

**DEPARTAMENTO DE  
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



**GRADO EN BIOLOGÍA**

**TÉCNICAS FUNDAMENTALES EN BIOLOGÍA**

**Curso ..... / .....**

**NOMBRE Y APELLIDOS:**

**CURSO Y GRUPO:**

**Taquilla n°:**

*Laboratorio de Prácticas TFB  
PDL 16-1-2025*

## 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 colgado en el campus virtual.

## MATERIAL DE LABORATORIO

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| Pipetas de 10 ó 5 ml            | 2  |
| Pipetas de 2 ó 1 ml             | 2  |
| Frasco lavador                  | 1  |
| Vasos de precipitados de 250 ml | 2  |
| Probeta de 100 ml               | 1  |
| Tubos Falcon 50 ml              | 6  |
| Tubos de ensayo 12 ml           | 20 |
| Gradillas                       | 2  |
| Propipeta                       | 1  |

# Práctica 1. Preparación de disoluciones de distintas concentraciones

## Introducción.

La **concentración** de una disolución indica la cantidad de soluto disuelto en una cantidad dada de disolución, o a veces, de disolvente. Habitualmente el disolvente empleado en Bioquímica es el **agua**. 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  $V_1$  y cuya concentración es  $C_1$ , al añadirle agua (u otro solvente) el volumen habrá aumentado y la concentración habrá disminuido. De esta forma tendremos preparada una disolución más diluida, cuyo volumen es ahora  $V_2$  y su concentración  $C_2$ . Sin embargo la cantidad de soluto disuelto no ha cambiado, de lo que se deduce la expresión:

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

Esta fórmula no es aplicable cuando **se quite** parte del volumen de una disolución dada. En ese caso, se elimina tanto soluto como solvente, y **la concentración no varía**.

Un concepto importante es el llamado **factor de dilución** de una solución respecto a aquella de la que procede. Es el número de veces que se ha diluido, y se calcula dividiendo el volumen final por el inicial ( $V_f / V_i$ ).

El objeto de esta práctica es familiarizarse con las concentraciones, sus conversiones y diluciones. Para ello, en el apartado **A)** se prepararán **disoluciones más diluidas** de NaCl, a partir de dos soluciones más concentradas expresadas en molaridad o en % p/v. En el apartado **B)** se prepararán **diluciones seriadas** de una solución de azul de bromofenol. Finalmente, se resolverán problemas sencillos de concentraciones.

## Procedimiento.

**A)** A cada alumno se le suministran 30 ml de NaCl 0,5 M y 30 ml de NaCl al 0,5% (p/v).

A partir de estas disoluciones, preparar en los tubos grandes con tapa (Falcon), otras más diluidas después de completar los cálculos de la tabla siguiente:

| Concentración final | Volumen final | ml de NaCl 0,5 M | ml de NaCl 0,5% (p/v) | ml de H <sub>2</sub> O |
|---------------------|---------------|------------------|-----------------------|------------------------|
| 200 mM              | 30 ml         |                  | —                     |                        |
| 100 mM              | 30 ml         |                  | —                     |                        |
| 50 mM               | 30 ml         |                  | —                     |                        |
| 0,25 % (p/v)        | 30 ml         | —                |                       |                        |
| 0,05 % (p/v)        | 30 ml         | —                |                       |                        |

**B)** A cada alumno se le suministran 2 ml de azul de bromofenol 10 mM. Usando tubos de ensayo normales, se deben preparar 6 diluciones seriadas del azul de bromofenol, aplicando para cada una un **factor de dilución** de 5 veces respecto a la anterior. Para ello se añaden 4 ml de agua destilada a los 6 tubos, y se les va añadiendo a cada uno sucesivamente 1 ml de la solución recién preparada. Es decir, cada nueva solución se prepara realizando una dilución 1:5 de la anterior.

Calcular las concentraciones de las nuevas soluciones que se van preparando, y expresarlas en los rangos **mM** y **μM**:

| Inicial   | 1 <sup>a</sup> (1:5) | 2 <sup>a</sup> (1:5) | 3 <sup>a</sup> (1:5) | 4 <sup>a</sup> (1:5) | 5 <sup>a</sup> (1:5) | 6 <sup>a</sup> (1:5) |
|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 10 mM     |                      |                      |                      |                      |                      |                      |
| 10.000 μM |                      |                      |                      |                      |                      |                      |

Observar el cambio de color y fotografiar los tubos alineados en una gradilla. Imprimir la fotografía e incluirla en este espacio.

Contestar 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) **μM**, (c) **nM**?
2. ¿Cuántos **mmol** (milimoles) de ácido acético teníamos en la disolución original?
3. ¿Cuántos **mmol** (milimoles) 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 (Pmol 58,44 g/mol) al 0,5% (p/v)
6. Calcular el % (p/v) de una disolución 134 mM de KCl (Pmol: 74,55 g/mol)

## Práctica 2. Preparación de tampones acetato, y medidas colorimétrica y electrométrica del pH

### 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.

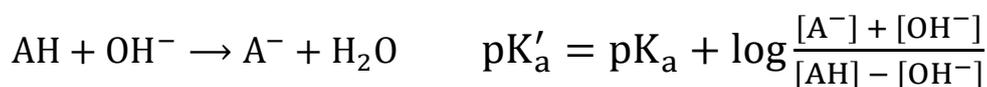
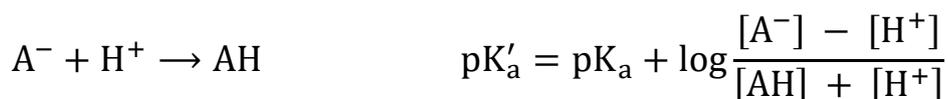


El pH de una disolución tampón se puede calcular mediante la **ecuación de Henderson-Hasselbalch**:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]}$$

Donde la suma  $[A^-] + [AH] =$  **concentración del tampón**. En la ecuación se puede observar que el pH del tampón depende del valor de  $pK_a$  y de la relación (cociente) entre las concentraciones molares de 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. 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 ácidos o de bases, se mide determinando la concentración de ácido fuerte (HCl) o de base fuerte (NaOH) requeridos para alterar el pH del tampón en una unidad (bajarlo o subirlo, respectivamente). La capacidad de tamponamiento depende de la **concentración** del tampón y, para una concentración determinada, es **óptima** cuando  $[base\ conjugada, A^-] = [ácido, AH]$ , es decir, cuando **pH =  $pK_a$** , ya que presenta la mayor capacidad de tamponamiento frente a ácidos y bases.

En esta práctica, en primer lugar se prepararán en tubos Falcon 30 ml de cada una de dos disoluciones de tampón acetato ( $pK_a = 4,7$ ) de distinta concentración: 0,2 M y 50 mM, ambas de pH 4,4. Además, a cada alumno se le entregará un tubo con 30 ml una disolución de NaCl 0,2 M, y debe preparar otro tubo con 30 ml de agua destilada.

El objetivo es comparar, de forma combinada colorimétrica y electrométrica, los cambios de pH producidos al añadir una base fuerte a los dos tampones acetato, a la disolución de NaCl, y al agua destilada. Para ello se añadirá a cada tubo un indicador universal que responde con cambios de color al cambiar el pH, y se usará un **pHmetro** para medir numéricamente esos cambios de pH.

## Procedimiento.

1. Preparar en dos tubos Falcon 30 ml de Tampón acetato 0,2 M y 50 mM, ambos de pH 4,4, a partir de ácido acético (HAc) 0,4 M, acetato sódico (NaAc) 0,4 M y agua. Se debe calcular qué volumen añadir de cada preparación, usando la ecuación de Henderson-Hasselbalch y conociendo la concentración final del tampón.

|  | ml HAc 0,4 M | ml NaAc 0,4 M | ml H <sub>2</sub> O |
|--|--------------|---------------|---------------------|
| <b>Tampón acetato 0,2 M pH 4,4 (30 ml)</b> |              |               |                     |
| <b>Tampón acetato 50 mM pH 4,4 (30 ml)</b> |              |               |                     |

2. Una vez añadidos los tres componentes, tapar y mezclar los tubos.

3. El profesor entregará a cada alumno un tubo Falcon con 30 ml de NaCl 0,2 M, y además se prepara otro tubo Falcon con 30 ml de agua destilada.

4. Añadir a cada uno de los cuatro tubos Falcon (los dos tampones, el NaCl, el agua), 50  $\mu$ l del **Indicador universal de pH**. Tapar y mezclar.

5. Medir el pH en todos los tubos. Anotar en la tabla el valor de pH y el color para cada tubo.

6. Añadir a cada tubo 0,2 ml de NaOH 2 M. Tapar, mezclar, y repetir la medida de pH. Anotar en la tabla el valor de pH y el color para cada tubo.

7. Añadir a cada tubo otros 0,3 ml de NaOH 2 M. Tapar, mezclar, y repetir la medida de pH. Anotar en la tabla el valor de pH y el color para cada tubo.

Anotar los datos en la siguiente tabla:

| total NaOH<br>2 M añadido | T. acetato 0,2 M |       | T. acetato 50 mM |       | NaCl 0,2 M |       | agua |       |
|---------------------------|------------------|-------|------------------|-------|------------|-------|------|-------|
|                           | pH               | color | pH               | color | pH         | color | pH   | color |
| 0 ml                      |                  |       |                  |       |            |       |      |       |
| 0,2 ml                    |                  |       |                  |       |            |       |      |       |
| 0,5 ml                    |                  |       |                  |       |            |       |      |       |
| variación pH              |                  |       |                  |       |            |       |      |       |

**Gama de colores del Indicador de pH:** pH 1,0 rojo cereza; pH 2,0 rosa; pH 3,0 rojo anaranjado; pH 4,0 naranja rojo; pH 5,0 naranja; pH 6,0 amarillo; pH 7,0 amarillo verdoso; pH 8,0 verde; pH 9,0 verde azulado; pH 10,0 azul.

*Composición del Indicador de pH: p-Dimethylaminoazobenzene, Methyl Red, Bromothymol Blue, Thymol Blue, Phenolphthalein.*

a) Interpretar los distintos resultados obtenidos en los cuatro tubos.

b) Calcular la capacidad de tamponamiento respecto a NaOH de las dos disoluciones tampón, de acuerdo con la definición que se indica en el texto.

## Práctica 3. Espectro de absorción

### Introducción.

Cuando la radiación electromagnética de **una determinada longitud de onda ( $\lambda$ )** incide sobre una sustancia en disolución, ésta puede ser **absorbida, reflejada o transmitida**. Si la  $\lambda$  está comprendida entre 400 y 700 nm (región visible del espectro) la radiación reflejada es captada por el ojo humano como colores. Existen otras sustancias, incoloras a simple vista, que son capaces de absorber, reflejar o transmitir luz ultravioleta (de  $\lambda$  inferior a 400 nm) o luz infrarroja (con  $\lambda$  superior a 700 nm).

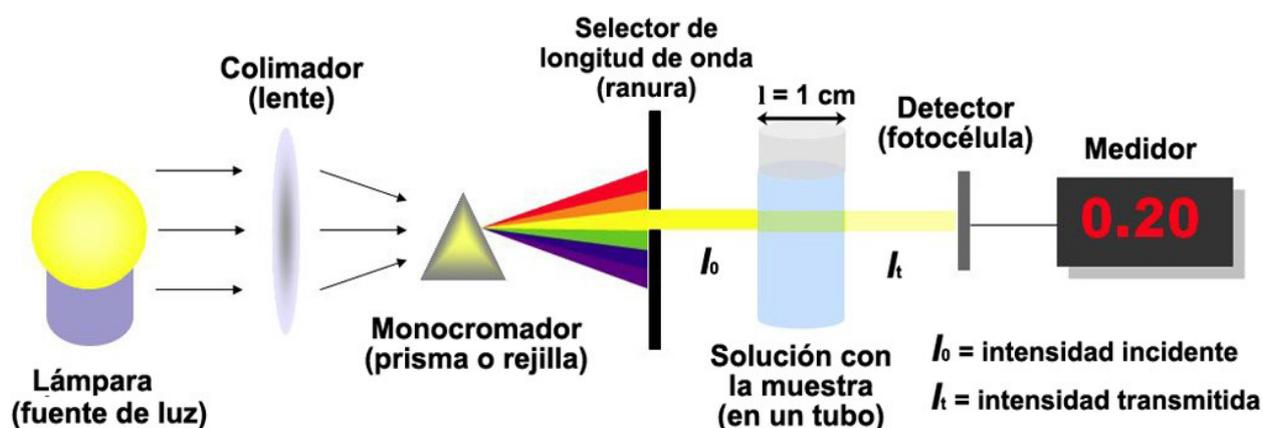
Cada sustancia absorbe más o menos energía radiante a lo largo de la escala de longitud de onda, lo que en conjunto conforma su **espectro de absorción**, que suele presentar uno o más **máximos de absorción** a determinadas  $\lambda$ . Esta es una propiedad característica de dicha sustancia, tan invariable como pueden ser los puntos de ebullición o de fusión, y que permite por lo tanto su identificación. El espectro de absorción y las absorbancias máximas y mínimas 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.

¿Como se puede medir la absorción de radiación por una sustancia en disolución? Cuando se hace pasar un rayo de radiación monocromática (de una determinada longitud de onda), con una **intensidad inicial o incidente  $I_0$** , a través de una disolución de una sustancia en solución colocada en un recipiente adecuado (transparente), parte de la radiación puede ser absorbida, de manera que en ese caso la **intensidad de la radiación transmitida,  $I_t$** , será menor que  $I_0$ . La intensidad absorbida  $I_{abs}$  no se puede medir, pero  $I_0$  e  $I_t$  sí se pueden medir.

$$I_0 = I_t + I_{abs}$$

$$I_{abs} = I_0 - I_t$$

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, y puede medir tanto  $I_0$  como  $I_t$ .



*Esquema de un espectrofotómetro*

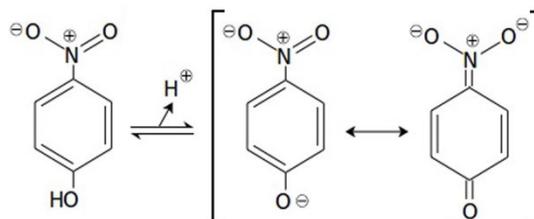
Los espectrofotómetros miden el grado de absorción de la luz en función de la absorbancia, que depende de  $I_0$  e  $I_t$ , y es proporcional a la concentración de soluto en la disolución, de acuerdo con la **ley de Lambert-Beer**:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{1}{T} = \epsilon \cdot c \cdot l \qquad T = \frac{I}{I_0} (\times 100)$$

siendo: **A** = absorbancia;  $I_0$  = intensidad de la luz incidente;  $I$  o  $I_t$  = intensidad de la luz transmitida; **T** = transmitancia (proporción de la luz incidente que es transmitida);  **$\epsilon$**  = coeficiente de extinción molar: absorbancia de una sustancia 1 M, cuando el paso óptico es 1 cm, para un pH y una  $\lambda$  determinados (se mide en  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ); **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 en una disolución más o menos compleja dentro de un tubo, descontando la absorbancia del disolvente los otros posibles solutos y el tubo 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.

## Procedimiento.

### Determinación del espectro de absorción de un soluto.

Añadir 0,2 ml de una disolución de **p-nitrofenol** 0,5 mM a 3,8 ml de una disolución de  $Na_2CO_3$  0,1 M. Mezclar y observar cómo aparece el color amarillo.

Con esta disolución, determinar el espectro de absorción. Para ello se selecciona la longitud de onda de 360 nm en el espectrofotómetro/colorímetro y se comprueba que la aguja de la escala marca  $\infty$  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 el valor 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, ajustando en cada caso el aparato a cero con el tubo blanco, y anotar los valores de absorbancia correspondientes.

Representar gráficamente los valores de absorbancia en ordenadas frente a las longitudes de onda en abscisas.

Con el valor máximo de absorbancia obtenido para la  $\lambda_{\max}$ , calcular el coeficiente de extinción molar a esa  $\lambda$  determinada.

### Determinación de una concentración de soluto a partir de su absorbancia y coeficiente de extinción molar.

Una vez identificado el máximo de absorbancia del p-nitrofenol, medir a esa  $\lambda_{\max}$  la absorbancia de una disolución problema (ajustando de nuevo el cero a esa  $\lambda$  con el tubo blanco).

A partir del dato de absorbancia del tubo problema, y utilizando el valor del coeficiente de extinción molar determinado previamente, calcular la concentración de p-nitrofenol en dicha disolución.

### Resultados.

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

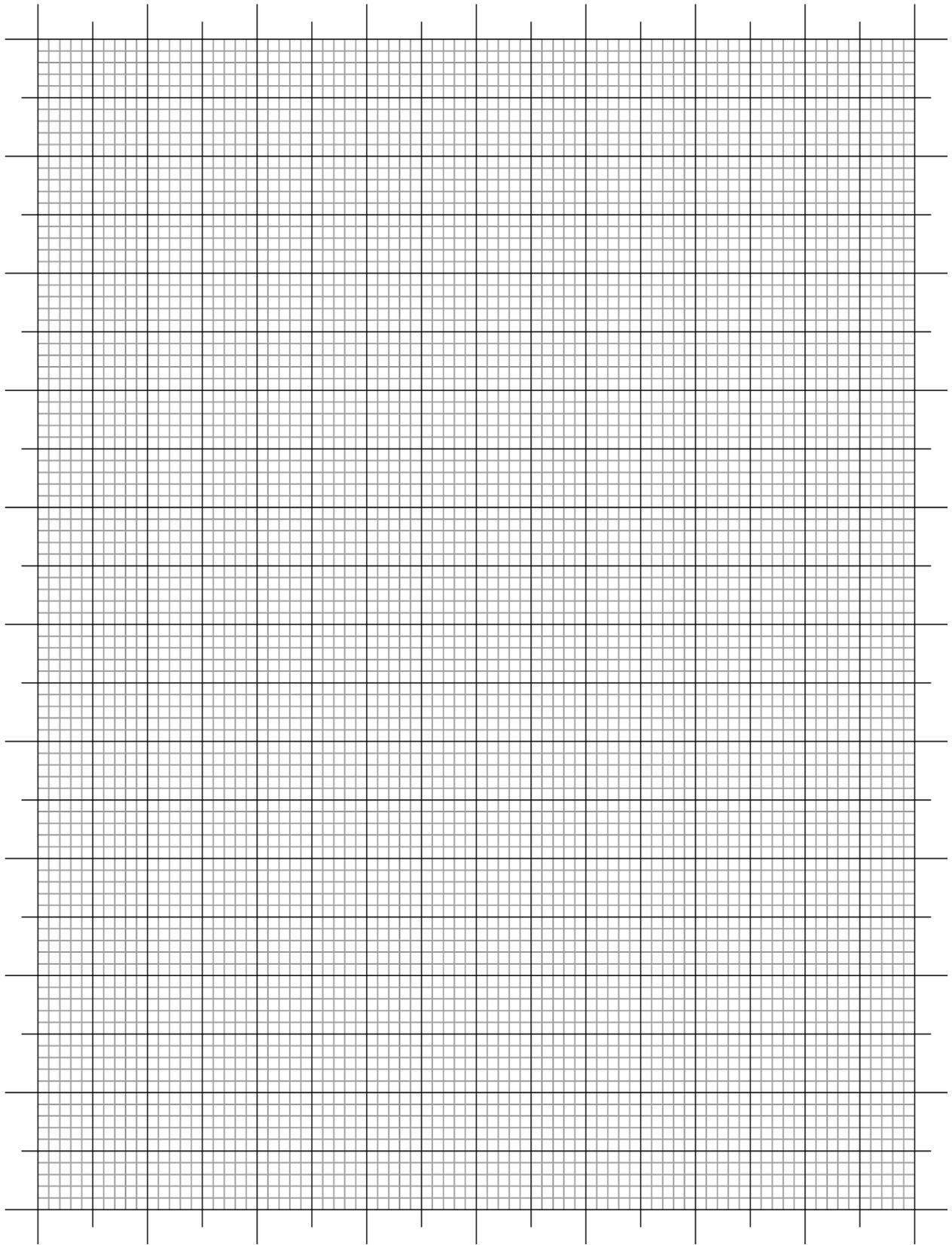
| $\lambda$ (nm) | Abs | $\lambda$ (nm) | Abs |
|----------------|-----|----------------|-----|
| 360            |     | 420            |     |
| 380            |     | 440            |     |
| 390            |     | 460            |     |
| 400            |     | 480            |     |
| 410            |     | 500            |     |

2. Cálculo del coeficiente de extinción molar  $\epsilon$  para el máximo de absorbancia.

3. Cálculo de la concentración de p-nitrofenol.

Abs a la  $\lambda_{\max}$  del problema =

4. Calcular el % de  $I_0$  absorbida por una sustancia cuando presenta una Abs = 0,6.



# Práctica 4. Homogeneización celular de bacterias y obtención de DNA cromosómico y plasmídico por precipitación y centrifugación

## 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  $\omega$  ( $\omega = 2\pi \text{ rpm}/60$ ), experimenta una **fuerza centrífuga**  $F_c$  ( $F_c = m \cdot g = m \cdot \omega^2 \cdot r$ ), 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 ( $\rho$ ) y la de la partícula misma ( $\rho_p$ ):  $F_c = m \cdot g \cdot (1 - \rho/\rho_p)$ .

Las partículas que sedimenten en el fondo del tubo forman el llamado **sedimento o precipitado**, y las que se mantengan en solución estarán en el **sobrenadante**.

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 genómico o 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. En los laboratorios de Bioquímica y Biología Molecular tienen una gran importancia como **vectores de clonación**.

## Procedimiento.

El protocolo a seguir para la sedimentación de células bacterianas y la extracción del DNA cromosómico y plasmídico es el siguiente (ver esquema en página 15):

### *A. 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). Mezclar invirtiendo los tubos. Las muestras deben quedar claras y viscosas como consecuencia de la lisis celular. Incubar 2 min a temperatura ambiente.

### *B. Obtención de DNA genómico.*

1. Añadir 1,0 ml de etanol absoluto frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) a una de las muestras obtenidas en el paso 3. Mezclar 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).

### *C. Obtención de DNA plasmídico.*

1. Neutralizar la otra muestra obtenida en el paso 3.2.1.3 con 0,15 ml de acetato potásico 3 M, pH 5. Mezclar por inversión. Aparecerán agregados blancos de tipo granuloso 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.

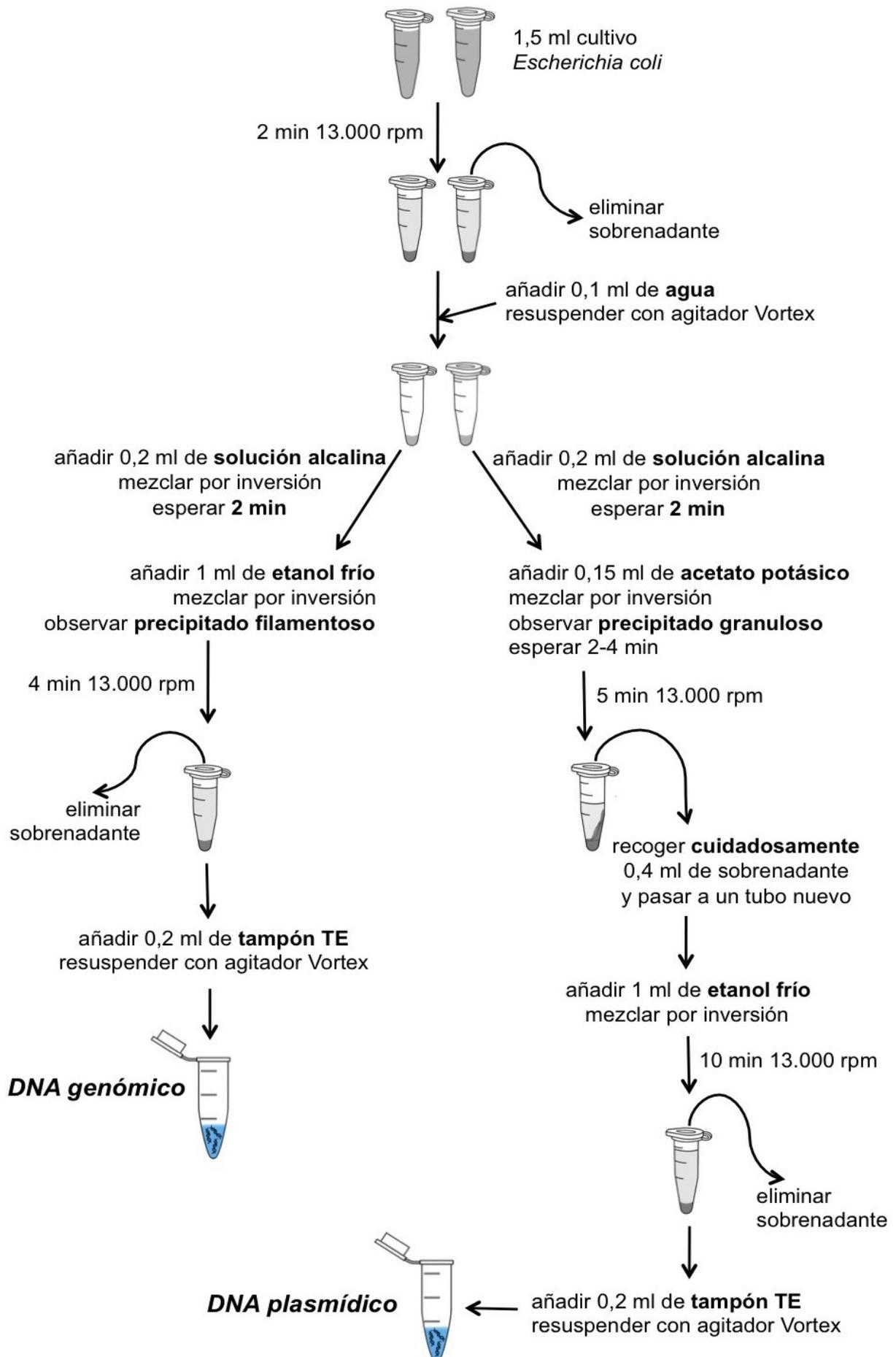
5. Precipitar el DNA plasmídico añadiendo 1 ml de etanol absoluto frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Mezclar bien por inversión.

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



## 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 experimentalmente se diluirán adecuadamente la disoluciones de DNA genómico y plasmídico obtenidas, y se medirá la absorbancia a 260 y 280 nm. Para calcular la concentración de DNA se tendrá en cuenta que una disolución con una  $A_{260\text{ nm}} = 1,0$  contiene una concentración de 50  $\mu\text{g}$  de DNA/ml.

Como no hay disponibilidad de suficientes espectrofotómetros con la capacidad de medir radiación ultravioleta de 260 y 280 nm, en esta práctica trabajaremos con unos valores de absorbancia supuestos, que son similares a los que se esperaría obtener.

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

| muestra        | dilución | $A_{260}$ | $A_{280}$ | Conc. DNA ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | DNA total ( $\mu\text{g}$ ) | $A_{260}/A_{280}$ |
|----------------|----------|-----------|-----------|---------------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| 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 revoluciones por minuto **rpm**, usando el nomograma que se adjunta en la página 17.

c) Usando el nomograma, calcular cuántas **rpm** habría que aplicar para conseguir una rcf de **20.000xg** usando un rotor de **10 cm** de radio medio.

