

Ponce . Centeno . Gallará . Barteik . Bojanich
Delgado . Piñas

TÉCNICAS BÁSICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Trabajo de Laboratorio



1ª Edición – AÑO 2015

***TÉCNICAS BÁSICAS
DE BIOLOGÍA MOLECULAR
Trabajo de Laboratorio***

1ª Edición

TÉCNICAS BÁSICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Trabajo de Laboratorio

1ª Edición

**Cátedra "A" de Química Biológica
Facultad de Odontología
Universidad Nacional de Córdoba**

Dr. Rubén Hugo Ponce

Profesor Titular

Dra. Raquel Vivian Gallará

Profesora Adjunta

Dra. Viviana Andrea Centeno

Profesora Asistente

Dra. María Eugenia Barteik

Profesora Asistente

Dra. María Alejandra Bojanich

Profesora Asistente

Dra. María Andrea Delgado

Profesora Asistente

Od. María Eugenia Piñas

Profesora Asistente

**TÉCNICAS BÁSICAS
DE BIOLOGÍA MOLECULAR
Trabajo de Laboratorio**

1ª edición: 2015

Queda hecho el depósito que establece la ley N° 11723.

Propiedad intelectual expediente N° en trámite.

Derechos reservados.

© 2015, Córdoba, Argentina

Técnicas básicas de biología molecular : trabajo de laboratorio /

Hugo Rubén Ponce ... [et al.]. - 1a ed edición para el alumno. –

Córdoba : Haravek Servicios Gráficos, 2015.

23 p. ; 29 x 21 cm.

ISBN: 978-987-27160-6-6

1. Bioquímica. I. Ponce, Hugo Rubén

CDD 611.018

TRABAJO DE LABORATORIO



I. NOCIONES BÁSICAS DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO Y MATERIAL DE LABORATORIO DE USO FRECUENTE

En un laboratorio de investigación o de análisis clínicos existen elementos nocivos o potencialmente peligrosos como son los productos biológicos provenientes de los pacientes y los reactivos químicos de diferente naturaleza tales como ácidos, productos cáusticos, productos volátiles (éter y cloroformo, que son muy tóxicos) y/o productos cancerígenos. Es indispensable que el operador conozca el riesgo potencial al que está expuesto en dichos lugares y tome conciencia de ello. Para tal fin es necesario adquirir conocimiento de los reactivos y materiales a los que se expone, y las normas básicas de trabajo a seguir para operar sin riesgos para su salud personal ni tampoco del medio ambiente que lo rodea.

OBJETIVOS

- Conocer el riesgo al que el operador están expuestos a manipular sustancias químicas.
- Identificar los materiales y equipos más usados en el laboratorio y la utilidad de los mismos.
- Manipular materiales y equipos de uso y cuidados específicos.
- Adquirir destreza en la utilización del material de vidrio del laboratorio.

CONTENIDOS

Normas básicas de seguridad en el laboratorio. Seguridad Química. Material de laboratorio: material volumétrico y no volumétrico. Otros materiales de uso común en el laboratorio.



NORMAS BÁSICAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

7

En un laboratorio donde se manipulan sustancias químicas, aparatos de diversa complejidad, materiales biológicos, etc., aumenta el riesgo de accidentes. Esto no significa que el trabajo de laboratorio sea peligroso, sino que es necesario establecer una serie de medidas de seguridad mínimas para evitar que dichos accidentes ocurran. Algunas de ellas son:

- ✓ Antes de comenzar las tareas en el laboratorio, hay que tener claro los objetivos que se persiguen, los pasos a seguir, los materiales que se utilizarán y la distribución de tareas entre los miembros del equipo de trabajo.
- ✓ En el laboratorio, se debe trabajar con concentración y en forma cuidadosa. Está prohibido comer, beber y fumar; morder los lápices o llevarse las manos o los materiales de uso a la boca o a los ojos.
- ✓ Es conveniente lavarse las manos antes y después del trabajo de laboratorio.
- ✓ El lugar de trabajo debe mantenerse limpio y ordenado. Sobre las mesadas sólo se colocarán los materiales y las drogas que van a utilizarse.
- ✓ Si se va a utilizar material de vidrio, es necesario que antes se verifique su estado. Se sugiere descartar aquel material que esta rajado o roto.
- ✓ Todos aquellos que participen de la experiencia deben conocer el funcionamiento de los aparatos y hacerlo bajo estricto control del personal responsable.
- ✓ Cuando se trabaja con sustancias químicas de cierta peligrosidad o con muestras biológicas, deben usarse algunos elementos como: guantes de látex descartables,

guardapolvo, anteojos para evitar las salpicaduras y barbijos si hay peligro de inhalación de gases tóxicos.

**LA SEGURIDAD COMIENZA POR CADA UNO DE NOSOTROS.
UN ACCIDENTE SIEMPRE PUEDE EVITARSE**

8

SEGURIDAD QUÍMICA

Al manipular **sustancias químicas** se deben tomar precauciones. Estas sustancias deben almacenarse en un lugar especial y adecuado denominado “**droguero**”, con rótulos que señalen el grado de peligrosidad como por ejemplo: toxicidad, inflamabilidad, sustancias explosivas, etc. Para manipular este tipo de sustancias existen normas de seguridad especiales. Algunas de ellas son:

- ✓ Cuando se mezcla un ácido o un álcali con agua siempre debe verterse el ácido o el álcali en el agua, nunca al revés, en pequeñas cantidades y enfriando la mezcla cada vez. Recuerda: **“No des de beber al ácido”**.
- ✓ En caso de quemaduras con ácidos concentrados fuertes, nunca hay que lavar la zona afectada con agua sin neutralizarla previamente.
- ✓ No encienda fósforos ni llama en las proximidades de recipientes con sustancias inflamables y/ o volátiles.
- ✓ Al finalizar una experiencia, los restos de reactivos se deben tirar por la pileta, manteniendo la canilla abierta para que corra suficiente agua. En ciertos casos es necesario implementar otras medidas.
- ✓ Si se trabaja con sustancias que emiten vapores tóxicos es preciso contar con muy buena ventilación, con un extractor de aire o mejor aún con una campana de extracción.
- ✓ Nunca aspiren sustancias químicas por la boca. Para ello se deben usar dispensadores o pro pipetas.
- ✓ Es indispensable conocer la peligrosidad de las sustancias químicas que se manipulan. Para tal fin existen códigos universales que identifican los tipos diferentes de sustancias:



CÓDIGOS DE SUSTANCIAS	CARACTERÍSTICAS
E: EXPLOSIVO	Las sustancias y preparados sólidos, líquidos, pastosos o gelatinosos que, incluso en ausencia de oxígeno atmosférico, puedan reaccionar de forma exotérmica con rápida formación de gases y que, en determinadas condiciones de ensayo, detonan rápidamente o bajo el efecto del calor, en caso de confinamiento parcial, explotan.
O: COMBURENTES	Las sustancias y preparados que en contacto con otras sustancias, en especial con sustancias inflamables, produzcan una reacción fuertemente exotérmica. Pueden provocar incendios o aumentar el riesgo de inflamabilidad al entrar en contacto con materiales combustibles.

F: INFLAMABLES	Sustancias y preparados líquidos cuyo punto de inflamación sea igual o superior a 21 °C e inferior o igual a 55 °C.
T: TÓXICOS	Las sustancias y preparados que, por inhalación, ingestión o penetración cutánea en pequeñas cantidades, puedan provocar efectos agudos o crónicos e incluso la muerte.
Xn: NOCIVA	Las sustancias y preparados que, por inhalación, ingestión o penetración cutánea, puedan provocar efectos agudos o crónicos e incluso la muerte.
C: CORROSIVA	Las sustancias y preparados que en contacto con tejidos vivos puedan ejercer una acción destructiva de los mismos.
Xi: IRRITANTE	Las sustancias y preparados no corrosivos que, en contacto breve, prolongado o repetido con la piel o las mucosas puedan provocar una reacción inflamatoria.



**MATERIALES DE LABORATORIO:
Reconocimiento y Utilización**

Es necesario que, antes de comenzar cualquier trabajo experimental, el alumno conozca el material que se utiliza. Cada uno de los materiales tiene una función y su uso debe ser acorde con la tarea a realizar. También es indispensable conocer los cuidados que se debe tener al manipularlos, ya que la utilización inadecuada de este material da lugar a errores en las experiencias realizadas y aumenta el riesgo en el laboratorio. En esta sección, haremos una breve descripción del material de vidrio y los aparatos más comunes que se puede encontrar en un laboratorio.

MATERIAL BÁSICO DE LABORATORIO



Balanza granataria



Embudo Buchner

Matraz Kitasato



Corte transversal del embudo Buchner



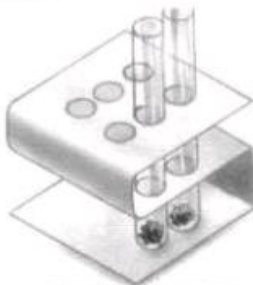
Embudo Gibson



Embudo cónico



Frascos lavadores



Gradilla y tubos de ensayo



Mechero Bunsen



Mechero de alcohol



Matraz de destilación



Matraz de fondo plano



Matraz Erlenmeyer



Matraz aforado



Mortero



Nuez doble



Pinzas de madera

Pinzas de bureta



Probeta



Bureta



Vaso de precipitados y agitador



Placa Petri



Vidrio de reloj



Cápsula de porcelana



Barra



Rejilla



Aro



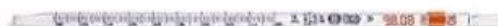
Soporte



Tripodes



Pipeta aforada



Pipeta graduada

Los materiales de laboratorio se clasifican de la siguiente forma:

1. **Material de vidrio:** dentro de este grupo se encuentran los materiales de vidrio calibrados a una temperatura dada, denominados **volumétricos**, que permiten medir volúmenes exactos de sustancias (matraces aforados, pipetas, buretas, probetas graduadas) y materiales de vidrio, **no volumétricos**, menos precisos.
2. **Equipos de medición:** son instrumentos que se usan para comparar magnitudes físicas mediante un proceso de medición. Como unidades de medida se utilizan objetos previamente establecidos como estándares o patrones; de la medición resulta un número que es la relación entre el objeto de estudio y la unidad de referencia. Los instrumentos de medición son el medio por el que se hace esta conversión. Ej. : balanza, pH metro, termómetro.
3. **Equipos accesorios:** equipos auxiliares para el trabajo de laboratorio. Ej. : centrífuga, estufa, baño termostatzado, etc.

MATERIAL DE VIDRIO Y PLÁSTICO

Generalmente se utilizan para contener, verter y medir soluciones líquidas. Algunos son de elevada precisión en sus medidas y otros son menos precisos, la elección dependerá del uso que se requiera. Entre los más importantes se mencionan:

a. Material Volumétrico:

Bureta: material cilíndrico de vidrio graduado, alargado, que termina en una llave para poder controlar el flujo del líquido que se va a medir. Se usa en operaciones donde se necesita medir volúmenes con gran exactitud.

Matraz aforado: instrumento de vidrio de cuello largo y angosto. Se usa para preparar soluciones a una concentración exacta.

Pipetas: son instrumentos de vidrio que se usan para medir los líquidos con mayor exactitud. Estas pueden ser aforadas (miden un volumen exacto) o parciales (miden un volumen aproximado). También existen las pipetas mecánicas o automáticas cuyo diseño permite medir volúmenes fijos o variables.

Probeta: instrumento de laboratorio de vidrio o plástico que se emplea para medir un volumen aproximado de líquido.

b. Material No Volumétrico:

Balón: es un recipiente de vidrio resistente al calor que sirve para preparar soluciones químicas.

Matraz Erlenmeyer: material de vidrio que se emplea en el laboratorio para calentar líquidos o preparar soluciones.

Vasos de precipitados: material de laboratorio de vidrio que se usa como recipiente y también para obtener precipitados. Son resistentes al calor.

Tubos de ensayo: son de vidrio o plástico de distintos tamaños (1, 4, 5, 10, 15, ml) que se utilizan para realizar reacciones químicas. También existen con tapa, al vacío y con distintas sustancias anticoagulantes para realizar extracciones de muestras sanguíneas.

EQUIPOS DE MEDICIÓN

Termómetros: se utilizan para medir la temperatura de refrigeradores, baños termostáticos, congeladores, temperatura ambiente, etc. Existen diferentes tipos:



Balanzas: es el instrumento que se usa para determinar la masa de una sustancia en el laboratorio. Existen muchos tipos de balanzas, pero en los laboratorios actualmente se usan las electrónicas, desplazando a las tradicionales balanzas mecánicas. La ventaja de las balanzas electrónicas es que, independientemente de su precisión, todas se utilizan de una manera

sencilla y clara. Es conveniente saber que la masa del recipiente en el que se va a efectuar una medida se denomina tara y a la operación de ajustar a cero la lectura de la balanza con el recipiente incluido se denomina TARAR.



Cronómetros: se utilizan para medir el tiempo de una determinada reacción química o de algún proceso.



Pipetas automáticas: se utilizan para la medición de volúmenes de líquidos del orden de 0,2 a 5000 microlitros (μ l).



EQUIPOS ACCESORIOS

Estufas: se utilizan para el calentamiento y el secado de diferentes materiales. Algunas se emplean para la incubación de material biológico.



15

Autoclaves: se utilizan para la esterilización de diferentes materiales.



Otros elementos accesorios que se emplean en el trabajo de laboratorio son:

Gradilla: material de madera, metal o plástico que se usa como soporte de los tubos de ensayo o tubos en general.



16

Mortero: material de porcelana o de vidrio, que se usa para moler o reducir el tamaño de las sustancias (Ej.: sales). Consta de dos partes: el mazo y el mortero propiamente dicho.



Frasco lavador o pizeta: Son frascos cerrados con un tapón atravesado por dos tubos. Por uno de ellos se sopla, saliendo el agua por el otro. Se utilizan para enjuagar el material de laboratorio. También frascos de plástico, con un sólo orificio de salida, por el que sale el agua al presionar el frasco.



Desecador: por lo general son de vidrio. Se utilizan para desecar sustancias o bien para preservarlas de la humedad ambiental.



Centrífuga: equipo que se utiliza para separar soluciones, generalmente en una fase líquida o sobrenadante (que corresponde a la porción superior de la muestra) y una fase sólida (también llamada sedimento o pellet) la que se deposita en el fondo del tubo.



PARA TRABAJAR EN EL LABORATORIO . . .

CUESTIONARIO

1. ¿Con que material de laboratorio prepararías soluciones a partir de una sustancia líquida?
2. ¿Qué material de laboratorio se puede calentar y por qué?
3. ¿Con cuál material de laboratorio prepararías soluciones a partir de una sustancia sólida?

18

ACTIVIDADES

1. Con una probeta medir 100 mL de agua y transferirla a un vaso de precipitado de 250 mL.
2. Utilizando 3 tubos de ensayo colocados en una gradilla trasvasar volúmenes de 5, 7 y 10 mL usando las pipetas adecuadas.
3. Llenar con agua destilada una probeta de 15mL de capacidad y pipetear usando alternativamente pipetas de vidrio graduadas de diferentes volúmenes y pipetas automáticas.

BIBLIOGRAFÍA

Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. 3ª edición. Ginebra, OMS. 2005.

Whitten K, Gailey K. Química General. Edit. Mc-Graw Hill. 1989.

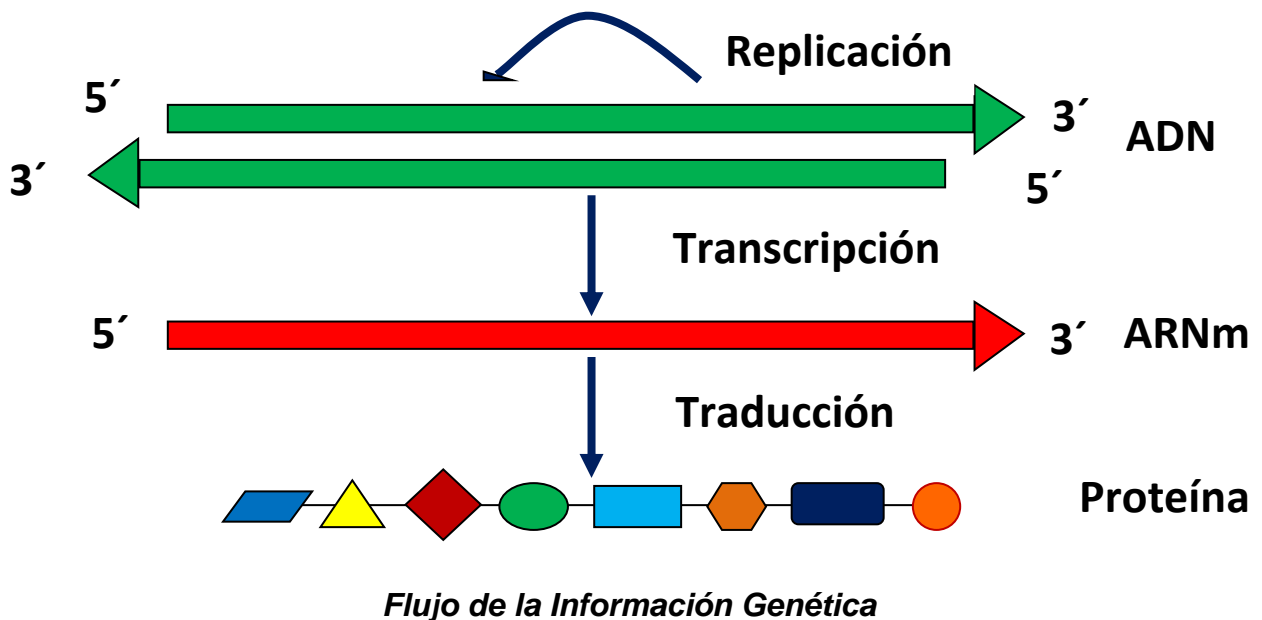
Mahan, B. Química: Curso Universitario. 3ª edición. 1989.

II. TÉCNICAS BÁSICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR



El dogma central de la Biología establece que el ADN es la molécula que contiene la información genética de un organismo que se auto perpetúa mediante el proceso de replicación. Esta información se expresa mediante 2 procesos consecutivos, la transcripción que produce ARN, y posterior traducción donde se sintetiza la proteína que finalmente ejecuta la función.

Todos los organismos heredan la información genética que especifica su estructura y función a partir de sus padres. Del mismo modo, todas las células se originan de células preexistentes. Así, el material genético debe ser replicado y transmitido desde los padres a la progenie celular en cada división. El cómo la información genética es replicada y transmitida desde una célula a otra, o desde un organismo a otro, representa una temática central para la **Biología Molecular**. En consecuencia, la dilucidación de los mecanismos de transmisión genética y la identificación del ADN como material genético fueron descubrimientos que conformaron los cimientos de nuestra comprensión de la biología a nivel molecular.



La **Biología Molecular** contemporánea se ocupa principalmente de estudiar los mecanismos responsables de la expresión y transmisión de la información genética que gobiernan la estructura y la función de las células y organismos.

OBJETIVOS

Que el alumno sea capaz de:

- Reconocer algunos componentes moleculares celulares fundamentales de los seres vivos.
- Adquirir habilidades para el desarrollo de reacciones químicas que permiten la identificación de algunos componentes moleculares celulares.
- Organizar y analizar protocolos de trabajo
- Discutir los resultados obtenidos
- Elaborar un informe relacionado con la actividad de laboratorio realizada

METODOLOGÍA

a - Extracción de ADN.

Fundamento de la técnica:

Durante el procedimiento de extracción, la homogenización permite romper la membrana celular para que las macromoléculas celulares pasen a la solución salina de cloruro de sodio, NaCl (solución A). Esta solución salina contribuye a liberar el contenido nuclear y solubilizar los ácidos nucleicos. La solución concentrada de NaCl (solución B) modifica las capas de hidratación que rodean a las moléculas liberadas al medio en el paso anterior. La solución C genera una interfase entre dos medios de diferente polaridad y permite la desnaturalización de las proteínas asociadas a las moléculas de ADN facilitando la pérdida de su estructura nativa. El agregado lento de etanol frío facilita la precipitación de las moléculas de ADN por deshidratación permitiendo su observación.

Procedimiento:

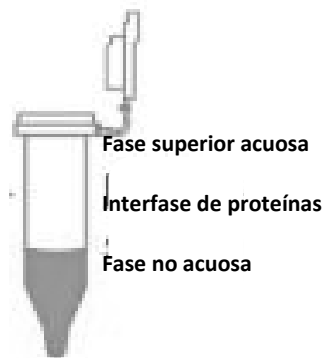
Se aislarán los núcleos de células de la pulpa de incisivos de ratas y a partir de ese material se aislará el ADN, utilizando una solución salina concentrada.

1. *Obtención de núcleos celulares:*

- a. Homogeneizar el tejido con 5 mL de **solución salina A**.
- b. Transferir el homogeneizado a un tubo cónico y centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos. Descartar el sobrenadante.
- c. Re-suspender el precipitado con 5 mL de **solución salina A**.
- d. Centrifugar nuevamente y preservar el precipitado.

2. *Aislamiento del ADN:*

- a. Re-suspender el precipitado, obtenido en el paso anterior, en 0,5 mL de **solución salina B** y agitar vigorosamente durante 2 minutos.
- b. Centrifugar a 4000 rpm durante 15 minutos.
- c. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo y agregar el mismo volumen de **solución C para desnaturalizar proteínas**.
- d. Agitar vigorosamente.
- e. Centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos. **Observe que la proteína desnaturalizada se deposita como una fina capa en medio del tubo** (ver figura).
- f. Recuperar la fase superior acuosa (en la que se encuentra el ADN) y transferir a un tubo limpio.



3. **Precipitación del ADN:**

- a. Agregar el doble del volumen transferido en el paso anterior de etanol frío.

Tenga la precaución de agregar el alcohol, con mucho cuidado, por las paredes del tubo. Intente visualizar las hebras del ADN mientras va precipitando desnaturalizado.



22

- b. Centrifugar a 10.000 rpm, durante 5 minutos, para precipitar el ADN desnaturalizado. Descartar el sobrenadante.
- c. Re-suspender el “pellet” final en agua destilada estéril.

Reactivos a utilizar:

- **Solución salina A:** NaCl 0,1%, citrato de sodio 0,05%, deoxicolato de sodio 0,04%; pH=7.
- **Solución salina B:** NaCl 2M.
- **Solución C:** mezcla de cloroformo/ alcohol isoamílico (24:1v/v).
- Etanol absoluto frío.
- Agua estéril.

b. Electroforesis.

Fundamento de la técnica:

La electroforesis se define como la migración de moléculas por acción de un campo eléctrico y es útil para la separación de sustancias con cargas eléctricas que se encuentren formando parte de una mezcla. El ADN es una molécula que contiene grupos fosfatos con carga negativa y si se lo coloca en un medio en el cual se establece un campo eléctrico se desplazará hacia el ánodo (polo positivo). Como medios “soporte” para realizar una corrida electroforética de ADN se utilizan geles, corrientemente de

acrilamida ó de agarosa. La elección del tipo de gel depende del tamaño de los fragmentos que se quieran analizar. La poliacrilamida es efectiva para separar fragmentos de ADN de entre 5 y 700 pares de base; en cambio los geles de agarosa permiten separar fragmentos de un rango más amplio de tamaños, entre 200pb y 50Kb. Esta última se utiliza frecuentemente para observar el ADN aislado. Para visualizar la posición alcanzada en el gel de las moléculas, después de la migración, se emplea una tinción con *bromuro de etidio* (compuesto fluorescente que se intercala en el ADN de doble hélice) que se puede observar directamente exponiendo el gel a la luz ultravioleta.

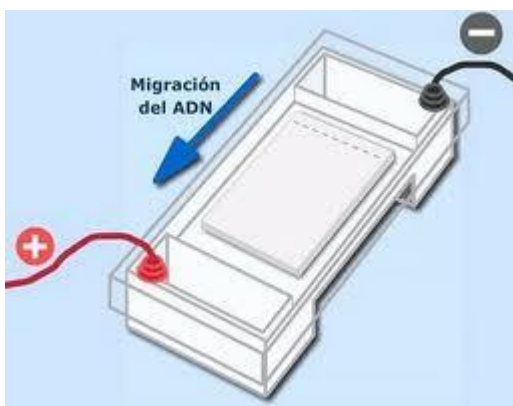
Preparación de un gel de agarosa y realización de una corrida electroforética:

- a. **Concentración de agarosa:** Un fragmento de ADN de un determinado tamaño migrará de manera diferente en geles que contengan concentraciones distintas de agarosa; eso se debe a que mayores concentraciones de agarosa en un gel, hacen más complejo el tramado del mismo, lo que dificulta la migración de las moléculas más grandes. Cabe señalar que concentraciones altas de agarosa (>2%) posibilitan una mayor resolución en la separación de fragmentos más pequeños de ADN.
- b. **Composición del buffer del gel y de corrida:** Los buffers más empleados son TAE (Tris base 0,45M, ácido acético glacial, EDTA 0,25 M) y TBE (Tris base 0,45 M, ácido bórico 0,45 M y EDTA 0,5M) pH 8.
- c. **Siembra de las muestras:** La siembra de muestras de ADN que se van analizar siempre se hará en el extremo del gel que esté orientado hacia el polo negativo porque el ADN migra hacia el polo positivo.

Procedimiento y reactivos:

- a. Calentar una solución de agarosa al 2 % (1,6 gr. de agarosa en 80 ml de buffer) en buffer TAE 1% V/V.
- b. Una vez que la agarosa está completamente disuelta (se observa una solución viscosa, transparente y sin grumos), agregar el bromuro de etidio 1mg/ml. Verter la solución de agarosa en un soporte de acrílico (previamente se colocó el “peine” que marcará las calles de siembra).
- c. Dejar enfriar a temperatura ambiente (15-20 min.) hasta que gelifique.
- d. Sumergir el gel en la cuba de electroforesis conteniendo buffer TAE 1x.

- e. Mezclar cada muestra de ADN con el marcador de frente de corrida o colorante (30% de glicerol, 0,01% azul de bromofenol y 0,01% de ciano xileno) y sembrar una muestra en cada calle.



- f. Conectar la cuba a la fuente de alimentación y realizar la electroforesis a un voltaje aproximado de 80 v (75-80 mA), durante 90 min.



- g. Finalizada la corrida electroforética, visualizar el gel por exposición a luz UV en un transiluminador.

⊗ **Advertencia:** El bromuro de etidio es cancerígeno, razón por el cual se debe trabajar siempre con guantes.

BIBLIOGRAFÍA

Sambrook and Rusell. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Vol. 3. Cold Spring Harbor, NY, USA. 2001.

Blanco A, Blanco G. Química Biológica. Ed. Ateneo, 9ª edición. Buenos Aires, Argentina. 2011.