



# ECITEC

Escuela de Ciencias de la Ingeniería y Tecnología  
Unidad Vallo de las Palmas  
COORDINACIÓN DE ETAPA BÁSICA

2  
0  
1  
9



# Bioingeniería Aplicada

UABC-CA-192

## BIOLOGIA MOLECULAR

### MANUAL DE PRACTICAS DE LABORATORIO

ESCUELA DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA ECITEC

DR. LUIS JESÚS VILLARREAL GÓMEZ, DRA. ANA LETICIA IGLESIAS, M. C. GRACIELA LIZETH PEREZ

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

### Presentación

El presente manual surge de la necesidad de complementar el programa de estudios vigentes de la materia de Química General (clave 11209) con el propósito de contribuir a una mejor comprensión de los conceptos fundamentales de la asignatura, basado en la contextualización del entorno del estudiante.

El manual consta de diversas prácticas que versan sobre los temas contenidos en la Carta Descriptiva de la asignatura de Química General. Como estrategia para fortalecer el proceso enseñanza-aprendizaje y optimizar las horas de sesión asignadas a laboratorio, se incluye un pre-laboratorio que consta de una serie de ejercicios previos al desarrollo de cada sesión de práctica.

En este manual, cada práctica de laboratorio pretende favorecer el trabajo cooperativo del estudiante a través de la interdependencia positiva, el intercambio de procedimientos, el manejo y gestión de materiales y recursos, todo ello en un margen de respeto hacia sus compañeros, responsabilidad y compromiso hacia las acciones que realiza en laboratorio.

En la medida de lo posible, las prácticas propuestas en este manual están orientadas hacia la optimización en el uso de reactivos químicos, reutilización de productos obtenidos para la siguiente práctica y la disminución de generación de residuos peligrosos.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

## ÍNDICE

<b>REGLAS BÁSICAS DE LABORATORIO</b>	<b>3</b>
<b>PREVENCION DE ACCIDENTES</b>	<b>4</b>
<b>GUIA DE ENTREGA DE REPORTE DE LABORATORIO</b>	<b>5</b>
<b>PRÁCTICA No. 1</b>	<b>6</b>
Normas De bioseguridad	
<b>Pre-laboratorio practica 1</b>	<b>10</b>
<b>PRÁCTICA No. 2</b>	<b>11</b>
Habilidades Básicas del laboratorio de Biología Molecular	
<b>Pre-laboratorio practica 2</b>	<b>13</b>
<b>PRÁCTICA No. 3</b>	<b>15</b>
Preparación de material y reactivos	
<b>Pre-laboratorio practica 3</b>	<b>17</b>
<b>PRÁCTICA No. 4</b>	<b>18</b>
Extracción de ADN	
<b>Pre-laboratorio practica 4</b>	<b>20</b>
<b>PRÁCTICA No. 5</b>	<b>21</b>
Estimación de la concentración de ADN por espectrometría	
<b>Pre-laboratorio practica 5</b>	<b>27</b>
<b>PRÁCTICA No. 6</b>	<b>28</b>
Electroforesis en gel de agarosa	
<b>Pre-laboratorio practica 6</b>	<b>31</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>32</b>

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

## REGLAS BÁSICAS DE LABORATORIO

### Equipo de Protección Personal (EPP)

- Utilizar bata blanca de manga larga
- Utilizar guantes de Nitrilo en todo momento
- Lentes de protección, en caso que la práctica así lo requiera.
- Utilizar zapato cerrado



### Disciplina

- No correr dentro del laboratorio
- No jugar con los materiales, reactivos y/o equipo de laboratorio
- Mantener apagado su celular, radio y cualquier equipo móvil de comunicación
- No introducir alimentos o bebidas en el laboratorio
- Prohibido escuchar música en cualquier dispositivo

### Reactivos, materiales y equipo

- No oler directamente o ingerir ningún reactivo o sustancia de laboratorio
- Manejar los materiales como indique el maestro o el auxiliar de laboratorio
- No operar el equipo sin la supervisión del maestro o el auxiliar de laboratorio.

A la persona que incumpla con lo antes mencionado se aplicaran las sanciones que establece el reglamento de laboratorio y estatuto escolar vigente.

### Material de Limpieza

- Desinfectante en aerosol base alcohol (Lysol)
- Toallas absorbentes anticorrosivas
- Escobetilla grande y escobetilla pequeña
- Jabón líquido base cloro

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

### Prevención De Accidentes

Todo laboratorio químico molecular es normalmente sitio de accidentes. Afortunadamente, la mayoría de estos son de pequeña importancia, aunque se pueden presentar algunos de graves consecuencias.

Durante el desarrollo practico de laboratorio de biología molecular se trabajará con materiales químicos peligrosos: flamables, explosivos, cancerígenos, etc. y además se realizarán manipulaciones de microorganismos y materiales biológicos potencialmente patógenos. Por lo que es necesario que tú como estudiante tomes con seriedad y profesionalismo tu trabajo dentro del laboratorio.

En el sentido de prevención de accidentes no necesarios, se recomienda la observación rigurosa de las precauciones siguientes:

- Trabajar siempre con el equipo de seguridad personal necesarios siguiendo las instrucciones del maestro.
- Desechar los guantes utilizados y retirar la bata de laboratorio antes de salir del Laboratorio.
- No trabajar con sustancias inflamables (alcohol, éter) en las proximidades de la llama.
- Nunca calentar un sistema completamente encerrado.
- Mantener el rostro tan lejos posible durante las operaciones de calentamiento o de mezcla de reactivos.
- Evitar montajes no estables de aparatos, como: soporte de libros, lápiz, caja de fósforos, etc.
- Nunca pipetear sustancias con la boca, siempre usar una perilla.
- Al transferir o manipular sustancias que desprendan humos tóxicos, o alguna muestra biológica potencialmente patógena hacerlo siempre en el interior de una campana extractora de gases para los humos tóxicos o en la cámara de flujo laminar para el caso de las muestras biológicas.
- Los ácidos concentrados deben ser adicionados al agua y no lo contrario.
- No se deben disponer los residuos indistintamente, depositándolos en cualquier bote de basura o vertiéndolos en la tarja, a menos que así se indique.
- No deberá operarse ningún equipo sin la asesoría del docente.
- En caso de dudas en la ejecución de cualquier trabajo práctico, buscar siempre al instructor no asumir procedimientos.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

### Guía para la Entrega del Reporte de Laboratorio

El reporte deberá ser realizado en equipo y constar de las siguientes partes en el siguiente orden:

- *Portada:* en esta sección se debe anotar el título general y específico de la práctica de laboratorio, así como los integrantes del equipo.
- *Introducción:* El propósito es dar antecedentes sobre el tema principal de estudio. Para ello se pueden plantear las siguientes preguntas para su auxilio. ¿Por qué es importante estudiar este tema?, ¿Qué se conoce hasta la actualidad sobre el tema? ¿Áreas profesionales donde se realiza la aplicación del proceso de laboratorio en cuestión? Presentar una descripción detallada de las técnicas experimentales que se realizarán durante la práctica, junto con el fundamento teórico necesario para su comprensión. Mínimo 1 página, máximo 2 páginas. De al menos 3 referencias bibliográficas.
- *Metodología:* Debes anotar el material biológico y reactivos utilizados, así como describir detalladamente los pasos seguidos durante el proceso experimental, de tal forma que si otra persona lee tu trabajo lo pueda reproducir en el laboratorio.
- *Resultados:* Debes incluir tablas, gráficas y/o esquemas, las cuales deberán estar numeradas y hacer referencia de ellas dentro del texto. Además, describe los resultados que obtuviste tras la realización de la parte experimental.
- *Discusión y conclusiones:* Aquí debes obtener tus propias conclusiones a partir de la comparación de tus resultados con los de los autores del marco de antecedentes que utilizaste y los resultados comparativos de los otros alumnos que realizaron la práctica. En esta sección puedes explicar tus errores y aciertos. Pregúntate ¿qué tan confiables son tus resultados?, si tus resultados no fueron los esperados explica ¿cuál fue la razón?, ¿tu trabajo, alcanzó el objetivo y competencia planteadas al inicio?, evalúa tu desempeño en general.
- *Bibliografía:* Las referencias deben citarse adecuadamente, ejemplos:  
Libro - Sneeler, P. Y Bianchi, D. 1993. Biología celular. Limusa. México. Pp.473-487  
Revista - Tolbert, N. E. Y Essner, E. 1981. Metabolic Pathway Peroxisomas and Glioxisomes. Ann. Rev. Biochem. 50:133-157.  
Sitio web – Solo se podrán incluir sitios web con dominio “.edu” e Incluir el link completo del sitio web revisado

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

PRÁCTICA No.	LABORATORIO	BIOLOGIA MOLECULAR	DURACIÓN(HORAS)
1	NOMBRE DE LA PRÁCTICA	<i>NORMAS DE BIOSEGURIDAD</i>	2

### COMPETENCIA

Comprender la importancia que tiene la aplicación de normas de trabajo en un laboratorio de biología molecular en torno a la bioseguridad y calidad profesional de las técnicas desempeñadas.

### FUNDAMENTO

El trabajo realizado en un laboratorio de biología molecular se encuentra relacionado a la investigación y manipulación de los procesos biológicos que se desarrollan en los organismos vivos con un enfoque en el análisis sobre la naturaleza (estructura, función, y composición) de las moléculas que los componen.

### INTRODUCCIÓN

Los métodos de análisis que se emplean durante el desarrollo ponen en riesgo la bioseguridad de las personas que los realizan, el medio ambiente y personas en general. Debido a que en la práctica académica y profesional suelen verse involucrados la manipulación de microorganismos con peligrosidad para el ser humano, así como sustancias altamente peligrosas, los trabajos dentro de un laboratorio de biología molecular son regulados por las normas básicas de bioseguridad en términos de la buena práctica profesional, entre las cuales se incluyen las siguientes:

- Lavarse las manos antes de entrar y al salir del laboratorio.
- Mantener limpia y en orden su área de trabajo. Las mesas se lavan con jabón antibacterial y se esterilizan con alcohol etílico al 70% antes y después de ser utilizadas.
- Familiarizarse con las sustancias químicas y microorganismos a usar en el laboratorio. Cuando se realice manipulación de alguno de estos, informar a los demás para que tengan el cuidado necesario.
- Organizar detalladamente las técnicas experimentales que se usaran durante la práctica, antes de comenzar el trabajo experimental, usando un esquema para estimar el riesgo que se implica. En base a esto el procedimiento debe ser adaptado.
- La manipulación de sustancias químicas y/o microorganismos se realizan bajo el nivel de bioseguridad conveniente para cada una de ellas. Ejemplo. Manipulación de microorganismos en cámaras de flujo laminar y sustancias químicas cancerígenas en áreas restringidas para evitar contaminación de todo el laboratorio y el personal.
- Es de suma importancia separar las zonas de trabajo para evitar contaminaciones cruzadas y degradación de las muestras contando con al menos las siguientes áreas:
  - Preparación de material, soluciones, buffers, geles, etc.
  - Extracción de ácidos nucleicos
  - Amplificación
  - Electroforesis

### Niveles de bioseguridad

La preocupación por regular las acciones de trabajo de los laboratorios en los cuales se realizan manipulaciones de agentes patógenos, y disminuir la probabilidad de amenaza por contaminación de los trabajadores y el medio ambiente ha traído como respuesta la generación de normas generales de contención desarrolladas para el control en el manejo de materiales infecciosos.

Las recomendaciones del CDC (centro de control de enfermedades, EUA) identifican 4 niveles de bioseguridad que representan las condiciones bajo las cuales un agente infeccioso puede manipularse de

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

forma segura. La adopción de un nivel en un laboratorio se basa en las prácticas y técnicas experimentales que se desarrollan.

- Nivel 1 – los agentes microbiológicos que se pueden manipular bajo este nivel no representan una amenaza para el humano (adultos saludables) pero lo pueden ser para personas inmunocomprometidas. Ejemplos de organismos son algunas especies de E. coli no patogénicas, etc. Para este nivel solo se requieren las practicas estándar de microbiología sin ninguna barrera recomendada, excepto por la recomendación de contar con un lava manos. Uso de guantes y quitarlos cuando sales de laboratorio, minimizar las salpicaduras para no crear aerosoles.
- Nivel 2 – recomendado cuando se trabaja con derivados biológicos con potencial de contener un agente infeccioso (sangre, fluidos corporales, etc.) Dentro de este nivel los principales peligros son picaduras con agujas y salpicaduras en ojos y nariz. Ejemplo de organismos que se manipulan con este nivel son algunas especies de salmonella, Toxoplasma, virus hepatitis B, y otros patógenos de la sangre los cuales son microorganismos que no causan infecciones mortales, que no son transmitidos por el aire y que existe tratamiento antibiótico contra ellos. El laboratorio cuenta con todas las barreras de nivel 1 y una autoclave para esterilización de los materiales usados, así como cámaras de extracción laminar para la realización de manipulaciones.
- Nivel 3 – recomendado para el trabajo con agentes que tienen el potencial de ser transmitidos por vías respiratorias que pueden provocar una infección grave y potencialmente letal. Uno de los principales riesgos es la exposición a aerosoles infecciosos. Los agentes estudiados en este nivel son Micobacterium tuberculosis, Coxiella burnetii, etc. Este nivel cuanta con todos los accesorios del nivel 2 y además tiene un acceso restringido, entrenamiento especial para el personal, descontaminación de todos los desechos y ropa que se usa dentro de estos. El área de trabajo debe tener acceso con puertas dobles que se abran solas, sistema de flujo de aire negativo con salida independiente.
- Nivel 4 – recomendado para la manipulación de agentes microbiológicos que representan un alto riesgo individual de enfermedades que ponen en riesgos la vida, que pueden transmitirse por aerosoles, o que su forma de transmisión es desconocida, y para los cuales no existen vacunas o terapias disponibles. Todos los microorganismos que pueden ser manipulados bajo este nivel son virus. Ejemplo de estos son en virus marburg.

Cada nivel de bioseguridad tiene barreras establecidas para ofrecer protección contra los microorganismos que se manipulen. Se cuenta con barreras primarias (guantes, bata, mascarillas, etc.) y barreras secundarias que son estructuras de los laboratorios que permiten la seguridad dentro del laboratorio tales como lavamanos, patrones especiales de ventilación, áreas separadas de contención. Etc. En el caso de muestras desconocidas es necesario tener un conocimiento previo de su origen y utilizar al menos las barreras primarias obligatoriamente.

#### **Eliminación de material contaminado**

En los laboratorios, la descontaminación y la eliminación de desechos son operaciones estrechamente relacionadas. En el trabajo cotidiano, algunos materiales contaminados son destruidos, mientras que la mayor parte de la cristalería, los instrumentos y la ropa del laboratorio vuelve a utilizarse. El principio básico es que todo el material que ha estado en contacto con microorganismos (potencialmente infeccioso) ha de ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado.



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

Un residuo infeccioso puede definirse como aquel material capaz de producir una infección, y en el laboratorio de microbiología los mismos son generados cada vez que se realiza un ensayo microbiológico de rutina, porque el material empleado ha entrado en contacto con microorganismos. Su manipulación debe ser realizada con mucho cuidado, para evitar la contaminación del ambiente y del personal que trabaja en el laboratorio. (Bioseguridad) A continuación se presentan algunas medidas que se deben tomar en cuenta para manipular y eliminar el material contaminado dentro del laboratorio.

- No se debe descartar ningún material contaminado directamente al desagüe ni en los depósitos de basura.
- Todo el material contaminado (vidrio, metálico, etc.) deberá ser colocado en recipientes irrompibles y resistentes al calor, ubicados en el área de trabajo. Si el material es desechable debe ser colocado directamente en las bolsas rojas de desechos biológicos para posteriormente ser esterilizados y descartados.
- No se debe retirar el material contaminado una vez que ha sido colocado en los recipientes destinados a su recolección, pues ello puede ocasionar accidentes por cortaduras, pinchazos o contacto directo con material contaminado.
- No se debe transferir el material de un recipiente a otro.
- Las micropuntillas deben descartarse dentro de recipientes plásticos especiales que contengan en el fondo una solución desinfectante.
- Los materiales punzantes deben descartarse en recipientes especiales a prueba de perforaciones. En el caso de las agujas nunca se les debe colocar directamente el protector plástico.
- Las láminas porta-objetos, así como los cubre-objetos, se deben descartar recipientes plásticos especiales que contengan en el fondo una solución desinfectante.
- Todos los recipientes que contienen material contaminado deberán trasladarse al área de esterilización, lavado y preparación en carros diseñados para transportar material.
- No se deben dejar por ningún motivo, recipientes con material contaminado en los pasillos o en lugares que no correspondan al área de trabajo o esterilización.
- Todo material reutilizable contaminado deberá seguir la siguiente secuencia de tratamiento:
  1. Esterilización: La esterilización por calor húmedo (autoclave) es uno de los métodos más empleados para la descontaminación de medios de cultivo y cualquier material que contiene sustancias que se pueden adherir al emplear la esterilización por calor seco (horno).
  2. Lavado
  3. Secado
  4. Preparación
  5. Esterilización
  6. Almacenamiento
- Todo material biológico no reutilizable contaminado deberá seguir la siguiente secuencia de tratamiento:
  1. Esterilización (autoclave o incineración) en bolsas rojas plásticas de desechos biológicos, marcadas con un código de color.
  2. Eliminación de las bolsas bien categorizadas (bolsas rojas)  
Se recomienda que el material a desechar se coloque en contacto con una solución desinfectante antes de su esterilización.
- Para manipular los recipientes con material contaminado el personal debe utilizar guantes resistentes, delantales plásticos, botas, gorros y otros elementos de protección, los cuales deben adaptarse a la tarea que se va a realizar y mantenerse en buenas condiciones de higiene. En caso

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

de que se produzca la ruptura de uno de los guantes, éste debe retirarse y descartarse en bolsas plásticas; inmediatamente el trabajador debe lavar sus manos con abundante agua y jabón, colocar una solución antiséptica y colocar un nuevo par de guantes.

- Se deben mantener en óptimas condiciones de higiene todos los recipientes donde se coloca el material contaminado, así como los carros para transporte de material y las áreas de disposición final del material de desecho.

#### **MATERIAL Y/O EQUIPO**

- Equipo de laboratorio
- NOM's
- Ley nacional de organismos genéticamente modificados
- Niveles de bioseguridad (CDC)

#### **PROCEDIMIENTO**

- Leer y entender las normatividades que rigen los laboratorios de biología molecular.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

**PRELABORATORIO 1  
NORMAS DE BIOSEGURIDAD**

I. Escoge la respuesta correcta.

1.- ¿Qué nivel de seguridad de laboratorio, es el laboratorio de biología molecular en ECITEC?

- a) Nivel 1                      b) Nivel 2                      c) Nivel 3                      d) Nivel 4

2.- ¿Cuál es el objetivo de la práctica de Bioseguridad?

- a) Comprender las normas de trabajo en un laboratorio en torno a la bioseguridad  
b) Comprender la importancia de cumplir con la clase y sus prácticas  
c) Entregar el material solicitado por el profesor  
d) Conocer sobre el ADN y sus propiedades

3.- ¿Cómo se manejan las muestras que provienen de una fuente desconocida?

- a) No se debe de maneja jamás una fuente desconocida  
b) Si no se conoce la naturaleza de la muestra no es necesario utilizar nada  
c) Uso de Barreras primarias obligatorias (guantes, bata, cubrebocas, etc.)  
d) Uso de barreras secundarias

4.- ¿Cuáles son los riesgos que puede sufrir una persona que trabaja en un laboratorio de biología molecular?

- a) Picaduras con agujas y salpicaduras en ojos y nariz.                      b) Contaminarse con Bromuro de etidio  
c) Inhalación de vapores tóxicos                      d) Todas las anteriores

5.- ¿Cómo se descontamina el material biológico para desecharse?

- a) Esterilización y disposición en bolsas rojas                      b) Lavado con cloro  
c) Lavado con alcohol                      d) Sólo disponerlo en la basura regular

6.- ¿Cuál es el equipo de protección básico del laboratorio?

- a) Ropa de invierno                      b) Traje de bioseguridad  
c) Guantes, bata, cubrebocas, lentes de protección                      d) Casco, botas y guantes térmicos

**Bibliografía**

- Organización Mundial de la Salud. 2005. Manual de Bioseguridad en el laboratorio. 3. 1-223.
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMAARNT-SSA1-2002. Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos-Clasificación y Especificaciones de Manejo. Secretaria de Medio ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

PRÁCTICA No.	LABORATORIO	BIOLOGIA MOLECULAR	DURACIÓN(HORAS)
2	NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Habilidades Básicas del laboratorio de Biología Molecular	2

### COMPETENCIA

Adquirir las habilidades necesarias desempeñarse en el laboratorio de biología molecular con total autonomía, siguiendo las prácticas de bioseguridad y adquiriendo calidad profesional en las técnicas a desarrollar.

### FUNDAMENTO

El trabajo realizado en un laboratorio de biología molecular se encuentra relacionado a la investigación y manipulación de los procesos biológicos que se desarrollan en los organismos vivos con un enfoque en el análisis sobre la naturaleza (estructura, función, y composición) de las moléculas que los componen.

### INTRODUCCIÓN

La micropipeta es un instrumento de laboratorio empleado para absorber y transferir pequeños volúmenes de líquidos y permitir su manejo en las distintas técnicas científicas.

Los volúmenes captables por estos instrumentos varían según el modelo: los más habituales, denominados p20, p200 y p1000, admiten un máximo de 20, 200 y 1000  $\mu$ l, respectivamente.

#### *Tipos*

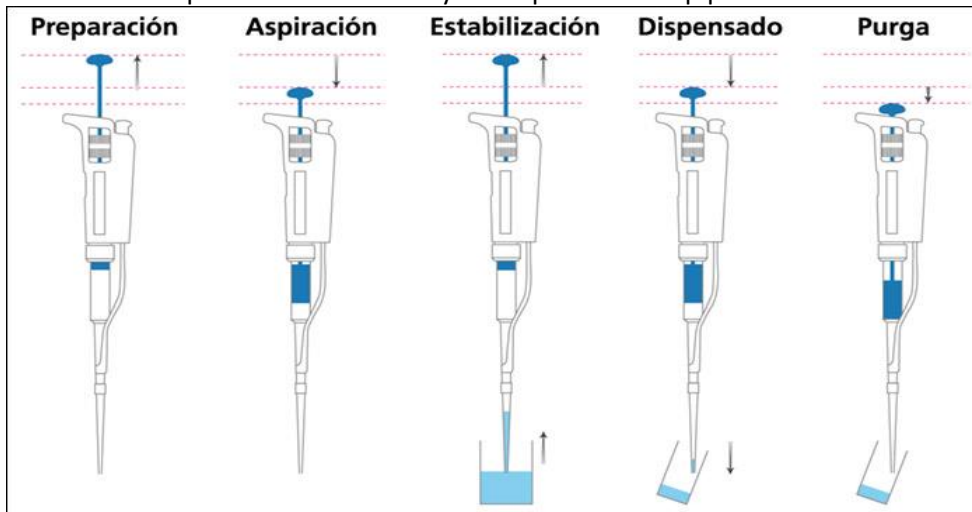
Micropipetas manuales: en las que el volumen a aspirar se fija girando un botón en su parte superior que está conectado a un sistema analógico de confirmación de volumen, y automáticas, en las cuales dicho sistema es digital.

Micropipetas simples: que sólo acogen una punta cada vez

Multicanales: permiten incorporar múltiples puntas absorbiendo el mismo volumen en todas ellas.

#### *Técnica de pipeteo para líquidos claros:*

- Se presiona el botón superior suavemente hasta el primer tope.
- Se sumerge la punta, en la solución que se necesita pipetear estando seguros que la punta este bien colocada y que no haya ningún tipo de residuos entre la punta y el cuerpo de la pipeta.
- Mantenga la pipeta verticalmente mientras toma la solución.
- Para descartar la solución de la punta presione el botón hasta el segundo tope.
- Descarte las puntas utilizando el eyector que traen las pipetas.



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

*Técnica de pipeteo para líquidos con alta viscosidad:*

- Presione el botón superior hasta el segundo tope.
- Sumerja la punta en la solución (2-3 mm) y suelte el botón despacio. La punta tiene que estar bien llena.
- Descarte el líquido de la punta presionando suavemente el botón superior hasta el primer tope.

*Cuidados y Mantenimiento del Equipo*

- Iniciar el día limpiando la parte externa de las pipetas de polvo o suciedad.
- Use solamente etanol al 70% para la limpieza de la pipeta. Otro tipo de solvente no es aconsejable.
- Utilizar las puntas adecuadas a las pipetas y a la cantidad de solución que se va a medir.
- El pistón y el cilindro pueden ser revisados dos veces al año si la pipeta es usada diariamente.

**MATERIAL**

Juego de micropipetas  
 Tubos de microcentrifuga de 0.5ml o 1.5 ml  
 2 vasos de precipitado de 100 ml

**REACTIVOS**

Agua destilada

**PROCEDIMIENTO**

- Análisis de error.
  - Preparación: Presione un tubo de micro centrifuga de 1.5 ml, coloque el tubo en la balanza analítica y presione el botón de tarar.
  - Medición: pese el volumen de agua determinado en la tabla 1. Para determinar la precisión de las micropipetas, debe de repetir el experimento varias veces.
  - Adicione el primer volumen de agua destilada al tubo de micro centrifuga, utilizando una micro pipeta de 100ul o 200 µl, de acuerdo a lo mostrado en la tabla 1. Tome la lectura de la balanza analítica. Repita el procedimiento. Cuando el tubo llegue a su capacidad total, reemplácelo por uno nuevo.

4. Llene la siguiente tabla con las mediciones realizadas

Volumen (µl)	Integrante de equipo	Peso tubo vacío (g)	Peso tubo lleno (g)	Diferencia de pesos	Promedio	Desviación estándar
10 ul						
50 ul						
100 ul						

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

**PRELABORATORIO 2**  
**HABILIDADES BÁSICAS DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

- I. Conteste lo que se indica
- 1) Técnicas de pipeteo (micropipetas)
- a) Enumere las técnicas de pipeteo que existen.
- 
- b) Describa el manejo adecuado de las micropipetas
- 
- 
- c) Mencione algunas medidas de mantenimiento de las micropipetas
- 
- 
- 2) Mencione que es una balanza trip y su funcionamiento
- 
- 
- 3) Escriba las fórmulas para obtener el promedio y la desviación estándar.
- 
- 
- 4) ¿Cuál es la fórmula para calcular exactitud?

a)  $V = (w + e) \times Z$

b) 
$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (V_i - \bar{V})^2}{n - 1}}$$

c)  $A = \bar{V} - V_s$

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

II. Relaciona ambas columnas

	Concepto	Descripción
a)	Exacto, pero no preciso	( ) El volumen medio difiere del esperado, pero los diferentes pipeteos tienen poca variación entre sí
b)	Preciso, pero no exacto	( ) El volumen medio se corresponde con el valor esperado, pero los diferentes pipeteos varían mucho entre sí.
c)	Exacto y preciso	( ) El volumen medio se corresponde con el valor esperado y los diferentes pipeteos no varían entre sí

III. Realice los cálculos para preparar las siguientes soluciones: *(incluir cálculos)*

- a) ¿Cuántos gramos de NaCl se requieren para preparar 375 ml de NaCl 0.83 M?
- a) 1.8177 gr de NaCl                      b) 18.177 gr de agua                      c) 18.177 gr de NaCl  
d) 25.38 gr de NaCl                      e) 8.3 gr de NaCl

- b) ¿Cuántos gramos de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  se necesitan para preparar 500 ml de 1 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ?

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

PRÁCTICA No.	LABORATORIO	BIOLOGIA MOLECULAR	DURACIÓN(HORAS)
3	NOMBRE DE LA PRÁCTICA	PREPARACIÓN DE MATERIAL Y REACTIVOS	2

### COMPETENCIA

Desarrollar la capacidad técnica y cognoscitiva para la preparación de diluciones y esterilización de materiales que se utilizan en el laboratorio de biología molecular

### FUNDAMENTO

Algunos de los factores importantes al realizar las técnicas de laboratorio de biología molecular son los relacionados al almacenaje y preparación de medios de cultivo bacterianos y su esterilización, preparación de soluciones tampón a través de un cálculo adecuado en sus concentraciones, etc.

### INTRODUCCIÓN

#### *Calculo de concentraciones*

La preparación de soluciones a concentraciones deseadas es un factor importante en la práctica de la biología molecular. Dentro de esto es necesario entender los procedimientos experimentales en su elaboración. Así como en comprender los fundamentos teóricos de las diferentes medidas de concentración que se utilizan.

La molaridad es la cantidad de moles que se tienen en un litro de determinada solución. En la preparación de una solución 1M, se pesa un mol (el peso molecular en gramos) de la sustancia y se disuelve en menos de 1 litro del solvente; para cuando se disuelva completamente, aforar la solución hasta 1 litro. Cuando se preparan disoluciones a un pH determinado se debe dejar volumen para añadir el ácido o base hasta el valor ideal y luego aforar con disolvente hasta 1 litro.

#### *Dilución de soluciones*

Cuando se preparan mezclas a partir de soluciones ya preparadas, se diluye cada componente usando la siguiente ecuación  $V_1C_1=V_2C_2$ . En la cual  $V_1$  es el volumen de solución ya preparada a la concentración  $C_1$  que debe ser añadida al volumen final  $V_2$  (volumen necesario para los experimentos) de concentración final  $C_2$  (concentración que se necesita para las practicas) la formula funciona para soluciones molares, porcentuales y peso/volumen.

#### *Relación entre la densidad y la concentración*

Algunas sustancias llegan al laboratorio como líquidos puros sin ninguna especificación de concentración. La concentración se calcula a partir de su densidad, usando la concentración molar como base. Por ejemplo, una sustancia cuya densidad es de 1.23g/ml se obtiene y desea calcular su concentración molar. Se toman 1ml y se calcula que en ese volumen se tiene 1.23 gramos de la sustancia. Se busca cuantos moles existen en esa cantidad de gramos y se divide entre el peso molecular de la sustancia.  $1.23/PM = \#$  de moles. Los moles se pueden usar para preparar soluciones molares usando la fórmula de molaridad.

### MATERIAL Y/O EQUIPO

- Autoclave
- Materiales de laboratorio
- Calculadora, papel y lápiz

### REACTIVOS

- Tris
- HCL
- NaCl
- EDTA
- SDS
- Agua desionizada



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

## PROCEDIMIENTO

### *Esterilización de materiales*

#### *Líquidos*

- 1.- Llenar las botellas hasta un 70 % de su capacidad.
- 2.- Poner el tapón de la botella cerrando completamente la botella con fuerza para después soltar el tapón hasta aproximadamente 1/3 de sus vueltas.
- 3.- Cuidado con las botellas de agua no cerrar totalmente con los tapones. (peligro de explotación)

#### *Preparación de plásticos (Tubos eppendorf, PCR)*

- 1.- Preparar contenedores de vidrio, vasos de precipitado de 1L, con suficientes tubos eppendorf para las prácticas que se realizaran.
- 2.- Poner un tapón de gasa estéril en la parte superior, por encima de los tubos eppendorf.
- 3.- Sobre la gasa poner una capucha de papel destreza pegada con tape blanco sobre la boca del matraz.

#### *Materiales de vidrio*

- 1.- Envolver con papel traza los utensilios de vidrio de la forma más adecuada para que no sufran contaminación cuando sean sacados de la autoclave para su almacenamiento.

#### *Autoclave*

- 1.- Seleccionar el tiempo necesario para el proceso, 15-20 minutos
- 2.- Seleccionar la presión necesaria para el proceso, 20 psi, algunas autoclaves tienen ese parámetro asignado para todos los procesos. Asegurarse que ese valor se encuentre dentro del área verde del funcionamiento del aparato.
- 3.- Acomodar todos los artículos a esterilizar acomodándolos de tal forma que no tengan riesgo de caer y romperse durante el proceso.
- 4.- Cerrar la puerta de la autoclave.
- 5.- Iniciar el proceso dando inicio al interruptor y dejar que el aparato realice la esterilización (autoclaves eléctricas). Observe si hay necesidad de abrir la válvula de escape de la autoclave. El proceso debe ser observado por un integrante del equipo durante todo su transcurso.
- 6.- Cuando el proceso termina dejar hasta que la presión dentro del aparato es igual a la del ambiente para ser abierta la puerta. ATENCION. Si se abre la puerta antes de esto la presión de vapor puede ser tan fuerte que quemara a quien la abra.

#### *Preparación de reactivos*

Solución amortiguadora:

- a) Tris-HCl 10 mM pH 8.0                      b) NaCl 100 mM                      c) EDTA 1 mM pH 8.0

Pesar las cantidades necesarias de Tris base, EDTA y NaCl para 100 mL de solución. Disolver en 90 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8 con unas gotas de HCl y aforar a 100 mL.

Solución amortiguadora de almacenamiento

- a) Tris-HCl 5.0 mM pH 8.0                      b) EDTA 0.1 mM pH 8.0

Pesar las cantidades necesarias de Tris base y EDTA para 100 mL de solución. Disolver en 90 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8 con unas gotas de HCl y aforar a 100 mL.

c) Solución SDS al 20%: Tomar por pipeteo la cantidad necesaria de SDS para realizar una solución del 20%, diluir en agua destilada.

d) Solución NaCl 6M: Pesar la cantidad de NaCl necesaria, diluir en agua destilada.

d) Solución Etanol al 70%: Tomar por pipeteo la cantidad necesaria de Etanol para realizar una solución del 70%, diluir en agua destilada.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

**PRELABORATORIO 3  
PREPARACIÓN DE MATERIAL Y REACTIVOS**

Escoge la respuesta correcta

1.- ¿Que formula es la que se emplea para calcular Molaridad?

- a)  $M = n/L$       b)  $\rho = m/v$       c)  $C1V1 = C2V2$       d)  $E = mc^2$

2.- Es la cantidad de moles que se tienen en un litro de determinada solución.

- a) Normalidad      b) Densidad      c) Molaridad      d) Porcentaje

3.- ¿Qué fórmula se utiliza para diluir una solución?

- a)  $M = n/L$       b)  $\rho = m/v$       c)  $C1V1 = C2V2$       d)  $E = mc^2$

4.- Si se quiere preparar 100 mL de una solución de NaOH al 10%. ¿Cuántos gramos de NaOH debe de utilizarse?

- a) 100 gr      b) 10 gr      c) 1 gr      d) 1000 gr

5.- ¿Cuál de estas sustancias es Neurotóxica?

- a) Agua      b) Etanol      c) Cloroformo      d) Fenol

6.- ¿Qué presión es la principalmente utilizada en la esterilización por autoclave?

- a) 50 psi      b) 20 psi      c) 5 psi      d) 15 psi

Realice los siguientes cálculos: *(incluya los cálculos)*

7.- Si la densidad de una solución que contiene 5 g de tolueno y 22.5 g de benceno es 0.876 g/mL. Calcula la molaridad, el porcentaje molar y el porcentaje en peso de esta solución.

- a) 3.5 M      b) 1.7 M      c) 7 M      d) 8.5 M

8.- Calcular la fracción molar de NaClO en una solución blanqueadora comercial que contiene 3.62 % en peso del soluto.

- a)  $8.9 \times 10^{-3}$       b)  $2 \times 10^{-3}$       c)  $15 \times 10^{-3}$       d)  $88.9 \times 10^{-8}$

**Gestión de Residuos:**

No se deseche en el fregadero. Pregunte al instructor como disponer de este residuo.

**Bibliografía**

- Skoog, D.A. and West, D.M. 2005. Fundamentos de química analítica. Cengage Learning Editores. Vol (8). ISBN: 9706863699, 9789706863690.
- Danzer, C. 2007. Analytical chemistry: theoretical and metrological fundamentals. Springer. ISBN: 3540359885, 9783540359883.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

PRÁCTICA No.	LABORATORIO	BIOLOGIA MOLECULAR	DURACIÓN(HORAS)
4	NOMBRE DE LA PRÁCTICA	EXTRACCIÓN DE ADN	6

### COMPETENCIA

Familiarizarse con los protocolos existentes de extracción de ADN y los posibles cambios que se pueden realizar para optimizar su extracción.

### FUNDAMENTO

Muchas técnicas de biología molecular incluyen algún tipo de manipulación del material genético. El ácido desoxirribonucleico (ADN) es la molécula que guarda el código genético de todas las células. Sin importar el tipo de organismo. El ADN genómico contiene ADN nuclear y mitocondrial, así como ADN de cloroplasto en el caso de plantas.

### INTRODUCCION

Todos los métodos de preparación de las muestras para la extracción de AND pueden dividirse en una serie de pasos generales que incluyen la preservación del tejido, la liberación de los ácidos nucleicos, su purificación o aislamiento y la estabilización o protección de los mismos. Inicialmente estos procedimientos eran largos y tediosos, podían pasar días antes de saber con certeza que se había logrado obtener ADN en calidad y cantidad suficiente para poder manipularlo. Sin embargo, gracias a los avances tecnológicos en el campo de la biología molecular, hoy día podemos obtener suficiente ADN de buena calidad en cuestión de minutos.

Es importante mencionar que no existe un método universal que garantice los mejores resultados en cualquier tipo de tejido y son muchos los factores que deberán tomarse en cuenta al momento de seleccionar un protocolo que mejor se ajuste a las necesidades de cada estudio.

Hoy día se pueden comprar kits de extracción de ADN listos para usar. Estos kits ayudan a extraer ADN de tipos de células particulares o tipos de muestra. Sin embargo, puede ser costoso su uso rutinario, por lo que muchos laboratorios tienen sus propios métodos para la extracción de ADN. Por lo que se explica de manera general los pasos a seguir para realizar una extracción de ADN.

#### *Paso 1. Romper las células para liberar el ADN*

Cuando se tiene un tejido celular es necesario separar las células que se encuentran unidas entre sí, a menudo este procedimiento se realiza por medios físicos, como es la molienda y la agitación en Vórtex, colocando una solución que contiene sal. Los iones de sodio ( $\text{Na}^+$ ), cargados positivamente ayudan a proteger los grupos fosfato con carga negativa que se extienden a lo largo de la cadena de ADN. Luego se agrega un detergente. El detergente descompone los lípidos en la membrana celular y los núcleos. El ADN se libera cuando estas membranas se rompen.

#### *Paso 2. Separación de ADN de proteínas y otros desechos celulares*

Para obtener una muestra de ADN limpia, es necesario eliminar la mayor cantidad de desechos celulares posible. Esto se puede hacer por una variedad de métodos. A menudo, se agrega una proteasa (enzima proteica) para degradar las proteínas asociadas con el ADN y otras proteínas celulares. Alternativamente, algunos de los restos celulares pueden eliminarse filtrando la muestra.

#### *Paso 3. Precipitar el ADN con un alcohol*

Finalmente, se agrega cuidadosamente alcohol helado (ya sea etanol o isopropanol) a la muestra de ADN. El ADN es soluble en agua, pero insoluble en presencia de sal y alcohol. Al agitar suavemente la capa de alcohol con una pipeta estéril, un precipitado se vuelve visible y puede ser expulsado. Si hay mucho ADN, es posible que vea un precipitado fibroso y blanco.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

#### *Paso 4. Purificación del ADN*

La muestra de ADN ahora puede purificarse más (limpiarse). Luego se resuspende en un buffer ligeramente alcalino, que se conoce como buffer de almacenamiento

Una vez extraído, el ADN puede usarse para análisis moleculares que incluyen PCR, electroforesis, secuenciación, huella digital y clonación, entre otras.

#### **REACTIVOS**

- Sol. Amortiguadora de sales.
- NaCl 6M.
- SDS al 20%
- Proteinasa K (20 mL/mg)
- Isopropanol al 99%
- Etanol al 70%
- Sol. Amortiguadora de Almacenamiento.

#### **MATERIAL Y EQUIPO**

- Tubos eppendorf de 1.5 mL
- Micropipetas
- Micropuntillas
- Baño maría
- Vórtex
- Centrifuga

#### **PROCEDIMIENTO**

1. Cortar el tejido en fragmentos pequeños y pesar aproximadamente de 10 a 30 mg; colocar esta cantidad en un tubo estéril de 1.5 mL.
2. Agregar 400 µL de la solución de sales y homogenizar con ayuda de un pistilo plástico estéril. El uso de una cantidad mayor de tejido requerirá de un mayor volumen de solución por lo que se recomienda no colocar más de 30 mg.
3. Agregar al homogenizado 40 µL de SDS al 20% y 8 µL de Proteinasa K con una concentración de 20 mg/mL (la concentración final en la solución de sales será de 2% de SDS y 400 µg/mL de Proteinasa K).
4. Asegurarse que los tubos estén perfectamente tapados e incubarlos a una temperatura de entre 55 y 65°C hasta que el tejido se digiera (esto puede variar dependiendo del tipo de tejido entre 1 y 3 horas).
5. Añadir 300 µL de NaCl 6 M, agitar en el vórtex durante 30 segundos e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Centrifugar a 10,000 X g por 30 minutos.
7. Recuperar en un nuevo tubo de 1.5 mL entre 600 y 700 µL de la mezcla, evitando acarrear el debris del fondo.
8. Agregar 650 µL de isopropanol al 99%, tapar el tubo, agitar vigorosamente durante algunos segundos e incubar en el refrigerador por 30 minutos.
9. Centrifugar a 12,000 X g por 15 minutos
10. Generalmente puede apreciarse el DNA precipitado en el fondo del tubo. Decantar el alcohol cuidando que el precipitado no se despegue de la pared del tubo.
11. Agregar 500 µL de etanol al 70% y centrifugar por 5 minutos a 12,000 X g.
12. Decantar de nuevo el alcohol y dejar secando los tubos abiertos e invertidos sobre papel secante durante unos 5 minutos.
13. Secar en la centrifuga con las tapas abiertas por 15 minutos a velocidad máxima.
14. Resuspender el DNA en 30 µL de solución amortiguadora de almacenamiento.
15. Guardar a 4° C si el DNA se va a utilizar inmediatamente o a -20° C para su posterior uso.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

**PRELABORATORIO  
EXTRACCIÓN DE ADN**

I. Conteste las siguientes preguntas.

1. ¿Cuáles son las partes que conforman el ADN?

2. ¿Cuáles son los pasos para la extracción de ADN?

3. ¿Para qué sirve la solución rica en sales en la extracción de ADN?

4. ¿Por qué se agrega alcohol cuando se realiza la extracción de ADN?

5. ¿Cuál es la función y la importancia del ADN en los organismos?

**Gestión de Residuos.**

No se dispense las soluciones en el fregadero.

**Bibliografía**

1. Milligan BG (1998) Total DNA isolation. In: Hoelzel AR, editor. Oxford, , New York, Tokyo: Oxford University Press. pp. 29–64. BG Milligan 1998 Total DNA isolation. AR Hoelzel Oxford, , New York, Tokyo Oxford University Press 2964 Molecular Genetic Analysis of Population: A Practical Approach, 2nd Edition. Molecular Genetic Analysis of Population: A Practical Approach, 2nd Edition.
2. Chomczynski P, Wilfinger W, Mackey K (1998) Isolation of Genomic DNA from Human, Animal, and Plant Samples with DNAzol Reagents. Biotechnol Int 185–188. P. Chomczynski W. Wilfinger K. Mackey 1998 Isolation of Genomic DNA from Human, Animal, and Plant Samples with DNAzol Reagents. Biotechnol Int 185 188.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

PRÁCTICA No.	LABORATORIO	BIOLOGIA MOLECULAR	DURACIÓN(HORAS)
5	NOMBRE DE LA PRÁCTICA	ESTIMACION DE LA CONCENTRACION DE ADN POR ESPECTROFOTOMETRIA	2

### COMPETENCIA

Aplicar el conocimiento de las propiedades físicas de la energía luminosa al efecto que esta tiene sobre las particularidades químicas de sustancias biológicas para el diseño de un método de estimación de la concentración y pureza de material genético proveniente de una muestra real de un tejido animal o vegetal.

### FUNDAMENTO

Una forma rápida para estimar la biomasa total presente en una muestra es mediante la extracción y cuantificación de ácidos desoxirribonucleicos (ADN) totales. Sólo organismos vivos y viables poseen ácidos nucleicos por lo que el análisis de este constituyente celular es representativo de la abundancia de organismos en un ambiente natural. En términos generales, las células son quebrantadas y homogenizadas con enzimas y detergentes. El ADN puede entonces ser precipitado y separado del debris celular. Finalmente, el ADN es cuantificado por espectrofotometría.

### INTRODUCCIÓN

#### ESPECTROFOTOMETRIA

La espectrofotometría es el método de análisis óptico más usado en las investigaciones biológicas. El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

Todas las sustancias pueden absorber energía radiante, aun el vidrio que parece ser completamente transparente absorbe longitud de ondas que pertenecen al espectro visible; el agua absorbe fuertemente en la región del infrarrojo.

La absorción de las radiaciones ultravioleta, visibles e infrarrojas depende de la estructura de las moléculas, y es característica para cada sustancia química.

Cuando la luz atraviesa una sustancia, parte de la energía es absorbida; la energía radiante no puede producir ningún efecto sin ser absorbida.

El color de las sustancias se debe a que éstas absorben ciertas longitudes de onda de la luz blanca que incide sobre ellas y solo dejan pasar a nuestros ojos aquellas longitudes de onda no absorbida.

La determinación precisa de la cantidad del DNA puede hacerse por espectrofotometría o fluorometría.

La espectrofotometría es un método analítico fundamentado en la evaluación de la interacción entre las radiaciones electromagnéticas y las moléculas, medida a través de la absorción o la transmisión de luz de la sustancia en cuestión. De acuerdo con el tipo de radiación o luz empleada, la espectrofotometría puede ser de absorción visible (colorimetría), ultravioleta o infrarroja. La principal aplicación de la espectrofotometría en el campo de la biología molecular y la genética, es el análisis cuantitativo de ácidos nucleicos y proteínas.

Los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta debido a la presencia de las bases aromáticas nitrogenadas o nucleótidos, cada una de las cuales tiene su propio y único espectro de absorción (dGTP: 255 nm; dATP: 259 nm; dCTP: 272 nm; dTTP: 247 nm) y por lo tanto contribuye de manera diferente a la propiedad total de absorción de UV de una molécula de DNA (~260 nm). La espectrofotometría proporciona una estimación simple y precisa de la concentración de DNA cuando este se encuentra relativamente puro, sin contaminación significativa de proteínas o solventes orgánicos que absorben a longitudes de onda similares.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

La fluorometría hace uso de marcas fluorescentes que se unen específicamente a los ácidos nucleicos. El fluorómetro emite luz sobre la muestra (excitación) y mide el nivel de luz fluorescente que esta emite en forma perpendicular a la del haz de excitación. La fluorometría es 1000 veces más sensible que la espectrofotometría por absorbancia por el hecho de que la señal fluorescente se magnifica cuando el marcador se une al DNA o RNA, además de que, al ser altamente específicos para cada tipo de ácido nucleico, las proteínas y otros componentes celulares no interfieren con la lectura.

Pese a su ampliamente extendido uso y reconocida resolución, tanto la espectrofotometría como la fluorometría tienen la gran desventaja de que no permiten conocer el nivel de degradación del ácido nucleico, sino solo su concentración y pureza relativas.

### MÉTODOS FOTOMÉTRICOS DE ANÁLISIS

#### 1. NATURALEZA DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA

La Radiación Electromagnética es una forma de Energía radiante que se propaga en forma de ondas. En este fenómeno ondulatorio se define:

a) Longitud de onda ( $\lambda$ ): es la distancia entre dos máximos de un ciclo completo del movimiento ondulatorio. Se expresa, según el S.I. en nanómetros (nm) y sus equivalencias son:  $1\text{nm} = 1\text{mm} = 10^9 \text{Å} = 10^{-9} \text{m}$ .

b) Frecuencia ( $\nu$ ): es el número de ciclos por segundo. Es inversa a la longitud de onda. Su fórmula es:  $\nu = c/\lambda$ , y se mide en ciclos por segundo o hertzios.

c) Fotones: la luz está formada por fotones, y estos son paquetes discontinuos de E. La E de un fotón depende de la frecuencia y de la longitud de onda, según la siguiente expresión:  $E = h \times \nu = h \times c/\lambda$  ( $h = \text{Cte. de Planck} = 6,62 \cdot 10^{-27} \text{erg/seg.}$ ). La Energía Electromagnética se mide en Ergios. La relación entre la longitud de onda y la Energía es inversa, por lo tanto, a menor longitud de onda mayor Energía y viceversa.

d) Espectro Electromagnético: cubre un amplio intervalo de E radiante, desde los rayos  $\gamma$  de longitud de onda corta hasta las ondas de radio, de longitud de onda larga. Se divide en varias regiones, las más interesantes para nosotros son:

- Región Ultravioleta:  $\lambda = 10\text{-}380 \text{ nm}$
- Región Visible:  $\lambda = 380\text{-}780 \text{ nm}$
- Región Infrarroja:  $\lambda = 780\text{-}30.000 \text{ nm}$

En la Región Visible, la luz se descompone en colores. La luz blanca contiene todo el espectro de longitudes de onda. Si interacciona con una molécula puede ser dispersada o absorbida.

#### 2. FENÓMENOS DE INTERACCIÓN ENTRE LUZ Y MATERIA

##### A. FENÓMENO DE ABSORCIÓN

Cuando una partícula que se encuentra en estado de reposo o estado fundamental interacciona con un haz de luz, absorbe E y se transforma en una partícula en estado excitado. La molécula absorbe la E de la onda y aumenta su energía, y ese aumento de energía es igual a la E de la Radiación Electromagnética absorbida ( $E = h \cdot \nu$ ). La partícula en estado excitado tiende a volver de forma espontánea a su estado de reposo desprendiendo la E absorbida en forma de calor.

“Espectro de Absorción”. Cada especie absorbente, que recibe el nombre de cromógeno, tiene un determinado espectro de absorción. El espectro de absorción es un gráfico donde se representa en ordenadas la Absorbancia y en abscisas la longitud de onda. La medida de la cantidad de luz absorbida por una solución es el fundamento de la espectrofotometría de absorción.

Por eso es importante trabajar a la longitud de onda a la que la sustancia estudiada absorbe la mayor cantidad de luz (a mayor cantidad de luz, mayor cantidad de sustancia).

##### B. FENÓMENO DE EMISIÓN

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

Algunos compuestos, tras ser excitados por la luz, vuelven al estado fundamental produciendo la emisión de energía radiante. En este caso, lo que se mide es la energía emitida y, en este fenómeno se basa la “fotometría de llama” o la “fluorescencia”.

### 3. LEYES DE ABSORCIÓN

Cuando un haz de luz pasa a través de un medio, se registra una cierta pérdida de intensidad, debido a la absorción por parte de la sustancia.

Se llama “TRANSMITANCIA (T)” a la relación entre la luz incidente y la luz transmitida:

$$T = I_s / I_0 ; \%T = (I_s / I_0) \times 100.$$

Se puede perder intensidad por la interacción con la cubeta o el solvente. Para evitar este error se hace una primera medida con una solución de referencia o BLANCO, que contiene todos los posibles compuestos que intervienen en la lectura menos el que vamos a medir. Todas las medidas que se hagan con posterioridad serán referidas a esta medida inicial y se harán en la misma cubeta que se utilizó en la medida del blanco.

La Transmitancia se usa poco, se emplea más la Absorbancia (A) porque la relación entre A y la concentración de una solución es directamente proporcional y la de la T es inversamente proporcional.

La relación entre la absorbancia y la transmitancia es la siguiente:

- Si el %T = 100       $A = 2 - \log T = 2 - \log 100 = 0$

- Si el %T = 0       $A = 2 - \log 0 = \infty$

En los aparatos que se usan actualmente se presentan absorbancias, pero el aparato lo que mide realmente es %T que luego transforma a absorbancia.

#### 3.1. LEY DE BEER

“La absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración y a la longitud del paso de la luz”.  $A = e \cdot b \cdot c$

Siendo: A: absorbancia (Sin unidades), e: el coeficiente de extinción molar, también llamado coeficiente de absorción (unidades  $1/(\text{mol}/\text{cm})$ ), b: es la longitud de paso de la luz (cm), c: es la concentración del absorbente (mol/L). La aplicación práctica de la Ley de Beer es, que conociendo la absorbancia de una sustancia podemos averiguar su concentración y esto lo podemos hacer de dos formas:

1. Por comparación con una solución conocida: si tenemos 2 soluciones, un problema (P) y una estándar (S), podemos establecer la siguiente relación matemática entre ellas:
2. A través de una curva de calibración: la curva de calibración es la representación gráfica en un eje de coordenadas de la Absorbancia (eje de ordenadas) frente a la Concentración (eje de abcisas). Se ensayan varias soluciones de concentración conocida y se determinan sus A, construyéndose la curva de calibrado, que es una recta. Una vez ensayadas las soluciones problemas, su concentración se averigua por interpolación de las A de las soluciones problema en la curva de calibración.

Hay que tener en cuenta la LINEALIDAD, que es el intervalo de concentraciones del cromógeno entre las cuales existe una relación lineal entre Absorbancia y Concentración. Cuando la concentración del cromógeno sobrepasa los límites de linealidad se deja de cumplir la Ley de Beer, convirtiéndose la recta en una curva. La lectura de la Absorbancia fuera de los límites de linealidad se traduce en una concentración falsamente baja de cromógeno. En esta situación, hay que diluir la muestra para que su concentración entre en los límites de la linealidad.

### 4. ESPECTROFOTÓMETRO

Se distinguen dos tipos de aparatos:



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

- Fotómetro o Colorímetro: se caracterizan porque utilizan filtros que solo permiten el paso de una determinada longitud de onda.
- Espectrofotómetros: utilizan cromadores. Con ellos se obtiene un haz de luz monocromático cuya longitud de onda se varía a voluntad. Los monocromadores pueden ser de dos tipos: prismas y redes de difracción.



## 2.2. COMPONENTES DEL ESPECTROFOTÓMETRO

1. Fuente de luz: proporciona energía radiante en forma de luz visible o no visible.

· Tipos de lámparas:

- Lámparas de filamento de tungsteno: se utilizan para longitudes de onda del espectro visible y el ultravioleta próximo. Son fuentes de un espectro continuo de energía radiante entre 360-950 nm.
- Lámparas de filamentos de haluros de tungsteno: son de mayor duración y emiten energía radiante de mayor intensidad.
- Lámparas de Hidrógeno y Deuterio: producen un espectro continuo en la región ultravioleta entre 220-360 nm.
- Lámparas de vapores de Mercurio: Emiten un espectro discontinuo o espectro de líneas que se utilizan para calibración de longitudes de onda, se emplean solo para espectrofotómetros y cromatografía HPLC.

· Precauciones:

- Las subidas y bajadas bruscas de tensión producen sufrimiento de la lámpara y cambios en las lecturas de la Absorbancia.
- La lámpara tiene una vitalidad limitada y se debe vigilar para que funcione bien el aparato. (03/10/01)

2. Rendija de entrada: tiene como función reducir al máximo la luz difusa y evitar que la luz dispersa entre en el sistema de selección de longitud de onda.

3. Monocromadores. Pueden ser:

- Prismas: son fragmentos con forma de cuña de un material que permite el paso de la luz. Ej. De vidrio para trabajar en el espectro visible o cuarzo para trabajar en el ultravioleta lejano.
- Redes de difracción: son un gran número de líneas paralelas situadas a distancias iguales entre sí y son hendiduras sobre un vidrio o una superficie metálica. Cada una de estas hendiduras se comporta como un pequeño prisma.

4. Rendija de salida: tiene como función impedir que la luz difusa atraviese la cubeta de la muestra, que provocaría desviaciones a la Ley de Beer. (04/10/01)

5. Cubeta: es el recipiente donde se coloca la muestra para la medición. Pueden ser de distintos tipos y tamaños (cuadradas, rectangulares, redondas). Se obtienen mejores resultados usando cubetas de bordes

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

paralelos. Si se utilizan cubetas redondas se deben marcar e introducir en el aparato siempre en la misma posición. Suelen estar fabricadas en vidrio o en plástico.

6. Detector. Puede ser de dos tipos:

- Fotocélulas o células fotovoltaicas:

Es una lámina de Cobre sobre la que se extiende una capa de Selenio o de Óxido de Cobre. A esto se le conoce como semiconductor. Sobre el semiconductor hay una capa de metal transparente que sirve de electrodo. La luz incide sobre el Selenio y éste desprende electrones, que pasan a la placa de Cobre originando una diferencia de potencial por existir carga negativa sobre el Cobre y positiva sobre el Selenio. El conjunto se conecta a un amperímetro que señala el paso de corriente. Características: son resistentes; económicas; sensibles desde el ultravioleta hasta los 1.000 nm. de longitud de onda; no se requiere batería externa, ni vacío, la corriente producida es directamente proporcional a la Energía que llega y tienen “efecto fatiga”, es decir, que presentan una subida inicial de corriente, que luego decrece progresivamente hasta el equilibrio. Por eso hay que esperar entre 30-60 segundos entre una lectura y otra.

- Fototubos multiplicadores:

Un fototubo multiplicador es un tubo que contiene un cátodo que emite electrones de forma proporcional a la Energía que incide sobre él. Tiene un ánodo que recoge los electrones y la corriente se multiplica varias veces al chocar los electrones sobre sucesivos ánodos que van teniendo un voltaje superior al precedente. La señal se amplifica en cientos o miles de veces.

Características: el tiempo de respuesta es muy rápido, no tienen “efecto fatiga” tan altos como la anterior y son muy sensibles.

7. Medidor: son sistemas de lectura de la Energía eléctrica que recoge el detector y que puede ser lectura directa (se utiliza una célula fotovoltaica) o puede ser amplificadores de señal como en el caso del fototubo multiplicador. Los actuales aparatos incorporan lectura digital y cálculos automáticos de concentraciones con relación a las curvas de calibración.

#### 4.2 TIPOS DE APARATOS

- ESPECTROFOTÓMETRO DE HAZ SIMPLE: es igual que la descripción dada para el espectrofotómetro en general. Consta de los mismos elementos (Ej. Bilirrubinómetro: para determinar bilirrubina directa en capilar).
- ESPECTROFOTÓMETRO DE DOBLE HAZ EN EL ESPACIO: todos los componentes están duplicados, menos la lámpara y el medidor. Dos haces de luz pasan al mismo tiempo por los distintos componentes separados en el espacio. Esto compensa las variaciones de intensidad de luz y de absorbancia.

#### MATERIAL Y/O EQUIPO

- Espectrofotómetro
- Cubetas para espectrofotómetro
- Muestras de ADN

#### PROCEDIMIENTO

La cuantificación del ADN se realizará mediante espectrofotometría utilizando el rango de luz UV. Debido a los anillos presentes en las bases nitrogenadas del ADN, esta molécula tiene absorbancia máxima a 260 nm. Para determinar pureza, se utiliza la razón de ADN/proteínas. La abundancia de proteínas residuales en el extracto se determina midiendo absorbancia a 280 nm. Un buen ADN (calidad y pureza) es aquel cuyo A260/A280 es de 1.7 a 2.0.

- a) Transferir 25  $\mu$ L del ADN puro a tubo limpio. Añada 475  $\mu$ L de TE y mezcle gentilmente. En este paso se diluye la cantidad de ADN a razón de 1 en 20 (factor de dilución 1/20).

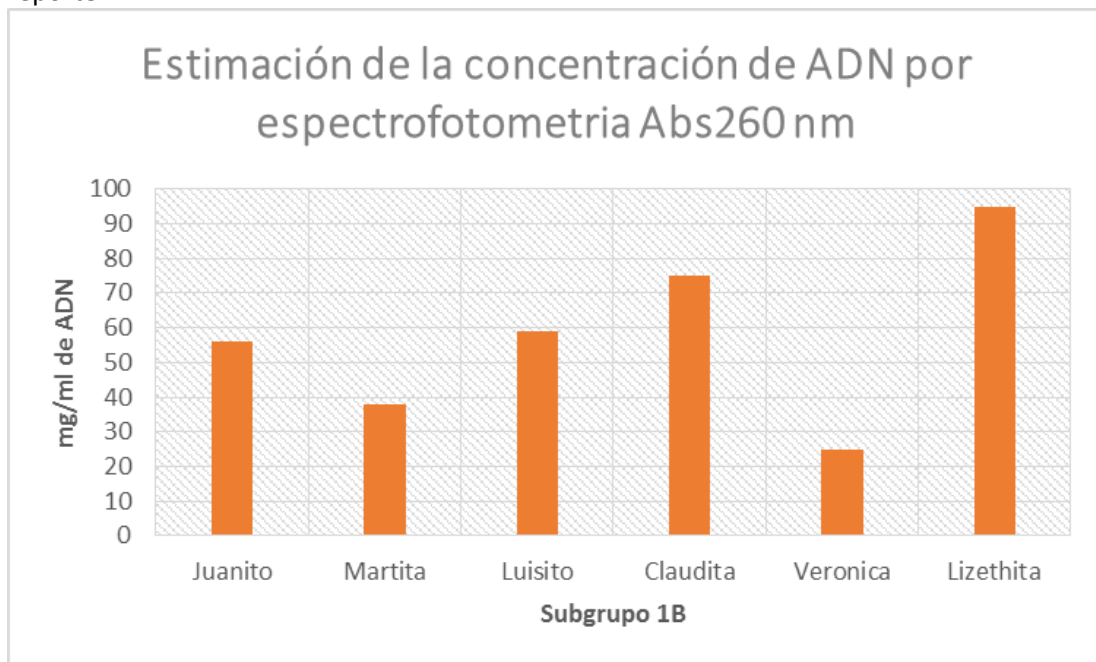
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

b) Utilizando TE como solución blanco, determinar la absorbancia de cada muestra a 260 y 280 nm.

### CALCULOS

1. Estima la biomasa de la muestra en función al estimado de ADN total utilizando la siguiente ecuación: donde

- Biomasa de la muestra:  $\text{mg/ml de ADN} = (\text{Abs}_{260} \times \text{Factor Dilución} \times 50 \text{ mg ADN/ml})$ .
  - Factor de conversión 50 mg ADN/ml
  - ADN total:  $\text{_____ } \mu\text{g ADN/ml} = (\text{Abs}_{260} \times 20 \times 50 \text{ mg ADN/ml}) / (\text{volumen muestra [ml]})$
3. Utilizando tu resultado y la de tus compañeros de equipo, realicen una gráfica de barras (eje de las x: muestra y eje de las "y": mg/ml de DNA) y discutan a que se debe las causas de las diferencias de concentración entre las muestras (utilizar Excel). Como el siguiente ejemplo y adjúntalo a tu reporte



### Gestión de Residuos:

No se deseche en el fregadero. Pregunte al instructor como disponer de este residuo.

### BIBLIOGRAFIA

- Harris, D.C. 2007. Análisis químico cuantitativo. Dover books on mathematics. Reverte. 3era edición. ISBN: 8429172246, 9788429172249.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. Molecular cloning a laboratory manual. Volume 3. CSHL Press. ISBN: 0879695773, 9780879695774.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

**PRELABORATORIO 5**  
**ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN POR ESPECTROFOTOMETRÍA**

I. Escoge la respuesta correcta

1.- ¿En qué región del espectrofotómetro se absorbe fuertemente el agua?

- a) Ultravioleta                      b) Visible                      c) Infrarrojo

2.- Sólo organismos vivos y viables poseen ácidos nucleicos por lo que el análisis de este constituyente celular es representativo de la abundancia de organismos en un ambiente natural.

- a) Verdadero                      b) Falso

III. Ordena los siguientes datos según sea correcto

3.- Los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta debido a la presencia de las bases aromáticas nitrogenadas o nucleótidos, cada una de las cuales tiene su propio y único espectro de absorción:

Dinucleótido trifosfatados (dNTP)	Longitud de onda
dGTP	( ) 259 nm
dATP	( ) 272 nm
dCTP	( ) 255 nm
dTTP	( ) 247 nm

4. La Radiación Electromagnética es una forma de Energía radiante que se propaga en forma de ondas. En este fenómeno ondulatorio se define:

Parámetros	Definición
Longitud de onda ( $\lambda$ )	( ) Cubre un amplio intervalo de E radiante, desde los rayos g de longitud de onda corta hasta las ondas de radio, de longitud de onda larga
Frecuencia ( $\nu$ )	( ) Se define con la siguiente expresión $E = h \times \nu = h \times c/\lambda$ ( $h = \text{Cte. de Planck} = 6,62 \cdot 10^{-27} \text{erg/seg.}$ )
Fotones	( ) Es el número de ciclos por segundo
Espectro electromagnético	( ) Es la distancia entre dos máximos de un ciclo completo del movimiento ondulatorio

5. Define los componentes de un espectrofotómetro:

Componentes	Función
Fuente de luz	( ) Tiene como función impedir que la luz difusa atraviese la cubeta de la muestra, que provocaría desviaciones a la Ley de Beer
Rendija de entrada	( ) Recipiente donde se coloca la muestra para la medición
Monocromadores	( ) Pueden ser de tipo prismas o redes de difracción
Rendija de salida	( ) Proporciona energía radiante en forma de luz visible o no visible
Cubeta	( ) Tiene como función reducir al máximo la luz difusa y evitar que la luz dispersa entre en el sistema de selección de longitud de onda.
Detector	( ) Son sistemas de lectura de la Energía eléctrica que recoge el detector y que puede ser lectura directa o puede ser amplificadores de señal como en el caso del fototubo multiplicador
Medidor	( ) Puede ser de tipo de fotocélulas o células fotovoltaicas y fototubos multiplicadores

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

PRÁCTICA No.	LABORATORIO	BIOLOGIA MOLECULAR	DURACIÓN(HORAS)
6	NOMBRE DE LA PRÁCTICA	ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	4

### COMPETENCIA

Adquirir los conocimientos necesarios para realizar la separación de biomoléculas, comprendiendo los fundamentos teóricos y prácticos necesarios para la visualización del ADN en gel de Agarosa.

### FUNDAMENTO

La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico a través de una matriz porosa, la cual finalmente las separa por tamaños moleculares y carga eléctrica, dependiendo de la técnica que se use.

### INTRODUCCIÓN

La electroforesis es un método de laboratorio en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica. Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta son colocadas en un campo eléctrico, estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta, dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas con carga neta positiva se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas con carga neta negativa lo harán hacia el ánodo (el polo positivo).

El movimiento de las moléculas está gobernado también por dos fuerzas adicionales; inicialmente la fricción con el solvente dificultará este movimiento originando una fuerza que se opone, por otro lado, las moléculas tienen que moverse en forma aleatoria o movimiento browniano debido a que poseen energía cinética propia denominado difusión. La energía cinética de las moléculas aumenta con la temperatura, por ello a mayor temperatura mayor difusión. La suma de todas estas fuerzas provoca que las moléculas no migren de una manera homogénea, de tal manera que, si las moléculas son colocadas en un cierto lugar de solución, los iones comenzaran a moverse formando un frente cuya anchura aumentara con el tiempo. Para reducir la anchura de este frente podemos reducir el movimiento de las moléculas empleando un medio que oponga más resistencia ha dicho movimiento. Una forma común de hacer esto es formar un gel. El gel consiste de un polímero soluble de muy alto peso molecular (p.e. agarosa, almidón, acrilamida) que atrapa moléculas de agua y forma un tamiz que dificulta el movimiento de los solutos, consecuentemente, la migración electroforética de las moléculas será más lenta, pero el ensanchamiento del frente se verá reducido también.

La velocidad de migración (v) de la partícula es directamente proporcional al producto de su carga efectiva (q) y el gradiente de potencial eléctrico (E) e inversamente proporcional al coeficiente de fricción (f) relativo a la talla y forma de la molécula, o sea, a la resistencia que le ofrece el medio:

$$V = q E / f$$

La velocidad de migración electroforética depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga / peso), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis. El voltaje no se puede incrementar indiscriminadamente porque se genera un excesivo calor. En contraste, al aplicar bajo voltaje puede ocurrir una pobre separación, por causa de la difusión por tiempo muy prolongado de la corrida electroforética.

La mayoría de las biomacromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos) poseen determinada carga eléctrica con grupos aniónicos y catiónicos capaces de disociarse. La carga neta de la partícula está dada por el pH del medio y puede ser modificada por la interacción con pequeñas moléculas de iones u

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

otras macromoléculas. De lo anterior se deduce que el pH influye sobre la velocidad de migración de las moléculas. En el punto isoeléctrico de la biomolécula, pH al cual su carga neta es 0, esta no migra. Por debajo del punto isoeléctrico tiene carga neta positiva y migra hacia el cátodo, y por encima del punto isoeléctrico tienen carga neta negativa y migra hacia el ánodo.

La agarosa es un polisacárido (originalmente obtenido de algas, como el agar-agar, pero de composición homogénea), cuyas disoluciones (típicamente de 0.5 a 2 %) poseen la propiedad de permanecer líquidas por encima de 50°C y formar un gel, semisólido al enfriarse. Este gel está constituido por una matriz o trama tridimensional de fibras poliméricas embebida en gran cantidad de medio líquido, que retarda el paso de las moléculas y se usa generalmente para separar moléculas de DNA de entre 200 y 20,000 nucleótidos.

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica analítica que permite para separar fragmentos de DNA en función de su longitud. El campo eléctrico provoca que las moléculas de DNA migren a través de la matriz de agarosa, desde el polo negativo hasta el polo positivo, debido a la carga neta negativa de los fosfatos presentes en la estructura química de la cadena de DNA. A la escala de longitud de las moléculas de DNA, la electroforesis puede considerarse como un proceso de tamizado a lo largo de una red intrincada; las moléculas de mayor longitud se desplazarán a una velocidad más lenta porque son retenidas con mayor facilidad por el entramado de la red.

Una vez que se ha completado la separación, los fragmentos de DNA de diferentes longitudes, estos pueden ser visualizados usando un marcador específico para el DNA (p.e. bromuro de etidio, SyberGreen™) que se intercala entre las bases nitrogenadas de la cadena y que es excitado por la luz ultravioleta permitiendo su detección.

En el gel pueden apreciarse bandas correspondientes a diferentes poblaciones de moléculas de DNA de diferente peso molecular. El tamaño de los fragmentos generalmente se reporta en número de pares de bases, nucleótidos o kilobases. El tamaño de los fragmentos se determina en función de un marcador estándar que contiene fragmentos lineales de longitud conocida (escalera de DNA o DNA ladder).

#### MATERIALES

- Pipetas de 2-20uL y de 20-200uL
- Cámara de electroforesis horizontal
- Bandeja para la preparación del gel
- Fuente de poder
- Probetas de 50mL, 100mL y 1000mL
- Botella de vidrio (dos veces más que solución de agarosa)
- Guantes para calor

#### REACTIVOS

- Syber safe o Bromuro de etidio
- Agarosa grado molecular
- TBE 10X
- Agua Destilada

#### PROCEDIMIENTO

##### Preparación de soluciones

- a) Preparación de geles de agarosa de diferentes concentraciones (%) para diferentes volúmenes

A) Preparación de un litro de TBE 10X Reactivo	Cantidades
Tris Base	108g
Ácido Bórico	55g
EDTA 0.5M	40 mL

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

b) *Protocolo de preparación de un gel de agarosa al 1% (250 mL)*

1. Preparar la bandeja sellando los bordes por presión o con cinta adhesiva (esto depende del modelo de cámara utilizado) y póngale los peines.
2. Pesar 2.5 gr. de agarosa.
3. Colocar la agarosa dentro de un envase de vidrio que contenga 250 mL de buffer TBE 0,5X y caliente en el microondas o en el baño de María hasta su completa disolución.
4. Cuando la solución de agarosa haya alcanzado una temperatura soportable por la mano, agregar 2.5 µL de bromuro de Etidio\* (Solución madre 10 mg/ mL) o 25 µL de SYBR Green \*1 (dilución final de la solución comercial es 1 en 10,000).
5. Mezcle bien, agitando el recipiente en forma circular, evitando que se formen burbujas en la solución.
6. Sirva la solución en la bandeja de corrida vertiendo la solución lentamente por uno de los extremos de la bandeja y retire las burbujas que queden sobre el área de corrida de las muestras con una punta limpia.
7. Deje polimerizar la agarosa
8. Para la corrida, llene el tanque de la cámara de electroforesis con buffer TBE 0,5X hasta cubrir el gel.
9. Conecte los electrodos de la cámara a la fuente de poder, gradúe el voltaje deseado y corra las muestras.

### RESULTADOS

1. Calcula el peso molecular de tu muestra:
  
2. Adjunta la fotografía del gel de agarosa, expuesta en la luz ultravioleta y señala tu muestra en la imagen

### Gestión de Residuos:

No se deseche en el fregadero. Pregunte al instructor como disponer de este residuo.

### Nota

1. El bromuro de Etidio es un fuerte agente mutágeno y posiblemente también cancerígeno y teratógeno. Debe ser manipulado con extrema precaución en el laboratorio. El uso de guantes, lentes de protección y bata de laboratorio es obligatorio.
2. SYBR Green exhibe un efecto mutagénico mucho menor que el bromuro de etidio, sin embargo, se recomienda el uso de protección personal durante su manipulación.

### BIBLIOGRAFIA

- Duina Posso Duque, Thaura Ghneim Herrera. 2008. Uso de Marcadores Microsatélites para la Estimación de Diversidad Genética en Plantas. Ediciones IVIC.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

**PRELABORATORIO 6  
ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA**

I. Escoge la respuesta correcta.

1.- Cuales son los dos parámetros importantes para el separado de moléculas en la técnica de electroforesis.

- a) Costo y aplicación  
b) Tipo de molécula y carga eléctrica  
c) Composición química y peso molecular  
d) Tamaño y carga eléctrica

2.- ¿Cuál es la razón por la que el voltaje no puede elevarse demasiado en la técnica de electroforesis

- a) Se genera excesivo calor  
b) Porque no se tiene la fuente de poder adecuada  
c) Dañaría a la molécula de ADN  
d) Las moléculas de ADN se moverían más rápido

3.- ¿Cuál es el origen de la agarosa?

- a) Sintética  
b) Algas  
c) Agarabinosa  
d) Aire

4.- ¿A qué temperatura, la agarosa tiene la capacidad de mantenerse líquida?

- a) Por arriba de 50°C  
b) Por debajo de 50°C  
c) Por arriba de 37°C  
d) Por debajo de 37°C

5.- De los reactivos utilizados en el protocolo, ¿cuál de ellos es cancerígeno?

- a) SYBR Green  
b) Bromuro de etidio  
c) Buffer TBE  
d) Agarosa

II.- Determina si la oración es verdadero o falso.

6.- Las moléculas con carga neta positiva se desplazarán hacia el cátodo (el polo positivo) y aquellas con carga neta negativa lo harán hacia el ánodo (el polo negativo).

- a) Verdadero  
b) Falso

7.- El pH influye sobre la velocidad de migración de las moléculas.

- a) Verdadero  
b) Falso



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA			
CARRERA	PLAN DE STUDIO	CLAVE SIGNATURA	NOMBRE DE LA ASIGNATURA
BIOINGENIERIA	2009-2	11816	Biología Molecular

### BIBLIOGRAFIA

- Berth M, Moser FM, Kolbe M, et al: The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;76(6):1223–43.
- C. PETIT y G. PRÉVOST, *Genetique et évolution*, «Journal of Molecular Biology», Londres 1967; C. A. VILLE, *Biología*, México 1966.
- Chomczynski P, Wilfinger W, Mackey K (1998) Isolation of Genomic DNA from Human, Animal, and Plant Samples with DNAzol Reagents. *Biotechnol Int* 185–188.P. ChomczynskiW. WilfingerK.
- Danzer, C. 2007. *Analytical chemistry: theoretical and metrological fundamentals*. Springer. ISBN: 3540359885, 9783540359883.
- Duina Posso Duque, Thaura Ghneim Herrera. 2008. *Uso de Marcadores Microsatélites para la Estimación de Diversidad Genética en Plantas*. Ediciones IVIC.
- França, L. T. C. (2002). «A review of DNA sequencing techniques.». *Quarterly Reviews of Biophysics* 35 (2).
- Maxam AM, Gilbert W: A new method for sequencing DNA, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Feb;74(2):560
- Harris, D.C. 2007. *Análisis químico cuantitativo*. Dover books on mathematics. Reverte. 3era edición. ISBN: 8429172246, 9788429172249.
- Mackey1998Isolation of Genomic DNA from Human, Animal, and Plant Samples with DNAzol Reagents.*Biotechnol Int*185188.
- Magdeldin, Sameh (2012). *Gel electrophoresis -Principles and Basics (en inglés)*. InTech. ISBN 9789535104582.
- Milligan BG (1998) Total DNA isolation. In: Hoelzel AR, editor. Oxford, , New York, Tokyo: Oxford University Press. pp. 29–64.BG Milligan1998Total DNA isolation.AR HoelzelOxford, , New York, TokyoOxford University Press2964Molecular Genetic Analysis of Population: A Practical Approach, 2nd Edition. Molecular Genetic Analysis of Population: A Practical Approach, 2nd Edition.
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMAARNT-SSA1-2002. *Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos-Clasificación y Especificaciones de Manejo*. Secretaria de Medio ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial.
- Organización Mundial de la Salud. 2005. *Manual de Bioseguridad en el laboratorio*. 3. 1-223.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. *Molecular cloning a laboratory manual*. Volume 3. CSHL Press. ISBN: 0879695773, 9780879695774.
- Salazar Montes, Adriana (2013). «Electroforesis». *Biología Molecular*. Mc Graw Hill. ISBN 9786071509123.
- Skoog, D.A. and West, D.M. 2005. *Fundamentos de química analítica*. Cengage Learning Editores. Vol (8). ISBN: 9706863699, 9789706863690.