

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA DE SUERO. PARÁMETROS CINÉTICOS K_m y $V_{m\acute{a}x}$.

La actividad de una enzima, es decir, la velocidad con que cataliza la transformación del sustrato, es directamente proporcional a su concentración. Por tanto, la actividad es una medida directa de la concentración enzimática.

En muchas ocasiones en el laboratorio de Bioquímica se requiere determinar la cantidad de enzima presente y ello, salvo muy contadas excepciones –algunas serían proteasas, por ejemplo- sólo puede hacerse mediante medidas de actividad. Tal es el caso de muchas enzimas de gran interés práctico en la clínica humana, como es el caso de la fosfatasa alcalina, cuya concentración en suero aumenta en las enfermedades hepato biliares y óseas, entre otras. El grado de destrucción o daño celular guarda relación con la cantidad de enzima presente en suero.

Ahora bien, debemos tener en cuenta que la actividad de un enzima es la velocidad con que cataliza la reacción. Por eso, todas las mediciones enzimáticas se han de hacer referidas al tiempo (o bien aparición de producto en la unidad de tiempo o bien desaparición de sustrato en la unidad de tiempo), pero ello implica una serie de precauciones:

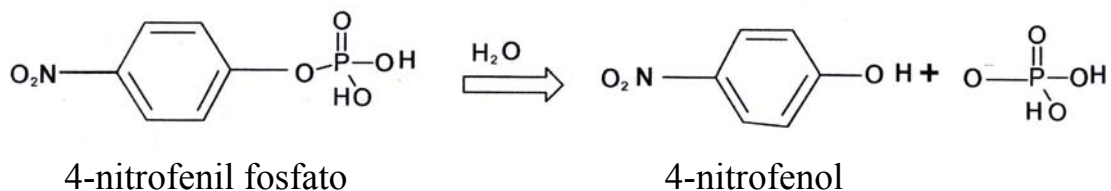
a) En ningún momento el sustrato debe llegar a hacerse limitante, es decir, llegar a una concentración lo suficientemente baja como para limitar la velocidad de la reacción (lo que ocurriría en la parte ascendente de la curva de Michaelis); por eso es necesario conocer con antelación las características cinéticas del enzima que vamos a medir, concretamente su K_m , dado que los ensayos para determinar concentración enzimática han de hacerse a concentraciones muy superiores a la K_m del sustrato.

b) En la medida de lo posible se deben emplear sustratos con características químicas fijas y definidas: por ello se emplean sustratos sintéticos, como en el caso que nos ocupa, en el que se utiliza el 4-nitrofenil fosfato, a pesar de que dicho compuesto no aparece nunca como biomolécula.

c) La reacción tiene que estar perfectamente cronometrada y se debe comprobar si es lineal con respecto al tiempo, si no lo fuera, la medición no sería válida más que a tiempo cero, lo que es difícil de apreciar experimentalmente.

La fosfatasa alcalina es una fosfomonoesterasa que cataliza la hidrólisis de monoésteres orgánicos de fosfato, teniendo un pH óptimo de

actividad alrededor de 9 – 10 (de ahí su nombre). La medición de su actividad se lleva a cabo siguiendo la hidrólisis del 4-nitrofenil fosfato, que en presencia del enzima e iones magnesio se hidroliza liberando 4-nitrofenol, compuesto cuyas soluciones tienen un color amarillento (a diferencia del éster que tiene mucho menos color), según la siguiente reacción:



El 4-nitrofenol, que al ser indicador de pH manifiesta su color únicamente a pH alcalino, absorbe luz en la zona visible del espectro a longitudes de onda entre 400 y 420 nm. Por tanto, la reacción consiste en medir la absorbancia a estas longitudes de onda en función del tiempo. El incremento en la absorbancia, que debe ser lineal por unidad de tiempo, es una medida de la actividad del enzima.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

REACTIVOS:

1. Tampón glicocola (glicina) 50 mM, MgCl₂ 1 mM, a pH 10.
 2. 4- nitrofenil fosfato disódico 2 mM disuelto en el tampón citado como 1.
 3. NaOH aproximadamente 0.02 N.
 4. Fuente del enzima: suero de rata
- Añadir a tubos de ensayo numerados:

Tubo	1	2	3	4	5	6	7
Soluc.1 (ml)	1	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	-
Soluc.2 (ml)	-	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Suero	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

Colocar los tubos a 25°C, a continuación añadir el suero atemperado de la misma forma y a intervalos fijos (cada 30 seg., por ejemplo). Agitar suavemente tras cada adición y dejar transcurrir la reacción durante 30 min. La reacción se detiene al añadir 5 ml de solución 3, agitando.

A continuación medir la absorbancia a 405 nm utilizando como blanco el tubo número 1. Anotar los resultados en la siguiente tabla:

tubo	A	[S] mM	V_0 mM/min	$1/[S]$	$1/V_0$
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					

- Representación de Michaelis-Menten
- Representación de Lineweaver-Burk
- Calcular K_m y $V_{m\acute{a}x}$ del enzima.
- Discutir los resultados en el sentido de:
 - ¿Cuál es la concentración adecuada de sustrato para medir la actividad enzimática?
 - ¿Es este diseño experimental el adecuado para medir K_m ?

