

1 Título práctica de laboratorio: DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOLECTRICO DE LA PROTEÍNA CASEÍNA

2 OBJETIVOS

Generales:

- Determinar el punto isoeléctrico de la proteína caseína y asociarlo con la solubilidad de la proteína.

Específicos:

- Establecer experimentalmente el punto isoeléctrico de la caseína.
- Comprobar el efecto que tiene el cambio del pH en la solubilidad de la caseína.
- Relacionar el punto isoeléctrico con la solubilidad de la proteína.
- Asociar el comportamiento anfótero de las proteínas corporales para el mantenimiento del pH orgánico.

3 REFERENTES CONCEPTUALES

Como referentes conceptuales los estudiantes deberán consultar los siguientes tópicos:

- Formación de las proteínas y el enlace peptídico.
- Efecto del enlace peptídico en el punto isoeléctrico de una proteína.
- Estructura y clasificación de las proteínas.
- Efecto de las soluciones fisioregulatoras en el punto isoeléctrico de las proteínas.
- Relación del pH y el punto isoeléctrico de las proteínas y su efecto en la solubilidad.
- Importancia fisiológica de la carga eléctrica de las proteínas y regulación del pH.

4 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Materiales y equipos

- Balón aforado de 250 mL.
- Pipetas graduadas de 10 mL.
- Gradilla.
10. Tubo de ensayo grande.
- Potenciómetro.
- Espectrofotómetro.
- Pipeteador.
- Cubetas de 1 mL.
1. Agitador magnético.

Reactivos

- Caseína hidrolizada.
20 mL de cada Buffers de acetato 0,5 N.
pH: 3,5; 4,0; 4,6; 5,0; 5,6 y 6,0.
25 mL de NaOH 0,1 N.
1 L Agua destilada desionizada.

Materiales que debe traer el estudiante

- Elementos de bioseguridad (Bata, guantes de nitrilo, monogafas)

Preparación de la caseína:

En un beaker de 500 mL coloque 200 mL de agua destilada y luego adicione lentamente 2,5 g de caseína hidrolizada mientras agita. Si la caseína no logra disolverse por completo, caliente la mezcla entre 40-50 °C. Cuando la caseína esté disuelta por completo, ajuste el pH hasta 11 con disolución de NaOH. Finalmente, transfiera todo el contenido del beaker a un balón aforado de 250 mL y complete el volumen con agua destilada (la solución debe ser homogénea y transparente).



5 PROCEDIMIENTO

1. Determinación del Punto Isoeléctrico y la Capacidad Buffer de un Aminoácido

Rotular 6 tubos de ensayo limpios y secos de acuerdo al pH de la solución buffer de acetato que se va a utilizar o al número del tubo asociado al pH del buffer. Adicionar por separado 7 mL de los buffers acetato 0,5N pH: 3,5; 4,0; 4,6; 5,0; 5,6 y 6,0 en cada tubo, agregar 3 mL de la solución de caseína y agitar por inversión mezclando bien las dos soluciones. Confirmar el pH de las soluciones con el potenciómetro. Dejar en reposo 20-30 minutos. Usando una escala de 0 a 5 registre el grado de turbidez de cada tubo, el mayor grado de turbidez tendrá un valor de 5, significa que hay un mayor contenido de precipitado y será el valor de pH más cercano al punto isoeléctrico de la proteína. Por el contrario el valor 0 significa que no hay precipitación de la proteína por lo tanto esta fuera del rango del su punto isoeléctrico.

Tubo No.	1	2	3	4	5	6
pH						
Turbidez						

Como actividad complementaria medir la absorbancia a una longitud de onda (λ) de 640 nanómetros. Los datos obtenidos se representaran en un gráfico de pH (X) vs. Absorbancia (y).

Tubo No.	pH	Absorbancia
1		
2		
3		
4		
5		
6		

6 PREGUNTAS DE PROFUNDIZACIÓN

- Encuentre el punto isoeléctrico del siguiente péptido:
NH₂Asp-Arg-Val-Tyr- Ile- His- Pro-Phe-Leu-Leu-Val-Tyr-SerCOOH.
- ¿Qué carga presentaría a pH fisiológico: 7,4 y que carga a pH 5 y 8?
- ¿Qué función cumple la hemoglobina en la estabilización del pH sanguíneo y que formas químicas presenta?

7 BIBLIOGRAFÍA

- Baynes J. Bioquímica Médica. 3a Ed. Editorial Elsevier. España; 2011.
- Koolman J, Klaus-Heinrich Röhm K-H. Bioquímica Humana. 4 Ed. Editorial Médica Panamericana. Argentina; 2012.
- Laguna J, Piña E. Bioquímica de Laguna. 6a Ed. Editorial Manual Moderno. México; 2007.
- López J, Fernandez A. Fisiología del Deporte. 3a Ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires; 2006.
- Pratt Ch. Bioquímica. 2 Ed. Editorial. Manual Moderno. México: 2008.