



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Bioquímica

Erratas:

Trabajo Práctico N° 4

Determinación de Actividad Enzimática

Antecedentes:

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad de la enzima.

La actividad enzimática refleja la capacidad de una enzima de transformar sustrato en producto en una unidad de tiempo. Se define la unidad de actividad enzimática, U, como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato en un minuto. La actividad enzimática específica es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína, U/mg prot, o por mililitro de disolución, U/ml.

Recientemente, el Sistema Internacional de Unidades (SI) ha definido la unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que transforma 1 mol de sustrato por segundo. Esta unidad se llama katal (kat). Como 1 mol son 10^6 μmoles y 1 minuto son 60 segundos, resulta que 1 katal equivale a 60×10^6 U. Esta unidad es muy grande, de forma que se utilizan frecuentemente los submúltiplos como el microkatal (μkat , 10^{-6} kat) o el nanokatal (nkat, 10^{-9} kat). Sin embargo esta unidad no es muy utilizada.

$$U = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \quad \text{kat} = \frac{\text{moles}}{\text{seg}}$$

Cuando se conoce el peso molecular de la enzima pura y el número de centros activos por molécula de enzima, las medidas de actividad enzimática permiten calcular el número de recambio de la enzima, o sea, el número de reacciones elementales que realiza el enzima por cada centro activo y por unidad de tiempo.

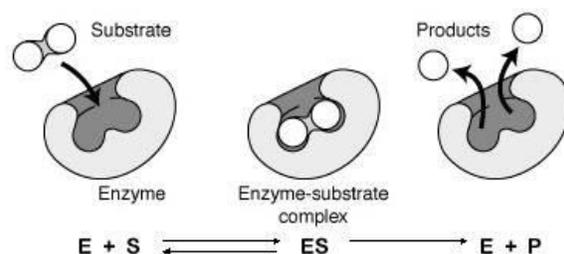


FIGURA 1

Esquema de una reacción catalizada por una enzima

Curva de progreso de la reacción: corresponde al gráfico de la cantidad de producto formado (expresa en concentración) en función del tiempo, para una reacción química. También puede corresponder a la cantidad de sustrato en función del tiempo.

La curva de progreso permite determinar la velocidad inicial de la reacción, V_0 , a partir de la pendiente de la curva en el tiempo inicial, T_0 , considerando una concentración de sustrato constante.

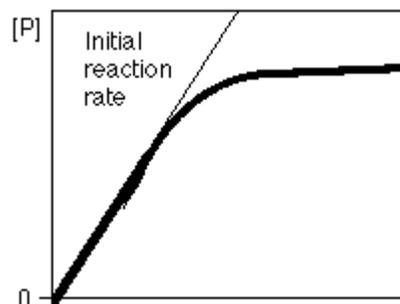


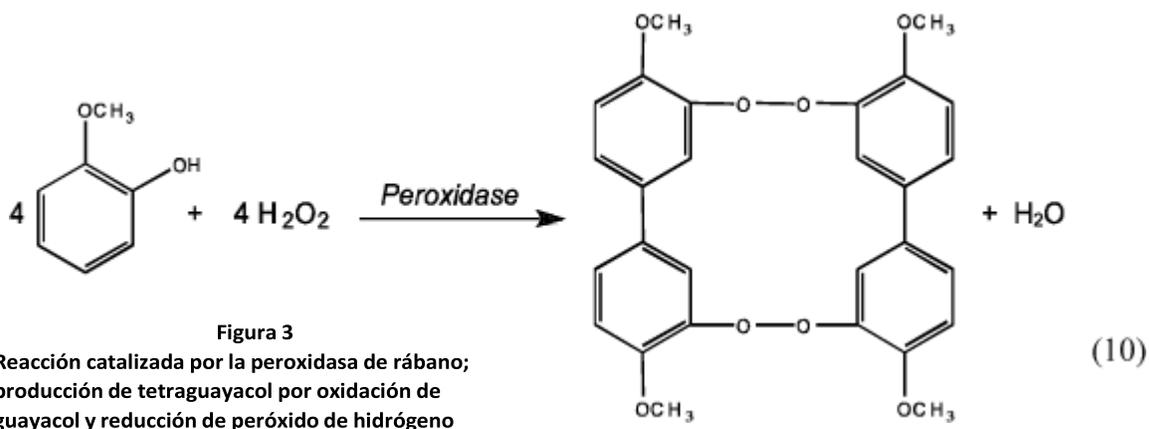
FIGURA 2

Esquema de una curva de progreso

¿Por qué en esta primera etapa de la reacción la aparición de producto ocurre a velocidad constante?

En este trabajo práctico se calculará la actividad de la enzima Peroxidasa de Rábano. Esta enzima cataliza tanto reacciones cromogénicas como quimioluminiscentes, dependiendo de los sustratos utilizados. **La reacción consiste en la oxidación de diferentes compuestos dadores de hidrógeno mediante la reducción de H_2O_2 .** El sustrato oxidable que utilizaremos en este trabajo práctico es el **guayacol**, que se oxida a un compuesto coloreado (color ladrillo) llamado **tetraguayacol**, el cual puede ser detectado a una longitud de onda de **470nm**.

La reacción ocurre de la siguiente manera:



La medición de la aparición de producto a 470 nm permite determinar, a tiempos cortos, la velocidad inicial de reacción, V_0 , con la cual se calculará posteriormente la actividad enzimática.

Objetivos:

- Elaborar curvas de progreso para la reacción catalizada por la peroxidasa de rábano utilizando distintas diluciones del extracto crudo de rabanito.
- Determinar actividad enzimática y actividad enzimática específica para la enzima en estudio.
- Establecer la concentración de proteína del extracto crudo de Rábano.

Reactivos:

- Extracto de rábano (mantener en hielo).
- Guayacol 1% (preparado en etanol 50%).
- Peróxido de hidrógeno 1%.
- Agua destilada.
- Amortiguador Tris 500 mM pH 8

Procedimiento:

1. Usted recibirá las siguientes soluciones:

Sustratos de la reacción		Solución enzimática	
Reactivos	Volumen (ml)	Reactivos	Volumen (ml)
H ₂ O destilada	1,840	H ₂ O	1,6
Tris 500 mM	40 µL		
Guayacol 1%	0,04	Extracto de rabanito	0,4
H ₂ O ₂ 1%	0,08		Total = 2 ml
	Total = 2 ml		

2. A partir de la solución enzimática prepare 3 diluciones (1:2, 1:3, 1:4). Utilice la siguiente tabla para preparar las soluciones. Considere un volumen final de 5 ml para cada dilución.

Dilución	Volumen extracto de rabanito (ml)	Volumen agua destilada (ml)	Volumen final de dilución (ml)
1:2			3
1:3			3
1:4			3

3. Realice la determinación de absorbancia para el blanco de la reacción. Recuerde que la determinación de absorbancia debe realizarse a 470 nm.

¿Cuál es el blanco apropiado en estos ensayos? Considere y discuta los siguientes controles propuestos;

- Tiempo cero de una reacción enzimática (cantidad de producto en la dilución enzimática antes de empezar la reacción).
- Control no enzimático (contaminación inicial con producto, más producto generado no enzimáticamente en las condiciones de ensayo)

4. Usando las 3 diluciones de solución enzimática realice los ensayos enzimáticos. Para ello utilice un volumen de solución de sustrato y, posteriormente, agregue un volumen equivalente de la dilución del extracto. Agitar la mezcla de reacción rápidamente y poner en espectrofotómetro registrando la absorbancia del tiempo cero. Continúe registrando la absorbancia a intervalos regulares de tiempo (se le indicará durante la realización del práctico estos tiempos). ¿Hasta qué momento es necesario registrar la absorbancia?

Recuerde que debe repetir este procedimiento para cada una de las diluciones enzimáticas que preparó previamente.

Con los datos obtenidos grafique los datos de **Absorbancia vs Tiempo** en minutos.

Esta curva será la **curva del progreso de la reacción** ¿Qué zona de la curva es útil para determinar la velocidad inicial de la reacción?

Resultados a informar:

1. Para cada una de las diluciones calcule la velocidad inicial de reacción expresada en $\mu\text{M}/\text{min}$.
2. A partir de las pendientes de las curvas de progreso calcule las unidades ($\mu\text{moles}/\text{min}$) enzimáticas de peroxidasa en el extracto crudo de rabanito para cada una de las diluciones. Para esto considere que el coeficiente de extinción molar del tetraguayacol es $7.019 \text{ litros mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Recuerde considerar los factores de dilución que correspondan.
3. Luego utilice la **concentración de proteína del extracto** para calcular la actividad específica de la enzima en el extracto crudo de rábano. Además exprese los resultados en términos de unidades de enzima por ml de extracto.

Además, su informe debe incluir:

1. Presente las curvas de progreso obtenidas para cada una de las diluciones usadas.
2. Muestre cómo calcular la velocidad de reacción a partir del gráfico anterior y discuta la importancia de obtener este valor en condiciones de velocidad inicial.
3. Informe los cálculos realizados para determinar la actividad específica en términos de U/mg y U/ml. Discuta las ventajas y desventajas de presentar los resultados en una u otra forma.
4. ¿Qué utilidad tienen realizar tres curvas de progreso utilizando diferentes diluciones?
- 5.Cuál es la función del amortiguador Tris (Tris(hidroximetil)aminometano))