

Tópicos en Biofísica Molecular

2do Cuatrimestre de 2013

Docentes: Lía Pietrasanta y Catalina von Bilderling

Práctica de laboratorio n° 1: Soluciones, pH

OBJETIVOS

Familiarizarse con el material de uso corriente en el laboratorio, la preparación de soluciones y el empleo de diluciones a partir de soluciones concentradas. Preparar una solución tampón o *buffer*, medir su pH (papel pH, pH metro), y llevar al pH específico de uso a partir de agregar a la solución un ácido o una base.

INTRODUCCIÓN

1. Concentración

Cuando una solución es de uso corriente en un laboratorio, se suele preparar una solución madre o stock concentrado de la misma y, a partir de ésta, realizar la dilución que se necesita en el momento. Tengamos en cuenta que:

- Se dice que una solución es “*N X*” (*N* por) cuando está concentrada *N* veces respecto de la de uso corriente.

- A veces es necesario diluir mucho una solución concentrada (por ej. $1/10^4$, $1/10^6$). En estos casos conviene hacer *diluciones seriadas* para disminuir los errores de medición al pipetear volúmenes muy pequeños

- Un mol de moléculas es un número de Avogadro de moléculas (6.02×10^{23}). La masa de una sustancia que corresponde a un mol de moléculas de esa sustancia es lo que conocemos como masa molar *M* (o, mal llamado pero generalmente usado peso molecular *PM*) y se expresa en gramos. Por ejemplo, la masa molar del oxígeno O_2 es de 32 g/mol y la del agua 18g/mol. *No confundirlo* con la masa molecular relativa (*Mr*). Aunque *Mr* coincide numéricamente con *M* no lleva unidades de masa sino que es relativa, indica cuántas veces más pesada es una molécula de una sustancia respecto de la unidad de masa atómica (u.m.a.), o de 1 Dalton (Da).

Unidades de concentración

- **% m/m** *porcentaje masa en masa*: g de soluto por cada 100 g de solución (soluto + solvente)
- **% m/v** *porcentaje masa en volumen*: g de soluto por cada 100 ml de solución.
- **% v/v** *porcentaje volumen en volumen*: ml de soluto por cada 100 ml de solvente.
- **M** *molaridad*: número de moles de soluto por cada 1 l de solución.
- **m** *molalidad*: número de moles de soluto por cada 1 Kg de solvente.

2. Soluciones tampones o *buffers*

Muchas reacciones químicas se ven afectadas por la acidez de la solución en la que se producen. Para que una reacción química particular se produzca, o se produzca a una tasa apropiada, el pH del medio donde se lleva a cabo debe estar controlado. Este control se logra mediante la utilización de soluciones tampón, o *buffers*, que son soluciones que mantienen un valor de pH particular.

Las reacciones bioquímicas son especialmente sensibles al pH. La mayoría de las moléculas biológicas contienen grupos de átomos que pueden ser neutros o estar cargados dependiendo del pH, y el hecho de que estén cargadas o no tiene un efecto significativo en la actividad biológica de la molécula. Por ejemplo, en todos los organismos multicelulares, tanto el fluido dentro de las células como el que las rodea tienen un pH característico prácticamente constante (pH fisiológico). Este valor de pH se mantiene de diversas maneras, y una de las más importantes es a través de los sistemas *buffers*.

En un laboratorio de biofísica molecular contamos con una numerosa cantidad de soluciones *buffer* salinas, cada una de las cuales mantiene el pH en un cierto rango. En la **Figura 1** se presenta una tabla con algunos de los *buffers* más utilizados y los rangos de pH de uso de cada uno de ellos (de la compañía *Sigma-Aldrich*).

Useful pH Ranges of Selected Biological Buffers (25° C, 0.1 M)

	pH	6	7	8	9	10	11	Useful pH Range	pKa (at 20)	pKa (at 25)	pKa (at 37)
MES								5.5-6.7	6.16	6.10	5.97
BIS-TRIS								5.8-7.2	-	6.50	6.36
ADA								6.0-7.2	6.65	6.59	6.46
ACES								6.1-7.5	6.88	6.78	6.54
MPES								6.1-7.5	6.80	6.76	6.66
MOPSO								6.2-7.6	-	6.90	6.75
BIS-TRIS PROPANE								6.3-9.5	-	6.8/9.0	-
BES								6.4-7.8	7.17	7.09	6.90
MOPS								6.5-7.9	7.13	7.20	7.70*
TES								6.8-8.2	7.50	7.40	7.16
HEPES								6.8-8.2	7.55	7.48	7.31
DIPSO								7.0-8.2	-	7.60	7.35
MOBS								6.9-8.3	-	7.60	-
TAPSO								7.0-8.2	-	7.60	7.39
TRIZMA								7.0-9.0	8.20	8.06	7.72
HEPPSO								7.1-8.5	-	7.80	6.66
POPSO								7.2-8.5	-	7.80	7.63
TEA								7.3-8.3	-	7.80	-
EPPS								7.3-8.7	-	8.00	-
TRICINE								7.4-8.8	8.16	8.05	7.80
GLYCYLGLYCINE								7.5-8.9	-	8.20	-
BICINE								7.6-9.0	8.35	8.26	8.04
HEPBS								7.6-9.0	-	8.30	-
TAPS								7.7-9.1	8.31	8.40	8.90*
AMPD								7.8-9.7	-	8.80	-
TABS								8.2-9.6	-	8.90	-
AMPPO								8.3-9.7	-	9.00	9.30
CHES								8.6-10.0	-	9.30*	9.80*
CAPSO								8.9-10.3	-	9.60	9.43
AMP								9.0-10.5	-	9.70	-
CAPS								9.7-11.1	10.24	10.40	10.78
CABS								10.0-11.4	-	10.70	-

Figura 1. Rangos de pH de uso para algunos de los *buffers* más utilizados (*Sigma-Aldrich*)

El *buffer* necesario para nuestro experimento dependerá del sistema en estudio. En esta práctica prepararemos los siguientes *buffers*:

- *Buffer fosfato salino (PBS), pH 7.4.* Es uno de los *buffers* más utilizados porque es isotónico y no tóxico para las células. Se utiliza para diluir sustancias utilizadas para el cultivo y para lavar los recipientes que contienen células.
- *Buffer HEPES, pH 7.4.* Utilizaremos este *buffer* para disolver soluciones de plásmidos (ADN circular) para su visualización en el Microscopio de Fuerza Atómica. Como la muestra para esta microscopía se prepara sobre mica, se suele agregar al buffer $MgCl_2$ que mediante sus cargas ayuda a que las moléculas de ADN se adsorban a la mica.

Medición del pH

Dado que el resultado de un ensayo depende del pH de la solución *buffer* que utilizemos, es muy importante medirlo. La medición de pH puede realizarse con ensayos rápidos, tales como papel o tiras o soluciones indicadoras del pH (**Figura 2**) o con un pH metro (**Figura 3**).

Los indicadores suelen ser ácidos o bases débiles que se caracterizan porque su molécula neutra tiene un color diferente al de la forma iónica. Por lo general, este cambio de color obedece a que la pérdida o ganancia de un H^+ por parte del indicador provoca una reorganización interna de los enlaces. Existe una gran variedad de sustancias indicadoras, en todas ellas, el color de la disolución dependerá de la relación entre las concentraciones de las formas disociada y sin disociar. Los papeles indicadores del pH se fabrican impregnando papel filtrante de alta calidad con soluciones indicadoras o de mezcla indicadora. Las tiras indicadoras contienen tintes indicadores especiales que están unidos de forma covalente a la celulosa del papel reactivo.



Figura 2. Diferentes tipos de tiras y papeles indicadores de pH (<http://www.colorphast.com>)

El pH-metro (**Figura 3**) permite medir el pH por un método potenciométrico, basado en hecho de que entre dos disoluciones con distinta concentración de iones H^+ se establece una diferencia de potencial. Esta diferencia de potencial determina que cuando las dos disoluciones se ponen en contacto se produzca un flujo de H^+ , o una corriente eléctrica. La medida del pH por este método es relativa, ya que no se determina directamente la

concentración de H^+ sino que se compara el pH de una muestra con el de una disolución de pH conocido. El pH-metro consiste básicamente en un electrodo de pH (**Figura 3**). Cuando el electrodo entra en contacto con la solución se establece una diferencia de potencial a través de la membrana de vidrio que lo recubre, que varía según el pH. Para determinar el valor del pH se necesita un electrodo de referencia, cuyo potencial no varía. El electrodo de referencia puede ser externo o puede estar integrado en el electrodo de pH.

NOTA: el pH-metro debe ser calibrado regularmente, preferiblemente antes de cada uso. Para ello se utilizan soluciones patrón de pH 4, 7 y 10.

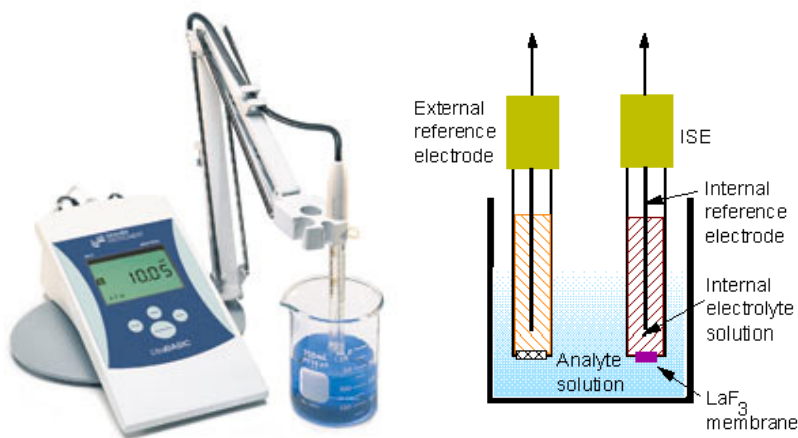


Figura 3. pH-metro (PRESISI TECHNOLOGIES PT) y esquema del electrodo utilizado para medir pH (tomado de http://assay.nih.gov/assay/index.php/Section17:pH_meters)

Una vez medido el pH, se agrega a la solución una pequeña cantidad de una solución de una base o un ácido hasta lograr el pH necesario. Cambiar el pH de una solución hasta obtener el pH deseado es lo que se denomina “llevar a pH” la solución.

DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

1. Preparación de *Buffer Fosfato Salino (PBS)*, pH 7,4 (250ml de solución stock 10X)

1.a Pesar:

0.5 g KCl

0.6 g KH_2PO_4

20 g NaCl

3.6 g Na_2HPO_4

1.b Disolver Na_2HPO_4 en 40 ml (aprox.) de agua destilada con agitador y con calor.

1.c Disolver KCl, NaCl y KH_2PO_4 en 130 ml (aprox.) de agua destilada.

1.d Combinar ambas soluciones.

1.e Medir pH. Ajustar a pH 7.4 con NaOH o HCl.

1.f Llevar a volumen.

1.g Rotular

1.h Preparar 50 ml de una solución de PBS 1X, pH 7.4

1.i Calcular a qué concentración en M están todos los componentes de esta solución 1X:

KCl: _____ M

KH₂PO₄: _____ M

NaCl: _____ M

Na₂HPO₄: _____ M

2. Preparación de Stocks: Buffer HEPES 100mM, pH 7.4 (250ml) y solución de MgCl₂ 40 mM (50 ml).

2.a Calcular qué cantidades hay que pesar de cada componente.

2.b Pesar:

HEPES: _____ g

MgCl₂: _____ g

2.c Disolver el HEPES en 200 ml (aprox.) de agua destilada.

2.d Medir el pH. Llevar a pH 7.4 con NaOH o HCl.

2.e Llevar a volumen.

2.f Preparar 50 ml de solución de MgCl₂.

2.g Rotular ambas soluciones.

2.h Preparar 15 ml de una solución HEPES 10mM, MgCl₂ 4mM, pH7.4.

BIBLIOGRAFÍA

- *Guía de Trabajos Prácticos* de la materia IBMC - cátedra Dr. A. Kornblitt, FCEN, UBA.
- <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html>
- *Molecular Cell Biology*. Harvey Lodish, Arnold Berk, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Matthew P. Scott, Anthony Bretscher, Hidde Ploegh, Paul Matsudaira. Publisher: W. H. Freeman; 6th edition (June 15, 2007). Págs. 51-54.