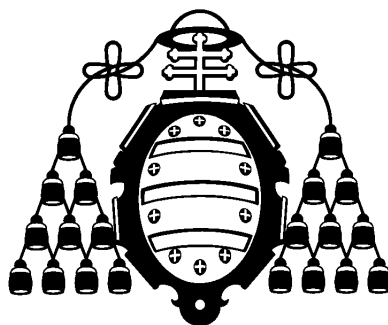


DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

GRADO EN BIOLOGÍA

TÉCNICAS FUNDAMENTALES EN BIOLOGÍA

Curso /

NOMBRE Y APELLIDOS:

CURSO Y GRUPO:

Taquilla nº:

Normas generales

1. Las prácticas empiezan todos los días a la hora estipulada. Por favor, sea puntual.
2. El uso de la bata es obligatorio (algunos reactivos pueden ser corrosivos).
3. Sea cuidadoso con el material. Compruebe el primer y último día que el material está completo, según la lista que se adjunta. Si falta algo, comuníquelo de inmediato a los profesores de prácticas.
4. Antes de cada práctica, lea cuidadosamente el guión que le corresponde.
5. Al final de cada práctica, lave y guarde en la taquilla todo el material que haya utilizado.
6. Los tubos y pipetas se deben lavar con abundante agua corriente en el grifo, posteriormente aclararlos con agua destilada del frasco lavador, y luego dejarlos escurrir en posición invertida y estable.
7. Cada día se deberá presentar el cuaderno en el que se recojan los procedimientos, resultados y conclusiones de la práctica correspondiente. Complete **todos** los apartados en el laboratorio.
8. El examen de prácticas se basará en las fórmulas y procedimientos explicados en las mismas, más los problemas del tema 2.

MATERIAL DE LABORATORIO

Pipetas de 10 ó 5 ml	2
Pipetas de 2 ó 1 ml	2
Probeta de 100 ml	1
Frasco lavador	1
Vasos de precipitado de 250 o 100 ml	2
Tubos Falcon	7
Gradillas	2
Tubos de ensayo	20
Propipeta o pera para pipeta	1

27 de marzo de 2017
Biol-TFB-PDL
Laboratorio de Prácticas

Práctica N^o 1

Preparación de disoluciones de distintas concentraciones

1.1. Introducción.

La **concentración** de una disolución indica la cantidad de soluto disuelto en una cantidad dada de disolución, o a veces, de disolvente. Las maneras de expresar dicha concentración son las siguientes:

- **Tanto por ciento en peso o volumen:** expresa la cantidad de cada componente (en peso o en volumen) en 100 partes (en peso o volumen) de disolución. Una disolución de NaCl al 1% (p/v) contendría 1 g de NaCl en 100 ml de disolución.
- **Molaridad (M):** es el número de moles de soluto en un litro de disolución.
- **Normalidad (N):** es el número de equivalentes gramo de soluto en un litro de disolución.
- **Molalidad (m):** es el número de moles de soluto en 1.000 gramos de disolvente.

Si tenemos preparada una disolución cuyo volumen es V y la concentración es C , al añadirle agua (u otra disolución) el volumen habrá aumentado y la concentración habrá disminuido. De esta forma tendremos preparada una disolución más diluida, cuyo volumen es ahora V' y su concentración C' , sin embargo la cantidad de sustancia disuelta no ha cambiado, de lo que se deduce la expresión:

$$VC = V'C'$$

En esta práctica se prepararán disoluciones concentradas de NaCl (58,44 g/mol) y a partir de ellas se prepararán otras más diluidas

1.2. Procedimiento.

Preparar 50 ml de NaCl 500 mM y 100 ml de NaCl al 0,5% (p/v). En primer lugar se pesa la cantidad correspondiente, se pone en sendos vasos de precipitados y se le añade una cantidad de agua destilada inferior al volumen final (por ej. 40 ml en el primer caso y 70 ml en el segundo caso). Una vez disuelto se enrasa al volumen final en una probeta y se devuelve a su respectivo vaso de precipitados.

Usar las pipetas de vidrio para preparar a partir de estas disoluciones, en los tubos grandes con tapa (Falcon), otras más diluidas después de completar la Tabla siguiente:

Concentración final	ml de NaCl 0,5 M	ml de H ₂ O	ml de NaCl al 0,5 % (p/v)	Volumen final
200 mM			—	30 ml
100 mM			—	30 ml
50 mM			—	30 ml
0,1 % (p/v)	—			30 ml

Conteste a estas preguntas:

Si tenemos 50 ml de una disolución de ácido acético 2 M y tiramos 20 ml:

1. ¿Cuál es la concentración de la disolución que nos ha quedado, expresada en:
(a) mM, (b) μ M, (c) nM?
2. ¿Cuántos mmoles de ácido acético teníamos en la disolución original?
3. ¿Cuántos mmoles de dicho ácido nos quedan?

4. Si mezclamos 5 ml de la disolución de NaCl 0,5 % (p/v) con 25 ml de agua, ¿cuál sería el factor de dilución?

5. Calcular la concentración molar de la disolución de NaCl al 0,5 % (p/v)

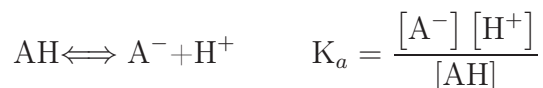
6. Calcular el % (p/v) de una disolución 134 mM de KCl (Pmol: 74,55)

Práctica N^o 2

Preparación de tampón acetato y medida electrométrica del pH

2.1. Introducción.

Una disolución tampón es aquella que se opone a los cambios de pH cuando se agregan concentraciones relativamente pequeñas de un ácido o una base. Consisten generalmente en una mezcla de un ácido débil y su sal o base conjugada, o bien de una base débil y su ácido conjugado.

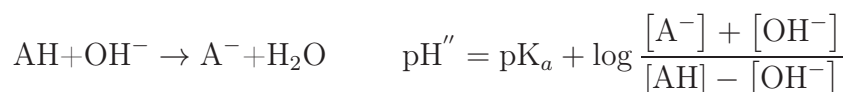
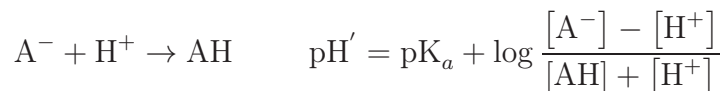


El pH de una disolución tampón se puede calcular mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{AH}]}$$

donde la suma $[\text{A}^-] + [\text{AH}] =$ concentración del tampón. En la ecuación se puede observar que el pH del tampón depende del valor de $\text{p}K_a$ y de la relación (cociente) de concentraciones molares entre la base conjugada y el ácido.

En una disolución de un ácido débil (AH) y de su sal o base conjugada (A^-), los iones H^+ añadidos son neutralizados por los aniones de la sal (A^-), la cual actúa por tanto como una base débil, y a la inversa, los iones OH^- añadidos resultan eliminados por neutralización con el ácido (AH), con lo que el pH de la disolución tampón apenas varía.



La capacidad de tamponamiento, es decir, la resistencia que opone una disolución tampón a que su pH varíe por adición de bases o de ácidos, se mide determinando la concentración de ácido fuerte (HCl) o de base fuerte (NaOH) requeridos para alterar el pH del tampón en una unidad. La capacidad de tamponamiento depende de la concentración del tampón y, para una concentración determinada, es óptima cuando $[\text{base conjugada}] = [\text{ácido}]$, es decir, cuando $\text{pH} = \text{p}K_a$, ya que presenta la mayor capacidad de tamponamiento frente a ácidos y bases.

En esta práctica: en primer lugar se preparará una disolución de tampón acetato de pH 4,4 ($pK_a = 4,7$). Además se les entregará una disolución de NaCl, y se comparará el cambio de pH producido al añadir una base fuerte al tampón acetato y a la disolución de NaCl.

2.2. Procedimiento.

1. Preparar en un tubo Falcon 30 ml de tampón acetato 0,1 M, pH 4,4, a partir de ácido acético 0,2 M y acetato sódico 0,2 M.

Cálculos:

NaAc 0,2 M Vol (ml)	HAc 0,2 M Vol (ml)	H ₂ O Vol (ml)	Tampón acetato 0,1 M Vol (ml)
			30

2. El profesor le entregará 30 ml de NaCl 0,1 M en un tubo Falcon.
3. Medir el pH en el tubo con tampón acetato 0,1 M. Repetir la medida del pH después de añadir 0,5 ml de NaOH 0,1 N.
4. Medir el pH en el tubo con NaCl 0,1 M. Repetir la medida del pH después de añadir 0,5 ml de NaOH 0,1 N.

Anotar los datos en la siguiente tabla:

NaOH 0,1 N añadido	pH Tampón acetato	pH NaCl 0,1 M
0 ml		
0,5 ml		
variación pH		

a) Interpretar los resultados y b) Calcular la capacidad de tamponamiento respecto a NaOH de la disolución tampón preparada en el apartado 1, de acuerdo con la definición que se indica en el texto.

Práctica N^o 3

Homogeneización de tejidos y técnicas de extracción de compuestos biológicos. Extracción de DNA bacteriano.

3.1. Introducción.

Sedimentación es un término general que se aplica para referirse al movimiento de una partícula o una molécula sometida a la fuerza de un campo centrífugo. La sedimentación por centrifugación se puede emplear para la separación de células y orgánulos subcelulares y para la caracterización de macromoléculas.

Una partícula situada en un campo centrífugo generado por la rotación de un rotor que gira con una velocidad angular ω experimenta una fuerza centrífuga ($F_c = m \cdot g = m \cdot \omega^2 \cdot r$) donde m es la masa de la partícula y r el radio de giro. En la sedimentación se debe tener en cuenta la relación entre las densidades del medio en el que se mueve la partícula y la de la partícula misma.

El objetivo de esta práctica es llevar a cabo un experimento sencillo de sedimentación en el que se obtendrán células bacterianas a partir de un cultivo y se separarán DNA cromosómico y DNA plasmídico mediante centrifugación diferencial.

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico, circulares y de pequeño tamaño (2–10 Kpb), que se encuentran en muchas especies bacterianas. A diferencia del DNA cromosómico bacteriano (2–10 Mpb), estas moléculas no son necesarias para la viabilidad general de la célula, aunque pueden contener genes que les confieren ventajas selectivas, como por ejemplo los que codifican resistencia a los antibióticos o permiten metabolizar ciertas sustancias y que, por lo tanto, contribuyen a la supervivencia en condiciones especiales.

3.2. Procedimiento.

El protocolo a seguir para la sedimentación de células bacterianas y la extracción del DNA cromosómico y plasmídico es el siguiente:

3.2.1. Obtención y lisis de las células.

1. Se les entregan dos tubos eppendorf con 1,5 ml de un cultivo de *E. coli* que ha sido inoculado el día anterior. Centrifugar dichos tubos 2 min en una microcentrífuga a máxima velocidad (**¡cuidar de equilibrar la centrífuga!**).

A continuación, eliminar el sobrenadante, dejando el sedimento de células lo más seco posible.

2. Resuspender el sedimento de células en 0,1 ml de agua destilada mediante un agitador Vortex.
3. Añadir a cada uno de los tubos 0,2 ml de la disolución alcalina (SDS 1%, NaOH 0,2 M). Agitar invirtiendo los tubos. Las muestras deben quedar claras y viscosas como consecuencia de la lisis celular. Incubar 2 min a temperatura ambiente.

3.2.2. Obtención de DNA genómico.

1. Añadir 1,0 ml de etanol absoluto frío (-20°C) a una de las muestras obtenidas en el paso 3. Agitar por inversión y observar la formación de un precipitado blanco filamentososo (se suele llamar *medusa*) constituido por el DNA cromosómico.
2. Centrifugar 4 min a 13.000 rpm.
3. Descartar el sobrenadante con una micropipeta.
4. Disolver el sedimento en 0,2 ml de tampón TE (Tris-HCl 10 mM; 0,5 mM EDTA, pH 8,0).

3.2.3. Obtención de DNA plasmídico.

1. Neutralizar la otra muestra obtenida en el paso 3 con 0,15 ml de acetato potásico 3 M, pH 5. Agitar por inversión. Aparecerán agregados blancos al precipitar el DNA cromosómico.
2. Incubar la muestra neutralizada durante 2 min a temperatura ambiente.
3. Centrifugar 5 min a 13.000 rpm en la microcentrífuga.
4. Utilizando una micropipeta, pasar cuidadosamente 0,4 ml del sobrenadante a otro tubo eppendorf nuevo evitando tocar el sedimento. En este sobrenadante se encuentra el DNA plasmídico.
5. Precipitar el DNA plasmídico añadiendo 1 ml de etanol absoluto frío (-20°C). Mezclar bien por inversión.
6. Centrifugar durante 10 min a 13.000 rpm en la microcentrífuga.
7. Debe observarse un sedimento de pequeño tamaño (algo mayor que la cabeza de un alfiler), traslúcido o blanquecino, constituido por DNA plasmídico y parte del RNA celular.
8. Descartar el sobrenadante por decantación y quitando los últimos restos con una micropipeta, evitando tocar el sedimento.
9. Disolver el sedimento en 0,2 ml de tampón TE.

3.2.4. Cuantificación de los resultados.

La cuantificación del DNA obtenido se hace determinando la absorción de luz ultravioleta de 260 nm de longitud de onda. Por otro lado, podemos averiguar si una muestra de DNA está contaminada con *proteínas*, midiendo la absorbancia a 280 nm. Una relación A_{260}/A_{280} mayor que 2 se considera aceptable.

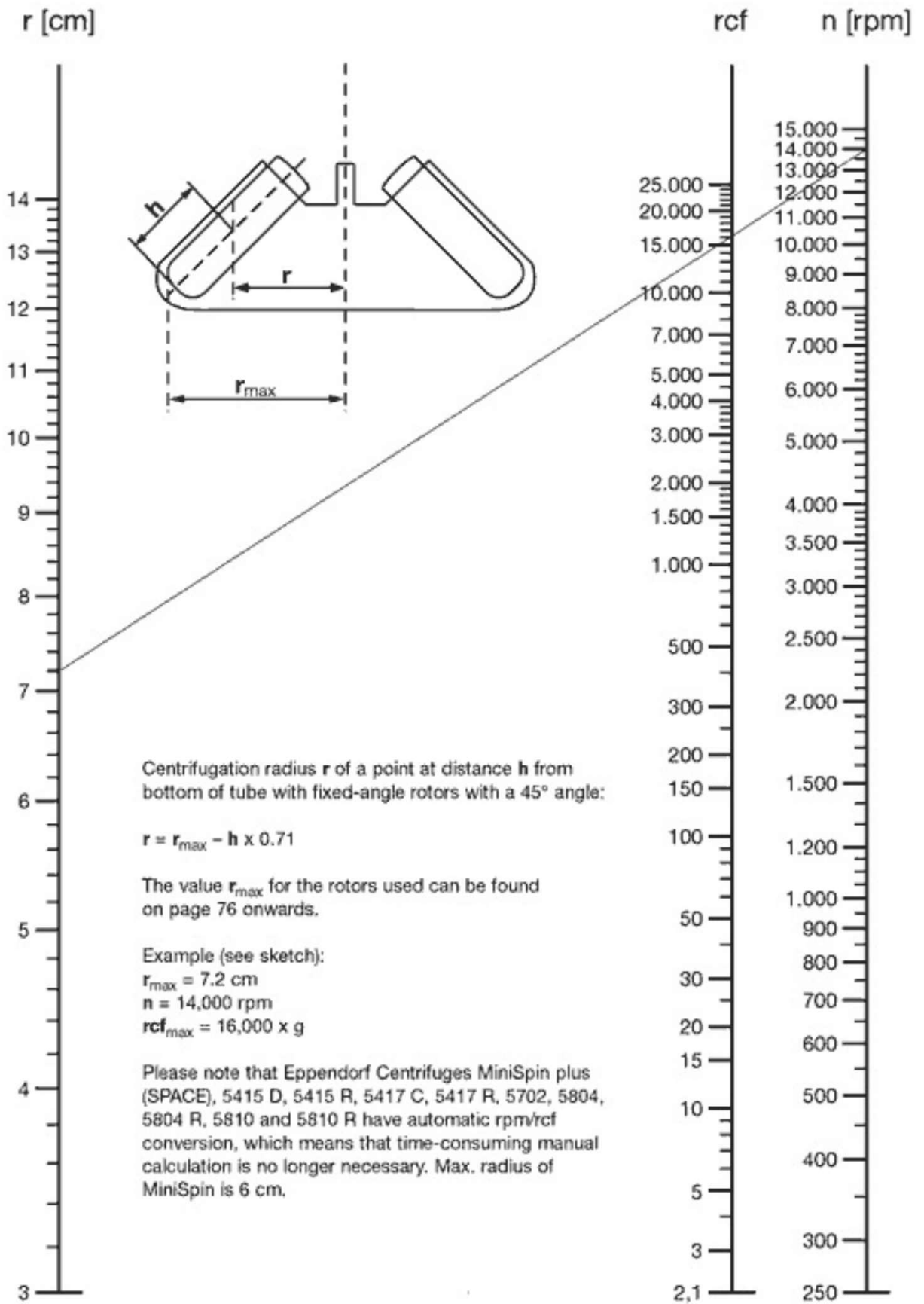
Para hacer esta determinación se diluirán adecuadamente la disoluciones de DNA obtenidas en 3.2.2 y 3.2.3 y se medirá la absorbancia a 260 y 280 nm. Para calcular la concentración de DNA se tendrá en cuenta que una disolución con $A_{260\text{ nm}} = 1,0$ contiene 50 μg de DNA/ml.

a) Completar la siguiente tabla teniendo en cuenta que los valores de absorbancia obtenidos son los que se indican:

Muestra	Dilución	A_{260}	A_{280}	[DNA] ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	DNA total (μg)	A_{260}/A_{280}
DNA genómico	100	0,53	0,25			
DNA plasmídico	50	0,22	0,1			

b) Calcular la fuerza centrífuga relativa (rcf en xg), en base al radio de giro y la velocidad del rotor en rpm, usando el nomograma que se adjunta.

c) Calcular cuántas rpm habría que aplicar para conseguir una rcf de 20.000xg usando un rotor de 10 cm de radio medio.



Práctica N^o 4

Espectro de absorción

4.1. Introducción.

Algunas sustancias disueltas presentan determinados colores porque absorben luz de ciertas longitudes de onda (λ) comprendidas entre 400 nm y 700 nm (región visible del espectro) y reflejan o dejan pasar luz de otras λ . Existen otras sustancias, incoloras a simple vista, que son capaces de absorber luz ultravioleta (de λ inferior a 400 nm) o luz infrarroja (con λ superior a 700 nm).

Cada sustancia absorbe más o menos energía radiante a lo largo de la escala de longitud de onda, lo que en conjunto conforma su “espectro de absorción”, que suele presentar uno o más “máximos de absorción” a λ características. Esta es una propiedad característica de dicha sustancia, tan invariable como pueden ser los puntos de ebullición o de fusión, y que permite por lo tanto su identificación. El espectro de absorción y la absorbancia máxima o mínima de una sustancia particular dependen de sus propiedades físicas y químicas, y pueden variar por modificaciones del pH, por el estado de óxido-reducción, por el solvente en el que está disuelta, etc.

Cuando se hace pasar un rayo de luz monocromática (de una determinada longitud de onda), de intensidad inicial o incidente I_0 , a través de una disolución de una sustancia colocada en un recipiente transparente, parte de la luz puede ser absorbida, de manera que en ese caso la intensidad de la luz transmitida, I , será menor que I_0 . El grado de absorción de luz por parte de una disolución se determina en un aparato denominado espectrofotómetro (o colorímetro), que consta esquemáticamente de los componentes que muestra la figura 4.1.

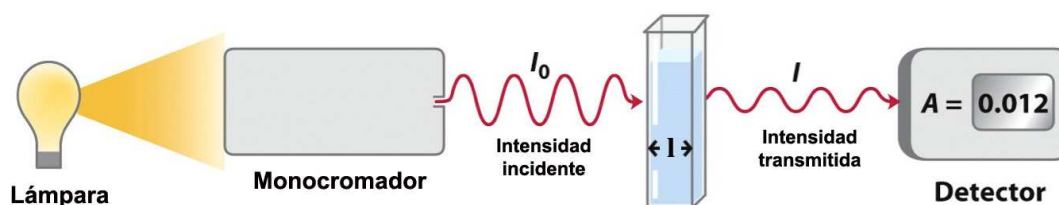


Figura 4.1: Esquema de un espectrofotómetro

El grado de absorción de la luz se mide en función de la absorbancia, que depende de la concentración de soluto en la disolución, de acuerdo con la ley de Lambert-Beer:

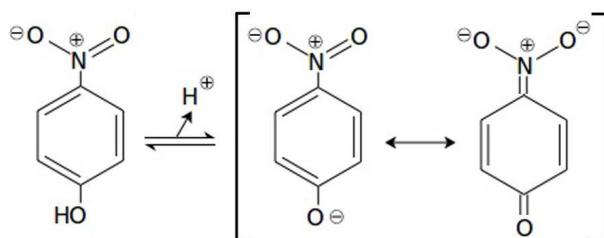
$$A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{1}{T} = \epsilon \cdot c \cdot l,$$

siendo: A = Absorbancia; I_0 = Intensidad de la luz incidente; I = Intensidad de la luz transmitida; T = Transmitancia (proporción de la luz incidente que es transmitida);

ϵ = Coeficiente de extinción molar ($M^{-1}cm^{-1}$): absorbancia de una sustancia 1 M, cuando el paso óptico es 1 cm, para un pH y λ determinados; c = Concentración del soluto (mol/l); l = Paso óptico (suele ser 1 cm).

La absorbancia tiene carácter aditivo, de forma que la absorbancia de una disolución es la suma de las absorbancias de sus componentes. Ello permite medir exclusivamente la absorbancia de un soluto descontando la absorbancia del disolvente y otros posibles componentes mediante el uso del llamado “tubo blanco”, que contiene todo menos el soluto de interés.

Para obtener el espectro de absorción de una sustancia se determina la absorbancia de una disolución de dicha sustancia a lo largo de un intervalo de longitudes de onda. En esta práctica, se determina el espectro de absorción del p-nitrofenol. Este compuesto se disocia como se muestra en el esquema siguiente:



La forma no disociada, que está presente en medio ácido, no absorbe en el rango visible mientras que la disociada, presente en medio alcalino, sí lo hace.

4.2. Procedimiento.

A) Determinación del espectro.

A 3 ml de una disolución de Na_2CO_3 0,1 M se le añaden 0,1 ml de una disolución de p-nitrofenol 0,75 mM.

Con esta nueva disolución, determinar el espectro de absorción. Para ello se selecciona la longitud de onda de 360 nm en el colorímetro y se comprueba que la aguja de la escala marca ∞ de absorbancia. A continuación, se introduce un tubo del colorímetro conteniendo 3 ml de Na_2CO_3 0,1 M y se ajusta el aparato para asignarle cero de absorbancia. Este tubo actúa como blanco, permitiendo restar para cada longitud de onda la absorbancia correspondiente a todos los componentes excepto el p-nitrofenol. Finalmente, se introduce otro tubo del colorímetro conteniendo la disolución de p-nitrofenol y se anota el valor correspondiente a su absorbancia. Repetir el proceso a 380, 390, 400, 410, 420, 440, 460, 480 y 500 nm.

Representar gráficamente los valores de absorbancia frente a la longitud de onda. Calcular, con el valor máximo de absorbancia obtenido, el coeficiente de extinción molar a la λ determinada.

B) Determinación de una concentración de soluto a partir de su absorbancia.

Medir la absorbancia a la λ_{\max} de una disolución problema de p-nitrofenol. A partir de este dato, calcular la concentración de p-nitrofenol en dicha disolución. Utilizar el valor del coeficiente de extinción molar determinado en el apartado A.

4.2.1. Resultados.

1. Determinación del espectro de absorción del p-nitrofenol:

λ (nm)	A	λ (nm)	A
360		420	
380		440	
390		460	
400		480	
410		500	

2. Cálculo del coeficiente de extinción molar para el máximo de absorbancia (ϵ):

3. Cálculo de la concentración de p-nitrofenol:

A (nm) del problema=

4. Calcular el % de I_0 que es absorbida por una sustancia cuando presenta una Abs = 0,3.

Título:

