

## EXPERIMENTO 8

### PURIFICACION DE LA ENZIMA LISOZIMA PRESENTE EN LA CLARA DE HUEVO

#### REQUISITOS

Repasar los principios del intercambio iónico, electroforésis, influencia del pH. y espectrofotometría

#### OBJETIVOS

Purificar la enzima lisozima a partir de la clara de huevo por cromatografía de intercambio iónico, basándonos en su punto isoeléctrico, purificación mediante electroforésis en geles de poliacrilamida y determinación de la actividad enzimática por espectrofotometría.

#### 1. FUNDAMENTO

Entre las proteínas de la clara de huevo la lisozima es la única que presenta un punto isoeléctrico  $> \text{pH } 9,5$  por esta razón es fácilmente separable del resto de las proteínas de la clara de huevo, a un pH entre 9,5 y 10 es la única que posee una carga neta positiva, por lo tanto los intercambiadores aniónicos dejarán libre esta enzima o los intercambiadores catiónicos se ligaran a ella. Nosotros seguiremos la purificación basados en este principio, para luego efectuar una electroforésis vertical en geles de poliacrilamida. Cuando comparemos el recorrido de las bandas originadas por las proteínas presentes en cada fracción (de F0 a F4) contra las bandas de las proteínas comerciales con peso molecular (PM) conocido, podemos verificar el grado de purificación de la fracción que contiene la enzima ya que presentara una banda nítida y con el mismo PM de la lisozima comercial. También, podemos establecer el PM aproximado de las otras proteínas presentes en las fracciones restantes, y así comprobar si la purificación mediante columnas de intercambiadores iónicos fue eficiente.

## 1.1 Características de la enzima:

La enzima lisozima es una hidrolasa que cumple funciones de protección antibacteriana en nuestro organismo, ya que hidroliza el enlace glucosídico de los polisacáridos que forman las paredes celulares de las bacterias, por esta razón, al provocar la lisis del microorganismo *Micrococcus lysodeikticus*, la suspensión bacteriana se aclara (pierde turbidez) permitiendo medir la actividad enzimática siguiendo el declive de la absorbancia a 450 nm. Enzima descubierta por Fleming en 1922 capaz de disolver la pared celular de algunas bacterias (*Micrococcus lysodeikticus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus megaterium*, etc.).

La mayoría de las bacterias Gramnegativas son resistentes a la lisozima; sin embargo, Repaske (1956) ha demostrado que algunas de ellas (*E. coli*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas aeruginosa*) pueden hacerse sensibles a aquélla si se opera en presencia de agentes acomplejantes, como, por ejemplo, con 0,1 a 5 mg por mililitro de etilendiaminotetraacetato (EDTA) o de verseno.

Es bastante común entre los seres vivos, pues se ha encontrado en el extracto de distintas plantas, en tejidos y secreciones de animales superiores, donde al parecer sirven de protección contra la invasión de microorganismos. La actividad de la lisozima ha sido determinada en la clara de huevo y en suero de adultos, niños, recién nacidos, y en el cordón umbilical; orina de adultos y niños; fluidos cerebroespinal; jugo gástrico; bilis; saliva; lagrimas; leche materna, fluido amniótico, esperma, transudados, pus y fluidos pleurales. También la producen algunas bacterias (*Staphilococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) durante la fase estacionaria del crecimiento e interviene en los procesos de autólisis de estos organismos.

Es fácil de obtener cristalizada a partir de la clara de huevo, que la contiene en un 3 %. Para ello basta elevar hasta 9,5 el pH de una solución de clara de huevo a la que se ha añadido ClNa al 5 % . A las 48 horas de reposo a + 4 °C se han formado cristales de enzima.

La lisozima de la clara de huevo tiene un PM de 13.900 (según Lehninger, Pág. 61); 14.500 (Harrow, Pág. 138); 14.388 (Senéz, Pág. 119), pertenece a la Clase 3 (hidrolasas) según la clasificación de la IUB. Es una sola cadena polipeptídica con 129 residuos de aminoácidos, cuya secuencia es perfectamente conocida, y cuatro enlaces cruzados intracadena de cistina. Tiene sólo 25 % de sus restos de aminoácidos en forma de regiones alfa helicoidales, plegada de modo muy compacto, con casi todos sus grupos R polares hacia el exterior de la molécula y los grupos R apolares o hidrófobos hacia el interior.

El complejo Enzima–Sustrato de la lisozima ha sido cristalizado y analizado proporcionando información sobre la estructura del centro activo, observada como una larga hendidura, a la cual puede acoplarse su sustrato normal (el péptidoglicano de cadena larga, presente en las paredes celulares bacterianas). Se cree que el grupo carboxilo del residuo del aminoácido Glu-35 en la enzima, tiene un valor pKa lo suficientemente alto para ser protonado en la región de pH de máxima actividad de la lisozima (pH 5 – 6) y este carboxilo puede actuar como un catalizador general para la hidrólisis.

De los 129 restos de aminoácidos de la alfa lactoalbúmina, una proteína de la leche, 54 son idénticos a los hallados en la enzima lisozima de la clara de huevo de gallina. Estas proteínas que aparentemente no se hallan relacionadas, comparten un común denominador, ambas activan grupos carbohidratos:

- La alfa lactoalbúmina es una subunidad reguladora de la enzima lactosa sintetasa, enzima ésta que cataliza la síntesis de la lactosa a partir de sus componentes monosacáridos.
- La lisozima es una enzima que hidroliza cadenas de polisacáridos de la pared celular bacteriana.

## **1.2 Estructura del peptidoglicano**

Las bacterias Grampositivas poseen una pared celular que tiene en su superficie, por fuera de la membrana celular lipídica, un complejo polisacárido-péptido de múltiples capas con enlaces cruzados, al que se denomina péptidoglicano. Las paredes celulares de las bacterias Gramnegativas contienen también peptidoglicano, pero éste forma una sola capa y está cubierto por una capa de membrana lipídica externa.

La estructura química del peptidoglicano (llamado también mureína) de la pared celular de una bacteria Grampositiva está formada por cadenas largas de polisacáridos paralelas entre sí que son copolímeros de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, unidas transversalmente mediante cadenas laterales peptídicas cortas (tetrapéptidos). La unidad básica estructural del péptidoglicano consta de:

- 1.- Un disacárido N-acetil-D-glucosamina y ácido N-acetilmurámico unidos por un enlace glicosídico  $\beta$  (1-4).
- 2.- Un tetrapéptido de L-alanina, D-alanina, ácido D-glutámico o D-glutamina, y además ácido mesodiaminopimélico, L-lisina, L-hidroxilisina u ornitina, dependiendo de la especie bacteriana de que se trate. Este tetrapéptido es poco habitual porque contiene aminoácidos D.
- 3.- Un puente peptídico de pentaglicina.

El resto de D-alanina terminal de la cadena lateral de una cadena polisacárida se une covalentemente con la cadena peptídica lateral de una cadena polisacárida adyacente, bien directamente, como en *E. coli*, o a través de un puente peptídico, de pentaglicina como en el *Staphylococcus aureus*. La glicina N-terminal del puente de pentaglicina se une mediante su grupo amino al grupo carboxilo de la D-alanina, mientras que la glicina C-terminal se une mediante su grupo carboxilo al grupo  $\epsilon$ -amino de la L-lisina. En las bacterias Grampositivas, además del peptidoglicano, se encuentran ácidos teicoicos, formando parte de la pared bacteriana.

La estructura del peptidoglicano es resistente a la acción de enzimas L-proteasas, tales como la tripsina y la quimotripsina, ya que éstas no atacan a los péptidos que contienen D- aminoácidos. La lisozima es una enzima capaz de lisar las cadenas polisacáridas del peptidoglicano de la pared celular de bacterias Grampositiva (*Micrococcus lysodeikticus*), hidrolizando el enlace Beta 1-4 glicosídico existente entre el ácido N- acetilmurámico y la N-acetil-glucosamina. Los productos de la acción de la lisozima son disacáridos de la N-acetil glucosamina y del ácido N-acetil murámico que todavía se hallan unidas a las cadenas laterales peptídicas. Una vez escindido el esqueleto de esa manera, la célula se hincha con la ruptura de la membrana hay pérdida del contenido celular y ocurre la muerte bacteriana.

En las bacterias Gramnegativas, la capa de peptidoglicano es mucho más delgada. Aunque está presente la misma estructura básica de polisacáridos, las cadenas peptídicas y sus uniones son algo diferentes.

### **1.3 Funciones de los peptidoglicanos:**

Los peptidoglicanos confieren a la pared bacteriana una forma característica y un soporte mecánico que protege a la bacteria de la lisis osmótica. La elevada concentración de metabolitos dentro de la bacteria genera una alta presión osmótica que puede llegar a alcanzar las 20 atmósferas. Asimismo los peptidoglicanos son responsables de la especificidad antigénica bacteriana y de su virulencia.

### **1.4 Métodos empleados para determinar la actividad de la lisozima:**

El método original para la determinación de la actividad de la lisozima mide el tiempo requerido para que la muestra hidrolice parte o toda el crecimiento del cultivo en placa de *Micrococcus lysodeikticus*. El segundo procedimiento más comúnmente usado para el ensayo de lisozima está basado en la acción

lítica de la enzima sobre la pared celular bacteriana resultando en la dispersión del contenido celular y el aclaramiento de la turbidez de la suspensión bacteriana. El método fotométrico para la determinación de la actividad de la lisozima está basado en el declive o disminución en la turbidez con el tiempo, cuando la muestra es adicionada a una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus*. La turbidez puede ser monitoreada a 450, 540, 640 o 645 nm.

La técnica de la placa de agarosa o lisoplaca usa una suspensión de la bacteria contenido en agar solidificado en placa de Petri. Se cortan posos en el agar, los cuales son llenados con la muestra y la placa es llevada a un cuarto de temperatura por 12 a 18 horas. Durante este período de tiempo las zonas aclaradas son relacionadas con una serie de estándares para determinar la concentración desconocida de lisozima de la muestra.

Han sido investigados otros procedimientos para la determinación de la actividad de lisozima en fluidos corporales. La actividad de la lisozima ha sido medida con un ensayo viscosimétrico, empleando un sustrato de Glicol quitina. La acción lisozima sobre el sustrato de glicol quitina resulta en la disminución de la viscosidad de la solución del sustrato, y el cambio en la viscosidad puede ser relacionado a la concentración de la enzima.

En adición a hidrólisis, la lisozima cataliza transglicosilaciones. Esta reacción ha sido utilizada para relacionar la cantidad de metilglicosamida liberada de la quitobiosa marcada en el C14 con la concentración de la enzima.

Una cuantificación inmunoquímica de la lisozima ha sido realizada por inmunoelectroforesis; la lisozima en suero u orina es determinada electroforéticamente en gel de agarosa conteniendo anticuerpos, y los inmunoprecipitados son coloreados con azul brillante de Comassie R-250.

Dos radioinmunoensayos para la lisozima han sido descritos. Ambos usan anticuerpos de lisozima aislada de orina de pacientes con leucemia monocítica. Los anticuerpos son incrementados en chivos y conejos. Esos ensayos utilizan lisozima marcada con yodo. El anticuerpo ligado a la lisozima es separado de ésta con un segundo anticuerpo o carbón cubierto con dextrano.

Ha sido reportado un método usando células de *Micrococcus lysodeikticus* vivas cargadas con iones de trimetilpenilamonio (TMPA<sup>+</sup>) como marcador. Este método emplea un electrodo selectivo para medir

TMPA+ liberado por lisis. La velocidad inicial del cambio de potencial está en función a la velocidad de lisis y es directamente proporcional a la actividad de la lisozima.

Un sustrato cromofórico ha sido evaluado como una alternativa de métodos de pared celular bacteriana. El sustrato utilizado fue 3,4- dinitrofenil tetra-N-acetil- $\beta$ -quitotetraósido. Bajo incubación con muestras de suero en buffer de citrato de sodio, el sustrato es convertido a 3,4- dinitrofenol. El incremento en absorbancia a 410 es medido con respecto al tiempo.

### **1.5 Preferencia de métodos:**

Algunos de los métodos descritos para la determinación de la actividad de la lisozima en fluidos corporales tienen limitaciones significativas, incluyendo sustratos no disponibles comercialmente, carentes de sensibilidad, necesidad de estándares humanos puros que no se obtienen fácilmente, algunos requieren instrumentos especializados, y otros procedimientos laboriosos.

Las dos técnicas más ampliamente aceptadas para la determinación de la actividad de la lisozima son el método turbidimétrico y el método de difusión de lisoplaca. Ambos son ampliamente afectados por varios factores que pueden ser controlados para dar resultados reproducibles. El método de lisoplaca es influenciado por el pH y la fuerza iónica del medio de gel. El método turbidimétrico es afectado por la técnica utilizada para preparar la suspensión de células bacterianas. Ambos métodos son afectados por el pH de la mezcla de reacción, por la naturaleza y las concentraciones de sales e iones presentes, y por la temperatura de reacción.

### **1.6 Interpretación:**

Los niveles de lisozima en suero y orina en personas sanas son usualmente insignificantes. Los niveles son elevados en suero y orina de personas con el síndrome de Chediak-Higashi y algunas leucemias.

La lisozima que se encuentra en circulación es rápidamente aclarada (eliminada) por el riñón. Así en las enfermedades en las cuales grandes cantidades de lisozima son liberadas, mediciones en suero y orina pueden ser realizadas.

## 2. MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

La clara de un huevo da aproximadamente 20 mg de enzima.

Lisozima comercial

2 g de CM-Celulosa

2 g de DEAE-Celulosa

Glicina 0,1 M en buffer de NaOH pH 10,0

Glicina 0,1 M en buffer de NaOH pH 10,0 con 0,5 M de NaCl

Centrifuga

Columna de 1 cm de diámetro x 25 cm de largo

Reactivos para calcular la concentración de proteínas por Lowry. (ver método)

Espectrofotómetro

Buffer fosfato 0,1 M pH 6,24

20 mg de *M. lisodeikticus* comercial

Equipo de electroforésis

Soluciones para electroforésis (ver método)

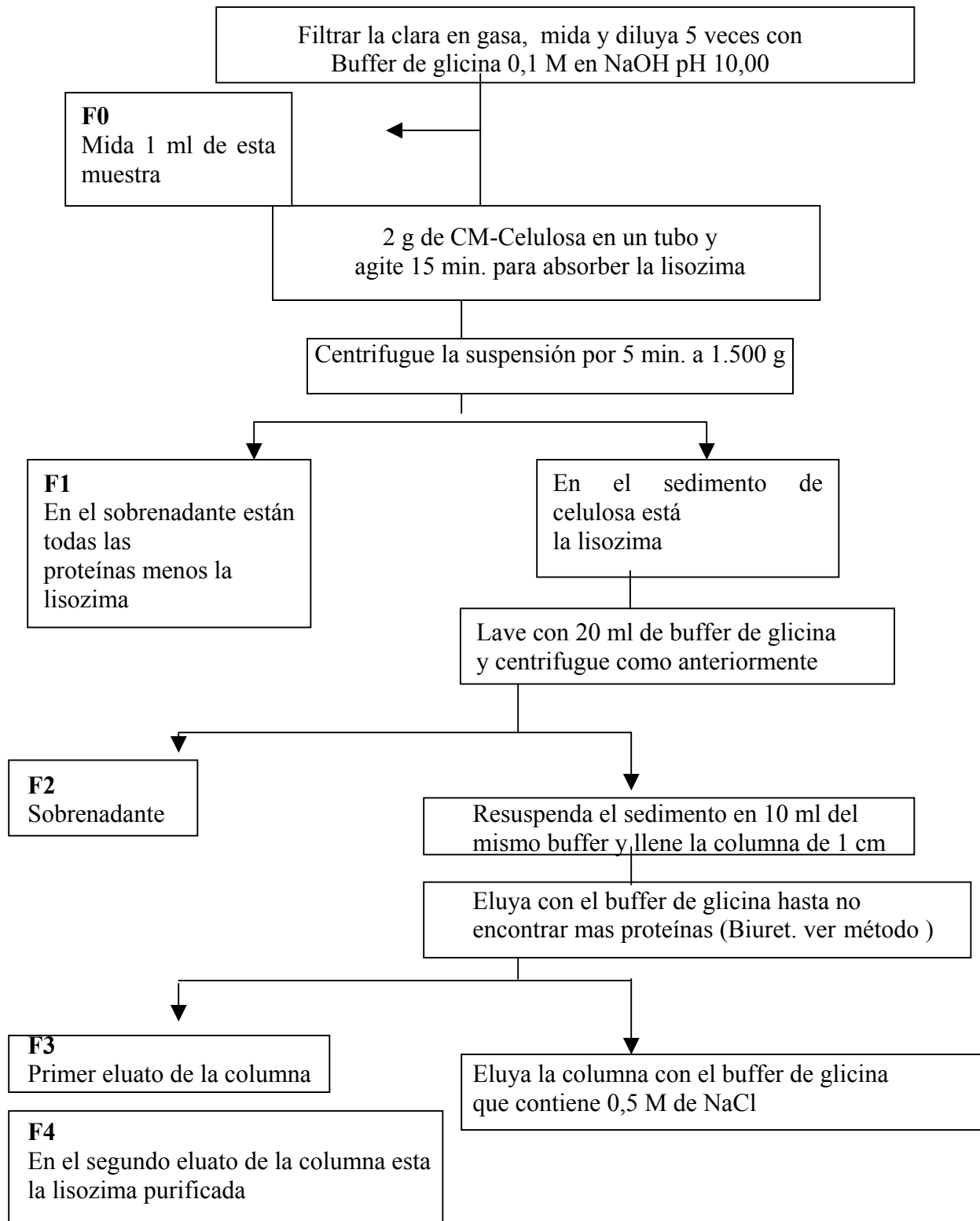
Agitador rotatorio

2.2

Procedimiento

2.2.1

Protocolo para la Purificación de la Enzima (columna de CM-Celulosa)





## 2.2.2 Lowry para Determinación de Proteínas

### 2.2.2.1 Soluciones

Solución A:	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2% en NaOH 0,1N
Solución B <sub>1</sub> :	CuSO <sub>4</sub> 1% en H <sub>2</sub> O
Solución B <sub>2</sub> :	Tartrato de sodio-potasio 2% en H <sub>2</sub> O
Solución Folin	diluida 1:1 con H <sub>2</sub> O
Solución C:	B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + A (1:1:100)
Solución de albúmina (Patrón)	1 mg/ml.

### 2.2.2.2 Procedimiento:

SOLUCION ALBUMINA	H2O	SOL . C	*	SOL. FOLIN	**	DO 600nm
Blanco 0 ml	0,6 ml	3 ml	*	0,3 ml	**	
Patrón 1 0,025 ml	0,575 ml	3 ml	*	0,3 ml	**	
Patrón2 0,05 ml	0,55 ml	3 ml	*	0,3 ml	**	
Patrón3 0,1 ml	0,5 ml	3 ml	*	0,3 ml	**	
Patrón 4 0,15 ml	0,45 ml	3 ml	*	0,3 ml	**	
Patrón 5 0,2 ml	0,4 ml	3 ml	*	0,3 ml	**	

\* ESPERAR 10 MINUTOS

\*\* ESPERAR 30 MINUTOS

<b>MUESTRA PROBLEMA X ml</b>	<b>0,6-Xml</b>	<b>3 ml</b>	<b>*</b>	<b>0,3 ml</b>	<b>**</b>	
SOLUCION ALBUMINA	H2O	SOL . C	*	SOL. FOLIN	**	DO 600nm

### 2.2.3 Reactivo de Biuret.

Prepare CuSO<sub>4</sub> al 0,5 % y NaOH al 10 %.

Coloque 0,5 ml en un tubo y 0,5 ml de NaOH al 10 % agite y añada 4 gotas del CuSO<sub>4</sub> al 0,5 %, agitando después de cada adición. La aparición de un color violeta indica la presencia de proteínas al formarse un complejo de coordinación entre el Cu y las uniones peptídicas

## 2.2.4 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida

- 1 Prepare todas las soluciones como se indica en método a continuación.
- 2 Disuelva la lisozima comercial en la misma proporción 1mg en 5 ml de buffer de la muestra.
- 3 Con una jeringa Hamilton coloque las muestras en cada pozo, anote el orden de colocación.
4. Corra el gel por 2 ½ h como indica el método.
5. Tiña, destiña y deje secar por 24 h
6. Compare las manchas y saque sus conclusiones.

### 2.2.4.1. Materiales y Método

- **Reactivos.**

Acrilamida  
Bis Acrilamida ( N,N'-Metilenbisacrilamida )  
Tris ( 2-hidrometil-2-metil-1,3-propanediol )  
SDS ( Dodecil sulfato de sodio )  
TEMED ( N,N,N',N'-Tetrametilen-etilendiamina)  
Persulfato de amonio  
2-Mercaptoetanol  
Glicerol  
Azul de bromofenol  
Glicina  
Ácido clorhídrico  
DTT Ditriotreitol

- **Soluciones stock.**

1. Tris-HCl 2 M pH 8,8 preparar 100 ml  
Tris 24,2 g  
H<sub>2</sub>O 50 ml  
NaOH 70 % lentamente hasta pH 8,8 ( aprox. 4 ml)  
H<sub>2</sub>O v.f 100 ml
2. Tris-HCl 1 M pH 6,8 preparar 100 ml  
Tris 12,1 g  
H<sub>2</sub>O 50 ml  
NaOH 70 % lentamente hasta pH 6,8  
H<sub>2</sub>O v.f 100 ml
3. SDS 10 %, preparar 100 ml.
4. Glicerol 50 %, preparar 100 ml.
5. Azul de bromofenol 1 % preparar 10 ml en etanol.

6. TEMED 10 %
7. Solución de tñido para 1 L
 

Azul de Coomassie- R-250	1 g
Metanol	450 ml
H <sub>2</sub> O	450 ml
Ácido acético glacial	100 ml
8. Solución de desteñido para 1 L
 

Metanol	100 ml
H <sub>2</sub> O	800 ml
Ácido acético glacial	100 ml

- **Soluciones de trabajo.**

- 1 Solución A. (Solución Stock de acrilamida) para 100 ml
 

Acrilamida	29,2 g
bis-acrilamida	0,8 g
H <sub>2</sub> O v.f	100 ml

nota: La acrilamida es tóxica, debe usarse guantes. La solución puede conservarse por meses en refrigeración.
2. Solución B, (Buffer de separación del gel) para 100 ml.
 

Tris-HCl 2 M pH 8,8	75 ml
SDS 10 %	4 ml
H <sub>2</sub> O	21 ml

nota : estable por meses en refrigeración.
3. Solución C (Buffer de concentración del gel) , para 100 ml.
 

Tris-HCl 1 M pH 6,8	50 ml
SDS 10 %	4 ml
H <sub>2</sub> O	46 ml

nota : estable por meses en refrigeración.
- 4 Persulfato de amonio para 5 ml
 

Persulfato de amonio	0,5 g
H <sub>2</sub> O v.f.	5,0 ml

nota: Puede usarse sin disolver.
- 5 Buffer de electroforésis para 1 L
 

Tris	3,0 g
Glicina	14,4 g
SDS	1,0 g
H <sub>2</sub> O v.f.	1,0 l

nota : estable por meses en refrigeración.

- 6 Buffer de la muestra, para 10 ml
- |                        |        |
|------------------------|--------|
| Tris-HCl 1 M pH 6,8    | 0,6 ml |
| Glicerol 50 %,         | 5 ml   |
| SDS 10 %               | 2 ml   |
| 2-Mercaptoetanol       | 0,5 ml |
| Azul de bromofenol 1 % | 1 ml   |
| H <sub>2</sub> O       | 0,9 ml |
- nota : estable por semanas en refrigeración o meses a - 20 °C

#### 2.2.4.2 Método

- **Cantidades de las soluciones de trabajo a usar, según el espesor del gel sobre la base de 2 geles de 6 X 8 cm.**

Espesor del gel	Separación	concentración
0,5 mm	5,6 ml	1,4 ml
0,75 mm	8,4 ml	2,1 ml
1,0 mm	11,2 ml	2,8 ml
1,5 mm	16,8 ml	4,2 ml

- **Cálculo de % del gel de separación.**

Solución A	x/3 ml
Solución B	2,5 ml
H <sub>2</sub> O	( 7,5-x/3 ) ml
Persulfato de amonio al 10 %	50 µl ( o pese 4 mg )
TEMED	5 µl
Volumen total	10 ml

- **Llenado del gel de separación.**

ejemplo: para 2 geles de separación 8 % ( 6 x 8cm x 0,75 mm )

Solución A	2,7 ml
Solución B	2,5 ml
H <sub>2</sub> O	4,8 ml
Persulfato de amonio al 10 %	50 µl ( o pese 4 mg )
TEMED	5 µl
Volumen total	10 ml

nota: no prepare el gel, debe seguir las siguientes instrucciones:

- **Preparación de los platos**

1. Coloque los platos en forma de sándwich, separados por los espaciadores e inserte en el aparato, ajuste los botones.
2. Combine la solución A ,B y el agua en un Erlenmeyer.

3. Agregue el Persulfato y el TEMED agitando suavemente, evite la aireación y trabaje rápidamente pues la polimerización puede estar comenzando.
4. Introduzca cuidadosamente la solución en el sándwich con una pipeta Pasteur, procure introducir la pipeta entre los vidrios, esto evita la formación de burbujas.
5. Detenga el llenado a 0,5 cm aproximadamente de donde llegan los dientes del peine, y coloque alrededor de 1 cm de agua, esto mantiene la superficie lisa.
6. Deje polimerizar por 30 a 60 min. se puede distinguir una separación entre el gel polimerizado y el agua.

- **Colocación del gel de concentración:**

Ejemplo: para 2 geles al 5 % ( 6x 8 cm x 0,75 mm ), 4 ml

H <sub>2</sub> O	2,3 ml
Solución A	0,67 ml
Solución C	1,0 ml
Persulfato de amonio al 10 %	30 µl ( o pese 2,5 mg )
TEMED	5 µl
Volumen total	4,0 ml

1. Saque el agua con una pipeta Pasteur.
2. Combine la solución A ,C y el agua en un Erlenmeyer
3. Agregue el Persulfato y el TEMED agitando suavemente.
4. Introduzca cuidadosamente la solución en el sándwich con una pipeta Pasteur, procure introducir la pipeta entre los vidrios, esto evita la formación de burbujas.
5. Introduzca cuidadosamente el peine, evitando la formación de burbujas.
6. Deje polimerizar por 30 min.
7. Retire cuidadosamente el peine después de la polimerización.
8. Agregue el buffer en los reservorios internos y externos, este seguro que todo este inmerso en el buffer.

- **Preparación de las muestras:**

1 La capacidad por pozo es la siguiente:

Espesor	1 pozo	5 pozos	10 pozos	15 pozos
0,5 mm	0,7 ml	45 µl	16 µl	9 µl
0,75 mm	1.0 ml	68 µl	24 µl	14 µl
1,0 mm	1,4 ml	90 µl	32 µl	18 µl
1,5 mm	2,1 ml	135 µl	48 µl	27 µl

2. Se combina la muestra con 5x buffer de la muestra como por ejemplo:  
20  $\mu$ l + 5  $\mu$ l
3. Se calienta a BM hirviendo por 2-10 min.
4. Se centrifuga por 1 segundo.
5. Se introduce la muestra dentro del pozo con una jeringa Hamilton. Evite la formación de burbujas.

- **Corrida del gel.**

1. Conecte los electrodos.
2. Encienda la fuente de poder a 200 V y 100 mA para empezar y 60 mA para finalizar cuando los geles son delgados. Cuando los geles son gruesos use 110 mA para empezar y 80 mA para terminar.
3. Aproximadamente 40-60 min.
4. Transcurrido el tiempo apague la fuente y desconecte los electrodos.
5. Retire los platos del gel de la cámara.
6. Quite cuidadosamente los espaciadores y retire el gel.

- **Teñido del gel con azul de Coomassie.**

1. Use guantes para transferir el gel a un recipiente de plástico con tapa.
2. Con una pequeña cantidad de la solución de teñido separe el gel del plato.
3. Añada la solución y agite por 5-10 min. a baja velocidad.
4. Retire la solución de teñido.

- **Desteñido.**

1. Lave con abundante agua.
2. Agregue la solución de desteñir por una hora, pero para un mejor revelado se recomienda dejar toda la noche.

- **Secado del gel.**

1. Cubra el gel con papel Whatman 3 MM para separar del recipiente de vidrio, cuidado de que el papel no se pegue al gel.

2. Cubra el frente del gel con acetato o papel de plástico, tenga cuidado de no dejar burbujas ya que se puede quebrar el gel.
3. Seque con un secador especial conectado a vacío.

### 2.2.5. Determinación de la Actividad de La Lisozima

2.2.5.1 Micro-organismo: Disuelva 20 mg de *M. lisodeikticus* comercial en 100 ml de buffer fosfato pH 7,00

2.2.52 Prepare el blanco con 3 ml de buffer fosfato solamente

2.2.53 Prepare el control con 2 ml del buffer que contiene el micro-organismo (MO) y 1 ml de agua.

2.2.54 A cada tubo previamente numerado (F0, F1, F2, F3 y F4) añada 2 ml del buffer con el micro-organismo y añada la fracción correspondiente, lea inmediatamente en transmitancia a 450 nm, tomando en cuenta el tiempo inicial. Siga el siguiente esquema:

Tubo	Identificación	Agua (ml)	Buffer fosfato (ml)	Buffer fosfato + MO (ml)
1	Blanco	0	3	0
2	Control	1	0	2
3	F0*	0	0	2
4	F1*	0	0	2
5	F2	0	0	2
6	F3	0	0	2
7	F4	0	0	2

\* Efectuar las diluciones

2.2.5.5 Dilución: Las fracciones F 0 y F1 deben ser diluidas previamente, para que no se salgan de la curva, de la siguiente manera: 0.5 ml de la Fracción en 9.5 ml H2O destilada (1:50). Debe tomarse en cuenta dicha dilución al momentos de efectuar los cálculos.

2.2.5.6 Lecturas: Efectué 3 lecturas posteriormente, cada 15 min.

2.2.5.7 Fórmula: Aplique la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{\text{Lectura inicial} - \text{Lectura final}}{\text{Tiempo}} = X$$

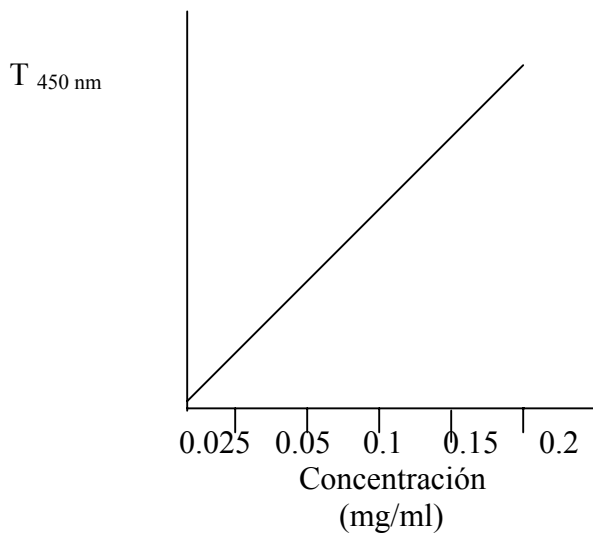
$$\text{Actividad específica} = \frac{X}{\text{mg. proteínas}}$$

2.2.5.8. Cálculos: Efectúe los cálculos y escriba sus resultados en una tabla., grafique como se explica a continuación:

**Figura 1 Gráfica de la solución patrón de albúmina**

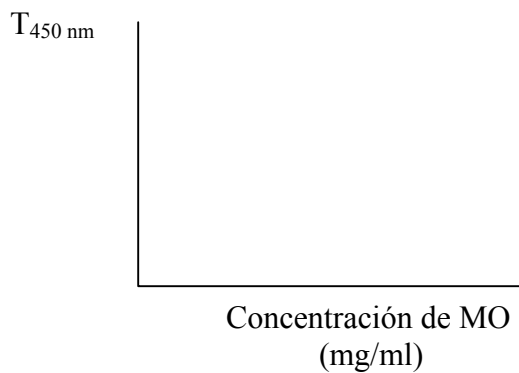
En el eje Y colocar las lecturas de tramitancia y en el X las concentraciones

La concentración de la solución patrón es(albúmina):  $1\text{mg/ml} = 0.025\text{mg}/0.025\text{ml}$



La concentración de la solución madre de MO comercial =  $20\text{mg}/100\text{ml} = 0.2\text{mg/ml}$

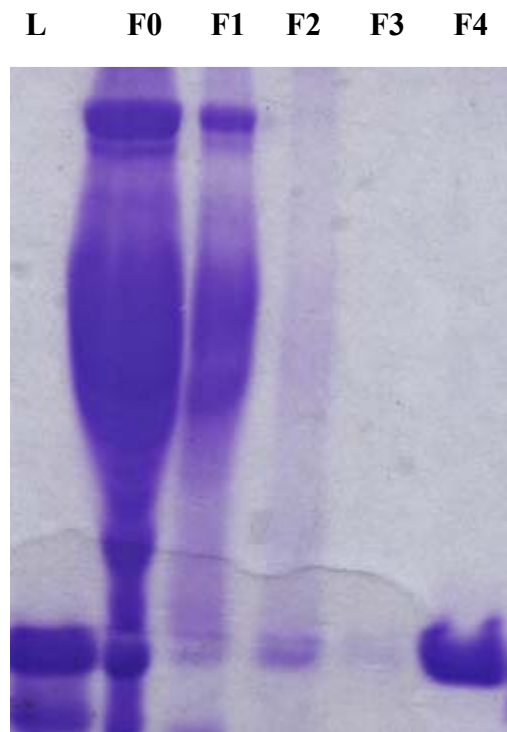
Unidad lisozima:  $\frac{0.001\mu\text{g sustrato Transformado}}{1\text{min}}$





2.2.5.9 Resultados esperados en el gel: La figura 2 muestra como debería presentarse los resultados del gel de electroforésis que Ud., preparó.

**Figura 2. Gel de poliacrilamida mostrando el recorrido de las fracciones y la lisozima comercial**



### **3. AUTO-EVALUACION**

1. Consulte sobre las propiedades líticas de la enzima, su sustrato, clasificación.
2. Diseñe un protocolo para intercambio con DEAE-Celulosa.
3. ¿Cómo cree Ud. que se pudo determinar el punto isoeléctrico de la lisozima?, diseñe un protocolo para llegar a determinarlo

#### 4. INFORME 8 (LISOZIMA)

**Apellidos**

Grupo de prácticas

Fecha

Calificaciones

**Nombres**

N° del mesón

N° del estudiante

Entrada		Desarrollo		Informe		<b>Definitiva</b>	
---------	--	------------	--	---------	--	-------------------	--

##### 1. Complete el siguiente cuadro referente a la lisozima

<b>Sustrato</b>	
<b>Producto</b>	
<b>Función en el organismo</b>	
<b>Donde se encuentra en el hombre</b>	
<b>Que organismos ataca</b>	
<b>Clasificación</b>	
<b>PM</b>	
<b>Numero de aminoácidos</b>	

2. Explique para cada fracción como hizo para purificar la enzima, ¿en que fracciones se espera encontrar la lisozima y por que?

Fraction	Biuret	pH	Sobrenadante o Sedimento	Intercambiados Cationico/Anionico	Observaciones
F0					
F1					
F2					
F3					
F4					
F5					

**Nota: El informe debe ser entregado al finalizar la práctica, sin anexar hojas.**

**3. Complete el siguiente cuadro**

<b>Fracción</b>	<b>Densidad Óptica</b>	<b>Mg proteínas</b>	<b>Numero de bandas</b>	<b>PM aproximado</b>	<b>Actividad Enzimática</b>	<b>Presencia de la lisozima</b>
F0						
F1						
F2						
F3						
F4						

**4. Recorte el gráfico de sus resultados y pegue en el espacio a continuación.**

**3. Dibuje el gel de la electroforésis e indique mediante flechas, sus resultados.**

**Nota: El informe debe ser entregado al finalizar la práctica, sin anexar hojas.**