

Programa de BIOQUÍMICA

Carrera: Tecnicatura Universitaria en Biotecnología

Asignatura: Bioquímica

Núcleo al que pertenece: Avanzado obligatorio

Profesor: María Julia Altube - Alejo Gianotti

Asignaturas previas necesarias para favorecer el aprendizaje: Química Orgánica

Objetivos: Que quienes cursan la asignatura conozcan la composición de las principales moléculas biológicas, sus funciones y características químicas. Que conozcan también las principales rutas metabólicas y las identifiquen como procesos productores y consumidores de energía. Que aprendan técnicas de separación y cuantificación de las moléculas biológicas.

Contenidos mínimos: Biomoléculas: Estructura, propiedades fisicoquímicas y funciones biológicas. Proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, lípidos y membranas. Enzimas y cinética enzimática. Introducción al metabolismo y bioenergética. Métodos de purificación y caracterización de biomoléculas.

Carga horaria semanal: 6 horas.

Programa analítico:

Unidad 1: Introducción a la Química biológica Química de los organismos vivos. Grupos funcionales en biomoléculas. Compuestos biológicos: moléculas pequeñas y macromoléculas. Funciones fundamentales de las macromoléculas.

Unidad 2: El agua Agua, características químicas y físicas. Agua como solvente: interacciones electrostáticas, puentes de hidrogeno. Interacciones hidrofóbicas. Propiedades acido-base, ácidos y bases débiles, pH y buffer.

Unidad 3: Hidratos de carbono Hidratos de carbono: funciones biológicas y clasificación. Monosacáridos. Isómeros. Propiedades químicas. Carbono hemiacetalico. Enlace glicosídico. Azúcares reductores y no reductores. Polisacáridos.

Trabajo Práctico 1: Identificación de hidratos de carbono e Introducción al manejo de micropipetas. Actividades: Empleo de reacciones colorimétricas para la identificación de distintos hidratos de carbono. Manejo y cuidado de micropipetas.

Unidad 3: Aminoácidos, péptidos y proteínas Estructura general de aminoácidos. Isomería óptica. Clasificación de aminoácidos según su grupo funcional. Propiedades acido base de los aminoácidos. Punto isoeléctrico.

Enlace peptídico: características químicas. Péptidos y proteínas. Propiedades ácido-base. Métodos de separación. Electroforesis. Cuantificación por métodos colorimétricos.

Niveles de estructura: primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. Interacciones que determinan la conformación de las proteínas en sus distintos niveles estructurales. Desnaturalización y agentes desnaturalizantes.

Unidad 4: Enzimas Catalizadores biológicos. Clasificación de enzimas. Sitio activo. Cinética enzimática. Factores que modifican la actividad enzimática: concentración de enzima, sustrato, temperatura y pH. Modelo de Michaelis-Menten.

Trabajo Práctico 2: Cuantificación y separación de proteínas. Actividades: Determinación de la concentración de proteína mediante el método colorimétrico Bradford. Separación de proteínas mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE. Objetivo: Que los alumnos

Unidad 6: Lípidos Clasificación de ácidos grasos. Composición química y función biológica de triacilgliceroles, ceras, fosfolípidos, glucolípidos, esteroides y detergentes. Agregados lipídicos: micelas, membranas y liposomas. Técnicas de extracción, separación y cuantificación de lípidos.

Unidad 7: Ácidos nucleicos Conceptos básicos sobre ADN y ARN: ubicación celular, estructura y función. Clasificación y composición química de bases nitrogenadas. Nucleótidos y nucleósidos. Estructura del ADN y función. Estructura y función de las distintas clases de ARN. Desnaturalización. Técnicas de aislamiento y análisis.

Trabajo Práctico 3: Extracción de lípidos. Actividades: Extracción de lípidos totales de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mediante el método Bligh&Dyer. Cromatografía en capa delgada.

Trabajo Práctico 4: Extracción de ADN genómico. Actividades: Aislamiento de ADN genómico de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mediante el método de congelamiento/descongelamiento. Electroforesis en gel de agarosa.

Unidad 8: Aspectos generales del metabolismo Anabolismo y catabolismo. Organismos autótrofos y heterótrofos. ATP. Moléculas reductoras.

Unidad 9: Bioenergética I Glucólisis, ciclo de Krebs, fermentación. Transporte de electrones y fosforilación oxidativa.

Unidad 10: Bioenergética II Fotosíntesis: Etapa luminosa: fotosistemas I y II. Etapa oscura: ciclo de Calvin.

Bibliografía:

Bibliografía obligatoria

- Blanco, A. Química Biológica Sexta edición. 2006. Ed. El Ateneo.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. "Lehninger principios de bioquímica" Quinta edición. 2009. Ed. Omega.

Bibliografía de consulta

- BaduiDergal, S. Química de los Alimentos. Cuarta Edición. Ed. Pearson Addison Wesley.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E., & Ahern, K. G. Bioquímica. Tercera edición. 2002. Ed. Pearson Education.
- Voet, D., & Voet, J. G. Bioquímica. Tercera edición. 2006. Ed. Médica Panamericana.

Organización de las clases: La materia está organizada en clases teóricas, seminarios, trabajos prácticos de laboratorio y clases de consulta.

Aprobación de la asignatura según Régimen de Estudios vigente de la Universidad Nacional de Quilmes (Res. CS N° 201/18):

Las asignaturas podrán ser aprobadas mediante un régimen regular, mediante exámenes libres o por equivalencias.

Las instancias de evaluación parcial serán al menos 2 (dos) en cada asignatura y tendrán carácter obligatorio. Cada asignatura deberá incorporar al menos una instancia de recuperación.

El/la docente a cargo de la asignatura calificará y completará el acta correspondiente, consignando si el/la estudiante se encuentra:

- a) Aprobado (de 4 a 10 puntos)
- b) Reprobado (de 1 a 3 puntos)
- c) Ausente
- d) Pendiente de Aprobación (solo para la modalidad presencial).

Dicho sistema de calificación será aplicado para las asignaturas de la modalidad presencial y para las cursadas y los exámenes finales de las asignaturas de la modalidad virtual (con excepción de la categoría indicada en el punto d).

Se considerará Ausente a aquel persona estudiante que no se haya presentado/a a la/s instancia/s de evaluación pautada/s en el programa de la asignatura. Los ausentes a exámenes finales de la modalidad virtual no se contabilizan a los efectos de la regularidad.

Modalidad de evaluación:

Para aprobar la asignatura el alumno deberá:

- Asistir al 75 % de las clases teóricas.
- Aprobar todas las instancias de evaluación con un mínimo del 50 % del parcial bien, que equivale a un 4. Estas instancias constan de 2 exámenes parciales teóricos y 4 exámenes cortos de laboratorio.
- En caso de desaprobar los exámenes estos se podrán recuperar.
- Trabajos prácticos en el laboratorio: asistir a todos los trabajos prácticos, llevar un cuaderno de laboratorio completo y actualizado, aprobar el informe de laboratorio.
- Promoción: tener aprobados los parciales teóricos y el laboratorio con una calificación como mínimo de 6 y promedio 7.
- Examen integrador: en caso de obtener un 4 o más pero no promocionar la asignatura, que podrá ser escrito u oral. El examen integrador se aprueba con 4 o más. En caso de no presentarse o desaprobar el Integrador quedará Pendiente de Aprobación y podrá rendir el Integrador fuera de la cursada, teniendo dos oportunidades.
- En caso de no presentarse o desaprobar alguna instancia de evaluación y no presentarse a la evaluación de recuperación, se considerará Ausente

CRONOGRAMA TENTATIVO

Semana	Tema/unidad	Actividad*			Evaluación
		Teórico	Práctico		
			Res Prob	Lab.	Otros Especifica r
1	Unidad 1 - 2: Introducción a Química Biológica - El agua	X			
2	Unidad 3: Hidratos de Carbono	X	X		
3	Unidad 4: Aminoácidos, péptidos y proteínas	X	X		
4	Trabajo Práctico 1: Curva de calibración - Hidratos de carbono		X		
5	Unidad 5: Enzimas	X	X		
6	Trabajo Práctico 2: Cuantificación de Proteínas		X		
7	Clase de consulta	Consulta		X	
8	Primer Parcial				X
9	Unidad 6: Lípidos	X			

10	Unidad 7: Ácidos Nucleicos	X	X	
11	Trabajo Práctico 3: Extracción de Lípidos			X
12	Trabajo Práctico 4: Extracción de Ácidos Nucleicos			X
13	Unidad 8 - 9: Aspectos generales del metabolismo - Bioenergética I	X	X	
14	Unidad 10: Bioenergética II	X	X	
15	Clase de consulta			X Consulta
16	Segundo Parcial			X
17	Recuperatorio Primer Parcial			X
18	Recuperatorio Segundo Parcial			X
19	Integrador			X
20	Cierre de actas			

ANEXO: GUÍAS DE TRABAJOS PRÁCTICOS

Trabajo Práctico N° 1: Armado de curva de calibración e Identificación de hidratos de carbono

Primera parte: identificación de azúcares

Los monosacáridos (hexosas y pentosas), en medio ácido fuerte, se deshidratan para dar anillos furfurales e hidroximetil-furfurales, respectivamente. Estos derivados furfurales, pueden reaccionar con distintos compuestos (fenoles y aminas), para dar complejos coloreados. Por otra parte, en medio ácido, el enlace glicosídico que mantiene unidos a los monosacáridos que forman disacáridos y polisacáridos, se hidroliza.

Éstas serán la bases de las distintas reacciones que se utilizarán en el trabajo práctico, con el fin de identificar distintos azúcares.

Molisch

La reacción de Molisch es una de las reacciones generalmente utilizada para la identificación de azúcares. En principio, los azúcares (monosacáridos, disacáridos y polisacáridos), dan positivo a esta reacción. El fundamento de esta reacción se basa en que las pentosas y hexosas, en medio ácido fuerte, se deshidratan para dar compuestos cíclicos conocidos como furfurales e hidroximetil-furfurales, respectivamente. Estos anillos reaccionan con el α -naftol, produciendo un complejo de color púrpura, que se visualiza como un anillo violáceo en el seno de la solución (Figura 1)

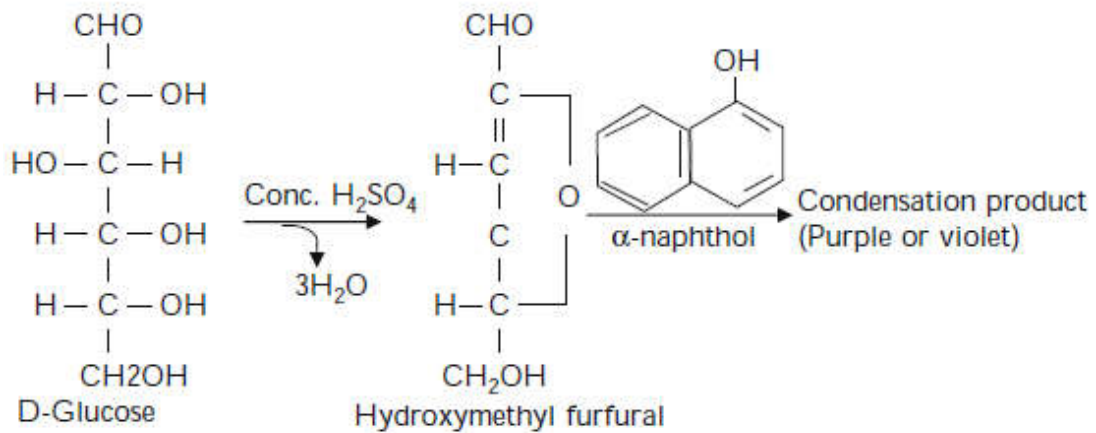


Fig. 1. Reacción de Molisch.

Fehling

La reacción de Fehling sirve para detectar azúcares reductores. Esta prueba es una reacción de óxido-reducción, donde el azúcar reductor se oxida y pasa a ácido carboxílico, y el CuSO₄ se reduce a CuO₂ y provoca un precipitado rojizo. Esta reacción se realiza en medio básico, Tanto las cetosas como aldosas dan positiva a esta reacción debido a que, en medio básico, las cetosas se tautomerizan a aldosas. Además, el medio básico, favorece la forma abierta de los azúcares, donde el grupo aldehído es el grupo reaccionante (Fig. 2).

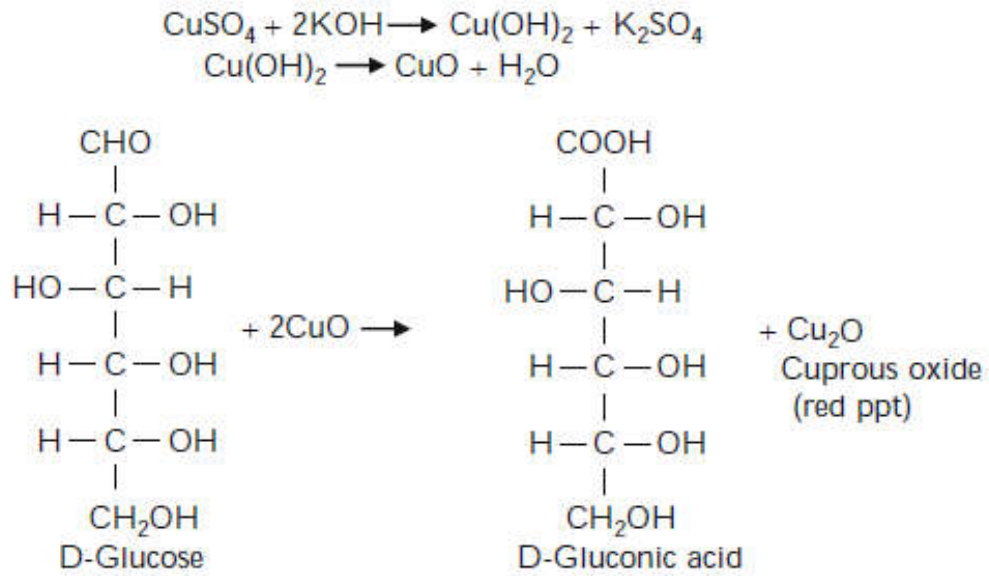


Fig. 2. Reacción de Fehling.

Seliwanoff

La reacción de Seliwanoff se utiliza para distinguir aldosas de cetosas. Las cetosas, en medio ácido fuerte, se deshidratan para dar los anillos furfurales; estos, reaccionan con el resorcinol para dar lugar a un producto coloreado rosado. Si bien las aldosas también reaccionan con el resorcinol, lo hacen más lentamente (Fig. 3).

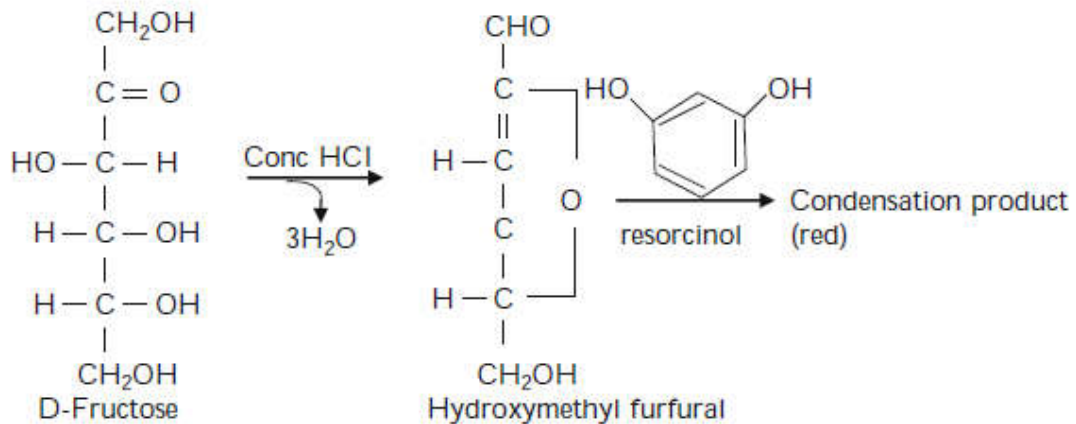


Fig. 3. Reacción de Seliwanoff

Procedimiento experimental

Se le entregarán cuatro tubos distintos (A, B, C, D), los cuales contendrán los siguientes compuestos: glucosa, frutosa, manitol y sacarosa, en distinto orden. Se realizarán, a cada tubo, las reacciones detalladas anteriormente de acuerdo al siguiente protocolo experimental, con el objetivo de identificar todos los compuestos. Todas las reacciones se llevarán a cabo en tubos de ensayo, y se calentaran en baño termostatzado, según corresponda.

Molisch

1. Agregar 1 mL de la solución de azúcar a cada tubo de ensayo con una pipeta pasteur.
2. Agregar **dos gotas** del reactivo de Molisch.
3. Agregar 1 mL de H₂SO₄ concentrado, dejándolo resbalar suavemente por la pared del tubo inclinado. (**TENER EXTREMO CUIDADO CON EL ÁCIDO SULFÚRICO**).

La reacción se evidencia con la aparición de un **anillo púrpura** en el seno de la solución.

Fehling

1. Agregar 1 mL de la solución de azúcar a cada tubo de ensayo con una pipeta pasteur.
2. Agregar **dos gotas** del reactivo de Fehling.
3. Incubar en baño termostatzado por **cinco minutos**.

La reacción positiva se evidencia por la aparición de un **precipitado rojizo** en el fondo del tubo.

Seliwanoff

1. Agregar 1 mL de la solución de azúcar a cada tubo de ensayo con una pipeta Pasteur.
2. Agregar **1 mL** del reactivo de Seliwanoff.
3. Calentar a ebullición por **cinco minutos**.

La reacción positiva se evidencia por la aparición de un **color rosado**.

Segunda parte: curva de calibración

La sulforodamina B (SRB) es un compuesto fluorescente que se utiliza, generalmente, para la tinción de proteínas celulares de células eucariotas (Fig. 4). La SRB presenta $\lambda_{\max}=565$ nm, por lo que absorbe en la región visible, y presenta un color fucsia intenso.

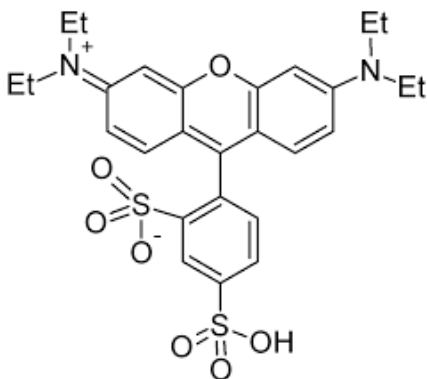


Fig. 4. Estructura de la sulforodamina B

Se procederá a realizar una curva de calibración con distintas concentraciones SRB, de acuerdo a la siguiente tabla.

Tubo	1	2	3	4	5	6
[SRB] (μM)	0	0.25	0.5	0.75	1.5	2.5

Vol 10 μM SRB						
H₂O (μL)						
Vol. final (μL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Tabla 1. Curva de calibración de SRB.

Procedimiento experimental

1. Calcular los volúmenes de que se deberán tomar del stock de SRB y H₂O, para generar la curva.
2. En tubos eppendorf de 1,5 mL, adicionar los volúmenes de H₂O y SBR calculados anteriormente (primero el H₂O, y luego la SBR).
3. Medir los tubos en un espectrofotómetro a $\lambda=565$ nm con una cubeta de plástico.

Paralelamente, se le proporcionará tres tubos (x,y,z) de SRB de concentración desconocida, a los cuales deberá medir la absorbancia de cada uno, como en el punto 3.

Trabajo Práctico N° 2: Cuantificación y separación de proteínas

Introducción

En bioquímica, muchas veces es necesario establecer la concentración de una proteína de forma precisa, por ejemplo, para establecer variables cinéticas en la catálisis enzimática, determinar cuánto ligando se une a una proteína determinada, ó la actividad de una enzima. Es por ello que es necesario contar con métodos rápidos, precisos y sensibles para la cuantificación de proteínas.

Existen distintos métodos para la determinación de la concentración proteica, que pueden dividirse en dos grandes grupos: métodos químicos y métodos físicos.

Los métodos químicos se basan en la unión o interacción de un reactivo con una proteína, que produce un producto coloreado (cromóforo), el cual puede ser cuantificado mediante una relación lineal entre la cantidad de producto y la cantidad de proteína. Sin embargo, estos métodos generalmente presentan interferencias, lo que hace difícil poder establecer con precisión la concentración proteica si no se toman los recaudos necesarios; además, a altas concentraciones estos métodos toman un comportamiento no lineal. Por último, habitualmente se necesitan de controles internos conocidos (curvas de calibración) que validen el ensayo.

Por otro lado, los métodos físicos se basan en propiedades físicas de las proteínas. Uno de estos métodos, que utilizaremos en el trabajo práctico, es la capacidad que tienen las proteínas de absorber radiación ultravioleta.

Primera parte: Método de Bradford

El método de Bradford se basa en la unión no covalente del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 (Figura 1) a residuos básicos (principalmente arginina y, en menor medida, histidina y lisina) y aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina) de las proteínas. La unión de éste colorante a las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del mismo de 465 nm (libre) a 595 nm (unido a proteína), el cual se puede monitorear por espectrofotometría UV-Vis. El *Coomassie Brilliant Blue* G-250 existe en dos especies diferentes: rojo (libre) y azul (unido); el colorante es convertido de rojo a azul cuando interacciona con proteínas. El complejo colorante-proteína presenta un coeficiente de

extinción muy alto, lo que permite cuantificar la cantidad de proteína con gran sensibilidad. Además, la rapidez que caracteriza a este método está dada por la cinética de formación del complejo proteína-colorante; transcurrido dos minutos del inicio de la reacción, el complejo ya se encuentra totalmente formado y permanece estable por aproximadamente una hora.

Otra de las ventajas que presenta este método es la poca interferencia con diferentes compuestos. Los principales interferentes son detergentes, como dodecil sulfato de sodio (SDS) y Tritón X-100 y buffers básicos (Tris). El límite de detección de éste método es 0,2-20 µg, por lo que es muy sensible.

Las desventajas que presenta el método de Bradford es que a altas concentraciones de proteína, el método comienza a comportarse de una forma no lineal; además, se necesita de curvas de calibración con proteínas conocidas que validen el ensayo y, por último, la muestra con la que se trabaja, no puede ser recuperada.

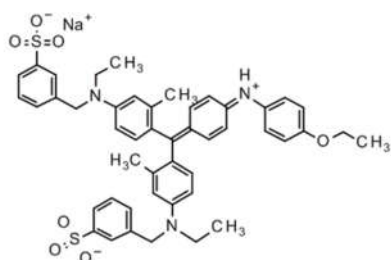


Figura 1. Estructura del *Coomassie Brilliant Blue G-250*

La albúmina sérica bovina (más conocida por sus siglas en inglés como BSA), es una proteína grande (66,5 kDa) extraída del suero bovino, es muy utilizada en ensayos bioquímicos ya que ha encuentra muy caracterizada, es de fácil manipulación, bajo costo, ausencia de interferencia muchas reacciones bioquímicas, etc.

Procedimiento experimental

Muestra	µg BSA	µL H ₂ O	µL BSA stock 1 mg/mL	µL reactivo de Bradford	Volúmen final (µL)
1	0			950	1000

2	2			950	1000
3	4			950	1000
4	6			950	1000
5	8			950	1000
6	10			950	1000

Tabla 1. Curva de calibración con BSA.

1. Realizar los cálculos correspondientes para obtener la cantidad de BSA que se indica en la Tabla 1.
2. En tubos eppendorf de 1,5 mL, preparar las muestras según la Tabla 1. Primero pipetear el agua, segundo la solución de BSA.
3. Realizar distintas diluciones de la muestra incógnita "x" (se indicará en el TP).
4. Agregar el reactivo de Bradford a cada muestra. Mezclar suavemente por inversión, evitando la formación de burbujas. Dejar reposar a temperatura ambiente por 10 min.
5. En una cubeta de plástico, medir las muestras en el espectrofotómetro a $\lambda=595$ nm. Registrar los valores.
6. Calcular la concentración de proteína de la muestra incógnita "x" en mg/mL.

Segunda parte: Separación de proteínas por SDS-PAGE

Una de las técnicas analíticas mayormente utilizadas en los laboratorios de bioquímica es la separación de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Debido a que este método permite separar proteínas por su tamaño, comúnmente es utilizado para determinar la masa molecular relativa de las proteínas.

Las proteínas son separadas a través de una matriz porosa de poliacrilamida; esta matriz es formada por la polimerización de un monómero de acrilamida y la bis-acrilamida (agente de entrecruzamiento) en una reacción por radicales libres, mediada por el persulfato de amonio (APS) y el N,N,N,N-etilendiamino (TEMED). De esta manera, se generan largas cadenas de acrilamida que son

entrecruzadas por moléculas de bis-acrilamida, dando como resultado un gel de poliacrilamida.

En una electroforesis en gel de poliacrilamida, para que las proteínas se separen y migren de acuerdo a su masa molecular, sin importar su forma y carga, se utiliza el dodecilsulfato de sodio (SDS), un detergente aniónico. El SDS provoca la desnaturalización las proteínas y, además, otorga una fuerte carga negativa a las mismas. La cantidad de SDS que se une a las proteínas es prácticamente constante.

Otro agente que se utiliza para el tratamiento de las muestras, es el β -mercaptoetanol; este compuesto provoca la reducción de los puentes disulfuro (S-S), que participan en el mantenimiento de la estructura terciaria de las proteínas. De esta manera, las proteínas quedarán completamente desnaturalizadas y con una carga neta negativa. Por lo tanto, en una electroforesis, las proteínas migrarán de acuerdo a su masa molecular relativa, independientemente de su forma y carga, de una forma lineal. Las proteínas con masas moleculares grandes, quedarán más retenidas en la matriz comparadas con las que poseen menores masas moleculares.

Procedimiento experimental

Usted dispondrá de tres proteínas distintas (P1, P2, P3), las cuales deberá analizar mediante un SDS-PAGE.

1. Agregar *sample buffer* (SB) a cada solución de proteína. Calentar las muestras a 100 °C durante 10 min. Centrifugar cinco minutos a 14000 rpm.
2. Sembrar todas las muestras en el gel de poliacrilamida. Paralelamente, sembrar el marcador de peso molecular (MW).
3. Colocar el gel en la fuente y aplicar un voltaje de 30 V durante 30 minutos. Luego, subir el voltaje a 100 V y dejar correr durante 1:30 h.
4. Una vez completada la corrida, teñir el gel con la solución de tinción por, al menos, cuatro horas.
5. Desteñir el gel con la solución de desteñido hasta que las bandas puedan visualizarse bien.
6. Analizar el gel y deducir a que proteína corresponde P1, P2 y P3.

Tinción: 0.25% (p/v) *Coomassie Brilliant Blue R-250* en 40% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético.

Desteñido: 40% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético.

Sample buffer (SB): 50 mM Tris-HCl (pH 6.8); 100 mM DTT; 2% SDS (v/v); 0,1% (p/v) azul de bromofenol; 10% (v/v) glicerol.

Trabajo Práctico No 3: Extracción de lípidos totales de *S. cerevisiae*

El método de Bligh&Dyer es un método de extracción de lípidos totales ampliamente utilizado, que se aplica a una gran variedad de muestras biológicas. Las principales características de éste método son que es un método rápido y simple, el tratamiento de la muestra es suave, El método consiste en la homogenización de la muestra biológica con una mezcla de solventes en la proporción cloroformo:metanol:agua (1:2:0,8), de tal forma que se genera un sistema monofásico (una fase). Este proceso de homogenización asegura la extracción eficiente de los lípidos totales. Luego, con adición de la misma proporción de cloroformo y agua, se genera un sistema bifásico (dos fases), que es donde se produce la extracción de lípidos. Los lípidos quedarán en la fase inferior (“clorofórmica”), mientras que los demás restos celulares, tales como ácidos nucleicos, proteínas y azúcares, quedarán en la fase superior metanólica (“metanólica”). De esta manera, al separar la fase superior de la inferior, se obtendrán los lípidos totales.

Una de las técnicas que frecuentemente se utilizan para el análisis cualitativo de lípidos es la cromatografía en capa delgada (CCD). Esta técnica, como toda técnica cromatográfica, se basa en la distribución de un componente entre dos fases: una fase fija ó estacionaria y una fase móvil. Las fases fijas que se usan habitualmente para el análisis de lípidos son placas de sílica gel, una matriz muy polar.

Procedimiento experimental

1. Transferir 1,5 mL de medio de cultivo YPD crecido de *S. cerevisiae* y trasvasarlo a un tubo
2. eppendorf de 1,5 mL.
3. Centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos. Descartar el sobrenadante.
4. Agregar 600 µL de metanol. Mezclar por inversión.
5. Agregar 300 µL de cloroformo. Mezclar por inversión.
6. Agitar durante 30 minutos en un agitador orbital a 4 °C.
7. Agregar 300 µL de cloroformo. Mezclar por inversión.
8. Centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos.

9. Tomar la fase inferior y trasvasar a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL.
10. Agregar 300 μ L de agua destilada.
11. Centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos.
12. Tomar la fase inferior y trasvasarla a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL.

Análisis cualitativo de lípidos mediante Cromatografía en capa delgada (CCD)

1. Preparar una placa de CCD de silica gel como fase estacionaria, con dimensiones de 5 cm de ancho y 20 cm de largo. Marcar la línea de siembra con lápiz a 1 cm de la base de la placa.
2. Equilibrar la placa con el solvente de desarrollo cloroformo:metanol:agua (65:25:4). secar con
3. aire caliente.
4. Sembrar la fracción de lípidos en la línea de siembra con capilares de vidrio.
5. Colocar la placa en la cuba y desarrollar con el solvente de desarrollo.
6. Revelar la placa con 5% (v/v) H₂SO₄ en etanol absoluto, seguido de calentamiento a 120°C durante 10 min.
7. Fotografíar la placa.

Trabajo Práctico N°4: Aislamiento de ADN genómico de *S. cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo unicelular, el cual es utilizado como modelo de estudio de células eucariotas. Una de las ventajas de la utilización de estos organismos es su sencilla manipulación celular, molecular y genética.

En los métodos de aislamiento de ADN de levaduras, uno de los pasos críticos es la ruptura de la pared celular. Existen varios métodos de ruptura celular: algunos utilizan enzimas que rompen específicamente la pared celular de las levaduras como la zimolasaolítica; el problema de este método radica en el alto costo de las enzimas. Otros procesos de ruptura involucran el tratamiento mecánico con bolillas de vidrio; la desventaja de este método es que, cuando se cuenta con muchas muestras, deja de ser un método práctico. Es por ello que se requieren métodos de extracción rápidos, simples y de bajo costo. En el trabajo práctico veremos uno de ellos, el cual consiste en la ruptura de la pared celular de las levaduras por ciclos de congelamiento/descongelamiento.

Una de las técnicas más utilizadas en biología molecular para el análisis del ADN es la electroforesis en geles de agarosa. La agarosa es un polímero lineal extraído de algas, que está formado por la D- galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa. Los distintos polímeros de agarosa interactúan entre sí mediante interacciones no covalentes, generando a un gel poroso.

Procedimiento experimental

1. Transferir 1,5 mL de medio de cultivo crecido de *S. cerevisiae* a un tubo eppendorf. Centrifugar 5 minutos a 14000 rpm.
2. Añadir 200 µL de buffer de lisis. Homogenizar.
3. Incubar a -80 °C por 2 minutos.
4. Incubar a 100 °C por 1 minuto.
5. Repetir pasos 4 y 5. Vortexear por 30 segundos.
6. Añadir 200 µL de cloroformo. Vortexear por 2 minutos.
7. Centrifugar 3 minutos a 14000 rpm.

8. Tomar la fase superior acuosa y transferir a un nuevo tubo eppendorf.
Agregar 400 μ L de etanol 100% frío. Mezclar por inversión.
9. Incubar 5 minutos a -20 °C.
10. Centrifugar 5 minutos a 14000 rpm. Descartar el sobrenadante.
11. Lavar el pellet con 500 μ L de etanol 70%.
12. Centrifugar 5 minutos a 14000 rpm. Descartar el sobrenadante.
13. Secar el pellet a temperatura ambiente durante 10 minutos.
14. Resuspender el pellet en 20 μ L de buffer TE.

Buffer de lisis: 2% (v/v) Triton X-100; 1% (p/v) SDS; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8,0; 10 mM Tris-HCl pH 8,0.

Buffer TE: 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0.

YPD: 1% (p/v) extracto de levadura; 2% (p/v) peptona; 2% (p/v) glucosa.