

Indice

INTRODUCCION AL ANALISIS BIOQUIMICO

Fundamentos del análisis bioquímico cuantitativo	1
Comentarios generales; Instrucciones; Registro de datos; Estequiometría y concentración; Cálculos estequiométricos; Soluciones patrón; Dilución en serie; Parte alícuota; Técnicas de dilución y cálculos; Cambios de concentración; Principios de los logaritmos; Exactitud y precisión de las mediciones, y "cifras significativas"; Análisis de la fiabilidad estadística de los resultados; Problemas	
Amortiguadores y pH	13
Concepto de pH; Disociación del agua —escala de pH; Acción amortiguadora; Medición del pH de ácidos, bases y sales débiles; Ejemplos prácticos de laboratorio; Problemas	
Bibliografía	23

Capítulo 1

MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE IONES HIDROGENO EN SOLUCION ACUOSA

Empleo de patrones amortiguadores y de indicadores	24
Empleo del medidor del pH	26
Experimento 1	
Medición del pH	26
Titulación potenciométrica de ácidos débiles	28
Bibliografía	30

Capítulo 2

PROPIEDADES ANFOTERICAS DE LOS ACIDOS AMINADOS

Concepto de ácidos aminados como iones anfóteros	31
Experimento 2	
Titulación de ácidos aminados poliácidos	32
Titulación de la glicina en presencia de formol	32
Estudio de ácidos aminados por electroforesis en papel	34

Problemas	36
Bibliografía	36

Capítulo 3

ABSORCION DE ESPECTROFOTOMETRIA

Fundamentos de espectrofotometría	37
Experimento 3	
Espectro de absorción del rojo de fenol	40
Medición espectrofotométrica del pK'_n del rojo de fenol	42
Reducción del citocromo c	44
Problemas	44
Bibliografía	45

Capítulo 4

ASLAMIENTO, PROPIEDADES QUIMICAS Y FISICAS Y MEDICION CUANTITATIVA DE LAS PROTEINAS

Estructuras elementales, función y nomenclatura de las proteínas	46
Propiedades de solubilidad de las proteínas	47
Experimento 4	
Separación de proteínas de diversos tejidos	50
Preparación de la miosina del músculo de conejo	50
Separación de la caseína	52
Preparación de la vitelina	53
Cristalización de la albúmina de huevo	54
Preparación de una globulina cristalina a partir de semillas de verduras	54
Propiedades de solubilidad de las proteínas	55
Precipitación isoelectrica de la caseína	56
Efecto del pH sobre la solubilidad de la miosina	57
Separación de las proteínas del plasma	57
Coagulación del fibrinógeno	59
Solubilidad de la albúmina sérica y efecto de la concentración de alcohol	59
Precipitación de las proteínas por metales	59
Precipitación de las proteínas por los ácidos	60
Reacciones coloreadas cualitativas (ejercicio)	60
Medición cuantitativa de las proteínas por la reacción del biuret	60
Comparación entre los diversos métodos	60
Base química de la medición del biuret	62
Preparación de la curva patrón para la reacción del biuret	63
Bibliografía	63

Capítulo 5

SEPARACION ELECTROFORETICA DE PROTEINAS SERICAS

Introducción	64
--------------------	----

Experimento 5

Separación de proteínas séricas en tiras de acetato de celulosa	66
Separación de proteínas séricas mediante geles de acrilamida	67
Otros métodos simplificados en gel de acrilamida	71
Bibliografía	73

*Capítulo 6***IDENTIFICACION DE LOS GRUPOS TERMINALES N DE LAS PROTEINAS POR EL METODO DE SANGER**

Introducción	74
Experimento 6	
Preparación de la proteína con DNP	75
Hidrólisis de la proteína con DNP y extracción de los ácidos aminados con DNP	76
Preparación de ácidos aminados con DNP como control	76
Identificación cromatográfica de los ácidos aminados con DNP	76
Bibliografía	79

*Capítulo 7***PROPIEDADES CATALITICAS DE LA AMILASA, CATALASA Y UREASA**

Introducción	80
Experimento 7	
Amilasa	82
Catalasa	84
Ureasa	86
Bibliografía	88

*Capítulo 8***ASLAMIENTO DEL DNA Y DEL RNA**

Desdoblamiento de los ácidos nucleicos	89
Aislamiento de los ácidos nucleicos	90
Experimento 8	
Aislamiento de RNA de ribosomas y DNA nuclear puros del hígado de la rata	91
Aislamiento del DNA de bacterias o levaduras	92
Bibliografía	92

*Capítulo 9***DISTRIBUCION DE LOS ACIDOS NUCLEICOS EN PARTICULAS SUBCELULARES**

Experimento 9	
Preparación de componentes subcelulares	95
Métodos de extracción para el análisis de ácidos nucleicos totales de tejidos y fracciones tisulares	96

Medición del DNA y RNA en cada fracción	98
Ejemplos de cálculo	99
Bibliografía	100

Capítulo 10

ESTUDIO DE LOS CAMBIOS HIPERCROMATICOS Y DE VISCOSIDAD EN EL DNA PURO

Estudio de los cambios hipercromáticos	102
Experimento 10	
Cambios hipercromáticos por alteraciones de pH, por calor o por acción de los detergentes	102
Cambios hipercromáticos producidos por acción enzimática	103
Propiedades de viscosidad del DNA	104
Cinética del desdoblamiento del ácido desoxirribonucleico por desoxirribonucleasa	107
Bibliografía	109

Capítulo 11

PROPIEDADES QUIMICAS DE LOS CARBOHIDRATOS

Química básica de carbohidratos	110
Experimento 11	
Pruebas generales para los carbohidratos	113
Acción de los ácidos sobre los azúcares	114
Reacción del I_2 y falta de difusibilidad de los polisacáridos	115
Acción de las bases sobre los carbohidratos	116
Fermentación de los azúcares	116
Formación de osazonas (reacción de la fenilhidracina)	117
Cromatografía de carbohidratos en capa fina o en papel	118
Bibliografía	121

Capítulo 12

ANALISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE CARBOHIDRATOS POR POLARIMETRIA

Teoría	122
Estudio de la rotación específica, de la inversión y de la cinética de la mutarrotación de los azúcares	123
Experimento 12	
Rotación específica y mutarrotación de la glucosa: cálculo de la constante de mutarrotación	124
Rotación específica e inversión de la sacarosa	127
Aislamiento de identificación de la trehalosa por polarimetría	128
Bibliografía	129

*Capítulo 13***AISLAMIENTO DEL GLUCOGENO Y MEDICION DEL GRADO DE RAMIFICACION POR OXIDACION CON ACIDO PERYODICO**

Química	130
Experimento 13	
Aislamiento del glucógeno del hígado de rata	133
Análisis de glucógeno	134
Cálculos	135
Problemas	138
Bibliografía	138

*Capítulo 14***AISLAMIENTO Y PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE LOS LIPIDOS**

Introducción	139
Experimento 14	
Extracción y cromatografía en columna de adsorción de pigmentos vegetales	139
Extracción de las hojas de espinaca	140
Extracción de los carotenos de las zanahorias	140
Preparación de la columna de adsorción	141
Propiedades físicas y químicas de los lípidos	142
Bibliografía	144

*Capítulo 15***PURIFICACION DE LA LISOZIMA DE CLARA DE HUEVO (MURAMIDASA)**

Principios experimentales	146
Purificación con cromatografía de intercambio iónico	147
Métodos de identificación y recolección	149
Experimento 15	
Preparación de las columnas	150
Preparación de la enzima	150
Medición de proteínas	152
Ensayo de enzimas	152
Purificación por filtración en gel —exclusión con gel Sephadex	153
Bibliografía	160

*Capítulo 16***CINETICA DE LA LISOZIMA DE LA CLARA DE HUEVO Y LA HEXOCINASA**

Fundamentos de cinética enzimática	161
Inhibidores de la acción de las enzimas	165
Formas lineales de la ecuación de Michaelis-Menten	167

Experimento 16

Cinética de la lisozima de la clara de huevo	167
Desnaturalización y recuperación de la lisozima mediante intermediarios mixtos de disulfuro	171
Electroforesis de la lisozima y sus derivados en gel de poliacrilamida	173
Restauración de lisozima y derivado disulfuro mixto	174
Bibliografía	177

*Capítulo 17***MEDICION DEL PESO MOLECULAR DE LAS PROTEINAS POR FILTRACION EN GEL**

Fundamentos	178
Experimento 17	
Bibliografía	180

*Capítulo 18***NUMERO DE REPOSICION DE LA TRIPSINA Y QUIMIOTRIPSINA**

Concepto del número de reposición (NRP)	181
Experimento 18	
Ensayo de proteólisis	182
Cálculo del NRP	182
Bibliografía	183

*Capítulo 19***NECESIDADES DE CATIONES PARA LAS FOSFOHIDROLASAS DE NUCLEOTIDOS**

Introducción	184
Experimento 19	
Preparación de las enzimas	185
Preparación de los reactivos	186
Bibliografía	189

*Capítulo 20***VELOCIDAD DE ABSORCION DE LA GLUCOSA POR EL INTESTINO DE RATA
(MEDICION DEL COEFICIENTE DE CORI)**

Introducción	190
Experimento 20	190
Bibliografía	192

*Capítulo 21***GLUCOLISIS EN EXTRACTOS SIN CELULAS; CICLO DE EMBDEN-MEYERHOF**

Introducción	193
--------------------	-----

Experimento 21

Preparación de los componentes tisulares	194
Reacción de glucólisis	195
Análisis	197
Bibliografía	199

*Capítulo 22***SEPARACION DE LIPIDOS Y MEDICION CON ISOTOPOS DE LA REPOSICION DE LIPIDOS EN EL CEREBRO**

Introducción	200
Empleo de isótopos en investigación bioquímica	200
Isótopos de interés en biología	200
Rapidez de desintegración de isótopos y cálculos de vida media	202
Métodos de medición	204
Nomenclatura y unidades de medida	206
Causas de error y tratamiento de los resultados	207
Método de los isótopos radiactivos para establecer la reposición de metabolitos tisulares	212
Técnicas de dilución de isótopos	214
Técnicas para manejar y desechar isótopos	215
Propiedades de solubilidad de los lípidos	215
Métodos generales de extracción de los lípidos	216
Experimento 22	
Aislamiento y reposición del colesterol, los fosfolípidos y las glucoproteínas del cerebro	216
Extracción y separación preliminares de la fracción colesterólica de los fosfolípidos, glucolípidos y esfingolípidos	217
Separación de los fosfolípidos de los glucolípidos y esfingomielinas en la fracción II	217
Purificación del colesterol	219
Medición de la radiactividad	219
Ampliación de los fundamentos de cromatografía	222
Cromatografía en capa fina y cromatografía en columna	222
Cromatografía en gas-líquido	222
Cromatografía de gluco y fosfolípidos en columna de ácido silícico	227
Propiedades cromatográficas	227
Absorción y elución preliminar de la esfingomielina y los cerebrósidos (fracción III)	228
Separación de la lecitina y cefalia (fracción II) por cromatografía en columna	228
Separación por cromatografía en capa fina del colesterol, fosfolípidos y glucolípidos extraídos por solventes, o de las subfracciones obtenidas de columna de ácido silícico	228
Cromatografía en capa fina de la fracción II o de las subfracciones CC de la fracción II	229
Cromatografía en capa fina de la fracción I	229

Análisis por cromatografía en gas-líquido de las fracciones I, II y III y de las subfracciones procedentes de las columnas de ácido silícico	229
Descripción general del aparato de cromatografía de gases	229
Preparación del material de relleno	231
Preparación de la columna	231
Manejo del aparato	232
Aplicación de la muestra por la técnica del lavado de solvente	233
Preparación de las fracciones I, II y III o de las subfracciones para la técnica de cromatografía de gas-líquido	233
Bibliografía	234

Capítulo 23

ENZIMAS DE OXIDORREDUCCION EN TEJIDOS DE MAMIFERO

Ecuaciones de oxidorreducción y cambios de energía libre	235
Situación intracelular de las deshidrogenasas y las enzimas respiratorias	238
Experimento 23	
Preparación de mitocondrias de hígado y de una fracción soluble enzimática	240
Localización e inhibición de la deshidrogenasa succínica	240
Deshidrogenasas dependientes de NAD en la mitocondria	240
Localización de la deshidrogenasa láctica, y necesidades de coenzimas	241
Localización de la deshidrogenación isocítrica y necesidades de coenzimas	242
Localización del sistema citocromo-oxidasa de citocromo	242
Demostración del sistema de citocromos	243
Medición de la oxidación del nucleótido de piridina reducido	244
Medición de la actividad de la deshidrogenasa succínica con cloruro de trifeniltetrazolio y 2,6-diclorofenolindofenol	245
Problema	248
Bibliografía	249

Capítulo 24

FOSFORILACION OXIDATIVA EN HIGADO DE RATA

Fundamentos	250
Experimento 24	251
Preparación de mitocondrias de hígado de rata	251
Técnica de incubación	252
Medición del fosfato	253
Medición del acetoacetato	253
Cálculo de la relación P/O	254
Preguntas	255
Bibliografía	255

Capítulo 25

EL SISTEMA AMORTIGUADOR ACIDO CARBONICO-BICARBONATO Y LA REGULACION DEL pH EN LOS LIQUIDOS TISULARES

Fundamentos	256
--------------------------	-----

Experimento 25

Papel del CO_2 del plasma en la regulación del pH	259
Regulación renal del pH del plasma	259
Medición de una presión parcial simulada de CO_2 pulmonar alveolar	259
Medición de la presión parcial de CO_2 en el aire del laboratorio	259
Efecto de la concentración de HCO_3 sobre el pH a una presión constante de CO_2	260
Transporte de ion hidrógeno y oxígeno por la hemoglobina en la regulación del pH	260
Bibliografía	263

*Capítulo 26***DEMOSTRACION DE LA TRANSAMINACION EN EXTRACTOS DE HIGADO**

Fundamentos	264
Experimento 26	
Identificación de ácidos aminados	266
Identificación de cetoácidos	266
Nebulizaciones	266
Bibliografía	266

*Capítulo 27***BIOSINTESIS DE LA UREA (EL CICLO DE LA UREA DE KREBS-HENSELEIT EN EL HIGADO)**

Fundamentos	267
Experimento 27	268
Bibliografía	270

*Capítulo 28***LA ASOCIACION DE LA TIROSINA U^{14}C EN LAS PROTEINAS DE MICROSOMAS DE TEJIDO NERVIOSO**

Experimento 28	271
Preparación de homogeneizados de cerebro	271
Bibliografía	273
TABLA DE LOGARITMOS DE CUATRO DECIMALES	274
INDICE ALFABETICO	276