
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



Manual de Practicas de Genética Avanzada

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA
MAURA ELENA CASTRO ZACARÍAS

Las agujas, Zapopan, Jal. Marzo 2007



Universidad de Guadalajara

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias**

*Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura
en Biología*

**C. MAURA ELENA CASTRO ZACARIAS
PRESENTE**

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **Producción de materiales educativos opción propuesta pedagógica** con el título: **"MANUAL DE PRACTICAS DE GENETICA AVANZADA"** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo el/la: **BIOL. SERGIO ALVAREZ BARAJAS** y el asesor/es es el/la: **Q.F.B. ADOLFO CARDENAS ORTEGA.**

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

**ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan., 26 de Marzo del 2007.


**DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

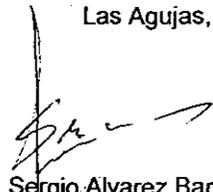

**M. en C. ISELA LETICIA ALVAREZ BARAJAS
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

Dr. Carlos Álvarez Moya.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Carrera de Licenciado en Biología.
 CUCBA.
 Presente

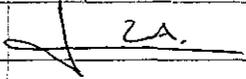
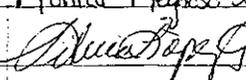
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad: **PRODUCCIÓN DE MATERIALES EDUCATIVOS**, opción: **PROPUESTA PEDAGÓGICA**, con el título: **"MANUAL DE PRACTICAS DE GENÉTICA AVANZADA"** que realizó el/la pasante: **CASTRO ZACARÍAS MAURA ELENA**, con número de código: **398283692**, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 Las Agujas, Zapopan, A 8 de Marzo de 2007

Firma 
 Nombre: Biol. Sergio Alvarez Barajas
 Director de Tesis

firma 
 nombre: QFB Adolfo Cárdenas Ortega
 Asesor de Tesis

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Carlos Álvarez Moya		22/03/07
Monica Reyeso Silva	Monica Reyeso Silva	22/03/07
Lucia J. López Pérez Suplente		22/03/07

Handwritten notes:
 V.Bo
 C.A.
 22/07

Manual de Practicas de Genética Avanzada

Agradecimientos

A Dios por brindarme la vida y estar siempre conmigo, eres el ser mas importante y sin ti nada de esto seria posible.

A mi madre por darme el mejor de los regalos, por tu apoyo incondicional, y porque "creiste" que lo lograría GRACIAS por estar conmigo, te quiero mucho.

A mi Director de Tesis, GRACIAS por todo su apoyo, por su amistad, por su carácter que gracias a el logre cumplir mi meta..

A mi Asesor de Tesis, por los siempre buenos consejos que me brindo y el apoyo que recibí de usted, gracias.

A usted Dr. Carlos Alvarez Moya, por brindarme su ayuda, ser mi coordinador de carrera y sinodal de esta tesis, mis más sinceros respetos y agradecimientos por su apoyo incondicional y su amistad que espero dure mucho,

A Fernando Alvarez Moya, por tu gentileza y amabilidad en todo el proceso administrativo para mi titulación,

A Monica Reynoso Silva, gracias, por ser mi sinodal, mi amiga y la ayuda que me brindaste.

A la Dra. Silvia Josefina López Pérez por ser mi sinodal y mi maestra.

A ti por darme la oportunidad de estar contigo, espero cumplir tu sueño, te quiero mucho y sobre todo gracias por ser el hombro donde me puedo apoyar.

A mis maestros, por darme los conocimientos durante toda mi carrera

A mis compañeros y amigos, que me brindaron su apoyo y comprensión, gracias por esos momentos que me permitieron estar con ustedes.

A ti gorda por ser mi amiga y tolerarme, espero seguir contando con tu amistad, gracias por tu siempre apoyo moral que recibo de ti.

Dedicatorias

A ti Dios te ofrezco este logro que he alcanzado en mi vida.

A mi madre porque gracias a ti lo obtuve y a ti te lo brindo con todo mi amor y mi esfuerzo, espero que esto cumpla uno de tus sueños.

A mis amigos: Cristina, Hugo, Alma, Alex, Fidel, Fátima, Javier y a todos aquellos que me faltaron por mencionar no menos importantes, les dedico el trabajo que realice.

A mi patrón Sergio Álvarez Barajas porque sin usted no hubiera logrado hacer las cosas de la mejor manera.

A ti te dedico esta etapa de mi vida por darme tu comprensión y paciencia.

DIRECTORIO

Lic. José Trinidad Padilla López
Rector General de la Universidad de Guadalajara

Dr. Juan De Jesús Taylor Preciado
Rector del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias

Dr. Alfredo Feria Velazco
Director de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales

Dra. Laura Guadalupe Medina Ceja
Jefa del Departamento de Biología Celular y Molecular

ÍNDICE

REGLAMENTO DEL LABORATORIO	2
INTRODUCCIÓN	3
DESARROLLO DE LAS PRÁCTICAS	
PRACTICA No. 1 CICLO DE VIDA Y SEXADO DE <i>Drosophila melanogaster</i>	4
PRACTICA No. 2 CROMOSOMAS EN LAS CÉLULAS DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES DE <i>Drosophila melanogaster</i> . Un método para determinar diferencias Taxonómicas o evidenciar daño genético	8
PRACTICA No. 3 OBSERVACIÓN DE CROMATINAS Y y X	12
PRACTICA No. 4 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LOS CROMOSOMAS HUMANOS	15
PRACTICA No.5 ANÁLISIS DE MUTACIONES SOMÁTICAS EN LOS PELOS ESTAMINALES DE <i>Tradescantia</i>	21
PRACTICA No.6 MEDIOS DE CULTIVO PARA <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	24
PRACTICA No.7 EXPERIMENTO DE DNA FINGERPRINTING	27

REGLAMENTO DEL LABORATORIO DE DOCENCIA BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

1. ES REQUISITO INDISPENSABLE TRAER BATA.
2. SE DARÁ UN MARGEN DE 20 MINUTOS PARA LA ENTRADA AL LABORATORIO.
3. SE RESTRINGIRÁ AL MÁXIMO LA SALIDA DEL ALUMNO DURANTE LA PRÁCTICA.
4. NO SE ALTERARA EL DIA PREVIAMENTE FIJADO PARA LA REALIZACIÓN DE LA PRÁCTICA.
5. NO SE PERMITEN VISITAS.
6. NO SE PERMITE INGERIR ALIMENTOS EN EL LABORATORIO.
7. POR FAVOR, NO FUMAR.
8. CADA EQUIPO DE TRABAJO ENTREGARA UN VALE POR EL MATERIAL RESPECTIVO.
9. LAS PERSONAS QUE FORMAN LOS EQUIPOS DE TRABAJO SE RESPONSABILIZARAN DEL MATERIAL Y EQUIPO ENTREGADO.
10. ES IMPORTANTE CUIDAR DE NO CONTAMINAR LOS REACTIVOS.
11. ES NECESARIO NOTIFICAR AL PROFESOR RESPONSABLE DEL GRUPO LA UTILIZACIÓN DE LOS APARATOS DEL LABORATORIO, PEDIR ASESORÍA EN CASO DE NO CONOCER SU FUNCIONAMIENTO.
12. EL MATERIAL Y LA MESA DE TRABAJO DEBEN QUEDAR PERFECTAMENTE LIMPIOS DESPUÉS DE LA PRÁCTICA.
13. EL SOLICITANTE DE MATERIAL DEBERÁ PEDIRLO AL RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE ACUERDO AL PROCEDIMIENTO PREESTABLECIDO (CON VALE Y CREDENCIAL) Y SE APEGARA A LOS LINEAMIENTOS EXISTENTES EN EL LABORATORIO.
14. PARA TRABAJAR EN EL LABORATORIO SE REQUIERE DE LA ASESORÍA DE UN PROFESOR, NO SE ATENDERÁ A NINGÚN ALUMNO SI NO SE ENCUENTRA EL PROFESOR.
15. SE SOLICITA LA REVISIÓN DEL MATERIAL PROPORCIONADO POR EL RESPONSABLE DEL LABORATORIO AL RECIBIRLO EL ALUMNO. RECLAMACIONES POSTERIORES O AL FINAL DE LA PRACTICA NO SERÁN ATENDIDAS.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Este manual tiene el propósito de ofertar a los alumnos de la Licenciatura en Biología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, de la U.D.G. es un apoyo didáctico en la enseñanza de la Genética Avanzada.

Este manual facilitara el trabajo docente, y permitirá que los alumnos tengan en un documento las prácticas contempladas en el plan de estudios de la materia,

El manual de Genética Avanzada proporciona la información indispensable permitiendo además que el alumno acuda a consultar la bibliografía recomendada.

Asimismo en los laboratorios existe el equipo para desarrollar las metodologías que aquí se mencionan, así como las técnicas que le otorgaran al alumno habilidades y destrezas para forjar el aprendizaje práctico y conservar esta experiencia como un apoyo del conocimiento.

Esperamos que también pueda servir como apoyo a otros laboratorios y profesionistas interesados en el campo de la Genética Avanzada

La genética es el campo de las ciencias biológicas que trata de comprender cómo los genes son transmitidos de una generación a la siguiente, y cómo se efectúa el desarrollo de las características que controlan esos genes (*Winchester, Genética*).

La genética es el estudio de los patrones de herencia, del modo en que los rasgos y las características se transmiten de padres a hijos. Los genes se forman de segmentos de ADN (ácido desoxirribonucleico), la molécula que codifica la información genética en las células.

El ADN controla la estructura, la función y el comportamiento de las células y puede crear copias casi o exactas de sí mismo.

La Genética, a veces confundida o sinonimizada con la Biología Molecular, ha estado causando un profundo impacto en todos los campos de la Biología, Medicina, Agricultura, etc. en la forma en que los problemas son abordados desde el punto de vista técnico y conceptual.

El corazón de cualquier programa en Biología Celular reside en la comprensión y análisis de la mecánica molecular subyacente a todos estos procesos así como en los circuitos regulatorios y efectos ambientales sobre los procesos de patogénesis, estilos de vida, manipulación genética y expresión amplia del genotipo en las más variadas condiciones de existencia de plantas, animales, bacterias y replications aislados como plásmidos y virus.

PRACTICA 1

CICLO DE VIDA Y SEXADO DE *Drosophila melanogaster*

Dr. Carlos Alvarez Moya

INTRODUCCIÓN

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, es actualmente uno de los modelos biológicos más utilizados para el estudio de la Genética, debido a que es de fácil manejo, tiene un ciclo de vida relativamente corto y no requiere de equipo especializado para su mantenimiento en el laboratorio. A todo lo anterior hay que añadir que solo presenta cuatro pares de cromosomas, los cuales pueden apreciarse como cromosomas gigantes en algunos tejidos: recto, intestino y glándulas salivales

Debido a que todos los estadios larvarios de la mosca de la fruta pueden ser utilizados para el estudio de la genética, es necesario conocer estas distintas fases. Al mismo tiempo las cruza son esenciales para la demostración de la transmisión genética, para ello es indispensable diferenciar los sexos.

Hay cuatro distintos estados en la vida de la mosca de la fruta: huevo, larva, pupa y adulto. A 21°C *Drosophila* producirá nuevos adultos en dos semanas: 8 días como huevo y larva y 6 como pupa. Las larvas pueden ser de 1, 2 y 3 estadios (24, 48 y 72 horas respectivamente)

La metamorfosis ocurre dentro del pupario, la pupa empieza a tornarse negra hasta que emerge la mosca adulta. Al emerger las alas se encuentran arrugadas y toman su aspecto normal dentro de las 12 horas siguientes. Las moscas recién eclosionadas tardan sólo 6 horas en adquirir la capacidad reproductiva, por lo cual, para obtener moscas vírgenes es necesario aislarlas y sexarlas en cuanto hayan emergido de la pupa.

El sexado en *Drosophila* puede distinguirse por las siguientes características:

MACHOS

Menor tamaño
Presencia de peine sexual
Punto negro en la región anterior
Pene (se observa al presionar el abdomen)

HEMBRAS

mayor tamaño
no peine sexual
barras negras espaciadas
ovipositor

OBJETIVO

Conocer las diferentes etapas larvarias de *Drosophila melanogaster* y determinar las diferencias entre machos y las hembras.

JUSTIFICACIÓN

Drosophila es un ensayo muy adecuado para el estudio principalmente de la genética. Debido al amplio conocimiento que se tiene de sus características biológicas, su corto tiempo de generación, y fácil mantenimiento en el laboratorio puede ser utilizada para la investigación y la enseñanza de la genética.

Muchas veces es necesario tener un modelo tan manejable para determinar un amplio ciclo de eventos genéticos desde el nivel molecular hasta el de poblaciones, con *Drosophila* se realizan pruebas *in vivo* e *in vitro*, tanto en células somáticas como germinales.

Esta practica ayudara a los alumnos a tener la capacidad de diferenciar aspectos morfológicos como genéticos en aquellos individuos que presentan diferentes etapas larvarias en su vida.

MATERIAL

Éter etílico
Eterizador
Algodón
Pinzas de disección
Portaobjetos

EQUIPO

microscopio estereoscópico

PROCEDIMIENTO

Huevos, larvas y pupas.

- 1) Las moscas contenidas en un frasco con medio de cultivo son separadas y colocadas en un frasco vacío.
- 2) Con la aguja de disección y con mucho cuidado tomar los huevecillos (pequeñas estructuras blancas colocadas sobre la superficie del medio) y colocarlos en un portaobjetos.
- 3) Inmediatamente colocar larvas de diferentes tamaños: las más pequeñas corresponden al primer estadio, las intermedias al segundo y las de mayor tamaño corresponden a las larvas del tercer estadio.

En el estado de pupa comienza la metamorfosis.

- 1) Coloca las pupas de las claras a las oscuras (están adheridas a la pared del frasco) y observarlas.
- 2) Dibuja tus observaciones y esquematiza el ciclo de vida.

La información proporcionada por el maestro respecto a la duración en días de cada estadio te será de suma utilidad.

Sexado de individuos adultos

- 1) Los individuos adultos son colocados en un eterizador humificado con éter.
- 2) Después de 10 segundos las moscas deben colocarse en la platina para proceder al sexado.

Los machos (con peine sexual) normalmente de menor tamaño son colocados a un lado de la platina y las hembras de mayor tamaño se colocan al otro.

La identificación se realizara de acuerdo con la explicación dada por el profesor.

RESULTADOS (Elaborar dibujos)

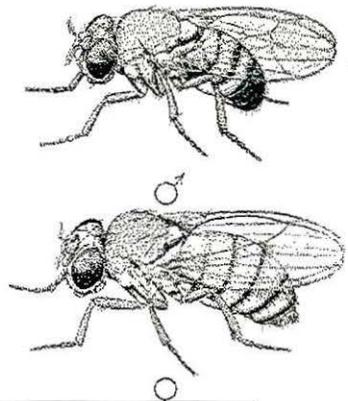
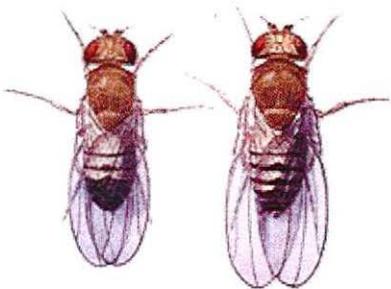
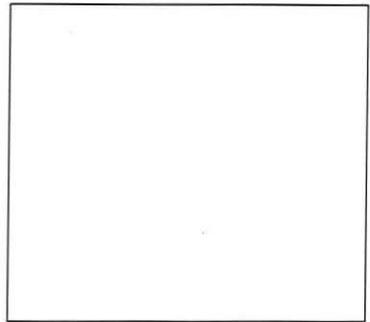
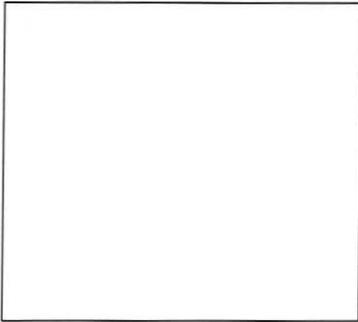


Figura 1. Mosca *Drosophila melanogaster*, hembra y macho

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

Alvarez Moya Carlos. Manual de Genética II. CUCBA. Universidad de Guadalajara. 1997.

Alvarez Moya Carlos. Comportamiento genotóxico de tres agentes xenobióticos en *Drosophila melanogaster* y en *Tradescantia*. Tesis de Doctorado de la Universidad de Guadalajara. 1998

Graf U., Wurgler F. R., Kazt A.J., Frei H., Hall C.B. y Kale P. G. (1984) Somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6, 153-188

Graf U. (1989). Somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6, 153-188

Graf U. (1991) Improved High bioactivation cross for the somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 00, 1-9

Graf U. (1992) Genotoxicity testing of promutagens in wings using mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 8, (1): 15-27.

Graf V. and Schalk NV: (1991) Improved high bioactivation Cross for the wings somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster* *Mutat. Res.* 1-9

Griffiths J. Ff. Millar J. H., Suzuki D:T: and Gelbard W. M. *Genetica*. Quinta edición. México. Editorial Interamericana-Mc. Graw Hill. 1995.

Lindsley D.L y Grell E.H (1968). *Genetic of the Drosophila melanogaster*. Carnegie Instit. Publ. 627, 1-60.

Lindsley D.L y Grell E.H (1985). *The Genóma of Drosophila melanogaster*, par I : Genes A-K *Drosoph. Serv.* 62, 1-60.

M Demerec and B P Kaufman. *Drosophila guide*. Institution Camegie of Washington. Washington DC 1961.

PRÁCTICA 2

CROMOSOMAS EN LAS CÉLULAS DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES DE *Drosophila melanogaster*. Un método para determinar diferencias taxonómicas o evidenciar daño genético

Dr. Carlos Alvarez Moya

INTRODUCCIÓN

Los cromosomas gigantes se forman mediante un proceso conocido como endocitosis, es decir, son el resultado de la unión o sinopsis de los cromosomas homólogos, seguida por la replicación de los cromosomas sin que posteriormente ocurra división celular, constituyendo así los llamados cromosomas politénicos. En ellos es claramente visible al microscopio la presencia de bandas oscuras las cuales varían en ancho y forma, generalmente cada banda contiene el material genético de un gen simple (unidad del material hereditario) estas bandas oscuras se alternan con otras más claras conocidas como interbandas en patrones característicos a cada cromosoma y en consecuencia: propia de cada especie de *Drosophila*. En las células de las glándulas salivales de la mosca los cromosomas politénicos se ven como brazos que parten de un centro común llamado cromómero.

El estudio de los patrones de bandas e interbandas en los cromosomas politénicos permite la elaboración de mapas citogenéticos de los cuales aportan evidencia para la localización lineal de los genes y las relaciones entre los mismos.

OBJETIVOS

- 1.- Conocer el método de obtención de los cromosomas gigantes característicos de los dípteros
- 2.- Observar, contar y diferenciar los cromosomas politénicos en *Drosophila melanogaster*.

JUSTIFICACIÓN.

En los núcleos de las glándulas salivales de *Drosophila* durante el periodo larvario, los cromosomas no muestran la apariencia típica descrita durante la metafase, sino que en su lugar aparecen unas estructuras enormemente largas, que tras su coloración presentan un patrón de bandas e interbandas. Estos cromosomas pueden ser observados muy fácilmente.

Esta practica esta diseñada para que el alumno conozca y aplique en el laboratorio el método de obtención de cromosomas presentes en dípteros así como a contarlos y aprender sobre todo a diferenciar dichos cromosomas

MATERIALES

Por equipo
Agujas de disección
Portaobjetos
Cubreobjetos
Larvas de *Drosophila* (las más grandes)
Solución para disección:
-ácido acético glacial 45cc
-agua destilada 30cc
Solución de tinción:
-Ac. acético glacial 45cc
-ácido láctico al 85% 25cc
-agua destilada 30cc

EQUIPO

Por equipo
Microscopio
Estereoscopio

PROCEDIMIENTO

1. Colocar en una platina de vidrio unas gotas de la solución de disección, extraer una larva del medio de cultivo procurando que sea de las más grandes y colocarla sobre un portaobjetos.
2. Con la ayuda de un estereoscopio realizar una disección colocando una aguja en el área de la mandíbula y la otra en la región central del cuerpo. Con un movimiento rápido hay que separar la región cefálica del resto del cuerpo para separar así las glándulas que quedan adheridas a la zona de la mandíbula.
3. Colocar las glándulas salivales en un portaobjetos en el cual se ha colocado previamente una gota de solución para tinción y teñir durante 5 minutos evitando que se evapore el colorante.
4. Pasado el tiempo de tinción, colocar un cubreobjetos sobre el espécimen y envolver la lamina completa en un pedazo de papel absorbente se presiona fuertemente con el dedo pulgar teniendo cuidado de no romper el cubreobjetos.
5. Observar la lamina al microscopio compuesto al 40x y 100x.



Figura 2. Glándulas salivales de la mosca *Drosophila melanogaster*, hembra y macho

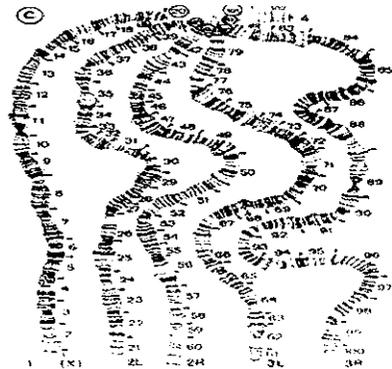


Figura 3. Cromosomas de *Drosophila melanogaster*



Figura 4. Cromosomas de *Drosophila melanogaster* vistas desde microscopio óptico.

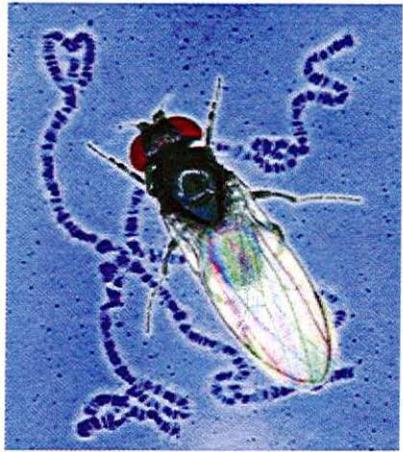
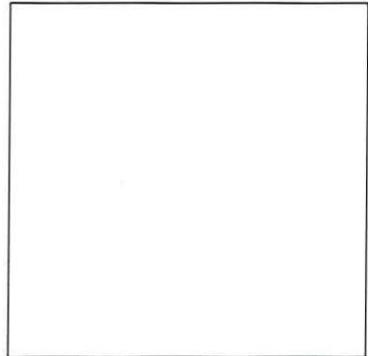
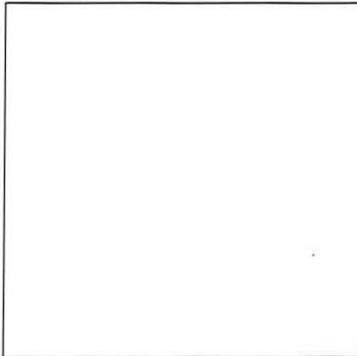


Figura 5. Cromosomas de *Drosophila melanogaster*.

RESULTADOS (Dibuja tus observaciones)



CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

Alvarez Moya Carlos. Manual de Genética II. CUCBA. Universidad de Guadalajara. 1997.

Alvarez Moya Carlos. Comportamiento genotóxico de tres agentes xenobióticos en *Drosophila melanogaster* y en *Tradescantia*. Tesis de Doctorado de la Universidad de Guadalajara. 1998.

Graf U., Wurgler F. R., Kazt A.J., Frei H., Hall C.B. y Kale P. G. (1984) Somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6, 153-188

Graf U. (1989). Somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6, 153-188

Graf U. (1991) Improved High bioactivation cross for the somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 00, 1-9

Graf U. (1992) Genotoxicity testing of promutagens in wings comating mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 8, (1): 15-27.

Graf U. and Schalk NV: (1991) Improved high bioactivation Cross for the wings somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster* *Mutat.Res.* 1-9

Griffiths J. Ff. Millar J. H., Suzuki D.T: and Gelbard W. M. *Genetica*. Quinta edición. México. Editorial Interamericana-Mc. Graw Hill. 1995.

Lindsley D.L y Grell E.H (1968). *Genetic of the Drosophila melanogaster*. *Carnegi Instit. Publ.* 627, 1-60.

Lindsley D.L y Grell E.H (1985). *The Genoma of Drosophila melanogaster*, par I : Genes A-K *Drosoph. Serv.* 62, 1-60.

M Demerec and B P Kaufaman. *Drosophila* guide. Institution Camegie of Washington. Washington DC 1961.

Romero Rodríguez Héctor. Estudio de la actividad mutagénica de aguas potables y potencialmente potables de la ciudad de Guadalajara Jalisco. Tesis de Maestría. Universidad de Guadalajara. 1998.

PRACTICA 3

OBSERVACIÓN DE CROMATINAS Y y X

Dr. Carlos Álvarez Moya.

INTRODUCCIÓN

Los cromosomas son cuerpos observables durante las mitosis celulares. Como ya se menciona su número es característico de cada especie. Sin embargo, en una amplia gama de organismos, existen dos cromosomas, los cuales, son responsables de la determinación del sexo, ellos son: X y Y . En el humano la presencia de dos cromosomas X determina el fenotipo hembra. En los varones o machos de otras especies el par XY determina el fenotipo masculino. Normalmente es muy notable la diferencia entre machos y hembras, sin embargo en muchos casos, las diferencias son mínimas, por lo cual hay la necesidad de recurrir a la observación de estos cromosomas para determinar el sexo. En aves esta práctica es frecuente.

OBJETIVO

Observar las cromatinas X en hembras y Y de varones así como conocer las técnicas para ello.

JUSTIFICACIÓN

Quando una célula no se encuentra en división, la cromatina tiene la forma de hilos largos y delgados. En el momento de la división celular, las fibras de cromatina se condensan.

Los cromosomas están formados por un materia complejo llamado cromatina, el cual consiste en fibras que contienen alrededor de 60% de proteínas, 35% ADN y 5% de RNA. En determinadas especies se halla una pareja de cromosomas que, a pesar de no ser iguales, son considerados homólogos (debido a que se aparean durante la meiosis); son los denominados cromosomas sexuales, pues no aparecen igual en hembras que en machos. El hombre, por ejemplo, el par número 23 puede presentar un cromosoma grande (designado con letra X) o uno mas pequeño (el cromosoma Y); las mujeres poseen en sus células dos cromosomas X.

El alumno aprenderá y aplicara una técnica para poder observar cromátidas humanas y podrá analizar las ventajas y limitaciones de esta técnica

MATERIALES

CROMATINA X	Portaobjetos
CROMATINA Y	Cubreobjetos
Aceto-orceina 0.02%	Algodón
Papel absorbente	Abatelenguas
Acido acético al 50%	

EQUIPO

Microscopio

Cromatina X (Raspado bucal)

PROCEDIMIENTO

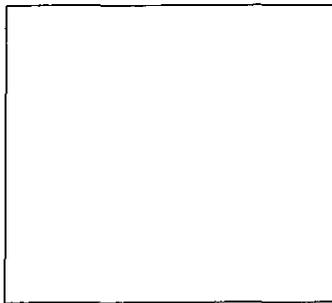
1. Limpiar dentro de la mejilla con un hisopo de algodón.
2. Raspar cuidadosamente la mejilla con el abatelenguas.
3. Colocar el raspado en un portaobjetos y agregar aceto-orceina durante 5 min.
4. Colocar un cubre objetos y eliminar el exceso de colorante con el papel, para ello, doblar la hoja y presionar cuidadosamente hasta que la laminilla luzca casi transparente.
5. Hacer la observación al microscopio a 10X, ubicar primero las células.
6. Hacer la observación a 40X, observar los núcleos y el corpúsculo de Barr. Debido a que solo se observa este cuerpo en 1/10 células, observar por lo menos 50 células.

Cromatina Y (en la raíz del cabello)

PROCEDIMIENTO

1. Cortar un cabello de 2cm de largo con todo y raíz y colocarlo en un portaobjetos.
2. Cubrirlo con una gota de aceto-orceina filtrada.
3. Calentar la laminilla a 60°C sobre una flama pequeña por 30 segundos.
4. Pasar el pelo a otra laminilla y colocarlo en una gota de ácido acético al 50%.
5. Apreciar los detalles de la raíz al microscopio.
6. Separar la vaina externa blanda. Quitar el resto, incluyendo el bulbo que generalmente se rompe y la vaina interna fibrosa que dificulta la observación.
7. Secar cuidadosamente el ácido acético con papel filtro y cubrir con aceto-orceina.
8. Colocar el cubreobjetos sin hacer presión.
9. Sellar la preparación con parafina y observar al microscopio.

RESULTADOS (Dibuja tus observaciones)



CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

Alvarez Moya Carlos. Manual de Genética II. CUCBA. Universidad de Guadalajara. 1997.

Alvarez Moya Carlos. Comportamiento genotóxico de tres agentes xenobióticos en *Drosophila melanogaster* y en *tradescantia*. Tesis de Doctorado de la Universidad de Guadalajara. 1998.

Griffiths J. Ff. Millar J. H., Susuki D:T: and Gelbard W. M. Genetica. Quinta edición. México. Editorial Interamericana-Mc. Graw Hill. 1995.

Heflich H.R (1991) Chemical mutagens. En: Genetic Toxicology. (li P.A., Heflich R. H. Ed.). CRC. Press, New Jersey, pp. 143-202

M Demerec and B P Kaufaman. *Drosophila* guide. Institution Camegie of Washington. Washington DC 1961.

Romero Rodríguez Héctor. Estudio de la actividad mutagénica de aguas potables y potencialmente potables de la ciudad de Guadalajara Jalisco. Tesis de Maestría. Universidad de Guadalajara. 1998.

Salamanca F. Citogenética Humana. Editorial Panamericana. México D.F. 1990

PRACTICA 4

OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LOS CROMOSOMAS HUMANOS

Dr. Carlos Alvarez Moya

INTRODUCCIÓN

Los cromosomas son estructuras formadas a partir de ADN. Cada especie posee un número característico de ellos y, particularmente en el humano, el número es de 46. El cariotipo, es decir, la dotación completa de cromosomas de una especie, nos permite conocer la existencia de aberraciones de tipo cromosómico, ya que en el caso de existir rupturas, deleciones, ausencias o duplicaciones de cromosomas, tales alteraciones pueden ser fácilmente detectables. Existen varias técnicas de tinción: bandas C que tiñen sólo centrómeros, bandas G (giemsa), bandas R etc. Dada la alta incidencia de enfermedades genéticas en el hombre resulta sumamente importante contar con una técnica para la tinción de cromosomas. En este caso se describirá la técnica de bandas G.

OBJETIVOS

- 1.-Conocer los procedimientos para la obtención de los cromosomas humanos.
- 2.-Conocer las diferencias entre los cromosomas y analizar como estas diferencias pueden tener diferentes usos: taxonómicos y diagnóstico de daño genético.

JUSTIFICACIÓN

Los cromosomas contienen la información genética del organismo. Cada tipo de organismo tiene un número de cromosomas determinado; en la especie humana, por ejemplo, hay 23 pares de cromosomas organizados en 8 grupos según el tamaño y la forma. La mitad de los cromosomas proceden del padre y la otra mitad de la madre. Las diferencias entre individuos reflejan la recombinación genética de estos juegos de cromosomas al pasar de una generación a otra.

Esta práctica se diseño para que el alumno adquiriera la habilidad de utilizar los procedimientos para la obtención de cromosomas humanos, así como el poder conocer las diferencias existentes entre los cromosomas y al analizarlos les pueda dar algún uso que necesite de los conocimientos adquiridos.

MATERIAL

Jeringa de 10ml	4 vasos de precipitado
Papel	Estufa de incubación
Centrífuga	Laminillas
Tubo de ensayo de 8ml con rosca	
Campana de flujo laminar o en su defecto un mechero	

REACTIVOS

Heparina

Medio McCoy

Fitohemaglutinina

Estreptomicina

KCl 0.075 M

Solución fijadora (3:1 Metanol-Acido acético)

Solución de tripsina (0.2 g en 100ml de agua desmineralizada)

Solución de PBS (16g de NaCl, 0.4g de KCl, 2.3g de Na_2HPO_4 , 0.4g de KH_2PO_4 , aforar a 2000ml de agua destilada y guardar en refrigeración)

Solución de Giemsa (1.5ml de giemsa, 1.5ml de metanol, 2ml de ácido acético, 4ml de Na_2HPO_4 , aforar a 50ml)

PROCEDIMIENTO

1° etapa

Se obtienen 2.5ml de sangre heparinizada y se agregan 8cc de medio McCoy adicionando 12 gotas de fitohemaglutinina y 4 gotas de estreptomicina. Todo se realiza en un tubo con rosca frente al mechero. Se cierra el tubo y la mezcla es incubada 78 horas a 37 °C.

2° etapa (fijación)

Una vez terminada la incubación, se añaden 0.3ml de colchicina para obtener las mitosis y nuevamente se incuba la muestra a 90 min. Posteriormente, los tubos son centrifugados 10min. A 1200 rpm y se extrae el sobrenadante. Finalmente se agrega solución fijadora (3ml) y se centrifuga. Esta operación se realiza 3 veces.

Laminillas. El botón final se disuelve V/V con solución fijadora, se agita con una pipeta Pasteur y se deja caer una gota sobre la laminilla, se secan y se guardan 3 días para luego realizar la tinción.

3° etapa (tinción)

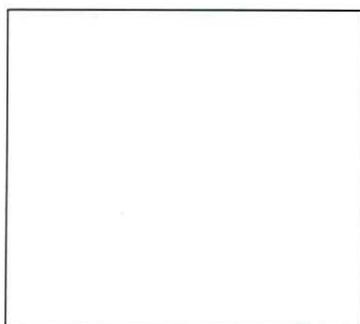
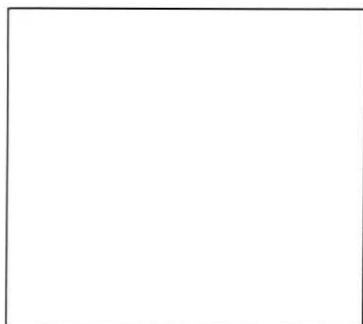
Las laminillas se sumergen a la solución con tripsina por 2 segundos y después, se sumergen también, en la solución con giemsa de 15-30 seg. Posteriormente se lavan en la solución PBS. Para ello, se utiliza un vaso de 250ml. Estos deben mantenerse.

4° etapa (análisis)

Observar las características de cada uno de los cromosomas. Estudiar las características de cada uno de ellos. Si es posible, analizar la presencia de anomalías en el cariotipo estudiado.

Con la ayuda de tu maestro, identifica en el microscopio algunos cromosomas y cuéntalos.

RESULTADOS (Dibuja tus observaciones)



CONCLUSIONES

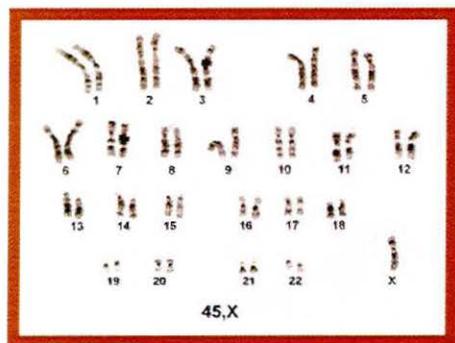


Figura 6. Cariotipo de una mujer con Síndrome de Turner AAX

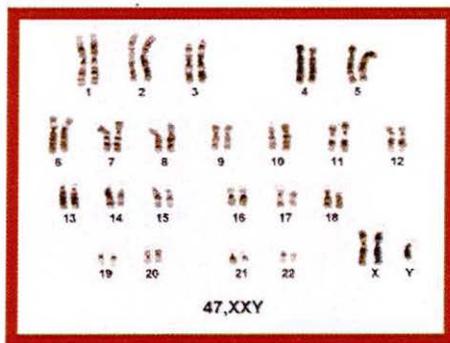


Figura 7. Cariotipo de un varón con síndrome de Klinefelter AAXXY

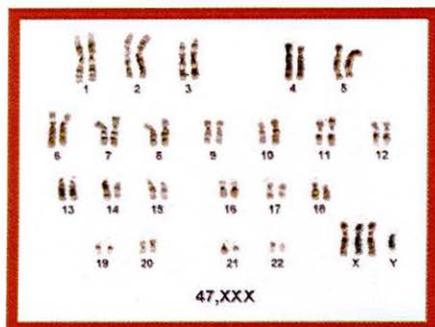


Figura 8. Cariotipo de una mujer AAXXX.



Figura 9. Cariotipo humano



Figura 10. Cariotipo humano

BIBLIOGRAFÍA

Alvarez Moya Carlos. Manual de Genética II. CUCBA. Universidad de Guadalajara. 1997.

Alvarez Moya Carlos. Comportamiento genotóxico de tres agentes xenobióticos en *Drosophila melanogaster* y en tradescantia. Tesis de Doctorado de la Universidad de Guadalajara. 1998.

es.encarta.msn.com/media_461516349_761566230_1_1/Cromosomas_humanos.html - 24k

Griffiths J. Ff. Millar J. H., Susuki D:T: and Gelbard W. M. Genetica. Quinta edición. México. Editorial Interamericana-Mc. Graw Hill. 1995.

<http://es.wikipedia.org/wiki/Cromosoma>

M Demerec and B P Kaufaman. *Drosophila* guide. Institution Camegie of Washington. Washington DC 1961

Romero Rodríguez Héctor. Estudio de la actividad mutagénica de aguas potables y potencialmente potables de la ciudad de Guadalajara Jalisco. Tesis de Maestría. Universidad de Guadalajara. 1998.

Salamanca F. Citogenética Humana. Editorial Panamericana. México D.F. 1990.

PRACTICA 5

ANÁLISIS DE MUTACIONES SOMÁTICAS EN LOS PELOS ESTAMINALES DE *Tradescantia*

Dr. Carlos Alvarez Moya

INTRODUCCIÓN

El bioensayo en los pelos estaminales de *Tradescantia* es muy útil para evaluar la mutagenicidad de agentes físicos y químicos. Esta prueba es eficiente para la detección de mutágenos en medios acuáticos, además, de ser muy sencilla y barata, produce resultados en un promedio de dos semanas. Se reportó que un incremento relativo en la frecuencia de mutación somática en *Tradescantia* puede indicar el mismo incremento relativo en el riesgo mutagénico en humanos.

OBJETIVO

Observar el efecto mutagénico de algunas sustancias químicas en un sistema de prueba.

JUSTIFICACIÓN

Si la mutación ocurre en una célula que desarrolla un tejido somático, dará origen a una población de células mutantes idénticas. Las células idénticas de una población originada por mitosis a partir de una sola célula progenitora se denominan clones. Si la mutación es dominante se expresará en el fenotipo de aquellos organismos diploides. Si es recesiva no se expresará ya que quedará enmascarada por el alelo salvaje (dominante), una segunda mutación puede crear una mutación homocigota recesiva, pero es un evento raro.

Esta practica esta diseñada para que el alumno observe y cuantifique las frecuencias de mutaciones que se presentan en este sistema de prueba.

PROCEDIMIENTO

1. Preparar una sustancia, de la cual se sospecha que, posee actividades mutagénica.
2. La sustancia se coloca en 100ml de solución e inmediatamente se sumergen los cortes de *Tradescantia*, para ello, los cortes más fuertes son seleccionados.
3. La lectura de los pelos estaminales se hace 6 días después del tratamiento durante 6-8 días.
4. Para observar estos eventos, rehacen preparaciones poniendo una gota de aceite de parafina extendida en un portaobjetos colocando 6 estambres: 3 pétalos y 3 antipétalos.

5. Utilizando el microscopio estereoscópico se peinan los estambres con una aguja de chaquira y se cuentan los pelos antipétalo y los pelos pétalo. El total se obtiene al multiplicar la suma por 3.
6. Cada estambre ya peinado se revisa con cuidado para detectar la presencia de eventos mutacionales: células color rosa.
7. Para cuantificar los eventos rosa se toma el siguiente criterio: una hilera de células rosa entre dos azules es considerada como un solo evento. En el caso de que dos células rosa estuvieran separadas por una o varias azules se registrara como dos eventos.
8. Se obtiene el total de frecuencia de mutación por día dividiendo la cantidad de eventos entre el total de pelos estaminales.
9. La media de la frecuencia de mutación es obtenida al promediar las mutaciones diarias de los 6 o 7 días de conteo.
10. Estos datos son comparados con los datos obtenidos de un testigo negativo (agua destilada)

RESULTADOS

Hoja de reporte de un día (ejemplo)

N1 ____ DE N1 de pelos eventos mutacionales frecuencia

FLOR

1	300	1	1/300
---	-----	---	-------

- 1° Obtener la frecuencia promedio diaria
- 2° Obtener la frecuencia promedio de los días 7-15
- 3° Hacer lo mismo con un testigo negativo (mismas condiciones pero sin mutágeno)
- 4° Aplicar prueba de varianza entre el grupo experimental y el testigo negativo.

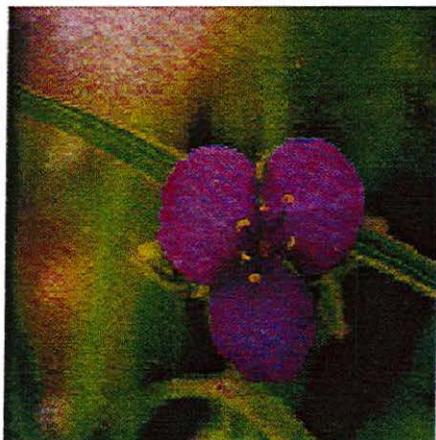


Figura 11. Tradescantia clon 4430

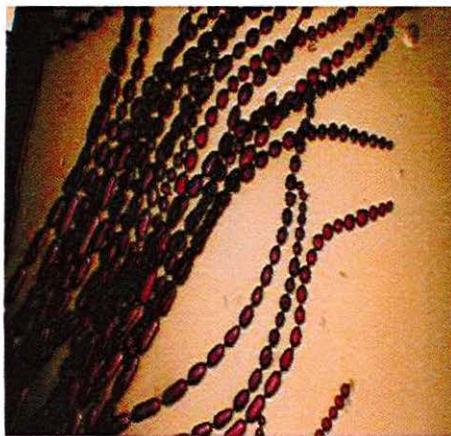


Figura 12. Pelos estaminales de Tradescantia clon 4430

CONCLUSIONES

Fue significativa la varianza? Que significa?

BIBLIOGRAFÍA

Alvarez Moya Carlos. Manual de Genética II. CUCBA. Universidad de Guadalajara. 1997.

Alvarez Moya Carlos. Comportamiento genotóxico de tres agentes xenobióticos en *Drosophila melanogaster* y en tradescantia. Tesis de Doctorado de la Universidad de Guadalajara. 1998

Grant, W.F., H.G. Lee, D.M. Logan and M.F. Salamote 1992. The use of *Tradescantia* and *Vicia fava* bioassays for the in situ detection of nmutagens in an aquatic environment, *Mutation Res.* 270: 53- 64.

Griffiths J. Ff. Millar J. H., Susuki D:T: and Gelbard W. M. Genetica. Quinta edición. México. Editorial Interamericana-Mc. Graw Hill. 1995.

Gichner T. (1982) Somatic mutation induced by maleic hidrazine and its potassium and diethanolamine salts in *Tradescantia* mutation assay. *Mutat. Res.* 103, 289-295

Ichikawa S. 1992. *Tradescantia* stamen-hair system as an excellent botanical tester of mutagenicity: its responses to ionizing radations and chemical mutagens, and some chemical mutagens, and some synergistic effects found. *Mutation Res.* 270: 3-22.

Knasmuller, S., T.W. Kim, T.H. Ma 1992. Synergistic effect between tannic acid and X-ray detected by the *Tradescantia*-micronucleus assay, *Mutation Res.* 270: 31-7

Ma, T.H., C. XU, S. Liao, H. Mcconnell, B.S. Jeong, C.D. Won 1996. In situ monitoring with the *Tradescantia* bioassay on the genotoxicity of gaseous emissions from a closed land fill site and as incinerator, *Mutation Res.* 359: 39- 52.

Romero Rodríguez Héctor. Estudio de la actividad mutagénica de aguas potables y potencialmente potables de la ciudad de Guadalajara Jalisco. Tesis de Maestría. Universidad de Guadalajara. 1998.

PRACTICA No. 6

MEDIOS DE CULTIVO PARA *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Dr. Carlos Alvarez Moya.

INTRODUCCIÓN

Drosophila melanogaster constituye un excelente modelo para la realización y comprobación de fenómenos genéticos. Para llevar a cabo los experimentos con este insecto es deseable mantenerlo en condiciones óptimas de temperatura humedad y alimentación. Los medios de cultivo de *Drosophila* son variados e incluyen: papas, plátanos, harinas de maíz etc. En todos ellos es conveniente agregar fungicidas y bactericidas para evitar la contaminación del mismo. Por todo lo anterior, es aconsejable que el alumno conozca como se elaboran estos medios, pues de su buena elaboración dependerá que se cuente o no con los especímenes.

OBJETIVO

Preparar medio de cultivo para *Drosophila melanogaster*

JUSTIFICACIÓN

Las moscas de la fruta, son frecuentemente utilizadas en los laboratorios de investigación genética. Para propósitos de investigación, fácilmente pueden reemplazar a los humanos. Se reproducen rápidamente, de modo que muchas generaciones pueden ser estudiadas en un corto tiempo, y ya se conoce el mapa completo de su genoma.

En esta practica el alumno puede adquirir habilidad en la realización de medios de cultivo para *Drosophila melanogaster*

MATERIALES

AGUA	1250ml
AGAR – AGAR	7.6 g
AZÚCAR	70 g
HARINA DE MAÍZ	112 g
LEVADURA DE CERVEZA SECA	55 g
NIPAGIN (fungicida)	0.4 g
ACIDO PROPIONICO (bactericida)	4ml

EQUIPO

Frascos de vidrio de ¼
Espátulas
Guantes
Platina
Estufa de cultivo



Figura 13. Medio de cultivo para mantenimiento de *Drosophila melanogaster*

Figura 14. Medio de cultivo para *Drosophila melanogaster*

PROCEDIMIENTO

Medio para mantenimiento y propagación de las líneas.

- 1) El azúcar y el agar son disueltos en 870 ml de agua y se hace lo mismo con la levadura y la harina en 380 ml de agua.
- 2) La primera mezcla se lleva a ebullición con movimiento continuo.
- 3) La segunda se agrega a la primera y se deja hervir de 5 a 10 min.
- 4) Se retira del fuego añadiendo nipagin y ácido propiónico y posteriormente se sirve en frascos de vidrio esterilizados.

REPORTE

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

Alvarez Moya Carlos. Comportamiento genotóxico de tres agentes xenobióticos en *Drosophila melanogaster* y en *tradescantia*. Tesis de Doctorado de la Universidad de Guadalajara. 1998.

Alvarez Moya Carlos. Manual de Genética II. CUCBA. Universidad de Guadalajara. 1997.

Graf U., Wurgler F. R., Kazt A.J., Frei H., Hall C.B. y Kale P. G. (1984) Somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6, 153-188

Graf U. (1989). Somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6, 153-188

Graf U. (1991) Improved High bioactivation cross for the somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 00, 1-9

Graf U. (1992) Genotoxicity testing of promutagens in wings somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 8, (1): 15-27.

Graf V. and Schalk NV: (1991) Improved high bioactivation Cross for the wings somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster* *Mutat.Res.* 1-9
Griffiths J. Ff. Millar J. H., Susuki D:T: and Gelbard W. M. *Genetica*. Quinta edición. México. Editorial Interamericana-Mc. Graw Hill. 1995.

Lindsley D.L y Grell E.H (1968). *Genetic of the Drosophila melanogaster*. Carnegie Instit. Publ. 627, 1-60.

Lindsley D.L y Grell E.H (1985). *The Genoma of Drosophila melanogaster*, par I : Genes A-K *Drosoph. Serv.* 62, 1-60.

M Demerec and B P Kaufman. *Drosophila guide*. Institution Carnegie of Washington. Washington DC 1961.

PRACTICA No. 7

EXPERIMENTO DE DNA FINGERPRINTING

Dra. Alma Rosa Villalobos A., Eduardo Sosa M., Verónica Palomera A.

INTRODUCCIÓN

En 1985 Alec J. Jeffreys desarrolló una tecnología de identificación precisa y accesible basada en el hecho de que todos los individuos llevan en el genoma de cada una de sus células un código de barras que los diferencia como individuos. Esta técnica es denominada huella génica o DNA fingerprinting.

La huella génica no solo se encuentra presente en un tejido como una huella dactilar, sino que cada una de las 50 billones de células que componen a un individuo comparten el mismo genotipo por lo cual es posible realizar la técnica de DNA fingerprinting a partir de gotas de sangre, semen y saliva tanto secas o en estado líquido, cabello, células presentes en excremento, muestras dentales, estructuras óseas, tejido momificado (aun cuando este degradado el ADN pueden estudiarse los microsátélites).

Debido a que todos los individuos son únicos genéticamente y al uso de varios marcadores moleculares altamente variables, la posibilidad de que dos organismos presenten la misma huella génica es remotísima; una entre un billón por lo cual este tipo de técnica presenta un grado de confiabilidad muy elevado.

El experimento introduce los conceptos básicos para DNA fingerprinting (perfil de DNA o huella génica), un método que le permite a las ciencias forenses identificar delincuentes, personas desaparecidas o secuestradas, cadáveres carbonizados; reconstruir la historia de la humanidad al investigar momias milenarias y llevar a cabo pruebas de paternidad o de relaciones de parentesco, detectar enfermedades infecciosas antes de que aparezcan sus síntomas e inclusive es posible saber si un implante de medula ósea resultará exitoso. También permite establecer relaciones evolutivas entre especies actuales y especies extintas, determinar con mayor precisión la ubicación taxonómica de las especies, así como análisis de pedigrí de caninos. A nivel de poblaciones es posible determinar los grados de diversidad genética, establecer la presencia de endogamia y trazar los patrones de migración de animales salvajes.

El DNA fingerprinting es una herramienta útil para examinar diferencias y similitudes en los organismos a nivel genético-molecular. El desarrollo del experimento permite al estudiante simular la técnica comúnmente utilizada en procedimientos forense en humanos, esto es, obtener DNA de cualquier célula, digerirla con enzimas de restricción y analizar los fragmentos de DNA resultantes a través de electroforesis en geles de agarosa. Los resultados proporcionan patrones de DNA, que revelan las diferencias y similitudes en el genoma de varios individuos. Esta práctica también proporciona un punto de comienzo para discusiones sobre implicaciones sociales, éticas y legales del análisis de DNA.

En este experimento, los estudiantes utilizan seis muestras de DNA de plásmidos. Una muestra se colectó en una escena de crimen, las otras cinco se obtuvieron de posibles sospechosos y se sometieron a digestión con dos enzimas de restricción. Los fragmentos de DNA se separan por electroforesis en geles de agarosa y se visualizan con un colorante no tóxico (azul de metileno) para DNA. Basándose en los patrones de los fragmentos de restricción, los estudiantes comparan la muestra del crimen (la evidencia) con las muestras de los sospechosos. El kit no contiene DNA humano real.

Así este experimento demuestra también los procedimientos básicos de electroforesis en geles de agarosa, incluyendo la preparación del gel, la aplicación de la muestra de DNA (junto con el buffer de carga) el corrimiento electroforético y la tinción del gel. También demuestra los principios de determinación de tamaño de fragmentos de DNA

Ejercicios preliminares al laboratorio

I. Introducción al DNA fingerprinting.

El análisis de las tres moléculas de DNA permite detectar diferencias y similitudes en muestras de DNA de diferentes individuos. Para ello observe la información de cada molécula y responda las siguientes preguntas.

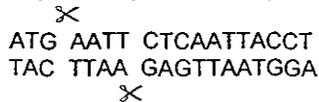
1. Compare el arreglo que presenta el esqueleto de azúcar-fosfato en las tres moléculas. ¿Existe alguna diferencia entre los enlaces fosfodiéster?
2. ¿Las tres moléculas contienen las mismas bases nitrogenadas?
3. ¿Los pares de bases están ordenados idénticos en las tres moléculas? Indique el patrón de complementariedad de bases.
4. Resumir las diferencias y similitudes de las tres moléculas.
5. Para determinar si las tres muestras de DNA son idénticas o diferentes ¿Qué es necesario comparar? Escriba la secuencia de bases de cada molécula.

II. Digestión de las muestras de DNA con enzimas de restricción.

¿Cómo podemos detectar diferencias en la secuencia de bases?. A primera vista, contestar esta pregunta parece difícil. Para responderla es necesario determinar si la secuencia lineal de pares de bases en el DNA es idéntica o no.

En 1968 se descubrió un grupo de enzimas que al interactuar con cualquier molécula de DNA resultaba en la hidrólisis (rompimiento enzimático) en los enlaces fosfodiéster entre ciertas pares de bases específicas (sitios de reconocimiento) ocasionando que la molécula de DNA se dividiera en dos fragmentos. Estas tijeras moleculares son llamadas endonucleasas de restricción.

En este experimento de DNA se utilizarán dos endonucleasas de restricción: EcoRI y PstI. Por lo que es importante comprender como actúan estas encimas.



La línea que atraviesa las pares de bases representan el sitio donde la endonucleasa de restricción reconoce el sitio GAATTC.

Observe la figura y conteste las siguientes preguntas:

1. ¿Cuántos fragmentos de DNA resultaran de este corte? _____
2. Escribe la secuencia de nucleótidos de cada fragmento resultante?
El tamaño de los fragmentos se expresa indicando el número de pares de bases de cada fragmento. Indica el tamaño de los fragmentos (menciona cualquier discrepancia que pudieras detectar).
3. El fragmento pequeño contiene _____ pb.
4. ¿Cuál es el tamaño del fragmento grande? _____ pb.

Considere los dos ejemplos de DNA mostrados a continuación. Se muestran cadenas sencillas por simplicidad.

Muestra 1: CAGTGATCTCGAATTCGCTAGTAACGTT

Muestra 2: TCATGAATTCCTGGAATCAGCAAATGCA Si ambas moléculas son digeridas con una enzima de restricción que reconoce la secuencia GAATTC. Determine el número de fragmentos resultantes y su tamaño en cada muestra.

Muestra 1:

- 5 Número de fragmentos _____.
- 6 Ordene los fragmentos de mayor a menor tamaño.

Muestra 2:

- 7 Numero de fragmentos _____.
- 8 Ordene los fragmentos de mayor a menor tamaño

OBJETIVO

Determinar e identificar el DNA humano mediante el uso de un kit, usando la técnica de electroforesis y la digestión con enzimas de restricción, así como la interpretación y aplicación de los resultados obtenidos.

JUSTIFICACIÓN

El uso de esta técnica empleada en genética para la identificación de los individuos en base al análisis del DNA ha sido de suma importancia para criminología, al analizar restos orgánicos como pelos, semen, saliva, sangre, etc. y que han quedado en la escena de un crimen o de un delito sexual, así como la identificación de personas desaparecidas, a partir del cadáver, o investigación de la paternidad

En esta práctica el alumno obtendrá las herramientas para poder manejar la técnica, la aplicación de esta, así como su intervención cuando sea necesaria.

DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

MATERIAL

Mezcla de enzimas EcoRI/pstI
Agarosa líquida
Buffer de corrimiento (TBE 1 X)
Agua para destañir
Marcadores de DNA λ HindIII
Buffer de carga
Muestras de DNA CS y S1 a S5
Regla milimétrica
Papel milimétrico y semilogarítmico

EQUIPO

Micropipeta P-10 o P-20 con puntas
Microtubos: Verde, azul, naranja, violeta, rojo y amarillo
Marcador para microtubos
Contenedor de basura
Gradilla de hule espuma para Microtubos
Bandeja para gel y peines: cinta
Cámara y fuente de poder
Charola para teñir el gel

PROCEDIMIENTO

I. Digestión de las Muestras de DNA (30 minutos)

El estudiante utiliza, en la primera etapa del procedimiento del DNA Fingerprinting, las enzimas de restricción para digerir las diferentes muestras de DNA.

1. Marcar cada uno de los microtubos como sigue:

VERDE	CS = escena del crimen
AZUL	S1 = sospechoso 1
NARANJA	S2 = sospechoso 2
VIOLETA	S3 = sospechoso 3
ROJO	S4 = sospechoso 4
AMARILLO	S5 = sospechoso 5

2. Marcar además los tubos con tu nombre y fecha y colocarlos en la gradilla de hule espuma
3. Pipetear 10 µl de cada muestra de DNA de los tubos stock y colocarlos en el fondo del microtubo **(tomando en cuenta el color del microtubo)**
4. Colocar 10 µl de la mezcla de enzima “ENZ” en la pared de cada uno de los microtubos.
5. Tapar los tubos y mezclar los componentes suavemente.
Si es posible utiliza una microcentrifuga para bajar las gotas al fondo (Centrifugar rápidamente por 20 segundos).
6. Colocar los tubos en la gradilla e incubarlos a 37°C por 45 minutos o durante toda la noche.
7. Después de la incubación retirar los tubos del baño maría y colocarlos en el refrigerador hasta el siguiente periodo de laboratorio.

II. Elaboración del gel de Agarosa al 0.8 % (30 minutos)

- 1.- Vaciar cuidadosamente la solución de agarosa al molde del gel hasta llenarlo con una profundidad de alrededor de 5 mm.
El gel debe cubrir cerca de un tercio de la altura de los dientes del peine.
2. Después de que la agarosa se solidifique, retire los peines y colocar el molde con el gel en la cámara de electroforesis orientando los pozos del gel hacia el electrodo (-) de color negro y que la base este hacia el polo rojo (+)
3. Llenar la cámara de electroforesis hasta cubrir el gel con buffer TBE 1X (aproximadamente 275 ml).

Momento para detener el Experimento

Cubrir la cámara de electroforesis y guardarla hasta utilizar.

El gel puede permanecer en buenas condiciones por algunos días, si se sumerge completamente en el buffer

III. Aplicación y Corrimiento Electroforético de las muestras de DNA digeridas

1. Retirar las muestras de DNA digeridas del refrigerador.
2. Centrifugar los tubos rápidamente con el propósito de recolectar el líquido en el fondo del tubo.
3. Añadir 5 µl del colorante de carga marcado como “LD” en cada tubo.

4. Tapar los tubos y mezclar suavemente agitando los tubos con el dedo y centrifugar.
5. Utilizando una punta diferente para cada muestra, colocar 10 µl de cada muestra dentro de los 6 pozos del gel, con el siguiente orden:

Línea 1	M, Marcador de DNA		10µl
Línea 2	VERDE	CS = escena crimen	20µl
Línea 3	AZUL	S1 = sospechoso 1	20µl
Línea 4	NARANJA	S2 = sospechoso 2	20µl
Línea 5	VIOLETA	S3 = sospechoso 3	20µl
Línea 6	ROJO	S4 = sospechoso 4	20µl
Línea 7	AMARILLO	S5 = sospechoso 5	20µl

6. Colocar la tapa en la cámara de electroforesis. Cuidando entre la correspondencia el cable rojo y negro de la tapa concordará con los cables rojo y negro de la base de la cámara. Conectar los electrodos con la fuente de poder.
7. Encender la fuente de poder y correr las muestras a 100 V por 30 o 40 minutos.
8. Apagar la fuente de poder una vez terminado el proceso de electroforesis (esto ocurre cuando los colorantes han migrado ¾ partes del gel)

IV. Tinción del gel

1. Retirar cuidadosamente la bandeja con el gel de la cámara. Tener cuidado ya que ¡el gel es muy resbaloso!
2. Colocar el gel en la bandeja de tinción y agregar.
3. Agregar 60ml de colorante 1X. Cubrir la bandeja con papel aluminio. Dejar el gel teñido toda la noche.

V. Lavado y fotografía (o secado) del gel

1. Vaciar el colorante en el contenedor apropiado y desteñir el gel con 60 ml de agua durante 15 min.
2. Dejar secar el gel sobre una película de soporte o en la bandeja de 3-5 días. Cuando el gel este seco, encintarlo dentro de tu cuaderno de notas de laboratorio para un registro permanente.

RESULTADOS

Reporte sus observaciones al contestar las siguientes consideraciones:

- 1) Describa la muestra de DNA antes y después de la digestión (sus propiedades físicas) ¿Existen diferencias notables?
- 2) ¿Puedes ver alguna evidencia que indique que tu DNA fue fragmentado o alterado al añadir la mezcla de *EcoR1* y *Pst1*?
- 3) Sin ninguna evidencia de cambio ¿es posible que el DNA este fragmentado?
- 4) ¿Al siguiente día aparece alguna indicación de que las enzimas de restricción cambiaran el DNA en alguno de los microtubos? Explica tu razonamiento

Reporte sus observaciones al contestar las siguientes consideraciones:

1. Si la molécula de DNA tiene carga negativa ¿hacia que polo migrará?. Explica tus resultados.
2. ¿Qué color representa al polo negativo?
3. ¿Cuáles de los fragmentos (grandes o pequeños) esperas que corran hacia el punto opuesto del gel mas rápidamente.

Reporte sus observaciones al contestar las siguientes consideraciones:

1. ¿Qué contiene cada banda del gel?
2. ¿Cuál sería la explicación lógica de la presencia de mas de una banda en cada muestra?
3. ¿Qué fue lo que provocó la fragmentación del DNA?
4. ¿Cuál de las muestras de DNA tienen el mismo numero de sitios de restricción para las endonucleasas utilizadas? Escribe también el número del carril.
5. ¿Cuál muestra tiene el fragmento de DNA mas pequeño?
6. ¿Cuántos sitios de restricción presenta la muestra del carril tres?
7. Basado en tu análisis de la fotografía ¿Cuál es la conclusión acerca de la muestra de DNA en la fotografía? ¿Alguna de las muestras parecen provenir de la misma fuente? Si es así ¿Cuáles muestras? Describe la evidencia que apoya tu conclusión.

Reporte sus observaciones al contestar las siguientes consideraciones:

1. ¿Por que los puntos de aplicación de las muestras se orientan hacia el polo negativo?
2. ¿Cómo es posible que la muestra de DNA pueda colocarse sin derramarse si el buffer de corrimiento cubre completamente el pozo de aplicación?
3. Describa la migración del buffer o carga en el gel de agarosa.
4. Explique porque hay una banda lenta y una banda rápida ¿A que colorante Corresponde cada una de ellas?

Análisis de los patrones de DNA digerido.

Incluya la fotografía o copia del gel seco; indicando cual muestra esta en cada carril.

1. ¿Qué es lo que tratamos de determinar? Replantear la pregunta central.
2. ¿Cuáles de tus muestras de DNA fueron digeridas?
3. ¿Qué observarías en el gel si el DNA no hubiera sido digerido?
4. ¿Qué causa la digestión del DNA?
5. ¿Qué determina el lugar en donde las endonucleasas cortan el DNA?
6. Una endonucleasa de restricción corta dos muestras de DNA en el mismo lugar. ¿Qué puedes asumir acerca del sitio de corte?
7. ¿Algunas de las muestras sospechosas parecen tener los sitios de reconocimiento para *EcoRI* o *PstI*, en el mismo lugar del DNA de la escena del crimen?
8. Basado en el análisis anterior ¿Algunas de tus muestras sospechosas, tienen el mismo patrón de DNA de la escena del crimen? Describe la evidencia científica que apoya tu conclusión.

I. Análisis cuantitativo del tamaño de los fragmentos de DNA

Con el fin de hacer la comparación mas exacta entre DNA de la escena del crimen y los DNA de los sospechosos; mas que una comparación visual, es necesario medir el tamaño de los fragmentos, obtenidos en el gel.

1. Mida la distancia de migración de cada banda (en milímetros), usando una regla. Mida la distancia del punto de aplicación de cada banda de DNA y **anote sus resultados en la tabla** que se proporciona. Utilice los datos de la tabla para construir una curva estándar y estimar el tamaño de los fragmentos de la escena del crimen y de los sospechosos.

2. Para hacer una estimación precisa de los tamaños de los fragmentos, tanto para los sospechosos como para los de la escena del crimen; construya una curva estándar usando la distancia (eje X) y tamaño del fragmento (eje Y) del marcador *NIHindIII*.

Usando ambos papeles, **el estándar y el semilogarítmico**, marque la distancia entre el tamaño para las bandas 2-6. en cada grafica use una regla y dibuje la línea uniendo los puntos. Extienda la línea hasta el margen derecho de la orilla de la grafica.

- a. ¿Cuál grafica muestra la línea mas recta?
 - b. Pasa tu estimación del tamaño de los fragmentos del DNA de los sospechosos y de la escena del crimen
 - c. ¿Por qué crees que una grafica es mas recta que la otra?
3. Decida que grafica, estándar o semilogarítmica debería ser usada para determinar el tamaño de los fragmentos de los sospechosos y del DNA de la escena del crimen.
Justifique su selección
4. Para estimar el tamaño de los fragmentos de la escena del crimen y de los sospechosos, investigue la distancia de corrimiento del fragmento. Localice la distancia sobre el eje de las X, de la grafica estándar y continúe la línea hacia el eje de la Y, donde la línea intercepte el eje Y, obtendrá el valor aproximado del tamaño del fragmento de DNA desconocido. Haga esto para todos los fragmentos de los sospechosos de la escena del crimen.
5. Compare los tamaños de los fragmentos.
¿Hay algún sospechoso que coincida? ¿Seguro?

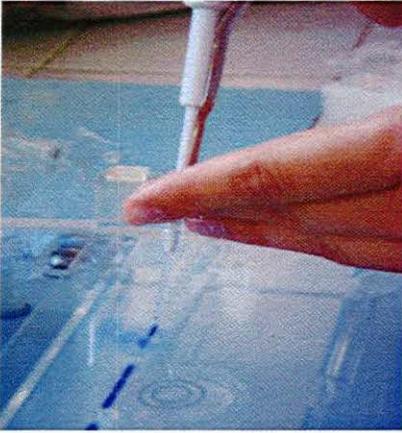


Figura 15. Técnica para el vaciado de muestras en gel

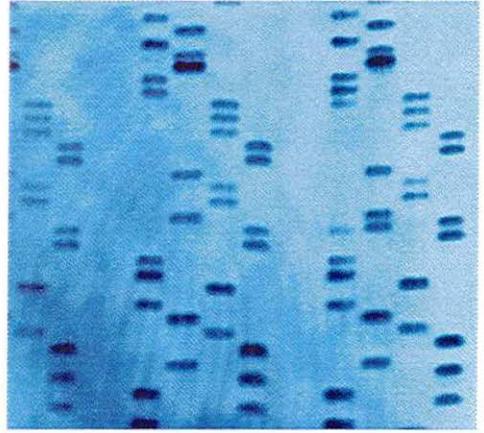


Figura 16. Fotografía el gel seco; indicando cual muestra esta en cada carril.

BIBLIOGRAFÍA

BIORAD. Biotechnology Explorer DNA Fingerprinting Kit. Instruction Manual. Catalog Number 166-007 – EDU

Rangel-Villalobos H. Relación Genética entre poblaciones Mexicanas: Mestiza, Huichol, Purepecha y Tarahumara, Revelada por Seis AMP-FLPs. Tesis de Doctorado en Genética Humana. Universidad de Guadalajara, 2000.