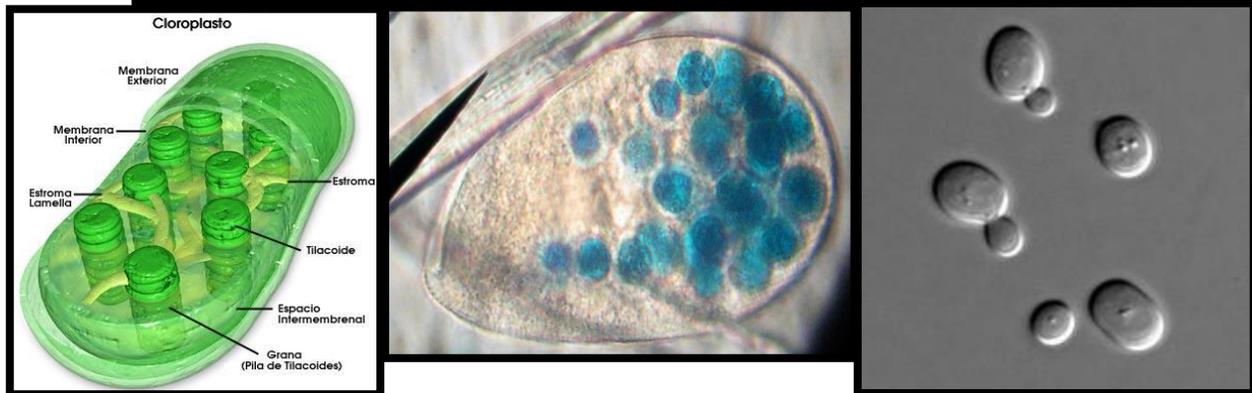




UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

U.M.S.N.H
FACULTAD
DE
BIOLOGÍA

FACULTAD DE BIOLOGÍA



Manual del Laboratorio de Biología Celular

Actualizado en 2023 por:
Q.F.B. Rita Sandra Mendoza Olivares
M. C. Sebastián Sánchez Suárez

Nombre del alumno _____ Sección _____

ÍNDICE

	Pág.
Práctica No. 1: Crenación, Hemólisis, Plasmólisis y Turgencia	1
Práctica No. 2: Permeabilidad selectiva del eritrocito.....	7
Práctica No. 3: Comunicación neuronal y Simulación de Modelos de potencial de membrana por computadora.....	12
Práctica No. 4: Aislamiento de cloroplastos.....	17
Práctica No. 5: Acción de lisosomas.....	22
Práctica No. 6: Fermentación alcohólica por levaduras.....	26
Bibliografía.....	32

INDICACIONES

DEL REPORTE

- Deberá entregarse una semana después de concluida la práctica.
- Desarrollar en el reporte el contenido siguiente:
 1. Portada
 2. Esquemas, dibujos, diagrama a bloques, videos y fotografías
 3. Resultados.
 4. Discusión.
 5. Conclusiones.
 6. Cuestionario.
 7. Bibliografía.
- Se calificará en escala de 0 a 10 cada reporte de prácticas de acuerdo a la calidad del mismo.
- En la bibliografía deberá referenciar por lo menos un libro de Biología Celular en formato APA.
- En caso de consultar páginas de internet, deberán ser de fuentes confiables y reconocidas, se referenciarán en formato APA y se anotará además la liga completa y la fecha de consulta.

DE LA EVALUACIÓN

- Asistencia 100% a las sesiones del laboratorio.
- La calificación integral del laboratorio tendrá una puntuación de 3.0 (30% de la calificación final), que será sumado a la calificación teórica final (correspondiente al 70% restante), siempre que ambas sean aprobatorias.
- El alumno que no apruebe, deberá presentar examen extraordinario y de ser necesario examen extraordinario de regularización de la materia.

MATERIAL PREPARADO POR EL ALUMNO

Las prácticas 2 y 5 requieren que se preparen material por el alumno con anticipación, en algunos casos el día anterior, pero en otros, el material debe colectarse y prepararse con días, y a veces semanas de anticipación.

Se recomienda, por lo tanto, leer cuidadosamente las instrucciones al inicio del curso, para poder planear su trabajo.

Práctica No. 2 Permeabilidad selectiva de la membrana del eritrocito.

Sangre desfibrinada

Si se dispone de sangre de carnero se prefiere trabajar con ella.

En caso contrario se trabajará con sangre venosa de un voluntario del grupo, la sangre se puede colectar con 24 horas de anticipación o bien, unas horas antes de iniciar la sesión de laboratorio.

Asegúrese de que la jeringa o el tubo colector contenga anticoagulante (EDTA al 10%).

Si la obtuvo el día anterior a la práctica, guárdela en el refrigerador (4°C) hasta la sesión del laboratorio.

Práctica No. 5: Acción de lisosomas y

Práctica No. 6: Fermentación alcohólica por levaduras

Cultivo de levaduras

Para cada práctica obtener 300 ml de cultivo.

Para preparar el cultivo pese 3 gr de levadura para pan, 3 gr de glucosa y disuélvalos en 300 ml de agua destilada. Coloque el cultivo en baño María a 30°C, 24 horas antes de utilizarlo.

Práctica No. 5: Acción de lisosomas.

Cultivo de ciliados

Tome muestras de agua (30 ml), de diferentes charcas y observe al microscopio cuál de ellas presenta *Paramecium* spp. Ahora para obtener un cultivo en el que abunden paramecios, se recomienda colocar un poco de paja no muy apretada en el fondo de un frasco, agregar el agua de charca que tiene los paramecios hasta cubrirla, taparlo con un vidrio y colocarlo en un lugar poco iluminado. Todo esto debe prepararlo con al menos dos semanas de anticipación y por lo menos con un frasco por equipo.

PRÁCTICA No. 1

“CRENACIÓN, HEMÓLISIS, PLASMÓLISIS Y TURGENCIA”

INTRODUCCIÓN

La membrana plasmática de las células vegetales y animales es muy permeable al agua, siendo pocas las sustancias que la atraviesan con igual facilidad, esto ocasiona que cuando exista entrada y salida de ella, la célula también se altere en su forma, ya que ésta, en parte está determinada por el estado de hidratación de los coloides celulares.

OBJETIVO

Observar los fenómenos de hipotonía, isotonía e hipertonía en células animales y vegetales.

MATERIAL

- Microscopio compuesto.
- 6 portaobjetos y 6 cubreobjetos.
- Piseta con agua destilada.
- Pipeta Pasteur.
- Solución de NaCl al 0.6%
- Solución de NaCl al 0.9%
- Solución de NaCl al 1.2%
- Solución de NaCl al 10%

METODOLOGÍA

De acuerdo al tipo de célula proceda según indicaciones.

CÉLULAS VEGETALES

1. Seleccione una hoja de Elodea en buen estado y colóquela sobre un portaobjetos limpio y seco, y con el envés de la hoja hacia arriba. Adicione gotas de agua de su medio, suficientes para cubrir la hoja totalmente y ponga con cuidado el cubreobjetos. Realice las observaciones correspondientes al microscopio.
2. Repita el paso 1, pero ahora agregando gotas de agua destilada.

3. Repita el paso 1 y adicione a la muestra en lugar de agua, gotas de las siguientes soluciones:
 - NaCl al 0.6%
 - NaCl al 0.9%
 - NaCl al 1.2%
 - NaCl al 10%

Notas:

- **No realice todas las preparaciones al mismo tiempo.** Para obtener resultados satisfactorios es muy importante que concluya con la observación de una muestra antes de preparar la siguiente.

CÉLULAS SANGUÍNEAS

1. Empleando una lanceta estéril obtenga una gota de sangre, colóquela en un portaobjetos limpio y seco, ponga el cubreobjetos y realice la observación correspondiente al microscopio.
2. Repita el paso 1 pero ahora agregando a su muestra de sangre 2 gotas de agua destilada.
3. Repita el paso 1, y adicione a la muestra 2 gotas de las siguientes soluciones:
 - NaCl al 0.6%
 - NaCl al 0.9%
 - NaCl al 1.2%
 - NaCl al 10%

Notas:

- Evite cualquier tipo de contaminación de su muestra, por ejemplo, con alcohol, agua, etc.
- Se recomienda usar en lugar de sangre humana, sangre de carnero con anticoagulante, mejorando el efecto visual de la osmolaridad en la célula.
- **No realice todas las preparaciones al mismo tiempo.** Para obtener resultados satisfactorios es muy importante que concluya con la observación de una muestra antes de preparar la siguiente.

RESULTADOS

1. Elaborar los esquemas correspondientes para cada una de las preparaciones.
2. Cada esquema debe incluir: título, aumento y además señalar las distintas estructuras celulares que se observen y describir si presentan alteraciones.
3. Anote en un cuadro los resultados de las soluciones hipotónicas, isotónicas e hipertónicas para los dos tipos de células.

ESQUEMAS DE CÉLULA VEGETAL

ESQUEMAS DE CÉLULA ANIMAL

CUESTIONARIO

1. Mencione las diferencias observadas entre el comportamiento de la célula vegetal y animal. Explique.

2. Describe lo que sucede en una célula cuando se coloca en un medio:
 - a) Hipotónico

 - b) isotónico

 - c) hipertónico

3. Explique en qué consisten los fenómenos de ósmosis y de difusión.

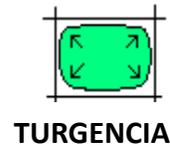
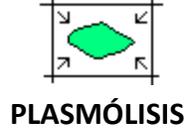
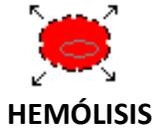
4. ¿Por qué los sueros fisiológicos que se aplican a pacientes intravenosamente deben ser isotónicos?

5. ¿Por qué se recomienda usar sangre de carnero en lugar de la sangre humana?

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

PRÁCTICA No. 1



CRENACIÓN

HEMÓLISIS

PLASMÓLISIS

TURGENCIA

I.- Células sanguíneas:



1 gota de sangre
Observar en 10 X y 40 X

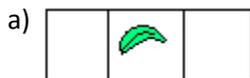


2 gotas de agua destilada y
1 gota de sangre
Observar en 10X y 40X

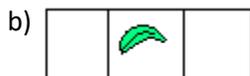


1 gota de sangre y
2 gotas de: 1.- solución NaCl al 0.6%
2.- solución NaCl al 0.9%
3.- solución NaCl al 1.2%
4.- solución NaCl al 10%
Observar en 10X y 40X

II.- Células vegetales:



1 hoja de elodea (envés hacia arriba) y
2 gotas de agua de su medio
Observar en 10 X y 40 X



1 gota de elodea y
2 gotas de agua destilada
Observar en 10 X y 40 X



1 hoja de elodea y
2 gotas de: 1.- solución de NaCl al 0.6%
2.- solución de NaCl al 0.9%
3.- solución de NaCl al 1.2%
4.- solución de NaCl al 10 %
Observar en 10X y 40X

PRÁCTICA No. 2

“PERMEABILIDAD SELECTIVA DE LA MEMBRANA DEL ERITROCITO”

INTRODUCCIÓN

Cuando un eritrocito es colocado en una solución isotónica, que contiene moléculas que pueden atravesar la membrana, la molécula penetrante entra en la célula ocasionando que ésta estalle. Este estallamiento de los eritrocitos es llamado hemólisis y puede ser detectado por medio de un espectrofotómetro, que mide el cambio en la absorción de la luz, debido al paso de la hemoglobina hacia el exterior.

OBJETIVO

Visualizar y determinar el porcentaje de hemólisis en eritrocitos causada por diferentes moléculas.

MATERIAL

- 4 vasos de precipitados de 100 ml.
- 6 vasos de precipitado de 250 ml.
- Una pipeta de 1 ml.
- 6 pipetas de 10 ml.
- Un agitador de vidrio.
- Una piseta con agua destilada.
- Espectrofotómetros.
- Celdas para espectrofotómetro.

REACTIVOS

- Solución de NaCl 0.17 M
- Solución de Glicerol 0.32 M
- Solución de Metanol 0.32 M
- Solución de Butanol 0.32 M
- Solución de Oxalato de amonio 0.12 M
- Solución de Fructuosa 0.25 M
- Solución de Ácido cítrico 0.26 M

MATERIAL BIOLÓGICO

Sangre desfibrinada (10 ml) por grupo de trabajo.

METODOLOGÍA

1. Preparar una solución "STOCK" de la siguiente manera:
Agregar con una pipeta 5 ml de sangre desfibrinada en un vaso de precipitados, adicione 45 ml de solución isotónica de NaCl 0.17 M. Se agita suavemente para homogenizar.
2. Preparar la solución al 100% de HEMOLISIS de la siguiente manera:
Agregar en un vaso de precipitados 0.5 ml de solución "STOCK" y agregar 3 ml de agua destilada; y luego adicione 26.5 ml de solución de NaCl 0.17 M. Se agita suavemente
3. Preparar la solución de 0% de HEMOLISIS de la siguiente manera:
Agregar en un vaso de precipitados 0.5 ml de solución "STOCK" y 29.5 ml de solución de NaCl 0.17 M. Se agita suavemente.
4. Para calibrar el espectrofotómetro primero ajuste a 0% de Transmitancia a una longitud de onda de 525 nm, y luego llene una celda con la solución de 100% de HEMOLISIS y calibre a 100% de Transmitancia a la misma longitud de onda. Una vez calibrado el espectrofotómetro, se obtiene la lectura de Transmitancia para la solución de 0% de HEMOLISIS.

Nota. Los datos obtenidos de las lecturas de estas soluciones servirán para realizar tablas de resultados y la curva estándar para Hemólisis de la sangre, graficando % de Transmitancia contra % de Hemólisis.

5. Posteriormente en un vaso de precipitados coloque 29.5 ml de una de las soluciones problema (Oxalato de amonio, Metanol, Fructosa, Butanol, Glicerol o Ácido cítrico), en seguida adicione 0.5 ml de solución "STOCK", agitando suavemente y llenando una celda con la mezcla.
6. Ponga la celda en el espectrofotómetro calibrando previamente y tome las lecturas cada 60 segundos hasta los 5 minutos o bien hasta obtener una lectura de 100% de Transmitancia.
7. Cuando haya terminado con la primera solución problema repita los pasos 5 y 6 utilizando las soluciones problema de las sustancias químicas restantes.

RESULTADOS

Utilizando su curva estándar para Hemólisis, obtenga los valores equivalentes de hemólisis de cada una de las lecturas de Transmitancia de las soluciones problema. Para cada solución problema realice una tabla de datos y dos gráficas:

- a) % de Transmitancia contra % de Hemólisis.
- b) % de Hemólisis contra Tiempo, presentando los valores en forma de barras.

De acuerdo a tus resultados presenta el ordenamiento de las diferentes moléculas según su velocidad de penetración al interior de los eritrocitos.

CUESTIONARIO

1.- Describa en detalle la estructura de la membrana plasmática según el modelo actual. Esquematícelo.

2.- Explique las características que debe presentar una molécula para que pueda atravesar fácilmente la membrana plasmática.

3.- Con qué finalidad se usa sangre desfibrinada en los experimentos.

4.- Si hubiéramos utilizado sangre de otro animal mamífero, ¿esperaríamos los mismos resultados? , explíquelo en función de la permeabilidad de la membrana.

ESQUEMAS

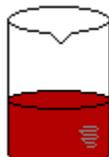
CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

PRÁCTICA No. 2

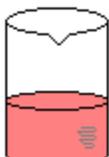
PERMEABILIDAD SELECTIVA DE LA MEMBRANA DEL ERITROCITO

Solución stock:



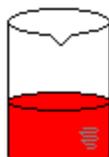
5 ml sangre desfibrinada y
45 ml de solución isotónica NaCl 0.17 M

Solución 100% Hemolisis:



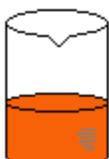
0.5 ml de solución stock y
3 ml de agua destilada y
26.5 ml de solución isotónica de NaCl 0.17 M

Solución 0% Hemolisis:



0.5 ml de solución de stock y
29.5 ml de solución isotónica NaCl 0.17 M

Solución problema:



0.5 ml de solución stock y
29.5 ml de solución de:

- 1.- Oxalato de amonio
- 2.- Fructosa
- 3.- Ácido cítrico
- 4.- Glicerol
- 5.- Metanol
- 6.- Butanol

Calibración del espectrofotómetro:

- 1.- Ajustar a 0% T a 525 nm (sin celda)
- 2.- Con solución al 100% hemolisis calibrar a 100% T
- 3.- Obtener %T de la solución 0% de hemolisis
- 4.- Medir %T de las soluciones problema

NOTA. Leer la muestra cada 60 segundos hasta completar los 5 minutos o hasta obtener una lectura de 100% de Transmitancia

PRÁCTICA No. 3

“COMUNICACIÓN NEURONAL Y SIMULACIÓN DE MODELOS DE POTENCIAL DE MEMBRANA POR COMPUTADORA”

INTRODUCCIÓN

En la célula, como pueden ser las neuronas, pueden identificarse corrientes iónicas, por ejemplo, de Na (en 1949, Cole y Marmont diseñaron la técnica de registro denominada fijación de voltaje). Esto permite el estudio de la transmisión de señales químicas en la sinapsis (1951, Fatt y Kats). Con la técnica de fijación de voltaje se ha construido un modelo matemático para explicar la electrofisiología de la membrana celular (1952, Odgkin y Huxley). Más recientemente se logró establecer el registro eléctrico de microáreas de membrana con fijación de voltaje-patchclamp (1976, Hamillet), lo cual implica disociación enzimática del tejido o cultivo del mismo.

Antiguamente se hacía la captura de datos tomando fotografías a la pantalla de un osciloscopio de rayos catódicos. La computadora hace la captura directamente y además el análisis de los datos.

Lo que aparece en el monitor de la computadora corresponde al registro que observa el investigador al efectuar un determinado experimento.

OBJETIVOS

- 1.- Simular un proceso experimental utilizando un modelo matemático computarizado para comprender el funcionamiento de la membrana celular.
- 2.- Correlacionar diferentes concentraciones iónicas extracelulares e intracelulares con la corriente eléctrica registradas a través de la membrana celular.

MATERIAL

- Computadora PC
- Programa IONIC instalado en la PC
- Lápices de colores

METODOLOGÍA

Encienda la computadora. Abra el programa IONIC (es uno de los programas para simulación de potencial de membrana). En pantalla aparecerá: Simulación de un potencial de acción. Cambios en las concentraciones iónicas. Usted podrá elegir.

- I) El potencial de membrana inicial.
- II) Los parámetros del estímulo que se desee.
- III) La concentración extracelular de potasio (si escribe 1 quiere decir la concentración normal, si escribe 2 quiere decir el doble, si escribe 0.5 corresponde a la mitad de lo normal).
- IV) La concentración extracelular de sodio.
- V) La longitud del eje X (abscisas).

La computadora calculará y graficará en la pantalla:

- a) El potencial de membrana.
- b) Las conductancias iónicas.
- c) El estímulo.

Tarea 1

Oprima la tecla ENTER, con la cual se acepta el potencial de membrana de -60 mV que se sugiere.

- Intensidad del estímulo: escriba 63 microamperios y oprima la barra espaciadora para borrar el cero que quedó del valor anterior. Oprima ENTER.
- Duración: 0.1 (ENTER). Que el estímulo empiece a los 0.5 ms (ENTER).
- Concentración de K = 1 (ENTER). Concentración de Na = 1 (ENTER). Escala del eje de tiempo: 10 (ENTER).

El programa pregunta (ver extremo inferior derecho de la pantalla) ¿Están correctos los datos? Si estamos de acuerdo, oprima ENTER. Y oprima la letra Y (yes). ¿Qué observa?

¿Otra corrida? Si (ENTER). ¿Sobrepuesta? Si (ENTER). Potencial de membrana -60 mV (ENTER). Estímulo de 64 microamperios (aumentamos un microamperio con respecto del valor de la corrida anterior) escribamos 64 (ENTER). Duración del estímulo = 0.1 (ENTER). Inicio del estímulo = 0.5 (ENTER). K = 1 (ENTER). Na = 1 (ENTER). Eje del tiempo = 10 (ENTER). ¿Están correctos estos datos? (ENTER). ¿Qué observa? Fíjese en las unidades de los ejes. ¿Ve el artefacto del estímulo?

Tarea 2

Ahora vamos a cambiar un poco la concentración de Potasio extracelular y no vamos a dar ningún estímulo eléctrico. El programa nos pregunta en el extremo inferior derecho de la pantalla si queremos otra corrida o no. Le indicamos que sí, (ENTER). ¿Sobrepuesta a la anterior? No, porque ahora queremos hacer otra maniobra experimental. Escribamos N (ENTER). El potencial de membrana igual (-60 mV) (ENTER). Estímulo 0 (ENTER) 0 (ENTER) 0 (ENTER). No vamos a estimular eléctricamente. K = 1.1 (ENTER). Na normal (1) (ENTER). Tiempo igual de 10 (ENTER) tres veces. K = 1.2 (ENTER). Hemos aumentado 0.1 la concentración extracelular de potasio con respecto a la corrida anterior (en la que habíamos puesto 1.1). Na = 1 (normal) (ENTER). Eje del tiempo = 10 (ENTER). Y ¿Están correctos estos datos? (ENTER). ¿Qué pasó aun cuando no se aplicó ningún estímulo eléctrico? El aumento de potasio es un estímulo químico.

Tarea 3

Por último, vamos a ir aumentando las concentraciones de sodio extracelular, pero aplicando también estímulos eléctricos. ¿Otra corrida? Si (ENTER). ¿Sobrepuesta? No (N) (ENTER). Potencial de membrana igual (-60 mV) (ENTER). Estímulo: amperaje 64 (ENTER). Duración 0.1 (ENTER). Inicio 0.5 (ENTER). K = 1, Na = 1.

Tiempo igual (10) (ENTER). ¿Están correctos estos datos? (ENTER).
Observe detenidamente.

¿Otra corrida? Si (ENTER). ¿Sobrepuesta? Si (ENTER). Potencial de membrana igual (-60 mV) (ENTER). El mismo tiempo de estímulo que en el paso anterior: oprimir (ENTER) tres veces. Potasio normal (1). Sodio 1.1 (ENTER). Tiempo igual (10) (ENTER). ¿Están correctos estos datos? (ENTER). Observe nuevamente con detenimiento.

Ahora, con imágenes sobrepuestas, vaya incrementando la concentración extracelular de Na: 1.2, 1.3, 1.4, etc., con todos los demás parámetros constantes. ¿Qué pasará si no damos ningún estímulo eléctrico y vamos aumentando la concentración de Na?

CUESTIONARIO

1.- ¿A qué se le llama potencial de membrana en reposo?

2.- ¿En qué consiste la despolarización?

3.- Mencione las principales ventajas del uso de los modelos matemáticos computacionales en la investigación.

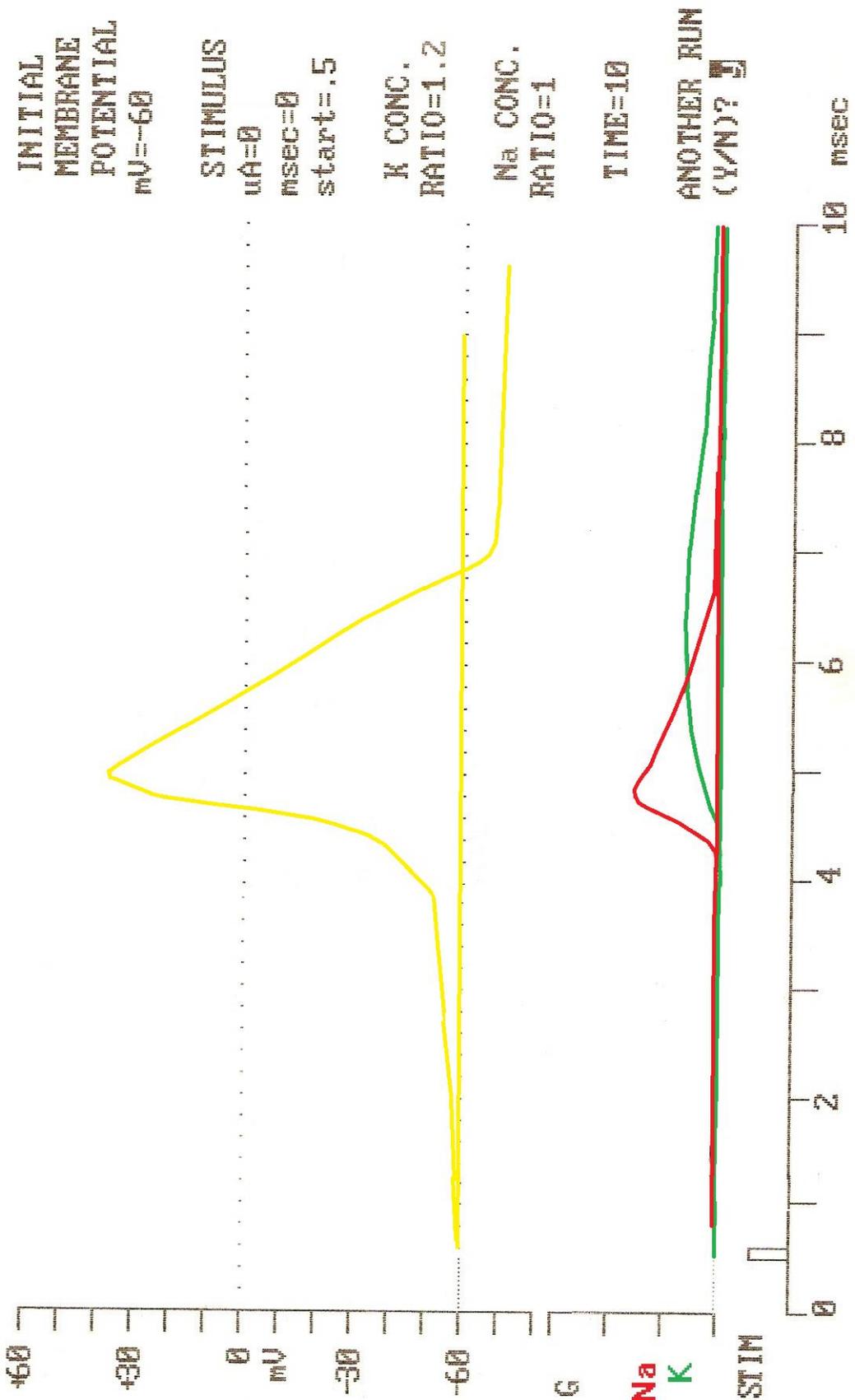
4.- Explique el funcionamiento de una neurona.

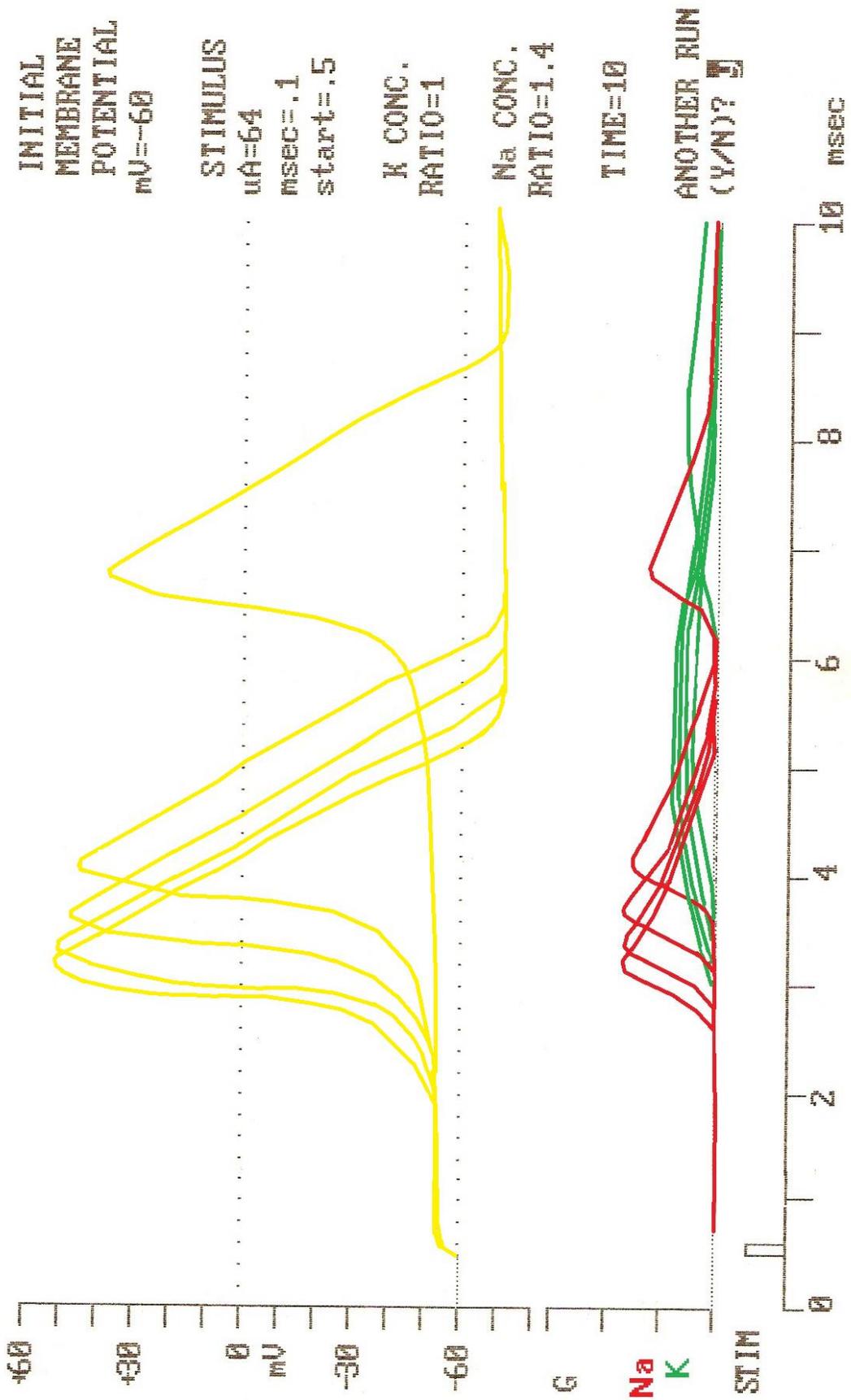
RESULTADOS

De cada uno de los casos revisados explica con su grafica

- El título del tipo de estímulo que es
- El mecanismo completo que la origina







CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

PRÁCTICA No. 4

“AISLAMIENTO DE CLOROPLASTOS INTACTOS”

INTRODUCCIÓN

La célula es la unidad básica de la vida que contiene una amplia variedad de distintos tipos de orgánulos. Si se requiere estudiar la función particular de los cloroplastos u otro orgánulo resulta de gran valor poder aislar en estado puro el orgánulo que interesa. La separación de un orgánulo, por lo general se hace mediante la técnica de centrifugación diferencial, la cual depende del principio de que las partículas de tamaño diverso se desplazan hacia el fondo del tubo de centrifuga a diferentes velocidades cuando se les coloca en un campo centrífugo.

Una suspensión de material de células rotas se somete al principio de la fuerza centrífuga muy baja durante un corto período de tiempo, de modo que solo los núcleos y las células íntegras se sedimentan formando un precipitado. Con fuerzas centrífugas cada vez mayores se pueden separar los cloroplastos y las mitocondrias en suspensión, luego los microsomas y para finalizar los ribosomas. Este último paso requiere de una ultracentrífuga, la cual genera velocidades que producen hasta 100 000 veces la fuerza de la velocidad.

Los cloroplastos cuando son aislados cuidadosamente son capaces de reducir el colorante 2,6-Diclorofenol-Indo fenol (DCPIP), el cual debe ser medido espectrofotométricamente comparado con una muestra control. La reducción se debe a que capta los electrones en lugar del NADPox en la parte no cíclica de la fotosíntesis.

OBJETIVO

Ensayar un método de aislamiento de cloroplastos y observar su funcionamiento en condiciones óptimas y con “SHOCK” osmótico.

MATERIAL

- Lámpara con foco.
- Mortero y pistilo.
- Pipeta de 10 ml.
- Pipeta de 1 ml.
- Vaso de precipitados de 100 ml.
- Tijeras.
- 6 tubos de ensaye 15 mm X 150 mm.
- Gradilla.
- Embudo.
- Sobre de gasas.

- Papel milimétrico.
- Charola metálica.
- Pipeta Pasteur con goma.
- Piseta con agua destilada.
- 4 espectrofotómetros.
- 6 celdas para espectrofotómetro.
- Una centrífuga clínica.
- 6 tubos para centrífuga.

REACTIVOS

- Solución de NaCl 0.35 M en Buffer de fosfatos 0.02 M, pH8.
- Solución de DCPIP 0.3 mM.

MATERIAL BIOLÓGICO

- Hojas de espinacas o de acelgas (3 o 4 por equipo)
- Bolsa de hielo

PROCEDIMIENTO

1. Congelar con anticipación el mortero con hielo, agregue 20 ml de buffer salino frío y las partes verdes de sus hojas de espinacas. Tritúrelas durante 5 minutos como máximo y en seguida filtre el homogenizado a través de gasa doble previamente humedecida con 10 ml de buffer salino.
2. El filtrado se distribuye de manera equitativa en dos tubos de ensaye y se centrifuga a 1000 rpm. Durante tres minutos (recuerde que los tubos deben tener la misma cantidad de líquido al centrifugar por lo que hay que agregarle solución buffer si es necesario para igualarlos), se obtienen dos fases:
El sobrenadante: que contiene los cloroplastos en suspensión.
El precipitado: que tiene células intactas y núcleos.
3. El sobrenadante obtenido se coloca en tubos de ensaye fríos. Se desecha el precipitado. Se coloca de nuevo el sobrenadante en tubos de centrífuga y se centrifuga a 3000 rpm durante 5 minutos.
4. Al final de este tiempo se descarta el sobrenadante y el precipitado se suspende en buffer salino frío utilizando en total 2 ml por cada tubo. De esta manera se tiene preparada la suspensión de **cloroplastos intactos**.
5. Preparar la suspensión de **cloroplastos con "SHOCK"** osmótico de la siguiente forma: Se coloca en un tubo 1 ml de la suspensión de cloroplastos intactos y 4 ml de agua destilada.

6. Envuelva 4 tubos de ensaye con papel aluminio, y después se preparan los tubos de la siguiente manera:

Tubo 1

- 0.5 ml de DCPIP.
- 9.3 ml de buffer salino.
- 0.2 ml de la suspensión de los cloroplastos con "SHOCK" osmótico.

Tubo 2

- 0.5 ml de DCPIP.
- 9.3 ml de buffer salino.
- 0.2 ml de la suspensión de cloroplastos intactos.

Tubo 3 (ESTE TUBO NO EXPONE A LA LUZ)

- 0.5 ml de DCPIP.
- 9.3 ml de buffer salino.
- 0.2 ml de la suspensión de cloroplastos intactos.

Tubo 4 (TUBO BLANCO)

- 0.5 ml de DCPIP.
- 9.5 ml de buffer salino.

7. Antes de proceder a tomar las lecturas correspondientes debe agitar perfectamente bien todos los tubos.
8. Para calibrar el espectrofotómetro primero ajuste a 0% de absorbancia a una longitud de onda de 450 nm, luego llene una celda con el contenido del tubo No. 4 (TUBO BLANCO) y calibre a 0% de absorbancia a la misma longitud de onda. Una vez calibrado el espectrofotómetro obtenga las lecturas de absorbancia a 450 nm de los tubos 1, 2 y 3 al tiempo de 0 minutos de exposición a la luz. Enseguida exponga los tubos 1, 2 y 4 a la luz, colocándolos a una distancia aproximada de 15 cm del foco durante un minuto. Al término de este tiempo tápelos nuevamente con papel aluminio y proceda a realizar las lecturas de absorbancia a 450 nm de los tubos 1, 2 y 3 en el espectrofotómetro ya calibrado como se dijo antes.
9. Repita el paso 8, cuatro veces más, es decir, los tubos son expuestos a la luz por un tiempo total de 5 minutos, en intervalos de un minuto de exposición.

RESULTADOS

- 1.- Presente una tabla con los datos experimentales obtenidos.
- 2.- Realice una gráfica de absorbancia (450 nm) contra tiempo de exposición a la luz, comparando los 3 tubos.

CUESTIONARIO

1. Explique porque durante el aislamiento de cloroplastos se trabaja a bajas temperaturas y además porque se utiliza una solución buffer salina.

2. Explique a detalle los resultados de lecturas obtenidos para cada tubo.

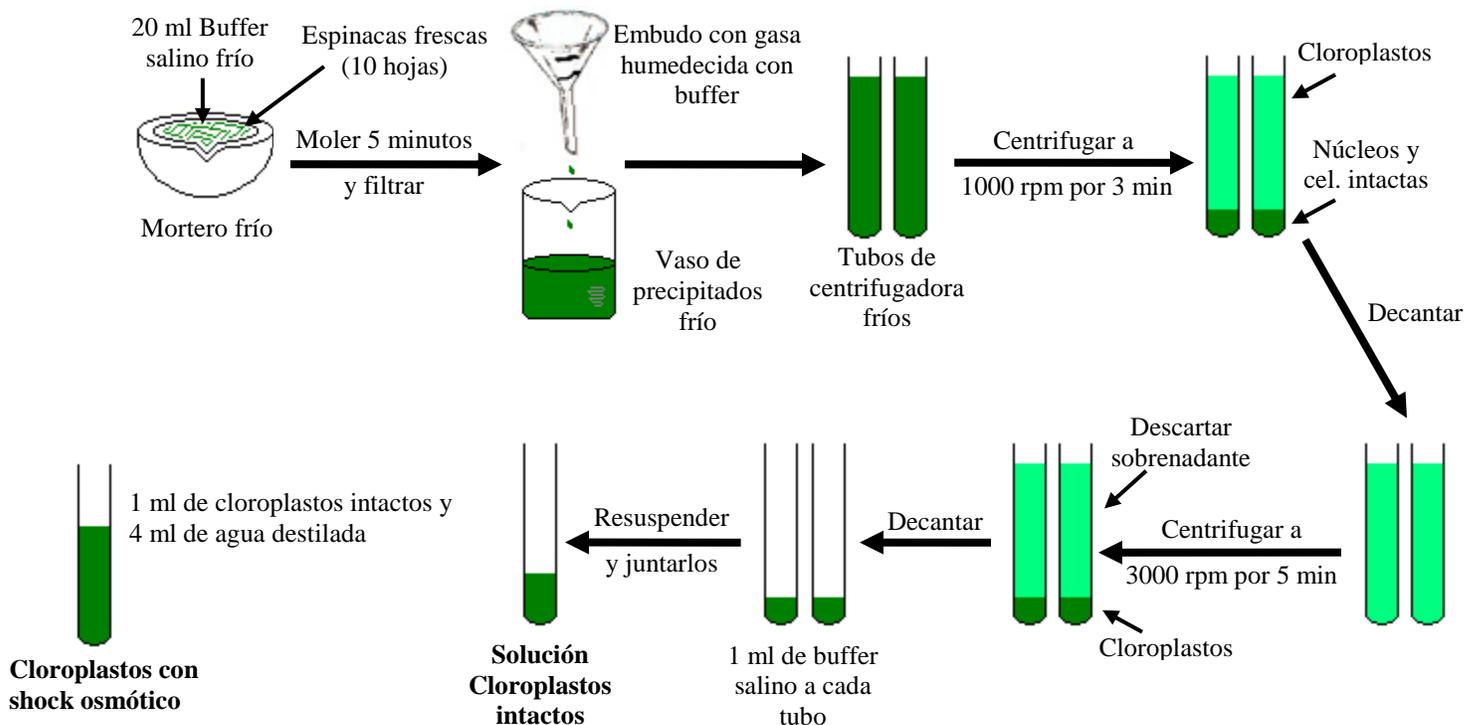
Tubo #	

3. Describir brevemente otra técnica para determinar fotosíntesis.

4. Nombre la materia prima y los productos para cada fase de la fotosíntesis.

PRÁCTICA No. 4

AISLAMIENTO DE CLOROPLASTOS INTACTOS



Los 4 tubos de ensayo van envueltos en papel aluminio

1.- 9.3 ml Buffer salino
0.5 ml DCPIP
0.2 ml Solución cloroplastos en shock

3.- 9.3 ml Buffer salino
0.5 ml DCPIP
0.2 ml Solución cloroplastos intactos

NO EXPONER A LA LUZ

2.- 9.3 ml Buffer salino
0.5 ml DCPIP
0.2 ml Solución cloroplastos intactos

4.- 9.5 ml Buffer salino
0.5 ml DCPIP

Calibración del espectrofotómetro:

- 1.- Con el tubo 4 calibrar a 0 % Absorbancia a una longitud de onda 450 nm.
- 2.- Leer tubos 1, 2 y 3 antes de exponer a la luz.
- 3.- Exponer tubos 1, 2 y 4 a la luz a 15 cm del foco por un 1 min. Taparlos y leer la Absorbancia de los tubos 1, 2 y 3.
- 4.- Calibrar el aparato con el tubo 4 cada vez.
- 5.- Repetir cuatro veces para un total de 5 min de exposición.

Graficar: Absorbancia (450nm) contra tiempo de exposición a la luz

ESQUEMAS

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

PRÁCTICA NO. 5

“ACCIÓN DE LISOSOMAS”

INTRODUCCIÓN

Las sustancias que penetran en la célula por fagocitosis o pinocitosis van a experimentar la acción de las enzimas digestivas intracelulares, contenidas en orgánulos llamados lisosomas. Estos orgánulos son corpúsculos esféricos que miden aproximadamente 0.5 micrómetros, están delimitados por una unidad de membrana y contienen enzimas hidrolíticas. Se han encontrado lisosomas en todas las células animales y vegetales.

Los lisosomas promueven la digestión intracelular, tanto del material exógeno que penetra en la célula por pinocitosis, como también el material endógeno. Este último puede estar constituido por orgánulos degenerados o por productos de desasimilación del metabolismo celular.

OBJETIVO

Que el estudiante observe la función de los lisosomas de manera análoga en ciliados.

MATERIAL

- Microscopio compuesto.
- Porta y cubreobjetos.
- Pipeta de 1 ml.
- Mechero de Bunsen.
- 6 tubos de ensaye 15 x 150 mm.
- Gradilla.
- Pinzas.
- Tela de asbesto.
- Tripie.
- Recipiente para baño María.
- Pipeta Pasteur con goma.
- Termómetro.
- Hoja de papel aluminio.

REACTIVOS

- Solución de Rojo Congo al 0.4%

MATERIAL BIOLÓGICO

- Cultivo de levaduras de pan (30 ml).
- Cultivo de ciliados (*Paramecium* spp.) por cada equipo.

PROCEDIMIENTO

1. En tres tubos de ensaye, coloca en cada uno de ellos un mililitro del cultivo de levaduras. Un tubo se pone en el refrigerador durante 10 minutos. Otro se coloca en el baño María a 30°C, y el último se tapa con papel aluminio y se pone en un baño María hirviendo durante 10 minutos.
2. Al término de la exposición de cada temperatura, se coloca de inmediato en cada tubo 0.5 ml de rojo de Congo al 0.4%. Agita cada tubo y deja en reposo durante 5 minutos. Realiza las observaciones al microscopio de cada uno de los tubos, poniendo atención al grado de tinción que se presenta.
3. Con base en sus observaciones selecciona el cultivo de levaduras más teñidas con el colorante para cumplir mejor el objetivo de tu práctica. Coloca sobre un portaobjetos unas gotas del cultivo de levaduras con gotas del cultivo de ciliados, espera 5 minutos. Observa al microscopio y realiza un esquema inicial. Siga observando cuidadosamente hasta visualizar de manera análoga la función de los lisosomas en ciliados (cambio de color de la levadura en su interior).

RESULTADOS

Presentar los siguientes **ESQUEMAS**

- a) Cultivo de levaduras a 0-4°C
- b) Cultivo de levaduras a 30°C
- c) Cultivo de levaduras a 100°C

--	--	--

- d) Esquema inicial del cultivo de ciliados con levaduras.
- e) Esquema final del cultivo de ciliados con levaduras.

--	--

CUESTIONARIO

1.- Tomando en cuenta tus observaciones experimentales, ¿Qué ocurre con las células de levadura dentro de los ciliados y por qué?

2.- Discuta lo que ocurre al calentar las levaduras y al agregar el colorante.

3.- Realice en esquemas, el origen y las funciones de los diversos tipos de lisosomas.

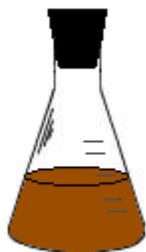
CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

PRÁCTICA No. 5

ACCIÓN DE LISOSOMAS

CULTIVO DE LEVADURA

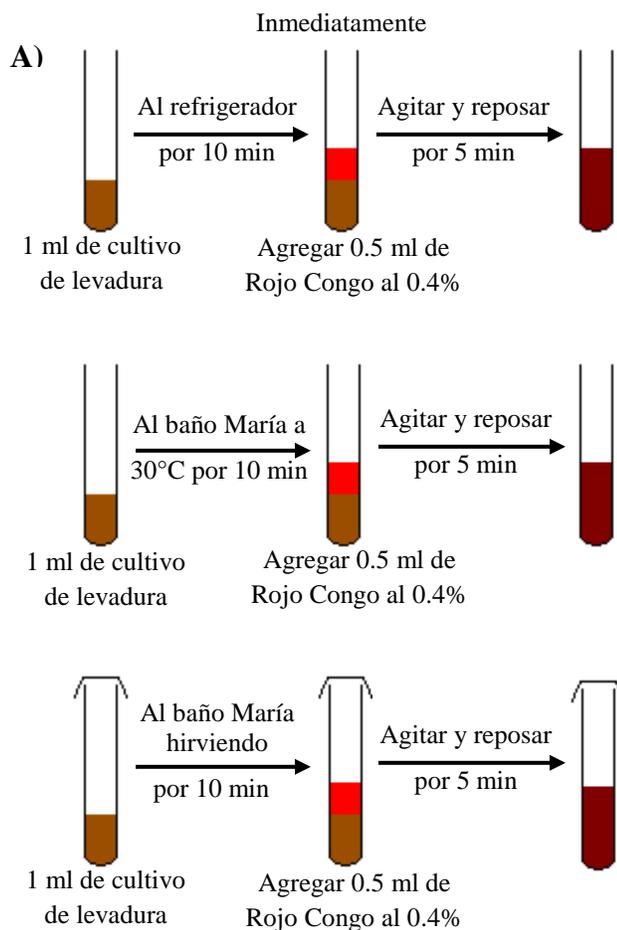


30 ml de agua destilada
 0.3 gr de levadura de pan
 0.3 gr de glucosa o sacarosa
Incubar a 30°C por 24 hrs

CULTIVO DE

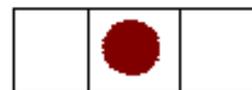


Paja
 Agua de charca con paramecios
Guardarlo por dos semanas en un lugar poco iluminado



B)

2 gotas del cultivo de levaduras más teñido
 2 gotas de cultivo de ciliados



Observar al microscopio.

Dibujar esquema inicial.

Siga observando hasta ver la función de los lisosomas en ciliados (cambio de color).

Observar al microscopio y comparar el grado de tinción.

PRÁCTICA No. 6

“FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA POR LEVADURAS”

INTRODUCCIÓN

Fermentación es el proceso metabólico mediante el cual la energía procede de compuestos orgánicos que actúan como donadores y aceptores de electrones. Muchos de los productos de la fermentación son sustancias de importancia industrial y económica.

Las principales fermentaciones son: láctica, alcohólica, butanodiólica y propiónica. Los organismos empleados en la industria de la fermentación, incluyen: levaduras, bacterias y mohos.

En la fermentación alcohólica se pueden utilizar diversas materias primas a base de carbohidratos como: melazas, granos, desechos de madera, frutos, entre otros. De los cuales se obtiene el piruvato, el cual se convierte por descarboxilación en CO₂ y acetaldehído, siendo éste reducido a etanol en una reacción ligada al NADH. Esta fermentación es característica de levaduras.

OBJETIVO

Demostrar y comprender el proceso de la fermentación alcohólica realizada por levaduras a partir de carbohidratos.

MATERIAL

- Agitador.
- Autoclave.
- Recipiente para baño María.
- Tubos de ensaye.
- Cinta masking tape.
- Estufa para incubación.
- Termómetros.
- Gradillas.

REACTIVOS

- Agua destilada.

MATERIAL BIOLÓGICO

- Cultivo de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*).
- Pasas secas (de uva).
- Jugo de uva enlatado.
- Uvas frescas.

PROCEDIMIENTO

1. Preparar cultivo de levaduras, con 24 hrs de anticipación, de la siguiente manera:

Para obtener 30 ml de cultivo, pese 0.3 gr de levadura, 0.3 gr de glucosa y disuélvalos en 30 ml de agua destilada. Coloque el cultivo en baño María a 30°C.

2. En nueve tubos de ensaye agregue lo siguiente (excepto lo que tiene asterisco) (*):

Tubo 1:

- 3 ml de agua destilada.
- 3 pasas.

Tubo 2:

- 3 ml de agua destilada.
- 3 pasas
- *3 ml de levadura.

Tubo 3:

- 3 ml de agua destilada.
- 3 pasas
- *3 ml de levadura.
- *3 ml de jugo de uva.

Tubo 4:

- 3ml de agua destilada.
- 3 pasas.
- 3 ml de jugo de uva.

Tubo 5:

- 3 ml de agua destilada.
- 3 uvas.
- *3 ml de levadura.

Tubo 6:

- 3 ml de agua destilada.
- 3 uvas.
- *3 ml de jugo de uva.

Tubo 7:

- 3 ml de agua destilada.
- 3 pasas.
- 3 uvas.
- *3 ml de levadura.

Tubo 8:

- 3 ml de agua destilada.
- 3 pasas.
- *3 uvas.

Tubo 9:

- 3 ml de agua destilada.
- 3 uvas.
- 3 ml de levadura.
- *3 pasas

3. En seguida ponga a todos los tubos un tapón de algodón bien ajustado y después ponerlos en el autoclave u olla de presión para su esterilización y Dejar enfriar.
4. Después debe agregar lo indicado con asterisco de manera aséptica.
5. Dejarlo a temperatura ambiente por un lapso de tres días y cumplido este tiempo registrar lo ocurrido con cada tubo.

RESULTADOS

Después de transcurridos tres días para la fermentación alcohólica correspondiente, Elabora una tabla y proporciona una explicación en detalle de lo que sucedió en cada tubo.

Cuestionario

1.- Explica y esquematiza las reacciones químicas que se llevan a cabo en el proceso de la fermentación alcohólica, así como la ubicación de las enzimas que intervienen en cada reacción.

2.- ¿Qué es una exo y una endoenzima? Y ¿Cuál de ellas interviene en el proceso de fermentación y por qué?

3.- ¿Cuál es la importancia de la fermentación desde el punto de vista industrial?

ESQUEMAS

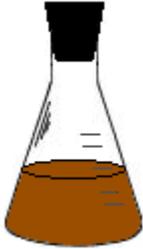
CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

PRÁCTICA No. 6

FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA POR LEVADURAS

CULTIVO DE LEVADURA

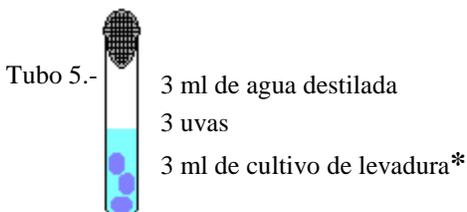
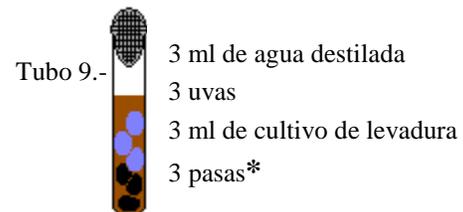
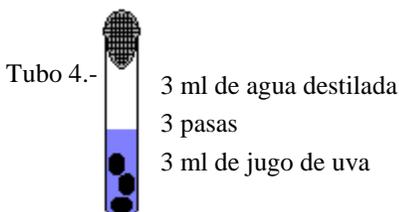
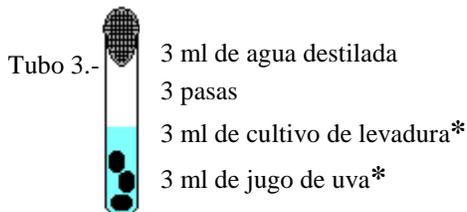
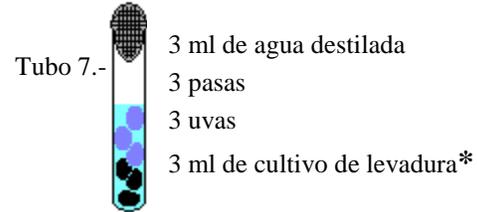
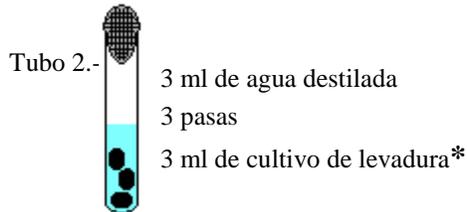


30 ml de agua destilada

0.3 gr de levadura de pan

0.3 gr de glucosa o sacarosa

Incubar a 30°C por 24 hrs



Esterilizar los 9 tubos con los elementos, excepto los marcados con *, estos se agregarán después en condiciones de esterilidad.

Incubar los tubos por 3 días a temperatura ambiente y reportar.

BIBLIOGRAFÍA

Avers, C.J. (1991) *Biología Celular*. México: Iberoamericana.

Callen, J.-C. & Aguilar O., M. T. (2000) *Biología Celular: de las moléculas a los organismos*. México, D.F.: Continental.

Darnell, J., Lodish, H. & Baltimore, D. (2003) *Biología Celular y Molecular*. Cuarta edición. Barcelona: Editorial Médica Panamericana.

Giese, A.C. (1992) *Fisiología Celular y General*. México: Nueva Editorial Interamericana.

Karp, G. (1998) *Biología Celular y molecular: Conceptos Y Experimentos*. México: McGraw-Hill Interamericana.

Paniagua, R. (2003) *Biología Celular*. Segunda edición. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.