



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

GENETICA MOLECULAR Y CELULAR

MANUAL DE PRÁCTICAS



BIOLOGIA: PLAN DE ESTUDIOS 2017

Nombre del Profesor: Dra. Amelia Portillo López

CONTENIDO

No. de práctica	Nombre de la práctica	No. Página
	<i>Reglas de seguridad en el laboratorio</i>	3
1	<i>Conociendo el banco de genes</i>	4
2	<i>Utilizando la información del banco de genes</i>	6
3	<i>Alineación de secuencias y árbol filogenético</i>	8
4	<i>Marco de lectura</i>	10
5	<i>Purificación de DNA bacteriano</i>	11
6	<i>Resolución de fragmentos de DNA en gel de agarosa</i>	13
7	<i>Purificación de DNA de plásmido (MINIPREP)</i>	16
8	<i>Transformación del plásmido pGLO (BIO-RAD)</i>	18
9	<i>Expresión de proteína verde fluorescente</i>	20
10	<i>Extracción de DNA de tejido y VNTR Humano (D1S80 ó MCT118)</i>	22
11	<i>Electroforesis de DNA en gel de Poliacrilamida</i>	25
12	<i>Cromosomas politénicos de las glándulas salivales de Drosophila sp.</i>	28
13	<i>Corpúsculos de Barr</i>	31
	<i>Literatura</i>	33

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.

➤ PRACTICA #1

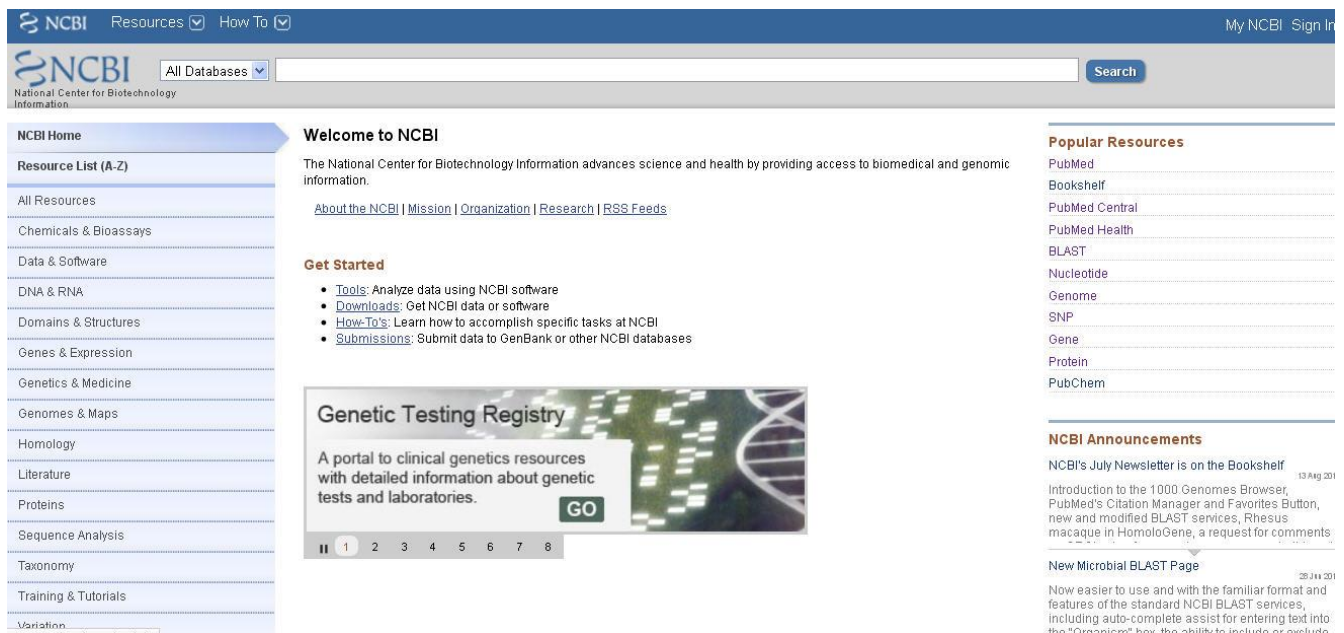
CONOCIENDO EL BANCO DE GENES

INTRODUCCION: a investigar por el estudiante

COMPETENCIA: Conocer las bases de datos de la información genética, así como las bases de datos de información científica.

METODOLOGIA:

1. Abrir la liga de internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
2. Leer cada una de las pestañas de utilerías que contiene el banco de información



3. Navegue en la sección de bookshelf, busque un libro de Genética y encuentre los tipos de cromosomas en base a posición de su centrómero en el ser humano, copie la información en su reporte.
4. Para buscar un gene, en el recuadro que dice All databases en la parte superior izquierda mueva con el cursos la flecha y ahí encontrará un listado, seleccione gene y en el recuadro grande a la derecha escriba el nombre de un gen: ejemplo: Alpha Globin, después coloque su cursor en search y de enter
5. Encontrará un listado del gen de diferentes organismos, busque el del ser humano y de enter en las letras sobresaltadas
6. Leer la información que contiene desde los investigadores que la obtuvieron, la clasificación taxonómica, etc.

7. Después localiza el gen y su posición física en el cromosoma y su identificación en el banco de genes, seleccionando las letras sobresaltadas de Mapviewer en el lado izquierdo de tu pantalla.
8. Copie la figura de su localización para su reporte
9. Navegue en cada pestaña de la página de NCBI y diga para que sirve, lea la información.

CUESTIONARIO:

- 1.- Escriba los nombres de los cromosomas en base a la posición de su centrómero?
- 2.- Que significa el patrón de bandeo que encontrará en los cromosomas de un cariotipo?
- 3.- Que tipos de cromosomas tiene el ratón en base a la posición de su centrómero?
- 4.- Cuales son los cromosomas mas grandes y mas pequeños en el ser humano?
- 5.- Explique que es:
 - a) gen,
 - b) locus,
 - c) loci,
 - d) alelo
 - e) gen silvestre

➤ PRACTICA #2

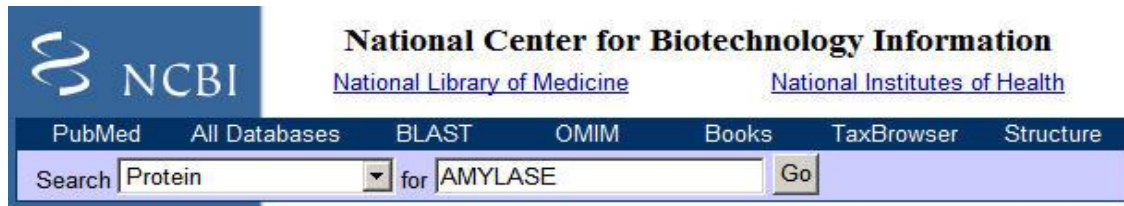
UTILIZANDO LA INFORMACIÓN DEL BANCO DE GENES

INTRODUCCION: a investigar por el estudiante

Competencia: 1) Obtener las secuencias de bases nucleotidicas de un gen, 2) la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por ese mismo gen y 3) del transcrito (RNA mensajero).

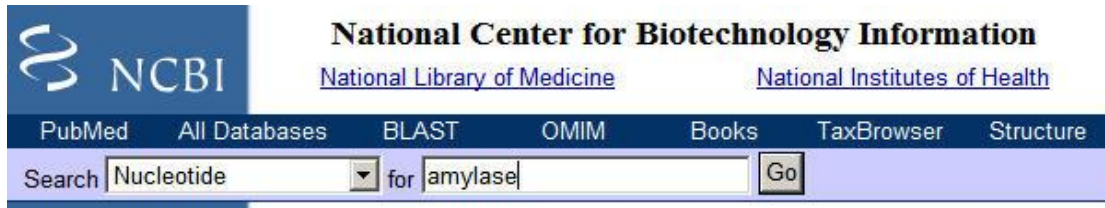
METODOLOGIA:

1. Abrir la liga de internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
2. Con el cursor busque en el primer cuadro a la izquierda la base de datos protein
3. Escriba el nombre de una proteína: por ejemplo: AMYLASE, alpha globin, actin, etc.

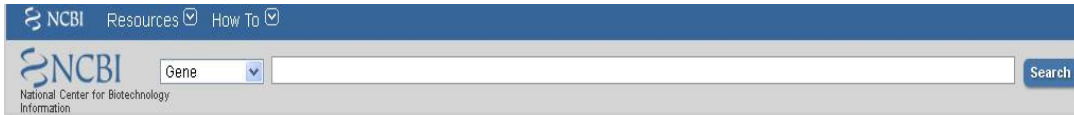


4. Presione GO
5. Encontrará un listado de amylase de diferentes organismos, escoga la del ser humano y con el cursor de “enter” al número que tiene asignada la proteína en letra bold de color
6. Lea la información que contiene y encuentra la secuencia de la proteína con la secuencia completa de aminoácidos, cuantos aminoacidos son? Con cual aminoacido inicia la proteína?
7. Copie la información y la secuencia en un archivo word, Anote en su cuaderno la identificación de la proteína en el banco de genes.
8. Buscar ahora la secuencia del transcrito (RNA mensajero).
9. Para ello coloque su cursor en las letras CDS que se encuentran a un lado de la secuencia de aminoácidos, esto lo trasladará a la secuencia del RNAm, copie la secuencia del RNAm en su archivo Word. Cuantas bases son?

Puedes también buscar la secuencia del RNAm en la hoja de ncbi y seleccionar la base de datos de nucleotide y poner el nombre del gen y nombre del organismo que había utilizado para la proteína como se ve en la siguiente figura.



10. Ahora encuentre la secuencia del gen en bases y grabe la información en Word, para ello ponerse en gene y escribir el nombre del gen amylase y analice la información que le proporciona la base de datos.



11. Ahora busque el gen completo esto es contendrá exones e intrones, calcule los tamaños de los intrones y exones del gen de la amylase, haga una tabla en su reporte.

CUESTIONARIO:

- 1.- Que es un intron y que es un exón?
- 2.- Como está constituido un gen bacteriano y un eucariotico?
- 3.- Que es el RNA mensajero y qué características tiene su secuencia para ser traducido por el ribosoma?
- 4.- A que se le denomina gen estructural y gen regulatorio?
- 5.- Cuantos aminoácidos son codificados por el código universal?
- 6.- Anexe una copia del código genético y explique qué significa codón.
- 7.- A qué se le denomina marco de lectura abierto.
- 8.- Explique que es un operon y explique el operon Lac

➤ PRACTICA #3

ALINEACIÓN DE SECUENCIAS Y ÁRBOL FILOGENÉTICO

INTRODUCCION: a investigar por el estudiante

COMPETENCIA: Utilizar programas de computo para analizar las secuencias conservadas entre genes de diferentes especies y construir arboles filogenéticos.

METODOLOGIA:

1. Abrir la liga de internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
2. Con el cursor busque en el primer cuadro a la izquierda la base de datos nucleotide
3. Escriba el nombre del gen: **16S ribosomal RNA gene ó 18S ribosomal RNA gene**
4. Presione Search
5. Encontrará un listado de diferentes organismos, escoga 10 bacterias diferentes y las secuencias aproximadamente del mismo tamaño (~500 pb)
6. ABRIR EL PROGRAMA **NOTEPAD** Y COPIAR CADA UNA DE LAS SECUENCIAS DE BASES DE CADA ORGANISMO DE LA SIGUIENTE FORMA Y GRABAR EL ARCHIVO (.TXT)

>E.coli

```
1 agtttgatca tggctcagat tgaacgctgg cggcaggcct aacacatgca agtcaaacgg
  61 taacaggaag cagcttgctg ctttgctgac gaggcggga cgggtgagta atgtctggga
 121 aactgcctga tggaggggga taactactgg aaacggtagc taataccgca taactcgca
 181 agcacaaga gggggacctt agggcctctt gccatcggat gtgccagat gggattagct
```

>Bacillus subtilis

```
1 agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc
  61 ggacagatgg gagcttgctc cctgatgta gcggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa
 121 cctgcctgta agactgggat aactccggga aaccggggct aataccggat gttgtttga
 181 accgatggt tcaacataa aaggtggctt cggctaccac ttacagatgg acccggcg
```

7.- Abrir el programa CLUSTALX

<http://downloads.scableinformatics.com/downloads/clustalx/>

8.- Abrir la ventana File y presionar en el comando Load sequence

9.- Buscar su archivo .txt y cargar la secuencia

10.- En la ventana Aligment buscar el comando Output format y abrir la subventana ahí seleccionar con el cursor GCG/MSF y presionar OK

11.- Posteriormente abrir de nuevo la ventana aligment y ahí seleccionar Do complete aligment

12.- Una vez alineadas las secuencias, se generará automáticamente un archivo .msf, el cual abrirá con el programa GENEDOC, ahí podrá observar claramente las secuencias homologas y cambiará parametros, etc.

GENEDOC

<http://www.psc.edu/biomed/genedoc/gddl.htm>

13.- Construir un árbol filogenético con las secuencias con el programa Treeview

<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

CUESTIONARIO:

1. Para que sirve un árbol filogenético?
2. Que significa secuencia conservada y secuencia consenso
3. Porque se utiliza el gen ribosomal para realizar arboles filogenéticos y/o identificación?
4. Que genes se utilizan para el código de barras de especies en animales y cuales en plantas?
5. Explique porque se usan genes mitocondriales?

➤ PRACTICA #4

MARCO DE LECTURA

INTRODUCCION: a investigar por el estudiante

COMPETENCIA: Analizar lo que es un marco de lectura abierto de un gen, así como su traducción utilizando programas disponibles gratuitamente.

METODOLOGIA:

Abrir la liga <http://web.expasy.org/translate/>

Colocar la secuencia de un transcrito (RNA mensajero, ejemplo amilasa (amy2A)) en el cuadrante en blanco del programa

Colocar el cursor en la palabra **Translate** que se encuentra en la parte inferior izquierda del cuadrante.

Analizar los diferentes marcos de lectura que mostrará el programa.

Que significa Stop?

Abrir la liga: <http://www.attotron.com/cybertory/analysis/trans.htm>

Colocar una secuencia de un transcrito en el primer cuadrante en letras minúsculas y sin numeración, después transcribir y después traducir.

CUESTIONARIO:

1. Que significa transcribir el DNA?
2. Que significa traducir el DNA?
3. En la cadena del péptido que se está sintetizando que parte de la proteína es primeramente sintetizada, el N-terminal o el C-terminal y que significan estas letras?
4. Cuantos aminoácidos son codificados en el código genético universal
5. Existe algún otro código genético?, Mencione cual es y en que varía con el universal

➤ *PRACTICA #5***PURIFICACIÓN DE DNA BACTERIANO**

INTRODUCCION: a investigar por el estudiante

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

MATERIAL:

- ✓ 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%

METODOLOGIA:

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, la solución se tornará viscosa.
5. Añadir 100 µl de NaCl 5 M y mezclar, NO VORTEX
6. Añadir 80 µl de solución de CTAB/NaCl, mezclar (NO VORTEX) 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 micro centrifuga a máxima velocidad.
8. Remueva el sobrenadante o fase líquida, donde está el DNA a un tubo nuevo, evitando la capa blanca de interface.
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 DNA añadirle 1 ml de etanol al 70%, mezclar con vortex 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 DNAsas 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, 50 µg de DNA tiene una absorbancia de 1 a 260 nm. La pureza del DNA tiene una relación $Abs_{260}/Abs_{280} > 1.8$ con respecto a la lectura de proteínas a 280 nm.

PCR:

- Utilizar la mezcla de PCR 2x proporcionada por el maestro
- Primers del gen 16S RNA:
- (10 µM) sentido: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG,
- (10 µM) Antisentido: ACGGTTACCTTGTTACGACTT
- Preparar una Rx de 12 µL: 6 µL de master mix, 1µL de primer sentido, 1µL de primer antisentido, 2µL de DNA, 2µL de agua para PCR.
- Correr la Rx a 58 grados, 30 ciclos.

CUESTIONARIO:

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

➤ PRACTICA #6

RESOLUCIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA EN GEL DE AGAROSA

INTRODUCCION: a investigar por el estudiante

COMPETENCIA: Hacer un gel de agarosa para determinar las longitudes de una cadena de DNA en base a su movilidad electroforética y porcentaje de agarosa.

MATERIALES:

- ✓ Buffer de electroforesis TAE o TBE
- ✓ Agarosa
- ✓ Loading buffer 10X
- ✓ Muestra de DNA
- ✓ Marcadores de peso molecular de DNA
- ✓ Bromuro de etidio (Eth Br) 10 mg/ml stock (**CANCERIGENO**)
- ✓ Cámara de electroforesis horizontal
- ✓ Plataforma para el gel
- ✓ Peine
- ✓ Fuente de poder
- ✓ Guantes desechables

METODOLOGIA:

- 1.- Hacer una solución de agarosa al 1% en amortiguador TAE o TBE 1x y calentarlo en microondas para homogenizar y dejar enfriar a una temperatura de 55°C
- 2.- Añadir 3 µl de EthBr y mezclar suavemente, evitar los vapores
- 3.- Transferir el agar a la charola de electroforesis y enseguida coloque los peines.
- 4.- Después de 15 minutos, con el agar solidificado, retire con cuidado los peines, jalándolos hacia arriba, en forma recta.
- 5.- Coloque la charola en la cámara de electroforesis.
- 6.- Agregue a la cámara amortiguador TAE 1x (hasta que se cubran los pozos con el amortiguador), aproximadamente 5 mm de la superficie.
- 7.- Sobre plástico (Saran Wrap, o parafilm), coloque la muestra y mézclela con 5% de loading buffer 10X para que la muestra quede a una dilución 1X
- 8.- Con el pipeteador automático homogenice la muestra y transfírela a uno de los pozos del gel de agar. Tenga cuidado de no rasgar los pozos del gel.
- 9.- Repita los tres últimos pasos para el resto de las muestras.
- 10.- 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 hr). Con el menor voltaje se obtiene una mejor resolución de bandas, especialmente con fragmentos chicos.

11.- Permita que avance la electroforesis hasta que el azul de bromofenol recorra 2/3 de la distancia del gel.

12.- Apague la fuente de poder y retire cuidadosamente el gel.

13.- En caso de no haber añadido Eth Br al preparar el gel, entonces se teñirá el gel por 10 a 30 min en una solución de bromuro de etidio 0.5 µg/ml y si es necesario desteñir 30 min en agua

14.- Visualicé el resultado de la electroforesis en un transiluminador U.V.

Nota: recuerde que la luz UV puede producir Mutaciones. Cuando visualice verifique que esta usted adecuadamente protegido. Ponerse lentes transparentes.

NOTA: El Bromuro de Etidio es mutagénico y potencial cancerígeno. Usar guantes. Trabajar con precaución, al ponerse los guantes no andar tocando nada. Desechar todo lo contaminado por Eth Br en los recipientes marcados.

Concentraciones de agarosa para separar fragmentos de DNA de varios tamaños	
% de agarosa	Rango efectivo de resolución de acuerdo a los fragmentos lineares de DNA (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 BUFFERS:

BUFFERS	Solución de trabajo	Concentración de la solución stock (por litro)
Tris- acetato EDTA (TAE)	1X: 0.04M de Tris-Acetato 0.001M de EDTA	50X : 242 g Tris base 57.1 ml de ácido Acético Glacial 100ml 0.5M de EDTA (pH 8.0) o se puede añadir 37.2 gr de Na ₂ EDTA.2H ₂ O
Tris borato EDTA (TBE)	0.5X 0.045M Tris-Borato 0.001M de EDTA	5X: 54 g Tris base 27.5 g de Acido Bórico 20 ml 0.5M de EDTA (pH 8.0)

Preparación del buffer de carga:

0.25% de azul de bromofenol

50% de glicerol en agua

CUESTIONARIO:

1. Como funciona una electroforesis
2. Que carga tiene el DNA y porque?
3. Porque se usa un buffer en la electroforesis?
4. Para que se utiliza un buffer de carga con la muestra?
5. Explique cómo funciona el Bromuro de Etidio y porque es mutagénico?
6. Que concentraciones de agarosa utilizaría para estas cadenas de DNA:
 - a. 3500 pb
 - b. 10 Kb
 - c. Gb
 - d. 100 pb
 - e. 500 pb

➤ PRACTICA #7

PURIFICACIÓN DE DNA DE PLÁSMIDO (MINIPREP)

INTRODUCCION: a investigar por el estudiante

COMPETENCIA: Obtener DNA plasmidico 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 el 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) 50mg/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 gr NaCl, 1 L de agua destilada.
- ✓ Ampicilina Stock: 60 mg/ml (guardar a -20 °C).

METODOLOGIA:

- 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 centrifugue 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 eppendorff 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 vortex.
- 10.-Centrifugar igual al paso 8
- 11.- Ecurrir y dejar secar a temperatura ambiente por 10 min y resuspender en 30 a 50 µl de TE o agua libre de RNAsas y DNAAsas.

CUESTIONARIO:

- a) Para que se utiliza cada reactivo en la metodología?
- b) Que es un plásmido?
- c) Que le confiere a una bacteria un plásmido?
- d) Existen plásmidos solo en bacterias en la naturaleza?
- e) Para que se utilizan en ingeniería genética los plásmidos?
- f) Esquematize un plásmido comercial y como esta ingeniarizado
- g) Que debe contener un plásmido para ser utilizado en ingeniería genética?
- h) De qué tamaño son los plásmidos (pares de bases) y de qué tamaño es el genoma bacteriano?
- i) Pueden estar varios plásmidos al mismo tiempo en una célula bacteriana?
- j) Que significa plásmidos unicopia y multicopia?
- k) Como se replican los plásmidos en una bacteria?
- l) Que vectores se utilizan en Terapia Genica?

➤ PRACTICA #8

TRANSFORMACIÓN DEL PLÁSMIDO PGLO (BIO-RAD)

INTRODUCCION: 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

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. Esterilizar a 121°C y 15 lb de presión por 15 min.

Esperar a que enfrie el agar a 55 °C y añadir la ampicilina stock (1 µl por ml de medio).

EL CALDO LB NO LLEVA AMPICILINA.**METODOLOGIA:**

1. Sacar un tubo de células competentes (50 µl) de -70°C, previamente preparado, colocar en hielo inmediatamente (las células dejaran de ser competentes al momento de adquirir la temperatura ambiental). Dejar disolver dentro del hielo.
2. Añadir 1-3 µl de DNA plasmidico (no más de 50 ng de DNA en un volumen no mayor a 10 µl o menos de preferencia a cada tubo de células competentes). Mezclar suavemente y dejar en hielo.

3. Incubar en hielo 30 min, mezclando cada 10-15 min.
4. Colocar el tubo eppendorf en un termoblock de 42°C y dejar 90 seg, sin agitar.
5. Rápídamente regrese al hielo
6. Añadir 800 µl de caldo LB previamente tibio a 37°C, incube por 30 a 45 min a 37°C con agitación.
7. Transfiera 50 a 200 µl a una caja con LB agar con antibiótico y otra sin antibiotico.
8. Disperse con una asa de vidrio y ponga a crecer por 16-18 hr a 37°C
9. Al siguiente día cuantifique las colonias transformadas y calcule la eficiencia de transformación.

Determinar la cantidad de DNA plasmidico utilizado en la transformación (concentración calculada en la práctica de extracción de DNA plasmidico)

DNA (µg) = [DNA µg/µL] X (volumen de DNA/µL añadido a las células competentes)

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

DNA del plásmido (µg) dispersado = Total de DNA usado X Fracción de DNA

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

CUESTIONARIO:

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

➤ PRACTICA # 9

EXPRESION DE PROTEINA FLUORESCENTE (pGLO)

INTRODUCCION: a investigar por el estudiante

COMPETENCIA: Realizar una expresión de un gen recombinante en células de *E.coli* y entender su fundamento.

MATERIALES:

- ✓ 2 cajas de petri
- ✓ 1 matraz de 500 ml (por grupo)
- ✓ 1 probeta (por grupo)
- ✓ 1 mechero
- ✓ 1 eppendorf estéril
- ✓ D (+) Arabinosa (utilizar 5 mg/ml)
- ✓ Ampicilina stock (60 mg/ml)
- ✓ 1 asa de vidrio
- ✓ 1 vaso de precipitado de 500 ml
- ✓ 1 pizeta de agua (por grupo)
- ✓ 1 pizeta con ROH
- ✓ 1 tubo de tapa de rosca con 3 ml de agua destilada estéril (por grupo)
- ✓ 1 filtro estéril de 0.2 μ M (por grupo)
- ✓ 1 jeringa de 5 ml (por grupo)

METODOLOGIA:

1. Preparar 200 ml de medio de cultivo: LB+amp+arabinosa de la siguiente forma: primero hidratar el medio LB y esterilizar 15 min a 121°C y 15 lb, una vez esterilizado dejar enfriar hasta 50°C.
2. Añadir la ampicilina con puntilla estéril.
3. Disolver 1 gr de arabinosa en el tubo con agua destilada estéril, pasar la solución una vez disuelta a una jeringa de 5ml y colocarle el filtro estéril y filtrar, añadiendo lo filtrado al medio ya estéril, evitar que este demasiado caliente ya que dañara a la arabinosa.
4. Vaciar el medio a las cajas de petri
5. Colocar 1 μ l de cepa con pGLO en 1 ml de sol salina estéril o caldo LB, utilizar el eppendorf estéril
6. Tomar 25 o 50 μ l y esparcir con una asa de vidrio en la caja de petri con LB+amp+arabinosa
7. Colocar en el incubador por 16-21 hrs a 37 °C
8. Observar la fluorescencia de la GFP expresada en las colonias bajo luz UV.
9. Tomar fotografía

CUESTIONARIO:

1. Explique cómo funciona el operón de arabinosa
2. De donde fue extraída la proteína fluorescente que contiene el plásmido pGLO
3. Para que se utiliza la expresión de la proteína fluorescente en la ingeniería genética?
4. Consideras a E.coli con el plásmido pGLO como transgénica, explica porque si o no?
5. Que función tiene la arabinosa en el medio de cultivo?
6. A que se le denomina Proteína recombinante
7. Que es una proteína heteróloga y homologa?

PRACTICA # 10

EXTRACCION DE DNA DE TEJIDO Y VNTR HUMANO (D1S80 ó MCT118)

INTRODUCCION: a investigar por el estudiante

COMPETENCIA: Extraer DNA 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 1.5%
- ✓ 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 DNAsas
- ✓ 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

PROCEDIMIENTO:**SECCION I: LISIS CELULAR**

- 1) Con un hisopo de algodón tomar células epiteliales de la boca
- 2) Colocar el hisopo en un microtubo que contenga 500 µL de PBS buffer y resuspender las células que trae consigo el hisopo
- 3) Centrifugar a 12,000 rpm 1 minuto y decantar el sobrenadante
- 4) Volver a repetir desde el paso 2
- 5) Añadir 450 µL de buffer de lisis a la muestra
- 6) Añadir 50 µL de SDS al 10%
- 7) Añadir 5 µL de proteinasa K y agitar suavemente
- 8) Incubar 1.5 hr a 50°C
- 9) Colocar a 100°C por 10 min en un termoblock

SECCION II: EXTRACCION DE DNA

1. Añadir 500 µL de la mezcla: FENOL/CLOROFORMO/ISOAMILALCOHOL dar vortex 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.
2. Transferir 450 µL de la capa superior y agregar 1/25 vol de NaCl 5M (18 µL)
3. Agregar 0.54 vol de Isopropanol (243 µL), mezclar por inversión y dejar de 1-3 min
4. Centrifugar 5 min a 12,000 rpm, después decantar el sobrenadante
5. Añadir 1 ml de etanol al 70%, centrifugar 5 min a 12000 rpm y decantar y eliminar exceso en una toalla absorbente
6. Secar a temperatura ambiente 5-10 min y resuspender el botón en 30 µL de TE buffer o agua libre de DNAsas
7. Almacenar a -20° C.
8. Leer a 260 y 280 nm (DNA puro tiene una relación Abs260/Abs280 > 1.8

SECCION III: PCR-VNTR

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

Preparar una mezcla de PCR para todo el equipo,

Nombre del reactivo	Reacción de 6 µL	CALCULAR POR EL NUMERO 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	
DNA (30-50 ng/µL)	2.5 µL	

Mezclar y cerrar el tubo y colocar en el termociclador

PROGRAMACION 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 GEL DE ACRILAMIDA

CUESTIONARIO:

1. Que es un marcador molecular?
2. Explique que son los microsatélites y VNTR
3. Poner la secuencia de bases del DNA del VNTR analizado en esta practica
4. De cuantas pares de bases es el VNTR amplificado?
5. Para que se utilizan los microsatelites?
6. Que genes se utilizan en el código de barras de los animales
7. Que genes se utilizan en el código de barras de las plantas

PRACTICA # 11

ELECTROFORESIS DE DNA EN GEL DE POLIACRILAMIDA

INTRODUCCION: a investigar por el estudiante

COMPETENCIA: Realizar una electroforesis de DNA

MATERIALES:

- ✓ 100 ml Sol. de poliacrilamida 29% y bisacrilamida 1% (29:1), disolver en 40 ml de agua e ir aforando a 100 ml.
- ✓ 1 L de BUFFER TAE 10 X (48.4 gr TRIS BASE, 11.42 ml de Ac. Acético glacial, 20 ml de EDTA 0.5M, pH 8.0).
- ✓ 1 ml Persulfato de amonio (PSA) al 10% (disolver 0.025 gr en 250 µL de agua) guardar en el refrigerador 4 °C)
- ✓ TEMED concentrado
- ✓ 50 ml Nitrato de plata al 1% (1 gr en 100 ml de agua destilada)
- ✓ 500 ml de Hidroxido de Sodio al 3% (3 gr en 100 ml de agua destilada)
- ✓ 500 ml de Formaldehído al 0.3 % (300 microlitros en 100 ml de agua destilada)
- ✓ 100 ml Carbonato de Sodio al 7.5%

Usar el porcentaje de Acrilamida de acuerdo al tamaño del fragmento a visualizar:

% de Acrilamida	Tamaño del fragmento
3.5 %	100-1000 pb
5%	100- 500 pb
8%	60- 400 pb
12%	50- 200 pb
20%	50- 100 pb

PREPARACION DEL GEL DE POLIACRILAMIDA AL 7%

Reactivo	2 Geles chicos (~10 ml)
TAE 10X	1 ml
Acrilamida/bisacrilamida	2.33 ml
Agua destilada	6.57 ml
TEMED	6 μ L (microlitros)
PSA (añadir a lo último)	70 μ L (microlitros)

NOTA: Usar guantes la poliacrilamida es neurotóxica y el TEMED es cancerígeno.

1. Limpiar los vidrios con agua destilada y secarlos, después limpiarlos con etanol.
2. Montar los vidrios con los separadores de la siguiente forma: Ponerles poca vaselina a los separadores y poner cada uno de ellos en las orillas de un vidrio en forma vertical, enseguida poner el otro vidrio sobre lo anterior, todo se hace sin tocar con las manos el centro de los vidrios para evitar contaminación con grasa. Si la cámara contiene el equipo de montaje no es necesario lo anterior.
3. Colocar un sujetador a cada lado de los vidrios ya unidos
4. Poner los vidrios en forma horizontal y añadir la solución descrita en la Tabla, una vez añadido el PSA el gel rápidamente iniciara la polimerización, por lo tanto deberá hacer el llenado de los vidrios rápidamente y enseguida poner el peine.
5. Dejar de 20-30 min para polimerizar el gel
6. Una vez polimerizado montar en la cámara de electroforesis vertical y llenar las cámaras con buffer TAE a 1X
7. Correr el gel a 90-100 V o en su caso a 5 v/cm
8. Una vez que haya corrido 2/3 partes, separar los vidrios y colocar el gel en la sol. fijadora

TINCION DEL GEL (Lo siguiente es para un gel chico, preparar el doble para el grande).
Preparar las siguientes soluciones frescas.

- A. SOL. FIJADORA: 5 ml de etanol, 250 μ L de Ácido acético concentrado, aforar a 50 ml con agua destilada
- B. SOL. DE TEÑIDO: 5 ml de nitrato de plata al 1%, aforar a 50 ml con agua destilada
- C. SOL. REVELADORA: 25 ml de Hidróxido de sodio al 3% y 25 ml de formaldehído al 0.3%, **preparar esta solución al instante cuando ya vaya a revelar NO ANTES.**
- D. SOL. DE ALMACENAMIENTO: 5 ml de Carbonato de sodio al 7.5% y se afora a 50 ml con agua destilada.

PROCEDIMIENTO DE TINCION:

- Adicionar la SOL. A, agitar suavemente 4 min, decantar la solución y añadir poca agua destilada y agitar suavemente 1 min, decantar.
- Adicionar la SOL. B, dejar 10 min con suave agitación. Decantar la sol. B en un recipiente para desechos de plata. Enjuagar con poca agua destilada, 10 segundos y decantar.
- Adicionar la SOL. C. Mezclar los dos reactivos y añadir un poco, este se tornara oscuro, tirar rápidamente y después añadir el resto por un extremo del gel, se revela en 6 min. Se decanta la solución.
- Adicionar la SOL. D, para almacenar el gel.
- Guardar en bolsa ziploc con poco buffer.

CUESTIONARIO:

1. Para que se utilizan los geles de acrilamida en la electroforesis de DNA
2. Cómo funciona la tinción de plata con el DNA, explique
3. Como polimeriza la acrilamida

PRACTICA # 12

**CROMOSOMAS POLITÉNICOS DE LAS GLÁNDULAS SALIVARES DE
*DROSOPHILA SP.***

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

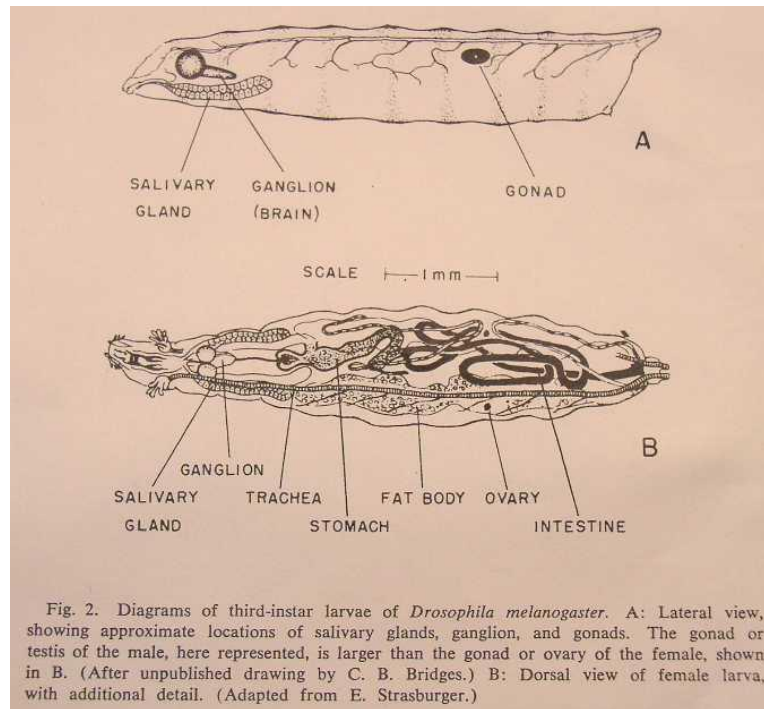
Solución Ringers: 860 mg NaCl, 30 mg KCl, 35 mg CaCl₂, Disolver en 100 mL H₂O destilada. Almacene a 4 °C.

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.

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 sol. Ringer en un portaobjetos como se muestra en la figura.

Note cual es el extremo de la larva, la región caudal es redonda y la cabeza es conica ver las siguientes figuras;



Localice las glándulas salivales y otros órganos como el siguiente diagrama bajo el microscopio estereoscópico

- 2.- Aisle 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 remuevalo con una pipeta pasteur. Limpie las glándulas del material extra (grasa) usando una aguja de disección o tijerillas.
- 3.- 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
4. 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.
5. 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.
6. 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 (mantengase 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

7. 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

8. 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.

9. **Examine bajo el microscopio** a (10 x10) 100x looking for well-spread and banded chromosomes. Switch to (10x40) 400x, pick best banding. At 1000x, illustrate in your book. Take a photograph if possible.

10. Para preservar la laminilla, selle las orillas del cubreobjetos con una capa de pintura uñas 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 que organismos podemos encontrar este tipo de cromosomas?
4. Que función tienen estos cromosomas?

PRACTICA # 13

CORPUSCULOS 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

METODOLOGIA

- 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:

En que células se deben buscar los corpúsculos de Barr?
En qué fase del ciclo celular son visibles los corpúsculos de Barr?
Cuántos corpúsculos de Barr esperarías encontrar en los siguientes organismos
XX, XY, XXX, XO, XXXY, XXXX, XXY
En qué etapa del desarrollo se da la inactivación?
Porque se les denomina así?
Que gen esta involucrado en la inactivación del cromosoma X?

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.

Sambrook, J. and Russel D. W. (2001) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Third Ed. Vol 1, 2 y 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Mertens, Thomas Robert, 2007. Genetics : laboratory investigations