

Universidad de las Américas  
Laboratorio Genética

## Guías de laboratorio Genética CBI 514

Semestre II 2008

Laboratorio N°1 Genética mendeliana e Interacción génica

INTRODUCCIÓN.

Muchos rasgos morfológicos o caracteres humanos son controlados genéticamente de manera simple. Por ejemplo, la capacidad para enrollar la lengua en forma de U es dominante (alelo R) sobre la falta de esta habilidad (alelo r). Otro ejemplo, es el fenotipo recesivo (alelo l) lóbulo de la oreja pegado a la cara con respecto al fenotipo dominante lóbulo de la oreja suelto (L) (figura 1).

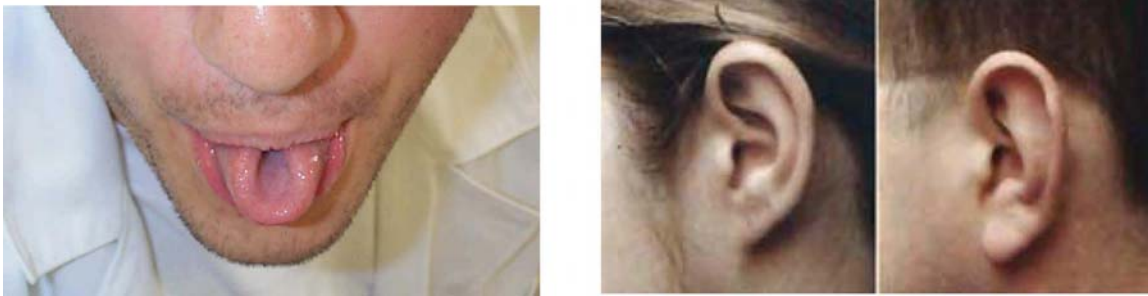


Figura 1. Fenotipos lengua enrollada (dominante) y lóbulos de la oreja pegado (recesivo) y suelto (dominante).

En los dos caracteres antes descritos los alelos se relacionan de manera simple (dominancia y recesividad), sin embargo, los alelos de un gen también pueden interactuar de manera compleja, produciendo fenotipos marcadamente distintos cuando se asocian entre sí. Un ejemplo de este tipo de relación es la codominancia, que se puede observar en el sistema ABO utilizado para clasificar distintos tipos de grupos sanguíneos en humanos. El sistema ABO tiene 3 alelos para un gen (i, IA e IB) que en asociación pueden producir 6 genotipos y 4 fenotipos distintos (Tabla 1). En esta serie alélica, los alelos IA e IB determinan un único antígeno, el cual se deposita sobre la superficie de los glóbulos rojos. Estos antígenos corresponden a dos diferentes formas de una misma proteína. Sin embargo, el alelo i no produce ningún tipo de antígeno. En los genotipos IAi e IBi, los alelos IA e IB son totalmente dominantes sobre i. Sin embargo, en el genotipo IAIB cada uno de los alelos produce su propio antígeno, así a estos alelos se les denomina codominantes pues los dos genes expresan su fenotipo en heterocigosis.

Comprender el modo de herencia del carácter grupo sanguíneo fue determinante para prevenir muchas muertes asociadas a las transfusiones de sangre. Por ejemplo, personas del grupo sanguíneo A producen glóbulos rojos con el antígeno A sobre su superficie, mientras que en su sangre circulan anticuerpos Anti-B. Por el contrario personas del tipo B tienen el antígeno B y producen anticuerpos Anti-A (Tabla 1). Así si una persona de tipo A recibe sangre de una persona de tipo B se producirá una reacción antígeno anticuerpo, lo que activará a las células del complemento que finalmente producirán hemólisis, destrucción de los glóbulos rojos.

Tabla 1. Fenotipos, genotipos, antígenos sobre los glóbulos rojos y anticuerpos en la sangre de personas con distinto grupo sanguíneo.

GENOTIPOS	FENOTIPO	ANTIGENO	ANTICUERPO
$I^A I^A; I^A i$	A	A	Anti-B
$I^B I^B; I^B i$	B	B	Anti-A
$I^A I^B$	AB	A y B	Ninguno
ii	O	NINGUNO	Anti-A y Anti-B

Otro antígeno que está presente en los glóbulos rojos es el antígeno Rh. Existen varios alelos dominantes (Rh) que determinan la presencia de este antígeno y un alelo recesivo (rh) que determina la ausencia de este antígeno. En forma natural las personas no tienen anticuerpos anti-Rh. Sin embargo, si una persona Rh<sup>-</sup> esta en contacto con sangre de una persona Rh<sup>+</sup>, su sistema inmune comenzará a producir anticuerpos anti-Rh. Esto es común en madres Rh<sup>-</sup> que tienen hijos Rh<sup>+</sup>, ya que en el momento del parto podría existir contacto entre la sangre de la madre con la del hijo. Al formar anticuerpos, si la madre Rh<sup>-</sup> presenta segundo embarazo y su hijo nuevamente posee el factor Rh<sup>+</sup>, los anticuerpos de la madre pueden atravesar la placenta y entrar al sistema circulatorio del hijo causando una patología llamada eritoblastosis fetal.

Como estos rasgos en humanos existen muchos rasgos o desordenes genéticos en plantas y animales que son controlados genéticamente por uno o pocos genes dando origen a patrones de herencia simples o complejos.

Objetivo general.

Identificar rasgos genéticos en humanos con mecanismos de herencia simple y compleja.

Objetivo específico:

Conocer el gen ABO, su posición en el genoma humano y comprender en términos moleculares como se producen los distintos fenotipos.

#### ACTIVIDADES

I.- Identificación de rasgos humanos con herencia mendeliana simple

a) En la siguiente tabla registre su fenotipo y determine su genotipo más probable para los siguientes rasgos.

Tabla 2. Caracteres humanos con herencia mendeliana simple.

N°	CARACTER	FENOTIPOS	GENOTIPOS
1	Lobulo de la oreja		
2	Capacidad de doblar la lengua en "U"		

II. Determinación del grupo sanguíneo ABO y factor Rh.

a) Siga el siguiente procedimiento para determinar su grupo sanguíneo.

- 1º. Rotule 4 portaobjetos como A, B, AB y Rh.
- 2º. En el portaobjeto rotulado como A, deje caer una gota del antisuero A; en el portaobjeto rotulado como B, deje caer una gota del antisuero B, repita el procedimiento para los portaobjetos rotulados B y Rh.
- 3º. Limpie su dedo pulgar con algodón empapado en alcohol.
- 4º. Una vez seco, pinche la yema del dedo con una lanceta estéril.
- 5º. Deposite una gota de sangre en cada uno de los 4 portaobjetos.
- 6º. Observe si hubo aglutinación en cada portaobjeto.
- 7º. Registre si hubo o no aglutinación en cada uno de los portaobjetos e indique su fenotipo y su genotipo más probable en la tabla 2.

Tabla 3. Los distintos grupos sanguíneos con el antígeno y el antisuero correspondiente.

GRUPO SANGUINEO	AN TIGENOS	ANTICUERPOS PRESENTES EN EL SUERO	
		Anti-A	Anti-B
A	A	NO	SI
B	B	SI	NO
AB	A Y B	SI	SI
O	-	SI	SI
ANTICUERPOS PRESENTES EN EL SUERO			
FACTOR	AN TIGENOS	Anti-Rh	
Rh+	Rh	NO	
Rh-	-	SI	

Figura 2. Grupos Sanguineos.


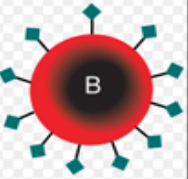
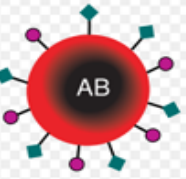



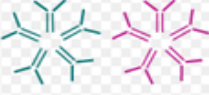



	Grupo A	Grupo B	Grupo AB	Grupo O
Sangre roja célula				
Anticuerpos	 Anti-B	 Anti-A	Ningunos	 Anti-A y Anti-B
Antígenos	A antígeno 	B antígeno 	A y B antígeno 	No antígenos

Tabla 4. Registro de la reacción de aglutinación.

Alumnos del grupo	Aglutinación (+/-)			GENOTIPO POSIBLE	FENOTIPO (GRUPO/Rh)
	A	B	Rh		
1					
2					
3					
4					

Laboratorio N° 2. Introducción a la genética: Herramientas computacionales para la investigación en genética.

## INTRODUCCIÓN.

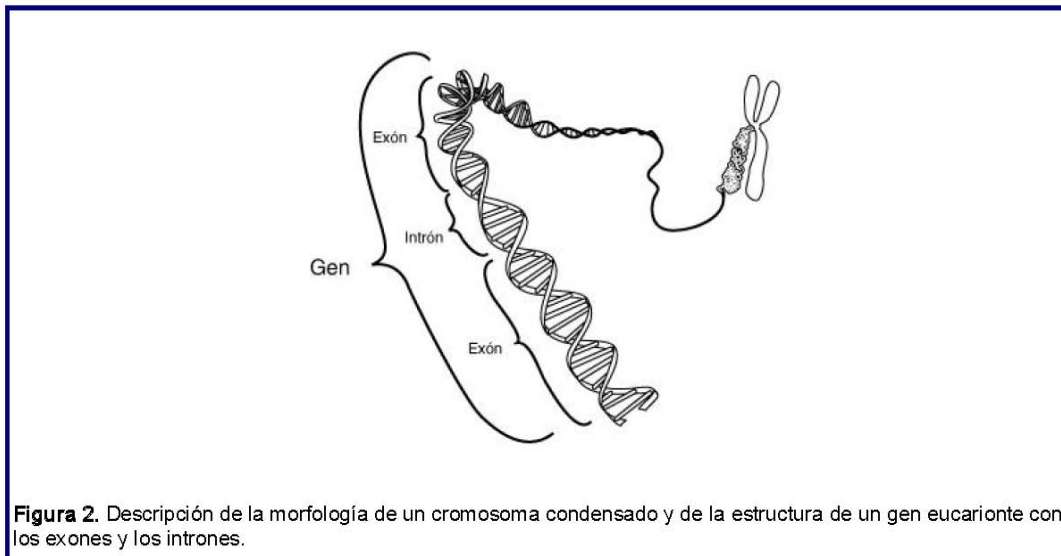
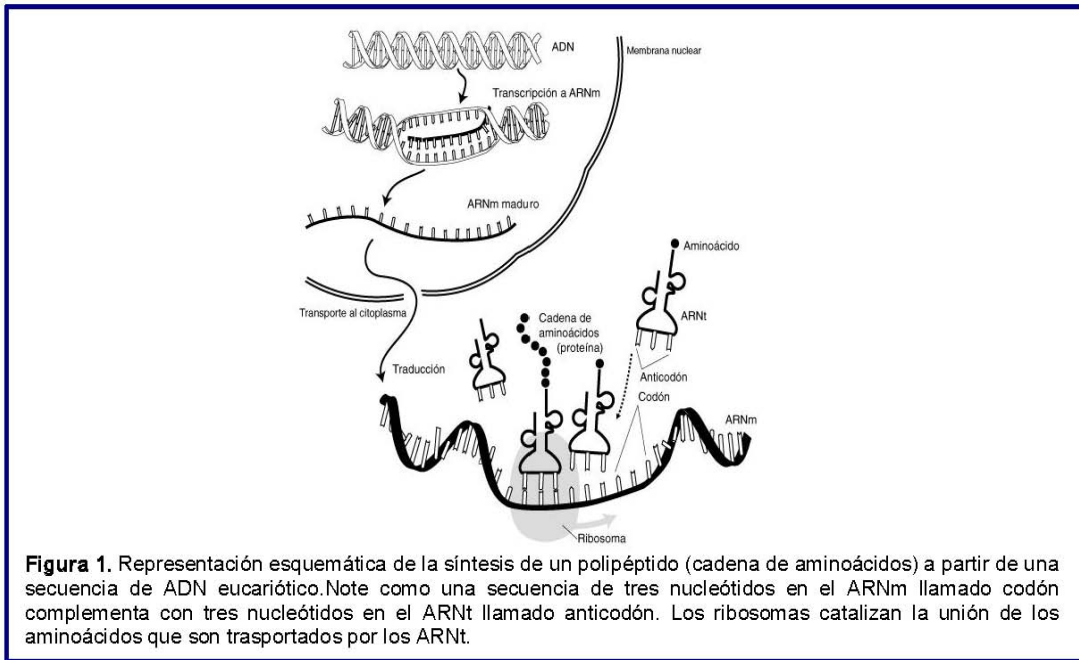
En términos generales la genética es la ciencia que estudia los patrones de herencia de los caracteres o rasgos biológicos. Debido a que el modo de herencia de un carácter cualquiera se determinada por los genes que posee un organismos, la genética también estudia todo lo relacionado con la estructura y la función de los genes. El material hereditario universal (excepto algunos virus) es la molécula de ADN o ácido desoxiribonucleico. El ADN esta compuesto por unidades básicas llamadas nucleótidos los que unidos entre si forman una doble hebra con forma de hélice. Cada nucleótido esta a su vez compuesto por un grupo fosfato, una desoxiribosa y una base nitrogenada. Existen solo cuatro bases nitrogenadas que se aparean en forma complementaria, ellas son Adenina–Timina y Citosina–Guanina.

El material genético total de un organismo se denomina genoma. En muchas especies el genoma esta compuesto por estructuras de ADN condensado denominados cromosomas. Los cromosomas usualmente son visibles al microscopio de luz sólo durante los procesos de división celular (mitosis y meiosis). Sin embargo, cuando las células están realizando la función para la cual fueron determinadas, los cromosomas están totalmente extendidos y forman cada uno de ellos una muy larga cadena de ADN. Los cromosomas se encuentran en el núcleo de las células eucariontes y diferentes especies tienen diferente número y morfología de cromosomas. La especie humana tiene 23 pares de cromosomas, 46 en total: 44 autosomas y 2 cromosomas sexuales. Cada uno de los progenitores aporta un cromosoma de cada par a sus hijos, de manera que los hijos reciben la mitad de los cromosomas de la madre y la mitad del padre.

La unidad física y funcional de la herencia, que se pasa de padres a hijos, son los genes. Los genes están compuestos por ADN la que a su vez contiene la información para elaborar una proteína específica. Un gen se puede definir entonces como la secuencia de ADN que codifica para un polipéptido (conjunto de aminoácidos, aa). Sin embargo, también hay genes que codifican para otras funciones biológicas como son la de producir el ARNt (Acido ribonucleico de transferencia) o el ARNr (ARN ribosomal).

El proceso para sintetizar un polipéptido (proteínas o enzimas) a partir de un gen puede ser bastante complejo, pero involucra algunos procesos básicos. De una secuencia de ADN de doble hebra se sintetiza una molécula de ARN de hebra simple mediante un proceso denominado transcripción. Este proceso esta catalizado por la enzima ARN polimerasa. El ARN de los organismos procariontes usualmente permite sintetizar directamente un a.a. o una proteína mediante un proceso llamado traducción que es mediado por los ribosomas. Mientras que el ARN eucariótico esta compuesto de intrones (regiones no codificantes) y exones (regiones codificantes), estos últimos mediante un proceso de corte y empalme (Splicing) deben ser unidos antes de que la síntesis de proteínas pueda ocurrir en el citoplasma (Figura 1 y 2).

En los organismos diploides existen para cada gen dos copias (uno de origen materno y otro de origen paterno). Para un individuo ambas copias pueden ser idénticas (homocigoto) o diferentes (heterocigoto), sin embargo, a nivel poblacional un gen puede tener muchas formas alternativas,



las cuales se producen por mutación a nivel del ADN. A cada forma alternativa de un gen se le denomina alelo. Interesantemente un alelo puede enmascarar el efecto de otro alelo, así el primero recibe el calificativo de dominante y el segundo de recesivo. La composición alélica

específica de un individuo para todos los genes que determinan un carácter se denomina genotipo, mientras que la característica observable del individuo producto de un determinado genotipo más la interacción con el ambiente se denomina fenotipo. Actualmente existen muchas bases de datos de genes y genomas que son de dominio público y que tienen acceso gratuito a través de internet. Estas bases de datos genéticos son muy variadas pero por lo general contienen información acerca de la estructura (secuencia) y la función de genes de distintos organismos como bacterias, plantas, y animales. También es posible encontrar información acerca del número de cromosomas o de la constitución genómica de distintas especies. Por ejemplo, en el caso de la especie humana la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) recopila información de cerca de 30.000 genes insertos en un genoma de unos 3.000.000.000 de pares de bases nitrogenadas. Un cabal conocimiento de estos recursos de internet es ahora fundamental para conocer y trabajar en el área de la genética.

Objetivo general.

Reconocer y utilizar recursos de internet y herramientas computacionales para la investigación en genética.

Objetivo específico.

Reconocer y describir funcionalmente genes de interés, localizar genes en los cromosomas y conocer los genomas de distintos organismos.

## ACTIVIDADES

### I. Caracterización estructural y funcional del gen SRY humano.

- 1º. Primero. Localice e ingrese al sitio WEB del National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/gquery.fcgi>.
- 2º. En la parte inferior se encuentra la información correspondiente a los genes disponibles en este sitio (Gene: gene-centered information). Ingrese a este sitio denominado Entrez gene y realice una búsqueda para el gen SRY (mayúscula). Ingrese al sitio web correspondiente al gen SRY humano y describa:
  - i. ¿Cuál es la posición (locus) del gen en el cromosoma Y (Location)?
  - ii. ¿Cuál es el número de identificación del gen (geneID)?
  - iii. ¿Cuál es la función del gen? Consulte la información entregada en la sección Summary.
- 3º. Observe la representación esquemática del gen (Barra horizontal de color azul y rojo) y presione esta barra con el botón izquierdo de su mouse. Se desplegará en su pantalla un cuadro pequeño de color verde denominado Links con dos subencabezados (mRNA links y Protein Links). Debajo de cada subencabezado presione donde dice FASTA (formato estándar para analizar secuencias de ADN y PROTEÍNAS).

- i. Determine cuántos nucleótidos conforman al gen SRY humano y cuántos aminoácidos codifica este gen (Note que los nucleótidos se representan con las letras ATCG mientras que para cada aminoácido existen distintas letras).
- ii. ¿Por qué el número de nucleótidos es mayor que el número de a.a.? (investigue lo que significa código genético para responder esta pregunta).

4º. Vuelva a la representación grafica del gen, a su derecha en contra el link [Try our new Sequence Viewer](#).

- i. Ahora observará un esquema del mRNA de SRY en verde, azul y rojo. Cada uno de ellos corresponde a secuencias de mRNA que se han descrito para el gen SRY.
- ii. Pinche con el botón derecho sobre las distintas barras, en la barra roja dirígase al link Graphical View (anote el numero de acceso de la proteína). Ingrese el número en la página siguiente.
- iii. Aquí obtendrá una representación grafica de la proteína, en esta se representará la proteína completa como dominios y secuencias de importancia al interior de la misma. Incluya esta imagen en su informe.

## II. Caracterización genómica de especies de interés en Ciencias Silvoagropecuarias.

- 1º. Localice e ingrese al sitio WEB de la NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/gquery.fcgi>.
- 2º. Ingrese al link [Genome: whole genome sequences](#), aquí se encuentran todas las especies cuyo genoma ha sido secuenciado en su totalidad. Dirígase al link [Eukaryotae](#) (organismos eucariotas).
- 3º. Con la información contenida en esta página complete la siguiente tabla. Además escoga otro organismo de interés y agreguelo a la tabla:

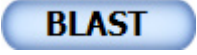

Tabla 1. Genomas de especies de importancia silvoagropecuarias.

Organismo	Nombre común	Nº cromosomas	Genomas de organelos	Nº genes	Nº proteínas
<i>Bos taurus</i>					
<i>Canis familiaris</i>					
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>					
<i>Lycopersicon esculentum</i>					

<i>Gallus gallus</i>					
<i>Equus caballus</i>					
<i>Oryza sativa</i>					
<i>Oryzias latipes</i>					

III. Caracterización de una secuencia desconocida.

Para esta actividad se utilizarán las herramientas bioinformáticas disponibles en el sitio del [NCBI](#) ([Blast](#), [OMIM](#), [OMIA](#), entre otras).

- 1º. Diríjase al sitio BLAST, pinche nucleotide BLAST. Ingrese la secuencia desconocida en (Enter Query Sequence).
- 2º. En database, escoja Others (nr etc).
- 3º. Presione el botón . Espere hasta que aparezca la página de resultados.
- 4º. La página de resultados mostrará un gráfico con barras de colores que le indicarán que tanto se parece su secuencia a las existentes en la base de datos. Aquí también obtendrá una lista de secuencias similares a la suya, con número de acceso, descripción, puntaje, porcentaje de identidad y links. En esta última columna, el botón  le llevará a la página con la información del gen correspondiente. Recuerde que la primera secuencia en la lista es la que más se parece a su secuencia.
- 5º. A partir de la información obtenida en este sitio y los ligados a él, indique:
  - i. Número de acceso.
  - ii. Organismo.
  - iii. Descripción del gen. (entregue secuencia completa)
  - iv. Ubicación (cromosoma, locus).
  - v. Carácter asociado (fenotipo). ¿es influenciado por el ambiente? Explique.

Laboratorio N°4 Ingeniería genética: Electroforesis y huellas dactilares de ADN.

## INTRODUCCIÓN.

En este laboratorio alumnos realizarán una serie de procedimientos experimentales para determinar cuál de las 5 muestras de ADN obtenidas de igual número de sospechosos de un supuesto asesinato coincide con el ADN obtenido desde la escena del crimen. El ADN es la molécula que contiene la información genética para cada una de las características biológicas de los seres vivos. Entre especies emparentadas como los monos y los humanos las diferencias genéticas pueden ser cercanas al 5 %, mientras que entre individuos de una misma especie estas se encuentran por debajo del 1%. Estas diferencias, pequeñas a nivel genético, sin embargo producen grandes variaciones fenotípicas entre las personas.

El avance de las técnicas moleculares ha permitido desarrollar aplicaciones prácticas para el uso del ADN como medio de identificación individual. Las aplicaciones más conocidas son las pruebas de paternidad y la identificación de sospechosos en un crimen, sin embargo, son muy utilizadas también en agricultura, en medicina y en la industria de alimentos. El procedimiento general se conoce con el nombre de DNA fingerprinting o huella dactilar de ADN. Este es un procedimiento que permite visualizar un patrón de bandas (fragmentos de ADN) específico para cada individuo obtenido a partir del procesamiento de su ADN.

Básicamente se busca en el ADN marcadores genéticos altamente variables entre individuos que permitan su comparación entre muestras de origen conocido. Estos marcadores usualmente no codifican para ninguna proteína, pero presentan un patrón de herencia codominante, que permite distinguir entre los heterocigotos y los distintos homocigotos. Estas características permiten establecer las relaciones de parentesco entre individuos con bastante verosimilitud.

En este laboratorio se simulará un análisis de ADN fingerprinting realizando los siguientes pasos prácticos:

- 1) Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.
- 2) Separación y tinción de los fragmentos de ADN en un gel de agarosa.
- 3) Análisis genético del patrón de bandas o mapa de restricción.

Las endonucleasas de restricción son enzimas que reconocen y cortan, mediante la hidrólisis de los enlaces azúcar-fosfato, el ADN de doble hebra en secuencias específicas. Esta característica las ha

convertido en herramientas esenciales en el clonamiento y mapeo de genes y genomas. Las enzimas de restricción son proteínas procarióticas y son utilizadas regularmente por las bacterias para protegerse del ataque infeccioso de virus llamados bacteriófagos. Estos virus infectan a las bacterias mediante la inyección de su ADN dentro del genoma bacteriano forzando al hospedero a replicar y expresar los genes virales. Las bacterias han desarrollado en forma natural un mecanismo de defensa compuesto por enzimas de restricción que cortan y destruyen el ADN viral antes de que este se integre al genoma bacteriano. Las bacterias previenen el corte de su propio genoma mediante la acción de enzimas metilasas, las cuales añaden grupos metilo al genoma bacteriano en cada ronda de replicación del ADN. El ADN foráneo que no tiene esta modificación es destruido por las enzimas de restricción.

Las enzimas de restricción cortan secuencias de ADN denominadas palíndromos, que se caracterizan por ser secuencias cortas de ADN que cuando son leídas en dirección 5' a 3' ambas hebras complementarias son idénticas (Figura 1). Cada enzima de restricción recibe su nombre de acuerdo a la bacteria desde la cual se ha aislado, por ejemplo la enzima EcoRI fue derivada inicialmente desde la bacteria *Echerichia coli*. En un fragmento grande de ADN, usualmente existen varias secuencias palíndromos por lo que una enzima puede cortar la molécula de ADN en varios fragmentos de distinto tamaño. Por ejemplo, si todo el genoma humano se cortara con la enzima EcoRI, la cual corta cada 4000 pares de bases, se generarían aproximadamente un millón de fragmentos.

Figura 1. Enzimas de Restricción Bam HI y Hind III, y sus sitios palindrómicos.



#### Electroforesis en Geles de Agarosa

La electroforesis separa fragmentos de DNA según su tamaño relativo. Los fragmentos de DNA se cargan en un gel de agarosa, que se coloca en un compartimiento llenado con una solución tampón conductora. Una corriente continua se pasa entre los electrodos de cada extremo del compartimiento. Los fragmentos de DNA se cargan negativamente, y cuando están colocados en un campo eléctrico son atraídos hacia el polo positivo y rechazados por el polo negativo. La matriz de gel de agarosa actúa como un tamiz molecular a través de el cual los fragmentos más pequeños de DNA puedan moverse más fácilmente que los más grandes. En el tiempo, los fragmentos más pequeños migrarán más lejos que los más grandes. Los fragmentos del mismo tamaño permanecen juntos y migran en la misma "banda" de DNA.

#### Visualización de los Fragmentos de Restricción de DNA

Los fragmentos de DNA en el gel no pueden ser observados a simple vista porque el DNA no posee color, así que una tinta azul de carga se agrega a la solución de DNA. La tinta carga no tiñe el DNA. El “frente de migración” coloreado (tinta azul) migra hacia el extremo positivo del gel apenas delante de los fragmentos más pequeños de DNA. Esto permite que el progreso de la electroforesis pueda ser monitoreado. Una vez migrado, el gel se sumerge en una solución diluida de tinción (bromuro de etidio o DNA Bio-Safe). Para realzar el contraste y para visualizar fácilmente las bandas de DNA, el exceso de solución de tinción se puede quitar destiñendo el gel con agua. Cuando las bandas son visibles, se pueden comparar los patrones de restricción de las diferentes muestras de DNA. Un análisis genético riguroso del patrón de bandas o mapa de restricción obtenido con la electroforesis requiere no solo la determinación del número de bandas para cada individuo, sino que además, es necesario establecer cual es el tamaño relativo de las bandas sobre el gel. Esto porque aunque dos geles con las mismas muestras de ADN suelen ser muy parecidos, nunca son exactamente idénticos. Usualmente los geles tienen diferente grosor o concentración de agarosa. Además, los tiempos de corrida o el voltaje aplicado pueden no ser exactamente igual entre un ensayo y otro. Para poder hacer un análisis más riguroso o comparable con otras muestras es necesario entonces establecer el tamaño de las bandas sobre el gel. Esto se consigue por hacer migrar junto con las muestras de ADN de estudio un marcador de peso molecular. El marcador de peso molecular está compuesto por una serie de fragmentos de ADN de tamaño conocido. Por lo que será posible establecer el tamaño de los fragmentos desconocidos en el gel por comparar el patrón de migración. En este práctico el marcador de peso molecular corresponde al genoma de Fago Lambda (aprox. 48.000 pb) que ha sido digerido con la endonucleasa de restricción HindIII. Este proceso de digestión permite obtener 6 fragmentos de ADN de distintos tamaños: 23.130 pb, 9.416 pb, 6.557 pb, 4.361 pb, 2.322 pb, 2.027 pb.

#### Validez de la Evidencia DNA.

Un factor importante que afecta la confiabilidad de la técnica de DNA finger print en medicina forense es la variabilidad genética de las diferentes poblaciones humanas. En seres humanos hay centenares de loci RFLP o de segmentos de DNA que se pueden seleccionar y utilizar para el análisis de la huella dactilar de DNA. Dependiendo de factores demográficos tales como étnia o aislamiento geográfico, algunos segmentos mostrarán más variación que otros. Algunas poblaciones muestran mucho menos variación en segmentos determinados del DNA que otros. El grado de variación afectará las probabilidades estadísticas de que un individuo posea la misma secuencia. Si el 90% de una población dada tiene la misma frecuencia en su modelo de huella dactilar de DNA para cierto segmento en particular de DNA, entonces, se obtendrá muy poca información. Pero si la frecuencia de un patrón de DNA en una población para un segmento determinado es extremadamente baja, entonces este segmento puede servir como herramienta para discriminar entre los individuos de esa población. Diversas poblaciones muestran diversos modelos en sus genotipos debido a las contribuciones hechas a sus patrimonios genéticos individuales durante un cierto período. Por lo tanto, al analizar cuan incriminatoria es la evidencia obtenida por el DNA finger print, es necesario hacerse la pregunta: ¿Estadísticamente cuánta gente en una población puede tener el mismo patrón al tomado de la escena del crimen: 1 en 1.000.000? 1 en 10.000? o, 1 en 10?

Objetivo general.

Reconocer y utilizar instrumental típico de Ingeniería genética.

Objetivo específico.

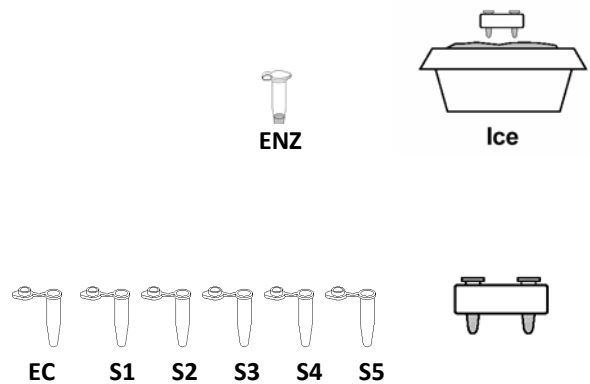
Realizar electroforesis en gel de agarosa y realizar un análisis de ADN fingerprinting.

### Actividades

#### Día 1 Preparando las muestras de DNA

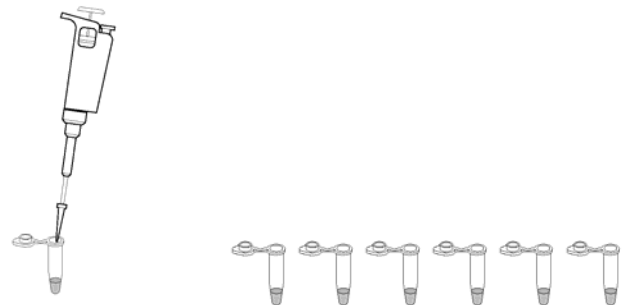
1. Localice el tubo que contiene la mezcla de enzimas, marcada ENZ, en el hielo.
2. Marque cada uno de los microtubos de la siguiente manera:

Verde	EC = escena del crimen
Azul	S1 = sospechoso 1
Naranja	S2 = sospechoso 2
Violeta	S3 = sospechoso 3
Rojo	S4 = sospechoso 4
Amarillo	S5 = sospechoso 5



Marque los tubos con el nombre de su grupo.  
Coloque los tubos en el soporte de hule espuma.

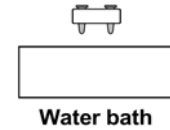
3. Pipetee 10  $\mu$ l de cada muestra maestra de DNA y transfíerelo a los microtubos de colores correspondientes. Utilice una punta nueva para cada muestra de DNA. Asegúrese que cada muestra sea transferida hasta el fondo del tubo.
4. Pipetee 10  $\mu$ l de la mezcla de enzimas (ENZ) hasta el fondo de cada tubo. Utilice una punta nueva por cada muestra.



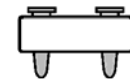
5. Tape los tubos y mezcle los componentes agitándolos con un golpe del dedo. Si hay una centrifuga accesible centrifugue las muestras, por 5 segundos a velocidad máxima, para recolectar todo el liquido al fondo de los tubos.



6. Coloque los tubos en el soporte/flotador e incúbelos por 45 min. a 37°C o hasta la mañana siguiente a temperatura ambiente.

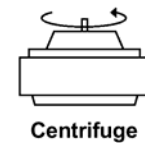


7. Después del periodo de incubación, remueva los tubos del baño de agua y colóquelos en el refrigerador hasta el siguiente periodo.

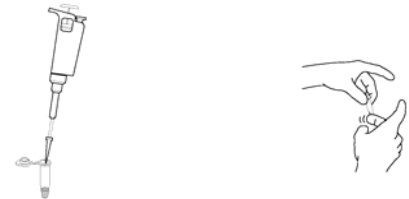


## Día 2 Electroforesis en un gel.

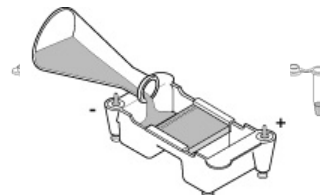
1. Remueva sus muestras de DNA digeridas del refrigerador. Si hay una centrifuga disponible utilícela para bajar todo el líquido de los tubos al fondo.



2. Utilizando una punta nueva para cada muestra, coloque 5 µl de tinta de carga (loading dye "LD") en cada tubo. Tape los tubos y mézclelos golpeando ligeramente con el dedo.



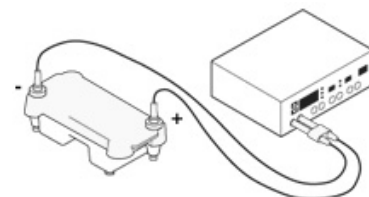
3. Prepare un gel de agarosa (0.8%) y colóquela en la cámara de electroforesis. Llene la cámara con el buffer de 1xTAE cubriendo el gel (aprox. 275ml de buffer).



4. Asegúrese que los pozos del gel estén cerca del electrodo negativo (negro) y que la base del gel esté cerca del electrodo positivo (rojo).
5. Utilizando una punta nueva para cada muestra cargue el gel de la siguiente manera:



Línea 1: Marcador molecular de DNA, 10µl  
Línea 2: EC, verde, 20 µl

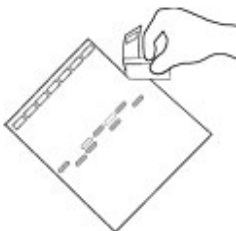
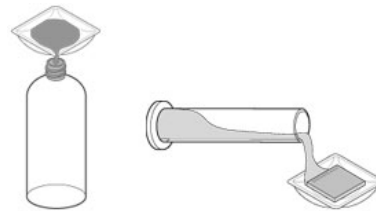


- Línea 3: S1, azul, 20  $\mu$ l
- Línea 4: S2, naranja, 20  $\mu$ l
- Línea 5: S3, violeta, 20  $\mu$ l
- Línea 6: S4, rojo, 20  $\mu$ l
- Línea 7: S5, amarillo, 20  $\mu$ l

6. Coloque la tapa de la cámara de electroforesis. La tapa se ajusta solo en una orientación: rojo con rojo y negro con negro. Conecte los terminales eléctricos a la fuente de poder.
7. Encienda la fuente de corriente y deje el proceso de electroforesis de su muestra a 100V por 30 minutos.
8. Cuando termine la electroforesis, apague la fuente y remueva la tapa de la cámara. Con cuidado remueva la bandeja con el gel de la cámara (tenga cuidado que el gel es muy resbaloso). Con cuidado empuje el gel de la bandeja con el pulgar y deje que se resbale a la bandeja de plástico para teñir.
9. Agregue 60 ml DNA Bio-Safe (la tinta azul) a la bandeja de plástico con el gel. Cubra con envoltura de polietileno (saran wrap) y deje que se tiña hasta el día siguiente.

### Análisis del Gel

1. Vacíe la tinta de Bio-Safe al recipiente de descarte y destiña el gel con 60 ml de agua por lo menos por unos 15 minutos.
2. Vacíe el agua de la bandeja y disponga de acuerdo a los deseos del maestro
3. Corte los carriles vacíos del gel con un cuchillo o una navaja. Deje que el gel se seque (en el Gel support film) por 3-5 días.



4. Cuando el gel este seco se puede incluir a las anotaciones con cinta adhesiva, para un récord permanente.

### **Pauta para la redacción de informes de laboratorio.**

El informe grupal solicitado se confeccionará en hoja tamaño carta, escrito en computador con tamaño de letra Arial 12 . Se exigirá orden y buena ortografía. El máximo número de páginas es 10 incluidas portada y bibliografía. Este informe deberá ser presentado una semana después de realizada la actividad y debe incluir:

- I. **INTRODUCCIÓN (Máximo 1 página):** En esta sección del Informe, debe aparecer solamente la información de mayor utilidad para el procedimiento y la discusión de resultados. Indicar los objetivos y fundamentos teóricos del trabajo que se realizó. El estudiante deberá redactar con sus propias palabras; **no se permite copia textual de ningún material de referencia.** Además, deberá indicar entre paréntesis o con superíndice el número de la referencia utilizada. La referencia completa se incluirá en la sección BIBLIOGRAFÍA.
- II. **RESULTADOS:** Iniciar la descripción de los resultados obtenidos, en forma ordenada. Estos resultados deben ser presentados en tablas, figuras y/o gráficos si corresponde al caso, indicando con una leyenda las respectivas tablas, figuras y gráficos. Debe incluir las observaciones realizadas, datos experimentales, y si es necesario, un ejemplo de los cálculos realizados. No se deben agregar figuras y/o dibujos que no aporten en la discusión y conclusión de los resultados. **Máximo 2 página y media.**

### **III. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN:**

- A. **DISCUSIÓN:** Se debe analizar de manera ordenada los resultados obtenidos mediante correlaciones de los hechos entre sí **apoyándose en la teoría.** Para ello, debe hacer referencia a las tablas, y/o gráficos, fotografías, etc. De la misma manera, se debe comparar los resultados obtenidos con los esperados. Además, incluir si fuera necesario, las fuentes de error y el procedimiento correcto para la realización del paso práctico, las limitaciones de las técnicas y procedimientos utilizados. Finalmente, deberá indicar la referencia utilizada según ejemplo mostrado en la sección BIBLIOGRAFÍA.
- B. **CONCLUSIONES:** Se presentarán solamente los hechos relevantes obtenidos a través de la discusión de resultados. Deben resumirse en forma concisa los hallazgos e inferencias más importantes de su discusión. El concluir la realización de todos los objetivos del paso práctico, **NO ES UNA CONCLUSIÓN**, por lo que no deberá ser mencionado en el informe.

IV. **BIBLIOGRAFÍA:** Listar todas las referencias utilizadas y ordenadas según aparición en el informe. Describir el material bibliográfico utilizado indicando el autor(es), año, título, edición, editorial (si fuese un libro) y páginas. Ejemplos:

1. Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. E. (2000). **Molecular Cell Biology**. Cuarta edición. Editorial W. H. Freeman & Co. 30- 35.
2. De Robertis y De Robertis. (1990). **Biología celular y molecular**. Décimo primera edición. Editorial El Ateneo. 60 – 70.
3. Auffray C. (2005). **El Genoma Humano**. Primera edición. Editorial Siglo XXI. 35-40.

Si ha consultado un sitio Web, deberá citarlo de la siguiente manera:

4. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001190.htm>.  
Visitado el día 23 de febrero del 2006 a las 14:35 h.

Todos los informes deben ser confeccionados según el formato y número de hojas indicado (**10 hojas máximo**). El no cumplimiento de estas normas y/o el atraso en su entrega, el informe será calificado descontado en su nota final, sin apelación.