

# 35. Determinación de la actividad enzimática alcohol deshidrogenasa (ADH) en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*)

Gabriel Dorado

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales,  
Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba

## RESUMEN

Las enzimas son el producto de expresión de genes; por tanto, su actividad puede verse modulada por el genotipo del individuo. El estudio de la actividad enzimática tiene gran importancia en ciencia básica, bioquímica y biotecnología. Asimismo, la presencia de distintas isoenzimas y su actividad enzimática diferencial puede ser empleada como marcador bioquímico de normalidad o anormalidad (diagnóstico de enfermedades). La enzima alcohol deshidrogenasa (Alcohol:NAD<sup>+</sup> oxidoreductasa; EC 1.1.1.1) cataliza la oxidación de alcoholes y la oxidación de aldehídos. Existe una clara diferencia en la actividad enzimática ADH entre genotipos de la mosca de la fruta o del vinagre (*Drosophila melanogaster*). Se observa también una clara influencia del ambiente (medio de cultivo). Estos resultados apoyan la hipótesis de que existe una adaptación de este organismo a medios con alcohol.

*Palabras clave:* absorbancia, etanol, isopropanol, isozimas, marcador molecular.

*Abreviaturas empleadas.* ADH: enzima alcohol deshidrogenasa; *Adh<sup>F</sup>*: alelo *F* del gen *adh*; *Adh<sup>S</sup>*: alelo *S* del gen *adh*; β-NAD<sup>+</sup>: beta-nicotín adenín dinucleótido oxidado; BSA: albúmina de suero bovino; RNA: ácido ribonucleico; PM: peso molecular; Tris-HCl, Tris clorhídrico, Trizma-HCl o Trizma-clorhídrico: Tris (hidroximetil) aminometano · clorhídrico.

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Algunas proteínas y ácidos nucleicos (RNA) tienen actividad catalítica, de forma que son capaces de acelerar muy significativamente las reacciones bioquímicas. La importancia de estos catalizadores va desde el propio origen de la vida (mundo primigenio de RNA) al uso de las enzimas como indicadores de diferentes patologías. El estudio de la actividad enzimática tiene también gran importancia en ciencia básica, bioquímica y biotecnología.

La enzima alcohol deshidrogenasa (Alcohol:NAD<sup>+</sup> oxidoreductasa; EC 1.1.1.1) cataliza la oxidación de alcoholes a los respectivos aldehídos:



La enzima ADH existe tanto en procariotas como eucariotas. La ADH de la mosca de la fruta o del vinagre (*Drosophila melanogaster*) consta de dos subunidades idénticas de 254 residuos, un peso molecular (PM) de 27.400 Da y un punto isoeléctrico variable según la isoenzima considerada: 6,0, 6,4, 6,5, 7,0 y 7,8 (Thatcher, 1980). Las constantes cinéticas han sido descritas por Chambers (1984).

El objetivo de este capítulo es determinar la actividad ADH en *D. melanogaster*. Se trata de un organismo muy importante y ampliamente utilizado en diversas disciplinas científicas (genética, genómica, bioquímica, desarrollo, comportamiento, evolución, etc).

## **2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO**

A continuación se indica el material empleado en los distintos apartados.

### **2.1. Mantenimiento y manejo de *Drosophila melanogaster***

Ácido propiónico.  
Agar.  
Agua del grifo.  
Algodón en rama.  
Anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>).  
Aparato de captura por succión.  
Armario frigorífico.  
Balanza.  
Botellas.  
Botellines.  
Cacerola.  
Calentador.  
Campana extractora de gases.  
Cloruro sódico (NaCl).  
Cuchara de madera.  
*Drosophila melanogaster*.  
Estufa.  
Etanol 99'5% (v/v).  
Éter etílico.  
Flexo.  
Frigorífico.  
Infernillo.  
Levadura de panadería fresca.  
Pipetas de 5 ml.  
Probetas de 100 ml y 1 l.  
Propipetas.  
Sacarosa.  
Termómetro.  
Tubos de ensayo.  
Vaso de aluminio.

### **2.2. Determinación de la actividad enzimática de la ADH**

Agua destilada.  
Albúmina de suero bovino (BSA).  
Anhídrido carbónico.  
Aparato de captura por succión.  
Balanza.  
Beta-nicotín adenín dinucleótido oxidado ( $\beta$ -NAD<sup>+</sup>).  
Bloque de metacrilato con pocillos.  
Campana extractora de gases.  
Centrífuga refrigerada (4 °C).  
Congelador (-20 °C).  
Espectrofotómetro.  
Estufa.  
Etanol.  
Éter etílico.  
Flexo.  
Frigorífico.  
Homogeneizador.  
Isopropanol (2-propanol).  
Micropipetas.  
Papel absorbente higiénico.  
Papel de aluminio.  
Papel indicador de pH.  
pH-metro.  
Puntas de micropipeta.  
Reactivo Bradford.  
Termómetro.  
Tubos eppendorf.  
Tubos eppendorf homogeneizadores.  
Tris-HCl.  
Varilla de vidrio con extremo romo.  
Vaso de precipitados.

### **3. PROTOCOLO A REALIZAR**

Básicamente consiste en obtener moscas de la fruta, homogeneizar los individuos y determinar la actividad enzimática ADH del extracto crudo.

El mantenimiento de *Drosophila melanogaster* se llevó a cabo según Dorado y Barbancho (1984). La determinación de la actividad enzimática de la ADH se realizó según Barbancho et al (1987) y Guillén et al (1987), midiendo el incremento en absorbancia a 340 nm causado por la reducción del  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>, según Vallee y Hoch (1955).

#### **3.1. Mantenimiento y manejo de *Drosophila melanogaster***

Las moscas pueden capturarse con trampas en una bodega o en el campo y son mantenidas y manejadas de la siguiente forma:

1. Añadir 1 l de agua del grifo en una cacerola y calentar con la ayuda de un infernillo u otro tipo de calentador.

2. Añadir 100 g de azúcar de mesa (sacarosa), 100 g de levadura de panadería, 12 g de agar y 0,5 g de sal común (cloruro sódico). Los ingredientes se van añadiendo poco a poco, removiendo con una cuchara de madera hasta la homogeneización de la mezcla.

3. Hervir durante 10 minutos.

4. Cuando la temperatura baje a 50 °C, añadir 5 ml de ácido propiónico con una pipeta, mezclando bien con la cuchara de madera.

**ATENCIÓN:** el ácido propiónico es tóxico. Utilizarlo con precaución y en una campana extractora de gases.

5. En su caso (opcional), añadir al medio etanol absoluto, hasta una concentración del 11% (v/v) con la ayuda de una probeta y pipeta. Este tipo de medio es útil para seleccionar y mantener moscas resistentes al etanol (que pueden presentar una mayor actividad de enzima ADH).

6. Repartir en tubos de ensayo, botellines y botellas con la ayuda de un vaso de aluminio o de una probeta.

7. Tapar los tubos de ensayo, botellines y botellas con algodón en rama.

8. Dejar enfriar hasta temperatura ambiente y guardar en armario frigorífico (4 °C) hasta su uso.

9. Introducir los recipientes con medio nutritivo en una estufa a 25 °C. Una vez alcancen dicha temperatura, transferir a ellos las moscas para su reproducción y crecimiento.

**Nota:** la manipulación de las moscas puede realizarse usando un flexo y un aparato de captura por succión. En caso necesario, las moscas pueden dormirse mediante éter etílico o –mejor– mediante anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>).

**ATENCIÓN:** el éter etílico es tóxico y puede provocar adicción. Utilizarlo con precaución y en una campana extractora de gases.

**ATENCIÓN:** el CO<sub>2</sub> puede causar asfixia. Utilizarlo con precaución y en una campana extractora de gases.

### 3.2. Determinación de la actividad enzimática de la ADH

El amortiguador (del inglés, “buffer”), la mezcla de reacción y el homogenado proteico crudo se obtienen de la siguiente forma:

1. Preparar una solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM (pH 8,6).

**ATENCIÓN:** las soluciones con “Tris” envenenan los electrodos de los pH-metros normales. Para ajustar el pH de este tipo de soluciones, deben emplearse electrodos especiales o papel indicador.

2. Preparar la mezcla de reacción, mezclando: 0,8 ml de la solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM (pH 8,6) previamente preparada, 0,6 ml de  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 4 mM (preparado en el mismo amortiguador) y 0,1 ml de isopropanol o etanol.

**ATENCIÓN:** el isopropanol es tóxico. Utilizarlo con precaución y en una campana extractora de gases.

3. Aislar las moscas que vayan a utilizarse con la ayuda de un flexo y un aparato de captura por succión.

4. Dormir las moscas con éter etílico o anhídrido carbónico.

**ATENCIÓN:** el éter etílico es tóxico y puede provocar adicción. Utilizarlo con precaución y en una campana extractora de gases.

**ATENCIÓN:** el CO<sub>2</sub> puede causar asfixia. Utilizarlo con precaución y en una campana extractora de gases.

5. Homogeneizar grupos de 20 moscas (separando machos de hembras) en un homogeneizador de pistón o en un tubo eppendorf homogeneizador y en presencia de 1 ml de amortiguador Tris-HCl 50 mM (pH 8,6).

**ATENCIÓN:** para evitar la contaminación cruzada de las muestras, la punta de del pistón debe sumergirse en un vaso con agua destilada y luego debe secarse con papel absorbente higiénico para cada muestra.

6. Centrifugar el homogenado a 10.000 g y 4 °C durante 10 min.

7. Iniciar la reacción añadiendo 20  $\mu$ l del sobrenadante del extracto crudo previamente obtenido (que contiene la enzima ADH).

8. Cuantificar la reducción del  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> al menos durante tres minutos a 30 °C, midiendo la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro.

9. Representar gráficamente los resultados. Se define una unidad de actividad enzimática ADH como la cantidad de enzima que reduce 1  $\mu$ mol de  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> por minuto, en las condiciones de reacción.

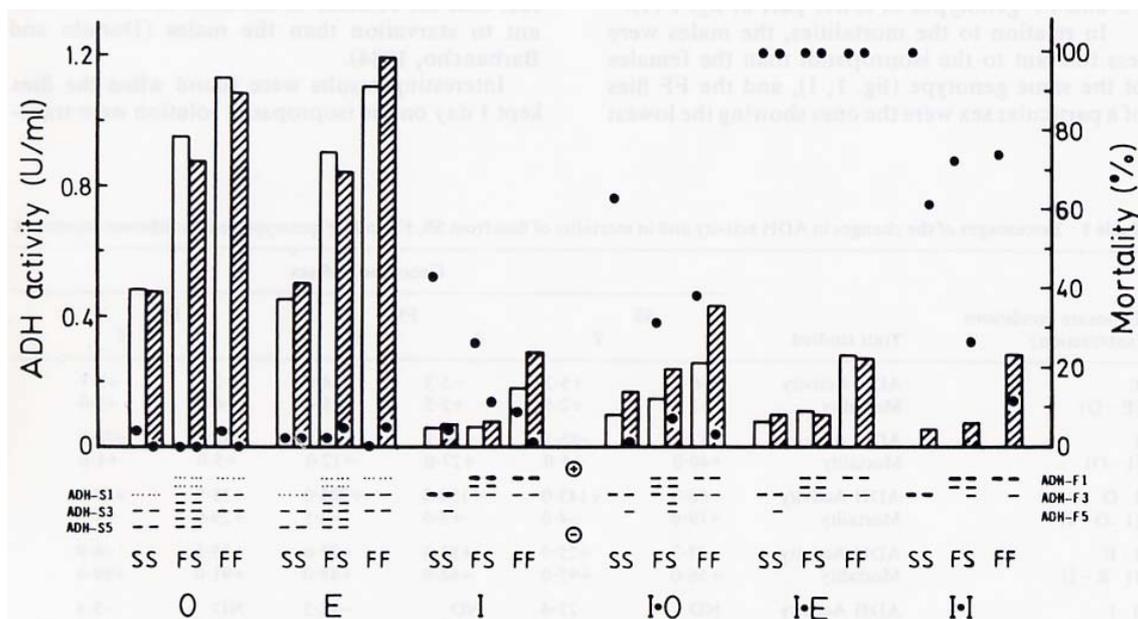
### 3.3. Determinación de la proteína total

La proteína total presente en el extracto crudo de *Drosophila melanogaster* se determina mediante el método de Bradford (1976), empleando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

## 4. RESULTADOS ESPERADOS

Los resultados esperados y obtenidos en este caso se muestran en la Fig. 1. Se aprecia una actividad ADH diferente para las diferentes bandas, correspondientes a las isoenzimas ADH en moscas de genotipo *Adh<sup>S</sup> Adh<sup>S</sup>* (SS), *Adh<sup>F</sup> Adh<sup>S</sup>* (FF) y *Adh<sup>F</sup> Adh<sup>F</sup>* (FF). En general los homocigotos SS

presentan menor actividad ADH que los FF, teniendo los heterocigotos una actividad enzimática intermedia (tratamientos con agua o etanol) o más parecida a los individuos SS (tratamiento con isopropanol).



**Figura 1. Actividad enzimática y patrón electroforético de las isoenzimas ADH en *Drosophila melanogaster*.** Se muestra la actividad enzimática correspondiente a las bandas de las isoenzimas ADH-S (izquierda) y ADH-F (derecha) tras segregación en gel de almidón (Garrido et al, 1988). Asimismo, se indica la mortalidad de los individuos en las distintas condiciones experimentales como son agua (0), etanol (E) e isopropanol (I), así como combinaciones de los mismos (Guillén et al, 1987).

Por tanto, la actividad diferencial de las isoenzimas depende no sólo del genotipo de las moscas, sino también del tratamiento al que fueron sometidas (Guillén et al, 1987). En particular, en este experimento se aprecia la influencia del agua, el etanol y el isopropanol. Cada enzima presenta tres formas, existiendo un solapamiento entre las formas S1 y S3 con las formas F3 y F5, respectivamente. Las formas S5 y F1 son exclusivas de las isoenzimas S y F, respectivamente. Los heterocigotos presentan el mayor número de bandas en las isoenzimas ADH.

## 5. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

Las enzimas son el producto de expresión de genes; por tanto, su actividad puede verse modulada por el genotipo del individuo. Los resultados obtenidos (Fig. 1) indican que existe una clara diferencia en la actividad enzimática ADH entre genotipos. Se observa también una clara influencia del ambiente (medio de cultivo). Estos resultados apoyan la hipótesis de que existe una adaptación de *D. melanogaster* a medios con alcohol (Dorado, 1983; Dorado y Barbancho, 1984; Sánchez-Cañete et al, 1986, Barbancho et al, 1987; Guillén et al, 1987; Garrido et al, 1988).

En este caso, las isoenzimas ADH son una herramienta útil para estudiar procesos fisiológicos y genéticos de adaptación al medio ambiente y en particular a la presencia de etanol. Así, *D. melanogaster* es capaz de sobrevivir

en medios con elevada concentración de alcohol (11%), que serían letales para otros organismos (Dorado, 1983; Dorado y Barbancho, 1984).

En otros casos, como ya se ha indicado, la presencia de distintas isoenzimas y su actividad enzimática diferencial puede ser empleada como marcador bioquímico de normalidad o anormalidad (diagnóstico de enfermedades).

## 6. BIBLIOGRAFÍA COMENTADA

- Barbancho M, Sánchez–Cañete FJS, Dorado G, Pineda M (1987) Relation between tolerance to ethanol and alcohol dehydrogenase (ADH) activity in *Drosophila melanogaster*: selection, genotype and sex effects. *Heredity* 58: 443-450. Estudio de la actividad ADH en la mosca de la fruta.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254. Método clásico de cuantificación de proteínas.
- Dorado (1983) "Modificación de la Eficacia Biológica del Locus *Adh* en *Drosophila melanogaster*, en Respuesta a una Selección para la Tolerancia al Etanol". Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba. Estudio de los polimorfismos genéticos/proteicos en la mosca del vinagre.
- Chambers GK (1984) The purification and biochemical properties of alcohol dehydrogenase—"fast (Chateau Douglas)" from *Drosophila melanogaster*. *Biochem Genet* 22: 529-549. Aislamiento y características cinéticas de la ADH de la mosca de la fruta.
- Dorado G, Barbancho M (1984) Differential responses in *Drosophila melanogaster* to environmental ethanol: modification of fitness components at the *Adh* locus. *Heredity* 53: 309-320. Estudio de los polimorfismos enzimáticos de la ADH en la mosca de la fruta.
- Garrido JJ, Dorado G, Barbancho M (1988) Participation of *Drosophila melanogaster* alcohol dehydrogenase (ADH) in the detoxification of 1–pentene–3–ol and 1–pentene–3–one. *Heredity* 61: 85-91. Implicaciones de los polimorfismos proteicos en el metabolismo de alcoholes y cetonas.
- Guillén E, Sánchez–Cañete FJS, Garrido JJ, Dorado G, Barbancho M (1987) Intergenotypic effect of isopropanol ingestion in the further detoxification of ethanol and isopropanol in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 59: 405-411. Estudio de la actividad ADH en la mosca de la fruta, en relación al metabolismo de alcoholes.
- Sánchez–Cañete FJS, Dorado G, Barbancho M (1986) Ethanol and isopropanol detoxification associated with the *Adh* locus of *Drosophila melanogaster*. *Heredity*: 167-175. Estudio de la actividad ADH en la mosca de la fruta, en relación al metabolismo de alcoholes.
- Thatcher DR (1980) The complete amino acid sequence of three alcohol dehydrogenase alloenzymes (*Adh*<sup>N-11</sup>, *Adh*<sup>S</sup> and *Adh*<sup>UF</sup>) from the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *Biochem J* 187: 875-883. Secuenciación y análisis de la ADH de la mosca de la fruta.
- Vallee B, Hoch F (1955) Zinc: a component of yeast alcohol dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 41: 327-338. Descripción y medida espectrofotométrica de la actividad ADH.

## AGRADECIMIENTOS

Proyecto PAFPU 'FORMAPROFE' ('UCO-N-031') de Formación del Profesorado Universitario, Junta de Andalucía.

## ANEXO 1: MEDIOS, SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO

En este apartado se indica la composición de los medios y soluciones empleados, así como el tipo de material biológico usado.

### Medio nutritivo para *Drosophila melanogaster*

La Tabla 1 muestra la composición del medio nutritivo empleado para el mantenimiento y crecimiento de la mosca del vinagre. Se indica también la opción para preparar medios con etanol, a fin de seleccionar moscas resistentes al etanol (que pueden presentar una mayor actividad de enzima ADH):

<b>Tabla 1. Medio nutritivo para <i>Drosophila melanogaster</i>.</b>		
	100 ml (g)	1 litro (g)
Sacarosa	10	100
Levadura de panadería	10	100
Agar	1,2	12
NaCl	0,05	0,5
Agua destilada	Hasta 100 ml	Hasta 1 litro
Mezclar bien, hervir durante 10 min y dejar enfriar hasta 50 °C		
Ácido propiónico	0,5 ml	5 ml
Etanol absoluto (opcional) <sup>a</sup>	% apropiado	% apropiado
Repartir, tapar, dejar enfriar y guardar a 4 °C		

<sup>a</sup>En caso de preparar medio con etanol, debe añadirse el porcentaje apropiado mediante el uso de probetas y pipetas (p.ej., 11%).

**ATENCIÓN:** el ácido propiónico es tóxico. Utilizarlo con precaución y en una campana extractora de gases.

### Solución de Tris-HCl (50 mM, pH 8,6)

La Tabla 2 muestra la preparación de una solución de Tris-HCl:

<b>Tabla 2. Solución de Tris-HCl (50 mM, pH 8'6).</b>		
	100 ml (g)	1 litro (g)
Tris-HCl (PM: 157,60)	0,788 [50 mM]	7,88 [50 mM]
Agua destilada	Hasta 100 ml	Hasta 1 litro
Ajustar el pH a 8,6		

**ATENCIÓN:** las soluciones con "Tris" envenenan los electrodos de los pH-metros normales. Para ajustar el pH de este tipo de soluciones, deben emplearse electrodos especiales o papel indicador.

### Solución de $\beta$ -NAD<sup>+</sup> (4 mM en Tris-HCl)

La Tabla 3 muestra la solución de  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>:

<b>Tabla 3. Solución de <math>\beta</math>-NAD<sup>+</sup> (4 mM en Tris-HCl).</b>		
	10 ml (g)	100 ml (g)
$\beta$ -NAD <sup>+</sup> (PM: 663,44)	0,027 [4 mM]	0,265 [4 mM]
Tris-HCl (pH 8,6)	Hasta 10 ml	Hasta 100 ml

### Mezcla de reacción (ADH)

La Tabla 4 muestra la preparación de la mezcla de reacción:

<b>Tabla 4. Mezcla de reacción (ADH).</b>		
	Cubeta 0,152 ml ( $\mu$ l)	Cubeta 1,520 ml ( $\mu$ l)
Tris-HCl (50 mM, pH 8,6)	80	800
$\beta$ -NAD <sup>+</sup> (4 mM en Tris-HCl)	60	600
Isopropanol o etanol	10	100
Homogeneizar grupos de 20 moscas en 1 ml de amortiguador Tris-HCl 50 mM (pH 8,6)		
Centrifugar a 10.000 g y 4 °C durante 10 min		
Extracto crudo (sobrenadante)	2	20
Medir la absorbancia a 340 nm (tres minutos a 30 °C)		
Representar gráficamente los resultados		

**ATENCIÓN:** las soluciones con “Tris” envenenan los electrodos de los pH-metros normales. Para ajustar el pH de este tipo de soluciones, deben emplearse electrodos especiales o papel indicador.

**Nota:** se define una unidad de actividad enzimática ADH como la cantidad de enzima que reduce 1  $\mu$ mol de  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> por minuto, en las condiciones de reacción.

### Material biológico (*Drosophila melanogaster*)

Las moscas de la fruta silvestres (poblaciones naturales) pueden obtenerse en una bodega con trampas succionadoras. También pueden capturarse en el campo con trampas de comida (les encantan el plátano, los higos chumbos, y en general las frutas maduras y fermentadas).