

- para-nitrofenilfosfato 50mM (sustrato).
- NaOH saturado
- Buffer dietanolamina/HCl Tris 0,5mM pH 9,8 con MgCl₂.6H₂O 0,5mM.

Material:

Tubos de hemólisis, gradillas, marcador, baño de agua a 37 °C, pipetas, espectrofotómetro.

Procedimiento:

Prepare 7 tubos como se indica a continuación y proceda según lo indicado:

1. Tome los tubos de hemólisis de la gradilla y rotúlelos del 1 al 7.
2. Agregue los reactivos como se indica en la tabla siguiente y luego mezcle cada uno de los tubos.

Tubos	Buffer 0,5mM pH 9,8	sustrato
1	3085 µL	15 µL
2	2985 µL	15 µL
3	2970 µL	30 µL
4	2940 µL	60 µL
5	2910 µL	90 µL
6	2850 µL	150 µL
7	2700 µL	300 µL

3. Mezcle y coloque los tubos en la gradilla del baño termostatzado a 37 °C.
4. A intervalos exactos de 30 seg entre tubo y tubo, añada sucesivamente 100 µL de la muestra en los tubos 2 al 7. **No le agregue al tubo 1 ya que es el blanco.**
5. A los 10 min de haber añadido la muestra en el tubo 2, detenga la reacción enzimática con 1 gota de NaOH saturado comenzando con el tubo 1 y continuando con los tubos restantes a intervalos de 30 seg.
6. Seleccione la longitud de onda de trabajo determinada en la actividad anterior y ajuste el aparato a cero con el tubo 1 y lea la absorbancia de los demás tubos. Registre los resultados.
7. Realice la representación gráfica de la actividad enzimática en función de la concentración de sustrato. Marque Km y Vmáx.
8. Realice una representación de dobles recíprocas para calcular la Km y la Vmáx de la enzima en UI/mL. Para convertir DO, (observada en el paso 7), a UI utilice la fórmula de la Guía de Actividades Prácticas página 92).

