



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO

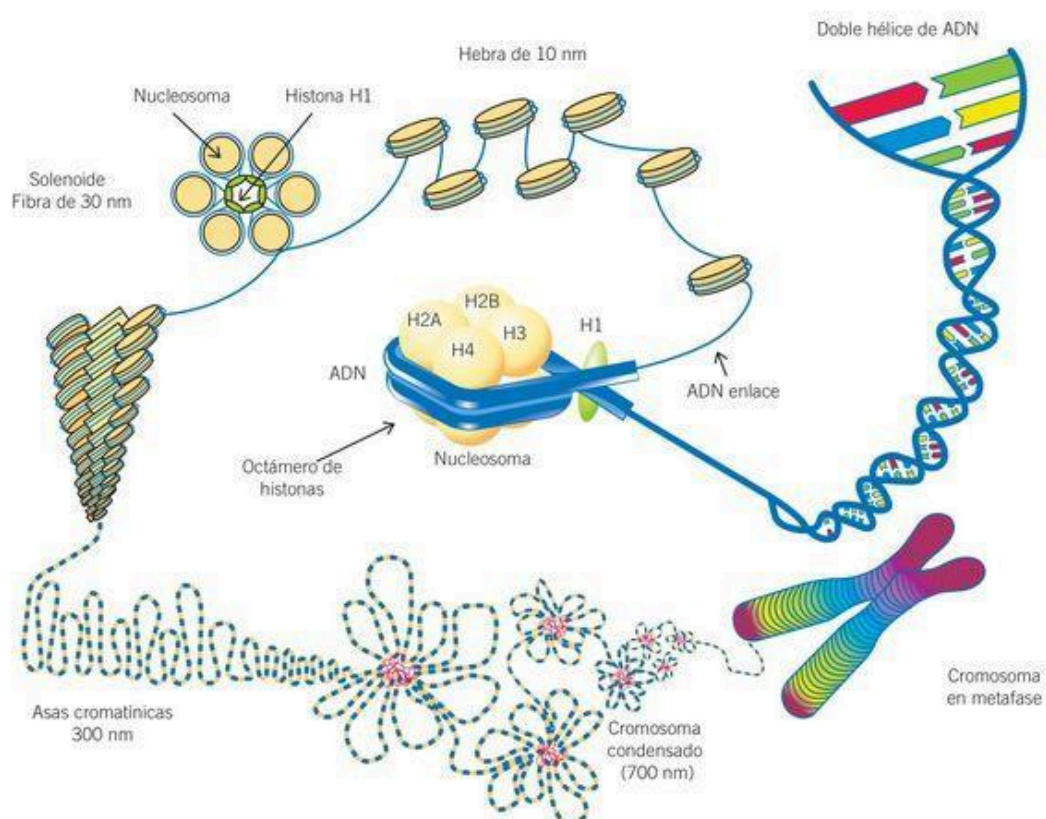


BIOLOGÍA

Facultad de Biología

Manual de Prácticas

BIOLOGÍA MOLECULAR



DR. MIGUEL MARTÍNEZ TRUJILLO
M.C. HUGO ALEJANDRO FARIÁS CHAGOYA
DRA. LOURDES BALLESTEROS ALMANZA
DR. JOSÉ LUIS ÁBREGO ARANDA
M.D MARCO AURELIO ÁRCIGA SOSA

Mayo 2024

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS:	3
3. LINEAMIENTOS EN EL LABORATORIO:	3
4. EVALUACIÓN DEL CURSO	4
PRÁCTICA 1.	5
MITOSIS EN CÉLULAS VEGETALES	5
PRÁCTICA 2.	8
MEIOSIS EN CÉLULAS DE LISTONCILLO	8
PRÁCTICA 3.	11
PURIFICACIÓN DE ADN EN PLANTAS	11
PRÁCTICA 4.	14
AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO EN BACTERIAS	14
PRÁCTICA 5.	17
ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	17
PRÁCTICA 6 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.	22
PRÁCTICA 7.	28
CÓDIGO GENÉTICO Y TRADUCCIÓN	28
PRÁCTICA 8.	34
A) EJERCICIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR. DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR PAPILOMA VIRUS HUMANO (VPH) EN CÁNCER DE CUELLO UTERINO MEDIANTE PCR.	34
B). EJERCICIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Diagnóstico de anemia falciforme	43
C). EJERCICIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Huellas dactilares del ADN	49
D). EJERCICIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SECUENCIACIÓN DE ADN	55
BIBLIOGRAFÍA	62

INTRODUCCIÓN

La Biología Molecular es una disciplina científica que ha crecido vertiginosamente a partir de descubrimiento de la doble hélice en 1953 y el desciframiento del código genético en 1965, hasta hallazgos como el descubrimiento de una molécula de ARN no codificante que podría servir como diana terapéutica para células cancerígenas o la publicación de la mayor base de datos de ADN de microorganismos marinos, sin olvidar la revelación del libro de la vida, reuniendo a biólogos y genetistas de todo el mundo para el Proyecto Genoma Humano secuenciando los tres mil millones de letras que lo componen.

El estudio del núcleo y los diferentes procesos que en este ocurren tales como la división celular o la síntesis de proteínas se explican solo mediante el análisis de la estructura y función de las moléculas primordiales y como están organizadas en la célula son necesarios para entender los mecanismos moleculares que dan origen a un sinnúmero de eventos vitales para los seres vivos.

Para tener un mayor conocimiento acerca de la organización molecular de la célula es necesario que sea a partir del estudio de las diferentes moléculas que la conforman. Este curso pretende analizar al núcleo y los distintos mecanismos moleculares que se llevan a cabo durante el ciclo celular, tales como la formación y asociación de los ácidos nucleicos que constituyen el material genético de los organismos.

OBJETIVOS:

Comprender la duplicación y distribución del material genético en células eucariontes, por medio de la observación y análisis de las diferentes etapas celulares.

Aprender diferentes técnicas de estudio en Biología Molecular.

Analizar procesos moleculares mediante el uso de la computadora.

LINEAMIENTOS EN EL LABORATORIO:

Se recomienda que se lea cada práctica antes de presentarse a la sesión de laboratorio, ya que este curso está dirigido hacia la aplicación de técnicas de estudio de la Biología Molecular. Para lo anterior, se pide el diseño y control sobre los experimentos que se estén realizando.

Para cada sesión de prácticas, el alumno deberá contar con el Manual de Prácticas de Biología Molecular.

El alumno deberá observar buena conducta dentro del laboratorio y cumplir con los Lineamientos que marca el Reglamento interno de los Laboratorios de Docencia:

El uso de la bata en el laboratorio es **obligatorio**, No se permitirá el acceso a ningún alumno si no la trae en ese momento.

El alumno deberá tener limpio su lugar de trabajo, por tal motivo deberá depositar la basura en los cestos y no en el suelo. Además, no se permite la ingesta de bebidas ni alimentos dentro del laboratorio.

Al término de la práctica todo el material de cristalería utilizado debe estar perfectamente bien lavado y sus mesas de trabajo limpias.

Trabaje en orden, evitando distraer a sus compañeros cuando estén realizando sus experimentos. El alumno desordenado será suspendido de la sesión en curso.

Está prohibido el uso de **teléfonos celulares** dentro del laboratorio como medio de comunicación, solo podrán ser utilizados para la toma de fotografías de las preparaciones cuando así se requiera, para una mayor calidad en el reporte.

EVALUACIÓN DEL CURSO

Se pasará lista de asistencia dentro de los primeros 15 minutos, después de este tiempo se contará como falta y no se le permitirá la entrada al laboratorio.

La evaluación final de la parte práctica tendrá un puntaje máximo de 3.0 (**30% de la calificación final**), la cual será sumada a la calificación teórica correspondiente.

Ambas calificaciones (teórica y práctica) deberán ser aprobatorias, de lo contrario automáticamente tendrán que presentar el examen extraordinario.

El curso tendrá un examen de evaluación final.

Sistema de Evaluación

Elemento de evaluación	Porcentaje
Asistencia (Se requiere el 80% de asistencia a las sesiones de laboratorio y del derecho a examen final)	5%
Examen final	10%
Reportes de laboratorio	15%

REPORTE

Referencias: Citar cuando menos una fuente bibliográfica, la cual deberá incluir: Autor, Título, Editorial, País y Año.

El informe será evaluado **POR EQUIPO**, y al término del semestre todos entregarán sus manuales debidamente contestados.

Solo se reportarán los resultados y el cuestionario en el mismo manual, en caso de requerir más hojas se anexarán. No se aceptarán hojas sueltas.

PRÁCTICA 1.

MITOSIS EN CÉLULAS VEGETALES

1. INTRODUCCIÓN

La mitosis es el proceso celular por el cual las células somáticas distribuyen sus cromosomas y se dividen para originar nuevas células hijas. En el crecimiento y desarrollo de un organismo, las células aumentan en número mediante la división, como resultado de la mitosis. Los núcleos resultantes mantienen el mismo número e identidad de los cromosomas de la célula de la cual derivan.

La mitosis es un proceso bajo control genético, el cual ha sido dividido en cuatro fases: **PROFASE, METAFASE, ANAFASE y TELOFASE**. Teniendo cada una de estas sus etapas intermedias correspondiente. Además de la etapa terminal de la división celular llamada **CITOCINESIS**. Este proceso celular ocurre en todas las regiones meristemáticas o zonas de crecimiento de una planta.

2. OBJETIVO

Observar las diferentes etapas de la mitosis en células vegetales.

3. MATERIAL

Material por equipo:

- Microscopio estereoscópico
- Microscopio compuesto
- Navajas de afeitar
- Toallas inter dobladas
- Aguja de disección (recta)
- Portaobjetos
- cubreobjetos
- Vidrios de Reloj
- Lámpara de alcohol

Reactivos:

- Acetocarmín

Material biológico

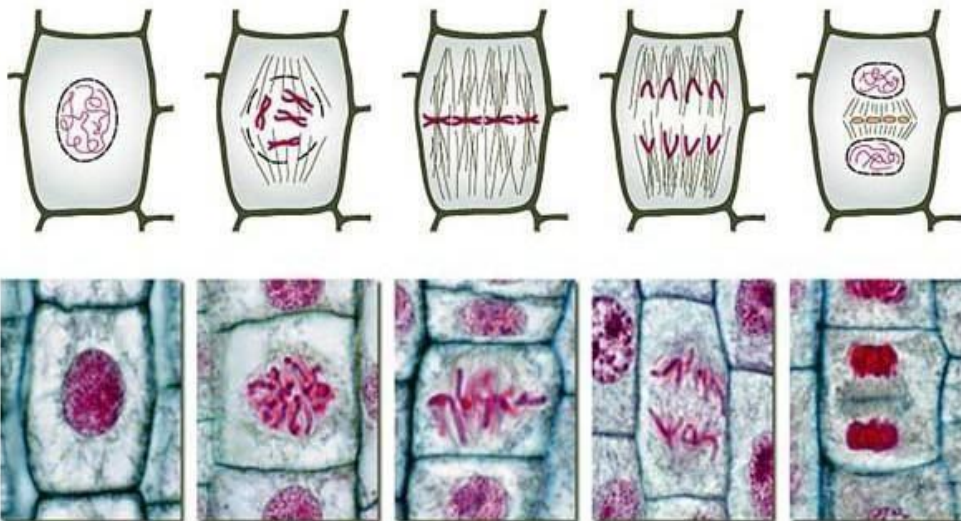
- 20 semillas de haba germinadas de 8 días de edad por equipo.

4. PROCEDIMIENTO

- Coloque las raíces en un vidrio de reloj limpio y cúbralos con gotas de acetocarmín por un lapso de **10 minutos**, calentando continuamente.
- Realice cortes transversales de los ápices radicales de las habas lo más delgado posible, en un portaobjetos limpio.
- Coloque el cubreobjetos y presione vigorosamente para separar las células.
- Proceda a observar las diferentes etapas de mitosis al microscopio. Adicione gotas de colorante sin dejar secar la muestra.

5. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

- Esquematice cada fase observada de la mitosis, o colocando el aumento, la etapa mitótica y su correspondiente explicación.
- Deberá ubicar como mínimo 9 fases celulares; estas son: Profase Temprana, Profase media, Profase tardía, Prometafase, Anafase Temprana, Anafase tardía, Telofase temprana y Telofase tardía.
- Para realizar lo anterior, auxíliese de las fotografías que se anexan en esta práctica.





6. CUESTIONARIO

1. Explique en qué consiste cada una de las etapas de la mitosis.
2. ¿Por qué se utilizan ápices radicales en estudios celulares o que ventaja representa su utilización?
3. Defina qué es la eucromatina y heterocromatina.

PRÁCTICA 2.

MEIOSIS EN CÉLULAS DE LISTONCILLO

1. INTRODUCCIÓN

En eucariontes la reproducción sexual está asociada a un proceso especial de división del núcleo llamado MEIOSIS. En este fenómeno de división celular existe una profase larga, durante la cual los cromosomas homólogos se aparean longitudinalmente (sinapsis) e intercambian segmentos de cromatina o material genético por un proceso llamado entrecruzamiento.

La meiosis es un mecanismo que distribuye las unidades hereditarias (genes), permitiendo también su recombinación aleatoria independiente en grado variable.

2. OBJETIVO

Observar e identificar las distintas etapas de la meiosis.

3. MATERIALES

Material por equipo:

- Microscopio compuesto.
- Microscopio estereoscópico
- Pipetas Pasteur
- Navajas de afeitar
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Lámpara de alcohol
- Agujas
- Pinzas de disección
- Cajas Petri

Reactivos

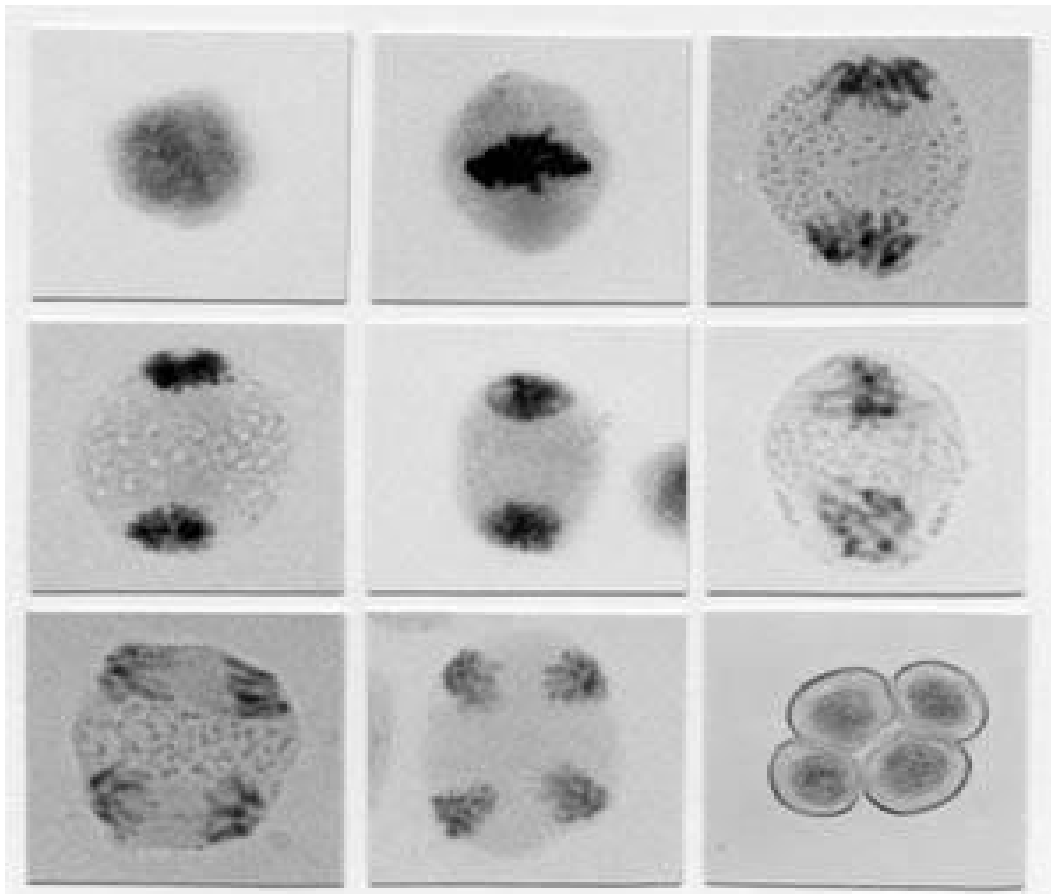
- Ácido acético al 45%
- Acetocarmín al 1%
- Etanol al 70%

Material biológico

- Inflorescencias de listoncillo

4. PROCEDIMIENTO:

- Fije con anticipación inflorescencias de listoncillo en solución Farmer.
- El día de la práctica transfiera las inflorescencias a una caja de petri que contenga etanol al 70 %.
- Tome 3 florecillas.
- De cada florecilla separe las anteras y colóquelas en un portaobjetos limpio, cubriéndolas con gotas de acetocarmín al 1 %.
- Corte con su navaja las anteras transversalmente, y presiónelas para exprimir su contenido.
- Remueva las anteras y añada gotas de colorante.
- Coloque el cubreobjetos sin presionar y caliente la preparación levemente, utilizando su lámpara de alcohol y evitando que el líquido hierva.
- Observe sus preparaciones al microscopio.



5. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS:

Realice esquemas de las diferentes fases de la meiosis, con el aumento correspondiente, las estructuras y la explicación de la fase meiótica que está observando.

6. CUESTIONARIO:

1. ¿Por qué se puede observar la meiosis en las inflorescencias y no en otros tejidos?
2. Durante la primera profase de la meiosis ocurre un evento de gran relevancia desde el punto de vista genético. Describalo.
3. Explique en detalle las etapas de la meiosis. Esquematice.

PRÁCTICA 3.

PURIFICACIÓN DE ADN EN PLANTAS

1. INTRODUCCIÓN

Una de las herramientas más importantes en la biología molecular es precisamente la extracción y purificación de ácidos nucleicos, la cual se puede realizar de diferentes organismos, tales como virus, bacterias, humanos, plantas, entre otros.

Para este propósito existe una gran cantidad de métodos, muchos de los cuales resultan lentos y costosos, actualmente ya se cuenta con métodos más rápidos y muy eficientes, tal es el caso de los kits comerciales específicos para ciertos tipos de tejidos.

En esta ocasión se utilizará un Kit comercial llamado Plant DNAZOL.

2. OBJETIVO

Analizar la importancia que tiene la extracción y purificación del ADN en la biología molecular.

Material biológico

Hojas de plantas herbáceas sin cutícula gruesa y glabras.

Reactivos

- Agua desionizada estéril
- Isopropanol
- Nitrógeno líquido (precaución – 200 °C)
- Buffer TE (pH 8.0)
- Cloroformo.

Materiales

- Mortero y pistilo previamente enfriados (-20 °C) 15 minutos antes de iniciar el experimento
- 2 tubos eppendorf de polipropileno de 1.5 ml fríos
- Espátula
- Papel Aluminio

3. PARTE EXPERIMENTAL

Descripción:

Plant DNAZOL es un reactivo específicamente formulado para el aislamiento de ADN genómico de plantas. Y el procedimiento se basa en el uso de una nueva solución lítica de un detergente de guanidina, la cual hidroliza al RNA y permite la precipitación selectiva del DNA del lisado.

El procedimiento de extracción es rápido y permite el aislamiento de ADN de distintos tejidos de plantas. El ADN extraído permite ser usado en análisis de Southern blot, hibridación, clonación molecular, PCR, etc.

Nota: el reactivo Plant DNAZOL contiene irritantes, por lo que es necesario evitar el contacto con la piel y ojos, en caso de contacto lavar copiosamente con agua; es necesaria una atención médica.

4. PROCEDIMIENTO

O: Extracción:

- Pesar 1 g de tejido de planta, lavarlo con detergente y enjuagar con agua fría estéril y secarlo con una toalla de papel.
- Colocar el tejido ya seco en un mortero y congelar lo más pronto posible en nitrógeno líquido.
- Moler el tejido en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino; colocando aproximadamente 0.2 g. en un tubo eppendorf de 1.5 ml frío.
- Adicionar 0.5 ml (500 µl) del reactivo Plant DNAZOL y agitar suavemente por unos segundos.
- Incubar con agitación a 25°C durante 5 min.
- Adicionar 0.5 ml (500 µl) de cloroformo mezclando vigorosamente e incubar con agitación a 25°C durante otros 5 min.
- Centrifugar a 12,000 rpm por 10 min y transferir el sobrenadante (fase acuosa) resultante (500 µl) a un tubo eppendorf frío, limpio y estéril.

Precipitación:

- Después de la centrifugación, el ADN resultante en la fase acuosa del extracto, precipitar con 0.5 ml (500 μ l) de isopropanol (alcohol isopropílico). Mezclar por inversión durante 6 a 8 veces y almacenar a temperatura ambiente por 5 min.
- Para sedimentar el precipitado de ADN, centrifugar a 5000 rpm por 4 min y remover el etanol. (En ocasiones el ADN precipitado no se observa antes de la precipitación).
- En ocasiones es necesario lavar el ADN utilizando 0.3 ml de Plant DNAZOL y 0.3 ml de etanol al 70%, volviendo a centrifugar a 12,000 rpm por 4 min, eliminando el sobrenadante.
- Por último, la pastilla se seca a temperatura ambiente y se solubiliza el ADN en 500 μ l. de Buffer TE pH = 8 o agua desionizada estéril.
- Analizar la integridad del ADN en un gel de agarosa al 0.8%.

5. CUESTIONARIO:

- 1 Explica la importancia que tiene purificar ADN.
- 2 ¿Con qué finalidad se emplearon los siguientes reactivos: isopropanol, cloroformo, EDTA y Plant DNAZOL, durante el proceso de extracción y purificación del ADN?
- 3 ¿Qué es un agente caotrópico?

PRÁCTICA 4. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO EN BACTERIAS

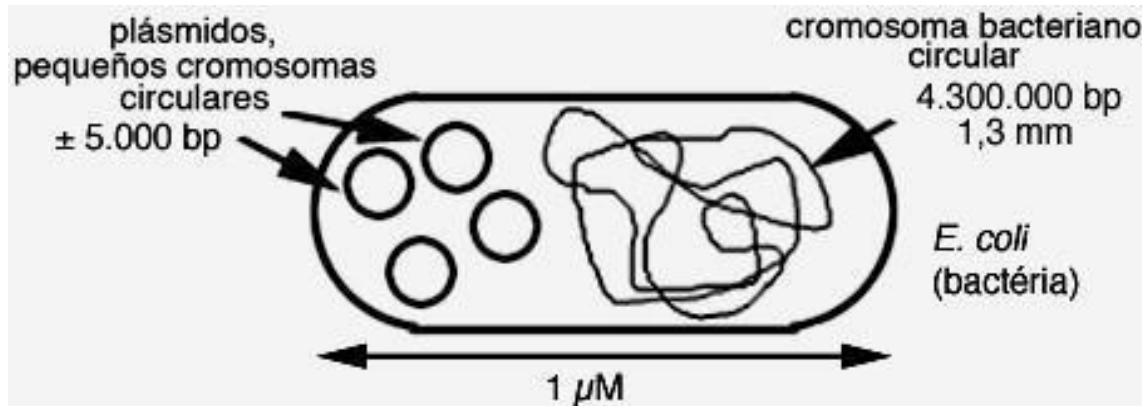
1. INTRODUCCIÓN

El término plásmido fue presentado por primera vez por el biólogo molecular Joshua Lederberg, en 1952. Los **plásmidos** son moléculas de ADN extracromosómico circular o lineal que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico. Están presentes normalmente en bacterias, y en algunas ocasiones en organismos eucariotas como las levaduras. Su tamaño varía de 1 a 250 kb. El número de plásmidos puede variar, dependiendo de su tipo, desde una sola copia hasta algunos cientos por célula.

Los plásmidos a menudo contienen genes o paquetes de genes que le confieren a las **bacterias** una ventaja selectiva, como puede ser la resistencia a los antibióticos, utilización de hidrocarburos, y otros.

Los plásmidos se utilizan en ingeniería genética porque es relativamente fácil manipularlos e insertar nuevas secuencias genéticas.

Cada plásmido contiene al menos una secuencia de ADN que sirve como un origen de replicación (ORI).



2. OBJETIVO

Aislar el ADN bacteriano mediante la técnica de Mini-Prep (Sambrook y Col., 1989).

3. MATERIAL

- Tubo eppendorf 1.5 ml fríos Centrifuga
- Vortex Micropipeta

Material biológico

- Bacterias de la cepa *E. coli* que contiene el plásmido pRBCS

Reactivos

- Medio LB
- Solución fría Birboin 1 (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0)
- Solución Birboin 2 (NaOH 0.2N, SDS 1%)
- Solución Birboin 3 (Acetato de potasio 3M, ácido acético glacial 5M)
- Etanol
- Agua desionizada
estéril Hielo

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

- Inocular una colonia en medio LB con el antibiótico específico, de ser necesario de 2 a 4 ml de medio.
- Incubar toda la noche a 37°C con agitación.
- Vaciar en un tubo eppendorf 1.5 ml y centrifugar a 12,000 rpm por 2 minutos.
- Eliminar el sobrenadante (en agua con cloro).
- Resuspender la pastilla en **150 µl** de solución fría **Birboin 1** (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0).
- Agitar en Vortex o resuspender con pipeta.
- Adicionar **300 µl** de solución **Birboin 2** (NaOH 0.2N, SDS 1%) (se prepara al momento), mezclar suavemente con la mano (no usar Vortex) y dejar en hielo por 5 minutos.

- Adicionar **225** μl de solución **Birboin 3** (Acetato de potasio 3M, ácido acético glacial 5M) y agitar suavemente (no usar Vortex) para disgregar los restos celulares. Si se usa Vortex se libera el ADN cromosomal a la solución y se mezcla con el ADN plasmídico, lo cual no es conveniente.
- Dejar 10 minutos en hielo.
- Centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C.
- Tomar 500 μl de sobrenadante limpio sin precipitado.
- Adicionar 500 μl de etanol. Refrigerar durante al menos 30 minutos.
- Centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos.
- Retirar el etanol con la pipeta evitando arrastrar la pastilla. Dejar secar a temperatura ambiente.
- Resuspender en 50 μl de agua desionizada estéril.
- Correr 2 μl en un gel de agarosa para corroborar la presencia del plásmido.

5. CUESTIONARIO

1. ¿Qué ventajas le representa el ADN plasmídico a la bacteria que lo posee?
2. Describe la estructura completa de un plásmido.
3. Describe el proceso de transformación genética por *Agrobacterium tumefaciens*.

PRÁCTICA 5.

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

1. INTRODUCCIÓN

La electroforesis es una técnica comúnmente utilizada en biología molecular para separar moléculas de ADN de una mezcla, utilizando la aplicación de un campo eléctrico.

Las moléculas de ADN en un campo eléctrico se mueven o migran en dirección determinada por su carga eléctrica.

El ADN se encuentra cargado negativamente y migra del cátodo (-) al ánodo (+), con una movilidad que depende primeramente del tamaño de la molécula. Un fragmento grande de ADN lineal migra a través de una matriz de gel (agarosa o acrilamida) más lentamente que uno pequeño.

2. OBJETIVO

Conocer la electroforesis como una técnica de separación de moléculas de ADN.

3. MATERIAL

- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder
- Micropipetas

Reactivos:

- Agarosa
- TAE (Buffer de electroforesis)
- Tris-Base
- Ácido acético glacial
- EDTA 0.5 M (pH 8.0)
- Colorante de carga 6X Naranja G o azul de bromofenol
- Colorante Gel Reed o Gel Green TM

4. PROCEDIMIENTO

EXPERIMENTAL Preparación del gel:

- Preparar 500 ml de gel de agarosa al 0.8% en un matraz Erlenmeyer de 750 ml, pesando 4 gramos de agarosa y disolviéndose en los 500 ml de buffer TAE 1X (Tris-Base 0.04M, EDTA 0.01M, Ácido Acético 0.04M).
- Para disolver completamente la agarosa, caliente la muestra en un horno de microondas. Posteriormente, vacíe 50 ml en otro matraz de 250 ml y adicione 0.5 μ l de colorante GelRed o GelGreen TM. (Figuras 1-3).



Fig.1

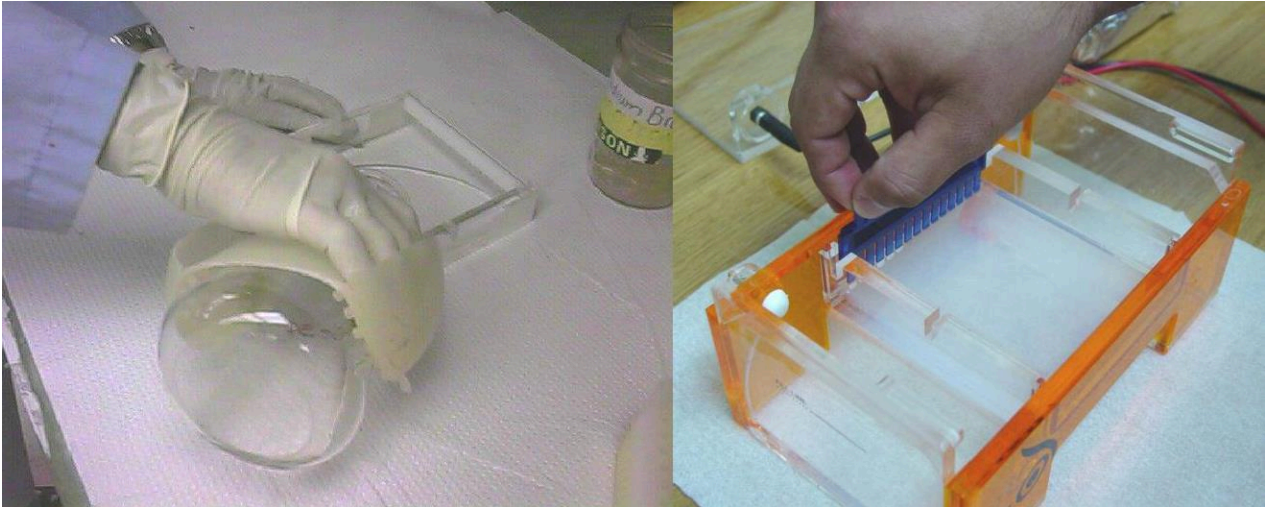


Fig.2

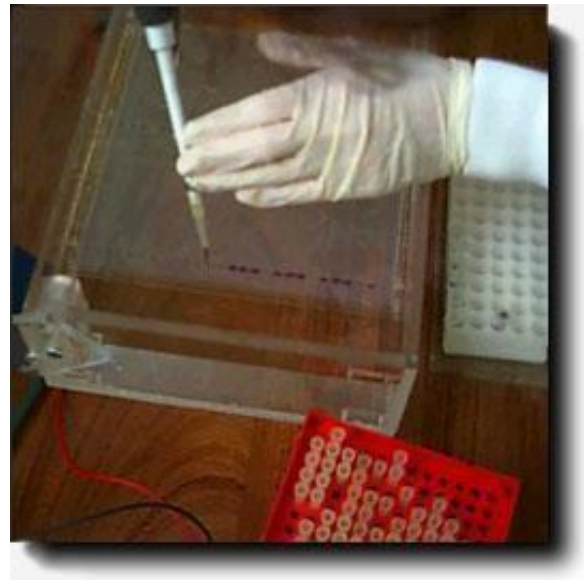
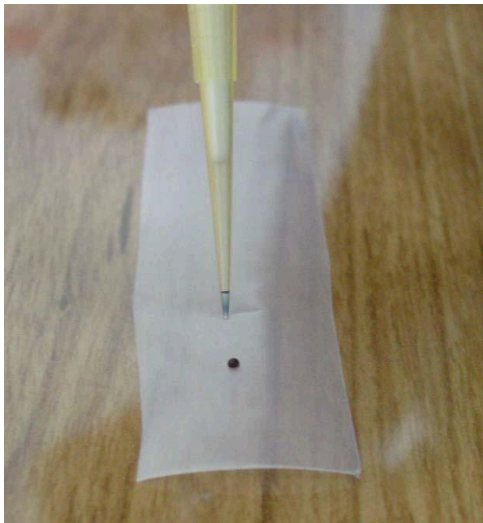


Fig. 3

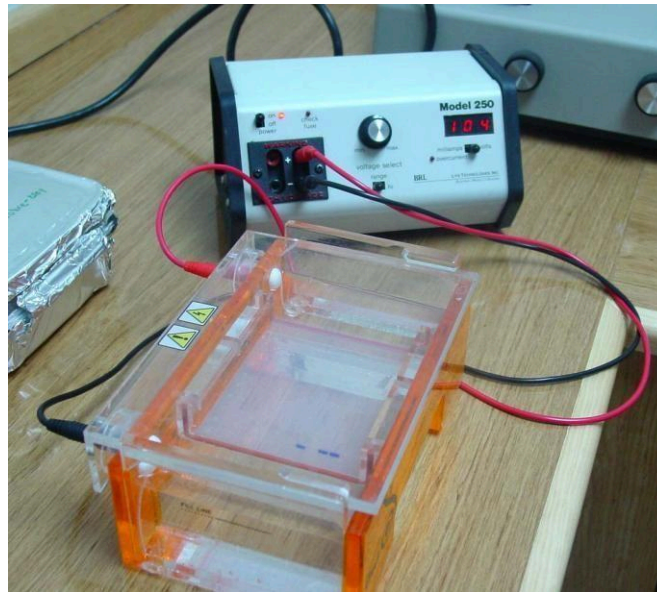
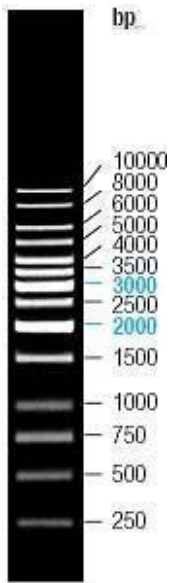
- Vacíe la solución de agarosa en la base de la cámara de electroforesis, ensamblándola previamente o sellándola con cinta adhesiva (Figura izquierda). Coloque el peine del tamaño de dientes adecuado para que se formen los pozos. Deje enfriar aproximadamente 30 minutos hasta que el gel se endurezca y adquiera un aspecto blanquecino.
- Retire el peine (Figura derecha) y coloque el gel en la orientación adecuada para que los pozos queden hacia el polo negativo (negro).
- Llene la cámara con buffer TAE 1X hasta que se cubra el gel, aproximadamente 1.0 mm por encima de este.



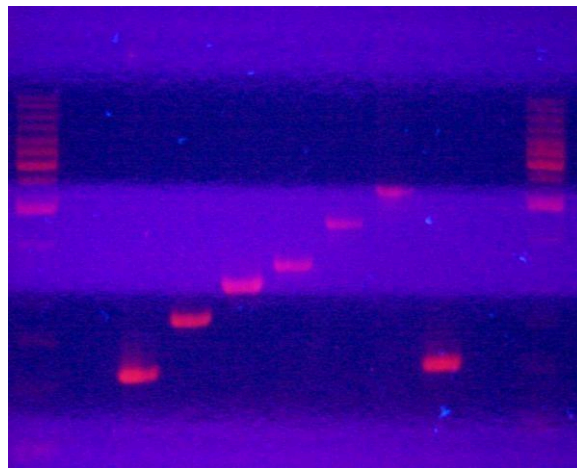
- Para colocar las muestras en el gel mezcle 3 μ l de solución del ADN con 3 μ l de buffer de carga (Azul de bromofenol 0.25%, glicerol 30%). Para esto se puede auxiliar con papel Parafilm. (Figura izquierda).
- Tome el contenido y descárguelo en un pozo teniendo cuidado de no derramar la muestra (Figura derecha).



- Como control se cargará una muestra con fragmentos de ADN de tamaño conocido (marcadores moleculares) (Figura izquierda).
- Coloque los cables de corriente y “corra” el gel a 90 voltios, aproximadamente, hasta que el primer colorante migre unas $\frac{3}{4}$ partes del tamaño del gel (Figura derecha).



- Observe el gel al transiluminador de luz ultravioleta (Figura izquierda) y capture la imagen con una cámara digital. En la figura derecha se observan productos de ADN.



5. CUESTIONARIO

1. ¿En qué se basa el principio de electroforesis?
2. ¿Para qué se utiliza el reactivo GelRed?
3. ¿Explique para qué sirve la agarosa y de dónde se obtiene?

PRÁCTICA 6.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

1. INTRODUCCIÓN

Un triunvirato de métodos, Secuenciación de ADN, Clonación y Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) sostienen la mayor parte de la Biología Molecular moderna. En Abril de 1983, Kary Mullis dio a conocer la técnica de PCR que consiste en la síntesis *in vitro* de secuencias específicas de ADN con la cual la insuficiente cantidad de ADN ya no es un problema en los procedimientos de Biología Molecular ni en los procedimientos de diagnóstico clínicos basados en el estudio de ADN.

La técnica se basa en la replicación del ADN por la enzima ADN polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de ADN en el sentido 5' → 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región de doble cadena se usan los denominados iniciadores (primers). Son una pareja de oligonucleótidos sintetizados, de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de ADN que se desea amplificar.

Partiendo de este principio, la Reacción en Cadena de la Polimerasa se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

1. En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C).
2. En el segundo paso (hibridación ó alineamiento) los iniciadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Se realiza gracias a la disminución de la temperatura (50-65°C).
3. En la tercera etapa (alargamiento) se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5' → 3' mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde. Todos estos pasos, así como diferentes factores que afectan la reacción de PCR se describen en el artículo del anexo 1.

La polimerasa I de ADN utilizada inicialmente por Mullis (1983) era derivada de *Escherichia coli* y se inactivaba en cada ciclo al incrementar la temperatura, por lo que en cada ciclo había que adicionar más ADN polimerasa, lo que convertía el procedimiento en algo tedioso y poco eficiente. Para resolver este problema se buscaron polimerasas en organismos que habitan fuentes termales y la primera de ellas (*Taq*) se aisló del *Archea*

Termus aquaticus. Aunque se han aislado otras polimerasas termoestables, la *Taq* sigue siendo el caballo de batalla en la mayoría de los laboratorios.

El diseño de oligonucleótidos para PCR debe reunir varias características, siendo las más importantes la T_m (temperatura a la cual la mitad de las moléculas están unidas al templado) y la longitud del oligonucleótido. Con base en la T_m se define la temperatura de alineamiento (T_a) en el termociclador. Si la T_a es muy baja ocurrirán alineamientos inespecíficos, mientras que si la temperatura es muy alta la unión del oligonucleótido será muy pobre. Generalmente se define la T_a 3-5 °C por debajo de la T_m de los oligonucleótidos.

La longitud de los oligonucleótidos se define con base en la probabilidad de encontrar una secuencia igual en un genoma, y tomando en cuenta a los mamíferos se considera que una longitud de 15 nucleótidos es suficiente para que éste sea específico en su hibridación. Sin embargo, hay que considerar que la longitud de los oligonucleótidos también determina la T_m de éstos.

Si bien es posible amplificar ADN *in vitro* sin recurrir a la clonación en vectores, en ocasiones es necesario combinar los dos procedimientos y clonar el producto de PCR para estudios posteriores, como su secuenciación ó su integración para realizar construcciones genéticas.

2. ANÁLISIS Y DISEÑO DE PRIMERS O CEBADORES

2.1. Cálculos de T_m

Se harán los cálculos de T_m de los oligonucleótidos que se utilizarán en las reacciones de PCR, utilizando la ecuación:

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = [2(\text{A}+\text{T}) + 4(\text{G}+\text{C})] - 5$$

Se harán los cálculos de T_m de los siguientes oligonucleótidos:

Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5' – 3'
M13F	GTAAAACGACGGCCAGT
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC

Se compararán los resultados obtenidos con los cálculos del programa Oligo Analyzer 3.0.

Página electrónica: <http://www.idtdna.com/ANALYZER/Applications/OligoAnalyzer/>

Se usarán los valores que ya están señalados en el programa.

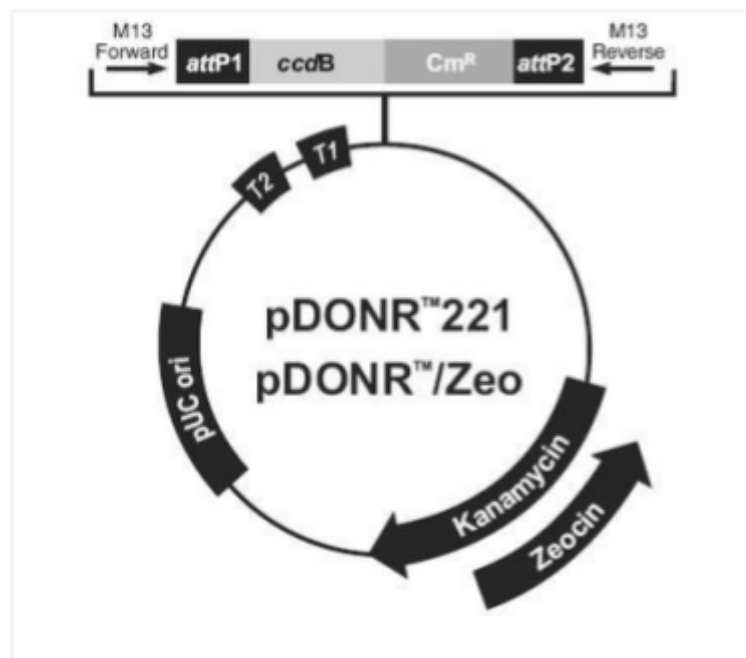


Figura 1. Características del vector pDONR221®. rrnB T2 secuencia de terminación de la transcripción: bases 268-295. rrnB T1 secuencia de terminación de la transcripción: bases 427-470. M13 sitio para el primer forward (-20): bases 537-552. attP1: bases 570- 801. Gen ccdB (c): bases 1197-1502. Cloranfenicol gen de resistencia: bases 1825-2505. attP2: bases 2753-2984. M13 sitio para el primer reverso: bases 3026-3042. Kanamicina gen de resistencia: bases 3155-3964. pUC origen: bases 4085-4758. (c) = secuencia complementaria.

3. AMPLIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

3.1. Mezclas de reacción

Se utilizará el kit para PCR Super Mix High Fidelity (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La amplificación se realizara en un termociclador Termocycler Personal Eppendorf. Las condiciones de amplificación se establecieron conforme a datos de alineación y temperatura óptima.

Se utilizará como templado DNA el plásmido pDONR221 y un control sin DNA. Las mezclas de reacción se prepararán de acuerdo a como se describe en la siguientes tablas:

Condiciones de amplificación del pDONR221	
Agua desionizada estéril	2 μ l
DNA plasmídico	1 μ l (100 ng)
Super Mix High Fidelity (Invitrogen)	45 μ l
Oligo M13F (10 μ M)	1 μ l
Oligo M13R (10 μ M)	1 μ l

Condiciones de amplificación sin DNA (control negativo) (Todos los equipos)	
Agua desionizada estéril	3 μ l
Super Mix High Fidelity (Invitrogen)	45 μ l
Oligo M13F (10 μ M)	1 μ l
Oligo M13R (10 μ M)	1 μ l

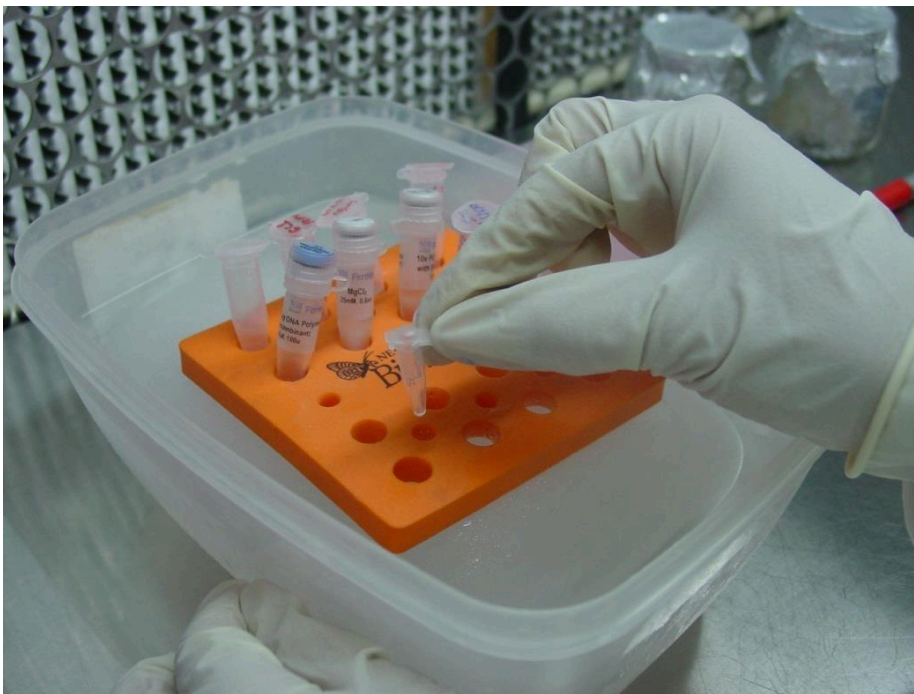
Para preparar la reacción se utilizará una campana de flujo laminar previamente desinfectada, para minimizar las contaminaciones con ADN. Se utilizarán guantes

estériles, una micropipeta graduable de 20 μ l y puntas estériles. (Figuras).





Se hará una mezcla de los componentes en el orden en que se encuentran en las tablas, utilizando tubos de 0.5 ml, en hielo.



Mezcle bien los componentes y deje el tubo en el hielo hasta que sea transferido al termociclador.

3.2. Procesamiento de las muestras en los termocicladores

Encienda primeramente el termociclador con el botón de la parte posterior. Cuando todos los tubos estén listos abra la tapa del termociclador, coloque los

tubos, cierre la tapa y gire la perilla como se observa en la figura. Siga las instrucciones del menú, cargue el programa adecuado y presione START y espere hasta que el programa se encuentre en proceso.

Se utilizarán dos programas diferentes, de acuerdo a las mezclas de reacción. Esto debido a las longitudes y T_m de los diferentes fragmentos que se amplificarán.

PROGRAMA

1 ciclo: 94 °C 5 min

30 ciclos: 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 68 °C 2:40 min 1

Ciclo: 68 °C 7min Mantener a 4 °C

Cuando el termociclador llegue a la temperatura de 4 °C se pasarán los tubos a hielo y posteriormente a congelador hasta que sean utilizados para su análisis. De cada muestra de reacción se tomarán 5 µl para ser analizados por electroforesis.



PRÁCTICA 7. CÓDIGO GENÉTICO Y TRADUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El **código genético** es el conjunto de normas por las que la información codificada en el material genético (secuencias de ADN o ARN) se traduce en proteínas (secuencias de aminoácidos) en las células vivas. El código define la relación entre secuencias de tres nucleótidos, llamadas codones, y aminoácidos. Un codón se corresponde con un aminoácido específico.

La secuencia del material genético se compone de cuatro bases nitrogenadas distintas, que tienen una función equivalente a letras en el código genético: adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C) en el ADN y adenina (A), uracilo (U), guanina (G) y citosina (C) en el ARN. Debido a esto, el número de codones posibles es de 64, de los cuales 61 codifican aminoácidos (siendo además uno de ellos el codón de inicio, AUG) y los tres restantes son sitios de finalización (UAA, llamado ocre; UAG, llamado ámbar; UGA, llamado ópalo). La secuencia de codones determina la secuencia aminoacídica de una proteína en concreto, que tendrá una estructura y una función específicas.

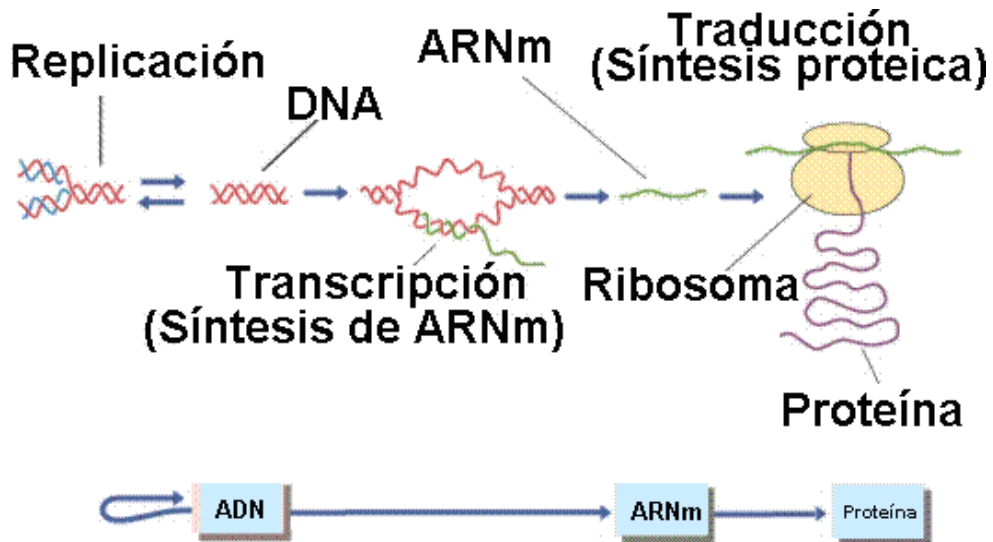
La información genética llevada por el ARNm deberá ser traducida en el citoplasma por los ribosomas (compuesto por varios tipos de proteínas más una forma de ARN, denominado ARN ribosómico). En el ribosoma no se podrá comenzar la lectura de un mensajero más que por una secuencia particular, distinta en las células eucariontes y en las procariontas. Asido el ARNm en el ribosoma, el tercer tipo de ARN (ARN de transferencia, ARNt) entra en acción.

Existen muchos tipos de ARNt y cada uno es capaz de reconocer determinados grupos de tres bases (codones) del ARNm. A cada triplete de nucleótidos, los ARN de transferencia hacen corresponder uno de los veinte aminoácidos que constituyen las cadenas polipeptídicas, las proteínas. La información es inscrita de un trazo en el ADN bacteriano, pero en los organismos superiores se ha descubierto hace una decena de años que la información genética constituye un mosaico en los que la información útil es interrumpida por secuencias no codificantes, aparentemente inútiles, llamadas intrones (las secuencias codificantes son llamadas exones). En la célula eucarionte, en principio, el ARNm transcribe todo, intrones incluidos.

La tabla muestra los 64 codones con sus correspondientes aminoácidos. El ARNm se da en sentido 5' - 3'.

		2ª base			
		U	C	A	G
1ª base	U	UUU (Phe/F) Fenilalanina	UCU (Ser/S) Serina	UAU (Tyr/Y) Tirosina	UGU (Cys/C) Cisteína
		UUC (Phe/F) Fenilalanina	UCC (Ser/S) Serina	UAC (Tyr/Y) Tirosina	UGC (Cys/C) Cisteína
		UUA (Leu/L) Leucina	UCA (Ser/S) Serina	UAA Parada (Ocre)	UGA Parada (Ópalo)
		UUG (Leu/L) Leucina	UCG (Ser/S) Serina	UAG Parada (Ámbar)	UGG (Trp/W) Triptófano
	C	CUU (Leu/L) Leucina	CCU (Pro/P) Prolina	CAU (His/H) Histidina	CGU (Arg/R) Arginina
		CUC (Leu/L) Leucina	CCC (Pro/P) Prolina	CAC (His/H) Histidina	CGC (Arg/R) Arginina
		CUA (Leu/L) Leucina	CCA (Pro/P) Prolina	CAA (Gln/Q) Glutamina	CGA (Arg/R) Arginina
		CUG (Leu/L) Leucina	CCG (Pro/P) Prolina	CAG (Gln/Q) Glutamina	CGG (Arg/R) Arginina
	A	AUU (Ile/I) Isoleucina	ACU (Thr/T) Treonina	AAU (Asn/N) Asparagina	AGU (Ser/S) Serina
		AUC (Ile/I) Isoleucina	ACC (Thr/T) Treonina	AAC (Asn/N) Asparagina	AGC (Ser/S) Serina
		AUA (Ile/I) Isoleucina	ACA (Thr/T) Treonina	AAA (Lys/K) Lisina	AGA (Arg/R) Arginina
		AUG (Met/M) Metionina, Comienzo	ACG (Thr/T) Treonina	AAG (Lys/K) Lisina	AGG (Arg/R) Arginina
	G	GUU (Val/V) Valina	GCU (Ala/A) Alanina	GAU (Asp/D) Ácido aspártico	GGU (Gly/G) Glicina
		GUC (Val/V) Valina	GCC (Ala/A) Alanina	GAC (Asp/D) Ácido aspártico	GGC (Gly/G) Glicina
		GUA (Val/V) Valina	GCA (Ala/A) Alanina	GAA (Glu/E) Ácido glutámico	GGA (Gly/G) Glicina
		GUG (Val/V) Valina	GCG (Ala/A) Alanina	GAG (Glu/E) Ácido glutámico	GGG (Gly/G) Glicina

apolar polar básico ácido codón de parada



2. OBJETIVOS

Estudiar la relación entre la secuencia de nucleótidos de una molécula del mRNA y la síntesis de proteínas.

Demostrar cómo una mutación en la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm modifica los resultados en la secuencia de aminoácidos de una proteína.

3. PROCEDIMIENTO

The image shows a virtual laboratory environment. On the left, there is a workstation with a shelf holding four colored bottles (green, blue, light blue, purple), a large grey machine with four buttons, a test tube rack with four colored test tubes, and a clock. A 'Start Experiment' button is located above the workstation. On the right, there is a rack of five bottles. The first bottle is green with a dropdown menu set to 'A'. The second is blue with a dropdown menu set to 'U'. The third is light blue with a dropdown menu set to 'G'. The fourth is grey with a dropdown menu set to '-'. The fifth is grey with a 'Make RNA' button. Below the bottles, there is an 'add to notes' button. The output of the 'Make RNA' button is displayed as follows:

```

RNA:
AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAO...
Peptide Sequences:
...Arg-Glu-Arg-Glu-Arg-Glu-Arg-Glu-Arg...
RNA:
GUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGI
Peptide Sequences:
...Val-Cys-Val-Cys-Val-Cys-Val-Cys-Val...
  
```

Selecciona cada uno de los nucleótidos haciendo clic en las flechas de cada botella,

Trata primero con AU, haz clic en make ARN para que veas la secuencia del mensajero que creaste y guárdala en tus notas,

Para traducir tu secuencia a aminoácidos haz clic en el botón de Translation Mix y adiciónalos a tus notas.

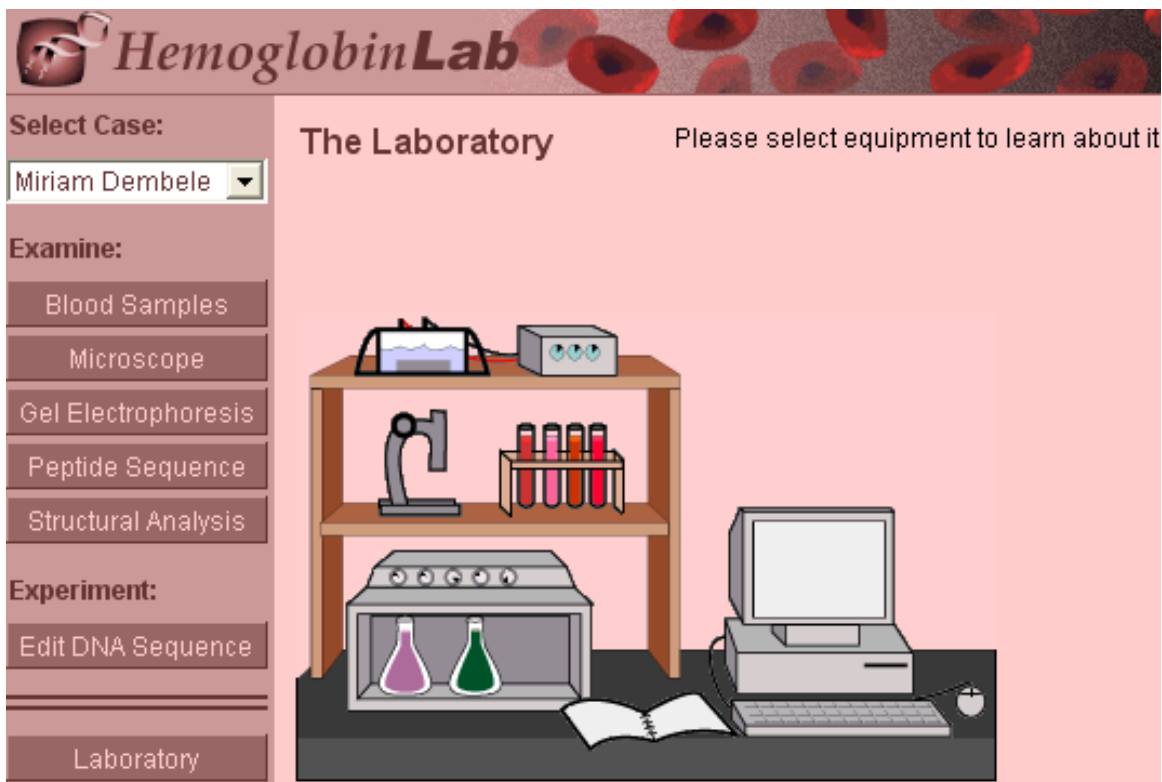
Luego continúa con AAU, y AUU. ¿Notaste algún cambio? ¿Cómo puedes explicar este resultado?

Ahora intenta con GGG, GGA, GGC, y GGU ¿Qué aminoácido sobresalió en los 4 experimentos?

Mutaciones en el código genético

Esta simulación te permitirá estudiar los efectos de mutaciones en un gen de globina y aprender como una sola mutación afecta la secuencia de la estructura de una proteína. Escalofríos, fiebre, dolor de cabeza y vómito son algunos síntomas de la enfermedad llamada Malaria. La Malaria es causada por un protozooario, *Plasmodium vivax*, que se reproduce en un mosquito del género *Anopheles* y vive en países tropicales.

Primero selecciona de la Web la Pagina HemoglobinLab. Presiona el botón de Start lab y posteriormente selecciona de la lista de caso a la paciente **Miriam Dembele**.

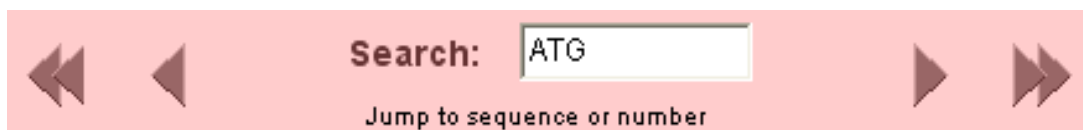


Lee el caso de Miriam. Ella es un caso consistente con aumento en resistencia a la enfermedad de Malaria. Compara la muestra de sangre de Miriam con la muestra del control sano. ¿Hay deferencias obvias?

Selecciona la vista de microscopio y toma nota de las diferencias que hay en la estructura de las células rojas. **¿La sangre muestra características fenotípicas de la enfermedad de células falciformes?**

Selecciona la vista de secuencia del péptido y haz click en el botón de diferencias para identificar el aminoácido cambiado en la hemoglobina de Miriam comparada con el control de hemoglobina normal. ¿Qué aminoácido ha sido sustituido para el gen de Miriam? Anota la posición del aminoácido, es importante para identificar el cambio en la secuencia de nucleótidos del gen de la globina.

Selecciona Edit DNA Sequence view. A parecerá la secuencia del gen de la hemoglobina de Miriam comparado con la secuencia del gen normal, localiza el triplete o codón con la secuencia ATG del ADN que indica la posición del codón de inicio que debería aparecer en el ARNm producido por la transcripción de este gen. Puedes teclear la secuencia ATG en la ventana de Search.



Esta acción te colocará en el nucleótido 87 con un delineado rojo, haz click en Bracket Codons y te delinea los tripletes de cada codón, usando las flechas avanza hasta el codón 6 (nucleótidos 105-107).

Haz click en el nucleótido 106 y cambia la A por una T y selecciona traducir para que compares la proteína que usaste para mutar, la proteína de Miriam y la proteína normal.

¿Esta simple mutación en una base, provoca la alteración en el gen de la hemoglobina?
Explica los resultados.

Se han identificado muchas posiciones invariables en el grupo Hemo de la hemoglobina de vertebrados e invertebrados, cambios en esos aminoácidos dan como resultado un gran número de serias enfermedades en la sangre, incluyendo una gran variedad de anemias. La anemia es una condición que involucra una anomalía en la capacidad para acarrear oxígeno en los glóbulos rojos ya sea por la baja producción de glóbulos rojos en el individuo o por la producción anormal de hemoglobina en las células, (Anemia o Talasemia) lo que se manifiesta por fatiga, palidez y baja de temperatura corporal. Una de estas variantes en los aminoácidos de la beta globina es la **Hemoglobina Hammersmith**, localizada en el aminoácido número 42 del polipéptido de la globina, la mutación da como resultado una hemoglobina inestable que no puede asir ni mantener la posición del grupo Hemo en la orientación adecuada para la unión de oxígeno.

- Selecciona la vista de las secuencias de los péptidos en Hemoglobin lab y compara las secuencias de cada una de las mujeres de la lista de pacientes presionando el botón de Find Difference hasta que encuentres a la paciente con la hemoglobina Hammersmith. (Asegura que la secuencia del péptido inicie desde el primer aminoácido)

¿Qué aminoácido está sustituido en esta paciente?

- a) Usa edit DNA Sequence para que identifiques el codón para este aminoácido, altera el codón cambiando las posiciones hasta que reproduzcas la mutación Hammersmith.
- b) Puedes guiarte en la tabla de codones para confirmar la mutación creada.

CUESTIONARIO

1. ¿Cómo se lleva a cabo la traducción en el ribosoma?
2. ¿Qué es un ORF (Marco de Lectura Abierto) y cuál es su importancia?
3. Describe los tipos de mutaciones que existen en la naturaleza.

PRÁCTICA 8.

A) EJERCICIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR. DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR PAPILOMA VIRUS HUMANO (VPH) EN CÁNCER DE CUELLO UTERINO MEDIANTE PCR.

1. INTRODUCCIÓN

Corre el año 1971. Susana Jiménez, una mujer de 31 años de Colima, Colima, está enferma. Ella visita a su médico, quien la explora y le extrae algunas células de su cérvix uterino. Estas células fueron enviadas a un laboratorio para determinar si ella tenía un cáncer de cuello uterino. Las células eran increíblemente malignas con Virus del Papiloma Humano y Susana Jiménez muere ocho meses más tarde. Las células de Susana Jiménez permanecen vivas 30 años después de su muerte en los laboratorios de todo el mundo.

a) PCR en VPH

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una de las más recientes y más nuevas técnicas disponibles y que presenta enormes ventajas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

Una de ellas es la tremenda sensibilidad. En una reacción de PCR con 30 ciclos, aunque exista en el tubo una sola copia del ADN molde puede potencialmente hacer

$$1 + 2^1 + 2^2 + 2^{29} = 1.061.109.567 \text{ copias del ADN molde}$$

Aunque la reacción no presenta una efectividad del 100%, el PCR es una técnica tremendamente sensible, pues consigue muchos millones de copias a partir de una sola.

b) VPH y Cáncer

La mayoría (80-90 %) de los carcinomas cervicales (cánceres) contienen el Virus del Papiloma Humano (VPH) bien el tipo 18 (VPH18, el más frecuente) o bien de tipo 16 (VPH16). La relación entre la infección por VPH (que es frecuente) y la transformación en células malignas (que es rara) es compleja y todavía no bien comprendida. Sin embargo, el cáncer cervical es uno de los cánceres más frecuentes en las mujeres alcanzando la cifra del 6-8 % del total. Por otro lado, los estudios epidemiológicos han demostrado que el mayor riesgo para el desarrollo de un carcinoma cervical es la infección por VPH.

c) Diagnóstico de infección con VPH

Las infecciones por Virus del Papiloma Humano (VPH) no pueden ser diagnosticadas por los métodos tradicionales utilizados en los laboratorios de diagnóstico virológico, pero el PCR permite la detección de estos virus.

d) Técnica

La técnica a utilizar en este protocolo experimental es la detección del ADN del VPH18 que se realiza en dos fases:

- Amplificación del ADN mediante la PCR y dos iniciadores (primers) específicos para el VPH18
- Comprobación mediante electroforesis en gel que la zona amplificada en la PCR con esos primers tiene un tamaño molecular de 270 bp (pares de bases)

2. OBJETIVO


Efectuar un diagnóstico de laboratorio de la presencia del VPH (Virus del Papiloma Humano) mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en 5 muestras de células: Dos obtenidas de líneas celulares utilizadas en los laboratorios de virología para el cultivo de los virus (HeLa y MRC5) y tres obtenidas del cérvix uterino de tres pacientes (1, 2 y 3).

3. REACTIVOS


- Agua destilada estéril Muestras de ADN celular HeLaMRC-5 (una línea celular de células diploides humanas)
- Primers específicos sintéticos (2) para el Virus del Papiloma Humano tipo 18 (VPH18 o HPV18)
- Buffer para PCR 10X Taq ADN polimerasa Aceite mineral

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

- Marque seis tubos pequeños Eppendorf de la siguiente manera:

<p>N (control negativo) H (HeLa) M (MRC-5) 1 (paciente 1) 2 (paciente 2) 3 (paciente 3)</p>	
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------

- Cuidadosamente y sin contaminación cruzada de los reactivos (cambio de las puntas de la micropipeta) añadida a cada tubo y en este orden lo siguiente:

<p>9μl de agua destilada estéril 2μl del buffer para PCR 10X 2μl de la pareja de primers 5μl del correspondiente ADN para cada tubo (agua para el control negativo) 2μl de Taq polimerasa</p>	
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------

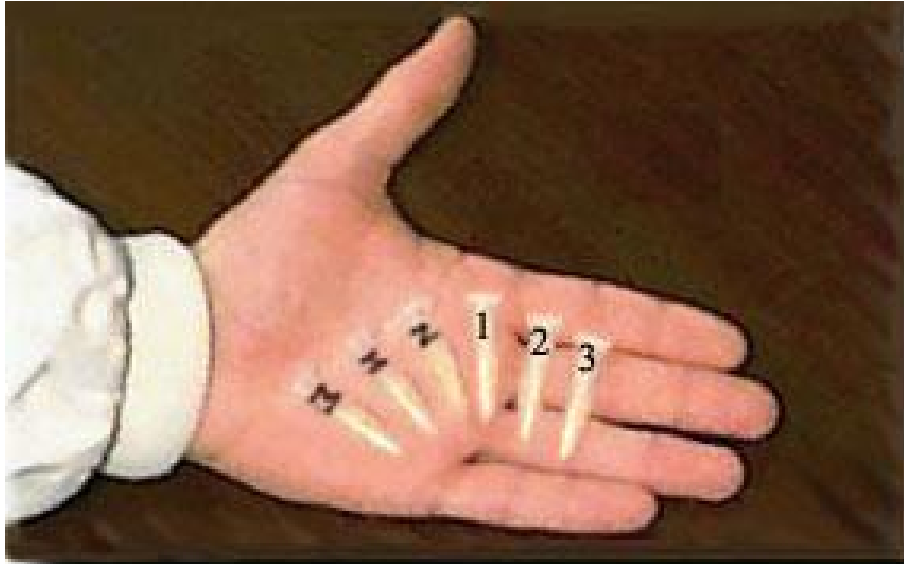
- Colocar las muestras en un termociclador



- En este protocolo experimental el termociclador se ajusta para que las muestras se incuben en las siguientes condiciones:

5 minutos a 95 °C	Permite separar las moléculas de ADN
30 ciclos con las siguientes condiciones	
1 minuto a 95 °C	Permite separar las cadenas de ADN
1 minuto a 60 °C	Permite la unión de los oligonucleótidos (primers o cebadores) a los sitios específicos que limitan el fragmento de ADN que se va a amplificar
1 minuto a 72 °C	Permite a la enzima Taq polimerasa alargar las cadenas de ADN, partiendo del extremo 3' de los oligonucleótidos.
Fin de los 30 ciclos	
Al menos 5 minutos a 4 °C, para transferir cada tubo al refrigerador.	Permite detener la reacción de polimerización

- He aquí las muestras procesadas:



- Colocación de muestras amplificadas en gel de agarosa

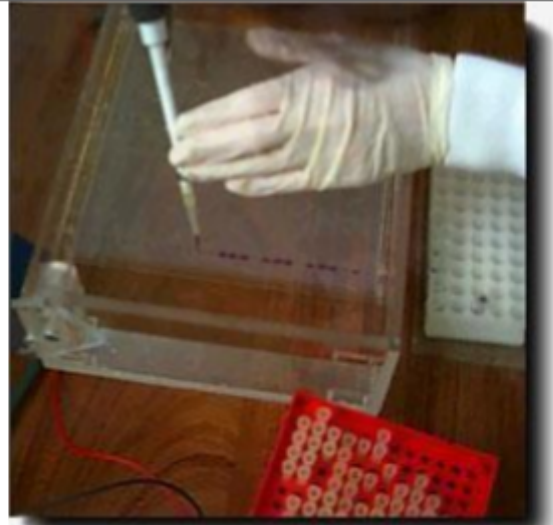
Extraer 10 μ l de cada reacción y colóquela en un nuevo tubo Eppendorf



Colocar las muestras sobre el gel de agarosa al 2 %

Colocar también la muestra suministrada del marcador de tamaños moleculares.

Anotar en que carril se coloca cada muestra

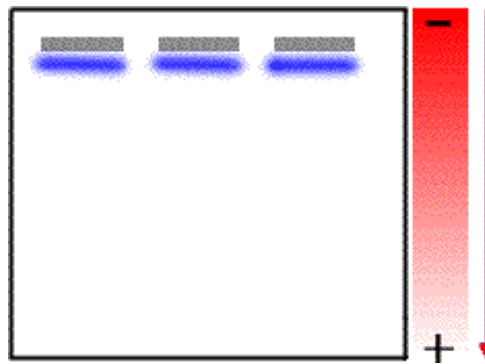


- Separación de los fragmentos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa

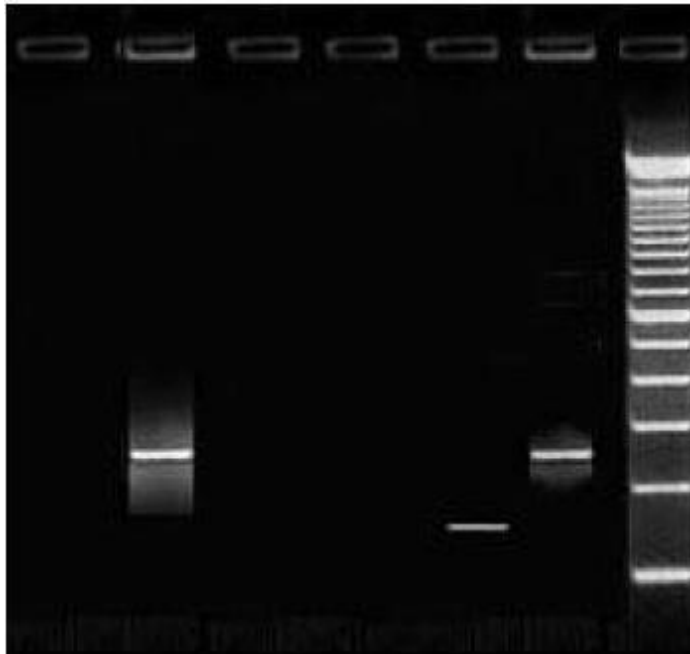


Realizar la electroforesis

Esperar hasta que el colorante control azul de bromofenol haya emigrado hasta la mitad del gel



- Visualización de las bandas en luz ultravioleta



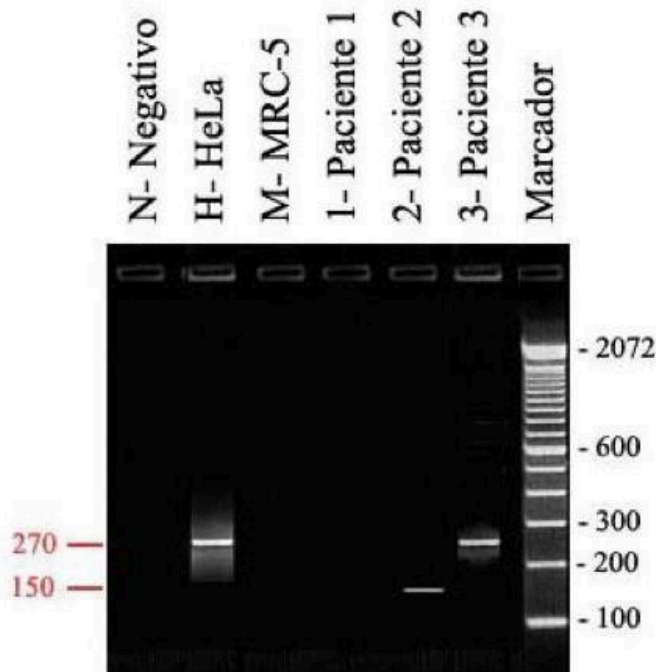
- Interpretación de los resultados:

Nº	Banda Marcador	Tamaño molecular (bp)
1		100
2		200
3		300
4		400
5		500
6		600

Tener en cuenta si las muestras problemas dan alguna banda. En caso positivo tener en cuenta la posición de la banda para estimar el tamaño molecular.

La posición indica el tamaño molecular del fragmento de ADN amplificado teniendo en cuenta la posición de las bandas del marcador de tamaño molecular

¿Qué muestras tienen el Virus del Papiloma Humano tipo 18?



Interpretación:

Control Negativo : negativo

HeLa : banda amplificada de 270 bp

MRC-5 : negativo

Paciente 1 : negativo

Paciente 2 : banda amplificada de 150 bp

Paciente 3 : banda amplificada de 270 bp

5. CUESTIONARIO

1. La técnica de la PCR es tremendamente sensible aunque no sea eficiente al 100 %. Si la PCR fuese efectiva al 100 % en 30 ciclos se obtendrían un mínimo de copias del ADN molde de:

- a. Menos de 10 millones de copias
- b. Unos 100 millones de copias
- c. Más de 1.000 millones de copias

2. La amplificación ha sido negativa en las siguientes muestras:

- a) HeLa, paciente 2 y paciente 3
- b) Control negativo, MRC-5 y paciente 1
- c) Control negativo, MRC-5, paciente 1 y paciente 2

3. La amplificación ha sido positiva en las siguientes muestras:

- a) HeLa, paciente 2 y paciente 3
- b) HeLa paciente 2
- c) En ninguna de las muestras

4. El tamaño de los polinucleótidos amplificados en las diversas muestras han sido de aproximadamente:

- a) Solo de 270 bp
- b) Solo de 150 bp
- c) de 150 y 270 bp

5. Mediante esta técnica se ha podido detectar el ADN del VPH 18 en las células:

- a) Paciente 2
- b) Paciente 3 y HeLa
- c) Paciente 2, paciente 3 y HeLa

B). EJERCICIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Diagnóstico de anemia falciforme

1. OBJETIVO

Se trata de interpretar los resultados de laboratorio para detectar una enfermedad genética mediante el estudio de los polimorfismos de ADN. Los cambios en el gen defectivo pueden ser detectados aunque únicamente afecten a los nucleótidos que codifican un sólo aminoácido, si se utiliza la adecuada enzima de restricción que actúe precisamente al nivel de esa secuencia, bien sea sobre la normal o sobre la alterada.

También se trata de familiarizarse en la utilización de pipetas, puntas, tubos y equipo de electroforesis para tener una idea, aunque sea de forma virtual, de los protocolos o procedimientos de la técnica en el laboratorio. Este último objetivo se refiere únicamente al ejercicio realizado en la modalidad alta de dificultad que utiliza los simuladores.

2. PLANTEAMIENTO PRÁCTICO

Se intenta diagnosticar en 4 pacientes (Pt1, Pt2, Pt3 y Pt4) la presencia en su ADN del gen codificador de la hemoglobina S comparándolo con el ADN de anemia falciforme (SS) (homocigótico de hemoglobina S) y el ADN de hemoglobina normal (WW) (homocigótico de hemoglobina normal).

La hemoglobulina S es una proteína anormal que se encuentra en los pacientes con la enfermedad de anemia falciforme. Consta de 2 cadenas alfa normales y dos cadenas beta mutantes en las que el aminoácido en posición 6 ha cambiado de glutamato a valina.

El diagnóstico se fundamenta en el aislamiento del ADN codificador de la cadenas betas de las hemoglobinas y la detección de la mutación mediante la enzima de restricción **Bsu36I, que fragmenta la hemoglobina normal pero no la hemoglobina S por la mutación.**

La hemoglobina S tiene una solubilidad baja y precipita formando largos filamentos que son los responsables de la deformación de los eritrocitos que se observa en la enfermedad. Esta enfermedad solo la padecen los individuos homocigóticos para el gen de la hemoglobina S.

Los glóbulos rojos que contienen hemoglobina normal son redondos y flexibles. Pero cuando los glóbulos rojos de las personas afectadas con esta enfermedad

(homocigóticos de hemoglobina S) liberan el oxígeno, la anomalía de la hemoglobina hace que las células se endurezcan y se deformen, a menudo hasta tener la forma de una letra C, como una hoz (falciformes). Los glóbulos falciformes tienden a quedar atrapados y a ser destruidos en el hígado y en el bazo. Como consecuencia, se produce una falta de glóbulos rojos, o anemia, la cual, en casos graves, puede provocar palidez, dificultades respiratorias y cansancio.

Hay otros factores, como el agrandamiento del bazo y algunas infecciones, que pueden empeorar la anemia al acelerar el proceso de destrucción de glóbulos rojos. Los niños que padecen anemia falciforme son especialmente propensos a contraer graves infecciones bacterianas como las que causan la meningitis y las infecciones de la sangre (septicemia). Las infecciones son la principal causa de muerte entre los niños que padecen esta enfermedad.

3. **PROTOCOLO Reactivos virtuales** Muestras de ADN:

ADN de anemia falciforme (SS) de individuo homocigótico para hemoglobina S
ADN del individuo homocigótico de hemoglobina normal (WW) ADN de 4
pacientes para ser genotipados (Pt1, Pt2, Pt3, Pt4)

Enzima de restricción Bsu36I

Marcador de pesos moleculares

Agua

Solución tampón universal 10X para enzimas de restricción

a) Digestión de ADN por enzima de restricción

En unos tubos marcados con los números 1 al 12 se han puesto los siguientes reactivos:

Reactivos	Tubos											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
4 µl de solución tampón 10X	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25 µl de agua	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11 µl de ADN de anemia falciforme (SS)	+						+					
11 µl de ADN de individuo normal (WW)		+						+				
11 µl de ADN de paciente problema Pt1			+						+			
11 µl de ADN de paciente problema Pt2				+						+		
11 µl de ADN de paciente problema Pt3					+						+	
11 µl de ADN de paciente problema Pt4						+						+
1 µl de la enzima de restricción Bsu36I							+	+	+	+	+	+

Los tubos 1 a 6 no llevan enzimas de restricción. Se han incubado los tubos a 37°C durante 10 segundos.

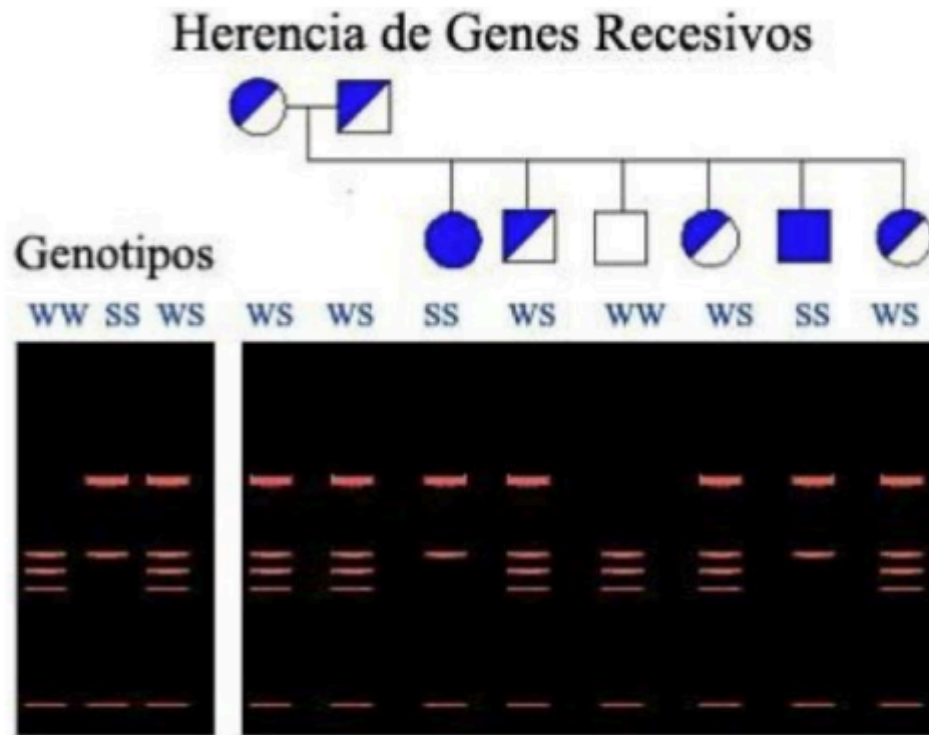
b) Electroforesis en gel de agarosa

- Mediante micropipeta se han transferido muestras de los 12 tubos a un gel de agarosa colocándolos en los primeros 12 carriles (muestra de tubo 1 en carril 1, muestra de tubo 2 en carril 2, etc).
- En el carril 13 se ha colocado el control del tamaño molecular o marcador de pesos moleculares.
- Se ha efectuado la electroforesis a 300 voltios durante 2 horas.
- Finalizada la electroforesis y apagadas las luces de la habitación con el transiluminador ultravioleta se han observado las bandas con fluorescencia.

c) Interpretación de los resultados

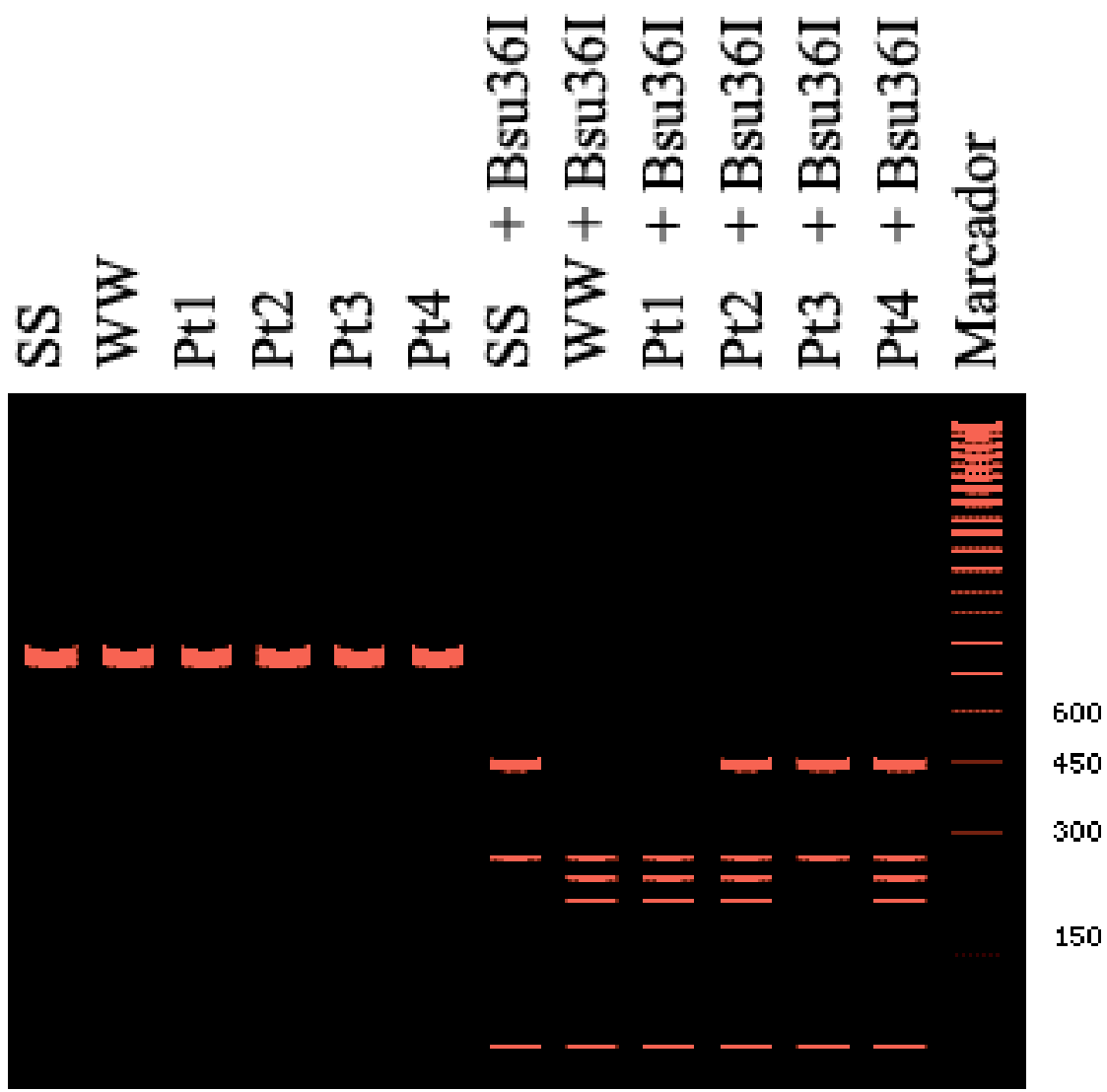
Tener en cuenta lo que se ha puesto en enzimas cada carril. Los tubos 1 a 6 no llevan de restricción	
Tener en cuenta el tamaño molecular de las bandas del marcador en pares de bases:	1 (150) 2 (300) 3 (450) 4 (600) 5 (750) 6 (900)
Considerar los genotipos posibles teniendo en cuenta el carácter homocigótico o heterocigótico:	WW = Homocigoto con hemoglobina silvestre SS = Homocigoto con hemoglobina S WS = Heterocigoto

Considerar la herencia de genes recesivos y los fenotipos que se obtienen



4. RESULTADOS

Los resultados que se han obtenido después de la electroforesis en gel de agarosa han sido los que se recogen en la siguiente imagen.



5. CUESTIONARIO

Las muestras de los 6 primeros tubos con ADN sin digerir con la enzima de restricción: han dado todas.

- a) han dado toda una única banda de unos 150 bp.
- b) han dado toda una única banda de unos 430 bp.
- c) han dado toda una única banda de unos 810 bp.

1. En las muestras de ADN se han encontrado el siguiente número de genotipos

- a) Uno. b) Dos. c) Tres.

2. La banda específica del gen mutado de la hemoglobina S tiene un tamaño aproximado de:

- a) 210 bp. b) 280 bp. c) 430 bp.

3. El genotipo homocigótico de la hemoglobina S se han encontrado en las siguientes muestras:

- a) Pt2. b) Pt3. c) Pt2 y Pt4.

4. El genotipo heterocigótico de la hemoglobina S se han encontrado en las siguientes muestras:

- a) Pt2. b) Pt3. c) Pt2 y Pt4.

C). EJERCICIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Huellas dactilares del ADN

1. OBJETIVOS

- Comprender como las enzimas de restricción se utilizan para cortar las moléculas de ADN en fragmentos.
- Comprender como las moléculas de ADN son separadas durante la electroforesis en gel de agarosa según su tamaño.
- Comprender como los polimorfismos de ADN o la técnica de los RFLPs (Fragmentos Polimórficos de diferente Longitud originados por enzimas de Restricción) se utilizan para identificar secuencias de ADN.
- Familiarizarse mediante el laboratorio virtual con la técnica de la digestión con enzimas de restricción. Familiarizarse mediante el laboratorio virtual con la técnica de separación de los fragmentos obtenidos en la digestión por medio de una electroforesis en gel de agarosa.
- Ser capaz de determinar los tamaños de los fragmentos de ADN por sus movilidades electroforéticas.

2. PLANTEAMIENTO PRÁCTICO

Típico caso de medicina legal o forense, en la que se han encontrado células sobre la víctima que permite identificar al sospechoso.

Sobre el ADN de espermatozoides recogidos en la víctima de un asesinato con violación (Perp) se efectúa un análisis del polimorfismo del ADN para compararlo con los resultados obtenidos con el ADN de células de 5 sospechosos (S1, S2, S3, S4 y S5).

3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL Material y equipo virtual.

Micropipeta y puntas amarillas 0-100 µl Equipo de electroforesis horizontal en gel de agarosa Transiluminador UV

Reactivos virtuales

Muestras de ADN:

ADN de espermatozoides recogidos en la víctima de un asesinato con violación (Perp)
ADN de células de 5 sospechosos (S1, S2, S3, S4 y S5)

Enzima de restricción BamHI y
 EcoRI Marcador de pesos
 moleculares Agua
 Buffer universal 10X para enzimas de
 restricción Agarosa
 Buffer para electroforesis 0.5X TBE
 (Tris/Borato/EDTA) Colorante fluorescente de
 Bromuro de etidio
 Dos colorantes con diferentes movilidades (azul de bromofenol y xilen-
 cianol).

a) Digestión de ADN por enzima de restricción

En unos tubos marcados con los números 1 al 12 se han puesto los siguientes reactivos:

Reactivos	Tubos											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
4 µl de solución tampón 10X	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25 µl de agua	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11 µl de ADN de espermatozoides sobre víctima (Perp)	+						+					
11 µl de ADN de células de sospechoso		+						+				
11 µl de ADN de células de sospechoso			+						+			
11 µl de ADN de células de sospechoso				+						+		
11 µl de ADN de células de sospechoso					+						+	
1 µl de la enzima de restricción BamHI							+	+	+	+	+	+
1 µl de la enzima de restricción EcoRI							+	+	+	+	+	+

Los tubos 1 a 6 no llevan enzimas de restricción. Se han incubado los tubos a 37°C durante 10 segundos

b) Electroforesis en gel de agarosa

- Mediante micropipeta se han transferido muestras de los 12 tubos a un gel de agarosa colocándolos en los primeras 12 carriles (muestra de tubo 1 en carril 1, muestra de tubo 2 en carril 2, etc).
- En la carril 13 se ha colocado el control del tamaño molecular o marcador de pesos

moleculares.

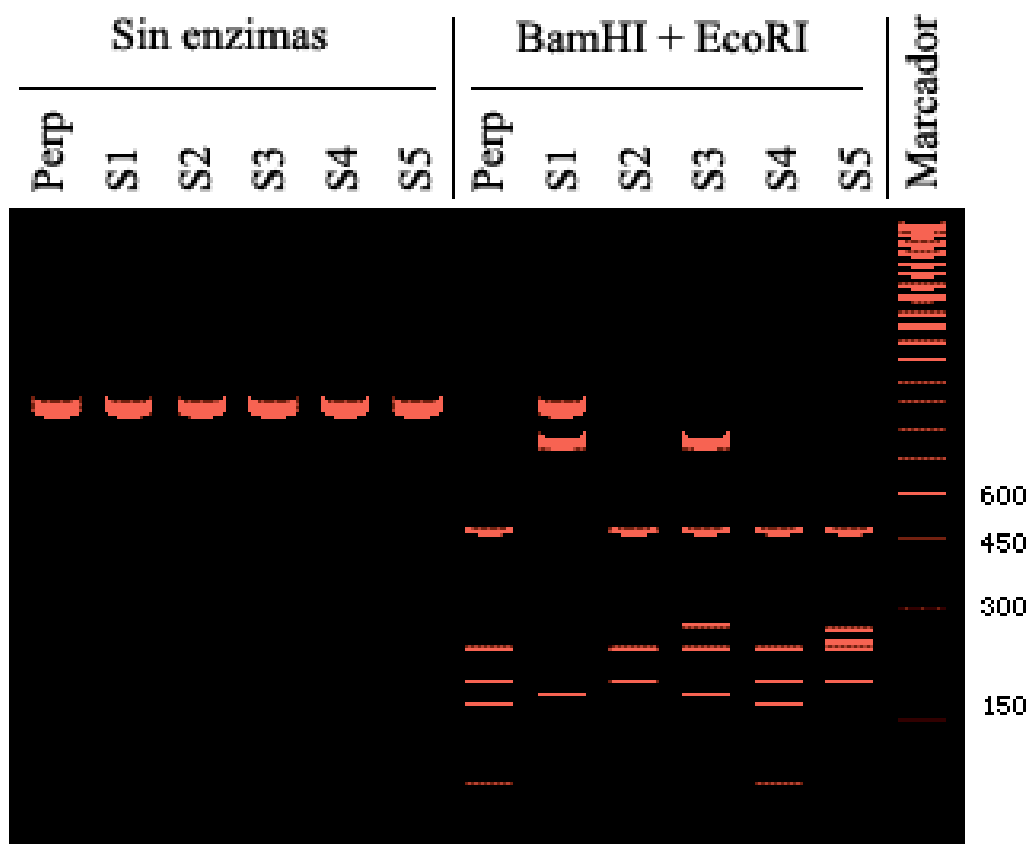
- Se ha efectuado la electroforesis a 300 voltios durante 2 horas.
- Finalizada la electroforesis y apagadas las luces de la habitación con el transiluminador ultravioleta, se han observado las bandas con fluorescencia

4. RESULTADO

N° Marcador	Banda	Tamaño molecular (bp)
1		150
2		300
3		450
4		600
5		750
6		900

Tener en cuenta patrones electroforéticos obtenidos : número de bandas y su posición para determinar si alguno de los ADN de los sospechosos (S1,S2, S3, S4 y S5) da el mismo polimorfismo que el ADN de la evidencia (Perp).	4 5 600 750
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------

- La posición indica el tamaño molecular del fragmento teniendo en cuenta la posición de las bandas del marcador de tamaño molecular.
- En la práctica real se efectúa con más enzimas de restricción para que la probabilidad de encontrar dos ADN con iguales patrones electroforéticos sea menor de 1/1 billón, de allí el nombre de 'huellas dactilares del ADN'.



5. CUESTIONARIO

1. Las bandas con un tamaño molecular superior a 750 pb se encontraron:

- a). Solamente en las 6 muestras no tratadas con enzimas
- b) En las 6 muestras no tratadas con enzimas y en la S1 y S3 tratadas con enzimas
- c) Solamente en las muestras tratadas con enzimas Perp, S2, S4 y S5

2. Las bandas con un tamaño molecular más bajo (inferior a 130 bp) se encontraron en las muestras digeridas con enzimas

- a) Perp y S4 b) S1 y S2 c) S3 y S4

3. Los patrones electroforéticos o polimorfismos o genotipos presentados en las 6 muestras digeridas con enzimas de restricción:

- a) Son todos ellos (los 6) diferentes
- b) Existen dos de ellos idénticos (Perp y S4)
- c) Existen dos parejas de idénticos (Perp-S4 y S2-S5)

4. Los polimorfismos detectados con solo 2 enzimas de restricción BamHI y EcoRI, permiten descartar a los siguientes sospechosos por presentar ADN diferente

- a) S1
- b) S1 y S3
- c) S1, S2, S3 y S5

5. Aunque los ensayos se realizan con más enzimas de restricción, la presentación de un polimorfismo idéntico significa que el ADN de la evidencia 'Perp' es el mismo que el ADN del sospechoso:

- a) S2
- b) S4
- c) S5

D). EJERCICIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SECUENCIACIÓN DE ADN

1. OBJETIVOS

Se trata de determinar la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN para poder conocer o identificar a que ADN pertenece ese ADN problema y poder realizar un diagnóstico o identificación. Se utiliza una zona del ADN conocida y de la que se conocen las variaciones (de lo que se trate: individuos, especies o géneros). Para llegar a esa zona del ADN conocida se utiliza un 'primer' o cebador que se une a una parte inmediata de ese ADN variable conocido, parte inmediata que tiene que ser común a todos ellos (los individuos, las especies, los géneros según sea el caso).

El objetivo concreto de este ejercicio es conseguir leer una secuencia en un gel de secuenciación y por lo tanto conocer o determinar la secuencia de nucleótidos de esa zona de ADN variable conocida.

También se trata de familiarizarse en la utilización de pipetas, puntas, tubos y equipo de electroforesis de alto voltaje para la separación de nucleótidos en el gel de secuenciación para tener una idea, aunque sea de forma virtual, de los protocolos o procedimientos de la técnica en el laboratorio.

2. PLANTEAMIENTO PRÁCTICO

Se intenta conocer la secuencia de nucleótidos de una zona del ADN de 2 microorganismos aislados del suelo para poderlos identificar, es decir, para poder determinar a que géneros pertenecen.

El diagnóstico se fundamenta en el aislamiento del ADN ribosómico 16S que presenta secuencias diferentes específicas y conocidas para cada género. De ese ADN ribosómico 16S se selecciona una zona que varía en cada género y una zona inmediata constante en todos los géneros para el primer o cebador. Determinando la secuencia de ese fragmento variable de ADN se puede identificar el género a que pertenece las bacterias aisladas o problemas. Se trata, pues, de determinar la secuencia de ADN para poder diagnosticar al género al que pertenecen.

3. PROTOCOLO

EXPERIMENTAL La técnica de la

secuenciación

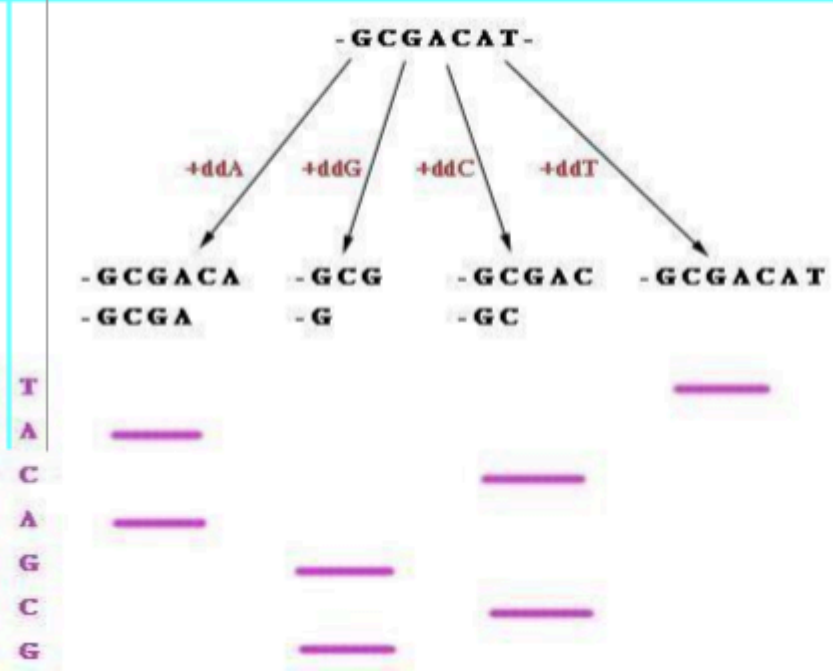
Consiste en la síntesis de ADN mediante la ADN polimerasa, a partir de la unión

con el primer o cebador. La diferencia con una síntesis de ADN normal es que además de los nucleósidos trifosfato normales (dNTP) se añaden una pequeña cantidad de unos didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTP). Estos ddNTP son moléculas que parecen nucleótidos normales excepto por carecer de un grupo hidroxilo en posición 3'. Se añaden a una cadena de ADN en crecimiento, pero finalizan o interrumpen la síntesis de ADN porque no se pueden añadir más nucleótidos para ampliar la cadena debido a esa carencia.

En la reacción se mezcla la cadena sencilla del ADN que se quiere secuenciar junto con el primer o cebador, la ADN polimerasa, los nucleósidos normales y una pequeña cantidad de uno de estos ddNTP marcados (con isótopos o colorantes fluorescentes). La síntesis de ADN se inicia con el cebador y finaliza cuando se incorpora un ddNTP en lugar de un dNTP normal. El resultado es una serie de fragmentos de longitudes diferentes. Se producen cuatro reacciones, cada una de ellas con un ddNTP diferente:

La reacción con ddATP produce fragmentos con A terminal, la reacción con ddCTP produce fragmentos con C terminal La reacción con ddGTP produce fragmentos con G terminal La reacción con ddTTP produce fragmentos con T terminal

Los fragmentos se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida, para separar unos fragmentos de otros según su tamaño. Los fragmentos más pequeños presentan un desplazamiento más veloz y dan lugar a bandas más desplazadas.



4. MATERIAL Y REACTIVOS VIRTUALES

ADN problemas.

- a. ADN_{r1}= ADN ribosómico de la bacteria problema nº 1.
- b. ADN_{r2}= ADN ribosómico de la bacteria problema nº 2.

Primer para el ADN ribosómico **agagtttgat**

ADN polimerasa.

Buffer.

dNTP/ddNTP para las reacciones A, C, G, T.

Radionucleótido (³²P dATP).

Película sensible a rayos X. Equipo de secuenciación en gel.

Poliacrilamida/bisacrilamida/TMED.

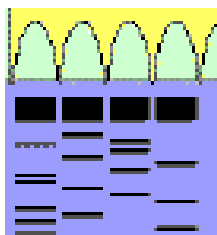
Urea (7 M de concentración final en gel).

Buffer TBE 0.5X.

5. SECUENCIACIÓN

- En las 4 primeras carriles del gel de secuenciación se colocan los resultados de las reacciones A, C, G, T del ADN ribosómico de la bacteria problema nº 1 (ADN_{r1}). Para llevar a cabo estas reacciones se utilizó el primer para el ADN ribosómico agagtttgat, ADN polimerasa, el dNTP/ddNTP para cada una de dichas reacciones A, C, G, T y el radionúclido (³²PdATP).
- En las 4 últimas carriles del gel de secuenciación se colocan los resultados de las reacciones A, C, G, T del ADN ribosómico de la bacteria problema nº 2 (ADN_{r2}).
- Se efectúa la electroforesis a 1.000 voltios durante 40 minutos.
- Una vez finalizada la separación electroforética se realiza el auto-radiograma para visualizar las bandas de secuenciación

6. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS



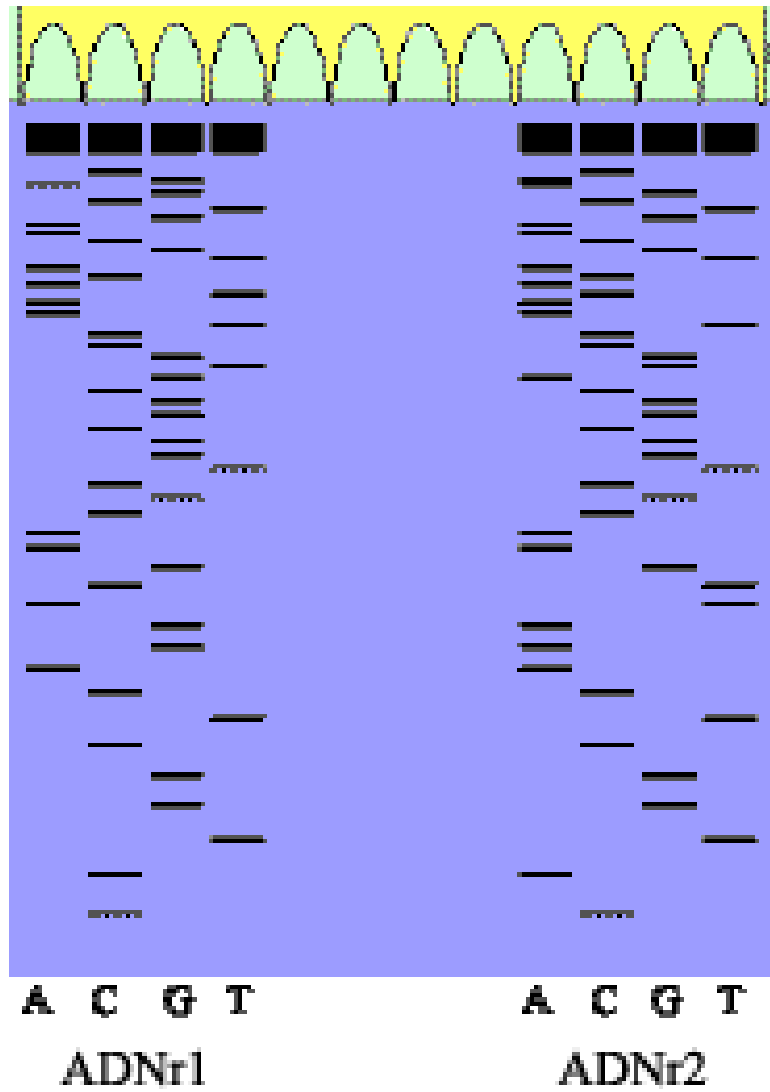
- a. Tener en cuenta que la 4 primeros carriles corresponden a la muestra ADNr1 y las 4 últimas a la muestra ADNr2
- b. Tener en cuenta que en cada muestra el orden de las reacciones de izquierda a derecha es de A C G T
- c. Empezar la determinación por las bandas más desplazadas (1, 2, 3...) según el carril en la que aparecen (CCT)

d. Leer unos doce nucleótidos o más si son necesarios

Conociendo la secuencia determinar el género al que pertenece la muestra problema

Secuencia	Género Bacteria
cctggctcag aacgaacgct ggcggcaggc ttaacacatg	<i>Agrobacterium</i>
cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg	<i>Bacillus</i>
cctggctcag agcgaacgct ggcggcaggc ctaacacatg	<i>Brevundimonas</i>
cctggctcag attgaacgct ggcggcatgc cttacacatg	<i>Burkholderia</i>
catggctcaa attgaacgct ggcggcaggc ctaacacatg	<i>Escherichia</i>
gagagttga tctggctca gactgaacgc tggcggcgtg	<i>Helicobacter</i>
catggctcag attgaacgct ggcggcaggc ctaacacatg	<i>Pseudomonas</i>
cccggctcag agtgaacgct ggcggtaggc ctaacacatg	<i>Stenotrophomonas</i>
catggctcag attgaacgct ggcggcaggc ctaacacatg	<i>Xanthomonas</i>

e. Auto-radiograma obtenido:



7. CUESTIONARIO

- En las dos muestras ADNr1 y ADNr2 el primer nucleótido obtenido después del primer es:

- a) A.
- b) C.
- c) G.

En la muestra ADNr1 los 10 primeros nucleótidos obtenidos son:

- a) CAGAGTTTGA.
- b) CCTGGCTCAG.
- c) CATGGCTCAA.

En la muestra ADNr2 los 10 primeros nucleótidos obtenidos son:

- a) CAGAGTTTGA.
- b) CCTGGCTCAG.
- c) CATGGCTCAA.

La secuenciación obtenida indica que la muestra ADNr1 pertenece a una bacteria del género:

- a) *Bacillus*.
- b) *Pseudomonas*.
- c) *Helicobacter*.

La secuenciación obtenida indica que la muestra ADNr2 pertenece a una bacteria del género:

- a) *Rhizobium*.
- b) *Escherichia*.
- c) *Agrobacterium*.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., et al. (2004). **Biología Molecular de la Célula**. Cuarta Edición. Ediciones Omega. Barcelona. (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**: 71–84.
- Cho HT, Cosgrove DJ. (2002). Regulation of Root Hair Initiation and Expansin Gene Expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **14**:3237-3253.
- Colon Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T, Doerner P. (1999). Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant Journal* **20**: 503-508.
- Consultas básicas: Martínez-Trujillo M, García-Pineda E, Campos-García J, Granados-García ME, Farías-Escalera A (2006) *Principios de Biología Molecular*. UMSNH-SEP. 238 pp.
- Darnell, J., et al. (1988). **Biología Celular y Molecular**. Editorial Labor. Barcelona.
- Lewin B. (2008). **Genes IX**. Jones and Bartlett. 892 pp.
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres
- Herráez, Á. (2012). **Biología molecular e ingeniería genética**. elsevier health sciences.
- Herrera-Estrella L., Depicker A., Van Montagu M., Schell J. (1983) Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti- plasmid- derived vector. *Nature* **303**: 209-213
- Karp, G. y cols (2016). **Biología celular y molecular: Conceptos y experimentos**. McGraw-Hill.
- Learn. Genetics (2023). **DNA extraction biotechniques virtual lab**. Disponible en: [DNA Extraction \(utah.edu\)](https://www.utah.edu/genetics/dna-extraction)
- Lewin, B. (1994). **Genes**. Segunda edición. Editorial Reverté. Barcelona.
- Martínez- Trujillo M, Limones-Briones V, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L (2004) Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant Molecular Biology Reporter* **22**: 63-70.
- Mena, M. y cols (2016). Ácidos nucleicos. En A. M. Salazar, **Biología molecular: Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud** (págs. 29-32). McGraw Hill Education.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497.
- Puerta, C. J., & Ureña, C. P. (2005). **Prácticas de biología molecular**. Pontificia Universidad Javeriana.
- Smale ST (1997) Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *BBA* **1351**: 73-88.
- Thermo Fisher Scientific. (2021). **Plant DNazol reagent**. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.th>

ermofisher.com/TFS-Assets%2FSLG%2Fmanuals%2FMAN0000929_10978021.PPS_Plant%20DNAzol_UG.pdf

- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ. (1997). Aux/IAA Proteins Repress Expression of Reporter Genes Containing Natural and highly Active Synthetic Auxin Response Elements. *The Plant Cell* **9**: 1963-1971.
- Watson JD., et al. (2004). **Molecular Biology of the Gene**. Fifth Edition. CSHL Press. 732 pp.