
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



"MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE LA ASIGNATURA MÉTODOS
ANALÍTICOS (BC117)"

PRODUCCIÓN DE MATERIALES EDUCATIVOS
PAQUETE DIDÁCTICO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:
VALTAZAR SANDOVAL DE LEÓN

Las Agujas, Zapopan. Jalisco. enero de 2006



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias

*Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura
en Biología*

207/ C. C. BIOLOGÍA

C. VALTAZAR SANDOVAL DE LEÓN
PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **PRODUCCIÓN DE MATERIALES EDUCATIVOS** opción **PAQUETE DIDÁCTICO** con el título : "MANUAL DE PRACTICAS DE LABORATORIO DE LA ASIGNATURA MÉTODOS ANALÍTICOS (BC117)" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo al **Q. F. B. ROSA MARÍA DOMÍNGUEZ ARIAS.**

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

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan., 7 de Junio del 2005

DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

DRA. ANA ISABEL RAMÍREZ QUINTANA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

C.c.p. - Q. F. B. ROSA MARÍA DOMÍNGUEZ ARIAS- Director del trabajo

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 material educativo, opción paquete didáctico con el título: **“MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE LA ASIGNATURA MÉTODOS ANALÍTICOS (BC117)”** que realizó el/la pasante VALTAZAR SANDOVAL DE LEÓN con número de código 397008205 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.



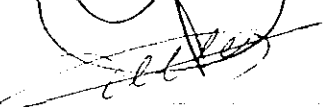
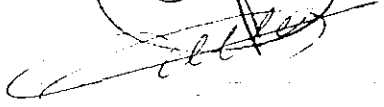
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente

Las Agujas Nextipac, Zapopan Jal. 04 de enero de 2006

Firma
 QFB Rosa María Domínguez Arias
 Director/a del trabajo,

firma
 Asesor(es)

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dra. en C. Mónica Elisa Ureña Guerrero		13/01/06
M en C. Silvia Josefina López Pérez		9-01-06
Dr. en C. Daniel Ortuño Sahagún		9-01-06
Supl. QFB Adolfo Cárdenas Ortega		05 01 06

Handwritten notes:
 CUCBA
 Carlos Álvarez Moya
 16/Ene/06

Handwritten numbers:
 2999121041568
 B3 926

Handwritten number:
 29.2

AGRADECIMIENTOS

No son suficientes unas líneas para agradecer a mis padres por el enorme sacrificio que hicieron para educarme y formarme como persona de bien; entregarme sus años, ser mis amigos, darme su cariño, ser profesores de la vida y por su comprensión son algunas de las cosas que les tengo que agradecer; a mi padre donde quiera que esté, en especial a mi madre que en estos últimos años me dio ánimos para finalizar mi carrera, y sobre todo por terminar el camino que inicio junto a mi padre..... mi educación

A mi directora Rosa Maria Domínguez Arias por la confianza que me brindo, su apoyo y ayuda incondicional, por su ejemplo, sus recomendaciones, motivación y estímulo constante que hicieron posible la realización de este trabajo. Le agradezco de manera muy especial el tiempo que me dedico y su amistad.

A mis sinodales por sus aportaciones, comentarios, sugerencias, observaciones y por corregir el manuscrito de todas sus imprecisiones que enriquecieron más este trabajo: Daniel Ortuño Sahún, Adolfo Cárdenas Ortega, Mónica Elisa Ureña Guerrero, Silvia Josefina López Pérez a ellas dos por apoyarme con material y reactivos para la realización de algunas prácticas.

A la profesora Ana V. Vélez Díaz de Puerto Rico por la ayuda desinteresada, su amistad, su paciencia al contestar mis dudas vía internet, sus recomendaciones, y consejos para una de las prácticas de este trabajo, de igual manera al profesor José Luis Iborra Pastor y colaboradores de España que de la misma forma me brindó su apoyo al resolver todas mis dudas.

A la QFB Cynthia Guadalupe Temores Ramírez por facilitar las instalaciones del laboratorio de ciencias básicas del CUCBA ya que sin su apoyo no se hubiera logrado realizar algunas de las prácticas, así como sus valiosas aportaciones, comentarios para las prácticas.

Agradezco a la Dra. en C. Patricia Nuño González por permitirme entrar al Instituto de Enfermedades Crónico Degenerativas del CUCS, por dejarme hacer uso del equipo para la realización de mis prácticas, por su amistad y sus sugerencias.

Al Dr. Martín de Jesús González Puga jefe del laboratorio de la clínica 46 del IMSS por permitirme la entrada, y facilitarme las instalaciones para la realización de una prácticas. Al MC Juan Hernández Gómez por facilitarme los cultivos bacterianos que necesite y por ayudarme a realizara una práctica en el Hospital del Carmen.

A mi amiga Miriam Sánchez Sánchez que tuve la suerte de conocer al iniciar la licenciatura, por su ayuda, paciencia, motivación para terminar la carrera, por brindarme su amistad y soportar mi compañía todos estos años. Por último, agradecer a todas las personas que de una forma u otra estuvieron implicados en el desarrollo de este trabajo, por sus manifestaciones de cariño y apoyo incondicional; con todos estoy en deuda..... ¡Gracias!

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

CONTENIDO

I. Introducción	3
II. El laboratorio como herramienta para la comprobación de fenómenos biológicos	4
III. Guía de uso del manual de prácticas de laboratorio (Métodos Analíticos BC117)	5
IV. Reglamento del laboratorio	7
V. Lavado de cristalería de laboratorio	9
VI. Prácticas de Laboratorio:	
• Práctica 1: Preparación de soluciones amortiguadoras	10
• Práctica 2: Centrifugación diferencial (fraccionamiento celular de bacterias)	15
• Práctica 3: Calibración de un método espectrofotométrico (Método de Lowry)	24
• Práctica 4: Determinación de cobre (Cu) en salvado de trigo por espectrofotometría de absorción atómica	30
• Práctica 5: Separación de pigmentos vegetales por cromatografía en papel	35
• Práctica 6: Electroforesis de aminoácidos	39
• Práctica 7: Determinación de anticuerpos anti-VIH por el método de ELISA	44
• Práctica 8: Amplificación del gen de la β -globina por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	49
VII. Programa de la asignatura de Métodos Analíticos	55
VIII. Apéndices	56

I. Introducción

Los métodos analíticos son una herramienta de las ciencias biológicas aplicadas, que favorece la resolución de problemas prácticos en diferentes áreas como biomedicina, industria, toxicología ambiental, agricultura, genética, ecología, etc.

El conocimiento de las diversas metodologías utilizadas en los laboratorios (de Biología Experimental, clínicos, ambientales, etc.) es de interés para la formación del biólogo, ya que son un apoyo efectivo tanto en la resolución de problemas analíticos como para la comprobación de fenómenos biológicos.

Por este motivo los estudiantes de biología encuentran en el curso de Métodos Analíticos información sobre los fundamentos, características y aplicaciones específicas, de diferentes técnicas así como de programas de control de calidad, y de las diferentes opciones disponibles en el mercado para analizar una muestra determinada, destacando sus potencialidades y limitaciones.

Es por eso fundamental que el curso de Métodos Analíticos contemple el desarrollo de prácticas de laboratorio, donde los alumnos apliquen los conocimientos teóricos adquiridos en el aula, con el fin de tener una visión integral de las diferentes metodologías. Con este propósito se realizó el Manual de prácticas de Métodos Analíticos que entre sus páginas contiene las técnicas básicas más usuales en la Biología Experimental.

Esperamos que los alumnos de la Licenciatura en Biología encuentren en este manual una guía práctica y sencilla para cumplir con los objetivos del curso, y que favorezca su formación profesional.

Pasante en Biología Valtazar Sandoval de León
MC. Rosa Maria Domínguez Arias

II. El laboratorio como herramienta para la comprobación de fenómenos biológicos

El laboratorio es un lugar independiente, con instalaciones adecuadas, diversos instrumentos y materiales necesarios para realizar experimentos o investigaciones en diversas áreas de la ciencia (Química, Física, Biología, etc.); por su naturaleza interdisciplinaria, es una herramienta fundamental en el desarrollo de las ciencias.

Dentro del laboratorio se busca aplicar los conocimientos teóricos a través de distintos métodos analíticos para analizar, comprender y comprobar fenómenos biológicos. Así, el laboratorio se convierte en un recurso para responder las preguntas que surgen en torno a los fenómenos biológicos.

En el laboratorio se reproducen los fenómenos de interés, se modifican variables para aportar información en relación con las hipótesis planteadas y se manipulan instrumentos para dicha información.

En el laboratorio se pueden estudiar, aislar y caracterizar los componentes que integran a un organismo biológico, para finalmente comprender el funcionamiento del mismo, y de los fenómenos relacionados con él. Estos estudios se realizan con muestras tomadas del organismo que es objeto de estudio, teniendo que separar, identificar y determinar las cantidades relativas de los componentes que contiene la muestra. Para realizar esta separación es necesario conocer las características físico-químicas de las muestras, y el fundamento de los diferentes métodos analíticos disponibles, para así seleccionar el más adecuado, que nos llevará a la obtención de resultados confiables y de calidad.

La importancia del laboratorio en investigaciones relacionadas con algunos fenómenos biológicos radica en el hecho de que las condiciones ambientales del laboratorio están *controladas* y *estandarizadas*, de modo que se puede asegurar que no se producen influencias extrañas (a las conocidas o previstas) que alteren el resultado del experimento o medición, y se garantiza que el experimento es repetible, es decir, cualquier otro laboratorio podría repetir el proceso y obtener el mismo resultado.

Por lo anterior, el laboratorio cumple una labor importante en todas y cada una de las investigaciones, ya que es la herramienta con la cual el investigador puede descifrar, entender y comprobar los fenómenos biológicos que suceden a su alrededor.

III. Guía de uso del manual de prácticas de laboratorio. (Métodos Analíticos BC117)

El presente manual se realizó con la finalidad de proporcionar a los alumnos una herramienta didáctica, para la comprensión del conocimiento adquirido en las aulas por medio de la comprobación en el laboratorio. Las metodologías se escribieron lo más claras y sencillas posibles, para intentar que se trabajen de igual forma.

Cada una de las prácticas consta de los siguientes apartados:

1. **INTRODUCCIÓN**

Describe los aspectos teóricos básicos del tema, los cuales se analizan con mayor amplitud durante las clases previas a la práctica.

2. **OBJETIVOS**

Conocimientos que deben obtener los alumnos al finalizar cada práctica.

3. **MATERIALES Y REACTIVOS**

Describe el material biológico, soluciones, reactivos, cristalería y equipo que se necesitan para llevar a cabo cada práctica.

4. **METODOLOGÍA**

Describe el procedimiento paso a paso, para la realización y desarrollo de la práctica.

5. **DIAGRAMA DE FLUJO**

Representación visual de la metodología que facilita al alumno una mayor comprensión de los materiales utilizados en cada práctica.

6. **RESULTADOS**

En este apartado el alumno realizará las anotaciones pertinentes de lo que observó durante el desarrollo de la práctica

7. **CONCLUSIONES**

En esta sección el alumno reportará el conocimiento adquirido al finalizar la práctica.

8. **ACTIVIDADES**

Incluye un cuestionario de 3 preguntas de conocimientos teóricos y prácticos relacionados con el contenido temático de la práctica, otro tipo de actividades, así como la discusión de la misma.

9. **EVALUACIÓN**

Apartado designado exclusivamente al profesor o al instructor para la evaluación de la práctica, y observaciones realizadas al alumno.

10. **BIBLIOGRAFÍA**

En éste apartado se citan las referencias bibliográficas consultadas para la estructuración de cada una de las prácticas, incluye páginas web que deberán de revisar los estudiantes con frecuencia para asegurarse de su vigencia. Así mismo el alumno debe citar en esta sección las referencias bibliográficas que consulte para contestar las actividades que están al final de cada práctica.

- El alumno deberá asistir a la práctica con el manual de prácticas.
- Las actividades propuestas en cada práctica deberán realizarse como tareas y presentarlas de acuerdo a la fecha establecida por el profesor.
- Los cuestionarios que están en cada práctica en la sección de actividades deberán ser resueltos y presentarse al inicio de la práctica.
- Se llevaran a cabo dos revisiones del manual de prácticas durante el semestre; las fechas serán establecidas por el profesor y/o el encargado del laboratorio.
- Si surgiera alguna duda consultar al profesor y/o encargado del laboratorio.

IV. REGLAMENTO DEL LABORATORIO

1. El alumno dispondrá previamente del calendario de las prácticas correspondientes, por lo cual deberá estudiar el procedimiento de cada práctica antes de ingresar al laboratorio.
2. El uso de bata blanca de manga larga es obligatorio, sin ésta el alumno no podrá trabajar en el laboratorio.
3. Se tendrá un máximo de 10 minutos después de la hora de entrada para tener acceso al laboratorio.
4. El técnico docente responsable de atender la práctica tendrá autoridad para suspender el desarrollo de la misma ante la ausencia del profesor del grupo.
5. El alumno debe respetar las disposiciones del profesor, de no ser así, el profesor tiene la autorización de suspender la práctica al alumno.
6. No deberán colocarse ropa, libros o bolsas sobre las mesas de trabajo, excepto el manual de prácticas o el cuaderno de notas.
7. No se permite fumar dentro del laboratorio, ni la entrada con alimentos.
8. El alumno no podrá abandonar el laboratorio sin permiso del profesor, de hacerlo así, tendrá falta en la práctica.
9. El alumno deberá prestar atención al profesor sobre las indicaciones del manejo y destino del material utilizado en las prácticas.
10. Durante el desarrollo de la práctica debe evitarse el contacto de las manos o de cualquier objeto con la boca, nariz u oídos.
11. En el caso de que se derrame algún reactivo, deberá seguir las siguientes instrucciones:
 - a) informe al profesor lo ocurrido inmediatamente.
 - b) coloque toallas de papel sobre el material derramado.
 - c) después de 15 minutos retire las toallas y pida indicaciones de cómo evitar contaminación química.
12. Todos los residuos peligrosos biológicos-infecciosos y químicos deben de ser desechados en contenedores especiales por los alumnos, de acuerdo a las indicaciones del profesor encargado de la práctica.
13. El equipo de trabajo deberá limpiarse antes de la práctica y al final de la misma, el alumno deberá lavarse las manos antes de salir.

14. El alumno deberá asegurarse de que las llaves de gas, agua y aire queden perfectamente cerradas antes de salir del laboratorio.

15. Todo material de cristalería que sea roto, deberá reponerse por el equipo de trabajo o alumno responsable, así como cualquier tipo de material faltante al finalizar la práctica.

16. Los resultados de cada práctica deberán presentarse en forma individual, de acuerdo con las indicaciones particulares del profesor.

17. Sólo se calificarán aquellos reportes de práctica en donde el alumno cuente con la respectiva asistencia al laboratorio.

V. LAVADO DE CRISTALERÍA DE LABORATORIO

El material de cristalería utilizado en el laboratorio debe estar perfectamente limpio para el desarrollo de un experimento, ya que el material sucio o mal lavado interfiere en las determinaciones analíticas.

El lavado de material de uso común se efectúa de la siguiente manera:

- Enjuagar con agua de la llave el material sucio (usar guantes de hule).
- Preparar un litro de una solución de detergente neutro concentrado al 5% libre de fosfatos.
- Con esponja y escobilla lavar cada una de las piezas.
- Enjuagar abundantemente con agua de la llave.
- Enjuagar con agua destilada 2 veces.
- Enjuagar con agua desionizada.
- Dejar el material en el escurridor.
- Secar el material de vidrio y de acero en un horno de secado a 50°C por 30 minutos.
- Separar el material que necesita esterilización en autoclave.

CONTROL DE CALIDAD EN EL LAVADO DE MATERIAL

Para monitorear el correcto lavado del material de vidrio se debe utilizar una solución de rojo de metilo como indicador de la presencia de detergentes en el material, esto se debe hacer después de haber lavado y antes de poner a secarlo en el horno, tomar como mínimo dos objetos (tubos, cajas de petri, matraces, etc.) del lote que recién se acaba de lavar.

El protocolo de control es el siguiente:

PREPARACIÓN DEL INDICADOR

Disolver 0.1 g de indicador de rojo de metilo en 300 ml de alcohol etílico y adicionar 200 ml de agua destilada.

PROCEDIMIENTO

Se colocan 2 - 5 gotas del indicador en el material de vidrio en estudio y se hace un testigo con una gota de detergente.

INTERPRETACIÓN

En el material bien lavado el indicador no debe cambiar su color original, mientras que en el testigo el indicador cambia a amarillo.

Si en un lote de material hay resultados positivos para la prueba, deberá rechazarse todo el lote del material y lavarse nuevamente.

Práctica 1

Preparación de soluciones amortiguadoras



INTRODUCCIÓN

Muchos compuestos importantes en Biología, contienen grupos débilmente ácidos y básicos, por ejemplo las moléculas de proteínas; la respuesta de estos grupos a cambios de pH, en el margen fisiológico, tiene una gran influencia en su función, por lo cual es importante mantener estable el pH.

Las soluciones amortiguadoras, también llamadas reguladoras, tampones, (o *buffer* en inglés), se caracterizan por mantener un valor de pH constante aunque se les adicionen ácidos o bases en cantidades considerables. Los componentes de un amortiguador son por lo general, un ácido débil y su base conjugada, sustancia que puede aceptar un protón y forma de nuevo un ácido. Así, podemos encontrar amortiguadores ácidos, cuyos componentes son un ácido débil y su sal de base fuerte; y también de pH básico, formado por una base débil y la sal de un ácido fuerte.

¿Cómo cambia el pH de una disolución de un ácido débil al cambiar la proporción base/ácido? Esta pregunta es importante ya que muchas de las pequeñas moléculas y las macromoléculas de las células se ionizan débilmente. Podemos contestar a ésta pregunta reorganizando la constante de disociación para obtener la ecuación de Hendersson Hasselbalch, que describe el cambio de pH durante la titulación de un ácido débil o de una base débil

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

K_a se define como la constante de equilibrio de la disociación de un ácido débil (a menudo denominada constante de disociación) se expresa como $K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$. Cuanto más grande sea K_a mayor es la tendencia del ácido a disociarse y el ácido es más fuerte.

La fuerza iónica de los ácidos generalmente se expresa en función del valor del pK_a :

$$pK_a = - \log K_a$$

Dado que el pK_a es el logaritmo negativo de K_a , un valor numéricamente pequeño de pK_a corresponde a un ácido fuerte y un valor numéricamente grande corresponde a un ácido débil.

Para preparar un amortiguador se debe primero escoger un compuesto cuyo pK_a sea cercano al pH deseado, y después calcular la concentración de sus componentes. Típicamente, las concentraciones del amortiguador están entre 1mM y 200mM, dependiendo de la fuerza iónica deseada y la capacidad amortiguadora requerida.

Si se espera que el pH disminuya durante un experimento, se debe elegir un amortiguador con un pK_a levemente por debajo del pH de trabajo, por el contrario si el pH aumenta durante el experimento, seleccione un amortiguador con un pK_a elevado sobre el pH de trabajo.

OBJETIVOS:

- Que el alumno calcule la concentración de las soluciones matrices para la preparación de un amortiguador.
- Que el alumno adquiera la habilidad de preparar soluciones amortiguadoras.

MATERIALES Y REACTIVOS

Pipeta graduada

Vaso de precipitado

Caja de petri

Matraz aforado

Espátula

Potenciómetro

Balanza analítica

Tris base (tris hidroximetil
aminometano)

Ácido Acético

Acetato de sodio

MgSO₄

Agua destilada

HCl (0.1M)

NaOH (0.1M)

Ejemplo: Cálculo de soluciones matrices para la preparación de un amortiguador

Para preparar un amortiguador de borato se necesitan: una solución de ácido bórico 0.5M y una solución de NaOH 0.5M. Calcular la cantidad necesaria para preparar 100 ml de cada una de éstas soluciones.

Recordando que un mol de un compuesto es igual a la suma de los pesos moleculares de los elementos que lo conforman expresado en gramos.

- Calcular el peso molecular (pm) de los compuestos

$$\text{H: } 1.0 \times 3 = 3 \qquad \text{Na: } 23 \times 1 = 23$$

$$\text{B: } 10.8 \times 1 = 10.8 \qquad \text{O: } 16 \times 1 = 16$$

$$\text{O: } 16.0 \times 3 = 48 \qquad \text{H: } 1 \times 1 = 1$$

$$\text{pm} = 61.8 \qquad \text{pm} = 40$$

- Calcular las cantidades que se van a necesitar de acuerdo a su peso molecular.

$$1.0\text{M} \text{ ----- } 61.8 \text{ g} \qquad 1000 \text{ ml} \text{ ----- } 30.9 \text{ g}$$

$$0.5\text{M} \text{ ----- } x \qquad 100 \text{ ml} \text{ ----- } x$$

$$x = 30.9 \text{ g} / 1000 \text{ ml} \qquad x = 0.39 \text{ g de ácido bórico.}$$

$$1.0\text{M} \text{ ----- } 40 \text{ g} \qquad 1000 \text{ ml} \text{ ----- } 20 \text{ g}$$

$$0.5\text{M} \text{ ----- } x \qquad 100 \text{ ml} \text{ ----- } x$$

$$x = 20 \text{ g} / 1000 \text{ ml} \qquad x = 2 \text{ g de NaOH se necesitan}$$

- Colocar las cantidades pesadas en el matraz aforado y aforar a 100 ml. Ajustar el pH si es necesario con un ácido ó una base (HCl o NaOH).

METODOLOGÍA

Tomando como referencia el ejemplo anterior, calcular las cantidades necesarias para preparar 2 soluciones amortiguadoras:

a) *Ácido acético – acetato de sodio* 0.1 M pH 4.0 50 ml

b) *Tris – MgSO₄* pH 9.5 200 ml

Nota: el amortiguador de *Tris – MgSO₄* pH 9.5, se utilizará en la práctica No.2

a) *Ácido acético - Acetato de sodio (Acetato)* 1M pH 4.0

Ácido Acético (CH₃COOH) _____ g _____ ml α 1.06

Acetato de Sodio (CH₃ – COONa) _____ g

Agua destilada _____ 30 ml

Disolver las sales y ajustar el pH con HCl si es necesario.

Aforar a 50 ml con agua destilada.

b) *Tris – MgSO₄* pH 9.4

Tris NH₂C(CH₂OH)₃ _____ g (0.1M)

Mg SO₄ (cristal heptahidratado) _____ g (0.01M)

Agua destilada _____ 180 ml

Disolver las sales y ajustar el pH con HCl si es necesario.

Aforar a 200 ml con agua destilada.

Diagrama de flujo de la práctica 1

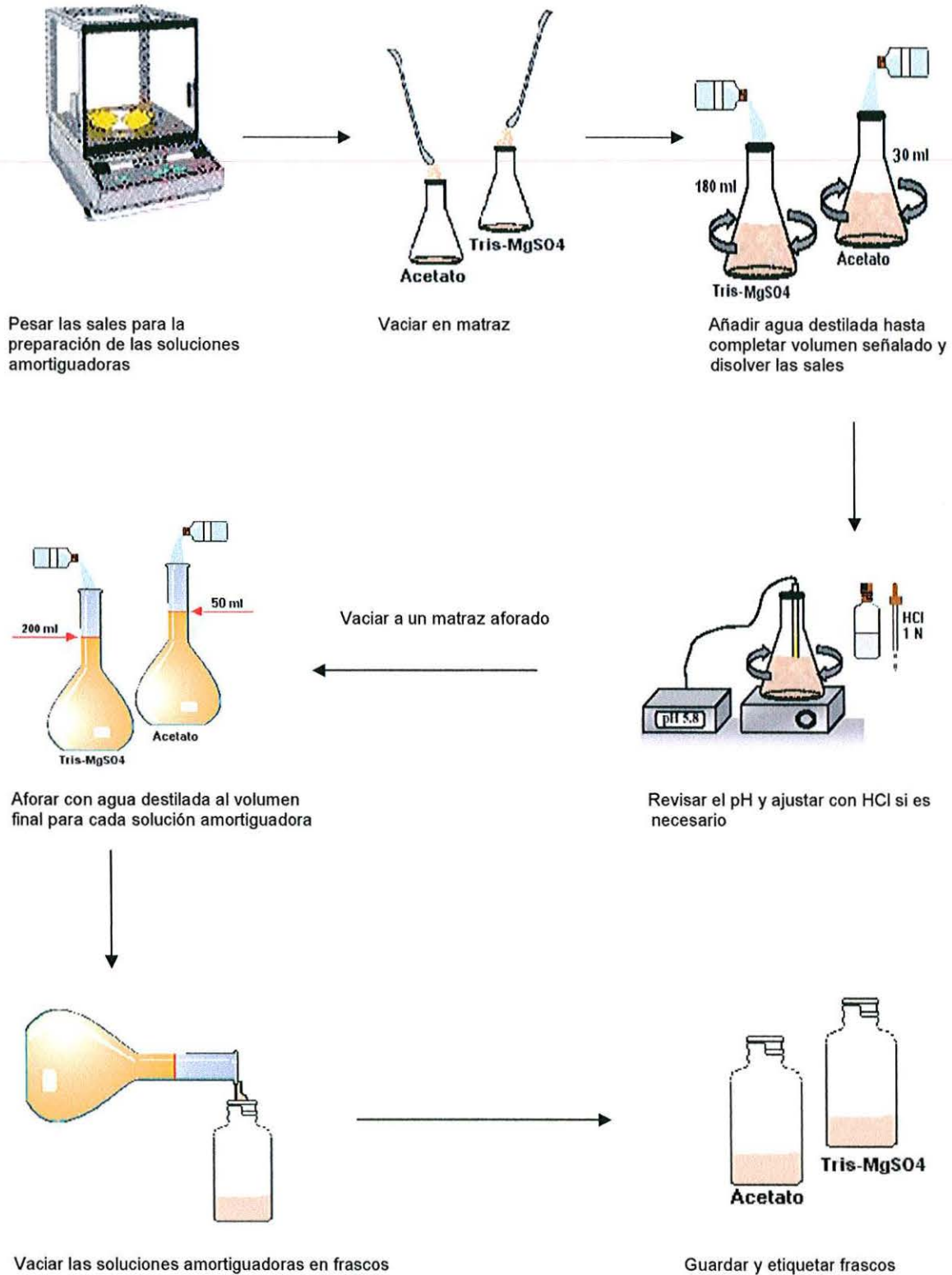


Figura 1: Preparación de soluciones amortiguadoras

RESULTADOS

CONCLUSIONES

ACTIVIDADES

- a) Calcular las cantidades necesarias de los componentes de los siguientes amortiguadores
- Tris 10 mM, EDTA 10 mM,
 - Tris 0.1 M, Mg SO₄ 0.01M
- b) Describa el procedimiento para preparar un amortiguador de fosfatos a pH 7.2
- c) Conteste las siguientes preguntas
- ¿Cuáles son los amortiguadores que mantienen el pH de los fluidos biológicos en el cuerpo humano?
 - ¿Porqué es crítico mantener el pH en las metodologías (electroforesis, cromatografía, ELISA, etc.)?
 - ¿Qué compuestos químicos se utilizan para ajustar el pH de una solución amortiguadora?

EVALUACIÓN

BIBLIOGRAFÍA

- Rendina G. Técnicas de Bioquímica Aplicada. Interamericana. México, D.F. 1974: 13 - 23.
- Mathews, C.K.; Vanholde, K.E.; Ahern, K.G. Bioquímica. 3^{era} rev. Editorial Interamericana. Pearson educación, s.a. España: Madrid, 2003: 45 - 51
- http://www.science.smith.edu/departments/Biochem/Biochem_353/Buffer_Prep.html (16 de abril del 2005)

Práctica 2

Centrifugación diferencial (fraccionamiento celular de bacterias)



INTRODUCCIÓN

La centrifugación es una técnica de separación que se basa en el movimiento de las partículas impulsadas por una fuerza vectorial, tangencial al eje de giro llamada **centrífuga**, que tiende a desplazarlas lejos del centro de rotación. Esta técnica separa las partículas de una muestra de acuerdo a su masa. La centrífuga es un aparato que necesariamente debe constar de: rotor o cabezal (horizontal u oscilante; y angular o de ángulo fijo), eje de centrifuga, motor, y accesorios (tubos para centrifuga, tacómetro, tapa, etc.).

Esencialmente, una centrífuga es un aparato que separa partículas que están en solución. En biología estas partículas pueden ser células (eucariontes y procariontes), orgánulos subcelulares o macromoléculas. Hay dos tipos de procesos de centrifugación: *centrifugación preparativa*, cuyo objeto es aislar partículas específicas, y *centrifugación analítica*, con la que se pretenden estimar propiedades físicas de alguna partícula en concreto: sus propiedades hidrodinámicas.

Dentro de la centrifugación preparativa hay dos métodos esenciales de separación: la **centrifugación diferencial** y la **centrifugación en gradiente de densidad** (con dos variaciones: *zonal* e *isopícnica*). En la centrifugación zonal la muestra se aplica en una capa delgada sobre el medio de centrifugación, que es un gradiente de densidad. Bajo la fuerza centrífuga, las partículas sedimentan a través del gradiente, concentrándose en zonas o bandas discretas. Su velocidad de avance (y por tanto, el mecanismo de la separación) depende de su tamaño, forma y densidad; todos estos parámetros se combinan en el coeficiente de sedimentación que se mide en unidades Svedberg "s". Un Svedberg es el cociente entre la velocidad con la que una partícula en suspensión se deposita en el fondo del recipiente que la contiene y la aceleración a la cual está sometida la suspensión y equivale a 1×10^{-13} cm/s.

Cuando se centrifuga una suspensión, se rompe la homogeneidad y se produce la separación del soluto y del disolvente. Las partículas que experimentan la mayor fuerza centrífuga sedimentan a mayor velocidad y son empujadas preferentemente hacia la parte inferior del tubo. Cuando las partículas tienen la misma densidad, la separación depende de la masa, de forma que las más pesadas tienen velocidades de sedimentación mayores.

La fuerza centrífuga relativa (FCR) es lo que comúnmente se llama “número de *g*”, es la fuerza requerida para que se produzca la separación. Las unidades de esta fuerza se expresan con el número de veces mayor que la gravedad (*g*).

$$FCR = 1.118 \times 10^5 * r * (rpm)^2$$

Siendo 1.118×10^5 una constante.

r = distancia horizontal del radio en centímetros desde el centro de rotación hasta el fondo del tubo durante la centrifugación.

rpm = velocidad de rotación del motor, viene dada como revoluciones por minuto.

Según la velocidad, los métodos de centrifugación pueden ser:

	Criterios aproximados
Centrifugación a baja velocidad	< de 1000 rpm
Centrifugación en alta velocidad	10000 – 20000 rpm
Ultracentrifugación	> 20000 rpm

Los componentes de las fracciones obtenidas por centrifugación pueden ser evidenciadas por otras técnicas analíticas como espectrofotometría, métodos cromatográficos y de electroforesis.

En esta práctica se pretende demostrar la presencia de la enzima fosfatasa alcalina y su actividad catalítica sobre sustancias orgánicas monofosfatadas en tres fragmentos celulares de una bacteria Gram negativa: periplasma, citoplasma y membrana. Para obtener el periplasma es necesario precipitar los esferoplastos que son células bacterianas que poseen restos de pared.

OBJETIVOS

- Separar los componentes celulares (citoplasma, periplasma y membrana) de una bacteria, por centrifugación.
- Identificar la presencia de una enzima (fosfatasa alcalina) en las fracciones celulares bacterianas.

MATERIALES Y REACTIVOS

Un matraz con cultivo de bacterias (gram negativas)	Amortiguador Tris-MgSO ₄ , pH 9.4 (amortiguador de ensayo)
Lisol para desinfectar el área	Solución hipertónica A (preparación descrita en apéndice 1):
Papel toalla	10 mM Tris
Tubos de centrifuga de 50 ml	10 mM EDTA
Tubos de centrifuga de 15 ml	20% Sacarosa
Tubos de ensayo pequeños	Solución de lisozima 10 mg/ ml
Pipetas de 5 ml	Tritón X-100 al 1%
Centrifuga preparativa refrigerada (Hermle Z323K)	Agua destilada
	Para-nitrofenil fosfato, 100 mM (sustrato)
	NaOH 1M

METODOLOGÍA

Parte I : Centrifugación diferencial

1. Centrifugar 35 ml de cultivo líquido de bacterias por 10 min a 5000 rpm.
2. Resuspender las células en 2 ml de solución A (Tris-EDTA-Sacarosa).
3. Añadir 0.15 ml de lisozima.
4. Mezclar bien e incubar a temperatura ambiente (T.A) por 30 minutos.
5. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos.
6. Guardar el sobrenadante en un tubo marcado **P (periplasma)**
7. Resuspender el sedimento (los esferoplastos) en 5 ml de agua destilada.
8. Centrifugar a 15,000 rpm por 20 minutos.
9. Guardar el sobrenadante en tubo marcado **C (citoplasma)**
10. Resuspender el precipitado en 2 ml de solución de Tritón X-100
11. Guardar en tubo marcado **M (membrana)**.

Parte II: Ensayo enzimático.

1. Medir el volumen de cada fracción obtenido con una micropipeta y registrar la medición en un cuaderno. Usar una pipeta y puntilla nueva por cada fracción.
2. Tomar 3 tubos, añadir a cada uno 0.2 ml de cada fracción usando una pipeta y puntilla nueva para cada tubo (tres tubos, tres fracciones). Colocar en otro tubo 0.2 ml de agua destilada como control.
3. Añadir a los 4 tubos 0.7 ml de **amortiguador de ensayo** (Tris-MgSO₄, pH 9.5).
4. Añadir a cada tubo 0.1 ml de **sustrato** (para-nitrofenil fosfato), anotar el momento en que se adicionó el sustrato).
5. Incubar a T.A por 30 minutos.
6. Agregar 1 ml de NaOH 1.0 M para detener la reacción, exactamente a los 30 min
7. Centrifugar a 1500 rpm en centrífuga por un minuto o hasta precipitar el particulado y leer sin agitar los tubos.
8. Leer absorbancia a **410 nm** a cada tubo de reacción para determinar la concentración del para-nitrofenol generado.

RESULTADOS

TABLA PARA DATOS Y CÁLCULOS:

Bacteria (nombre):			
	Fracción P (Periplasma)	Fracción C (Citoplasma)	Fracción M (Membrana)
Volumen obtenido			
Absorbancia			
Concentración de paranitrofenol generado [p-NP]			
Actividad enzimática por minuto (EA)			
Actividad de la muestra			
Actividad total en la fracción (TAf)			
Porcentaje de actividad			
Actividad celular total (TAA)			

CÁLCULOS:

1. Calcular la **concentración de para-nitrofenol (p- NP)** para cada fracción usada en el ensayo y para cada tubo en total. El coeficiente de extinción molar es de 22,100 / mol cm. Si tomamos en cuenta que el del NaOH es de **11,050 / mol cm**.

$$\text{(Absorbancia) Abs} = K C L \quad C = [\text{p-NP}]$$

K = coeficiente de extinción molar;

C = concentración [p-NP]

L = distancia que viaja el rayo de luz a través de la muestra, o sea, el ancho de la cubeta (1 cm)

Por lo tanto

$$C = \text{Abs} / K L$$

2. Calcular la **actividad enzimática por minuto (AE)** para cada fracción

$$\text{AE} = [\text{p-NP}] / 30 \text{ min} = \text{moles que se generan por minuto}$$

3. Calcular la actividad presente en el tubo de ensayo.

$$\text{Actividad} = \text{AE} / 0.2 \text{ ml}$$

0.2 ml = cantidad de muestra usada para la prueba.

4. Calcular la **actividad total (TAf)** para cada fracción.

$$\text{TAf} = (\text{Actividad}) \times (\text{vol total de fracción})$$

Volumen total = volumen que se midió de cada fracción recogida.

5. Calcular **actividad total del ensayo:** $\text{TAA} = \Sigma \text{TAf}$

6. Calcular el **% de actividad** correspondiente a cada fracción:

$$(\text{TAf} / \text{TAA}) \times 100$$

Ejemplo para realizar los cálculos:

- Volumen obtenido: sencillamente se escribe el volumen de sobrenadante que se logró recuperar.
- Absorbancia: anotar la lectura que se obtuvo en el espectrofotómetro luego de la reacción.
- Concentración de p-NP obtenido: calcular usando la ecuación de Beer-Lambert, asumiendo que el coeficiente de extinción molar de p-NP es de 11,050 / mol cm

Ejemplo: Abs= 0.195

$$C = \frac{0.195}{11,050} \text{ mol/cm}$$

$$C = 1.76 \times 10^{-5} \text{ mol de p-NP generado} \\ (11,050) (1 \text{ cm})$$

Actividad enzimática por minuto, dividir la concentración de p-NP obtenido en el ensayo; el resultado dividirlo entre 30 minutos, que fue el tiempo de reacción.

$$1.76 \times 10^{-5} \text{ mol de p-NP} / 30 \text{ min} = 5.88 \times 10^{-7} \text{ mol/min}$$

Actividad de la muestra, para el ensayo usó 0.2 ml de sobrenadante:

$$5.88 \times 10^{-7} \text{ mol/min} / 0.2 \text{ ml} = 2.94 \times 10^{-6} \text{ mol/min/ml}$$

Actividad total de la fracción, multiplicar la actividad de la muestra por la cantidad de ml de sobrenadante de esa fracción. Si se obtuvieron 3.7 ml de volumen de una fracción, multiplico la actividad de la muestra por el volumen que recolectamos.

$$[2.94 \times 10^{-6} \text{ mol/min/ml}] \times 3.7 \text{ ml} = 1.088 \times 10^{-5} \text{ mol/min}$$

Actividad celular total, es la sumatoria de la actividad total de cada fracción.

Diagrama de flujo de la práctica 2

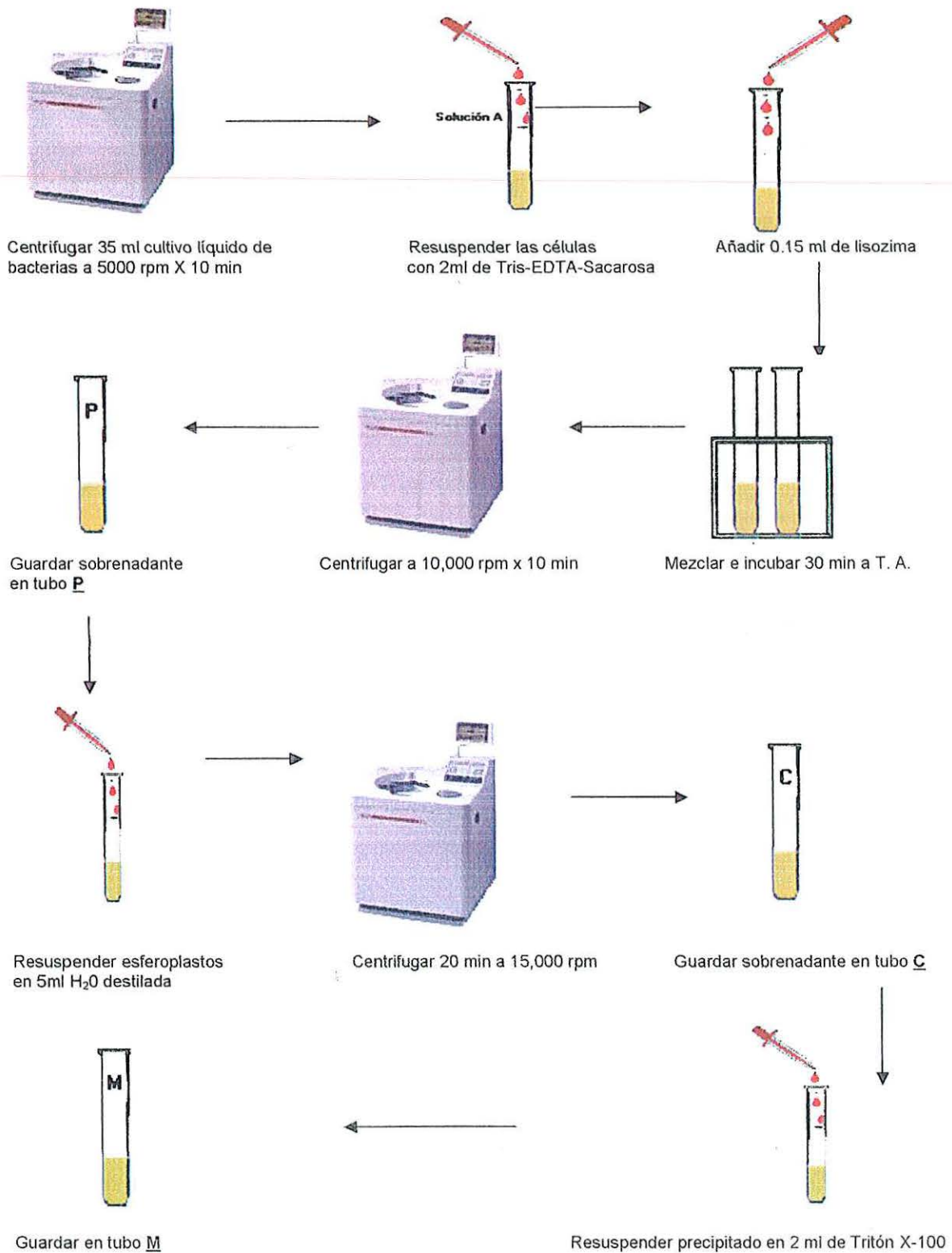
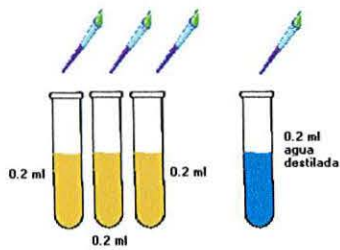


Figura 2: Centrifugación Diferencial

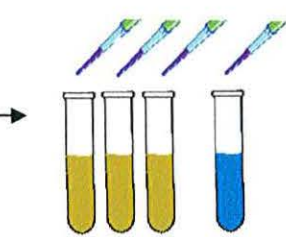
Diagrama de flujo de la práctica 2: segunda parte



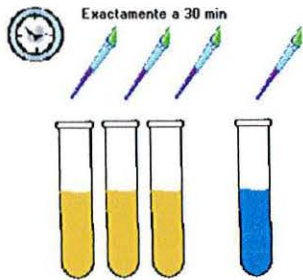
Medir y anotar volúmenes de cada fracción



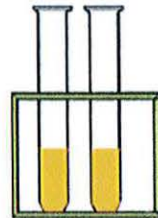
Añadir 0.2 ml de cada fracción obtenida en 3 tubos y 0.2 ml de agua destilada



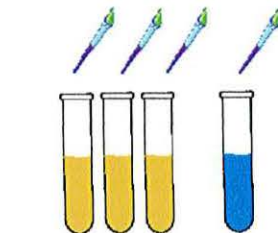
Añadir 0.7 ml de amortiguador de ensayo



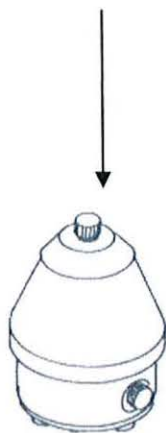
Adicionar 1.0ml de NaOH 1M tubo para detener la reacción



Incubar a T. A



Añadir 0.1 ml de sustrato a cada y, momento en que se adicionó el amortiguador de sustrato (T=0)



Centrifugar un minuto x 1500 rpm



Leer la absorbancia a 410 nm

Figura 3: Ensayo enzimático

CONCLUSIONES

ACTIVIDADES

Realizar el dibujo de una bacteria e identificar cada una de las estructuras celulares y anexar en esta sección de la práctica.

¿Cuántas etapas tiene el proceso de fraccionamiento subcelular?

¿Qué es la ultracentrifugación?

¿Cómo puede calcular la velocidad de centrifugación de una mezcla de componentes?

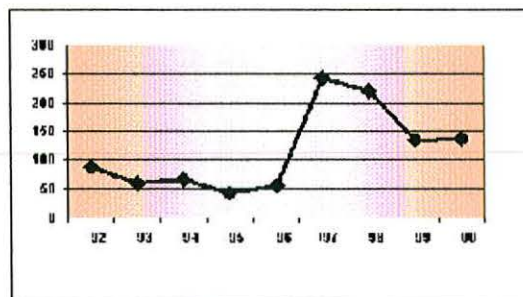
EVALUACIÓN

BIBLIOGRAFÍA

- González de Buitrago J.M. Técnicas y métodos de Laboratorio Clínico. 2^{da} Edición. Masson. España; Barcelona, 2004: 235 - 236
- X. Fuentes Arderiu, M. J. Castiñeiras Lacambra, J.M. Queralto Campaño. Bioquímica Clínica y Patología Clínica. Vol. 1. 2^{da} Edición. Reverte. España; Barcelona, 1998: 148.
- <http://www.uprm.edu/biology/profs/velez/fraccionamiento.htm> Departamento de Biología
- Vélez Díaz A.V. Catedrática Auxiliar. Manual de Fisiología Celular. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez.
- <http://es.geocities.com/centrifugacion/centpreparativa.htm> (15 junio de 2005)

Práctica 3

Calibración de un método espectrofotométrico (Método de Lowry)



INTRODUCCIÓN

La calidad puede definirse como: "realizar un procedimiento correcto, hacerlo bien y a satisfacción del usuario" de un producto ó servicio.

En un laboratorio de calidad se deben efectuar procesos analíticos con un alto nivel de exactitud y precisión y un bajo nivel de error, que conducen a la obtención de resultados confiables. Para llevar a cabo estos procesos, es necesario establecer un **programa de control de calidad** que debe ser conocido y aplicado por todos los integrantes del laboratorio. El programa de control de calidad consiste en técnicas operativas y actividades necesarias para cumplir con los requisitos de calidad establecidos, y en forma práctica es el monitoreo diario de los procedimientos realizados en el laboratorio. Parte del programa de control de calidad, en la fase analítica, es la estandarización o calibración de los métodos analíticos utilizados.

Para **calibrar un método** analítico es necesario elegir una serie de al menos 3 estándares de concentraciones conocidas de un analito, con los cuales se construye una curva de calibración. Los valores obtenidos son graficados cada vez que se corren los estándares. Posteriormente se analizan durante un tiempo para generar suficientes datos que puedan ser procesados estadísticamente en graficas como la de Levy-Jennings.

El análisis estadístico de los estándares determina si los resultados de las muestras se encuentran dentro de los límites de calidad permisibles, o dicho de otro modo, si se aceptan o es necesario descartarlos.

La espectrofotometría es un método analítico que utiliza la interacción de una fuente luminosa con la muestra para medir la concentración de diferentes analitos. Los métodos espectrofotométricos se clasifican, de acuerdo a esta interacción, en métodos de absorción, de emisión y trasmisión de la radiación electromagnética (REM). En particular los métodos de absorción se subdividen en métodos ultravioleta, visibles e infrarrojos, dependiendo de la longitud de onda utilizada.

Los métodos de absorción UV son de uso común en los laboratorios para la determinación cuantitativa de diversos analitos, como azúcares, proteínas, metabolitos intermediarios, etc., la sensibilidad y la selectividad de estos métodos se basa en la particular capacidad que tienen los analitos de absorber energía a una determinada longitud de onda.

Existen diversos métodos que permiten cuantificar la concentración de proteína presente en las muestras biológicas, los métodos más usuales son:

- Reacción del Biuret.
- Método de Lowry.
- Método de Bradford.
- Método del ácido Bicínico.
- Métodos inmunológicos.

OBJETIVOS

- Proporcionar a los alumnos algunas herramientas necesarias para implementar un programa de control de calidad.
- Realizar una curva de calibración del método de Lowry para determinar la concentración de proteínas.
- Elaborar una gráfica de Levy-Jennings.

MATERIAL Y REACTIVOS

Tubos de ensayo
Micropipetas
Pipetas graduadas
Papel parafilm
Gradillas
Marcador
Agitatos
Baño María
Espectrofotómetro

- Reactivo A: Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N (5 g de Na_2CO_3 en 250 ml NaOH 0.1N)
- Reactivo B: CuSO_4 al 0.5% en Citrato de Sodio al 1% (0.05 g de CuSO_4 en 10 ml de Citrato, Citrato de sodio 1%; 1 g de citrato en 100ml H_2O)
- Reactivo C: 1 ml de reactivo "B" mas 5 ml de reactivo "A"
- Reactivo D: 1 ml de reactivo de Folin + 1.3 ml de H_2O
- Stock de albúmina: 25 mg en 10 ml de H_2O

Curva de Albúmina (solución matriz de albúmina: 25 mg de albúmina en 10 ml de agua destilada)

Blanco de reactivos: colocar en un tubo una cantidad de agua que debe ser igual a la que se pone de muestra (20 μl). A esta agua se le agregarán los reactivos.

METODOLOGÍA

1. Diluir la solución de albúmina de la siguiente forma:

Solución matriz de albúmina (μl)	H ₂ O (μl)	Concentración del estándar (μg/20)
100	900	5
200	800	10
300	700	15
400	600	20
500	500	40

2. Tomar 20 μl de cada dilución y colocarla en un tubo de ensayo.

3. Agregar 2 ml de reactivo C. Agitar y reposar 10 min

4. Agregar 200 μl de reactivo D. Agitar y reposar 40 min

5. Leer absorbancia a 700 nm

Nota¹: El paso crítico para obtener resultados sensibles y reproducibles es medir correctamente el volumen de muestra, y agitar por inversión perfectamente las muestras inmediatamente después de añadir el reactivo folin. Debe ponerse cuidado en que no se formen gradientes amarillos al fondo o en la superficie de la solución, ya que esta debe permanecer siempre uniforme.

A temperatura ambiente, el tiempo de reposo puede variar de 5 minutos a varias horas sin que la absorbancia se vea afectada.

Nota²: Todos los reactivos que se necesitan para esta práctica deben de ser preparados el mismo día en que se realiza.

Diagrama de flujo de la práctica 3

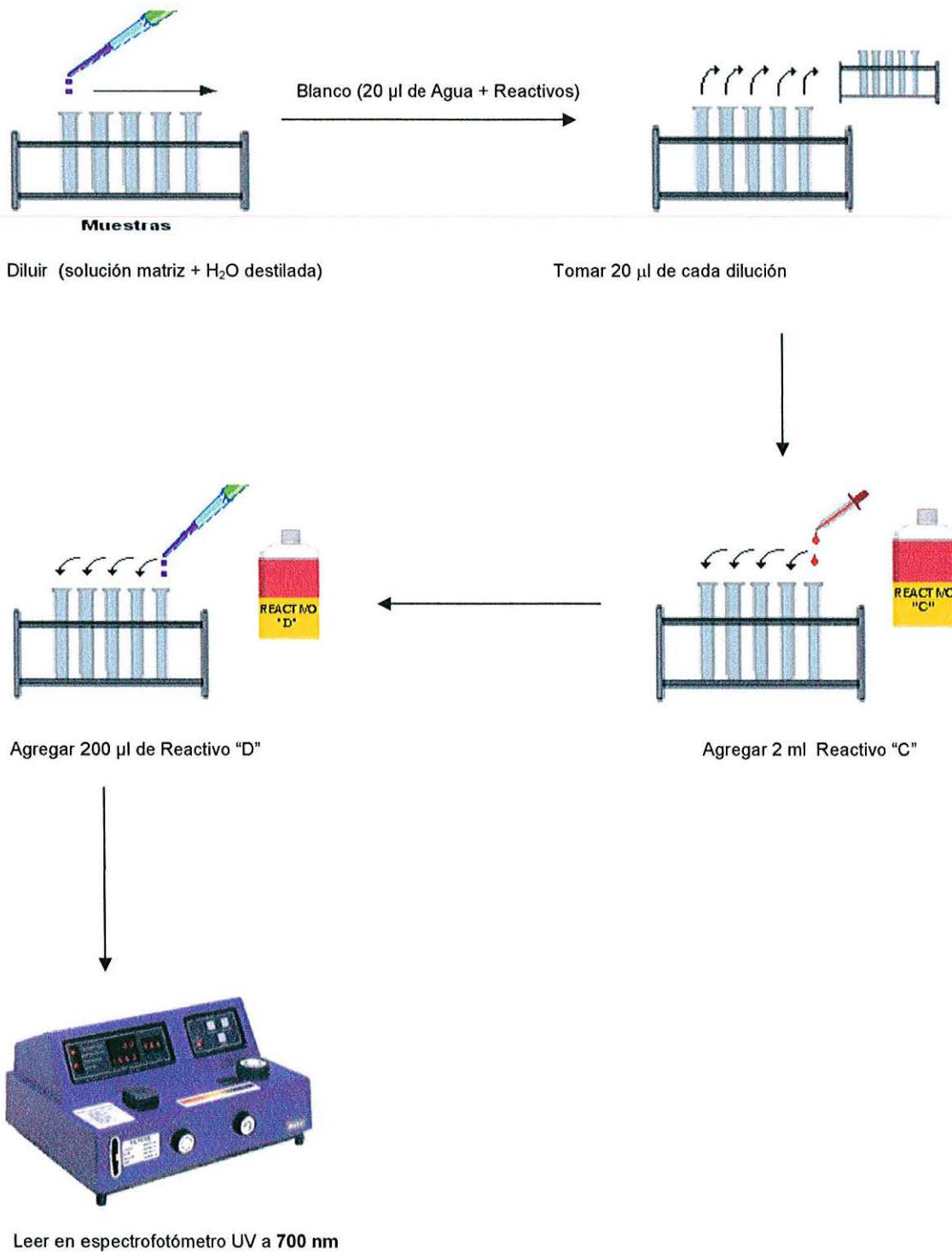


Figura 4: Curva de calibración del método de Lowry

RESULTADOS (Curva de calibración, representar gráfica en papel milimétrico)

CONCLUSIONES

ACTIVIDADES

Visitar un laboratorio de tu escuela y revisar alguna de las bitácoras utilizadas en el programa de control de calidad (ejemplo gráfico de temperatura de refrigeradores, mantenimiento preventivo, uso del equipo). Efectuar un pequeño reporte de los registros de la bitácora.

¿Cuál es el fundamento del método de Lowry?

Hacer un gráfico de absorbancia vs concentración, con los datos obtenidos en la práctica

¿Cuál es la diferencia entre estándar y control?

¿Cuál es la diferencia entre precisión y exactitud?

¿Qué información aporta el cálculo de la desviación estándar de una serie de datos?

Selecciona un método analítico y diseña un programa de control de calidad. (Entregar este programa de control de calidad al finalizar el semestre)

EVALUACIÓN

BIBLIOGRAFÍA

- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L.; Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-276.
- González de Buitrago J.M. Técnicas y métodos de Laboratorio Clínico. 2^{da} Edición. Masson, 2004: 107-117.
- Harvey D. Química Analítica Moderna. McGraw-Hill / Interamericana. España; Madrid, 2002: 30-40.
- Iborra Pastor J.L. Prácticas de Bioquímica. 3^{era} Edición. Diego Marín Librero-Editor. Murcia, España. 2004: 31 - 42.

Práctica 4

Determinación de cobre (Cu) en salvado de trigo por espectrofotometría de absorción atómica



INTRODUCCIÓN

La absorción de la luz por medio de átomos, permite el desarrollo de metodologías para el análisis cualitativo y cuantitativo de diferentes muestras. El método de absorción atómica está basado en la absorción de la luz, y consiste en hacer pasar un haz de luz monocromática, de longitud de onda específica, por el analito, en forma de vapor atómico. La medida de la intensidad luminosa antes y después de su paso por el vapor atómico, permite determinar la absorción que efectúan los átomos objeto del análisis. De acuerdo a la ley de Beer, la cantidad de absorción aumenta con la concentración de los átomos en un medio absorbente, es decir, la absorbancia es proporcional a la concentración del elemento en la muestra, ya sea que se encuentre en su condición original o sujeta a pre- tratamiento.

El método de absorción atómica se utiliza ampliamente en los análisis de más de 60 metales (Mg, Zn, Cu, Pb, As, K, Ca, etc.) en líquidos biológicos, aguas, suelos, plantas y animales, en concentraciones del orden de partes por millón.

Los componentes de un espectrofotómetro de absorción atómica son:

- A) una lámpara de cátodo hueco (fuente de energía radiante construida por el mismo elemento que se quiere medir)
- B) un nebulizador
- C) un monocromador
- D) un sistema detector

La absorción atómica tiene dos métodos generales de atomización: la atomización con llama y la electrotérmica con horno de grafito, los cuales vaporizan el elemento que quiere medirse.

El cobre (Cu^{++}) es un mineral esencial para la salud ya que forma parte de numerosas enzimas importantes.

Interviene en procesos como:

- a. Formación de pigmentos en cabello y piel.
- b. Síntesis del colágeno.
- c. Formación de hemoglobina y glóbulos rojos.
- d. Tiene un papel importante en la reproducción y el embarazo.
- e. Interviene en el buen funcionamiento de las glándulas tiroideas y suprarrenales, importantes en la producción de energía como catalizador de la citocromo-c-oxidasa.

El hombre obtiene el Cu de los alimentos que ingiere, particularmente son ricos en cobre:

- a) Frutos secos, cereales integrales (arroz, trigo, centeno, etc.) y mariscos
- b) Productos derivados de la soya
- c) Las vísceras (hígado, riñones, etc.)

El salvado de trigo es la cubierta exterior del grano de trigo, sin sabor pero con muchos beneficios para el organismo, ya que al proporcionar fibra ayuda a problemas de estreñimiento, mala digestión, colesterol elevado, sobrepeso y diabetes.

El salvado de trigo, y el germen de trigo, se pueden usar como ingredientes para preparar cereales de desayuno bajos en grasas, alto contenido en fibra, proteínas, hidratos de carbono, magnesio, fósforo, hierro, **cobre**, zinc, ácido fólico, biotina, vitaminas B1, B6 y E.

OBJETIVO

- Determinar la concentración de Cu en salvado de trigo por el método de absorción atómica.

MATERIAL Y REACTIVOS

Matraz aforado de 50 ml	Pinzas
Vaso de precipitado	Espátula
Cápsula de porcelana o crisol	Balanza analítica
Mechero bunsen	Mufla u horno eléctrico
Soporte universal	Papel filtro Whatman #2
Guantes de asbesto	20 g de Salvado de Trigo
Cámara de secado	Ácido nítrico q.p.
Embudo	Agua desionizada

METODOLOGÍA

1. Pesar 10 g de muestra de salvado de trigo en una cápsula de porcelana o crisol.
2. Colocar la cápsula en un horno eléctrico durante 30 min a una temperatura de 850°C.
3. Enfriar la cápsula en una cámara de secado durante aproximadamente 15 min y se le adicionan 15 ml de una disolución de ácido nítrico-agua (1:3) 4 ml de ácido nítrico y 12 ml de agua.
4. Llevar a ebullición en un mechero bunsen durante 5 min.
5. Filtrar la mezcla a través de un papel filtro Whatman # 2; los filtrados se recogen en un matraz aforado de 50 ml (si es necesario se lava dos veces el papel filtro con agua caliente).
6. Enfriar el filtrado y afora hasta la marca con agua desionizada.
7. Tomar las alícuotas para el análisis de cobre de esta disolución, prosiguiendo de acuerdo al método propuesto en el instructivo del equipo que se vaya a utilizar.
8. Utilizar el método de adición de estándar para la cuantificación.

Diagrama de flujo de la práctica 4

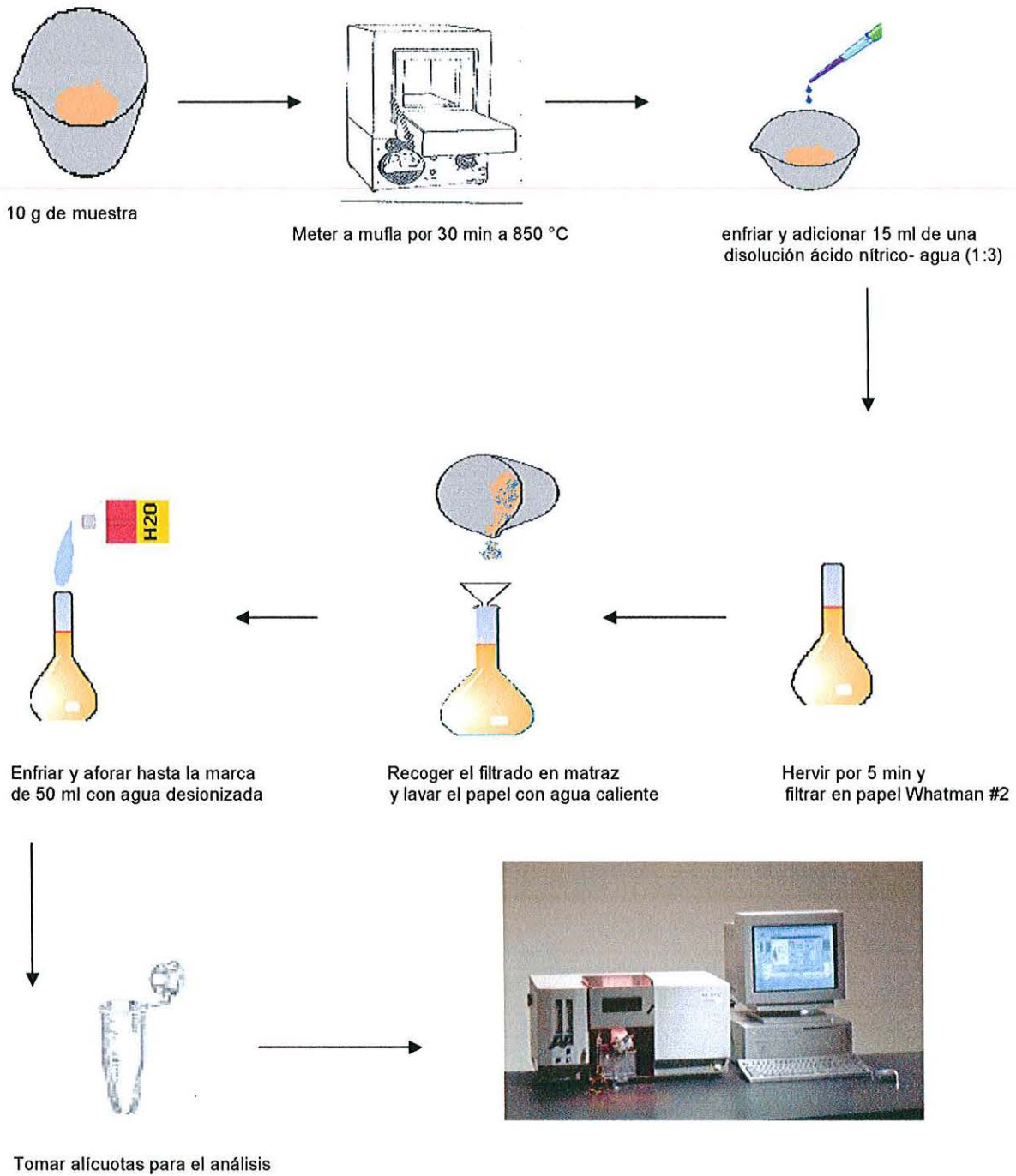


Figura 5: Análisis de Cu en salvado de trigo

RESULTADOS

CONCLUSIÓN

ACTIVIDADES

¿Cuál es la diferencia entre espectroscopía por llama y electrotérmica?

Investiga la concentración mínima detectable de los siguientes elementos: Al, As, Ba, Ca, Cd, Cr por el método de espectroscopía de llama y por el método electrotérmico.

¿Qué combustible utiliza la espectroscopía por llama?

¿Qué variante de espectrofotometría de absorción atómica se utilizó en esta práctica?

EVALUACIÓN

BIBLIOGRAFÍA

- Harvey D. Química Analítica Moderna. McGraw-Hill/Interamericana. España; Madrid, 2002: 288-294
- González de Buitrago J.M. Técnicas y métodos de laboratorio clínico. 2^{da} Edición. Masson, España; Barcelona, 2004: 133-149
- López-de-Alba, L. López-Martínez, J. Amador-Hernández. "Determinación Espectrofotométrica de cobre en Formulaciones Médicas, Salvado de Trigo y Aguas Potables". Bol. Soc. Chil de Química, N° 4 Vol. 44, 469-477(1999)

Práctica 5

Separación de pigmentos vegetales por cromatografía en papel



INTRODUCCIÓN

La cromatografía es un método de separación en el cual los solutos se distribuyen entre una fase móvil y una fase estacionaria.

Hay que indicar que el nombre de la técnica "cromatografía" (del griego *chroma* y *graphein* que significan respectivamente "color" y "escribir") es incorrecto, ya que no consiste en escribir con colores. Este nombre proviene de la primera experiencia cromatográfica realizada, la cual se utilizó para separar pigmentos de plantas. Fue descubierta por el botánico ruso, de origen italiano, Mijail Tswett en 1906, él separó los pigmentos de las plantas (clorofila a y clorofila b) y obtuvo una serie de bandas horizontales coloreadas (cromatógramas). En sus inicios, la cromatografía se utilizó para fraccionar e identificar moléculas pequeñas como aminoácidos o azúcares.

Los métodos cromatográficos pueden clasificarse de tres formas:

- a) según el estado físico de la fase móvil y estacionaria
- b) según el método de contacto entre la fase móvil y estacionaria, y
- c) según los mecanismos físicos o químicos responsables de la separación de los componentes de la muestra.

De acuerdo a este último criterio los solutos se separan por adsorción, intercambio iónico, exclusión molecular, reparto y afinidad.

La cromatografía de adsorción, puede efectuarse en papel o sobre un adsorbente como agarosa, acetato de celulosa, o almidón. El fenómeno de adsorción es la retención de una especie química en los sitios activos de la superficie de un sólido (adsorbente) quedando delimitado el fenómeno a la superficie que separa las fases o superficie interfacial; depende de la naturaleza de la sustancia adsorbida, la temperatura, la concentración y el estado de subdivisión del adsorbente.

Hay varios tipos de cromatografía en papel: ascendente, descendente, radial, y de separación de zonas. La cromatografía en papel se usa para una identificación cualitativa.

OBJETIVO

- Separar los pigmentos fotosintéticos de las espinacas mediante cromatografía en papel.

MATERIAL Y REACTIVOS

Mortero	Papel filtro
Embudo	Hojas de espinaca
Matraz	Alcohol etílico
Caja de Petri	Carbonato cálcico
Probeta graduada (50 ml)	

METODOLOGÍA

1. Lavar las hojas de espinacas, retirar las nervaduras y ponerlas en un mortero, junto con el alcohol (50 ml) y una pequeña cantidad de carbonato cálcico (1 g) que evita la degradación de los pigmentos fotosintéticos.
2. Triturar la mezcla hasta que las hojas se decoloren y el disolvente adquiera un color verde intenso.
3. Filtrar con un embudo y papel de filtro.
4. Colocar el filtrado en una caja de Petri, y sobre ella poner un rectángulo de unos 15 centímetros de ancho por 10 cm de alto doblado en "V" para que se mantenga en pie sobre la caja de Petri.
5. Dejar así el montaje y esperar 90 min. Los pigmentos se irán separando según su adsorción.
6. Observar el papel e identificar las cuatro bandas o zonas según su grado de solubilidad en el alcohol, que corresponden a los distintos pigmentos fotosintéticos presentes en las hojas de espinaca y hacer las anotaciones en la hoja de resultados.

Diagrama de flujo de la práctica 5

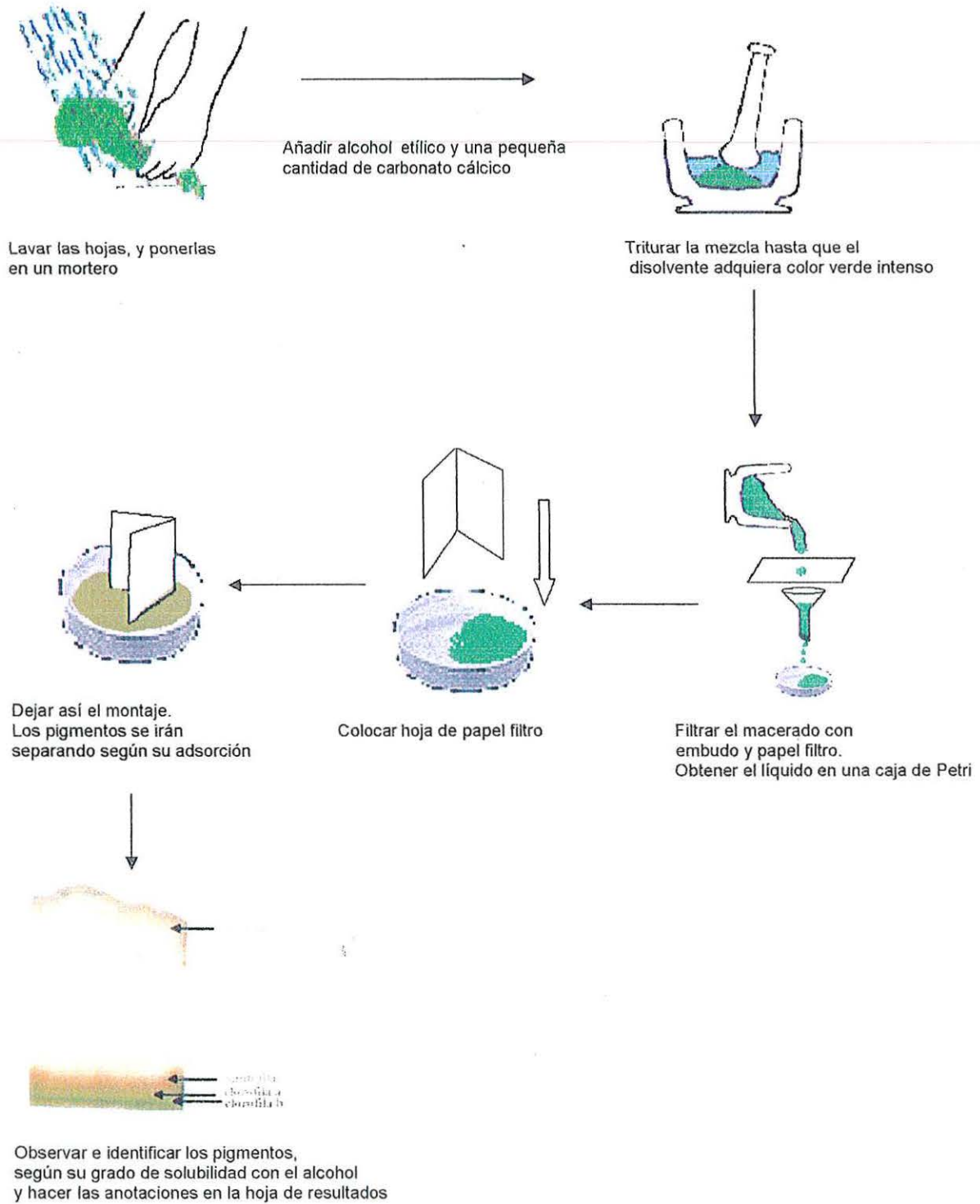


Figura 6: Extracción de pigmentos vegetales de espinacas

RESULTADOS

CONCLUSIONES

ACTIVIDADES

Buscar ejemplos para la aplicación de la cromatografía en papel

¿Cuál es la diferencia entre adsorción y absorción?

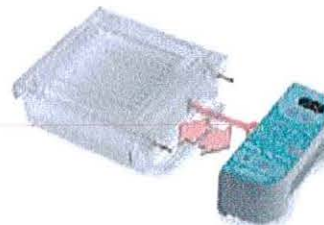
¿Qué es un cromatograma y cuántas variantes existen?

EVALUACIÓN

BIBLIOGRAFÍA

- X. Fuentes Arderiu, M. J. Castiñeiras Lacambra, J.M. Queralto Campaño. Bioquímica Clínica y Patología Clínica. Vol. 1. 2^{da}. Edición. Reverte. España; Barcelona, 1998: 155-167.
- Harvey D. Química Analítica Moderna. McGraw-Hill/Interamericana, España; Madrid, 2002: 381-382
- http://es.wikipedia.org/wiki/Cromatograf%C3%ADa_en_papel
- http://www.ust.cl/html/cree/asignaturas/material_profesor/material_qgeneral/cromatografia_papel.pdf

Práctica 6 Electroforesis de aminoácidos



INTRODUCCIÓN

Los aminoácidos son los precursores moleculares de las proteínas. Un alfa aminoácido consta de un átomo de carbono central (carbono alfa) unido a un grupo amino, un grupo carboxilo y una cadena lateral. Los aminoácidos en disolución a pH neutro existen como iones bipolares (grupo amino esta protonado $-\text{NH}_3^+$ y el grupo carboxilo desprotonado) el estado de ionización varía con el pH, en disolución ácida el grupo amino está $-\text{NH}_3^+$ y el grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) no está disociado por el contrario cuando el pH es alcalino el grupo carboxilo pierde el protón. Estas características físico-químicas permiten que puedan migrar en un campo eléctrico.

La electroforesis es una técnica de separación en la cual los analitos con carga neta se separan, de acuerdo a su capacidad para desplazarse a través de un medio de conducción, habitualmente un amortiguador acuoso, y en respuesta a la aplicación de un campo eléctrico. Constituye una herramienta muy útil en el procedimiento rutinario de análisis de ácidos nucleicos, aminoácidos (A.A) y proteínas.

La mayoría de los estudios básicos en biología experimental requieren el uso de la electroforesis, por lo que existen diversos tipos:

1. **Electroforesis Vertical:** realizada en geles de poliacrilamida, se emplea principalmente para el análisis de RNA y proteínas.
2. **Electroforesis Horizontal o sumergida:** en gel de agarosa, también se emplea principalmente para el análisis de DNA y RNA.
3. **Electroforesis de campos pulsantes:** se utiliza para separar fragmentos muy grandes de DNA (DNA genómico).

4. **Electroforesis Bidimensional:** Para análisis más sofisticado de proteínas, donde la primera dimensión separa las proteínas en función de su punto isoeléctrico (isoelectroenfoque), mientras que la segunda lo hace, según su tamaño, en gel de poliacrilamida.

El principio de todas éstas variantes de electroforesis es la migración de las moléculas a través de un gel u otro tipo de matriz de naturaleza porosa. Los principales soportes para la electroforesis son el papel, las membranas de acetato de celulosa, agarosa, almidón y poliacrilamida.

Es importante señalar que la electroforesis en asociación con otras técnicas tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), e hibridación, brindan una gran ayuda a la Biología Experimental para el análisis de ácidos nucleicos y proteínas.

OBJETIVO

- Introducir al alumno en el manejo de la técnica de electroforesis.
- Separar aminoácidos por medio de electroforesis

MATERIALES Y REACTIVOS

Fuente de poder

Estufa

Cámara electroforética

Cámara fotográfica

Pinzas de madera o plástico

Micropipeta de 10 μ l

Papel Whatman #1

Atomizador (rociador de líquidos)

Recipientes para material sucio

Papel toalla

Lápiz

Solución Tampón para electroforesis

- Amoniaco 15 ml
- Ácido Acético 3.5 ml
- Agua destilada hasta completar 1lt

Ninhidrina (1 g/L en acetona q.p)

Solución de aminoácidos de carga positiva negativa y neutra al 5% en agua destilada (Gly, Lys, Leu, Asp, muestra problema).

METODOLOGÍA

1. Trazar con el lápiz una línea muy débil en el centro del papel Whatman. En la línea señalar débilmente cinco puntos distribuidos equitativamente a lo ancho del papel.
2. Aplicar 10 μ l de cada uno de los cuatro aminoácidos patrón y la muestra problema mediante la micropipeta de 10 μ l en cada punto (Gly, Lys, Leu , Asp, problema)
3. Señalar en el margen superior derecho de la tira de papel el signo (+), para indicar el extremo del papel que se va a situar en el compartimento de la cubeta que va a actuar como ánodo.
4. Una vez aplicadas las muestras, rociar ligeramente el papel con la solución amortiguadora de electroforesis mediante el pulverizador, procurando no mojar directamente las muestras.
5. Quitar la tapadera de la cubeta, tomar el papel con las pinzas y colocarlo sobre la cubeta. introducir cada uno de los extremos del papel en los compartimentos de la cubeta, procurando que el extremo señalado en el papel con el signo (+) sea el compartimento del ánodo.
6. Revisar que los extremos queden bien sumergidos en la solución amortiguadora de electroforesis, sino quedan bien sumergidos llenar los compartimentos con más solución amortiguadora.
7. Asegurar que el papel esté bien humedecido antes de comenzar la electroforesis
8. Colocar la tapadera en la cubeta, conectar la fuente de alimentación a la red de alimentación y encender la misma. Ajustar el potencial a unos 300 V.
9. Apagar la fuente de poder a los 30 min y desconectar de la energía eléctrica, quitar la tapadera, sacar el papel de la cubeta mediante las pinzas, procurando no romperlo y colocarlo encima del papel de filtro de la mesa del laboratorio
10. Introducir el papel en la estufa a 105 °C durante 5 min para secado.
11. Sacar el papel de la estufa con las pinzas de madera y dejar enfriar, una vez enfriado se rocía el papel con la solución de ninhidrina. Nada más que se impregne, dejando que escurra el exceso de la misma.
12. Llevar nuevamente a la estufa, y dejarla durante 3 min para que se realice la reacción de color.

Diagrama de flujo de la práctica 6

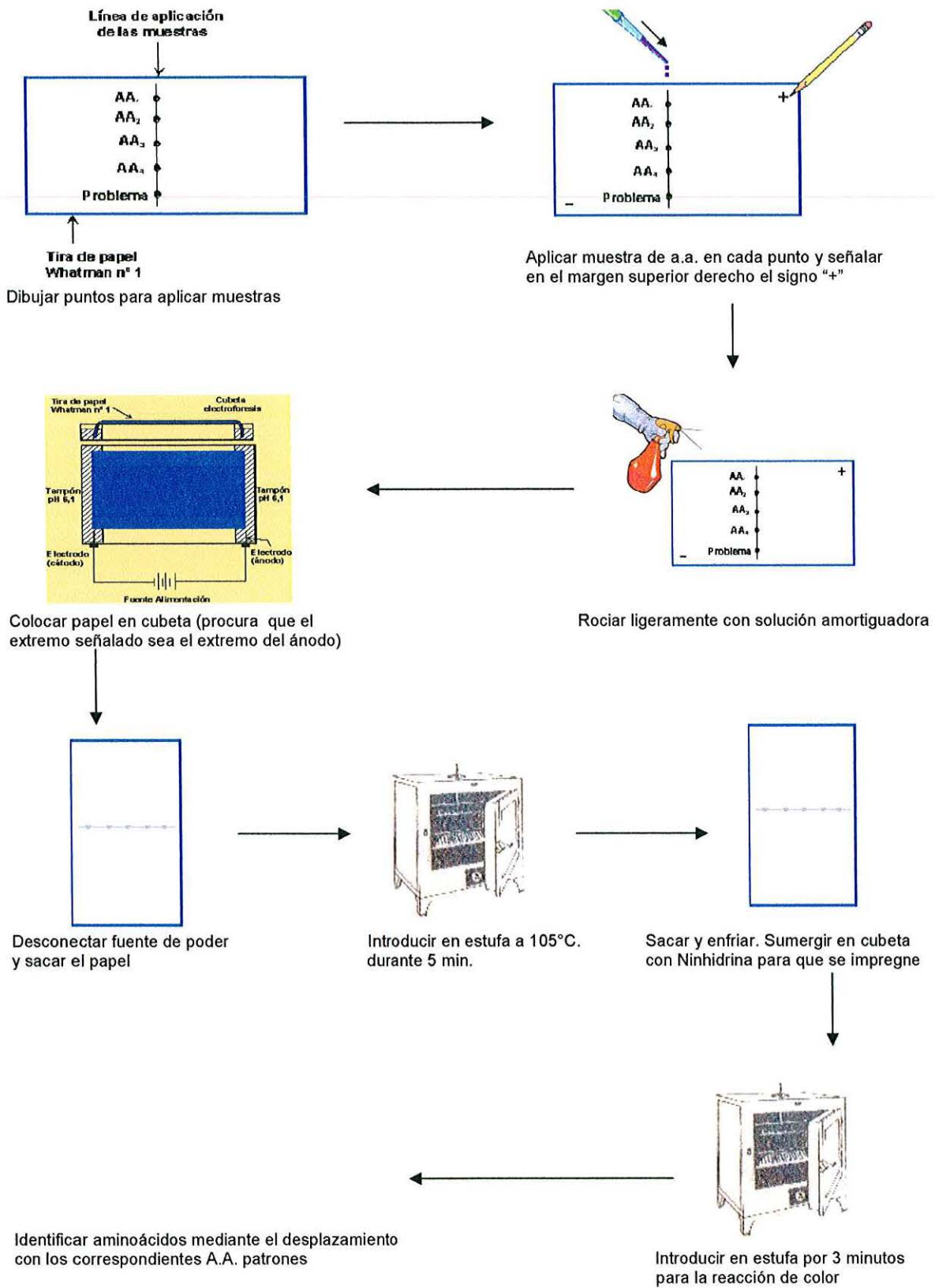


Figura 7: Separación de aminoácidos por electroforesis en papel

RESULTADOS

CONCLUSIONES

ACTIVIDADES

Tomar una fotografía del corrimiento electroforético que se obtiene al final de la práctica.

¿Cómo influye el pH de una solución amortiguadora en la electroforesis?

¿Cuáles son los factores de error posible en un corrimiento electroforético?

¿En qué consiste la electroforesis bidimensional?

EVALUACIÓN

BIBLIOGRAFÍA

- Carlos Augusto Yábar Varas. Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN (Serie de Normas Técnicas N°38). Instituto Nacional de Salud, (MPR-CNPS-016) Lima, 2003.
- Harvey D. Química Analítica Moderna. McGraw-Hill/Interamericana, España; Madrid, 2002: 414-417
- Iborra Pastor J.L. Prácticas de Bioquímica. 3^{era}. Edición. Diego Marín Librero-Editor. Murcia, España. 2004: 16-19.

Práctica 7

Determinación de anticuerpos anti-HIV por el método de ELISA



INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos (Ac) son proteínas que produce el sistema inmunitario como respuesta a una sustancia ajena. Estas moléculas solo se unen a estructuras específicas denominadas antígenos (Ag) que se definen como proteínas que no reconoce el sistema inmunitario.

Se denominan técnicas inmunoquímicas aquellas que utilizan la reacción antígeno anticuerpo o alguna de sus propiedades para medir elementos, sustratos o enzimas. La reacción Ag-Ac es indetectable por si misma *in vitro* se necesita una segunda fase, llamada fase indicadora. En función de esta fase se clasifican a los inmunoensayos.

Los enzimoimmunoanálisis (EIA) son de dos tipos: homogéneos y heterogéneos. En los homogéneos, no es necesario un paso intermedio de lavado o separación.

Los EIA heterogéneos, utilizan un marcador enzimático, y son generalmente conocidos como ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas). Requieren la realización de pasos previos de separación, antes de efectuar la medición de la actividad enzimática. Las enzimas usadas habitualmente son la fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rábano, y son básicamente de tres tipos:

1. **Ensayo tipo sándwich.** Este ensayo es para la medición de Ag. Existe un primer anticuerpo unido habitualmente a una fase sólida; Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo marcado. Así pues cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo.

2. **Ensayo competitivo.** Para medición de Ag. La muestra se hace competir con antígeno marcado frente a un anticuerpo (unido normalmente a una fase sólida). Se lava para eliminar el componente que ha quedado libre y se revela. La cantidad de producto formado es inversamente proporcional al antígeno (no unido a enzima) existente en la muestra.
3. **Ensayo indirecto.** Se usa para medir niveles de Ac. Se fija antígeno a la fase sólida y se hace reaccionar con la muestra donde se encuentra el anticuerpo. Tras un lavado se añade inmunoglobulina-antiglobulina humana marcada con una enzima. Se vuelve a lavar y se revela. La cantidad de producto formado es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en la muestra.

Los métodos de ELISA, en sus diferentes variedades, son utilizados para detectar el contacto con diversos agentes infecciosos, tales como VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), HPV (Virus Papova Humano), protozoarios (*Toxoplasma gondii*), hormonas LH (hormona luteinizante), y FSH (hormona estimulante de los folículos), drogas (cocaína, marihuana, etc.) y otros.

OBJETIVO

- Determinar la presencia de anticuerpos anti-VIH en sangre humana.

MATERIAL Y REACTIVOS

Suero humano

Kit: charola con 96 micropozos que contienen péptidos cubiertos, en una bolsa

Pipetas de precisión

Puntas de pipeta desechables

Cinta adhesiva

Papel absorbente

Baño María con control de temperatura

Papel cuadriculado para graficar

Lector de micropozos

Cronómetro

Conjugado anticuerpo peroxidasa 12 ml

Control positivo 0.8 ml

Control negativo 0.8 ml

Diluyente de la muestra 12 ml

Solución TMB (peróxido de hidrógeno) 12 ml

Solución para finalizar el proceso (6 ml HCl 2N)

Solución amortiguadora de Fosfato Salino 20X (PBS) como solución de lavado (30 ml)

METODOLOGÍA

1. Seleccione o corte los micropozos que va a utilizar.
2. Seleccione 2 micropozos para blancos, control positivo y negativo. Coloque 100 μ l de diluyente de la muestra en cada uno de ellos, y adicione 5 μ l de control positivo y negativo en los micropozos correspondientes.
3. Coloque 100 μ l de diluyente de la muestra dentro de los micropozos seleccionados para muestras y adicione 5 μ l de muestra en cada pozo y mezcle.
4. Cubra los micropozos con cinta adhesiva e incube a 37°C por 20 minutos.
5. Al final del periodo de incubación, retire la charola del baño maría y deseche la solución de reacción en la tarja en un solo movimiento para no contaminar los pozos. Lave los micropozos 4 veces con solución de lavado y una vez con agua destilada, tirar el agua destilada y la solución de lavado en la tarja de un solo movimiento.
6. Seque la charola colocándolo volteada sobre una toalla de papel desechable.
7. Agregue 100 μ l del anticuerpo (Ac) conjugado con peroxidasa en cada micropozo, excepto en el que contiene la solución blanco.
8. Cubra los micropozos con cinta adhesiva e incube a 37°C por 20 minutos.
9. Al final del periodo de incubación, retire la charola del baño maría y deseche la solución de reacción en la tarja en un solo movimiento para no contaminar los pozos. Lave los micropozos 4 veces con solución de lavado y una vez con agua destilada, tirar el agua destilada y la solución de lavado en la tarja de un solo movimiento.
10. Agregue 50 μ l de solución TMB en cada micropozo y espere 10 minutos a temperatura ambiente.
11. Agregue 50 μ l de solución de paro en cada micropozo incluyendo los blancos.
12. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de ELISA durante los siguientes 30 minutos.

Diagrama de flujo de la práctica 7

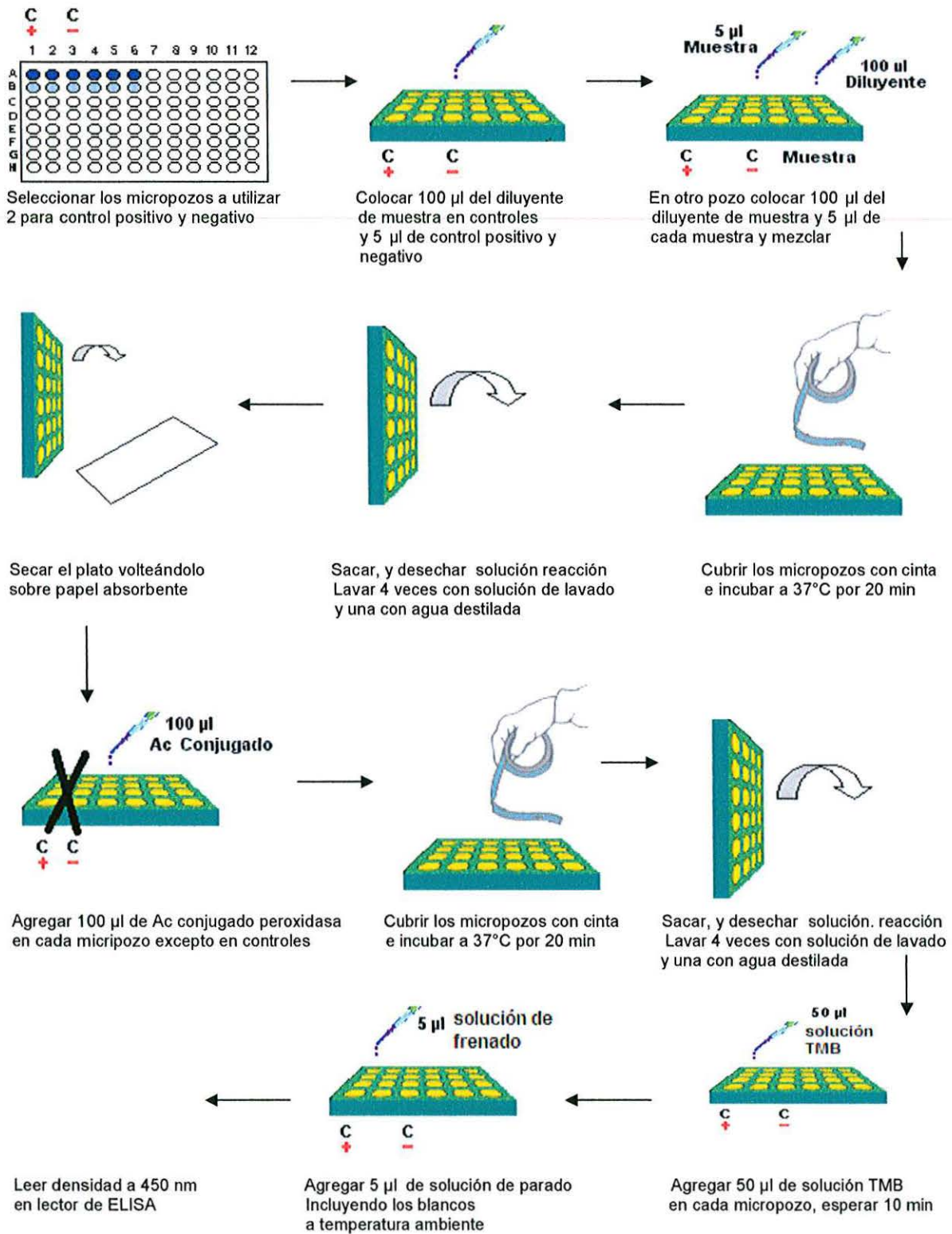


Figura 8: Prueba de ELISA para el virus VIH (virus de la inmunodeficiencia humana)

RESULTADOS

CONCLUSIONES

ACTIVIDADES

Realiza un cuadro comparativo de las diferencias entre los métodos inmunoquímicos

¿En qué consiste un ensayo de microelisa?

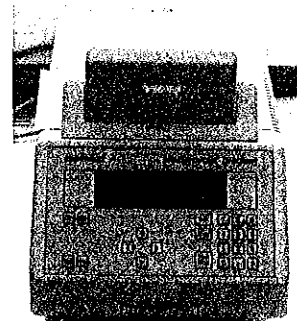
¿Cuál es el punto crítico en la metodología de ELISA?

EVALUACIÓN

BIBLIOGRAFIA

- Prieto S. Amich S. Salve M.L. Laboratorio clínico, principios generales. Interamericana/McGraw-Hill. España; Madrid. 1993: 498-501.
- <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/elisa.htm> (16 Enero de 2006)

Práctica 8
Amplificación del gen de la β -globina por PCR (reacción en cadena de la polimerasa)
(Práctica demostrativa)



INTRODUCCIÓN

Desde el momento en que Watson y Crick publicaron en 1953 la estructura del DNA, se comenzaron a desarrollar técnicas para permitir el análisis de las características físicas y las secuencias de los ácidos nucleicos. Entre éstas, se encuentran la electroforesis, el análisis con enzimas de restricción, la hibridación molecular y la secuenciación. Estos métodos continúan siendo las herramientas básicas de la biología molecular, cuyo panorama cambió cuando se describió por primera vez la técnica de amplificación de ácidos nucleicos, conocida como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descubrimiento realizado por Kary Mullis (1987).

La PCR es una técnica de replicación *in vitro* muy útil para las investigaciones de biología molecular, es tan sensible que se puede amplificar una sola copia de DNA por medio de ciclos repetidos de síntesis dirigida por cebadores; la identificación del fragmento amplificado se visualiza en electroforesis, identificando una banda del tamaño esperado, al compararla con un marcador de peso molecular. Su principio es relativamente sencillo; consta de un proceso cíclico en el cual se repiten tres eventos: desnaturalización, hibridación y amplificación. Al final del ciclo vuelven a ser desnaturalizadas hasta completar los ciclos (generalmente entre 20 y 30 ciclos). Se ha fomentado el desarrollo de técnicas combinadas de la PCR por parte de los investigadores, entre los que se encuentran RFLP-PCR (PCR fragmentos generados por enzimas de restricción), ASO-PCR (PCR hibridación alelo específica), etc., que ayudan a identificar cambios conocidos en una secuencia dada (mutación), un ejemplo de estos cambios es la talasemia β que es causada por mutaciones del gen de β -globina.

La talasemia comprende un grupo de enfermedades hereditarias, cuya característica es la producción deficiente de una de las cadenas polipeptídicas de la hemoglobina; la velocidad de síntesis disminuye en grado diverso aunque en la mayoría de los casos la cadena formada resulta estructuralmente normal. En la talasemia β disminuye la producción de las cadenas beta. La información de las anomalías moleculares se ha obtenido a partir de estudios con técnicas moleculares utilizando PCR en sus diferentes modalidades.

Al patrón de combinación de diferentes sitios polimórficos de DNA a lo largo de un cromosoma se le denomina haplotipo.

La PCR por si sola no es una metodología de diagnóstico completo, sino que forma parte fundamental de muchos de ellos, aumentando significativamente su sensibilidad. Indiscutiblemente, no hay un protocolo estándar para todas las situaciones. Por lo tanto, cada vez que se utiliza la PCR requiere de un nuevo protocolo o estandarización previa de la técnica.

OBJETIVO

- Introducir al alumno al manejo de la técnica de PCR.
- Identificar los haplotipos β que causan talasemia β .

MATERIAL Y REACTIVOS

Micropipetas

Microtubos de 0.2 ml (de polipropileno)

Gradillas

Puntas de 1000 y 200 μ l

Cronómetro

Microcentrifuga

Termociclador

Fuente de poder

Muestra problema

Gel de agarosa al 3%

Iniciador 5' 25 pM/ μ l

(TCCTATCCATTACTGTTCCCTTGAA)

Iniciador 3' 25 pM/ μ l

(GTA CTCATACTTTAGTCCTAACT)

TaqPol 5 U/ μ l

METODOLOGÍA

1. Obtener DNA genómico de acuerdo a la metodología descrita en el apéndice 1
2. Preparar la mezcla de reacción para PCR (descrita en el apéndice 2).

Nota: Mantener los reactivos (TaqPol, dNTPs, iniciadores, etc.) en hielo durante todo el transcurso de la práctica para evitar su desnaturalización.

3. Colocar 20 μ l de mezcla de PCR en el fondo de un tubo nuevo tipo Eppendorf de 0.2 ml.
4. Agregar 2 μ l de mezcla iniciador-Taq (preparación descrita en apéndice 3) y 1.5 μ l de DNA genómico (100 ng/ μ l) ambos en la pared del tubo.
5. Colocar muestras en el termociclador, cerrarlo.

6. *Iniciar PCR: condiciones de amplificación en termociclador*

- Desnaturalización 94°C 1 min
- Alineación 55-65°C 1 min
- Extensión 72°C 1.5 min
- 30 ciclos
- Extensión prolongada 72°C por 3 minutos
- Terminación 4 °C

7. Sacar las muestras y prepararlas para realizar electroforesis en gel de agarosa al 3% (ver apéndice 2) en un amortiguador de TBE 1X con bromuro de etidio (25 μ L / 500mL de amortiguador)

8. Revisar el corrimiento electroforético en transiluminador y observar la amplificación del fragmento de DNA.

Diagrama de flujo de la práctica 8

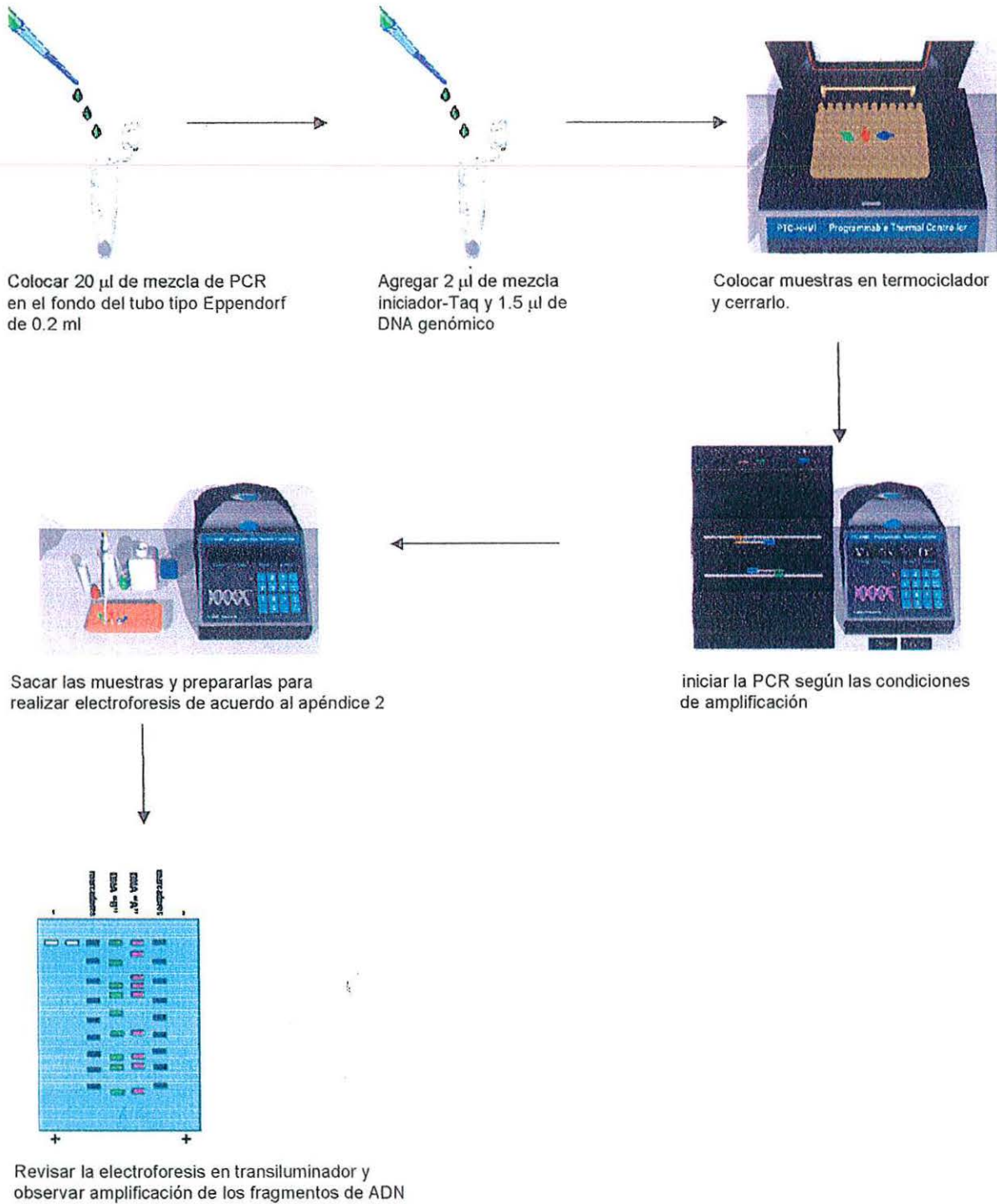


Figura 9: PCR (amplificación de fragmentos de DNA)

RESULTADOS

CONCLUSIONES

ACTIVIDADES

Describe las 3 etapas de la técnica de PCR mediante un esquema.

¿Qué función tiene el termociclador en la metodología de PCR?

¿Qué tipo de enlaces se rompen en la primera etapa de la PCR?

¿Qué resultados se esperan, al variar las condiciones de temperatura y número de ciclos en el método de PCR?

EVALUACIÓN

BIBLIOGRAFÍA

- Innis M.A.; Gelfand D.H.; Sninsky J.J.; White J.T.; 1990. PCR protocols, a guide to methods and applications, Academic Press Inc. 1990: 3-11
- Ruiz Reyes G. Fundamentos de Interpretación Clínica de los Exámenes de Laboratorio. 1ª edición. Panamericana, México; DF, 2004.
- Tesis Doctoral: M. en C. Alma Rosa Villalobos Arámbula. Haplotipos β en familias mestizas mexicanas con talasemia Beta. Gdl. Jalisco, Agosto de 1996.

VII. PROGRAMA DE ASIGNATURA METODOS ANALITICOS

4 HORAS/SEM

SEMANA No	HORA S	CONTENIDOS	TÉCNICA DIDACTICA	TRABAJO DE APOYO	LUGAR
1		GENERALIDADES DE QUÍMICA ANALITICA	EXPOSICION	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	Aula
	2h	Unidades de medición	EJERCICIOS	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	Aula
		Características de los métodos analíticos	EXPOSICIÓN	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	Aula
	2h	Clasificación de los métodos analíticos	EXPOSICIÓN	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	Aula
2		Métodos comunes en el laboratorio	Revisión de artículos	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	Aula
	2h	Medición de pH	EXPOSICIÓN	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA/	Aula/ Lab.
		Medición de temperatura	EXPOSICION	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA/	Aula/ Lab.
	2h	Medición de volúmenes	EXPOSICION	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	Aula/ Lab.
		Medición de pesos	EXPOSICION PRÁCTICA 1	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA/	Aula/ Lab.
3	2h	Centrifugación	EXPOSICION PRÁCTICA 2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	Aula/ Lab.
	2h	Control de calidad	EXPOSICIÓN	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	Aula
4	2h	Programas de control de calidad	Revisión de artículos	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA/	Aula/ Sala de cómputo
	2h	1ª evaluación/ Métodos ópticos(Introducción)	EXPOSICIÓN	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	Aula
5	4H	Métodos ópticos (Espectrofotometría Vis-UV, Fluorescencia)	EXPOSICION PRÁCTICA 3	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA/	Aula/ Lab.
6	2H	Métodos ópticos (espectrofotometría AA)	EXPOSICION PRÁCTICA 4	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA/	VISITA A LAB. EXTERNO
	2H	Métodos ópticos (Nefelometría y turbidimetría)	EXPOSICIÓN	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA/	VISITA A LAB. EXTERNO
7	2h	2ª evaluación / Métodos de separación	EXPOSICIÓN	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	Aula
	2h	Cromatografía	EXPOSICIÓN	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	Aula

8	4H	Cromatografía de capa fina y cromatografía de exclusión molecular	REVISIÓN DE ARTICULOS <i>PRÁCTICA 5</i>	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA/	Aula/ Lab.
9	4H	Cromatografía de intercambio iónico y Cromatografía de gases	REVISIÓN DE ARTICULOS	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA/ PRACTICA DE LABORATORIO	VISITA A LAB. EXTERNO
10	4h	Cromatografía HPLC	EXPOSICION	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	Laboratorio
11	4h	Electroforesis	EXPOSICIÓN <i>PRÁCTICA 6</i>	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA/	Aula/ Lab.
12	4h	Isoelectroenfoque	EXPOSICIÓN	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	Aula/ Lab.
13	4H	3ª Evaluación / Métodos radioquímicos	EXPOSICIÓN	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	Lab.
14	4H	Radioinmunoanálisis	EXPOSICIÓN <i>PRÁCTICA 7</i>	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA/	Aula/ VISITA A LAB. EXTERNO
15	4H	Otros métodos inmunoquímicos	EXPOSICION	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA/ PRACTICA DE LABORATORIO	Aula/ VISITA A LAB. EXTERNO
16	4H	Métodos moleculares	EXPOSICIÓN <i>PRÁCTICA 8</i>	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA/	Aula/ VISITA A LAB. EXTERNO
17	4H	VISITA A UN LABORATORIO EXTERNO			

VIII. APÉNDICES

Apéndice 1

Práctica 2

Solución hipertónica Tris-EDTA-Sacarosa pH 8.0 de la práctica 2

10 mM Tris base	0.121 g
10 mM EDTA	0.372 g
20% sacarosa	20.000 g
agua	80.0 ml

Disolver las sales y la sacarosa, ajustar el pH con NaOH, y completar volumen a 100 ml

Apéndice 2

Práctica 8

Metodología de extracción de DNA en sangre periférica por el método DTAB-CTAB

1. Tomar muestra de sangre a un alumno de cada equipo en un tubo con anticoagulante EDTA 10%(3 ml).
2. Colocar en un microtubo estéril de 1.5 ml, 30 μ l de sangre y agregar 600 μ l de solución DTAB al 8% e incubar a 65-68°C durante 5 min.
3. Agregar 550 μ l de cloroformo, tapar y agitar vigorosamente durante 5 minutos.
4. Centrifugar a 14,000 rpm. durante 10 min.
5. Pasar el sobrenadante a un microtubo de 1.5 ml, agregar 100 μ l de solución CTAB al 5% mezclar, luego agregar 750 μ l de agua ultrapura estéril (de ampollitas), mezclar suavemente por inversión.
6. Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min.
7. Descartar el sobrenadante y agregar 200 μ l de sol NaCl 1.2 M. Resuspender el botón.
8. Agregar 850 μ l de etanol absoluto al 100% (frío). Mezcle suavemente por inversión.
9. Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min.
10. Eliminar el sobrenadante y lavar el botón dos veces con etanol al 70%.
11. Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min.
12. Descartar el sobrenadante y secar el botón.
13. Resuspender el botón con solución amortiguadora TE 1X.
14. Determinar la calidad y cantidad de DNA por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Determinación de la calidad y cantidad del DNA obtenido

Se determinara por espectrofotometría y a partir de electroforesis en agarosa.

1. Seleccionar la longitud de onda (260/280) para leer en el espectrofotómetro.
2. Hacer ajuste a "0" en el espectrofotómetro con H₂O destilada.
3. Diluir 10 µl de DNA en 990 µl de H₂O grado inyectable (ampolleta de 5 ml).
4. Leer la absorbancia a 260 nm y a 280 nm.
5. Determinar el grado de pureza con la siguiente relación.

Abs 260-DNA/Abs 280-proteínas.

Relación: > 1.71 (buen grado de pureza)

< 1.71 (contaminación con proteínas)

6. Calcular la concentración multiplicando:

DO X 100* X 50** = ng/ml.

*Factor de dilución: 1000/10.

** 1 DO de DNA genómico (50 ng/µl o µg/ml) .

La electroforesis muestra la posibilidad de contaminación del DNA con sales o proteínas, así como su integridad o degradación.

Apéndice 3

Mezcla PCR

H ₂ O estéril	856 µl
Amortiguador PCR 10X	120 µl
dNTPs 10 mM/µl *	24 µl
*dNTPs	10 µM

Amortiguador PCR 10X

Trisma base	12 mM
MgCl ₂	1.8 mM
KCl	60 mM
Gelatina	1 g

Mezcla iniciador-Taq

Iniciador 5' 25 pM/µl	1 µl
Iniciador 3' 25 pM/µl	1 µl
TaqPol 5 U/µl	0.1 µl

Preparación del gel (30 ml al 3%)

Agarosa	0.9 g
TBE 1X	30 ml

Preparación del gel (30 ml al 1%)

Agarosa 0.3 g
TBE 1X 30 ml

Amortiguador TBE 10X (1000 ml)

Tris	0.89 M	108 g
Ácido Bórico	0.89 M	55 g
EDTA	25mM	9.3 g

Corrimiento Electroforético.

1. Remover el peine, colocar el gel en la cámara horizontal para electroforesis sumergida, cubrir con amortiguador TBE 1X.
2. Colocar cuidadosamente la muestra en cada punto de aplicación.
3. Cerrar la cámara y acomodar el campo eléctrico cuidando que el DNA migre hacia el ánodo. Correr a 80 volts por 40-60 min (hasta que los colorantes migren a la tercera parte del gel) .
4. Teñir el gel en una solución con Bromuro de Etidio (5 µg/ml) por 5 minutos.
5. Desteñir con agua, observar el gel en un transiluminador de luz UV.