

Determinación de proteínas en la clara de huevo

Las proteínas son las moléculas más abundantes en las células eucarióticas y de ellas dependen todas las funciones que ellas realizan. Su estructura de cadena, formada por combinaciones de 20 aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, es la responsable de su diversidad estructural y funcional. Cuando las cadenas de aminoácidos se encuentran en un ambiente acuoso (o polar) se pliegan de forma que los aminoácidos hidrofóbicos se orientan hacia el interior de la proteína y los hidrofílicos hacia el exterior, dando lugar a las terciarias y cuaternarias.

La detección de proteínas por el método Bradford se basa en el empleo de un colorante hidrofóbico (el Azul de Coomassie) cuyas disoluciones acuosas, en presencia de ácido fosfórico, tienen un color pardo y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente. Este método, por tanto, no se basa en la formación de complejos con iones Cu^{++} como en los métodos Biuret o Lowry, en los que se necesita la desnaturalización de la proteína en medio básico.

La clara de huevo tiene una elevada concentración de proteínas (12-14%), siendo la más abundante la albúmina cuya función principal en el huevo es desconocida, aunque se cree que sirve de reservorio de proteína para el crecimiento del pollo y para almacenar algunas moléculas difíciles de disolver como ácidos grasos libres, algunas hormonas y iones de calcio, entre otras.

Materiales:

- Tubos de ensayo
- Pipetas Pasteur de plástico
- Cubetas de espectrofotómetro (de 3 ml)
- Dispensador para el Bradford
- Espectrofotómetro
- Centrífuga de mesa
- 1 Huevo
- Reactivo Bradford,
- Solución de albúmina bovina (0.3 mg/ml)
- HCl 5%
- Solución saturada de sulfato amónico $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4; 75\%]$.
- Agua destilada

Procedimiento 1:

- a) Marcar seis tubos de ensayo, cuatro con los números 1, 2, 3 y 4 y dos con las letras A y B.
- b) Encender el espectrofotómetro y ajustar la longitud de onda a 595 nm.
- c) En un tubo de ensayo, diluir 1 ml de clara de huevo con 9 ml de agua (1ª dilución $\rightarrow 1/10$). [PROFESOR].
- d) Diluir de nuevo 1 ml de la disolución anterior (c) con otros 9 ml de agua (2ª dilución $\rightarrow 1/100$). [PROFESOR].
- e) Pasar 1 ml de esa nueva disolución (d) a cada uno de los tubos de ensayo previamente marcados como A y B.
- f) Al tubo A añadirle 1 ml de agua y al tubo B añadirle 1 ml de HCl 5% (3ª dilución $\rightarrow 1/200$). Agitar bien tapando los tubos con un poco de papel de parafina e incubar durante 5 minutos.
- g) Trasvasar 0'25 ml de cada sobrenadante A y B a los tubos marcados 2 y 3 respectivamente.

Prácticas de E. Secundaria

i) Poner 0'25 ml de agua en el tubo 1 y 0'25 ml de la solución de albúmina en el tubo 4. Al final los cuatro tubos tienen:

Tubo	Añadirle:
1	0'25 ml de agua
2	0'25 ml del tubo A (sobrenadante)
3	0'25 ml del tubo B (sobrenadante)
4	0'25 ml de solución de albúmina

j) Añadir a cada tubo 3 ml de reactivo Bradford. Agitar y esperar entre 5 y 10 minutos.

k) Trasvasar a la cubeta de espectrofotómetro 3 ml del tubo 1 y medir la absorbancia en el espectrofotómetro. Ajustar a 0'00 el aparato con esta muestra.

l) Devolver la muestra a su tubo y repetir la acción con los otros tubos **en orden creciente** de tonalidad azul, anotando los valores de absorbancia.

m) Calcular por regla de tres, por comparación con la muestra del tubo 4 (patrón de albúmina), la concentración de proteína en los tubos 2 y 3.

A criterio del profesor de la asignatura, y teniendo en cuenta las diluciones hechas (1/200), se puede calcular la concentración de proteínas en la clara de huevo, antes y después del tratamiento con HCl.

Procedimiento 2:

a) Pasar 1 ml de clara de huevo sin diluir a un tubo nuevo y añadirle 1 ml de sulfato amónico concentrado. Agitar bien.

b) Centrifugar durante 5 min a la máxima velocidad.

Cuestiones:

¿Tiene proteínas la clara de huevo? ¿Muchas o pocas?

¿Qué hace el HCl? ¿Y el sulfato amónico?

¿Cuál es el efecto del tratamiento con HCl en la cantidad de proteínas medida?

¿Para qué hay que usar un tubo con agua, sin proteínas?

¿Por qué se mide el color azul a 595 nm, si esa una longitud de onda corresponde al amarillo-naranja en el espectro de la luz visible?