

1994E

091213478

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**“ELABORACIÓN DE SIETE PROTOCOLOS PARA LA
IMPLEMENTACIÓN DEL MANUAL DE PRÁCTICAS DE
LABORATORIO DE LA MATERIA DE BIOLOGÍA
MOLECULAR”**

**MATERIAL DIDÁCTICO EDUCATIVO
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

PATRICIA CASTRO REYES

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO JULIO 2002

185339/02/458
B729

[Firma manuscrita]



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

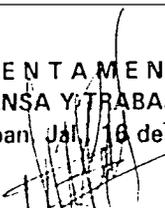
C. PATRICIA CASTRO REYES
P R E S E N T E .

Manifiestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de Material Didáctico Educativo con el título "ELABORACIÓN DE SIETE PROTOCOLOS PARA LA IMPLEMENTACIÓN DEL MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE LA MATERIA DE BIOLOGÍA MOLECULAR", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptada como Directora de dicho trabajo la DRA. ANNE SANTERRE y como asesores los M.C. RAMÓN REYNOSO OROZCO y DRA. ALMA ROSA VILLALOBOS ARÁMBULA.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, 16 de octubre del 2001


DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

p.a. 
M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

c.c.p. DRA. ANNE SANTERRE. - Directora del Trabajo
c.c.p. M.C. RAMÓN REYNOSO OROZCO.-Asesor del Trabajo
c.c.p. DRA. ALMA ROSA VILLALOBOS ARÁMBULA.-Asesor del Trabajo
c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam

C. DRA. MONICA ELIZABETH RIOJAS LOPEZ
PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION
DE LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTE.

Por este conducto me permito poner a su consideración mi anteproyecto de titulación en la modalidad: **Material didáctico educativo.**

Titulado : **ELABORACION DE SIETE PROTOCOLOS PARA LA IMPLEMENTACION DEL MANUAL DE PRACTICAS DE LABORATORIO DE LA MATERIA DE BIOLOGÍA MOLECULAR.**

el cual se anexa. para que sea turnado al Comité de Titulación de esta dependencia para su revisión y en su caso aprobación.

Así mismo pongo a su consideración a:
DRA. ANNE SANTERRE

como Director de Tesis. Así mismo, como asesor (No indispensable, opcional) a:

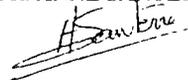
**M.C.. RAMON REYNOSO OROZCO Y
DRA. ALMA ROSA VILLALOBOS ARAMBULA**

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para reiterarle mi consideración más distinguida.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 24 de Octubre del 2000.

Vo.Bo.
El Director
DR. ANNE SANTERRE



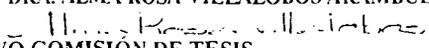
El Alumno
PATRICIA CASTRO REYES



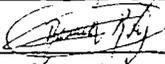
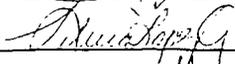
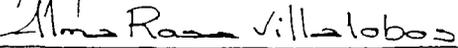
M.C. RAMON REYNOSO

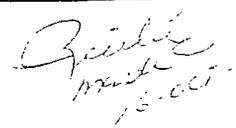


Los Asesores
DRA. ALMA ROSA VILLALOBOS ARAMBULA



EXCLUSIVO COMISIÓN DE TESIS

SINODALES	APROBADO	FECHA
1. BTOL. DOLORES M. BARRAGAN REYNAGA		
2. M.C. RAMON REYNOSO OROZCO		
3.- M.C. SILVIA LOPEZ PEREZ		
SUPL. DRA. ALMA ROSA VILLALOBOS ARAMBULA		



C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo en la modalidad de MATERIAL DIDÁCTICO EDUCATIVO que realizó el (la) pasante: PATRICIA CASTRO REYES con el Título: ELABORACIÓN DE SIETE PROTOCOLOS PARA LA IMPLEMENTACIÓN DEL MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE LA MATERIA DE BIOLOGÍA MOLECULAR, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

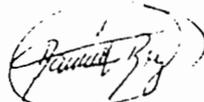
ATENTAMENTE

Las Agujas, Zapopan, Jal., a Noviembre 27 del 2001.

EL DIRECTOR DE TESIS

EL ASESORES

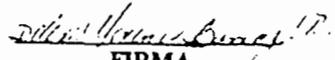

DRA. ANNE
SANTERRE.


M.C. RAMON
REYNOSO OROZCO.

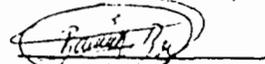

DRA ALMA ROSA
VILLALOBOS ARAMBULA.

SINODALES

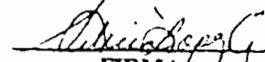
1.- BIOL. DOLORES M. BARRAGÁN REYNAGA.
NOMBRE COMPLETO


FIRMA

2.- M.C. RAMÓN REYNOSO OROZCO.
NOMBRE COMPLETO


FIRMA

3.- M.C. SILVIA LÓPEZ PÉREZ.
NOMBRE COMPLETO


FIRMA

AGRADECIMIENTOS

**A todos los profesores e investigadores que contribuyeron
en la realización de ésta tesis; en especial a la
Dra. Anne Santerre L.**

**A familiares y amigos que me apoyaron
en los momentos adversos.**

ÍNDICE DE TESIS

Págs.

CAPITULO UNO

ANTECEDENTES, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

I. Antecedentes.

I.1. Plan de desarrollo docente de la Universidad de Guadalajara y del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA). a

I.2. Departamento de Biología Celular y Molecular, Laboratorio de Genética y Docencia. b

I.3. Biología Molecular, materia especializante de la Carrera de Biología. b

I.4. Practicas de Laboratorio. c

I.4.1. Definición y clasificación en el ámbito educativo. c

I.4.2. Habilidades y estrategias a desarrollar durante una práctica de laboratorio. d

I.4.3 Conducta necesaria durante las prácticas de laboratorio. e

II. Justificación. f

III. Objetivos. f

III.1. Objetivos Generales.

III.2. Objetivos Específicos.

IV. Bibliografía. g

CAPITULO DOS**MANUAL DE PRÁCTICAS DE LA MATERIA DE BIOLOGÍA MOLECULAR****Introducción al Laboratorio de Biología Molecular**

	5
I. Medidas de seguridad	5
II. Lavado de cristalería	6
III. Conocimientos de equipo y herramientas del laboratorio de Biología Molecular.	6

Práctica No.1**Técnicas de Micropipeteo y Microcentrifugación**

10

INTRODUCCIÓN

OBJETIVO GENERAL

OBJETIVOS PARTICULARES

NOTAS PRELIMINARES

CONVERSIÓN METRICA

MICROCENTRIFUGACIÓN

MICROPIPETEO

PRÁCTICA CON MICROPIPETA DE VOLUMEN PEQUEÑO

PRÁCTICA CON MICROPIPETA DE VOLUMEN GRANDE

REPORTE DE PRÁCTICA

BIBLIOGRAFÍA

Práctica No.2**Preparación de Soluciones Básicas para el Laboratorio de Biología Molecular**

16

INTRODUCCIÓN

OBJETIVO GENERAL

OBJETIVOS PARTICULARES

METODOLOGÍA

REPORTE DE PRÁCTICA

BIBLIOGRAFIA

Práctica No.3**Extracción de DNA genómico**

19

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS GENERALES

OBJETIVOS PARTICULARES

METODOLOGÍA

REPORTE DE PRÁCTICA

BIBLIOGRAFÍA

Práctica No.4
Corrimiento Electroforético de DNA en Geles de Agarosa

23

INTRODUCCIÓN
OBJETIVOS GENERALES
OBJETIVOS PARTICULARES
METODOLOGÍA
REPORTE DE PRÁCTICA
BIBLIOGRAFÍA

Práctica No. 5
Determinación Espectrofotométrica de la Concentración de DNA

28

INTRODUCCIÓN
OBJETIVO GENERAL
OBJETIVOS PARTICULARES
METODOLOGÍA
REPORTE DE PRÁCTICA
BIBLIOGRAFÍA

Práctica No. 6
Amplificación del DNA Genómico por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

31

INTRODUCCIÓN
OBJETIVO GENERAL
OBJETIVOS PARTICULARES
METODOLOGÍA
REPORTE DE PRÁCTICA
BIBLIOGRAFÍA

Práctica No. 7
**Corrimiento Electroforético en Geles de Poliacrilamida de los Fragmentos
Amplificados por RAPDs**

35

INTRODUCCIÓN
OBJETIVO GENERAL
OBJETIVOS PARTICULARES
NOTAS PRELIMINARES
METODOLOGÍA
REPORTE DE PRÁCTICA
BIBLIOGRAFÍA

Anexo 1

Programa de la Materia de Biología Molecular (BC 108)

41

Generalidades Administrativas
 Generalidades de la Materia
 Academia
 Objetivo general.
 Objetivos específicos.
 Contenido temático sintético.
 Prácticas de Laboratorio.
 Bibliografía básica.
 Bibliografía Complementaria.

Anexo 2

Preparación de Soluciones Concentradas y de Trabajo

45

Preparación de acetato de sodio
 Preparación de Bromuro de etidio
 Preparación de mezcla Cloroformo:alcohol isoamílico (C:I)
 Preparación de Etanol 70%
 Preparación de mezcla Fenol:Cloroformo:alcohol isoamílico (F:C:I)
 Preparación de Fenol Equilibrado
 Preparación de SDS 20%
 Preparación de mezcla STE
 Preparación de mezcla TE
 Preparación de Tris

Anexo 3

Diagramas de Flujo de las Siete Prácticas

49

Diagrama de Flujo de la Práctica No.1
 Diagrama de Flujo de la Práctica No.2
 Diagrama de Flujo de la Práctica No.3
 Diagrama de Flujo de la Práctica No.4
 Diagrama de Flujo de la Práctica No.5
 Diagrama de Flujo de la Práctica No.6
 Diagrama de Flujo de la Práctica No.7

CAPITULO TRES

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Págs.

I. Discusión.

h

I.1. Infraestructura para la práctica

I.1.1. Trabajo preliminar

I.1.2. Espacio físico para el desarrollo de las prácticas

I.1.3. Equipos, accesorios y reactivos

I.1.4. Duración de la práctica

I.2. Organización de la práctica

I.2.1. Preparación de la práctica por parte del Profesor

I.2.2. Preparación de la práctica por parte del Alumno

I.2.3. Seguimiento de la práctica por parte del Profesor

I.2.4. Seguimiento de la práctica por parte del Alumno

II. Conclusiones.

n

III. Perspectivas.

n

Capítulo No. 1

Antecedentes
Justificación
Objetivos



ELABORACIÓN DE SIETE PROTOCOLOS PARA LA IMPLEMENTACIÓN DEL MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE LA MATERIA DE BIOLOGÍA MOLECULAR

I. ANTECEDENTES.

I.1. PLAN DE DESARROLLO DOCENTE DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA Y DEL CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS (CUCBA).

Uno de los elementos esenciales de la reforma académica se expresó en el Modelo Básico de la Organización de la Red Universitaria en Jalisco (aprobado en octubre de 1993) entre cuyos principios articuladores destacan: el compromiso y corresponsabilidad con la sociedad; el mejoramiento permanente de la calidad educativa; el desarrollo integral y equilibrado de la enseñanza, la investigación, la extensión y la difusión, como ejes de la función sustantiva institucional y la flexibilidad de las estructuras académicas y administrativas.

El Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) asume los compromisos de la Red Universitaria y tiene como misión fundamental "la formación de recursos humanos de alto nivel, emprendedores con responsabilidad social y capacidad de liderazgo en las áreas del trabajo profesional y académico, apoyándose en la investigación y las experiencias directas para hacer más eficientes los procesos de producción de alimentos y materias primas de origen biológico así como posibilitar la conservación de los recursos naturales del estado de Jalisco y mejorar la calidad ambiental de los asentamientos humanos en beneficio de los sectores sociales y productivos". Así, el CUCBA busca encaminar esfuerzos con el fin de aumentar el impacto de la U de G en el desarrollo regional agropecuario, la salud pública, la salud ambiental y la conservación de los recursos naturales de los municipios, orientando las funciones de la U de G al desarrollo sustentable de Jalisco. Para eso el CUCBA oferta tres carreras a nivel Licenciatura: Biología, Agronomía y Veterinaria, además de Posgrados, servicios y asesorías.

Así el Plan de desarrollo, contempla en su programa de docencia, la realización de acciones permanentes y sistemáticas que repercutan en el rendimiento académico del alumno, en su desempeño social y laboral. La organización de la Red Universitaria según el modelo departamental, la implementación del sistema de créditos y de las curriculas flexibles promovieron de manera importante la integración de los estudiantes en las actividades de investigación. Esto se da, en particular a través de la participación de los alumnos en materias particulares y especializantes en prácticas de Laboratorio relacionadas con proyectos de investigación vigentes, optimizando así el uso de los recursos, espacios y equipos científicos.

I.2. DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR, LABORATORIOS DE GENÉTICA Y DOCENCIA.

El Departamento de Biología Celular y Molecular (DBCM) oferta una gran cantidad de materias que se imparten en el CUCBA, tanto Básicas Comunes, Particulares y Selectivas, dentro de las tres licenciaturas (Biología, Médico Veterinario Zootecnista y Agronomía), como Especializantes (Obligatorias y Selectivas) para la licenciatura en Biología.

Hoy en día, con el rápido desarrollo de las técnicas de biología molecular y del ADN recombinante, la formación de un biólogo con carencias en el manejo de las técnicas de aislamiento, manipulación y análisis de ADN limitará sus oportunidades en el mercado del empleo, tanto nacional como internacional. En el CUCBA, la responsabilidad de tal formación depende naturalmente de los laboratorios del DBCM.

Los laboratorios del DBCM apoyan a la docencia con las siguientes materias, Biología Molecular (BC 108), Genética Avanzada (BC 121), Genética Evolutiva (BC 111) e Ingeniería Genética (BC 123), todas con un objetivo común: el entendimiento de las bases moleculares de la herencia y de la expresión génica.

I.3. BIOLOGÍA MOLECULAR, MATERIA ESPECIALIZANTE DE LA CARRERA DE BIOLOGÍA.

En el caso de la materia de Biología Molecular (ver programa de la materia en Anexo No.1) cada semestre un promedio de 100 alumnos se inscriben a esta materia y requieren el trabajo de laboratorio.

Así a partir de 1996 el Laboratorio de Genética ha invertido recursos y esfuerzos para la preparación y desarrollo de prácticas de laboratorio en las materias ofertadas dentro del plan flexible de estudio de la Carrera de Biología, para permitir al estudiante el manejo de equipos, herramientas, materiales y reactivos en laboratorio para el aislamiento, manipulación y análisis del ADN, lo cual es indispensable para su formación y su integración en el sector generador de empleos.

Es importante señalar que el desarrollo de prácticas no se había ofrecido en el plan de estudio cuatrimestral por falta de tiempo (la carga horaria por materia sólo permitía la enseñanza teórica), y por supuesto de recursos. Actualmente el nuevo plan de estudio semestral ampliado permite agregar al programa una carga horaria reservada a las prácticas. Además, el apoyo financiero obtenido de FOMES (Fondo para la Modernización de la Educación Superior, 1997-1999) y del CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, 1995-1996 con proyecto número 2578 P-M y 1999-2000 con proyecto número 28813-N) permitieron la compra de los reactivos y equipos necesarios que apoyan además de la investigación a la realización de las prácticas.

Las prácticas que se han estado realizando, están obviamente relacionadas con la investigación en curso (optimización de recursos). Así los alumnos al realizar las prácticas no solamente reciben un entrenamiento en el manejo de una "técnica" sino que también pueden integrar esta técnica, como un paso metodológico, en el contexto de un proyecto global de investigación, contribuyendo así a la formación de egresados que cumplen con las expectativas del difícil mercado del empleo.

Durante la realización del presente trabajo de Tesis uno de los proyectos de investigación en el cual participaba el Laboratorio de Genética fue "Establecimiento de un banco genómico regional del pez tilapia", proyecto multidisciplinario; con estudios de productividad, inmunología, microbiología y genética; y multi-institucional (SEMARNAP, CUCBA y CUCEI). Este proyecto tiene como objetivo general proponer a los acuacultores la introducción de líneas definidas del pez Tilapia en las granjas regionales.

El segundo proyecto que se desarrolla "Aplicación de la técnica de RAPDs al análisis filogenético de los Taxa del complejo *Gymnopilus*" tiene como objetivo contribuir al establecimiento de una monografía mundial del Género *Gymnopilus* y se está realizando en colaboración estrecha con el Laboratorio de Micología del Departamento de Botánica y Zoología del CUCBA.

Finalmente, la realización de ambos proyectos está dando pie a la transferencia de diferentes tecnologías y la formación de recursos humanos de alto nivel a través de la preparación de varias Tesis de Doctorado, Maestría y de Licenciatura.

I.4. PRÁCTICAS DE LABORATORIO

I.4.1 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN EN EL ÁMBITO EDUCATIVO.

Entre las teorías psicológicas, al menos las más representativas: Conductismo, Cognoscitivismo, Humanismo, Psicoanálisis y Teoría Sociocultural, existen diferencias en un gran número de enfoques y características. Sin embargo, todas estas teorías están de acuerdo en que dentro del fenómeno educativo es de suma importancia llevar a los individuos tanto por la preparación teórica como por su aplicación práctica. Este es un argumento del proceso educativo, que no tiene controversia (**Guzmán 1993**).

Según David Ausubel y sus colegas (**Ausubel 1998**), se ha subestimado, de manera injustificada, la importancia de la práctica y los ejercicios para el aprendizaje y la retención significativa. Ellos aseveran que la práctica constituye una variable muy importante que debe tomarse en cuenta si es de nuestro interés el aprendizaje y la retención significativa a largo plazo y la transferencia a los aspectos relacionados y secuencialmente dependientes de la materia de estudio.

El Trabajo Práctico es una de las actividades de las llamadas ciencias experimentales más importante del aprendizaje (**Mateo 1999**). Existen cinco razones por las que vale la pena hacer prácticas en el laboratorio:

1. Ofrecen la posibilidad de comprensión de conceptos complejos y abstractos.
2. Permiten el desarrollo de capacidades de investigación y la apreciación del espíritu de la ciencia.
3. Las experiencias prácticas, tanto las intelectuales como las manipulativas, son cualitativamente diferentes de las experiencias no prácticas que se realizan en el aula.
4. Proporcionan la oportunidad de experimentar con problemas significativos y no triviales, cuestión fundamental en la enseñanza que a su vez satisface a los estudiantes.
5. Ofrecen oportunidades únicas para identificar y remediar las ideas equivocadas.

Ahora bien, existen varios tipos de trabajo práctico de los cuales diversos autores proponen clasificaciones según los objetivos que se intenten lograr:

1. Desarrollar procedimientos y técnicas prácticas utilizadas en las investigaciones científicas.
2. Familiarizar a los estudiantes con fenómenos naturales (vivir el fenómeno).
3. Realizar investigaciones para aproximar el trabajo científico (Quesada 1997).

Por otro lado, podemos dividir las experiencias prácticas en dos grupos:

1. Las prácticas que no involucran ningún tipo de deducción ni interpretación.

Desarrollo de trabajos prácticos para ejemplificar principios, comprobar leyes o mejorar la comprensión de determinados conceptos operativos como ver el cambio de color en una reacción química o constatar que todos los seres vivos tienen células y ADN.

2. Las prácticas destinadas a provocar la discusión, la deducción y la interpretación de resultados.

El desarrollo de este tipo de trabajos prácticos permiten explicar el éxito o fracaso de un protocolo experimental como el análisis de los fragmentos de ADN digeridos o amplificados después de su electroforesis (Mateo 1999).

1.4.2. HABILIDADES Y ESTRATEGIAS A DESARROLLAR DURANTE UNA PRÁCTICA DE LABORATORIO.

En lo que refiere al proceso de enseñanza-aprendizaje, los ejercicios prácticos que se diseñan son de suma importancia para desarrollar las siguientes habilidades y estrategias (Quesada 1997):

- **Habilidades prácticas:** medir o manipular aparatos, entre otras.
- **Estrategias de investigación:**
 - Importancia de la reproducibilidad de sus mediciones, resultados y control de variables
 - Comprensión de un diseño experimental
 - Ejecución de un protocolo para el éxito de su práctica
 - Análisis e interpretación de datos experimentales

- **Habilidades de comunicación:**

- Seguimiento de instrucciones
- Formulación de preguntas
- Comunicación de resultados

En conjunto la realización de las prácticas fomentará la observación, clasificación, inferencia, emisión de hipótesis, interpretación en el marco de modelos teóricos o aplicación de conceptos, entre otros (Mateo 1999). Este conjunto es básico para cualquier tipo de trabajo experimental científico.

1.4.3. CONDUCTA ADECUADA DURANTE LAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO:

Es importante enfatizar que la impartición de una práctica difiere mucho de una clase teórica; en particular es más ruidosa y se puede ver más “desorganizada” por lo cual es importante destacar algunas reglas de comportamiento cooperativo que se deben respetar.

Normalmente en un manual de prácticas de laboratorio no se toman en cuenta ciertas habilidades por parte de los alumnos, que son necesarias y que deben aprender o por lo menos recordar. Entre las conductas necesarias que pueden contribuir a una disciplina de cooperación que permita el progreso de los individuos para trabajar en grupo (Johnson 1999) están las siguientes “Normas mínimas de conducta adecuada como parte de las habilidades cooperativas”:

- Movimiento entre los grupos sin ruidos indebidos y sin molestar a los demás. El tiempo de trabajo disponible en los grupos es corto normalmente, de modo que es conveniente que el ordenamiento de muebles, material y equipos así como el acomodo de los alumnos en los grupos se haga lo más rápido posible.
- Permanecer con su grupo correspondiente. Los alumnos que recorren el laboratorio durante el tiempo de trabajo en grupo son improductivos y distraen a los demás.
- Hablar en voz baja. Aunque los grupos de aprendizaje dependen de la interacción personal, no necesitan ser ruidosos. Algunos docentes nombran un estudiante por grupo para controlar que todos hablen en voz baja.
- Alentar la participación de todos. Todos los integrantes del grupo tienen que compartir sus ideas y materiales y ser parte de los esfuerzos grupales para alcanzar el objetivo planteado. (Una manera de formalizar la participación de todo el grupo consiste en que los estudiantes hablen por turno).
- Mirar los materiales con los que se está trabajando para evitar accidentes y derrames de reactivos.

II. JUSTIFICACIÓN:

En el CUCBA aproximadamente 100 alumnos que toman el curso de Biología Molecular necesitan realizar prácticas de laboratorio cada semestre.

De acuerdo con nuestra convicción, la mejor manera de aprender las bases moleculares de la herencia y de la expresión génica, así como de facilitar la entrada de los egresados en el mercado del trabajo y/o estudios de Postgrado, es mediante la realización de prácticas de laboratorio. Por lo que el desarrollo de un manual de prácticas, permitirá contribuir al mejoramiento del rendimiento académico del alumno así como elevar su desempeño social y laboral.

En los últimos tres años el Laboratorio de Genética del Departamento de Biología Celular y Molecular, recibió apoyos económicos (Universidad de Guadalajara, CONACYT, FOMES) que le permitieron desarrollar varios protocolos de investigación clásicos en el área de la Biología Molecular (Electroforesis y reacción en cadena de la polimerasa, por ejemplo).

Con la realización de este trabajo de Tesis de Licenciatura en Biología se pretende, en primer término adecuar los protocolos básicos que se prepararon en el laboratorio de genética, para el desarrollo de los proyectos de investigación, a las condiciones del laboratorio de docencia en el área de la biología molecular. En segundo lugar, diseñar y elaborar los protocolos para la práctica docente. Finalmente contribuir con la elaboración de un manual de prácticas para los alumnos inscritos a la materia de Biología Molecular.

III. OBJETIVOS.

III.1 OBJETIVO GENERAL.

Diseñar y estandarizar siete protocolos de laboratorio referentes al aislamiento, manipulación y análisis de DNA, para elaborar un manual de prácticas básicas en la clase de Biología Molecular.

III.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Seleccionar los protocolos de prácticas que puedan realizarse en las condiciones del laboratorio de Docencia del Departamento de Biología Celular y Molecular.
2. Diseñar, adecuar y elaborar cada uno de los protocolos seleccionados.
3. Diseñar y elaborar el manual de practicas para la Materia de Biología Molecular.

BIBLIOGRAFÍA.

- Ausubel D.P., Novak J.D., Hanesian H. Psicología educativa, un punto de vista cognoscitivo. México, Trillas, Mayo 1998.
- Gil Quesada F.J. et al. Enciclopedia general de la educación. Didácticas específicas. Ciencias Experimentales. Vol.3, Editorial Océano; Barcelona, España 1997.
- Guzmán Jesús, Carlos. Implicaciones educativas de seis teorías Psicológicas. UNAM. CONALTE, México1993.
- Johnson D.W. y Johnson R.T. Aprender juntos y solos; Aprendizaje cooperativo, competitivo e individualista. Editorial Aique, Argentina 1999.
- Mateo J. y colbs. (1999). Enciclopedia General de la Educación. Edit. Océano, Barcelona.

Capitula No. 2 **Manual**



Universidad de Guadalajara

C. U. C. B. A.

MANUAL DE PRÁCTICAS DE
BIOLOGÍA MOLECULAR



*El destino de la humanidad, está en la
manipulación y aprovechamiento del
conocimiento propio, en la conservación
del ambiente como parte de la naturaleza
y de la existencia de la vida.*

Lic. Biología

Patricia Castro Reyes

ÍNDICE DE MANUAL DE PRÁCTICAS

	Págs.
1. Portada.....	1
2. Introducción al Laboratorio de Biología Molecular	
2.1. Medidas de Seguridad	
2.2. Lavado de cristalería.....	5
2.3. Conocimiento de Reactivos, Equipos y Herramientas del laboratorio de Biología Molecular	
2.4. Bibliografía.....	6
3. Práctica No.1	
Técnicas de Micropipeteo y Microcentrifugación.....	10
4. Práctica No.2	
Preparación de Soluciones Básicas para el Laboratorio de Biología Molecular.....	16
5. Práctica No.3	
Extracción de ADN Genómico.....	19
6. Práctica No.4	
Corrimiento Electroforético del DNA en Geles de Agarosa.....	23
7. Práctica No. 5	
Determinación Espectrofométrica de la Concentración de ADN.....	28
8. Práctica No. 6	
Amplificación del ADN Genómico por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	31
9. Práctica No. 7	
Corrimiento Electroforético en Geles de Poliacrilamida de los fragmentos Amplificados por RAPDs.....	35
10. Anexos 1	
Programa de la Materia de Biología Molecular.....	41
11. Anexo 2	
Preparación de Soluciones Concentradas y de Trabajo.....	44
11. Anexo 3	
Diagrama de Flujo de las Prácticas.....	47

“INTRODUCCIÓN AL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR”

- I. MEDIDAS DE SEGURIDAD.
- II. LAVADO DE CRISTALERÍA DE LABORATORIO.
- III. CONOCIMIENTO DE EQUIPOS Y HERRAMIENTAS DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR.
- IV. BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCIÓN:

Las técnicas de Biología Molecular involucran el uso rutinario de una variedad de equipos, herramientas y accesorios científicos que se han desarrollado a lo largo de los últimos 20-30 años; son relativamente sencillos de usar, pero precisos y costosos así que su uso necesita de algunas medidas de precaución.

Además, los reactivos que se manipularán durante las prácticas son potencialmente peligrosos por lo que es necesario conocer la naturaleza de los productos utilizados, y por supuesto es imprescindible respetar las medidas de precaución como el uso de bata, guantes, lentes, cubre boca y campana de extracción de humos.

I. MEDIDAS DE SEGURIDAD

Es importante prestar atención a las siguientes medidas de seguridad, ya que permiten el éxito del trabajo del laboratorio.

- 1) Utilizar bata de algodón (uso personal, OBLIGATORIO), guantes desechables, lentes de protección UV y campana de extracción de humos (cuando prepare reactivos volátiles y /o tóxicos).
- 2) Utilizar siempre un bulbo o pipetor para obtener los volúmenes precisos de las soluciones. NUNCA pipetear con la boca: es peligroso.
- 3) Preparar y acomodar sobre la mesa de trabajo todo el material y reactivos necesarios para un experimento.
- 4) Debido al uso de reactivos y equipos peligrosos en las prácticas de Biología Molecular es necesario conocer las reglas de uso de los siguientes reactivos químicos y equipo:
 - a. **Bromuro de Etidio:** La tinción con bromuro de etidio es el método más rápido, sencillo y sensible para teñir el ADN, gracias a sus propiedades fluorescentes y de unión al ADN. Sin embargo, es una sustancia mutagénica y posiblemente carcinogénica (se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN) por lo que se debe de manejar con mucha precaución y no contaminar el espacio y utensilios de trabajo.

- b. **Fenol:** El fenol es una sustancia muy corrosiva que puede causar quemaduras muy severas. Es necesario usar guantes, bata y lentes de protección para manipularlo además de una campana de extracción de humo (no lo hará el estudiante). En caso de contacto enjuagar con mucha agua, y después lavar con jabón y agua.
- c. **Acrilamida y Bis-acrilamida:** La acrilamida es un neurotóxico muy agresivo que se absorbe a través de la piel. El efecto de la acrilamida es acumulativo. Use guantes y máscara cuando pese la acrilamida y la bis-acrilamida en polvo. Use guantes cuando manipule soluciones que contienen estas sustancias químicas. Aunque la Poli-acrilamida (una vez polimerizada) está considerada generalmente como NO-toxica, se recomienda manipular los geles con guantes ya que puede contener cantidades pequeñas de acrilamida no polimerizada.
- d. **Transiluminador:** El transiluminador emite radiaciones ultravioletas (302 nm) las cuales son peligrosas en particular para la retina de los ojos. NUNCA mire directamente hacia la fuente de luz UV sin protección. Para minimizar la exposición es indispensable utilizar lentes protectores (tipo UV), careta, bata y guantes para cubrir toda la piel. Además el transiluminador podría estar contaminado con bromuro de etidio así que es necesario manejarlo con precaución.

II. LAVADO DE CRISTALERÍA DE LABORATORIO.

Se pedirá la colaboración del estudiante para la limpieza del material utilizado en la práctica:

- a. Enjuagar con agua de la llave el material sucio (usar guantes de hule).
- b. Preparar un litro de una solución de Extran al 5% (detergente).
- c. Con esponja y escobilla lavar cada una de las piezas.
- d. Enjuagar abundantemente con agua de la llave.
- e. Enjuagar con agua destilada 2 veces.
- f. Enjuagar con agua desionizada.
- g. Dejar el material en el escurridor.
- h. Secar el material de vidrio y de acero en un horno de secado (50°C).
- i. Apartar el material que necesita esterilización en autoclave.

III. CONOCIMIENTO DE EQUIPOS Y HERRAMIENTAS DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

Balanza de precisión:

La balanza de precisión permite pesar pequeñas cantidades definidas de reactivo (entre 1 mg y 1 g.).

Baño María:

El Baño María permite mantener los reactivos o tubos de reacción a una temperatura constante establecida, por ejemplo se trabaja típicamente a 37°C con endonucleasa de restricción y a 50°C y 65°C para la lisis celular durante la extracción de ADN.

Cámara de electroforesis horizontal y Fuente de Poder

La cámara de electroforesis permite de establecer una corriente eléctrica entre los dos extremos del gel de electroforesis, permitiendo así el desplazamiento de las moléculas de estudio. La fuente de poder permite alimentar a la cámara de electroforesis con una corriente constante.

Cámara polaroid con película tipo 667:

Este tipo de cámara fotográfica instantánea se usa para fotografiar geles teñidos con bromuro de etidio. La cámara viene equipada con una caperuza que facilita el enfoque (existen en diferentes tamaños según el tamaño del gel). Para fotografiar geles teñidos con Bromuro de Etidio se recomienda utilizar una película de alta velocidad tipo 667 (ISO 3000) así se obtiene un registro permanente del gel (el cual no se puede almacenar más de unos días y no se puede secar; a menos que se utilice una agarosa especial). El tiempo de exposición varía con la cantidad del ADN, el nivel de tinción, el grosor del gel y la densidad del filtro.

Campana de extracción de humos:

La campana de extracción permite trabajar en condiciones de seguridad con soluciones volátiles, ya que un motor permite extraer los humos.

Espectrofotómetro UV-visible y Cubetas de cuarzo:

La luz ultravioleta se puede utilizar para determinar la cantidad del ADN extraído así como para evaluar su pureza (a 260 y a 280 nm respectivamente). Para medir longitudes de onda en el rango del ultravioleta se necesita de una luz especial emitida por una lámpara de deuterio ya que la lámpara visible (de tungsteno) no produce suficiente energía en esta región del espectro electromagnético para permitir mediciones correctas.

Para medir las concentraciones de ácidos nucleicos en solución es necesario trabajar en el rango del UV. Las longitudes de onda cortas que se deben de utilizar para estudiar el ADN son absorbidas por el plástico o el vidrio. Como consecuencia se utilizará cubetas de cuarzo cuyo precio es elevado por lo que es importante manipularlas con sumo cuidado, al igual que el espectrofotómetro.

Microcentrifuga:

La centrifuga es un equipo a través del cual se aprovecha la fuerza centrífuga para separar líquidos de distintas intensidades, o las sustancias sólidas de un líquido en que están suspendidas. Ello constituye un método sistemático de separación de grandes partículas de una solución o suspensión. Como lo indica su nombre, las microcentrifugas fueron diseñadas para centrifugar cantidades pequeñas de muestras (menos de 2 ml) colocadas en tubos especiales (microtubos) resistentes a altas velocidades (hasta 14,000 rpm).

Micropipetas:

Una micropipeta es esencialmente una bomba de alta precisión unida a una punta desechable. El volumen de aire disponible en el barril se ajusta girando el botón más adentro o afuera del pistón y el volumen disponible se visualiza en una graduación. Al apretar el botón (hasta el primer tope) se desplaza el volumen específico de aire del pistón y al liberar el botón se crea un vacío, el cual desplaza un volumen equivalente de solución. El volumen extraído se expulsa apretando otra vez el botón (hasta el segundo tope).

Las micropipetas permiten pipetear volúmenes pequeños con alta precisión. Existen varios tipos de micropipetas (volumen fijo o variable) con diferentes rangos de capacidades (de 0.2-5 μl , 0.5-10 μl , 2-20 μl , 5-40 μl , 20-200 μl , 100-1000 μl). Es muy importante conocer el uso y manejo adecuado ya sea para un pipeteo correcto o para evitar daños en el mecanismo de las mismas. Ver mas abajo los ejercicios prácticos correspondientes.

Plancha con termostato y agitador magnético:

Esta herramienta ayuda en la preparación de soluciones calentándolas en acción de una resistencia eléctrica y agitándolas con la fuerza de centrifugación con una barra magnética.

Potenciómetro:

La gran mayoría de las reacciones químicas y biológicas, se llevan a cabo en soluciones acuosas. La concentración de los iones H^+ y OH^- en el agua determina la alcalinidad, acidez o neutralidad de las soluciones acuosas. Mientras más grande es la concentración de iones hidrogeno, más bajo es el pH de una solución. En la determinación electroquímica del pH, se utiliza la diferencia de un potencial eléctrico entre dos soluciones de diferente pH, separadas de una membrana por un vidrio especial. Un sistema completo para la medición de pH, esta integrado por un electrodo de vidrio, un electrodo de referencia, un medidor de pH y la solución de muestreo (Manual de fisiología).

Es muy importante saber usarlo adecuadamente para una medición correcta del pH de la solución.

Transiluminador:

El transiluminador emite radiaciones ultravioletas a 302 nm, que atraviesen el gel y permitan la visualización del ADN teñido con bromuro de etidio gracias a las propiedades fluorescentes del mismo.

Termociclador:

Este equipo permite la amplificación in vitro del ADN. Básicamente se trata de una placa en la cual se colocan los microtubos y que el equipo calienta o enfría repetidamente a las temperaturas deseadas durante un tiempo definido.

Vortex:

Este aparato permite agitar soluciones contenidas en un tubo de ensayo o microtubo de forma variable.

BIBLIOGRAFÍA:

- 1) Arriaga Ma. C.; Neri C. Manual de Prácticas Fisiología Vegetal. Universidad de Guadalajara.
- 2) Bloom, M. V.; Freyer, G. A.; Micklos, D. A. Laboratory DNA Science: An Introduction to Recombinant DNA Techniques and Methods of Genome Analysis. Editorial The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1996.
- 3) Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

PRÁCTICA No. 1

TÉCNICAS DE MICROPIPETEO Y MICROCENTRIFUGACIÓN.

INTRODUCCIÓN:

La mayoría de las reacciones con ADN y otras manipulaciones de ácidos nucleicos se realizan en tubos pequeños (microtubos o tipo Eppendorf) y con volúmenes tan pequeños como 1 μ l por ejemplo, con el fin de ahorrar reactivos costosos como enzimas y amortiguadores lo que involucra pipeteos precisos con micropipetas de volúmenes ajustables. Del buen pipeteo depende también el éxito de la mayoría de los experimentos.

La microcentrifuga es una herramienta indispensable en el laboratorio de Biología Molecular. Su uso requiere también de precaución elemental.

OBJETIVO GENERAL:

Que el alumno conozca la función, el manejo y las precauciones de la utilización de micropipetas y microcentrifuga que se usarán durante el desarrollo de las prácticas de Biología Molecular.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Que el alumno practique el manejo y programación de las micropipetas de volumen variable.
2. Que el alumno se familiarizarse con el manejo de la microcentrifuga, en particular con el balanceo de microtubos.
3. Que el alumno practique en la preparación de una reacción de amplificación del ADN por Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) utilizando micropipetas de volumen variable.

NOTAS PRELIMINARES:

CONVERSIONES MÉTRICAS Y MICROPIPETEO

Es importante empezar con unidades de medición y su conversión. Ahora nos concentraremos en las mediciones basadas sobre el litro, pero los mismos prefijos (mili- y micro-) también se aplican a la medición de sólidos, basado en el gramo. Las dos unidades más útiles para medir líquidos en Biología Molecular son el mililitro (ml) y el microlitro (μ l).

$$1 \text{ ml} = 0.001 \text{ litro}$$

$$1 \mu\text{l} = 0.000001 \text{ litro}$$

$$1,000 \text{ ml} = 1 \text{ litro}$$

$$1,000,000 \mu\text{l} = 1 \text{ litro}$$

MICROCENTRIFUGACIÓN

Es importante familiarizarse con la ubicación correcta de tubos de reacción en el rotor de la centrifuga. Los tubos (del mismo volumen) deben de ser balanceados en el rotor de la centrifuga para evitar dañar tanto al rotor como al eje del motor de la centrifuga. Otra precaución es usar tubos que resisten a las fuerzas de centrifugación con el fin de evitar rupturas durante la centrifugación y por lo tanto la pérdida de las muestras y daños al rotor y a la centrifuga.

Antes de utilizar las centrifugas (de 6 y 12 pozos) proporcionadas por el Maestro, tome un momento para responder a la siguiente pregunta: ¿Cómo colocaría en la centrifuga 2,3,4,5 y 6 tubos del mismo volumen, en un rotor de 6 y 12 pozos? (realizar un esquema del rotor)

MICROPIPETEO

Un pipeteo impreciso es una de las principales causas de malos resultados en un experimento. Si esta usted poco familiarizado con el manejo de las micropipetas tome tiempo para practicar. Rápidamente estas técnicas serán para usted muy fáciles.

a. Tome las siguientes precauciones cuando utilice una micropipeta digital:

- Verifique la etiqueta que precisa el rango del volumen de cada pipeta.
- Nunca gire el ajustador de volumen fuera de los límites máximo y mínimo del rango de la pipeta como lo indica el fabricante sobre cada pipeta.
- Nunca utilice la micropipeta sin una punta desechable, esto podría arruinar el pistón.
- Nunca invierta o recargue horizontalmente la micropipeta con una punta llena, pues el fluido podría entrar en el pistón.
- Nunca libere el botón rápidamente después de haber pipeteado el fluido, esto podría dañar al pistón y la medición no sería la real.
- Nunca introduzca el barril de la micropipeta en el líquido.
- Nunca exponga al fuego el barril de la micropipeta.
- Nunca reutilice una punta que se ha usado para cargar otro reactivo.

b. Manejo general de micropipetas de volumen variable

1. Rotar el ajustador de volumen al nivel deseado. Note que la posición del botón cambia cuando se modifica el volumen. Asegúrese también de ubicar bien los decimales
2. Sujete firmemente la punta adecuada en el extremo de la micropipeta.
3. Cuando succione o expulse el líquido, mantenga firmemente el tubo entre el pulgar y el índice. Mantener el tubo al nivel de los ojos para poder observar un cambio en el nivel del líquido en la punta de la pipeta. No pipetear con el tubo en la gradilla. No permita que otra persona sostenga el tubo mientras usted pipetea.

4. Cada tubo debe estar sostenido en la mano cuando se esta manipulando y abrirse con el pulgar. Mantenga el tubo por su cuerpo y no por la tapa evitando así contaminaciones a través de la boca del tubo.
5. Para un mejor control, agarre la micropipeta en la palma de su mano con los dedos alrededor del barril, controlando el botón con el pulgar. Mantenga la pipeta en una posición casi vertical.
6. La mayoría de las micropipetas tienen un botón de dos-posiciones (o tope). Cuando se aprieta hasta el primer tope se mide el volumen deseado. Cuando se aprieta más (al segundo tope) se introduce un volumen suplementario de aire permitiendo así sacar cualquier solución que se halla quedado en la punta. Controlar con el pulgar estas dos posiciones.
7. Para pipetear la muestra del tubo:
 - a. Presione el botón hasta el primer tope y manténgalo en esta posición. Introduzca la punta en la solución a pipetear. Succione la solución con la punta soltando lentamente el botón. Asegúrese que la punta se quede dentro de la solución cuando suelte el botón.
 - b. Pase el extremo de la punta dentro del tubo para quitar cualquier gota en exceso que se halla quedado adherida fuera de la punta.
 - c. Verifique que no se quedaron burbujas de aire en la punta. Para evitar futuros errores de pipeteo aprende a reconocer los niveles aproximados de llenado de las puntas para volúmenes determinados.
 - d. Si usted nota una burbuja de aire o un espacio de aire en la punta, regrese con precaución el fluido en el tubo del reactivo. Centrifugue el tubo (un pulso) para bajar toda la solución al fondo de éste.
8. Para colocar el volumen pipeteado en el tubo de reacción:
 - a. Coloque la punta de la pipeta en el interior del tubo, eso crea un efecto de capilaridad que ayudará a sacar el fluido de la punta.
 - b. Lentamente, presione el botón hasta el primer tope para vaciar la muestra. Presione al segundo tope para sacar de la punta los últimos residuos del líquido.
 - c. Manteniendo el botón apretado saque la punta de la pipeta del reactivo que se acaba de depositar evitando así de volver a succionar el líquido en la punta.
 - d. Remueva la punta de la micropipeta con la mano o con la micropipeta en un vaso de precipitado reservado para tal fin o tipo de punta ubicado sobre la mesa de trabajo. La punta se saca apretando el botón más allá del segundo tope o apretando otro botón específico para eliminar las puntas.
9. Para prevenir la contaminación cruzada de reactivos:
 - a. Agregue siempre secuencialmente los reactivos a los tubos de reacción.
 - b. Coloque cada gota de reactivo en un lugar diferente dentro de la pared del tubo, cerca del fondo. De esta manera la misma punta se puede utilizar para pipetear la misma solución en diferentes tubos
 - c. Utilice una nueva punta para cada reactivo a pipetear
 - d. Si la punta se contamina, cámbiela

PRÁCTICA CON UNA MICROPIPETA DE VOLUMEN PEQUEÑO

Preparación del material:

Reactivos	Materiales
1 ml de solución I, coloreada	micropipeta de 100-1000 μl con puntas
1 ml de solución II, coloreada	micropipeta de 0.5-10 μl con puntas
1 ml de solución III, coloreada	vaso de precipitado para puntas usadas
1 ml de solución IV, coloreada	microcentrifuga (14,000 rpm)
25 ml de solución V, coloreada	marcador permanente
	gradilla
	microtubos (0.5 ml -1.5 ml)

Este ejercicio simula la preparación de una reacción de PCR, utilizando una micropipeta con un rango de 0.5-10 μl o 1-20 μl .

1. Con un marcador rotular tres tubos de 1.5 ml: A, B, C.
2. Utilizar la siguiente tabla para agrega las soluciones correctas en cada uno de los tubos.

Tubo	Solución I	Solución II	Solución III	Solución IV
A	4 μl	5 μl	1 μl	-
B	4 μl	5 μl	-	1 μl
C	4 μl	4 μl	1 μl	1 μl

3. Programar la micropipeta con 4 μl y agregar la Solución I a cada tubo de reacción.
4. Con una punta nueva adicionar el volumen apropiado de la Solución II en otro lugar de los tubos A, B y C.
5. Con una punta nueva agregar 1 μl de la Solución III a los tubos A y C.
6. Con una punta nueva agregar 1 μl de la Solución IV a los tubos B y C.
7. Cerrar los tubos, mezclar los reactivos con uno de los siguientes métodos:
 - a. Pegando el fondo del tubo sobre la mesa de trabajo asegurándose que todas las gotas se agruparon en una sola en el fondo del tubo.
 - b. Dando un pulso de unos segundos en una microcentrifuga, asegurándose que los tubos de reacción estén ubicados de manera balanceada en el rotor de la microcentrifuga. (Centrifugar los tubos en una posición no balanceada dañaría el eje de la microcentrifuga.).
8. Así, se agregó un volumen total de 10 μl en cada tubo de reacción. Para verificar la certeza de sus mediciones, ponga la micropipeta en 10 μl y saque con precaución la solución de cada tubo.

- a. ¿ Está la punta completamente llena?
- b. ¿ Queda un pequeño volumen en el fondo del tubo? Esto indica en este sobre medición.
- c. ¿ Después de haber pipeteado todo el volumen, queda un espacio de aire en el extremo de la punta lo que indicaría una medición demasiado baja. El volumen real del líquido se puede determinar simplemente rotando el botón hasta expulsar el aire de la punta, entonces se lee el volumen del líquido presente en el tubo directamente de la micropipeta.

9. Si las mediciones no fueron adecuadas, repetir el ejercicio hasta obtener resultados casi perfectos.

PRÁCTICA CON UNA MICROPIPETA DE VOLUMEN GRANDE

Este ejercicio simula una reacción de transformación bacteriana, preparación de plásmidos o extracción de ADN, utilizando una micropipeta de rango 100-1000 μl . No es tan fácil pipetear cuando se utiliza una micropipeta para volúmenes grandes, los errores pueden ser considerables.

1. Con un marcador rotular dos tubos de 1.5 ml: E y F.
2. Utilice la siguiente tabla para agregar las soluciones correctas a cada uno de los tubos.

Tubo	Solución I	Solución II	Solución III	Solución IV
E	100 μl	200 μl	150 μl	550 μl
F	150 μl	150 μl	350 μl	250 μl

3. Programe la micropipeta y agregue los volúmenes apropiados de las Soluciones I-IV a cada tubo de reacción. Seguir el mismo procedimiento de la micropipeta de volumen pequeño.
4. El volumen total es de 1000 μl en cada tubo de reacción. Para verificar la precisión de sus mediciones, con la micropipeta en 1000 μl saque con precaución la solución de cada tubo.
 - a. ¿ Está el extremo de la punta completamente lleno?
 - b. ¿ Queda un pequeño volumen en el fondo del tubo?
 - c. ¿ Queda aire en el extremo de la punta?
5. Si las mediciones no fueron adecuadas, repetir el ejercicio hasta obtener resultados casi perfectos.

REPORTE DE PRÁCTICA

1. Listar y comentar las medidas preventivas que usted tomaría antes de trabajar en un laboratorio de Biología Molecular.
2. ¿Por qué los tubos deben balancearse en el rotor de la microcentrifuga?
3. ¿Cuáles son los errores comunes de pipeteo?. Comentar también su experiencia, ¿cuántas veces tuvo que pipetear para obtener volúmenes exactos?, ¿Cómo supo que eran volúmenes exactos?
4. ¿Por qué es necesario dominar las técnicas de pipeteo?

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Bloom, M. V.; Freyer, G. A.; Micklos, D. A. Laboratory DNA Science: An Introduction to Recombinant DNA Techniques and Methods of Genome Analysis. Editorial The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1996.
- 2) Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

PRÁCTICA No. 2

“PREPARACIÓN DE SOLUCIONES BÁSICAS PARA EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR”

INTRODUCCIÓN:

Durante esta práctica se prepararán las soluciones necesarias para la realización de las futuras prácticas. Es indispensable que las soluciones se preparen adecuadamente para asegurar el éxito de las prácticas de Biología Molecular

Todas las soluciones tienen una composición química precisa: mezcla de componentes y concentraciones definidas, pH, solubilidad y condiciones de almacenamiento. Además por cuestiones prácticas, muchas soluciones se preparan en forma concentrada (2, 5, 10 veces concentradas = 2X, 5X, 10X) y se diluyen al momento de su uso generalmente a 1X.

Aquí no se pretende preparar todas las soluciones que se utilizan durante la práctica, sin embargo, es importante que el alumno consulte el Anexo 2 donde se detallan las mismas, así como su modo de preparación.

OBJETIVO GENERAL:

Que el alumno aprenda a preparar algunas soluciones típicas a utilizar en las prácticas de Biología Molecular.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Que el alumno aprenda a preparar las soluciones concentradas con las cuales trabajará a lo largo de las prácticas.
- Que el alumno aprenda a valorar la importancia de este paso preliminar (pesar, calcular molaridades, porcentajes, medir el pH, etc.) en el éxito de los protocolos experimentales.

METODOLOGÍA:

I. Preparación del material

<u>Reactivos</u>	<u>Materiales</u>
Ácido bórico	Vasos de precipitado de 150 ml y 2 litro
Agua Desionizada (H ₂ O)	Matraces aforados de 100 ml y 1 litro
EDTA *	Balanza analítica (o de precisión).
Tris base **	Potenciómetro
Solución saturada de NaOH	Barras magnéticas
Pastillas de NaOH	

II. Guía de preparación de las soluciones:

EDTA, pH 8, 0.5 M

Para preparar 100 ml: en un vaso de precipitado de 150 ml, agregar 18.61 g de EDTA a 80 ml de agua desionizada. Mezclar vigorosamente y entibiar la solución. Ajustar el pH agregando pastillas de NaOH hasta que se disuelva la sal (cerca del pH 8) y después con una solución saturada de NaOH.

Transferir la solución a un matraz volumétrico y aforar a 100 ml.

* EDTA= Ácido etilendiamine-tetraacético

Autoclave (opcional), almacene en refrigeración.

Solución concentrada de TBE 5X

Para preparar un litro: mezclar y disolver en un vaso de precipitado de 2 litros:

Tris base: 54 g;

Ácido Bórico: 27.5 g;

Solución de EDTA 0.5M, pH 8: 20 ml.

Pasar la solución a un matraz volumétrico y aforar a 1 litro.

** TRIS-HCl= Trizma Base= Tris(hidroximetil aminometano)

Autoclave (opcional), almacene en refrigeración.

Solución de trabajo TBE 0.5X

Para preparar un litro: mezclar 100 ml de TBE 5X con 900 ml de agua desionizada en una probeta de 1 litro.

REPORTE DE PRÁCTICA

Debido a la importancia de las soluciones a utilizar en las prácticas de Biología Molecular, es necesario familiarizarse con los reactivos y soluciones que se utilizarán.

1. Comente cuáles conocimientos previos estuvo aplicando usted y cuáles aptitudes adquirió durante la práctica.
2. Entregar una tabla en donde describa las fórmulas condensadas y esquemáticas de cada uno de los reactivos utilizados (Ver también los compuestos del Anexo 1) así como su peso molecular.

Ejemplo:

Compuesto	Formula condensada	Formula esquemática	Peso molecular

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Bloom, M. V.; Freyer, G. A.; Micklos, D. A. Laboratory DNA Science: An Introduction to Recombinant DNA Techniques and Methods of Genome Analysis. Editorial The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1996.
- 2) Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

PRÁCTICA No. 3

“EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO”

INTRODUCCIÓN:

El aislamiento del ADN es uno de los procesos más utilizados en muchas áreas de la genética molecular. El ADN purificado es necesario para estudios básicos de estructura, química y manipulación, así como relaciones proteínas-ADN, hibridación de ADN-ADN y ADN-ARN, secuenciación, clonación; por mencionar algunas. Originalmente el ADN se aisló de bacterias pero hoy en día existen múltiples protocolos para aislar ADN de cualquier ser vivo o muerto, sin embargo, de manera general los pasos comunes son la lisis celular y la precipitación del ADN.

Casi todas las técnicas que se utilizan para separar y aislar macromoléculas celulares, requieren que estén disueltas en el citosol; así se obtienen fácil y rápidamente por centrifugación de las células disgregadas. Las macromoléculas en solución en el sobrenadante resultante de la centrifugación se purificarán y precipitarán para separarlas de los componentes no deseados. Por ejemplo, para la separación del ADN de las otras macromoléculas, tanto el fenol como la mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) se usan comúnmente para disociar las proteínas de los ácidos nucleicos.

OBJETIVO GENERAL:

Que el alumno aprenderá un método estándar de extracción de ADN utilizando un protocolo sencillo y clásico.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Que el alumno realice cada paso de un protocolo clásico de extracción de ADN.
- Que el alumno conozca las propiedades y efectos bioquímicos y moleculares de los reactivos utilizados en la extracción de ADN genómico.

METODOLOGÍA:

I. PREPARACIÓN DEL MATERIAL.

Reactivos

100 mg de músculo fresco de Tilapia
 Amortiguador de lisis STE (Anexo 2)
 SDS al 20 % (Anexo 2)
 Fenol equilibrado
 NaOH 3M
 FCI (Anexo 2)
 CI (Anexo 2)
 Acetato de sodio 3M, pH 5.2

Material, Equipo y Accesorios

Baño María
 Homogeneizador de porcelana
 Micropipeta 100-1,000 μ l y puntas
 Micropipeta 10-100 μ l y puntas
 Micropipeta 0.5-10 μ l y puntas
 Tubo cónico 15 ml
 Tubos Eppendorf
 Microcentrifuga

Etanol al 100 %
 Etanol al 70%
 Amortiguador T.E. (Anexo 2)

Dispensador de puntas
 Guantes desechables
 Pipetas Pasteur
 Campana de extracción de humos
 Cronómetro

II. EXTRACCIÓN DE ADN.

1. ETAPA PRELIMINAR:

Pre-Calentar el baño María a 50–65 °C
 Reunir el equipo y herramienta necesarios.
 Disponer de las soluciones preparadas anteriormente.
 Pesar 100 mg de músculo fresco de Tilapia.

2. PREPARACIÓN DEL TEJIDO Y LISIS CELULAR:

1. **HOMOGENIZACIÓN DEL TEJIDO.** Homogeneizar aproximadamente 100 mg de tejido en 1 ml de amortiguador de lisis STE con el homogeneizador de porcelana.
2. **LISIS QUÍMICA.** Con la ayuda de una pipeta pasteur, transferir el homogeneizado a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml, añadir 70 µl de SDS al 20% y agitar suavemente (el SDS inhibe también a las ADNasas).
3. **LISIS POR CALOR.** Calentar el material lisado a 50-60 °C durante 15 minutos, mezclar cada 2 minutos.
4. Centrifugar durante 5 minutos a 7,000 rpm, para precipitar los residuos celulares.
5. Descartar el botón con un palillo estéril.

3. PRECIPITACIÓN SELECTIVA DE LAS PROTEÍNAS COEXTRAIDAS CON EL ADN

6. En la campana de extracción de humos, añadir al tubo 700 µl de fenol equilibrado, cerrar muy bien el tubo, mezclar suavemente por inversión e incubar 5 minutos a temperatura ambiente. En esta etapa que se observa un precipitado gris.
7. Centrifugar a 7000 rpm 5 minutos.
8. Transferir la fase acuosa (superior) a un microtubo nuevo de 1.5 ml (no transferir la interfase, ni la fase orgánica)
9. Repetir las etapas 6, 7, 8 si la fase acuosa no es clara.
10. A la última fase acuosa recuperada añadir 700 µl de FCI (bien homogeneizado al momento de usarlo), cerrar bien el tubo, mezclar con suavidad por inversión e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
11. Centrifugar a 7000 rpm 5 minutos.
12. Transferir la fase acuosa a un microtubo nuevo de 1.5 ml sin tocar la interfase ni la fase orgánica.
13. Repetir las etapas 10, 11, 12 si la fase acuosa no es clara.
14. A la última fase acuosa recuperada, añadir 700 µl de CI (homogeneizado), cerrar bien el tubo, mezclar con suavidad por inversión 5 minutos a temperatura ambiente.
15. Centrifugar a 7000 rpm 5 minutos.
16. Transferir la fase acuosa a un microtubo nuevo de 1.5 ml sin tocar la fase orgánica.
17. Repetir las etapas 14, 15, 16 si la fase acuosa no es clara.

4. PRECIPITACIÓN SELECTIVA DEL ADN : La precipitación con etanol se usa comúnmente para ADN y ARN.

18. Evaluar el volumen resultante de la fase acuosa y añadir 1/10 partes de este volumen en forma de acetato de sodio 3M, pH 5.2, cerrar el tubo y mezclar suavemente.
19. Añadir 2 a 3 volúmenes de etanol al 100%, frío (-20° C), cerrar el tubo, mezclar suavemente. Es posible observar el ADN precipitando como hilos gris / blanco. Dejar el tubo a -20 °C de 30 minutos a 12 horas. Si la concentración del ADN es suficiente (superior a 1µg / ml el ADN precipitará en 10 a 15 minutos. El acetato de sodio (0.3M concentración final) gracias a sus cationes monovalentes neutraliza la carga negativa del ADN y junto con la adición del etanol favorece su precipitación (insolubilización en agua).
20. Centrifugar, 10 minutos a 10,000 rpm. (bajo refrigeración), se observará un precipitado (pastilla) blanco al fondo del tubo.
21. Descartar el sobrenadante con precaución (que no se desprege la pastilla), agregar 1 ml de etanol 70% frío, invertir el tubo varias veces, centrifugar a 10,000 rpm, 5 minutos.
22. Repetir una vez más el paso 21.
23. Descartar el sobrenadante, secar el precipitado a vacío o en el aire.
24. Agregar 50 µl de T.E., cerrar el tubo, disolver el ADN con golpes suaves, almacenar de -20 a -70 °C.

REPORTE DE PRÁCTICA

La minipreparación es un procedimiento sencillo y eficiente para aislar ADN:

1. Investigue y comente los efectos bioquímicos y moleculares de las soluciones y / o reactivos (Amortiguador de lisis, fenol, Acetato de Sodio, Etanol al 70%, C:I, isopropanol, T.E., FCI, CI) utilizados en el protocolo.
2. ¿ Observó Ud. la formación de dos fases después de las centrifugaciones en presencia de solventes orgánicos?, ¿ A que se deben ?
3. ¿ Observó Ud. un precipitado de ADN ?
4. Considerando los tres tipos de moléculas orgánicas: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, ¿ Cuál paso del protocolo actúa sobre proteínas, lípidos y ácidos nucleicos respectivamente?

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Este protocolo fue modificado del protocolo de Hillis D.M., A.Larson, S.K. Davis y Zimmer E.A., *Nucleic Acids III.: Sequencing*. pp. 318-371. En Hillis D.M. y C. Moritz (eds) *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.EUA.
- 2) Bloom, M. V.; Freyer, G. A.; Micklos, D. A. *Laboratory DNA Science: An Introduction to Recombinant DNA Techniques and Methods of Genome Analysis*. Editorial The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1996.
- 3) *Molecular Cloning, a laboratory manual, Segunda Edición*, Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

PRÁCTICA No. 4

“CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO DEL ADN EN GELES DE AGAROSA”

INTRODUCCIÓN:

De manera general después de extraer el ADN se verifica su concentración y calidad, así como la posible contaminación por proteínas coextraídas y sales. Para esto se utilizan diferentes metodologías como la electroforesis horizontal y la espectrofotometría.

La electroforesis tanto en geles de agarosa (llamado también Horizontal o Submarina) como en geles de poliacrilamida (Vertical) se ha convertido en una técnica básica en el área de la Biología Molecular. Es esencial para los procedimientos de clonación, purificación de fragmentos de restricción, mapas de restricción, transferencias de Southern y Northern, análisis de polimorfismos del ADN y secuenciación. La elección de uno o otro tipo de electroforesis depende en particular del tamaño (en pares de bases) del ADN a estudiar. Los geles de acrilamida son muy eficientes para separar moléculas de ADN de entre 5 y 500 pares de bases (pb), su poder resolutivo es muy alto (hasta de 1 pb). Sin embargo su manejo es más peligroso que el de agarosa. Los geles de agarosa tienen un poder resolutivo más bajo que la poliacrilamida pero también un rango de separación más alto (de 200 hasta 50,000 pb, según la concentración de la agarosa: 0.3 a 2 %).

Los científicos han usado la propiedad de carga eléctrica del ADN para elaborar una metodología que permite separar los fragmentos de ADN en base a diferencias del tamaño en pb. Así una solución que contiene la mezcla de fragmentos de ADN se coloca en un pequeño pozo (punto de aplicación) en el gel. Un campo eléctrico hace que las moléculas de ADN se muevan, así el ADN de carga negativa se desplaza hacia el electrodo positivo (ánodo) en un campo eléctrico constante: imagine que el gel es una malla con poros muy pequeños que dejan que las moléculas pequeñas se muevan rápidamente a través de él. Mientras, más grande es el tamaño de la partícula, más lenta es su migración. Así, después de un periodo de exposición a un campo eléctrico constante, los fragmentos se separan por tamaño. Los fragmentos de mismo tamaño tienden a desplazarse juntos en el gel. El grupo de fragmentos de mismo tamaño forma una concentración llamada “banda” que agrupa los fragmentos con estas características.

El gel de agarosa es fácil de preparar, cargar, correr y teñir (con un colorante Bio-Seguro o con bromuro de etidio). La migración de la molécula de ADN dentro del gel de agarosa sometido a un campo eléctrico es inversamente proporcional al logaritmo de su tamaño. Así fragmentos cortos de ADN migran más rápidamente que los fragmentos largos. Cargando en el gel moléculas de ADN de tamaño conocido (estándares o marcadores de ADN) es posible determinar con certeza el tamaño del ADN de estudio después de su electroforesis, tinción y análisis.

OBJETIVO GENERAL:

Que el alumno se introduzca en el análisis del ADN genómico a través de la electroforesis en geles de agarosa.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Que el alumno aprenda a estudiar los fundamentos de la Técnica de electroforesis.
- Que el alumno practique la elaboración, carga, corrimiento y tinción de un gel de agarosa.
- Que el alumno aprenda a determinar la calidad del ADN extraído en la práctica anterior a través del análisis de su corrimiento electroforético.

METODOLOGÍA:**I. Preparación de los reactivos.**

Reactivos	Materiales, Equipo y Accesorios
Agarosa	Matraz Erlenmeyer
TBE 0.5X	Plancha con agitador
Jugo azul	Micropipeta 10-100 µl y puntas
Marcador de ADN	Micropipeta 0.5-10 µl y puntas
Bromuro de etidio o colorante "Bio-Seguro"	Micropipeta 10-100 µl y puntas
Jugo azul (amortiguador de carga)	Cámara electroforética con molde y peines, fuente de poder
	Guantes desechables
	Vortex
	Transiluminador
	Cámara fotográfica Polaroid
	Microcentrifuga
	Cinta
	Película 667

II. Preparación del gel de agarosa:

Se recomienda utilizar una concentración de agarosa de 0.8 %, ya que ésta concentración proporciona una resolución excelente para análisis de ADN genómico y minimiza el tiempo de corrimiento electroforético (30 minutos).

1. Etiquetar un matraz Erlenmeyer de 250 ml con "agarosa al 0.8%", adicionar 0.8 gr. de agarosa y 100 ml de TBE 0.5X. El corrimiento se hará en este mismo amortiguador, para que el gel y el amortiguador de corrimiento tengan la misma fuerza iónica.
2. Calentar la solución en un horno de microondas o en una plancha calentadora hasta que la agarosa se funda completamente (la solución se pone transparente, dejar que se enfríe a 60°C (cuidado: no ponga el frasco caliente sobre una superficie fría).

Mientras se enfría la solución, sellar los extremos del molde de electroforesis con cinta. Apretar fuertemente la cinta para que no se produzcan fugas.

3. Poner y nivelar el molde sobre la mesa de trabajo, acomodar los peines (0.5 mm arriba del fondo del molde), vaciar la agarosa tibia (0.5 cm de alto).
4. Dejar solidificar la agarosa y sacar el peine, levantándolo con precaución, eliminar la cinta.
5. Vaciar el amortiguador TBE 0.5X a la cámara de electroforesis horizontal y sumergir el molde con el gel en la cámara con los pozos de carga hacia el electrodo negativo o cátodo (negro). El ADN correrá hacia el polo positivo (rojo, ánodo). Verificar el nivel del TBE tiene que cubrir apenas (2 mm) el gel y los pozos. El exceso de buffer encima del gel provocará que menos corriente atraviese el gel y el corrimiento se retrasará.

III. Corrimiento electroforético:

1. Descongelar las muestras de ADN genómico, agitar con el Vortex (15 segundos) y centrifugar (10,000 rpm. a 30 segundos) para precipitar las partículas no disueltas en T.E.
2. Mezclar en un tubo nuevo (o sobre un trozo de parafilm), 2 μ l de jugo azul y 10 μ l de la muestra de ADN. Dar un pulso de centrifugación.
3. Aplicar en el primer carril el marcador de ADN (12 ml).
4. Colocar los 12 μ l en el pozo del gel. Los pozos se visualizan mejor con un fondo negro bajo la cámara de electroforesis.
5. Sin mover la cámara, poner la tapa, conectar los cables a la fuente de poder. Asegurarse que los pozos de carga quedan del lado del electrodo negativo (negro) para que el ADN migre hacia el polo positivo (rojo). Bajar el voltaje a 0 y encender la fuente de poder, subir el voltaje a 90 V y dejar el corrimiento hasta que el colorante azul (azul de bromofenol) se desplace hasta tres cuartas partes del gel (aproximadamente una hora dependiendo del tamaño del gel).

NOTA: Jugo azul o amortiguador de carga 6X (concentrado 6 veces)

El jugo azul contiene 2 colorantes (0.25% de azul de bromofenol y 0.25% de cianol xileno FF) que adicionan color a la muestra (así se puede evaluar el avance del ADN durante la electroforesis) y un alto porcentaje de glicerol (30%) que incrementa la densidad de la solución a cargar en el gel, simplificando así el proceso de aplicación de las muestras. El azul de bromofenol migra aproximadamente 2.2 veces más rápidamente que el xileno cianol independientemente de la concentración del agarosa. El azul de bromofenol migra, a la misma velocidad que el ADN de doble cadena de 300 pares de bases de largo y el xileno cianol FF migra de manera similar al ADN de doble cadena de 4 Kb.

Se proporciona preparado al momento de la práctica.

IV. Tinción del gel de agarosa con bromuro de etidio (lo hará el Maestro):

1. Con mucha precaución (no olvidar bata y guantes) deslizar el gel de agarosa en un recipiente con bromuro de etidio a 1 μ g/ml o en un colorante Bio-seguro, lo suficiente

para cubrir el gel (ver Introducción al Laboratorio de Biología Molecular, para recordar el manejo adecuado del bromuro de etidio). Teñir por 15 minutos para que el colorante entre en el gel y se una al ADN. Es aconsejable trabajar en equipo de dos personas: una con guantes, que maneje el gel (contaminado con bromuro de etidio), otra que maneje las cosas no contaminadas, evitando así contaminaciones involuntarias (cerraduras de puerta, pipetas, mesa y accesorios).

2. Enjuagar el gel poniéndolo en otro recipiente con agua desionizada, por 5 minutos. El gel se maneja con una espátula reservada a este uso y etiquetada. El bromuro de etidio se regresará a su botella ámbar y se puede reusar hasta 10 veces.

V. Fotografía del gel tenido:

1. Colocar el gel sobre la superficie del transiluminador, teniendo cuidado de ponerse lentes o careta anti-radiaciones U.V.
2. Bajar la tapa transparente anti-U.V. del transiluminador, encender el transiluminador y observar brevemente el resultado de la electroforesis (bandas fluorescentes).
3. Tomar una fotografía del gel con la cámara polaroid. Sacar la fotografía de la cámara, esperar un minuto. Revelar la fotografía.
4. Analizar los resultados de la práctica a través en estudio de la fotografía.

Nota: La mayoría de las fuentes de luz ultravioleta que se instalan en los transiluminadores emiten luz a 302 nm (donde se encuentra el rendimiento fluorescente mas alto del complejo DNA-bromuro de etidio). La película fotográfica adecuada para registrar la emisión fluorescente del complejo ADN-bromuro de etidio es la de tipo 667 (3000 ASA). En condiciones optimas se pueden detectar desde 10 ng de ADN.

REPORTE DE PRÁCTICA:

1. ¿Cuál es la función del marcador de ADN?
2. ¿Cuál es la función del amortiguador TBE?
3. ¿Cuál es la función de los 2 colorantes de carga y la del glicerol?
4. Durante el corrimiento qué ocurriría si:
 - a) El gel se preparara con agua en lugar de amortiguador?
 - b) La cámara se llena con agua en lugar de TBE?
 - c) Si los electrodos se invierten?
 - d) Si se aplica alto voltaje?
 - e) Si el gel tiene burbujas?
 - f) Si se coloca demasiada muestra?

BIBLIOGRAFÍA:

- 1) Andrews AT. Electrophoresis. Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications. Clarendon Press, Oxford, 1986
- 2) Bloom, M. V.; Freyer, G. A.; Micklos, D. A. Laboratory DNA Science: An Introduction to Recombinant DNA Techniques and Methods of Genome Analysis. Editorial The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1996.
- 3) Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

PRÁCTICA No. 5

“DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN”

INTRODUCCIÓN:

La espectrofotometría ultravioleta se puede utilizar para determinar la concentración del ADN en una muestra, así como estimar su pureza. Esto es posible porque las proteínas y los ácidos nucleicos presentan diferentes espectros de absorción de luz. Los ácidos nucleicos: ADN y ARN absorben fuertemente en el rango del UV con un máximo de absorbancia a 260 nm (longitud de absorción de las bases nitrogenadas) lo cual permite detectar cantidades tan pequeñas como 2 µg/ml.

Una solución pura de ADN de doble cadena, con una concentración de 50 µg /ml presenta una absorbancia 260 nm de 1.0. Así, la concentración del ADN se determina calculando la concentración a partir de las lecturas obtenidas de las muestras, tomando en cuenta el factor de disolución (típicamente diluidas 1/50 ó 1/100). Las proteínas tienen una absorbancia máxima a 280 nm (longitud de absorción de los anillos aromáticos de los aa como triptófano), por lo que a esta longitud se determina la concentración de las proteínas coextraídas con el ADN que no fueron purificadas durante las etapas de extracción con los solventes (fenol, FCI: Cl). Una relación óptima de absorbancia 260/280 de una preparación de ADN de doble cadena, pura, es de 1.8 a 2.0. Números mas altos indican contaminación con ARN, números más bajos, indican contaminaciones con proteínas coextraídas o fenol lo cual sugiere la necesidad de otras etapas de purificación.

OBJETIVO GENERAL:

Que el alumno cuantifique y determine la pureza del ADN por espectrofotometría.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Que el alumno manipule las cubetas de cuarzo y el espectrofotómetro.
- Que el alumno determine la concentración y pureza del ADN extraído en las prácticas anteriores.

METODOLOGÍA:

I. Preparación de reactivos:

Reactivos	Material, Equipo y Accesorios
Muestras de ADN	Espectrofotómetro (UV-Visible)
Agua desionizada estéril	Cubetas de cuarzo
	Micropipeta 1-10 µl con puntas

Micropipeta 2-50 μl con puntas
 Micropipeta 100-1000 μl con puntas
 Microtubos de 1.5 μl
 Gasas
 Pizeta

Procedimiento.

II. Ejercicio práctico:

1. Encender el espectrofotómetro y la luz UV, dejar equilibrar por 20 minutos. Nota: para medir absorbancias en el rango del UV se necesita de una lámpara especial de deuterio ya que la lámpara de tungsteno que se utiliza para medir el rango de luz visible NO produce suficiente energía en esta región del espectro fotomagnético. Además debido a la baja longitud de onda se necesita usar cubeta de cuarzo en vez de vidrio o plástico. Se recomienda muchas precauciones con dichas cubetas, son frágiles y muy costosas.
2. Programar el espectrofotómetro a 260 y/o 280 nm según el equipo.
3. Preparar las muestras de ADN a cuantificar aplicando las siguientes diluciones:
 - 1/100 (5 μl de muestra y 495 μl de agua desionizada estéril)
 - 1/50 (10 μl de muestra y 490 μl de agua desionizada estéril)
 - 1/20 (25 μl de muestra y 75 μl de agua desionizada estéril)
 - El volumen final es de 500 μl
4. Sacar las cubetas de cuarzo de su caja, no tocar los lados claros por donde pasara el rayo de luz.
5. Enjuagar con precaución la cubeta, con agua desionizada estéril.
6. Hacer el cero del espectrofotómetro a la(s) longitud(es) que se desee trabajar (depende del equipo) con la cubeta con 500 μl de agua desionizada estéril.
7. Transferir el ADN de interés en la cubeta y medir la D.O. a 260 nm
 La D.O. debería de ser entre 0.1 y 1 para ser confiable. Si no lo es, adaptar la dilución de la muestra a los resultados de la primera lectura.
8. Medir la absorbancia de A 280 nm, con el procedimiento anterior.

Nota: algunos espectrofotómetros pueden medir la absorbancia a diferentes longitudes de onda (rastreo espectrofotométrico).

REPORTE DE PRÁCTICA:

1. Calcular la concentración final del ADN de su muestra a partir de las lecturas A260, A280 ($\mu\text{g}/\text{ml}$), sabiendo que OD de 1(260nm)= 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cadena doble de ADN.
2. Evaluar la pureza A260/A280 del ADN a partir de la relación A260/A280.

BIBLIOGRAFÍA:

- 1) Bloom, M. V.; Freyer, G. A.; Micklos, D. A. Laboratory DNA Science: An Introduction to Recombinant DNA Techniques and Methods of Genome Analysis. Editorial The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1996.
- 2) Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

PRÁCTICA No. 6

“AMPLIFICACIÓN DE DNA GENÓMICO POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)”

INTRODUCCIÓN:

En el estudio de la función y la estructura génica se requiere de suficientes cantidades del ADN de interés. Con la técnica conocida como reacción en cadena de la polimerasa (o PCR por sus siglas en inglés), es posible la amplificación *in vitro* de secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante ciclos repetidos de síntesis dirigida por cebadores.

El mecanismo es básicamente el utilizado por las células durante la replicación. Los oligonucleótidos específicos llamados también, “primers” o cebadores (son fragmentos de ADN de cadena sencilla, con una longitud de 10 a 30 nucleótidos) son complementarios a las secuencias de ADN que flanquean la secuencia de interés a amplificar. Uno de los cebadores es diseñado para alinearse a la hebra con sentido y otro a la hebra sin sentido, con sus extremos 3' apuntándose uno al otro. Los cebadores se mezclan con una solución amortiguadora, el ADN molde, los dNTPs (desoxirribonucleótidos tri-fosfatos), magnesio (en forma de $MgCl_2$) y una enzima ADN polimerasa termoestable (*Taq pol*). La mezcla se cubre con una capa de aceite mineral para prevenir la evaporación (o bien se cubren los tubos de reacción con una tapa termo-regulable) y se colocan en el interior de un termociclador.

El termociclador permite realizar de manera automática y programable las siguientes etapas del proceso de amplificación:

Etapas de DESNATURALIZACIÓN: el ADN molde de doble hebra es desnaturalizado por calor a una temperatura por encima de su punto de fusión, (típicamente 91-94 °C durante un minuto).

Etapas de HIBRIDACIÓN O ALINEACIÓN: se baja la temperatura lo suficiente para que ocurra la hibridación entre los cebadores y el ADN molde (entre 30 y 65°C durante un minuto). El uso de altas concentraciones de cebadores favorece que la unión cebador-ADN blanco transcurra con mayor eficiencia que la de re-alineamiento de las hebras del ADN molde.

Etapas de ELONGACIÓN: en esta etapa la temperatura se eleva a 72°C para favorecer la actividad catalítica de la *Taq pol*, la cual se ha unido al extremo 3' de los apareamientos molde-cebador. La síntesis comienza a partir de los extremos 3'OH hasta que la reacción se detiene mediante un aumento de la temperatura (94°C) por segunda vez.

El producto de esta reacción es de longitud indefinida y se conoce como “producto largo”. Así se completa el primer ciclo de la PCR.

El segundo ciclo comienza con el paso de desnaturalización, seguido de la hibridación del cebador con el molde. Esta vez, sin embargo, los cebadores no sólo se hibridan con el ADN original sino también con las hebras que han sido sintetizadas en la primera reacción. Estas hebras poseerán la secuencia del cebador que hizo posible la síntesis en el ciclo previo y se

extenderán más allá del sitio de unión del otro cebador. El segundo ciclo repite el primero con respecto al ADN original, pero la síntesis sobre las nuevas hebras ocurrirá sólo hasta el final de la molécula, lo cual corresponde al extremo 5' del cebador opuesto.

Después de un tercer ciclo de PCR, es fácil ver que la síntesis dirigida por los productos de los primeros dos ciclos terminará en los extremos definidos por ambos cebadores y este tipo de producto se acumulará exponencialmente con subsiguientes ciclos.

Con el desarrollo de cebadores para la amplificación al azar del ADN polimórfico (o Random Amplification of Polymorphic DNA: **RAPD por sus siglas en inglés**) es posible estudiar genomas sin tener un conocimiento previo de la secuencia de ADN de estudio, es decir sin disponer de cebadores específicos.

La técnica de RAPDs, se basa en la amplificación enzimática del ADN mediante la PCR usando cebadores de un número pequeño de bases (generalmente 10 bases) seleccionados al azar (disponibles comercialmente). Los segmentos que se amplifican tienen tamaños diferentes correspondiendo al ADN que yace entre los cebadores que se unieron a las cadenas sentido y anti-sentido. Así, después de un RAPD se obtiene un número de fragmentos amplificados que depende del número de sitios reconocidos por los cebadores utilizados. Probando una serie de cebadores se obtiene una colección de fragmentos amplificados los cuales pueden ser visualizados y analizados en geles de agarosa y/o poliacrilamida. Los polimorfismos entre muestras de estudio se presentan como presencia o ausencia de fragmentos por un cebador dado.

Una ventaja de la técnica de RAPDs es que no se necesita de conocimiento previo del ADN de estudio, lo cual reduce el tiempo y costo del mismo.

En esta práctica se amplificará por PCR el ADN extraído y cuantificado durante las prácticas previas. Se utilizará un cebador corto de 10 pb de secuencia azarosa.

OBJETIVO GENERAL:

- Que el alumno se introduzca en las técnicas de amplificación de ADN.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Que el alumno estudie los fundamentos de las técnicas de PCR y RAPDs.
2. Que el alumno practique las técnicas de RAPDs con el ADN genómico extraído en prácticas anteriores.
3. Que el alumno conozca el manejo y programación de un termociclador.

METODOLOGÍA:

I. Preparación de reactivos:

Reactivos	Material, Equipo y Accesorios
Reacción 10X	Termociclador
Polimerasa de ADN (<i>Taq pol</i>)	Microcentrifuga
Cebador	Tubos para reacción de PCR
Aceite mineral	Gradilla
Amortiguador 10X	Micropipeta y puntas
dNTP (10 mM)	
MgCl ₂ (50 mM)	
Agua grado HPLC estéril	
ADN 5 ng/μl	

Para realizar la reacción de PCR se necesita añadir ADN (muy poco) a una solución amortiguadora (amortiguador de reacción) que contiene la Polimerasa de ADN (*Taq* polimerasa), los cebadores, los 4 desoxirribonucleótidos tri-fosfatos (dNTP) y el co-factor Mg⁺⁺ (en forma de MgCl₂). La reacción se somete a 35 ciclos de replicación, durante cada uno de ellos se multiplica por dos la cantidad de ADN molde amplificado que se tiene al inicio de cada ciclo.

II. Programación del termociclador:

35 ciclos:

- Desnaturalización 94°C, durante 1 minuto.
- Hibridación o Alineación (54°C durante 1 minuto).
- Extensión 72°C, durante 1 minuto.
- El último ciclo # 36 una modificación: Extensión prolongada a 72°C, por 3 minutos

III. Reacción de PCR

Preparación de ADN y Mezclas:

Dilución del ADN molde:

Apoyándose en los resultados de la determinación espectrofotométrica, leer en espectrofotómetro y diluir el ADN a una concentración de 5 ng/μl con Agua desionizada.

Preparación de la "Mezcla de Reacción" (Mezcla de PCR).

Amortiguador 10X	33 μl
Mezcla dNTP + MgCl ₂	6.6 μl
Agua HPLC	34.3 μl
Cebador	6.6 μl
<i>Taq</i> -polimerasa (5 unidades/ μl)	<u>2 μl</u>
TOTAL	82.5 μl

Preparación de la Reacción de PCR

- Etiquetar los tubos de reacción de PCR (de 0.2 ml)
- Colocar los tubos sobre una gradilla
- En el fondo de cada tubo colocar 1 μ l del ADN de estudio (diluido a 5 ng/ μ l).
- En la pared del tubo colocar 9 μ l del amortiguador de reacción
- En la pared del tubo, del lado opuesto a la primera gota colocar 1 μ l de la mezcla cebador-*Taq* polimerasa
- En la tapa del tubo colocar una gota de aceite mineral (opcional).
- Cerrar el tubo y colocarlo en la microcentrifuga (equilibrar los tubos).
- Dar un pulso de centrifugación
- Verificar que el volumen total es de 10 μ l

Colocar los tubos de reacción en el bloque del termociclador, cerrar la tapa, empezar la PCR. Verificar que el programa se realiza correctamente (dos primeros ciclos).

Cuando se termina la PCR, apagar el termociclador, sacar los tubos de reacción del termociclador y colocarlos a 4°C si se utilizarán al día siguiente; o al congelador si se utilizarán hasta la semana siguiente, para su análisis por electroforesis.

REPORTE DE PRÁCTICA:

- 1- Realizar una representación gráfica de la PCR.
- 2- Mencionar las características de cada uno de los componentes de la Reacción de PCR (ADN, amortiguador, MgCl₂, *Taq* pol, cebadores)

BIBLIOGRAFÍA:

- 1) Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. PCR Protocols, a guide to methods and applications, Academic Press, 1990
- 2) Newton, C.R.; Rickwood, D.; Hames, B.D. PCR, Essential Data Series. John Wiley & Sons, Oxford, 1995.

PRÁCTICA No.7

“CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR RAPDs”

INTRODUCCIÓN: La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) es un método estándar para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. Los geles de poliacrilamida pueden elaborarse en una variedad de formas, tamaños y condiciones, la selección dependerá del tamaño de los fragmentos a separar. Se recomienda usar geles de poliacrilamida para separar fragmentos pequeños de 5-500 pb. Su poder de resolución es extremadamente alto, ya que es posible separar fragmentos de ADN que difieren en tan sólo 1 pb. Sin embargo, tienen la desventaja de que son más difíciles de preparar y manejar que los geles de agarosa. Los geles de poliacrilamida se corren con una configuración vertical en un campo eléctrico constante.

OBJETIVO GENERAL:

Que el alumno analice el ADN amplificado por la técnica RAPDs, por electroforesis en geles de poliacrilamida.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Que el alumno estudie los fundamentos de la electroforesis en geles de poliacrilamida.
2. Que el alumno practique la elaboración, carga, corrimiento y tinción de un gel de poliacrilamida.
3. Que el alumno aplique dos técnicas diferentes de tinción.
4. Que el alumno analice los fragmentos amplificados por RAPDs.

Notas preliminares:

Estructura del Gel de Poliacrilamida

El gel se forma por la polimerización del grupo vinilo de monómeros de acrilamida $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH}_2$. El gel consiste en largas cadenas de acrilamida con puentes cruzados entre ellas por la inclusión al azar de un co-monómero bifuncional, usualmente N, N'- metileno-bis-acrilamida (bis) ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH} = \text{CH}_2$).

La reacción produce cadenas al azar de poliacrilamida que incorporan una pequeña porción de moléculas bis, formando una malla tridimensional.

La concentración de acrilamida determina el promedio de longitud de la cadena polimerizada (T) y la concentración de bis determina la cantidad de puentes cruzados formados (C). Ambas concentraciones determinan las propiedades físicas del gel como densidad, elasticidad, resistencia mecánica y tamaño del poro.

La relación entre acrilamida (T) y bisacrilamida (C) es importante en la determinación de las propiedades físicas del gel, y si C es mayor al 10%, los geles tienden a ser opacos y

quebradizos. Cuando C es menor al 1%, los geles tienden a una consistencia pegajosa, siendo muy difíciles de manejar.

Cinética de la Formación del Gel de Poliacrilamida

La polimerización es una reacción dependiente de la proporción entre los monómeros de acrilamida (T) y la bisacrilamida (C). La polimerización más eficaz se lleva a cabo cuando T = 5% y cuando C tiene una proporción entre el 3 y 5 % respecto a T, resultando en una polimerización al menos del 95% dentro de los primeros 15 minutos, en tanto que si C = 10%, se necesitaría entre 30 y 60 min. para la polimerización. Cuando C es mayor al 10%, se recomienda dar un tiempo de gelificación de toda la noche antes de utilizar los geles.

La polimerización de los monómeros procede mediante un mecanismo de formación de radicales libres, iniciado por un catalizador, como el Persulfato de Amonio, también se utiliza una base (TEMED) para acelerar la reacción. En la reacción mediada por el persulfato de amonio, se requieren cantidades traza de oxígeno para que se lleve a cabo la reacción de generación de radicales libres, y su exceso, la inhibe. Por dicha razón, las soluciones de acrilamida deben ser desgasificadas para evitar problemas con la formación de burbujas durante la polimerización del gel.

El tiempo de gelificación óptimo está entre 10 y 30 minutos. Los geles que polimerizan en menos de 10 minutos o soluciones que no gelifican en más de 1 hora deben desecharse, ya que en estas condiciones los geles no polimerizan homogéneamente, lo cual provocará separaciones pobres.

METODOLOGÍA:

Reactivos

Material, Equipo y Accesorios

Acrilamida-Bisacrilamida al 30 %	Material para Electroforesis vertical
Agua desionizada	Vaso de precipitado
Amortiguador TBE 0.5X	Tubos de reacción de PCR
Persulfato de Amonio al 10 %	Fuente de poder
TEMED	Plato agitador
Marcadores de peso molecular	Micropipetas y puntas
Jugo Azul	Charolas de plástico para teñir
Bromuro de Etidio	
Tinción de plata BioRad, (No.Catalogo: 161-0449)	
Metanol, Ácido acético	

Preparación de geles de poliacrilamida al 5 %

1. Verificar que se encuentren limpios los soportes, vidrios y separadores.
2. Armar la placa que contendrá el gel y verificar con agua destilada o desionizada que no haya fugas.
3. Eliminar el agua de la placa absorbiendo con papel los restos de agua que pudieran quedar entre los vidrios.

4. Preparar en un vaso de precipitado limpio la siguiente solución, agregando en orden los reactivos proporcionados:

Nota: Debido a la utilización de compuestos peligrosos se recomienda el uso de guantes y en caso de derramar parte de los líquidos sobre el área de trabajo absorberlos con papel y depositarlo en el recipiente destinado como contenedor de estos residuos.

Para dos geles:

Solución de Acrilamida-Bisacrilamida al 30 %	1.66 ml
Amortiguador TBE 5X	2.00 ml
Agua Desionizada	6.27 ml
Persulfato de Amonio al 10 %	70 μ l
TEMED	<u>20 μl</u>
Total	10 ml

5. Mezclar y vaciar la solución a la placa, llenando hasta la parte superior del vidrio más pequeño. Colocar el peine, llenar con la misma solución todos los espacios vacíos del peine entre los vidrios.
6. Esperar entre 20 y 25 minutos para que polimerice el gel, esto puede monitorearse observando la polimerización que ocurre en la solución residual que quedo en el vaso de precipitado.
7. En tanto ocurre la polimerización, preparar un litro de amortiguador de corrimiento y las muestras a analizar.
 Amortiguador de corrimiento: T.B.E. 0.5X: Mezclar 900 ml de agua desionizada con 100 ml de T.B.E. 5X (Practica # 2)
 Muestras a analizar: Ordenar las muestras (tubos de reacción de PCR) y mezclar sobre un trozo de parafilm, 10 μ l de cada reacción de PCR con 2 μ l del jugo azul.
8. Quitar los peines y montar la placa en el porta placa, sumergir en el tanque y agregar el amortiguador de corrimiento en la cámara interna hasta llenarla, agregar de la misma manera el amortiguador de corrimiento al interior del tanque.
9. Aplicar 12 μ l de cada una de las muestras en cada pozo.
10. Aplicar los marcadores de peso molecular (1 μ l).
11. Poner la tapadera de la cámara, verificando el color de las conexiones, con el portaplaca, la tapa y la conexión al regulador de voltaje.

Rojo --- Rojo --- Rojo y Negro --- Negro --- Negro

12. Encender la fuente de poder (regulador de voltaje) y correr los geles a 90 Volts durante 1 hora.

13. Terminado el corrimiento del gel, apagar la fuente de poder, destapar la cámara y empezar a desmontar los geles. Deberá usarse guantes, lavar cuidadosamente los vidrios de la cama, los acrílicos, los separadores y la cámara.
14. Colocar los geles en la solución adecuada, dependiendo del tipo de tinción que vaya a utilizarse.

Tinción con Bromuro de etidio:

Se aplica el mismo protocolo que para los geles de agarosa (ver práctica No. 4): aplicando precauciones de laboratorio ya descritas se coloca el gel en la solución diluida de bromuro de etidio, se enjuaga, se visualiza y se toma la fotografía.

Tinción de geles con Plata

Pasos a seguir en la tinción de plata:

- | | |
|-------------|-----------------|
| 1. Fijación | 20 minutos |
| 2.- Lavado | 10 minutos |
| 3.- Lavado | 10 minutos |
| 4.- Teñido | 10 a 20 minutos |
| 5.- Paro | 15 minutos |

1 - Solución de Fijación (Para fijar 2 geles)

Metanol	100 ml
Ácido acético	20 ml
Fijador Concentrado (kit)	20 ml
Agua destilada	<u>60 ml</u>
	200 ml

- a. Agregar solución fijadora a cada charola y colocar los geles, observando que queden totalmente sumergidos.
- b. Agitar por 20 minutos cuidando que los geles no se rompan o se doblen.

2 - Solución de Lavado.

- a. Desechar la solución fijadora y lavar los geles con agua desionizada o en su defecto agua destilada, cambiando el agua cada 10 minutos dos o tres veces.
- b. Mantener en agitación durante este paso evitando que los geles se rompan o se doblen.

3 - Solución de Tinción.

En los últimos 10 minutos de lavado preparar 100 ml de esta solución, para teñir 2 geles.

Solución A

Agua desionizada	35 ml
Solución de plata	5 ml
Solución reductora	5 ml
Reactivo de revelado	5 ml
Total	50 ml

Solución B

- a. Pesar 2.5 gramos del acelerador, disolver en agua desionizada y aforar a 50 ml.
- b. Vaciar el agua del ultimo lavado, mezclar en este instante la solución A y B, distribuir la mezcla (100 ml) en cada charola.
- c. Mantener en agitación teniendo especial cuidado después de los 5 minutos, tiempo en el cual se tiñe el gel.
- d. Una vez que se han detectado las bandas de interés, desechar la solución colorante y colocar la solución de paro.

4 - Solución de Paro.

- a. Preparar una solución 5% de ácido acético y agregar después de desechar la solución colorante, los geles pueden mantenerse en esta solución, sin embargo se recomienda ponerlos en agua destilada después de 20 minutos.

REPORTE DE PRÁCTICA:

1. Observar la fotografía o el dibujo del gel teñido y:
 - a) Si no hay bandas visibles, mencione posibles explicaciones del fallo.
 - b) Si hay bandas, determinar su tamaño en pb al compararlas con las bandas de tamaño conocido del marcador de ADN.
 - c) Cuidadosamente medir la distancia (en mm) de cada fragmento del marcador, medir desde el punto de aplicación a la banda.
 - d) Utilice papel logarítmico y grafique en el eje de las "x" la distancia en mm y en el "y" el tamaño en pb de las bandas amplificadas.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Andrews AT. Electrophoresis. Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications. Clarendon Press, Oxford, 1986
- 2) BioRad laboratory 2000; Life Science Research Products 2000 / 01.
- 3) Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

Anexo 1 Programa de la materia.



Anexo 1

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA. PROGRAMA DE ASIGNATURA

NOMBRE DE LA MATERÍA	BIOLOGÍA MOLECULAR
CODIGO DE MATERÍA	108
DEPARTAMENTO	BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
CODIGO DE DEPARTAMENTO	BC
CENTRO UNIVERSITARIO	CIENCIAS BIOLOGÍA Y AGROPECUARIAS
CARGA HORARIA TEORÍA	95
PRÁCTICA	10
TOTAL	105
CREDITOS	10
TIPO DE CURSO	CURSO TÉORICO
NIVEL DE FORMACIÓN PROFESIONAL	LICENCIATURA.
PRERREQUISITOS	BC101 BIOLOGÍA CELULAR
CORREQUISITOS	NINGUNO
FECHA DE ELABORACIÓN	JULIO 2000
ACADEMIA	BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR SUBACADEMÍA DE BIOLOGÍA MOLECULAR
PARTICIPANTES	Dr. en C. Laura Guadalupe Medina Ceja. M. en C. Carlos Beas Zarate M. en C. Silvia Josefina López Pérez.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los procesos moleculares básicos de la célula, relacionados con la naturaleza, producción y preservación de las estructuras biológicas; y la relación de estas estructuras con la función de los organismos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Estudiar el origen de la Biología Molecular como disciplina científica, a partir de las aportaciones de otras disciplinas, así como el campo de acción de ésta.
2. Analizar la estructura de los ácidos nucleicos, como base química para la comprensión del almacenamiento y expresión de la información genética en las células.
3. Comprender el proceso de transferencia de la información genética entre las células progenitoras y sus descendientes.
4. Analizar los principios básicos de las técnicas de Ingeniería Genética.
5. Estudiar el proceso de transcripción como la fase intermedia de la expresión genética, así como los mecanismos de regulación involucrados.
6. Estudiar el proceso de traducción como punto final para la expresión de la información genética, así como su regulación.

CONTENIDO TEMÁTICO SINTETICO.

UNIDAD 1: ESTRUCTURA BIOQUÍMICA DE LOS ÁCIDOS NUCLEÍCOS.

- El descubrimiento del ADN (Experimentos de Griffith)
- Estructura y organización del ADN (Modelo de Watson-Crick)
- Estructura y organización molecular del ARN
- Topología del ADN (desnaturalización y renaturalización, complementariedad de bases, repeticiones invertidas y estructuras secundarias, formas A, B y Z del ADN)
- Empaquetamiento del ADN (empaquetamiento en virus y bacterias, componentes y estructura de la cromatina, organización estructural de los cromosomas)
- El concepto de Gen
 - El descubrimiento del gen
 - El concepto de *loci*,
 - El concepto de *cistrón*
 - Exones e intrones
 - El paradigma básico: un gen-una proteína

UNIDAD 2: REPLICACIÓN

- Relación de la replicación con el ciclo celular
- El replicón: la unidad de replicación (replicón bacteriano y eucarionte)
- Modelo semiconservativo de la replicación del ADN: experimentos de Nelson y Sthal
- Estrategias diferentes de replicación: ojales, círculos rodantes y lazos D.
- El aparato de la Replicación
 - ADN polimerasas: tipos y características
 - Primosoma: helicasa y proteínas SSB
 - Topoisomerasas y helicadas
 - Otras enzimas
 - Modelos que explican la replicación del ADN
- Sitios de inicio y terminación de la replicación.
- Errores en el proceso de replicación
- Sistemas de modificación post-replicativos (restricción y reparación)

UNIDAD 3: TRANSCRIPCIÓN

- Transcripción en procariontes
 - Control del inicio de la transcripción
 - Estructura de la polimerasa de ARN
 - Estrategia general de la transcripción
 - Terminación (intrínseca y dependiente de rho)
 - Control de la transcripción: Operones
- Transcripción en eucariontes
 - Polimerasa I, II y III
 - Inicio de la transcripción: promotores y “enhancers”
 - Estrategias generales de transcripción

- Regulación de la transcripción
- Maduración del ARN
 - Mensajero
 - Transferencia
 - Ribosomal
- Exportación del ARN al citoplasma

UNIDAD 4: TRADUCCIÓN; LA EXPRESIÓN DEL CÓDIGO GENÉTICO

- Organización de los ribosomas
- Estructura del ARN de transferencia
- Etapas de la síntesis proteica (inicio, elongación y terminación)
- El significado del Código Genético
- Estructura y función biológica de las proteínas
- Acción de algunos antibióticos sobre la síntesis de proteínas
- Regulación de la traducción.

PRÁCTICAS DE LABORATORIO

Siempre y cuando se cuente con el equipo y material.

1. Extracción de ADN genómico.
2. Cuantificación de ADN por espectrofotometría de luz UV
3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA.

1. Molecular Biology of the Cell. *Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts y Watson*. 3a. Ed., Garland Publishing Inc. New York, 1996.
2. Molecular Cell Biology. *Lodish, Baltimore, Zipursky, Matsudaira y Darnell*. 4a. Ed., W. H. Freeman and Company, 2000.
3. Genes VII *Benjamin Lewin*, Oxford University Press, 2000.
4. Conceptos de Genética. *W. Klung*, Prentice may, 1999.
5. Biología Molecular y Biotecnología. *Smith y Wood*, Addison Wesley Logman, 1998.

BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA.

1. Biochemistry. *Voet y Voet*, 2a. Ed., Jonh Wiley & Sons, Inc. 1995
2. Moléculas Biológicas. *Smith y Wood*. Addison-Wesley Iberoamericana, 1997.
3. Lecturas Universitarias: Antología de Biología Molecular. *Mario Castañeda*. UNAM, 1973.
4. Temas selectos de Biología: Introducción a la Biología Molecular. *Haggis, Michie, Muir, Roberts, Walker*. Ed. Alhambra, 1969.
5. Basic Methods in Molecular Biology. *Davis, Kuehl, Battey*. 2a. Ed. Appleton-Lange, 1994.
6. Essential Molecular Biology. A practical Aprooach. Vol. II. *Brown*. The Practical Approach series, Oxford University Press, 1991.

Anexo 2 **Preparación de
soluciones
concentradas de trabajo.**



ANEXO 2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES CONCENTRADAS Y DE TRABAJO

1. PREPARACIÓN DE ACETATO DE SODIO

Acetato de sodio, 3 M, pH 5.2

Para preparar 100 ml: disolver 40.81 g. de acetato de sodio.3 H₂O en 80 ml de agua desionizada estéril. Ajustar el pH con ácido acético glacial.

Pasar la solución a un matraz volumétrico de 100 ml para aforar.

2. PREPARACIÓN DE BROMURO DE ETIDIO.

El mayor riesgo con el bromuro de etidio es la inhalación del polvo durante la preparación de la solución stock o concentrada (250 mg/ 50 ml de agua desionizada), por lo que se necesita trabajar en campana de extracción de humos, con guantes y cubre boca. Cabe mencionar que se encuentran a la venta pastillas pre-pesadas (de 10 mg) para diluir directamente en agua.

Finalmente la etiqueta del frasco ámbar tendrá la siguiente leyenda: **“PRECAUCIÓN, Bromuro de etidio, SUSTANCIA MUTAGÉNICA Y CARCINOGENICA. - USAR GUANTES”**.

Preparación la solución de trabajo (1 µg/ml). Se agregan 100 µl de la solución stock a una botella ámbar que contiene 500 ml de agua desionizada. Las soluciones de bromuro de etidio se almacenan en frasco ámbar a 4°C. Finalmente, el Bromuro de etidio utilizado se almacena hasta su desactivación.

Bromuro de etidio concentrado: 10 mg/ml: disolver una pastilla de 10 mg en 1 ml de agua desionizada, diluir (100 µl en 200 ml) al momento de usarlo.

3. PREPARACIÓN DE C.I.

C.I. (cloroformo: alcohol isoamílico, 24:1)

Para preparar 25 ml: mezclar al momento de usarlo 24 ml de cloroformo con 1 ml de alcohol isoamílico.

4. PREPARACIÓN DE ETANOL

Etanol al 70 %

Para preparar 100 ml, mezclar 70 ml de Etanol absoluto con 30 ml de agua desionizada estéril en una probeta graduada.

5. PREPARACIÓN DE FCI

F.C.I. (fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, 25:24:1)

Para preparar 50 ml: mezclar 25 ml de fenol equilibrado, con 24 ml de cloroformo y 1 ml de alcohol isoamílico al momento de usarlo, agitar para formar una emulsión.

6. PREPARACIÓN DEL FENOL.

Para usarlo, es necesario equilibrar el fenol a un pH de 7.8 ya que el DNA pasaría en la fase orgánica a un pH demasiado ácido.

El método que se usa para preparar el fenol equilibrado es el siguiente:

1. A 100 gr de fenol agregar 100 ml de agua desionizada estéril
2. Mezclar hasta disolver el fenol
3. A la solución agregar 100 ml de Tris 1 M
4. Mezclar hasta formar la emulsión, reposar para separar las fases acuosas (superior) y orgánicas (inferior)
5. Eliminar la fase superior
6. Agregar 100 ml de la solución de T.E., mezclar hasta formar la emulsión, reposar para que se separen las fases acuosas (superior) y orgánicas (inferior)
7. Eliminar la fase superior y repetir el paso 6, hasta que el pH de la fase superior sea superior a 7.8.
8. En este momento el fenol esta listo para su uso en el protocolo de la práctica. Se almacena a 4°C en frasco ámbar, con una capa de T.E. de 1 ml

El fenol se proporciona "equilibrado" a los alumnos.

Las mismas precauciones se aplican al fenol al FCI y al CI, así que estas soluciones se entregan preparadas a los estudiantes.

7. PREPARACIÓN DE SDS (Dodecil sulfato de sodio)

SDS 20 %

Para preparar 100 ml: agregar 2 g de dodecil sulfato de sodio (SDS) a 95 ml de agua desionizada tibia, mezclar suavemente.

Pasar la solución a un matríz volumétrico para aforar a 100 ml.

Poner en autoclave, almacene bajo refrigeración.

8. PREPARACIÓN DE S.T.E. (Solución de Lisis)

S.T.E. (Cloruro de sodio, 100 mM ; Tris. HCl 50 mM, pH 8 ; EDTA, 10 mM, pH 8)

Para preparar 100 ml: mezclar 0.584 g de NaCl, 50 ml de Tris 1M pH 8 y 50 ml de EDTA 0.2 M, pH 8.

Pasar la solución a un matraz volumétrico de 100 ml para aforar.
Poner en autoclave, almacenar bajo refrigeración.

9. PREPARACIÓN DE T.E.

T.E. (Tris HCl, 10 mM ; EDTA (Ethylenediamine-tetraacetic acid) 1 mM, pH 8)

Para preparar 100 ml: mezclar 98.8 ml de agua desionizada estéril con 1 ml de Tris 1M, pH 8 y 200 μ l de EDTA 0.5M, pH 8 en una probeta graduada de 100 ml.
Poner en autoclave, almacenar bajo refrigeración.

10. PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN TRIS (Trizma-Base: Tris(hidroximetil) aminometano).

Solución de almacenamiento de Tris, pH 8, 1M

Para preparar un litro: disolver 121.1 g de Tris base en 800 ml de agua desionizada y estéril, ajustar el pH con 42 ml de HCl concentrado, verificar el pH con el potenciómetro.
Pasar la solución a un matraz volumétrico y aforar a 1 litro.
Poner en autoclave, almacenar bajo refrigeración.

Solución de trabajo de Tris, pH 8, 10 mM

Para preparar 100 ml: mezclar 99 ml de agua desionizada estéril y 1 ml de la solución 1M, pH 8 en una probeta de 100 ml.
Poner en autoclave, almacenar bajo refrigeración.

NOTA:

Por razones obvias de seguridad, el fenol, el F.C.I., el C.I. y el bromuro de etidio se proporcionan preparados al momento de la práctica. Se conservan a 4°C en frascos ámbar.

Todos los reactivos usados son de la Marca Sigma.

Anexo 3 Diagramas de flujo.

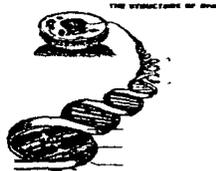
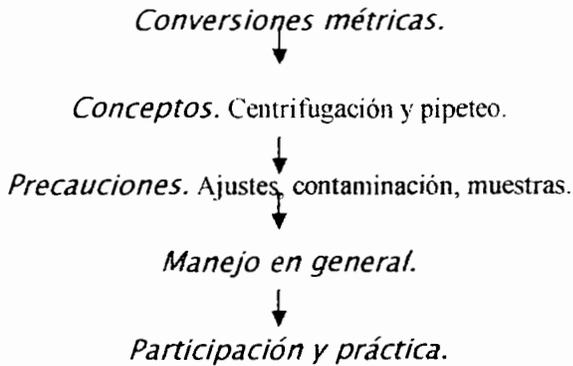
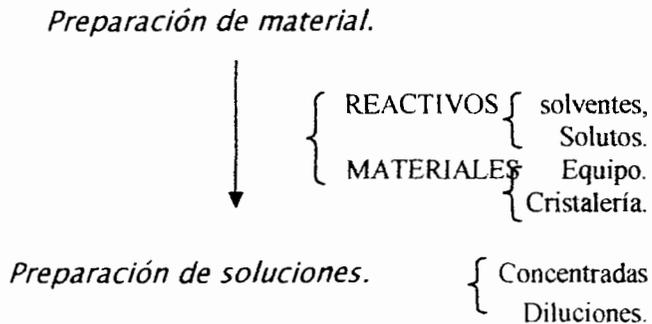


Diagrama de flujo de las prácticas de Biología Molecular.

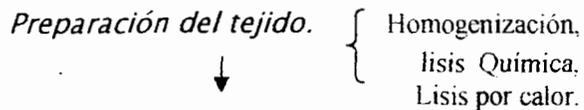
Práctica No. 1 Técnicas de micropipeteo y microcentrifugación.

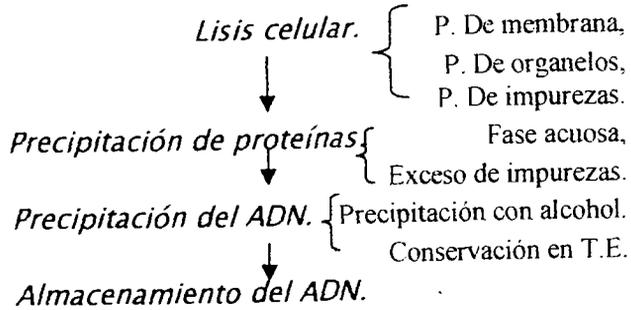


Práctica No.2 Preparación de soluciones Básicas para el laboratorio de Biología Molecular.

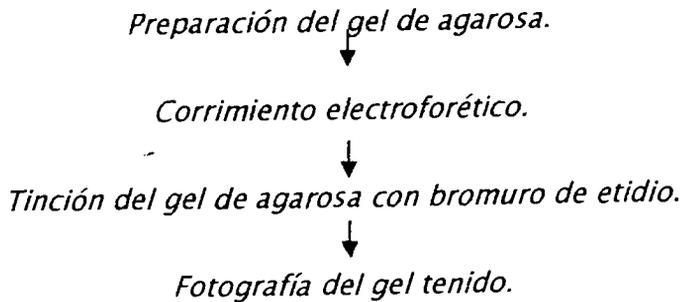


Práctica No.3 Extracción de ADN gnómico.

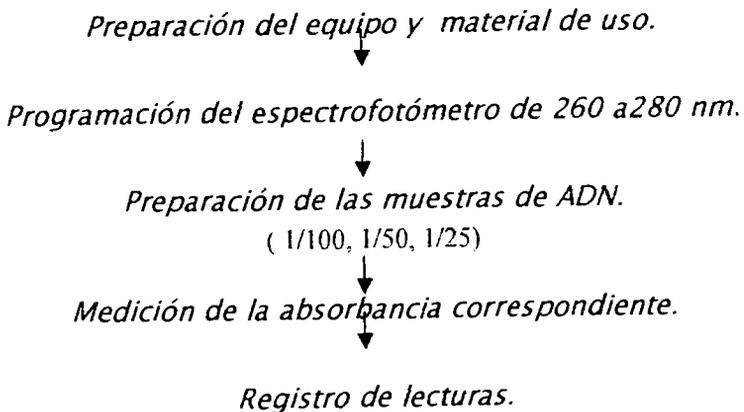




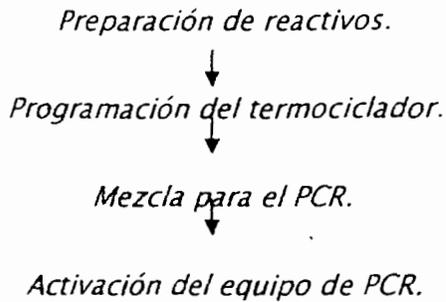
Práctica No.4 Corrimiento electroforético de ADN en geles de agarosa.



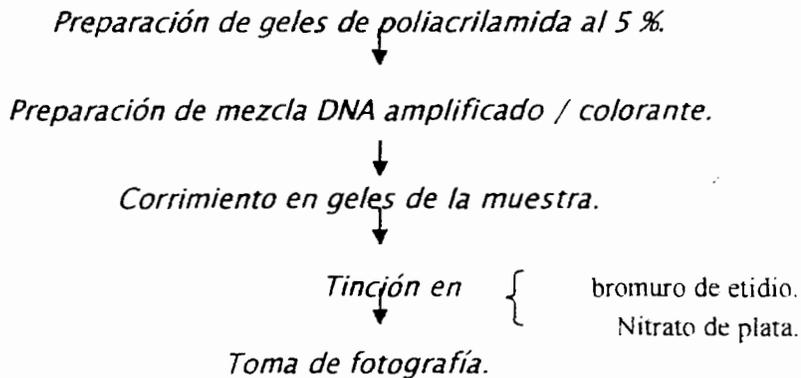
Práctica No.5 Determinación espectrofotométrica de la concentración de ADN.



Práctica No. 6 Amplificación del ADN genómico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).



Práctica No.7 Corrimiento Electroforético en geles de poliacrilamida de los fragmentos amplificados por RAPDs.



Homogenizar:
Tejido(100mg) + 5 min. STF(1ml)

→

Agregar
70 µl SDS 20%

→

Agitar
suavemente

→

Calentar a 55° C

→

Centrifugar a
7,000rpm

→

Descartar botón

→

Recuperar
Sobrenadante

→

Agregar
700 µl fenol

→

Mezclar

→

Centrifugar
7,000 rpm

→

Recuperar fase
acuosa

→

Mezclar

→

Recuperar fase
acuosa

Recuperar
botón

→

Agregar
EtOH70%

→

Secar

→

Agregar
20µl TE

→

Mantener a
4° C 12 horas

→

Almacenar
a -80° C

Recuperar
sobrenadante

→

centrifugar

→

Mezclar

→

Recuperar fase
acuosa

Enfriar
30 min. -20° C

→

Mezclar

→

Agregar Vol.1/10
De NaOAc 3 M
pH 5.2

→

Recuperar botón

→

Centrifugar

→

Mezclar

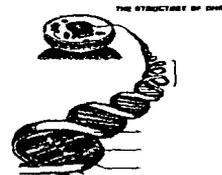
→

Agregar
700 µl Cl

→

Agregar
700 µl FCI

Capítulo 3. **Discusión** **Perspectivas**



I. DISCUSIÓN

Las prácticas que se describieron en este documento son sencillas y clásicas, sin embargo representan la base de cualquier protocolo de aislamiento, manipulación, análisis o clonación del ADN, incluyendo la formación de moléculas del ADN recombinante o de Organismos Genéticamente Modificados (OGM). La realización de estas prácticas permite al alumno familiarizarse con equipos, accesorios y reactivos clásicos de un laboratorio de Genética Molecular. Además este tipo de formación práctica es muy importante para que el Biólogo recién egresado esté preparado para el mercado moderno del trabajo.

Ahora bien, nosotros consideramos importante destacar algunas observaciones, fruto de nuestra experiencia en la impartición de 5 de las 7 practicas antes mencionadas (No. 1 a No. 5).

I.1 INFRAESTRUCTURA PARA LA PRÁCTICA

I.1.1. Trabajo preliminar

En una primera etapa cada práctica fue estandarizada y ajustada a las condiciones del Laboratorio de Genética del DBCyM lo que involucró un esfuerzo previo para reunir los equipos, herramientas y reactivos mínimamente necesarios para empezar a aplicar los protocolos existentes.

Una vez superada esta etapa nos entrenamos en la realización de los protocolos de interés, superando varios detalles técnicos (queda fuera de este contexto detallarlos).

Para el establecimiento y adaptación de las metodologías existentes a las condiciones del laboratorio de docencia tuvimos que tomar en cuenta varios aspectos.

I.1.2. Espacio físico para el desarrollo de las prácticas

El laboratorio de docencia del DBCyM cuenta con cuatro mesas de trabajo (4 x 2 metros). En cada mesa se pueden instalar dos estaciones de trabajo (una frente a otra). Así que se cuenta con el espacio suficiente para 8 estaciones de trabajo. Se busca que cada estación cuente con los reactivos, materiales y herramientas necesarios. Sin embargo algunos equipos costosos se tendrán que compartir en cada mesa o con todo el grupo.

La organización adecuada de las estaciones de trabajo permite evitar el ruido excesivo en el aula, los movimientos inoportunos de alumnos, de reactivos, de herramientas entre las mesas de trabajo así como ahorrar tiempo. Es muy importante que los alumnos cuenten con el material necesario para agilizar la realización de la práctica y para evitar riesgos al manejar reactivos y/o materiales peligrosos, fomentando así las buenas costumbres dentro del laboratorio (GLP, Good Laboratory Practice). Se recomienda que 5 alumnos compartan

una misma estación de trabajo sin embargo un numero real de estaciones de trabajo dependerá del material disponible.

1.1.3. Equipos, accesorios y reactivos disponibles

La siguiente tabla resume los equipos, herramientas, reactivos y consumibles necesarios para la realización de las siete practicas propuestas.

TABLA: Equipos, herramientas, reactivos y consumibles necesarios para la realización de las siete prácticas

EQUIPO	HERRAMIENTA	REACTIVO	CONSUMIBLE
Equipo Común a las 7 prácticas	Micropipeta de 0.5-10 μ l Micropipeta de 1-10 μ l Micropipeta de 100-1000 μ l Microcentrifuga (14,000 rpm)	Agua Desionizada (H ₂ O ₂)	Puntas Microtubos (0.5 ml ; 1.5 ml)
Equipo específico de una sola práctica:			
Para Práctica No. 1	Vaso de precipitado para puntas usadas. Marcador permanente. Gradilla		
Para Práctica No.2	Vasos de precipitado de 150 ml y 2 litro Matraces aforados de 100 ml y 1 litro Balanza analítica Potenciómetro Barras magnéticas	Ácido bórico EDTA Tris base Solución saturada de NaOH Pastillas de NaOH	
Para Práctica No. 3	Baño María Homogeneizador de porcelana	100 mg de músculo fresco de Tilapia Amortiguador de lisis STE SDS al 20% Fenol equilibrado NaOH 3M FCI Cl Acetato de sodio 3M, pH 5.2 Etanol al 100% Etanol al 70% Amortiguador T.E.	

Para Práctica No. 4	Matraz Erlenmeyer Vortex Transiluminador Cámara fotográfica Cinta Película 667	Agarosa TBE 0.5X Jugo azul Bromuro de etidio o colorante "Bio-Seguro" Jugo azul (amortiguador de carga)	Guantes desechables
Para Práctica No. 5	Espectrofotómetro (UV- Visible) Cubetas de cuarzo Pizeta	Muestras de ADN	Gasas
Para Práctica No. 6	Termociclador Gradilla	Reacción 10X Polimerasa de ADN (<i>Taq pol</i>) Aceite mineral Cebador Amortiguador 10X dNTP (10 mM) MgCl ₂ (50 mM) Agua grado HPLC estéril DNA 5 ng/μl	Tubos para reacción de PCR
Para Práctica No. 7	Material para Electroforesis vertical Vaso de precipitado Fuente de poder TEMED Plato agitador Charolas de plástico para teñir	Acrilamida-Bisacrilamida al 30 % Amortiguador TBE 0.5X Persulfato de Amonio al 10 % Marcadores de peso molecular Jugo Azul Bromuro de Etidio Tinción de plata BioRad, No. Catalogo: 161-0449 Metanol, Ácido acético	Tubos de reacción de PCR

Es importante señalar que, desafortunadamente, en el laboratorio de docencia del DBCyM, NO contamos con la mayoría de los artículos antes mencionados para la impartición de las prácticas. Así, las prácticas que se han impartido hasta ahora se realizaron con equipos, reactivos y recursos destinados principalmente a la investigación dentro de proyectos vigentes adscritos al laboratorio de genética del DBCyM.

Al principio las prácticas se impartieron en las instalaciones del laboratorio de genética dividiendo los alumnos en grupos pequeños (5 alumnos), lo que resultó inconveniente para las demás actividades de los profesores, tanto para el titular de la materia (consumo de mucho tiempo para repetir las prácticas a grupos pequeños y fuera de horario de clases), así como para sus colegas. La impartición de las prácticas "in situ" presenta dos ventajas:

- 1) Se evitó el traslado de equipos costosos, herramientas frágiles y de reactivos peligrosos o inestables del laboratorio de genética al aula de docencia
- 2) Estando ahí, el estudiante tuvo la oportunidad de enterarse de la investigación en curso en nuestro laboratorio.

Actualmente, frente a la carga de trabajo de investigación y a los grupos numerosos de alumnos, impartimos las prácticas en el laboratorio de docencia a donde trasladamos lo necesario antes de la práctica.

Cabe mencionar aquí que a la fecha solamente las practicas 1 a 5 se ha impartido de manera regular a alumnos de las clases de Biología Molecular, Genética Avanzada y/o Ingeniería Genética por los maestros del laboratorio de genética (periodo 1997-2000) gracias al apoyo de estudiantes de la carrera de biología (prestadores de Servicio Social, Estudiantes sobresalientes, Tesistas). Sin embargo la experiencia que se adquirió durante las prácticas fue decisiva y enriquecedora para la redacción de este documento.

I.1.4. Duración de la práctica

El Programa curricular de Biología Molecular, materia básica particular obligatoria, incluye una carga horaria total de 105 horas por semestre, de las cuales 85 corresponden a la enseñanza teórica y 20 a la enseñanza practica. Se imparte tres días a la semana con una duración total de 5 horas. El departamento de control escolar la programa en dos sesiones de 2 horas y una clase de 1 hora. Las practicas se imparten durante las sesiones de 2 horas.

Hemos observado que este tiempo es insuficiente ; el tiempo realmente necesario es de tres horas, debido a los siguientes factores:

- Generalmente los alumnos necesitan mas tiempo que el Maestro para desarrollar los protocolos (manipulación cautelosa de reactivos, herramientas y equipos, toma de alícuotas, disposición de muestras, por manos inexpertas).
- El Maestro tiene que tomar tiempo para dar explicaciones generales al grupo y aclarar dudas a lo largo del avance del trabajo experimental.
- Usualmente los grupos son numerosos y atender individualmente varias estaciones de trabajo requiere tiempo y coordinación.

Así, cuando se apliquen las prácticas de manera sistemática se propondrá a control escolar una reorganización en la distribución de las cargas horarias, para que se cuente con tres horas seguidas. Así se podrán impartir 7 prácticas del Manual (3 horas cada una, dando un total de 21 horas de práctica).

I.2. ORGANIZACION DE LA PRÁCTICA

Es importante señalar que el desarrollo de prácticas de laboratorio no solo involucra el tiempo que comparten el Maestro y el Alumno en el laboratorio de docencia, sino que involucra un tiempo de preparación previa a la práctica y de seguimiento después de ésta, para ambos, el Maestro y el Alumno.

La inversión de tiempo en la preparación de la práctica, tanto por parte del alumno como del profesor permitirá el mejor aprovechamiento del tiempo de la practica, el éxito de la misma así como prevenir accidentes en la aula.

I.1.2. Preparación de la Práctica por parte del Profesor

El Profesor debe reunir con anticipación los equipos y herramientas necesarios para la práctica. Si estos se utilizan también para la investigación, debe que asegurarse de no interferir con dicha actividad. En nuestra experiencia los equipos necesarios se han trasladado del laboratorio de genética al laboratorio de docencia. Ahí los equipos que se comparten (Baño María, termociclador, fuente de poder, centrifuga, etc.) se ubican en un lugar accesible, los demás (micropipetas, puntas, tubos, gradillas, marcadores, etc.), se reparten entre las estaciones de trabajo. Además el Profesor debe preparar con antelación los reactivos que se van a utilizar durante la práctica o cuando sea necesario, preparar (pesar) los sales necesarias para que los alumnos preparen sus soluciones.

El tiempo estimado para la preparación de una práctica por parte del maestro o el Técnico Docente es de 30 minutos a 2 horas.

I.2.2. Preparación de la Práctica por parte del Estudiante

Se entregará al alumno al principio del semestre el Manual de prácticas a los alumnos de la materia de Biología Molecular (BC108). El Alumno tendrá la obligación de leer y entender la práctica ANTES de entrar en el aula. Se ha pensado elaborar un cuestionario que el alumno tendría que entregar contestado un día antes de la práctica. Aún extremosa esta medida podría ser necesaria para obligar al alumno a dedicar tiempo para la preparación de cada una de sus prácticas.

I.2.3. Seguimiento a la Práctica por parte del Profesor

En esta etapa el profesor recogerá los reactivos, herramientas y equipos utilizados durante la práctica y los regresa en su lugar de origen así como verificará que el laboratorio quede limpio; además tendrá que corregir y calificar los reportes de prácticas. A través de esta actividad el Maestro quién podrá evaluar el impacto de cada práctica y así mejorarlas.

I.2.4. Seguimiento a la Práctica por parte del Estudiante

El estudiante deberá que elaborar el reporte de cada práctica. Más que repetir el contenido del Manual al momento de redactar el reporte de práctica, se pretende que el alumno reflexione sobre el impacto de la práctica en su proceso de formación como Biólogo. Para guiar este proceso el alumno responderá a preguntas y/o problemas y comentará su experiencia, organizado su trabajo en varias secciones: Introducción, Material y Métodos (diagrama de flujo de cada práctica), Resultados, Discusión y Conclusión. Se pedirá un reporte por estación de trabajo.

Además es un excelente herramienta que permite retro-alimentar al maestro sobre el éxito del desarrollo de la práctica.

II. CONCLUSIONES

- Los siete protocolos de práctica seleccionados en el presente trabajo, se pueden realizar en las condiciones de logística, programación y funcionamiento en que trabaja el laboratorio de docencia del Departamento de Biología Molecular.
- El diseño y elaboración de cada uno de los protocolos seleccionados son adecuados, atendiendo a los objetivos del programa de Biología Molecular.
- Consideramos que a través de su desarrollo el estudiante adquiere la destreza y actitud mínima necesaria para el mercado actual del trabajo. Además se busca motivar su curiosidad o hacer nacer el interés del alumno en el campo de la investigación, tanto aplicada como básica.
- El manual de prácticas que aquí se propone, es susceptible de ser modificado, mejorado o rediseñado de acuerdo a los cambios que puedan sufrir el programa de Biología Molecular o bien en su forma, pero consideramos que es adecuado en su fundamento para su utilización hasta la fecha de su edición.

III. PERSPECTIVAS

Desafortunadamente, se debe hacer énfasis en el costo de estas prácticas. Los equipos necesarios son novedosos y en consecuencia se cuenta con poco de ellos dentro de nuestros Centros Universitarios, además es cierto que el material necesario es especializado y entonces costoso.

La impartición sistemática de las siete prácticas, a aproximadamente 100 alumnos por semestre, no se puede hacer en los laboratorios de investigación, ni tampoco con los equipos de investigación que no son diseñados para atender a grupos numerosos. Además desafortunadamente la presencia de grupos numerosos de alumnos en los laboratorios de investigación perturba la investigación en curso, por lo cual es imprescindible contar con los equipos necesarios DENTRO del laboratorio de Docencia y reservado para dicha finalidad.

Sin embargo la respuesta y el entusiasmo de los alumnos a los cuales se impartieron estas prácticas es un estímulo para seguir los esfuerzos en conseguir la infraestructura necesaria para ello.

Como seguimiento al impulso que dio el presente trabajo, actualmente se encuentran en curso de preparación otros protocolos de práctica en colaboración con profesores de materias como Genética Avanzada (BC102), Genética Evolutiva (BC111), Ingeniería Genética (BC123), Evolución (BZ 104), Biosistemática (BZ107). Todas estas materias

tienen como pre-requisito el curso de Biología Molecular (BC 108). El objetivo de este esfuerzo es el de elaborar un Manual Común de protocolos de aislamiento, manipulación y análisis de DNA. Entre los protocolos podemos citar los siguientes:

- Utilización de endonucleasas de restricción por la digestión y análisis del DNA del Fago Lambda.
- Huellas moleculares de DNA (DNA Finger Printing), al analizar por PCR polimorfismos ALU y VNTR.
- Transferencia de Ácidos nucleicos y proteínas (Southern, Northern, Western).