

INDICE DE CONTENIDO	SECCIÓN	PAGINAS
EXPERIMENTO 1	1	1
INTRODUCCION A LOS METODOS EMPLEADOS EN LA BIOQUIMICA EXPERIMENTAL MODERNA		
REQUISITOS		1
OBJETIVOS		1
FUNDAMENTOS	1	1
COMPOSICIÓN Y ORGANIZACIÓN DE LA MATERIA VIVA	2	2
TECNICA PARA AISLAR UNA ORGANELA EN FORMA RELATIVAMENTE PURA	3	7
Fraccionamiento diferencial	3.1	7
Extracción	3.1.1	7
Homogeneización	3.1.2.	7
Centrifugación diferencial	3.1.3.	7
TÉCNICAS DE SEPARACIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	4.	9
Precipitación selectiva. fraccionamiento salino	4.1.	10
Diálisis y Ultracentrifugación	4.2	10
Cromatografía de Intercambio iónico	4.3	11
Cromatografía por afinidad	4.4.	13
Filtración en gel	4.5	14
Electroforesis	4.6	15
Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)	4.6.1	16
Electroforesis en columnas cilíndricas	4.6.1.1	16
Electroforesis en placas verticales planas	4.6.1.2	18
Purificación del receptor de Insulina	4.7	20
PROTOCOLO	5	22
ANEXOS	6	23
Preparación de soluciones	6.1	23
Soluciones	6.2	23
Formulas de soluciones	6.3	23
Ejemplo	6.4	24
Problemas para resolver	6.5	25
INFORME 1	7	26
INDICE DE FIGURAS	FIGURAS	PAGINAS
Dibujo de una célula eucariota ideal	1	4
Esquema de separación de fracciones por centrifugación diferencial	2	9
Diálisis y Ultrafiltración de una mezcla proteica	3	11
Separación de dos proteínas en DEAE-Celulosa, cargada positivamente	4	13
Cromatografía de afinidad	5	14

INDICE DE CONTENIDO	SECCIÓN	PAGINAS
Separación de dos proteínas de diferente tamaño mediante una columna de Sephadex.	7	15
Diagrama de un aparato de gel en disco	8	17
Electroforesis de preparaciones sucesivas durante la purificación de una proteína de suero del cangrejo azul	9	18
Equipo de electroforesis vertical	10	19
Gel que muestra la separación de fragmentos de ADN	11	20
INDICE DE TABLAS	TABLAS	PAGINAS
Elementos que componen el cuerpo humano (en seco)	1	3
Principales biomoléculas, sus bases estructurales y funciones	2	3
Componentes celulares su composición y funciones	3	5
Preparaciones utilizadas para estudiar los procesos bioquímicos	4	6
Algunos inhibidores de proteasas usados comúnmente	5	8
Principales métodos para separar y purificar biomoléculas	6	9
Purificación del receptor de la insulina	7	20
Purificación del receptor de la insulina	8	21
EXPERIMENTO 2	2	27
METODOS CUANTITATIVOS PARA LA IDENTIFICACION DE AMINOACIDOS Y PROTEINAS		
REQUISITOS		27
OBJETIVOS		27
FUNDAMENTOS	1	27
Fundamentos químicos de las pruebas	1.1	27
Prueba de la ninhidrina (Hidrato de tricetohidrindeno)	1.1.1	27
Prueba de Biuret	1.1.2	28
Prueba de coagulación	1.1.3	29
Prueba de Sulfato de amonio	1.1.4	29
Prueba xantoprotéica	1.1.5	29
Prueba de los grupos SH	1.1.6	29
Prueba de Sakaguchi	1.1.7	30
Prueba de Hopkins-Cole	1.1.8	30
Prueba de Millón	1.1.9	31
MATERIALES Y MÉTODOS	2	
Materiales	2.1	31
Métodos	2.2	32
Marcha analítica	2.3	34
AUTO-EVALUACIÓN	3	33
Aminoácidos no polares	4.1	35
Aminoácidos polares	4.2	36
Aminoácidos acídicos	4.3	37

INDICE DE CONTENIDO	SECCIÓN	PAGINAS
INFORME 2 (CUANTITATIVAS AMINOÁCIDOS)	5	38
INDICE DE FIGURAS	FIGURAS	PAGINAS
Reacción de la prueba de la ninhidrina	1	28
Reacción de la prueba de Biuret	2	29
Reacción de la prueba de los grupos SH	3	30
Grupo guanidina	4	31
Reacción de la prueba de Hopkins-Cole	5	32
EXPERIMENTO 3		39
CURVAS DE TITULACION DE AMINOACIDOS. DETERMINACION DE VALORES DE pK		
REQUISITOS		39
OBJETIVOS		39
FUNDAMENTOS	1	39
MATERIALES Y MÉTODOS	2	43
Equipos	2.1	43
Reactivos	2.2	43
Procedimiento	2.3	43
Titulación de los Aminoácidos	2.4	43
AUTO-EVALUACIÓN	3	44
INFORME 3 (TITULACION DE AMINOACIDOS)	4	45
INDICE DE FIGURAS	FIGURAS	PAGINAS
Formula general de los aminoácidos	1	39
Funciones ácido y base conjugada de los aminoácidos	2	39
Constante de equilibrio de la reacción de ionización	3	40
La función (b) <u>amina</u>	4	40
Curva de titulación del ácido acético	5	41
Curva de titulación del aminoácido alanina (ALA)	6	42
EXPERIMENTO 4		47
METODOS CUALITATIVOS PARA LA IDENTIFICACION DE CARBOHIDRATOS (MONOSACARIDOS, DISACÁRIDOS Y POLISACARIDOS)		
REQUISITOS		47
OBJETIVOS		47
FUNDAMENTOS	1	47
Fundamentos químicos de las pruebas	1.1	48
Prueba de Molish ⁴⁸	1.1.1	48
Prueba de Barfoed	1.1.2	48
Prueba de Bial o de Orcinol-HC	1.1.3	48
Prueba de Seliwanoff	1.1.4	49
Prueba de Lugol	1.1.5	49

INDICE DE CONTENIDO	SECCION	PAGINAS
Prueba de Benedict	1.1.6	49
Prueba Fenilhidrazina	1.1.7	50
MATERIALES Y MÉTODOS	2	50
Materiales	2.1	50
Métodos	2.2	51
Marcha analítica para monosacáridos, disacáridos y polisacáridos	2.3	53
Preparación del almidón de diversas especies de granos para observar los gránulos al microscopio	2.4.1	54
Hidrólisis ácida de disacáridos	2.4.2	54
AUTO-EVALUACIÓN	3	54
ANEXO	4	55
REPRESENTACIÓN DE FISCHER DE MONOSACÁRIDOS	4.1	55
REPRESENTACIÓN DE HAWORTH	4.2	55
DISACÁRIDOS MAS IMPORTANTES Y ESTRUCTURAS DEL PIRANO Y FURANO5	4.3	56
ANÓMEROS DE LA GLUCOSA Y REPRESENTACIÓN EN SILLA	4.4	57
INDICE DE FIGURAS	FIGURAS	PAGINAS
Reacción de Molish	1	48
Reacción de Bial	2	49
Reacción de Seliwanoff	3	49
Reacción de la prueba de Benedict cualitativo	4	50
Reacción de la Prueba de Fenilhidrazina	5	50
EXPERIMENTO 5		60
ENZIMA CATALASA		
ACTIVIDAD ENZIMATICA. FACTORES QUE LA AFECTAN. DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS- MENTEN. EFECTO DE INHIBIDORES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.		
REQUISITOS		60
OBJETIVOS		60
FUNDAMENTOS	1	60
Condiciones a controlar durante la manipulación de las enzimas	1.1	63
Condiciones a controlar durante la manipulación de las enzimas	1.1.	63
El pH	1.1.1	63
La fuerza iónica	1.1.2.	64
La agitación	1.1.3.	64
Determinación de la actividad enzimática	1.2.	64
Métodos de detección	1.2.1	64
Tiempo de incubación	1.2.2	64
Concentración de la enzima	1.2.3.	65
Concentración del substrato	1.2.4.	66
Temperatura de incubación	1.2.5.	67
pH de incubación	1.2.6.	67

INDICE DE CONTENIDO		SECCION	PAGINAS
La determinación de la constante de Michaelis y el efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática		1.3.	67
Métodos para determinar la constante Michaelis-Menten		1.3.1	68
Inhibición de la actividad enzimática		1.3.2	69
Métodos para determinar el efecto de inhibidores		1.3.3	69
MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS		2	73
Procedimiento		2.1	73
Preparación de la enzima		2.2.1.	73
Detección de la actividad enzimática		2.2.2.	73
Determinación del volumen de enzima		2.2.3	74
Determinación del tiempo de reacción		2.2.4.	
AUTO-EVALUACIÓN		3	74
INFORME 6 (CATALASA)		4	75
INDICE DE FIGURAS		FIGURAS	PAGINAS
Diagrama de energía para reacciones con ΔG positiva y negativa comparando una reacción catalizada contra una no catalizada		1	61
Influencia del aumento de la temperatura sobre la actividad enzimática		2	63
Influencia del aumento del pH sobre la actividad enzimática		3	64
Velocidad de reacción frente concentración del sustrato (V vs. [S])		4	65
Actividad enzimática frente a la concentración de la enzima		5	66
Inhibidor competitivo (K_m alterada y la V_{max} es igual). Por los métodos de Michaelis-Menten y Lineaweaver-Burk		6	70
Inhibidor no competitivo (K_m inalterada y V_{max} menor en ausencia de inhibidor). Por los métodos de Michaelis-Menten y Lineaweaver-Burk		7	71
Inhibidor irreversible no competitivo (K_m y V_{max} menor en ausencia de inhibidor). Por los métodos de Michaelis-Menten y Lineaweaver-Burk		8	72
INDICE DE TABLAS		TABLAS	PAGINAS
Clasificación de las enzimas en su primer dígito		1	62
EXPERIMENTO 6			77
ESPECTRO DE ABSORCION DEL CITOCROMO-C OXIDADO Y REDUCIDO Y DETERMINACION CUANTITATIVA DE GLUCOSA			
REQUISITOS			77
OBJETIVOS			77
FUNDAMENTOS		1	77
Aspectos teóricos		1.1	77
Colorimetría		1.1.1	78
Fotometría		1.1.2	78
Ley de Lambert-Beer		1.1.3	79
Fotómetros		1.1.4	81
Espectrofotómetros		1.1.5	81

INDICE DE CONTENIDO	SECCION	PAGINAS
MATERIALES Y MÉTODOS	2	82
Equipos materiales y reactivos	2.1	82
Procedimiento	2.2	82
Espectro de absorción del citocromo c.	2.2.1	82
Determinación de azúcar reductor (glucosa sanguínea) por el método de Somogyi-Nelson	2.2.2	83
Solución de hidróxido de bario	2.2.2.1	83
Solución de sulfato de zinc	2.2.2.2	83
Reactivo cúprico-alcálico	2.2.2.3	84
Reactivo arsenomolibdato	2.2.2.4	84
Soluciones patrón (standard) de glucosa	2.2.2.5	84
Desproteínización	2.2.2.6	84
INFORME 6 (CITOCROMO-C)	3	86
EXPERIMENTO 7		87
PURIFICACION DE LA ENZIMA INVERTASA DE LEVADURA		
REQUISITOS		87
OBJETIVOS		87
FUNDAMENTOS		87
MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS	2	88
Preparación del enzima bruto	2.1.	89
Levadura	2.1.1	89
Centrifugación	2.1.2	89
Enzima bruto	2.1.3	89
Purificación de la enzima bruta	2.2	89
Homogenización	2.2.1	89
Reposo	2.2.2.	89
Enfriamiento	2.2.3.	89
Diálisis	2.2.4.	90
Preparación de la columna de DEAE-celulosa	2.3	90
Resina	2.3.1.	90
Eluir	2.3.2	90
Tampón Tris-HCl 0,05M	2.3.4	90
Aumento fuerza iónica	2.3.5.	91
Medida de la actividad específica de la enzima	2.4	91
Dilución	2.4.1	91
Tampón acetato	2.4.2.	91
Incubar	2.4.3.	91
Determinación de proteínas por el método de Lowry	2.5	92
Prepare las siguientes soluciones	2.5.1	92
Cálculos según el método de Lowry	2.5.2.	92
Cálculo y tratamiento de datos	2.6.	92
Definición	2.6.1.	92
Actividad específica	2.6.2.	92

INDICE DE CONTENIDO		SECCION	PAGINAS
Rendimiento		2.6.3	93
Tabla de resultados		2.6.4	93
AUTO-EVALUACION		3	93
INFORME 7 (INVERTASA)		4	94
INDICE DE FIGURAS		FIGURAS	PAGINAS
Reacción de hidrólisis de la sacarosa		1	88
EXPERIMENTO 8			96
PURIFICACION DE LA ENZIMA LISOZIMA PRESENTE EN LA CLARA DE HUEVO			
REQUISITOS			96
OBJETIVOS			96
FUNDAMENTOS			96
MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS			96
Características de la enzima		1.1	97
Estructura del peptidoglicano		1.2	98
Funciones de los peptidoglicanos		1.3	99
Métodos empleados para determinar la actividad de la lisozima		1.4	99
Preferencia de métodos:		1.5	101
Interpretación		1.6	101
MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS		2	102
Procedimiento		2.2	103
Protocolo para la Purificación de la Enzima (columna de CM-Celulosa)		2.2.1	103
Lowry para Determinación de Proteínas		2.2.2	104
Soluciones		2.2.2.1	104
Procedimiento		2.2.2.2	104
Reactivo de Biuret		2.2.3	104
Electroforesis en Geles de Poliacrilamida		2.2.4	105
Materiales y Método		2.2.4.1	105
Determinación de la Actividad de La Lisozima		2.2.5	110
Micro-organismo		2.2.5.1	110
Blanco		2.2.5.2	110
Control		2.2.5.3	110
Fracciones		2.2.5.4	110
Dilución		2.2.5.5	110
Lecturas		2.2.5.6	110
Formulas		2.2.5.7	110
Efectué 3 lecturas posteriormente, cada 15 min		2.2.5.5	110
Aplique la siguiente fórmula		2.2.5.6	110
Cálculos		2.2.5.8.	110
Resultados esperados en el gel		2.2.5.9	112
AUTO-EVALUACION		3	112
INFORME 8 (LISOZIMA)		4	113
INDICE DE FIGURAS		FIGURAS	PAGINAS
Gráfica de la solución patrón de albúmina		1	111
Gel de poliacrilamida del recorrido de las fracciones y la lisozima		2	112

INDICE DE CONTENIDO	SECCION	PAGINAS
EXPERIMENTO 9		116
PURIFICACION PARCIAL DE LA CASEINA PRESENTE EN LA LECHE Y DETERMINACION DE SU PESO MOLECULAR Y DEL PRODUCTO DE LA HIDROLISIS POR LA ENZIMA BROMELINA DE LA PIÑA MEDIANTE ELECTROFORESIS		
REQUISITOS		116
OBJETIVOS		116
FUNDAMENTOS		116
MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS	2	116
Materiales	2.1	116
Métodos	2.2	117
Preparación de las fracciones	2.2.1.	117
Preparación de la caseína comercial.	2.2.1.2	118
Hidrólisis de la caseína por la bromelina	2.2.1.3	119
Corrida del electroforesis	2.2	119
Soluciones	2.2.1	119
Diluciones	2.2.2	119
Marcadores	2.2.3	119
Muestra	2.2.4	119
Corrida	2.2.5	119
Teñido y desteñido	2.2.6	119
conclusiones	2.2.7	119
AUTO-EVALUACION	3	119
INFORME 9 (CASEINA)	4	120
EXPERIMENTO 10		122
PRUEBAS CUALITATIVAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LÍPIDOS		
REQUISITOS		122
OBJETIVOS		122
FUNDAMENTOS		122
MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS	2	125
Materiales	2.1	125
Métodos	2.2	125
Fundamentos químicos de las pruebas para lípidos	1.1	124
Prueba de acroleína	1.1.1	124
Prueba de fusión	1.1.2	124
Prueba de Iodo	1.1.3	124
Prueba de Lieberman	1.1.4	124
Prueba de saponificación	1.1.5	125
AUTO-EVALUACIÓN	3	126
Marcha analítica	4	127
INFORME 10 (PRUEBAS CUALITATIVAS PARA LÍPIDOS)	5	128
INDICE DE FIGURAS	FIGURAS	PAGINAS
Cabeza-Cola de los ácidos grasos	1	122
Isomería CIS-TRANS de los ácidos grasos, puentes de hidrógeno con el agua y su ionización	2	123

INDICE DE CONTENIDO	SECCION	PAGINAS
Saponificación de un ácido graso	3	123
Reacción de la prueba de la acroleína	4	124
Reacción de la prueba de fusión	5	124
Reacción de la prueba de Iodo	6	124
Prueba de saponificación	7	125
EXPERIMENTO 11		129
EXTRACCION Y PURIFICACION DE LIPIDOS COMPLEJOS		
REQUISITOS		129
OBJETIVOS		129
FUNDAMENTOS	1	129
MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS	2	130
Materiales	2.1	130
Métodos	2.2	130
Extracciones y obtención de las fracciones	2.2.1	130
Preparación de la fracción 1: Colesterol.	2.2.1.1	130
Preparación de la fracción 2: Lecitina y Cefalina	2.2.1.2	130
Preparación de la fracción 3: Fosfátidos de Esfingosina y Glucósidos de esfingosina	2.2.1.3	130
Identificación de lípidos	2.2.2	131
Lecitinas y Cefalinas mediante la prueba de Fusión	2.2.2.1	131
Fosfátidos de esfingosina y glucósidos de esfingosina	2.2.2.2	132
AUTO-EVALUACIÓN	3	132
INFORME 11 (EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS)	4	133
INDICE DE TABLAS	TABLAS	PAGINAS
Identificación del colesterol mediante la prueba de Lieberman	1	131
EXPERIMENTO 12		134
SEPARACION DE NUCLEOTIDOS DEL ARN DE LEVADURA POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO		
REQUISITOS		134
OBJETIVOS		134
FUNDAMENTOS	1	134
Tipos y características del ARN ribosómico, ARN de transferencia y ARN mensajero	1.1	136
ARN de transferencia (tARN)	1.1.1	136
Estructura primaria y secundaria de tARN	1.1.1.1	137
Estructura terciaria del tARN	1.1.1.2	139
INDICE DE CONTENIDO	SECCION	PAGINAS
Transcripción y síntesis del ARN	1.1.2	139
Reconocimiento	1.1.3	142
Iniciación	1.1.4	142
Elongación	1.1.5	142
Término	1.1.6	143
ARN polimerasa	1.1.7	143
Detalles del experimento	1.1.8	144
MATERIALES EQUIPOS Y METODOS	2	144
Materiales	2.1	144

INDICE DE CONTENIDO		SECCION	PAGINAS
Métodos		2.2	144
AUTO-EVALUACIÓN.		3	145
INFORME 12 (ARN)		4	147
INDICE DE TABLAS		TABLAS	PAGINAS
Pka de los nucleótidos		1	145
INDICE DE FIGURAS		FIGURA	
Representación del mecanismo en el que participa el adaptador		1	137
Secuencia de bases del ^{Ala} tARN de levadura dibujado en su forma de trébol.		2	138
Transcripción y síntesis del ARN		3	140
Modelo del complejo de preiniciación de la transcripción de los genes eucarióticos de tipo II y sus componentes		4	141
EXPERIMENTO 13			148
EXTRACCIÓN DE ADN			
REQUISITOS			148
OBJETIVOS			148
FUNDAMENTOS		1	148
ÁCIDOS NUCLEICOS		1.1	149
ADN.		1.2	149
Secuencia del ADN		1.2.1	150
Estructura del ADN.		1.2.2.1	150
Estructura primaria		1.2.2.2	150
Estructura secundaria		1.2.2.3	150
Estructura terciaria		1.2.2.4	153
Formas del ADN.		1.2.2	155
Desnaturalización del ADN		1.2-3	156
Renaturalización del ADN		1.2.4	156
Cromosomas		1.2.5	157
Estructura cromosómica de un procarionta		1.2.5.1	158
Estructura cromosómica de un eucariota		1.2.5.2	158
MATERIALES Y METODOS		2	159
Materiales		2.1	159
Métodos		2.2	160
AUTO-EVALUACIÓN		3	160
INFORME 12 (ARN)		4	161
Polaridad del ADN		1	151
Estructura primaria		2	151
La difracción de rayos X que habían realizado Franklin y Wilkins		3	152
La equivalencia de bases de Chargaff.		4	152
ADN en procariontas		5	153
ADN en eucariotas		6	154
Formas tipo B, A y Z del ADN		7	155
Renaturalización de un ADN		8	157
Partes de los cromosomas		9	159
INDICE DE TABLAS		TABLAS	PAGINAS
Características de los tipos de ADN		1	153

INDICE DE CONTENIDO	SECCION	PAGINAS
PESOS ATOMICOS INTERNACIONALES	1	162
ABREVIATURAS DE UNIDADES, PREFIJOS Y CONSTANTES FISICAS	2	163
PREFIJOS UTILIZADOS EN LOS SISTEMAS DE UNIDADES INTERNACIONALES	3	163
PROBLEMAS DE PREPARACION DE SOLUCIONES	1	164
PROBLEMAS DE PREPARACION DE BUFFERES O AMORTIGUADORES	2	165
PROBLEMAS AMINOACIDOS	3	166
PROBLEMAS DE LA ESTRUCTURA DE PROTEINAS	4	168
PROBLEMAS SOBRE DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LAS PROTEINAS	5	169
GRUPOS QUIMICOS Y PRINCIPALES REACCIONES EN BIOQUIMICA UTILES PARA RESOLVER PROBLEMAS	1	172
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	1	179
REFERENCIAS ELECTRONICAS	2	180