cuáles son tus fortalezas en el aspecto de la comunicación?
- ¿Cuáles son tus debilidades? ¿Cómo crees que puedes superarlas?

En el desarrollo de las ciencias, la comunicación de las observaciones, resultados y propuestas es fundamental para continuar construyendo el conocimiento. Los científicos comunican sus resultados y conclusiones de distintas maneras, por ejemplo, conferencias, congresos y, principalmente, utilizando **reportes científicos**. El reporte científico no sólo informa sobre los resultados de una investigación, sino también recopila la información previa del campo de investigación, propone nuevas ideas o modelos basados en los resultados, da cuenta de las limitaciones o problemas en la investigación, analiza los avances tecnológicos que pueden ayudar a replantear la dirección de una investigación o llevar a la resolución de un problema en particular y también plantea nuevas preguntas que surgen a partir de los datos obtenidos.

De hecho, uno de los objetivos fundamentales de la ciencia es la de dar respuesta a las preguntas surgidas de la observación, utilizando como base la literatura cercana al tema de estudio, es decir, los conocimientos que otros científicos han generado sobre el tema (Figura 1.1.).

Las hipótesis

Uno de los aspectos fundamentales para realizar una investigación es plantear una hipótesis.

Reflexiona:

- ¿Para qué crees que les sirven las hipótesis a los científicos?
- ¿En qué crees que se basan los científicos para plantear sus hipótesis?
- ¿Qué crees que ocurre cuando, después de los experimentos, la hipótesis resulta ser falsa?

Una hipótesis puede construirse en varios niveles. En su nivel más simple, es la predicción de lo que se espera que ocurra en un experimento, mientras que en niveles más complejos, las

hipótesis se utilizan para probar ideas o modelos muy sofisticados que involucran muchos experimentos y un gran equipo multidisciplinario.

En el caso del laboratorio de Bioquímica, generalmente plantearás hipótesis sencillas, es decir, deberás predecir el resultado de los experimentos que realices y fundamentar por qué piensas que ocurrirán de esa manera.

Para construir las hipótesis debes utilizar frases cortas en las que menciones las variables que se están manipulando y cómo se relacionan entre ellas, así como las mediciones que se realizarán. Las hipótesis siempre deben plantearse en términos que puedas medir, para poder decir si se cumplieron o no. Adicionalmente, la hipótesis incluye aquella información que previamente obtuvimos o conocemos respecto a la investigación, es decir, el fundamento que utilizamos para poder realizar la predicción. Para ayudarnos a construir la hipótesis generalmente se utilizan las preposiciones “**si**” y “**entonces**”. Examinemos el siguiente ejemplo:

Si sentimos que la garganta nos duele, nos planteamos:

“Si tengo dolor de garganta entonces podría deberse a que tengo una infección en la garganta debida a bacterias o virus, o bien porque gritamos mucho el día anterior”.

Sin embargo, la anterior hipótesis no toma en cuenta lo que tenemos como conocimiento previo. Al replantearla podemos decir:

“Si sé que el resfriado es contagioso y no estuve en contacto con alguien que estuviera enfermo, y además fui a un juego de fútbol en donde grité mucho, entonces es probable que esto último me causara el dolor de garganta”.

A pesar de que mejoró, la hipótesis no establece como se validará o no la predicción, es decir, no estamos proponiendo un experimento para **medir** si nuestra predicción se cumple. Entonces se podría mejorar diciendo:

“Si no tengo fiebre o síntomas de una infección en la garganta, pero sí una inflamación en la garganta, entonces el cultivo de exudado faríngeo y otros estudios clínicos darán negativo para una infección bacteriana o viral, por lo que la inflamación se deberá a un uso excesivo de las cuerdas vocales.

En resumen, la hipótesis es una parte importante en una investigación y como se mostró, debe ser cuidadosamente planteada ya que considera el problema que se está investigando, el conocimiento previo y el diseño del experimento. Adicionalmente, al contrastar la hipótesis con los resultados se llega a conclusiones válidas, que permiten replantear las hipótesis y/o reportar lo encontrado.

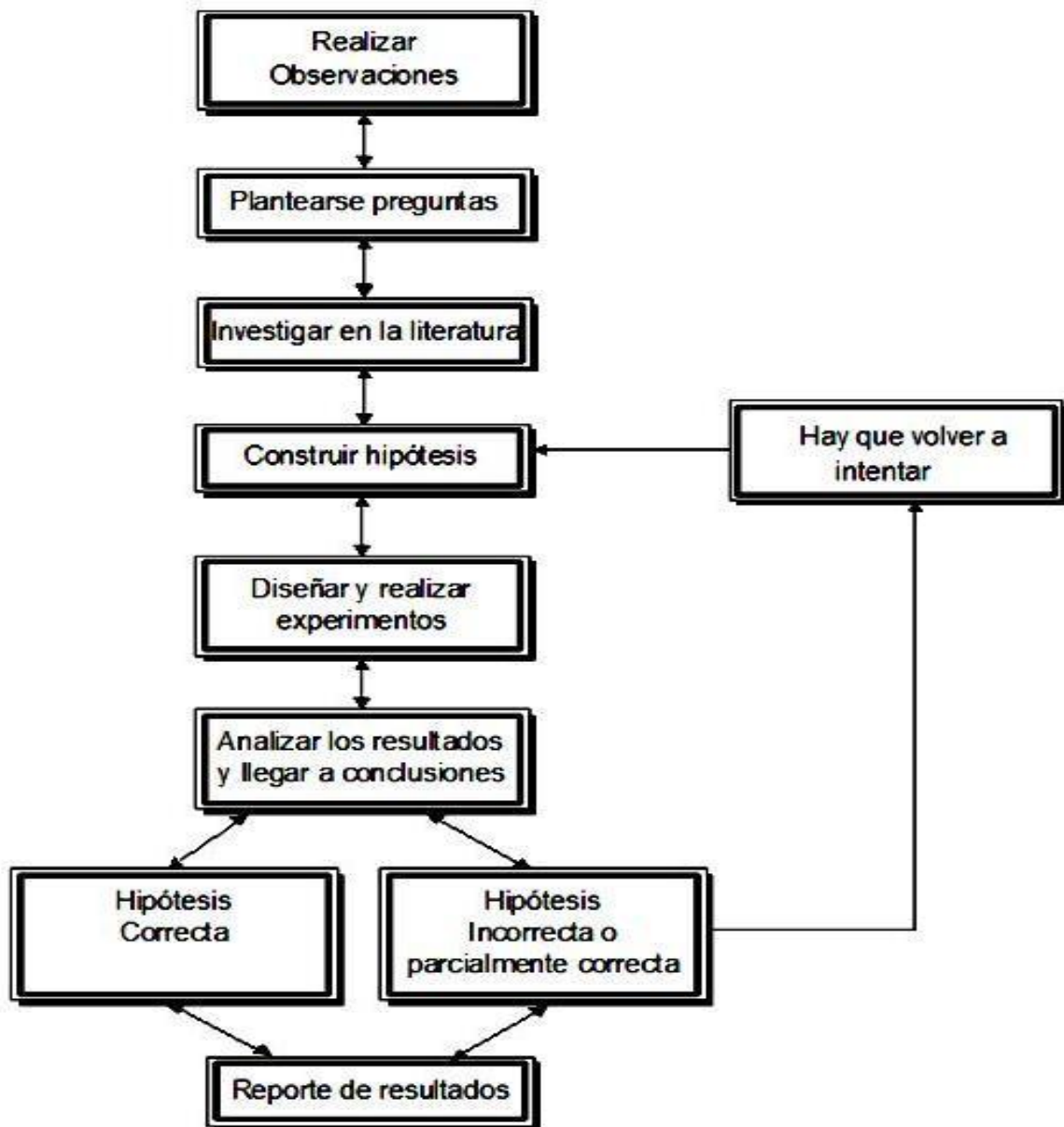


Figura 1.1. Diagrama que representa el método científico. Es importante recordar que el llamado método científico no es una serie de pasos a seguir, sino una estrategia flexible que no necesariamente debe seguir este orden. Utilizamos este esquema porque es útil para entender cómo se puede dar sentido y estructura a una investigación cuando debemos escribir un reporte científico.

Reporte científico

Como se comentó con anterioridad, el principal propósito de escribir un reporte científico es el de comunicar la información que ha sido compilada como resultado de la investigación, la experimentación y el análisis de los datos. Estos reportes generalmente se publican en revistas científicas arbitradas, es decir, en revistas en las que los científicos más reconocidos en cierto campo revisan todos los trabajos y valoran si deben publicarse o no. Los reportes científicos cubren una gran variedad de tópicos pero usualmente se enfocan en transmitir la información con un propósito claro y para una audiencia específica. Un buen reporte es un documento

preciso, objetivo y completo. Debe también estar bien escrito, claramente estructurado y ser ameno, para que el lector mantenga la atención en él. Generalmente, el valor de una investigación se evalúa a través del reporte, es decir, el reporte escrito es el único producto tangible de cientos de horas de trabajo. Es por esto que el reporte debe ser de gran calidad.

Reflexiona:

¿A qué crees que se refiere cuando se dice que un reporte científico debe ser objetivo?

Investiga:

Investiga el nombre de tres revistas arbitradas que utilicen los bioquímicos como referencia para su campo de trabajo.

Frecuentemente, los reportes presentan las siguientes secciones: resumen del contenido, introducción o antecedentes, métodos, resultados, discusión, conclusiones, recomendaciones o perspectivas y referencias. La inclusión de recomendaciones generalmente ocurre en reportes para la industria y son determinantes para la toma de decisiones por parte de los directivos. A continuación se da una breve descripción de cada una de las secciones que conforman un reporte científico.

Resumen. Su función es presentar un avance del contenido del reporte de una manera en la que el lector juzgue si le interesa leer el reporte completo. Se incluyen los antecedentes más relevantes, una frase sobre el objetivo del proyecto, una descripción corta de los métodos que se usaron, los principales resultados y las conclusiones o implicaciones de los resultados. El resumen normalmente se escribe como un solo párrafo de 100 a 200 palabras.

Introducción. Contiene la información necesaria para que el lector conozca por qué es importante el reporte, así como de qué trata. La información que se utiliza en la introducción se basa en la literatura científica publicada con anterioridad y va de lo general a lo específico, esto es, se comienza primero desde un contexto amplio del tema, lo que facilita entender los conceptos y la importancia del tópico de la investigación en un área particular de estudio. Después, se hace un resumen de investigaciones anteriores, propias o de otros investigadores (literatura específica) para ayudar a justificar la presente investigación, es decir, se le comunica al lector qué se sabe y qué no se sabe sobre el tema en cuestión. Esto lleva directamente a una sección en la que se plantean las preguntas de investigación del trabajo, es decir, las **hipótesis**. En algunas publicaciones se requiere que la parte final de la introducción contenga los **objetivos** del estudio.

Métodos. El propósito de esta sección es describir precisamente los materiales y métodos usados para realizar los experimentos, siempre con suficiente detalle para que alguien más pueda reproducirlos. Algunas veces se debe justificar por qué se usó un método en particular, ya que puede haber una variedad de métodos alternativos para responder una pregunta o investigar un fenómeno. La sección de métodos debe escribirse en pasado, ya que describe lo que se hizo.

Resultados. En esta sección se describen pero **no** se explican los resultados, es decir, sólo presenta los hechos que serán analizados posteriormente en el reporte. La sección de resultados debe ser clara y precisa y generalmente contiene figuras, como diagramas, tablas, gráficas, cuadros o mapas que pueden ser muy útiles para mostrar o enfatizar la información en un reporte. Las figuras deben ser usadas para compilar los datos de una manera ordenada, son una herramienta útil para ayudar a los lectores a entender datos complejos o numerosos.

Los investigadores deben diseñar cuidadosamente sus figuras de manera que presenten la información de manera sencilla y clara. Es esencial que las figuras estén integradas correctamente en el cuerpo del reporte, que se indiquen claramente en el texto (con la numeración asignada) cuando se mencionen y siempre deben explicarse. Un error común es mencionar la figura y sólo decir que los datos se encuentran en ella. Lo correcto es explicarle al lector cuáles datos son relevantes en la figura, cómo se relacionan dichos datos con lo descrito en otras figuras o utilizar los datos que en ella se presentan para justificar por qué se realizó el siguiente experimento que se presenta en el reporte. La descripción de esta sección al igual que la de métodos se hace en pasado.

Discusión. La sección de discusión tiene dos objetivos principales: 1) explicar los resultados del estudio con base en la literatura científica existente y 2) evaluar si lo encontrado en el estudio tiene un significado práctico, biológico, y/o está relacionado con otro fenómeno. Para ello se necesita: a) interpretar y explicar los resultados; b) evaluar si las preguntas que se plantearon en la hipótesis han sido contestadas; c) mostrar cómo los resultados de la investigación se relacionan con los que han sido reportados anteriormente; d) calificar y evaluar la importancia y significado de los resultados, esto es, si los resultados son estadísticamente significativos, o si existió algún defecto en el diseño o en el procedimiento que pudo afectar el resultado; e) plantear nuevas preguntas o determinar si se abrieron nuevas áreas de interés. La descripción de esta sección se hace en presente.

Conclusiones. Esta sección puede ser incluida como parte de la discusión o bien como una sección aparte. Establece de manera clara y concisa cuál es la relevancia del trabajo y sus implicaciones.

Referencias. Es necesario incluir una lista de referencias, las cuales deben estar citadas en el cuerpo del reporte. Las referencias se pueden colocar en una lista por orden alfabético, o numeradas de acuerdo a como fueron apareciendo en el texto. Cada referencia debe contener toda la información bibliográfica. Existen diversas formas de citar la literatura consultada, como la APA, Harvard o Chicago, entre otras. Cada publicación tiene distintos requisitos para presentar las referencias.

Referencias

- Day, Robert A. *How to Write and Publish a Scientific Paper*. 4th edition. Phoenix, AZ: Oryx Press, 1994.
- Williams, Joseph M. *Style: Ten Lessons in Clarity and Grace*. 6th edition. New York: Longman, 2000.

PARTE II: REVISIÓN DE MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS Y ELABORACIÓN DE CURVA ESTÁNDAR DE PROTEÍNA

Introducción

El espectrofotómetro es un instrumento ampliamente utilizado en el análisis cualitativo y cuantitativo de moléculas biológicas. Esto quiere decir que este instrumento nos ayuda a determinar **cuáles** sustancias (proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, entre otras), están presentes en una disolución y en qué **cantidad**. Los espectrofotómetros pueden emitir radiaciones de diferentes longitudes de onda tanto en el ultravioleta como en el visible.

Muchas sustancias absorben radiación a diferente longitud de onda (puede ser en el espectro visible o en el ultravioleta), por tanto, cuando determinamos a qué longitud de onda absorbe una sustancia desconocida, podemos tener idea de qué tipo de molécula se trata. Esta misma propiedad se utiliza para cuantificar la sustancia: a mayor cantidad de radiación absorbida, mayor concentración de ésta. Si la sustancia no absorbe radiación en el ultravioleta o el visible, puede modificarse químicamente para producir un compuesto que sí absorba en estas longitudes de onda. A este tipo de mediciones se les conoce como **indirectas**.

Leyes que rigen la espectrofotometría

Cuando un haz luminoso de intensidad P_0 pasa a través de una solución, parte de éste se absorbe, por lo tanto la intensidad de la radiación emergente P es menor al incidente P_0 . La relación entre ambos se denomina **transmitancia**, T :

$$T = P/P_0 \dots \dots \dots (1)$$

La cantidad de luz absorbida es proporcional al número N de iones o moléculas capaces de absorber energía; por lo tanto, T disminuye a medida que la concentración aumenta.

Ley de Lambert y Beer, conocida generalmente como Ley de Beer, considera que al dividirse la solución en pequeñas secciones, en cada una de ellas se absorberá una pequeña cantidad de radiación ΔP , que es proporcional a ΔN . Tomando en cuenta que N es directamente proporcional a la concentración y si la longitud por la que pasa el haz de luz (longitud de la celda) es constante, podemos llegar a la ecuación general:

$$-\log P/P_0 = abc \dots \dots \dots (2)$$

donde:

- c es la concentración
- b es la longitud de la celda o paso óptico
- a es la constante de proporcionalidad llamada absorptividad o coeficiente de extinción

La **absortividad o coeficiente de extinción** mide qué tanto una sustancia absorbe la radiación a una longitud de onda determinada. Es una característica propia de cada especie química y depende de su estructura. El valor de la absortividad para un compuesto varía con la longitud de onda.

A la relación $-\log P/P_0$ se le denomina **absorbancia** de la solución (A) y es específica para una longitud de onda dada (λ). Por tanto, la ecuación final que define a la ley de Beer queda de la siguiente manera:

$$A^\lambda = a^\lambda bc \dots \dots \dots (3)$$

Es importante mencionar que se le coloca el superíndice λ a la absorbancia A y a la constante de proporcionalidad a porque dependen de la longitud de onda (ec. 3). Si la concentración se expresa en molaridad, entonces se denomina a la constante de proporcionalidad **coeficiente de absortividad molar** o coeficiente de extinción (ϵ). Convencionalmente, el paso de la luz en las celdas de laboratorio es de 1 cm, por lo que las unidades de ϵ son $\text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$. Hay que destacar que **A** es adimensional, ya que por definición es un índice.

Podemos construir una gráfica para observar cómo varía la absorbancia de una especie en solución a una longitud de onda dada en función de su concentración. A esta gráfica se le llama **curva de calibración** o **curva estándar** y para construirla se mide la absorbancia de varias soluciones de concentración conocida, llamadas disoluciones estándar. Es una línea recta y de acuerdo con la ecuación 3 la pendiente es ϵb .

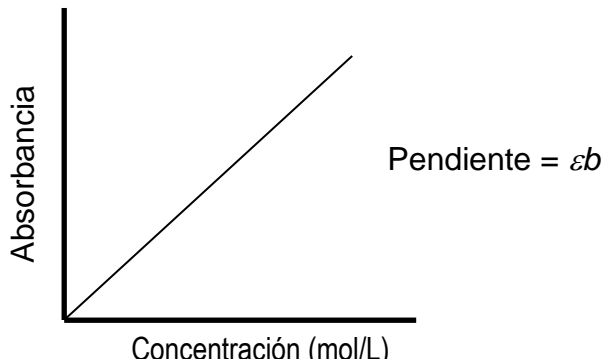


Figura 1.2. Curva estándar.

Conociendo ϵ y la longitud del paso de la luz b , la concentración de la sustancia en cualquier otra muestra puede ser determinada usando la Ley de Lambert-Beer. La cuantificación de la especie debe realizarse a la longitud de máxima absorción.

La ley de Lambert-Beer para cuantificar compuestos se utiliza de manera rutinaria en el laboratorio de bioquímica. Una de sus aplicaciones principales es para determinar la concentración de proteínas en una solución.

Determinación de la concentración de proteínas

Dos aplicaciones comunes de la determinación de la concentración de proteínas son: 1) para reportar la actividad específica de una enzima (esto es la velocidad a la que una cantidad definida de enzima forma productos o usa el sustrato por unidad de tiempo) y 2) para hacer un cargado homogéneo de proteína en geles de poliacrilamida-SDS.

Existen varios métodos para medir proteínas totales, y la elección de cuál utilizar depende de su aplicación. Por ejemplo, para el cálculo de la actividad enzimática, se requiere tener exactitud en los resultados, mientras que para colocar cantidades iguales de proteína en un gel de poliacrilamida-SDS, la precisión es más importante.

Recuerda:

¿Cuál es la diferencia entre exactitud y precisión?

Cuantificación de proteínas por el método colorimétrico de Lowry. Cuando a un péptido o proteína en disolución básica se le hace reaccionar con cobre se forma un compuesto colorido por coordinación entre los nitrógenos del péptido con el ion metálico. En el método de Lowry, el reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato) se añade para incrementar la cantidad de color desarrollado. El aumento en el color ocurre cuando el complejo de cobre tetradentado transfiere los electrones al complejo fosfomolibdato/fosfotungstato, reacción que produce una coloración azul que se lee a 750 nm. Esta reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu ocurre solamente con los residuos de tirosina y triptófano de la proteína.

La determinación de proteínas con el método de Lowry tiene varias ventajas: es un ensayo 10 a 20 veces más sensible que la medición de la absorción ultravioleta de las proteínas (280 nm), es varias veces más sensible que la detección con ninhidrina y 100 veces más sensible que la reacción de Biuret. Sin embargo, hay algunas desventajas del método como son que el color varía dependiendo de la proteína que se determina y que hay varios reactivos usados en la obtención de proteínas que interfieren con la reacción.

Referencias

- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. 1982. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Springs Harbor, NY.
- Stoscheck CM. Quantitation of Protein. 1990. *Methods in Enzymology* 182, 50-69.
- Peterson GL. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 83, 346-356.
- Wang Y, [Wade](#) H, [Wong](#) E-T, [Li](#) YC, [Rodewald](#) LW, [Wahl](#) GM 2007. Quantitative analyses reveal the importance of regulated Hdmx degradation for P53 activation. *PNAS* 104 (30), 12365-12370.

2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE PROTEÍNAS.

Purificación de la enzima lactato deshidrogenasa de músculo esquelético de pollo. PARTES I Y II DEL PROTOCOLO.

Introducción

Todos los tejidos contienen miles de proteínas que difieren en tamaño, forma y carga. Algunas tienen actividad enzimática y otras cumplen otras funciones (por ejemplo, estructurales). Una condición esencial para el estudio de la estructura y función de una proteína específica es su purificación a partir de los tejidos. Hay varios aspectos que deben considerarse para seleccionar un método para purificar una proteína, como por ejemplo, para qué se usará la proteína (e.g. si es una enzima, si determinaremos su actividad, o si queremos conocer la secuencia de sus aminoácidos o su conformación en el espacio), cuáles son sus características (tamaño, carga, solubilidad, hidrofobicidad y función biológica), la cantidad que se requiere purificar y el costo. Por lo tanto, no hay un procedimiento único para la purificación de proteínas, aunque sí podemos seguir una guía básica para realizar la purificación de forma sistemática. Dicha guía toma en consideración lo siguiente:

- A. **Definir los objetivos de la purificación.** Grado de pureza, cantidad y nivel de actividad requeridos.
- B. **Seleccionar la muestra biológica de inicio.** Dependerá de la localización de la proteína, puede estar tanto en compartimentos extracelulares o intracelulares.
- C. **Desarrollar una técnica de análisis.** Esta técnica se utilizará para la determinación rápida de la pureza, actividad o contenido total de proteína. Un método frecuentemente utilizado para evaluar la pureza es la separación de la proteína mediante electroforesis, que se detallará más adelante.
- D. **Minimizar la manipulación de la muestra.** Evitar los procedimientos largos, ya que se corre el riesgo de perder la actividad biológica de la proteína y/o reducir el rendimiento.
- E. **Remover los posibles contaminantes al inicio del proceso.** Un ejemplo son las proteasas, que pueden degradar la proteína de interés.
- F. **Reducir el uso de aditivos.** El uso de muchos y diversos aditivos como sales y amortiguadores en cada paso puede llevar a la pérdida de la actividad de la enzima y aumentar los costos de la purificación. Se deben seleccionar y usar sólo los aditivos necesarios.
- G. **Usar una técnica diferente en cada paso.** Esto es porque la sucesiva repetición de un mismo paso no mejora la pureza de la preparación pero sí disminuye el contenido proteico. Para seleccionar la técnica adecuada en cada paso se deben tomar en cuenta las propiedades fisicoquímicas de la proteína como tamaño, carga, hidrofobicidad y especificidad por ligandos.
- H. **Minimizar el número de pasos.** En cada paso de purificación se pierde proteína y tiempo. Generalmente se utilizan entre 5 y 8 pasos de purificación para obtener un enriquecimiento alto de la preparación proteica.

Un protocolo típico de purificación de una proteína intracelular utiliza varias técnicas (detalladas más adelante), que pueden incluir:

- 1ª fase:** Ruptura de las membranas celulares, centrifugación diferencial o centrifugación usando gradiente de densidad (para separar proteínas de las partículas subcelulares, o bien, de agregados de diferente peso molecular).

2ª fase: Puede incluir la precipitación selectiva de proteínas por la adición de sales o disolventes miscibles en agua.

3ª fase: Se remueven las proteínas contaminantes utilizando la separación basada en la carga, tamaño y afinidad de la proteína.

A continuación se describen brevemente las tres fases del proceso y algunas técnicas para purificar una proteína.

SELECCIÓN DE LA FUENTE DE LA PROTEÍNA. Las fuentes de la proteína pueden ser muy variadas: microorganismos, tejidos, cultivos celulares, células transformantes¹, entre otras. La elección de la procedencia de la proteína debe basarse en criterios tales como el tipo de proteína, la facilidad para obtener cantidades suficientes de biomasa, la cantidad de la proteína de interés en el tejido o célula, y cualquier propiedad peculiar de la proteína escogida (como su carga, masa o afinidad por ciertos sustratos), que ayudará en su estabilización y su aislamiento. En algunos casos, el investigador necesita forzosamente utilizar un tejido en particular, aún cuando la cantidad del tejido y de la proteína es escaso. La recomendación para estos casos es realizar un ensayo piloto con una fuente de proteína distinta a la requerida, pero que tenga propiedades similares.

PRIMERA FASE.

El objetivo inicial de la purificación es la obtención del homogeneizado o extracto crudo y su clarificación o concentración. La **homogeneización** es un proceso donde las células y los tejidos son lisados o rotos en fragmentos lo suficientemente pequeños para dar lugar a una suspensión uniforme y estable llamada **homogeneizado**. Los equipos con los que se realiza la homogeneización son diversos y comprenden desde el mortero hasta las ondas ultrasónicas pasando por la licuadora. El método a utilizar para obtener el homogeneizado depende de la dificultad que presente el material biológico para romperse. Igualmente importante al método de homogeneización es la selección de la solución de homogeneización, puesto que será el medio al que estará expuesta la proteína y en el que se pueden adicionar componentes para ajustar el pH, la fuerza iónica, inhibidores de proteasas o algún estabilizador de la proteína.

Posteriormente, para eliminar los contaminantes o clarificar la muestra se puede recurrir al proceso de **centrifugación**. La centrifugación utiliza la fuerza de gravedad para separar los diferentes componentes del homogeneizado (como restos de tejido u organelos, por ejemplo), basándose en su tamaño, forma y densidad. Después de la centrifugación, algunas de las partículas más pesadas, que normalmente permanecían en suspensión, se sedimentan.

Es importante conocer la fuerza centrífuga a la que someteremos la muestra, ya que de ésta depende el tamaño (o la densidad) de los componentes que se sedimentarán y los que quedarán en suspensión. La fuerza centrífuga relativa (RCF) se calcula con la siguiente ecuación:

$$RCF = 1.12r \left(\frac{RPM}{1000} \right)^2$$

Donde RPM son las revoluciones por minuto de un rotor con un radio r (expresada en mm). El radio usado es la distancia del centro del eje del rotor a la posición intermedia del tubo.

¹ Células a las que se les introdujo un gene que codifica una proteína proveniente de otro organismo, a través del uso de técnicas de biología molecular. Ver sección 4 del manual.

La fuerza centrífuga creada puede ser tan pequeña como 600 Xg (600 veces la gravedad) o tan grande como 300,000 Xg. En el primer caso se sedimentan fragmentos de tejido, células intactas y núcleos, entre otros. Si la fuerza aplicada es intermedia (13,000 Xg), podemos separar los organelos celulares y, cuando la fuerza es muy grande (100,000 Xg), la mayor parte de las moléculas solubles que componen el citosol permanecen en solución y las moléculas aglomeradas en las membranas sedimentan (denominada fracción microsomal). Como puedes ver, dependiendo de la fuerza aplicada, la sedimentación varía. Esto implica que podemos realizar un proceso llamado centrifugación diferencial, en el que el homogeneizado se somete a una serie de centrifugaciones a distintas fuerzas para ir desechando gradualmente los contaminantes de la muestra y avanzar en la purificación de la proteína de interés.

Investiga:

Busca el diagrama de una centrífuga de laboratorio y señala cuáles son sus partes.

SEGUNDA FASE

El objetivo principal es remover los contaminantes más pequeños, de una forma específica. Éstos pueden ser proteínas, ácidos nucleicos, toxinas y virus. Uno de los métodos más utilizados para eliminar proteínas contaminantes es la precipitación. Para que una proteína precipite debemos modificar el ambiente que le rodea, debido a que los grupos cargados en la superficie de una proteína pueden interaccionar tanto con las moléculas de agua como con los iones que se encuentran en solución. Existen varias estrategias para precipitar a las proteínas tales como cambio de pH, incremento en la temperatura, adición de disolventes, de moléculas cargadas, etc. El método más comúnmente empleado es la **precipitación por salado** con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Las proteínas globulares aumentan su solubilidad al incrementar la concentración de iones, fenómeno denominado de “**salting in**”. Pero cuando se eleva en exceso la concentración de iones, disminuye la solubilidad de las proteínas y precipitan (“**salting out**”). La mayor parte de las proteínas presentan en su superficie una capa de agua (capa de solvatación) que al incrementar la concentración de los iones disminuye. El mecanismo de salting-out se basa en la exclusión del cosolvente, es decir la sal establece puentes de hidrógeno con el agua y al hacerlo sustrae el agua de la proteína. Por lo anterior, la conformación de la proteína se modifica para evitar la exposición de sus residuos apolares con el solvente, dando como resultado nuevas interacciones y por lo tanto lleva a la formación de plegamientos o asociaciones nuevas que pueden llevar a su precipitación. El método del salting out es uno de los más utilizados en la purificación de proteínas, ya que permite deshacerse de una gran cantidad de contaminantes de una forma económica. Es por esto que se han diseñado tablas y fórmulas en las que se pueden determinar las cantidades de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido o en solución, que se deben añadir a una mezcla de proteínas para obtener una concentración dada de sal. La precipitación de una proteína a una concentración dada de sal depende las propias características iónicas y de contenido de residuos polares, por lo que cada proteína precipita a cierta concentración y tipo de sal. Para establecer está concentración se deben de realizar pruebas. Además, se tiene que determinar si la proteína permanece activa o pierde su actividad biológica al ser precipitada.

Después de la precipitación hay que retirar el agente precipitante, que es comúnmente la sal. Una manera es diluir la solución para reducir la concentración del compuesto, otras formas

pueden ser la diálisis, la ultrafiltración o bien, el paso por una columna de exclusión molecular. A continuación se describen brevemente estas técnicas.

La **diálisis** suele llevarse a cabo colocando la muestra en un tubo de diálisis, que es una membrana semipermeable de celulosa o celofán con un tamaño de poro determinado. Se coloca la muestra dentro del tubo de diálisis y éste se sumerge en una solución que contiene al menos 30 veces más volumen que la muestra a dializar. Lo anterior aumenta las probabilidades de que la alta concentración de sal en el tubo migre hacia la solución en la que se encuentra bañada el tubo y cuando se alcance el equilibrio, la concentración de sal en la muestra y la solución de diálisis sea muy baja. Existen dos desventajas de la diálisis: el costo de la membrana de diálisis y que el proceso incluye la agitación del tubo de diálisis a 4°C durante toda la noche.

Por su parte, **la filtración en gel** no tiene el problema del tiempo. Una columna empacada con Sefadex-G25[®] puede usarse para eliminar moléculas de peso molecular menores a 5000 daltones. La muestra se coloca en la columna, y al añadir el amortiguador de elución, las moléculas de menor tamaño se meten entre los poros de la matriz de Sefadex y se retienen allí, mientras que las grandes no se retienen y salen más rápidamente de la columna. Posteriormente eluyen o salen las de peso molecular menor. En un simple paso la muestra se desala, concentra, cambia de amortiguador y pierde proteínas o moléculas contaminantes.

Investiga:

- ¿Cómo es un equipo para diálisis?
- ¿Qué es el Sefadex-G25[®] y cuáles son sus propiedades?
- ¿Cómo es una columna de filtración en gel?
- ¿Qué es un amortiguador de elución?
- ¿Qué significa *eluir*?

Dibuja:

¿Cómo te imaginas que ocurre la filtración en gel a nivel microscópico? Dibuja la matriz de Sefadex con sus poros, las moléculas grandes y las pequeñas y cómo salen éstas de la columna.

TERCERA FASE

El objetivo de esta fase es obtener una proteína pura o con mínimas trazas de contaminantes proteicos. Para alcanzar el objetivo se utilizan uno o la combinación de varios métodos cromatográficos, como la cromatografía de exclusión molecular, de intercambio iónico, interacción hidrofóbica y de afinidad. A continuación sólo se describen las dos técnicas que se usarán en el laboratorio.

La **cromatografía de intercambio iónico** es una técnica que separa las biomoléculas de acuerdo con su carga. Los grupos cargados sobre la superficie de una proteína interaccionan con los grupos con carga opuesta de la fase estacionaria.

La purificación de proteínas con este tipo de cromatografía se basa en que la carga electrostática de las proteínas depende del pH en el que se encuentran. El pH en el que se iguala el número de cargas positivas y las negativas se llama **punto isoeléctrico** o pI y es

diferente para cada proteína. A valores de pH menores al pI, la carga neta de una proteína es positiva, por lo que puede unirse fuertemente a una resina con cargas negativas o **intercambiador catiónico**. Por el contrario, a un pH mayor al pI, la proteína tendrá carga negativa y será capaz de unirse a intercambiadores de tipo aniónico que contienen grupos cargados positivamente (Figura 2.1). Cuando una proteína tiene muchas cargas positivas o negativas, la fuerza con que se une a la columna es mayor que si tiene pocas cargas. Para eluir a la proteína de interés se utilizan soluciones que modifican el pH o la concentración de sales en la resina. Estas sales también pueden interactuar con la resina, reemplazando a las proteínas que están adheridas a ella. Debido a que la separación de las proteínas de la matriz utilizando sales ocurre en orden de menor a mayor fuerza de unión (dependiendo de qué tan cargada esté la proteína), es común eluir a las proteínas usando un gradiente de concentración de sales en orden creciente de concentración.

Reflexiona:

¿Por qué una proteína tiene cargas positivas a $\text{pH} < \text{pI}$?

¿Por qué una proteína tiene carga negativa a $\text{pH} > \text{pI}$?

Dibuja lo que crees que ocurre con las proteínas en ambas condiciones.

Dibuja cómo crees que la sal reemplaza a una proteína con muchas cargas positivas y a otra con pocas cargas positivas durante la elución. ¿Cuál sale primero?

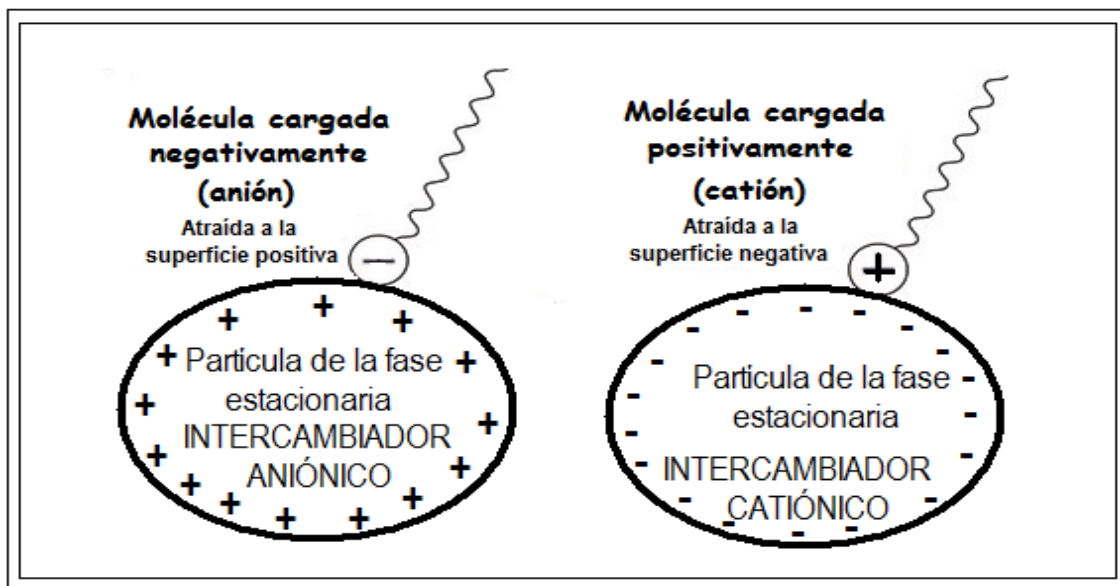


Figura 2.1. Separación por cromatografía de intercambio iónico. Los soportes o resinas de cromatografía pueden estar cargados positiva o negativamente. De esta carga depende cuáles son las moléculas que interaccionarán con la resina.

Cromatografía de afinidad. Si la proteína a purificar tiene una afinidad específica por un ligando como un cofactor, un anticuerpo o un ion metálico, esa propiedad puede usarse para purificarla. Por ejemplo, para purificar a una deshidrogenasa es común usar al cofactor de la enzima, el NAD^+ o bien un compuesto que presente alguna similitud a éste (Figura 2.2). Cuando la muestra atraviesa la columna de afinidad, la proteína de interés se unirá al ligando, mientras que el resto saldrá de la columna. Este tipo de separación, basada en el reconocimiento biológico, es muy específica y elimina muchos contaminantes.

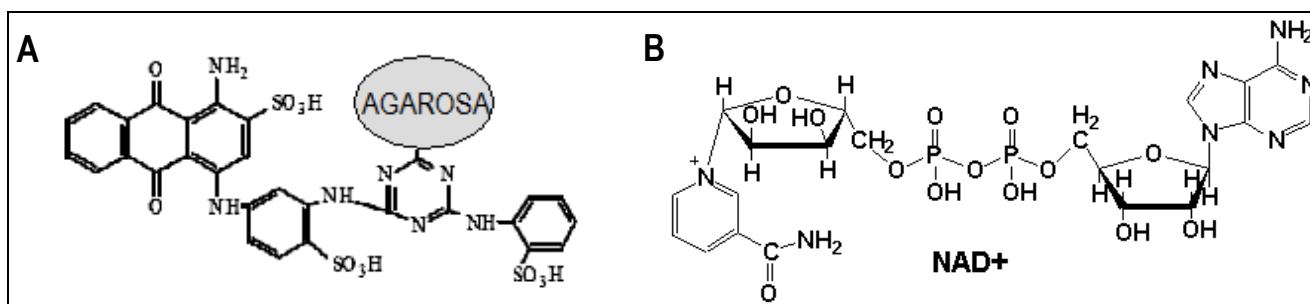


Figura 2.2. Comparación entre las moléculas de Cibacrón blue 3GA y el NAD⁺. **A)** Los colorantes de triazina como el Cibacrón blue 3GA son comúnmente acoplados a resinas de agarosa para utilizarse en ensayos de purificación por cromatografía de afinidad. La molécula es estable, fácil de remover, barata y varias compañías las tienen disponibles para realizar purificaciones de proteínas que unen nucleótidos de piridina **B)** NAD⁺.

Referencias

- Allen T, Mark W. 2004. Desalting, Concentration, and Buffer Exchange by dialysis and ultrafiltration. Current protocols in protein science 4.4.1-4.4.15. John Wiley & Sons Inc, New York, USA.
- Castle DJ. 2004. Overview of cell fractionation. Current protocols in protein science 4.1.1-4.1.9. John Wiley & Sons Inc, New York, USA.
- Devlin TM. Textbook of biochemistry with clinical correlations. Cuarta edición. 1997. John Wiley & Sons Inc, New York, USA. Pp 69-85. Localización **QP514.T4**
- Protein purification Handbook. 1999. Amhersham Pharmacia Biotech AB. Uppsala, Sweden. Code number 18-1132-29 Pp 94.
- Salem J. 2001. Enzymes: purification. Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons Ltd. Pp 1-7. Consultar la página www.els.net
- Sheehan D, O'Sullivan S. 2001. Ion exchange chromatography. Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons Ltd. Pp 1-4. Consultar la página www.els.net
- Voet D, Voet JG. Biochemistry. Segunda edición. 1995. John Wiley & Sons Inc, New York, USA. Pp 71-104
- Sitio del que se tomo parte de la metodología para la extracción de la lactato deshidrogenasa de pollo http://www.acad.carleton.edu/curricular/BIOL/classes/bio380/lab_protocol.html autor: John Tymoczko y actualizada por Rebecca Bryant

Sitios recomendados para

1. Aprender sobre las características y propiedades de las proteínas
<http://depa.pquim.unam.mx/proteinas/estructura/index.html> página desarrollada por el Dr. Rogelio Rodríguez Sotres.
2. Calcular la concentración de sulfato de amonio a añadir a una muestra.
<http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>
<http://www.proteinchemist.com/cgi-bin/s2.pl>
3. Calcular la fuerza centrífuga de un rotor. Convierte rpm a Xg o viceversa.
<http://www.gmi-inc.com/archivedpages/Rotor%20RCF%20Calculator.htm>
4. Macro-Prep Ion Exchange Supports. Instruction manual (2000). Biorad www.bio-rad.com
5. Aprender sobre cromatografía
<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cromatografia.htm>
6. Realizar una autoevaluación sobre los fundamentos de la cromatografía
http://www4.ujaen.es/~acarrera/TBQ_HotPot/T3_TBQ_VF/T3_TBQ_VF.htm

Parte III. Monitoreo del proceso de purificación.

A. Determinación de la concentración de proteínas

Introducción

Para evaluar de manera cuantitativa el éxito de una purificación de proteínas es necesario conocer dos parámetros en cada paso del proceso de purificación: el **rendimiento** y el **grado de pureza**.

El **rendimiento** es un parámetro expresado en porcentaje que se obtiene de medir la actividad biológica de la proteína de interés en cada paso de la purificación. El 100% corresponde a la actividad del extracto inicial.

El **grado de pureza** se refiere al incremento en pureza a lo largo del proceso. Este valor se obtiene de dividir la **actividad específica** de cada paso entre la actividad específica del paso inicial de purificación. El índice da el valor de 1 para el extracto inicial.

Para obtener el valor de la **actividad específica** (que se encuentra generalmente expresado en **Unidades/ mg proteína**) es necesario contar con **a)** una técnica que determine la concentración de proteínas totales en la muestra, y **b)** una técnica que específicamente detecte o mida la cantidad de la proteína blanco o de interés (unidades de actividad). En casos raros, la proteína blanco es fácil de detectar, porque es colorida (mioglobina), porque es fluorescente (proteína verde fluorescente) o porque tiene propiedades espectroscópicas características. Cuando la proteína es una enzima, como la lactato deshidrogenasa, se puede realizar un ensayo enzimático específico para determinar si estamos llevando a cabo la purificación de manera adecuada. Esta actividad se realizará en el curso y se encuentra descrita en la sección 3 del manual. Para las proteínas que no son enzimas, el ensayo se basa en medir la actividad biológica de la proteína (si existe interacción proteína-proteína pueden determinarse cambios espectroscópicos intrínsecos a las proteínas involucradas o bien de moléculas unidas covalentemente como fluoróforos) o bien en la detección de la proteína con anticuerpos (si éstos están disponibles).

En esta sección se realizará la determinación de proteínas de cada una de las fracciones obtenidas durante el protocolo de purificación de la lactato deshidrogenasa de músculo esquelético de pollo. Este paso es necesario para determinar la actividad específica de la proteína de interés. Además debemos conocer la concentración de proteínas porque llevaremos a cabo el corrimiento electroforético de todas las fracciones obtenidas de la purificación y debemos colocar cantidades iguales de proteína en el gel para llevar a cabo la comparación.

Investiga:

¿Qué es un fluoróforo?

A continuación se da una breve explicación del fundamento de la determinación de proteínas por absorbancia a 280 nm y por un método colorimétrico como es el método de Bradford.

Cuantificación de proteínas por medición de absorbancia a 280 nm.

El uso de la absorbancia en la región ultravioleta para medir la concentración de proteína es posiblemente el método más simple y rápido para determinar la concentración de proteínas, aunque puede producir resultados poco exactos, sobre todo cuando se tiene una mezcla de proteínas y ácidos nucleicos. Sin embargo, las ventajas de emplearlo son: a) la muestra no se

destruye durante la determinación; b) no es necesario producir una curva de calibración; c) no utiliza reactivos adicionales; y d) no requiere esperar tiempos de incubación. Se debe contar con un espectrofotómetro que mida en el intervalo de longitud de onda del UV y con celdas de cuarzo o metacrilato grado UV o poliestireno grado óptico.

La cuantificación de proteína por la medida de la absorción a 280 nm depende de la presencia de los aminoácidos aromáticos tirosina (Tyr) y triptófano (Trp). Un alto orden de estructuración o plegamiento de la proteína puede modificar la contribución de estos aminoácidos en la absorbitividad molar del péptido o proteína y, en consecuencia, la absorbancia es sensible a cambios en el pH y fuerza iónica del medio. El uso más común del ensayo de absorbancia es el monitoreo de las fracciones provenientes de las cromatografías, o cuando se requiere una estimación rápida de la concentración de proteínas aún cuando no sea exacta.

Para calcular la concentración de proteínas de la muestra se usará la ecuación de Lambert y Beer y el coeficiente de extinción molar de la albúmina de suero bovino (BSA). Dependiendo en qué unidades se desee expresar la concentración se empleará un valor diferente de coeficiente de extinción, por ejemplo, para darlo en molaridad se emplea $43\,824\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$; cuando se desea reportar en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ se usa el coeficiente de extinción dado en porcentaje (ϵ en la ecuación 4), que es de 6.6 para una solución de BSA al 1% (10 mg/mL) y se emplea la fórmula 4 para determinar la concentración de la muestra.

$$\text{Concentración } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \left(\frac{\text{Abs}_{\lambda 280\text{nm}}}{\epsilon (\%)} \right) * 10 \quad (4)$$

Cuantificación de proteínas por un método colorimétrico.

La **determinación de proteínas por el método de Bradford** es ampliamente usada ya que es simple, rápida, barata y sensible. Es necesario construir una curva de calibración para determinar la concentración de las muestras. El método se basa en la unión específica del colorante azul de Coomassie brillante G250 (CBBG) a los residuos de Arg, Trp, Tyr, His y Phe de las proteínas. El CBBG se une a los residuos de las proteínas produciendo una absorbancia máxima a 595 nm, mientras que el colorante libre tiene una absorbancia máxima a 470 nm. A diferencia del método de Lowry (otra técnica colorimétrica para determinar proteínas) que es muy sensible a la composición de la solución que acompaña a las proteínas, el método de Bradford sólo es afectado por algunos detergentes. Una de las desventajas de este método es que el colorante CBBG se une fuertemente a las celdas de cuarzo. Por esto se recomienda usar celdas de vidrio o de polipropileno. Al usar celdas de polipropileno se facilita su limpieza con un poco de alcohol.

Referencias

- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. 1982. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Springs Harbor, NY.
- Stoscheck CM. Quantitation of Protein. 1990. *Methods in Enzymology* 182, 50-69.

Página web para consultar métodos para determinar proteínas:

<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/protcurve.html>

Parte III. Monitoreo del proceso de purificación.

B. Separación de las proteínas en gel de poliacrilamida-SDS

Introducción

La **electroforesis** de proteínas en geles de poliacrilamida es una herramienta analítica indispensable y rutinaria en un laboratorio de Bioquímica. La electroforesis puede usarse para separar y comparar una mezcla compleja de proteínas, evaluar la pureza de una proteína durante el proceso de aislamiento y permite conocer algunos valores aproximados de las características fisicoquímicas de las proteínas como la composición de subunidades, punto isoeléctrico, tamaño y carga.

Reflexiona:

¿Por qué en un pH cercano a 9.0 las proteínas tienen mayoritariamente carga negativa?

Investiga:

¿Qué es el SDS? ¿Por qué se uniforman las cargas de las proteínas cuando se emplea?

En la electroforesis, la migración de las partículas o moléculas cargadas ocurre cuando se establece un campo eléctrico. La velocidad de la migración depende de la fuerza del campo eléctrico aplicado y de la carga neta de las moléculas a separar. La muestra se encuentra disuelta en una disolución llamada **amortiguador de corrida**; cuando éste se encuentra en un pH cercano a 9.0, la mayor parte de las proteínas se encontrarán cargadas negativamente, por lo que al aplicar el campo eléctrico migrarán al ánodo. En condiciones normales, la migración diferencial de las proteínas dependerá tanto de la carga como del tamaño y estructura de la proteína, pero cuando se trata de un gel en el que se ha incluido un agente desnaturante como el dodecil-sulfato de sodio (SDS), se pierde la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas y se uniforman sus cargas, por lo que la migración sólo depende de su peso molecular.

Existe una gran variedad en la composición de los geles, que responde a las necesidades de separación de diferentes mezclas de proteínas. En este caso se utilizará la electroforesis en **geles de poliacrilamida-SDS** para evaluar el proceso de purificación de una proteína. El gel de poliacrilamida se prepara a partir de las reacciones entre los radicales libres de los monómeros de la acrilamida. Las cadenas de poliacrilamida se entrecruzan con la N,N'-metileno bisacrilamida para formar una red. La tetrametiléndiamina o TEMED es el agente iniciador de la polimerización y el ion persulfato ($S_2O_8^{2-}$) realiza la función de catalizador favoreciendo la formación de radicales libres. En un gel de poliacrilamida-SDS, las proteínas pequeñas viajan más rápido que las de mayor tamaño, porque el tamaño del poro del gel entorpece el paso de las proteínas de mayor peso molecular.

Referencias

- Bradley JSCO, Markwell J. 2007. Assay for determination of protein concentration. Current protocols in protein science 3.4.1-3.4.29.
- Devlin TM. Textbook of biochemistry with clinical correlations. Cuarta edición. 1997. John Wiley & Sons Inc, New York, USA. Pp 69-85. Localización **QP514.T4**
- Reiner W. 2005. Gel electrophoresis. John Wiley & sons, Ltd. www.els.net
- Voet D, Voet JG. Biochemistry. Segunda edición. 1995. John Wiley & Sons Inc, New York, USA. Pp 71-104

3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

PARTE I: CURVAS TEMPORALES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA LACTATO DESHIDROGENASA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE POLLO.

Introducción

Las enzimas son **catalizadores proteicos** que aceleran la velocidad de una reacción y no se consumen o modifican durante ésta. Sin su presencia muchas de las reacciones bioquímicas celulares no podrían proceder a la velocidad requerida o incluso no se llevarían a cabo. La velocidad de reacción en presencia de las enzimas se incrementa de 10^6 a 10^{12} veces con respecto a la reacción en ausencia de éstas. Otra propiedad de las enzimas es su alto grado de **especificidad**, es decir, solamente catalizan la reacción en la que participa un sustrato determinado (**especificidad absoluta**) o un grupo de sustratos con ciertas características químicas y geométricas comunes (**especificidad de grupo**).

La enzima, al ser una proteína, tiene una estructura geométrica característica y la porción de la enzima que específicamente une o reacciona con el sustrato se denomina **centro catalítico** o **sitio activo**. Muchas enzimas catalizan las reacciones utilizando únicamente los residuos de aminoácidos de su sitio activo, pero para otras es indispensable que se unan a un **cofactor**, que es un ion metálico como el Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mo^{2+} para llevar a cabo la catálisis. Otras enzimas necesitan una **coenzima**, es decir una molécula orgánica con características no proteicas, que generalmente se sintetiza a partir de vitaminas. La coenzima funciona como un **cosustrato**, ya que se une transitoriamente al sitio activo de la enzima y se libera al medio durante cada ciclo catalítico. Éste es el caso de las deshidrogenasas, como la que purificaste anteriormente y con la que trabajarás en esta práctica, cuya coenzima es el NAD^+ . Algunas coenzimas no se liberan durante el sitio catalítico y se unen fuertemente a la enzima, ya sea por medio de enlaces covalentes o interacciones no covalentes, en este caso se les da el nombre de **grupo prostético**.

Diseño de un ensayo enzimático

Durante el aislamiento y purificación de una enzima es necesario realizar un ensayo para determinar la cantidad y pureza de la misma, así como evaluar sus características cinéticas, es decir la velocidad con la que se lleva a cabo la reacción en distintas condiciones. Para el diseño de un ensayo enzimático se requiere conocer la reacción que se analiza, es decir: a) cuáles son las especies que se requieren (sustrato, coenzimas, cofactores, entre otros); b) la estequiometría de la reacción completa; y c) los efectos del pH, temperatura y fuerza iónica sobre la actividad de la enzima.

Adicionalmente, se debe contar con un método para identificar y monitorear el progreso de la reacción. Esto se puede llevar a cabo monitoreando los cambios físicos, químicos o biológicos que ocurren durante la conversión del sustrato a producto. Para determinar los cambios en las concentraciones de sustrato o producto se pueden utilizar distintas técnicas, como la espectrofotometría, la fluorometría, la titulación ácido-base y el conteo radiactivo. La elección de la técnica de detección depende esencialmente de las características estructurales del sustrato y/o producto, así como de la química de la reacción (modificación del pH por efecto de la actividad de la enzima, reversibilidad de la reacción, la influencia del o los productos de la reacción, entre otros).

La **cinética química** es el estudio de la velocidad a la cual una reacción ocurre y de los factores que la alteran. En la cinética enzimática la velocidad, habitualmente denominada **actividad enzimática**, involucra el seguimiento de la concentración del sustrato o producto que usa o forma, respectivamente la enzima durante un intervalo de tiempo. Este ensayo de actividad se denomina **ensayo cinético** (Figura 3.1). También es factible realizar la determinación de la

actividad de una enzima a un único tiempo determinado, midiendo la concentración del sustrato o producto después de incubar a la enzima en un medio de reacción por el tiempo que nosotros decidimos, éste se denomina **ensayo a tiempo fijo**.

Cuando se realizan ensayos temporales o cinéticos se obtienen gráficos que presentan por lo general tres fases (Figura 3.1). La primera fase ocurre generalmente durante el primer segundo. En esta fase, denominada transitoria, suelen ocurrir las reacciones de formación del o los intermediarios de vida corta, y se puede evaluar incluso lo que ocurre en el primer ciclo catalítico de la enzima. Como esta fase es tan corta, su análisis requiere la utilización de técnicas especiales de mezclado y detección rápida de sustratos o productos como son la espectroscopia de flujo detenido (stopped-flow), la química de apagamiento en flujo (chemical quench-flow) y la fotólisis óptica.

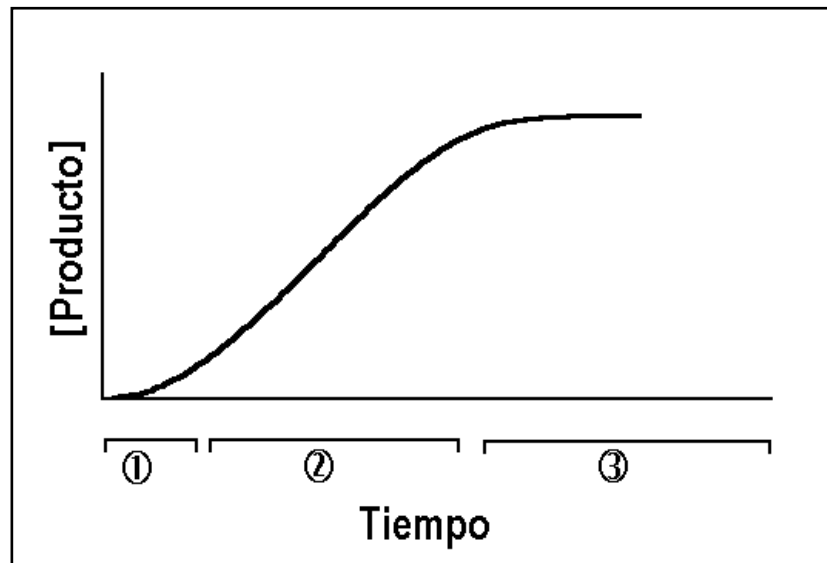


Figura 3.1 Curva temporal de formación de producto en una reacción enzimática. La acumulación de producto generalmente presenta tres fases. La fase 1 no dura más de 1 segundo, la fase 2 corresponde a la fase de velocidad inicial y la fase 3 en la que ya se empieza a acumular el producto y/o a acabar el sustrato.

En la segunda fase, denominada fase de **velocidad inicial**, la concentración de producto se incrementa linealmente conforme el tiempo transcurre (Figura 3.1). La velocidad inicial de una reacción ocurre en los primeros minutos de la reacción; una relación lineal que se mantiene cuando el consumo de sustrato no va más allá del 5% de la concentración inicial. Esta fase es en la que se enfoca la mayor parte de los estudios cinéticos y es la que seguiremos en el experimento de curvas temporales de actividad de la lactato deshidrogenasa. Por último, la fase 3 se produce generalmente debido al decremento en la concentración de sustrato, aunque también puede ocurrir la desnaturalización de la enzima o su inhibición causada por la alta concentración de producto de la reacción. En esta fase la concentración de producto no cambia con respecto al tiempo.

Lactato deshidrogenasa

La lactato deshidrogenasa o LDH es una L-lactato: NAD⁺ oxidoreductasa, y su clasificación es EC 1.1.1.27. Es una enzima importante en el metabolismo anaerobio de la glucosa para la regeneración del ATP. La actividad de la LDH es alta durante la actividad física intensa, cuando la tensión de oxígeno disminuye y la demanda de ATP es alta. Bajo condiciones aerobias, la

enzima cataliza de manera reversible la conversión de lactato a piruvato (Figura 3.2). Cuando disminuye el O₂ celular o bien el pH es cercano a 7.0, la enzima cataliza la reacción reversa, es decir, el piruvato es convertido a lactato con la concomitante conversión de NADH a NAD⁺. La regeneración del NAD⁺ permite que el flujo de la vía glucolítica continúe. Cuando la demanda de energía cesa o cuando se acumula una gran cantidad de lactato, la actividad de la enzima, que cataliza la reacción de piruvato a lactato, disminuye.

Investiga

¿A qué se refiere la cita EC 1.1.1.27?

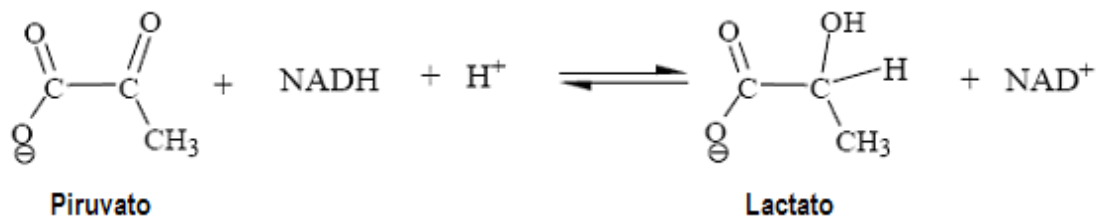


Figura 3.2. Reacción que cataliza la lactato deshidrogenasa. La reducción del piruvato para formar lactato es reversible y dependiente de la presencia de una coenzima.

La LDH es un tetrámero cuyas subunidades tienen un peso molecular de 35 kDa cada una. Existen varios tipos de LDH, dependiendo del tipo de subunidades que las conformen. Hay dos tipos de subunidades, la **H** que predomina en el corazón y la **M** que predomina en el músculo y el hígado. Las subunidades se pueden asociar formando 5 tipos de tetrámeros con estequiometrías distintas: H₄, H₃M₁, H₂M₂, H₁M₃ y M₄. Todas estas tienen actividad de LDH, pero tienen diferentes afinidades por el lactato o el piruvato. Las enzimas que catalizan la misma reacción pero difieren en su estructura son llamadas **isoenzimas**.

PARTE II. FACTORES QUE MODIFICAN LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO Y DE UN INHIBIDOR.

Introducción

El término **cinética enzimática** implica el estudio de la velocidad de una reacción catalizada por una enzima y los efectos que pueden tener factores como los inhibidores. Uno de los principales estudios que se realizan en una enzima es medir el efecto en la velocidad de la reacción cuando se modifican las concentraciones del sustrato y se mantienen constantes la concentración de enzima, el pH, la fuerza iónica del medio, la temperatura, entre otros. Se evalúa la influencia de estos factores en la reacción catalizada por enzimas con la finalidad de determinar los intermediarios en una reacción y el papel que juegan en la reacción enzimática, es decir, para predecir mecanismos de reacción. Es esencial entender estos mecanismos para desarrollar nuevas herramientas moleculares, por ejemplo, para combatir enfermedades en las que se conoce a la enzima que la produce. También es usual medir la actividad enzimática con diferentes sustratos para entender su especificidad o bien, medir la actividad de la enzima de diferentes tejidos u organismos para entender cómo las diferencias en actividad están relacionadas con la función y/o la fisiología del organismo del que proceden.

Efecto de la concentración de sustrato en la actividad de la enzima

En las reacciones no catalizadas por enzimas la formación de producto depende linealmente de la concentración de sustrato añadido (Fig. 3.3A). Mientras que en las reacciones catalizadas por enzimas, generalmente se obtiene una dependencia hiperbólica de la velocidad respecto a la concentración de sustrato, distinguiéndose 3 partes distintas en la curva (Fig. 3.3B). En la primera parte, a bajas concentraciones de sustrato, la velocidad es proporcional a la concentración de sustrato, de tal manera que si se duplica la concentración de sustrato, se duplica la velocidad (reacción de primer orden). La segunda parte de la curva, a concentraciones intermedias de sustrato, la velocidad se incrementa menos que en la primera parte con el incremento de la concentración, iniciando alrededor de la $\frac{1}{2}$ de la V_{max} . La última parte de la curva, a altas concentraciones de sustrato, la velocidad es independiente de la concentración de sustrato (reacción de orden cero), así la velocidad alcanzada es cercana a la máxima.

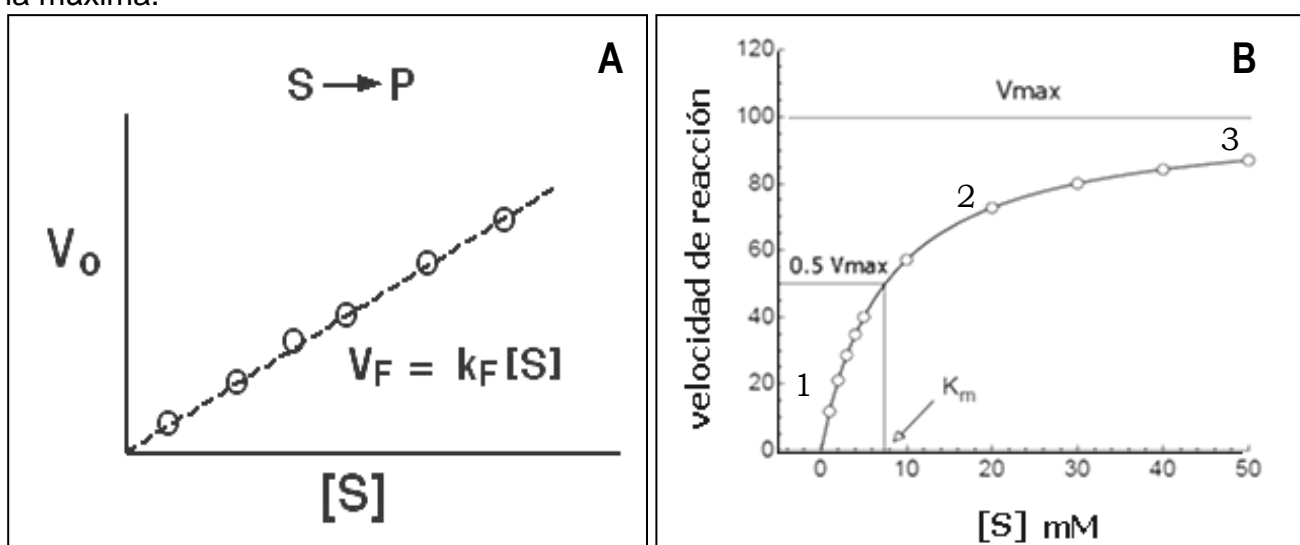


Figura 3.3 Efecto de la concentración de sustrato en una reacción no catalizada y una catalizada por enzimas. A) Reacción no catalizada por enzimas, la formación de producto depende proporcionalmente de la $[S]$. B) Curva de saturación de una enzima. La curva se ajustó a la ecuación michaeliana. Se muestran los parámetros cinéticos característicos de una enzima, K_m y V_{max} .

A pesar de que la curva del efecto de la concentración de sustrato en la velocidad de la enzima es compleja, existe una ecuación matemática que expresa la relación que existe entre las variables: la hipérbola cuadrática o también denominada ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 1), llamada así debido al trabajo pionero de Michaelis y Menten y de Briggs y Haldane. La deducción de la ecuación se describe en el ANEXO I.

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

En la ecuación de Michaelis-Menten hay dos variables que son la velocidad (v) y la concentración de sustrato $[S]$. La K_m y la V_{max} son constantes. La **K_m** es llamada la **constante de Michaelis-Menten**. El valor de K_m de una enzima para un sustrato específico

es la **concentración del sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la velocidad máxima**. La V_{max} es la **velocidad teórica máxima de la reacción catalizada por la enzima**. A concentraciones muy altas de sustrato el valor de la velocidad se aproxima al de la velocidad máxima de la reacción, pero nunca se llega a ésta. Los valores de K_m y V_{max} son característicos de una enzima, y se conocen como **parámetros cinéticos de la enzima**. Aunque son constantes, dependen de las condiciones en las que se lleva a cabo la reacción, ya que hay que recordar que la enzima es una proteína cuya estructura y carga eléctrica se modifican cuando los componentes de la solución cambian.

Una manera para obtener los valores de K_m y V_{max} de una enzima es graficando los valores de velocidad contra la concentración de sustrato. Este método tiene la desventaja de que se grafica una curva y no una línea recta, por lo que la interpolación es difícil. Otra manera para obtener los valores de K_m y V_{max} es la de utilizar alguna de las expresiones matemáticas que producen una línea recta como son la de **Eadie-Hosftie**, la de **Hanes** o la de **Lineaweaver-Burk**, también llamada de dobles recíprocos (Fig. 3.4), que es la más popular y se muestra a continuación:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$y = m * x + b$$

Puedes observar en la ecuación que las formas lineales de la ecuación de Michaelis-Menten son expresiones matemáticas simples y son útiles para obtener los valores de K_m y V_{max} . Y son ampliamente usados para evaluar o analizar el efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática.

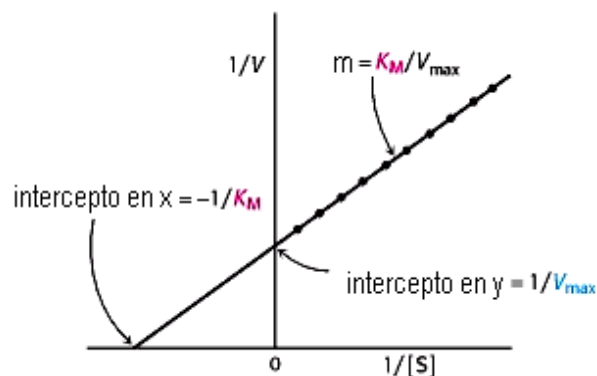


Figura 3.4 Gráfica de dobles recíprocos.

Efecto de inhibidores en la actividad enzimática

Una de las formas de regulación de la actividad de una enzima es a través de moléculas que disminuyen su velocidad de reacción, llamadas **inhibidores**. Los inhibidores pueden encontrarse de manera natural en las células para controlar la velocidad de una reacción metabólica, o bien pueden ser compuestos sintéticos que se utilizan como herramientas experimentales para el estudio de las reacciones enzimáticas. Muchos compuestos tóxicos como antibióticos, pesticidas o herbicidas son inhibidores de enzimas responsables de

reacciones vitales para la célula. La interacción de un **inhibidor** y una enzima varía dependiendo de la naturaleza química del inhibidor y de la reacción química que cataliza la enzima. Para dilucidar el tipo de interacción entre ambas moléculas se determina el efecto del inhibidor en las constantes cinéticas de la enzima.

Tipos de inhibidores:

Inhibidor competitivo. Son moléculas que tienen una similitud estructural y química con el sustrato de la enzima, por lo que se pueden unir al sitio activo. Sin embargo, debido a que el inhibidor no es idéntico al sustrato, la enzima no es capaz de convertirlo en producto y el inhibidor simplemente bloquea el sitio activo, porque no es posible que tanto el inhibidor como el sustrato se encuentren al mismo tiempo dentro de éste. Si se adiciona más sustrato (y el inhibidor no se une de manera irreversible a la enzima) se reduce la inhibición. En un gráfico de dobles recíprocos el intercepto en **y** es el mismo en ausencia y presencia del inhibidor, es decir el inhibidor no afecta la V_{max} de la enzima, sin embargo la pendiente de la curva se incrementa. El incremento en la pendiente indica la fuerza de unión del inhibidor. De tal manera que el valor de la K_m de la reacción catalizada por la enzima se incrementa, a este nuevo valor de K_m se le llama K_m aparente (Figura 3.5).

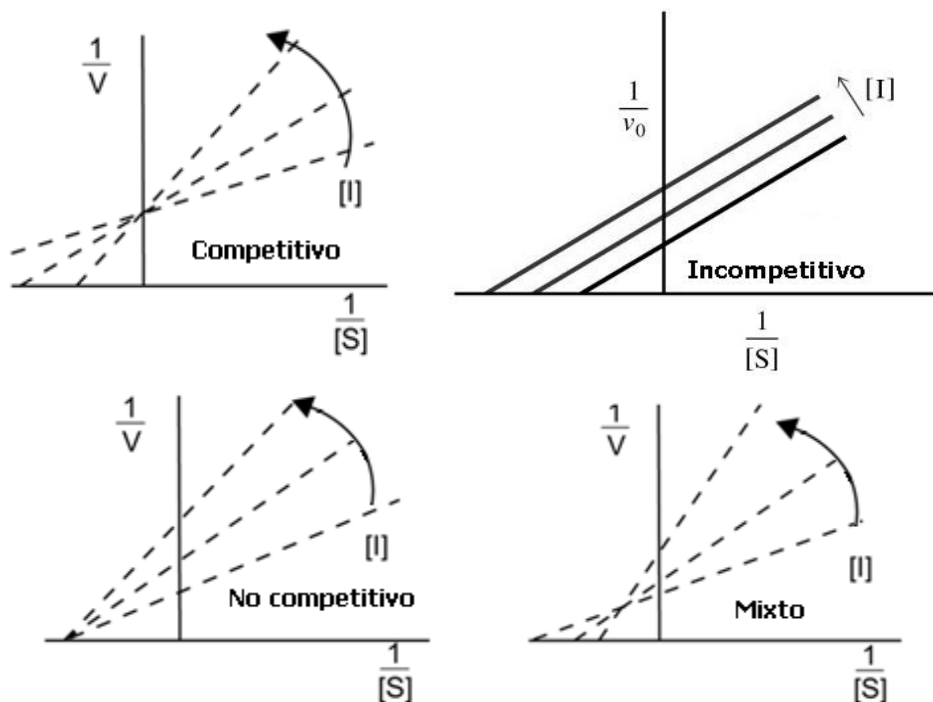


Figura 3.5. Efecto de los inhibidores sobre los parámetros cinéticos de una enzima.

Inhibidor incompetitivo o incompetitivo. Es un inhibidor que no es capaz de unirse a la enzima libre sino que sólo se une al complejo enzima-sustrato. Lo anterior puede deberse a que la unión del sustrato expone o crea sitios de acceso o unión para el inhibidor, en el sitio activo o fuera de éste. Una vez que el inhibidor se une a la enzima se previene la formación del producto. El inhibidor incompetitivo altera tanto la K_m como la V_{max} de la enzima pero no afecta la pendiente, por lo que las curvas de dobles recíprocos a diferentes concentraciones

de inhibidor son paralelas (Figura 3.5). Los valores nuevos de las constantes cinéticas son K_m aparente y V_{max} aparente.

Inhibidor no competitivo. El inhibidor se une tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato. Un **inhibidor no competitivo puro** es aquel que modifica tanto la K_m de la enzima como la pendiente de la curva de dobles recíprocos, así las curvas en ausencia y presencia del inhibidor presentan diferencias en ambos interceptos, $1/V_{max}$ y $1/K_m$. La mayor parte de los inhibidores no competitivos en realidad son **inhibidores mixtos** es decir no sólo se afecta la unión del sustrato sino también la conversión del sustrato a producto. Debido a lo anterior, los inhibidores mixtos alteran tanto el valor de la V_{max} como el de la K_m . Sin embargo, la gráfica de dobles recíprocos muestra que además de que se afectan ambos interceptos las curvas en ausencia y presencia de inhibidor se intersectan en el segundo cuadrante (Figura 3.5).

Referencias

- Bennett NG, Gutfreund H. 1973. The Kinetics of the interconversion of intermediates of the reaction of pig muscle lactate dehydrogenase with oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide and lactate. *Biochemistry Journal* 135, 81-85.
- Devlin TM. 1992. Textbook of biochemistry with clinical correlations. Ed. Wiley- Liss, pp. 135-190. Localización **QP514.2**
- Kopperschläger G, Kirchberger J. 1996. Methods for separation of lactate dehydrogenases and clinical significance of the enzyme. *Journal of chromatography B*, 684, 25-49.
- Lehninger, A.L. 2005. Principios de Bioquímica. 4ª edición. Editorial Omega. Barcelona. pp. 191-237.
- Mathews C. 1992. Bioquímica, 2da edición, Ed. McGraw-Hill pp. 398-433. Localización **QP514.2**
- Nelson D. Principles of Biochemistry. 2004, 4a edition Ed. Freeman and company, pp. 202-233. **QH345 L43**
- Pardo-Vázquez JP. Cap 10. Cinética enzimática. En Bioquímica de Laguna. El Manual Moderno, SA de CV., 2002, pP185
- Voet D, Voet JG. 1992. Bioquímica. Ed. Omega S. A. pp. 342-378. Localización **QP514.2**

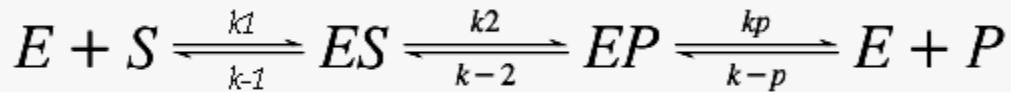
Sitios recomendados para

1. aprender utilizar los conceptos de K_m , V_{max}
 - <http://csm.jmu.edu/biology/courses/bio220/aotw3.html> en la página pulsar la tecla [kinetics_model.xls](#), después regresa a la página inicial y contesta las preguntas que se te hacen.
 - http://www.mhhe.com/biosci/genbio/biolink/j_explorations/ch07expl.htm

ANEXO I: DEDUCCIÓN DE LA ECUACIÓN DE MICHAELIS-MENTEN

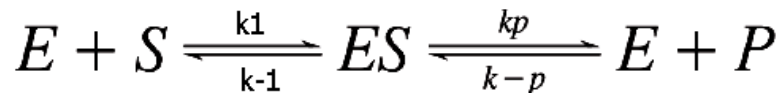
Para llegar a la descripción de la actividad enzimática en función de la concentración de sustrato descrita por Michaelis-Menten se tuvieron que realizar algunas consideraciones, debido a que existen varios pasos intermedios de la reacción, todos reversibles y a que la velocidad de formación de cada una de las especies involucradas depende no solo de su

concentración sino también de las constantes de velocidad (k_1 , k_{-1} , k_2 , k_{-2} , k_p , k_{-p}) y que se encuentran en la siguiente reacción.



Las simplificaciones y suposiciones para obtener la curva matemática que mejor se ajusta a los datos experimentales fueron las siguientes:

1. Suponer que hay un complejo central (ES), esto es que **ES** se rompe directamente en E + P.



Simplificándose la reacción a dos pasos:

Paso 1. Formación de ES que depende de:

A) La velocidad de formación $v_1 = k_1[S][E]$

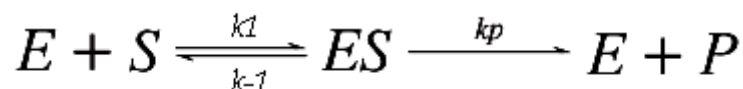
B) La velocidad de disociación $v_{-1} = k_{-1}[ES]$

Paso 2. Formación de productos que depende de:

A) La velocidad de formación $v_p = k_p[ES]$

B) La velocidad de disociación $v_{-p} = k_{-p}[E][P]$

2. Asumir que la reacción reversa (**P**→**S**) es despreciable. La reacción es termodinámicamente factible y podemos establecer condiciones experimentales que minimicen la reacción reversa, por ejemplo añadiendo una enzima que convierta P en otra especie como Q y que está no reaccione con nuestra enzima. O bien podemos medir la velocidad de reacción a tiempos muy cortos en donde la reacción reversa es insignificante. Lo anterior nos simplifica la reacción:



De tal forma que la velocidad a tiempos cortos correspondería a la velocidad inicial de reacción y quedaría expresada como sigue:

$$v_0 = k_p[ES]$$

Pero para formar el producto debemos considerar que tan rápido se rompe el complejo ES, quedando descrito en los dos siguientes pasos:

Paso 1. En la formación del complejo **ES** debemos considerar:

$$[E]_{\text{total}} = [E] + [ES]$$

entonces

$$[E] = [E]_{\text{total}} - [ES]$$

$$V_{\text{formación ES}} = k_1 [S] [E]$$

sustituyendo E en la ecuación de velocidad de formación de ES resulta:

$$V_{\text{formación ES}} = k_1 [S] ([E]_{\text{total}} - [ES])$$

Paso 2. Ruptura del complejo ES:

$$\text{Velocidad de ruptura ES} = v_{-1} + v_p$$

Sustituyendo las velocidades

$$\text{Velocidad de ruptura ES} = k_{-1}[ES] + k_p[ES]$$

3. Suposición del estado estacionario de Briggs Haldane.

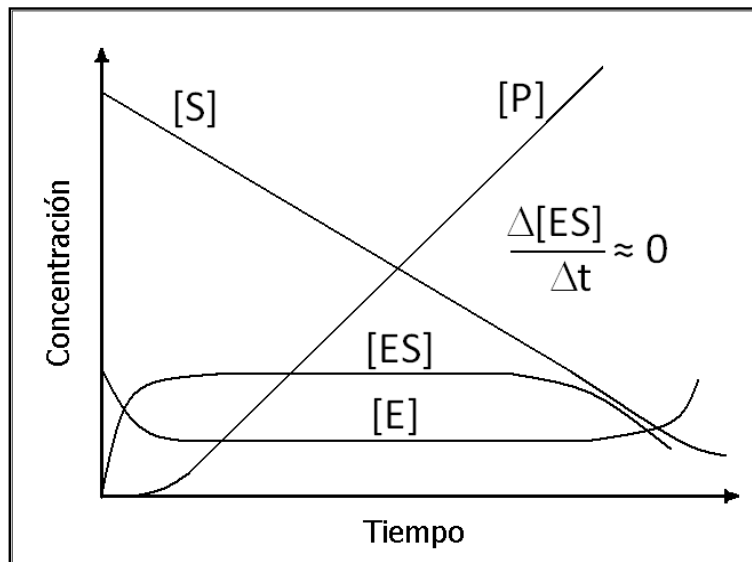


Figura A.1. Cambios en las concentraciones de las especies involucradas en la catálisis. En el estado estacionario la concentración del complejo ES se mantiene pequeña y constante.

En el modelo cinético del estado estacionario, hay un intervalo de tiempo durante la catálisis enzimática en el que la concentración del complejo ES es constante (Figura A.1), por lo tanto la velocidad de formación del complejo ES es igual al de su disociación:

$$k_1[S]([E]_{\text{total}} - [ES]) = k_{-1}[ES] + k_p[ES]$$

Despejando [ES]

$$[ES] = \frac{k_1[S][E]_{total}}{k_{-1} + k_p + k_1[S]}$$

rearrreglando

$$[ES] = \frac{[S][E]_{total}}{\left[[S] + \frac{k_{-1} + k_p}{k_1} \right]}$$

Si regresamos a la ecuación de velocidad inicial $V_0 = k_p[ES]$ y sustituimos **ES**, obtenemos lo siguiente:

$$V_0 = \frac{k_p [S][E]_{total}}{\left[[S] + \frac{k_{-1} + k_p}{k_1} \right]}$$

4. Por último si se considera que la $[S] \gg [E]$ (Figura A.1) la interacción de S con E para formar ES no afecta significativamente la $[S]$. La enzima está saturada de sustrato y

$$[ES] = [E]_{total}$$

Entonces podemos definir la velocidad máxima de la enzima o V_{max} como:

$$V_{max} = k_p[E]_{total}$$

Si sustituimos en la ecuación de velocidad inicial tendríamos que:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{\left[[S] + \frac{k_{-1} + k_p}{k_1} \right]}$$

Agrupando las constantes:

$$K_m = (k_{-1} + k_p)/k_1$$

Sustituyendo K_m en la ecuación de velocidad inicial se obtiene la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

4. ESTRUCTURA, PROPIEDADES Y FUNCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO I: CONJUGACIÓN

Los **plásmidos** son moléculas de DNA extracromosómico, covalentemente cerrados y generalmente, de tamaño pequeño que se encuentran en muchas especies bacterianas y que se pueden replicar de manera independiente del DNA cromosómico. A diferencia de éste, los plásmidos no son necesarios para la viabilidad de la célula, pero pueden contener genes que contribuyen a la sobrevivencia en condiciones especiales, como los que confieren resistencia a antibióticos o a metales, por ejemplo. Algunas clases de plásmidos poseen además la propiedad conocida como "replicación relajada", esto es, están presentes en muchas copias por célula, lo que facilita enormemente su aislamiento y purificación.

Una bacteria sólo puede adquirir un plásmido a partir de otra bacteria que lo contenga, ya sea por transmisión vertical (es decir, de célula progenitora a célula hija) o por cualquiera de los tres mecanismos conocidos de **transferencia horizontal de material genético**. Estos son: **la transformación, la transducción y la conjugación**.

En la *transformación*, el DNA liberado de una célula bacteriana entra a otra célula, generalmente de la misma especie.

En la *transducción*, un virus bacteriano accidentalmente toma DNA del cromosoma o de un plásmido de la bacteria a la que ha infectado y lo inyecta a otras bacterias.

La *conjugación* bacteriana es un proceso de transferencia de material genético en el que la información genética de un plásmido es transferido a otra célula. Este proceso, a diferencia de la transformación, tiene como condición esencial el contacto celular. A la célula que aporta el material genético se le llama donadora y a aquélla que lo recibe, receptora. No todos los plásmidos pueden transmitirse por conjugación, es decir ser **conjugativos**, solamente aquellos que poseen un grupo de genes denominados **genes tra**. Dentro de este grupo de plásmidos se encuentra el **factor de fertilidad o plásmido F** de *E. coli*. El plásmido F confiere a la célula bacteriana la capacidad de conjugarse con otra célula que no lo posea. Este plásmido se presenta en una sola copia por cromosoma bacteriano y tiene la capacidad de integrarse a éste. Cuando se integra suprime su sistema de replicación y se replica como parte del cromosoma.

El plásmido F contiene más de 40 genes *tra*, la mayoría de los cuales son necesarios para la construcción de un organelo llamado **pili sexual** o **pili F** constituido por una proteína, la **pilina**, codificada por uno de los genes *tra*. El Pili F es necesario para promover el contacto entre las bacterias donadora y receptora y para la formación de un puente citoplasmático para la transferencia del material genético. La transferencia se inicia a partir de un sitio específico en el plásmido y que forma parte de los genes *tra*, denominado *oriT*.

Algunos plásmidos no son capaces de llevar a cabo la conjugación por sí mismos, pero pueden ser transferidos (**plásmidos movilizables**) a otras bacterias cuando coexisten con plásmidos con genes *tra*, debido a que contienen un grupo de genes denominados **genes mob**, los cuales incluyen un sitio *oriT*, pero carecen de otros genes necesarios para la conjugación, incluyendo los que codifican para la formación del pili.

En relación al plásmido F, existen cuatro tipos de cepas bacterianas:

Cepa F⁻. Célula bacteriana que no posee un plásmido F, y que actúa como célula receptora en la conjugación.

Cepa F⁺. Célula bacteriana que posee un plásmido F independiente del cromosoma bacteriano, actúa como célula donadora en la conjugación y transfiere al plásmido F a la célula receptora (F⁻) transformándola en célula F⁺.

Cepa Hfr (*High frequency of recombination*). Bacteria que posee un plásmido F integrado a su cromosoma. Las cepas Hfr tienen la capacidad de transferir porciones de su cromosoma (célula donadora) y por ello confieren alta frecuencia de recombinación. No transfieren el plásmido F, por lo que al término de la conjugación la célula receptora permanece como F⁻.

Cepa F'. Célula bacteriana que posee un plásmido F extracromosómico, pero que antes estuvo integrado al cromosoma y que se escindió llevando consigo genes bacterianos. Actúa como célula donadora en la conjugación y transfiere el factor F junto con los genes bacterianos, transformando a la célula receptora en una célula F', la cual será un diploide parcial o merocigoto. Esto quiere decir que tendrá dos copias de los genes bacterianos que están presentes en el plásmido F'. A ese tipo de transferencia se le conoce como **sex-ducción**.

Una bacteria Hfr transfiere los genes bacterianos a una célula F⁻ en un tiempo constante. Se calcula que la transferencia de todo el cromosoma de *Escherichia coli* de una bacteria a otra tarda aproximadamente 100 minutos. Esta característica ha sido utilizada en el mapeo genético, ya que permite localizar un determinado marcador genético (es decir, una característica determinada) en un tiempo dado.

En esta práctica se comprobará la conjugación bacteriana mediante la transferencia de un marcador genético: la resistencia a la kanamicina. El marcador genético de selección que se utilizará para la cepa receptora será la resistencia a la estreptomicina.

Investiga: ¿Qué es y para qué se utiliza un marcador genético de selección?

Referencias

- Brown T.A. *Genetics. A Molecular Approach*. 2nd ed. Chapman & Hall. USA. 1992. pp 467.
- Lewin B. *Genes V*. Oxford University Press. USA. 1994. pp 1272.
- Genética General, Manual de prácticas de laboratorio. Regulación genética en el operón lac. Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria. México, 2002.

TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO II: TRANSFORMACIÓN

Introducción

Desde épocas antiguas, el ser humano ha seleccionado animales y plantas con características fenotípicas deseables. La domesticación ha proporcionado importantes beneficios a la humanidad incrementando la producción de insumos para consumo humano. Por ejemplo, hace 100 años una vaca producía en promedio 2000 a 3000 litros de leche al año; actualmente, las vacas Holstein proporcionan un promedio de 6000 litros al año, y las mejores vacas son capaces de producir de 8000 a 10,000. Asimismo, una gallina hace 100 años producía en promedio 70 huevos al año, mientras que en este siglo las mejores razas producen cerca de 250 al año.

Las técnicas convencionales de reproducción han llevado a nuevas combinaciones de genes. Sin embargo, la recombinación cruzada entre miembros de especies distintas no ha sido exitosa. Por ejemplo, la cruce entre la yegua y el burro, produce la mula, que es estéril. Así, el número de combinaciones nuevas es limitado, debido a que los genes pueden recombinarse sólo entre los miembros de la misma especie o con organismos muy relacionados.

Las barreras impenetrables entre especies han sido parcialmente superadas con el surgimiento de técnicas de manipulación y de selección del material genético, es decir, con la **ingeniería genética**. Debido a que el DNA contiene un código genético esencialmente igual para todos los organismos, en principio se pueden transferir secuencias de genes de organismos no relacionados y producir organismos con características útiles y particulares, que de otra manera sería imposible obtener: los denominados organismos **transgénicos**.

Actualmente se ha identificado y caracterizado un gran número de genes. Este conocimiento abre la posibilidad de buscar métodos para introducir o modificar un gene que proporcione una característica deseable, como por ejemplo, curar enfermedades. No obstante los posibles beneficios, hay que considerar que al introducir genes no propios al huésped, se pueden ocasionar efectos indeseados, por ejemplo, que la característica introducida lleve a una alteración en el metabolismo, en la señalización y, por tanto, modifique la fisiología y sobrevivencia del individuo, o bien que se “escape” la nueva información de manera indiscriminada a otros organismos.

Requisitos para construir un vector de clonación

Aún cuando el código genético es básicamente el mismo para todos los organismos, los detalles finos del control genético difieren. Un gene bacteriano no siempre puede expresarse eficientemente si es introducido en una célula eucarionte. Para la producción de un organismo genéticamente modificado se debe producir o construir un **transgene**, que consiste en el gene de interés más una parte extra de DNA que controle correctamente la función del gene en el nuevo huésped. Por ejemplo, para que un gen procarionte se pueda expresar en un organismo eucarionte se le debe agregar una región promotora en el extremo 5' del gen para que sea reconocido por el aparato transcripcional del organismo receptor. Recordando que la región promotora es un segmento de DNA localizada río arriba de la región 5' del gen y que actúa como un elemento que controla la expresión del gen. Asimismo, se debe añadir una secuencia de poli A en la porción 3' del gen para que el RNAm pueda ser traducido.

Los **plásmidos** poseen un interés singular en la Ingeniería Genética por ser uno de los vectores más sencillos de usar. Un **vector de clonación** es un sistema que permite introducir

en una célula hospedera el fragmento de DNA que se pretende clonar (obtener múltiples copias); en esta célula hospedera el vector se replica y se expresa. La molécula que resulta de la unión de un DNA vector con el DNA de interés (**inserto**) se denomina molécula **vector recombinante**.

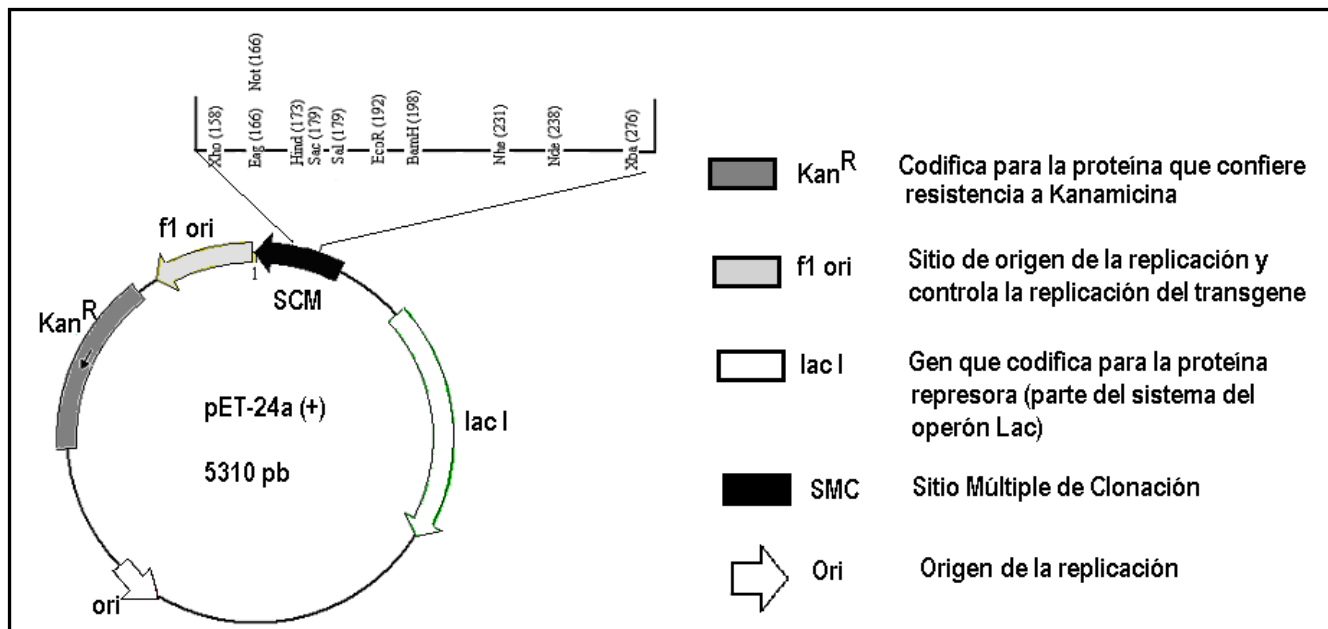


Figura 4.1. Vector de clonación pET-24a. Se muestran algunas características del vector, como el sitio origen de la transcripción (ori), el sitio de clonación múltiple (SCM), el sitio que confiere resistencia a kanamicina, Kan^R; f1 ori, origen de replicación f1 y el sitio que servirá para controlar la expresión del transgene una vez que sea insertado en el sitio de clonación múltiple, el sitio de unión al represor lac I. Los vectores usualmente presentan más de un origen de replicación, Ori que es el que es usado para que la bacteria se replique, mientras que f1 ori es el origen de replicación usado por el fago F1 y es usado para producir DNA de cadena sencilla.

Para ser utilizado como vector de clonación, un plásmido debe poseer al menos tres características (Figura 4.1):

- 1) Tener su propio origen de replicación y, por tanto, la capacidad de replicación autónoma e independiente del genoma del hospedero.
- 2) Tener un sitio de clonación múltiple (SCM) que permita la apertura del DNA con enzimas de restricción (enzimas que cortan secuencias internas de DNA de manera específica) y hace posible la clonación de insertos de DNA en la forma y orientación deseada.
- 3) Poseer marcadores genéticos seleccionables que permitan aislar a las células hospederas que contengan al vector, generalmente resistencia a un antibiótico. La mayoría de los plásmidos naturales no cumplen todas estas condiciones, por lo que una primera tarea de la Ingeniería Genética ha consistido en la construcción de plásmidos artificiales, combinando en una misma molécula diversos rasgos útiles procedentes de los plásmidos naturales. La presencia en el plásmido del gen de resistencia a ampicilina, kanamicina o tetraciclina permite seleccionar las bacterias que portan estos plásmidos, gracias a su capacidad para crecer en presencia de dicho antibiótico.

Adicionalmente, hay que considerar que muchos genes se expresan sólo bajo ciertas circunstancias metabólicas y/o en tejidos específicos, por lo que usualmente es necesario

sustituir el promotor del donador por uno que asegure su expresión, denominados promotores fuertes, que también pueden ser inducibles bajo ciertas condiciones de crecimiento.

Transformación

Existen varias técnicas para la introducción del transgene en la célula u organismo, como son la microinyección, la infección de una célula huésped con virus que contenga al vector, o mediante el uso de bacterias (principalmente para la transformación de plantas). En el caso de la transformación de bacterias, generalmente se introduce el DNA ajeno por microelectroporación o por choque térmico.

Durante el choque térmico, las bacterias que serán las hospederas son pre-tratadas con agentes que ocasionan el aumento en su permeabilidad membranal. Entre estos se encuentran una temperatura elevada y el uso de iones que cambian la carga eléctrica de la membrana al recubrir las cabezas polares de lípidos (por ejemplo los iones Ca^{2+}), lo que disminuye la repulsión de cargas eléctricas entre los fosfatos de los nucleótidos y la membrana y además facilita la entrada del plásmido al interior celular. Las células que han recibido un tratamiento apropiado para llevar a cabo la introducción de material genético se denominan **células competentes**.

Una vez que se introduce el material genético a las células competentes, se disminuye la temperatura y se diluye el calcio, con lo que se restaura la permeabilidad membranal. Al colocar a las células en condiciones óptimas de crecimiento se obtienen las **células transformantes**.

Referencias

- Devlin T. Biochemistry. 1992 Ed. Wiley- Liss, pp. 768-773. Localización **QP514.2**
- Micklos DA, Freyer GA y Crotty DA. 2003 DNA Science. A first course. 2nd edition. Cold spring Harbor Laboratory Press, CSH, New York, USA. Localización **QH442**.
- Nelson D. Principles of Biochemistry. 2004, 4a edition Ed. Freeman and company, pp. 279-317. **QH345 L43**
- Seidman C, Brent R. 1998. Introduction of plasmid DNA into cells. Current protocols in protein science. A.4D.1-A.4D.2.
- Sosa-Peinado A. Mustafi D, Makinen MW. 2000. Overexpression and biosynthetic deuterium enrichment of TEM-1 beta-lactamase for structural characterization by magnetic resonance methods. Protein Expression & Purification 19: 235-45.
- Stryer L. Bioquímica, 2004, Ed. Reverté, pp.745-773.
- <http://www.colvema.org/PDF/amg1.pdf>
- <http://www.revista.unam.mx/vol.1/num3/art3/>
- <http://es.geocities.com/picodelobo/transgenesis.html>
- http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes
- <http://www.sciencegateway.org/tools/transform.htm> (determinación de eficiencia de la transformación)

TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO II:

AISLAMIENTO DE PLÁSMIDOS

Introducción

Desde finales de la década de los años 70 del siglo pasado, se desarrolló un gran número de métodos de aislamiento de plásmidos. La mayoría toma en cuenta las diferencias topológicas (es decir, su acomodo en el espacio) entre los plásmidos circulares y los fragmentos

cromosomales lineales, así como el tamaño de ambos. Cuando los puentes de hidrógeno entre las cadenas complementarias del DNA del plásmido circular se rompen, ya sea por calentamiento o por un pH alcalino, las cadenas permanecen cercanas ya que el enrollamiento entre las dos cadenas no se perturba grandemente. En contraste, las cadenas lineales o rotas de DNA se liberan o separan completamente. Si una mezcla de plásmido desnaturalizado y de DNA cromosomal se renaturalizan rápidamente, ya sea por enfriamiento o al restaurar el pH neutro de la solución, la fidelidad de la reasociación es diferente para ambas macromoléculas. La renaturalización de los plásmidos circulares es rápida debido a que las cadenas están próximas, mientras que las moléculas lineales de DNA se renaturalizan menos precisamente, formando redes de DNA o agregados que pueden ser removidos de la suspensión por centrifugación. El plásmido permanece en la solución y puede ser precipitado con alcohol después de que el DNA cromosomal ha sido removido.

Referencias

- Tümmler B y Mekus F. Genomic DNA: Purification. Encyclopedia of life sciences & 2005, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net.
- Stryer L. Bioquímica, 2004, Ed.Reverté, pp.745-773.
- Watson JD, Gilman M, Witkowski JA, Zoller M. Recombinant DNA. Segunda edición, WH Freeman.

TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO II: ENSAYOS DE RESTRICCIÓN DE PLÁSMIDO.

Introducción

Las **endonucleasas de restricción o tipo II** se caracterizan por su habilidad para reconocer una secuencia usualmente de 4 a 6 pares de bases (pb) y cortarla específicamente en ambas cadenas de la molécula de DNA. Si bien existen tres tipos de endonucleasas con características de reconocimiento y de corte del DNA distintas, son las del tipo II son las que se utilizan en biología molecular, debido a que son capaces de cortar directamente la secuencia que reconocen y a que no modifican la secuencia blanco. Las endonucleasas se denominan **enzimas de restricción**, debido a que es la forma de defensa de las bacterias contra la invasión por bacteriófagos, es decir, restringen la invasión por el DNA viral.

Las enzimas de restricción generalmente reconocen secuencias **palindrómicas**, es decir segmentos de DNA que se leen igual de derecha a izquierda que de izquierda a derecha. Algunas enzimas de restricción (*EcoRI*, *HindIII*) rompen las dos cadenas del DNA en posiciones no simétricas del centro del palíndromo y producen fragmentos con secuencias complementarias de una cadena, denominados **extremos cohesivos**. Mientras que otras enzimas (*HaeIII*) cortan exactamente sobre los dos ejes de simetría, produciendo **extremos romos** (Figura 4.2).

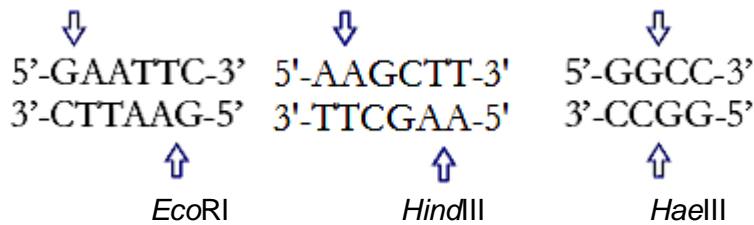


Figura 4.2. Dos diferentes formas de corte de las enzimas de restricción en una secuencia de DNA. Las dos primeras enzimas *EcoRI* y *HindIII* producen extremos cohesivos al cortar la secuencia que se muestra y en el último ejemplo, *HaeIII* produce fragmentos de DNA con extremos romos. Las primeras 3 letras de la enzima se refieren a las iniciales del género y especie de la bacteria de donde se aisló y se escribe en itálicas. Por ejemplo, *EcoRI* se refiere a que la enzima proviene de *Escherichia coli*.

Las enzimas de restricción son una herramienta experimental muy importante en el desarrollo de las técnicas para el análisis y la manipulación de los ácidos nucleicos. Han sido utilizadas en la eliminación de secuencias genómicas que van desde un nucleótido hasta cientos de bases, así como en la introducción de secuencias ajenas a un genoma, lo que ha permitido la producción de proteínas recombinantes.

Existen diferentes factores que afectan la reacción de restricción por endonucleasas. Se inhiben usualmente con los contaminantes que se pueden encontrar en las preparaciones de DNA, tales como otras proteínas, fenol, cloroformo, etanol, EDTA, SDS y una alta concentración de sales. Los efectos de la contaminación pueden disminuir si se aumenta la cantidad de enzima añadida a la reacción, arriba de 10 a 20 U / μ g DNA, incrementando el volumen de reacción, lo que diluye a los inhibidores potenciales, o aumentando la duración de la incubación. La digestión del DNA genómico por estas enzimas puede facilitarse por la adición de policationes como espermidina, que actúa uniendo contaminantes cargados negativamente. Cuando un plásmido está **superenrollado** es necesario añadir más enzima o bien, desnaturalizarlo.

El tratamiento de una molécula de DNA con enzimas de restricción permite producir fragmentos definidos que pueden separarse mediante electroforesis horizontal. En soluciones alcalinas, los grupos fosfato de los nucleótidos se encuentran cargados negativamente, entonces al imponer un campo eléctrico, estas moléculas migran hacia el electrodo positivo o ánodo. Cuando la migración ocurre en un gel, las moléculas de DNA se separan de acuerdo a su tamaño, porque las moléculas pequeñas se mueven más rápidamente a través del poro del gel que las más grandes.

Generalmente, un segmento de DNA contiene secuencias blanco para varias enzimas de restricción. Si un fragmento de DNA a analizar es lo suficientemente extenso, se puede cortar con una o varias enzimas de restricción, de manera individual o en mezclas. Un diagrama de una molécula de DNA en donde se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción se denomina mapa de restricción. El análisis de los mapas de restricción constituye una importante herramienta para localizar secuencias de bases específicas en un cromosoma y para estimar el grado de diferencias entre cromosomas relacionados.

Existen varias aplicaciones de los mapas de restricción, como la obtención de los patrones de RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") utilizados en las pruebas de paternidad,

así como también en la identificación de individuos a partir de evidencias forenses como saliva, sangre, semen, cabello, etc.

Referencias

- Devlin T. Biochemistry. 1992 Ed. Wiley- Liss, pp. 768-773. **QP514.2**
- Kenneth D. Digestion of DNA with Restriction Endonucleases. *Current Protocols in Protein Science* (1998) A.41.1-A.41.3.
- Mitsis P, Exonucleases. Encyclopedia of life sciences © 2001, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net.
- Micklos DA, Freyer GA y Crotty DA. 2003. DNA Science. A first course. 2ndedition. Cold spring Harbor Laboratory Press, CSH, New York, USA. Localización **QH442**
- Nelson D. Principles of Biochemistry. 2004, 4a edition Ed. Freeman and company, pp. 279-317. Localización **QH345 L43**
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory. CSH, New Harbor Laboratory. CSH. New York, USA.
- Voet y JG Voet. Biochemistry. Energy metabolism: Integration and organ specialization. 2da. Ed. John Willey & Sons, INC. 1995. Pp848-914.

TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO II: INDUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

Introducción

La necesidad de producir proteínas heterólogas o **recombinantes** para varias aplicaciones científicas y comerciales ha influido en el desarrollo de diversas herramientas para purificar y manipular proteínas. Los sistemas bacterianos han sido los más utilizados para este fin, debido a que son fácilmente manipulables genéticamente, se propagan en periodos de tiempo corto, son económicos y se requiere sólo un entrenamiento mínimo para su manejo. Además, muchas de las características inherentes a los sistemas bacterianos permiten la automatización en proyectos de producción a gran escala, donde se requiere la producción y muestreo de cientos de clonas.

A pesar de lo anterior, los sistemas bacterianos tienen sus limitantes: las proteínas de eucariontes o las proteínas de membrana generalmente no se expresan o no son funcionales. El carácter químico del citoplasma de las bacterias y de sus chaperonas (proteínas que se unen a las proteínas recién sintetizadas), así como las enzimas que se encargan de las modificaciones post-traduccionales son muy diferentes entre los organismos eucariontes. Por ejemplo, los sistemas de expresión de bacterias no glicosilan a las proteínas. Otros sistemas de expresión, como los sistemas de células de mamífero, de insecto o levadura, tienen la capacidad de procesar las proteínas eucariontes de manera correcta y son utilizados cuando la funcionalidad de las proteínas es crítica, aunque el costo de estos sistemas es considerablemente más alto y la tecnología que se necesita es más complicada. Adicionalmente, la producción de grandes cantidades de proteínas, como algunos productos terapéuticos, se puede lograr tanto en plantas como en sistemas animales.

Muchas compañías ofrecen una serie de diferentes vectores con capacidades de expresión muy variadas, con o sin proteínas de fusión que funcionan como etiquetas para la detección y/o purificación de la proteína deseada, la presencia de marcadores selectivos de la cepa transformante y promotores distintos.

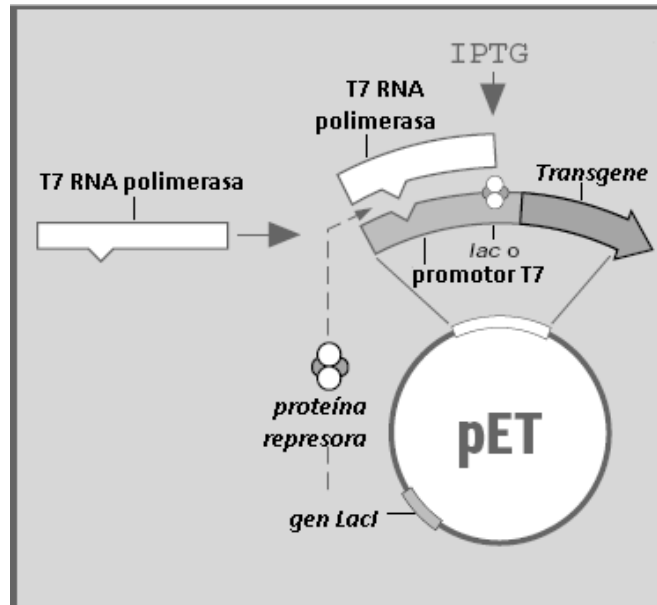


Figura 4.3. Mecanismo de acción del IPTG en la expresión de proteína mediada por el vector pET.

Los vectores de expresión como el pET son usados comúnmente para la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli*. En los sistemas pET, los plásmidos son clonados bajo las señales de expresión fuerte del promotor del **bacteriofago T7**, quién controla la alta expresión de la RNA polimerasa T7.

Adicionalmente, los sistemas pET cuentan con una copia del gen cromosomal de la RNA polimerasa T7 bajo el control del operador de la lactosa, sistema que se estudiará con más detalle en el siguiente protocolo experimental del curso. Basta mencionar ahora que para que se exprese la RNA polimerasa T7 y por tanto se lleve a cabo la expresión de la proteína de interés, se tiene que introducir lactosa o un análogo de ésta, el más utilizado es el **isopropil β -D tiogalactosido** (IPTG), análogo no hidrolizable de la lactosa que sirve como un inductor artificial del operón de la lactosa (Fig. 4.3). El IPTG se une a la proteína represora, ocasionándole a la proteína un cambio conformacional que le impide su función biológica de unirse al DNA. La actividad biológica de la proteína represora es unirse a una secuencia de DNA denominada operador impidiendo en el caso del vector pET la transcripción del gen para la RNA polimerasa T7 y por tanto la transcripción del transgene. El efecto del IPTG de liberar de la represión del gen es denominado inducción, por lo que el IPTG es llamado inductor. El gen que codifica para la proteína represora se encuentra incluido en el vector, *Lacl*, y su transcripción ocurre a la par que todos los genes incluidos en el vector (Fig. 4.9). Así a pocas horas de inducción, la formación del producto, es decir, de la proteína deseada, puede llegar a ser más del 50% de la proteína total en la célula.

Como se mencionó anteriormente, la producción de la proteína recombinante en un organismo no relacionado puede llevar a que la proteína no sea funcional, ya sea porque no presenta las modificaciones postraduccionales necesarias o bien porque no se plegó adecuadamente, provocando su aglomeración. Cuando las proteínas se aglomeran formando agregados que sólo pueden solubilizarse a través del uso de soluciones de detergentes, se dice que forman **cuerpos de inclusión**. En este caso, aumentan los costos de producción y/o recuperación de la proteína.

Referencias

- Ghayeb J, Kimura H, Takahara M, Hsiung H, Masui Y, Inouye M. 1984. Secretion cloning vectors in *Escherichia coli*. The EMBO Journal 3, 2437-2442.
- Hammlev D, Madden D, Nørby S, Turner J. Unit 2. DNA profiling. European initiative for biotechnology education 1995. <http://www.reading.ac.uk/NCBE>.
- LaVallie E. 1995. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Current Protocols in Protein Science 5.1.1-5.1.8.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory. CSH, New Harbor Laboratory. CSH. New York, USA.
- Sosa-Peinado A, Mustafi D, Makinen MW. 2000. Overexpression and biosynthetic deuterium enrichment of TEM-1 beta-lactamase for structural characterization by magnetic resonance methods. Protein Expression & Purification 19: 235-45.
- Voet y JG Voet. Biochemistry. Energy metabolism: Integration and organ specialization. 2da. Ed. John Wiley & Sons, INC. 1995. Pp906-914.

5. REGULACIÓN DEL METABOLISMO

PARTE I: REGULACIÓN GENÉTICA EN EL OPERÓN *lac*

Introducción

La regulación metabólica es el incremento o el decremento de una reacción enzimática o de toda una secuencia de reacciones enzimáticas de las rutas metabólicas. La regulación surge de la necesidad de la célula de estar en equilibrio.

La célula logra el equilibrio entre sus reacciones enzimáticas a través, principalmente, de la modificación de la actividad de las enzimas que contiene. Dado que cada célula tiene un gran número de enzimas, el control se lleva a cabo a través de algunos mecanismos globales de regulación metabólica.

Uno de estos mecanismos globales de regulación involucra el aumento o disminución de la concentración de enzima por medio de **la regulación de la expresión genética**.

El DNA de una célula puede contener miles de genes dependiendo de su complejidad. Sin embargo, sólo una parte de esta conformación genética es requerida por la célula en todo momento (expresión constitutiva). Existen genes con una función más especializada y cuya participación sólo es requerida por la célula bajo ciertas circunstancias. Por ello, todos los organismos son capaces de regular la expresión de sus genes. En el caso de las bacterias, la regulación de la expresión genética les permite responder metabólicamente a los cambios en su ambiente de manera rápida y precisa.

Las bases de nuestro entendimiento sobre la **regulación de la expresión génica** en bacterias fueron propuestas por Francois Jacob y Jacques Monod en 1961. Ambos, junto con André Lwoff, compartieron el Premio Nobel de 1965 por su teoría del **operón**. Un operón se define como un conjunto de genes que pueden regular su propia expresión dependiendo de la presencia o ausencia de un sustrato.

El **operón de la lactosa** se requiere para el transporte y metabolismo del carbohidrato lactosa en *Escherichia coli*. El operón está formado por tres componentes: un gen regulador, un centro de control (operador y promotor) y los genes estructurales (Fig. 5.1A). El **gen regulador** (el gen *lacI*) no se encuentra adyacente al operón, y su producto proteico tiene función de **represor** al unirse al **operador**, localizado entre el promotor y *lacZ*. El **operador** es una secuencia de DNA que de hecho, se encuentra traslapada en la secuencia del promotor (Fig. 5.1B). El promotor es la secuencia que determina el inicio de la transcripción de la RNA polimerasa.

Cuando el represor o proteína represora esta unido al operador, la RNA polimerasa no puede unirse al promotor y por lo tanto no hay transcripción de los genes estructurales (Fig.5.1C). Los **genes estructurales son** *lacZ*, *lacY* y *lacA*, que codifican para las enzimas β -galactosidasa, permeasa y transcetilasa respectivamente. Todos ellos se transcriben en una sola molécula de RNA **mensajero (RNA policistrónico**, es decir, que contiene la información para codificar varias proteínas),

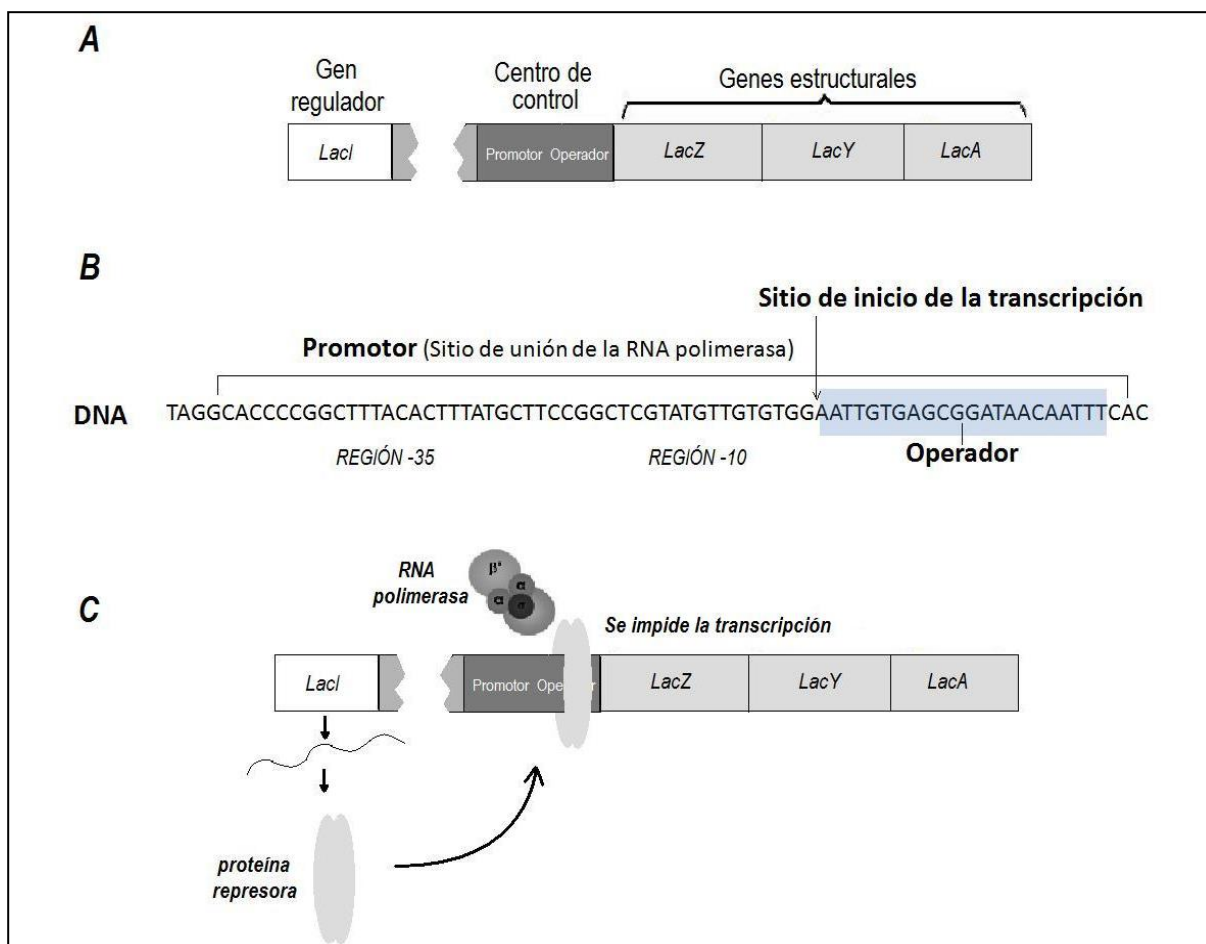


Figura 5.1. Componentes del operón de lactosa y su función. **A.** Genes que componen el operón de lactosa. **B.** Secuencia de DNA en la que se encuentran traslapadas las secuencias del promotor con el operador (secuencia sombreada). **C.** En ausencia de lactosa la proteína represora se une al operador impidiendo la unión de la RNA polimerasa por lo que la transcripción de los genes estructurales no ocurre.

Cuando hay lactosa presente, la bacteria toma unas pocas moléculas de ésta y las convierte en **alolactosa** que es capaz de unirse al represor, impidiendo que éste se pegue al operador. La subsecuente unión de la **RNA polimerasa** al promotor ocasiona la transcripción de los genes estructurales y la posterior traducción en las enzimas necesarias para la utilización de la lactosa como fuente de carbono y energía. Cuando se termina la lactosa, el represor se vuelve a unir al operador bloqueando la expresión de los genes estructurales.

La presencia o ausencia de la lactosa no es el único factor que influye sobre la expresión del operón de la lactosa. Si la célula tiene una fuente de glucosa suficiente para sus requerimientos energéticos, no necesita metabolizar lactosa aún cuando esté presente, entonces lleva a cabo un proceso denominado **represión catabólica**, que involucra a una segunda proteína reguladora, **CAP (proteína activadora de catabolito)**, y un segundo sitio de unión, el **sitio CAP**, adyacente al promotor.

La CAP se une al sitio CAP sólo en presencia de **AMP cíclico (AMPC)**, un nucleótido modificado derivado del ATP por la **adenilatociclasa**. La cantidad de AMPC en la célula depende de la concentración de glucosa, y por ende de ATP, que inhibe a la adenilato ciclasa. Si los niveles de glucosa son altos (nivel de ATP alto) hay poco AMPC y si son bajos hay mucho

AMPc (niveles de ATP bajos). Al controlar la cantidad de AMPc en la célula, la glucosa indirectamente regula la unión del complejo CAP-AMPc al sitio CAP. Esto es muy importante porque cuando el complejo CAP-AMPc está unido, se estimula la unión de la RNA polimerasa al promotor (regulación positiva), lo que ocasiona la transcripción de los genes estructurales del operón de lactosa.

Referencias

- Devlin TM. Textbook of biochemistry with clinical correlations. Regulation of gene expression. Ed John Wiley & Sons, INC, New York, 1997. Pp. 20-52. Localización **QP514.2**
- Gardner JE. Garder E. Principios de genética. 1998, 4a edition Ed. Limusa, pp. 390-407. Localización **QH581.2 M 65**
- Genética General. Manual de prácticas de laboratorio. Regulación genética en el operónlac. Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria. México, 2002.
- Klug SW, Cummings RM. Conceptos de genética. Ed. Prentice Hall. Madrid 1999. Pp. 51-71.
- Lodish H, Molecular Cell Biology, 2003, Ed. Freeman and company, pp. 115-125. Localización **QH581.2 M 65**
- Stryer L. Bioquímica, 2004, Ed.Reverté, pp.868-873.