



Biología Molecular

Guías de

Laboratorio



Visión

Ser la mejor organización de educación superior posible para unir personas e ideas que buscan hacer realidad sueños y aspiraciones de prosperidad en un entorno incierto

Misión

Somos una universidad privada, innovadora y comprometida con el Somos una organización de educación superior que conecta personas e ideas para impulsar la innovación y el bienestar integral a través de una cultura de pensamiento y acción emprendedora

Universidad Continental

Material publicado con fines de estudio

ASUC01157



Índice

VISIÓN	2
MISIÓN	2
NORMAS BÁSICAS DE LABORATORIO	3
ÍNDICE	4

Primera unidad

POTENCIAL DE HIDRÓGENO (pH)	5
PROTEÍNAS	9
ENZIMAS	12

Segunda unidad

USO Y MANEJO DE MICROPIPETAS	17
EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA	21
VERIFICACIÓN DE LA CALIDAD DE ADN: TÉCNICA DE ELECTROFORESIS	24

Tercera unidad

VERIFICACIÓN DE LA CALIDAD DE ADN: TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRÍA	27
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA: PCR CONVENCIONAL	30
USO DE ADN LADDER, ELECTROFORESIS Y REVELADO DE PRODUCTOS DE PCR	34



MODELO DE INFORME DE PRÁCTICA EN EL LABORATORIO

I. Carátula:

- 1.1 Universidad, Facultad y Escuela Académico Profesional:
- 1.2 Semestre:
- 1.3 Título del informe (el de la guía de experimentación)
- 1.4 Curso: Biología Molecular
- 1.5 Docente:
- 1.6 Estudiante: (nombres y apellidos)
- 1.7 Fecha de entrega: (según lo acordado con el docente-una semana después de la práctica de laboratorio)

II. Objetivos (Copie los objetivos de la guía de experimentación)

III. Fundamento teórico (Complemente el fundamento científico de la guía de experimentación)

IV. Equipos, materiales y reactivos (Dibuje y coloque el nombre de los equipos, materiales y reactivos, que utilizó durante la experimentación. En su defecto se puede incluir fotografías de los diversos materiales utilizados)

V. Procedimientos (Explique por escrito y en forma gráfica cada experimento realizado)

VI. Resultados (Elabore una tabla en la que se especifiquen: el número de experimento, título del experimento y resultados particulares)

VII. Conclusiones (3 como mínimo)

VIII. Cuestionario (Estas preguntas se encuentran en la parte final de la guía de experimentación, respóndalas en forma concreta y clara)

IX. Referencias bibliográficas (en orden alfabético)

Ejemplo:

Karp, G. (2011). Biología Celular y Molecular. Conceptos y experimentos. 6ª ed. México D. F.: Mc Graw Hill.

EL INFORME DEBE SER:

- Compuscrito
- Grupal
- Entregado en la fecha y hora indicada por el docente, en un fólder manila de color celeste, forrado: *fólder de informes de práctica en el laboratorio.*
- Preciso
- Ordenado
- Limpio



Guía de laboratorio N° 1

Potencial de Hidrógeno (pH)

Sección :	Docente:
Fecha :/...../.....	Duración: 2 horas

Instrucciones: Realice la siguiente práctica de laboratorio formando grupos, en forma limpia y ordenada. Respete las normas de bioseguridad. Ante cualquier duda consulte con el docente y registre toda la información que puede de los diferentes experimentos desarrollados, puesto que esta información deberá ser considerada al redactar el respectivo informe grupal. Los equipos, instrumentos, materiales y reactivos descritos corresponden a cada grupo ¡Realizar prácticas de laboratorio es empezar a hacer ciencia!

1. Objetivo

- Identificar el carácter ácido y básico de fluidos biológicos o relacionados a estos.
- Medir el pH de algunos fluidos biológicos.

2. Fundamento Teórico

Según Bronsted- Lowry: Ácido es toda sustancia capaz de donar iones hidrogeniones [H⁺], en tanto base es toda sustancia capaz de aceptarla, o que de manera complementaria contiene una alta concentración de iones oxhidrilo [OH⁻].

En relación con esta definición, es menester destacar que muchos procesos biológicos son reacciones ácido- base en solución acuosa; por ejemplo, la acidez del jugo gástrico es importante para la digestión, en tanto la basicidad (alcalinidad) es vital para el transporte de oxígeno.

El pH, potencial de hidrógeno, es una medida de la acidez o alcalinidad de una solución, en este caso, biológica. Dado que las concentraciones de ión H⁺ y OH⁻ son muy pequeñas, para hacer más manejables estas se definen como:

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

Teniendo como parámetro de referencia la constante de ionización de 1L de agua pura a 25°C, el rango de pH va de 0 a 14. Si es inferior a 7, la solución es ácida; si es 7 es neutra, y si es mayor de 7, la solución es básica.

Como toda dualidad, existen sustancias que poseen la característica de actuar como ácidos o bases, dadas ciertas circunstancias, con la finalidad de mantener constante cierto nivel de pH. Estas sustancias se denominan AMORTIGUADORES O BUFFERS (bicarbonato y fosfatos, por ejemplo). Para preparar buffers se suele utilizar la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

Cualquier variación de pH, puede ocasionar muerte celular localizada o generalizada. Si varía el pH sanguíneo, el cual debería ser de 7,35 a 7,45, se produce un desequilibrio conocido como acidosis o alcalosis que puede ser a su vez metabólica o respiratoria.

El Biología Molecular, el conocimiento del pH es importante, porque este influye en la estructura de las proteínas, la actividad enzimática, la configuración de los ácidos nucleicos, la calidad del agua y diversas soluciones necesarias para diversos protocolos, así como la preparación del gel de agarosa o poliacrilamida que permiten la migración de marcadores moleculares de ADN o ARN.



3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Potenciómetro	Dos dígitos de sensibilidad	1

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos de ensayo	6 x 100 mL	1
2	Gradilla	Metálico/Para 24 tubos	1
3	Probeta	50 mL	1
4	Varilla de vidrio	Borosilicato	1
5	Pipeta (o gotero de vidrio)	5 mL	1

3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Cinta de pH	De 0.5 de escala	10
2	Papel de tornasol	Tira	10
3	Agua destilada	Químicamente pura	2 mL
4	Fenoltaleína	Líquida/comercial	1 mL
5	Amoniaco	1 mL en 100 mL de agua destilada	2 mL
6	Jugo gástrico	De rumiante	2 mL
7	Bilis	De rumiante	2 mL
8	Zumo de limón	Zumo filtrado	2 mL
10	Saliva	recolectado a intervalos de las horas de comida con 2 días de anticipación	2 mL
11	Lágrimas o sudor	Recolectado de alumnos	2 mL

4. Indicaciones/instrucciones:

- El trabajo es grupal, pero cada estudiante debe portar su propio manual de guías de laboratorio (guías de experimentación).
- Siempre se debe vestir mandil y se deben respetar las reglas de bioseguridad inherentes a la práctica, las cuales también serán indicadas por el docente.
- Antes de cada práctica, un representante de cada grupo de trabajo debe pedir los equipos, instrumentos, materiales y reactivos necesarios a los jefes de laboratorio y reunir otros diversos materiales solicitados con anticipación a los estudiantes. Sólo si se cuentan con todos los materiales solicitados, el grupo podrá empezar la práctica.
- Durante la práctica, se debe mantener el orden, la limpieza y la disciplina. Se deben registrar diversos datos que se vayan obteniendo en los experimentos, así como tomar las fotografías necesarias. Ante cualquier duda se puede consultar con el profesor.
- El estudiante se debe desconectar de las redes sociales mientras dure la práctica experimental. Se debe seleccionar la opción de vibrador en el celular.
- Al final de la práctica, los estudiantes deben hacer firmar la respectiva guía de laboratorio según el modelo de informe de guía de laboratorio entregado por el profesor. Este informe es grupal, se evalúa según una lista de cotejo y se entrega cada semana inmediatamente antes de empezar a desarrollar la siguiente práctica de laboratorio.

5. Procedimientos:

- Primero:** Prepare las muestras antes de identificar su pH de la siguiente manera:
- Jugo gástrico: muestra normal
 - Zumo de limón: contenido filtrado
 - Orina: muestra normal



- Saliva: muestra normal (recolectado a intervalos de las horas de comida con 2 días de anticipación)
- Lágrimas o sudor: muestra normal
- Bilis: muestra normal
- Agua destilada: muestra normal
- Amoniaco: 1mL en 100mL de agua qp

Segundo: Tenga en cuenta el siguiente cuadro para proceder a medir la acidez, neutralidad o alcalinidad y pH de los fluidos orgánicos preparados en el orden indicado.

Muestra	Papel tornasol		Fenolftaleína		Cinta de pH			Potenciómetro		
	A	B	A	B	A	N	B	A	N	B
Jugo gástrico										
Zumo de limón										
Bilis										
Orina										
Lágrimas										
Sudor										
Agua destilada										
Saliva										
Amoniaco										

A: Acido

N: Neutro

B: Básico (alcalino)

6. Resultados

Registre los valores y observaciones en la tabla mostrada anteriormente.

7. Conclusiones

.....
.....
.....

8. Cuestionario

- ¿Cuál es el pH de una solución biológica cuyo $[H^+]$ es 10^{-8} mol/L?
- ¿Cuál es el pH de una muestra de orina cuya concentración de iones H^+ es $6,4 \times 10^{-8}$ mol/L? ($\log 2 = 0.301$)
- La alta concentración de iones H^+ puede dañar la mucosa del estómago, produciendo hemorragias, dolor, inflamación y contracción muscular. Proponga una alternativa de solución a este hecho utilizando la teoría ácido- base y pH.



Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Lehninger, Nelson, D, Cox, M. Principios de bioquímica. 5ª ed. Barcelona.: Omega.
- Karp, G. (2011). Biología Celular y Molecular. Conceptos y experimentos. 6ª ed. México D. F.: Mc Graw Hill.



Guía de laboratorio N° 2

Proteínas

Sección : Docente:

Fecha :/...../..... Duración: 2 horas

Instrucciones: Realice la siguiente práctica de laboratorio formando grupos, en forma limpia y ordenada. Respete las normas de bioseguridad. Ante cualquier duda consulte con el docente y registre toda la información que puede de los diferentes experimentos desarrollados, puesto que esta información deberá ser considerada al redactar el respectivo informe grupal. Los equipos, instrumentos, materiales y reactivos descritos corresponden a cada grupo ¡Realizar prácticas de laboratorio es empezar a hacer ciencia!

1. Objetivo

- Identificar y reconocer proteínas a través de la prueba de Biuret y desnaturalización.

2. Fundamento Teórico

Las proteínas son componentes orgánicos, básicamente cuaternarios: C, H, O y N, aunque a veces contienen átomos de P, S, Fe y Ca. Estos principios inmediatos orgánicos son el producto de la organización de varias estructuras básicas, denominadas aminoácidos, las cuáles se unen a través de enlaces peptídicos. Todo aminoácido químicamente es un aminocarboxilo.

Las proteínas adoptan diferentes grados de configuración, es decir de estructura, puede ser: primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. Todas estas son solubles en agua, a excepción de la primaria. Asimismo, cuando estas interactúan con el calor o algún agente orgánico pierden su configuración inicial y en consecuencia sus propiedades inherentes.

Las funciones que desempeñan las proteínas en un organismo son variadas, entre ellos tenemos: estructural (queratina), de transporte (hemoglobina), de contracción (actina y miosina), de protección (interferón), hormonal (insulina), entre otros.

Conocer la secuencia de los aminoácidos es importante porque a partir de estas y teniendo en cuenta el código genético, se puede conocer la secuencia de nucleótidos que la genera, lo que generalmente corresponde a un gen.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos de ensayo	6 x 100 mL	1
2	Gradilla	Metálico/Para 24 tubos	1
3	Pinza para tubos	de madera o metal	1
4	Mechero	de ron	1
5	Pipeta (o gotero de vidrio)	5 mL	1

3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Alcohol etílico	96°	1 mL
2	NaOH	10%	1 mL
3	CuSO ₄	5%	4 mL
4	Agua	destilada	2 mL



5	Suero sanguíneo	obtenido a partir de un tubo rojo	1 mL
6	Huevo	de gallina/clara	7 mL
7	Leche	evaporada/comercial	1 mL
8	Soya	disuelto en agua	1 mL

4. Indicaciones/instrucciones:

- El trabajo es grupal, pero cada estudiante debe portar su propio manual de guías de laboratorio (guías de experimentación).
- Siempre se debe vestir mandil y se deben respetar las reglas de bioseguridad inherentes a la práctica, las cuales también serán indicadas por el docente.
- Antes de cada práctica, un representante de cada grupo de trabajo debe pedir los equipos, instrumentos, materiales y reactivos necesarios a los jefes de laboratorio y reunir otros diversos materiales solicitados con anticipación a los estudiantes. Sólo si se cuentan con todos los materiales solicitados, el grupo podrá empezar la práctica.
- Durante la práctica, se debe mantener el orden, la limpieza y la disciplina. Se deben registrar diversos datos que se vayan obteniendo en los experimentos, así como tomar las fotografías necesarias. Ante cualquier duda se puede consultar con el profesor.
- El estudiante se debe desconectar de las redes sociales mientras dure la práctica experimental. Se debe seleccionar la opción de vibrador en el celular.
- Al final de la práctica, los estudiantes deben hacer firmar la respectiva guía de laboratorio según el modelo de informe de guía de laboratorio entregado por el profesor. Este informe es grupal, se evalúa según una lista de cotejo y se entrega cada semana inmediatamente antes de empezar a desarrollar la siguiente práctica de laboratorio.

5. Procedimientos:

5.1. Prueba de Biuret: es consecuencia de una reacción típica de enlaces peptídicos. Las proteínas estando en un medio fuertemente alcalino (NaOH) y en presencia de sulfato cúprico, reaccionan con el hidróxido cúprico, formado por el NaOH y el CuSO₄, para formar a su vez el complejo Biuret – cupro – sódico que se manifiesta con una coloración rosa – violácea.

Disponga los materiales de acuerdo con la estructura de la siguiente tabla; luego, anote los resultados que observó con criterio crítico.

Tubo N°	Muestra	Añadir	Agregar	Lo que se indica	Resultados
1	Albúmina de huevo 1 mL	NaOH 10% (0,5 mL)	CuSO ₄ 1% (1 mL)	Agitar	
2	Albúmina de soya 1 mL				
3	Suero sanguíneo 1 mL				
4	Leche 1 mL				

5.2. Desnaturalización: las proteínas se caracterizan por ser básicamente hidrofílicas (solubles en agua), esto es notable en las estructuras secundaria y terciaria que poseen. Sin embargo, cuando son sometidas a la acción del calor o cambios de pH, estas proteínas pierden sus respectivas estructuras, pasando a adquirir una naturaleza filamentosas, hidrofóbica (insoluble en agua), primaria.

Organice e interrelacione las muestras y materiales, según las especificaciones del siguiente cuadro, y las indicaciones del docente:



Tubo Nº	Muestra	Agregar	Lo que se indica	Resultados
1	Albúmina de huevo 1 mL	Agua destilada 1 mL	Agitar	
2	Albúmina de huevo 1 mL	--	Calentar suavemente	
3	Albúmina de huevo 1 mL	NaOH Concentrado (gotas)	--	
4	Albúmina de huevo 1 mL	Alcohol etílico (0,5 mL)	Agitar	
5	Albúmina desnaturalizada	Agua destilada (1 mL)	Agitar	

6. Resultados

- Registre los valores y observaciones en las tablas mostradas anteriormente.
- En la primera tabla, base sus resultados de acuerdo con la coloración obtenida.
 - En la segunda tabla, base sus resultados de acuerdo con la consistencia obtenida.

7. Conclusiones

.....
.....
.....

8. Cuestionario

- ¿Cuál es el mecanismo de reacción química de la prueba de Biuret?
- ¿Por qué se dice que algunos aminoácidos son levógiros y otros dextrógiros?
- Cierta proteína X, está formada por 600 aminoácidos ¿Qué pasará con esta proteína al reaccionar con agua, sabiendo que su estructura es terciaria y que pasará con ella si fuera sometida a un campo magnético? Justifique sus respuestas.

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Lehninger, Nelson, D, Cox, M. Principios de bioquímica. 5ª ed. Barcelona.: Omega.
- Santos, J. (2009). Las proteínas: Estructuras fascinantes. Recuperado de <https://booksmedicos.org/las-proteinas-estructuras-fascinantes/> [Consulta: 03 de diciembre de 2018].



Guía de laboratorio N° 3

Enzimas

Sección : Docente:

Fecha :/...../..... Duración: 2 horas

Instrucciones: Realice la siguiente práctica de laboratorio formando grupos, en forma limpia y ordenada. Respete las normas de bioseguridad. Ante cualquier duda consulte con el docente y registre toda la información que puede de los diferentes experimentos desarrollados, puesto que esta información deberá ser considerada al redactar el respectivo informe grupal. Los equipos, instrumentos, materiales y reactivos descritos corresponden a cada grupo ¡Realizar prácticas de laboratorio es empezar a hacer ciencia!

1. Objetivos

- Comprobar que la digestión química es una función básicamente enzimática.
- Comprobar la función de algunas enzimas, así como el efecto de la temperatura y pH sobre ellas.

2. Fundamento Teórico

Una enzima es una proteína básicamente globular, de naturaleza catalizadora, es decir, que permite acelerar las reacciones bioquímicas, y asimismo disminuir la energía de activación de éstas, por esto mismo y su trascendencia en los organismos se denomina BIOCATALIZADORES. Toda enzima actúa sobre un sustrato, en particular, de ahí su especificidad y cuando lo hace es para polimerizarlo o despolimerizarlo según las necesidades biológicas. Por ejemplo: la α -amilasa salival actúa sobre el almidón, dando como productos residuos de glucosa y maltosa; el jugo gástrico posee una enzima llamada pepsina la cual despolimeriza proteínas y la catalasa es una enzima que evita la intoxicación celular, inducida por la presencia de agua oxigenada, convirtiendo esta en oxígeno y agua. Además, las enzimas gozan de otra propiedad importantísima que consiste en que pueden ser reutilizables.

Sin embargo, como las enzimas son proteínas son afectadas al igual que estas por variaciones de temperatura y pH, y en consecuencia también son afectadas sus estructuras y funciones biológicas.

Toda enzima sigue el siguiente mecanismo de acción: Reconocimiento- Formación de complejo-Catálisis-Formación de productos.

Según la Unión Internacional de Bioquímica (UIB) las enzimas se pueden clasificar en las siguientes familias: hidrolasas, ligasas, transferasas, óxido-reductasas, liasas e isomerasas.

Las enzimas se obtienen a partir de modificaciones postraduccionales de enzimas precursoras, conocidas también como zimógenos. En general, podría concluirse que las casi todas las enzimas son proteínas, aunque no todas las proteínas son enzimas. Algunos ácidos nucleicos, como el ARN pueden ser enzimas, como las ribozimas.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Equipo de Bunsen	Mechero+trípode+rejilla	1

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos de ensayo	6 x 100 mL	1
2	Gradilla	Metálico/Para 24 tubos	1



3	Mechero	de ron	1
4	Varilla	vidrio	1
5	Vaso de precipitación	250 mL	1
6	Pipeta (o gotero de vidrio)	5 mL	1
7	Mortero y pilón	porcelana	1
8	Cronómetro	digital	1

3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Ron	comercial/azul	30 mL
2	Agua oxigenada	comercial	25 mL
3	Agua destilada	comercial	10 mL
4	Lugol	parasitológico	2 mL
5	HCl	1 N	1 mL
6	NaOH	1 N	1 mL
7	Jugo gástrico	De rumiante	2 mL
8	Hígado	De pollo	1
9	Tomate	Pequeño	2 mL
10	Saliva	recolectado a intervalos de las horas de comida con 2 días de anticipación	6 mL
11	Almidón	harina	5 g
12	Aceite	De cocina	2 mL

4. Indicaciones/instrucciones:

- El trabajo es grupal, pero cada estudiante debe portar su propio manual de guías de laboratorio (guías de experimentación).
- Siempre se debe vestir mandil y se deben respetar las reglas de bioseguridad inherentes a la práctica, las cuales también serán indicadas por el docente.
- Antes de cada práctica, un representante de cada grupo de trabajo debe pedir los equipos, instrumentos, materiales y reactivos necesarios a los jefes de laboratorio y reunir otros diversos materiales solicitados con anticipación a los estudiantes. Sólo si se cuentan con todos los materiales solicitados, el grupo podrá empezar la práctica.
- Durante la práctica, se debe mantener el orden, la limpieza y la disciplina. Se deben registrar diversos datos que se vayan obteniendo en los experimentos, así como tomar las fotografías necesarias. Ante cualquier duda se puede consultar con el profesor.
- El estudiante se debe desconectar de las redes sociales mientras dure la práctica experimental. Se debe seleccionar la opción de vibrador en el celular.
- Al final de la práctica, los estudiantes deben hacer firmar la respectiva guía de laboratorio según el modelo de informe de guía de laboratorio entregado por el profesor. Este informe es grupal, se evalúa según una lista de cotejo y se entrega cada semana inmediatamente antes de empezar a desarrollar la siguiente práctica de laboratorio.

5. Procedimientos

5.1. Acción de la amilasa salival (ptialina)

Recolección de saliva: El donante de saliva no debe haber ingerido comida durante un mínimo de 2 horas; antes de la recolección se procederá a hacer un enjuague bucal simple con agua; luego manteniendo la boca cerrada esperará entre 5 y 7 minutos, evitando hablar y pasar saliva. La recolección se realizará en un recipiente de vidrio, de boca ancha dejando caer por gravedad la saliva, evitando así la formación de espuma.

Disponga los materiales, reactivos y muestras según la estructura la estructura de la siguiente tabla y teniendo en cuenta las indicaciones del docente:



Tubo N°	Muestra	Agregar	Lo que se indica	Observaciones	
				Evid. química	Velocidad
1	Almidón	Saliva (5mL)	Baño maría 5 min 3 gotas de lugol		
2	Carne	Saliva (5mL)	Baño maría 5 min 3 gotas de lugol		
3	Aceite	Saliva (5mL)	Baño maría 5 min 3 gotas de lugol		
4	Hígado	Saliva (5mL)	Baño maría 5 min 3 gotas de lugol		

5.2. Acción del jugo gástrico (pepsina)

Proceda la experimentación teniendo en cuenta la estructura de la siguiente tabla y las indicaciones del docente:

Tubo N°	Muestra	Agregar	Lo que se indica	Observaciones	
				Evid. química	Velocidad
1	Almidón	Jugo gástrico	Baño maría 5 min		
2	Carne				
3	Aceite				
4	Hígado				

5.3. Acción de la catalasa:

Identificación de la catalasa: Proceda la experimentación teniendo en cuenta la estructura de la siguiente tabla y las indicaciones del docente.

Además tenga en cuenta que el desprendimiento de burbujas, se identifican con el concepto, índice de reacción, que adoptará los siguientes valores: 0=no hay reacción / 1=reacción lenta / 2=reacción rápida / 3=reacción muy rápida

Tubo N°	Muestra	Agregar	Lo que se indica	Observaciones	
				Evid. química	Índice de reacción
1	Almidón	Agua oxigenada (5mL)	Baño maría por 5 min		
2	Tomate				
3	Aceite				
4	Hígado				

- *Reutilización de la catalasa:* con una pipeta saque 1 mL del sobrenadante del tubo donde se observó la presencia de catalasa y proceda según las siguientes especificaciones:



Tubo N°	Muestra	Agregar	Someter a	Observaciones		
				Evid. Quím.	Índice de reacción	Tiempo
1	Hígado en trocitos	1° sobrenadante 1mL 2° agua oxigenada 5mL	Baño maría 5 min			
2	Hígado triturado					

- Desnaturalización de la catalasa: Siga las estructuras indicadas en las siguientes tablas:

a) Por acción del calor:

Tubo N°	Muestra	Agregar	Someter a	Lo que se indica	Añadir	Observaciones		
						E.Q.	Índice de reacción	t
1	Hígado en trocitos	Agua destilada 5mL	Calentamiento	Retirar al agua sobrenadante	Agua oxigenada 5mL			
2	Hígado triturado							

b) Por variación de pH:

Tubo N°	Muestra	Agregar	Agregar	Agregar	Observaciones		
					E.Q.	Índ. Rc.	t
1	Hígado en trocitos	HCl 1N 1mL	NaOH 1mL	Agua oxigenada 5mL			
2	Hígado triturado						

6. Resultados

- Registre los valores y observaciones en las tablas mostradas anteriormente.
- Elabore una gráfica: índice de reacción vs. acción de la catalasa.

7. Conclusiones

.....

.....

.....

8. Cuestionario

- ¿Cuáles son las ecuaciones químicas que describen las acciones enzimáticas de la amilasa, pepsina y catalasa sobre sus respectivos sustratos?
- ¿Qué son los cofactores enzimáticos?
- ¿Qué efectos tienen el HCl y NaOH en la alteración del pH?
- ¿Por qué se tienen que someter a baño maría algunas muestras?



Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Lehninger, Nelson, D, Cox, M. Principios de bioquímica. 5ª ed. Barcelona.: Omega.
- Karp, G. (2011). Biología Celular y Molecular. Conceptos y experimentos. 6ª ed. México D. F.: Mc Graw Hill.



Guía de laboratorio N° 4

Uso y manejo de micropipetas

Sección : Docente:

Fecha :/...../..... Duración: 2 horas

Instrucciones: Realice la siguiente práctica de laboratorio formando grupos, en forma limpia y ordenada. Respete las normas de bioseguridad. Ante cualquier duda consulte con el docente y registre toda la información que puede de los diferentes experimentos desarrollados, puesto que esta información deberá ser considerada al redactar el respectivo informe grupal. Los equipos, instrumentos, materiales y reactivos descritos corresponden a cada grupo ¡Realizar prácticas de laboratorio es empezar a hacer ciencia!

1. Objetivos

- Utilizar las micropipetas de manera correcta.
- Verificar el funcionamiento de micropipetas utilizando el método gravimétrico.

2. Fundamento teórico

Las pipetas son instrumentos que permiten cargar volúmenes específicos de líquidos, que pueden ser de vidrio o plástico. Cuando los volúmenes a cargar son relativamente pequeños, del orden de microlitros (μL) por ejemplo, a las pipetas se les denomina micropipetas. Se destacan las pipetas de volumen fijo y las de volumen variable, las cuales en general disponen de controles mecánicos. También se han introducido recientemente en el mercado pipetas que disponen de controles de tipo electrónico.

La pipeta mecánica o de pistón funciona generalmente transmitiendo la fuerza que un operador, de forma manual, ejerce sobre un émbolo que se encuentra unido a un pistón mediante un eje que lo desplaza a lo largo de un cilindro de longitud fija, forzando un volumen predefinido de líquido fuera de la pipeta. En el laboratorio de biología molecular se suelen utilizar las micropipetas mecánicas por desplazamiento de aire.

Sin embargo, el constante uso de las micropipetas y su falta de mantenimiento puede hacer que las micropipetas se vuelvan imprecisas y pierdan veracidad. Una manera de comprobar la imprecisión consiste en la realización de mediciones repetidas de un mismo volumen de pipeteo en condiciones controladas de temperatura. Al obtener un valor de imprecisión mayor al permitido por el fabricante, se estarán cargando volúmenes erróneos que pueden alterar los experimentos.

El método más común de verificación de funcionamiento de las micropipetas es el método gravimétrico que se basa en el hecho de que 1 mL de agua ap. equivale a 1 g de la misma.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Balanza analítica	Resolución menor a 0.001g	1
2	Termómetro digital	Con sensor extensible y pantalla de lecturas de temperaturas	1
3	Cronómetro	digital	1



3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Vaso de precipitación (beaker)	Vidrio/50 mL	1
2	Tips (puntas)	Graduadas: Blancas/Amarillas/Azules	2 c/u
3	Microtubos	1.5 mL/base plana	1
4	Micropipetas	100-1000 μ L/50-200 μ L/0.5-10 μ L	1 c/u
5	Manuales	Límites para precisión	1 de cada micropipeta

3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Agua destilada	comercial	10 mL

4. Indicaciones/instrucciones:

- El trabajo es grupal, pero cada estudiante debe portar su propio manual de guías de laboratorio (guías de experimentación).
- Siempre se debe vestir mandil y se deben respetar las reglas de bioseguridad inherentes a la práctica, las cuales también serán indicadas por el docente.
- Antes de cada práctica, un representante de cada grupo de trabajo debe pedir los equipos, instrumentos, materiales y reactivos necesarios a los jefes de laboratorio y reunir otros diversos materiales solicitados con anticipación a los estudiantes. Sólo si se cuentan con todos los materiales solicitados, el grupo podrá empezar la práctica.
- Durante la práctica, se debe mantener el orden, la limpieza y la disciplina. Se deben registrar diversos datos que se vayan obteniendo en los experimentos, así como tomar las fotografías necesarias. Ante cualquier duda se puede consultar con el profesor.
- El estudiante se debe desconectar de las redes sociales mientras dure la práctica experimental. Se debe seleccionar la opción de vibrador en el celular.
- Al final de la práctica, los estudiantes deben hacer firmar la respectiva guía de laboratorio según el modelo de informe de guía de laboratorio entregado por el profesor. Este informe es grupal, se evalúa según una lista de cotejo y se entrega cada semana inmediatamente antes de empezar a desarrollar la siguiente práctica de laboratorio.

5. Procedimientos

5.1. Pipeteo

1. Identifique el volumen máximo y mínimo que puede transferir la micropipeta.
2. Seleccione un volumen girando la perilla de ajuste.
3. Coloque un tip compatible sin golpear la micropipeta contra la puntera del tip.
4. Presione con el dedo pulgar, el pulsador hasta el **primer tope** y manténgalo presionado.
5. Sumerja la punta del tip en el agua, aproximadamente, 3 – 5 mm.
6. Deje que el pulsador retroceda lentamente y de manera constante.
7. Mantenga la micropipeta con el tip lleno siempre en posición vertical.

Opcional: con la ayuda de un cronómetro compruebe si se forma una gota (hasta 10 segundos).

8. Transfiera el volumen de agua colocando la punta del tip cerca de la pared del microtubo de 1.5 mL y presione el pulsador despacio hasta el **segundo tope**. Repita el procedimiento hasta no dejar residuos de agua en los tips.
9. Expulse el tip en el tacho de desecho oprimiendo el émbolo expulsador.

Importante: Repita los procedimientos hasta que su pipeteo sea uniforme para garantizar una buena volumetría en futuros experimentos cuantitativos.

5.2. Verificación de función de micropipetas por método gravimétrico

1. Tempere las micropipetas y materiales dejándolos sobre la superficie de trabajo por lo menos una hora antes de empezar los procedimientos de verificación.
2. Mida y registre la temperatura del agua de ensayo.
3. Cambie el volumen nominal (V nominal) de la pipeta al mayor volumen (100%).



Tipo de micropipeta	Volumen nominal del 100%	Volumen nominal del 50%	Volumen nominal del 20%
p-1000	1000 μL	500 μL	200 μL
p-200	200 μL	100 μL	40 μL
p-20	20 μL	10 μL	4 μL

- Coloque el beaker limpio sobre la balanza y tárela a cero.
- Coloque un tip nuevo.
- Oprima el pulsador hasta su primer tope.
- Sumerja la punta del tip en el envase con agua destilada.
- Deje retroceder el pulsador lentamente y de manera uniforme.
- Abra la puerta de la balanza y dirija la micropipeta al beaker.
- Transfiera el agua al interior del beaker.
- Registre el valor de la masa que aparece en el display de la balanza.
- Vuelva a tarar la balanza.
- Repita el paso 5 hasta obtener diez lecturas para cada valor nominal.

6. Resultados

6.1. Cálculo y análisis de los resultados del control gravimétrico

- Registre los pesajes volumétricos:

Nº de pesada	Masa nominal al 100% (m=g)	Masa nominal al 50% (m=g)	Masa nominal al 20% (m=g)
X ₁			
X ₂			
X ₃			
X ₄			
X ₅			
X ₆			
X ₇			
X ₈			
X ₉			
X ₁₀			

- Efectúe los siguientes cálculos:

- Valor medio de las pesadas (\bar{X})

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + X_4 + X_5 + X_6 + X_7 + X_8 + X_9 + X_{10}}{10}$$

- Volumen medio (\bar{X}_Z)

$$\bar{X}_Z = \bar{X} * Z$$

- Desviación estándar (DS o s)

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

- Error porcentual

$$E\% = \frac{\bar{X}_Z - masa_{nominal}}{masa_{nominal}} * 100$$



- Coeficiente de variación (CV)

$$CV = \frac{s}{\bar{X}} \cdot 100$$

3. Registre los parámetros volumétricos:

Parámetro	Volumen nominal al 100%	Volumen nominal al 50%	Volumen nominal al 20%
E%			
CV%			

4. Interpretación de los resultados:

- Si los resultados %E y %CV son menores que los límites de tolerancia o iguales, entonces la micropipeta funciona bien.
- Si los valores calculados son mayores que los límites de tolerancia:
 - * Compruebe que todas las instrucciones se hayan seguido de manera correcta.
 - * Corrija posible defecto por desgaste.
 - * Ajuste mecánicamente (si es posible).
 - * Solicite la calibración de la micropipeta.

7. Conclusiones

.....

.....

.....

8. Cuestionario

- ¿Qué diferencia existe entre validación y verificación de pipeteo?
- Si usted desea transferir el volumen X en un microtubo, seleccione la(s) micropipeta(s) que puede usar (asumiendo que todas están sin errores de reproducibilidad y de veracidad)

X	p-2	p-10	p-20	p-100	p-200	p-1000
12 µL						
22 µL						
44 µL						

- Si tuviera una p-20 con %E = 10%, ¿qué haría para transferir 12 µL?
- Si no tuviera p-100, ¿cómo transferiría 22 µL?

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Organización Panamericana de la Salud. (2005). Manual de mantenimiento para equipos de laboratorio. Washington: Documentos técnicos OPS.
- Universidad Peruana Cayetano Heredia. (2018). Prácticas de Epidemiología Molecular aplicada e Enfermedades Infecciosas. Lima: UPCH.



Guía de laboratorio N° 5

Extracción de ADN a partir de sangre periférica

Sección : Docente:

Fecha :/...../..... Duración: 2 horas

Instrucciones: Realice la siguiente práctica de laboratorio formando grupos, en forma limpia y ordenada. Respete las normas de bioseguridad. Ante cualquier duda consulte con el docente y registre toda la información que puede de los diferentes experimentos desarrollados, puesto que esta información deberá ser considerada al redactar el respectivo informe grupal. Los equipos, instrumentos, materiales y reactivos descritos corresponden a cada grupo ¡Realizar prácticas de laboratorio es empezar a hacer ciencia!

1. Objetivos

- Utilizar las micropipetas de manera correcta.
- Verificar el funcionamiento de micropipetas utilizando el método gravimétrico.

2. Fundamento teórico

Las técnicas derivadas de la biología molecular y la ingeniería genética se utilizan de forma creciente tanto con fines básicos como aplicados, fundamentalmente al diagnóstico clínico, partiendo de muestras biológicas muy diversas. Ello requiere la extracción y análisis de RNA y DNA y, en su caso, de proteínas u otras macromoléculas.

El ADN de las células eucarióticas se ubica principalmente en el núcleo, el cual está inmerso en el citoplasma, el cual está compartimentalizado por la membrana celular. Esto es una indicación de que, para poder liberar el ADN del núcleo, se deben lisar diferentes estructuras celulares y separarlas de manera conveniente para finalmente aislar el ADN. Los procedimientos usuales de lisis son:

- Rotura mecánica (trituration, lisis hipotónica)
- Tratamiento térmico (alta o bajas temperaturas)
- Tratamiento químico (detergentes, agentes caotrópicos, reducción de tioles, etc.)
- Digestión enzimática (proteínasa K, etc.)

Las muestras más empleadas para extraer ADN son las muestras de sangre periférica, habitualmente de sangre venosa que contiene aproximadamente unos 40 mg DNA/ml. La sangre periférica es recogida sobre anticoagulante EDTA. Se utiliza la fracción celular total o sus distintos tipos separados por alguno de los métodos disponibles, en especial la centrifugación según sus diferencias de tamaño o densidad.

Los procedimientos de extracción de ADN están hoy día condicionados por los continuos avances tecnológicos, instrumentales, de automatización e informáticos. Han llegado a tal desarrollo que pueden a veces enmascarar el carácter científico que subyace a todo el proceso analítico.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microcentrífuga	Hasta 15000 rpm	1
2	Baño María	56°C	1
3	Hotplate	60°C y 90°C	1
4	Centrífuga	Hasta 5000 rpm	1



3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Tips (puntas)	10, 20, 100, 200 y 1000 μ L	varias
2	Microtubos	1.5 mL/base plana	5
3	Micropipeta	5 - 50 μ L	1
4	Microtubos	De 1.5 mL	5
5	Tubo para extracción al vacío (lila)	Con EDTAK2/6 mL	1

3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Agua para PCR	Libre de nucleasas	10 mL
2	Buffer de lisis	comercial	200 μ L
3	Proteinasa K	Al 0.0002%	20 μ L
4	PBS	Al 5%	200 μ L
4	Cloroformo: Alcohol isoamílico	24:1/Almacenada entre 2 - 8°C en frasco de vidrio	700 μ L
5	Buffer TE	Para 500 mL: Tris HCl 1M (5mL)+EDTA 0.5M (1 mL); H ₂ O qp. (494mL) pH:8.0	100 μ L
6	Etanol	Absoluto o qp.	1000 μ L
7	Plasma	Obtenido a partir de tubo con EDTA	500 μ L
8	Isopropanol	comercial	450 μ L

4. Indicaciones/instrucciones:

- El trabajo es grupal, pero cada estudiante debe portar su propio manual de guías de laboratorio (guías de experimentación).
- Siempre se debe vestir mandil y se deben respetar las reglas de bioseguridad inherentes a la práctica, las cuales también serán indicadas por el docente.
- Antes de cada práctica, un representante de cada grupo de trabajo debe pedir los equipos, instrumentos, materiales y reactivos necesarios a los jefes de laboratorio y reunir otros diversos materiales solicitados con anticipación a los estudiantes. Sólo si se cuentan con todos los materiales solicitados, el grupo podrá empezar la práctica.
- Durante la práctica, se debe mantener el orden, la limpieza y la disciplina. Se deben registrar diversos datos que se vayan obteniendo en los experimentos, así como tomar las fotografías necesarias. Ante cualquier duda se puede consultar con el profesor.
- El estudiante se debe desconectar de las redes sociales mientras dure la práctica experimental. Se debe seleccionar la opción de vibrador en el celular.
- Al final de la práctica, los estudiantes deben hacer firmar la respectiva guía de laboratorio según el modelo de informe de guía de laboratorio entregado por el profesor. Este informe es grupal, se evalúa según una lista de cotejo y se entrega cada semana inmediatamente antes de empezar a desarrollar la siguiente práctica de laboratorio.

5. Procedimientos

1. Recolecte 6 mL de sangre en un tubo con EDTAK2 (de tapa lila) de 6 mL
2. Centrifugue la sangre en el tubo con EDTAK2 a 2500 rpm por 10 minutos.
3. Rotule tres microtubos con sus respectivos datos (nombre y apellido) y fecha.
4. Transfiera 500 μ L de la interfase hacia un microtubo con mucho cuidado, haciendo uso de una micropipeta.
5. Resuspenda el contenido de interfase (que contiene los leucocitos) con 200 μ L de PBS. Inmediatamente adicione 20 μ L de Proteinasa K, tape el microtubo, homogenice bien y finalmente agregue 200 μ L de buffer de lisis. Permita la lisis y digestión a 56°C por 60 minutos (baño María).
6. Con mucho cuidado adicione 700 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), tape e invierta suavemente el microtubo o póngalo en contacto con el vórtex hasta ver que la solución quede blanquecina.
7. Centrifugue a 13000 rpm por 10 minutos.
8. Retire con cuidado el microtubo y extraiga, despacio, la fase acuosa de la parte superior (sin aspirar partículas de la interfase) y transféralo a otro microtubo de 1.5 mL. Descarte la fase orgánica (que queda



en el anterior microtubo).

Opcional: repetir los pasos de 3 a 5.

9. Agregue 450 μ L de isopropanol a la fase acuosa e incube por 15 minutos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
10. Centrifugue a 13000 rpm por 10 minutos.
11. Elimine el sobrenadante por inversión rápida (una sola vez).
12. Agregue 1 mL de etanol al 70%, tape e invierta suavemente el microtubo.
13. Centrifugue a 13000 rpm por 10 minutos.
14. Elimine el sobrenadante por inversión rápida (una sola vez) y deje secar el microtubo por 10 minutos a temperatura ambiente. En caso de que exista etanol remanente puede usar un Hotplate a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos para evaporarlo completamente.
15. Resuspenda el pellet de ADN con 100 μ L de buffer TE y consérvelo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la siguiente práctica.

6. Resultados

- Documente y registre lo observado y experimentado en cada procedimiento (fotografías, dibujos, datos, etc.)

7. Conclusiones

.....

.....

.....

8. Cuestionario

- ¿Qué tejido es más rico en concentración de ADN?, ¿cuál será la concentración aproximada?
- ¿Qué tejido es más pobre en concentración de ADN?, ¿cuál será la concentración aproximada?
- ¿Cómo se aísla ADN a partir de muestras bucales?
- ¿Cómo se comprueba la calidad del ADN extraído?
- Describa un protocolo para extracción de ARN.

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Herráez, A. (2012). Biología Molecular e Ingeniería Genética. Madrid: Elsevier.
- Universidad Peruana Cayetano Heredia. (2018). Prácticas de Epidemiología Molecular aplicada e Enfermedades Infecciosas. Lima: UPCH.



Guía de laboratorio N° 6

Verificación de la calidad del ADN: Técnica electroforética

Sección : Docente:

Fecha :/...../..... Duración: 2 horas

Instrucciones: Realice la siguiente práctica de laboratorio formando grupos, en forma limpia y ordenada. Respete las normas de bioseguridad. Ante cualquier duda consulte con el docente y registre toda la información que puede de los diferentes experimentos desarrollados, puesto que esta información deberá ser considerada al redactar el respectivo informe grupal. Los equipos, instrumentos, materiales y reactivos descritos corresponden a cada grupo ¡Realizar prácticas de laboratorio es empezar a hacer ciencia!

1. Objetivos

- Ejecutar un protocolo para preparar gel de agarosa al 2%.
- Verificar la calidad el ADN extraído mediante la técnica de electroforesis.

2. Fundamento teórico

La calidad del ADN extraído a partir de cualquier muestra debe pasar un proceso de control de calidad con la finalidad de poder verificar que su concentración sea adecuada y que esta concentración sea lo más pura posible respecto a otras biomoléculas como las proteínas, por ejemplo.

La electroforesis es una técnica que permite la migración de fragmentos de ADN utilizando campos eléctricos. Se sabe que la carga eléctrica neta del ADN es negativa, por lo que esta puede moverse hacia el polo positivo (ánodo) y alejarse del polo negativo (cátodo). Son factores determinantes en el movimiento de fragmentos de ADN: el peso molecular de dichos fragmentos (a mayores pesos moleculares, menos velocidad de migración y menor distancia de desplazamiento) y el pH del medio en el que se produce la migración.

Está claro que el ADN se debe mover sobre una superficie adecuada, la cual está constituida por un gel de agarosa, cuya concentración común es del 2%, aunque esta puede variar. La agarosa está formada por un polisacárido que forma una red tridimensional que permite la movilidad de los fragmentos de ADN que se desean estudiar.

Cuando se usa el gel de agarosa y la electroforesis para verificar calidad del ADN extraído, el indicador de dicha calidad no lo constituye el hecho de la migración en sí, sino la capacidad de luminiscencia de las bandas formadas a partir del ADN en estudio.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Cámara de electroforesis	Hasta 200 V	1
2	Baño María	37°C	1
3	Horno microondas	Comercial	1
4	Fotodocumentador	radiación UV	1

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Matraz	Vidrio/500 mL	1
2	Micropipeta	5 - 50 µL	1
3	Peine para electroforesis	Plástico	1



4	Probeta	50 mL	1
5	Bagueta	Vidrio	1

3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Agarosa	comercial	3.0 g
2	Agua	qp.	200 mL
3	Buffer TE	Agua + EDTA	20 mL
4	Bromuro de etidio	colorante	50 uL
5	Azul de bromofenol	Colorante comercial	1 uL

4. Indicaciones/instrucciones:

- El trabajo es grupal, pero cada estudiante debe portar su propio manual de guías de laboratorio (guías de experimentación).
- Siempre se debe vestir mandil y se deben respetar las reglas de bioseguridad inherentes a la práctica, las cuales también serán indicadas por el docente.
- Antes de cada práctica, un representante de cada grupo de trabajo debe pedir los equipos, instrumentos, materiales y reactivos necesarios a los jefes de laboratorio y reunir otros diversos materiales solicitados con anticipación a los estudiantes. Sólo si se cuentan con todos los materiales solicitados, el grupo podrá empezar la práctica.
- Durante la práctica, se debe mantener el orden, la limpieza y la disciplina. Se deben registrar diversos datos que se vayan obteniendo en los experimentos, así como tomar las fotografías necesarias. Ante cualquier duda se puede consultar con el profesor.
- El estudiante se debe desconectar de las redes sociales mientras dure la práctica experimental. Se debe seleccionar la opción de vibrador en el celular.
- Al final de la práctica, los estudiantes deben hacer firmar la respectiva guía de laboratorio según el modelo de informe de guía de laboratorio entregado por el profesor. Este informe es grupal, se evalúa según una lista de cotejo y se entrega cada semana inmediatamente antes de empezar a desarrollar la siguiente práctica de laboratorio.

5. Procedimientos

1. En un matraz de vidrio resistente al calor, agregue 3.0 g de agarosa en polvo.
2. Disuelva la agarosa en polvo con una mezcla de 180 mL de agua qp. y 20 mL de buffer TE. Utilice el buffer TE preparado en la práctica anterior. Realice este procedimiento en baño María a 56°C.
3. Agite la mezcla anterior utilizando una bagueta.
4. Cuando la solución de agarosa haya alcanzado consistencia líquida agréguele dos o tres gotas de bromuro de etidio.

¡Cuidado! El bromuro de etidio es cancerígeno, por lo que debe utilizar gorra protectora, mascarilla y doble guante de látex.

5. Prepare la cámara electroforética cercando el molde de la cámara con los bordes de jebes respectivos.
6. Vierta el gel de agarosa líquida sobre toda la superficie de la cámara electroforética, de manera uniforme y tan pronto como sea posible.
7. Coloque los peines sobre los bordes de jebes de la cámara de electroforesis de tal manera que queden sumergidos en el gel y puedan formar los pocillos donde se depositarán las muestras de ADN.
8. Espere unos minutos y verifique que el gel de agarosa se ha solidificado.
9. Agregue el buffer de electroforesis sobre el gel de agarosa.
10. En el primer pocillo del gel coloque 4 uL del ADN ladder o marcador.
11. En los pocillos restantes agregue 2 uL de ADN, 1 uL de colorante (azul de bromofenol) y 7 uL de agua qp.
12. Tape la cámara de electroforesis y conecte los polos a la fuente de voltaje. Programe una corrida a 110V por 30 minutos. Compruebe la electroforesis con la formación de burbujas a nivel de los polos eléctricos.
13. Cuando la electroforesis haya terminado, retire el gel con mucho cuidado.
14. Coloque el gel de agarosa sobre la superficie del fotodocumentador, debidamente protegido.
15. Fotografié la superficie del gel de agarosa y observe las bandas.

6. Resultados

- Documente y registre lo observado y experimentado en cada procedimiento (fotografías, dibujos,



datos, etc.)

7. Conclusiones

.....

.....

.....

8. Cuestionario

- ¿Qué se entiende por "calidad del ADN"?
- ¿En qué casos se utiliza el gel de agarosa y en cuáles el gel de poliacrilamida?
- ¿Para qué se utiliza el ADN ladder y cuál es su origen?
- ¿Por qué se dice que el bromuro de etidio es un agente intercalante?

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Herráez, A. (2012). Biología Molecular e Ingeniería Genética. Madrid: Elsevier.
- Klug, et al. (2013). Conceptos de genética. Madrid: Pearson



Guía de laboratorio N° 7

Verificación de la calidad del ADN: Técnica espectrofotométrica

Sección : Docente:

Fecha :/...../..... Duración: 2 horas

Instrucciones: Realice la siguiente práctica de laboratorio formando grupos, en forma limpia y ordenada. Respete las normas de bioseguridad. Ante cualquier duda consulte con el docente y registre toda la información que puede de los diferentes experimentos desarrollados, puesto que esta información deberá ser considerada al redactar el respectivo informe grupal. Los equipos, instrumentos, materiales y reactivos descritos corresponden a cada grupo ¡Realizar prácticas de laboratorio es empezar a hacer ciencia!

1. Objetivos

- Analizar la técnica espectrofotométrica para cuantificación de ADN.
- Verificar la calidad del ADN extraído utilizando *nanodrop one*.

2. Fundamento teórico

La calidad del ADN extraído a partir de cualquier muestra debe pasar un proceso de control de calidad con la finalidad de poder verificar que su concentración sea adecuada y que esta concentración sea lo más pura posible respecto a otras biomoléculas como las proteínas, por ejemplo.

El ADN absorbe preferentemente radiación UV de 260 nm, de tal manera que una unidad de absorbancia equivale a 50 ug/mL. Así pues, mientras mayor es la concentración de ADN, se absorbe mayor radiación UV. La pureza del ADN en cambio es una medición relativa, es decir, comparable a la absorción de radiación por parte de las proteínas, las cuales absorben a 280 nm. Por lo tanto, una relación de absorbancia A260/A280 mayor a 1,7 pero menor a 2,0 indica que el ADN extraído tiene una pureza aceptable.

Cuando la relación A260/A280 es menor a 1,7 se debería suponer que el proceso de extracción y aislamiento del ADN no fue suficientemente bueno, por lo que, para realizar futuros experimentos sería recomendable volver a extraer ADN.

Es de esta manera que la capacidad de absorbancia de radiación UV por parte del ADN puede ser utilizada para cuantificar la concentración del ADN y su respectiva pureza.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Espectrofotómetro para ADN	Nanodrop one	1
2	Minicentrífuga	Para 6 tubos	1

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Micropipeta	5 - 50 µL	1
2	Tips	5 - 50 µL	1
3	Papel lente	cuadrante	1



3.3. Reactivos

Item	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Agua	qp.	200 mL
2	ADN extraído	- 20 °C	20 µL

4. Indicaciones/instrucciones:

- El trabajo es grupal, pero cada estudiante debe portar su propio manual de guías de laboratorio (guías de experimentación).
- Siempre se debe vestir mandil y se deben respetar las reglas de bioseguridad inherentes a la práctica, las cuales también serán indicadas por el docente.
- Antes de cada práctica, un representante de cada grupo de trabajo debe pedir los equipos, instrumentos, materiales y reactivos necesarios a los jefes de laboratorio y reunir otros diversos materiales solicitados con anticipación a los estudiantes. Sólo si se cuentan con todos los materiales solicitados, el grupo podrá empezar la práctica.
- Durante la práctica, se debe mantener el orden, la limpieza y la disciplina. Se deben registrar diversos datos que se vayan obteniendo en los experimentos, así como tomar las fotografías necesarias. Ante cualquier duda se puede consultar con el profesor.
- El estudiante se debe desconectar de las redes sociales mientras dure la práctica experimental. Se debe seleccionar la opción de vibrador en el celular.
- Al final de la práctica, los estudiantes deben hacer firmar la respectiva guía de laboratorio según el modelo de informe de guía de laboratorio entregado por el profesor. Este informe es grupal, se evalúa según una lista de cotejo y se entrega cada semana inmediatamente antes de empezar a desarrollar la siguiente práctica de laboratorio.

5. Procedimientos

1. Retire el microtubo con ADN extraído de la congeladora. Deje temperar por 20 minutos.
2. Encienda el nanodrop one. Abra la tapa del equipo y ubique el sensor óptico.
3. Realice el blanco del nanodrop one con agua destilada o agua qp. Para esto debe colocar X uL de agua qp. en el sensor óptico del nanodrop. Tenga cuidado de que no se formen burbujas. Cierre la tapa del equipo. Presione medir (measure).
4. Una vez realizada la lectura de blanco, limpie el agua utilizada que se encuentra en el sensor óptico con un poco de papel lente.
5. Coloque ahora X uL de la muestra de ADN en el sensor óptico. Cierre la tapa del equipo. Presione medir (measure).
6. Limpie la muestra de ADN del sensor óptico con papel lente y vuelva a colocar una muestra de ADN para que sea lecturada. Realice este paso 5 veces. Obtenga el promedio de estas 5 mediciones.

6. Resultados

- Documente y registre lo observado y experimentado en cada procedimiento (fotografías, dibujos, datos, etc.)
- Registre los valores de concentración y pureza del ADN extraído. Si acaso el promedio obtenido indique mala calidad, lo recomendable sería volver a extraer ADN.

7. Conclusiones

.....
.....
.....

8. Cuestionario

- ¿Qué longitud de onda absorbe preferentemente el ADN desnaturizado o de cadena sencilla?
- ¿Qué longitud de onda absorben preferentemente, las proteínas?
- ¿Una densidad óptica de ARN, a qué concentración de ARN corresponde?
- Describa gráficamente el funcionamiento del nanodrop one. Indique las respectivas partes.



Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Herráez, A. (2012). *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Madrid: Elsevier.
- Stephenson, F. (2014). *Cálculos en Biología Molecular y Biotecnología*. Madrid: Elsevier.



Guía de laboratorio N° 8

Reacción en Cadena de la Polimerasa: PCR convencional

Sección : Docente:

Fecha :/...../..... Duración: 2 horas

Instrucciones: Realice la siguiente práctica de laboratorio formando grupos, en forma limpia y ordenada. Respete las normas de bioseguridad. Ante cualquier duda consulte con el docente y registre toda la información que puede de los diferentes experimentos desarrollados, puesto que esta información deberá ser considerada al redactar el respectivo informe grupal. Los equipos, instrumentos, materiales y reactivos descritos corresponden a cada grupo ¡Realizar prácticas de laboratorio es empezar a hacer ciencia!

1. Objetivos

- Ejecutar un protocolo básico de PCR convencional.

2. Fundamento teórico

Desde que se descubrió la estructura del ADN, muchas técnicas analíticas se han desarrollado, sin embargo, ninguna es tan popular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) o PCR por su acrónimo en inglés. Esta técnica emula, *in vitro*, la replicación semiconservativa que el ADN lleva a cabo *in vivo*.

La PCR es una técnica de clonación molecular, es decir, es una técnica que permite "sacar copias" de moléculas de ADN molde o diana. Para llevar a cabo una PCR convencional se necesitan: cebadores o primers específicos, deoxinucleótidos trifosfato o dNTPs (ddCTP, ddTTP, ddATP, ddGTP), Mg^{2+} (cofactor), una polimerasa, siendo la Taq polimerasa la más utilizada, agua para PCR (libre de nucleasas) y desde luego, el ADN de interés (molde o diana). Cuando estos componentes se mezclan en las proporciones correctas, se obtiene una "solución maestra" o "master mix" que se coloca en pocillos dentro de un equipo que tiene la capacidad de hacer variar la temperatura según las fases que el PCR exige: desnaturalización (95°C), hibridación (55°C) y elongación (72°C). Este equipo se denomina termociclador.

Las temperaturas antes descritas son sólo referenciales y pueden ser programadas en el termociclador. Estas temperaturas pueden ser calculadas matemáticamente o programarse a partir de las indicaciones de los proveedores de reactivos para PCR. En cualquier caso, se obtienen amplicones o copias de ADN. Teóricamente sería apenas necesario disponer de una sola molécula de ADN para poder realizar el PCR, lo cual es un indicativo de la alta sensibilidad de esta técnica. El rendimiento total de una PCR depende del valor de su eficiencia, la cual mientras más cerca del 100% esté, mayor cantidad de producto será obtenido.

Varias disciplinas científicas se han beneficiado del PCR entre ellas: biología molecular, genética, ciencias de la salud, ciencias forenses y antropología. Incluso el PCR se ha adaptado para poder hacerlo cuantitativo, siendo la máxima expresión de esto la PCR en tiempo real.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Termociclador	Con gradiente térmico	1
2	Minicentrífuga	MiniSpin	1
3	Cabina de bioseguridad	Tipo 1B	1
4	Agitador vórtex	analógico	1



3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Micropipetas	100-1000 μ L/50-200 μ L/0.5-10 μ L	1 c/u
2	Tips	Graduadas: Blancas/Amarillas/Azules	varios
3	Tubos de PCR	0.2 mL	varios
4	Gradilla	Formato 12 x 8 para tubos de 0.2 mL	1
5	Frasco para tubos de PCR utilizados	De plástico pequeño	1
6	Frasco para tips utilizados	De plástico pequeño	1

3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Etanol	70%	50 mL
2	Mezcla de dNTPs	10 mM	Según protocolo
3	MgCl ₂	Según protocolo	Según protocolo
4	Buffer	Según protocolo	Según protocolo
5	Set de cebador	Cebador universal para genoma humano	Según protocolo
6	ADN muestra o molde	50 ng/mL	Según protocolo
7	Taq ADN polimerasa	5 U/ μ L	Según protocolo

4. Indicaciones/instrucciones:

- El trabajo es grupal, pero cada estudiante debe portar su propio manual de guías de laboratorio (guías de experimentación).
- Siempre se debe vestir mandil y se deben respetar las reglas de bioseguridad inherentes a la práctica, las cuales también serán indicadas por el docente.
- Antes de cada práctica, un representante de cada grupo de trabajo debe pedir los equipos, instrumentos, materiales y reactivos necesarios a los jefes de laboratorio y reunir otros diversos materiales solicitados con anticipación a los estudiantes. Sólo si se cuentan con todos los materiales solicitados, el grupo podrá empezar la práctica.
- Durante la práctica, se debe mantener el orden, la limpieza y la disciplina. Se deben registrar diversos datos que se vayan obteniendo en los experimentos, así como tomar las fotografías necesarias. Ante cualquier duda se puede consultar con el profesor.
- El estudiante se debe desconectar de las redes sociales mientras dure la práctica experimental. Se debe seleccionar la opción de vibrador en el celular.
- Al final de la práctica, los estudiantes deben hacer firmar la respectiva guía de laboratorio según el modelo de informe de guía de laboratorio entregado por el profesor. Este informe es grupal, se evalúa según una lista de cotejo y se entrega cada semana inmediatamente antes de empezar a desarrollar la siguiente práctica de laboratorio.

5. Procedimientos

5.1. Descontaminación del material de trabajo

1. Limpie con etanol al 70% la superficie de trabajo de la cabina de bioseguridad.
2. Coloque gradilla, pipetas, tips y tubos para PCR (eppendorf) en la superficie de trabajo de la cabina de bioseguridad. Irradie el material expuesto y destapado en el caso de los tubos para PCR por 15 minutos con radiación UV.



5.2. Descongelamiento de soluciones de trabajo

3. Paralelamente a la irradiación vaya descongelando las soluciones de trabajo por un tiempo aproximado de 15 a 20 minutos. Verifique que la rotulación de los tubos que contienen las soluciones sean las correctas.

5.3. Preparación del master mix

4. Homogenice las soluciones a utilizar, excepto Taq ADN polimerasa (observe la tabla).
5. Disponga las soluciones de trabajo según el orden que aparece en la siguiente tabla. Los volúmenes de cada componente del PCR para obtener el master mix, serán descritos por el docente. Este master mix se puede preparar en una placa con pocillos (12 x 8) para PCR o tubos para PCR de 0.2 mL.

Orden	Solución	Volumen
1	Buffer	
2	MgCl ₂	
3	dNTP	
4	Cebador universal	
5	Taq ADN polimerasa	
6	Agua para PCR	
Resultado = master mix		

Nota: El Taq ADN polimerasa debe ser retirado de la congeladora inmediatamente antes de su uso y tan pronto se saque el volumen necesario debe ser devuelto a congelación. Taq polimerasa no debe ser homogenizada con vórtex o minicentrífuga.

- 5. Homogenice el master mix obtenido usando el vórtex. También podría utilizar la minicentrífuga.
- 6. Coloque 8 µL de master mix en 2 pocillos de placa para PCR o dos tubos para PCR.
- 7. Coloque 2 µL de agua libre de nucleasas en un pocillo o tubo para PCR.
- 8. Coloque 8 µL de ADN muestra (obtenido en la práctica de extracción de ADN) en el otro pocillo o tubo para PCR.

5.4. Uso del termociclador y amplificación de ADN molde

- 9. Coloque la placa con pocillos o tubos para PCR en el termociclador.
- 10. Programe las siguientes temperaturas para una PCR convencional: desnaturalización (95°C), hibridación (55°C) y elongación (72°C). Programe 32 ciclos, lo cual durará aproximadamente 2 horas con 30 minutos. Cierre herméticamente la tapa del termociclador.
- 11. Presione enter en el display o teclado del termociclador y empezará la amplificación.
- 12. Una vez pasado el tiempo indicado, abra la tapa del termociclador, retire la placa con pocillos o tubos para PCR con ADN molde amplificado.
- 13. Conserve en congelación el ADN obtenido por PCR hasta la próxima práctica. Rotule los contenedores blanco y de este ADN molde con sus datos (nombre y apellidos) y la respectiva fecha de la práctica.

6. Resultados

- Documente y registre lo observado y experimentado en cada procedimiento (fotografías, dibujos, datos, etc.)

7. Conclusiones

.....

.....

.....

8. Cuestionario

- Si se dispone al inicio de una PCR de 2 moléculas de ADN,, luego de 20 ciclos, suponiendo una eficiencia del 100%, ¿cuántos amplicones se obtendrán?
- Si se dispone al inicio de una PCR de 4x10⁵ moléculas de ADN, luego de 20 ciclos, suponiendo una eficiencia del 80%, ¿cuántos amplicones se obtendrán?
- ¿Qué variantes de PCR existen? Describa por los menos 4 variantes, entre ellas la RT-PCR.
- ¿Qué diferencias existen entre la PCR convencional y la PCR en tiempo real?



Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Herráez, A. (2012). *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Madrid: Elsevier.
- Stephenson, F. (2014). *Cálculos en Biología Molecular y Biotecnología*. Madrid: Elsevier.



Guía de laboratorio N° 9

Uso de ADN ladder, electroforesis y revelado de productos de PCR

Sección : Docente:
Fecha :/...../..... Duración: 2 horas

Instrucciones: Realice la siguiente práctica de laboratorio formando grupos, en forma limpia y ordenada. Respete las normas de bioseguridad. Ante cualquier duda consulte con el docente y registre toda la información que puede de los diferentes experimentos desarrollados, puesto que esta información deberá ser considerada al redactar el respectivo informe grupal. Los equipos, instrumentos, materiales y reactivos descritos corresponden a cada grupo ¡Realizar prácticas de laboratorio es empezar a hacer ciencia!

1. Objetivos

- Ejecutar un protocolo para preparar gel de agarosa al 2%.
- Comprobar la formación de ADN amplificado por PCR mediante electroforesis.

2. Fundamento teórico

La electroforesis es una técnica que permite la migración de fragmentos de ADN utilizando campos eléctricos. Se sabe que la carga eléctrica neta del ADN es negativa, por lo que esta puede moverse hacia el polo positivo (ánodo) y alejarse del polo negativo (cátodo). Son factores determinantes en el movimiento de fragmentos de ADN: el peso molecular de dichos fragmentos (a mayores pesos moleculares, menos velocidad de migración y menor distancia de desplazamiento) y el pH del medio en el que se produce la migración.

Está claro que el ADN se debe mover sobre una superficie adecuada, la cual está constituida por un gel de agarosa, cuya concentración común es del 2%, aunque esta puede variar. La agarosa está formada por un polisacárido que forma una red tridimensional que permite la movilidad de los fragmentos de ADN que se desean estudiar.

La electroforesis se puede usar para verificar que el ADN muestra, molde o diana, efectivamente se ha amplificado. El cebador o primer utilizado define la longitud aproximada del ADN amplificado (amplicón) que de haberse llevado a cabo de manera correcta tiene la longitud esperada. Esta longitud de ADN (dada lógicamente en pares de base o pb) debe ser comparada con un ADN patrón o ADN ladder que tiene una longitud conocida y está hecha del fago lambda. El ADN ladder funciona como una especie de regla y también se corre en la electroforesis para luego ser revelada con el fotodocumentador.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Cámara de electroforesis	Hasta 200 V	1
2	Baño María	37°C	1
3	Horno microondas	Comercial	1
4	Fotodocumentador	radiación UV	1

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Matraz	Vidrio/500 mL	1
2	Micropipeta	5 - 50 µL	1
3	Peine para electroforesis	Plástico	1



4	Probeta	50 mL	1
5	Bagueta	Vidrio	1

3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Agarosa	comercial	3.0 g
2	Agua	qp.	200 mL
3	Buffer TE	Agua + EDTA	20 mL
4	Bromuro de etidio	colorante	50 uL
5	ADN ladder	Universal /de 50 pb	4 uL
6	Azul de bromofenol	Colorante comercial	1 uL

4. Indicaciones/instrucciones:

- El trabajo es grupal, pero cada estudiante debe portar su propio manual de guías de laboratorio (guías de experimentación).
- Siempre se debe vestir mandil y se deben respetar las reglas de bioseguridad inherentes a la práctica, las cuales también serán indicadas por el docente.
- Antes de cada práctica, un representante de cada grupo de trabajo debe pedir los equipos, instrumentos, materiales y reactivos necesarios a los jefes de laboratorio y reunir otros diversos materiales solicitados con anticipación a los estudiantes. Sólo si se cuentan con todos los materiales solicitados, el grupo podrá empezar la práctica.
- Durante la práctica, se debe mantener el orden, la limpieza y la disciplina. Se deben registrar diversos datos que se vayan obteniendo en los experimentos, así como tomar las fotografías necesarias. Ante cualquier duda se puede consultar con el profesor.
- El estudiante se debe desconectar de las redes sociales mientras dure la práctica experimental. Se debe seleccionar la opción de vibrador en el celular.
- Al final de la práctica, los estudiantes deben hacer firmar la respectiva guía de laboratorio según el modelo de informe de guía de laboratorio entregado por el profesor. Este informe es grupal, se evalúa según una lista de cotejo y se entrega cada semana inmediatamente antes de empezar a desarrollar la siguiente práctica de laboratorio.

5. Procedimientos

5.1. Preparación de gel agarosa al 2%

Nota: Mientras ejecute estos procedimientos vaya descongelando los tubos para PCR con ADN amplificado en la práctica anterior de 15 a 20 minutos, a temperatura ambiente.

1. En un matraz de vidrio resistente al calor, agregue 3.0 g de agarosa en polvo.
2. Disuelva la agarosa en polvo con una mezcla de 180 mL de agua qp. y 20 mL de buffer TE. Utilice el buffer TE preparado en la práctica anterior. Realice este procedimiento en baño María a 56°C.
3. Agite la mezcla anterior utilizando una bagueta.
4. Cuando la solución de agarosa haya alcanzado consistencia líquida agréguele dos o tres gotas de bromuro de etidio.

¡Cuidado!: El bromuro de etidio es cancerígeno, por lo que debe utilizar gorra protectora, mascarilla y doble guante de látex.

5.2. Electroforesis

5. Prepare la cámara electroforética cercandando el molde de la cámara con los bordes de jebes respectivos.
6. Vierta el gel de agarosa líquida sobre toda la superficie de la cámara electroforética, de manera uniforme y tan pronto como sea posible.
7. Coloque los peines sobre los bordes de jebes de la cámara de electroforesis de tal manera que queden sumergidos en el gel y puedan formar los pocillos donde se depositarán las muestras de ADN.
8. Espere unos minutos y verifique que el gel de agarosa se ha solidificado.
9. Agregue el buffer de electroforesis sobre el gel de agarosa.
10. En el primer pocillo del gel coloque 4 uL del ADN ladder o marcador.
11. En un tubo para PCR aparte coloque 9 uL de producto PCR blanco (que contiene en lugar de ADN molde, agua qp.) con 1 uL de colorante azul de bromofenol. Homogenice y coloque estos 10 uL en un segundo pocillo del gel.
12. En un tubo para PCR aparte coloque 9 uL de producto PCR obtenido con 1 uL de colorante azul de



- bromofenol. Homogenice y coloque estos 10 uL en un tercer pocillo del gel.
13. Tape la cámara de electroforesis y conecte los polos a la fuente de voltaje. Programe una corrida a 110V por 1 hora con 30 minutos. Compruebe la electroforesis con la formación de burbujas a nivel de los polos eléctricos.
 14. Cuando la electroforesis haya terminado, retire el gel con mucho cuidado.
 15. Coloque el gel de agarosa sobre la superficie del fotodocumentador, debidamente protegido.
 16. Fotografíe la superficie del gel de agarosa y observe las bandas.

6. Resultados

- Documente y registre lo observado y experimentado en cada procedimiento (fotografías, dibujos, datos, etc.)
- Calcule el tamaño aproximado de los fragmentos de PCR amplificados en comparación con las bandas obtenidas para el ADN ladder.

7. Conclusiones

.....

.....

.....

8. Cuestionario

- ¿Cómo se obtiene el ADN ladder a partir del fago lambda?
- Describa las propiedades del colorante azul de bromofenol
- Describa las propiedades del bromuro de etidio
- ¿Qué es la electroforesis capilar y qué aplicaciones tiene?

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Córscico, B. et al. (2013). Análisis estructural y funcional de macromoléculas. Buenos Aires. Universidad Nacional de la Plata.
- Herráez, A. (2012). Biología Molecular e Ingeniería Genética. Madrid: Elsevier.
- Klug, et al. (2013). Conceptos de genética. Madrid: Pearson