



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

BIOTECNOLOGÍA

MANUAL DE PRÁCTICAS



BIOLOGÍA: PLAN DE ESTUDIOS 2017-2
EDICIÓN 2021-2

Dra. Amelia Portillo López
Dr. Manuel Alejandro Carballo Amador

CONTENIDO

<i>No. de práctica</i>	<i>Nombre de la práctica</i>	<i>No. Página</i>
	<i>Reglas de seguridad en el laboratorio</i>	<i>3</i>
<i>1</i>	<i>Producción de yogurt</i>	<i>4</i>
<i>2</i>	<i>Producción de vino</i>	<i>6</i>
<i>3-4</i>	<i>Aislamiento de un organismo productor de antibiótico</i>	<i>10</i>
<i>5-7</i>	<i>Producción de exoenzimas: amilasas, lipasas y proteasas</i>	<i>14</i>
<i>8</i>	<i>Preparación de células competentes</i>	<i>19</i>
<i>9</i>	<i>Purificación de ADN plasmídico</i>	<i>21</i>
<i>10</i>	<i>Electroforesis de ADN en agarosa</i>	<i>23</i>
<i>11</i>	<i>Transformación química de E.coli</i>	<i>26</i>
<i>12</i>	<i>Expresión de proteína verde fluorescente en E. coli</i>	<i>28</i>
<i>13</i>	<i>Expresión y extracción de Taq polimerasa de un organismo modificado genéticamente</i>	<i>30</i>
<i>14</i>	<i>Detección por PCR de la toxina Bt en organismos transgénicos.</i>	<i>33</i>
	<i>Literatura</i>	<i>34</i>

REGLAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO



- Localizar todos los equipos de seguridad como extinguidores, lavador de ojos, regaderas, entre otros.
- Proteger los ojos en caso de trabajar con reactivos corrosivos, peligrosos o con luz ultravioleta.
- Usar bata de laboratorio todo el tiempo, es importante para protección del material corrosivo o blanqueadores.
- Nunca pipetee con la boca o pruebe algún reactivo.
- No ingerir alimentos o bebidas en el laboratorio.
- El pelo largo de preferencia recogerlo para evitar accidentes.
- No usar calzado con los pies descubiertos.
- No colocar los libros o cuadernos en el área de trabajo, tampoco el uso de teléfonos celulares durante la sesión.
- Reporte cualquier daño o accidente en el laboratorio.
- Pregunte al maestro cualquier duda en el manejo de reactivos y/o equipos.
- Todos los reactivos pueden ser un riesgo para la salud, trabaje con cuidado.
- La mayoría de las prácticas de este laboratorio usan reactivos cancerígenos o tóxicos, así como agentes potencialmente patógenos, trabaje con seriedad y cuidado.
- En caso de contaminarse con algún reactivo lavarse con agua rápidamente y avisar al maestro.

➤ PRÁCTICA #1

Producción de yogurt (Aislamiento de lacto bacterias)

INTRODUCCIÓN: a investigar por la o el estudiante.

OBJETIVO: PRÁCTICA r uno de los procesos involucrados en la industria alimenticia donde participa la Biotecnología y aplicar un proceso industrial para la producción de yogurt con responsabilidad.

MATERIAL:

- ✓ Yogurt comercial natural y/o bulgaros
- ✓ 2 Cajas de Petri
- ✓ Tinción Gram
- ✓ 2 Portaobjetos y cubre objetos, aceite de inmersión, microscopio óptico
- ✓ 1 Asa bacteriológica
- ✓ 1 Mechero
- ✓ 1 Termoplato
- ✓ 1 Agitador magnético
- ✓ 1 Cuchara desechable
- ✓ 1 Matraz Erlenmeyer de 1000 ml (1 por todo el grupo)
- ✓ Papel secante y papel aluminio
- ✓ Papel para pesar
- ✓ 1 Espátula
- ✓ 1 Piseta de etanol y 1 de agua destilada
- ✓ 1 Probeta de 250 ml
- ✓ Papel pH
- ✓ 1 Vaso desechable de foam
- ✓ Leche fresca o de caja

Medio de cultivo MRS, preparar con la siguiente fórmula:

Triptona o peptona (10 g), agar nutritivo (23 g), extracto de levadura (5 g), glucosa (20 g), K_2HPO_4 (5 g), citrato de amonio (2 g), acetato de sodio (5 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.5 g), $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (0.2 g), tween 80 (1 ml), agua destilada 1 L, ajustar el pH entre 6.2 a 6.4, esterilizar a 121 °C y 15 lb durante 15 min.

Calcular el volumen a preparar estimando 25 ml por cada caja de Petri.

METODOLOGÍA:

Tinción de bacterias

1. Preparar un frotis, con el yogurt comercial: dejar secar y fijar con la flama del mechero.
2. Teñir con los colorantes de Gram: cubrir con cristal violeta durante 1 min, lavar con agua.
3. Colocar Lugol por 1 min, decolorar con alcohol por 2 segundos y lavar con agua.
4. Teñir con safranina durante 30 segundos, lavar, escurrir y dejar secar.
5. Observar al microscopio sin cubreobjetos con aceite de inmersión a 100X.
6. Registrar las observaciones.

Aislamiento de bacterias

1. Preparar el medio de cultivo y sembrar con el asa bacteriológica el yogurt comercial.
2. Incubar a 37 °C en un frasco con una vela para crear un ambiente disminuido en oxígeno.

Elaboración de yogurt

1. Para preparar el yogurt: calentar la leche a punto de hervir y dejar enfriar hasta 45 °C, vaciar en vasos de foam aproximadamente 200 ml.
2. Añadir dos cucharadas de yogurt comercial.
3. Incubar de 3 a 6 h a 46 °C y después refrigerar.
4. A las 48 h realizar una tinción de Gram y determinar el tipo de lacto bacilo presente en las cajas de Petri.

PRÁCTICA #2

Producción de vino

(Aislamiento de levaduras, pruebas de etanol y sulfitos)

INTRODUCCIÓN: a investigar por la o el estudiante.

OBJETIVOS: Aplicar los procesos involucrados en la industria alimenticia donde participa la Biotecnología y experimentar un proceso industrial para la producción de vino con responsabilidad.

MATERIAL

Primera sesión

- ✓ 1 kg de uva fresca
- ✓ 1 Matraz Erlenmeyer de 500 ml
- ✓ 1 Bolsa ziploc grande
- ✓ 1 Trampa de CO₂ y un tapón horadado
- ✓ Papel indicador de pH y/o potenciómetro
- ✓ 10 Tubos con tapa de rosca y con sol salina estéril (1% NaCl)
- ✓ 4 Cajas de Petri
- ✓ 10 Pipetas de 1 o 2 ml (estériles)
- ✓ 1 Perilla
- ✓ 1 Pipeta de 10 ml
- ✓ 1 Matraz Kitasato de 1000 ml
- ✓ 1 Asa de vidrio
- ✓ 1 Vaso de precipitado de 500 ml con etanol puro
- ✓ 1 Micropipeta de 200 µl
- ✓ Ampicilina stock (100 µg/ml)
- ✓ Puntillas de 200 µl
- ✓ Papel aluminio y de pesar
- ✓ 1 Espátula
- ✓ 1 Termoplato
- ✓ 1 Mechero
- ✓ 1 Agitador magnético
- ✓ 1 Piseta con alcohol
- ✓ 1 Piseta con agua destilada
- ✓ 1 Probeta de 250 ml
- ✓ Papel secante

Segunda sesión:

- ✓ 2 Portaobjetos y cubreobjetos
- ✓ Microscopio óptico

- ✓ Aceite de inmersión
- ✓ 1 Mechero y encendedor
- ✓ 1 Asa bacteriológica
- ✓ Levadura liofilizada comercial
- ✓ Azul de metileno
- ✓ 1 Pipeta Pasteur con bulbo
- ✓ 2 Cajas de Petri con el medio YEPD (preparada de la sesión anterior)
- ✓ 4 Tubos con solución salina estéril (preparada de la sesión anterior)

Medio de cultivo

YEPD: extracto de levadura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), glucosa 2% (p/v) y agar 1.5% (p/v).

PROCEDIMIENTO:

1. Colocar las uvas (sin tallo) sin lavar en una bolsa ziploc y triturar.
2. Colocar el jugo en un matraz de 500 ml o 1 L con o sin cáscara.
3. Colocarle una trampa de CO₂.
4. Dejar los matraces a temperatura ambiente (~20-25 °C).
5. Del tiempo cero, tome 1 ml y haga diluciones hasta -4.
6. Con una puntilla de 200 µl o pipeta de 1 ml, siembre 0.1 ml en YEPD agar de la dilución -3 y -4.
7. Colocar las cajas a crecer a 30 °C por 24-48 h, después almacenarlas en el refrigerador con parafilm a su alrededor hasta la próxima sesión.
8. Observar las colonias al microscopio para corroborar de que son levaduras.
9. Aislar las colonias de levaduras en una caja nueva de YEPD, dividida en 4 u 8; con un plumón coloree las divisiones por el lado del agar.
10. A los 14 días repetir el procedimiento desde el paso 5 a 9.
11. Utilizar un matraz Kitasato de 500 o 1000 ml y un embudo con papel filtro para filtrar el vino.
12. Medir la concentración de etanol.

Pruebas de etanol

Material

- ✓ 5 Tubos con tapa de rosca con 10 ml del medio YEPD
- ✓ Etanol grado reactivo
- ✓ 1 Pipeta de 10 ml
- ✓ Asa bacteriológica
- ✓ Mechero
- ✓ Encendedor
- ✓ Piseta con etanol
- ✓ 1 Vaso de precipitado de 250 ml
- ✓ 1 Espátula
- ✓ Extracto de levadura, peptona y dextrosa (glucosa)

METODOLOGÍA

1. Añadir etanol a cuatro tubos ajustando diferentes porcentajes hasta colocar 20%; ejemplo un tubo con 5%, otro con 10%, 15%, 20% y un control sin etanol.
2. Colocar una asada pequeña de la colonia de levadura en estudio.
3. Incubar a 30 °C por 24 y 48 h.
4. Registrar resultados.

Pruebas de producción de sulfitos

Material

- ✓ 5 Tubos con tapa de rosca con 10 ml del medio YEPD
- ✓ 1 Pipeta de 10 ml
- ✓ Asa bacteriológica
- ✓ Mechero y Encendedor
- ✓ Piseta con etanol
- ✓ 1 Vaso de precipitado de 250 ml
- ✓ 1 Espátula
- ✓ Metabisulfito de sodio o potasio
- ✓ Tablas de concentraciones de metabisulfito
- ✓ Medio de cultivo Biggy agar
- ✓ 2 Cajas de Petri
- ✓ 1 Termoplato
- ✓ 1 Matraz Erlenmeyer de 500 ml

METODOLOGÍA

1. Añadir diferentes concentraciones de metabisulfito stock a cada tubo de medio líquido de YEPD e inocular un tubo sin metabisulfito como control, considerando la normatividad de México y el mundo.
2. Inocular con la levadura a probar.
3. Poner a crecer a 30 °C por 24-48 h.
4. Determinar viabilidad por turbidez comparando con el control.
5. En el caso de usar el agar Biggy, preparar el medio de acuerdo con las instrucciones comerciales.
6. Sembrar la cepa a probar, incubar y determinar el color de producción de sulfitos.
7. Sembrar una caja con el control de levadura comercial de vino.

PRÁCTICA #3 y 4

Aislamiento de un organismo productor de antibiótico

INTRODUCCIÓN: a investigar por la o el estudiante.

OBJETIVOS: Emplear una técnica de aislamiento de un organismo productor de antibiótico utilizado en la farmacéutica.

Primera Sesión: (Aislamiento primario)

MATERIALES

Por par de estudiantes:

- ✓ 7 Tubos con tapa de rosca
- ✓ 3 Cajas Petri
- ✓ 7 Pipetas de 1 o 2 ml (estériles)
- ✓ 1 Pipeta de 10 ml
- ✓ 1 Matraz o vaso de precipitado de 250 ml
- ✓ 1 Matraz de 500 ml
- ✓ Papel aluminio y de pesar
- ✓ 1 Espátula
- ✓ 1 Incubadora a 28-30 °C
- ✓ 1 Termoplato.
- ✓ 1 Mechero.
- ✓ 1 Agitador magnético.
- ✓ 1 Piseta con alcohol.
- ✓ 1 Botella de solución salina fisiológica (1% NaCl)
- ✓ 3 ajas Petri con agar de extracto de levadura y glicerol (GYEA) con un fungicida
- ✓ Muestra de tierra de un bosque, jardín y zona agrícola

METODOLOGÍA

1. Etiquetar 6 tubos del 1 al 6; con la pipeta de 10 ml, verter 9 ml de solución salina a cada tubo.
2. Pesar 1 g de tierra y depositarlo en el tubo 1.
3. Hacer vortex al tubo 1 hasta que toda la muestra este disuelta.
4. Realizar una dilución decimal del tubo 1 al 6 transfiriendo 1 ml de tubo a tubo. Usar una pipeta estéril para cada transferencia y asegurarse de mezclar con la pipeta antes de cada transferencia.
5. Etiquetar tres cajas Petri con sus iniciales y las diluciones a ser depositadas en ellas.

- De cada uno de los tres últimos tubos transferir 100 µl a una caja con agar GYEA.
- Dispersar la dilución sobre la superficie del agar en cada caja con una espátula de vidrio en forma de “L”, el cuál será esterilizado cada vez en alcohol y sobre la flama. Asegúrese de que el tubo de vidrio se enfríe antes de usar.
- Incubar las cajas a 30 °C por siete días.

Segunda sesión: Selección de colonias e Incubación

El objetivo en esta sesión de laboratorio será seleccionar colonias de *Actinomicetos* que puedan ser productoras de antibiótico. Los actinomicetos seleccionados serán estriados en cajas de agar nutritivo que fueron inoculadas previamente con *Staphylococcus epidermidis*. Después de la incubación se buscará evidencia de antibiosis.

MATERIALES

- ✓ Tinción Gram
- ✓ 5 Porta y cubreobjetos, aceite de inmersión
- ✓ Microscopio óptico
- ✓ 1 Asa bacteriológica
- ✓ 1 Termoplato
- ✓ 1 Mechero
- ✓ 1 Agitador magnético
- ✓ Medio: agar nutritivo o BHI agar
- ✓ 4 Cajas Petri
- ✓ 1 Matraz de 500 ml
- ✓ Papel aluminio y de pesar
- ✓ 1 Espátula
- ✓ 1 Incubador a 28-30 °C
- ✓ 4 Porciones de trypticase soy agar (licuado)
- ✓ Cultivo TBS de *Staphylococcus epidermidis*
- ✓ 3 Cajas de aislamiento primario de la sesión previa
- ✓ Baño María a 50 °C

METODOLOGÍA

1. Colocar cuatro porciones de agar licuado en baño María (50 °C) para prevenir la solidificación; luego inocular cada uno con 1 ml de *S. epidermidis*.
2. Etiquetar las cajas Petri con sus iniciales y la fecha.
3. Vaciar los contenidos de cada tubo inoculado en las cajas Petri. Dejar que el agar se enfríe y solidifique.
4. Examinar las tres cajas de aislamiento primario por la presencia de colonias similares a *Actinomyces*. Tienen una apariencia polvosa según la presencia de esporas. Podrán ser blancos o de color. Su maestro/maestra los atenderá en la selección de colonias.
5. Usando una aguja de inoculación estéril, raspar las esporas de las colonias de *Actinomyces* en las cajas de aislamiento primario para inocular las cajas esparcidas con TSA. Usar un inoculador de una colonia distinta para cada una de las cuatro cajas.
6. Incubar las cajas a 30 °C hasta la siguiente sesión de laboratorio.

Tercera y cuarta sesión: Evidencia de antibiosis y confirmación

Examinar las cuatro cajas que fueron estriadas durante la última sesión de laboratorio. Si se observa evidencia de antibiosis (inhibición de crecimiento de *S. epidermidis*), proceder con lo siguiente para confirmar los resultados.

MATERIALES

- ✓ 1 Caja Petri con agar de soya tríptica
- ✓ Cultivo TSB de *S. epidermidis*.

Si la antibiosis está presente, hacer dos estrías formando una cruz en la caja de TSA. Hacer primero un estriado en línea recta con esporas de la colonia de *Actinomyces*, usando una asa de inoculación estéril. Hacer otro estriado cruzando la anterior con organismos de un cultivo de *S. epidermidis*. Incubar a 30 °C hasta la siguiente sesión.

Medio de cultivo agar de extracto de levadura y glicerol (GYEA): glicerol 5 ml, extracto de levadura 2 g, fosfato dipotásico 1 g, agar 15 g, agua destilada 1 L, ajustar a pH 6.9-7.0 con HCl (1-6 N).

Medio de cultivo agar de soya tríptica o caldo (TSA): triptona 15 g, soytone (phytone peptone) 5 g, NaCl 5 g, agar 15 g y agua destilada 1 L.

Medio A1: 10 g de almidón, 2 g de extracto de levadura, 2 g de peptona, 18 g agar, 1 L de agua destilada o agua de mar si son actinomicetos marinos.

PRÁCTICA #5-7

Producción de exoenzimas: amilasas, lipasas y proteasas

INTRODUCCIÓN: A investigar por la o el estudiante.

OBJETIVO: Estimular la producción de exoenzimas bacterianas para llevar a cabo una bioprospección de enzimas utilizadas industrialmente.

Esta práctica consta de cuatro sesiones de laboratorio

Primera sección: Proteasas

MATERIAL

- ✓ 4 Tubos de ensaye con tapa de rosca
- ✓ 1 Pipeta de 10 y 2 ml
- ✓ 4 Cajas de Petri (2 por cada tipo de medio)
- ✓ 1 Asa bacteriológica y una de vidrio
- ✓ 1 Termoplato (por grupo)
- ✓ 2 Agitadores magnéticos (por grupo)
- ✓ 1 Mechero
- ✓ Papel de aluminio
- ✓ 2 Espátulas (por grupo)
- ✓ 1 Piseta con alcohol
- ✓ 1 Piseta de agua destilada
- ✓ 3 Matraces de 500 ml (por grupo)
- ✓ Triptona
- ✓ NaCl
- ✓ Leche descremada (*skim milk*)
- ✓ Agar técnico o bacteriológico
- ✓ Gelatina
- ✓ 1 Probeta de 250 ml (por grupo)
- ✓ 1 Vaso de precipitado de 250 ml

Medio de cultivo *SKIM MILK AGAR*: Triptona 20 g, NaCl 5 g, agar 15 g y agua destilada 1 L. Leche descremada 100 g/L prepararla en la mitad del volumen. Preparar y esterilizar la leche por separado. Esterilizar el medio en autoclave por 12 minutos a 121 °C y 15 lb.

Gelatina nutritiva: Peptona o triptona 4 g, extracto de levadura 1 g, gelatina 15 g, agar 15 g y agua destilada 1 L. Esterilizar el medio en autoclave por 15 minutos a 121 °C y 15 lb.

METODOLOGÍA

1. Pesar 1 g de tierra/suelo y añadir al primer tubo de salina y mezclar invirtiendo el tubo varias veces. Realizar diluciones -1, -2 y -3.
2. Sembrar 0.1 ml de la dilución -3 en una caja de cada medio incubar a 37 °C.
3. En la otra caja sembrar las cepas que el profesor o la profesora le proporcione.
4. Las colonias aisladas las volverá a usar en las siguientes secciones.

Segunda sesión: Lipasas

Traer un trozo de jamón o salchicha, olvidado en el refrigerador por 1 semana dentro de una bolsa de plástico, hasta que este pegajoso.

2 Cajas de Petri
1 Mechero
1 Termoplato (por grupo)
1 Agitador magnético (por grupo)
1 Asa bacteriológica
1 Espátula
Papel aluminio
Papel para pesar
1 Piseta con alcohol
1 Matraz de 500 ml (por grupo)

Medio de cultivo *Spirit blue agar* (DIFCO). Esterilizar el medio en autoclave por 15 minutos a 121 °C y 15 lb.

Añadir tween (20 u 80) cuando el medio este tibio, 20 ml por L.

METODOLOGÍA

1. Estriar una asada de las bacterias aisladas anteriormente en una caja y en otra caja de la capa superficial de las bacterias crecidas en el jamón.
2. Incube a temperatura ambiente.
3. Observar a las 18 h las cepas de color azul fuerte son las productoras de lipasas.

Tercera sección: Amilasas

NOTA: Poner una papa con humedad en una bolsa de plástico esperar a podrirse. Como alternativa, dejar arroz ya cocido de igual forma.

MATERIAL

- ✓ 4 Tubos de ensaye con tapa de rosca
- ✓ 1 Vaso de precipitado de 100 ml
- ✓ 2 Cajas de Petri
- ✓ 1 Mechero
- ✓ 1 Termoplato (por grupo)
- ✓ 1 Agitador magnético (por grupo)
- ✓ 1 Asa bacteriológica
- ✓ 1 Espátula (por grupo)
- ✓ Papel aluminio
- ✓ Papel para pesar
- ✓ 1 Piseta con alcohol
- ✓ 1 Matraz de 500 ml (por grupo)
- ✓ NaCl
- ✓ Agar bacteriológico
- ✓ Caldo nutritivo
- ✓ Almidón

Medio de cultivo: almidón 10 g, caldo nutritivo 8 g, agar bacteriológico 15 g, 1 L de agua destilada. Esterilizar el medio en autoclave por 15 minutos a 121 °C y 15 lb.

METODOLOGÍA

1. Sembrar como anteriormente de la tercera dilución, así como de las cepas proporcionadas e incube a 37 °C por 24 h.
2. Revelar la acción de las exoenzimas en el medio añadiendo un poco de lugol y dejar enfriar la caja. La zona clara es donde la enzima degradó el almidón.

Cuarta sesión: Precipitación de una enzima, ejemplo amilasas

Preparar el medio de cultivo antes utilizado, pero en líquido, sin agar, inocular e incubar.

MATERIALES:

- ✓ Sulfato de amonio
- ✓ Hielo
- ✓ 1 Vaso de precipitado de un litro
- ✓ 1 Vaso de precipitado de 250 ml
- ✓ 1 Embudo para filtrar
- ✓ Papel *Whatman* No 1
- ✓ 1 Kitasato para filtrar al vacío y su manguera
- ✓ 1 Pipeta de 10 ml
- ✓ 1 Pipeteador
- ✓ Agua destilada fría

METODOLOGÍA

1. Filtrar el cultivo para remover el organismo. Colocar el medio líquido en un vaso de precipitado de 250 ml añadir suavemente con agitación 66 g de sulfato de amonio por cada 100 ml de medio; mezclar hasta que todo el sulfato de amonio este disuelto y poner sobre hielo por al menos 30 minutos. Si hizo duplicado filtre los dos volúmenes.
2. Mezcle y coloque el líquido en tubos de centrifuga de 50 ml, etiquete y balancee los tubos y centrifugue 10 minutos a 3,000-5,000 g.
3. Deseche el sobrenadante e invierta el tubo sobre papel absorbente para remover todo el exceso. Un botón estará presente en el fondo del tubo.
4. Disolver el botón de la enzima en 0.5 ml de agua destilada, si fue la misma especie reúna los volúmenes.
5. Corte de 10-15 cm de largo una membrana/tubo de diálisis y póngalo en agua hirviendo por 5 minutos. Después enjuague en agua destilada dos veces.
6. Haga un nudo en un extremo del tubo de diálisis y añada el volumen de la enzima y después haga un nudo en el otro extremo.
7. Coloque el tubo de diálisis con la muestra dentro de un vaso de precipitado de 500 ml con agua destilada fría y deje sumergida la membrana toda la noche bajo refrigeración para dializarla.
8. Al siguiente día, corte un extremo de la bolsa y ponga alícuotas de 1 ml en tubos de microcentrífuga etiquetados. Colóquelos en el congelador.

Concentración de proteína

1. Para medir la concentración de proteína (enzima), colocar 5 μ l de la muestra en 1 ml de agua destilada en un tubo de microcentrífuga. Colocarla en la celda de espectrofotómetro y leer a 280 nm. Ajustar el espectrofotómetro a cero con agua.
2. Calcule la concentración de la proteína suponiendo que una concentración de albumina de 3.5 mg/ml da una lectura de 1.98 a 280 nm.
3. Realizar una electroforesis de proteína: SDS-PAGE.
4. Preparar los geles para correr la muestra al siguiente día o sesión.
5. Preparar las soluciones, excepto el persulfato de amonio que debe ser fresco.

PRÁCTICA #8

Preparación de células competentes (técnica modificada de Cohen et al., 1972)

INTRODUCCIÓN: a investigar por la o el estudiante.

OBJETIVOS: Manipular una célula para hacerla susceptible a ser transformada.

MATERIAL

- ✓ Bacteria *E. coli* (cepas DH5 alfa, JM109, entre otras)
- ✓ Caldo LB (Luria Bertani): 5 g extracto de levadura, 10 g triptona, 10 g NaCl y 1 L de agua destilada.
- ✓ Cloruro de calcio: CaCl_2
- ✓ 2 Tubos de centrifuga de 50 ml estériles
- ✓ 15 Tubos de microcentrífuga de 1.5 o 2 ml (esterilizar)
- ✓ 2 Pipetas serológicas de 10 y 5 ml (esterilizar)
- ✓ Glicerol (esterilizar unos 25 ml)
- ✓ 1 Charola para hielo
- ✓ 1 Matraz de 500 ml
- ✓ 1 Frasco con tapa de rosca de 100 o 200 ml (para CaCl_2)
- ✓ 1 Asa bacteriológica
- ✓ 2 Mecheros
- ✓ Piseta con agua destilada y otra de alcohol
- ✓ Puntillas estériles de 1 ml y 200 μl

METODOLOGÍA

Preparar caldo LB (150 ml), colocar 100 ml en un matraz Erlenmeyer de 1 L y esterilizar. El resto repartir 3-5 ml de medio en 8 tubos con tapa de rosca para rehabilitar las cepas que les proporcionará el maestro o maestra, el resto dejarlo como blanco para el espectrofotómetro.

Preparar CaCl_2 a 0.1 M, esterilizar y poner en el refrigerador.

Esterilizar pipetas, tubos de microcentrífuga y glicerol.

1. Tomar una colonia de una caja recién crecida de 16-20 h a 37 °C (o 10 μl de la cepa de -80 °C) y transfírela a 100 ml de caldo LB en un frasco de un litro.

2. Incube el cultivo por aproximadamente tres horas a 37 °C con vigorosa agitación (300 rpm).
3. El cultivo deberá tener una absorbencia de 0.4 a 0.5, leída en el espectrofotómetro a 600 nm (OD₆₀₀). Por lo tanto, leer la absorbencia cada 20 a 30 min.
4. Asépticamente transfiera las células a un tubo desechable de polipropileno estéril de 50 ml.
5. Enfríe los tubos a 4 °C, colocándolos en hielo por 10 min. Colocar el CaCl₂ 0.1 M en el hielo.
6. Mientras tanto ponga a enfriar la centrifuga *Sorvall* a 4°C.
7. Centrifugue las células a 4,000 rpm por 10 min a 4 °C.
8. Decante el medio de las células en un solo movimiento y déjelo boca abajo por 1 min sobre papel absorbente, dejando que escurra el exceso de medio.
9. Resuspenda el botón de células en 10 ml de CaCl₂ 0.1M frío. NO VORTEX y déjelo en hielo por 20 min.
10. Recupere las células por centrifugación igual al paso 7 y 8.
11. Resuspenda el botón de células en 2 ml de CaCl₂ 0.1M frío y una vez resuspendido añadir 400 µl de glicerol estéril. Mezclar suavemente.
12. Usando unas puntillas frías (-80°C) transferir 100 µl de células a tubos de microcentrífuga fríos.

NOTA: Para una mayor eficiencia dejar las células en hielo toda la noche y al siguiente día transferir alícuotas a tubos de microcentrífuga.

LA CLAVE DE UNAS CÉLULAS COMPETENTES EFICIENTES RADICA EN EL FRÍO
POR LO TANTO TODO DEBERÁ ESTAR MUY FRÍO Y HACER LOS
PROCEDIMEINTOS RÁPIDO Y DE ACUERDO A LA TÉCNICA.

PRÁCTICA #9

Purificación de ADN plasmídico (Técnica miniprep)

INTRODUCCIÓN: a investigar por la o el estudiante.

OBJETIVOS: Purificar el plásmido *Ti* de *Agrobacterium tumefaciens*.

MATERIAL

- ✓ 2 Tubos de microcentrífuga de 1.5 a 2 ml
- ✓ 2 Tubos de cultivo líquido o cajas con la bacteria previamente aislada
- ✓ Soluciones 1, 2 y 3.
- ✓ Isopropanol o etanol grado reactivo
- ✓ Agua libre de AADNsas y ARNasas

METODOLOGÍA

Preparación de soluciones

Calcule los gramos para cada reactivo, el peso molecular puede variar de acuerdo con el reactivo que se utilice y su pureza o grado de hidratación. Corroborar siempre antes el peso molecular (PM) de cada frasco de reactivo.

Solución # 1

50 mM	Glucosa
25 mM	Tris-HCl (pH8.0); PM: 121.14
10 mM	EDTA (pH 8.0); PM: 292.25
50 µg/ml	ARNasa (100µg/ml)

Guardar en refrigeración a 4°C

Solución # 2

0.2 N	NaOH; PM: 40 PM
1% (p/v)	SDS

Solución # 3

3M	KOAc (Acetato de Potasio); PM: 98.14 PM
----	---

Ácido acético glacial
Ajustar el pH de la solución a pH 5.5

NOTA

Preparar la solución #3 de la siguiente manera: 29.4 g KOAc, 11.5 ml de ácido acético, añadir 50 ml de agua destilada, medir el pH y ajustar a 5.5; después aforar a 100 ml. Guardar en refrigeración a 4 °C.

Solución de lisozima (opcional): 50mg/ml en la Sol #1 (usar una dilución de 1:10).

Solución de etanol al 70% (v/v).

METODOLOGÍA

1. Poner a crecer la cepa en 5 ml de cultivo líquido de 24-48 h a temperatura ambiente.
2. Al siguiente día tomar 1 ml, colocar en un tubo eppendorf y centrifugar a 3,000 rpm por 10 min.
3. Suspender el botón en 100 μ l de Sol # 1.
(opcional agregar 100 μ l de lisozima 5 mg/ml e incubar a temperatura ambiente por 10 min)
4. Añadir 200 μ l de la Sol #2, mezclar por inversión, e incubar a temperatura ambiente por 10 min.
5. Añadir 150 μ l de la Sol # 3 fría (hielo), mezclar por inversión e incubar en hielo por 10 min.
6. Centrifugar a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C y decantar.
7. Pipetear el sobrenadante a un tubo eppendorf y añadir 300 μ l de isopropanol e incubar a temperatura ambiente por 2 a 5 min.
8. Centrifugar 12,000 rpm por 10 min.
9. Lavar el botón en 1 ml de etanol al 70%, mezclar con vortex.
10. Centrifugar igual al paso 8.
11. Escurrir y dejar secar a temperatura ambiente y resuspender en 50 μ l de amortiguador TE o agua libre de ARNasas y AADNsas.

PRÁCTICA #10

Electroforesis de ADN en agarosa

INTRODUCCIÓN: a investigar por la o el estudiante.

OBJETIVOS: Cuantificar el ADN plasmídico purificado en la sesión anterior, así como su tamaño, visualizado en un gel de agarosa.

MATERIALES

- ✓ Buffer de electroforesis TAE o TBE
- ✓ Agarosa
- ✓ Amortiguador de carga 6X
- ✓ Muestra de ADN
- ✓ Marcadores de peso molecular de ADN (escalera)
- ✓ Bromuro de etidio (10 mg/ml) (**potencial cancerígeno**) usar 0.5 µg/ml; considerar alguna alternativa como *Novel Juice*, *Syber Safe*, *SafeView*, entre otros
- ✓ Cámara de electroforesis horizontal
- ✓ Fuente de poder
- ✓ Guantes desechables
- ✓ Parafilm

Procedimiento: usar guantes

1. Preparar una solución de agarosa al 1.4% (p/v) en amortiguador TAE o TBE 1X y calentarlo en microondas. Poco a poco homogeneizar y dejar enfriar a una temperatura de 55 °C.
2. Añadir 5 µl de bromuro de etidio a 100 ml de agarosa fundida y tibia. Mezclar suavemente, evitar los vapores, recuerda es potencial cancerígeno.
3. Transferir el agar a la charola de electroforesis y enseguida coloque los correspondientes peines. Dejar solidificar.
4. Después de 30 minutos, con el agar solidificado, coloque la charola en la cámara de electroforesis y agregue amortiguador TAE 1X (hasta que se cubran los pozos con el amortiguador) a la cámara. Aproximadamente 5 mm de la superficie. Retire el peine con cuidado en línea recta.

5. En el primer pozo colocar el estándar de ADN.
6. Sobre plástico (*Saran Wrap* o parafilm), coloque la muestra y mézclela con 5% de amortiguador de carga 6X para que la muestra quede a una dilución 1X.
7. Con la micropipeta homogenice la muestra y transfírela a uno de los pozos del gel de agar. Tenga cuidado de no rasgar los pozos o el gel. Repita los tres últimos pasos para el resto de las muestras.
8. Revise las conexiones, que los pozos estén en el polo negativo y encienda la fuente de poder programando el voltaje constante entre 1 a 10 V/cm (aproximadamente 80 V, por 1 h). Con el menor voltaje se obtiene una mejor resolución de bandas, especialmente con fragmentos chicos.
9. Permita que avance la electroforesis hasta que el azul de bromofenol recorra 2/3 de la distancia del gel.
10. Apague la fuente de poder y retire cuidadosamente el gel.
11. En caso de no haber añadido con bromuro de etidio al preparar el gel, entonces se teñirá el gel por 10 min en una solución de bromuro de etidio 0.5 µg/ml y si es necesario desteñir 30 min en agua.
12. Visualicé el resultado de la electroforesis en un transiluminador UV.

Nota: recuerde que la luz UV puede producir mutaciones. Cuando visualice verifique que está usted adecuadamente protegido. Ponerse lentes protectores.

NOTA

El bromuro de etidio es potencial mutagénico y cancerígeno. Usar guantes y bata todo el tiempo. Trabajar con precaución, al ponerse los guantes no andar tocando nada. Desechar todo lo contaminado por bromuro de etidio en los recipientes marcados.

Concentraciones de agarosa para separar fragmentos de ADN de varios tamaños	
% de agarosa	Rango efectivo de resolución de acuerdo con los fragmentos lineares de ADN (Kb)
0.5	1 a 30
0.7	0.8 a 12
1.0	0.5 a 10
1.2	0.4 a 7
1.5	0.2 a 3

Preparación de los amortiguadores

Buffers	Solución de trabajo	Concentración de la solución stock (por litro)
Tris- acetato EDTA (TAE)	1X: 0.04M de Tris-Acetato 0.001 M de EDTA Para 1 L: Tris 4.84 g, ácido acético 1.14 ml, EDTA 0.5M pH 8.0, 2 ml	10X: 48.4 g Tris base 11.42 ml de ácido acético glacial 20 ml 0.5 M de EDTA (pH 8.0) o se puede añadir 7.44 g de Na ₂ EDTA.2H ₂ O
Tris borato EDTA (TBE)	1X: 10.8 g Tris, 5.5 g ácido bórico, 4 ml EDTA 0.5 M pH 8.0	5X: 54 g Tris base 27.5 g de ácido bórico 20 ml 0.5 M de EDTA (pH 8.0)

Preparación del amortiguador de carga: 0.25% de azul de bromofenol, 50% de glicerol en agua grado molecular.

PRÁCTICA #11

Transformación química de E.coli

INTRODUCCIÓN: a investigar por la o el estudiante.

OBJETIVOS: Utilizar una de las metodologías de transformación.

MATERIAL

- ✓ Células competentes (HB 101 K-12, JM109, XL1 blue)
- ✓ Ampicilina stock (60 mg/ml)
- ✓ LB agar
- ✓ 2 Cajas de Petri
- ✓ 1 Asa de vidrio
- ✓ 1 Mechero
- ✓ 1 Termoplato (por grupo)
- ✓ 1 Agitador magnético (por grupo)
- ✓ 1 Matraz de 1000 ml
- ✓ Caldo LB
- ✓ Plásmido pGLO (proteína verde fluorescente)
- ✓ Micropipetas de 2, 200 y 1000 μ l
- ✓ Puntillas de 10, 200 y 1000 μ l (estériles)
- ✓ 1 Cuba para hielo
- ✓ 2 Tubos de microcentrífuga estériles

METODOLOGÍA

1. Preparar 100 ml de caldo LB por equipo.
2. Preparar 250 ml de LB agar para 4 equipos: 5 g extracto de levadura, 10 g triptona, 10 g NaCl, 15 g de agar, 5 g arabinosa, 1 L de agua destilada.
3. Esterilizar el medio en autoclave por 15 minutos a 121 °C y 15 lb de presión.
4. Esperar a que enfríe el agar a 55 °C y añadir la ampicilina stock (1 μ l/ml de medio).

METODOLOGÍA

1. Descongelar un tubo de células competentes (50 a 100 μ l) colocando en hielo inmediatamente (las células dejaran de ser competentes al momento de adquirir la temperatura ambiental).
2. Añadir 0.5-1 μ l de ADN plasmídico (no más de 50 ng de ADN en un volumen no mayor a 10 μ l a cada tubo de células competentes). Mezclar suavemente.
3. Incubar en hielo por 30 min.
4. Colocar el tubo de microcentrífuga en un termobloque de 42 °C y dejar de 45 a 60 segundos, sin agitar.
5. Rápidamente regrese al hielo.
6. Añadir 800 μ l de caldo LB previamente tibio a 37 °C o medio SOC. Incube por 45 min a 37 °C con agitación.
7. Transfiera 50 a 200 μ l a una caja con LB agar con el antibiótico apropiado.
8. Disperse con asa de vidrio y ponga a crecer por 16-18 h a 37 °C.

PRÁCTICA #12

Expresión de proteína verde fluorescente en E. coli

INTRODUCCIÓN: a investigar por la o el estudiante.

OBJETIVOS: Aplicar una técnica de expresión de una proteína recombinante, siendo la GFP una de las más utilizadas como marcador de genes.

MATERIAL

- ✓ 2 Cajas de Petri
- ✓ 1 Matraz de 500 ml (por grupo)
- ✓ 1 Probeta (por grupo)
- ✓ 1 Mechero
- ✓ 1 Tubo de microcentrífuga estéril
- ✓ L (+) arabinosa (utilizar 5 mg/ml)
- ✓ Ampicilina stock (60 mg/ml) usar 1 μ l por ml de medio
- ✓ 1 Asa de vidrio
- ✓ 1 Vaso de precipitado de 500 ml
- ✓ 1 Piseta de agua (por grupo)
- ✓ 1 Piseta con alcohol
- ✓ 1 Tubo de tapa de rosca con 3 ml de agua destilada estéril para la arabinosa (por grupo)
- ✓ 1 Filtro estéril de 0.2 μ M (por grupo)
- ✓ 1 Jeringa de 5 ml (por grupo)
- ✓ 1 Tubo con 10 ml de solución salina estéril (1% NaCl)

METODOLOGÍA

1. Preparar 200 ml de medio de cultivo LB con ampicilina y arabinosa de la siguiente manera.
2. Primero hidratar el medio LB y esterilizar 15 min a 121 °C y 15 lb. Una vez esterilizado dejar enfriar hasta 50 °C.
3. Añadir la ampicilina con puntilla estéril.
4. Disolver 1 g de arabinosa en el tubo con agua destilada estéril.

5. Pasar la solución una vez disuelta a una jeringa de 5 ml y colocarle el filtro estéril y filtrar, añadiendo lo filtrado al medio estéril. Evitar que este demasiado caliente ya que dañará a la arabinosa.
6. Vaciar el medio a las cajas de Petri.
7. Colocar 1 μ l de cepa con pGLO en 1 ml de solución salina estéril. Utilizar el tubo de microcentrífuga estéril.
8. Tomar de 25 a 50 μ l y esparcir con una asa de vidrio en la caja de Petri con LB con ampicilina y arabinosa.
9. Colocar en la incubadora por 24 h a 37 °C.
10. Observar la fluorescencia de la GFP expresada en las colonias bajo luz UV.
11. Tomar fotografía.

PRÁCTICA #13

Expresión y extracción de Taq polimerasa de un organismo modificado genéticamente

INTRODUCCIÓN: a investigar por la o el estudiante.

OBJETIVOS: Aplicar una técnica de expresión de una proteína recombinante.

- ✓ 4 Frascos para los buffers (tubos de centrifuga de 50 ml)
- ✓ 1 Frasco para el medio de cultivo de 500 ml 1 por equipo
- ✓ 2 Tubos de centrifuga de plástico de 50 ml estériles
- ✓ 1 Frasco con agua destilada estéril
- ✓ 2 Tubos de ensaye con tapa de rosca
- ✓ 10 Tubos de microcentrifuga por equipo
- ✓ Puntillas de 200µl
- ✓ 4 Pipetas serológicas de 10 ml por equipo
- ✓ Papel aluminio
- ✓ 1 Espátula delgada
- ✓ Agua destilada
- ✓ Piseta con agua y alcohol
- ✓ Asa bacteriológica
- ✓ 1 Mechero
- ✓ Dextrosa
- ✓ KCl
- ✓ Glicerol
- ✓ Triptona
- ✓ Extracto de levadura
- ✓ Tris
- ✓ EDTA
- ✓ Tween 20
- ✓ Triton X-100
- ✓ DTT (dl-dithiothreitol)
- ✓ IPTG (isopropyl b-d-1-thiogalactopyranoside)

Medio de cultivo *Super Broth* (SB): Triptona 32 g, extracto de levadura 20 g, NaCl 5 g, NaOH 1 M, 5 ml y agua destilada 1000 ml; preparar 100 ml. Esterilizar agua destilada en un matraz de 250 ml, tapado con aluminio, los tubos eppendorf, puntillas de 200 µl y 1000µl, papel de aluminio en cuadritos para pesar, dos espátulas. Esterilizar 15 min a 121 °C y 15 lb.

Antibiótico: Preparar la solución stock con 50 mg de ampicilina en 1 ml de agua destilada estéril, en un eppendorf estéril. Todo bajo asepsia.

Inductor: Preparar la solución stock de IPTG a 0.5 M (0.119 g en 1 ml de agua destilada estéril en un tubo eppendorf estéril).

Preparar las siguientes soluciones

Pesos moleculares: Tris base = 121.14, EDTA= 292.25, Dextrosa = 192, KCl=74.54, NaCl = 58.44, DTT = 154.3, IPTG = 338.3.

Preparar soluciones stock en frascos separados de Tris y EDTA a 0.5 M, pH 7.9

Preparar 25 ml de cada uno de los siguientes buffers:

BUFFER A	BUFFER B	BUFFER DE ALMACENAMIENTO	BUFFER DE ALMACENAMIENTO
50 mM Tris, pH 7.9	10 mM Tris, pH 7.9	50 mM Tris, pH 8.0	50 mM Tris, pH 8.0
50 mM dextrosa	50 mM KCl	100 mM NaCl	100 mM NaCl
EDTA 1 mM	1 mM EDTA	0.1 mM EDTA	0.1 mM EDTA
4 mg/ml de lisozima	0.5% Tween-20	0.5 mM DTT	0.5 mM DTT
	0.5% Triton X-100	1% Triton X-100	1% Triton X-100
		50% glicerol	75% glicerol

METODOLOGÍA

Primer día: preparación de reactivos y siembra del pre-inóculo.

1. Colocar a crecer el pre-inóculo en SB en un tubo con 10 ml y 10 μ l de ampicilina stock, toda la noche.

Segundo día: al siguiente día tomar 100 μ l del pre-inóculo y sembrar 100 ml de SB con 100 μ l de ampicilina stock, poner a crecer a 37 °C a 60 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.3 (aproximadamente 3-5 h).

2. Inducir con IPTG añadiendo 100 μ l de la solución stock para ajustar a una concentración final de 0.5 mM, dejar crecer por 16 h a 37 °C con 250 rpm.

Tercer día: Redistribuir los 100 ml en dos tubos desechables estériles de 50 ml. Centrifugar a 14,000 rpm a temperatura ambiente por 10 min.

3. Resuspender el botón en 3 ml de Buffer A e incubar por 15 min a temperatura ambiente.
4. Añadir 3 ml de Buffer B y mezclar e incubar 60 min a 75 °C en baño María con agitación.
5. Centrifugar por 10 min a 12,000 g en una *Sorvall* con refrigeración a 4 °C.
6. El sobrenadante es removido y mezclado con un volumen igual de Buffer de almacenamiento con glicerol al 50%; adicionalmente añadir el mismo volumen del buffer de almacenamiento, pero con 75% de glicerol, hacer alícuotas y almacenar a -20°C.
7. Correr una PCR con diferentes diluciones, es recomendable no excederse ya que el glicerol interfiere con la reacción, probar de 1-3 μ l en 50 μ l de volumen final.

PRÁCTICA #14

Detección de la toxina Bt en alimentos y/o plantas transgénicas

INTRODUCCIÓN: a investigar por la o el estudiante.

OBJETIVOS: Búsqueda de secuencias del gen Bt en material transgénico y detección experimental por PCR.

✓ **CTAB buffer de extraction:**

2% (p/v) CTAB

100 mM Tris·Cl, pH 8.0

20 mM EDTA, pH 8.0

1.4 M NaCl

Almacene a temperatura ambiente (estable varios años)

METODOLOGÍA

1. Las hojas serán cortadas en pequeños trozos ~1 cm² y se homogeneizarán en un mortero congelado. Transferir 100 mg a un microtubo de centrifuga.
2. Añadir 250 µl de buffer de extracción. Nota: se utiliza 1 ml de buffer de extracción por g de tejido de planta.
3. Macerar con un homogeneizador manual para microtubo y después añadir 25 µl de SDS al 20% y dar vortex por 30 segundos.
4. El microtubo se incubará por 30-60 minutos en un baño en seco de 55 a 65 °C, para la lisis celular. Mezclar ocasionalmente.
5. Centrifugar 5 min a 14,000 rpm y transferir el sobrenadante o capa superior a un microtubo nuevo.
6. Posteriormente añadir un volumen igual (aproximadamente 250 µl) de una solución de cloroformo:Isoamil alcohol (24:1), agitar por inversión 2 min, sin vortex,
7. Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos en una microcentrífuga.
8. Separar la fase acuosa en un microtubo nuevo y añadir 1/10 volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol frío, para precipitar el ADN.
9. Mezclar por inversión y colocar en el congelador por 60 min.
10. Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos y desechar el sobrenadante.
11. Lavar el botón o pellet de ADN dos veces con 1 ml de etanol al 70%. Mezcle por inversión y centrifugue en cada lavado 5 min a 14,000 rpm.
12. Deseche el sobrenadante y deje secar el botón al aire.
13. Hidratar el ADN con 50 µl de buffer TE o agua libre de ADNAsas.
14. Realizar PCR para la detección del gen *Cry* de la toxina *Bt*.

LITERATURA

1. Laboratory manual for biotechnology and laboratory science: the basics. Seidman, LA. 2011. Ed. Benjamin Cummings.
2. Biotechnology: applying the genetic revolution, Clark, David P. Ed. ELSEVIER, 2009. [clásico]
3. From Genes to Genomes: Concepts and Applications of ADN Technology. Dale, Jeremy; von Schantz, Malcolm; Plant, Nicholas. Wiley, 3a ed (2011).
4. Modern Industrial Microbiology and Biotechnology. Nduka Okafor. CRC Press, 1a ed (2007) [clásico]
5. Microbiology and Technology of Fermented Foods. Robert W. Hutkins. Wiley-Blackwell, 1a ed (2006) [clásico]
6. Plant Biotechnology and Agriculture: Prospects for the 21st Century. Altman, Arie; Hasegawa, Paul Michael. Academic Press, 1a ed (2011).
7. De la Biología molecular a la biotecnología. Paulina Balbás. México : Trillas, 2002. [clásico]
8. Short Protocols in Molecular Biology. Ausbel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E. et a l. (2000) Second Ed. Greene publishing Associates John Wiley and Sons.
9. Biotechnology A laboratory course. Becker, J.M., Caldwell G.A. and Zachgo, E.A. 1996. 2d. ed. Academic Press.
10. Laboratory exercises in Microbiology. Prescott, H. (2002).. 5th ed.
11. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Sambrook, J. and Russel D. W. (2001). Third Ed. Vol 1, 2 y 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press.