



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

COORDINACIÓN GENERAL ACADÉMICA

Coordinación de Bibliotecas

Biblioteca Digital

La presente tesis es publicada a texto completo en virtud de que el autor ha dado su autorización por escrito para la incorporación del documento a la Biblioteca Digital y al Repositorio Institucional de la Universidad de Guadalajara, esto sin sufrir menoscabo sobre sus derechos como autor de la obra y los usos que posteriormente quiera darle a la misma.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DEL SUR DE JALISCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS EXACTAS, NATURALES Y TECNOLÓGICAS



PRODUCCION DE MATERIALES EDUCATIVOS
MANUAL DE PRÁCTICAS: INGENIERÍA GENÉTICA

Que presenta para obtener el grado de Ingeniera en Sistemas Biológicos:

Luz Elena Pacheco Farías

Directora: Dra. en C. y T. Laura Elena Iñiguez Muñoz

Asesor: Ing. Reyes Eduardo Anzaldo Ortega

Ciudad Guzmán, Municipio de Zapotlán el Grande, Jalisco, México. 13 de
diciembre de 2021.

Índice

Agradecimientos	3
Encuadre del sistema de prácticas	4
Práctica 1: Extracción de DNA	10
Práctica 2: Electroforesis horizontal de agarosa para ácidos nucleicos	18
Práctica 3: Cuantificación de DNA con NanoDrop TM	28
Práctica 4: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	37
Práctica 5: Enzimas de restricción: Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP) ..	46
Práctica 6: Clonación de DNA	53
Práctica 7: Preparación de muestras para secuenciación en Illumina®	61
Práctica 8: Técnica de Western Blot	68
Referencias bibliográficas:	75

Agradecimientos

A Dios, quien con su infinita bondad llena siempre mi vida de fortaleza y amor.

A mi familia, en especial a mi madre María Teresa Farías Serrano y a mi padre Heriberto Pacheco Gutiérrez, a mis hermanos Isaac, Miguel, Monserrat, Juan y Teresa por su inmenso apoyo y amor. A Kevin Alejandro Candelas Jacobo por todo su cariño y su constante motivación.

A mi directora la Dra. Laura Elena Iñiguez Muñoz y al Dr. Jorge Enrique Pliego Sandoval por permitirme trabajar con ustedes, guiarme y brindarme sus conocimientos en compañía de grandes consejos.

A mi asesor el Ing. Reyes Eduardo Anzaldo Ortega por aportar de su valioso tiempo y conocimiento.

A mis profesores, en especial a la Dra. Angélica Araceli Ramírez Guerrero y amigos, quienes llevo en mi corazón no solo por sus enseñanzas sino por su amistad.

A la Universidad de Guadalajara por concederme tantas oportunidades y conocimiento.

Y a todas las personas que formaron parte de este camino.

Encuadre del sistema de prácticas

Introducción

La Ingeniería Genética es una disciplina que surge de la Biología Molecular con gran importancia en la actualidad, debido a que proporciona herramientas tecnológicas y moleculares que permitan diseñar y modificar productos o procesos de un organismo. Con ello, se pretende lograr genes que sean más útiles y aprovechables para el ser humano, generando enormes avances en sectores como la agricultura, ganadería, medio ambiente y medicina.

La Ingeniería Genética también es conocida como tecnología del DNA recombinante por el conjunto de técnicas y metodologías que permiten aislar y manipular el DNA con el objetivo de incrementar nuestro bienestar respetando la naturaleza, las leyes y principios éticos de la sociedad.

Para comprender los fundamentos científicos y aplicaciones de las herramientas moleculares se requiere estudio y preparación que permita la manipulación y modificación genética de microorganismos, con un enfoque claro hacia su aplicación en los procesos biotecnológicos (CINVESTAV y Favier, 2012; Iwasa y Marshall, 2018; Salazar, Sandoval y Armendáriz, 2016).

Es importante que los estudiantes del área biotecnológica adquieran los fundamentos de la Ingeniería Genética que servirán para comprender y emplear las técnicas innovadoras que ofrece esta disciplina. Se busca que con esta asignatura se adquieran los conocimientos teóricos básicos y prácticos mediante los principios éticos en la ejecución de las técnicas básicas de laboratorio con herramientas tecnológicas que compone la Ingeniería Genética.

Competencias profesionales

Los conocimientos de Ingeniería Genética adquiridos en esta asignatura permitirán comprender los procedimientos necesarios para realizar la manipulación del material genético para un propósito específico, contemplando los aspectos éticos, científicos y humanísticos que esto conlleva, para que sea capaz de ejecutar acciones destinadas a la previsión, planificación y resolución de la problemática planteada en diferentes ámbitos de la realidad agrícola: producción, sustentabilidad, rentabilidad y medio ambiente, con énfasis en todo lo que directa o indirectamente está relacionado con la producción vegetal en sus diferentes entornos de tecnificación, para aprovechar y aplicar procesos actualizados de sistematización con el objetivo de procurar la alimentación, protección, riqueza y bienestar a la sociedad.

Niveles de desempeño

Al trabajo conjunto que se desarrollará en el trabajo práctico de esta asignatura se le asigna un nivel de desempeño 2, ya que contiene actividades con grado de complejidad intermedio que deben ser ejecutadas en equipo, por lo que requieren de organización entre los integrantes.

Nivel 1. Se realizan funciones rutinarias de baja complejidad. Se reciben instrucciones. Se requiere baja autonomía.

Nivel 2. Se realiza un conjunto significativo de actividades de trabajo, variadas y aplicadas en diversos contextos. Algunas actividades son complejas y no rutinarias. Presenta un bajo grado de responsabilidad y autonomía en las decisiones. A menudo requiere colaboración con otros y trabajo en equipo.

Nivel 3. Se requiere un importante nivel de toma de decisiones. Tiene bajo su responsabilidad recursos materiales con los que opera su área, así como control de recursos financieros para adquisición de insumos, o responsabilidades comparables.

Nivel 4. Se desarrolla un conjunto de actividades de naturaleza diversa, en las que se tiene que mostrar creatividad y recursos para conciliar intereses.

Nivel 5. Se desarrolla un conjunto de actividades de naturaleza diversa, en las que se tiene que mostrar un alto nivel de creatividad, así como buscar y lograr la cooperación entre grupos e individuos que participan en la implantación de la solución a un problema de magnitud institucional (Méndez Robles *et al.*, 2017).

Programa del sistema de prácticas

Unidad 1: Enzimas involucradas en la Ingeniería Genética

Práctica 1: Extracción de DNA

Sesiones: 1 Duración: 3 horas Ámbito de desarrollo: Laboratorio

Objetivo de la práctica: Identificar y dominar la técnica de extracción de DNA aplicando los principios básicos teóricos.

Práctica 2: Electroforesis horizontal de agarosa para ácidos nucleicos

Sesiones: 1 Duración: 3 horas Ámbito de desarrollo: Laboratorio

Objetivo de la práctica: Identificar y efectuar los fundamentos de electroforesis para ácidos nucleicos aplicando la técnica correcta.

Práctica 3: Cuantificación de DNA con NanoDrop TM

Sesiones: 1 Duración: 2 horas Ámbito de desarrollo: Laboratorio

Objetivo de la práctica: Identificar, interpretar y dominar la técnica de cuantificación de DNA con NanoDrop TM aplicando principios básicos teóricos.

Unidad 2: Enzimas como herramientas en la Ingeniería Genética

Práctica 4: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Sesiones: 1 Duración: 2 horas Ámbito de desarrollo: Laboratorio

Objetivo de la práctica: Identificar y dominar la técnica de PCR convencional aplicando los fundamentos teóricos y prácticos.

Práctica 5: Enzimas de restricción: Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP)

Sesiones: 1 Duración: 3 horas Ámbito de desarrollo: Laboratorio

Objetivo de la práctica: Identificar el uso de enzimas de restricción en la técnica de RFLP aplicando fundamentos teóricos y prácticos.

Unidad 3: Clonación Molecular: vectores empleados para la clonación de DNA

Práctica 6: Clonación de DNA

Sesiones: 2 Duración: 3 horas Ámbito de desarrollo: Laboratorio

Objetivo de la práctica: Reconocer y desarrollar la etapa de ligación que compone la clonación de DNA, aplicando los principios teóricos y prácticos.

Unidad 4: Análisis de las secuencias clonadas

Práctica 7: Preparación de muestra para secuenciación en Illumina®

Sesiones: 1 Duración: 2 horas Ámbito de desarrollo: Laboratorio

Objetivo de la práctica: Identificar los procedimientos de preparación de muestras para la secuenciación en Illumina® aplicando los fundamentos.

Práctica 8: Técnica de Western Blot

Sesiones: 1 Duración: 2 horas Ámbito de desarrollo: Laboratorio

Objetivo de la práctica: Identificar y desarrollar el proceso de preparación de muestra de proteínas para la técnica Western Blot.

Prácticas generales de seguridad

- Usar zapatos de piso con suela antiderrapante y que cubra todo el pie; llevar las uñas cortas y no utilizar accesorios como anillos, reloj o pulseras.
- Ubicar en el laboratorio la localización de la regadera, el lava-ojos, el extintor de incendios y la ruta de evacuación.
- Utilizar en todo momento bata blanca adecuada (larga y manga larga, bien abotonada) cubrebocas y cofia.
- Durante la sesión práctica debe evitarse llevar objetos a la boca, morderse las uñas o tocarse el rostro con las manos.
- Los reactivos deben manejarse con micropipetas, espátulas limpias y recipientes secos.
- Debe utilizarse siempre un dispositivo de pipeteo. El pipeteo con la boca está PROHIBIDO.

Práctica 1: Extracción de DNA

Introducción

La extracción de ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés) es una técnica empleada para obtener una cantidad y calidad de DNA adecuado que permita su manipulación o amplificación. A lo largo del tiempo se han diseñado distintos protocolos químicos y físicos que presenta ventajas y desventajas, las cuales se deben tomar en cuenta con el tipo de muestra que se obtuvo y los procesos posteriores a la extracción del ácido nucleico (Ríos Sánchez *et al.*, 2016).

Uno de los métodos de extracción relativamente sencillos y de bajo costo es la técnica fenol-cloroformo considerado uno de los más eficaces para cualquier tipo de muestra. Consiste de cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del DNA (Salazar, Sandoval y Armendáriz, 2013).

Propósito específico

Identificar y dominar la técnica de extracción de DNA aplicando los principios básicos teóricos.

Criterios de desempeño

- Previo a la práctica deberás leer el procedimiento y elaborar un diagrama de flujo.
- Durante la práctica, realizarás procedimientos químicos y físicos para una correcta extracción DNA.
- Al finalizar la práctica, dejarás limpio y ordenado tu lugar de trabajo.

Resultados esperados

Serás competente para realizar la extracción de DNA a partir de una muestra, aplicando conocimientos teóricos y técnicos para su correcta ejecución.

Desarrollo de la práctica

Esta actividad la realizarás formando un equipo de 5-6 personas.

Materiales necesarios para trabajar por equipo:

Guantes y cubre bocas

Muestra biológica

Microtubos

Gradilla

Micropipetas

Puntillas

Mortero (opcional)

Sanitas

Reactivos:

Proteinasa K

RNasa A

Cloroformo

Isopropanol

Etanol al 70 %

Buffer Tris EDTA (TE)

Buffer de lisis (Tris-HCl 100 mM [pH 8,0], EDTA 100 mM, NaCl 10 mM y SDS al 1 %)

Equipo necesario:

Centrífuga

Vortex

Refrigerador

Por seguridad, considerar las siguientes recomendaciones:

- Evitar el contacto de sustancias químicas en piel y ojos.
- La absorción de líquidos con micropipeta se debe llevar de manera lenta.

- No se expulsan a la fuerza los líquidos de la micropipeta.
- En caso de derrame limpiar la zona.
- Aplicar el uso correcto de la centrífuga.

El primer paso en la extracción es la homogeneización del tejido y la lisis, esto permite romper las membranas celulares y nuclear ocasionando la liberación del ácido nucleico de las células. Para el caso de las células vegetales se requieren métodos más agresivos como la homogenización con mortero y química.

Como segundo paso se encuentra la separación de proteínas y lípidos, se realiza en combinación de distintas estrategias como son los solventes orgánicos que permitan la desnaturalización de proteínas y la separación por medio de ciclos de centrifugación, logrando así una fase orgánica que contiene lípidos y proteínas y una fase acuosa que contiene los ácidos nucleicos y otras pequeñas moléculas hidrosolubles.

En el tercer paso se encuentra la precipitación de DNA, proceso importante en el cual es recuperado, para ello, se adiciona isopropanol, el cual permite que el DNA se pliegue sobre sí mismo haciéndolo insoluble. Posteriormente se realizará una centrifugación para obtener un botón de DNA en el fondo del tubo, al decantar el alcohol y realizar un lavado con etanol al 70 % permite eliminar residuos de etanol que pudieran quedar.

Finalmente, el botón de DNA se disuelve en soluciones que aseguren su preservación, un ejemplo de solución es el Buffer Tris EDTA (TE), esto permitirá el empleo del DNA en técnicas posteriores (Salazar, Sandoval y Armendáriz, 2013;Tammelleo, 1995).

Pasos a seguir:

- Agregue 700 µL de Buffer de lisis en la muestra DNA y agitar con vortex.
- Añada 10 µL de RNasa A.
- Incubar a 37 °C durante 1 hora.
- Añada 10 µL de proteinasa K.
- Incubar a 50 °C durante la noche.
- Agregue 700 µL de fenol /cloroformo /isopropanol (25: 24: 1).
- Centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos.
- Pipetee la fase acuosa en un tubo nuevo.
- Repita los pasos (agregue fenol/cloroformo/isopropanol en la fase acuosa, centrifugue, recolecte la fase acuosa) 2 veces.
- Agregue 70 µL de cloroformo.
- Centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos.
- Pipetee la fase acuosa en un tubo nuevo.
- Repita los pasos (agregue fenol/cloroformo/isopropanol en la fase acuosa, centrifugue, recolecte la fase acuosa) 1 vez.
- Agregue una décima parte del volumen de 3M NaOAc.
- Agregue dos volúmenes de etanol al 100 %.
- El DNA comienza a precipitar inmediatamente, después de mezclar.
- Centrifugar a 13 000 rpm durante 30 minutos a 4 °C.
- Eliminar el sobrenadante por decantación.
- Lavar con etanol al 70 %.
- Centrifugar a 13 000 rpm durante 10 minutos.
- Eliminar el sobrenadante por decantación, y secar a temperatura ambiente, el restante se eliminará por evaporación.
- Disolver el sedimento de DNA en el volumen apropiado de Buffer TE.
- Limpiar el área de trabajo e instrumentos de laboratorio utilizados.
- Dejar las micropipetas a su máxima capacidad.

Cuestionario:

¿Cuáles son los métodos de extracción de DNA más utilizados? _____

Referencia consultada: _____

¿Cuáles son las ventajas y desventajas del método de extracción de DNA por fenol-cloroformo? _____

Referencia consultada: _____

¿Por qué se realiza la homogeneización y lisis de la muestra? _____

Referencia consultada: _____

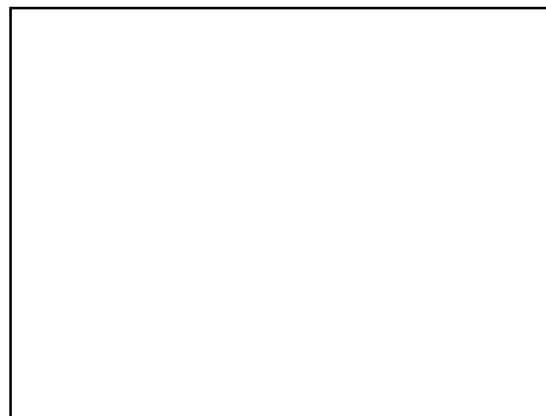
¿Para qué se utiliza el Dodecilsulfato Sodio (SDS)? _____

Referencia consultada: _____

¿Para qué se utiliza la solución TRIS en la extracción de DNA? _____

Referencia consultada: _____

Describir la fase fenólica y la fase acuosa, acompañado de un dibujo en el que indique la ubicación de cada fase:



Referencia consultada: _____

¿Qué es la precipitación del DNA? Y ¿Cuáles son los componentes para llevarla a cabo? _____

Referencia consultada: _____

¿Por qué se utiliza etanol al 70 % para lavar el botón de DNA? _____

Referencia consultada: _____

¿Cuáles son las aplicaciones de la extracción de DNA? _____

Referencia consultada: _____

Discusión de resultados: _____

Redactar una conclusión general de la práctica: _____

Sistema de evaluación

Es requisito que todos los alumnos presenten su manual y un diagrama de flujo sencillo elaborado de forma individual el día de la sesión de laboratorio. Por otra parte, deberán entregar la práctica contestada una semana después de haber concluido las actividades. El cumplimiento de estos factores se registrará en la lista de cotejo de la que dependerá la asignación de una calificación de la siguiente manera:

Actitudes: 20 %

Dominio teórico: 40 %

Dominio práctico: 40 %

Lista de cotejo

Acciones a evaluar	SÍ	NO	%
1.Presentó completo al inicio de la práctica el manual y diagrama de flujo.			5
2.Durante la sesión, ¿portó bata, cubrepelo, cubrebocas y zapatos apropiados?			5
3.Al final de la sesión, ¿el espacio de trabajo y los materiales utilizados están limpios y ordenados?			10
4.¿Mostró evidencia de su extracción?			20
5.¿Demostró dominio en la técnica de extracción de DNA?			20
6.¿Contestó el cuestionario incluyendo referencias consultada?			40

Práctica 2: Electroforesis horizontal de agarosa para ácidos nucleicos

Introducción

La electroforesis es una herramienta con gran importancia debido a que intervine en la Ingeniería Genética o DNA recombinante con la implementación y desarrollo de nuevas técnicas para el análisis e identificación del contenido genético (Fierro, 2014).

El principio de la electroforesis en gel de agarosa para ácidos nucleicos consiste en la migración o desplazamiento de las moléculas a través de una matriz porosa en función de su peso molecular por medio de un campo eléctrico. La agarosa es un polisacárido que se obtiene de las algas marinas con las características de ser gelatinoso y un compuesto no tóxico, es el más utilizado en la electroforesis horizontal para ácidos nucleicos y la concentración recomendada de agarosa es de entre 0.5 a 2 % (Montalvo y Lugo, 2016; Salazar, Sandoval y Armendáriz, 2013).

Propósito específico

Identificar y efectuar los fundamentos de electroforesis para ácidos nucleicos aplicando la técnica correcta.

Criterios de desempeño

- Previo a la práctica deberás leer el procedimiento y elaborar un diagrama de flujo.
- Durante la práctica, seguirás las instrucciones descritas para preparar el gel de agarosa, la carga del gel y corrimiento de electroforesis.
- Al finalizar la práctica, dejarás limpio y ordenado tu lugar de trabajo.

Resultados esperados

Serás competente para realizar la técnica de electroforesis horizontal de agarosa para ácidos nucleicos aplicando conocimientos teóricos y técnicos para su correcta ejecución.

Desarrollo de la práctica

Esta actividad la realizarás formando un equipo de 5-6 personas.

Materiales necesarios para trabajar por equipo:

Guantes

Muestra de DNA

Micropipetas

Puntas para micropipeta

Microtubos de 1.5 mL de volumen

Matraz

Probetas

Cinta *masking* común

Papel parafilm

Agua destilada

Frasco rotulado para almacenar Buffer TAE 1X utilizado

Reactivos:

Agarosa grado Biología Molecular

Buffer TAE 1X

Buffer de carga

Bromuro de etidio

Marcador de peso molecular

Equipo necesario:

Balanza analítica

Microcentrífuga

Microondas

Cámara horizontal de electroforesis y componentes (molde para hacer el gel, peine, cables para conectar a la fuente de poder)

Fuente de poder electroforesis

Fotodocumentador o lámpara ultravioleta (UV)

Por seguridad, considerar las siguientes recomendaciones:

- Uso obligatorio de guantes y equipo de protección.
- Extrema precaución en el manejo de las sustancias químicas, evitar el contacto en piel y ojos.
- El bromuro de etidio debe manejarse de acuerdo a la hoja de datos de seguridad del material(https://www.iquimica.unam.mx/images/iqseguro/004_Manejo_de_bromuro_de_etidio.pdf).
- Aplicar el uso correcto de equipo de electroforesis.
- Verificar que los equipos estén conectados a reguladores.
- La absorción de líquidos con micropipeta se debe llevar de manera lenta.
- No se expulsan a la fuerza los líquidos en micropipetas.
- En caso de derrame limpiar la zona.

La electroforesis horizontal de agarosa se realiza por medio de un sistema compuesto por un gel montado en una solución Buffer, una cámara y una fuente de poder con la que se aplica una corriente eléctrica que provoca la migración de las muestras cargadas a través del gel de agarosa. Los ácidos nucleicos son moléculas con cargas negativas, por ello al aplicar corriente eléctrica estos migrarán desde el polo negativo hacia el polo positivo.

La porosidad del gel dependerá de la cantidad de agarosa que se utilice, una alta concentración formará poros muy pequeños por los que solo podrán migrar moléculas pequeñas, mientras que una concentración muy baja de agarosa formará poros muy grandes, ocasionando que la capacidad para separar moléculas no sea buena.

Al preparar el gel de agarosa se añade bromuro de etidio, es utilizado como agente intercalante que se interpone entre las bases, este permite observar con ayuda de luz UV la altura a la que han corrido las bandas en el gel. El colorante de Buffer de carga permite visualizar el avance de las muestras y así detener la corriente eléctrica de manera eficiente. La velocidad de migración de las moléculas en el gel es inversamente proporcional a su tamaño, esto quiere decir que las moléculas de mayor tamaño tardarán más en migrar que las moléculas de menor

peso. Para observar los resultados de la corrida es necesario colocar el gel en un fotodocumentador o una lámpara de luz UV que permita tomar fotografías (Salazar, Sandoval, Armendáriz, 2016).

Pasos a seguir:

Para la preparación de gel de agarosa al 1.5 %

- Medir con una probeta 50 mL de Buffer TAE 1X.
- En seguida pesar en la balanza analítica 0.75g de agarosa de grado molecular y colocarla en un matraz junto a los 50 mL del Buffer TAE 1X. Una vez agregados, es necesario agitar de manera circular para incorporar la agarosa al Buffer y evitar la formación de grumos grandes.
- Para continuar, se deberá colocar el matraz dentro de un microondas para fundir e integrar los restos de agarosa que se encuentren en las paredes del matraz, inicialmente se deberán aplicar 20 segundos y posteriormente agitar de manera circular con mucho cuidado. Este paso se repetirá hasta lograr observar en contra luz que el contenido en el matraz no contenga cristales de agarosa, evitando que la mezcla llegue a hervir.
- Una vez sean eliminados los cristales se dejará enfriar un poco la mezcla para agregar el bromuro de etidio y así evitar la evaporación de este reactivo.

Nota: El bromuro de etidio, es un químico altamente cancerígeno que deberá manipularse con mucho cuidado y **NO** deberá agregarse cuando la preparación se encuentre en el proceso de evaporación para evitar daños en la salud.

- Preparación de la cámara de electroforesis: sus componentes son base para el gel, calibrador, peine, tapadera con conexiones a polos negativo y positivo, base de la cámara y fuente de poder.
- Se deberá localizar la base de la cámara para colocar dentro el calibrador y pueda ser equilibrada. Posterior se tomará la base donde se formará el gel y pondrá cinta *masking* en los costados de modo que permita contener la mezcla de agarosa. Una vez armada la base se situará dentro de la cámara y con ayuda del calibrador será equilibrada.

- Inmediatamente después de que la mezcla dentro del matraz disminuya el proceso de evaporación, se tomarán 2 μL de bromuro de etidio sin tocar las paredes del recipiente y se colocarán dentro del matraz dejándolo caer en la agarosa, en seguida se agitará con precaución.

Nota: Los residuos de bromuro de etidio deben ser tratados de manera especial, por lo que la punta utilizada deberá separarse en una bolsa especial para su desecho.

- Una vez que se encuentre perfectamente incorporado el bromuro de etidio en la agarosa, se colocará de manera suave y sin generar burbujas toda la preparación en la base previamente armada y completamente equilibrada.
- Después de agregar toda la preparación, se colocará el peine que ayudará a crear los pocillos, se dejará reposar de 15 a 20 minutos para que la agarosa gelifique y se obtengan los pocillos.
- Transcurrido el tiempo, el gel se encontrará solidificado y con un color blanco opaco. Es necesario verificar que se encuentre frío de la parte inferior para retirar el peine y las cintas con mucho cuidado de no romper los pocillos formados.
- Se colocará de nuevo el gel respetando la dirección de los pocillos en el polo negativo de la cámara y se agregará de manera suave el Buffer TAE 1X hasta sumergir completamente el gel montado, es necesario cuidar que se cubra completamente.
- Es importante establecer de manera escrita la organización del gel: la posición del marcador molecular y de las muestras.
- Posteriormente el marcador molecular y las muestras se pasarán por centrifugación para tener los componentes homogenizados en cada microtubo.
- Para continuar, se utilizará papel parafilm donde se colocarán gotas de Buffer de carga para cada muestra. Primero se colocará una gota de agua destilada en una superficie limpia y después se sellará el papel parafilm para que éste no se mueva. Después se situarán 2 μL de Buffer de carga para el marcador molecular y para las muestras de DNA se pondrán 4 μL de Buffer de carga en orden sobre el papel parafilm.
- Una vez colocado el Buffer de carga, se tomarán 5 μL de marcador de peso molecular y se colocará sobre la gota de Buffer de carga y se deberá homogenizar con ayuda de

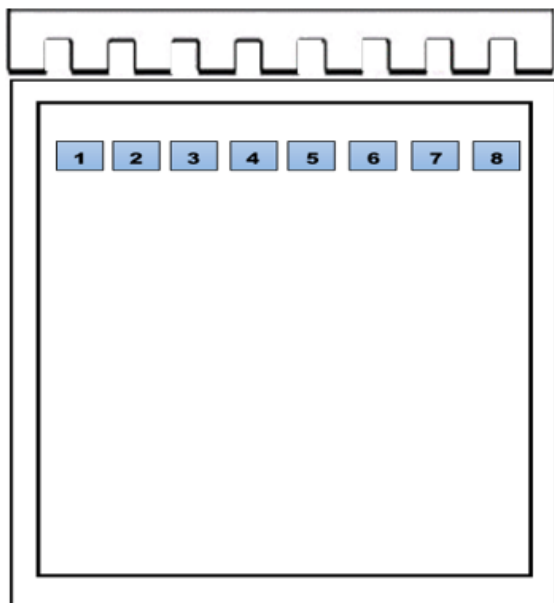
la micropipeta. Después se deberá tomar todo el contenido homogenizado y con mucho cuidado se cargará en el pocillo correspondiente en el gel sin crear burbujas y evitando la perforación.

- Para el caso de las muestras de DNA, se tomarán 10 μ L de muestras y se colocarán sobre la gota del Buffer de carga con ayuda de la micropipeta se homogeniza para después cargar en el siguiente pocillo con mucho cuidado. Repetir el paso anterior hasta cargar todas las muestras.
- Después de cargar el gel, se procederá a tapar la cámara de electroforesis cuidando que los polos queden de manera correcta, polo negativo del lado de los pocillos y polo positivo del lado contrario al igual que las conexiones a la fuente de poder. El siguiente paso será programar la fuente de poder a 100 volts y un tiempo 30 minutos, de modo que permitirá indicar la opción de “iniciar la corrida” y en automático se podrá observar un burbujeo dentro de la cámara.

Nota: Es importante verificar que la migración se realice de manera correcta hacia el polo positivo durante la corrida.

- Luego del tiempo programado se apagará la fuente de poder y se retirará la tapa de la cámara con mucho cuidado. En seguida se tomará el gel con todo y la base para colocarlo sobre un papel.
- Y el Buffer TAE 1X contenido en la cámara se deberá guardar en un frasco previamente rotulado con mucho cuidado de no salpicar y derramar, la cámara de electroforesis y la tapadera se deberán enjuagar con agua destilada y dejar secar.
- Finalmente, para la visualización de los fragmentos en el gel será necesario su exposición a un transiluminador o lámpara UV.
- Limpiar el área de trabajo e instrumentos de laboratorio utilizados.
- Dejar las micropipetas a su máxima capacidad.

A continuación, indicar las cargas que se colocarán en cada pocillo del gel de agarosa:



Ubicación de las cargas

Pocillo 1: _____
Pocillo 2: _____
Pocillo 3: _____
Pocillo 4: _____
Pocillo 5: _____
Pocillo 6: _____
Pocillo 7: _____
Pocillo 8: _____

Cuestionario:

¿Cuál es el fundamento de la técnica? _____

Referencia consultada: _____

¿Por qué la electroforesis se realiza en concentraciones bajas de sales? _____

Referencia consultada: _____

¿Por qué se utiliza un marcador de peso molecular? _____

Referencia consultada: _____

¿Qué es y por qué se utiliza el bromuro de etidio? _____

Referencia consultada: _____

¿Cuál es la función del Buffer TAE 1X? _____

Referencia consultada: _____

Explicar la migración en función de la carga: _____

Referencia consultada: _____

Indicar en el esquema del gel la posición y el tamaño de los fragmentos generados:

Ubicación de los fragmentos							
1	2	3	4	5	6	7	8
Pocillo 1: _____							
Pocillo 2: _____							
Pocillo 3: _____							
Pocillo 4: _____							
Pocillo 5: _____							
Pocillo 6: _____							
Pocillo 7: _____							
Pocillo 8: _____							

¿Cuáles son las aplicaciones de esta técnica? _____

Referencia consultada: _____

Discusión de resultados: _____

Redactar una conclusión general de la práctica: _____

Sistema de evaluación

Es requisito que todos los alumnos presenten su manual y un diagrama de flujo sencillo elaborado de forma individual el día de la sesión de laboratorio. Por otra parte, deberán entregar la práctica contestada una semana después de haber concluido las actividades. El cumplimiento de estos factores se registrará en la lista de cotejo de la que dependerá la asignación de una calificación de la siguiente manera:

Actitudes: 20 %

Dominio teórico: 40 %

Dominio práctico: 40 %

Lista de cotejo

Acciones a evaluar	SÍ	NO	%
1.Presentó completo al inicio de la práctica el manual y diagrama de flujo.			5
2.Durante la sesión, ¿portó bata, cubrepelo, cubrebocas y zapatos apropiados?			5
3.Al final de la sesión, ¿el espacio de trabajo y los materiales utilizados están limpios y ordenados?			10
4.¿Mostró evidencia de su electroforesis?			20
5.¿Demostró dominio en la técnica de electroforesis horizontal de agarosa para ácidos nucleicos?			20
6.¿Contestó el cuestionario incluyendo referencias consultada?			40

Práctica 3: Cuantificación de DNA con NanoDrop™

Introducción

La cuantificación de DNA es una técnica importante para conocer la concentración y pureza del ácido nucleico que se extrajo para el uso en otras aplicaciones. Puede realizarse por distintos métodos, los más utilizados son la espectrofotometría y la fluorometría (Salazar, Sandoval y Armendáriz, 2013).

La espectrofotometría describe el fundamento de atravesar un haz de luz en una solución con el objetivo de medir la intensidad que es absorbida, esto permite obtener la concentración en una solución de un compuesto en específico. Los espectrofotómetros son instrumentos especializado que proyectan el haz de luz, dentro de los más conocidos se encuentra el NanoDrop™ que contiene métodos programados que facilitan la cuantificación (Burbano Rosero *et al.*, 2017; García, 2013).

Propósito específico

Identificar, interpretar y dominar la técnica de cuantificación de DNA con NanoDrop™ aplicando principios básicos teóricos.

Criterios de desempeño

- Previo a la práctica deberás leer el procedimiento y elaborar un diagrama de flujo.
- Durante la práctica, aplicarás conocimientos prácticos de dilución y cálculos que permitan establecer la concentración y pureza de DNA.
- Al finalizar la práctica, dejarás limpio y ordenado tu lugar de trabajo.

Resultados esperados

Serás competente para realizar la cuantificación DNA, aplicando la técnica e interpretación de datos correctamente.

Desarrollo de la práctica

Esta actividad la realizarás formando un equipo de 5-6 personas.

Materiales necesarios para trabajar por equipo:

Guantes.

DNA

Micropipeta

Puntillas

Equipo necesario:

NanoDrop™

Computadora

Por seguridad, considerar las siguientes recomendaciones:

- Aplicar el uso correcto de NanoDrop™.
- Verificar que los equipos estén conectados a reguladores.
- Evitar el contacto de sustancias químicas en piel y ojos.
- La absorción de líquidos con micropipeta se debe llevar de manera lenta.
- No se expulsan a la fuerza los líquidos en micropipetas.
- En caso de derrame limpiar la zona.

Se reconoce que el DNA absorbe la luz ultravioleta en una longitud de onda de 260 nm, por lo que el análisis de una solución que contiene DNA debe ser a esa longitud de onda por medio de un espectrofotómetro y medir la absorbancia tomando en cuenta que cuanto más luz absorbe, mayor contenido de ácido nucleico en la solución (Burbano Rosero *et al.*, 2017; Salazar, Sandoval y Armendáriz, 2013).

Del mismo modo, es necesario realizar una serie de cálculos siguiendo la ley de Beer Lambert que permiten obtener los resultados de concentración (Bermúdez-Jiménez *et al.*, 2021).

Se estableció la siguiente fórmula para el cálculo de la concentración de los ácidos nucleicos:

$$\mu\text{g}/\mu\text{L de AN} = \text{OD a 260 nm} \times \text{Dilución} \times \text{constante} / 1\,000$$

En donde:

OD a 260 nm: absorbancia del ácido nucleico a 260 nm de longitud de onda.

Dilución: se indica la dilución que se realizó.

Constante: proveniente del valor teórico de OD para cada ácido nucleico: 50 para el DNA (Salazar, Sandoval y Armendáriz, 2013).

El espectrofotómetro NanoDrop™ es el tipo de lector de fotos que se utiliza para la cuantificación de muestra de ácidos nucleicos con alta precisión, el instrumento está controlado por una computadora que contiene un software especial para la cuantificación. Es necesario calibrar para su uso, esto se realiza mediante la muestra blanco colocando de 1 a 2µL de agua destilada en la parte inferior del pedestal.

Es importante limpiar de manera consecutiva después de cada muestra, así como al inicio y al final de su uso.

Para el correcto manejo de NanoDrop™ es necesario consultar el modelo e instrucciones específicas: manejo de software, tipos de muestras, componentes, limpieza y recomendaciones (Thermo Fisherscientific and Biosystems, 2017).

Pasos a seguir:

Inicio rápido para uso de NanoDrop™

- De doble click en el icono del escritorio de NanoDrop y seleccione la aplicación para iniciar el equipo.
- La opción “Ass to report” ofrece el guardado automático de todas las mediciones realizadas, por lo que debe asegurarse que esta opción se encuentre seleccionada en el panel izquierdo y así generar un registro automático.
- Establezca un Blanco usando un Buffer o agua destilada. Pipetee 1-2 µL del Blanco en la parte inferior del pedestal, baje el brazo del aparato con mucho cuidado y presione la tecla de “Blank”.

Nota: Para la solución Blanco puede utilizarse el mismo Buffer en el que está suspendida/disuelta la molécula de interés. También puede utilizarse agua destilada como Blanco.

Nota: Es importante que el brazo del aparato sea bajado para todas las mediciones incluyendo las realizadas con cubetas.

- Enseguida introduzca el ID de la muestra en el campo apropiado que muestra la interfaz. Posteriormente pipetee 1-2 μL de la muestra, baje el pedestal superior y presione Measure.

Nota: Es recomendable usar una alícuota fresca de la muestra para cada medición.

Nota: Es importante que el brazo del aparato sea bajado para todas las mediciones incluyendo las realizadas con cubetas.

Después de una medición.

- Limpie ambos pedestales de medición usando un trapo de laboratorio seco y libre de pelusa, para prevenir la contaminación de las muestras y evite la acumulación de residuos. El instrumento está listo para la próxima muestra.
- Cuando se usa la opción de la cubeta, remueva la cubeta, enjuague bien y seque entre cada muestra.

Ciclo de Blanco.

Es recomendable que una alícuota de Blanco sea medida como si fuera otra muestra. Esto para confirmar que el instrumento esté trabajando correctamente y que cualquier muestra seca en el fondo a partir de mediciones anteriores no represente un problema.

Para correr el ciclo de Blanco realice lo siguiente:

- Cargue una alícuota del Blanco al pedestal de medición más bajo y baje el brazo de toma de muestra en la posición baja.
- Presione la tecla de “Blank” para almacenar el blanco de referencia.
- Analice una réplica fresca del Blanco como si fuera una muestra y seleccione Measure. El resultado tiene que ser un espectro que no varíe más de 0.04 A (10mm de absorbancia equivalente).
- Limpie el Blanco de ambas superficies del pedestal de mediciones y repita el proceso hasta que el espectro sea menor a 0.04 A (10 mm de absorbancia equivalente).

Nota: No es necesario un Blanco entre cada muestra, es recomendable que un nuevo Blanco sea tomado cada 30 minutos cuando se miden muchas muestras.

Limpieza del pedestal.

- Agregue de 3-5 μL de agua destilada en el fondo del pedestal.

Nota: Nunca use un bote que ejerza presión para aplicar agua desionizada o algún otro líquido en la superficie del instrumento.

- Baje el brazo del pedestal superior para formar una columna líquida; deje reposar por 2-3 minutos.
- Seque ambos pedestales con un trapo de laboratorio seco y libre de pelusa.
- La limpieza final de ambas superficies de medición con agua destilada es recomendada después de realizar la última medición.

Nota: El uso de detergentes o alcohol isopropílico no es recomendado para la limpieza de las superficies del equipo. Si se usa una solución para descontaminar es importante el uso de 3-5 μL de agua destilada

- Observar la curva y anotar los valores arrojados de las lecturas de cada muestra.
- Limpiar el área de trabajo e instrumentos de laboratorio utilizados.
- Dejar las micropipetas a su máxima capacidad.

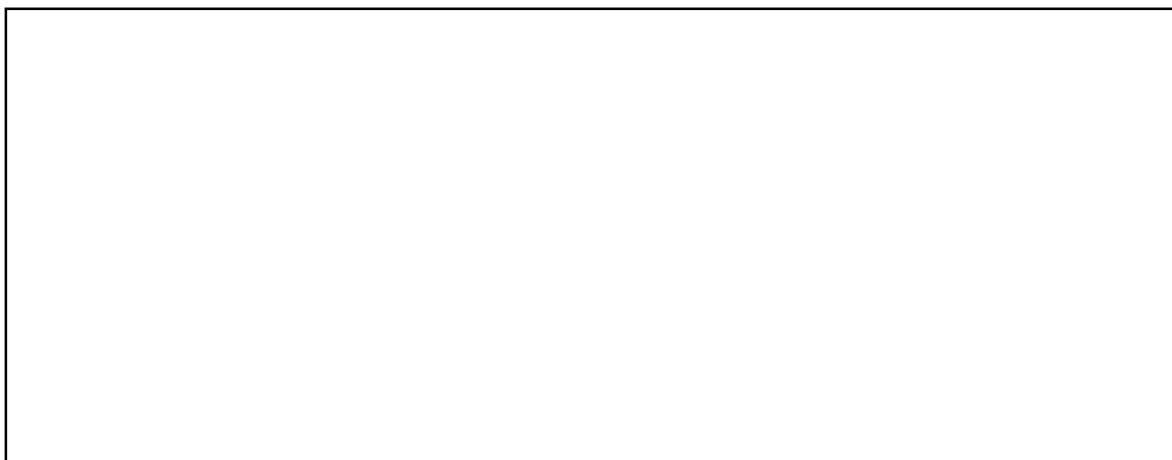
Tabla de valores obtenidos

Muestra	260 nanómetros	280 nanómetros
DNA de equipo 1		
DNA de equipo 2		
DNA de equipo 3		
DNA de equipo 4		
DNA de equipo 5		
DNA de equipo 6		

Dibujar la curva de la muestra observada en la interfaz del equipo



Realice los cálculos correspondientes para obtener la concentración de DNA



Cuestionario:

¿Cuáles son los métodos de cuantificación más utilizados? _____



Referencia consultada: _____



¿Cuál es el fundamento de la espectrofotometría? _____

Referencia consultada: _____

¿A qué longitud de onda es la absorción máxima de los ácidos nucleicos? _____

Referencia consultada: _____

¿Qué ocurre cuando la muestra presenta una mayor absorbancia? _____

Referencia consultada: _____

¿Qué factores intervienen para obtener una buena concentración de DNA? _____

Referencia consultada: _____

¿Qué es y para que se utiliza una muestra Blanco? _____

Referencia consultada: _____

¿Para qué sirve medir la concentración de DNA? _____

Referencia consultada: _____

Discusión de resultados: _____

Redactar una conclusión general de la práctica: _____

Sistema de evaluación

Es requisito que todos los alumnos presenten su manual y un diagrama de flujo sencillo elaborado de forma individual el día de la sesión de laboratorio. Por otra parte, deberán entregar la práctica contestada una semana después de haber concluido las actividades. El cumplimiento de estos factores se registrará en la lista de cotejo de la que dependerá la asignación de una calificación de la siguiente manera:

Actitudes: 20 %

Dominio teórico: 40 %

Dominio práctico: 40 %

Lista de cotejo

Acciones a evaluar	SÍ	NO	%
1. Presentó completo al inicio de la práctica el manual y diagrama de flujo.			5
2. Durante la sesión, ¿portó bata, cubrepelo, cubrebocas y zapatos apropiados?			5
3. Al final de la sesión, ¿el espacio de trabajo y los materiales utilizados están limpios y ordenados?			10
4. ¿Mostró evidencias de su cuantificación?			20
5.¿Demostró dominio en la técnica de extracción de DNA?			20
6. ¿Realizo los cálculos y respondió el cuestionario incluyendo referencias consultada?			40

Práctica 4: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Introducción

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction) es una técnica desarrollada por el doctor Kary Mullis en 1986, con el objetivo de generar muchas copias de fragmentos específicos de DNA. En la actualidad existen distintos protocolos actualizados y equipos automatizados que facilitan su ejecución (Iwasa y Marshall, 2018).

La técnica de PCR convencional permite la obtención de un gran número de copias de fragmentos específicos de DNA en poco tiempo y de manera sencilla, el procedimiento consiste en 3 pasos: desnaturalización, ciclos de hibridación y extensión o elongación final; estos se programan y realizan con determinadas características en equipos denominados termocicladores convencionales. La PCR es una herramienta muy utilizada por las diversas aplicaciones que ofrece en varias disciplinas, como la Biología Molecular, Ingeniería Genética y la medicina (Jimenez y Espino, 2013; Vázquez Conde, 2018).

Propósito específico

Identificar y dominar la técnica de PCR convencional aplicando los fundamentos teóricos y prácticos.

Criterios de desempeño

- Previo a la práctica deberás leer el procedimiento y elaborar un diagrama de flujo.
- Durante la práctica, realizarás los procedimientos descritos para preparar la muestra y termociclador para ejecutar la PCR convencional.
- Al finalizar la práctica, dejarás limpio y ordenado tu lugar de trabajo.

Resultados esperados

Serás competente para realizar la PCR convencional, aplicando conocimientos teóricos y técnicos para su correcta ejecución.

Desarrollo de la práctica

Esta actividad la realizarás formando un equipo de 5-6 personas.

Materiales necesarios para trabajar por equipo:

Guantes libres de talco

Muestra de DNA

Tubos para PCR

Micropipetas

Puntillas

Gradillas

Reactivos:

Etanol 70 %

KIT/ 200pbs: DONGSHENG BIOTECH

TAQ MIX. Incluye:

TAQ DNA POLIMERASA, DNTP'S, Mg₂SO₄,

BUFFER y AZUL DE BROMOFENOL.

AGUA LIBRE DE NUCLEASAS.

Equipo necesario:

Termociclador convencional

Campana

Por seguridad, considerar las siguientes recomendaciones:

- Evitar el contacto de sustancias químicas en piel y ojos.
- La absorción de líquidos con micropipeta se debe llevar de manera lenta.
- No se expulsan a la fuerza los líquidos de la micropipeta.
- En caso de derrame limpiar la zona.
- Aplicar el uso correcto de campana.
- Aplicar el uso correcto de termociclador.

La técnica de PCR provee la capacidad de amplificar secuencias específicas de DNA a partir de cantidades muy pequeñas de una manera rápida, se encuentra fundamentada en el mecanismo de replicación. El proceso de PCR convencional está conformado por los siguientes pasos:

El primer paso es la desnaturalización, para ello el DNA es expuesto a una temperatura de 90 °C ocasionando la separación de la doble cadena.

El segundo paso es la hibridación, pequeños segmentos de DNA llamados *primers* o cebadores se unen de manera complementaria a una sección específica de la secuencia, marcando el inicio de la secuencia a amplificar esto sucede a una temperatura de entre 50 a 60 °C.

Finalmente, el tercer paso es la elongación, en este la enzima polimerasa agrega nucleótido por nucleótido de manera complementaria después de los cebadores, generando una copia exacta del segmento a una temperatura de 70 °C.

Los ciclos se repiten hasta obtener el número de copias necesarias, la técnica de PCR es generada en un termociclador que permite controlar la actividad enzimática (Clark y Pazdernik, 2009; Salazar, Sandoval y Armendáriz, 2016).

Pasos a seguir:

- Para iniciar es necesario hacer una limpieza de la superficies y paredes de la campana con etanol a 70 % y sanitas, evitando la parte superior para no ocasionar un daño.
- Una vez limpia la campana, se colocarán dentro los materiales necesarios como son las micropipetas, puntillas, gradilla, tubos y guantes. Enseguida se activa la luz UV durante 20 minutos, esta ayudará a mantener estéril la campana. Recodar que mientras se encuentre encendida la luz UV es necesario retirarse del lugar debido a que esta podría causar daños en la salud.
- Pasados los 20 minutos se realizará la mezcla de la reacción, es importante mencionar que cada Kit de PCR contiene un instructivo que describe las especificaciones de los reactivos y los volúmenes que se deben agregar para la reacción. Y de este modo obtener las concentraciones necesarias.

- Ajustar la micropipeta al volumen deseado (consultarlo en la hoja de instrucciones del KIT 200pbs: DONGSHENG BIOTECH) para tomar del Master Mix y se colocará en un tubo para PCR.
- Enseguida se agregarán los primes, primero se tomará 1 μ L del primer forward y se colocará en el tubo que contiene la mezcla, después se agregará 1 μ L del primer reverse.

Nota: Se deberá tener mucho cuidado de que las puntas que se utilizan para pipetear **NO** toquen ninguna superficie. Si esto ocurre se deberá desechar y utilizar una nueva puntilla.

- Para continuar, se ajustará la micropipeta a 5 μ L para tomar de la muestra de DNA y se colocará en el tubo con los componentes antes ya agregados.

Nota: Es importante que todos los reactivos y la muestra se mantengan a la temperatura correspondiente antes y después de ser utilizados.

- Por último, se agregarán 3.5 μ L de agua de grado molecular para completar la reacción. Al colocar el volumen es importante mezclar con ayuda de la micropipeta al absorber y expulsar varias veces el volumen de modo que permita la homogenización de los componentes de la reacción.
- Después de preparar la reacción se conecta el termociclador convencional a un regulador y posteriormente se enciende. En la parte superior se ubica el apartado de los orificios donde se colocarán los tubos para PCR, una vez sean colocadas las muestras en su posición se cierra el equipo.
- El monitor del termociclador presenta distintas funciones, una de ellas es elaborar un programa en el equipo, de modo que este se encargue de seguir los pasos establecidos una vez sea señalada la función “correr programa”.
- Por lo que la programación del equipo será de la siguiente manera:
 1. Desnaturalización inicial a una temperatura de 95 °C por 5 minutos.
 2. Amplificación con 30 ciclos, cada ciclo será conformado por los procesos de desnaturalización a una temperatura de 94 °C por 1 minuto, de alineamiento a una temperatura de 55 °C durante 1 minuto y de elongación a una temperatura de 72 °C por 2 minutos.
 3. Extensión final, la cual se llevará a cabo a una temperatura de 72 °C por 5 minutos.

- Una vez que el termociclador realice completamente la programación establecida, los productos pueden ser retirados para la realización de la electroforesis o el almacenamiento en congelación.
- Finalmente se apaga y desconecta el equipo de PCR.
- Limpiar el área de trabajo e instrumentos de laboratorio utilizados.
- Dejar las micropipetas a su máxima capacidad.

Cuestionario:

¿Cuál es el fundamento de PCR? _____

Referencia consultada: _____

¿Qué diferencia existe entre la PCR convencional y la PCR en tiempo real? _____

Referencia consultada: _____

¿Qué elementos químicos son necesarios? _____

Referencia consultada: _____

¿Cuál es la función de la Polimerasa? _____

Referencia consultada: _____

Describir la función de los *Primers Forward* y *Reverse*: _____

Referencia consultada: _____

¿Qué sucede en la fase de desnaturalización? _____

Referencia consultada: _____

¿Qué sucede en la fase de alineación? _____

Referencia consultada: _____

¿Qué sucede en la fase de elongación? _____

Referencia consultada: _____

¿Cómo se analiza el producto de amplificación? _____

Referencia consultada: _____

Describir las aplicaciones de la PCR: _____

Referencia consultada: _____

Discusión de resultados: _____

Redactar una conclusión general de la práctica: _____

Sistema de evaluación

Es requisito que todos los alumnos presenten su manual y un diagrama de flujo sencillo elaborado de forma individual el día de la sesión de laboratorio. Por otra parte, deberán entregar la práctica contestada una semana después de haber concluido las actividades. El cumplimiento de estos factores se registrará en la lista de cotejo de la que dependerá la asignación de una calificación de la siguiente manera:

Actitudes: 20 %

Dominio teórico: 40 %

Dominio práctico: 40 %

Lista de cotejo

Acciones a evaluar	SÍ	NO	%
1. Presentó completo al inicio de la práctica el manual y diagrama de flujo.			5
2.Durante la sesión, ¿portó bata, cubrepelo, cubrebocas y zapatos apropiados?			5
3.Al final de la sesión, ¿el espacio de trabajo y los materiales utilizados están limpios y ordenados?			10
4. ¿Mostró evidencias de su PCR?			20
5.¿Demostró dominio en la técnica de PCR?			20
6.¿Respondió el cuestionario incluyendo referencias consultada?			40

Práctica 5: Enzimas de restricción: Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP)

Introducción

El descubrimiento de las enzimas de restricción ha traído consigo una revolución para el campo de la Biología Molecular y la Ingeniería Genética, ya que gracias a la caracterización, aislamiento y regulación de los diferentes tipos de enzimas han surgido nuevas metodologías. Entre las que destacan la clonación para la obtención de DNA recombinante, producción de proteínas recombinantes, estudio de polimorfismos, mapas de restricción, generación de organismos transgénicos y secuenciación de genomas.

La innovación de las enzimas de restricción facilitó el estudio de DNA, ahora es posible seccionar moléculas grandes de DNA y separarlas en fragmentos para un mejor análisis y aprovechamiento en la industria (Salazar, Sandoval y Armendáriz, 2016).

Propósito específico

Identificar el uso de enzimas de restricción en la técnica de RFLP aplicando fundamentos teóricos y prácticos.

Criterios de desempeño

- Previo a la práctica deberás leer el procedimiento y elaborar un diagrama de flujo.
- Durante la práctica, reconocerás el uso de enzimas de restricción para el desarrollo de la técnica de RFLP.
- Al finalizar la práctica, dejarás limpio y ordenado tu lugar de trabajo.

Resultados esperados

Serás competente para la identificación y aplicación de enzimas de restricción en la técnica de RFLP, así como la interpretación de resultados.

Desarrollo de la práctica

Esta actividad la realizarás formando un equipo de 5-6 personas.

Materiales necesarios para trabajar por equipo:

Guantes

Productos de PCR (cepas de *Saccharomyces cerevisiae*)

Agua de grado molecular

Microtubos

Micropipetas

Puntillas

Reactivos:

Enzima de Restricción Hha I, Hae III y Hinf I (Invitrogen)

Buffer de la Enzima

Equipo necesario:

Incubadora

Microcentrífuga

Por seguridad, considerar las siguientes recomendaciones:

- Evitar el contacto de sustancias químicas en piel y ojos.
- La absorción de líquidos con micropipeta se debe llevar de manera lenta.
- No se expulsan a la fuerza los líquidos de la micropipeta.
- En caso de derrame limpiar la zona.
- Aplicar el uso correcto de los instrumentos de laboratorio.

La selectividad de las enzimas las vuelve de gran utilidad como herramientas primordiales en la Ingeniería Genética, ya que cada enzima de restricción contiene una secuencia de reconocimiento particular por lo que son organizadas por tipos según el sitio de escisión que presente. Entre sus usos más comunes están:

Los Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP): ya que las enzimas de restricción cortan en lugares específicos, si un organismo tiene una mutación genética en alguno de los sitios de restricción, las enzimas no cortarán ese lugar resultando en un patrón de corte distinto, esto ayuda a observar diferencias entre individuos de una misma especie.

El método de PCR-RFLP es una técnica que está compuesta por la combinación de distintos métodos moleculares básicos. Primero se debe realizar una amplificación del gen de interés mediante la PCR y posteriormente se realiza la digestión (o corte en fragmentos) del producto amplificado por medio de enzimas de restricción. Y finalmente se realiza una electroforesis para la visualización de los fragmentos generados por las enzimas de restricción (Clark y Pazdernik, 2009; National Human Genome Research Institute y Pavan, 2020).

Pasos a seguir:

- Previamente se realizó una PCR con las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* para la obtención de los productos.

Nota: Las condiciones necesarias para la PCR se encuentran descritas por Segura *et al.* (2010).

- Una vez realizada la PCR los productos se utilizarán sin una purificación adicional.
- Se tomarán alícuotas de 7 µL de los productos de PCR y se colocarán en un microtubo. Para continuar agregar el volumen indicado de agua de grado molecular.

Nota: Todos los microtubos deberán estar previamente rotulados.

- Enseguida se tomarán 25 µL de la enzima de restricción y se colocarán en el microtubo.

Nota: Los reactivos se deberán homogeneizar y colocar en hielo para mantener las temperaturas correctas. Los volúmenes necesarios para la reacción de las enzimas de restricción son diferentes según el fabricante.

- Una vez que todos los componentes se encuentren en el microtubo, se llevará a la microcentrífuga durante 5 segundos para integrar todos los componentes de la reacción.
- Una vez realizada la reacción se incubará a 37 °C durante 2 horas.

- Transcurrido el tiempo de incubación, los productos de restricción se analizarán por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 3 %, con las siguientes condiciones: con un marcador de peso molecular de 100 pb, la corrida será a 120 V por 80 min, en Buffer TAE 1X y aplicar bromuro de etidio para teñir el gel.
- Finalmente usar fotodocumentador para observar las bandas generadas.
- Limpiar el área de trabajo e instrumentos de laboratorio utilizados.
- Dejar las micropipetas a su máxima capacidad.

Cuestionario:

¿Cuántos tipos de enzimas de restricción hay? _____

Referencia consultada: _____

¿De dónde son aisladas las enzimas de restricción? _____

Referencia consultada: _____

Describir las aplicaciones de las enzimas de restricción: _____

Referencia consultada: _____

¿Cuáles son las condiciones de almacenamiento y conservación que deben de tener las enzimas de restricción? _____

Referencia consultada: _____

Mencionar 5 enzimas de restricción de uso común en aplicaciones biotecnológicas:

Enzima:	Organismo de origen:	Secuencia de reconocimiento:
---------	----------------------	------------------------------

_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Referencia consultada: _____

Insertar una fotografía del gel con las bandas generadas por las enzimas de restricción y señala el peso de cada una



Discusión de resultados: _____

Redactar una conclusión general de la práctica: _____

Sistema de evaluación

Es requisito que todos los alumnos presenten su manual y un diagrama de flujo sencillo elaborado de forma individual el día de la sesión de laboratorio. Por otra parte, deberán entregar la práctica contestada una semana después de haber concluido las actividades. El cumplimiento de estos factores se registrará en la lista de cotejo de la que dependerá la asignación de una calificación de la siguiente manera:

Actitudes: 20 %

Dominio teórico: 40 %

Dominio práctico: 40 %

Lista de cotejo

Acciones a evaluar	SÍ	NO	%
1. Presentó completo al inicio de la práctica el manual y diagrama de flujo.			5
2. Durante la sesión, ¿portó bata, cubrepelo, cubrebocas y zapatos apropiados?			5
3. Al final de la sesión, ¿el espacio de trabajo y los materiales utilizados están limpios y ordenados?			10
4. ¿Mostró evidencia de la técnica RFLP?			20
5. ¿Demostró dominio en la técnica de RFLP?			20
6. ¿Respondió el cuestionario incluyendo referencias consultada?			40

Práctica 6: Clonación de DNA

Introducción

La clonación molecular o genética, se refiere al conjunto de técnicas utilizadas para generar copias genéticamente idénticas de DNA, células u organismos con DNA recombinante, esto se logra al aislar un fragmento de DNA, que a su vez es vinculado en un vector que permita transferir esta información a células huésped. Por lo que es necesario que el vector contenga secuencias que permitan replicarse dentro de la célula huésped. Una vez el segmento de DNA está dentro de una bacteria, se replica junto con el DNA bacteriano (o viral). El número de moléculas de DNA recombinante aumenta en proporción al número de células bacterianas (o viral) que se forman. De esta manera se forman millones de copias del DNA en un periodo corto.

Esta tecnología surgió a partir de la necesidad de obtener grandes cantidades de un gen, para analizar la secuencia de nucleótidos, estudiar sus mutaciones, analizar su función y la modificación genética de un organismo para un beneficio (Iwasa y Marshall, 2018; Mader y Windelspecht, 2019).

Propósito específico

Reconocer y desarrollar la etapa de ligación que compone la clonación de DNA, aplicando los principios teóricos y prácticos.

Criterios de desempeño

- Previo a la práctica deberás leer el procedimiento y elaborar un diagrama de flujo.
- Durante la práctica, seguirás las instrucciones descritas para realizar la ligación entre el inserto y el vector para la clonación de DNA.
- Al finalizar la práctica, dejarás limpio y ordenado tu lugar de trabajo.

Resultados esperados

Serás competente para describir y realizar el procedimiento de clonación molecular de manera eficiente.

Desarrollo de la práctica

Esta actividad la realizarás formando un equipo de 5-6 personas.

Materiales necesarios para trabajar por equipo:

Guantes

Vector

Inserto (DNA)

Micropipetas

Puntillas

Microtubos

Reactivos:

Buffer del kit

Enzima ligasa

Agua libre de nucleasas

Contenedor con hielo

Equipo necesario:

Incubadora

Por seguridad, considerar las siguientes recomendaciones:

- Evitar el contacto de sustancias químicas en piel y ojos.
- La absorción de líquidos con micropipeta se debe llevar de manera lenta.
- No se expulsan a la fuerza los líquidos de la micropipeta.
- En caso de derrame limpiar la zona.

- Aplicar el uso correcto de centrífuga.

Para lograr el DNA recombinante es necesario la transformación celular, es decir, que el material genético se incorpore para que se replique, transcriba y traduzca aprovechando la maquinaria enzimática de la célula huésped. Para ello, se involucran los siguientes pasos:

Preparación del vector de clonación: Será el vehículo con el que se podrá regular el gen que se desea clonar, existen varios tipos, entre ellos, los plásmidos.

Preparación del inserto: Es el gen que se desea insertar en el vector de clonación, este debe ser aislado y purificado.

Ligación: En este paso, se unirán el vector y el inserto gracias a la actividad de enzimas que “ligan/pegan” los extremos de ambos.

Transformación: El vector recombinante será introducido a la célula del hospedero.

Selección: En esta etapa se deben escoger a las células que fueron transformadas de las que no, para ello existen varias técnicas, por ejemplo, selección por color de colonias: azul y blanco (Salazar, Sandoval y Armendáriz, 2016).

Pasos a seguir:

Previamente, se eligió un vector con características específicas que ayuden en la clonación del DNA de interés.

Se realizó una digestión del inserto de interés con enzimas de restricción específicas para la obtención de éste, tipo de enzimas son funcionales para el vector.

- Para comenzar con la clonación es necesario calcular la cantidad apropiada del DNA inserto esto se realiza de la siguiente manera:

$$\frac{(\text{Concentración en ng del vector}) * (\text{tamaño en kb del inserto})}{(\text{tamaño en kb del vector})} = \text{Relación molar inserto: vector}$$

- Se recomienda optimizar esta relación molar inserto: vector desde 3:1 o bien 1:1, posteriormente se deberá preparar la reacción de ligación.

Reacción de ligación

- Para iniciar, pipetear el volumen del inserto y añadir en un microtubo.
- Enseguida, también se añadirá al microtubo el vector.
- Para continuar se deberán pipetear los volúmenes de Buffer, enzima ligasa y agua libre nucleasas que señala el instructivo del kit.

Nota: Es importante mantener los reactivos en el contenedor con hielo, esto con el fin de evitar modificación en su efectividad.

Nota: Al colocar los volúmenes deseados se deberá pipetear suavemente.

- Posteriormente, la reacción se deberá incubar durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C.

Este es el procediendo que se debe realizar para lograr la ligación entre el vector y el inserto, los siguientes pasos son la transformación y selección. A continuación, para complementar la práctica se describen de manera teórica algunas consideraciones importantes que se deben tomar en cuenta para su realización.

Transformación

En este procesó las bacterias competentes adquieren el DNA

- Una consideración importante es el cuidado de las bacterias competentes, que deberán estar congeladas a una temperatura de -80 °C mientras no se usen.
- La preparación con la reacción de ligación y las células competentes se deberán hacer de manera suave, para permitir la mezcla del plásmido con las células competentes.
- Este procedimiento también incluye la realización de un choque térmico, es importante realizarlo de manera adecuada para lograr un buen resultado.
- Limpiar el área de trabajo e instrumentos de laboratorio utilizados.
- Dejar las micropipetas a su máxima capacidad.

Cuestionario:

¿Cuál es el fundamento de la clonación? _____

Referencia consultada: _____

¿En cuántas etapas está dividida la metodología tradicional de la clonación de DNA?
(explicar brevemente cada etapa) _____

Referencia consultada: _____

¿Qué es un vector de clonación? _____

Referencia consultada: _____

¿Cuáles son los 3 componentes esenciales de un vector de clonación? _____

Referencia consultada: _____

¿Cuáles son los vectores de clonación más utilizados? _____

Referencia consultada: _____

Describe las características de los Plásmidos y Bacteriófagos o fagos: _____

Referencia consultada: _____

¿Cuál es la bacteria más utilizada como hospedera del vector? ¿Por qué?_____

Referencia consultada:_____

Describir las aplicaciones de la clonación en la industria:_____

Referencia consultada:_____

Discusión de resultados:_____

Redactar una conclusión general de la práctica: _____

Sistema de evaluación

Es requisito que todos los alumnos presenten su manual y un diagrama de flujo sencillo elaborado de forma individual el día de la sesión de laboratorio. Por otra parte, deberán entregar la práctica contestada una semana después de haber concluido las actividades. El cumplimiento de estos factores se registrará en la lista de cotejo de la que dependerá la asignación de una calificación de la siguiente manera:

Actitudes: 20 %

Dominio teórico: 40 %

Dominio práctico: 40 %

Lista de cotejo

Acciones a evaluar	SÍ	NO	%
1. Presentó completo al inicio de la práctica el manual y diagrama de flujo.			5
2. Durante la sesión, ¿portó bata, cubrepelo, cubrebocas y zapatos apropiados?			5
3. Al final de la sesión, ¿el espacio de trabajo y los materiales utilizados están limpios y ordenados?			10
4. ¿Mostró evidencias de la práctica de clonación?			20
5. ¿Demostró dominio en la técnica de clonación?			20
6. ¿Respondió el cuestionario incluyendo referencias consultada?			40

Práctica 7: Preparación de muestras para secuenciación en Illumina®

Introducción

La secuenciación del DNA es una técnica utilizada para determinar el orden de los nucleótidos en un segmento de DNA, tiene sus principios en la década de 1970 con métodos manuales. En la actualidad se han desarrollado nuevos métodos tecnológicos que han permitido su optimización. El uso de nuevas tecnologías de secuenciación ofrece la ventaja de secuenciar gran cantidad de segmentos de DNA de forma masiva y en paralelo, en un menor tiempo y a un menor costo (Mader y Windelspecht, 2019; Rubio *et al.*, 2020).

El método de secuenciación por Illumina® es uno de los más básicos y utilizados. El proceso general está compuesto por: la amplificación de los fragmentos de DNA para la generación del clúster y la detección de bases en la secuenciación a través de etiquetas fluorescentes. Esta tecnología es aplicable para secuenciar el DNA de cualquier organismo, en regiones específicas o en el genoma completo a través de distintos métodos.

La preparación de bibliotecas es esencial para una secuenciación correcta, por lo que, se han desarrollado distintos Kits que permitan la preparación de las bibliotecas de manera efectiva (Rubio *et al.*, 2020; illumina, 2021).

Propósito específico

Identificar los procedimientos de preparación de muestras para la secuenciación en Illumina® aplicando los fundamentos.

Criterios de desempeño

- Previo a la práctica deberás leer el procedimiento y elaborar un diagrama de flujo.
- Durante la práctica, realizarás las instrucciones descritas para la preparación de muestras para el equipo de Illumina®.
- Al finalizar la práctica, dejarás limpio y ordenado tu lugar de trabajo.

Resultados esperados

Serás competente para describir y realizar la preparación de muestras para la secuenciación en Illumina®.

Desarrollo de la práctica

Esta actividad la realizarás formando un equipo de 5-6 personas.

Materiales necesarios para trabajar por equipo:

Guantes

Muestra DNA

Micropipeta

Puntillas

Contenedor con hielo

Microtubos

Reactivos:

Master Mix de fragmentación

Fragmentasa de dsDNA

EDTA

Equipo necesario:

Termociclador

Vortex

Microcentrífuga

Por seguridad, considerar las siguientes recomendaciones:

- Evitar el contacto de sustancias químicas en piel y ojos.
- La absorción de líquidos con micropipeta se debe llevar de manera lenta.
- No se expulsan a la fuerza los líquidos de la micropipeta.
- En caso de derrame limpiar la zona.
- Aplicar el uso correcto de los instrumentos de laboratorio.

El flujo de trabajo de secuenciación de Illumina® se puede dividir en cuatro procesos independientes: 1. Preparación de bibliotecas, 2. Generación de grupos, 3. Secuenciación, 4. Análisis de datos.

En esta ocasión se describirá el proceso de preparación de bibliotecas, el cual consiste en la obtención de fragmentos cortos de DNA con un tamaño adecuado y la adición de adaptadores con sitios de unión a la celda de flujo y del cebador de secuenciación. Dicho proceso puede realizarse por medio de la sonicación o bien, de manera enzimática. Una vez fragmentado el DNA, se seleccionan aquellas hebras de un rango de tamaño específico.

El proceso de preparación de bibliotecas suele incluir estos pasos: establecer el tipo de muestra ARN o DNA genómico, fragmentación, adaptadores y biblioteca de secuenciación (illumina, 2021; Jauk, 2019).

Pasos a seguir:

- Para la preparación de bibliotecas es importante seleccionar un Kit de preparación de bibliotecas apropiado para la aplicación deseada.
- Precaliente el termociclador a 37 °C.
- A continuación, prepare el Master Mix de fragmentación.

Nota: Mantenga todos los reactivos en hielo.

- Asegúrese de que la enzima se mezcle bien en vortex antes de su uso.
- Pipetee el volumen requerido de fragmentasa de dsDNA.
- Agregue la fragmentasa de dsDNA a su muestra de DNA.
- Regrese el tubo de reacción en hielo.
- Pipetee el volumen requerido de Buffer de reacción de fragmentasa 10x v2.

- Agregue el Buffer de reacción de fragmentasa 10x v2 a su muestra de DNA.
- Mezcle la preparación del Master Mix de fragmentación en vortex y centrifugue.
- Trabajar sobre hielo o sobre un bloque frío.
- Agregue 4 µL de Master Mix de fragmentación en cada microtubo, aplique vortex y centrifugar.
- Devuelva el tubo de reacción en hielo o en un bloque frío.
- Coloque las muestras en el termociclador e incube a 37 °C durante 30 minutos.
- Retirar las muestras del termociclador e inmediatamente colocar de nuevo en hielo.
- Agregue 5 µL EDTA en la Mix para detener la reacción.
- Proceda inmediatamente a la purificación posterior a la fragmentación.

Nota: Los volúmenes necesarios dependerán a la Kit que se eligió.

Nota: Los métodos de cuantificación de bibliotecas pueden variar según el Kit de preparación de bibliotecas seleccionado.

- Limpiar el área de trabajo e instrumentos de laboratorio utilizados.
- Dejar las micropipetas a su máxima capacidad.

Cuestionario

¿Qué es la Secuenciación de Nueva Generación (NGS)? _____

Referencia consultada: _____

¿Cuáles son los beneficios de la secuenciación de DNA con Illumina®? _____

Referencia consultada: _____

Describir de manera breve los siguientes métodos de secuenciación de DNA con illumina®:

1. Secuenciación del genoma completo 2. Secuenciación de metilación 3. Secuenciación dirigida 4. Secuenciación de chips 5. Secuenciación microbiana

Referencia consultada: _____

¿Cuáles son los beneficios y aplicaciones de la secuenciación agrícola? _____

Referencia consultada: _____

Describir los componentes de los fragmentos para la generación de librerías: _____

Referencia consultada: _____

¿Cuál es el tamaño de los fragmentos recomendado para la generación de librerías en la secuenciación con illumina®? Explicar ¿Por qué? _____

Referencia consultada: _____

Discusión de resultados: _____

Redactar una conclusión general de la práctica: _____

Sistema de evaluación

Es requisito que todos los alumnos presenten su manual y un diagrama de flujo sencillo elaborado de forma individual el día de la sesión de laboratorio. Por otra parte, deberán entregar la práctica contestada una semana después de haber concluido las actividades. El cumplimiento de estos factores se registrará en la lista de cotejo de la que dependerá la asignación de una calificación de la siguiente manera:

Actitudes: 20 %

Dominio teórico: 40 %

Dominio práctico: 40 %

Lista de cotejo

Acciones a evaluar	SÍ	NO	%
1. Presentó completo al inicio de la práctica el manual y diagrama de flujo.			5
2.Durante la sesión, ¿portó bata, cubrepelo, cubrebocas y zapatos apropiados?			5
3.Al final de la sesión, ¿el espacio de trabajo y los materiales utilizados están limpios y ordenados?			10
4.¿Mostró evidencias de la preparación de muestra?			20
5.¿Demostró dominio en la técnica de preparación de muestras para secuenciación de Illumina®?			20
6.¿Respondió el cuestionario incluyendo referencias consultada?			40

Práctica 8: Técnica de Western Blot

Introducción

La transferencia Western es una técnica utilizada para la detección y caracterización de proteínas. La aplicación de esta metodología ofrece resultados semicuantitativos y cuantitativos de la proteína a partir de muestras biológicas simples o complejas. Su fundamento se basa en la separación de proteínas de acuerdo a su carga y peso molecular en geles y su posterior transferencia a una membrana sólida en la que un anticuerpo específico detecte la proteína de interés.

La técnica de Western Blot está compuesta por los siguientes pasos generales: preparación de muestras, separación por tamaño en gel de poliacrilamida de SDS, transferencia a un soporte sólido, marcación de la proteína diana utilizando un anticuerpo y análisis de las bandas generadas (Heda *et al.*, 2020; Mishra, Tiwari y Gomes, 2017).

Para lograr resultados correctos y reproducibilidad de la técnica, es importante aplicar cada paso de manera adecuada, por lo que, en la presente práctica se describirá el método de preparación de muestras.

Propósito específico

Identificar y desarrollar el proceso de preparación de muestra de proteínas para la técnica de Western Blot.

Criterios de desempeño

- Previo a la práctica deberás leer el procedimiento y elaborar un diagrama de flujo.
- Durante la práctica, realizarás el procedimiento químico para una correcta preparación de muestra para la técnica Western Blot.
- Al finalizar la práctica, dejarás limpio y ordenado tu lugar de trabajo.

Resultados esperados

Serás competente para realizar la preparación de muestras para la técnica de Western Blot, aplicando conocimientos teóricos y técnicos para su correcta ejecución.

Desarrollo de la práctica

Esta actividad la realizarás formando un equipo de 5-6 personas.

Materiales necesarios para trabajar por equipo:

Buffer de lisis

Buffer de muestra: SDS y beta-mercaptoetanol o ditioneitol

Cóctel inhibidor de fosfatasa y proteasa

Equipo necesario:

Centrífuga

Contenedor con hielo

Por seguridad, considerar las siguientes recomendaciones:

- Evitar el contacto de sustancias químicas en piel y ojos.
- La absorción de líquidos con micropipeta se debe llevar de manera lenta.
- No se expulsan a la fuerza los líquidos de la micropipeta.
- En caso de derrame limpiar la zona.
- Aplicar el uso correcto de los instrumentos de laboratorio.

La preparación eficaz de la muestra es un paso que no es tomado con relevancia en la técnica de transferencias de Western provocando resultados erróneos y fallas en la reproducibilidad del método. Por lo que, una eficiente extracción y purificación de proteínas es primordial para evitar este tipo de errores.

Dentro de los factores que se deben considerar para la preparación de muestra se encuentra el seleccionar un método de homogenización adecuado que permita la liberación del contenido intracelular mediante la rotura de las membranas celulares, así como elegir un Buffer de lisis óptimo para facilitar la adecuada solubilización de proteínas y prevenir la degradación. Una vez que se prepare el lisado y la homogenización de la muestra, se podrá realizar la separación según su tamaño por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS.

Es importante señalar que una vez que se tenga preparada la muestra de proteínas, ésta se deberá conservar en temperaturas optimas hasta su uso y someterse a la menor manipulación

posible para minimizar la degradación de proteínas (Bass *et al.*, 2017; Mishra, Tiwari y Gomes, 2017).

Pasos a seguir:

Preparación de muestra por método químico

Nota: La elección del método de preparación químico o físico dependerá del tipo de muestra de partida, la localización subcelular de la proteína y de las condiciones óptimas que requiera el anticuerpo.

- Tomar el volumen deseado de la muestra de partida y colocar en un microtubo previamente rotulado.
- Enseguida pipetear el volumen de Buffer de lisis y agregar al microtubo con la muestra.

Nota: La elección del Buffer de lisis, depende en parte de la localización de la proteína de interés dentro de la célula: citoplasmática, unida a la membrana, dentro de orgánulos celulares, etc.

- Centrifugar a 4 °C teniendo en cuenta que la fuerza de centrifugación y el tiempo varían en función del tipo de muestra.
- Colocar los tubos en hielo y recolectar el sobrenadante en microtubos previamente enfriados y rotulados, descartando el pellet.

Nota: es importante mantener siempre la muestra a una temperatura 4 °C para evitar la degradación de proteínas.

Preparación de la muestra para carga en gel:

- Proteínas desnaturalizadas

Nota: Con el objetivo de que los anticuerpos tengan una mayor afinidad se realiza la desnaturalización de la proteína.

- Tomar el volumen deseado de Buffer de carga y agregar a la muestra. Posteriormente, colocar la mezcla a una temperatura 100 °C durante 5 minutos.
- Limpiar el área de trabajo e instrumentos de laboratorio utilizados.

- Dejar las micropipetas a su máxima capacidad.

Cuestionario

¿Cuál es el fundamento técnico de Western Blot? _____

Referencia consultada: _____

Describir de manera breve el proceso de la técnica de Western Blot: _____

Referencia consultada: _____

¿Por qué es importante la preparación de muestra en la técnica de Western Blot? _____

Referencia consultada: _____

¿Por qué la preparación de muestra se debe realizar en una temperatura de 4 °C? _____

Referencia consultada: _____

¿Por qué en algunos casos la muestra de proteína se debe desnaturalizar? _____

Referencia consultada: _____

Describir las aplicaciones de la técnica de Western Blot: _____

Referencia consultada: _____

Discusión de resultados: _____

Redactar una conclusión general de la práctica: _____

Sistema de evaluación:

Es requisito que todos los alumnos presenten su manual y un diagrama de flujo sencillo elaborado de forma individual el día de la sesión de laboratorio. Por otra parte, deberán entregar la práctica contestada una semana después de haber concluido las actividades. El cumplimiento de estos factores se registrará en la lista de cotejo de la que dependerá la asignación de una calificación de la siguiente manera:

Actitudes: 20 %

Dominio teórico: 40 %

Dominio práctico: 40 %

Lista de cotejo

Acciones a evaluar	SÍ	NO	%
1. Presentó completo al inicio de la práctica el manual y diagrama de flujo.			5
2.Durante la sesión, ¿portó bata, cubrepelo, cubrebocas y zapatos apropiados?			5
3. Al final de la sesión, ¿el espacio de trabajo y los materiales utilizados están limpios y ordenados?			10
4.¿Mostró evidencias de la técnica de Western Blot?			20
5.¿Demostró dominio en la técnica de Western Blot?			20
6.¿Respondió el cuestionario incluyendo referencias consultada?			40

Referencias bibliográficas:

- Bass, J. J. et al. (2017). An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*. John Wiley and Sons, Ltd, 27(1), pp. 4–25. doi: 10.1111/SMS.12702.
- Bermúdez-Jiménez, C. et al. (2021). Oximetría de pulso y su eficacia para diagnosticar vitalidad pulpar. *Revista de la Asociación Dental Mexicana*, 78(2), pp. 84–89. doi: 10.35366/99283.
- Burbano Rosero, E. M. et al. (2017). Manual de biología molecular. Disponible en: <http://up-rid2.up.ac.pa:8080/xmlui/handle/123456789/2219>.
- CINVESTAV y Favier, A. T. (2012). Fundamentos de mejoramiento genético vegetal. México. Disponible en: <http://www.ira.cinvestav.mx/>.
- Clark, D. P. y Pazdernik, N. J. (2009). *Biotechnology Applying the Genetic Revolution*. United States: Elsevier Science & Technology. Disponible en: www.elsevierdirect.com.
- Fierro, F. F. (2014). Electroforesis de ADN', Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. pp. 27–52. Disponible en: [https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBB-D5ADF759505257D4900580FE6/\\$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf](https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBB-D5ADF759505257D4900580FE6/$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf)
- García, R. (2013). Instrumentos que revolucionaron la química: la historia del espectrofotómetro. *Salud y Ambiente*, 6(8), pp. 11–19. Disponible en:

www.saber.ula.ve/avancesenquimicaAvancesenQuímica,13.

Heda, G. D. et al. (2020). Optimization of western blotting for the detection of proteins of different molecular weight. *Biotechniques. Future Science Group*, 68(6), p. 318. doi: 10.2144/BTN-2019-0124.

illumina (2021). DNA Sequencing, Understanding the genetic code, illumina: Innovative technologies. Disponible en: <https://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing.html>

Iwasa, J. y Marshall, W. (2018). Karp. Biología celular y molecular: conceptos y experimentos. 8a edn. Editores: McGraw-Hill Interamericana. México: *McGraw-Hill Interamericana*. Disponible en: <https://www.mheducation.com.mx/>

Jauk, F. (2019). Secuenciación masiva paralela (NGS): conceptos básicos y aplicaciones. *Laboratorio de Secuenciación, Hospital Italiano de Buenos Aires*, 23, pp. 21–23. Disponible en: http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol23/n2_educacional/2-ROL-DE-NGS-EN-PATOLOGIA-MIELOIDE-jauk-n23-ext.pdf.

Jimenez, C. B. y Espino, F. J. (2013). Genética Conceptos esenciales. 1a edn. Madrid: *Medica Panamericana*. Disponible en: <https://www.medicapanamericana.com/mx>

Mader, S. S. y Windelspecht, M. (2019). Biología. 13a edn. Edited by *HMcGraw-Hill Interamericana*. Ciudad de México: *McGraw-Hill Interamericana*. Disponible en: <https://www.mheducation.com.mx/>

Méndez Robles, M. D. et al. (2017). Prácticas de microbiología. 1a edn. Editores: *Staudeg*. Zapopan, Jalisco: *Staudeg*. Disponible en:

- Mishra, M., Tiwari, S. y Gomes, A. V. (2017). Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques, Expert review of proteomics. *NIH Public Access*, 14(11), p. 1037. doi: 10.1080/14789450.2017.1388167.
- Montalvo, A. y Lugo, M. (2016). Electroforesis: Fundamentos, avances y aplicaciones. *Epistemos*, 26, pp. 48–54. Disponible en: <https://doi.org/10.36790/epistemos.v13i26.96>
- National Human Genome Research Institute y Pavan, W. (2020). Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP). NHGRI, *National Human Genome Research Institute*. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Fragmentos-de-restriccion-de-longitud-polimorfica>
- Ríos Sánchez, E. et al. (2016). Comparative analysis of different DNA extraction methods and their genotyping efficiency in Mexican population. *Acta Universitaria*, 26(4), pp. 56–65. Doi: 10.15174/au.2016.1078.
- Rubio, S. et al. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Médica. Editorial Pontificia Universidad Javeriana*, 61(2). Doi: 10.11144/JAVERIANA.UMED61-2.SNGS.
- Salazar M., A., Sandoval R. y Armendáriz B., J. (2013). Fundamentos y Aplicaciones en las ciencias de la salud. 1a ed. México: *McGraw-Hill Interamericana*. Disponible en: <https://www.mheducation.com.mx/>

- Salazar M., A. M., Sandoval R., A. S. y Armendáriz B., J. S. (2016). *Biología molecular: fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. 2a. ed. México: *McGraw-Hill Interamericana*. Disponible en: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/wdgbibliomhe/detail.action?docID=4536068>.
- Segura G., L. E. et al. (2010). PCR-RFLP de las regiones ITS-5 . 8S como herramienta de identificación de levaduras : ventajas y desventajas', 8, p. 13. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73013006002>.
- Tammelleo, A. D. (1995). MI: independent living home pt. drowns: failure to follow nursing care plan., *The Regan report on nursing law*, 36(4), p. 3.
- Thermo Fisherscientific and Biosystems, A. (2017). Document Connect, Thermo Fisherscientific. Disponibles en: https://www.thermofisher.com/documentconnect/documentconnect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFSAAssets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0017035_7600060_UG_EN.pdf
- Vázquez Conde, R. (2018). *Biología 1* . 3a edn. Ciudad de México: *Grupo Editorial Patria*. Disponible en: https://elibro-net.wdg.biblio.udg.mx:8443/es/lc/udg/titulos/40530?as_all=biologia__1&as_all_op=unaccent__icontains&prev=as