



Universidad  
Continental

# **BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

---

## **Guías de Laboratorio**

---



### **Visión**

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

### **Misión**

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

**Universidad Continental**

Material publicado con fines de estudio

ASUC01045



## Índice

VISIÓN Y MISIÓN

ÍNDICE

### Primera unidad

1. SEMANA 1: Bioseguridad y reconocimiento de Material de Laboratorio 4
2. SEMANA 2: Microscopía y células bacterianas 21
3. SEMANA 3: Estructuras de Locomoción Celular: Pseudópodos, Cilios y Flagelos 29
4. SEMANA 4: Observación del Núcleo Celular en Elementos Formes de la Sangre 34

### Segunda unidad

1. SEMANA 5: Permeabilidad Selectiva de la Membrana Celular 38
2. SEMANA 6: Taller Movimiento a través de las membranas 42
3. SEMANA 7: Estudio de Orgánulos Celulares: Mitocondrias y Cloroplastos 46
4. SEMANA 8: EVALUACION PARCIAL

### Tercera unidad

1. SEMANA 9: Extracción y análisis del ADN 51
2. SEMANA 10: Taller Evaluación del estado del ADN 57
3. SEMANA 11: Taller Problemas aplicativos en relación con el ADN 60
4. SEMANA 12: Taller Estudio de casos 62

### Cuarta unidad

1. SEMANA 13: Taller Introducción a la Transformación bacteriana 63
2. SEMANA 14: Transformación bacteriana 70
3. SEMANA 15: Análisis de resultados de la transformación bacteriana 73
4. SEMANA 16: EVALUACION FINAL 76



## SEMANA 1: Guía de práctica N° 1

### BIOSEGURIDAD Y RECONOCIMIENTO DE MATERIAL DE LABORATORIO

Sección : .....Docente: .....

Fecha : ...../...../.....

Duración: 4 horas

**Instrucciones:** Dar lectura de manera grupal la presente guía y discutir sobre el tema. Tome debida nota y establecer conclusiones.

#### I. BIOSEGURIDAD

##### 1. Objetivos

- Reconocer las terminologías usadas frecuentemente en las guías de Bioseguridad de los laboratorios.
- Establecer el tipo de laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad en relación al nivel de riesgo.
- Considerar las medidas de Bioseguridad en laboratorios de Biotecnología en donde se manipula ADN.
- Identificar las principales señales de Bioseguridad.

##### 2. Fundamento Teórico

La preocupación por eliminar los riesgos y proteger al personal docente, administrativo y estudiantes, ha llevado que las condiciones de trabajo recaen sobre todos y cada uno de los usuarios de los laboratorios. La bioseguridad es una doctrina de comportamiento encaminada a lograr actitudes y conductas que disminuyen el riesgo del personal en cuando a su salud, de adquirir infecciones o contaminación en el laboratorio. El conocimiento y la aplicación adecuada de estas normas como la utilización de mandil o guardapolvo, guantes, mascarillas, entre otros; así como la importancia de estas normas antes, durante y después de cada práctica es un deber de cada estudiante en el ambiente de laboratorio en donde se está desarrollando. Estas normas son la base de un buen control de calidad del producto o experimento que se esté llevando a cabo. Conocer las diferentes soluciones como el hipoclorito de sodio, fenol al 5% o solución sulfocrómica, que se utilizan para mantener limpio y desinfectado nuestra mesa de trabajo y materiales, así como su preparación en las condiciones que se necesitan, deben realizarse en forma rutinaria por cada estudiante.

#### I. TERMINOLOGÍAS BÁSICAS EN BIOSEGURIDAD

##### 1. Acto inseguro

Es todo incumplimiento de normas y/o procedimientos establecidos que realizan los trabajadores y estudiantes y que trae como consecuencia mayor probabilidad de lesiones en las personas y contaminación al medio ambiente.

##### 2. Agente infeccioso

Priones, viroides, virus, bacterias, hongos, rickettsias, protozoarios o helmintos capaces de producir infección.



**3. Agente de riesgo**

Elementos biológicos, físicos, químicos y mecánicos capaces de causar daños o enfermedad en el personal que tiene contacto con ellos.

**4. Antisépticos**

Son agentes que inhiben el crecimiento y desarrollo de los organismos pero no necesariamente los mata el mismo que puede ser usado sobre la piel y los tejidos vivos a diferencia de los desinfectantes que se utilizan sobre objetos inanimados. Aunque algunos antisépticos específicos pueden ser utilizados para ambos fines (alcohol 70-90%), su efectividad no es necesariamente la misma en cada caso: Un buen antiséptico puede no ser eficaz como desinfectante y viceversa.

**5. Antiseptia**

Es el mecanismo o proceso de aplicación del antiséptico y que difiere de la desinfección y esterilización, puesto que no destruye a todos los gérmenes patógenos ubicados sobre la superficie de los seres animados.

**6. Inoculación**

Mecanismo por el cual una persona se infecta con un germen que está situado en alguna parte de su cuerpo como consecuencia de una incorrecta manipulación.

**7. Bioseguridad**

Se refiere al conjunto de actitudes y procedimientos orientados a impartir la contaminación por agentes biológicos, físicos o químicos, tomando en cuenta las medidas preventivas destinadas a proteger la salud y la seguridad del personal que trabaja en el laboratorio.

**8. Carcinógeno**

Sustancia o agentes capaces de causar cáncer por ejemplo el bromuro de etidio para la visualización de la ampliación de ADN o el uso excesivo de xilol.

**9. Comburente**

Material que ayuda a la combustión, también se puede llamar oxidante.

**10. Condición insegura**

Es toda situación física que crea un riesgo y que en determinadas circunstancias puede ocasionar lesiones a los trabajadores, daño a la propiedad o al medio ambiente.

**11. Contaminación**

Es la presencia de un agente infeccioso en la superficie del cuerpo, vestidos, instrumentos, vendajes quirúrgicos u otros artículos inanimados o sustancias incluyendo el agua y los alimentos.

**12. Contención**

Describe métodos seguros para el manejo de muestras de agentes infecciosos en el laboratorio. En él intervienen las técnicas de procesamiento de dichas muestras con equipos de seguridad diseñados para la protección del personal y el diseño de la infraestructura.

**a. Contención primaria**

Es la protección del personal y del ambiente inmediato contra la exposición a agentes infecciosos.

Es provista por una buena técnica microbiológica y el uso apropiado del equipo de seguridad la aplicación de vacunas aumenta el nivel de protección personal.



**b. Contención secundaria**

Es la protección del ambiente externo contra la exposición de material infeccioso. Se logra por una combinación de las características de la edificación y prácticas operacionales.

**13. Descontaminación**

Es la disminución de la carga microbiana de objetos contaminados.

**14. Desechos contaminados**

Son desperdicios potencialmente infecciosos contaminados con sangre, pus, orina, heces y otros fluidos corporales.

**15. Desechos no contaminados**

Son desperdicios que no presentan riesgo de infecciones para las personas que los manipulen.

**16. Desinfección**

Es un proceso físico o químico que compromete medidas intermedias entre limpieza y esterilización. Logra matar a los microorganismos, pero no esporas.

Se efectúa mediante el uso de agentes químicos en estado líquido o la pasteurización a 75°C.

**17. Desinfectante**

Sustancia o mezcla de sustancias químicas utilizadas para matar microorganismos, pero no necesariamente esporas. Los desinfectantes suelen aplicarse a superficies u objetos inanimados.

**18. Enfermedad infecciosa**

Se define como la proliferación de microorganismos dentro de los tejidos produciendo daño y dando lugar a una variedad de manifestaciones clínicas.

**19. Enfermedad transmisible**

Aquella causada por un agente infeccioso capaz de transmitirse de una persona o animal infectado o de un reservorio a un hospedador susceptible.

**20. Esterilización**

Es un proceso que tiene por objeto la destrucción de toda la forma de vida, incluyendo esporas de microorganismos. Se realiza preferentemente por medio del vapor saturado a presión (autoclave), por calor seco (horno), incineración (mechero de gas), y, en algunos casos, mediante el uso de agentes químicos determinados en forma de líquido o de gas. En los laboratorios de biología molecular se aplica la radiación por luz ultravioleta.

**21. Individuo infectado**

Persona que alberga un agente infeccioso y que puede o no presentar manifestaciones clínicas de la enfermedad.

**22. Grupo de riesgo**

Conjunto de microorganismos (virus, bacterias, hongos o protozoarios) capaces de causar algún tipo de alteración en otros seres vivos: según sea nulo, escaso o elevado potencial patogénico. De acuerdo al microorganismo que cultiva y manipula en los laboratorios, así como los mecanismos de transmisión y virulencia, pueden ser:

**a. Grupo de riesgo N° 1**

Un microorganismo que es improbable de causar enfermedad humana o animal de importancia veterinaria, por lo que el riesgo individual y población es escaso o nulo.



- *Bacillus subtilis*
- *Bacillus cereus*
- *Acantamoeba sp.*
- *Naegleria sp.*

**b. Grupo de riesgo N° 2**

Riesgo individual moderado, riesgo bajo en la comunidad. La exposición del agente patógeno tiene poca probabilidad de riesgo grave para el personal de laboratorio y la población, el ganado o el medio ambiente. Existe medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es ilimitada.

- *Entamoeba histolytica*
- *Aeromonas sp.*
- *Escherichia coli*
- *Bordetella sp.*
- *Leishmania sp.*
- *Bartonella bacilliformis*
- *Pseudomonas sp.*
- *Clostridium sp.*
- *Staphylococcus sp.*
- *Corynebacterium sp.*
- *Neisseria sp.*
- *Listeria monocytogenes*
- *Salmonella sp.*
- *Mycoplasma sp.*
- *Shigella sp.*
- *Treponema pallidum*
- *Streptococcus sp.*
- *Vibrio cholerae*
- *Campylobacter spp.*
- *Haemophilus spp.*
- *Leptospira spp.*
- *Blascomyces dematitidis*

**c. Grupo de Riesgo N° 3**

Riesgo individual alto, riesgo bajo la comunidad. El agente suele provocar enfermedad humana o animal grave; pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro. Existe medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

- *Brucella spp.*
- *Histoplasma capsulatum*
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Paracoccidioides brasilienses*
- *Mycobacterium bovis*
- *Taenia sollium*
- *Yersenia pestis*
- *Virus hepatitis B*



**d. Grupo de Riesgo N° 4**

Alto riesgo individual como comunitario. El agente patógeno que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o animales y se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. Normalmente no existe medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

- Virus Dengue
- Virus Ébola
- Virus VIH
- Virus Marbug
- Virus Influenza del tipo A
- Virus Machupo
- Bacillus anthrax
- Virus Viruela

**23. Individuo inmune**

Persona que posee anticuerpos protectores específicos o inmunidad celular como consecuencia de una infección inmunización anterior.

**24. Individuo susceptible**

Es cualquier persona cuya historia clínica y sintomatología indican que probablemente padece o está desarrollando alguna enfermedad transmisible.

**25. Infección**

Entrada de microorganismos dentro de los tejidos, sin producir necesariamente sintomatología o enfermedad.

**26. Inmunidad**

Es el estado de resistencia debido a la presencia de anticuerpos o células que poseen acción específica sobre microorganismos que producen enfermedad infecciosa.

**27. Limpieza**

Proceso físico por el cual se elimina de los objetos en uso, las materias orgánicas y otros elementos sucios, mediante el lavado con agua con o sin detergente: El propósito de la limpieza no es destruir o matar los microorganismos que contaminan los objetos, sino eliminarlos por arrastre.

**28. Sustancias químicas de alto riesgo**

Sustancias con características y reacciones especiales.

**a. Sustancias tóxicas**

Son agentes químicos que al ser expuesto al organismo por vía oral o por inhalación o entrar en contacto con la piel, producen daño al ser humano por acción de mecanismos físicos o químicos (fisiológicos o enzimáticos), o por una combinación de ambos.

**b. Sustancias irritantes**

Son agentes químicos que provocan alteración primaria sobre la piel, mucosas y ojos.

**c. Sustancias corrosivas**

Son agentes químicos que causan destrucción visible o alteraciones irreversibles en el lugar de contacto con los tejidos.

**d. Sustancias Alergizantes**

Son agentes químicos que, por contacto, inhalación o ingestión, provocan una





reacción sensibilizante de tipo alérgico en un número significativo de personas.

**e. Sustancias inflamables**

Son sustancias químicas que producen gases o vapores y que, a una temperatura dada, alcanzan una concentración en aire que les permite inflamarse sobre el envase o recipiente.

**f. Sustancias explosivas**

Son sustancias que por una acción química exotérmica producen gases o vapores que involucren un rápido aumento de volumen y liberación de energía.

Como consecuencia se producen ondas expansivas de sonido y calor. Estas reacciones se desencadenan por percusión, inflamación o chispa.

**g. Sustancias Mutagénicas y Carcinogénicas**

Son sustancias que pueden producir cambios a nivel de la información genética celular que resultan en mutaciones (daño al feto en personal gestante) o cáncer.

**h. Sustancias teratógenas**

Sustancia que provocan alteración durante el desarrollo fetal o causa defectos de nacimiento.

**II. TIPOS DE LABORATORIOS CON RELACIÓN AL NIVEL DE RIESGO**

**a. Nivel de Bioseguridad 1:**

Laboratorio básico que permite el trabajo con agentes de bajo riesgo y no que está separado del edificio, el trabajo se realiza en mesas de laboratorio. Son ejemplos de los laboratorios que se encuentran en los centros de salud, hospitales de nivel local, laboratorios de diagnóstico, universidades y centros de enseñanza.

**b. Nivel de Bioseguridad 2:** Laboratorio básico que cuenta con cámaras de bioseguridad y otros dispositivos apropiados de protección personal o de contención física. Cuenta con áreas de tránsito limitado, se puede trabajar con agentes de riesgo de clase II y III. Es utilizado en Hospitales regionales y laboratorios de Salud pública.

**c. Nivel de Bioseguridad 3:** Laboratorio que cuenta con áreas de acceso restringido y barreras de contención para proteger al operador. Está destinado para trabajar con agentes de clase III. Son laboratorios de diagnóstico especializado.

**d. Nivel de Bioseguridad 4:** Laboratorio de contención máxima que cuenta con recintos separados o aislados, con sistemas de apoyo exclusivo, en cuyo diseño se incluyen barreras de contención que dan protección máxima al personal y/o comunidad. Sirve para trabajar con agentes de clase IV. Como los que cuenta los laboratorios del Instituto Nacional de Salud.

**III. NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD**

- El acceso al laboratorio estará limitado solo al personal autorizado.
- El personal que trabaje en el laboratorio debe cumplir a cabalidad las normas de bioseguridad.
- Toda área debe estar marcada con la respectiva señal de riesgo biológico y su nivel de contención.
- Al ingresar al laboratorio se debe tener en cuenta el debido porte del guardapolvo abotonado y limpio. Asimismo, una vez que ingrese se debe colocar



los abrigos, libros y demás objetos, en sitios adecuados para evitar un posible accidente y nunca sobre los bancos o mesa de trabajo. Los laboratorios cuentan con casilleros para los estudiantes

- Las puertas y ventanas deben permanecer cerradas durante la sesión de laboratorio para evitar la contaminación por corrientes de aire. La extracción de ADN en el laboratorio de biología molecular se debe realizar obligatoriamente en la cámara de flujo laminar.
- Al inicio y término de una práctica se debe limpiar la superficie de trabajo con una solución desinfectante de preferencia fenol al 5% o cresol 3% dejándolo actuar durante 30 minutos.
- El laboratorio debe permanecer limpio y ordenado, durante el trabajo o el término del mismo.
- Lávese las manos con jabón carbónico a la hora de entrar y al término de cada sesión de trabajo, secándolos con toallas de papel.
- El personal con cabello largo debe recogerlo para trabajar dentro del laboratorio.
- Así como usar todos los implementos necesarios para la protección según el nivel de riesgo biológico.
- Evitar que las mangas, puños, pulseras, etc. estén cerca de las llamas cuando se usa el mechero.
- Durante la práctica no se deben guardar ni consumir alimentos y bebidas dentro del laboratorio. Evitar aplicarse cosméticos.
- Se debe colocar un calzado adecuado para las prácticas en el laboratorio, así como mantener las uñas cortas, limpias y sin esmalte. En el laboratorio de biología molecular es necesario el uso de botines, mascarillas, guantes y gorras.
- Hable en tono bajo y evite al máximo el movimiento dentro del laboratorio.
- Emplee los equipos según las instrucciones o los procedimientos operativos estandarizados, al igual que emplee los protocolos correspondientes a la práctica.
- El transporte de materiales o de muestras entre los laboratorios se realizará de manera tal que en caso de caídas no se produzca salpicadura.
- Todo personal debe poner especial cuidado en evitar el contacto con materiales potencialmente infecciosos sin la debida protección.
- Para la toma de muestra de sangre se deberá utilizar jeringas y agujas descartables. Asimismo, no pipetear con la boca soluciones potencialmente dañinas o contaminadas con agentes infecciosos. Los materiales de vidrios ya usados deben ser expuestas en solución sulfocrómica.
- Los derrames y accidentes deben ser informados inmediatamente al supervisor de laboratorio.
- Se usarán máscaras faciales si existe el riesgo de salpicaduras o aerosoles.
- Apagar los instrumentos eléctricos antes de manipular las conexiones.

#### **IV. Bioseguridad y tecnología del ADN recombinante**

La tecnología del ADN recombinante entraña la combinación de información genética procedente de distintas fuentes para crear organismos genéticamente modificados (OGM) que pueden no haber existido antes en la naturaleza. En un principio, los especialistas en biología molecular expresaron cierta preocupación por la posibilidad de que esos organismos tuvieran propiedades impredecibles y



perjudiciales y pudieran representar un riesgo biológico en caso de que salieran de los laboratorios. Esa preocupación fue el objeto de una conferencia científica celebrada en Asilomar (California, EE.UU.) en 1975, en la que se debatieron cuestiones de seguridad y se propusieron las primeras directrices en materia de tecnología del ADN recombinante. La experiencia obtenida a lo largo de los más de 25 años de investigación que siguieron ha demostrado que la ingeniería genética puede desarrollarse en condiciones de seguridad cuando se realizan las debidas evaluaciones de riesgos y se adoptan las medidas de seguridad apropiadas.

La tecnología del ADN recombinante, también conocida como ingeniería genética, se utilizó por primera vez para donar fragmentos de ADN en hospedadores bacterianos a fin de sobre expresar productos génicos concretos destinados al estudio. Las moléculas de ADN recombinante también se han utilizado para crear organismos genéticamente modificados, como animales transgénicos o con genes inactivados (knock-out), así como plantas transgénicas.

Esta tecnología ya ha tenido un enorme impacto en la biología y la medicina, y probablemente tenga una influencia aún mayor en el futuro, ahora que se ha determinado la secuencia completa de nucleótidos del genoma humano. Gracias a la ingeniería genética podrán estudiarse decenas de miles de genes cuya función aún se desconoce. La terapia génica puede llegar a convertirse en el tratamiento habitual de ciertas enfermedades, y probablemente se obtengan nuevos vectores para la transferencia de genes mediante técnicas de ingeniería genética. Además, las plantas transgénicas producidas mediante esta tecnología pueden desempeñar un papel cada vez más importante en la agricultura moderna.

Los experimentos que supongan la creación o el uso de OGM deben realizarse después de efectuar una evaluación del riesgo biológico. Las propiedades patógenas y cualquier peligro potencial asociado a esos organismos pueden ser nuevos y no estar bien caracterizados. Hay que evaluar las propiedades del organismo donante, la naturaleza de las secuencias de ADN que van a transferirse, las propiedades del organismo receptor y las propiedades del entorno. Esos factores ayudarán a determinar el nivel de bioseguridad que se necesita para manipular sin riesgo el OGM resultante e identificar los sistemas de contención biológica y física que habrá que emplear.

### **a. Vectores víricos para la transferencia de genes**

Vectores víricos, por ejemplo, los adenovirus, se utilizan para transferir genes a otras células. Esos vectores carecen de ciertos genes necesarios para la replicación vírica y son propagados en líneas celulares que complementan el defecto.

Las poblaciones de esos vectores pueden contaminarse con virus que tienen intacta la capacidad de replicación, generados por sucesos poco frecuentes de recombinación espontánea en las líneas celulares de propagación, o procedentes de una purificación insuficiente. Esos vectores deben manipularse al mismo nivel de bioseguridad que el adenovirus del que proceden.

### **b. Animales transgénicos y con genes inactivados (knock-out)**

Los animales que llevan información genética extraña (animales transgénicos) deben manipularse en niveles apropiados para las características de los productos de los genes extraños. Los animales en los que se han suprimido de forma selectiva ciertos genes (knock-out) no suelen entrañar riesgos biológicos



particulares.

Cabe citar como ejemplos de animales transgénicos los animales que expresan receptores de virus normalmente incapaces de infectar a esa especie. Si esos animales salieran del laboratorio y transmitieran el transgén a la población animal salvaje, en teoría podría generarse un reservorio animal de esos virus en particular.

Esta posibilidad se ha examinado en el caso de los poliovirus y es particularmente pertinente en el contexto de la erradicación de la poliomielitis. Los ratones transgénicos, generados en distintos laboratorios, que expresaban el receptor de poliovirus humanos eran susceptibles a la infección por poliovirus por varias vías de inoculación, y la enfermedad resultante era análoga a la poliomielitis humana desde los puntos de vista histopatológico y clínico. Sin embargo, el modelo murino difiere del ser humano en que la replicación de los poliovirus administrados por vía oral en el tubo digestivo es poco eficiente o no se produce. Por consiguiente, es muy poco probable que, de escaparse esos ratones transgénicos de un laboratorio, se genere un nuevo reservorio animal de poliovirus. A pesar de todo, este ejemplo indica que en cada nueva línea de animales transgénicos es preciso efectuar estudios detallados para determinar las vías por las que pueden infectarse los animales, el tamaño del inóculo necesario para que se produzca una infección y el grado de excreción de virus por parte de los animales infectados. Además, deben adoptarse todas las medidas posibles para garantizar una contención estricta de los ratones transgénicos receptores.

**c. Plantas transgénicas**

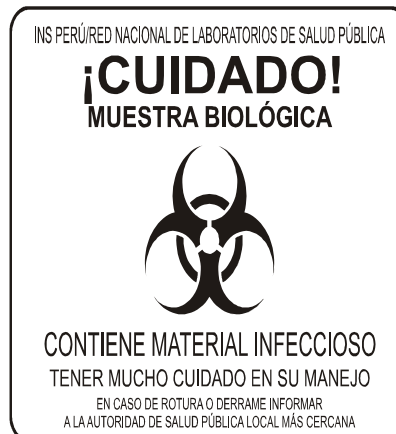
Las plantas transgénicas que expresan genes que confieren tolerancia a los herbicidas o resistencia a los insectos son actualmente objeto de una controversia considerable en muchos lugares del mundo. El debate gira en torno a la seguridad de esas plantas cuando se utilizan como alimentos, así como a las consecuencias ecológicas a largo plazo de su cultivo.

Las plantas transgénicas que expresan genes de origen animal o humano se utilizan para elaborar productos medicinales y nutricionales. Una evaluación del riesgo determinará el nivel de bioseguridad más apropiado para la producción de esas plantas.

**(Título V tomado del: "Manual de Bioseguridad en el laboratorio" OMS. Ginebra 2005)**

**V. PRINCIPALES SEÑALES DE BIOSEGURIDAD**

A continuación, señalamos tres símbolos de bioseguridad propuestos por el Instituto Nacional de Salud.



### 3. Indicaciones

3.1 Se constituirán los alumnos en grupo de 4 por mesa.

3.2 Se nombrará un delegado por mesa de trabajo

### 4. Procedimientos:

**Primero:** Se asignará un tema de Bioseguridad por mesa de trabajo conforme al marco teórico de la presente guía el cual deberá ser discutido. Podrán usar información complementaria de fuentes confiables. Ver MARCO TEÓRICO.

**Segundo:** Los delegados de mesa presentarán un resumen, así como las conclusiones y sugerencias sobre el tema discutido y analizado en sus respectivos grupos. se discutirán preguntas sobre el tema.

**Tercero:** Se verificará si el laboratorio asignado a la práctica del curso de Biología Celular y Molecular cumple con las normas y señalización aprobadas conforme a los parámetros establecidos a nivel internacional.

### 5. Resultados: Análisis

### 6. Conclusiones

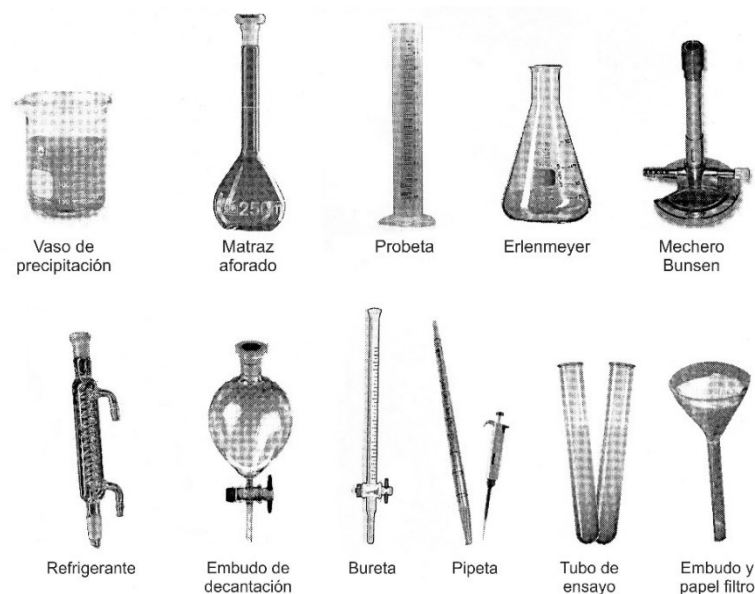
## 7. Sugerencias y /o recomendaciones

### II. Reconocimiento de Materiales y Equipos de Laboratorio

#### 1. Objetivos

- Identificar cada material de vidrio, plástico o metal usados comúnmente en los ensayos de laboratorio haciendo énfasis en los trabajos requeridos para Biología Molecular.
- Describir cada equipo e instrumento de Laboratorio y reconocer su utilidad y manejo adecuado para los ensayos de rutina y de investigación.
- Clasificar los materiales, equipos e instrumentos de laboratorio por su composición y utilidad.

#### 2. Fundamento Teórico



##### A. Vaso de Precipitación o beaker

Es un recipiente cilíndrico de vidrio fino que se utiliza en el laboratorio, sobre todo, para preparar o calentar sustancias y trasvasar líquidos. Suele llevar marcada una escala graduada en mililitros, que permite medir distintos volúmenes, aunque no con gran precisión. Las capacidades de los vasos de precipitados suelen variar entre los 25 y los 2 000 mililitros.



##### B. Matraz Aforado o fiola

Se le denomina también matraz volumétrico. Es un recipiente de vidrio con forma de pera y cuello estrecho y largo en el que aparece una marca o enrase que indica la capacidad exacta del matraz a una cierta temperatura. Este instrumento de laboratorio se emplea, principalmente, para preparar soluciones de una determinada concentración. El rango de capacidad de los matraces aforados más utilizados va de 25 a 1 000 mililitros.





**C. Probeta**

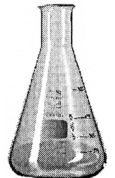
Este cilindro de vidrio graduado, con una amplia base, se utiliza en los laboratorios para medir volúmenes de líquidos o simplemente contenerlos. Suele estar calibrada en mililitros.

Para realizar una buena lectura del volumen, hay que situar los ojos a la altura de la superficie libre del líquido, sin embargo, cuando se requiere una precisión mayor en la medida, se utilizan otros instrumentos como las pipetas.



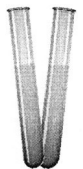
**D. Matraz de Erlenmeyer**

Es un instrumento de laboratorio de vidrio de forma troncónica y cuello cilíndrico corto. Generalmente lleva una escala graduada en mililitros, que permite medir el volumen de un líquido. En microbiología, el matraz sirve para disolver y preparar agar para cultivos bacteriológicos y micóticos. Hay matraces Erlenmeyer de distintas capacidades que pueden variar de 50 a 2 000 mililitros y más.



**E. Tubo de Ensayo**

Es un tubo delgado de vidrio, cerrado por un extremo. Este material de laboratorio se utiliza para contener o calentar pequeñas cantidades de sustancia. En el calentamiento del tubo hay que tener presente una serie de normas de bioseguridad, como sujetar el tubo con unas pinzas aislantes, agitarlo continuamente y dirigir su boca hacia un lugar que no implique riesgo en caso de que se derrame su contenido. Hay tubos de ensayo de distintos tamaños, y para sostenerlas se utilizan las gradillas de madera, metal o plástico. En el procesamiento y extracción de ADN se utilizan los tubos Eppendorf.



**F. Refrigerante**

Este instrumento de laboratorio se utiliza en los procesos de destilación para condensar el vapor. Es de vidrio, de forma cilíndrica, con un tubo central por el que pasa el vapor, contenido en una cámara por la exterior por donde circula agua fría en contracorriente. Existen distintos tipos de refrigerantes, según la forma de su tubo interior. Así, el refrigerante de Liebig presenta un tubo recto y el refrigerante de serpentín en espiral.



**G. Embudo de Decantación**

También conocido como embudo de separación. Es un instrumento de vidrio, con una llave en su parte inferior, que se utiliza en el laboratorio en la separación de líquidos no miscibles, por diferencia de densidades. Una vez que se encuentran los líquidos en reposo, y aparece nítida la superficie de separación, se abre la llave, dando paso al más denso hasta cuando el tubo estrecho inferior de goteo se observa la superficie de separación procediéndose al cierre de la llave. En el embudo de decantación se pueden efectuar también extracciones.



**H. Bureta**

Este instrumento de laboratorio se utiliza en volumetría, un método químico que permite medir la cantidad de disolución necesaria para reaccionar exactamente con otra disolución a través de una punta capilar.



**I. Pipeta y Micropipetas**



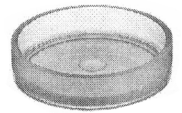


Es un tubo de vidrio abierto por los dos extremos que se emplea para transvasar o medir pequeñas cantidades de líquido en el laboratorio. Los dos tipos de pipeta que más se utilizan son la graduada o de Mohr y la volumétrica o de vertido. La primera lleva una escala graduada; las más comunes permiten medir de 1 a 10 mililitros. En la pipeta de vertido aparece un único engrase, que corresponde con un determinado volumen. En medidas de menor volúmenes se utilizan las micropipetas con medidas micromilimétricas.



**J. Placas Petri**

Material de vidrio que permite sostener medio de cultivos microbianos como el agar con fines de aislamiento, identificación y conteo de colonias bacterianas o aplicación de discos de antibióticos para antibiogramas. Las placas petri también son usadas para contener tejidos o cualquier otra muestra biológica.



**K. Embudo y papel de Filtro**

Son los elementos de laboratorio básicos en el proceso de filtración, que consiste en separar un sólido de un líquido en el que se encuentra suspendido, a través de un material poroso. El papel de filtro, de pliegues o liso, retiene las partículas de sólido mientras permite el paso del líquido; se coloca sobre el embudo, generalmente de vidrio y cortado en bisel por su parte inferior.



**L. Trípode**

Son utensilios de hierro que presentan tres patas y se utilizan para sostener materiales que van a ser sometidos a calentamiento.

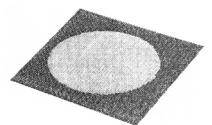
**M. Rejilla de Asbesto**

Es una tela de alambre de forma cuadrangular con la parte central recubierta de asbesto, con el objeto de lograr una mejor distribución del calor. Se utiliza para sostener utensilios que se van a someter a un calentamiento y con ayuda de este utensilio el calentamiento se hace uniforme.



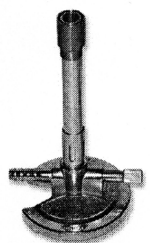
**N. Soporte Universal**

Es un utensilio de hierro que permite sostener varios recipientes a través de anillos circulares del mismo material, adaptado para dicho soporte.



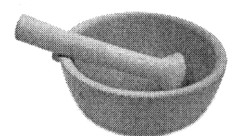
**O. Mechero Bunsen**

Es un utensilio metálico que permite calentar sustancias. Este mechero de gas que debe su nombre al químico alemán ROBERT W. BUNSEN puede proporcionar una llama caliente (de hasta 1 500 grados Celsius), constante y sin humo, por lo que se utiliza mucho en los laboratorios. Está conformado por un tubo vertical metálico, con una base, cerca de la cual tiene la entrada de gas, el tubo también presenta un orificio para la entrada de aire que se regula mediante un anillo que gira. Al encender el mechero hay que mantener la entrada del aire cerrada; después se va abriendo poco a poco. Para apagar el mechero se cierra el gas. Con ayuda del collarín se regula la entrada de aire. Para lograr calentamientos adecuados hay que regular la flama del mechero a modo tal que esta se observe bien oxigenada determinado por una flama azul.



**P. Mortero**

Hechos de diferentes materiales como porcelana, vidrio o ágata. Los morteros de vidrio y de porcelana se utilizan para triturar materiales de poca dureza y los de ágata para materiales que tienen mayor dureza.



**Q. Equipos e instrumento de laboratorio**





Autoclave, horno, estufa, baño maría, microscopios, estereoscopio, cámara de flujo laminar, termociclador, balanza analítica, centrífuga, ultracentrífuga, espectrofotómetro, microscopio electrónico.

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Balanza	De precisión	1
2	Centrífuga	5 000rpm	1
3	Microscopio óptico compuesto	Lentes LED	1
4	Espectrofotómetro	Rango luz visible	1
5	Microcentrífuga	10 000rpm	1

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos de ensayos	13X100, 15X150	1
2	Probeta	50 ml	1
3	Beaker	50 ml	1
4	Mechero Bunsen		1
5	Tripode y Rejilla	Asbesto	1
6	Gradilla		1
7	Pinza	Madera	1
8	Balón de vidrio	100 ml	1
9	Matraz Erlenmeyer	100 ml	1
10	Fiola	100 ml	1
11	Láminas y laminillas	Sin uso	1
12	Pipeta	1, 5 y 10 ml	1c/u
13	Micropipeta con Tips	10, 50 y 100 ul	1c/u
14	Placas petri	Vidrio	1
14	Embudo	Vidrio	1
15	Papel filtro	Cualitativo	1
15	Varilla	Vidrio	1
16	Mortero	Porcelana	1
17	Pipeta Pasteur	Vidrio y Plástico	1

#### 3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Alcohol	70° y 97° spray	100ml
2	Solución Sulfocrómica	Solución diluida	100 ml
3	Aceite de inmersión	En gotero	10 ml

### 4. Instrucciones

4.1 Considerar la mayor seguridad del transporte de los materiales de vidrio.

4.2 Atender las indicaciones del docente sobre el buen uso de los equipos e instrumentos.



4.3 Evitar hacer uso de equipos de laboratorio si no está presente el docente de práctica.

**5. Procedimientos:**

- A. Describe las características principales de los materiales, equipos e instrumentos de laboratorio en el cuadro de entrada.

Nº	NOMBRE	CARACTERÍSTICAS	FUNCIÓN
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			

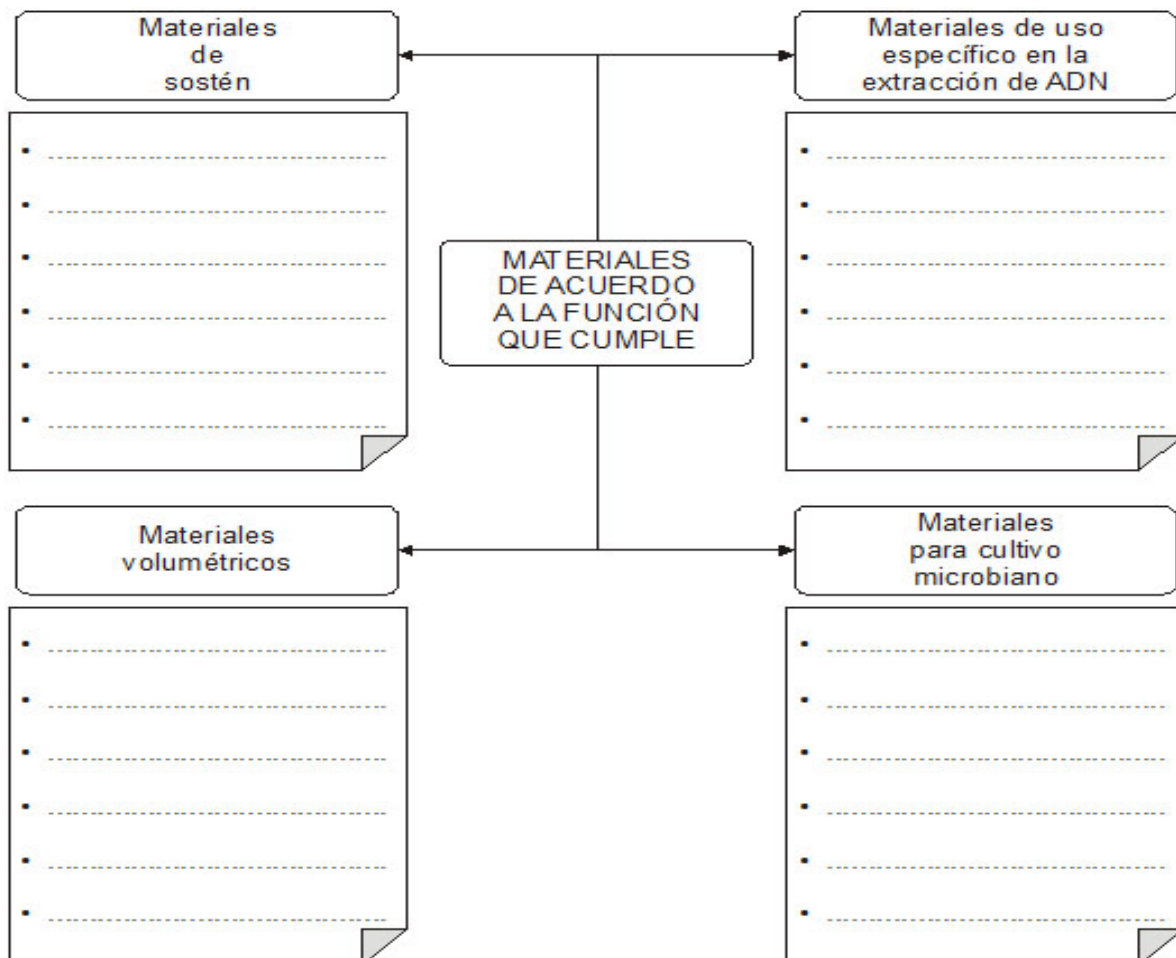


10			
----	--	--	--

B. Menciona y ubica los materiales del laboratorio de acuerdo a su composición en el siguiente cuadro de doble entrada.

TIPOS DE MATERIALES						
Madera	Plástico	Vidrio	Metal	Porcelana	Volumétrico	Térmicos

C. Organiza los materiales del laboratorio de acuerdo a la función que cumple:





**7. Conclusiones**

**8. Sugerencias y /o recomendaciones**

**9. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

- Organización Mundial de la Salud. (2005). Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. 3ª ed. Ginebra: Ediciones de la OMS.
- Manual de Bioseguridad en el Laboratorio [en línea. [Consulta: 20 de febrero de 2017]]. Disponible en web:  
[http://combios.unizar.es/doc/manual\\_bioseguridad\\_OMS.pdf](http://combios.unizar.es/doc/manual_bioseguridad_OMS.pdf)



## SEMANA 2: Guía de práctica N° 2

### MANEJO DEL MICROSCOPIO Y OBSERVACIÓN DE CÉLULAS BACTERIANAS

Sección : .....Docente: .....

Fecha : ...../...../.....

Duración: 4 horas

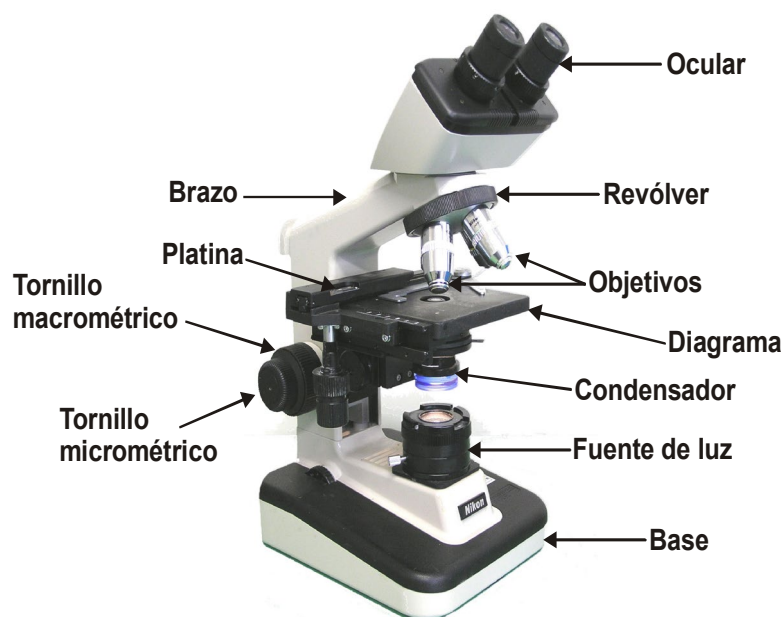
**Instrucciones:** Leer con detenimiento la presente guía de práctica considerando el buen uso del microscopio a fin de evitar la pérdida o ruptura de alguna pieza de dicho instrumento de laboratorio. Así mismo se debe tomar en cuenta que se manipulará cultivos bacterianos, por tanto, las medidas de bioseguridad aplicadas para éste fin, evitará la contaminación del área de trabajo y riesgo de infección.

#### 1. Objetivos

- Identificar cada una de las partes y sistemas que conforman la estructura del microscopio óptico.
- Desarrollar habilidades en el manejo adecuado del microscopio óptico.
- Reconocer los debidos cuidados en el uso, limpieza y transporte del microscopio óptico.
- Emplear adecuadamente los procedimientos de coloración microbiológica como la tinción Gram para la observación en el microscopio óptico de células procariotas.

#### 2. Fundamento teórico sobre microscopía

El microscopio (de mikroz, *micrós* = pequeño y okopew, *scopéo* = observar) es un instrumento que permite observar objetos que son demasiado pequeños para ser vistos a simple vista. El tipo más común y el primero que se inventó es el microscopio óptico. Se trata de un instrumento óptico que contiene una o varias lentes que permiten obtener una imagen aumentada del objeto y que funciona por refracción. La ciencia que investiga los objetos pequeños utilizando este instrumento se llama microscopía.





El conocimiento de las estructuras del ser vivo está basado casi totalmente en el estudio con el microscopio. El microscopio óptico es un instrumento que permite la observación de objetos y detalles de estructuras tan pequeñas que no podrían ser observadas a simple vista. Con él, nuestro grado de visibilidad se amplía en cientos o miles de veces, gracias a un conjunto de lentes, dispuestos convenientemente. Las principales dificultades en la observación y estudio de estructuras biológicas son su reducido tamaño y su transparencia a la luz visible. Dado que el microscopio permite superar estas dos dificultades, su uso y el conocimiento de los principios y técnicas en microscopía, resultan fundamentales para el desarrollo de la investigación en ciencias biológicas.

**SISTEMA MECÁNICO:** Comprende los siguientes dispositivos:

- **Pie:** Base que da soporte y estabilidad al microscopio.
- **Columna:** Estructura que une el pie con la platina y el tubo. Sostiene además el condensador y el diafragma.
- **Platina:** Superficie plana para sostener el portaobjetos y el cubre-objetos que contienen a las preparaciones.
- **Tubo:** Proporciona soporte a los lentes oculares y objetivos.
- **Tornillo macrométrico:** Asociada a dos tornillos, permite el movimiento vertical del tubo o de la platina para obtener la distancia a la cual el objeto puede ser observado nítidamente; es decir, el enfoque preciso para el observador.
- **Tornillo micrométrico:** Permite movimientos muy cortos en un ajuste fino del enfoque para lograr una observación precisa.
- **Revólver.** Sistema giratorio relacionado con el tubo, que porta los lentes objetivos para diversos aumentos, pudiendo utilizarlos alternativamente.
- **Pinzas.** Par de láminas rectangulares, situadas sobre la platina, para mantener al porta-objetos.

**SISTEMA ÓPTICO:** Comprende los lentes oculares y los lentes objetivos.

- **Oculares:** Lentes dispuestos en la parte superior del tubo cercano al ojo del observador. Su aumento puede ser de 6X, 10X y 15X. Siendo el más común 10X.
- **Objetivos:** Son lentes de diferentes aumentos situados en el otro extremo del tubo, en el revólver. El de menor aumento es más corto (3.2X, 4X, 5X y 10X) y el de mayor aumento es más largo (40X y 44X). Puede existir además un objetivo de inmersión de 100 a 150 aumentos, es decir de 100X a 150X.

**SISTEMA DE ILUMINACIÓN:**

- **Diafragma:** Abertura que regula la cantidad de luz que ingresa hacia la preparación.
- **Condensador:** Lente que concentra el haz luminoso hacia la preparación.
- **Espejo o luz incorporada:** Proporciona la luz que llega hasta el objeto a estudiar y el sistema óptico del microscopio. Existe un espejo plano por un lado y cóncavo por el otro, para ser usados cuando se disponga de abundante o escasa luz, respectivamente. La luz incorporada corresponde a un foco de luz eléctrica adaptado en el lugar que ocupa el espejo.

**a) Grado de Aumento:**



Es la magnificación total que sufre la imagen del objeto debido al efecto de los lentes oculares y objetivos. Se obtiene multiplicando el número de veces que aumenta el lente ocular por el número de veces que aumenta el lente objetivo. Si el objetivo aumenta la imagen de un objeto 40 veces, esta al pasar por la lente ocular será nuevamente aumentada.

- Si el ocular aumenta 10 veces, la magnificación total en este caso será:  $10X \times 40X = 400X$ .
- Este resultado permite saber cuántas veces más grandes estamos viendo la imagen de un objeto.

**b) Poder de Resolución:**

Es la posibilidad de distinguir separados dos puntos muy cercanos entre sí. Cuanto mayor sea el poder de resolución, menor será la distancia entre dos puntos a la cual pueden distinguirse como tales. La distancia límite en la cual dos puntos pueden ser todavía distinguibles se denomina Límite de Resolución. El poder de resolución de un microscopio compuesto depende de la longitud de onda de la fuente luminosa y de la apertura numérica (propiedad óptica de la lente). Puede ser calculado mediante la siguiente fórmula:

$$P.R. = \frac{\text{LAMBDA}}{2 \text{ A.N.}}$$

Donde:  
LAMBDA = Longitud de onda de la fuente luminosa  
A.N. = Apertura numérica de la lente.

Existe una correspondencia entre el aumento de un objeto y su apertura numérica, de tal modo que las lentes con mayores aumentos generalmente tendrán mayores aperturas numéricas. El poder de resolución es quizá la característica más importante de un buen microscopio ya que de nada sirve una imagen muy grande del objeto, si ésta se ve borrosa y no puede distinguirse en sus detalles.

**c) Distancia de Trabajo:**

- Es la distancia que existe entre el objeto en observación y el lente objetivo.
- Esta distancia variará según el aumento del lente objetivo con la cual se trabaje. Es inversamente proporcional al grado de aumento; es decir, cuanto mayor sea el aumento del lente objetivo menor será la distancia de trabajo.
- Cuando se trabaje con un lente de inmersión la distancia de trabajo será mínima. En estos casos es necesario usar aceite de inmersión entre el lente objetivo y la preparación debido a que el índice de refracción para este tipo de lente es la del aceite y no la del aire. Esto permite obtener una imagen de gran tamaño y al mismo tiempo de gran nitidez.

A continuación, explicamos cual es el manejo adecuado del microscopio.

- Limpiar el espejo, condensador y los lentes del microscopio.
  - Eliminar el polvo mediante un soplete de aire o pincel fino.
  - Frotar sin presionar, con papel de lente, usando este solo una vez.



- Comprobar si el lente objetivo de menor aumento está a continuación del tubo; si no es así, debe colocarse en dicha posición haciendo girar el revólver hasta alcanzar un "tope" que lo indique.
- Abrir completamente el diafragma y observando a través del ocular, mover el espejo orientándolo de modo que la luz reflejada se observe en un círculo uniformemente iluminado. Este constituye el "campo óptico". Una vez obtenida la iluminación máxima, NO SE DEBE CAMBIAR LA POSICION DEL MICROSCOPIO. Con luz incorporada no hay espejo.
- Ubicar y sujetar el porta-objetos en la platina, procurando que la preparación se halle en el centro de la abertura circular.
- Mover el tornillo macrométrico para acercar el lente objetivo de menor
- Observando por el lente ocular, mover nuevamente el tornillo macrométrico en el sentido inverso hasta que aparezca la imagen.
- Una vez enfocada la imagen girar el tornillo hasta que sea nítida. Nunca se debe usar el tornillo micrométrico para grandes desplazamientos, para ello está el tornillo macrométrico.
- Cuando los tornillos macro y micrométrico se encuentren incorporados en un solo dispositivo, el ajuste fino se hace solo después de haber realizado el avance rápido de acercamiento a la preparación.
- Antes de pasar al siguiente aumento verificar que la imagen a observar se encuentre en el centro del campo, hacer girar el revólver cambiando el lente objetivo hasta llegar al "tope" y accionar solamente el tornillo micrométrico hasta obtener la nueva imagen.
- Para observar una muestra con el objetivo de inmersión, se coloca una gota de aceite de cedro encima de la lámina de la preparación antes de girar el revólver. Esto permite que la imagen se vea con nitidez para realizar la observación ya que este tipo de lentes requiere que el índice de refracción sea similar al del vidrio.
- Terminada la observación, girar el revólver para colocar el objetivo de menor aumento en la primera posición de trabajo.
- Retirar la preparación y dejar limpio el microscopio, secando la platina con cuidado.
- Si usó el objetivo de inmersión, debe limpiarse inmediatamente después de su uso con ayuda del papel de lente. Quitar el grueso del aceite con una hoja, luego limpiar con una segunda impregnada en xylol o de preferencia alcohol isopropílico. Finalmente, con una tercera, secar el lente. No usar cantidades excesivas de solvente pues pueden disolver el cemento de los componentes de los lentes.
- Mantener cubierto o guardado el microscopio cuando no esté en uso.
- En sitios con excesiva humedad ambiental deberá guardarse el microscopio en una campana de vidrio con un desecante como carbonato de calcio.

### TINCIÓN EN PROCARIONTES

El reino monera agrupa a los organismos conformados por células procariotas, es decir bacterias, mycoplasmas, rickettsias, clamideas y las cianobacterias conocidas como algas verde-azuladas o cianofitas.

Las cianobacterias a diferencia de las bacterias patógenas, son microorganismos autotróficos que fijan el nitrógeno ambiental y realizan fotosíntesis. Su capacidad de





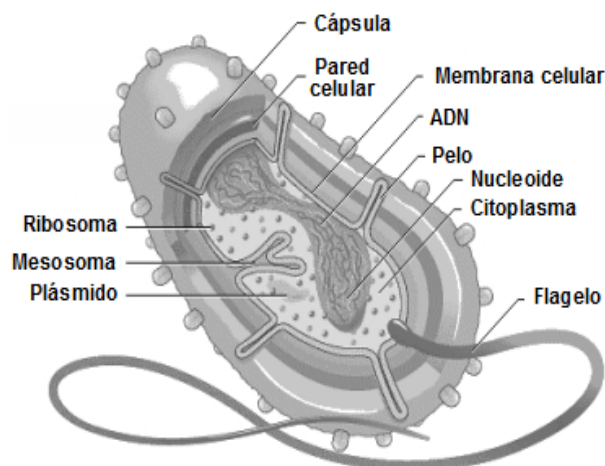
formar grandes colonias nos permite identificarlo en el ambiente como el *Nostoc sp* que se observa en la práctica sin necesidad de ser sometido a la coloración Gram. Las células bacterianas son muy pequeñas, entre 1 y 10 micrómetros (mm) de longitud, y solo pueden observarse con ayuda de un microscopio.

Las bacterias son organismos procariotas, que carecen de núcleo verdadero, característica que las diferencia de las células vegetales y animales. El núcleo de las plantas y de los animales contiene el material genético en forma de ácido desoxirribonucleico (ADN). El material genético de la célula bacteriana está formado también por ADN (generalmente circular) pero se encuentra en una región densa que no está separada del resto del citoplasma por ninguna membrana. Muchas bacterias poseen también pequeñas moléculas de ADN circulares llamadas plásmidos, que llevan información genética, pero, la mayoría de las veces, no resultan esenciales en la reproducción.

### TINCIÓN GRAM

Los fundamentos de la tinción Gram se basan en las diferencias entre las paredes celulares de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

La pared celular de las bacterias Gram positivas posee una gruesa capa de peptidoglucano, además de dos clases de ácidos teicoicos: Anclado en la cara interna de la pared celular y unido a la membrana plasmática, se encuentra el ácido lipoteicoico, y más en la superficie, el ácido teicoico que está anclado solamente en el peptidoglucano (también conocido como mureína).



Por el contrario, la capa de peptidoglucano de las Gram negativas es delgada, y se encuentra unida a una segunda membrana plasmática exterior (de composición distinta a la interna) por medio de lipoproteínas. Tiene una capa delgada de peptidoglucano unida a una membrana exterior por lipoproteínas. La membrana exterior está hecha de proteína, fosfolípido y lipopolisacárido.

Por lo tanto, ambos tipos de bacterias se tiñen diferencialmente debido a las diferencias constitutivas de su pared. La clave es el peptidoglucano, ya que es el material que confiere su rigidez a la pared celular bacteriana, y las Gram positivas lo poseen en mucha mayor proporción que las Gram negativas.



**3. Materiales del laboratorio**

- Microscopio
- Servilleta de algodón, sin almidonar
- Papel de seda
- Lámina portaobjeto
- Lámina cubre objeto
- Gotero
- Asa de Kohlle o de siembra
- Mechero de Bunsen
- Soporte para láminas

**REACTIVOS:**

- Alcohol metílico
- Violeta genciana
- Lugol
- Safranina (Fucsina)
- Azul de metileno

**MUESTRA BIOLÓGICA:** Muestras de bacterias cuyas colonias han sido cultivadas en agar, las cianofitas pueden adquirirse con el nombre vulgar de 'cushuro'.

**4. Procedimiento y resultado**

- 4.1** Coloca el microscopio sobre tu mesa de acuerdo a las instrucciones del docente e identifica cada uno de sus partes.
- 4.2** Explicar cuáles son las características de la visión con el microscopio:

**5. Procedimientos y resultados**

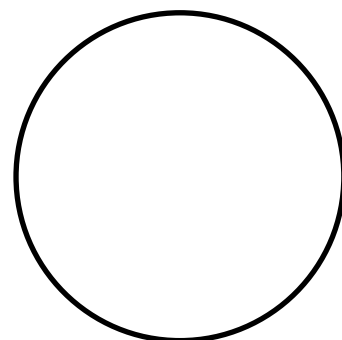
**TINCIÓN SIMPLE:**

- 1º Colocar una gota de muestra en un portaobjeto.
- 2º Dejar secar la preparación y fijarla a la llama del mechero sin que se efectúe un calentamiento excesivo.
- 3º Con el gotero, cubrir con fucsina.
- 4º observar al microscopio (objetivo de inmersión).

**Grafica los procedimientos y la respectiva observación en el microscopio.**

Muestra: \_\_\_\_\_

Aumento: \_\_\_\_\_



**TINCIÓN GRAM:** Para observación de bacterias.



**A. Fijar un frotis:**

- 1° En el mechero hacer flamear el asa de Kohlle.
- 2° Tomar el asa (previamente flameada) y con esta tomar un poco de muestra.
- 3° Una vez obtenida una pequeña cantidad de la muestra (con el asa), hacer que esta tenga contacto con una lámina portaobjetos, la cual servirá para depositar la muestra contenida en el asa.
- 4° Con el asa (conteniendo la muestra) sobre la lámina portaobjetos, proceder a realizar la extensión de la muestra en el portaobjetos mediante movimientos giratorios (dar vueltas con el asa) sobre la lámina, de tal forma que, al terminar la extensión, tengamos como productos una espiral en la parte media de la lámina.
- 5° Esperar que seque al aire libre o ayudarse con la llama del mechero para fijar la muestra, teniendo en cuenta que el calor no debe ser directo (solo se pasa por la llama), puesto que el calor excesivo puede cambiar la morfología celular de las bacterias a observar. El calor deseable es aquel en el que el portaobjetos sea apenas demasiado caliente para ser colocado sobre el dorso de la mano.

**B. Tinción:**

Adicionar violeta cristal o violeta genciana, utilizando la cantidad suficiente de dicho colorante sobre la muestra, como para lograr cubrirla por completo. Se deja actuar al colorante por 2 minutos.

**C. Enjuague:**

Al transcurrir el minuto, se debe enjuagar la lámina conteniendo la muestra con agua corriente. Para realizar el lavado, se debe tener en cuenta que el chorro de agua no debe caer directamente sobre la muestra, esta debe caer sobre la parte superior de la lámina que no contiene muestra. El chorro debe ser un chorro delgado, aproximadamente de medio a un centímetro de espesor. También el enjuague se debe realizar poniendo la lámina en posición inclinada hacia abajo.

**D. Mordiente:**

Una vez enjuagado el portaobjetos, se aplica como mordiente yodo o lugol durante 2 minutos más. El mordiente es cualquier sustancia que forme compuestos insolubles con colorantes y determine su fijación a las bacterias.

**E. Decoloración:**

Pasado el minuto de haber actuado el mordiente, el frotis se decolora con etanol al 75% o etanol al 95% o acetona o alcohol – acetona, hasta que ya no escurra más líquido azul. Para esto se utiliza el gotero del frasco del decolorante. Se van añadiendo cantidades suficientes del decolorante, hasta lograr que este salga totalmente transparente, es decir, hasta que ya no escurra más líquido azul.

**F. Lavado y secado:**

Lavar con agua para quitar los residuos de decolorante y esperar que seque la lámina al aire libre o con la ayuda de la llama de un mechero de la forma anteriormente descrita.

**G. Tinción de contraste:**

Una vez que la lámina ya secó, procedemos a teñir nuevamente, pero esta vez se va a utilizar un colorante de contraste como por ejemplo la safranina, dejar actuar durante 2 minutos.

**H. Nuevo enjuague:**

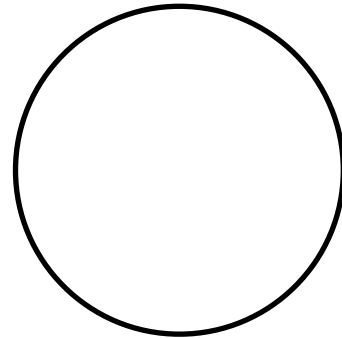


Pasado el minuto correspondiente, se procede a enjuagar la lámina con agua, se escurre el agua sobrante y se seca en la forma anteriormente descrita. De esta manera, ya tendremos listo el frotis para su respectiva observación microscópica.

**Grafica los procedimientos y la respectiva observación en el microscopio.**

Muestra: \_\_\_\_\_

Aumento: \_\_\_\_\_



**Indica cuáles son bacterias gram positivas y cuales son gram negativas**

#### 6. Cuestionario

1. ¿Cuáles son las características de los organismos que pertenecen al reino mónera?
2. Investiga. ¿Qué es la mureína?
3. ¿Cuál es la diferencia entre una bacteria Gram positiva y Gram negativa?
4. ¿Cuáles son los pasos que debes tener en cuenta para la observación de un objeto?
5. ¿Debes tener en cuenta aplicar algún elemento químico para obtener resultados en una muestra? ¿Por qué?

#### Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Forbes AB, Sahm DF, Weissfeld AS. Diagnóstico Microbiológico. 11ª ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2004.
- Manejo del Microscopio Óptico Compuesto [en line. [Consulta: 18 de febrero de 2017]]. Disponible en web: <https://es.scribd.com/doc/36405504/MANEJO-Y-USO-DEL-MICROSCOPIO-OPTICO-C>



### SEMANA 3: Guía de práctica N° 3

#### ESTRUCTURA DE LOCOMOCIÓN CELULAR: PSEUDOPODOS, CILIOS Y FLAGELOS

Sección	: .....	Docente:	.....
Fecha	: ...../...../.....	Duración:	4 horas

**Instrucciones:** Considerar el cultivo de protozoarios, conforme lo indica la presente guía de práctica, con una semana de anticipación.

#### 1. Objetivos

- Observar las estructuras de locomoción que presentan las células de los protozoarios de vida libre.
- Diferenciar estructuras de locomoción como flagelos, cilios y pseudópodos.
- Observar la presencia de cilios en células epiteliales humanas.

#### 2. Fundamento Teórico

Las células han desarrollado diversas estructuras de locomoción, no solo para su desplazamiento como ocurre en organismos unicelulares sino también para el transporte y defensa.

En protozoarios unicelulares, encontramos cilios, flagelos y pseudópodos cuya estructura y fundamento bioquímico es estudiado a nivel molecular. En el caso de los cilios, el aparato ciliar está conformado por la estructura microtubular con un patrón proteico de 9 + 2, también se presentan en los flagelos, y en el cuerpo basal o cinetosoma de la matriz citoplasmática cuya estructura de 9 (3) o nueve tripletes de microtúbulos se asemeja a los centriolos.

Desde el punto de vista médico, se presenta el **síndrome del cilio inmóvil** que genera ciertas enfermedades como la bronquiectasia y sinusitis en las vías respiratorias. La inmovilidad puede presentarse en los flagelos de los espermatozoides provocando infertilidad en los varones que lo padecen. Los cilios forman parte de ciertos receptores sensoriales como los fotorreceptores de conos y bastones en la retina, y epitelio olfatorio; y pueden ser inmóviles por ausencia de los microtúbulos centrales.

Los pseudópodos no solo son prolongaciones de membrana para el desplazamiento celular, sino también un mecanismo importante para la incorporación de partículas de nutrientes durante la fagocitosis, mecanismo necesario para la inmunidad natural celular del sistema de defensa en organismos superiores.

#### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

##### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico	Fuente de luz LED	3

##### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
------	----------	----------------	----------

<b>1</b>	Placas Petri	vidrio	3
<b>2</b>	Laminas portaobjetos	Sin uso	6
<b>3</b>	Laminas cubreobjetos	Sin uso	6
<b>4</b>	Pipetas Pasteur	Vidrio con chupón	3
<b>5</b>	Lamina histológica de epitelio	Corte histológico de mucosa traqueal, oviducto o trompa de Falopio	2

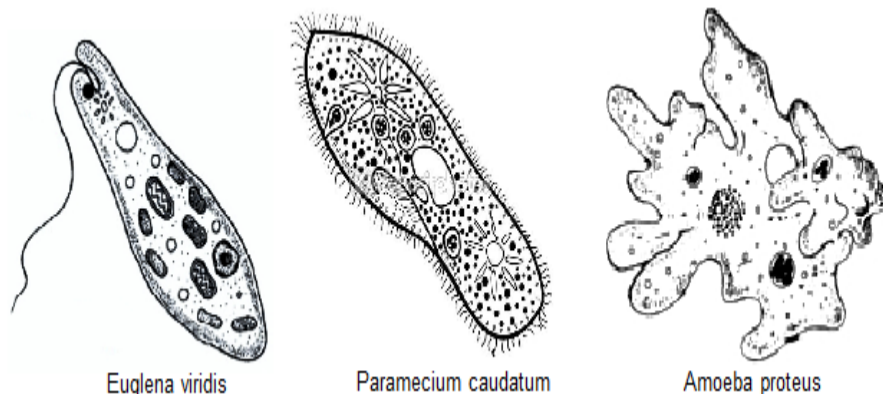
### 3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
<b>1</b>	Lugol	4% en frasco gotero	50 ml
<b>2</b>	Verde de metilo	En frasco gotero	50 ml

### 4. Indicaciones:

#### 4.1 Cultivo de Protozoarios (ojo: realizar con una semana de anticipación)

- En un frasco mediano de boca ancha, con agua estancada, agregar: arroz molido, zanahoria y lechuga picada. Así mismo incorporar una cucharada de la levadura *Saccharomyces cerevisae*.
- Mantener abierto al aire libre una semana, en un lugar donde no se exponga a luz directa.



*Euglena viridis*

*Paramecium caudatum*

*Amoeba proteus*

4.2 Tomar la muestra biológica de cultivo de protozoarios del fondo o sedimento evitando el exceso sobre la lámina portaobjeto.

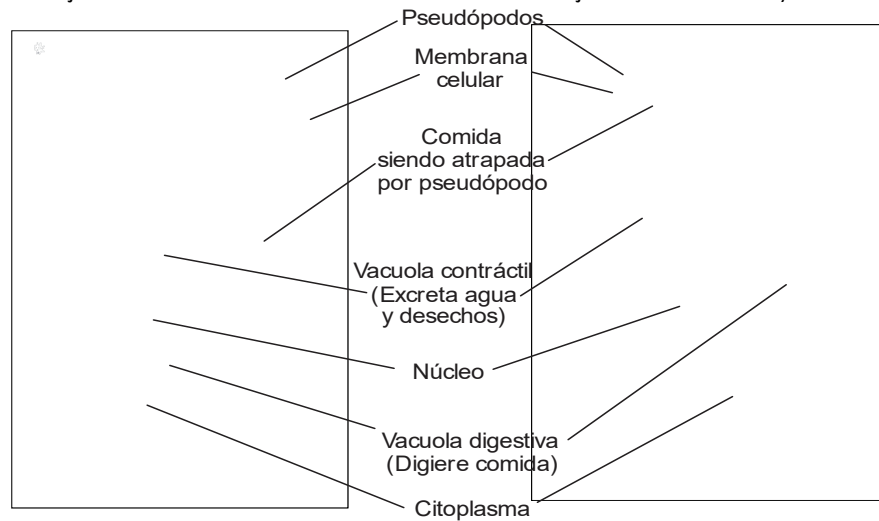
4.3 Hacer buen uso del micrométrico cuando el objetivo es de 100X, a fin de evitar la ruptura de las láminas histológicas.

### 5. Procedimiento y Resultados:

#### A. Movimiento ameboideo por pseudópodos: *Amoeba proteus* (Clase Sarcodina)

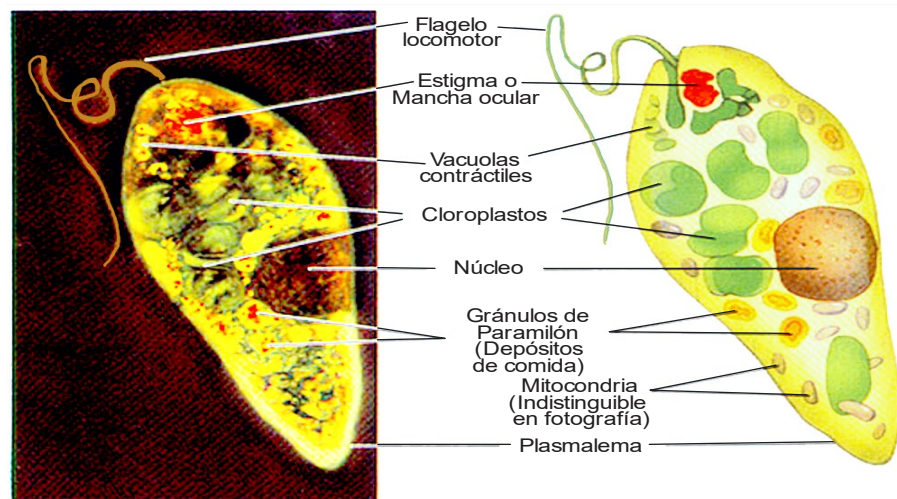
1. Sobre una lámina portaobjeto, con un gotero coloque una gota del cultivo de protozoarios que contenga *Amoeba*, cubrirlo luego con una laminilla cubre objeto.
2. Preparar otra lámina portaobjeto con una gota de muestra y una gota de Verde de metilo o Lugol. Limpiar el exceso luego de cubrirlo con la laminilla.

3. Dibujar las observaciones realizadas con objetivos 10X, 40X y 100X



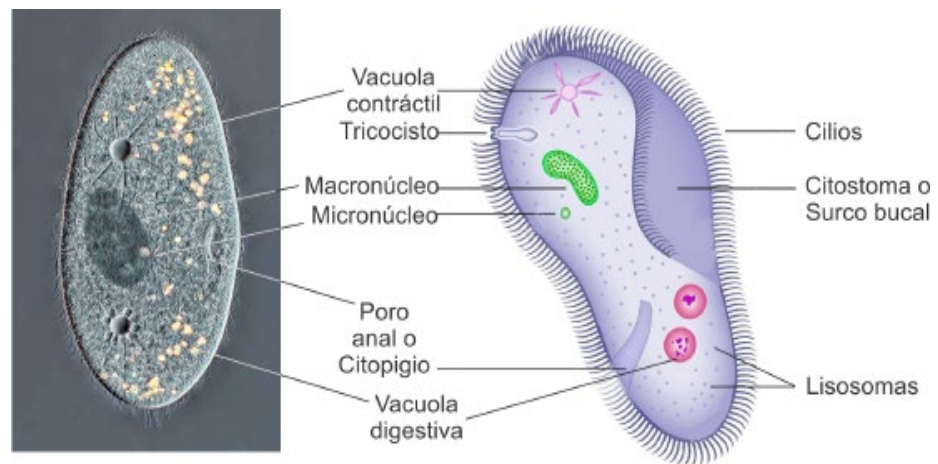
**B. Movimiento flagelar por flagelos: Euglena viridis (Clase mastigophora)**

1. Sobre una lámina portaobjeto, con un gotero coloque una gota del cultivo que contenga Euglena y cubrir con una laminilla cubreobjeto.
2. Preparar otra lámina portaobjeto con una gota de muestra y una gota de Verde de metilo o Lugol. Limpiar el exceso luego de cubrirlo con la laminilla.
3. Dibujar las observaciones realizadas con objetivos 10X, 40X y 100X.



**C. Movimiento ciliar por ciliosos: Paramecium caudatum (Clase ciliophora)**

1. Sobre una lámina portaobjeto, con un gotero coloque una gota del cultivo que contenga Paramecio y cubrir con una laminilla cubreobjeto.
2. Preparar otra lámina portaobjeto con una gota de muestra y una gota de Verde de metilo o Lugol. Limpiar el exceso luego de cubrirlo con la laminilla.
3. Dibujar las observaciones realizadas con objetivos 10X, 40X y 100X.



Uno de los cilióforos protozoarios parásitos para el hombre es *Balantidium coli* el mismo que puede ser observado en muestras de heces de cerdo.

**D. Observación de cilios en tejidos humanos**

En tejidos epiteliales humanos como el epitelio cilíndrico del oviducto y el epitelio pseudoestratificado de las vías respiratorias entre otros, presentan como estructura de movimiento cilios en su dominio apical con función específica como el transporte del ovocito y barrera mecánica de protección respectivamente. Observe al microscopio láminas fijas y coloreadas con hematoxilina y eosina.

**6. Protocolo:** Realizar esquemas de lo observado

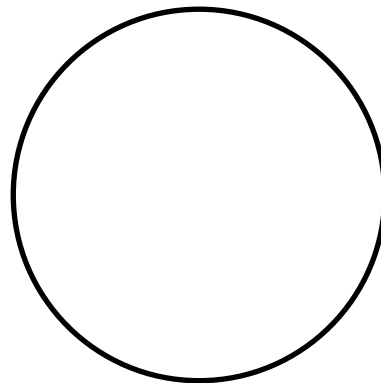
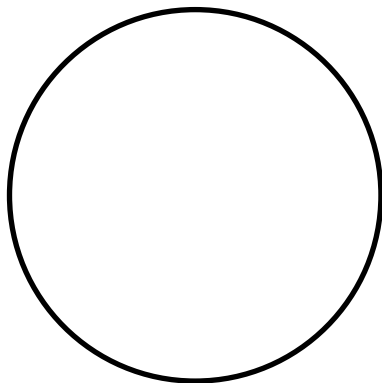
AUMENTO OBJETIVO	<i>Amoeba proteus</i> (Sarcodina)	<i>Euglena viridis</i> (Mastigophora)	<i>Paramecium caudatum</i> (Ciliophora)
10 X			
40 X			





AUMENTO OBJETIVO	<i>Amoeba proteus</i> (Sarcodina)	<i>Euglena viridis</i> (Mastigophora)	<i>Paramecium caudatum</i> (Ciliophora)
100 X			

Identifica los cilios en los epitelios descritos de la trompa de Falopio y mucosa traqueal.



### 7. Cuestionario

1. ¿A qué atribuye la gran movilidad de los protozoarios de vida libre e indique qué protozoarios parásitos para el hombre tiene estructura de locomoción?
2. Explique las diferencias entre los diferentes tipos de movimientos: por pseudópodos, flagelos, cilios, en relación a la participación del citoesqueleto.
3. ¿Qué es el síndrome de Kartagener y su importancia médica?
4. ¿Qué diferencias a nivel del citoesqueleto se produce entre un cilio o flagelo respecto a las microvellosidades?
5. ¿Cuáles son las partes de un cilio y su diferencia en cuanto a la disposición de sus microtúbulos?

### Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Alberts B. Biología Molecular de la Célula. 5ª ed. Madrid: Omega; 2010
- Cultivo de Protozoarios [en line. [Consulta: 20 de febrero de 2017]]. Disponible en web: <http://biologiapuntocom.blogspot.pe/2012/05/practico-cultivo-y-observacion-de.html>

## SEMANA 4: GUÍA DE PRÁCTICA N° 4

### OBSERVACIÓN DEL NÚCLEO CELULAR EN ELEMENTOS FORMES DE LA SANGRE

Sección : .....	Docente: .....
Fecha : ...../...../.....	Duración: 4 horas

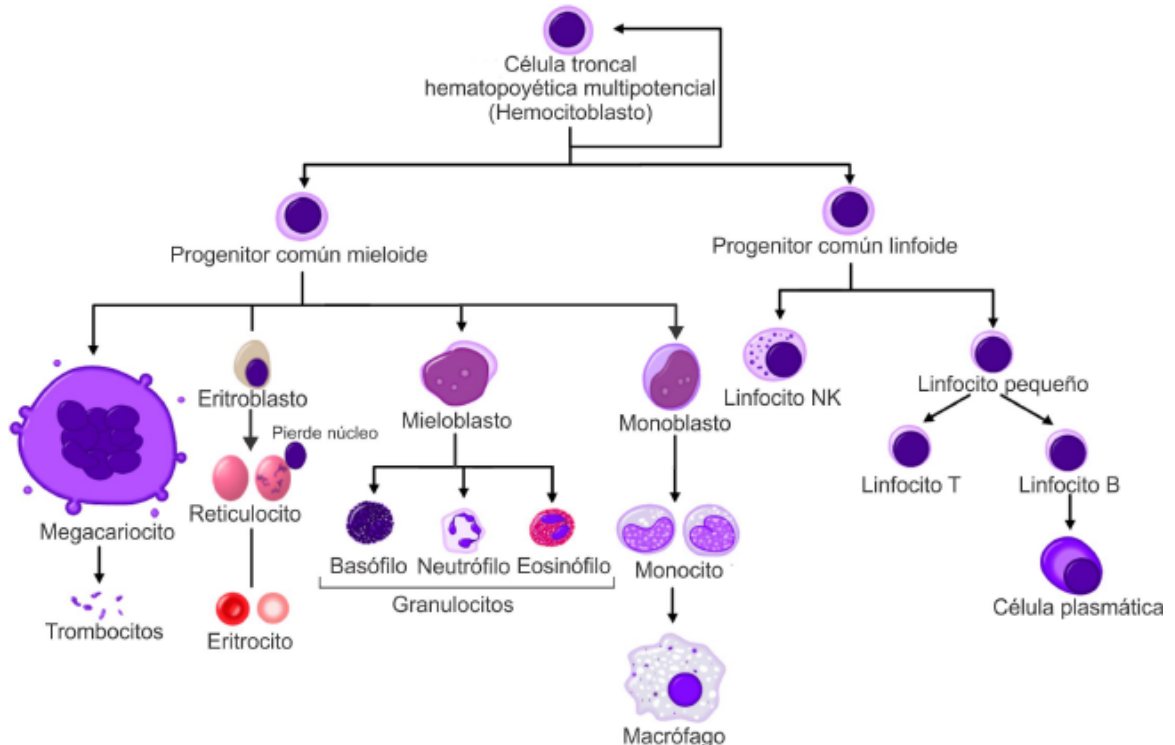
**Instrucciones:** Leer con previsión la presente Guía de práctica considerando las medidas de Bioseguridad en la toma de muestra de sangre periférica.

#### 1. Objetivos

- Identificar los diferentes elementos formes de la sangre como eritrocitos, leucocitos y plaquetas en sangre periférica humana y de aves.
- Observar las diferentes formas nucleares y su contenido en leucocitos.

#### 2. Fundamento Teórico

El núcleo constituye una de las principales características estructurales que presentan las células eucarióticas. Su importancia en la célula se debe a que contiene el material genético, nos referimos al ADN, al interior de su cromatina y protegido por la proteína *histona* de naturaleza básica.



Dentro del núcleo se encuentra el nucléolo conformado básicamente por ARN y proteínas. El número de nucléolos dependerá de la actividad metabólica de la célula en relación a la síntesis de proteínas debido a que da origen a los ribosomas. En la periferia



del carioplasma o nucleoplasma limitando con la carioteca o membrana nuclear se encuentran las proteínas denominadas *lamininas* que participa en la desorganización de la carioteca durante la división celular.

Las tinciones usadas para fines histopatológicos nos permitirán diferenciar el núcleo en cuanto a su forma y coloración que adopta respecto al citoplasma de la célula. Un buen ejemplo es lo que nos muestra las células sanguíneas debido a las variaciones del núcleo celular principalmente en los leucocitos o glóbulos blancos. Así mismo, a diferencia de las células humanas los eritrocitos, que no presentan núcleo en su maduración, los eritrocitos de las aves sí las poseen.

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto	Fuente de luz LED	4

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Láminas porta y cubre objetos	Sin uso	4
2	Lancetas	hematológicas	2
3	Varillas de coloración	Vidrio	2
4	Piceta	Con agua destilada	1

#### 3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Alcohol a 70°	En spray	250 ml
2	Colorante Wright	En frasco con gotero	100 ml

Las torundas de algodón serán dispuestas por el laboratorio. La sangre de aves puede ser extraída en vacutainer EDTA el cual servirá como medio de transporte.

### 4. Procedimiento y resultado

#### 4.1. Obtención de sangre capilar.

- Desinfectar el dedo anular con alcohol y algodón y con una lanceta estéril punzar el dedo y dejar caer una gota de sangre sobre un extremo de la lámina portaobjetos.
- Con ayuda de otra lámina portaobjeto formar un ángulo de 45° y realizar un frotis o extendido, tratando de esparcir homogéneamente la gota de sangre sobre la superficie de la lámina.
- Dejar secar la preparación al ambiente y proceder luego a la coloración con Wright o Giemsa.

#### 4.3. Coloración

- Cubrir con colorante Wright o Giemsa por un minuto.
- Sin eliminar el colorante agregar agua destilada y dejar actuar por diez minutos.



- c. Eliminar luego el colorante lavando suavemente con agua de caño inclinando la lámina portaobjeto y dejar secar.
- d. Proceder a observar al microscopio con el objetivo de 100X y aceite de inmersión.

## 5. RESULTADOS

Esquematice los siguientes elementos que abajo se indican y que serán observados con ayuda del microscopio.

### 5.1. Eritrocitos en aves

Si se puede obtener una muestra de sangre de aves, se podrá observar que a diferencia de los mamíferos los glóbulos rojos o eritrocitos en aves, son células nucleadas grandes y ovoides o elípticas. El núcleo de color púrpura se ubica en la parte central.

Los leucocitos o glóbulos blancos en las aves presentan cierta similitud a los mamíferos. Los neutrófilos toman el nombre de heterófilos con núcleos en banda o lobuladas.

### 5.2. Leucocitos humanos granulares

#### a. Neutrófilos segmentados o adultos

Presenta un núcleo con varios lóbulos (2 a 5) unidas por bandas de cromatinas.

#### b. Neutrófilos en banda o abastionados o juveniles

Presenta un núcleo no dividido en forma de "S" o en cayado "O".

#### c. Eosinófilos

Reaccionan con tintes ácidos. Son redondos, voluminosos, con granulaciones acidófilas de color anaranjado, núcleo con dos lóbulos.

#### d. Basófilos:

Reaccionan con tintes básicos. Son escasos de 0-1 %, presenta un núcleo difícil de observar, pues se halla cubierto por una granulación de color violeta o morado oscuro que contienen histamina y heparina.

### 5.3. Leucocitos humanos agranulares

#### a. Linfocitos

De forma redonda e irregular, su núcleo es morado, voluminoso y ocupa la mayor parte de la célula, el citoplasma es azul y sin granulaciones. Su número aumenta con las infecciones.

#### b. Monocitos

De forma redonda u ovalada de 15 a 20 mm de diámetro, núcleo variable generalmente en forma de riñón, citoplasma sin gránulos. Presenta actividad fagocitaria.

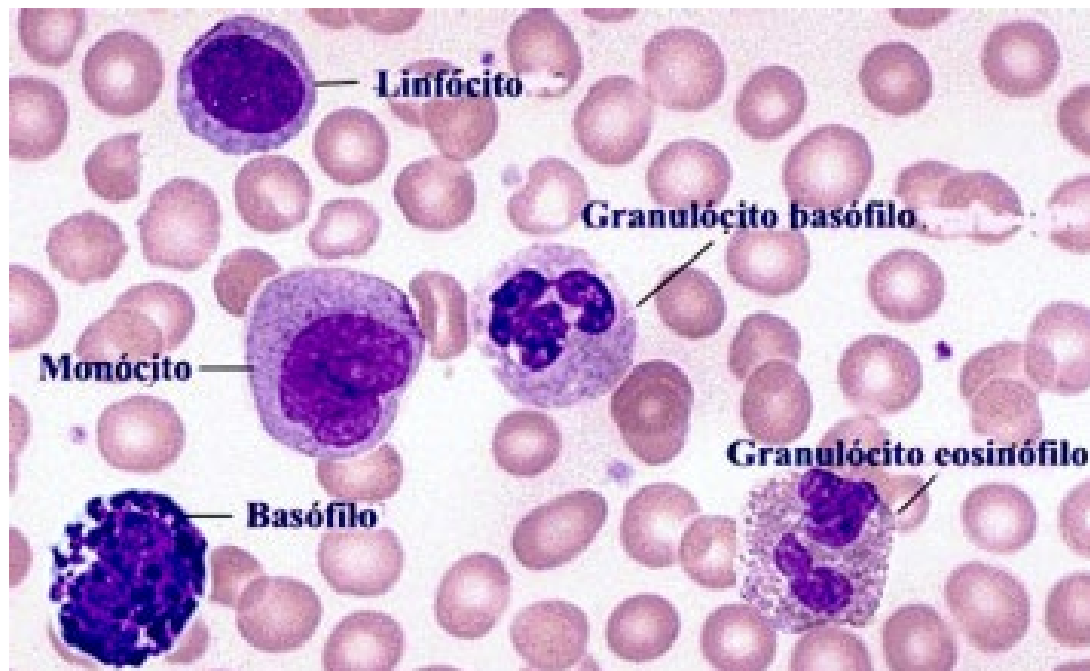
### 5.4. Plaquetas o Trombocitos o Corpúsculos de Bizzozero o de Zimmermam o Hayem

Las más pequeñas de los elementos de la sangre, de forma redonda y no contienen hemoglobina. Son esenciales en la coagulación de la sangre. Son fragmentos de 2 a 4 mm en cuyo citoplasma presentan gránulos llamados alfa que contiene enzimas como las hidrolasas y catepsinas.

### 5.6. Hematíes o Eritrocitos o Glóbulos rojos o acariocitos

De forma generalmente redonda o de un disco bicóncavo de 7 a 8 mm de

diámetro. Sin núcleo, de color rosa intenso, contiene hemoglobina. La proteína que se encarga del transporte de oxígeno y anhídrido carbónico.



## 5. Conclusiones:

## 6. Cuestionario

1. ¿Qué indica si una célula presenta mayor número de nucléolos?
2. ¿Por qué se tiñen el núcleo y el citoplasma de diferente color?
3. Si en el frotis sanguíneo el número de neutrófilos abastados se incrementa significativamente, ¿qué interpretación clínica postularía?
4. ¿Por qué los eritrocitos humanos se observa una región central clara?
5. ¿Qué indica un incremento de basófilos en la sangre?

### Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Vélez AH, Rojas MW, Borrero RJ, Restrepo MJ. Hematología. 6<sup>ta</sup> ed. Bogotá: Corporación para la Investigación Biológicas; 2007.
- Sangre de Aves [en línea [Consulta: 22 de febrero de 2017]]. Disponible en web: [http://www.fvet.uba.ar/b\\_histo/10-2-sangreave.htm](http://www.fvet.uba.ar/b_histo/10-2-sangreave.htm)

## SEMANA 5: GUÍA DE PRÁCTICA N° 5

### PERMEABILIDAD SELECTIVA DE LA MEMBRANA CELULAR

Sección : .....Docente: .....

Fecha : ...../...../.....

Duración: 4 horas

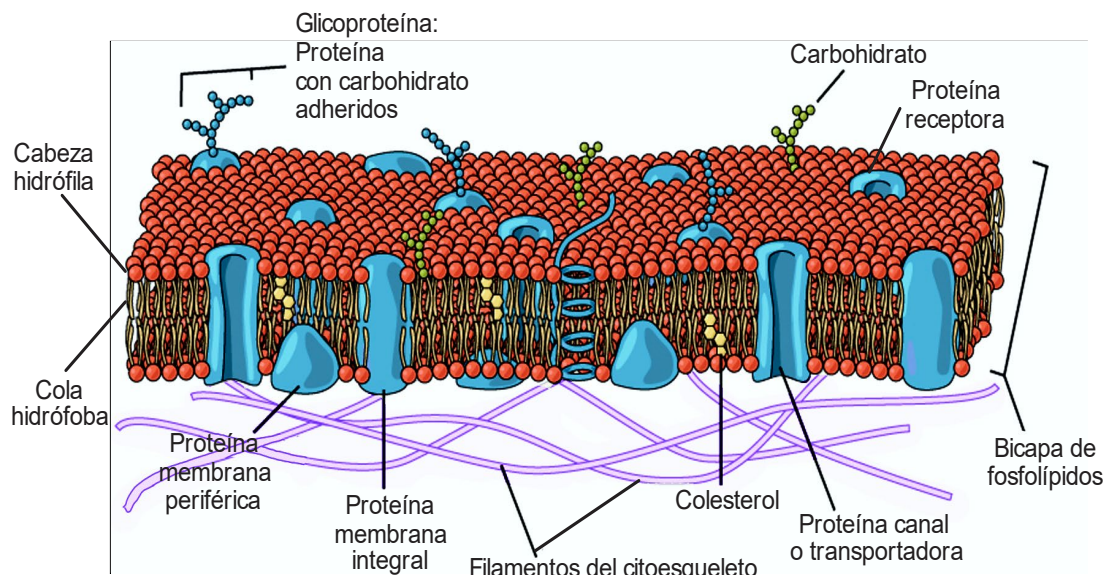
**Instrucciones:** Leer con previsión la presente guía de práctica considerando las medidas de Bioseguridad en la toma de muestra sanguínea y durante el procesamiento del lavado de los eritrocitos.

#### 1. Objetivos:

- Reconocer las propiedades de permeabilidad de la membrana celular.
- Establecer las diferencias de transportes de moléculas a través de la membrana.
- Observar los cambios que experimenta la célula en diferentes medios de presión osmótica.

#### 2. Fundamento Teórico:

La membrana plasmática de las células eucarióticas es una estructura dinámica formada por dos capas de fosfolípidos en donde interactúan moléculas de colesterol y proteínas. Los fosfolípidos tienen una cabeza hidrófila y dos colas hidrófobas.



**Fuente:** <http://archive.cnx.org/contents/08a457f1-4667-4483-9f06-d0e8d8c48fda@2/la-membrana-celular>

Las dos capas de fosfolípidos se sitúan con las cabezas hacia fuera y las colas, enfrentadas hacia adentro. Es decir, los grupos hidrófilos se dirigen hacia la fase acuosa de la capa exterior de la membrana con el líquido extracelular e intracelular y la capa interior hacia el interior de la bicapa. Las proteínas embebidas en las capas de



fosfolípidos cumplen la función de transportar grandes moléculas hidrosolubles, como azúcares y ciertos aminoácidos. También hay proteínas y fosfolípidos unidas a carbohidratos (glicoproteínas y glicolípidos) embebidas en la membrana y cuya porción de oligosacáridos queda al exterior con el fin de constituir en porción de receptores de membrana para hormonas, enzimas y agentes patógenos como virus. También constituyen antígenos de reconocimiento celular como el complejo mayor de histocompatibilidad.

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico	Fuente de luz LED	3
2	Centrífuga	5000rpm	1

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Láminas porta objetos	Sin uso	6
2	Láminas cubre objetos	Sin uso	6
3	Tubos de ensayo	13 x 100	6
4	Gradilla	polipropileno	1
5	Pipeta Pasteur	vidrio	3
6	Beaker	50 ml	1

#### 3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Solución salina	0,2%	50 ml
2	Solución salina	0,9%	250 ml
3	Solución salina	5%	50 ml
4	Tinta china	En frasco con gotero	10 ml

### 4. Indicaciones

- 4.1 La toma de muestra sanguínea se tomará con Vacutainer EDTA y lancetas. El laboratorio proveerá alcohol y algodón. Los alumnos traerán catafilo de cebolla
- 4.2 La toma de muestra sanguínea se realizará en condiciones de bioseguridad. Se eliminarán los vacutainer en los depósitos destinados para este fin.
- 4.3 Las láminas y laminillas podrán ser reutilizadas si son sometidas previamente en solución sulfocrómica.

### 5. Procedimiento y resultados

#### • DIFUSIÓN DE SOLUTOS:

- Colocar en dos vasos de precipitación agua destilada, en una fría y en la otra caliente.
- Adicionar una gota de tinta a cada uno y observar la velocidad de difusión.



OBSERVACIONES	INTERPRETACIÓN

• **OSMOSIS:**

- Limpiar y desinfectar con alcohol y algodón el pulpejo de uno de los dedos.
- Pinchar con la lanceta y colocar una gota de sangre en tres láminas distintas realizando un extendido ligero. Así mismo extender porciones de catafilo de cebolla en tres láminas distintas.
- Agregar las soluciones salinas: 0,2%, 0,9% y 5% respectivamente. Observar al microscopio.

OBSERVACIONES		INTERPRETACIÓN
sangre	catafilo	

• **LAVADO DE GLÓBULOS ROJOS:**

- En un tubo 13×100 con EDTA obtener muestra de sangre periférica en un volumen aproximado a la quinta parte del tubo de ensayo y luego adicionar solución salina al 0,9% en un volumen que cubra las tres cuartas partes del tubo de ensayo. Proceder a centrifugar a 3 500 rpm por 10 minutos.
- Si el sobrenadante muestra hemólisis muy marcado entonces la solución salina no se encuentra en la concentración adecuada pues se ha expuesto a un medio hipotónico ha pues provocado hemólisis.
- Si el sobrenadante muestra ligera hemólisis entonces retirar el sobrenadante y adicionar al paquete de glóbulos rojos solución salina al 0,9% hasta las tres cuartas partes del tubo de ensayo y proceder a centrifugar a 3 500 rpm por 10 minutos.





- Al finalizar se observa el sedimento de glóbulos rojos bien constituido y un sobrenadante transparente.
- Puede obtener muestra de glóbulos rojos lavado con una pipeta Pasteur y adicionarlo a dos tubos de ensayo a fin de agregar solución salina al 0,2% y 5% respectivamente y observar si hubo hemólisis y crenación tomando una muestra, luego de centrifugarlo, para observarlo al microscopio. Verifique la coloración del sobrenadante.

OBSERVACIONES	INTERPRETACIÓN

**6. Conclusiones:**

- 1.
- 2.
- 3.

**7. Cuestionario**

1. Mencione que sustancias se transporta por difusión en los pulmones.
2. ¿Qué es presión osmótica?
3. ¿Qué es la presión oncótica?
4. ¿A qué se denomina solución hipotónica, isotónica e hipertónica?
5. Investiga las diferencias que existe entre transporte pasivo y activo.

**Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

- Curtis H, Barnes NS. Biología. 6ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2000
- Membrana Celular [en line. [Consulta: 20 de febrero de 2017]]. Disponible en web: [http://www.biologia.edu.ar/cel\\_euca/la\\_membrana\\_celular.htm](http://www.biologia.edu.ar/cel_euca/la_membrana_celular.htm)

**SEMANA 6: TALLER NUCLEO CELULAR****PERMEABILIDAD SELECTIVA DE LA MEMBRANA CELULAR**

Sección : .....Docente: .....

Fecha : ...../...../.....

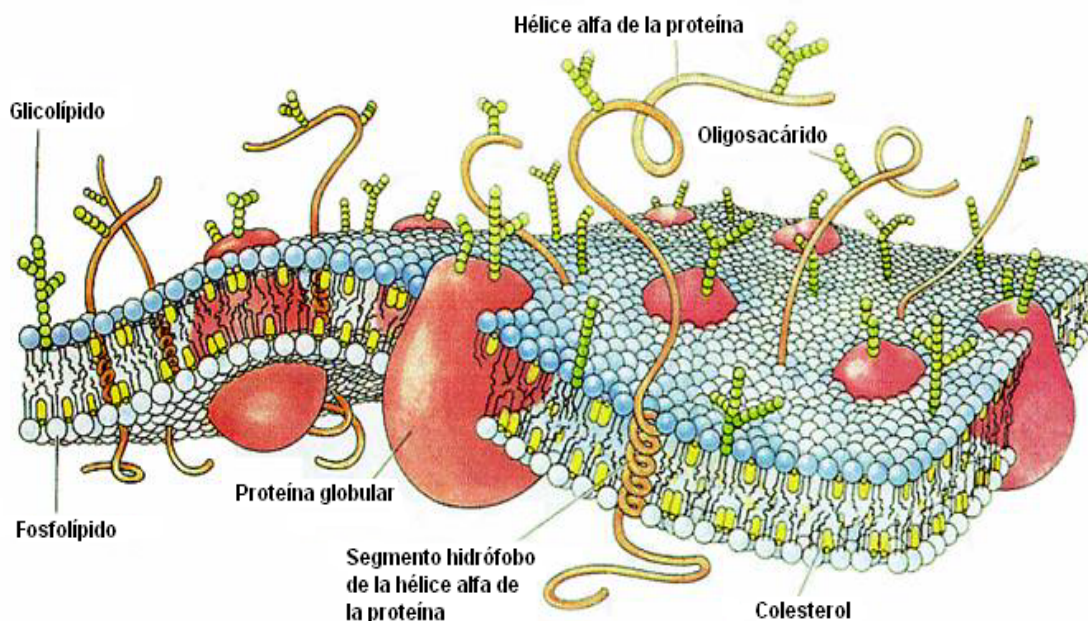
Duración: 4 horas

**Instrucciones:** Leer y seguir las indicaciones para el desarrollo del taller.**1. OBJETIVO**

Conocer el fundamento molecular del transporte a través de las membranas

**2. FUNDAMENTO****TRANSPORTE A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS.****Membranas Biológicas:** *Modelo del MOSAICO FLUIDO*

Un mosaico es una especie de rompecabezas en el que armamos una figura completa a partir de partes más pequeñas. El agua, el aceite, los líquidos en general son fluidos. Según el MODELO DE MOSAICO FLUIDO, las membranas están formadas por dos capas de fosfolípidos en la que se incluyen una gran variedad de proteínas, lípidos y carbohidratos. Las partes constituyentes están unidas pero conservan su independencia lo cual les permite ciertos movimientos. Las membranas celulares dividen a las células en compartimentos (u organelas), permitiéndoles realizar actividades especializadas dentro de pequeñas áreas del citoplasma, concentrar reactivos y organizar reacciones metabólicas.

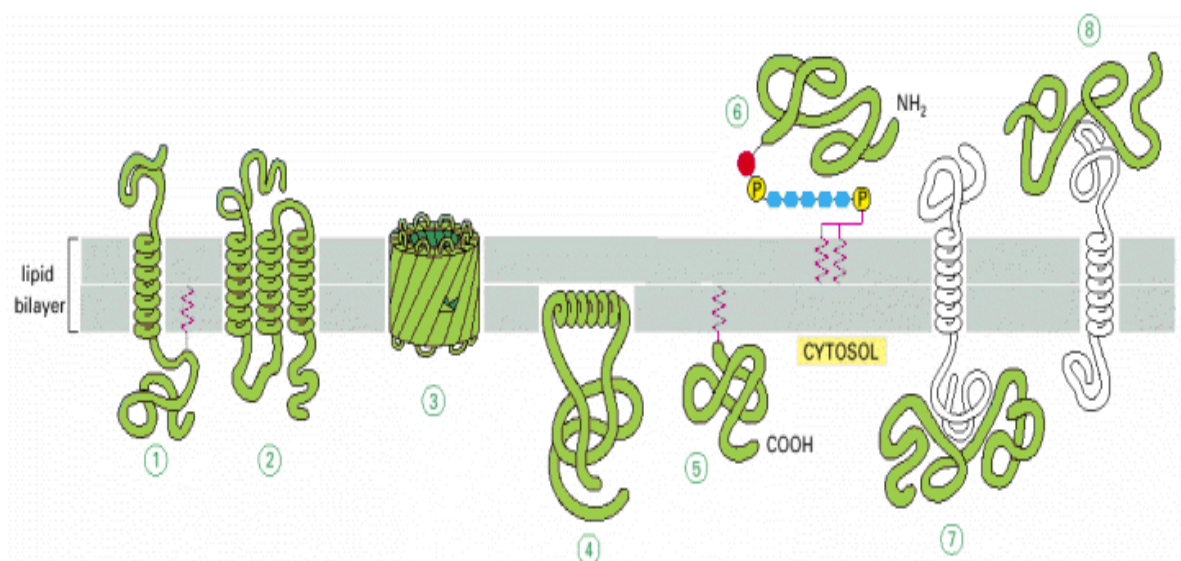




En la mayoría de las membranas los lípidos de la bicapa están en un estado fluido o líquido cristalino, lo que permite a la molécula de lípido moverse rápidamente en el plano de la membrana. Las proteínas también se mueven dentro de la membrana. Las bicapas lipídicas son flexibles, se auto sellan, es decir pueden volver a cerrarse si en un momento se sepan e incluso pueden fusionarse con otras membranas.

### Proteínas de membrana

En las membranas encontramos diversos tipos de proteínas en la membrana. Las proteínas **integrales o intrínsecas** de membrana están incluidas en la bicapa con su superficie hidrofílica expuesta al entorno acuoso y su superficie hidrófoba en contacto con el interior hidrófobo de la bicapa. Las proteínas **transmembranas** son proteínas integrales que se extienden completamente a través de toda la membrana.



Las proteínas **periféricas** de membrana se asocian con la superficie de la bicapa, uniéndose, generalmente, a regiones expuestas de proteínas integrales, y se pueden extraer fácilmente sin romper la estructura de la membrana. Mientras que las **extrínsecas** se anclan a una proteína periférica.

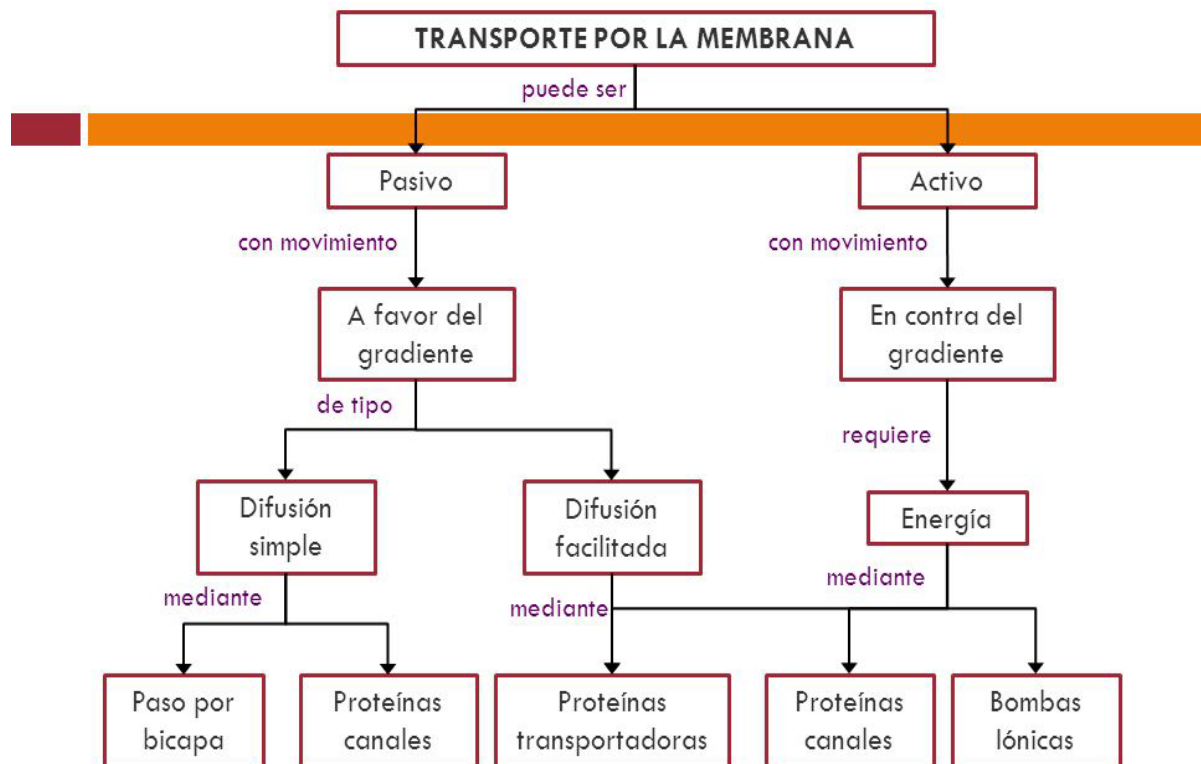
Las proteínas de membrana tienen muchas funciones, por ejemplo, transportan materiales, actúan como enzimas o receptores, reconocen a otras células y también las unen estructuralmente.

### Tipos de transporte a través de las membranas

Las membranas biológicas son **selectivamente permeables**: permiten el paso de algunas sustancias, pero no de otras, regulando el paso de las moléculas que entran y salen de la célula y de sus componentes, el volumen y la composición interna de iones y moléculas.

Las proteínas cumplen la función de transporte facilitando el paso de ciertos iones y moléculas cuyo paso no está permitido. Cuando se unen al soluto específico que van a transportar sufren una serie de cambios estructurales.

Existen dos mecanismos de transporte:



### 3. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

- Los estudiantes deberán llevar los datos solicitados por el docente previamente.
- Papel y materiales de escritorio.

### 4. PROCEDIMIENTO y RESULTADOS

- Seguendo lo estudiado en la clase teórica, traer ejemplos de cada uno de los tipos de transporte a través de las membranas.
- El docente organizara grupos de trabajo para preparar un material que permita explicar el tipo de transporte que le toca al grupo.

### 5. CONCLUSION:

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MANUAL DE PRÁCTICAS DE BIOLOGÍA [en línea]. [Consulta: 07 de agosto de 2016]. Disponible en web: [www.serbi.ula.ve/serbiula/librose/pva/.../ManualBiologia.pdf](http://www.serbi.ula.ve/serbiula/librose/pva/.../ManualBiologia.pdf)

MANUAL PRÁCTICAS BIOLOGÍA [en línea]. [Consulta: 07 de agosto de 2016]. Disponible en web: <https://es.scribd.com/doc/39559010/Manual-Practicas-Biologia-1.pdf>

Oram, R. F. (2007). Biología sistemas vivos. (1ª. ed.). México: McGraw-Hill.

## SEMANA 7: Guía de práctica N° 6

### ESTUDIO DE ORGÁNULOS CELULARES: MITOCONDRIAS Y CLOROPLASTOS

Sección : .....Docente: .....

Fecha : ...../...../.....

Duración: 4 horas

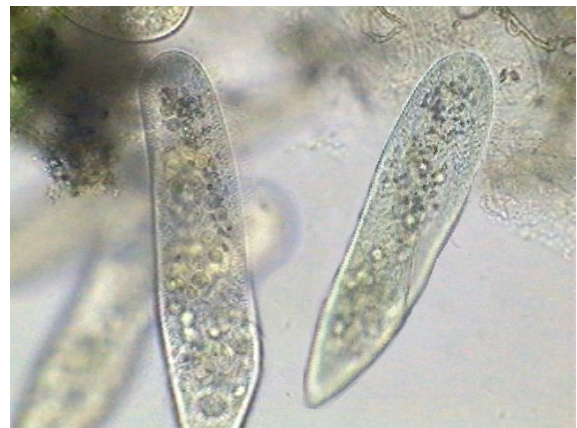
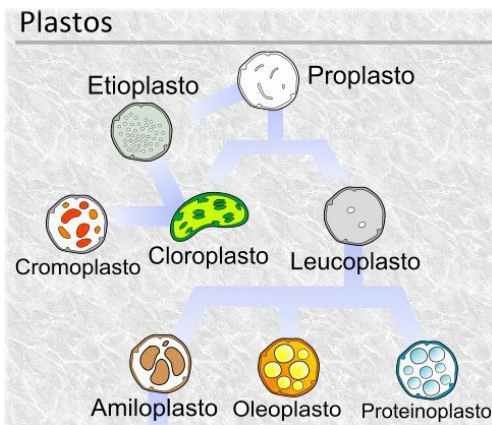
**Instrucciones:** Leer con previsión la presente Guía de práctica y considerar las muestras biológicas requerida por grupo o mesa de trabajo.

#### 1. Objetivos

- Reconocer mediante tinción especial a las mitocondrias en células superiores.
- Reconocer a los principales plastidios vegetales como los cloroplastos en algas y vegetales.
- Relacionar los procesos metabólicos en orgánulos de doble membrana como la respiración celular y la fotosíntesis.

#### 2. Fundamento Teórico

En células eucarióticas se puede observar dos organelos citoplasmáticos que comparten el hecho de estar constituido por doble membrana, nos referimos a la mitocondria y al cloroplasto el principal plastidios vegetal.



Las mitocondrias son consideradas las maquinarias para la síntesis de ergomoléculas es decir ATP. En su mitosol o matriz ocurre el ciclo de Krebs o ciclo del ácido tricarbóxico y en la cresta, perteneciente a su membrana interna, ocurre la cadena respiratoria o fosforilación oxidativa en donde se produce la mayor síntesis de ATP.

Los vegetales presentan como organelos diferenciales, respecto a los animales, a los plastidios. Dichas organelas pueden contener pigmentos o pueden sintetizar y acumular diversas sustancias, como los *Leucoplastos* que son plastidios que no poseen pigmentos puesto que almacenan sustancias de reserva. Así tenemos a los *Amiloplastos* que



almacenan almidón, los *Proteinoplastos* que acumulan proteínas, los *Elaioplastos* que contienen grasas y aceites esenciales. Los *Cromoplastos* son plastidios coloreados por pigmentos muchos de los cuales son precursores de vitaminas o constituir antioxidantes a neutralizar radicales libres como el *Caroteno* que presenta un pigmento de color naranja, el *Licopeno* de color rojo, la *Xantofila* de color amarillo y los *Cloroplastos* que presentan un pigmento de color verde y cuya función principal es realizar la fotosíntesis.

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico compuesto	Fuente de luz LED	3

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Placas Petri	Vidrio	3
2	Piceta	Con agua destilada	1
3	Láminas porta y cubre objetivos	Sin uso	6
4	Pinzas	Metálica	3
5	Hoja de afeitar		1
6	Papel filtro	Cuantitativo	3

#### 3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Verde Janus	Diluido en 1:10000 en gotero	50 ml
2	Lugol	En gotero	50 ml
3	Ázul de metileno	En gotero	50 ml

Los estudiantes deberán traer Hoja de Elodea, Ají amarillo, Zanahoria, Tubérculo de papa, Betarraga como parte de las muestras biológicas que deberán ser procesadas.

### 4. Indicaciones

- 4.1 Durante el procesamiento de la muestra de origen vegetal siempre deberá permanecer húmedo y sobre el papel filtro en la placa Petri.
- 4.2 El uso de la hoja de afeitar o en su defecto el bisturí, durante el procesamiento de la muestra, se realizará con el mayor cuidado.

### 5. Procedimientos y resultados

#### A. Observación de mitocondria en epitelio bucal

1. Con una lámina limpia portaobjeto y mediante un raspado suave obtener una muestra de la mucosa bucal.
2. Realizar un frotis extendiendo la muestra con otra lámina.
3. Dejar secar la lámina con la muestra al medio ambiente.
4. Cubrir la muestra con suero fisiológico, lugol y otro con Verde Janus durante 5 minutos.



5. Eliminar el exceso de suero, colorante respectivamente y dejar secar al medio ambiente.
6. Observar al microscopio con objetivos de 10X, 40X y 100X.

**B. Observación de plastidios en vegetales**

**Cloroplastos:** Se localizan en las hojas debajo de la epidermis superior en el tejido que corresponde al parénquima clorofiliano o clorénquima.

1. Seleccionar una hoja joven de Elodea y realizar un corte transversal lo más delgado posible haciendo uso de una hoja de afeitar y colocarla sobre una gota de agua en una lámina portaobjeto.
2. Cubrir la muestra con una laminilla.
3. Observar al microscopio con objetivo de menor y mayor aumento.

**Cromoplastos:** Son organelas con pigmento no fotosintético. Dichas organelas presentan formas variadas (redondeadas, elípticas o aciculares).

1. Realizar cortes finos de zanahoria, ají amarillo, betarraga sobre una lámina portaobjeto.
2. Colocar una gota de agua sobre el corte.
3. Cubrir la muestra con una laminilla.
4. Observar al microscopio con objetivo de menor y mayor aumento.

**Amiloplastos:** Son plastidios de almacén que contienen almidón como sustancia de reserva energética.

1. Sobre una lámina portaobjeto colocar una gota de Lugol.
2. Agregar un trozo delgado de papa.
3. Cubrir la muestra con una laminilla.
4. Observar al microscopio con objetivo de menor y mayor aumento.

**6. Resultados:**

MUESTRAS	OBSERVACIÓN DE MITOCONDRIA Y PLASTIDIOS		
	OBJETIVO 10X	OBJETIVO 40X	OBJETIVO 100X
Epitelio bucal			
Hoja de elodea			





MUESTRAS	OBSERVACIÓN DE MITOCONDRIA Y PLASTIDIOS		
	OBJETIVO 10X	OBJETIVO 40X	OBJETIVO 100X
Ají amarillo			
Zanahoria			
Betarraga			
Papa			

**7. Conclusiones:**



### Cuestionario

1. ¿Qué indica la teoría endosimbiótica respecto al origen de las mitocondrias?
2. ¿En qué etapa ocurre específicamente los procesos de descarboxilación en la matriz mitocondrial?
3. ¿Por qué las mitocondrias fijan el Verde de Janus?
4. ¿Qué función cumplen los plastidios en las células vegetales?
5. ¿Cuáles son las etapas de la fotosíntesis?

### Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Audesirk G. Byers B. Biología la Vida en la Tierra. 9<sup>na</sup> ed. España: Pearson Educación; 2013.
- Estructuras de las Células Vegetales [en línea [Consulta: 21 de febrero de 2017]]. Disponible en web:  
<http://www.ck12.org/book/CK-12-Conceptos-Biolog%C3%ADa/section/2.10/>

## SEMANA 8: EVALUACION PARCIAL



## SEMANA 9: Guía de práctica N° 7

### EXTRACCION Y ANALISIS DEL ADN

Sección : ..... Docente: .....  
Fecha : ...../...../..... Duración: 4 horas

**Instrucciones:** Leer con previsión la presente Guía de práctica a fin de interpretar los procesos que se llevaran a cabo en la práctica.

#### 1. Objetivos

- Obtener ADN de muestras biológicas.
- Purificar y evaluar la composición de bases nitrogenadas del ADN obtenido.
- Interpretar la información obtenida.

#### 2. Fundamento Teórico

##### INTRODUCCIÓN

La biología molecular es una de las herramientas más útiles de las que se vale hoy en día la ciencia y la medicina moderna. La obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN), es el punto de partida para la mayoría de análisis genéticos; incluso contando con pequeñas cantidades. El ADN se encuentra en el interior del núcleo de todas las células, disperso y muy replegado, unido a proteínas para formar la cromatina. Por lo tanto, podremos extraerlo a partir de prácticamente cualquier material de origen biológico. La extracción de ADN requiere una serie de etapas básicas. En primer lugar, tienen que romperse la pared celular y la membrana plasmática para poder acceder al núcleo de la célula. A continuación, debe romperse también la membrana nuclear para dejar libre el ADN. Por último, hay que proteger el ADN de enzimas que puedan degradarlo y para aislarlo hay que hacer que precipite en alcohol. El objetivo de los pasos de purificación es separar el DNA de materiales contaminantes, como RNA y proteínas. Para lo cual es necesario homogeneizar el tejido disgregándolo y separando sus células y demás componentes, luego romper las células para separar el núcleo y romper éste para liberar el ADN, separarlo de las proteínas y precipitarlo para separarlo de la solución acuosa. El ADN (y también algo de ARN) aparecerá entonces como un agregado de fibras blanquecinas de aspecto mucoso que se adhieren a una varilla de vidrio o a la pipeta.

##### Espectro de absorción de bases nitrogenadas:

Debido a que la absorbancia es proporcional al grosor de una muestra y la concentración de la sustancia en ésta, es necesario analizar la longitud de onda ( $\lambda$ ) adecuada para cada muestra, en nuestro caso para cada nucleótido. Como cada sustancia tiene unas propiedades espectrales únicas, distintas sustancias producen distintos espectrogramas. Esto se debe a que cada sustancia tiene un arreglo de átomos tridimensional particular que hace que cada sustancia tenga características únicas. Al ser expuestos a la luz del espectrofotómetro, algunos electrones de los átomos que forman las moléculas absorben energía entrando a un estado alterado.



Muestra	B	1	2	3
Adenina	.....	0.2	.....	.....
Citosina	.....	.....	0.2	.....
Guanina	.....	.....	.....	0.2
Agua destilada	3.0	2.8	2.8	2.8

**Tabla 1.** Componentes de mezcla de cada tubo trabajado a medir su absorbancia.

Al recuperar su estado original, la energía absorbida es emitida en forma de fotones. Esa emisión de fotones es distinta para cada sustancia, generando un patrón particular, que varía con el largo de onda usado. Dependiendo del largo de onda, será la cantidad de energía absorbida por una sustancia, lo que logra generar un espectro particular al graficar Abs vs.  $\lambda$ . Denominamos espectro de una sustancia a la representación de absorbancia (A) en función de longitud de onda ( $\lambda$ ), este gráfico presenta ondulaciones con máximos y mínimos. Para hacer las determinaciones cuantitativas se elige, en general, la longitud de onda correspondiente a un máximo, pues el error de medición es mínimo y la sensibilidad máxima. Estos se muestran en la tabla siguiente:

$\lambda$ (nm)	Adenina	Citosina	Guanina
235	1.395	0.206	0.600
240	1.833	0.233	0.794
245	2.20	0.310	0.845
250	2.32	0.450	0.800
255	2.39	0.620	0.690
260	2.42	0.820	0.600
265	2.36	0.999	0.580
270	2.22	1.090	0.579
275	1.99	1.074	0.556
280	1.468	0.901	0.483

**Tabla 2.** Espectro de absorción de bases.

#### Interpretación:

- La gráfica para la adenina (en rojo) mostrará un pico máximo a una longitud de onda de 260, con un absorbancia máxima de 2.42.



- La gráfica para la citosina (en celeste) mostrará un pico máximo a una longitud de onda de 260, con un absorbancia máxima de 1.090.
- La gráfica para la guanina (en marrón) mostrará un pico máximo a una longitud de onda de 260, con un absorbancia máxima de 0.845.

### Análisis espectrofotométrico del DNA

Los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de las cadenas de DNA. La absorción de UV de DNA es una característica de la molécula, que es usada eficientemente para determinar su concentración. Cada una de las bases tiene su propio y único **espectro de absorción** y por lo tanto contribuye de manera diferente a la propiedad total de absorción de UV de una molécula de DNA.

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos:

Ítem	Materiales	Característica	Cantidad
1	Incubadora	A 58°C	1
2	Espectrofotómetro	Con 5 cubetas	1
3	Centrífuga	5000 rpm	
4	Balanza		1
5	Termómetro	0 - 50 ° C	1

#### 3.2. Materiales

Ítem	Materiales	Característica	Cantidad
1	Mortero con pilón	Porcelana	1
2	Beaker	25, 50, 100 ml	3
3	Gasa estéril	paquete	1
4	Tubos de ensayo	con gradilla	5
5	Bagueta de vidrio		1
6			

#### 3.3. Reactivos

Ítem	Reactivos	Característica	Cantidad
1	Solución A: NaCl + EDTA	En frasco etiquetado	100ml
2	Solución B: NaCl 15M	En frasco etiquetado	100ml
3	Solución C: NaCl 0,1M + Citrato de Na 0.01M	En frasco etiquetado	100ml
4	Solución de LISIS: SDS 1% + EDTA 0.3% + NaCl 0.9%	En frasco etiquetado	100ml
5	Cloroformo	En frasco	50ml
6	Alcohol isoamílico		100ml



7	EDTA		50ml
8	SDS		20ml
9	Etanol	En frasco	100ml
10	Etanol frio	En frasco	100ml
11	Hielo	En bandeja	5 vasitos
12	NaOH	En frasco	1N

**OJO:** los estudiantes deberán traer las gónadas de *Argopecten*: conchas de abanico del mercado frescas, y 25 g de *Pisum sativum*: arvejas congeladas. Dejar en la refrigeradora de la universidad hasta la realización de la práctica.

#### 4.PROCEDIMIENTO Y RESULTADOS

##### A. Extracción del DNA de gónadas de *Argopecten*:

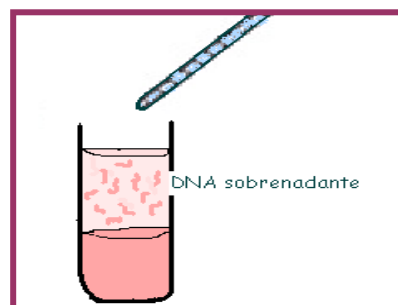
**1. Homogenización** de la muestra en un mortero, provocando la lisis celular, con la adición de 20 ml de la solución "A": NaCl y EDTA que permite la inactivación de las nucleasas evitando así algún daño al DNA por esta enzima.

**2.Resuspensión** del precipitado, pasarlo a un beaker de 25 ml y adicionar 5mL de la solución "A" y 0.5ml de SDS, permitirá obtener una mayor solubilización de las membranas por acción de este detergente.

**3.Desproteizado** de la mezcla, empleando altas concentraciones de sales: solución "B", 10 ml, crea un medio hipertónico en el cual el agua de la superficie de las proteínas será retirada por la sal provocando su precipitación.

**4.Separación del DNA**, adicionar a la mezcla final solventes orgánicos como cloroformo 10ml y 10 ml de alcohol isoamílico permitirá precipitar proteínas del sobrenadante y evitar la formación de espuma respectivamente.

**5.Concentración del ácido nucleico**, luego de una centrifugación, al adicionar etanol frío se obtendrá una mezcla donde el DNA se encuentra en la superficie de esta, debido a que las combinaciones de las sales con el ácido nucleico forman complejos que presentan una solubilidad muy baja en el alcohol. La extracción del DNA en forma de fibras se transportan a una solución "C" (NaCl 0,1M y citrato de Na 0.01M ) para su disolución .



##### B. Extracción de DNA de *Pisum sativum*

**1.Se homogenizan** en el mortero 12 gr. de muestra congelada de *Pisum sativum* con 25 ml de solución Lisis (SDS 1%, EDTA 0.3 %, NaCl 0.9 %) por un tiempo máximo de 5 minutos. Ello nos permitirá lisar las membranas: cuando el detergente (SDS) 0.5 ml, entra en contacto con la célula, captura los lípidos y las proteínas de la membrana lo cual libera el ADN, además inhibe cualquier actividad nucleasa en la preparación; Se añade 5ml de EDTA, que es un

agente quelante que actúa removiendo traza de metales necesarios por endonucleasas para actuar. De esta manera se previene que las endonucleasas que están presentes en el citoplasma de la célula actúen degradando el DNA.

**2. Se transvasa** el homogenizado a un beaker y se incuba a 58 °C por un tiempo de 15 minutos para terminar de lisar al máximo las membranas y liberar el DNA. El calor suavizará los fosfolípidos (grasas) en las membranas que rodean la célula y el núcleo. También desactivará (desnaturaliza) a las enzimas desoxirribonucleasas (ADNasas) las cuales, si están presentes, pueden cortar el ADN en pedazos tan pequeños que lo haría imposible de ver. Si las enzimas se desnaturalizan y el ADN se desenrolla, éste pierde su forma y se vuelve inactivo. Después, enfriamos el beaker durante 10 minutos a 2 °C, asegurando el estado del DNA.

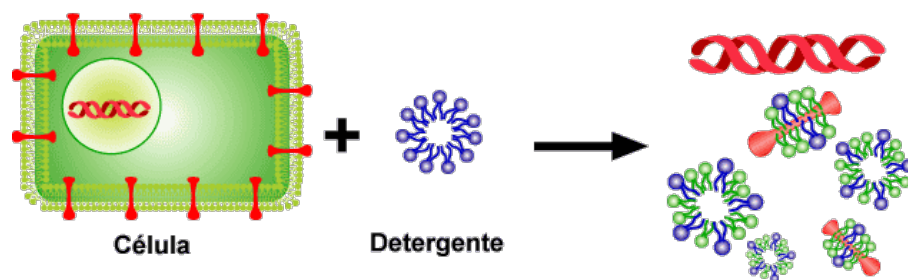
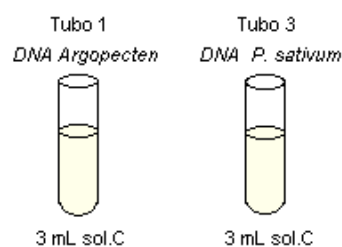


Fig 1. Cuando el detergente entra en contacto con la célula, captura los lípidos y las proteínas lo cual libera el ADN.

**3. Se filtra** la solución utilizando gasa estéril. Se precipita el DNA de la solución obtenida empleando 2 volúmenes de etanol frío, el que competirá con el DNA por el agua, deshidratándolo y llevándolo al fondo del tubo. Esto debe ser de forma lenta y por las paredes del beaker. El ADN precipita en la interfase de agua y alcohol (la interfase es la zona entre el agua y el alcohol). Por esto, es crucial verter el alcohol muy despacio de manera que forme una capa sobre la solución acuosa. Si el alcohol se mezcla con el agua, este se diluye demasiado y el ADN no se precipitará. De esta manera, se observará el DNA en forma de filamentos los que serán recuperados con ayuda de una bagueta delgada girando en sentido horario en forma continua. Una vez obtenidas las fibras de DNA, se colocan en un tubo de ensayo con solución C (NaCl 0.1 M y Citrato de Sodio 0.01 M) realizando movimientos circulares en sentido contrario al empleado para extraerlo (antihorario).

#### Análisis espectrofotométrico del ADN:

A. Preparar 3 mL de una solución de DNA y solución C (NaCl 0.1 M y Citrato de Sodio 0.01 M) en la proporción de 1:10, para las muestras de DNA de *Argopecten* y *Pisum sativum*.



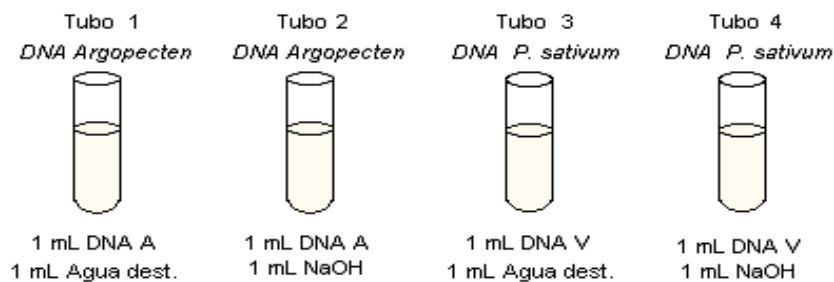
Luego llevar espectrofotómetro registrando las lecturas:



Absorbancia	Tubo 1	Tubo 3
1:10 a 260nm		
1:3 a 260 nm		

Si los valores de absorbancia para ambos tubos no alcanzan el rango de 0.500 se procede a obtener unas nuevas diluciones de las muestras, esta vez en una proporción de 1:3 para una solución de 3 mL de DNA y sol. C, las lecturas deberían estar en el rango pedido.

B. A partir de estos DNA, preparamos tubos de 2 ml cada uno, a dos de los cuales se agregará Hidróxido de sodio 1N y agua destilada a los otros dos de acuerdo al esquema, con el propósito de llevar el DNA de un estado nativo (doble cadena) a un estado denaturado (cadena simple).



Medir las absorbancias de los tubos 2 y 4 a 260 nm; y los tubos 1 y 3 a 280 nm, registrar las lecturas:

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
A <sub>260</sub>				
A <sub>280</sub>		---		---

Conservar los datos para el taller de evaluación del ADN, la siguiente semana.

## 6. Conclusiones

### Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Salomon E, Berg L, Martin D. Biología. 5<sup>ta</sup> ed. México: McGraw-Hill, Interamericana; 2001.
- Herencia de los Grupos Sanguíneos [en línea. [Consulta: 20 de febrero de 2017]]. [http://ficus.pntic.mec.es/rmag0063/recursos/php/grupos\\_sanguineos/los\\_grupos\\_sanguineos.php](http://ficus.pntic.mec.es/rmag0063/recursos/php/grupos_sanguineos/los_grupos_sanguineos.php)





## SEMANA 10: TALLER DE EVALUACION DEL ESTADO DEL ADN

Sección : ..... .Docente: .....

Fecha : ...../...../.....

Duración: 4 horas

**Instrucciones:** Leer con previsión la presente Guía de práctica a fin de interpretar los procesos que se llevarán a cabo en la práctica.

### 1. Objetivos

- Analizar el estado de desnaturalización, de concentración y grado de pureza del ADN obtenido en la práctica anterior.

### 2. Fundamento Teórico

La biología molecular es una de las herramientas más útiles de las que se vale hoy en día la ciencia y la medicina moderna. La obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN), es el punto de partida para la mayoría de análisis genéticos; incluso contando con pequeñas cantidades. El ADN se encuentra en el interior del núcleo de todas las células, disperso y muy replegado, unido a proteínas para formar la cromatina. Por lo tanto, podremos extraerlo a partir de prácticamente cualquier material de origen biológico. La extracción de ADN requiere una serie de etapas básicas. En primer lugar, tienen que romperse la pared celular y la membrana plasmática para poder acceder al núcleo de la célula. A continuación, debe romperse también la membrana nuclear para dejar libre el ADN. Por último, hay que proteger el ADN de enzimas que puedan degradarlo y para aislarlo hay que hacer que precipite en alcohol. El objetivo de los pasos de purificación es separar el DNA de materiales contaminantes, como RNA y proteínas. Para lo cual es necesario homogeneizar el tejido disgregándolo y separando sus células y demás componentes, luego romper las células para separar el núcleo y romper éste para liberar el ADN, separarlo de las proteínas y precipitarlo para separarlo de la solución acuosa. El ADN (y también algo de ARN) aparecerá entonces como un agregado de fibras blanquecinas de aspecto mucoso que se adhieren a una varilla de vidrio o a la pipeta.

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

- Equipo de multimedia y pizarra para el análisis de los datos.
- Cuadernos de apunte con las anotaciones de la práctica anterior.

### 4. Procedimiento y resultado

#### A. Estado del DNA

La desnaturalización de una molécula de ADN de doble cadena implica la separación de las dos hebras. Esto se consigue aumentando el pH hasta niveles en los que todas las bases se encuentren desprotonadas y, por tanto, no se establezcan puentes de hidrógeno. Este método permite obtener dos moléculas de ADN de cadena sencilla sin conformación alguna en la que no hay puentes de hidrógeno ni apilamiento de bases, partiendo de una doble hélice.



Realiza los siguientes cálculos de la desnaturalización del ADN con los resultados obtenidos la práctica anterior:

**DNA Argopecten:**

Abs 260 tubo 1	100%		
Abs 260 tubo 2	x	X =	%

Si hay un exceso sobre el 100%, se deduce que el DNA Argopecten del tubo 1 ya se encontraba denaturado, de lo contrario estaba en estado nativo.

**Resultado:** \_\_\_\_\_

**DNA Pisum sativum:**

Abs 260 tubo 3	100%		
Abs 260 tubo 4	x	X =	%

Si hay un exceso sobre el 100%, se deduce que el DNA Pisum sativum del tubo 3 ya se encontraba denaturado, de lo contrario estaba en estado nativo.

**Resultado:** \_\_\_\_\_

**B. Concentración de DNA**

**DNA Argopecten:**

Se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{1 \text{ mg/ml DNA}}{x} = \frac{27 \text{ unidades } A_{260}}{0.331 \text{ unidades } A_{260}} \quad X = 12.26 \times 10^{-3} \text{ mg/ml DNA}$$

El tubo 1 contenía 3 mL de Sol.C:

1 ml Sol.C	12.26 x 10 <sup>-3</sup> mg/ml DNA	
3 ml Sol.C	X	mg/ml DNA      Donde X=

Como el DNA se obtuvo de una muestra de 5 mL:

1 mL	X =	mg/ml DNA
5 mL	Y =	mg DNA

La concentración de DNA Argopecten es de 12.26 x 10<sup>-3</sup> mg/ml DNA obtenido de una muestra de Y = mg DNA.

**DNA Pisum sativum:**

Se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{1 \text{ mg/ml DNA}}{x} = \frac{20 \text{ unidades } A_{260}}{0.204 \text{ unidades } A_{260}} \quad X = 10.20 \times 10^{-3} \text{ mg/ml DNA}$$



El tubo 1 contenía 3 mL de Sol.C:

1 ml Sol.C	$10.2 \times 10^{-3}$ mg/ml DNA	
3 ml Sol.C	<b>X</b> mg/ml DNA	Donde <b>X</b> =

Como el DNA se obtuvo de una muestra de 5 mL:

1 mL	<b>X</b> mg/ml DNA	
5 mL	<b>Y</b> mg DNA	Donde <b>Y</b> =

Se obtuvo de una muestra de **Y** = \_\_\_\_\_ mg DNA *Pisum sativum* una solución con una concentración de  $10.2 \times 10^{-3}$  mg/ml DNA.

### C. Grado de Pureza

El cociente  $A_{260}/A_{280}$  da una estimación de la pureza de los ácidos nucleicos: una preparación pura de DNA tiene un valor de  $A_{260}/A_{280}$  de 1,8 y 2,0 respectivamente. Valores significativamente menores indican contaminación con proteínas y por consiguiente, no será posible cuantificar con precisión la cantidad de ácidos nucleicos.

#### Determinación de impurezas en DNA *Argopecten*:

$$A_{260} \ 0.331 / A_{280} \ 0.158 =$$

Resultado indica: \_\_\_\_\_

#### Determinación de impurezas en DNA *Pisum sativum*:

$$A_{260} \ 0.204 / A_{280} \ 0.134 =$$

Resultado indica: \_\_\_\_\_

## 5. Conclusiones

### Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- De Robertis EDP, Ponzio, HIB. Biología Celular y Molecular. 15<sup>ava</sup> ed. Buenos Aires: El Ateneo; 2003.
- López AM. Manual de Bioquímica y Biología Molecular. México: McGraw-Hill Interamericana;2000.
- Panduro, A. Biología Molecular en la Clínica. México: McGraw-Hill Interamericana; 2000.



## SEMANA 11: TALLER DE PROBLEMAS SOBRE ADN

Sección : ..... .Docente: .....

Fecha : ...../...../..... Duración: 4 horas

**Instrucciones:** Los estudiantes deberán leer con anticipación la información dispuesta para el taller.

### 1. Objetivos

. Resolver problemas aplicativos sobre los conocimientos obtenidos las últimas dos semanas.

### 2. Fundamento Teórico

La biología molecular es una de las herramientas más útiles de las que se vale hoy en día la ciencia y la medicina moderna. La obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN), es el punto de partida para la mayoría de análisis genéticos; incluso contando con pequeñas cantidades. El ADN se encuentra en el interior del núcleo de todas las células, disperso y muy replegado, unido a proteínas para formar la cromatina.

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

- Equipo de multimedia y pizarra para el análisis de los datos.
- Cuadernos de apunte con las anotaciones de la práctica anterior.

### 4. Procedimiento y resultado

Teniendo en cuenta los conocimientos adquiridos en las dos prácticas anteriores y en la teoría, resolver los siguientes problemas:

1. En el DNA de ciertas células bacterianas, el 13% de los nucleósidos son adenosina ¿Cuáles son los porcentajes de los otros nucleósidos?
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
2. El DNA del bacteriófago M13 tiene la siguiente condición de bases: 23 % A, 36 % T, 21 % G, 20 % C. ¿Qué puede deducir del DNA de este fago?



3. Calcular la longitud de un dúplex de DNA cuyo peso molecular es de  $3 \times 10^7$ . Cuál es el volumen ocupado por una molécula de ese DNA. Cuántas vueltas helicoidales contiene ese DNA.

**Sabiendo que:  $PM = 3 \times 10^7$  gr/mol,  $PM_{pb} = 618$  gr/mol y N° de pb por vuelta 10**

4. El peso molecular del DNA del bacteriófago T4 de doble cadena es  $1.3 \times 10^8$ .

a) ¿cuántos aminoácidos pueden ser codificados por el DNA del T4?

b) ¿Cuántas proteínas diferentes de peso molecular 55.000 puede ser codificado por DNA T4?

**Sabiendo que:**

333 aa = 1 proteína de 37 000 daltons

495 aa = 1 proteína de 55,000 daltons

5. La longitud del DNA de una célula humana haploide es de  $3.3 \times 10^9$  pares de bases (pb). Asumiendo que todo se encontrase en forma de doble hélice de tipo B. ¿Calcular cuál sería su longitud en metros?

#### Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- MANUAL DE PRÁCTICAS DE BIOLOGÍA [en línea]. [Consulta: 07 de agosto de 2016]. Disponible en web: [www.serbi.ula.ve/serbiula/librose/pva/.../ManualBiologia.pdf](http://www.serbi.ula.ve/serbiula/librose/pva/.../ManualBiologia.pdf)



## SEMANA 12: TALLER DE ESTUDIO DE CASOS

Sección : ..... .Docente: .....

Fecha : ...../...../.....

Duración: 4 horas

**Instrucciones:** Leer con previsión la presente Guía de práctica a fin de interpretar los procesos que se llevarán a cabo en la práctica.

### 1. Objetivo

- Analizar el estado de desnaturalización, de concentración y grado de pureza del ADN obtenido en la práctica anterior.

### 2. Fundamento teórico

La biología molecular es una de las herramientas más útiles de las que se vale hoy en día la ciencia y la medicina moderna. La obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN), es el punto de partida para la mayoría de análisis genéticos; incluso contando con pequeñas cantidades. El ADN se encuentra en el interior del núcleo de todas las células, disperso y muy replegado, unido a proteínas para formar la cromatina.

### 3. Procedimiento

- A. Se procederá a la formación de grupos de máximo 5 estudiantes.
- B. Cada grupo asumirá uno de los siguientes temas:
  - a. Radicales libres como causa de envejecimiento.
  - b. Defectos de los canales iónicos y transportadores en la producción de enfermedades.
  - c. Trastornos por defectos en la actividad lisosómica.
  - d. Consecuencias del sistema de reparación del ADN.
- C. Los estudiantes de cada grupo deberán investigar sobre el tema asignado y preparar el material necesario para la exposición de sus resultados en la clase práctica.

### 4. Conclusión

#### Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

De Robertis EDP, Ponzio, HIB. Biología Celular y Molecular. 15<sup>ava</sup> ed. Buenos Aires: El Ateneo; 2003.

López AM. Manual de Bioquímica y Biología Molecular. México: McGraw-Hill Interamericana; 2000.



## SEMANA 13: TALLER DE INTRODUCCION A LA TRANSFORMACION BACTERIANA

Sección : ..... .Docente: .....

Fecha : ...../...../..... Duración: 4 horas

**Instrucciones:** Leer con previsión la presente Guía de práctica a fin de interpretar los procesos que se llevaran a cabo en la práctica.

### 1. Objetivos

- Aprender las bases teóricas de la transformación bacteriana en el laboratorio de biotecnología.
- Realizar los pasos de preparación a la transformación bacteriana.

### 2. Fundamento teórico

En esta práctica vas a realizar un procedimiento denominado **transformación genética**. Recuerda que un gen es un fragmento de ADN que codifica una proteína, la cual proporciona al organismo una determinada característica. Transformación genética literalmente significa cambio originado por genes, e implica la inserción de un gen en un organismo para modificar alguna de las características del organismo. La transformación genética se utiliza en muchas áreas de la biotecnología. En agricultura, se pueden introducir por transformación en las plantas los genes que codifican características como la resistencia al frío, a los pesticidas o a la sequía. En biodegradación, las bacterias se pueden transformar con genes que las hagan capaces de digerir los vertidos accidentales de petróleo. En **medicina**, las enfermedades originadas por genes defectuosos se están empezando a tratar con terapia génica, mediante la transformación de las células del paciente con copias del gen, que carecen de la anomalía que produce la enfermedad.

Se usará un **protocolo para transformar bacterias** con un gen que codifica una proteína denominada GFP (Green Fluorescent Protein). La fuente natural de este gen es una medusa fosforescente llamada *Aequorea victoria*, en el cual la GFP es la responsable de que la medusa brille o emita fluorescencia en la oscuridad. Después de la transformación, las bacterias expresan el gen de la medusa y sintetizan la proteína, lo que les permite emitir un color verde brillante cuando son expuestas a luz ultravioleta.

En esta práctica, aprenderás el proceso de transferir genes de un organismo a otro mediante un plásmido. Además de un cromosoma, las bacterias suelen contener uno o más pequeños fragmentos de ADN denominados plásmidos. Un plásmido suele contener genes que favorecen la supervivencia bacteriana. En la naturaleza, las bacterias pueden transferirse estos plásmidos para compartir sus genes beneficiosos o ventajosos. Este mecanismo permite a las bacterias adaptarse a nuevos ambientes. El reciente incremento de la resistencia bacteriana se debe a la transmisión de plásmidos.

El plásmido pGLO de BioRad contiene el gen para la síntesis de la proteína GFP y un gen de resistencia al antibiótico ampicilina. pGLO también contiene un sistema especial de regulación de genes que se puede usar para controlar la expresión de la proteína fluorescente en las células transformadas. El gen para sintetizar GFP se puede activar en las células transformadas simplemente añadiendo arabinosa al medio de cultivo. La selección



de las células que se han transformado con el plásmido pGLO se realiza observando el crecimiento en placas con antibiótico. Las células transformadas aparecerán blancas (fenotipo salvaje) en placas que no contengan arabinosa, y de color verde fluorescente cuando se añada arabinosa al agar.

Tendrás a tu disposición los materiales y protocolos para realizar la transformación. Tus tareas serán:

1. Realizar la transformación.
2. Determinar el grado de éxito obtenido en la alteración genética del organismo.

## INDICACIONES PRINCIPALES

Lo más importante es que los estudiantes añadan los compuestos adecuados en los tubos y placas correspondientes. Por ello, la rotulación de los tubos y la organización previa de la práctica es esencial para que ésta se lleve a cabo correctamente.

### Técnicas básicas de laboratorio

#### Técnica de esterilización

En cualquier técnica microbiológica es imprescindible no introducir bacterias contaminantes en el experimento. Dado que las bacterias contaminantes se encuentran en todas partes (los dedos, la mesa, etc.) es importante evitar que el material entre en contacto con esas superficies. Cuando los estudiantes estén trabajando deben evitar tocar el extremo del asa de siembra, la punta de la pipeta y el agar de la placa y asimismo deben evitar que entren en contacto con cualquier superficie contaminada. En todo momento conservar las condiciones de esterilidad.

#### Uso de la pipeta

Antes de comenzar la práctica, explicar a los estudiantes el manejo de las pipetas, haciendo hincapié en su graduación. Se emplearán volúmenes de 100 y 250  $\mu$ l, y también de 1 ml.

#### Trabajar con E. coli

El organismo utilizado en este kit, una cepa de E. coli K-12, el vector que contiene la proteína recombinante GFP, y las células transformadas que se forman por combinación de los anteriores, no son organismos patógenos como por ejemplo el E. coli O157:H7, que es conocido por su implicación en toxiinfecciones alimentarias. Sin embargo, el manejo del E. coli K-12 del kit debe hacerse según las normas estándar de seguridad microbiológica. Entre ellas podemos citar: Las superficies de trabajo se desinfectan antes de empezar la práctica y cada vez que se produzca un derrame accidental. Todos los residuos líquidos o sólidos deben ser desinfectados antes de tirarse, sumergiéndolos en la solución de lejía al 1%. **Se deben lavar las manos:** (i) después de manejar material con moléculas de ADN recombinante, y (ii) antes de salir del laboratorio. Todos los procedimientos se realizarán con precaución para minimizar la formación de aerosoles. Se utilizarán pipeteadores manuales, estando prohibido pipetear con la boca. Está prohibido comer, beber, fumar y aplicarse cosméticos en la zona de trabajo. Se recomienda el uso de gafas protectoras y guantes.

#### Desinfección y eliminación del material

Si no se dispone de autoclave, todas las soluciones y material (asas de siembra y pipetas) contaminados se dejan en una solución de lejía al 10% durante al menos 20 minutos. Se debe





situar un recipiente con esta solución desinfectante en cada puesto de trabajo. Todas las asas de siembra y pipetas se deben esterilizar. Las placas Petri se esterilizan cubriendo el agar con la solución de lejía al 10% durante 1 hora o más, y eliminando luego el líquido por la pila. Después, las placas envueltas en bolsas dobles se pueden depositar en la basura. Se recomienda el uso de gafas de seguridad cuando se aplique la solución de lejía.

### Lámparas ultravioleta

La radiación UV puede dañar los ojos y la piel. La luz UV de onda corta es más dañina que la de onda larga. La lámpara de UV recomendada por BioRad es de onda larga. Si es posible, usar gafas protectoras de seguridad.

### Incubación

Este protocolo está diseñado para usar una estufa a 37 °C. La transformación se puede realizar sin usar la estufa, pero entonces el número de días necesarios para que crezcan las colonias dependerá de la temperatura ambiental. Los mejores resultados se observan con cultivos de 24-48 horas y con colonias con medidas de 1 -1.5 mm de diámetro. La refrigeración de las placas reducirá significativamente la eficacia de la transformación. La temperatura óptima de crecimiento de E. coli es de 37 °C y temperaturas inferiores producirán una tasa de crecimiento menor. A 28 °C se necesitan 2 días de incubación para obtener colonias de tamaño adecuado. A 21 °C son necesarios 3 días de incubación.

### Indicaciones metodológicas

#### Técnicas básicas

- **Transferencia de colonias bacterianas de las placas de agar a los tubos.** Al coger una colonia de las placas de cultivo, se puede caer en la tentación de coger más células de las necesarias. Conviene recordar que una sola colonia de 1 mm de diámetro contiene millones de células.
- **Transferencia de ADN** La transferencia del plásmido desde el tubo a la solución de transformación es crucial. Los estudiantes deben mirar atentamente al asa de siembra para comprobar que hay una fina película de la solución plasmídica en el anillo. Es similar a una película de jabón en un aro para hacer pompas de jabón.
- **Choque térmico.** El procedimiento utilizado para favorecer la captación de ADN extraño se denomina choque térmico. Es importante que los estudiantes sigan los tiempos recomendados. También es importante el cambio brusco de temperatura y la duración del choque térmico. Para obtener óptimos resultados, los tubos con la suspensión celular se deben sacar directamente del hielo, situarlos en un baño a 42 °C durante 50 segundos y ponerlos inmediatamente en hielo otra vez. Por ejemplo, si no hay choque térmico se producirán una décima parte de transformaciones, o si la duración del choque es de 90 segundos se obtendrán la mitad de transformaciones que con 50 segundos.
- **Siembra de las células transformadas y células control** La adición de demasiado medio de transformación a las placas es contraproducente ya que las placas no pueden absorber el exceso de líquido y la siembra será desigual. El paso de la suspensión bacteriana de los tubos a las placas Petri se debe hacer con cuidado. Las bacterias se depositan en el fondo de los tubos, por lo que los alumnos deben agitar los tubos. Para



ello debe coger la parte superior del tubo con los dedos pulgar e índice y se debe golpear ligeramente el fondo del tubo con el dedo índice de la otra mano. Asegúrate de que los alumnos golpean el tubo con el dedo o bien agiten la suspensión con la pipeta antes de la siembra. También debes asegurarte de que los alumnos tapen las placas Petri una vez hayan realizado la extensión de la suspensión bacteriana.

- **Almacenamiento** debes conservar las bacterias transformadas con pGLO en placas de LB/amp/ara. Lo mejor es almacenar las placas con el medio hacia arriba en un sitio frío, como la nevera. Esto mantendrá vivas a las células pero impedirá que crezcan hasta que las necesites. Almacenar las placas boca abajo evita que la humedad se condense y caiga sobre las colonias. Las placas se deben utilizar en un plazo de 2 -4 semanas. Si se van a almacenar más tiempo, se deben precintar con Parafilm para evitar su deshidratación

### Indicaciones teóricas

- **Medios de cultivo** Los medios de cultivo líquidos y sólidos denominados caldo LB (Luria y Bertani) y agar LB, se elaboran a partir de un extracto de levaduras y productos de degradación enzimática de la carne, por lo que contienen una mezcla de carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos, sales y vitaminas adecuados para el crecimiento bacteriano. El agar, que es un polisacárido de algas, es líquido cuando se calienta y solidifica cuando se enfría, proporcionando un soporte sólido para el crecimiento de las bacterias.
- **Selección del antibiótico** El plásmido pGLO contiene, además de la proteína GFP, el gen para la producción de betalactamasas, lo que hace a la bacteria portadora de este gen ser resistente a la ampicilina. Las betalactamasas son enzimas producidas y excretadas por las bacterias que contienen estos plásmidos. Las betalactamasas inactivan la ampicilina presente en el agar LB, permitiendo el crecimiento bacteriano. Únicamente las bacterias transformadas con el plásmido y que expresan las betalactamasas sobrevivirán en las placas que contienen ampicilina. Sólo un reducido porcentaje de células captan el plásmido. Las células que no se transforman no pueden crecer en las placas con ampicilina.
- **Solución de transformación** Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en la solución ( $\text{CaCl}_2$  50 mM, pH 6.1) neutralizan la repulsión entre las cargas negativas de los grupos fosfato del ADN y los fosfolípidos de la membrana celular, permitiendo la entrada del ADN en las células.
- **Choque térmico** El choque térmico aumenta la permeabilidad de la membrana celular al ADN. Aunque se desconoce por qué, se sabe que la duración del choque térmico es crítica para el proceso, por lo que se ha optimizado para el tipo de bacteria y condiciones utilizadas.
- **Recuperación** Los 10 minutos de incubación después de la adición del caldo LB permite a las células crecer y expresar la betalactamasa que proporciona la resistencia a ampicilina, y así las células transformadas sobreviven en las placas con ampicilina. La incubación puede realizarse "overnight" a temperatura ambiente o en la estufa a 37 °C, para así aumentar hasta 10 veces la eficacia de la transformación.



- **Regulación del gen pGLO** La expresión génica está estrechamente regulada en todos los organismos para permitir la adaptación a diferentes condiciones y para evitar una superproducción de proteínas innecesarias. Los genes implicados en la degradación de los diferentes nutrientes son un buen ejemplo de genes con una alta regulación. Por ejemplo, la arabinosa es una fuente de energía y de carbono para la bacteria. Los genes bacterianos que codifican las enzimas para degradar la arabinosa no se expresan cuando no hay arabinosa en el medio. Pero cuando hay arabinosa, los genes se activan, volviéndose a inactivar cuando se agota la arabinosa. La arabinosa inicia la transcripción de estos genes induciendo la unión de la ARN polimerasa. En el plásmido modificado genéticamente pGLO, algunos de los genes implicados en la degradación de la arabinosa han sido sustituidos por los genes que en la medusa codifican la proteína GFP. Cuando las bacterias transformadas con el plásmido pGLO están creciendo en presencia de arabinosa, el gen GFP se activa y las bacterias emiten un color verde brillante cuando se exponen a luz ultravioleta.

Este es un excelente ejemplo del dogma central de la biología:

**ADN → ARN → PROTEÍNA → CARACTERÍSTICA**

- En ausencia de arabinosa en el medio, el gen GFP permanece inactivado y las colonias bacterianas son de color blanco. Se recomienda hacer un análisis y descripción más detallada de la regulación génica y de la función de la arabinosa como promotor.

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos:

Ítem	Materiales	Característica	Cantidad
1	cocinilla		1
2	Agitador de tubos		
3			

#### 1.1. Materiales

Ítem	Materiales	Característica	Cantidad
1	Matraz de erlenmeyer	1 litro	1
2	Agar LB	kit	1
3	Pipeta estéril	5ml	3
4	Placas Petri pequeñas	estériles	20
5	Bagueta de vidrio		1
6	Piceta	con agua destilada	1

#### 1.2. Reactivos

Ítem	Reactivos	Característica	Cantidad
1	Ampicilina	kit	
2	arabinosa	kit	
3	Solución de	CaCl <sub>2</sub> 50mM a pH 6.1	100ml



	transformación:	en frasco rotulado	
4	Rotulador de cera		1
5	Papel parafilm		
6			
7			

**OJO:** los estudiantes deberán traer su EPP completo.

### 3. Procedimiento:

#### Preparación paso 1: 3-7 días antes de la transformación

##### A. Preparar el agar

Las placas se deben preparar al menos 3 días antes de que los alumnos realicen la práctica. Se deben almacenar 2 días a temperatura ambiental y luego bajo refrigeración hasta el momento de su uso. Los dos días a temperatura ambiente secan el agar para favorecer la captación de la solución de transformación (unidad 2 del alumno).

Para preparar el agar, añadir 500 ml de agua destilada a un matraz Erlenmeyer de 1 litro. Añadir el contenido del paquete de agar LB. Agitar el matraz para disolver el agar, y calentar hasta ebullición en el microondas. Volver a agitar y calentar unas tres veces más hasta que el agar se disuelva, teniendo cuidado de dejar enfriar el matraz antes de agitarlo, para evitar que el medio caliente salte a la mano.

Cuando el agar se haya disuelto, dejarlo enfriar hasta que el matraz se pueda tocar sin quemarse (50 °C). Mientras se enfría el agar, etiqueta las placas y prepara la arabinosa y la ampicilina como se indica a continuación. Ten cuidado de que el agar no se enfríe tanto que llegue a solidificar.

##### B. Preparar la arabinosa y la ampicilina

Nota: la arabinosa requiere al menos 10 minutos para disolverse. Ten paciencia.

La arabinosa se encuentra deshidratada en un pequeño vial. Con una pipeta estéril, añade 3 ml de la solución de transformación en el vial para rehidratar el azúcar. Agita el vial, mejor con la ayuda de un vórtex. (Se utiliza la solución de transformación porque está estéril. En su lugar se puede utilizar agua destilada estéril).

La ampicilina también está envasada en un pequeño vial y deshidratada. Con otra pipeta estéril, añade 3 ml de la solución de transformación al vial para rehidratar el antibiótico (Se utiliza la solución de transformación porque está estéril. En su lugar se puede utilizar agua destilada estéril).

**Nota:** Un excesivo calentamiento (> 50 °C) destruye la ampicilina y la arabinosa, y como el agar solidifica a 27 °C se debe controlar el enfriamiento del agar, y luego repartir el agar en las placas de forma continua, sin interrupción. Si se forman muchas burbujas, se pueden eliminar una vez se hayan preparado todas las placas, calentando suavemente el fondo de cada placa con la llama de un mechero Bunsen. Una vez que las placas se han preparado no tocarlas hasta que el agar se haya solidificado. Tira el agar sobrante a la basura, nunca por el fregadero. Limpiar los restos de agar alrededor de las placas.



### C. Rotular las placas

Las 40 placas de agar se deben rotular con un rotulador de tinta indeleble en la base, cerca del borde de la placa. Rotular 16 placas como LB, 16 como LB/amp y 8 como LB/amp/ara.

### D. Añadir el agar LB en las placas

Primero, añadir el agar LB en las placas marcadas como LB. Hacer una torre de entre 4 y 8 placas y con una mano abrir la tapa de la placa inferior sujetando el resto de la torre, mientras que con la otra mano se añade el agar LB. Rellenar la placa entre un tercio y la mitad de su capacidad ( $\approx 12$  ml). Tapar esa placa, y continuar con la placa superior en la torre. Cuando se hayan rellenado todas las placas dejarlas enfriar en esa posición.

A continuación, añadir la ampicilina ya hidratada al agar LB sobrante en el matraz. Agitar el matraz brevemente para mezclarla. Rellenar las 16 placas rotuladas como LB/amp según la técnica descrita antes.

Por último, añadir la arabinosa hidratada al agar LB con ampicilina sobrante en el matraz. Agitar el matraz brevemente para mezclarla y rellenar las 8 placas marcadas como LB/amp/ara utilizando la técnica ya descrita. LB/amp/ara

### E. Almacenar las placas

Después de dejar las placas dos días a temperatura ambiente se pueden utilizar o se pueden almacenar en columnas de hasta 20 placas de altura introduciéndolas en bolsas. Guardar las placas en la nevera de forma invertida y dentro de las bolsas hasta su uso.

## 4. Cuestionario

Los estudiantes en grupos de práctica analizan los fundamentos de la práctica a realizar, respondiendo a las siguientes preguntas:

- ¿Qué es un gen?
- ¿Cuántos genes tenemos los seres humanos? ¿Y cuántos las bacterias?
- Realiza un esquema para explicar el cambio de un gen y sus consecuencias.
- ¿Qué es un protocolo?
- ¿Qué es un vector de transformación y cual utilizaremos en la práctica?
- Realiza un cuadro comparativo entre las características de: plásmido, gen, cromosoma.
- ¿Qué es un cultivo y qué tipos de cultivos existen?
- ¿Qué es el kit pGLO y que contiene?

## 5. Conclusión

### Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- De Robertis EDP, Ponzio, HIB. Biología Celular y Molecular. 15<sup>ava</sup> ed. Buenos Aires: El Ateneo; 2003.
- López AM. Manual de Bioquímica y Biología Molecular. México: McGraw-Hill Interamericana; 2000.

**SEMANA 14: Guía de práctica: TRANSFORMACION BACTERIANA**

Sección : ..... Docente: .....

Fecha : ...../...../.....

Duración: 4 horas

**Instrucciones:** Leer con previsión la presente Guía de práctica a fin de interpretar los procesos que se llevaran a cabo en la práctica.**1. Objetivos**

Realizar la introducción de un gen en la bacteria E. coli, mediante la utilización del kit pGLO.

**2. Fundamento teórico:****Repasar el fundamento teórico y la discusión del taller de introducción.**

Este proceso de transformación presenta tres pasos principales, dirigidos a introducir el plásmido en E. coli, y proporcionar las condiciones adecuadas para que las células expresen los nuevos genes adquiridos.

Para introducir el plásmido pGLO a través de la membrana celular:

1. Usar una solución de transformación de CaCl<sub>2</sub> (cloruro cálcico).
2. Someter las células a un proceso denominado choque térmico. Para que las células transformadas crezcan en presencia de ampicilina:
3. Ponerlas en un medio de cultivo adecuado y someterlas a una corta incubación para que empiecen a expresar los nuevos genes adquiridos.

**3. Equipos, Materiales y Reactivos****3.1. Equipos:**

Ítem	Materiales	Característica	Cantidad
1	Bañomaría	42°C	1
2	Recipiente con lejía en cada mesa	Al 10%	250ml
3	Lámpara UV	Onda larga	1
4	Estufa	a 37°C	1

**1.3. Materiales**

Ítem	Materiales	Característica	Cantidad
1	Asas de siembra		1
2	Pipetas	1 ml, 100 y 250 µl estériles	2 de cada una
3	Gradilla para		1
4	Caja de tecnopor	con hielo picado	5
5	Rotulador		1
6	Termómetro		
7	Tubos eppendorf		2

**1.4. Reactivos**



Ítem	Reactivos	Característica	Cantidad
1	Plásmido rehidratado		1
2	Placas	Agar LB LB/amp LB/amp/ara	1 2 1
3	Solución de transformación:	CaCl <sub>2</sub> 50mM a pH 6.1	100ml
4	Caldo LB	En frasco, licuado, etiquetado	100ml

**OJO:** los estudiantes deberán traer sus EPP completos.

#### 4.PROCEDIMIENTO Y RESULTADOS

1. Rotula un tubo eppendorf como + pGLO y otro como -pGLO. Pon el nombre de tu grupo. Sitúalos en la gradilla de corcho.
2. Abre los tubos y con una pipeta estéril, añade a cada uno 250 µl de la solución de transformación (CaCl<sub>2</sub>).
3. Pon los tubos en hielo.
4. Con un asa de siembra estéril pincha una única colonia de la placa con E. coli. Coge el tubo rotulado como + pGLO e introduce el asa en la solución de transformación, y gira el asa entre tus dedos índice y pulgar hasta que la colonia se disperse en la solución de transformación. Vuelve a dejar el tubo en hielo. Con otra asa estéril, repite el proceso para el tubo -pGLO.
5. Sitúa la solución plasmídica pGLO bajo la luz UV, y anota tus observaciones. Introduce un asa estéril en la solución con el plásmido pGLO, y carga el asa de manera que se observe una capa de la solución en el aro. Es similar a la capa de jabón en un aro para hacer pompas de jabón. Introduce el asa en el tubo +pGLO. Cierra el tubo y vuelve a dejarlo en el hielo. Cierra también el tubo -pGLO, pero sin añadirle solución plasmídica. ¿Por qué?
6. Incubar los tubos en hielo 10 minutos. Asegúrate de poner los tubos en la gradilla de manera que el fondo del tubo esté en contacto con el hielo.
7. Mientras los tubos están en hielo, rotula las 4 placas de agar LB en la base de la siguiente manera:
  - Una placa LB/amp: +pGLO.
  - Una placa LB/amp/ara: +pGLO.
  - Una placa LB/amp: -pGLO.
  - Una placa LB: -pGLO.
8. Choque térmico. Lleva la gradilla con los tubos al baño a 42 °C, y déjala allí durante 50 segundos exactos. Asegúrate de poner los tubos en la gradilla de manera que el fondo del tubo esté en contacto con el agua caliente. Transcurridos los 50 segundos, vuelve a llevar la gradilla con los tubos al hielo. Para mejorar el proceso, el paso del hielo (0 °C) a 42 °C y de nuevo al hielo debe hacerse rápidamente. Incubar los tubos en hielo durante 2 minutos.
9. Sacar la gradilla del hielo y déjala en la mesa. Abre un tubo, y con una nueva pipeta estéril, añade 250 µl de caldo LB al tubo y vuelve a taparlo. Haz lo mismo con el otro tubo, usando otra pipeta estéril. Dejar los tubos 10 minutos a temperatura ambiente.
10. Golpea los tubos con el dedo para mezclar. Con otra pipeta estéril, pasa 100 µl de cada tubo a las placas de agar correspondientes.



11. Usando un asa de siembra estéril para cada placa, extiende la suspensión por la superficie de las placas de agar pasando el asa rápidamente de izquierda a derecha. NO PRESIONES MUY FUERTE PARA NO ROMPER EL AGAR.

12. Haz una columna con las placas sujetándolas con cinta adhesiva. Pon el nombre de tu grupo en la placa inferior, y mételas en la estufa a 37 °C en posición invertida hasta el día siguiente.

### **5.Resultados:**

Esquematiza un organizador con todos los pasos realizados

### **6.Cuestionario:**

1. ¿Puedo modificar genéticamente un organismo? ¿Qué organismo?
2. ¿Cómo puedo saber si las células se han transformado?
3. Describe cómo podrías usar dos placas de agar LB, E. coli y ampicilina para determinar si la bacteria resulta afectada por la ampicilina.

### **Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

De Robertis EDP, Ponzio, HIB. Biología Celular y Molecular. 15<sup>ava</sup> ed. Buenos Aires: El Ateneo; 2003.

- López AM. Manual de Bioquímica y Biología Molecular. México: McGraw-Hill Interamericana;2000.
- Panduro, A. Biología Molecular en la Clínica. México: McGraw-Hill Interamericana; 2000.
- Timothy MC, Sinclair J. Biología Molecular en Medicina. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1998.





## SEMANA 15: TALLER DE ANALISIS Y PROCESAMIENTO DE DATOS DE LA TRANSFORMACION BACTERIANA

Sección	: .....	Docente:	.....
Fecha	: ...../...../.....	Duración:	4 horas

**Instrucciones:** Leer con previsión la presente Guía de práctica a fin de interpretar los procesos que se llevaran a cabo en la práctica.

### 1. Objetivos

- Analizar el estado de desnaturalización, de concentración y grado de pureza del ADN obtenido en la práctica anterior.

### 2. Fundamento teórico

En esta práctica vas a realizar un procedimiento denominado **transformación genética**. Recuerda que un gen es un fragmento de ADN que codifica una proteína, la cual proporciona al organismo una determinada característica. Transformación genética literalmente significa cambio originado por genes, e implica la inserción de un gen en un organismo para modificar alguna de las características del organismo. La transformación genética se utiliza en muchas áreas de la biotecnología. En agricultura, se pueden introducir por transformación en las plantas los genes que codifican características como la resistencia al frío, a los pesticidas o a la sequía. En biodegradación, las bacterias se pueden transformar con genes que las hagan capaces de digerir los vertidos accidentales de petróleo. En **medicina**, las enfermedades originadas por genes defectuosos se están empezando a tratar con terapia génica, mediante la transformación de las células del paciente con copias del gen, que carecen de la anomalía que produce la enfermedad.

Se usará un **protocolo para transformar bacterias** con un gen que codifica una proteína denominada GFP (Green Fluorescent Protein). La fuente natural de este gen es una medusa fosforescente llamada *Aequorea victoria*, en el cual la GFP es la responsable de que la medusa brille o emita fluorescencia en la oscuridad. Después de la transformación, las bacterias expresan el gen de la medusa y sintetizan la proteína, lo que les permite emitir un color verde brillante cuando son expuestas a luz ultravioleta.

En esta práctica, aprenderás el proceso de transferir genes de un organismo a otro mediante un plásmido. Además de un cromosoma, las bacterias suelen contener uno o más pequeños fragmentos de ADN denominados plásmidos. Un plásmido suele contener genes que favorecen la supervivencia bacteriana. En la naturaleza, las bacterias pueden transferirse estos plásmidos para compartir sus genes beneficiosos o ventajosos. Este mecanismo permite a las bacterias adaptarse a nuevos ambientes. El reciente incremento de la resistencia bacteriana se debe a la transmisión de plásmidos.

El plásmido pGLO de BioRad contiene el gen para la síntesis de la proteína GFP y un gen de resistencia al antibiótico ampicilina. pGLO también contiene un sistema especial de regulación de genes que se puede usar para controlar la expresión de la proteína fluorescente en las células transformadas. El gen para sintetizar GFP se puede activar en las



células transformadas simplemente añadiendo arabinosa al medio de cultivo. La selección de las células que se han transformado con el plásmido pGLO se realiza observando el crecimiento en placas con antibiótico. Las células transformadas aparecerán blancas (fenotipo salvaje) en placas que no contengan arabinosa, y de color verde fluorescente cuando se añada arabinosa al agar.

Tendrás a tu disposición los materiales y protocolos para realizar la transformación. Tus tareas serán:

1. Realizar la transformación.
2. Determinar el grado de éxito obtenido en la alteración genética del organismo.

### **3. Procedimiento y resultados**

#### **A. Recogida de resultados**

Observa los resultados obtenidos tras la transformación a la luz normal de la habitación. Después sitúa las placas bajo luz ultravioleta y observa lo que ocurre.

1. Observa atentamente y dibuja lo que ves en cada placa. Apunta los resultados para poder comparar las observaciones de las células +pGLO con las observaciones de las células no transformadas.

Anota las observaciones para cada placa.

2. ¿Cuánto crecimiento se observa en cada placa, a simple vista?

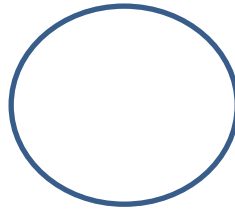
3. ¿De qué color son las bacterias?

4. ¿Cuántas colonias bacterianas hay en cada placa? (Cuéntalas).

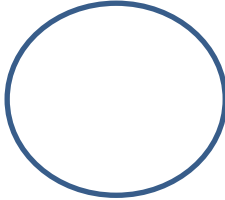


**Observaciones**

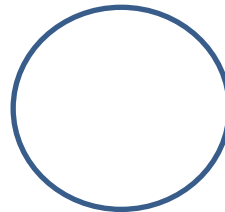
+pGLO LB/Amp



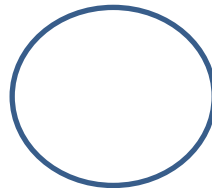
+pGLO LB/Amp/ara



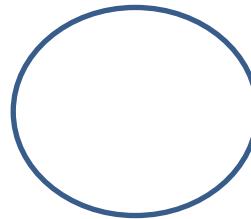
-pGLO LB/Amp



-pGLO LB



Placas control Placas transformadas



**B. Análisis de los resultados**

La finalidad del análisis de los resultados obtenidos es determinar si se ha producido la transformación genética., constesta las siguientes preguntas:

1. ¿Qué características inicialmente observadas en E. coli no parecen haberse alterado? Anota a continuación esas características que no se han modificado y las observaciones al respecto.

Característica original Observaciones

2. De las características de E. coli inicialmente observadas, ¿cuáles parecen ser significativamente diferentes después de la transformación? Anota esas características a continuación y describe los cambios que has observado.



3. Si las células transformadas han adquirido la capacidad para crecer en presencia del antibiótico ampicilina, ¿qué puedes deducir acerca de los otros genes presentes en el plásmido utilizado para la transformación?

4. Basándote en los resultados obtenidos, ¿cómo puedes demostrar que los cambios producidos se deben al proceso realizado?

**Conclusión:**

**Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

De Robertis EDP, Ponzio, HIB. Biología Celular y Molecular. 15<sup>ava</sup> ed. Buenos Aires: El Ateneo; 2003.

- López AM. Manual de Bioquímica y Biología Molecular. México: McGraw-Hill Interamericana; 2000.
- Panduro, A. Biología Molecular en la Clínica. México: McGraw-Hill Interamericana; 2000.
- Timothy MC, Sinclair J. Biología Molecular en Medicina. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1998.

**SEMANA 16: EVALUACIÓN FINAL**