



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA
CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

GENÉTICA MOLECULAR Y CELULAR

MANUAL DE PRÁCTICAS



BIOLOGÍA: PLAN DE ESTUDIOS
2017-2

NOMBRE DEL PROFESOR: DRA.. AMELIA PORTILLO
LÓPEZ Y DR. CARLOS ALBERTO
FLORES LÓPEZ.

CONTENIDO

| No. de práctica | Nombre de la práctica | No. página |
|-----------------|---|------------|
| | REGLAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO | 3 |
| 1 | TINCIÓN FLUORESCENTE DE ADN | 5 |
| 2-3 | PREPARACIONES DE CÉLULAS COMPETENTES | 8 |
| 4-5 | PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO | 11 |
| 6 | TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS BACTERIANAS | 13 |
| 7 | OBSERVACIÓN DE CROMOSOMAS POLITÉNICOS | 15 |
| 8 | OBSERVACIÓN DE CORPÚSCULOS DE BARR | 18 |
| 9 | PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO BACTERIANO | 20 |
| 10 | AMPLIFICACIÓN DE ADN | 22 |
| 11 | ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA | 24 |
| 12-14 | VNTR DE HUMANO | 30 |
| 15 | PURIFICACIÓN DE ADN DE TEJIDO ANIMAL | 33 |
| 16 | TINCIÓN DE ADN | 35 |
| | LITERATURA | 36 |

REGLAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO



Localizar todos los equipos de seguridad como extinguidores, lavador de ojos, regaderas, etc.

Proteger los ojos si trabajará con reactivos corrosivos, peligrosos o con luz ultravioleta.

Usar bata de laboratorio, lo protegerá del material corrosivo o blanqueadores.

Nunca pipetee con la boca o pruebe algún reactivo.

No fumar, comer o beber en el laboratorio.

El pelo largo de preferencia recogerlo.

No usar sandalias con los pies descubiertos.

No colocar los libros o cuadernos en el área de trabajo.

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.

Videos complementarios:

Lab Techniques & Safety:

(https://www.youtube.com/watch?v=VRWRmIEHr3A&ab_channel=CrashCourse)

Equipo de protección personal adecuado:

(<https://www.jove.com/embed/player?id=10402&access=2q8rb7nvmo&t=1&chap=1&s=1&language=Spanish&fpv=1%22%20%3E%3Cp%3E%3Ca%20title=%22Proper%20Personal%20Protective%20Equipment%22%20href=%22https://www.jove.com/v/10402/proper-personal-protective-equipment>)

Almacenamiento de sustancias químicas: Categorías, riesgos y compatibilidades:

(<https://www.jove.com/embed/player?id=10380&access=is2pto6zdzq&t=1&chap=1&s=1&language=Spanish&fpv=1%22%20%3E%3Cp%3E%3Ca%20title=%22Chemical%20Storage:%20Categories,%20Hazards%20And%20Compatibilities%22%20href=>

<https://www.jove.com/v/10380/chemical-storage-categories-hazards-and-compatibilities>)

Manejo de derrames de sustancias químicas:

(<https://www.jove.com/embed/player?id=10371&access=pgqj4yv5f8&t=1&chap=1&s=1&language=Spanish&fpv=1%22%20%3E%3Cp%3E%3Ca%20title=%22Handling%20Chemical%20Spills%22%20href=%22https://www.jove.com/v/10371/handling-chemical-spills>)

Las estaciones de ducha y lavaojos de emergencia:

(<https://www.jove.com/embed/player?id=10373&access=50kjjv97px&t=1&chap=1&s=1&language=Spanish&fpv=1%22%20%3E%3Cp%3E%3Ca%20title=%22Emergency%20Eyewash%20and%20Shower%20Stations%22%20href=%22https://www.jove.com/v/10373/emergency-eyewash-and-shower-stations>)

Eliminación adecuada de residuos:

(<https://www.jove.com/embed/player?id=10403&access=2d0hbvs4ra&t=1&chap=1&s=1&language=Spanish&fpv=1%22%20%3E%3Cp%3E%3Ca%20title=%22Proper%20Waste%20Disposal>)

PRÁCTICA #1 TINCIÓN FLUORESCENTE DE ADN

INTRODUCCIÓN: A investigar por el estudiante.

OBJETIVO: Observar cromosomas por medio de tinciones y microscopio de fluorescencia para identificar sus diferentes estados de condensación con responsabilidad.

MATERIALES:

- Muestra células del cultivo de interés (cromosomas)
- ADN - Sonda (molécula fluorescente)
- Microscopio de fluorescencia
- Buffer de Hibridación
- Solución de montaje (DAPI + Antifade)
- 2XSSC
- Etanol 70, 90 y 100%
- Solución de enjuague (1 y 2)
- Solución contracolorante diluida en antifade
- Hidróxido de Sodio (NaOH 0.1 M disuelto en etanol 70%)
- Vórtex
- Centrífuga
- Tubos de PCR
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Micropipeta y puntillas
- Termoplato

2XSSC: Cloruro de Sodio (NaCl) 300 mM, Citrato de Sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 30 mM, ajustar a pH: 7 con Ácido Clorhídrico (HCl) 1N

NaOH: Hidróxido de Sodio 0.1 M disuelto en Etanol 70%

Enjuague 1: En un recipiente de por lo menos 100 mL, agregar 16 mL de 2XSSC, 64 mL de agua bidestilada y 0.240 ml de detergente no iónico

Enjuague 2: En un recipiente de por lo menos 100 mL, agregar 80 mL de 2XSSC y 0.080 mL de detergente no iónico

METODOLOGÍA:

Desnaturalización con Hidróxido de Sodio (NaOH)

1. Preparar la sonda a partir de su descongelamiento y homogeneizar en vórtice, después brevemente centrifugar.
2. Atemperar el buffer de hibridación y en un tubo de PCR agregar 7 μ L del buffer de hibridación y 1 μ L de la sonda 1, homogeneizar en vórtice, posteriormente, centrifugar brevemente.
3. Marcar al reverso del portaobjetos la región a hibridar (los 8 μ L previamente preparados hibridan una región de 22x22mm).
4. Colocar nuestro extendido celular de la muestra que se busque observar.
5. Colocar portaobjetos en una solución de NaOH 0.1M (en Etanol al 70%) a temperatura ambiente durante 6 minutos.
6. Con la ayuda de unas pinzas, extraer el portaobjetos y colocarlo en Etanol 70%, con un poco de agitación para detener la acción desnaturalizante del NaOH.
7. Deshidratar en Etanol al 70, 90 y 100% durante 2 minutos cada uno, posteriormente dejar secar totalmente y desnaturalizar la solución de sonda a 70°C durante 5 minutos con el apoyo del termoplato.
8. Una vez pasados los 5 minutos, colocar la solución de sonda en un recipiente con hielo unos segundos, posteriormente centrifugar brevemente y después colocar la sonda desnaturalizada en la región a hibridar en el portaobjetos y colocar un cubreobjetos.

Hibridación

1. Sellar con Parafilm®, colocar portaobjetos sobre una superficie de 71°C durante 4 minutos, después incubar durante 30 minutos a 45°C como mínimo o toda la noche a 37°C.
2. Previamente calentar la solución de enjuague 1 a 71°C y atemperar la solución de enjuague 2 junto con el contracolorante a utilizar.
3. Extraer el portaobjetos de la incubadora y quitar cuidadosamente la lámina de Parafilm®.
4. Sumergir portaobjetos en solución 2XSSC a temperatura ambiente hasta que el cubreobjetos logre desprenderse.
5. Sumergir el portaobjetos en el enjuague 1 durante 2 minutos, después sumergir en el enjuague 2 por lo menos 1 minuto.
6. Drenar el exceso de líquido y colocar una gota (aprox. 20 μ L) de contracolorante (con antifade) en la zona hibridada. Agregar el cubreobjetos y drenar el exceso de contracolorante presionando suave y uniformemente con papel absorbente.
7. Aplicar solución de montaje y observar en microscopio de fluorescencia.

CUESTIONARIO:

1. ¿Cuál es la finalidad de utilizar el NaOH?
2. Explica el razonamiento teórico y práctico de la técnica FISH.
3. ¿Para qué nos sirve utilizar la técnica FISH y qué se puede observar en el microscopio de fluorescencia?

PRÁCTICA #2-3 PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

INTRODUCCIÓN: a investigar por el estudiante.

OBJETIVO: preparar células competentes de *E. coli* mediante el uso de reactivos para realizar una transformación genética.

MATERIALES:

- Tubos de ensayo con tapa
- Matraz Erlenmeyer
- Espátula y papel para pesar
- Termoplato
- Pipeta 10 mL
- Asa bacteriológica
- Cepa de *E. coli* (proporcionada por el docente).
- Mechero de Bunsen
- Gradilla
- Papel aluminio
- Peptona de carne
- Vórtex
- Microtubos de centrifuga
- Espectrofotómetro
- Baño con hielo
- Micropipeta

REACTIVOS:

- CaCl_2
- Agua destilada
- Glicerol bacteriano

METODOLOGÍA:

Sesión 1: Preparación del cultivo para *E.coli*.

Preparación del caldo nutritivo

1. Colocar 8 gramos de peptona de carne en un litro de agua destilada matraz Erlenmeyer. Nota: preparar uno para todo el grupo.
2. Agitar y mezclar frecuentemente de forma mecánica.
3. Hervir hasta disolver por completo el medio.
4. Esterilizar la boca del tubo de ensayo en el fuego (Figura 1).
5. Vaciar 6 mL del medio de cultivo en los tubos de ensayo con tapa.
6. Meter los tubos de ensayo al autoclave para esterilizar a 121°C durante aproximadamente 15 minutos. Nota: poner papel aluminio cubriendo las tapas.

Procedimiento de inoculación

7. Para inocular el tubo con caldo nutritivo (Figura 1), esterilice el asa bacteriológica en el fuego, enfriar al aire y tomar una asada de la colonia bacteriana o caldo con bacteria y proceder a inocular. Nota: hacer todo cerca del mechero para mantener un radio estéril.
8. Si se quiere sembrar en un tubo inclinado proceda como lo anterior solo que estríe sobre el agar inclinado.
9. Incubar a 37°C por 24 hrs.

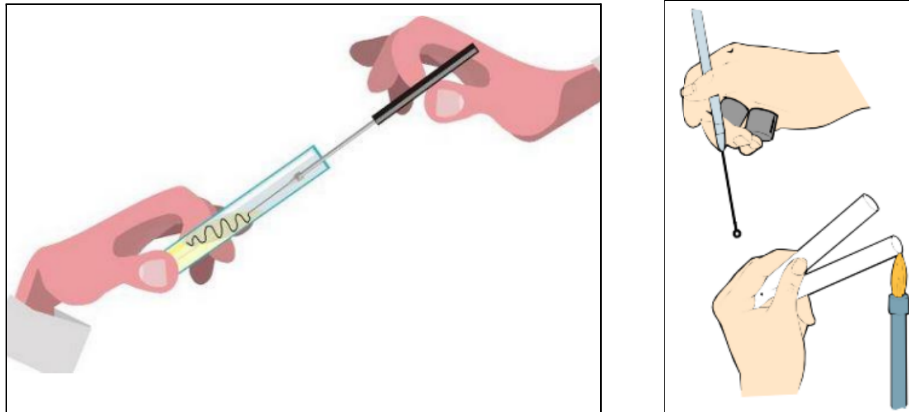


Figura 1. Inoculación del microorganismo en el tubo de ensayo (izquierda) y esterilización de los tubos de ensayo (derecha).

Sesión 2: Preparación de células competentes

1. Crecer las células hasta que la absorbancia a 600nm se encuentre entre 0.4-0.6.
2. Una vez que se tenga el cultivo bacteriano en los tubos de ensayo, centrifugue a 8000 rpm durante 5 minutos en tubos para centrifuga estériles.
3. Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 5 mL de CaCl₂ previamente enfriado en hielo.
4. Resuspender en vórtex. Nota: Las células se pueden mantener en hielo durante 10 minutos.
5. Una vez listo, 1.5 mL en 3 microtubos de centrifuga de 1.5 mL y centrifugar por 30 segundos en microcentrifuga.
6. Resuspender el sedimento en 0.5 mL de CaCl₂ previamente enfriado en hielo. Nota: No agitar con vórtex, hágalo manualmente.
7. Distribuir 50 µL de la solución del paso anterior en 10 microtubos de centrifuga de un solo uso, junto con 1.5 mL de glicerol bacteriano.
8. Congelar a -70°C para su almacenamiento.

CUESTIONARIO:

1. ¿Cuál es la finalidad de la preparación de células competentes?
2. ¿Qué nombre recibe el proceso natural de la pregunta anterior?
3. ¿Qué le ocurre a la célula durante el proceso de la preparación de una célula competente?

4. Explica brevemente cómo funcionan los métodos para la preparación de células competentes.

PRÁCTICA #4-5 PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

INTRODUCCIÓN: A investigar por el estudiante.

COMPETENCIA: Obtener ADN plasmídico y entender las bases del protocolo, además de su uso en Ingeniería genética.

MATERIALES:

- Cepa de *E. coli* con plásmido
- Microtubos de 1.5 o 1.7 ml
- Puntillas para micropipetas
- Solución # 1: 50 mM Glucosa (PM 180.16), 25 mM Tris-HCl (pH8.0) (121.14 PM), 10 mM EDTA (pH 8.0) (292.25 PM), 50 µg /ml enzima Rnase (100µg/ml). Guardar en refrigeración a 4°C si se le añadió la enzima.
- Solución # 2: 0.2N NaOH (40 PM), 1% SDS.
- Solución # 3: 29.4g KOAc (Acetato de Potasio), 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.
- Solución de lisosima (opcional) 50 mg/ml en la Sol #1 (usar una dilución de 1:10)
- Solución de Etanol al 70%
- Caldo LB (Luria Bertani): 5 gr Extracto de levadura, 10 gr Triptona, 10 g NaCl, 1 L de agua destilada.
- Ampicilina Stock: 60 mg/ml (guardar a -20 °C).

METODOLOGÍA:

1. Poner a crecer la cepa de *E.coli* con plásmido en 5 ml de cultivo LB (Luria Bertani) con ampicilina (1 µl del stock por ml de caldo) toda la noche.
2. Al siguiente día tomar 1 ml (con crecimiento, turbio) y colóquelo en un tubo eppendorf y centrifugar a 6,000 rpm por 10 min
3. Después resuspender el botón en 100 µl de Sol # 1
4. Añadir 200 µl de la Sol #2, mezclar por inversión, e incubar a temperatura ambiente por 10 min.
5. Añadir 150 µl de la Sol # 3 fría en hielo, mezclar por inversión e incubar en hielo por 10 min en hielo o congelador.
6. Centrifugar a 12000 rpm por 10 min a 4 °C o temperatura ambiente.
7. Transferir con la pipeta el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y añadir al sobrenadante 300 µl de Isoproponal o etanol absoluto, mezclar suavemente e incubar a temperatura ambiente por 2 a 5 min.
8. Centrifugar 12000 rpm por 5 min y decantar el sobrenadante y desecharlo.

9. Añadir al botón o precipitado 1 ml de Etanol al 70%, mezclar con vórtice.
10. Centrifugar igual al paso 8.
11. Escurrir y dejar secar a temperatura ambiente por 10 min y resuspender en 30 a 50 μ l de TE o agua libre de RNAsas y ADNAsas.

CUESTIONARIO:

1. ¿Para qué se utiliza cada reactivo en la metodología?
2. ¿Qué es un plásmido?
3. ¿Qué le confiere a una bacteria un plásmido?
4. ¿Existen plásmidos solo en bacterias en la naturaleza?
5. ¿Para qué se utilizan en ingeniería genética los plásmidos?
6. Esquematiza un plásmido comercial y cómo está ingenierizado.
7. ¿Qué debe contener un plásmido para ser utilizado en ingeniería genética?
8. ¿De qué tamaño son los plásmidos (pares de bases) y de qué tamaño es el genoma bacteriano?
9. ¿Pueden estar varios plásmidos al mismo tiempo en una célula bacteriana?
10. ¿Qué significa plásmidos unicopia y multicopia?
11. ¿Cómo se replican los plásmidos en una bacteria?
12. ¿Qué vectores se utilizan en Terapia Génica?

PRÁCTICA #6 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS BACTERIANAS

INTRODUCCIÓN: A investigar por el estudiante.

COMPETENCIA: Realizar una transformación química en células competentes de E.coli y entender su fundamento

MATERIALES:

- Células competentes (HB 101 K-12) (JM109 o TOP10F')
- Ampicilina stock, 60 mg/ml (mantener congelado)
- LB agar
- 3 cajas de petri
- 1 asa de vidrio
- 1 mechero
- 1 termoplato (por grupo)
- 1 agitador magnético (por grupo)
- 1 matraz de 1000 ml
- 1 matraz de 250 ml
- 1 probeta de 100 ml
- Caldo LB y agar LB
- Plásmido pGLO (green fluorescent protein, BIORAD)
- Micropipetas
- Puntillas (estériles)
- 1 cuba para hielo
- 2 eppendorf estériles
- Preparar 100 ml de caldo LB para todo el grupo

METODOLOGÍA:

1. Preparar 250 ml de LB agar: 5 gr Extracto de levadura, 10 gr Triptona, 10 gr NaCl, 15 gr de agar, 5 gr arabinosa, 1L de agua destilada, el caldo es lo mismo solo sin agar.
2. Esterilizar a 121°C y 15 lb de presión por 15 min. Esperar a que enfríe el agar a 55 °C y añadir la ampicilina stock (1 µl por ml de medio). NOTA: el caldo LB no lleva ampicilina.
3. Sacar un tubo de células competentes (50 µl) de -70°C, previamente preparado, colocar en hielo inmediatamente (las células dejarán de ser competentes al momento de adquirir la temperatura ambiental). Dejar disolver dentro del hielo.
4. Añadir 1-3 µl de ADN plasmídico (no más de 50 ng de ADN en un volumen no mayor a 10 µl o menos de preferencia a cada tubo de células competentes). Mezclar suavemente y dejar en hielo.
5. Incubar en hielo 30 min, mezclando cada 10-15 min.
6. Colocar el tubo eppendorf en un termoblock de 42°C y dejar 90 seg, sin

agitar.

7. Rápidamente regrese al hielo.
8. Añadir 800 μl de caldo LB previamente tibio a 37°C, incube por 30 a 45 min a 37°C con agitación.
9. Transfiera 50 a 200 μl a una caja con LB agar con antibiótico y otra sin antibiótico.
10. Disperse con una asa de vidrio y ponga a crecer por 16-18 hr a 37°C.
11. Al siguiente día cuantifique las colonias transformadas y calcule la eficiencia de transformación.

Determinar la cantidad de ADN plasmídico utilizado en la transformación (concentración calculada en la práctica de extracción de ADN plasmídico)

$\text{ADN } (\mu\text{g}) = [\text{ADN } \mu\text{g}/\mu\text{L}] \times (\text{volumen de ADN}/\mu\text{L} \text{ añadido a las células competentes})$

$\text{Fracción de ADN utilizado} = \frac{\text{Volumen puesto en la caja de Petri}}{\text{Volumen Total (células + caldo LB)}}$

$\text{ADN del plásmido } (\mu\text{g}) \text{ dispersado} = \text{Total de ADN usado} \times \text{Fracción de}$

$\text{ADN Eficiencia de transformación} = \frac{\text{No de colonias en la caja de Petri}}{\text{ADN del plásmido dispersado}}$

CUESTIONARIO:

1. ¿A qué se le denomina transformación?
2. ¿Cómo se usa la transformación en medicina?
3. ¿Cómo se usa la transformación en la agricultura?
4. ¿Por qué los plásmidos son considerados como buenos vectores?
5. ¿Cómo una bacteria puede desarrollar resistencia a antibióticos?
6. ¿Por qué encontró diferencias en el número de colonias de una caja con antibiótico y la que no tiene antibiótico?
7. ¿A qué se le denomina transfección?

PRÁCTICA #7 OBSERVACIÓN DE CROMOSOMAS POLITÉNICOS

INTRODUCCIÓN: Investigación por el estudiante

COMPETENCIA: Aislar, teñir y observar los cromosomas politénicos

MATERIALES:

- 1 microscopio Estereoscopio
- 1 microscopio óptico
- Larvas de *Drosophila*
- 1 estuche de disección con navajas
- 2 portaobjetos
- 2 cubreobjetos
- 1 mechero
- 2 pipeta Pasteur con bulbo
- 1 vidrio de reloj

Solución Ringers: 860 mg NaCl, 30 mg KCl, 35 mg CaCl₂, Disolver en 100 mL H₂O destilada. Almacene a 4 °C.

Aceto-orcein stain (filtrada y fresca): 2% colorante orceina (2 gr de colorante), en 45% HOAc (55 ml de agua destilada y 45 ml de ácido acético). Caliente para disolver, deje enfriar, filtre por papel Whatman #1.

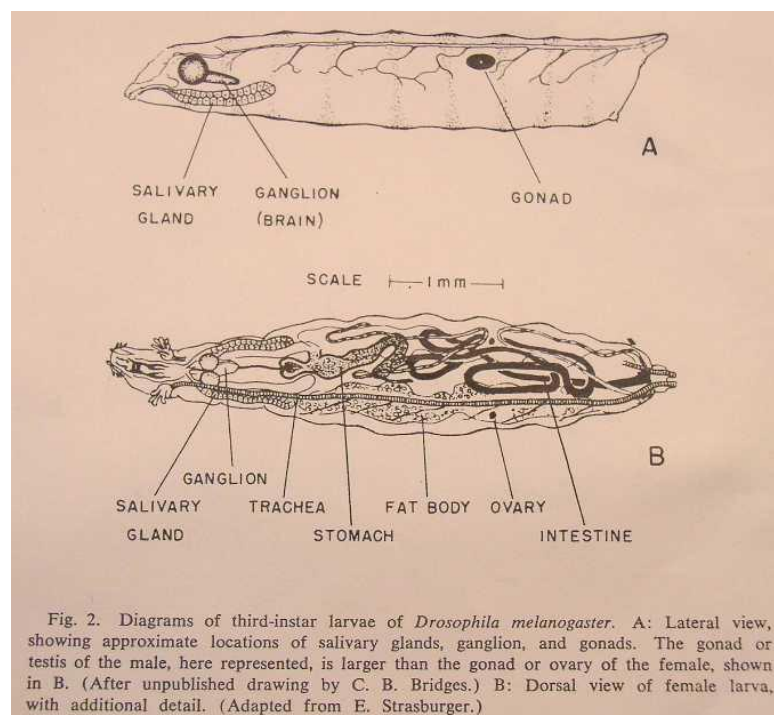


Figura 1.

METODOLOGÍA:

1. Tome una larva que contenga el tercer instar de un frasco de cultivo, (previamente hecho), puede rodarla hasta el extremo del frasco. Coloque una gota de la solución Ringer en un portaobjetos como se muestra en la figura. NOTA: observa que la región caudal es redonda y la cabeza es cónica (ver en Figura 1).
2. Localiza las glándulas salivales y otros órganos como el siguiente diagrama bajo el microscopio estereoscópico.
3. Aísle un par de glándulas salivares (ellas están adheridas cerca de la boca, transparente y en par). Presione todos los desechos hasta la orilla de la gota y remuévalo con una pipeta pasteur. Limpie las glándulas del material extra (grasa) usando una aguja de disección o tijerillas.
4. Fijar las glándulas en una solución de ácido acético al 45% de la siguiente forma: Remueva la mayoría de la solución Ringer de donde lavo las glándulas con una pipeta Pasteur y replácela con el ácido acético al 45%. Asegúrese de que están bien sumergidas. Quitar cualquier material extra que pueda estar presente. Deje por espacio de 5 minutos. Mientras tanto dibuje las glándulas
5. Remueva el ácido acético con una pipeta pasteur, deséchelo. Lave de nuevo con ac. Acético al 45% si hay partículas flotando. Tenga presente no dejar las glándulas secarse.
6. Teñir con aceto-orceína, cubra bien con el colorante las glándulas fijadas, asegúrese de que estén bien sumergidas en el colorante. Caliente suavemente sobre la flama, cuidado de no secar. Observe en el microscopio estereoscópico. Espere 20 minutos para que el núcleo se convierta a color oscuro.
7. Remover el colorante con lavados con ac. Acético al 45% de la siguiente forma: Cuando las glándulas se observen un poco teñidas, cuidadosamente remueva el exceso de colorante (manténgase pendiente de no perderlas). Coloque las glándulas en el centro del portaobjetos y con ácido acético 2x concentrado lave y remueva en cada lavado. No debe observarse colorante u otro material excepto las glándulas. Dejar las glándulas sumergidas en ac. Acético.
8. Cubra con un cubreobjetos: Con las glándulas en el centro del portaobjetos ponga sobre el portaobjetos papel blanco o Kleenex, presione con cuidado sobre la glándula. Observe una mancha roja formada sobre la glándula aplanada.
9. Squash los cromosomas: Sujetar el cubreobjetos en los bordes para evitar el movimiento, presione firmemente hacia abajo varias veces con una goma de lápiz sobre la glándula para aplastarla y aplanarla. En caso de que se extienda bien, examinar con alto seco para ver los cromosomas. Si se ven como bolas de hilo, es necesario difundir más.
10. **Examine bajo el microscopio** a (10x10) 100x en busca de

cromosomas bien distribuidos y en bandas. Cambie a (10x40) 400x, elija las mejores bandas. A 1000x, ilustra en tu libro. Tome una fotografía si es posible.

11. Para preservar la laminilla, selle las orillas del cubreobjetos con una capa de pintura transparente, deje secar completamente y etiquete: *Drosophila* cromosomas politénicos, fecha.

CUESTIONARIO:

1. ¿A que se le denomina cromosoma politénico?
2. ¿En qué fase de la meiosis se encuentran estos cromosomas?
3. ¿En qué organismos podemos encontrar este tipo de cromosomas?
4. ¿Qué función tienen estos cromosomas?

PRÁCTICA #8 OBSERVACIÓN DE CORPÚSCULOS DE BARR

INTRODUCCIÓN: Investigación por el estudiante

COMPETENCIA: Observar la evidencia citológica del cromosoma X inactivo en preparaciones de células de descamación de la mucosa oral.

MATERIALES:

- 2 hisopos de algodón o dacron estéril
- 2 portaobjetos
- 1 pizeta con etanol
- 1 pizeta con agua destilada
- 1 conito para agua
- HCl 6 N
- Colorante Wright
- Sol. amortiguadora de Fosfatos
- Aceite de inmersión
- Papel absorbente

METODOLOGÍA:

1. Lavar los portaobjetos con agua y jabón. Luego lavarlos con etanol 70%, y dejar secar.
2. (La persona donante de células epiteliales debe ser mujer) Enjuagar la boca con agua durante 10 segundos.
3. Frotar el interior de las mejillas usando un hisopo estéril, con movimientos rotatorios para impregnar todo el hisopo. Frotar en la superficie de un portaobjetos en forma rodante.
4. Colocar sobre las muestras unas gotas de HCl 6N. Retirar con agua destilada tras 5 segundos no añadirlo de forma directa.
5. Cubrir el portaobjetos con colorante Wright y esperar 2 minutos.
6. Agregar una porción igual de buffer de fosfatos y mezclar gentilmente, procurando no tirar mucho de la mezcla. Esperar 3 minutos.
7. Lavar con un chorro indirecto de agua destilada. Poner a escurrir y dejar secar.
8. Observar a 100x con aceite de inmersión.

CUESTIONARIO:

1. ¿En qué células se deben buscar los corpúsculos de Barr?
2. ¿En qué fase del ciclo celular son visibles los corpúsculos de Barr?
3. ¿Cuántos corpúsculos de Barr esperarías encontrar en los siguientes organismos: XX, XY, XXX, XO, XXXY, XXXX, XXY?
4. ¿En qué etapa del desarrollo se da la inactivación? ¿Por qué se les

denomina así?

5. ¿Qué gen está involucrado en la inactivación del cromosoma X?

PRÁCTICA #9 PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO BACTERIANO

INTRODUCCIÓN: A investigar por el estudiante.

COMPETENCIA: Practicar un protocolo de purificación y analizar el fundamento de la técnica

MATERIALES:

- TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)
- SDS (sodium dodecyl sulfate) al 10%
- 5 M de NaCl
- CTAB/NaCl solución (Disolver 4.1 gr de NaCl en 80 ml de agua destilada y despacio añada 10 gr de CTAB mientras mezcla con un agitador. Si es necesario caliente a 65°C, ajuste a 100 ml.
- Caldo LB (Luria Bertani): 5 gr Extracto de levadura, 10 gr Triptona, 10 gr NaCl, 1 L de agua destilada.
- 25:24:1 Fenol/cloroformo/isoamil alcohol
- Isopropanol
- Etanol a 70%

METODOLOGÍA:

1. Inocular 5 ml de caldo LB con la cepa bacteriana de interés, dejar crecer hasta que sobresature el medio (dejar crecer toda la noche)
2. Tomar 1.0 ml y colocarlos en un microtubo y centrifugar 5 min a 6000 rpm, decantar el sobrenadante
3. Resuspender el botón en 560 µl de TE buffer y mezclar con la puntilla
4. Añadir 30 µl de SDS al 10%, Mezclar por inversión.
5. Añadir 100 µl de NaCl 5 M y mezclar, NO vórtice
6. Añadir 80 µl de solución de CTAB/NaCl, mezclar (NO vórtice) e incubar 30 min a 65°C.
7. Añadir un volumen aproximadamente igual (0.7 ml) de 24:1 cloroformo/isoamilalcohol, mezclar vigorosamente 1 min y centrifugar 10 min en una microcentrífuga a máxima velocidad.
8. Remueva el sobrenadante o fase líquida, donde está el ADN a un tubo nuevo, evitando la capa blanca de interfase.
9. Añadir 60% del volumen de isopropanol grado reactivo y mezclar por inversión, observará un precipitado blanco, dejar 5 min y después centrifugar 5 min a máxima velocidad y después decantar el sobrenadante.
10. Al precipitado o botón de ADN añadir 1 ml de etanol al 70%, mezclar con vórtice y después centrifugar 5 min a máxima velocidad, decantar el sobrenadante y escurrir sobre papel secante, dejar secar 5 min y resuspender el botón o precipitado en 50 µl de agua libre de ADNAsas o TE buffer.

11. Almacenar a -20°C .
12. Calcular la concentración en espectrofotómetro. Colocar 1 ml de agua destilada en la celda de cuarzo y añadir 5 μL de su muestra, leer a 260 y 280 nm. NOTA: 50 μg de ADN tiene una absorbancia de 1 a 260 nm. La pureza del ADN tiene una relación $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280} > 1.8$ con respecto a la lectura de proteínas a 280 nm.

CUESTIONARIO:

1. ¿Cómo es el ADN bacteriano? Descríbalo o dibújelo y explique cómo se duplica.
2. ¿Para qué sirve cada uno de los reactivos utilizados en la purificación del ADN?
3. Describa en qué consiste la técnica de PCR y para qué sirven los reactivos que se utilizan.
4. ¿Por qué se utiliza la longitud de onda de 260 nm y la de 280 nm?, explique

PRÁCTICA #10 AMPLIFICACIÓN DE ADN

INTRODUCCIÓN: Uno de los avances más espectaculares en el campo de biología molecular es la “reacción en cadena de la polimerasa” (PCR), creada y desarrollada por el Dr. Kary Mullis. Actualmente la PCR se aplica en diferentes áreas de las ciencias biológicas y de la salud, en donde forma parte de los laboratorios de investigación y estos la utilizan principalmente para expresión génica, genotificación, detección de patógenos y análisis de mutaciones (Tamay, *et al*, 2013).

La reacción en cadena de la polimerasa es un método enzimático *in vitro* que permite la amplificación de una secuencia específica del ADN (Pedrosa, 1999), y por ende su función es obtener muchas copias de un fragmento de ADN mediante una catálisis llevada a cabo por una enzima llamada ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN, de esta forma las cantidades pequeñas de ADN pueden ser sintetizadas y copiadas para analizarse. Cuando usamos como sustrato ADN genómico, hablamos de una PCR, sin embargo cuando usamos ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se trata de una RT-PCR (Reverse Transcription-PCR). Esta última está controlada por una enzima transcriptasa reversa, que tiene la capacidad de convertir el ARNm en una molécula de ADNc; dicho método fue copiado de los retrovirus que usan una transcriptasa reversa para convertir su genoma de ARN en ADN y así duplicarse en millones de partículas virales (Tamay, *et al*, 2013).

Para que la PCR se lleve a cabo es necesario tener lo siguiente: deoxinucleótidos para proporcionar energía y nucleósidos para la síntesis de ADN, ADN polimerasa, ADN molde y buffer con magnesio. Para realizar la amplificación es necesario obtener información de la secuencia de ADN y con base a eso diseñar los dos primers que son específicos para la secuencia del ADN. Por consiguiente, la PCR consiste en una serie de ciclos constituidos por 3 etapas principales: desnaturalización, alineamiento y elongación (Gutiérrez, 2006). La primera fase consiste en desnaturalizar las dos cadenas de ADN a amplificar, mediante calentamiento a una temperatura de 95°C durante 20-30 segundos (el tiempo depende de la secuencia del templado, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper los tres enlaces), el resultado final serán las cadenas separadas que servirán como templado para el alineamiento. La siguiente etapa es el alineamiento, en donde los primers se alinean al extremo 3' del templado, después hibridan dos oligonucleótidos cebadores diseñados para que sean complementarios a los extremos de la región que se quiere amplificar. La temperatura de hibridación o melting (T_m) debe ser entre 50-60°C para que se forme el complejo templado-primers; si la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente. Finalmente, en la elongación se utiliza la Taq polimerasa en donde actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su

función catalítica a una velocidad muy rápida, agrega de NTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN, la extensión de cada cadena es en dirección de la síntesis del ADN (5' a 3'), normalmente la reacción dura un minuto a una temperatura de 72°C (la enzima es funcional en esta temperatura), el resultado de esta etapa serán los amplicones ya formados con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb). Cada ciclo puede realizarse en 3 minutos, por lo que 20 ciclos pueden completarse en una hora (Oliva, *et al*, 2008; Tamay, *et al*, 2013).

COMPETENCIA: Categorizar las alteraciones genéticas como generadoras de cambios en los seres vivos, mediante el análisis molecular de cada anomalía para identificar aquellas que son desfavorables al ser humano y aquellas que son explotadas a nivel biotecnológico de una forma responsable bajo las normas bioéticas.

METODOLOGÍA:

1. Limpiar con etanol al 70% el área de trabajo
2. Rotular los tubos de PCR estéril que les proporcione el profesor
3. Se realizaran reacciones de 15 microlitros en total
NOTA: Asegurarse de preguntarle al profesor dará instrucciones de las cantidades que se requerirán de cada reactivo para la PCR. De igual forma se utilizaran los primers universales para invertebrados, que amplifican un pedazo de ~700 pares de bases del citocromo oxidasa 1. (Cebadores: LCO1490: 5'-ggtcaacaaatcataaagatattg-3', HCO2198: 5'-taaacttcagggtgaccaaataatca-3'). Los cebadores amplifican a una temperatura de 40 grados Celsius.
4. A cada tubo de PCR añadir la cantidad de 1.5 microlitros del buffer (NOTA: siempre mantener el buffer en frío), seguido de 0.75 microlitros de cada cebador (NOTA: por lo general siempre se trabaja con una concentración de cebadores a 10 mM), 0.3 microlitros de dNTPs, 0.45 microlitros de magnesio (en caso de que se use un buffer que no tenga el magnesio), 0.06 microlitros de Taq polimerasa, 9.69 microlitros de agua ultra pura de grado molecular, y 1.5 microlitros de sus muestras de ADN.
5. Una vez se tengan los tubos con todos los reactivos, se procederá a llevar los tubos a la termocicladora del laboratorio de Biología molecular.
6. Anotar en la bitácora, los pasos que se programaron en la termocicladora.

PRÁCTICA #11 ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA

INTRODUCCIÓN: Una importante herramienta en la biología molecular con la que se puede caracterizar, identificar, y aislar ADN o ARN; es la electroforesis en gel de agarosa, la cual tiene como fin separar moléculas de ácidos nucleicos. Dicha tecnología tiene el fin de separar y visualizar moléculas de ADN. Lo que a su vez nos permite evaluar de manera cualitativa la calidad y cantidad de ADN en una muestra particular. Por calidad nos referimos al tamaño de ADN en tu muestra. Debido a que la calidad del ADN va a jugar un papel vital en la capacidad de amplificar (i.e. vía PCR) regiones específicas de tu template de ADN. Por lo que se sugeriría que siempre que se realiza una extracción de ADN, se evalúe la calidad, cantidad y pureza de la misma. Dependiendo del uso que se le vaya a dar al ADN extraído dependerá el criterio de cada una de estas 3 características. En este laboratorio vamos a estar enfocados solamente en evaluar la calidad del ADN. Por lo tanto, al realizar una electroforesis de agarosa con el ADN que se extrajo en el laboratorio anterior, cada equipo podrá evaluar la calidad de su ADN y determinar si la calidad es la suficiente para poder realizar una amplificación vía PCR.

En cuanto al gel como tal utilizado en una electroforesis, este tiene un comportamiento de tamiz molecular, ya que permite separar las moléculas de ADN en función de tres características: 1) su carga eléctrica; 2) su forma; y 3) su tamaño. En cuanto a la carga eléctrica, dado que el ADN tiene una carga negativa (ver pregunta #1), podemos utilizar esta propiedad inherente del ADN a nuestro favor. Ya que al ser todas negativas, en principio todas deberían de ser atraídas a una misma dirección, al utilizar una corriente eléctrica. Que en este caso, sería una atracción al polo opuesto (i.e. las moléculas de ADN al estar cargadas negativamente siempre serán atraídas hacia el polo positivo “ánodo”). Mientras que en lo que se refiere al punto 2 (separación basado en la forma) esta característica no será tomada en cuenta en la electroforesis de ADN, esto debido al hecho de que independientemente de la secuencia del ADN, sabemos que esta molécula tiene la propiedad de estar conformado por dos hélices de ADN, siempre en la misma conformación independientemente de la secuencia. Por lo que una electroforesis de ADN solamente separará ADN basado en el número de pares de bases que contenga (i.e. tamaño).

COMPETENCIA: Discriminar la organización molecular del contenido genético del núcleo celular mediante el análisis de la información científica existente y de ejercicios y prácticas de laboratorio para determinar su importancia y aplicación en diferentes áreas de las ciencias naturales con un sentido crítico y trabajo en equipo.

MATERIALES: (todo el material será provisto por el profesor, a excepción de las micropipetas, papel parafilm y guantes de látex o nitrilo)

- Agarosa (provista por el profesor)

- Balanza analítica
- Buffer TAE al 1X
- Matraz de 100-200 mL
- Microondas
- Guantes para objetos calientes
- Tinte para geles (i.e. bromuro de etidio o sybr safe)
- Molde para hacer geles (molde y peine para pocillos)
- Cámara de electroforesis
- 1 Micropipeta por equipo (1-10 o 2-20 microlitros)
- Puntillas apropiadas estériles
- Fuente de poder
- Muestra de ADN a evaluar (se utilizara el ADN extraído en el laboratorio anterior)
- Transiluminador
- Buffer de carga (“loading buffer”)
- Pedazo muy pequeño de papel parafilm
- Master mix para PCR
- Primers
- Termocicladora

METODOLOGÍA PCR:

1. Utilizar la mezcla de PCR 2x proporcionada por el maestro
2. Primers del gen 16S ARN:
3. (10 μ M) sentido: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG,
4. (10 μ M) antisentido: ACGGTTACCTTGTTACGACTT
5. Preparar una Rx de 12 μ L: 6 μ L de master mix, 1 μ L de primer sentido, 1 μ L de primer antisentido, 2 μ L de ADN, 2 μ L de agua para PCR.
6. Correr la Rx a 58 grados, 30 ciclos.

METODOLOGÍA ELECTROFORESIS:

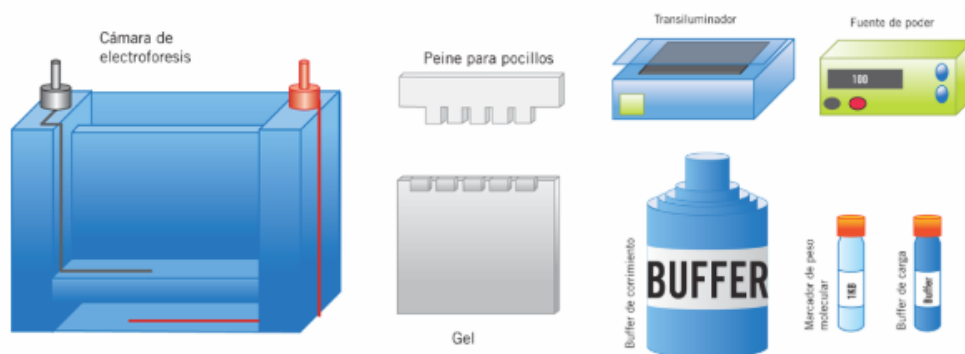


Figura 1. Equipo básico utilizado en una electroforesis

1. Calcular las cantidades de agarosa (se hará un gel al 1% de agarosa) y el buffer para preparar el gel dependiendo sus concentraciones con una regla de 3.
2. Pesar la agarosa deseada en la balanza analítica (tarar báscula con papel para pesar, etc.). En este caso se hará un gel de 50mL al 1% de agarosa, por lo que se debe de usar 0.5 gramos de agarosa y aforar a 50mL con el buffer TAE al 1X.
3. Mezclar la agarosa con el buffer (TAE) en un matraz de manera vigorosa para mayor disolución por parte de la agarosa. NOTA: en algunos casos se puede utilizar agitador magnético o mosca de preferencia, pero en este laboratorio no será necesario. (No dejar grumos de agarosa porque podrían estropear el paso o desplazamiento de las proteínas del ADN).
4. Colocar el matraz con la mezcla en un microondas y calentarlo unos segundos (el tiempo depende de la intensidad del microondas y la cantidad de gel preparado). En este caso debido al microondas con el que se cuenta y la cantidad de gel preparado (50 mL), se recomienda calentarlo 50 segundos. Sin embargo, es muy importante estar monitoreando en todo momento dicho calentamiento, dado que se debe de evitar que el líquido ebulle y se tire por fuera del matraz dentro del microondas. Por lo que uno debe de estar con uno de los guantes para objetos calientes puesto (solamente en una mano), mientras que la otra mano se tendrá solamente un guante de nitrilo o látex, con el fin de poder controlar el microondas y apagarlo inmediatamente después de que ebulle.
5. Sacar el matraz del microondas utilizando el guante para objetos calientes y mezclarlo en forma giratoria. Se debe revisar que no se sigan viendo pedazos de agarosa sin disolver. En caso de que se sigan observando pedazos sin disolver se procederá a repetir el paso 4 (solo que esta vez solamente se requerirá prender el microondas 10-15 segundos) y volver a hacer el paso 5. Se repetirán estos dos pasos hasta que ya no se pueda observar agarosa (en mi experiencia, son 3-4 repeticiones).
6. Dejar el matraz con el líquido caliente a temperatura ambiente, sobre una mesa segura, en donde no haya riesgo de que alguien lo tire.
7. Una vez el líquido llegue a una temperatura aproximada de 50-55°C se procederá a añadir 3 microlitros del tinte de gel. Esto obviamente se hará con el uso de las micropipetas y las puntillas estériles.
8. Una vez añadido el tinte, se mezclará el líquido como se hizo en el paso 5.
9. Verter la mezcla al molde para gel (ver Figura 2) y asegurarse de poner la peiqueta que generará los pozillos (ver Figura 2).
10. Asegurarse de que no se formen burbujas dentro del gel
11. Dejar que se solidifique el gel.

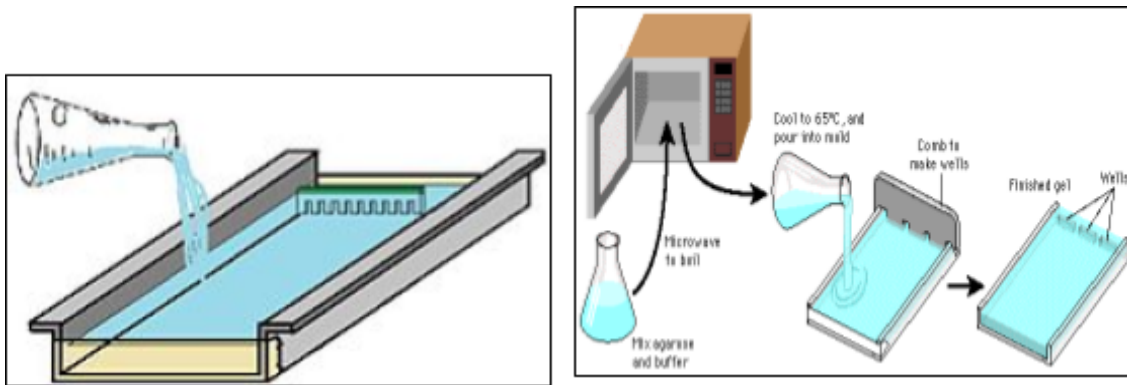


Figura 2. Protocolo de elaboración del gel de agarosa

12. Una vez que el gel haya solidificado (será obvio a simple vista, por el cambio de color del mismo) se retirará con mucho cuidado la peineta.
13. Colocar el gel sólido (con todo y base del molde) en la cámara de electroforesis, de tal forma que los pozos queden del lado del cátodo (lado negativo). Ver figura 3.

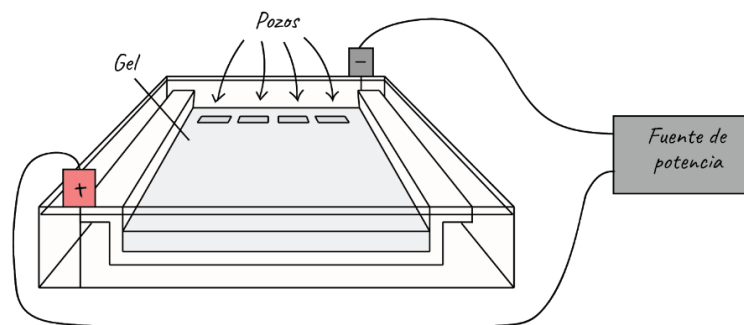


Figura 3. Colocación del gel de agarosa en la cámara de electroforesis.

14. Rellenar la cámara con el buffer TAE (1X) hasta donde se indica la marca del nivel de la cámara, con el fin de permitir que las cargas eléctricas viajen sin afectar pH del medio.
15. Mezclar 10 microlitros de su muestra de ADN con 1 microlitro de buffer de carga. Esta mezcla se realizará sobre un pedazo de papel parafilm. (NOTA: el buffer de carga tiene la función de permitir que la muestra de ADN se vaya al fondo de cada pozillo).
16. Es muy importante que el paso 15 se haga con mucho cuidado, ya que pueden ocurrir dos cosas: 1) si se sueltan los 11 microlitros en el pozillo de forma muy brusca y rápida, puede salirse del pozillo; 2) si con la puntilla de cada micropipeta por error rompen el fondo del pozillo, el mismo ya podrá retener la muestra de ADN dentro del pozillo.

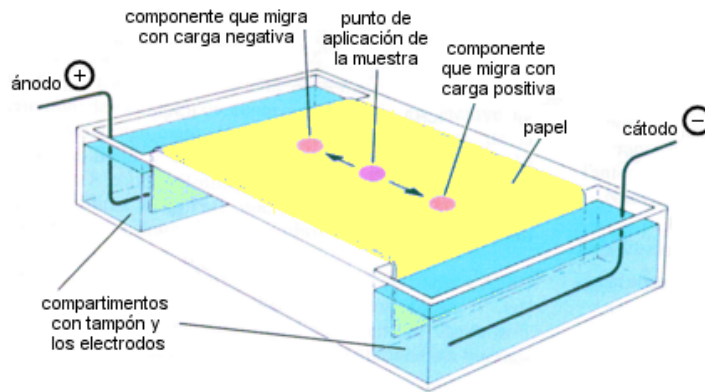
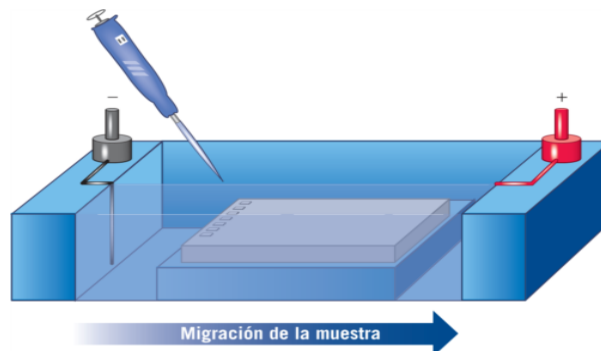


Figura 4. Llenado de buffer en cámara de electroforesis.

17. Asegurarse de dejar un pozillo libre para que el profesor pueda poner la escalera de ADN.



Fuente: Adriana María Salazar Montes, Ana Soledad Sandoval Rodríguez, Juan Socorro Armendáriz Borunda: *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*, 2e: www.accessmedicina.com
Derechos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.

Figura 5. Llenado de muestras de ADN en gel de agarosa

18. Una vez todas las muestras estén puestas en los pozillos respectivos se podrá cerrar la cámara poniéndole la tapa. Insertar los cables en la fuente de poder.
19. Prender la fuente de poder a unos 50 mV.
20. Asegurarse que estén saliendo burbujas del cátodo y ánodo (la presencia de burbujas es evidencia de que la corriente eléctrica está fluyendo).
21. Esperar a que se observe que las muestras han corrido suficiente tiempo a través del gel (esto se hace usando los marcadores del buffer de carga como testigos).
22. Una vez ha corrido suficiente el gel, se procederá a apagar la fuente de poder.
23. Desconectar los cables de la fuente de poder.
24. Quitar la tapa de la cámara.
25. Remover el gel (con todo y base del molde) de la cámara de electroforesis.
26. En caso de no contar con suficiente tiempo para revisar el gel en el transiluminador. El gel se podrá poner en un recipiente (asegurándose que no

le dé la luz, e.g. envuelto en papel aluminio) y dejar en refrigeración (e.g. 4 grados Celsius). Podrá revisarse a lo máximo 2 días después de haberse corrido.

27. En caso de que sí se pueda revisar el resultado, se procederá inmediatamente a poner el gel sobre el fotodocumentador.
28. Una vez prendido el fotodocumentador y asegurada la posición correcta del gel sobre el mismo se procederá a prender la luz ultravioleta.
29. Tomar foto de gel y añadir la misma a la bitácora.
30. Proceder a analizar resultados y escribir la discusión en su bitácora.
31. Verter el buffer TAE usado al contenedor adecuado.
32. Enjuagar la cámara de electroforesis.
33. Dejar secar la cámara.
34. Limpiar la mesa de trabajo.

CUESTIONARIO:

1. ¿Cuál es la razón por la cual el ADN está cargado negativamente?
2. Averiguar qué es una escalera de ADN, y su uso en un gel de electroforesis.
3. Tomar la información de la escalera que se está utilizando en este laboratorio e investigar el patrón de bandeo que genera (se tendrá que buscar esta información en internet). Incluir en la bitácora una foto de dicho patrón.
4. Averiguar qué otro tipo de material se utiliza para crear geles para una electroforesis.
5. De acuerdo a la pregunta #4, averiguar las ventajas de ese otro material, es decir, en qué circunstancias conviene usar agar y que otras conviene usar otro material.
6. Averiguar de qué depende el voltaje que se determine usar en una electroforesis.
7. ¿Por qué es necesario usar un tinte (e.g. bromuro de etidio)?
8. ¿Por qué es necesario usar luz ultravioleta?
9. ¿Cuál es la ventaja de usar "sybr safe" vs "bromuro de etidio"?
10. Averiguar sobre las distintas concentraciones que se pueden usar con un gel de agarosa y describir las ventajas y desventajas de cada porcentaje (e.g. cuando es mejor utilizar un gel de agarosa al 1.5% o al 2% versus uno al 1%).

PRÁCTICA #12-14 VNTR DE HUMANO

INTRODUCCIÓN: a investigar por el estudiante

COMPETENCIA: Extraer ADN de células humanas y obtener un secuencia repetida del genoma humano a fin de entender su utilidad en los análisis de paternidad y medicina forense, entre otros usos.

MATERIALES:

- 2 microtubos eppendorf por persona
- Puntillas de 1-10, 10-100 y 100-1000 microlitros
- Micropipetas de 1-10, 10-100 y 100-1000 microlitros
- Fenol/Cloroformo/Isoamil alcohol
- Buffer de Lisis: 100 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8.0, 10 mM Tris pH 8.0
- SDS (sodium docedyl sulfate o lauryl sulfate) a 20%
- Parafilm
- PBS buffer: 8.0 gr NaCl, 0.2g KCl, 1.15 gr Na₂HPO₄·7H₂O, 0.2 gr KH₂PO₄, Aforar 1L H₂O
- TE buffer, pH 8.0: 10mM Tris, 1mM EDTA
- Agua libre de ADNsas
- Tubos de PCR
- Mezcla de PCR
- Agarosa
- Buffer TAE (1X): 4.84 gr TRIS, 1.14 ml Ac. Acético, 2 ml EDTA 0.5M pH 8.0

METODOLOGÍA:

SECCIÓN I: LISIS CELULAR

1. Colocar en un microtubo 500 µL de TE.
2. Con un hisopo de algodón tomar células epiteliales de la boca.
3. Resuspender las células que trae consigo el hisopo en el microtubo del paso 1).
4. Centrifugar el microtubo a 12,000 rpm 1 minuto y decantar el sobrenadante.
5. Añadir 250 µL de buffer de lisis al botón de células y resuspenderlas.
6. Añadir 5 µL de proteinasa K o 10 µL de papaína y agitar suavemente.
7. Incubar 1 hr en el termoblock a 55°C ó 37°C.
8. Añadir 50 µL de SDS al 20%.
9. Incubar a 100°C por 10 min en un termoblock.

SECCIÓN II: EXTRACCIÓN DE ADN

1. Añadir 300 µL de la mezcla: FENOL/CLOROFORMO/ISOAMILALCOHOL dar vórtice por unos 2 minutos y centrifugar 10 min a 14,000 rpm. VACIAR EL CONTENIDO DEL CLOROFORMO Y MEZCLA DE FENOL EN UN FRASCO

ETIQUETADO CON DESECHOS DE FENOL.

- Transferir aproximadamente 300 µL del sobrenadante o capa superior a un tubo nuevo, evitar la interfase blanca y agregar al sobrenadante 9 µL de NaCl 5M
- Agregar 168 µL de Isopropanol o Etanol al 100% frío, mezclar por inversión y dejar de 1-3 min.
- Centrifugar 5 min a 12,000 rpm, después decantar el sobrenadante y escurrir sobre papel secante.
- Secar a temperatura ambiente 5-10 min y resuspender el botón en 25 µL de agua libre de ADNsas.
- Leer en un espectrofotómetro a 260 y 280 nm (ADN puro tiene una relación Abs260/Abs280 > 1.8).
- Almacenar a -20° C.

SECCIÓN III: PCR-VNTR

En hielo descongelar los reactivos, mezclar, centrifugar y dejar en hielo.

- Preparar una mezcla de PCR para todo el equipo,
- Mezclar y cerrar el tubo y colocar en el termociclador.

PROGRAMACIÓN DEL TERMOCICLADOR

1 ciclo de: 94 °C 5 min

30 ciclos de:

94 °C 1 min

63 °C 1 min

72 °C 1 min

Extensión final 72 °C 1 ciclo de 10 min

20 °C 10 min

- Observar el producto de PCR en un gel de acrilamida.

| Nombre del reactivo | Reacción de 6 µL | Calcular por el número de equipos |
|---|------------------|-----------------------------------|
| Master Mix 2X | 3 | |
| Agua para PCR | 0 | |
| (Forward 68°C) 10 pmol/µL cebador sentido | 0.25 µL | |
| (Reverse 70°C) 10 pmol/µL cebador antisentido | 0.25 µL | |
| ADN (30-50 ng/µL) | 2.5 µL | |

CUESTIONARIO:

- ¿Qué es un marcador molecular?

2. Explique que son los microsatélites y VNTR
3. Poner la secuencia de bases del ADN del VNTR analizado en esta práctica
4. ¿De cuántas pares de bases es el VNTR amplificado?
5. ¿Para qué se utilizan los microsatélites?
6. ¿Qué genes se utilizan en el código de barras de los animales?
7. ¿Qué genes se utilizan en el código de barras de las plantas?

PRÁCTICA #15 PURIFICACIÓN DE ADN DE TEJIDO ANIMAL

INTRODUCCIÓN: a investigar por el estudiante.

OBJETIVO: Practicar una metodología de purificación de ADN con reactivos y materiales para posteriormente utilizarlas en otras aplicaciones como PCR, con responsabilidad.

MATERIALES:

- Etanol al 96-100%
- Muestra de ADN (tejido de animal)
- Buffer de digestión
- Buffer de elución
- Congelador (-20°C)
- Baño de agua (incubadora)
- Buffer de lisis/ligamiento
- Proteinasa K
- ARNasa A
- Tubo de colecta y columna
- Centrífuga
- Micropipetas y puntillas
- Pistilo
- Buffer de lavado 1 y 2
- Microtubos de centrifuga

METODOLOGÍA:

Sección 1: Lisado de tejido animal.

1. Preparar incubadora o baño de agua a 55°C.
2. Colocar el tejido animal en un microtubo de centrifuga estéril:
 - ≤25 mg de tejido animal
 - ≤10 mg de tejido del bazo
3. Añadir 180 µL de PureLink® Genomic Buffer de Digestión y utilizar el pistilo para triturar completamente el tejido, después, agregar 20 µL de Proteinasa K (asegurarse que el tejido esté completamente inmerso en la mezcla).
4. Incubar a 55 °C con vórtice ocasional hasta que la lisis se complete durante 1-4 horas.
5. Centrifugar el lisado a máxima velocidad durante tres minutos a temperatura ambiente para remover partículas no deseadas. Transferir el sobrenadante a otro microtubo de centrifuga estéril sin tomar el pellet.
6. Añadir 20 µL de ARNasa A al lisado, aplicar vórtice durante 2-3 segundos e incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.

7. Agregar 200 μL de PureLink® Genomic Lisis/ligamiento y mezclar con vórtice durante 3 segundos.
8. Agregar 200 μL de Etanol al 96-100% y realizar un vórtice de 5 segundos.

Sección 2: Ligamiento de ADN

1. Inmediatamente, añadir el lisado de aproximadamente 640 μL a una columna con su tubo de colecta y centrifugar a 10,000 x g durante un minuto a temperatura ambiente.
2. Descartar tubo de colecta y colocar otro tubo de colecta estéril.

Sección 3: Lavado de ADN

1. Añadir 500 μL Buffer de lavado 1 a la columna.
2. Centrifugar columna a temperatura ambiente a 10,000 x g durante un minuto.
3. Descartar tubo de colecta y colocar columna en un tubo de colecta nuevo y estéril.
4. Agregar 500 μL Buffer de lavado 2 a la columna.
5. Centrifugar la columna a máxima velocidad durante tres minutos en temperatura ambiente, descartar tubo de colecta.

Sección 4: Elución de ADN

1. Colocar columna en microtubo de centrifuga estéril de 1.5-mL.
2. Añadir 25–200 μL de PureLink® Genomic Buffer de elución a la columna (colocar reactivo directamente en el filtro de la columna).
3. Incubar durante un minuto a temperatura ambiente y centrifugar columna a máxima velocidad durante un minuto a temperatura ambiente.

Sección 5: Calidad y pureza de ADN

1. Abrir software NanoDrop.
2. Colocar 1.5 μL de agua ultra pura en el espectrofotómetro para calibrar.
3. Colocar 1.5 μL de Buffer de elución para tarar el software. Presionar “Blank”.
4. Colocar las muestras de ADN purificado (1.5 μL), limpiando con un pañuelo entre muestra y muestra. Presionar “Measure”. Nota: anotar la concentración del ADN (ng/ μL), los valores 260/280 y 260/230.

Sección 6: Almacenamiento de ADN

1. Depositar ADN purificado en congelador -20°C para su uso futuro.

CUESTIONARIO:

1. ¿Qué indican los valores 260/280 y 260/230?
2. Explica brevemente el funcionamiento de todos los buffers utilizados en la práctica.
3. ¿Cuál es la importancia de la purificación del ADN?
4. ¿Qué pruebas pueden realizarse posterior a una purificación?

PRÁCTICA #16 TINCIÓN DE ADN

INTRODUCCIÓN: A investigar por el estudiante.

COMPETENCIA: Realizar una estandarización de tinción de cromosomas con reactivos y equipos para demostrar poliploidía en plantas con responsabilidad.

MATERIALES:

- Portaobjetos (con células fijadas previamente en etapa de metafase)
- Cubreobjetos
- Solución de GIEMSA como método de tinción
- Microscopio óptico
- Pinzas
- Papel absorbente
- Agua destilada
- Micropipeta
- Microtubos
- Muestra celular

METODOLOGÍA:

1. Tomar muestra celular de interés.
2. Colocar 10 gotas de la solución de GIEMSA sobre la superficie del portaobjetos en la que se encuentran las células fijadas. Mover de manera circular agitando hasta que la solución cubra la muestra biológica.
3. Incubar por 15 minutos a 37°C.
4. Eliminar tinción sobrante con la micropipeta y sumergir el portaobjetos en agua destilada durante 30 segundos.
5. Secar a temperatura ambiente ambiente durante 5-10 minutos y eliminar el exceso de agua destilada en el portaobjetos.
6. Añadir 1-2 gotas de medio de montaje a las células teñidas.
7. Colocar cubreobjetos en el medio de montaje. Con el apoyo de un microscopio, visualizar los cromosomas en objetivo 10X, 40X y 100X (utilizar aceite de inmersión para el último objetivo)

CUESTIONARIO:

1. ¿Cuántos cromosomas se encuentran dentro de cada célula humana?
2. ¿Cual es la función de la solución de GIEMSA?
3. Dibuja y señala los tipos de cromosomas, sus partes y características.

LITERATURA

- Ausbel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E. et al. (2002) Short Protocols in Molecular Biology. Second Ed. Greene publishing Associates John Wiley and Sons.
- iGENETICS A Molecular Approach. 3ra Edición. Editorial PEARSON. 2010.
- Martin, E., Macarena, M., Moreno, H., Silenzi, G. & Bonano, M. (2017). Comparación de métodos de extracción de ADN para el género *Astylus* (Coleoptera: Melyridae). *Acta zoologica Lilloana* 61. (1): 55-64, Junio 2017
<https://www.researchgate.net/publication/319681991/download>
- Mertens, Thomas Robert, 2007. Genetics : laboratory investigations.
- Oliva, R.; Ballesta, F.; Oriola, J. y J. Clària. (2008). Genética médica. Edicions Universitat de Barcelona. España. 446 pp.
- Padilla, C., Diez, J., Martínez, E., Bárcena, J., & García, C. (2006). Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa.
- Preparación de Geles de Agarosa para Electroforesis. Standard Operating Procedures (SOPs). Laboratorio de Genómica Viral y Humana. Facultad de Medicina UASLP
http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Mol_GelAgarosa.pdf
- Sambrook, J. and Russel D. W. (2001) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Third Ed. Vol 1, 2 y 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Tamay, L.; Ibarra, C. y C. Velasquillo. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Medigraphic* 2 (2): 70-78.
- Valdelamar, L. M. M., Díaz, A. S., & Flores, R. C. Secuenciación de fragmentos de ADN. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/secuenciacion.pdf>
- Velázquez, L. P. A., Martínez, M. D. C. A., & Romero, A. C. (2014). Extracción y purificación de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 1.
<http://www.publicaciones.inecc.gob.mx/libros/710/extraccion.pdf>