

Tópicos en Biofísica Molecular
1^{er} Cuatrimestre de 2018
Docentes: Lía Pietrasanta y Alan Bush

Guía 1: Soluciones y diluciones

Problema 1

¿Cuántos gramos de NaOH sólido se necesitan para preparar 500 ml de una solución 40 mM? (PM=40)

Expresar la concentración en %.

Problema 2

¿Cuántos ml de azúcar 20% se deben usar para preparar 2 ml de sacarosa 5%?

Problema 3

¿Cómo se preparan 47 ml de una solución de NaCl 7%?

Problema 4

¿Cómo prepararía 50 ml de una solución para disolver proteínas EGFP conteniendo 10 mM TRIS pH 7.9 1% BSA? Se dispone de:

TRIS 0.1M pH 7.9

BSA sólida

Problema 5

Se tiene una solución de proteína cuya concentración se desea obtener. Para ello se elige un método espectrofotométrico usando la siguiente dilución:

10 µl de solución proteica + 990 µl de buffer

Se mezclan y se determina una concentración de 20 µl/ml. ¿Cuál es la concentración de la solución proteica original?

Problema 6

Se necesitan preparar 50 ml de una solución para lisar bacterias conteniendo NaOH 0.2 M y SDS 1% p/v.

Se dispone de:

NaOH 10M

SDS 10% p/v

NaOH sólido (PM=40)

Problema 7

Para el trabajo práctico de transformación de bacterias se necesitaran placas de medio Luria-Bertani (LB) complementadas con ampicilina 100 µg/ml. La composición del medio LB es: 1% m/v Triptona, 1% m/v NaCl y 0.5% m/v extracto de levadura. Para crear medios "sólidos" se requiere agregar 20 gr por litro de agarosa. Usted cuenta con un stock de ampicilina 200mg/ml. ¿Cómo rotularía dicho stock para facilitar la preparación del medio? Describa el procedimiento a seguir para la preparación del mismo.

Problema 8

Para el cultivo de la línea celular HC11 se quieren preparar 50 ml del siguiente medio: Medio RPMI, 10% FBS, con antibiótico-antimicótico e insulina 5 µg/ml.

En el laboratorio hay:

- Medio RPMI 5X
- FBS líquido
- Antibiótico-antimicótico 100X
- Insulina 5 mg/ml

Problema 9

¿Cómo prepararía una solución para disolver ADN que consiste en HEPES 10 mM MgCl₂ 4µM, pH 7.4?

Cuenta con

- HEPES 0.1M
- MgCl₂ sólido
- HCl o NaOH

Problema 10

Un litro de buffer PBS (buffer fosfato salino) se prepara según las siguientes cantidades y componentes:

- 0.2 g KCl (PM=74.5)
- 8 g de NaCl (PM=58.4)
- 0.24 g KH₂PO₄ (PM= 136)
- 1.44 Na₂HPO₄ (PM= 142)

Indique a qué concentración en mM están cada uno de los componentes en la solución final.

Problema 11

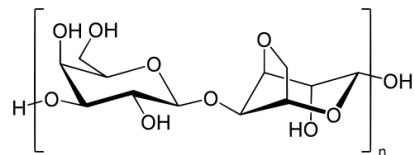
Calcule la concentración de H₂O (PM = 18) en agua pura a 4 °C. Es decir, ¿Cuántos moles de agua hay en un litro de agua pura?

Problema 12

Las bacterias del genero *Escherichia coli*, tienen una geometría aproximadamente cilíndrica, con un tamaño característico de 1 µm de diámetro por 3 µm de largo. Calcule la concentración que tiene un plásmido de copia única dentro de la bacteria. ¿Cuál será la concentración de dicho plásmido si se introduce dentro de una célula HeLa de 3000 µm³?

Glosario

Agarosa: polisacárido extraído de algas marinas, utilizado en biología molecular para hacer geles. Se puede usar para hacer medios "sólidos" o para hacer geles de electroforesis.



Ampicilina: antibiótico derivado de la penicilina con la adición de un grupo amino que aumenta su espectro de acción. Utilizado en biología molecular para hacer medios selectivos, es decir un medio que sólo permite crecer a bacterias que sean resistentes al antibiótico en cuestión.

Antibiótico: compuesto que inhibe el crecimiento de bacterias u organismos eucariotas unicelulares.

Antimicótico: compuesto que inhibe el crecimiento de hongos.

BSA: Albúmina de Suero Bovino (*Bovine Serum Albumin*). Proteína purificada del suero de vacas. Usada como estándar en calibración de concentraciones proteicas. También se usa como "agente bloqueante", es decir que se agrega concentraciones relativamente altas de BSA a una solución para bloquear "sitios de adsorción" y evitar así la pérdida de otras proteínas o compuestos de interés por adsorción a dichos sitios.

Buffer (solución tampón o amortiguadora): Solución de un ácido débil y su base conjugada utilizada para regular el pH. Usando estas soluciones el cambio en pH obtenido al agregar ácido (o base) es mucho menor al que se obtendría al agregar la misma cantidad de ácido (o base) a agua pura.

EGFP: Proteína verde fluorescente mejorada (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) derivada de la proteína fluorescente verde (GFP) originalmente aislada de la medusa *Aequorea victoria* y modificada genéticamente para incrementar sus propiedades fluorescentes.

Escherichia coli: bacteria Gram-negativa que normalmente forma parte de la flora intestinal humana. Es un organismo modelo ampliamente estudiado y utilizado como herramienta en biología molecular.

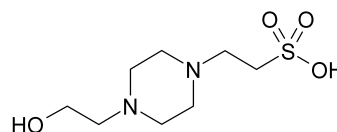
Extracto de levadura: utilizado como fuente de vitaminas y minerales en medios "complejos" de cultivo celular.

FBS: Suero Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*). Utilizado en medios de cultivos debido a la alta concentración de "factores de crecimiento" que permiten la proliferación de células de mamíferos.

HC11: Línea celular inmortalizada generada a partir de epitelio mamario de ratón.

HeLa: Línea celular humana derivada de un cáncer cervical en 1951, ampliamente utilizada en investigación debido a su notable capacidad replicativa.

HEPES: Compuesto orgánico que con grupos funcionales ácidos y básicos. En solución acuosa a pH neutro es un zwitterión, es decir un compuesto eléctricamente neutro, pero con cargas positivas y negativas en diferentes partes de la molécula. Es utilizado en la preparación de *buffers*.



Insulina: hormona polipeptídica involucrada en la regulación del metabolismo celular.

MgCl₂: Cloruro de magnesio. Esta sal es normalmente utilizada en la preparación de *buffers* para disolver ADN ya que el magnesio estabiliza la estructura de este ácido nucleico.

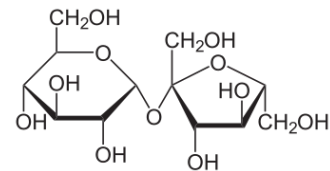
NaOH: Hidróxido de sodio, también conocido como soda cáustica. Es una base fuerte (es decir que se disocia completamente en solución acuosa) utilizada entre otras cosas para realizar lisis alcalina o ajustar el pH de soluciones.

PBS: Buffer fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline*). Solución *buffer* a partir de sales de fosfato ampliamente utilizado en biología molecular. Esta solución tiene la misma osmolaridad que las células animales, por lo que puede ser utilizado para resuspender células sin lizarlas.

Plásmido: Molécula de ADN circular capaz de replicarse independientemente de los cromosomas. Los plásmidos suelen llevar genes que confieren determinadas propiedades a las células portadoras.

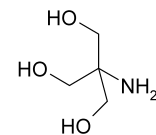
RPMI: Medio "definido" utilizado para el cultivo de líneas celulares de mamíferos, desarrollado en el *Roswell Park Memorial Institute*.

Sacarosa: disacárido de glucosa y fructosa. Componente principal del azúcar de mesa. Usado como fuente de carbono en cultivos celulares y para crear soluciones de alta osmolaridad, entre otros usos.

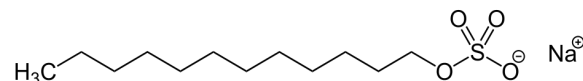


Triptona: producto de digestión de caseína por tripsina. La caseína es una proteína que se encuentra en alta concentración en la leche bovina, y por lo tanto se puede purificar en grandes cantidades y es relativamente económica. La tripsina es una proteasa, es decir una enzima capaz de digerir (cortar) otras proteínas en sitios específicos. La triptona es utilizada normalmente como fuente de aminoácidos y nitrógeno en medios "complejos" de cultivo celular.

TRIS: Base orgánica débil normalmente usada en *buffers*.



SDS: Dodecil Sulfato de Sodio (*Sodium Dodecyl Sulfate*). Detergente iónico utilizado entre otras cosas para mejorar la solubilidad en agua de compuestos hidrofóbicos como algunas proteínas.



Suero: fracción no celular de la sangre, obtenido por centrifugación de la sangre luego de su coagulación natural.