



Manual de Practicas de laboratorio

Luis Alfonso R´guez Páez
Profesor

Facultad de Ciencias Agrícolas
Facultad de Ciencias Básicas
Universidad de Córdoba
2022

Los Diez Mandamientos de la conservación de los resultados*

1. Cíñete a los hechos. No divagues ni editorialices.
2. Emplea un cuaderno de laboratorio de lomo pegado para impedir que se puedan arrancar o poner hojas.
3. Haz dos copias de todos los apuntes, uno de ellos debería conservarse en un lugar separado y seguro.
4. Incluye los datos e informaciones directamente en el cuaderno de laboratorio tan pronto como sean generados. Puedes firmar y fechar cada página del cuaderno (la firma es un procedimiento requerido en cuadernos de investigación industrial). No confíes en la memoria ni escribas en hojas sueltas con la intención de pasarlas más tarde al cuaderno.
5. Utiliza tinta permanente, preferentemente negra, que se reproducirá satisfactoriamente en la fotocopidora.
6. Identifica cualquier equivocación o error, y explícalos.
7. Pega los registros en el cuaderno o consévalos, tras identificarlos y clasificarlos correctamente, de modo que se puedan recuperar rápidamente.
8. Utiliza términos aceptados universalmente; si es posible evita las abreviaturas, los nombres codificados o los códigos de números.
9. Mantén el cuaderno de laboratorio limpio; evita las manchas y los vertidos.
10. Elabora una tabla de contenidos y un índice del cuaderno de laboratorio tan pronto como esté lleno.

** Derivado de «Record Books: Their Generation, Maintenance, and Safekeeping». Dow Chemical Company, Midland, Michigan.*

Medidas de seguridad en el laboratorio

1. Prepara cada sesión de trabajo leyendo cada experimento hasta familiarizarte con los principios y métodos implicados. Al conocer el experimento disminuyes la posibilidad de que ocurran accidentes. Además, esta programación previa te permite emplear el tiempo en el laboratorio de una manera más eficaz.
2. En el laboratorio está prohibido comer, beber y fumar.
3. En el laboratorio debes llevar en todo momento la bata o el mandil de laboratorio. Esto garantiza que ningún material de cultivo te caiga accidentalmente sobre las ropas o la piel, y además protege la piel o la ropa de manchas o vertidos de sustancias químicas.
4. Al lugar de trabajo en el laboratorio sólo debes llevar aquellos materiales estrictamente necesarios para el trabajo, como son los manuales del laboratorio y tus cuadernos de laboratorio, entre otros. El resto de objetos, como serían abrigo, libros, o bolsos, debes dejarlos fuera del área de trabajo.
5. Comienza cada jornada desinfectando el área de trabajo. Satura la zona con desinfectante, extiende el desinfectante con una toalla de papel, y deja que se seque. Repite este procedimiento después de que hayas terminado de trabajar para asegurar que cualquier material depositado en el área de trabajo es desinfectado de una forma adecuada.
6. Todos los cultivos y sustancias químicas deberían estar adecuadamente etiquetadas con tu nombre, clase, fecha y experimento. El etiquetado es crucial para evitar usos o colocaciones indebidos.
7. Sé muy cuidadoso con los mecheros Bunsen. Para evitar quemaduras, apaga los mecheros cuando no los uses. Cuando trabajes, ten cuidado de no colocar las manos sobre la llama.
8. Todo material contaminado debe ser desinfectado antes de ser eliminado o reutilizado. Todo el material a autoclavar debería colocarse en un recipiente apropiado para su recolección. Debes colocar las pipetas usadas en una solución desinfectante.
9. Tras la sesión de trabajo, lávate las manos antes de abandonar el laboratorio para mantener unas buenas condiciones higiénicas.
10. En caso de accidente o lesión, avisa inmediatamente al profesor o al responsable del laboratorio para que pueda realizarse una acción rápida y apropiada.

Nota

Los estudiantes deberían estar concienciados de que las medidas de seguridad son de la mayor importancia. Durante la primera jornada de introducción, dedica cierto tiempo en familiarizar a los estudiantes con la localización de los lavajos, las duchas, los extintores, las salidas de emergencia y los recipientes de recogida de materias peligrosas.

FORMA DE ELABORAR LOS REPORTES

Los reportes deberán elaborarse en maquina de escribir o en computadora, respetando márgenes y cuidando la ortografía, deberán ajustarse al siguiente formato:

A. Carátula de presentación: (ver formato)

Universidad de Córdoba
Facultad de XXXXXXX
Nombre del pregrado
Titulo de la práctica
Nombre completo del alumno, y
Fecha de entrega

B. El contenido se divide de la siguiente manera:

1. Introducción.

Como mínimo media cuartilla (una cuartilla es igual a una hoja tamaño carta), contendrá las bases científicas del tema de la practica, habrá que consultar libros o cualquier otro tipo de fuentes confiable de información como Internet, artículos, etc.

2. Objetivos.

Se especifican los objetivos de la práctica en turno, por lo general se encuentran impresos en la práctica. (Deben empezar con un verbo en infinitivo).

3. Materiales.

Enlistar todo el material, reactivos y equipo utilizado.

4. Métodos

Describir lo realizado en la practica, deberá ser escrito en pasado y en forma impersonal.

5. Resultados.

Se redactaran en pasado y de forma concisa, pudiendo hacer cuadros, dibujos, graficas, etc.

6. Discusión.

Esta parte de la práctica es de las más importantes ya que deberá explicar los resultados de la práctica en relación a las bases científicas encontradas en la literatura, lo cual indica el grado de comprensión de la practica.

7. Conclusión(es).

Deberá ser muy breve y concisa, ejemplo: al elevar la temperatura en la reacción se incrementa la velocidad de formación del producto.

8. Cuestionario.

Si se pide en la práctica correspondiente, se deberán contestar las preguntas.

9. Bibliografía.

Toda literatura deberá ser reportada de la siguiente manera.

Ebbing, D. D. 1996. Química general 5a ed. McGraw Hill. Capítulo 15, Ácidos y bases, pag. 635.

Practica N° 1:

Extracción de DNA Método de extracción de DNA (04/03/00) Modificado LS.

Duración: 3 horas.

Introducción

El ácido desoxirribonucleico es un tipo de ácido nucleico, una macromolécula que forma parte de todas las células. Contiene la información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos conocidos y de algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria.

Muchas de las técnicas de biología molecular incluyen algún tipo de manipulación del material genético. Hoy día podemos obtener suficiente ADN y de buena calidad de manera sencilla y en poco tiempo.

La extracción de ADN requiere una serie de etapas básicas. En primer lugar tienen que romperse la pared celular y la membrana plasmática para poder acceder al núcleo de la célula. A continuación debe romperse también la membrana nuclear para dejar libre el ADN. Por último hay que proteger el ADN de enzimas que puedan degradarlo y para aislarlo hay que hacer que precipite en alcohol. La extracción de ADN de una muestra celular se basa en el hecho de que los iones salinos son atraídos hacia las cargas negativas del ADN, permitiendo su disolución y posterior extracción de la célula. Se empieza por lisar (romper) las células mediante un detergente, vaciándose su contenido molecular en agua, en la que se disuelve el ADN. En ese momento, el agua contiene ADN y todo un surtido de restos moleculares: ARN, carbohidratos, proteínas y otras sustancias en menor proporción. Las proteínas asociadas al ADN, de gran longitud, se habrá fraccionado en cadenas más pequeñas y separadas de él por acción del detergente. Sólo queda, por tanto, extraer el ADN de esa mezcla para lo cual se utiliza alcohol.

Objetivos:

Conocer y preparar las soluciones madres necesarias para la extracción de DNA
Extraer de DNA de tejido vegetal

Procedimiento

1. Molida (Fractura de pared Celular).

- 1.1. Tomar tejido para cuatro tubos eppendorf, y en nitrógeno líquido, moler con mortero y pistilo (hacer una serie de seis muestras, 6 muestras x 4 tubos = 24 tubos).

2. Extracción (lisis de membranas).

- 2.1. En tubo eppendorf con 500 µl de buffer de extracción a temperatura de cuatro (Tris-HCl 0.05 M, EDTA 0.02 M, NaCl 0.35 M, Urea 7.0, Mercaptoetanol 14 M 0.1% y LS 1%), colocar unos 0.5 g del polvo (tres puntas de espátula), y agitar.
- 2.2. Incubar por 10 min. con agitación esporádica.

3. Separación de Proteínas-Carbohidratos.

- 3.1. Añadir 500 µl de fenol/cloroformo/isoamilico (50:50:1) frío, agitar en vortex por 30 seg. y dejar a temperatura de cuatro por min.
- 3.2. Centrifugar en microcentrífuga (fría) por 10 min. Y extraer, en otro eppendorf, la fase acuosa (baba).

4. Precipitación de DNA.

- 4.1. Precipitar con 75 µl de acetato de sodio 3 M y 500 µl de isopropanol frío, mezclar por inversión y dejar a -20°C por más de 1 hora, hasta formar madeja (*pausa para hacer una nueva serie de seis muestras*).
- 4.2. Centrifugar en microcentrífuga por 2 min. Y eliminar el sobrenadante.
- 4.3. Añadir 500 µl de buffer de lavado (etanol 76% y acetato de amonio 10 mM).
- 4.4. Centrifugar en microcentrífuga por 2 min. y eliminar el sobrenadante. Reunir dos (o las cuatro pastillas en un solo tubo y escurrir (puede usarse papel absorbente).
- 4.5. Reextraer desde el paso 2.1. o fijar a la membrana (*estos son métodos opcionales*).

5. Lavado.

- 5.1. Lavar las pastillas con 500 µl de etanol 70%, agitar por inversión y dejar 5 min. Centrifugar en microcentrifuga por 2 min. Eliminar el sobrenadante.
- 5.2. Repetir el paso 5.1. y secar a 65°C (pausa).

6. Resuspensión.

- 6.1. Resuspender el DNA en 100 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) Caliente y equilibrar por 20 seg. a 65°C.
- 6.2. Añadir 1 µl de RNAasa e incubar a 37°C por 1 hora.
- 6.3. Centrifugar en microcentrifuga por 2 min.(pausa).

7. Purificación (GLASSMAX).

- 7.1. Precalentar 100 µl de TE a 65°C. Esta solución se utilizara para eluir el DNA.
- 7.2. Añadir por 50 µl de DNA, otros 50 µl de buffer (tris-HCl ph 8.0 50 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM) y agitar con vortex.
- 7.3. Añadir 450 µl (4.5 volúmenes) de solución de ligación (NaI 6 M).
- 7.4. Ensamblar y marcar adecuadamente un tubo/cartucho de (GLASSMAX). Transferir la muestra al cartucho. Centrifugar en microcentrifuga por 20 seg. Separar el cartucho, desechar el liquido del tubo y usar el mismo tubo.
- 7.5. Reensamblar el cartucho en el tubo y añadir 400 µl de buffer de lavado frío (etanol 76 %, acetato de amonio 10 mM), centrifugar en microcentrifuga por 1 min. Separar el cartucho, desechar el liquido.
- 7.6. Repetir el paso 7.5. otras dos veces. Repetir otras dos veces mas, pero usando etanol 70% frío en lugar de buffer de lavado (la ultima centrifugada debe ser de 2 min para eliminar trazas de etanol y se desecha el tubo).
- 7.7. Marcar un tubo nuevo, ensamblar el cartucho y añadir 50 µl del TE caliente del paso 7.1. colocar el tubo/cartucho a 65°C por 2 min. Para asegurar equilibrio. Centrifugar en microcentrifuga por 20 seg. Para eluir el DNA. Desechar el cartucho y almacenar el DNA a 4°C.

*****La microcentrifuga debe tener 13.000 RPM.**

CUESTIONARIO.

Una manera de purificar una molécula es deshacerse de todas las moléculas, excepto la de interés. Si queremos extraer ADN de lenteja (Lens culinaris) ¿De que moléculas piensas que deberíamos deshacernos?

¿Qué sustancias son necesarias para lograr purificar ADN de acuerdo a sus propiedades químicas y la de las demás moléculas?

¿Porque El ADN tiene carga negativa y en que afecta la solubilidad del mismo?

¿Cuál es la diferencia entre ADN genómico y ADN cromosómico?

¿Qué papel juega cada uno de los reactivos utilizados en el proceso de extracción y purificación del DNA?

Preparación de soluciones Stock para extracción de DNA

Buffer de extracción

LS (0.50 ml):

Tris-HCl 1M pH 8.0 [50 mM]	5 ml	25 ml
EDTA 0.5 M pH 8.0 [20 mM]	4 ml	20 ml
NaCl 5 M [350 mM]	7 ml	35 ml
Mercaptoetanol 14 M [0.1%]	100 µl	500 µl
Urea [7 M]	42.042 g	210.21 g
LS [1%]	1 g	5 g
Total (agua desion. est.)	100 ml	500 ml

Fenol/Cloroformo/Isoamilico [50:50:1] (0.5ml): (frío a 4°C)

Fenol	24.8 ml	49.5 ml
Cloroformo	24.7 ml	49.5 ml
Alcohol isoamilico	0.5 ml	1 ml
Total	50 ml	100 ml

Acetato de sodio 3 M (0.075 ml) (estéril)

Isopropanol (0.5 ml) (frío a -20°C)

Buffer de lavado (0.5 ml + 1.2 ml) (frío a -20°C)

Etanol 100% [76%]	38 ml	76 ml
Acetato de amonio 7.5 M [10 mM]	67 µl	133 µl
Total	50 ml	100 ml

Etanol 70% (0.5 ml + 1.2 ml) (frío a -20°C)

TE (0.2 ml + 0.05 ml)		(estéril)
Tris-HCl 1M pH 8.0 [10 mM]	0.5 ml	1 ml
EDTA 0.5 M pH 8.0 [1 mM]	0.1 ml	0.2 ml
Total (agua desion. est.)	50 ml	100 ml

RNAasa [10 µg/ml] (4 µl) (frío a -20°C)

Buffer para Glassmax (0.05 ml):		(estéril)
Tris-HCl 1M pH 8.0 [50 mM]	2.5 ml	5 ml
NaCl 5 M [50 mM]	0.5 ml	1 ml
MgCl ₂ 1 M [10 mM]	0.5 ml	1 ml
Total (agua desion. est.)	50 ml	100 ml

Nal 6 M (0.45 ml) (estéril)

Referencias.

Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. Plant mol. Biol. Rep. 1:19-21.

Doyle, J.J., J.L Doyle, and L.H. Bailey. 1989. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12(1): 13-15.

Shure.

Life & Technologies 1998. Recombinant DNA techniques. Training center Workshop. Workshop January 1998, Mexico, D.F.

Simms, D., D., N, Guan, and K. Sitaraman. 1990. A novel spin cartridge for the rapid purification of small amounts of DNA. Focus 13(3):99-100.

EQUIPO Y MATERIALES DE APOYO REQUERIDO

Equipo requerido	Cantidad (unidades)
Cámara de Flujo Laminar	1
Autoclave	1
Agitadores y calentador magnético	2
Potenciómetro o pHmetro	1
Micropipeta 1000 I EPPENDORF, GILSON, SIGMA	2
Micropipeta 100 ó 200 I EPPENDORF, GILSON, SIGMA	2
Micropipeta 20 I GILSON, SIGMA	2
Micropipeta 10 µL	1
Micropipeta 1 µL	100
Mortero chico con pistilo RCM, LAB-TECH	100
Punta para micropipeta 100 ó 200-1000 I SIGMA pqte. 500	100
Punta para micropipeta 10 ó 20-200 I SIGMA pqte. 500	100
Punta para micropipeta <1-20 I SIGMA pqte. 500	100
Reloj de alarma digital	1
Termociclador	1
Microcentrifuga	1
Vortex	1
Baño de María	1
Espectrofotómetro	1
Campana de electroforisis	1
Fuentes de Poder para electroforesis	1
Sistema Documentador de Geles	1

Materiales de apoyo	Cantidad
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético 100 g	10 gr
Thiadiazuron 50 g	10 gr
6-bencil aminopurina 25 g	15 gr
Nitrato de amonio 500 g	1000 gr
Nitrato de potasio 500 g	1000 gr
Sulfato cuprico pentahidratado 250 g	500 gr
Sulfato ferroso heptahidratado 500 g	500 gr
Sulfato de magnesio heptahidrarado 500 g	500 gr
Sulfato de manganeso monohidratado 500 g	500 gr
Sulfato de cinc 500 g	500 gr
Cloruro de calcio dihidrato 500 g	500 gr
Cloruro de cobalto hexahidratado 250 g	500 gr
Yoduro de potasio 500 g	500 gr
Fosfato monobásico de potasio 500 g	500 gr
Molibdato de sodio dihidratado 500 g	500 gr
Ácido bórico 500 g	500 gr
Na ₂ EDTA (Acido etilendiaminotetraacético disódico) 500 g	500 gr
Myo - inositol 500 g	100 gr
Glicina 100 g	10 gr
Piridoxina 100 g	10 gr
Tiamina – HCl 100 g	10 gr
Ácido Nicotínico 100 g	10 gr
Antibioticos	50 gr
Fungicida (Kg)	2 Kg

Frascos para cultivar in vitro (Gerber)	1000 unidades
Cubeta 20 lt para desechos y tapas	4
Detergente biodegradable líquido y en polvo	2 lts
Embudo plástico	5
Detergente	4 kg
Agua desionizada 20 lt	5
Sacarosa 1 kg	4
Hidróxido de sodio 500 g	1
Etanol 96% 2 l	4
Dimetil sulfóxido (DMSO) 500 ml	1
Sanitas Caja de 1000 unidades	6
Nitrógeno líquido (cargas de 20 lts)	2
Termo grande y chico	1
Guantes de latex (4 por cada día de extracción).	8 cajas
Tubos eppendorf en frascos con tapa (estériles) (8 tubos por muestra)	1000 tubos
Gradillas para tubos eppendorf	2

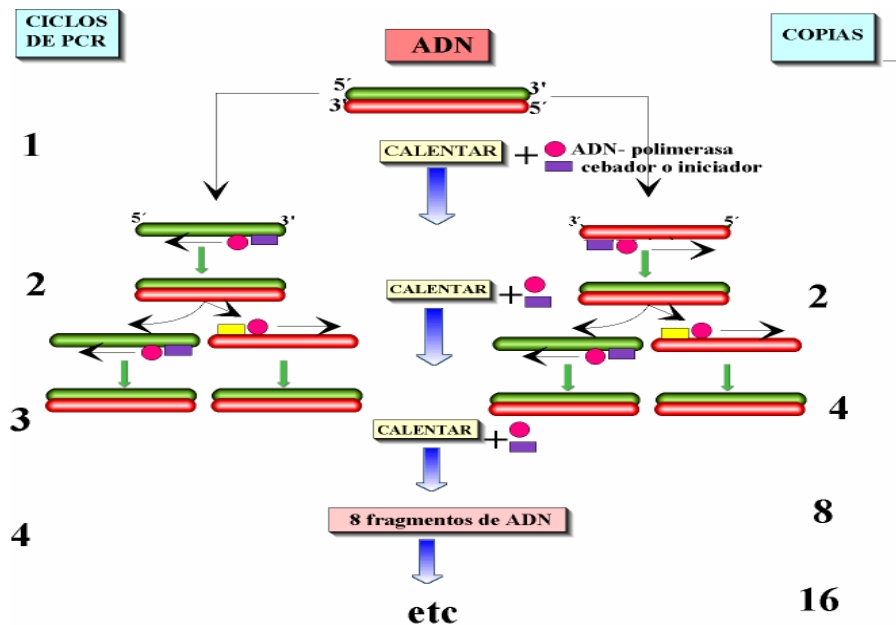
PRACTICA No 2: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

1. Introducción: La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR es una técnica que amplifica el ADN in vitro, utilizando una ADN polimerasa termoestable de procariotas termófilos. Las altas temperaturas se utilizan para desnaturalizar el DNA en dos moléculas monocatenarias, cada una de las cuales es copiada por la polimerasa.

En la reacción intervienen tres segmentos de ADN: el segmento de doble cadena que se quiere amplificar, y dos pequeños fragmentos de cadena sencilla, los oligonucleótidos (primers u oligos), que tienen la misma secuencia que los extremos flanqueantes del ADN molde. Además, participan en la reacción la enzima Taq polimerasa (Taq), deoxinucleótidos-trifosfato (dNTPs), sales, y un tampón. Los oligos se añaden a la reacción en exceso con respecto al ADN que desea amplificarse. Los oligos hibridarán con las regiones complementarias del ADN, quedando orientados con sus extremos 3' enfrentados, de modo que la síntesis mediante la ADN polimerasa (que cataliza el crecimiento de nuevas cadenas 5'-3') se extiende a lo largo del segmento de ADN que queda entre ellas. El primer ciclo de síntesis producirá nuevas cadenas, de longitud indeterminada, las cuales, a su vez, son capaces de hibridar con los oligos. Este tipo de productos se irá acumulando de forma geométrica, con cada ciclo de síntesis, utilizando como moldes las moléculas de ADN parental de la reacción. Durante el segundo ciclo de síntesis, las cadenas hijas servirán a su vez como moldes, generándose en este caso fragmentos cuyo tamaño será el del fragmento que engloba los extremos de ambos oligos. Estas nuevas cadenas hijas servirán de molde a su vez para sucesivos ciclos de síntesis. La cantidad de estos productos se duplica con cada ciclo, por lo que se van acumulando de forma exponencial. Al cabo de 30 ciclos, habrán aparecido 270 millones de estas moléculas, por cada una de ADN original que hubiese.

El primer paso necesario en este proceso de la síntesis es la desnaturalización del ADN. Puesto que el molde es una molécula de ADN de doble cadena, será necesaria la separación de estas para que los oligos puedan acceder a sus secuencias complementarias y unirse a ellas, en el siguiente paso, llamado de alineamiento ("annealing"). Una vez que los oligos se han unido a las cadenas, sirven como cebadores para la acción de la ADN polimerasa, la cual comienza a crear a partir de ellos nuevas cadenas de ADN complementarias, en el proceso de elongación. Estos tres pasos consecutivos (desnaturalización, alineamiento y elongación) constituyen un ciclo de síntesis.

En vez de una simple técnica, la reacción de PCR se ha convertido, en combinación con otros métodos, en una herramienta versátil y en la base de una revolución tecnológica en la genética molecular. El método de PCR se ha utilizado para detectar la presencia de mutaciones, para producir mutaciones in vitro, para diagnosticar enfermedades genéticas, para preparar ADN para su secuenciación, para identificar virus y bacterias en enfermedades infecciosas, para amplificar ADN de fósiles, para analizar defectos genéticos en gametos y en células aisladas de embriones y para muchas otras aplicaciones.



2. OBJETIVOS:

Aprender como es el manejo y desarrollo de la técnica de la PCR, así como conocer e interpretar los resultados de un producto de PCR

3. MATERIALES

- Micropipeta ajustable de 0.5 uL – 10 uL
- Micropipeta ajustable de 10 uL - 100 uL
- Puntas nuevas y estériles para micropipeta ajustable de 0.5 uL–10 uL (Blancas)
- Puntas nuevas y estériles para micropipeta ajustable de 10 uL–100 uL (Amarillas)
- Frascos con microtubos nuevos y estériles de 0.2 mL.
- Gradillas para microtubos
- Guantes
- Tapabocas

¡ Todo a la U.V. por 15 minutos !

3. PROCEDIMIENTO

Premezcla

Tapar y marcar cada tubo (Iniciales de la muestra y tipo de Amplificación) mas el Control negativo (-)

Agregar, en el mismo orden, las cantidades señaladas de: H₂O

Buffer

MgCl₂

dNTP's

Primers

Taq

Agregar a cada uno de los tubos (a excepción del control -) 1 μ L de ADN diluido.

Los cebadores usados para amplificar corresponden al gen 16S, que es uno de los marcadores genéticos universales para el análisis de comunidades microbianas es el gen ARN ribosomal 16S (ARNr 16S), la información de su secuencia se obtiene del ADN por ser mucho más fácil de procesar y secuenciar que el ARN (Pacheco y Sandoval, 2018)

Es el gen marcador más utilizado para perfilar comunidades microbianas (Tringe y Hugenholtz, 2008), mide aproximadamente 1500 pb y se compone de nueve regiones hipervariables V1-V9, separadas por nueve regiones altamente conservadas (Baker et al., 2003; Wang y Qian, 2009). Para la amplificación del gen 16S los primers 1492 reverse (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) y 27 forward (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) PCR (Nieto y Szpinak, 2017), 2.5 mM de MgCl₂, 1X *Buffer Taq*, 1U de *Taq* DNA polimerasa, 40 ng de ADN a un volumen final de 25 μ L (Nakajima et al., 1996).

Primer			
	[Stock]	[] / individuo	Vol./individuo (ul)
ADN	20 ng/ μ l		2 μ l
Taq	5 U/ μ l		0.2 μ l
Primer F	20 μ M		0.25 μ l
Primer R	20 μ M		0.25 μ l
dNTP's	1.25 mM		4 μ l
MgCl ₂	25 mM		2.5 μ l
Buffer	10X		2.5 μ l
H ₂ O			13.3 μ l
TOTAL			25

Complete la columna en blanco correspondiente a la concentración de cada reactivo por individuo

4.2 Corrida en el Termociclador

Proceed

Presionar la tecla <

Buscar el programa a emplear (16S) Proceed

El programa 16s corresponde a las siguientes condiciones: Programa de PCR para primer universal 16S (1492 reverse y 27 forward)

PASO	TIEMPO	TEMPERATURA	NUMERO DE CICLOS
Denaturación inicial	3 min	95°C	1
Denaturación	30 s	95°C	35
Anillamiento	40 s	58°C	
Extensión	2 min	72 °C	
Extensión final	5 min	72 °C	1

Considerando las condiciones de amplificación sugeridas en el inserto del kit PCR Master Mix (2X) se determinó la programación del termociclador.

Visualización:

- Geles de agarosa al 1.4%, 70 voltios, 1 hora.

Bibliografía

1. Barreto G., Cifuentes L. Guía de Laboratorios y Talleres de Biología Molecular. Universidad del Valle. 2007
2. Ferreira M., Grattapaglia D. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Ministerio de agricultura. Brasil. 1998.
3. NAKAJIMA, E; MATSUMOTO, T; YAMADA, R; KAWAKAMI, K; TAKEDA, K; OHNISHI, A; KOMATSU, M. 1996. Technical note: Use of a PCR-single conformation polymorphism (PCR-SSCP) for detection of a point mutation in the swine Ryanodine Receptor (RYR1) gene. *J. Anim. Sci.* 74 :2904-2906.
4. Sambrook J., Fritsch E.F, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition. 1989.

CUESTIONARIO

1. Teniendo en cuenta que la PCR es muy sensible a la presencia de cualquier ADN, que estrategias adoptaría para evitar amplificar ADN foráneo
2. Si su amplificado aparte del producto esperado presenta otras bandas inespecíficas que podría hacer usted para disminuir la presencia de estas bandas extra, teniendo en cuenta que el control negativo aparece libre de contaminación.
3. Si su después de llevar a cabo el proceso de amplificación usted no encuentra producto amplificado o encuentra muy poco que estrategias adoptaría para mejorar este resultado

PRACTICA NO. 3 del curso en Genetica molecular para pregrado ELECTROFORESIS HORIZONTAL (Corrimiento y visualización de ADN)

Introducción.

La Biología Molecular es una ciencia cuyo objetivo fundamental es la comprensión de todos aquellos procesos celulares que contribuyen a que la información genética se transmita eficientemente de un ser a otro y se exprese en nuevos individuos. Este conocimiento ha permitido cruzar barreras naturales entre especies y colocar genes de cualquier organismo en otro organismo huésped mediante el empleo de técnicas de ingeniería genética. Una de las consecuencias importantes de las cuales se derivada el desarrollo de la biología molecular, es la producción de fragmentos de ácidos nucleicos a gran escala abriendo así las puertas a la secuenciación de los ácidos nucleicos y por ende la generación de nuevas disciplinas, como el diagnóstico molecular, la terapia génica y la obtención de organismos recombinantes. La electroforesis en gel de agarosa es de las más utilizadas para analizar y caracterizar ácidos nucleicos de distintas procedencias. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de DNA de diferente tamaño van a emigrar de forma distinta en una electroforesis en gel de agarosa. Además, si en dicha electroforesis se aplican marcadores de peso molecular GeneRuler DNA (fragmentos de DNA de tamaño conocido) se puede calcular el tamaño aproximado del DNA en estudio.

El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. Muchas moléculas importantes biológicamente (aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos, etc.) poseen grupos ionizables y existen en solución como especies cargadas, bien como cationes, o bien como aniones. Estas especies cargadas se van a separar en función de su carga cuando se aplica un voltaje a través de los electrodos. Existen muchos tipos de electroforesis, que se engloban en dos categorías fundamentales:

- Electroforesis de frente móvil.
- Electroforesis de zona.

Actualmente, sólo se utiliza la electroforesis de zona, en la cual la muestra se desplaza sobre un soporte sólido, como papel de filtro, celulosa o gel (agarosa, acrilamida...) y los componentes de la muestra migran en forma de pequeñas bandas, también llamadas zonas. La electroforesis en gel es una técnica muy utilizada para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos.

Los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos nucleicos son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa. Estos geles se colocan en la cubeta de electroforesis, sumergidos en un tampón de pH alrededor de 8.0. De esta forma las moléculas de DNA o RNA sometidas a la electroforesis se desplazarán al polo positivo ya que a pH superiores a 5 poseen carga negativa. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de DNA de diferente tamaño, van a emigrar de forma distinta en un gel de electroforesis. La distancia recorrida por cada fragmento de DNA va a ser inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Es importante la utilización de marcadores de tamaño conocido porque nos permitirán calcular los pesos moleculares de las muestras de DNA problema. En el caso de los geles de agarosa, se le añade Ez Vision (antes Bromuro de Etidio) sustancia que se intercala entre las bases del DNA y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Tras la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se verán las bandas correspondientes a las muestras de DNA aplicado y los marcadores de peso molecular. El DNA problema que se va a analizar mediante electroforesis en gel de agarosa en esta práctica es DNA plasmídico. Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico, circular y de pequeño tamaño (entre dos y varios cientos de kilobases) que se encuentran en muchas especies bacterianas. Se caracterizan porque se replican de manera independiente del DNA cromosómico bacteriano, tienen su propio origen de replicación, y no son necesarios para la viabilidad general de la célula, pero pueden contener genes que contribuyan a la supervivencia en condiciones especiales, como los que confieren resistencia a antibióticos. Una determinada célula bacteriana puede no tener ningún plásmido o puede albergar un número variable de los mismos. Algunas clases de plásmidos poseen la propiedad conocida como “replicación relajada”, esto es, están presentes en forma de muchas copias por célula, lo que facilita enormemente su aislamiento y purificación.

Los objetivos fundamentales de esta práctica son familiarizarse con métodos de separación de ácidos nucleicos mediante electroforesis en geles de agarosa y Determinación de los tamaños moleculares mediante electroforesis en gel de agarosa, haciendo una recta patrón con fragmentos de DNA de peso molecular conocido.

MATERIALES

- 1 Vaso de precipitados 100 mL
- 1 Parrilla eléctrica
- 1 Micropipeta de 20 μ L
- 1 Pipeta graduada de 10 mL
- 1 Pipeta graduada de 5 mL
- 1 Equipo de electroforesis horizontal y componentes completos
- 1 Matraz aforado de 500 mL
- 1 Piceta con agua
- 1 Propipeta
- 1 Microespatula

Lámpara UV

REACTIVOS

- Trisma Base
- Ácido acético glacial
- Elilendiaminotetraacetato
- Rojo Texas, Muestras de ADN y marcador de peso molecular
- Agua desionizada
- Amortiguador de carga
- Agarosa (grado electroforesis)

Alumnos

- Guantes por cada integrante
- Papel adsorbente.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Preparación del amortiguador TAE 50X

Prepare solamente 100mL de solución amortiguadora de Tris-Acetato-EDTA (TAE) con la siguiente formulación la cual tiene una concentración relativa 50X; ésta solución alcanzara para todo el grupo.

TAE 50 X

Acido acético glacial	57 mL
EDTA 0.5M pH 8	100 mL
Tris base	242 g
Agua hasta	1000 mL



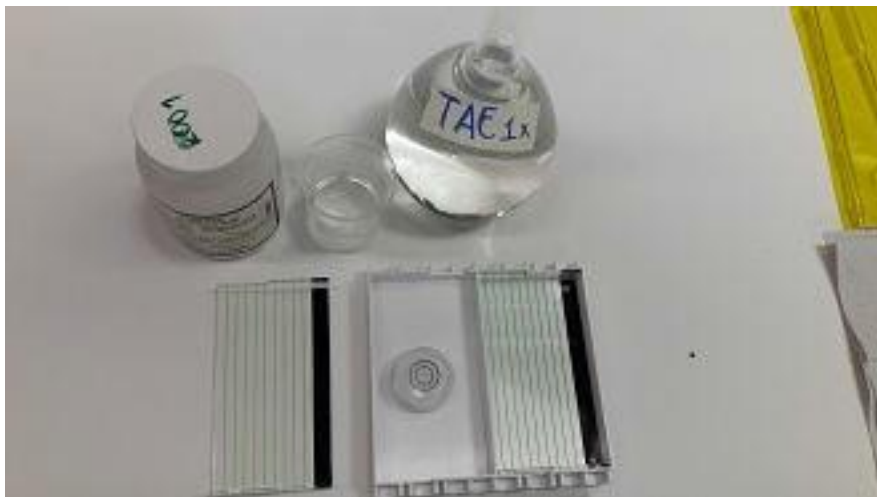
Para los fines de ésta práctica la solución TAE 50X será diluida por cada equipo, para preparar 500mL de TAE con una concentración relativa 1X. Efectúe los cálculos pertinentes para efectuar ésta solución.

Actividades preparativas

Coloque sobre la mesa cuidadosamente los aditamentos del equipo de electroforesis, recuerde que solo se ocuparan ciertas partes del equipo con son la bandeja de moldeado de geles, el peine, el tanque de corrimiento, la tapa del tanque, su regulador de voltaje y el cable de corriente.

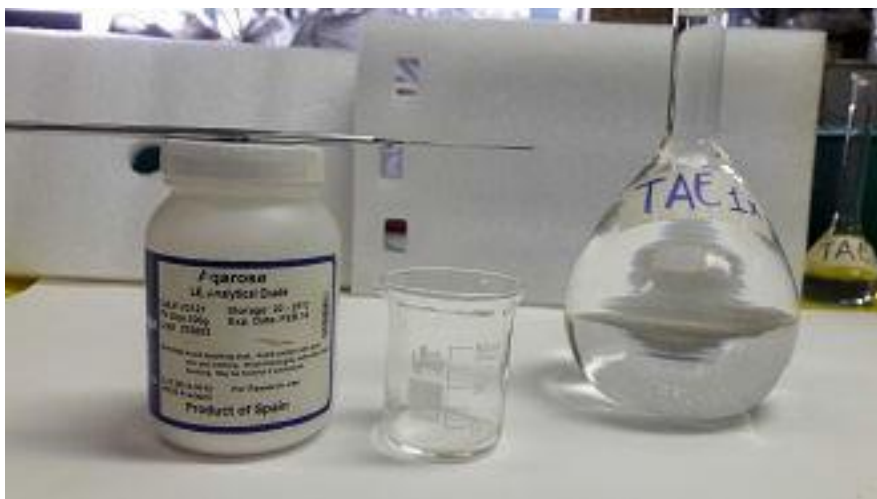


Sobre una superficie nivelada coloque la bandeja donde se elaborara el gel, ya que su espesor debe ser uniforme y permitirá que las muestras de ADN que se coloquen migren uniformemente. Coloque además la charola de moldeado donde depositara una solución de agarosa



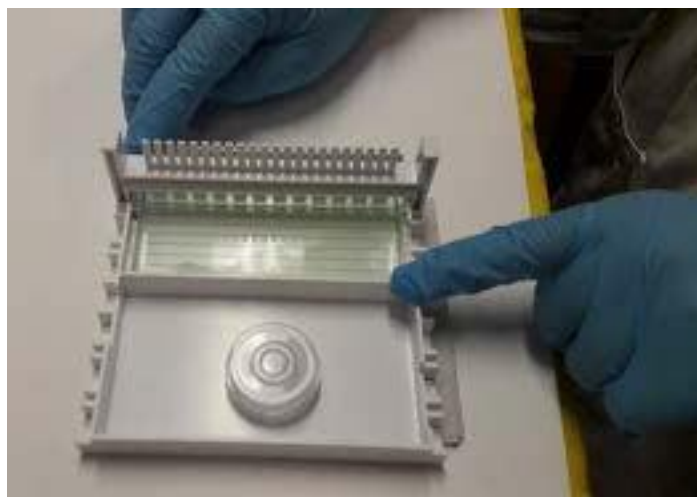
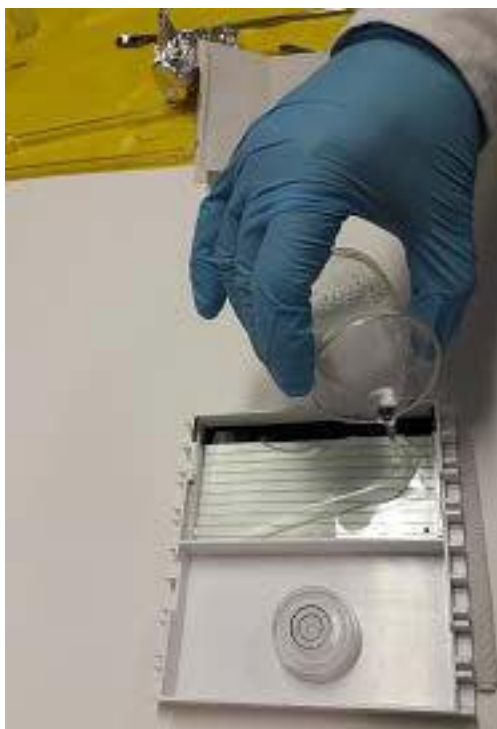
Preparación del gel de electroforesis

Prepare en un vaso de precipitados de 100 mL, una solución de 25 mL de agarosa al 1.0% p/v en solución TAE 1X. Para disolver la agarosa deberá calentar la solución con agitación.

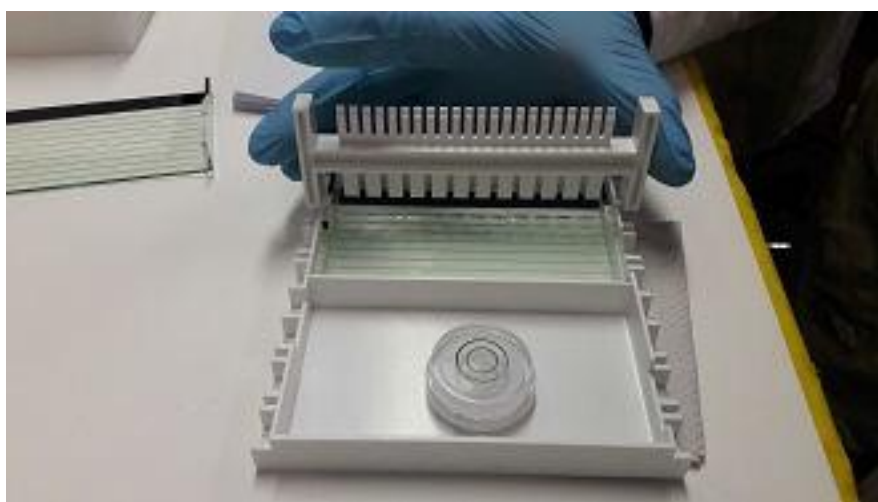


Cuando la solución se encuentre menos caliente deposite lentamente la solución de agarosa sobre la charola de moldeado. Los 25mL de solución son suficientes como para que el grosor del gel tenga

un espesor de 4 mm y coloque inmediatamente el peine. Efectué ligera presión sobre la charola, hasta que el gel solidifique.



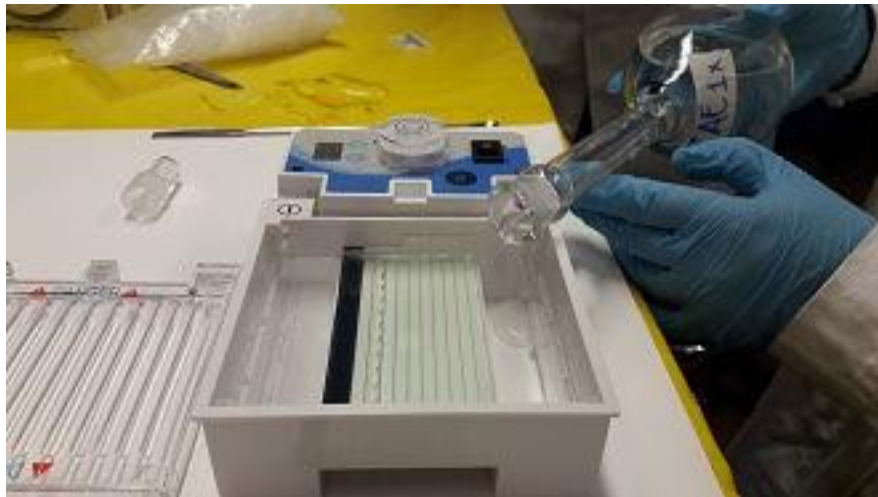
Una vez que el gel solidifico, retire cuidadosamente el peine, levantando en dirección vertical y cuidadosamente, Sujete los dos lados del peine y tire lentamente después de que el gel solidificó. Los pozos del gel deben ser formados y sin daños



Saque la charola de moldeado junto con el gel y colóquelos en el tanque de corrimiento. Observe bien el cátodo (+) y ánodo (-) y el sentido en el que colocarán para que la muestras migren adecuadamente.



Vierta la solución amortiguadora a un nivel de aproximadamente 3 mm por encima de la superficie del gel. Se requieren 250-300 ml de amortiguador para que cubra totalmente la superficie del gel. Evite derramar amortiguador por fuera del tanque ya que al conectar puede sufrir un accidente de choque eléctrico. Si existe derrame, seque adecuadamente



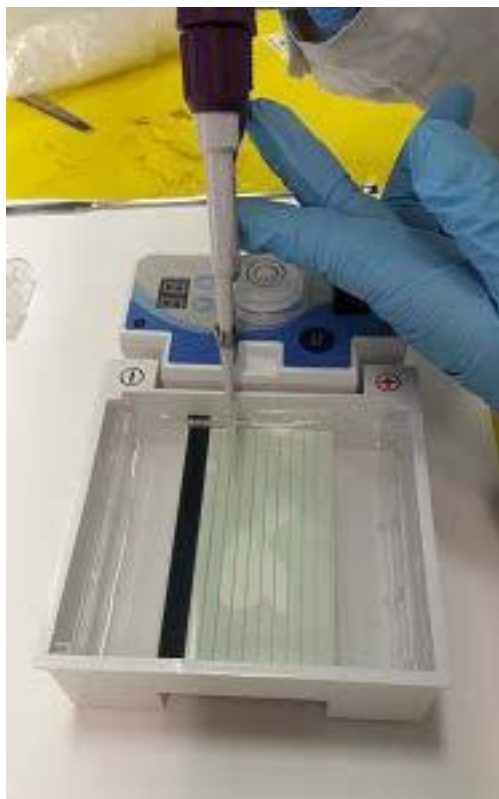
Observación: La migración puede verse afectada si el tanque de migración no se coloca sobre una superficie nivelada

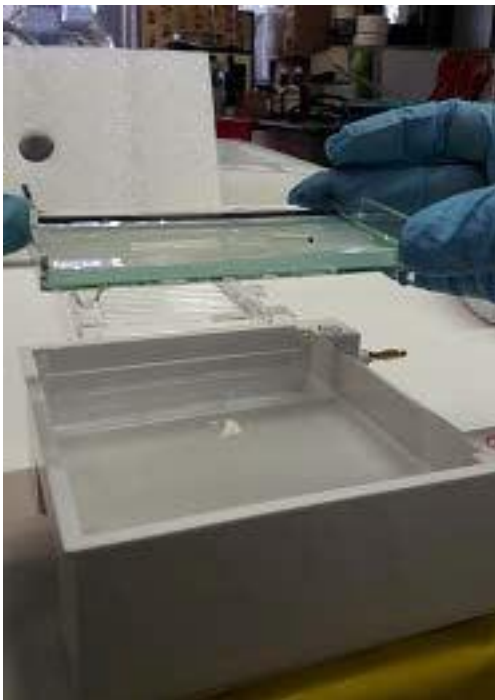
Preparación de las muestras

Como últimos pasos, prepare sobre un pliego pequeño de parafilm las muestras que serán colocadas en cada uno de los pozos del gel. Las muestras están compuestas de una mezcla de 0.20 μL de una solución de Rojo Texas que actuará como agente de revelado, 0.3 μL de amortiguador de carga que actuará como marcador de avance y 0.2 μL de ADN o de marcador de peso molecular. Esto se efectúa con una micropipeta de 5 μL , absorbiendo varias veces y posteriormente se deposita la muestra en cada pozo. Se debe tener cuidado de observar donde quedan cada uno de los pozos y anotar en el cuaderno, la disposición de cada uno de ellos. Evite picar el gel, con la micro punta de la pipeta ya que esto impedirá que exista un buen desarrollo y migración de las muestras.

Corrimiento de las muestras y revelado

Una vez terminado el proceso de carga de las muestras tape el tanque de migración, cerciórese de que no existan derrames de líquido y conecte la fuente a la corriente eléctrica y programe la cámara en el voltaje adecuado aproximadamente 90 Volt sy el tiempo aproximado de 30 minutos. Deberá vigilar el corrimiento hasta que alcance $\frac{3}{4}$ parte del gel o más evitando que se salga el marcador de avance.





Después de la operación, apague la alimentación, abra la tapa y saque la bandeja de gel. El gel obtenido se visualiza en el fotodocumentador Enduro o lo puede visualizar con una lámpara UV, deberán observarse las bandas de ADN tanto de las muestras como del marcador de peso molecular. Puede tomar fotos como evidencia del gel

Limpieza del equipo

Cuando limpie la superficie del equipo, utilice el paño húmedo, cerciórese de no utilizar cualquier limpiador corrosivo y desconectar la energía. Cuando limpie el tanque de la migración, separe por favor la caja de control primero, utilice simplemente el agua o el limpiador neutro.

Hay un electrodo de platino en la parte inferior del tanque de migración, es delicado, tenga cuidado de no romper por la limpieza. La limpieza del equipo para gelificar, bandeja de gel y peines se efectúa con agua o limpiador neutro.

Análisis de Resultados

A partir de una fotografía, compare la migración del marcador de peso molecular (PM) y de sus diferentes bandas que lo componen, con el de las muestras problemas y efectúe el cálculo del R_f (factor de migración).

Para ello investigue primeramente el peso molecular de cada banda en el marcado en unidades de pares de bases (pb) y fabrique una gráfica del $\log_{10}$ PM contra el R_f de cada banda.

Obtenga los parámetros de la pendiente e intersección al eje y diseñe la ecuación de regresión lineal. Por último calcule el peso molecular de sus muestras problema por intrapolación a esta curva o despejando de la ecuación el peso molecular y sustituyendo el R_f de sus muestras problema.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué es la electroforesis y cuál es el fundamento de ésta técnica?
2. ¿Cuáles son los principales tipos de electroforesis que existen?
3. Durante la electroforesis ¿qué pasa con los ácidos nucleicos?
4. ¿Cómo actúa el bromuro de etidio en comparación con el EzVision sobre el revelado del ADN?
5. ¿Qué ventajas tiene la agarosa sobre la proliacrilamida?

REFERENCIAS

- Aaij C. y P. Borst. 1972. The gel electrophoresis of DNA. *Biochimica and Biophysica Acta* 269: 192- 200.
- Cann J. R. 1989. Phenomenological theory of gel electrophoresis of protein-nucleic acid complexes. *Journal of Biological Chemistry* 264: 17032-17040.
- Sambrook J. y D. W. Russell. 2001a. Molecular cloning: a laboratory manual. Vol1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE.UU., pp. 5.61-5.64
- Sambrook J. y D. W. Russell. 2001b. Molecular cloning: a laboratory manual. Vol1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE.UU., pp. 5.65-5.67
- Sambrook J. y D. W. Russell. 2001c. Molecular cloning: a laboratory manual. Vol1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE.UU., pp. 5.68-5.70
- Sharp E. A., B. Sugden y J. Sambrook. 1973. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12: 3055-3063
- Thorne H. Y. 1966. Electrophoretic separation of polyoma virus DNA from host cell DNA. *Virology* 29: 234-239.