

Contenidos

1. ÁCIDOS NUCLEICOS

Extracción de ADN	17
-------------------------	----

Actividades:

Extracción de ADN de diversos materiales biológicos

Obtención de fibras y ovillos de ADN

Precipitación y purificación de ADN

Cuantificación de ADN

2. ENZIMAS Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Ensayo de actividad de la catecolasa	27
--	----

Actividades:

Obtención de extractos enzimáticos a partir de material biológico

Detección de reacciones enzimáticas con sustratos exógenos

Estudio de factores que afectan la actividad enzimática

Inhibición de la actividad enzimática por inhibidores específicos

3. CICLO CELULAR

Mitosis en meristemos de cebolla	35
--	----

Actividades:

Preparación de materiales para su observación in vivo, fijados y teñidos

Observación de tejidos meristemáticos en ciclo de división y tejidos diferenciados

Análisis del ciclo celular, identificación de fases y estimación cuantitativa de su duración

Efecto de inhibidores del ciclo celular

4. REPRODUCCIÓN

Estudio de la meiosis en anteras de lirio	49
--	-----------

Actividades:

Utilización y manejo del microscopio óptico

Obtención de preparaciones microscópicas semipermanentes a partir de material biológico vivo

Caracterización de las etapas de la división meiótica

Observación y análisis detallado de las distintas fases de la meiosis, tanto de la primera como de la segunda división

5. CROMOSOMAS

Estudio del cariotipo humano y localización de genes específicos en los cromosomas	59
---	-----------

Actividades:

Organización cromosómica de los genomas

Estudio del cariotipo humano normal

Identificación de cariotipos anómalos con aneuploidías

Búsqueda de genes en las bases de datos del genoma humano

Localización cromosómica y mapeo de genes específicos

6. FOTOSÍNTESIS

Aislamiento de pigmentos fotosintéticos	75
--	-----------

Actividades:

Extracción de pigmentos vegetales

Separación por cromatografía en papel de clorofilas y otros pigmentos

Detección de almidón como producto de la fotosíntesis

Observación de cloroplastos al microscopio óptico

7. DESARROLLO Y REGULACIÓN EN PLANTAS

Estudio de la regulación hormonal	87
--	-----------

Actividades:

Estudio del desarrollo en plantas

Efecto de tratamientos hormonales sobre el crecimiento de las plantas

Análisis estadístico de los datos experimentales

8. ANATOMÍA EXTERNA E INTERNA DE ANIMALES

Disección de un invertebrado y un vertebrado	101
---	------------

Actividades:

Disección de un invertebrado

Disección de un vertebrado

9. SISTEMA CIRCULATORIO

Estudio comparativo del corazón de vertebrados	115
---	------------

Actividades:

Disección de corazón de mamíferos y de peces

Estudio comparativo de las partes del corazón: ventrículos, aurículas y válvulas en los distintos grupos de vertebrados

Análisis de los procesos de sístole y diástole y su relación con las características morfológicas de cada una de las regiones que forman el corazón

Estudio de los diferentes tipos de sistemas circulatorios en los distintos grupos de vertebrados

Relación entre los sistemas circulatorios de vertebrados y los distintos modos de vida que presentan

Evolución del sistema circulatorio y ventajas adaptativas para cada tipo de circuito

10. FECUNDACIÓN Y DESARROLLO

Fecundación y desarrollo embrionario del erizo de mar	127
--	------------

Actividades:

Inducción y análisis de la fecundación *in vitro* del erizo de mar

Observación del dimorfismo sexual existente en el erizo de mar

Estudio de su morfología externa e interna y observación de las características específicas del grupo de los equinodermos

11. BIOINFORMÁTICA

Búsqueda bibliográfica en INTERNET	137
---	------------

Actividades:

Empleo de bases de datos de información científica

Búsqueda bibliográfica

Obtención de artículos científicos

Acceso a libros científicos en red

2. ENZIMAS Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Ensayo de actividad de la catecolasa

En esta práctica se va a analizar la actividad de la enzima **Catecolasa**, también conocida como catecol oxidasa, polifenol oxidasa o **Tirosinasa**. Es una enzima muy importante y muy abundante en la naturaleza. Se encuentra tanto en las células de organismos vegetales como de animales.

En las plantas, esta enzima (que se suele denominar catecolasa) es responsable del pardeo o color marrón que cualquiera ha podido observar en las patatas, champiñones, alcachofas, piñas, plátanos, manzanas y otras muchas frutas, cuando después de pelarlas o trocearlas quedan expuestas durante un tiempo al aire. En general, es un fenómeno que se puede observar, con mayor o menor intensidad, en todos los tejidos de plantas al poco tiempo de ser cortadas o dañadas.

Es una reacción que tiene un papel protector para las plantas, ya que los productos de esta reacción, las quinonas, son dañinas para las bacterias y, por tanto, protegen a los tejidos vegetales heridos o dañados de la invasión bacteriana. Es una enzima de indudable interés en los procesos de transformación y almacenamiento de los productos vegetales comerciales, ya que su actividad modifica el aspecto y el sabor de los mismos. Evitar o favorecer la actividad de esta enzima en determinadas etapas del procesamiento para la comercialización tiene una gran importancia económica.

En los animales esta enzima (que suele denominarse tirosinasa) tiene una gran relevancia ya que es responsable del proceso de melanización. La formación de melanina produce la pigmentación oscura marronacea de los epitelios, y también de la tinta de los calamares y pulpos. La enzima tirosinasa convierte el aminoácido tirosina en el pigmento oscuro e insoluble melanina. La melanina proporciona una pantalla protectora frente a la radiación solar. Los albinos carecen de esta enzima funcional, por un defecto o mutación en el gen que la codifica.

Materiales

Patatas
Agua destilada
Catecol (0,09M)
Batidora de brazo doméstica
Pipetas Pasteur
Tubos de ensayo
Vasos de precipitados
Embudos
Papel de parafilm o film plástico transparente
Gasas
Termómetro 0-100 °C
Mechero Bunsen
0,1M ácido cítrico y 0,2M fosfato disódico
Feniltiourea
Baño termostatzado (opcional)

Objetivos

- Se estudiará la enzima **catecol oxidasa** denominada también **tirosinasa**. Esta enzima se encuentra en las células, tanto en material vegetal como animal, y es responsable del proceso de melanización en animales y del pardeo en vegetales.
- Se realizará su extracción a partir de material biológico vivo.
- Se analizará la actividad catecol oxidasa por medio de la reacción del extracto enzimático obtenido con un sustrato exógeno añadido, a través del producto coloreado que se obtiene en la reacción.
- Se comparará con la reacción obtenida a partir del sustrato celular endógeno.
- Se estudiará el efecto de la temperatura, del pH, de la concentración de enzima y la concentración de sustrato en la reacción.
- Se analizará la inhibición enzimática por medio de un inhibidor químico específico de la enzima y por desnaturalización de la enzima.

Introducción

En el interior de las células tiene lugar una multitud de reacciones simultáneas, que proceden, de forma ordenada y regulada, a una gran velocidad debido a la presencia de enzimas que actúan como catalizadores biológicos.

Las enzimas, como cualquier catalizador químico, aceleran la velocidad de la reacción, sin modificar la situación de equilibrio, disminuyendo la energía de activación necesaria para que ésta tenga lugar, permitiendo, por tanto, que la reacción ocurra en condiciones fisiológicas de temperatura y pH.

Las enzimas son proteínas, y poseen las características químicas y las propiedades típicas de éstas. Como cualquier proteína tienen estructura primaria, secundaria, terciaria y en algunos casos cuaternaria. Su estructura tridimensional es la clave de su actividad catalítica. Cada enzima tiene una forma precisa que permite la interacción específica con una determinada molécula de **sustrato**, que es la molécula que va a ser transformada en la reacción. La región de la enzima que interacciona con el sustrato se denomina sitio activo. La enzima interacciona con el sustrato favoreciendo la reacción sin ser alterada durante el transcurso de la misma, de forma que puede volver a ser reutilizada.



Diversos factores pueden afectar **la cinética de una reacción enzimática, modificando la velocidad o provocando una inhibición de la reacción**. La concentración tanto de enzima como de sustrato son, lógicamente, factores importantes que determinan la velocidad de la misma. Cualquier condición que disminuya el movimiento de las moléculas, es decir, que reduzca su energía cinética, disminuirá el número de colisiones correctas entre la enzima y el sustrato, reduciendo la velocidad de la reacción y la producción del producto. Diversos factores ambientales, como temperatura, pH o la presencia de otras moléculas químicas pueden afectar a la propia actividad de la enzima. Cualquier condición que provoque un cambio en la forma de la enzima y en su sitio activo que impida el correcto encaje con el sustrato impedirá que se produzca la reacción. Algunos productos químicos actúan como **inhibidores** de una determinada enzima ya que pueden interaccionar parcialmente con el sitio activo e impedir el acceso del sustrato inhibiendo o ralentizando la reacción, otros pueden interaccionar con otras regiones diferentes de la enzima y provocar el mismo efecto al cambiar ligeramente la forma de la enzima. Algunas enzimas, aunque no todas, requieren de la presencia de otras moléculas, que se denominan genéricamente **cofactores** o **coenzimas** (dependiendo de si son moléculas inorgánicas u orgánicas), para que tenga lugar la correcta interacción con

el sustrato; su presencia o ausencia y su concentración puede provocar la inhibición de la reacción o bien ligeros cambios en la velocidad de la misma.

La mayoría de las enzimas se nombran con el sufijo *-asa* que sigue al nombre del sustrato de la reacción sobre el que actúan o bien al tipo de reacción, aunque en algunos casos se utiliza la combinación de ambos.

Parte experimental

1. *Obtención de un extracto enzimático a partir de patata*

Cortar en pequeños trozos una patata de aproximadamente 25 gr, previamente lavada y pelada.

Añadir 200 ml de agua destilada y batir durante 30 segundos, con una batidora de brazo tipo minipimer.

Filtrar a través de una doble capa de gasa y dejar reposar para que se pose el almidón. Cuando se observe una capa de precipitado blanco, que corresponde al almidón extraído de las células de la patata, decantar y guardar el sobrenadante que contiene el extracto enzimático de catecolasa que se va a utilizar en la práctica.

El extracto se reparte en tres tubos de ensayo, llenándolos hasta la mitad, y se marcan con rotulador (A, B, C); el resto se tapa y se guarda en nevera.

El tubo A contiene el extracto enzimático que se va a utilizar a continuación (punto 2) en condiciones normales o control, para observar la reacción cuando se añade el sustrato catecol exógeno.

El tubo B se hierve al baño maría durante 15 minutos para desnaturalizar la enzima, y se utilizará en los experimentos descritos en el punto 3.

El tubo C se deja a temperatura ambiente y se agita cada cierto tiempo para oxigenar el contenido y observar la reacción que transcurre lentamente con el sustrato endógeno, es decir, el catecol que contienen las células de la patata.

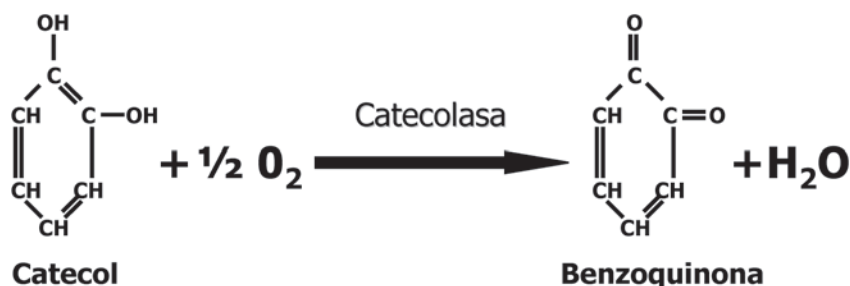
2. *Reacción enzimática*

Como sustrato para la reacción enzimática con la catecolasa obtenida de las células de patata se va a utilizar una disolución de catecol 0,09M (1%).

NOTA: El catecol es un producto tóxico y no debe ser manipulado por los alumnos. Debe ser pesado y la disolución preparada previamente por el profesor. Es recomendable la utilización de guantes desechables. La disolución al 1% es estable durante 2-3 días en la oscuridad.

El Catecol puede obtenerse de Sigma Ref. C9510 (100g 21,80€) (<http://www.sigmaaldrich.com>)

En presencia de oxígeno, la catecol oxidasa cataliza la oxidación del catecol, un compuesto fenólico muy abundante en las células vegetales, convirtiéndolo en benzoquinona, un compuesto que polimeriza dando lugar a los pigmentos melánicos coloreados.



La reacción dará un producto coloreado, inicialmente ámbar y tornará a marrón cada vez más oscuro a medida que avanza el tiempo de reacción y se acumula mayor cantidad de producto.

La reacción requiere oxígeno por lo que es necesario agitar suavemente para airear la mezcla al inicio durante unos 15 segundos, y cada 2 o 3 minutos durante el tiempo que dure la reacción (unos 5-10 minutos). Para agitar tapar la boca del tubo con parafilm o plástico para evitar que salpique, ya que es tóxico, y después destapar para airear.

Se marcarán con números distintos tubos de ensayo, y se añaden 3ml de H_2O (puede utilizarse también un buffer de pH 7).

Con una pipeta Pasteur se añadirán gotas según se indica en las distintas tablas. **ATENCIÓN:** *Jamás debe pipetearse con la boca la disolución de catecol.*

TUBO	Enzima Tubo A	Catecol	Agua destilada	Reacción = color (-, +, ++)
1	20	0	20	
2	0	20	20	
3	20	20	0	
4	5	20	15	

Observar las diferencias en la reacción como consecuencia de la presencia / ausencia de enzima y del sustrato; se observará, así mismo, el efecto de las diferentes concentraciones relativas de enzima y de sustrato.

3. *Inhibición de la reacción por desnaturalización de la enzima*

Se realiza la reacción con el extracto enzimático de catecolasa obtenida de patata, pero hervido previamente (tubo B). Este tratamiento provoca la desnaturalización de la estructura de la enzima y por tanto su inactivación.

TUBO	Enzima Tubo B	Catecol	Agua destilada	Reacción = color (-, +, ++)
5	20	20	0	

Comparar el resultado con el obtenido en el tubo número 3.

4. *Estudio del efecto del pH en la reacción*

Para estudiar el efecto del pH en la reacción catecol/catecolasa se utilizarán diferentes proporciones de una solución 0,1M de ácido cítrico y 0,2M de fosfato disódico, para obtener el tampón o buffer en el que posteriormente se realizará la reacción:

pH	Cítrico (ml)	Fosfato (ml)	Agua destilada(ml)
9,2	0	40	10
7,1	10	34	11
2,5	40	0	10

Reacción:

TUBO	Enzima A (gotas)	Catecol (gotas)	Buffer	Reacción = color (-, +, ++)
6	20	20	3 ml pH 9,2	
7	20	20	3 ml pH 7,1	
8	20	20	3 ml pH 2,5	

5. Inhibición de la reacción por un inhibidor químico específico

La enzima catecolasa contiene cobre (Cu^{++}) que actúa como cofactor en la reacción y es por tanto esencial para el correcto funcionamiento de la misma. La enzima es inhibida por cualquier agente que atraiga y una el cobre, haciéndolo inaccesible para ser utilizado como cofactor en la reacción.

Como inhibidor se utilizará una disolución saturada de feniltiourea (PTU) (0,5 gr en 50 ml).

NOTA. La feniltiourea es un producto muy tóxico. Debe ser manipulado con mucha precaución únicamente por el profesor, preparado antes de la práctica, con guantes para pesarlo, y evitando respirar el polvo o los vapores.

La feniltiourea (o feniltiocarbamida) puede obtenerse de Sigma Ref. P-5272 (100gr 29,30€) (<http://www.sigmaaldrich.com>)

TUBO	Enzima A	Catecol	PTU	Reacción = color (–, +, ++)
9	20	20	20	

Observar la reacción y comparar con el tubo número 3.

Notas

Si se dispone de colorímetro en el laboratorio, se puede realizar un estudio cuantitativo de la reacción. Para ello es necesario valorar la intensidad del color obtenido en cada caso al medir la variación de absorbancia a 500 nm. Plantear el estudio del efecto de la variación de concentraciones de extracto enzimático y de sustrato, obteniendo diferentes datos a intervalos periódicos y representando los valores obtenidos en una gráfica en función de la concentración y el tiempo.

Si se dispone de centrífuga se puede obtener un extracto enzimático más puro y en menor tiempo, centrifugando el batido de patata durante 5 minutos a 500 g, y filtrando posteriormente a vacío con filtro de papel.

Los alumnos pueden completar el estudio de esta actividad enzimática en casa, analizando y comparando el extracto enzimático procedente de diferentes materiales, por ejemplo champiñón, plátano, patata y piña. Se estudiará la actividad con el sustrato endógeno, el catecol, presente en las propias célu-