



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA
CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

Biología Celular y Molecular

MANUAL DE PRÁCTICAS



BIOLOGIA: PLAN DE ESTUDIOS 2017-2
Dr. Faustino Camarena Rosales
Dr. Julio E. Valencia Suárez

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN AL LABORATORIO:	4
REGLAMENTO DE LABORATORIO	5
CONSIDERACIONES GENERALES	5
NORMAS DE TRABAJO	5
COMPORTAMIENTO	7
DISPOSICIONES PARA ACADÉMICOS, ALUMNOS Y COLABORADORES DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR,	8
LIBRETA DE LABORATORIO	11
PRACTICA #1	13
TITULO: INTRODUCCIÓN AL TRABAJO DE LABORATORIO	13
PRACTICA #2	15
TITULO: USO DE MICROSCOPIO COMPUESTO	15
TINCIÓN GRAM	18
TINCIÓN DE HEMATOXILINA- EOSINA (HE)	19
ILUMINACION KÖHELER	20
PRACTICA #3	22
TITULO: OSMOSIS Y DIFUSIÓN	22
PRACTICA #4	27
TITULO: SEPARACIÓN DE ORGANELOS (CENTRIFUGACIÓN)	27
PRACTICA #5	30
TITULO: USO DE MICROPIPETEADOR AUTOMÁTICO	30
PRACTICA #6	33
TITULO: FERMENTACIÓN	33
PRACTICA #7	36
TITULO: OBSERVACIÓN DE CÉLULAS EN MITOSIS	36
PRACTICA #8	38
TITULO: MEIOSIS	38
TINCIÓN WRIGHT	39
PRACTICA #9	40

TITULO: EXTRACCIÓN DE ADN	40
PRACTICA #10	45
TITULO: EXTRACCIÓN DE ADN MÉTODO DE FENOL	45
PRACTICA #11	47
TITULO: ELECTROFORESIS	47
PREPARACIÓN AGAROSA EN HORNO DE MICROONDAS	53
CUANTIFICACIÓN DE ADN	54
PRACTICA #12	57
TITULO: USO DE ENDONUCLEASAS	57
PRACTICA #13	60
TITULO: PCR INESPECÍFICO	60
PRACTICA #14	67
TITULO: PCR ESPECÍFICO	67
LITERATURA	70

Introducción al laboratorio:

En el desarrollo de las prácticas se busca la familiarización metodológica con las técnicas básicas utilizadas en la Biología Celular y Molecular. Por seguridad para los usuarios, los materiales y equipos se mantendrán en el laboratorio.

La evaluación de las practicas se realizará con los siguientes criterios

--- Asistencia (menos del 80%, no tiene derecho a la evaluación ordinaria)

--- Reporte resumido que contenga el título de la práctica, una breve introducción (uno o dos párrafos), antecedentes (información teórica de la practica en uno o dos párrafos), objetivo, descripción de materiales y métodos, resultados (uno o dos párrafos), discusión (recuerde en esta sección se compara la información de lo esperado de acuerdo a la información teórica contra lo obtenido), conclusión (sólo se resalta el conocimiento obtenido con la práctica). Finalmente una autoevaluación con base en los criterios que se describen en la siguiente liga.

CRITERIOS DE AUTOEVALUACIÓN EN EL DESARROLLO DE HABILIDADES PRACTICAS

Entrega de la libreta de laboratorio (en dos ocasiones en el semestre, a mediados de septiembre y al final del curso el 29 o 30 de noviembre, según corresponda). La libreta de laboratorio se evaluará de acuerdo a los criterios que se describen en la siguiente liga.

Reglamento de Laboratorio



Consideraciones generales

El trabajo en los laboratorios relacionados con las áreas de Ecología Molecular y Biotecnología, están asociados con diferentes tipos de riesgos, que los podemos categorizar en:

- .. Peligros para las personas que trabajan en el laboratorio.
- .. Peligros para la salud de otras personas, así como riesgos para el ambiente, producidos por las actividades que se realizan.
- .. Riesgos en el manejo de los materiales y equipos utilizados.

Por lo tanto es necesario tener una serie de precauciones para garantizar la reproducibilidad de los resultados.

NORMAS DE TRABAJO

- .. Es Obligatorio
 - o En el laboratorio utilizar en todo momento: bata, guantes y zapato cerrado.
 - o Lavarse las manos antes y después del trabajo en el laboratorio.
 - o Mantener en funcionamiento el aire acondicionado a la temperatura indicada por el encargado del laboratorio (esto tiene como objetivo mantener en buenas condiciones el equipo de trabajo en condiciones de temperatura extrema).
 - o Mantener limpia el área de trabajo y material que se utilice.
 - o Si utiliza equipos, materiales de uso delicado y reactivos, es responsabilidad del usuario leer manuales o consultar sobre su funcionamiento.
 - o Muchos de los reactivos que se emplean son sensibles a la luz o temperatura y peligrosos para la salud humana (mutagénicos o carcinogénicos), por lo que se debe estudiar las fichas técnicas donde se señalan las propiedades químicas y físicas de los mismos así como su manejo y los riesgos para la salud.

- o Cuidar los reactivos y trabajar con alícuotas independientes.
- o Respetar las bitácoras, los cronogramas de actividades y los registros de uso de los aparatos.
- o Notificar cualquier desperfecto del equipo e informar al responsable del laboratorio cuando los reactivos están por terminarse.
- o Mantener en buen estado los reactivos, soluciones y los espacios de trabajo asignados.
- o Todo el material deberá ser lavado con jabón enzimático, posteriormente deberá enjuagarse con abundante agua destilada.
- o Etiquete las muestras, reactivos y soluciones adecuadamente, indicando la siguiente información:

Muestras

Nombre del responsable

Fecha

Origen y detalle del contenido de la muestra

Soluciones

Nombre del responsable

Fecha

Nombre de la solución, indicando los componentes y la concentración

Reactivos

Fecha en que se recibió y fecha de apertura

En caso de que pierda la etiqueta original, rotular el reactivo.

DE LOS CONGELADORES Y REFRIGERADORES SE ELIMINARÁ TODO LO QUE NO CUMPLA LA REGLAMENTACIÓN

Es responsabilidad de cada uno de los usuarios el disponer adecuadamente los desechos tóxicos, mediante la asignación de contenedores específicos.

Nota: es importante esterilizar el material biológicamente peligroso (bacterias modificadas, sustancias), antes de depositarlos en sus respectivos contenedores.

- · Está prohibido
 - o Sacar fuera del laboratorio, equipo y materiales (únicamente podrán salir con autorización del responsable del laboratorio).
 - o El acceso a personas no autorizadas.
 - o Comer y Fumar dentro del laboratorio.
 - o Utilizar artículos personales (celulares, computadoras, etc.) con guantes.
- · El laboratorio es un lugar de trabajo, si es requerido platicar se recomienda ocupar los espacios externos al laboratorio.
- · En caso de duda contactar a la persona responsable del laboratorio.

El trabajo operativo en estos laboratorios implica costos, tanto en tiempo como en recursos, por lo que se recomienda utilizar el sentido común en todas sus acciones.

COMPORTAMIENTO

En los laboratorios relacionados con la Ecología Molecular y la Biotecnología, generalmente se comparten equipos y recursos, además de largos tiempos de compañía, por lo que también es importante considerar los aspectos relacionados con la actitud, particularmente la disposición al trabajo en equipo, el respeto a los colegas y finalmente el buen humor.

La limpieza y el orden en el espacio de trabajo auxilian para obtener buenos resultados al disminuir los riesgos de contaminación de los artículos que utilizamos y de nosotros mismos, además permiten un mejor ambiente de trabajo. Si hay orden en el laboratorio y en el espacio de trabajo, también lo hay en las ideas.

Disposiciones para académicos, alumnos y colaboradores del laboratorio de Biología Molecular,

La normatividad federal vigente en materia de seguridad obliga a los usuarios del laboratorio seguir las siguientes recomendaciones:

1. Todas las gavetas deben de estar disponibles para cualquier inspección que se realice. Si alguien desea mantener sus reactivos o materiales bajo candado, deberá mantener disponible una copia de la llave con el encargado del laboratorio.
2. Todos los reactivos deben estar colocados en charolas de contención.
3. De todos los reactivos deberá estar disponible la hoja de seguridad, en español.
4. Los residuos del laboratorio quedan clasificados en las siguientes categorías:
 - a. Residuos biológico- i n f e c c i o s o s
 - i. Punzo cortantes como navajas
 - ii. Guantes
 - iii. Desechos de disecciones o residuos animales y vegetales
 - iv. Desechos de cultivo microbiológicos
 - b. Residuos líquidos
 - i. Mezcla de solventes
 - ii. Contaminados con bromuro de etidio
 - c. Residuos sólidos contaminados con bromuro de etidio
 - d. Basura general
5. Los desechos se colocarán en recipientes específicos para su acumulación, posteriormente se pasaran al almacén general de la Facultad de Ciencias. En bitácoras específicas se anotarán las cantidades generadas.
 - a. Residuos biológico- i n f e c c i o s o s
 - i. Punzo cortantes como navajas:
 1. Los desechos se colocarán en el bote rojo ubicado en la mesa del laboratorio
 2. En la bitácora se anotará la cantidad aproximada que mensualmente deposite por responsable
 - ii. Guantes (no contaminados con Bromuro de etidio):

1. Los desechos se colocarán en el bote con bolsa roja ubicada al frente del laboratorio
2. En la bitácora el encargado del laboratorio anotará la cantidad aproximada que semanalmente se deposite
3. La bolsa roja no debe llenarse a más del 80 % de su capacidad. En caso de llenarse por favor cerrar y colocar la siguiente.
4. NO DEBEN DE TIRARSE GANTES NO CONTAMINADOS EN NINGUN OTRO RECIPIENTE
 - iii. Desechos de disecciones o residuos animales y vegetales
 1. El responsable de la generación del desecho determinara su mejor destino. Sí corresponde a la bolsa roja (biológico infecciosos), favor de anotar en la bitácora.
 - iv. Desechos de cultivo microbiológicos
 1. El responsable de la generación del desecho determinara su mejor destino. Sí corresponde a la bolsa roja (biológico infecciosos), favor de anotar en la bitácora.
 - b. Residuos líquidos (no contaminados con bromuro de etidio)
 - i. Mezcla de líquidos no contaminados con bromuro de etidio
 1. Los desechos se colocarán temporalmente en los frascos cubiertos con papel aluminio que están sobre las mesas, después en el frasco de galón color ámbar, el cual esta etiquetado y ubicado en la gaveta debajo de la campana de extracción de vapores al final del laboratorio
 2. En la bitácora se anotará la cantidad aproximada que mensualmente se deposite por responsable
 - ii. Contaminados con bromuro de etidio
 1. Los desechos se colocarán temporalmente en el frasco de galón color ámbar, el cual esta etiquetado y ubicado en cuarto oscuro, en la gaveta debajo de la tarja
 2. En la bitácora se anotará la cantidad aproximada que mensualmente se deposite por responsable
 - c. Residuos sólidos contaminados con bromuro de etidio
 - i. Geles
 1. Los desechos se colocarán en el bote etiquetado, ubicado en el cuarto oscuro
 2. En la bitácora ubicada en el cajón superior del lado izquierdo, se anotará la cantidad aproximada que semanalmente se deposite
 - ii. Plásticos, papel y cartón
 1. Los desechos se colocarán en el bote etiquetado, ubicado en el cuarto oscuro
 2. En la bitácora ubicada en el cajón superior del lado izquierdo, se anotará la cantidad aproximada que semanalmente se deposite
 - d. Basura general. NO DEBERA CONTENER NINGUNO DE LOS RESIDUOS ANTES INDICADOS. El conserje asignado al laboratorio la recogerá periódicamente

Libreta de Laboratorio

PREVIO A LA PRACTICA DEBE OBTENER INFORMACION TEORICA DEL TEMA Y ESCRIBIRLO EN LA LIBRETA

Toda la descripción del proceso que involucra la generación de datos en el laboratorio debe estar anotada en la libreta de laboratorio o bitácora. Es una herramienta obligada que garantiza la reproducción de los experimentos y respalda nuestra investigación al registrar las actividades e ideas, errores y aciertos.

La libreta deberá ser de pasta dura, hojas enumeradas y cosidas (evite cuadernos engargolados). Toda anotación debe ser escrita con tinta.

Con base a criterios internacionales se establecen las siguientes recomendaciones:

La libreta deberá ser única; exclusivamente se usará en el laboratorio.

- .. Etiquete correctamente la libreta con sus datos personales, título del curso o proyecto, nombre del profesor o tutor.
- .. De preferencia dejar las dos primeras páginas como índice.
- .. Anote todo lo que realice en laboratorio en forma cronológica, con información clara y entendible.
- .. Indique lo que sucedió en cada ocasión que trabaje en el laboratorio, incluyendo la información teórica, variaciones de los protocolos y la justificación correspondiente, evitando anotar datos en hojas sueltas.
- .. No utilice corrector, ni sobrescriba, en su caso cruce con una línea las palabras o frases escritas erróneamente.
- .. En cada página se recomienda anotar: título de la actividad o experimento, fecha, número de página y en lo posible los archivos electrónicos generados y asociados a los experimentos realizados.
- . No arranque las hojas. No se admite la bitácora si no tiene continuidad en su enumeración.
- .. Anote todos los cálculos que realice.
- .. Cronológicamente, pegue las fotos, gráficas y otros documentos o comprobantes que se generen de su trabajo en el laboratorio.
- .. Resuma sus resultados, analícelos y contrástelos, finalmente sintetice sus conclusiones.
- .. Se sugiere utilizar la última página para incluir una tabla de abreviaturas y códigos utilizados.
- .. Las penúltimas páginas serán para anotar las formulas de los reactivos que se utilicen.

Anote el listado de todos los materiales y equipos utilizados

Describa los métodos seguidos no se olvide es clave relatar los resultados. Discuta las actividades realizadas así como los resultados obtenidos, explicitando sus sugerencias Sintetice sus conclusiones

Nota: para más información de la libreta de laboratorio se recomienda la siguiente bibliografía: Kanare, H. M: 1985. Writing the Laboratory Notebook. Washington D.C.: American Chemical Society. <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/tools/notebook/notebook.html> <http://www.chem.tamu.edu/class/majors/syllabusmaterials/laboratorynotebook.htm>

PRACTICA #1

Título: Introducción al trabajo de laboratorio

Duración: 3 horas

INTRODUCCION: a investigar por el estudiante

Información relacionada con el marco de referencia:

¿Cuáles son las principales recomendaciones para trabajar en laboratorios de Biología?

¿Cuáles son las características que diferencian a los laboratorios de zoología, botánica, química y biología molecular?

OBJETIVO: Introducir al trabajo en el laboratorio de Biología Molecular.

MATERIAL:

BATA PARA LABORATORIO

METODOLOGIA:

1. En forma teórica se revisaran aspectos generales del laboratorio, así como el reglamento y las recomendaciones para el manejo de los desechos?
2. Recorrido en el laboratorio, con el fin de identificar las diferentes áreas de trabajo así como los principales equipos.
3. Revisión del manejo de la libreta de laboratorio.

Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis:

1. Resuma la información teórica y contrástela con el marco de referencia que obtuvo.
2. Esquematice la distribución de las áreas del laboratorio, identifique los recipientes para desechos y analice los cuidados que debe tener en cada área.
3. Prepare su libreta de laboratorio, contraste con la información que recomiendan diversos autores para llevar la libreta de laboratorio y explique su valor utilitario.
4. Procure emitir recomendaciones para mejorar los diferentes aspectos señalados en la sesión.

Libreta de laboratorio

Como reporte de practicas se entregará individualmente en una libreta de laboratorio, así como el resumen que deberá enviar por la plataforma Blackboard.

PRACTICA #2

Título: Uso de microscopio compuesto

Duración: 3 horas

INTRODUCCION: a investigar por el estudiante

Información relacionada con el marco de referencia:

¿Cuáles son los tipos de microscopio útiles en la actividad relacionada con la biología celular y molecular?

¿Cuáles son las principales características de los microscopios compuestos?

Copie un esquema de un microscopio compuesto

¿Cuáles son las principales recomendaciones para el uso del microscopio?

OBJETIVO: Reconocer de estructuras y formas celulares partir de observaciones en microscopio compuesto y su contraste con esquemas o descripciones escritas, de células y tejidos, tanto animales como vegetales.

MATERIAL:

Materiales

5 Portaobjetos y 5 cubreobjetos

Azul de metileno

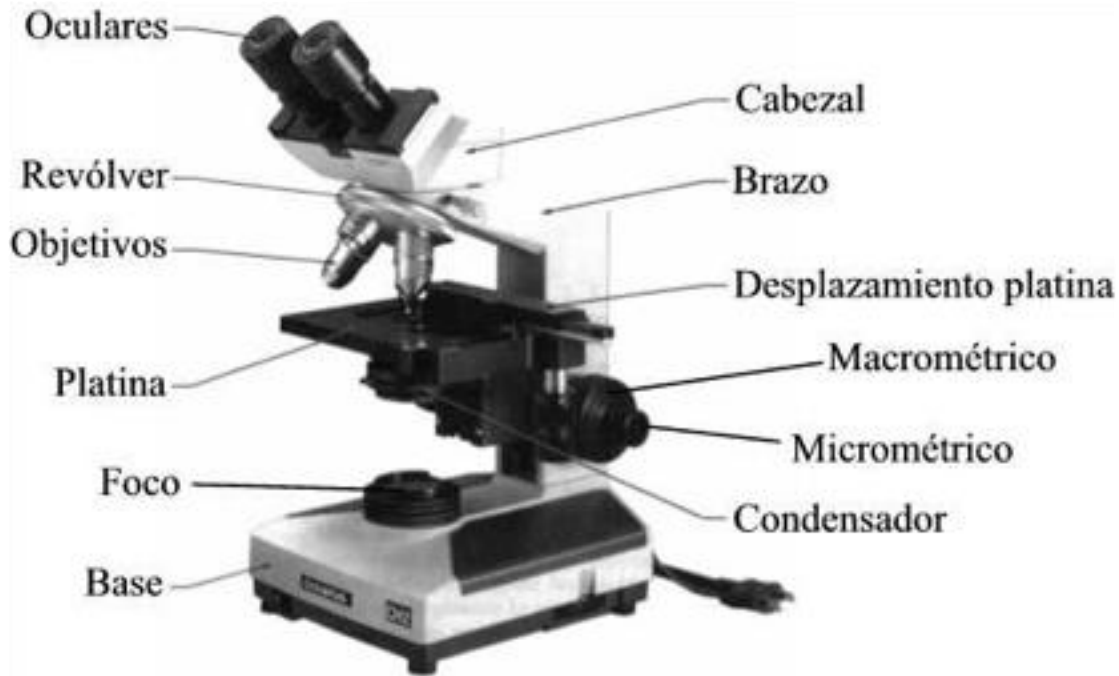
Estuche de disección

Caja Petri

Muestras celulares

Equipos

Microscopios compuestos



METODOLOGIA:

El microscopio es un instrumento delicado. Debido a esto debe recordar las siguientes instrucciones básicas:

- Coloque el microscopio en una posición cómoda sobre la mesa. Tómelo siempre del brazo. Si desea cambiar la posición del instrumento levántelo y NO lo arrastre por la mesa.
- Es conveniente verificar la limpieza de los lentes antes de comenzar a realizar observaciones.
- Encienda la lámpara, baje el condensador y abra el diafragma completamente. Recuerde, la observación se realiza más eficientemente con iluminación Köhler.

Realización de la observación

- Aleje el objetivo de la platina y coloque la lente de aumento menor (4x).
- Seleccione la preparación que desea observar, revísela para asegurarse que esta se encuentra limpia.
- Abra la pinza del carro, coloque la preparación con el cubreobjetos hacia arriba y cierre el carro.
- Ajuste la posición del carro de modo que la región a observar quede justo en el orificio de la platina.
- Usando el macrométrico acerque la lente a la preparación. Cuando logre un foco aproximado utilice el micrométrico (gírelo lentamente) para el ajuste de precisión.

f) Si desea cambiar el aumento, gire el revólver y seleccione el nuevo objetivo a utilizar. Debiera bastar un pequeño ajuste del micrométrico para llegar a foco, si fuera necesario reajuste la iluminación usando el condensador.

Si requiere usar el lente de inmersión (100x en los microscopios de la FC) NUNCA lo use como objetivo seco, puede rayarlo.

Uso del objetivo de inmersión

a) La preparación debe estar enfocada a 40X (objetivo a seco), gire el revólver de modo que el objetivo de inmersión quede en una posición intermedia (40X y 100X).

b) Coloque una gota de aceite de inmersión sobre el cubre objeto.

c) Lleve el objetivo de inmersión al eje óptico.

d) Utilizando el tornillo micrométrico lleve el objeto a foco, si lo requiere modifique la cantidad de luz del condensador.

e) Cuando finalice la observación baje la platina, retire la preparación. Limpie tanto el objetivo como la preparación con un paño humedecido con Xilol.

Al finalizar las observaciones el microscopio y las preparaciones deben quedar limpios. Gire el revólver y deje la lupa como lente de observación. Apague la lámpara y enrolle el cordón en el pie del microscopio.

Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis

Debe seguir una estructura, que puede variar según el observador, pero que debe ser sistemática y ordenada. Se sugiere que considere en sus observaciones el siguiente esquema:

a) Objetivo: referido al porque se realiza la observación (Ej. observación de núcleo)

b) Material: es el órgano o tejido del que se obtuvo la preparación (Ej. riñón de rata)

c) Método: se refiere a la técnica histológica usada para elaborar la preparación (a fresco o permanente) y a la tinción utilizada. (Ej. Preparación a fresco de células)

d) Aumento: la amplificación del objeto observado y depende del ocular y del objetivo.

Aumento = aumento del objetivo x aumento del ocular

e) Observaciones: considere describir la forma celular; relación con otros elementos presentes, tamaño celular; forma, número y posición del núcleo y algunas características del citoplasma

f) Esquematice y coloree lo observado

Tinción Gram

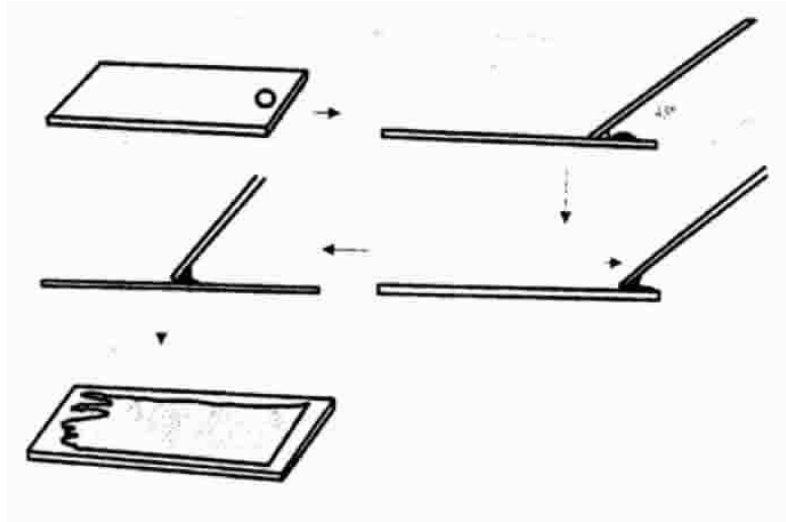
1. Coloque la muestra sobre el porta objetos y distribúyala.
2. Fije la muestra por secado, pasándolo sobre un mechero. El paso del portaobjetos sobre la llama del mechero debe ser rápido, repita hasta que este seca la muestra. La temperatura del porta debe ser la que soporta el dorso de la mano sin quemarla
2. Coloque unas gotas del colorante violeta de genciana, cubriendo la extensión; el tiempo de actuación del colorante es de dos minutos.
3. Lave con agua destilada para arrastrar el colorante.
4. Ponga solución de lugol durante un minuto.
5. Lave nuevamente con agua destilada.
6. Decolore con unas gotas de alcohol de 96°, que debe actuar de 30 segundos a un minuto, para arrastrar el colorante que queda libre.
7. Lave cuidadosamente con agua destilada.
8. Agregue unas gotas de safranina durante un minuto.
9. Lave con agua destilada.
10. Seque al aire.
11. Agregue aceite de inmersión y observe a 100X

Las bacterias Gram positivas aparecen en visión microscópica teñidas de un color morado intenso, por la violeta de genciana.

Las bacterias Gram negativas, aparecen en visión microscópica teñidas de un color sonrosado débil, por la safranina.

a) Se arranca del suelo una planta de leguminosa con sus raíces. En las raicillas finas se verán unos nódulos en forma de pequeñas verrugas. Con las pinzas se desprende un nódulo. Se lava para quitarle la arena. El nódulo se parte con el bisturí sobre un portaobjetos agregando una gota de agua. Se quitan los residuos del nódulo, secando la preparación a la llama del mechero, se coloca el portaobjetos en el soporte de tinciones y se tiñe según la técnica de Gram.

b) Con la aguja de disección se toma una pequeña porción de yogurt. Se disuelve en una gota de agua y se hace una extensión sobre el portaobjetos. Se lava la preparación, dejando caer con un cuentagotas unas gotas de la mezcla alcohol-cloroformo para arrastrar las gotas de grasa del yogurt y se deja secar al aire. Se coloca el portaobjetos en el soporte de tinciones y se tiñe según la técnica de Gram.



c) Disuelva en una gota de agua sobre un portaobjetos, una pequeña porción de sarro dentario tomada con la aguja y con esto se hace una extensión o frotis que se seca a la llama del mechero. Se coloca el portaobjetos en el soporte de tinciones y se tiñe según la técnica de Gram.

Rhizobium leguminosarum: Nódulos de leguminosas: trébol, soya, alfalfa. Gram negativas

Acetobacter aceti: Telita que se forma sobre el vinagre. Gram negativa.

Lactobacillus vulgaris: Yogurt. Gram positiva

Informe de resultados

Los resultados de una tinción de Gram se reportan como sigue:

--- Forma bacteriana

--- Coloración

--- Agrupación bacteriana (escasa, media, abundante)

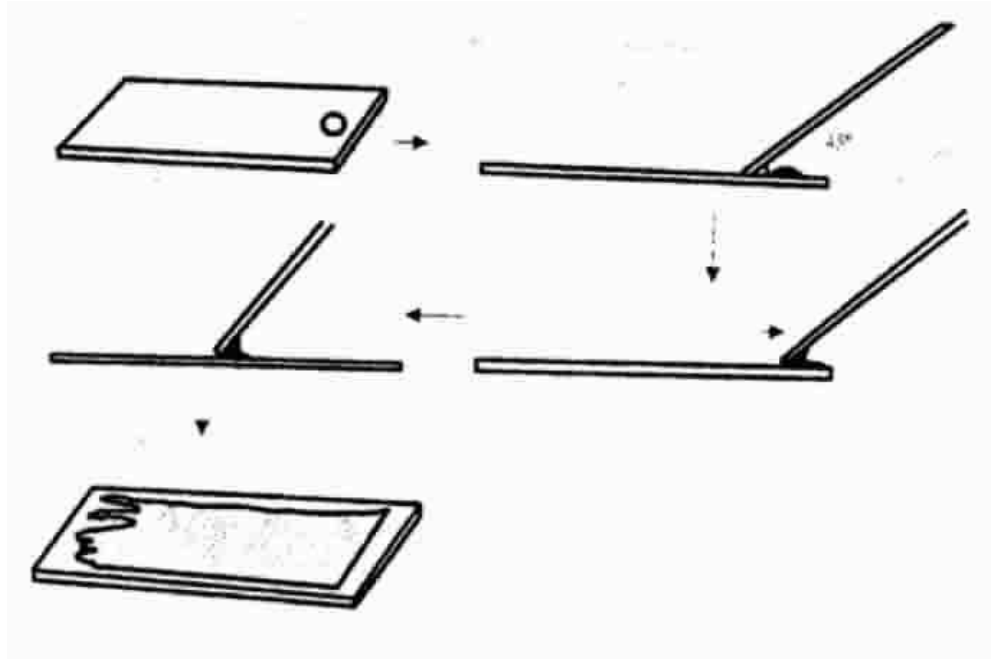
--- En muestras de esputo, excretas, saliva o "pus" se considera la respuesta leucocitaria y su tipo (polimorfonuclear o monocitos) así como el conteo de células epitealiales a 10X.

La flora bacteriana observada por tinción de Gram se informa por género, forma o agrupación, pero nunca por especie, ya que la identificación solo se puede lograr mediante pruebas bioquímicas

Tinción de Hematoxilina- Eosina (HE)

1. Obtención una gota de sangre.

2. Realización del frotis sanguíneo. Se hace colocando una pequeña gota de sangre sobre un extremo del porta, con el lado de otro porta, en un movimiento uniforme, extiende la gota sobre el primer porta.



3. Secar el frotis al aire.
4. Fijar del frotis con alcohol absoluto (echar alcohol sobre la muestra hasta cubrirla totalmente, dejar que el alcohol se evapore totalmente).
5. Tinción con hematoxilina (Echar el colorante sobre la muestra hasta cubrirla totalmente, esperar exactamente 15 minutos, echando más colorante si éste se evaporara).
6. Lavar abundantemente con agua para que el colorante sobrante desaparezca y deje de actuar.
7. Tinción con eosina (echar el colorante sobre la muestra y dejar actuar durante 1 minuto exactamente).
8. Lavar abundantemente con agua para que el colorante sobrante se elimine y no siga actuando.
9. Secar al aire.
10. Observar al microscopio comenzando con pocos aumentos.

ILUMINACION KÖHELER

El Dr. Koehler, desarrolló un nuevo sistema de iluminación, que aún hoy en día se maneja y lleva su nombre, agregando un diafragma de campo luminoso posterior a la emisión de luz emitida por un bombillo de bajo poder, y centrando la mayor intensidad de luz exactamente cubriendo el diámetro de cada lente frontal de cada objetivo en su apertura numérica específica, para de esta manera, poder aprovechar al 100% la luz emitida por la fuente emisora.

Metodología: _

- 1.-Llevar el espécimen a foco utilizando el objetivo 10X.
- 2.-Cerrar completamente el diafragma del condensador.
- 3.-Cerrar completamente el diafragma de campo.
- 4.-Con el control de altura del condensador llevar el condensador hasta arriba.
- 5.-Bajar el condensador poco a poco hasta observar una figura geométrica (octágono) bien definida con el reborde ligeramente azulado.
- 6.-Con los tornillos de centrado del condensador colocar el octágono al centro del campo de observación.
- 7.-Abrir el diafragma de campo hasta que una de las aristas toque el borde del campo de observación y repetir el centrado hasta que todas las aristas toquen el borde del campo de observación al mismo tiempo.
- 8.-Cambie al objetivo 40X.
- 9.-Abrir el diafragma del condensador a la apertura numérica marcada por el objetivo.
- 10.-Observando con un solo ojo (derecho) mover el mando micrométrico hasta obtener el mejor punto de enfoque.
- 11.-Observando con el otro ojo (izquierdo) sin tocar el micrométrico gire la dioptría hasta obtener el mejor punto de enfoque.
- 12.- Cambie al objetivo 10X.
- 13.- Abrir el diafragma del condensador a la apertura numérica marcada por el objetivo.
- 14.- Sí el espécimen continua en foco , los ajustes se hicieron correctamente, de lo contrario repita desde el punto 8 hasta lograr el correcto ajuste.

PRACTICA #3

Titulo: Osmosis y difusión

Duración: 3 horas

INTRODUCCION: a investigar por el estudiante

Información relacionada con el marco de referencia:

¿explique los procesos de transporte pasivo, correspondiente a la osmosis y la difusión.

OBJETIVO: Demostrar los procesos pasivos de transporte de moléculas, de difusión y osmosis.

MATERIAL:

Vasos de precipitado o recipientes

Pipeteador

Pipetas de 10 y 5 mL

Estuche de disección

Cuchillo

Portaobjetos y cubreobjetos

Aproximadamente 100 gr de azúcar

Aproximadamente 100 gr de sal

1 zanahoria

2 huevos frescos

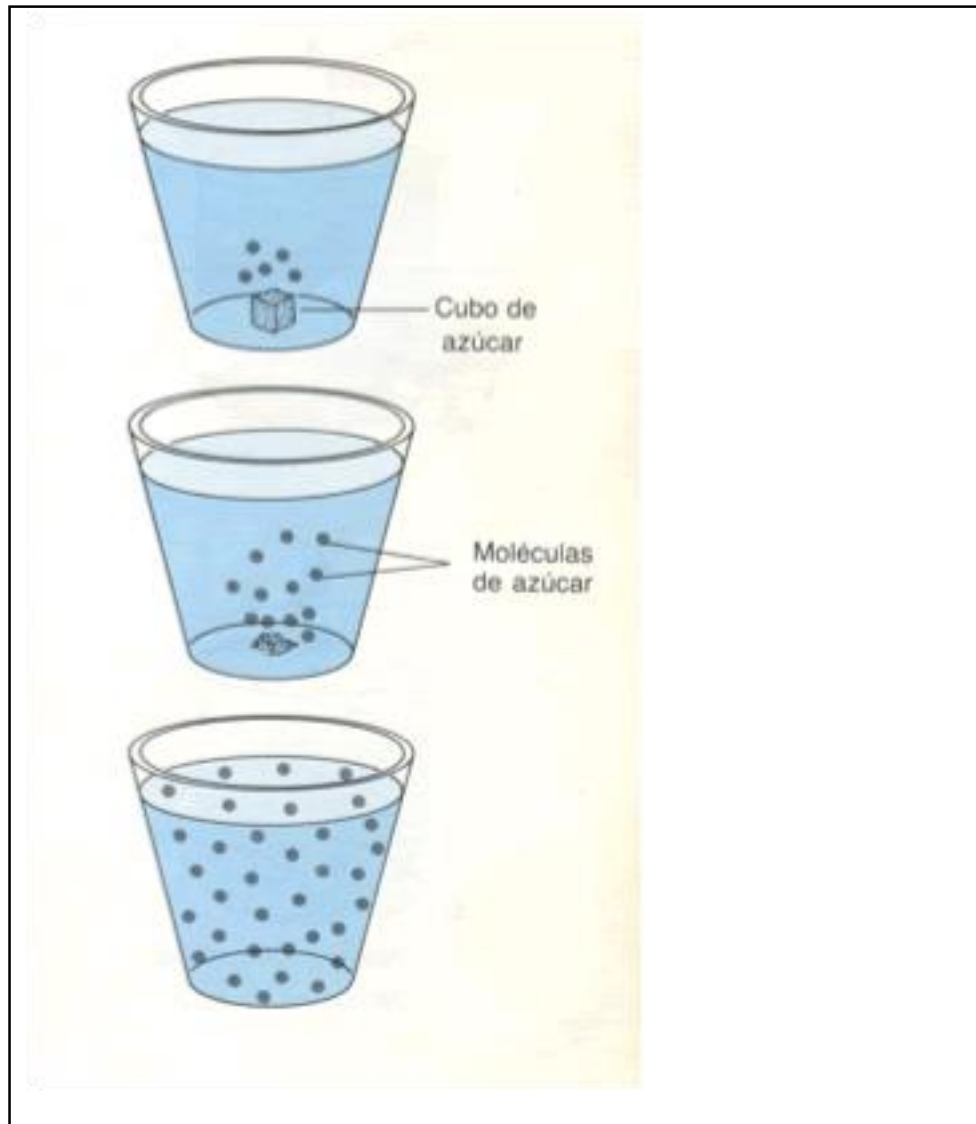
Equipos

1 microscopio compuesto

Metodología:

1. Demostración de la difusión

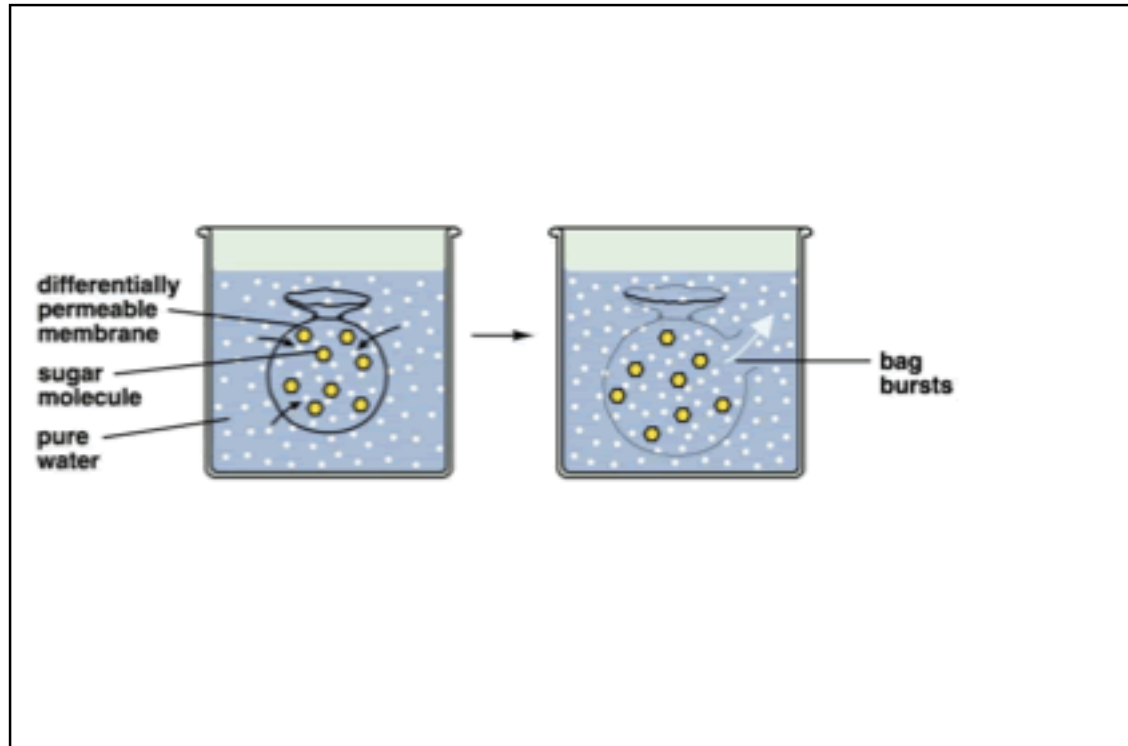
- Coloque agua destilada en un recipiente (mida el volumen)
- Agregue 5 gotas de azul de metileno
- Describa lo que sucede cada 15 minutos



2. Demostración de la osmosis, prueba A, en zanahoria

- Corte un trozo de la zanahoria
- Horade de tal forma que se forme un recipiente.
- Llene la cavidad con azúcar o sal

- d. Coloque el trozo en un recipiente con agua, de tal forma que la parte externa este en contacto con líquido
 - e. Describa lo que sucede después de 2 horas
3. Demostración de la osmosis, prueba B, en zanahoria
 - a. Corte un trozo de zanahoria y horádelo.
 - b. Agregue 1 mL de agua destilada
 - c. Coloque el trozo en un recipiente con solución hipersalina o híper azucarada, de tal forma que la parte externa este en contacto con el líquido
 - d. Describa lo que sucede después de 2 horas
4. Demostración de la osmosis con un huevo.
 - a. Rompa con sumo cuidado la cáscara de un huevo, en el extremo más cónico, dejando una pequeña perforación.
 - b. Por el otro extremo del huevo rompa la cáscara, sin dañar la membrana
 - c. Llene la cavidad con agua destilada
 - d. Coloque el huevo de tal forma que la parte externa este en contacto con líquido hipersalino o híper azucarado
 - e. Describa lo que sucede después de 2 horas
5. Demostración de la osmosis con bolsa de diálisis
 - a. Cierre uno de los extremos de un tubo de diálisis, amarrando fuertemente un hilo.
 - b. Llene el interior con una determinada concentración de sal o azúcar
 - c. Colóquelo de tal forma que la parte externa este en contacto con líquido que contenga una diferente concentración.



6. Demostración de la osmosis en células

- Vegetales a escala macroscópica. Coloque un trozo de tejido vegetal en diferentes concentración de sal o azúcar y anote las características del tejido cada 30 minutos
- Células vegetales a escala microscópica. Coloque tres finos tejidos (como el de la cebolla) en portaobjetos. Agregue a cada gota de un líquido con una diferente concentración de sal o azúcar y observe al microscopio. Esquematice sus observaciones.



c. Células animales a escala microscópica. Coloque tres gotas de sangre en portaobjetos. Agregue a cada gota de un líquido con una diferente concentración de sal o azúcar y observe al microscopio. Esquematice sus observaciones.



Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis

En cada inciso se realizan recomendaciones para plasmar resultados. Analice los resultados con respecto a lo esperado de acuerdo a la bibliografía.

PRACTICA #4

Título: Separación de organelos (Centrifugación)

Duración: 3 horas

INTRODUCCION: a investigar por el estudiante

OBJETIVO: Aplicar técnicas de centrifugación diferencial y de gradiente, para la separación de organelos y estructuras celulares.

MATERIAL:

Tubos eppendorf

homogeneizador

Amortiguador TEK (Tris-HCl 50 mM pH 7.5; EDTA 10 mM y KCl al 1.5%)

Sacarosa

Tubos de centrífuga

Equipos

Centrífuga eppendorf

Centrífuga refrigerada

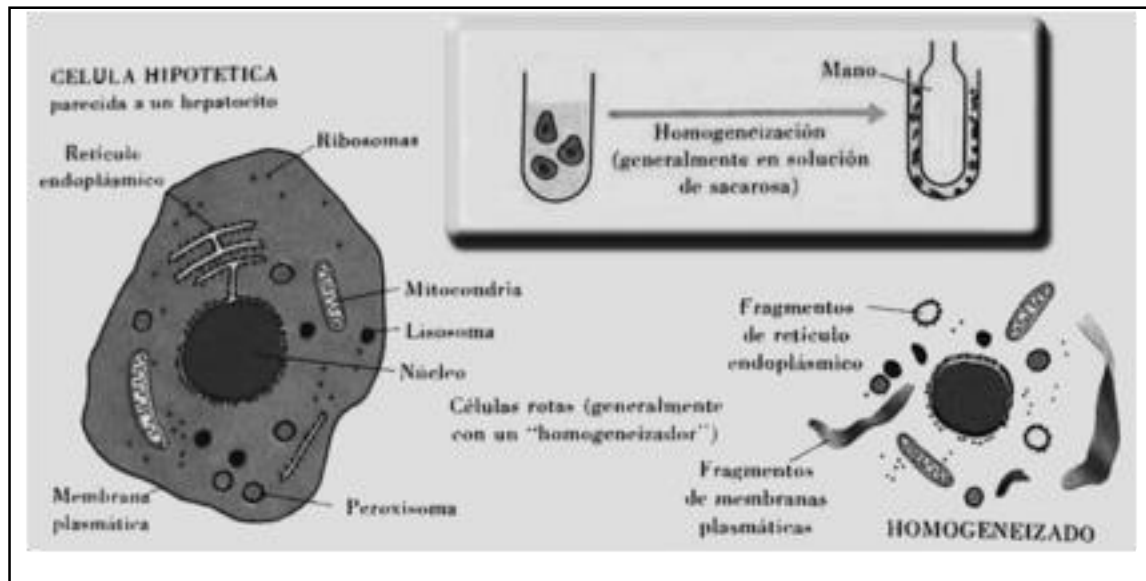
Mini fuga

METODOLOGIA:

Extracción de mitocondrias, a partir de tejidos ricos en mitocondrias, utilizando al menos de 3 a 5 gr. de tejido rico en mitocondrias (hígado, cerebro o gónadas maduras).

1. Con un homogeneizador de aspas o vidrio, se homogeneiza el tejido (3 a 5 gr., rico en mitocondrias) en dos volúmenes de TEK (Tris-HCl 50 mM pH 7.5; EDTA 10 mM y KCl al 1.5%). Durante el homogeneizado mantenga la muestra en hielo y evite la formación de espuma (característica de un exceso de molido).
2. Centrifugue a 500 xg, por 10 min. a 4 C.
3. Subyaciendo a la muestra agregue lentamente un volumen de TEK-15% sacarosa.

4. Centrifugue (1,500 xg por 10 min. a 4°C) y obtenga el precipitado (oscuro- núcleos) y el sobrenadante (claro- mitocondrias).
5. Repita el paso 2 y 3.
6. Para concentrar el precipitado o el sobrenadante, por separado (no los revuelva), centrifugue a 14,000 xg durante 1:30 hora a 4 °C y elimine el sobrenadante.
7. Resuspenda el precipitado con 10 ml de TEK y repita la centrifugación a 14,000 xg por 30 minutos.
8. En caso de que el sobrenadante este turbio o con pigmentos, repita el paso 6.
9. Resuspenda el precipitado con TEK (mitocondrias en 0.9 ml por cada 5 gr. de tejido inicial) y conserve en ultracongelador, correctamente etiquetado, posteriormente para observar los organelos en microscopio, tiña con verde de malaquita, y para extraer ADN, utilice cualquiera de los protocolos.



Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis

Describe en cada protocolo lo que sucede en cada paso.

Analice cada uno de los pasos, con base en la información teórica de la practica, es decir interprete lo que se hace en cada paso.

Con base en el análisis, describa puntualmente lo que aprendió.

PRACTICA #5

Título: Uso de micropipeteador automático

Duración: 3 horas

INTRODUCCION: a i Información relacionada con el marco de referencia:

¿Cómo se pipetea una sustancia?

¿qué son los pipeteadores automáticos y cual es el principio de su funcionamiento?

OBJETIVO: Identificar las habilidades requeridas para el manejo del micropipeteador automático

MATERIAL:

Material requerido:

Puntas de pipeteador automático

Pipeteas pasteur

Pipetas de diferentes medidas

Equipos

Minifuga

Pipeteadores automáticos

Pistones para pipetas

METODOLOGIA:

Ejercicio a:

--- Deposite los siguientes volúmenes (en microlitros):

Tubo	Solución I (agua)	Sol. II (aceite)	Sol. III (alcohol)
1	40	15	-----
2	40	-----	40
3	40	10	10

--- Centrifugue

--- Extraiga las fases y anote los volúmenes recuperados.

Ejercicio b:

--- Deposite en un trozo de papel aluminio los siguientes volúmenes:

Muestra	Solución I (agua)	Sol. II (aceite)	Sol. IV (colorante)
1	4	-----	2
2	4	4	2

--- Homogeneice y solo coloque el agua con el colorante en el pozo del gel, en la muestra 2, tenga cuidado de no agregar aceite

Ejercicio c:

--- Deposite los siguientes volúmenes en un tubo (en microlitros):

Tubo	Solución I (agua)	Sol. II (aceite)	Sol. III (alcohol)
1	0.5	0.5	-----
2	0.5	-----	0.5
3	0.3	0.3	0.4

--- Centrifugue y extraiga el volumen completo, que en los tres ejercicios debe ser de 1 microlitro

Ejercicio d:

Para cada pipeteador:

- 1.- En una balanza coloque un recipiente (acorde a los volúmenes que posteriormente se manejarán)
- 2.- Acorde al pipeteador, tome el menor volumen posible de agua destilada y coloque en el recipiente que tiene en la balanza, anote el resultado.
- 3.- En eventos independientes, tome al menos 4 volúmenes diferentes de agua destilada y colóquelo en el recipiente que tiene en la balanza, anote el resultado.
- 4.- Grafique el resultado para cada pipeteador, anotando el número de inventario del equipo.

Con pipetas de gran volumen (mayor del mL)

Para las siguientes sesiones prácticas también se requiere un dominio de las técnicas de pipeteo de grandes volúmenes, por lo que se plantean solo recomendaciones específicas:

Nunca se aspire con la boca.

No moje los pistones con los reactivos.

Ejercicio e- Pipeta Pasteur:

--- Deposite los siguientes volúmenes aproximados:

Tubo	sol. I	Sol. II
1	5 ml	5 ml
2	0.5 ml	5 ml

--- Centrifugue y Recoja las fases

Ejercicio d- Pipeta:

--- Deposite los siguientes volúmenes.

Tubo	sol. I	Sol. II
1	5 ml	8 ml
2	0.5 ml	2 ml

--- Centrifugue y Recoja las fases

Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis

Analice cada uno de los pasos, con base en la información teórica de la practica, es decir interprete lo que se hace en cada paso.

Con base en el análisis, describa puntualmente lo que aprendió.

PRACTICA #6

Titulo: Fermentación

Duración: 3 horas

INTRODUCCION: a investigar por el estudiante

OBJETIVO:

Demostrar los efectos de los procesos de fermentación y fotosíntesis.

Describir la estructura de una célula de levadura indicando la localización de las reacciones metabólicas involucradas en la glicólisis y fermentación.

MATERIAL:

Tubos de centrifuga 8

Gradilla

Pipetas

Equipos

Horno a 37 C

METODOLOGIA:

1.- Fermentación de levadura

Experimento

1. Marque en una curva del tubo en forma de "S", una escala, utilizando un marcador y una regla.

2. En una gradilla, una pipeta con agua destilada, tres tubos de ensayo, tres pipetas graduadas de 2 ml, tres pipetas Pasteur con bulbo y trozos de parafilm. Marque los tubos 1, 2, 3 y llénelos del siguiente modo:

Tubo 1 = 1 ml de sacarosa (2% p/v)+ 1 ml de suspensión de levadura.

Tubo 2 = 1 ml de galactosa (2% p/v)+ 1 ml de suspensión de levadura.

Tubo 3 = 1 ml de agua + 1 ml de suspensión de levadura.

2. Mezcle las soluciones. En cada tubo coloque el tapón horadado al cual previamente le coloco el tubo en forma de "S", en la curva lejana del tubo coloque unas gotas de colorante. El tapón debe quedar bien sellado con parafilm.

El gas producido se acumulará en el extremo cerrado del tubo "s". Registre el nivel del gas cada minuto por alrededor de 20 min. Anote los datos una la tabla.

Examinando Células de Levadura

1.- Usando una pipeta Pasteur, transferir varias gotas del cultivo de levaduras a un portaobjetos. Agregar una gota de rojo neutro y colocar el cubreobjetos. Usar aumento (40 X) para observar la levadura.

2.- Bajo condiciones óptimas, las levaduras se multiplican por gemación, que involucra un proceso en el citoplasma con un subsiguiente desprendimiento de una nueva célula. Busque en su preparado, células con yemas.

3.- ¿Las levaduras son procariontas o eucariotas?

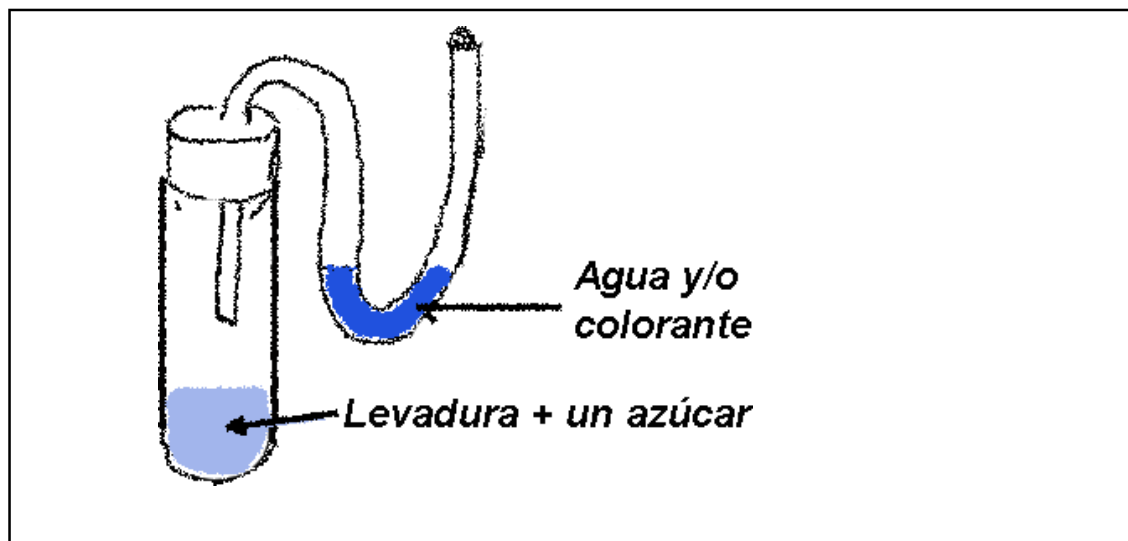
4.- ¿En qué partes de la célula de levadura ocurre la glucólisis?

¿El tipo de carbohidrato fermentado afecta la tasa formación de gas?

¿Que tipo de carbohidrato sustentó la tasa más rápida de fermentación?

¿Qué molécula es desdoblada en la reacción que produce el CO₂?

¿Por qué es ventajoso para un organismo realizar fermentación?



Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis

Describa en cada protocolo lo que sucede en cada paso.

Analice cada uno de los pasos, con base en la información teórica de la práctica, es decir interprete lo que se hace en cada paso.

Con base en el análisis, describa puntualmente lo que aprendió.

PRACTICA #7

Título: Observación de células en mitosis

Duración: 3 horas

INTRODUCCION: a investigar por el estudiante

Información relacionada con el marco de referencia:

Revise los estadios de la mitosis, esquematícelos y resuma las características de cada estadio.

OBJETIVO: Utilizando como herramienta el microscopio, reconocer morfológicamente células que se encuentren en los diferentes estadios de división celular.

MATERIAL:

Estuche de disección

Cubreobjetos

Portaobjetos

Vaso de precipitado de 50 ml

Navaja

Microscopio compuesto

Termoplato

METODOLOGIA:

Una semana antes de la sesión, escoja una cebolla fresca de 5 a 7 cm de diámetro. Quite las raíces y fibras secas de la base del bulbo.

1. Inserte 3 palillos de forma que la cebolla se pueda suspender en un vaso o recipiente con agua, de tal forma que las raíces toquen continuamente el agua.
2. Procedimiento de tinción:

- a. Elija de la cebolla una o varias raíces completa. La región de mayor interés es la apical (zona de crecimiento).
- b. Con la hoja de afeitar de un solo filo corte la mitad inferior de la punta de una raíz. Póngala en un vaso pequeño y cúbrala con colorante de acetocarmin. Caliente paulatinamente el vaso con el colorante de 3 a 5 minutos, evitando que el líquido hierva.
- c. Corte la parte más intensamente teñida de la punta de la raíz y colóquela en un portaobjetos, agregándole una gota de acetocarmin. Corte la raíz en pequeños trozos y cúbrala con un portaobjetos. Coloque papel absorbente sobre la preparación y con el borrador de un lápiz presione firmemente, para convertir el material en una capa delgada, evitando resbale el cubreobjetos. Limpie el exceso de colorante con papel.
- d. Localice en la preparación a las células que presenten estructuras filamentosas teñidas más intensamente.
- e. Localice y esquematice una célula que se encuentre en: a) Interfase. b) Profase. c) Metafase. d) Anafase. e) Telofase. Preste especial atención en la forma y disposición de los cromosomas. Considerando que la mayoría de la células que se observen estarán en interfase, se recomienda ser persistente en la búsqueda de los diferentes estadios de la mitosis.

Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis

Analice cada uno de los pasos, con base en la información teórica de la practica, es decir interprete lo que se hace en cada paso. Esquematice lo observado en el microscopio. Con base en el análisis, describa puntualmente lo que aprendió.

PRACTICA #8

Titulo: Meiosis

Duración: 3 horas

INTRODUCCION: a investigar por el estudiante

OBJETIVO: Identificar células en diferentes estadios meióticos

MATERIAL:

Muestras de esperma

tubos cónicos de centrifuga de 15 mL

pipetas Pasteur con bulbo.

pipetas graduadas de 5 mL

caja de Petri

Porta y cubre objetos

Estuche de disección

Solución Wright

Fijador "buffer"

Aceite de inmersión

----- NOTA: liga para ver como se ven los espermatozoides de las ratas -----

Preparaciones permanentes de diferentes tejidos gaméticos

Microscopio

METODOLOGIA:

NOTA IMPORTANTE PARA LA PRACTICA SE TENDRAN DISPONIBLES LAMINILLAS DE GONADAS DE DIFERENTES TIPOS DE ORGANISMOS NO SERA NECESARIO SACRIFICAR A UN ORGANISMO

POR OTRO LADO, SERA MUY INTERESANTA CONTAR CON DONADORES DE ESPERMA PARA OBSERVAR LOS ESPERMAS EN VIVO

Tinción Wright

Preparación de laminillas

1. Con una pipeta Pasteur tomar una muestra de esperma y colocar una gota en un extremo de un portaobjetos.
2. Con el extremo de un segundo portaobjetos distribuir la muestra de manera homogénea a manera de frotis, repartiendo lo mejor posible la muestra.
3. Agregar 3 gotas de solución Wright y cubriendo el portaobjetos en el interior de una caja Petri.
4. Esperar 5 minutos
5. Agregar 3 gotas del fijador "búfer".
6. Esperar 7 minutos.
7. Lavar con agua destilada.
8. Secar al aire.
9. Observar al microscopio

Observación de laminillas

1. En cada una de las laminillas procure reconocer los diferentes tipos de gametos. Utilice el microscopio a 100x.

Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis

Esquematice sus observaciones e interprete lo observado .

PRACTICA #9

Titulo: Extracción de ADN

Duración: 3 horas

INTRODUCCION:

Generalidades

El primer paso de los métodos moleculares, aplicados a los estudios poblacionales es la extracción del ADN. En la extracción de ácidos nucleicos, existen cinco etapas principales: 1) conservación de tejidos, 2) homogenización de tejidos, 3) degradación y eliminación de compuestos orgánicos diferentes al ADN o ARN, 4) precipitación de los ácidos nucleicos y 5) resuspensión y conservación.

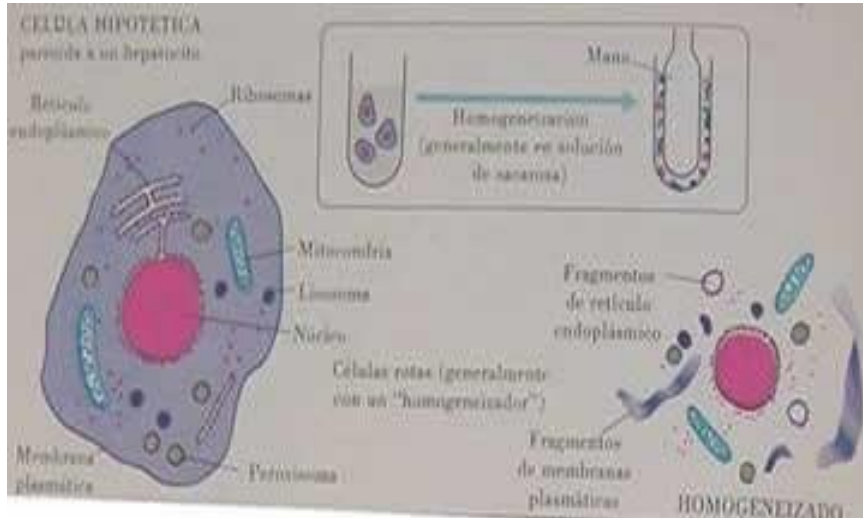
Conservación

Para la conservación de tejidos existen diversas alternativas, las cuales son utilizadas de acuerdo a las condiciones específicas de trabajo. La técnica de mayor eficacia es la de crio-conservación en nitrógeno líquido, pero lamentablemente es la que presenta una mayor dificultad en su aplicación, ya que son requeridos recipientes especiales y facilidades para la adquisición del nitrógeno líquido.

Una alternativa fácil de aplicar en cualquier lugar de México, es la combinación entre el uso de "Hielo seco" (dióxido de carbono comprimido), para el transporte de muestras hasta el laboratorio y la conservación en ultracongelador a temperaturas menores de -70 °C. Con el hielo seco también se pueden congelar rápidamente las muestras, ya que al ponerlo en contacto con alcohol o éter, disminuye notablemente la temperatura y para protección de las muestras solo se requieren utilizar bolsas de plástico. En trabajo de campo, se recomienda poner en una bolsa de plástico a la muestra, la cual se introduce en otra bolsa, a la que se le agrega el hielo seco y el alcohol, resultando una reacción inmediata que literalmente congela a la muestra.

Otras alternativas, incluyen el uso de etanol, con el que se deshidrata rápidamente la muestra, o soluciones hipersalinas con DMSO al 20% y en casos especiales la deshidratación con el sol así como con otros agentes castrantes de la humedad.

Homogenización



Para facilitar la degradación de los tejidos, sin dañar los ácidos nucleicos, podemos combinar el uso de métodos físicos con los químicos. El más eficiente de los métodos físicos, involucra la congelación de la muestra y su posterior macerado en un mortero precongelado. La congelación más recomendable se logra con nitrógeno líquido y como método alternativo, con el uso de "hielo seco" y etanol. Debido a las dificultades operativas de estas técnicas, es posible utilizar homogenizadores de vidrio (Potter Elvehjen) y lo más común, es el macerado con una navaja sobre una superficie sólida, como podría ser un portaobjetos. Posteriormente se aplican métodos de homogenizado químico, con detergentes (para desnaturalizar los lípidos) y enzimas que facilitan la degradación de las proteínas (como proteinasa K). Con soluciones amortiguadoras se mantienen las condiciones salinas (con KCl 1 mM) y de pH neutro en la muestra (Tris-HCl, 0.25mM, pH 7.8 a 8.0). Adicionalmente se agrega EDTA (0.02 a 1.0 mM), como agente castrante de los iones magnesio y calcio, requeridos para la acción de las exonucleasas que degradan los ácidos nucleicos. Para garantizar una adecuada reacción, los tejidos macerados, se colocan en tubos de 1.5 ml, con el amortiguador (TES, TEK o TEN), el detergente (comúnmente SDS al 0.2 % u otros detergentes no iónicos como el IGEPAL) y proteinasa K, posteriormente se tapan herméticamente y se mantienen en agitación constante, con temperaturas desde la ambiental (TA) hasta los 65 °C. Cabe aclarar que el tiempo de digestión química, varía dependiendo de la naturaleza del tejido y la técnica de conservación, ocupándose desde una hasta veinticuatro horas. Los tiempos y cantidades de reactivos se deben estandarizar, buscando evitar la sobre digestión por efecto de las exonucleasas. Otros agentes utilizados en el homogenizado químico son la albumina (al 0.5% para remover ácidos y fosfolípidos), sorbitol o manitol (balance iónico), carbonato de sodio (controlar la concentración de sales), sacarosa (mantener la densidad del medio).

Degradación y eliminación de compuestos orgánicos



Para la degradación de los compuestos orgánicos, generalmente se utiliza fenol estabilizado, cloroformo estabilizado con alcohol isoámilico o cloroformo. Dependiendo de la técnica de conservación así como de las condiciones y tipo de tejido, se elige la técnica mas adecuada. Para la eliminación de los compuestos, en cada paso se utilizan técnicas de centrifugación, con velocidades superiores a 10,000 xg con tiempos superiores a los 5 minutos.

Precipitación de los ácidos nucleicos

Después de la eliminación de los compuestos orgánicos, en solución quedan los ácidos nucleicos, debido a su alto gradiente de sedimentación en agua (o en el amortiguador). Para precipitarlos, a la solución se le incrementa notablemente la salinidad (con acetato o cloruro de sodio) y se le agrega alcohol y posteriormente es centrifugado en velocidades superiores a 10,000 xg por más de 10 minutos.

Cabe aclarar, que comúnmente son utilizados dos tipos de alcohol, el etanol y el isopropanol. Con etanol, se necesita facilitar la precipitación utilizando temperaturas bajas por largos periodos (la noche a -20°C o una hora a -70°C). En algunos casos, pueden requerirse sucesivos lavados con alcohol, para eliminar las sales.

Una vez formado el precipitado (el cual puede no observarse a simple vista), se elimina el alcohol, por centrifugación, decantación y evaporación. El precipitado de los ácidos nucleicos, en caso de que se observe, pasara de un color blanquecino, cuando esta húmedo, a uno semi transparente, cuando está totalmente seco. Es importante eliminar totalmente el alcohol y las sales, ya que pueden interferir con las reacciones posteriores.

Resuspensión y conservación

Para la resuspensión, es prudente considerar el uso que se le dará al ADN. En el caso de requerir la muestra por unos cuantos días, para PCR (reacción de polimerasas en cadena, por sus siglas en ingles), el precipitado obtenido previamente puede resuspenderse en agua que preferentemente haya sido destilada, desionizada, nanopurificada y esterilizada ($\text{H}_2\text{O} \bullet \text{ddue}$).

Para un aplicación general se conserva en TE y en algunos casos es recomendable agregarle enzimas que degraden el ARN, como la ARNasa. La posterior conservación se realiza a bajas temperaturas, como la de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ cuando se utilizara en las siguientes semanas, o a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para mantenerla por meses o incluso años.

Los protocolos específicos para la extracción del ADN dependerán de las muestras y costos de extracción permisibles (en tiempo y esfuerzo), que van desde unos cuantos pesos hasta decenas de pesos. En el primer caso, con costos muy bajos, encontramos las técnicas de extracción fenólica o de cloroformo que requieren al menos unas 4 horas de dedicación.

En el mercado existen juegos comerciales, con un costo de alrededor de 3 a 6 veces el equivalente al de una extracción convencional, pero que requieren generalmente una hora de trabajo en laboratorio y generalmente con una mayor garantía de reproducibilidad.

OBJETIVO:

Aplicar técnicas para la extracción de ADN, buscando promover el uso de equipos para el manejo de reactivos a micro escala, así como la aplicación de técnicas físicas y químicas para la separación de biomoléculas.

MATERIAL:

Puntas

Tubos

Diversos reactivos

Pipeteadores

Centrífugas

METODOLOGIA:

1. Homogeneizar el tejido (40 a 200 mg) con 613 μL de solución de lisis (10mM Tris; 400 mM NaCl; 2 mM $\text{Na}_2\text{*EDTA}$) 30 μL SDS (al 20% en TEN -solución de lisis-) y 7 μl de proteinasa K (20 μg /ml). La mezcla se homogeneiza y se mantiene en agitación constante de 5 a 24 horas. Nota: es importante verificar la

adecuada agitación durante la primer hora, regla empírica, recuerde que con bajo tiempo de digestión hay poca separación de ADN, contrastantemente un tiempo prolongado puede incrementar el tiempo de exposición a las Dnasas, del mismo tejido, y en consecuencia también hay poca obtención de ADN. Un tiempo generalmente adecuado es de 12 a 14 horas (overnight).

2. Al tubo se le agregan 375 μ l de NaCl 6M (previamente filtrado). Para lograr una adecuada homogeneización puede utilizar el Vortex durante 10 segundos, y se centrifuga en TA (temperatura ambiente) por 15 min. a 14,000 xg.
3. Pasar a un tubo limpio los 780 μ l de la fase superior, se le agregan 750 μ l de Cloroformo, y después de homogeneizar completamente (con vortex 10 segundos), se centrifuga a 10,000 rpm por 10 min.
4. Posteriormente se toman aproximadamente 750 μ l del sobrenadante, evitando tomar o tocar la interfase que contiene proteínas. Considere que es preferible tomar menos líquido, pero no contaminado.
5. Al sobrenadante se le agregan 750 μ l de Isopropanol, se homogeneiza. Es recomendable dejar reposar el tubo en posición vertical, durante unos 30 min a TA o en refrigerador, para facilitar la precipitación del ADN.
6. Las muestras son centrifugadas a 10,000 rpm por 15 min, TA.
7. El sobrenadante es retirado cuidadosamente, procurando no perturbar el fondo del tubo, en donde esta depositado el ADN.
8. Para secar el precipitado (pellet), se deja el tubo abierto a 37 C, durante media hora o se coloca en un sistema de vacío.
9. Finalmente el pellet seco, se resuspende con 100 μ l de TE. Para conservar la muestra se guarda en congelación a -20 C (durante meses) o a -80° C (durante años).

Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis

Anote las modificaciones del protocolo

¿qué sucede en cada paso del protocolo de extracción de ADN?

racionalice la causa de utilizar cada reactivo, interprete y contraste contra lo que usted observe en la sesión.

PRACTICA #10

Titulo: Extracción de ADN método de fenol

Duración: 3 horas

INTRODUCCION: a investigar por el estudiante

Cuales son los principios básicos para la extracción de ADN

Que otros protocolos son comunes para la extracción de ADN

OBJETIVO:

Aplicar técnicas para la extracción de ADN, buscando promover el uso de equipos para el manejo de reactivos a microescala, así como la aplicación de técnicas físicas y químicas para la separación de biomoléculas.

MATERIAL:

Puntas

Tubos

Diversos reactivos

Pipeteadores

Centrífugas

METODOLOGIA:

1. Se cortan muy finamente 40 a 200 mg de tejido, evitando las escamas y huesos.
2. La muestra se homogeneiza utilizando uno de los métodos mecánicos.
3. En un tubo con tapa se agregan 400 μ l del amortiguador STE (Tris-HCL M pH; EDTA M y NaCl M), 40 ml de SDS al 20% y 40 ml de proteinasa K. --- Se deja en agitación suave por 1 hora (Proteinasa K de la compañía sigma), a temperatura ambiente.

4. Agregar 400 μ l de fenol estabilizado, agitándose hasta la formación de la emulsión.
5. Centrifugar a 12,000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente (TA).
6. Se recoge la fase acuosa.
7. Agregar 400ml de Cloroformo- Alcohol isoámilico (24: 1; v:v), agitándose suavemente.
8. Centrifugar a 12,000 x g por 10 minutos.
9. Se recoge el sobrenadante.
10. Agregar 1/8 del volumen de acetato de sodio 3 o 4M.
11. Agregar 2 volúmenes de Isopropanol (1 ml) y dejar en reposo 15 min a TA.
12. Centrifugar a 12,000 x g por 10 minutos.
13. Se tira el líquido suavemente, sin perturbar el precipitado.
14. Agregar 400ml de Isopropanol 70%, sin agitar.
15. Centrifugar a 12,000 x g por 10 minutos.
16. Se elimina el líquido suavemente, sin perturbar el precipitado.
17. Secar el precipitado a 37°C, de 30 minutos a 1 hora, o 8 horas a temperatura ambiente.
18. Agregar 200ml de TE.
19. Conservar a -20°C, hasta su posterior uso.

Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis

Anote lo que sucede en cada paso y las modificaciones del protocolo

¿qué sucede en cada paso del protocolo de extracción de ADN?

racionalice la causa de utilizar cada reactivo, interprete y contraste contra lo que usted observe en la sesión

PRACTICA #11

Titulo: Electroforesis

Duración: 6 horas

INTRODUCCION:

Generalidades de la electroforesis

La electroforesis es el movimiento de partículas eléctricamente cargadas a través de un gas o líquido como resultado de un campo eléctrico formado entre unos electrodos sumergidos en el medio. En nuestro caso, la técnica se aplica para la separación por tamaño de los fragmentos en los ácidos nucleicos. Por efecto de la corriente eléctrica directa, las moléculas se mueven a través de una matriz inerte (de polímeros de agarosa o acrilamida), que se encuentra en un amortiguador, todo estos durante un tiempo determinado.



Considerando las características de las muestras, son diversas las variables que intervienen en la electroforesis y que es necesario controlar. Las principales a considerar son: características de la muestra, corriente eléctrica (Volts, Watts y Amperes), amortiguador, matriz (tipo y concentración) y otros reactivos.- al final de la página, se presenta una mayor explicación.

Descripción de la electroforesis

La electroforesis es el movimiento de partículas eléctricamente cargadas a través de un gas o líquido como resultado de un campo eléctrico formado entre unos electrodos sumergidos en el medio. En nuestro caso, la técnica se aplica para la separación por tamaño de los fragmentos en los ácidos nucleicos. Por efecto de la corriente eléctrica directa, las moléculas se mueven a través de una matriz inerte (de polímeros de agarosa o acrilamida), que se encuentra en un amortiguador, todo estos durante un tiempo determinado.



Considerando las características de las muestras, son diversas las variables que intervienen en la electroforesis y que es necesario controlar. Las principales a considerar son: características de la muestra, corriente eléctrica (Volts, Watts y Amperes), amortiguador, matriz (tipo y concentración) y otros reactivos.

Características de la muestra

Previo a la realización de una electroforesis, se debe tener una idea de el tamaño de los fragmentos, para tomar adecuadas decisiones en las variables a controlar. La información requerida es mínima y puede ser subjetiva, separando los tamaños de las moléculas en tres categorías simples:

Tamaños grandes, fragmentos mayores de 2,000 pares de bases (pb)

Tamaños medianos, de entre 500 y 5,000 pb

Tamaños pequeños, menores de 1,000 pb

Corriente eléctrica

Las tres variables a considerar son Volts, Watts y Amperes. Estas se relacionan directamente, la molécula será arrastrada por la fuerza del voltaje. El wattaje, esta relacionado con la resistencia del medio y la intensidad de corriente, el efecto de valores altos producirá calor.

Los ácidos nucleicos son atraídos hacia el polo positivo o ánodo (generalmente señalado con el color rojo), debido a configuración que deja expuestos a los grupos fosfato, particularmente a los átomos de oxígeno. Por tal motivo en la matriz electroforética la muestra se coloca proximal al polo negativo o cátodo (con el color negro).

En las técnicas con ácidos nucleicos generalmente solo nos ocupamos de regular el voltaje y evitamos los efectos del calor, utilizando voltajes alrededor de 5 V/cm. Como regla empírica, utilizamos mayores voltajes cuando deseamos separar moléculas grandes y menores voltajes para moléculas de tamaño pequeño.

En resumen, los voltajes utilizados de acuerdo al tamaño de fragmento esperado, son los siguientes:

Voltaje	Fragmento
5 V / cm	1 – 30 Kb
4.5	0.5 – 10
3 – 4	< 2

Nota: es posible utilizar voltajes mayores hasta de 10 V/cm, dependiendo de las necesidades experimentales.

Cuando se utiliza una gran resistencia en el medio (por ejemplo, por alta concentración en la matriz, altos voltajes, cambio en el amortiguador), para contrarrestar el calentamiento podemos introducir la charola de electroforesis en el refrigerador o utilizamos un sistema de enfriamiento para el amortiguador, y lo bombeamos a través de la charola.

Amortiguador

Los amortiguadores deben reunir varias características, entre las que se incluyen: a) adecuada conductividad, b) estables a diferentes temperaturas, c) pH neutro que facilite el arrastre de las moléculas sin desnaturalizarlas y d) capacidad de castrar iones magnesio y calcio, los cuales pueden ser cofactores para la acción de las exonucleasas.

En forma convencional se utilizan los amortiguadores denominados TBE (Tris-borato-edta) y TAE (tris-acetato-edta). El primero favorece la electroforesis de moléculas chicas a medianas, en cambio el segundo para moléculas grandes a medianas. El amortiguador, en las electroforesis de agarosa, cubre totalmente a la matriz inerte, pero es deseable que no exceda la superficie en más de 4 mm, ya que se pueden producir algunas aberraciones

Al igual que los reactivos de uso cotidiano, los amortiguadores se preparan más concentrados que la solución de uso, brindando una mayor durabilidad a TA. En el caso del TBE, se prepara en una concentración 5X y se usa a 0.5X, en el caso del TAE de 50X y se usa a 1 X. El EDTA disódico utilizado, puede requerir mucho tiempo en su preparación, por lo que típicamente se prepara una solución 10X, garantizando que las soluciones queden cristalinas. Sin este cuidado, cuando se mezclan los componentes del amortiguador concentrado se obtiene una solución lechosa, con una rápida precipitación de sus componentes.

Matriz

La matriz para la electroforesis se elabora con un polímero con las siguientes características: 1) no debe modificar a las moléculas de las muestras, 2) permita un eficiente paso de la corriente, 3) se pueda regular el tamaño del poro para favorecer el paso de las moléculas de acuerdo a su tamaño y 4) debe ser de fácil preparación y manipulación.

Los polímeros utilizados más comúnmente son la agarosa y la acrilamida. La primera, es de uso rutinario en una concentración de 0.8% y funciona más eficientemente con moléculas de medianas a grandes, pero si se incrementa la concentración o si se agregan aditivos, permite la visualización de moléculas pequeñas, inclusive a nivel de unidades o decenas de bases.

La matriz de acrilamida, utilizada en electroforesis verticales, permite una más eficiente regulación del tamaño de los poros que se forman entre los polímeros y se puede obtener una mayor resolución, por lo que es posible diferenciar tamaños de moléculas que difieren de solo una base. El proceso de preparación de la acrilamida es más laborioso y requiere cuidados especiales en su preparación. Es comúnmente preferido el uso de agarosa y se reserva el uso de la acrilamida para verificar el tamaño de bandas en muestras problemáticas o para tomar las fotografías para las publicaciones.

En forma empírica se ha establecido el uso de concentraciones altas (de 1 al 4%) para estudiar moléculas chicas, contrastantemente, las concentraciones menores del 0.8% y hasta el 0.4%, se utilizan para moléculas grandes. En concentraciones altas, para contrarrestar el efecto de la resistencia traducida en calor se utilizan bajos voltajes (menores de 5 V/cm hasta 2.5 V/cm), y en concentraciones rutinarias del 0.8 % o menores, es posible elevar el voltaje (hasta 10 V/cm), a pesar de que se puede generar una aberración debida a la velocidad de arrastre de las moléculas.

Las concentraciones recomendadas dependiendo del tamaño del fragmento esperado, son las siguientes:

Agarosa	Fragmento
0.5 %	1-30 Kb
0.7	0.8 – 12
1.0	0.5 – 10
1.5	0.2 – 3




Concentración de agarosa	Imagen exagerada del efecto del cambio de concentración
Normal Pozo	
Alta	
Baja	

Imagen exagerada del efecto del cambio de concentración

Otros reactivos.

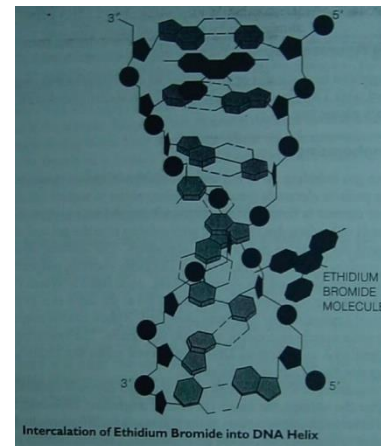
Considerando que las electroforesis horizontales son submarinas, para evitar o al menos disminuir la difusión de la muestra, se homogeniza con una solución hiperdensa de sacarosa (de hasta 4 M), a la que se le agrega azul de bromofenol, que además tiñe a la muestra, permite verificar el avance de la electroforesis, debido a que avanza a una velocidad similar a la de moléculas de unos 500 pares de bases.

Dependiendo del experimento que se realice, a la solución hiper-densa de azul de bromofenol, se le pueden agregar otros reactivos, como urea que permite mantener parcial o totalmente desnaturalizados a los ácidos nucleicos así como para desnaturalizar a las enzimas que se utilicen (como las endonucleasas) o que estén en el medio (como las exonucleasas, DNAsas y RNAsas).

Finalmente, para visualizar los fragmentos de los ácidos nucleicos, típicamente se utiliza Bromuro de Etidio, el cual se intercala entre las bases y fluoresce con la luz ultravioleta. Este reactivo es mutagénico y peligroso para la salud humana en bajas concentraciones, pero se puede manipular con cuidados básicos y resulta relativamente económico.

Para incorporar el bromuro en los ácidos nucleicos, se utilizan dos estrategias: 1) se agrega en el gel durante su preparación o 2) se “baña” el gel en una solución de agua con bromuro, durante 5 a 10 minutos y se enjuaga el excedente. Cuando se trabaja con bromuro de etidio incorporado al gel, se agrega justo antes de la polimerización de la agarosa, por lo que se sugiere utilizar guantes en los siguientes pasos.

Es importante aclarar, que el bromuro de etidio es atraído hacia el polo negativo (al contrario que los ácidos nucleicos), lo cual se debe tomar en cuenta para establecer la estrategia de tinción más adecuada, ya que si se busca teñir fragmentos muy pequeños, el bromuro puede rebasarlos y en consecuencia no se logren visualizar.



Visualización de ADN

OBJETIVO: Aplicar técnicas de electroforesis para la visualización de ADN, buscando promover el uso de equipos para el manejo de reactivos a microescala, así como la aplicación de técnicas físicas para la separación de biomoléculas, por tamaños relativos.

MATERIAL:

Puntas

Azul de bromofenol

Agarosa

Bromuro de etidio

Muestras

Pipeteadores

Cámara de electroforesis

Transiluminador

Cámara fotográfica

METODOLOGIA:

CUIDADO EN LA PRACTICA SE UTILIZA BROMURO DE ETIDIO – MUTAGENICO, TERATOGENICO, CARCINOGENICO

Generalidades de la electroforesis

La electroforesis es el movimiento de partículas eléctricamente cargadas a través de un gas o líquido como resultado de un campo eléctrico formado entre unos electrodos sumergidos en el medio. En nuestro caso, la técnica se aplica para la separación por tamaño de los fragmentos en los ácidos nucleicos. Por efecto de la corriente eléctrica directa, las moléculas se mueven a través de una matriz inerte (de polímeros de agarosa o acrilamida), que se encuentra en un amortiguador, todo estos durante un tiempo determinado.

Considerando las características de las muestras, son diversas las variables que intervienen en la electroforesis y que es necesario controlar. Las principales a considerar son: características de la muestra, corriente eléctrica (Volts, Watts y Amperes), amortiguador, matriz (tipo y concentración) y otros reactivos.

Protocolo

Preparación agarosa en horno de microondas

Para verificar el producto de las extracciones de ADN en el curso, se recomienda la aplicación de una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. Considerando que se trabaja con bromuro de etidio incorporado al gel, se recomienda utilizar guantes en todos los siguientes pasos.

--- En la preparación del gel para las cámaras de electroforesis chicas (minisub), coloque en un matraz Erlenmeyer 0.24 gr. de agar y agregue 20 ml del amortiguador TAE 1x.

- Coloque el matraz en el horno de micro-ondas con el máximo poder hasta la ebullición, retire y homogeneice, repitiendo hasta que la solución sea cristalina. Como método alternativo, coloque el matraz en un termoplato con la máxima temperatura y agitación constante, hasta que inicie la ebullición.

--- Agregue 10 ml de amortiguador TAE 1x y 1.5 ml de bromuro de etidium. Agite hasta la homogeneización del agar.

--- Retire el matraz del termoplato y espere hasta que alcance aproximadamente los 30 °C.

--- Transfiera el agar a la charola de electroforesis y coloque los correspondientes peines.

--- Después de 30 minutos, con el agar solidificado, retire con cuidado los peines, jalándolos hacia arriba, en forma recta.

--- Coloque la charola en la cámara de electroforesis.

--- Agregue a la cámara 300 ml de amortiguador TAE 1x (hasta que se cubran los pozos con el amortiguador).

--- En un tubo de centrifuga o sobre parafilm, coloque 8 μ l de la muestra*.

--- Agregue 2 μ l de Azul de bromofenol y agua destilada para llevar el volumen final a 10 μ l.

--- Con el pipeteador automático homogeneice la muestra y transfírela a uno de los pozos del gel de agar. Tenga cuidado de no rasgar los pozos o el gel.

--- Repita los tres últimos pasos para el resto de las muestras dejando al menos un pozo para colocar la escalera del fago lambda digerido con HindIII, según las instrucciones del fabricante.

--- Revise las conexiones, que los pozos estén el polo negativo y encienda la fuente de poder programando el voltaje constante entre 2 y 5 V/cm (aproximadamente 80 V, por 1 hora). Con el menor voltaje se obtiene una mejor resolución de bandas, especialmente con fragmentos chicos.

--- Permita que avance la electroforesis hasta que el azul de bromofenol recorra 2/3 de la distancia del gel.

--- Apague la fuente de poder y retire cuidadosamente el gel.

-Visualicé el resultado de la electroforesis en un transiluminador U.V.

Nota: recuerde que la luz U.V. puede producir efectos inmediatos. Cuando visualice verifique que esta usted adecuadamente protegido.

Nota: * La cantidad de muestra que se agregue variara dependiendo de la concentración de ADN. En la visualización cuando se agrega un exceso de ADN se observan aberraciones dendríticas en la muestra, por el contrario si se agrega una baja concentración (menos de 5 ng) no se observara el ADN.

Cuantificación de ADN

Para la cuantificación del ADN, existen dos métodos indirectos que permiten estimar la concentración del ADN en las muestras, por visualización y mediante espectrofotómetro.

Estimación de la concentración de ADN por visualización.

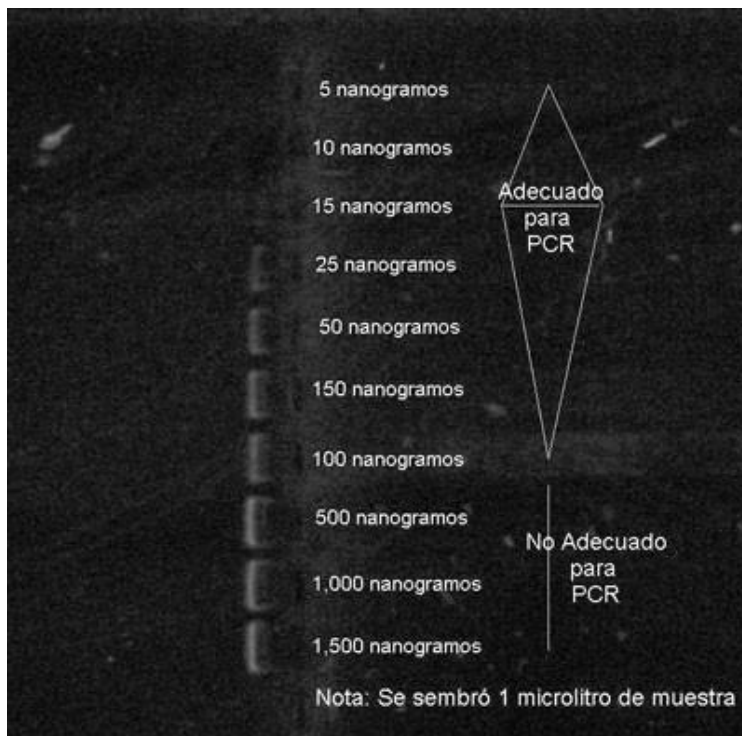
El método indirecto más recomendable para la determinación de la concentración de ADN en una muestra es mediante la visualización de un gel de electroforesis en el cual se colocan muestras con concentraciones conocidas.

El procedimiento requiere la preparación de una cámara de electroforesis, colocando cada una de las muestras que se desea evaluar en pozos individuales y dejando al menos 10 pozos libres.

Posteriormente se inicia la electroforesis con 6 v/cm y diez minutos antes de que concluya la corrida, se detiene la fuente de poder, se destapa la cámara de electroforesis, sembrando muestras de concentraciones conocidas.

Finalmente se cierra la cámara de electroforesis, se enciende nuevamente la fuente de poder, dejando que corra durante 10 minutos, se visualiza el producto con U.V. y se toma una fotografía.

En este método la estimación se realiza contrastando intensidades de luz entre las muestras, lo cual se realiza visualmente o con el auxilio de algún programa computacional que contraste intensidades de color.



Estimación mediante espectrofotómetro.

En este método se utiliza un espectrofotómetro que mida la absorbancia a 260 nm y 280 nm. En un equipo automatizado se sigue el siguiente protocolo.

--- Encienda el espectrofotómetro al menos 15 minutos antes de iniciar las lecturas.

Preparación del blanco.

- Agregue 10 m l de TE-RNasa (o la solución que utilizó para resuspender el ADN de la muestra problema) y 990 m l de Agua .ddue, en una celda, asegurándose de la perfecta homogeneización.

--- Coloque la celda en la posición 1 del espectrofotómetro.

Preparación de las muestras.

--- Agregue 10 ml de la muestra problema y 990 ml de Agua destilada, en otra celda, asegurándose de la perfecta homogeneización.

Lectura.

Para la lectura solo se tiene que responder con el teclado del equipo las preguntas que aparecen en pantalla. El equipo permite evaluar la concentración de proteínas (limpieza de la muestra), presencia de ARN y concentración de oligos (ADN degradado).

Es importante aclarar que la relación A_{260}/A_{280nm} no es lineal, por lo que puede llevar a lecturas erróneas, recomendándose solo como método complementario de evaluación.

Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis

Analice el trabajo realizado y los resultados. Se recomienda fotografiar e imprimir los resultados, para pegar la foto en la libreta. Interprete todo lo que se observa en el gel.

PRACTICA #12

Titulo: Uso de endonucleasas

Duración: 6 horas

INTRODUCCION: a investigar por el estudiante

OBJETIVO:

Identificar las habilidades y cuidados para el trabajo en campana de flujo laminar

En esta sesión se busca mostrar un ejemplo de análisis de restricción de ADN, utilizando diferentes endonucleasas.

MATERIAL:

Materiales

Muestra de ADN

Endonucleasa

Agua ddue

Puntas

Tubos

Equipos

Campana de Flujo laminar

Pipeteadores

METODOLOGIA:

El protocolo general involucra el tomar muestras de ADN, agregarle endonucleasas, incubar las muestras a 37°C y verificar los productos de la digestión mediante una electroforesis en agarosa.

Es importante señalar que la actividad de las endonucleasas puede afectarse dramáticamente con su inadecuada manipulación, por lo que es importante en todo momento mantener la endonucleasa en hielo o a -20°C hasta su uso.

Para la digestión se utilizarán endonucleasas del tipo II, posiblemente alguna de las siguientes: Eco RI, HindIII o EcoRV Como muestra de ADN se manejará al fago lambda, para el cual los patrones de

restricción están ampliamente reportados en la literatura. Para los cálculos siga el ejemplo que a continuación se presenta:

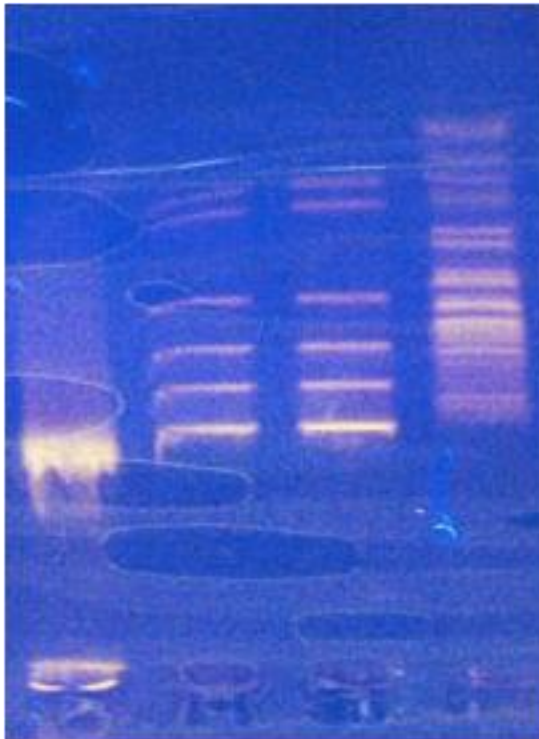
Ejemplo

Volumen	Reactivo
1 μL	Muestra
0.2 μL	Endonucleasa (calcule en base al número de unidades, al menos con 2 a 5 unidades por reacción, es necesario calcular)
1 μL	Amortiguador (si se requiere a 1 x)
6 μL	Agua.dd o TE (se determina con base al Volumen Total)
10 μL	Total Producto esperado

Finalmente se realiza la electroforesis

Producto esperado:

Carril 1 ADN sin digerir Carriles 2-4 ADN cortado con endonucleasas



Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis

Revise como se realizó el trabajo en la campana de flujo laminar.

Contraste los resultados contra lo esperado de acuerdo a la bibliografía

PRACTICA #13

Titulo: PCR inespecífico

Duración: 3 horas

INTRODUCCION:

PCR

La reacción en cadena de la polimerasa tiene tres pasos que se repiten cíclicamente, 1) desnaturalización de los ácidos nucleicos, 2) alineación de un cebador iniciador (?primer?), y 3) polimerización, por efecto de una polimerasa termo resistente, en un medio rico de nucleótidos libres (dNTPs). En un ciclo, a partir de una molécula se obtienen dos, en el segundo ciclo de dos se obtienen cuatro y siguiendo una progresión geométrica en 30 ciclos se tendrían 1, 073, 741, 755 copias. Para una eficiente reacción del PCR, se busca controlar numerosas variables, de las cuales las principales son: 1) Muestra de los ácidos nucleicos, 2) Condiciones químicas de la reacción y 3) condiciones físicas

Muestra de los Ácidos nucleicos

Generalmente los problemas en los resultados del PCR, están relacionados con la cantidad y calidad de ácidos nucleicos. En cuanto a la cantidad, regularmente se sugiere utilizar de 15 a 50 ng, no obstante, para la amplificación de fragmentos de ADN mitocondrial, a partir de muestras de ADN total, se amplía el rango de 15 a 200 ng, prefiriéndose los valores altos. Fuera de estos rangos es necesario utilizar técnicas complementarias o el uso de aditivos en la mezcla de reacción, lo que puede elevar sustancialmente los costos. En cuanto a la calidad, es preferible utilizar productos del tipo C1 (una banda clara y nítida, sin barrido, ver en interpretación de la electroforesis), aunque en muestras de ADN con barrido ligero (C2 y C3), se pueden obtener resultados adecuados. En muestras degradadas, generalmente se requiere utilizar técnicas complementarias

Condiciones químicas de la reacción

En la mezcla de reacción se utilizan diversos componentes, además del ADN que sirve de molde. Los componentes de una reacción típica, incluyen un cebador ?hacia adelante? (?forward? o F), uno ?hacia atrás? (?reverse? o R), mezcla de los dNTPs (deoxinucleotidos), polimerasa termoresistente (Taq polimerasa), iones magnesio (en forma de cloruro de Magnesio), amortiguador y agua destilada, desionizada, ultrapurificada y esterilizada (H₂O?ddue). Adicionalmente, dependiendo del tipo de termociclador podría utilizarse aceite mineral. La concentración de los cebadores F y R, ha sido ampliamente estandarizada, recomendándose utilizar de 0.5 a 1 µl de una solución con concentración de 20 µM, para una reacción de volumen total de 25 µL. La solución madre (?stock?), se prepara en una concentración de 50 a 100 µM, para garantizar una mejor conservación de los cebadores. El diseño de los cebadores es básico para entender los resultados de una reacción de PCR. Es recomendable es uso de cebadores específicos, que tengan aproximadamente la misma proporción de C-G con respecto a A-T,

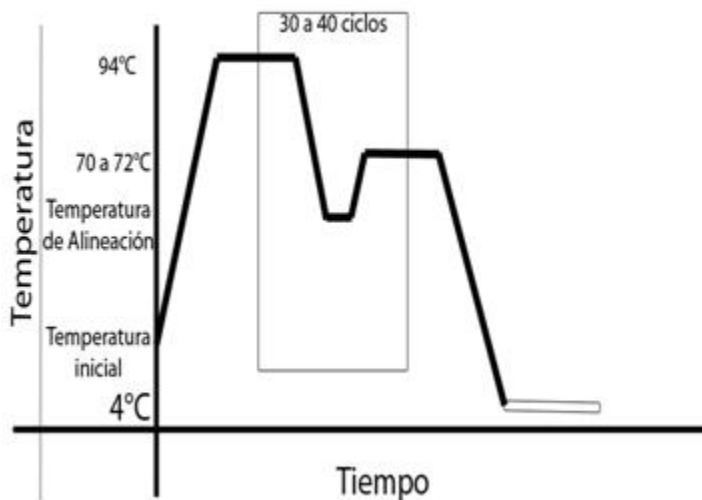
evitando la formación de pasadores (dobles del cebador durante la reacción) o la formación de dímeros simples o pareados (unión de bases complementarias) por unión entre el mismo cebador o entre los cebadores. Los dNTPs se agregan en exceso para cubrir adecuadamente las demandas de la reacción. En una reacción de 25 μ L, es común utilizar 2 μ L de una concentración de 2.5mM. Agregar una mayor cantidad implica un desperdicio de los nucleótidos, además de que pueden interferir en la reacción. La primer polimerasa termo resistente utilizada fue a Taq polimerasa, de la cual se utilizan de 0.25 a 1 unidad por reacción, no obstante, en la actualidad existen al menos 10 polimerasas de uso en las reacciones de PCR, de las cuales las más comerciales son las obtenidas de *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Thermococcus litoralis* (Vent o Tli). Generalmente de la solución madre, se utilizan de 0.5 hasta 2 μ L por reacción. El magnesio es requerido para una adecuada función de la polimerasa y se recomienda una concentración de 1.65 mM por reacción. En casos especiales, se puede utilizar hasta 4mM, aunque con el riesgo de disminuir la especificidad en la acción de la polimerasa. La preparación de la solución madre de 25 o 50 mM, es laboriosa y requiere de filtrado y esterilización de los reactivos, las que pueden ser muy difíciles de lograr en un laboratorio general, por lo que se recomienda adquirirla de proveedores especializados. El pH y el balance iónico, se logra con el uso de un amortiguador termo resistente, con tris-HCl (pH8.4) y cloruro de potasio. Cabe aclarar que en la reacción debido a los cambios de temperatura el pH variara desde aproximadamente 7 hasta 10. La preparación es sumamente complicada, por lo que se sugiere adquirirlas de una compañía especializada. Finalmente para el agua, es posible obtenerla de un ultrapurificador y esterilizarla, manteniéndola en el área de trabajo de PCR. Para lograr una mayor eficiencia en la reacción es posible agregar diversos aditivos, como formamida, DMSO o Tween 20 (se recomienda revisar la página de internet: <http://www.staff.uni-mainz.de/lieb/additiva.html>), los cuales son utilizados generalmente de forma empírica. Comercialmente se encuentran disponibles juegos de mezclas para PCR, como PCR-super mixer, en los cuales incluyen total o parcialmente los reactivos requeridos, de tal forma que solo se requiere agregar la muestra a amplificar. Lamentablemente en estos juegos, la polimerasa puede perder actividad después de unas semanas o meses y típicamente recomiendan su uso antes de que se cumplan los seis meses de preparación. En los casos que se exceda el tiempo de conservación, suele ser requerido suplementar la mezcla con polimerasa fresca. En síntesis la mezcla de reacción típica incluye los siguientes componentes y concentraciones:

Reactivo	Concentración final
dNTP'S	0.2 mM (rango de 0.05 a .25 mM)
Iniciador F	0.4 mM (rango de 0.2 a 1 mM)
Iniciador R	0.4 mM (rango de 0.2 a 1 mM)
Taq-Polimerasa	0.2 U (rango de 0.2 a 1 U)
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	1.65 mM (rango 1.5 a 4 mM)

ADN (molde o templete)	15 a 200 ng
Amortiguador (Tris-HCl 10 a 220 mM ?pH 8.4- y 50 a 55 mM de KCl), solución madre a 10 X	1.1 X
Agua (H ₂ O ddue)	Volumen necesario para la reacción

En los primeros termocicladores no se contaban con mecanismos para mantener la temperatura homogénea en todo el interior de los tubos de reacción, por lo que se agrega de uno a dos volúmenes de aceite mineral, previamente esterilizado y conservado en el área de trabajo de PCR.

Condiciones físicas



Un ciclo regular requiere de cuatro etapas: 1) desnaturalización inicial, 2) ciclos de desnaturalización, alineación y polimerización, 3) polimerización final y 4) conservación. La desnaturalización inicial, se puede lograr eficientemente con 94 °C durante 5 minutos. Si existe la sospecha de que las muestras no están completamente purificadas (sospecha de proteínas), se puede elevar la temperatura inicial hasta los 96 °C durante 2 minutos y después a 94 °C por los 3 minutos restantes. Para algunos PCR, como el de RAPDs, puede ser recomendable omitir la desnaturalización inicial. La polimerasa puede perder efectividad durante la desnaturalización inicial, por lo que algunos fabricantes recomiendan agregarla después de esta desnaturalización inicial. Los ciclos, comprenden una desnaturalización inicial de 94 °C por 30 segundos, la alineación a la temperatura de alineación promedio o de fusión (T_m por sus siglas en inglés) por 30 segundos y la polimerización a 72 °C por 1 minuto por cada mil pares de bases. La temperatura de alineación promedio, se toma a partir de los datos del fabricante de los cebadores o se calcula con la siguiente ecuación empírica: **Calculo de T_m (método de G-C)** Por ejemplo para la secuencia: ttc ccc ggt ctt gta aac c N= 10 # GC= 10 %GC= 52% T_m= 2°C * (A+T) + 4°C * (G+C) = 2 * (9) + 4 (10) = 58°C corrección 58-5= 53°C Nota: Se define T_m (Temperatura de fusión)

como la temperatura a la cual el 50 % de los ácidos nucleicos se mantiene disociado o desnaturalizado. El número de ciclos está limitado por la eficiencia de la polimerasa, estableciéndose un rango de entre 25 a 40 ciclos. Una mayor cantidad de ciclos puede producir bandas fantasmas u otras aberraciones en los productos del PCR. Las variantes en los ciclos son diversas de acuerdo a las condiciones obtenidas en la estandarización. Las principales variaciones son: Incrementar en uno a dos segundos por ciclo el tiempo de la polimerización, cuando se obtienen barridos o con baja eficiencia. Variar la pendiente de cambio entre temperaturas, principalmente entre la alineación y polimerización, cuando hay baja eficiencia en la reacción y en la electroforesis se observan los oligos. Realizar 5 a 6 ciclos iniciales, con 1 a 4 grados arriba de la temperatura de alineación, cuando la reacción es sumamente específica para un fragmento y las falsas alineaciones generan resultados erróneos. Realizar de 5 a 6 ciclos iniciales, con 1 a 4 grados abajo de la temperatura de alineación, cuando se obtiene baja eficiencia. La polimerización final se realiza a 72 °C por 10 minutos, posteriormente se programa al termociclador en un tiempo de espera a 4 °C y se conservan los productos en refrigerador. El aceite mineral generalmente no produce problemas en la manipulación de los productos del PCR, no obstante puede ser necesario eliminarlo, para lo cual se puede introducir el tubo a -70 °C y una vez solidificada la muestra, se puede retirar fácilmente el aceite por decantación, o deposita el contenido del tubo en un pedazo de parafilm de donde se recoge posteriormente el producto de PCR.

Otros cuidados

Considerando la gran sensibilidad de la reacción de PCR, en un análisis, se deben extremar los cuidados en:

Proteger de cualquier fuente de contaminación, tanto a los materiales como a los reactivos.

Trabajar con guantes limpios, la protección pertinente y en una campana de flujo laminar tipo I o II.

Hacer reproducibles todas las variables posibles alrededor de los experimentos.

En la extracción de ADN, se debe eliminar los otros compuestos orgánicos presentes en la muestra (residuos de fluidos orgánicos), así como los residuos de los reactivos utilizados en la reacción (SDS, fenol, cloroformo, alcohol y el exceso de sales).

En un estudio, mantener el mismo paquete de materiales y reactivos, ya que el cambio de uno de ellos puede requerir una nueva estandarización.

Nota final: La ropa requerida para efectuar un PCR, busca proteger al máximo a la muestra y a los reactivos de cualquier contaminación e incluye accesorios como cubre bocas y gorra de laboratorio.

OBJETIVO:

Probar las habilidades requeridas para efectuar una reacción de PCR

MATERIAL:

Materiales

Puntas de 10 μ L

Puntas de 200 μ L

Tubos para PCR

Reactivos para PCR

Equipos

Campana de Flujo laminar

Juego de pipeteadores

Termociclador

METODOLOGIA:

La reacción en cadena de las polimerasas, es la replicación artificial del ADN, la cual depende de condiciones físicas y químicas.

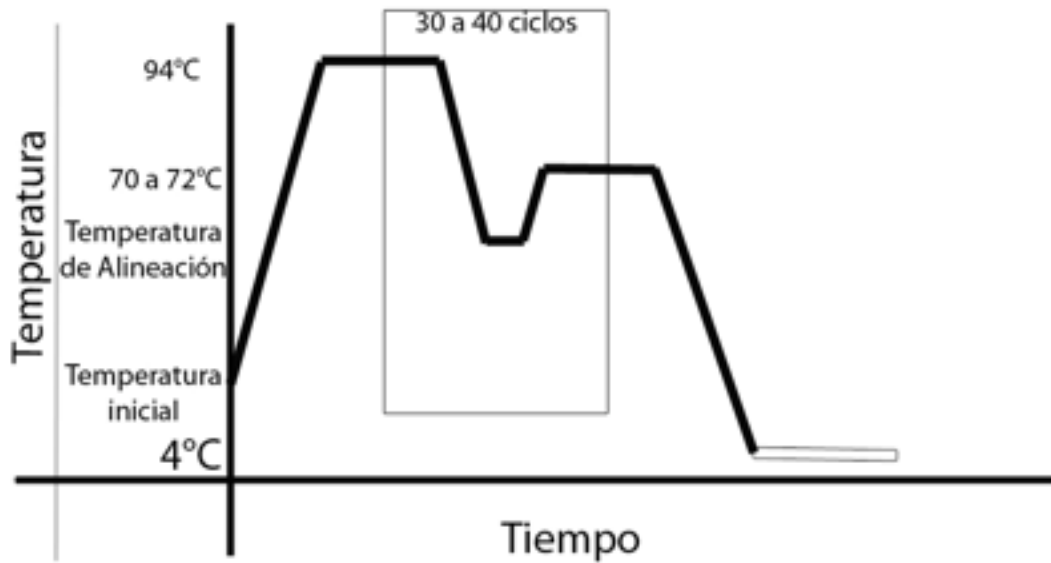
En cuanto a las condiciones físicas, consideramos el incremento de temperatura para desnaturalizar parcialmente el ADN, después una rápida disminución para que se efectúe una alineación de un cebador ("primer") y se forme una molécula híbrida (ADN molde con el cebador). Finalmente con un ligero incremento de la temperatura para que las polimerasas (extraídas de una bacteria termófila) puedan actuar eficientemente. Estos cambios de temperatura se repiten en treinta o cuarenta ciclos.

Las condiciones para la amplificación son las siguientes.

Teórico	Usado en practica
Desnaturalización inicial 95°C por 2'45"	
Ciclos 30	
Desnaturalización 94°C por 30"	
Alineación 36°C por 30"	
Polimerización 72°C por 30"	
Extensión final 72°C por 10 minutos	

Conservación 6°C Indefinido.

Gráfica:



La reacción en cadena de las polimerasas inespecifica, actualmente se utiliza para verificar otros protocolos o para realizar barridos rápidos del ADN. Por su facilidad demostrativa se presenta en esta sesión.

De las condiciones químicas, la reacción debe contener al menos lo siguiente:

Reactivo	Concentración esperada	volumen requerido
ADN molde	15 a 50 nanogramos	
Cebador RAPD	0.1 a 1 micromolar	
dNTP	200 micromolar de cada dNTP (dGTP, dCTP, dATP, dTTP)	
Taq polimerasa	0.2 a 1 unidades	
Cloruro de Magnesio	1.5 a 3 molar	

Amortiguador	1.1 X	
Agua ddue		
Aditivos	variable	
Total		25 microlitros

En un tubo termotransparente se agregan los reactivos necesarios. En el caso de la practica que realizaremos deberá llevar a un volumen final de 25 microlitros. Posteriormente se homogeneizan los reactivos, se precipitan por centrifugación y en caso de requerirse, se agregan 50 microlitros de aceite mineral para evitar la evaporación durante el experimento. Finalmente los tubos, debidamente etiquetados se colocan en el termociclador (aparato para controlar las condiciones físicas de la reacción).

Posteriormente se realiza la electroforesis correspondiente.

Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis

Describe el trabajo realizado en la campana, analice lo realizado (qué reactivos utilizo?, porque?...).

PRACTICA #14

Titulo: PCR específico

Duración: 3 horas

INTRODUCCION: a investigar por el estudiante

Información relacionada con el marco de referencia:

Identifique las características del PCR, así como el valor utilitario del este tipo de reacciones.

OBJETIVO: Probar las habilidades requeridas para efectuar una reacción de PCR específico

MATERIAL:

Materiales

Puntas de 10 μ L

Puntas de 200 μ L

Tubos para PCR

Juego de Reactivos para PCR

Equipos

Campana de Flujo laminar

Juego de pipeteadores

Termociclador

METODOLOGIA:

Para efectuar el ejercicio amplificación se utilizará un cebador universal

En cuanto a las condiciones físicas, consideramos la desnaturalización, alineación y polimerización en treinta ciclos.

Las condiciones para la amplificación son las siguientes.

Desnaturalización inicial 95°C por 2'45"

Ciclos 30

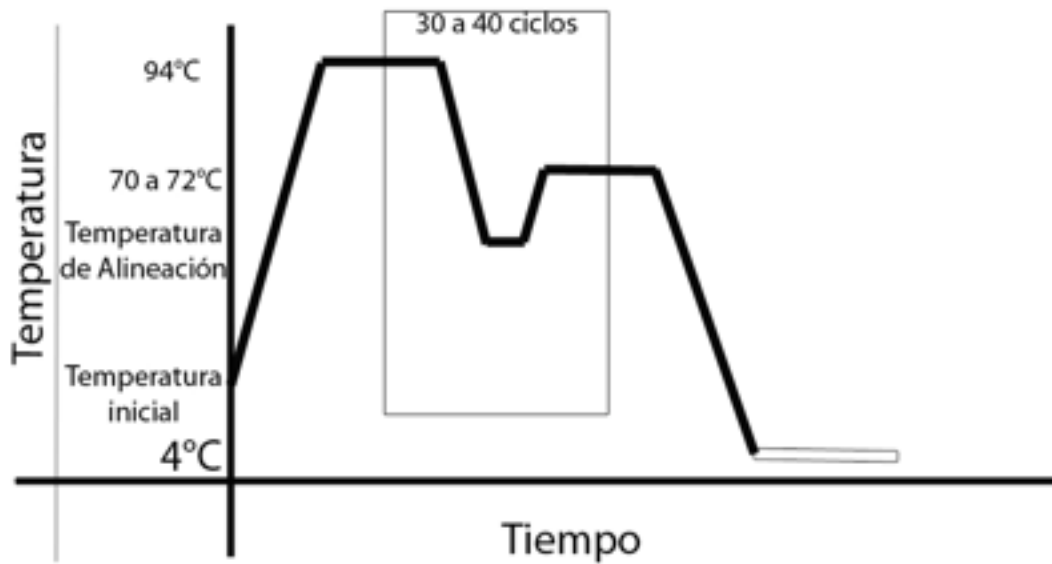
Desnaturalización 94°C por 30"

Alineación 50°C por 30"

Polimerización 72°C por 30"

Extensión final 72°C por 10 minutos

Conservación 6°C Indefinido.



De las condiciones químicas, la reacción se realizara con un paquete comercial, por lo que se debe agregar solo lo siguiente:

Reactivo	Concentración esperada	volumen requerido
ADN molde	15 a 50 nanogramos	1 microlitro
Cebador 1 (forward)	0.1 a 0.5 micromolar	1 microlitro
Cebador 2 (reverse)	0.1 a 0.5 micromolar	1 microlitro
Reactivo comercial		
Agua ddue		
Total		25 microlitros

En un tubo termotransparente se agregan los reactivos necesarios. En el caso de la practica que realizaremos deberá llevar a un volumen final de 25 microlitros. Posteriormente se homogeneizan los reactivos, se precipitan por centrifugación y en caso de requerirse, se agregan 50 microlitros de aceite mineral para evitar la evaporación durante el experimento. Finalmente los tubos, debidamente etiquetados se colocan en el termociclador (aparato para controlar las condiciones físicas de la reacción).

Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis

Describa el trabajo realizado en la campana, analice lo realizado (qué reactivos utilizo?, porque?...).

LITERATURA

- Alberts, B. (2016) *Biología molecular de la célula*. 6a ed. Omega
- Alberts, B. (2021) *Introducción a la biología celular*. 5a ed. Médica Panamericana
- Karp, G., Iwasa, J., Marshall, W. (2019). *Biología celular y molecular*. 8a ed. McGraw-Hill Interamericana.
- Lodish, H.F. *Biología celular y molecular*. 7ª ed. Médica Panamericana.
- Karp. G. (2014). *Biología celular y molecular : conceptos y experimentos*. 5a ed. McGraw-Hill Interamericana.
- Bonifacino, J. S. (2004). *Short protocols in cell biology*. 1a ed. John Wiley.
- Gerstein, A. S. (2001). *Molecular biology problem solver: a laboratory guide*. 1a ed. Wiley-Liss.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. (2019). *Lehninger: principios de bioquímica*. 7a ed. Omega.
- Green, M.R., Sambrook, J. (2014). *Molecular cloning : a laboratory manual*. 4a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.