|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **GUÍA DE PRÁCTICA DE LABORATORIO** | | | | | | | | | |
| **PERÍODO ACADÉMICO** | | 2024-1S | | | | | | | |
| **ASIGNATURA** | | Biología molecular | | | | **SEMESTRE:** 6to | | **PARALELO:** A | |
| **NOMBRE DEL DOCENTE** | | Mgt. Felix Falconi Ontaneda | | | | | | | |
| **NÚMERO DE PRÁCTICA** | | 1 | **FECHA:** 4/04/2024 | | **HORA:** 17:00-20:00 | | | | **DURACIÓN:** 3 |
| **NOMBRE DE LOS ESTUDIANTES.** | | **NÓMINA** | | | | | | | |
| 1. Aguirre Villavicencio Lesly Camily | | | | 1. Mena Morocho Kevin Jhoey | | | |
| 1. Armijos Guillen Víctor Enrique | | | | 1. Mena Pazmiño Sherelyn Deyanira | | | |
| 1. Bravo Lapo Geomara Dayana | | | | 1. Moyon Guachi Danny Roberto | | | |
| 1. Cabrera Zapata Mishell Alejandra | | | | 1. Muñoz Valle Karen Michelle | | | |
| 1. Calderón Bonilla Luis Alejandro | | | | 1. Panchi Naranjo Fiorela Stefanny | | | |
| 1. Castillo Quiroz Katherine Mishel | | | | 1. Paucar Bastidas Damaris Estefania | | | |
| 1. Chicaiza Simbaña Eslendy Alexandra | | | | 1. Pilco Pallo Jonathan Stiven | | | |
| 1. Chuncha Villegas Esteban Gabriel | | | | 1. Quelal Benavides Michelle Nayeli | | | |
| 1. Freire Pozo Arianna Chenoa | | | | 1. Sánchez Valencia Adriana Mikahela | | | |
| 1. Galarza López María Alejandra | | | | 1. Tene Tene Edgar Samuel | | | |
| 1. García Urquizo Marilyn Andrea | | | | 1. Torres Gonza María Belén | | | |
| 1. Guajan Chávez Katherine Anahí | | | | 1. Toscano Toscano Leonela Dayan | | | |
| 1. Herrera Cajas Daniela Monzerrath | | | | 1. Vicuña Idrovo Dorian Darwin | | | |
| 1. Illicachi Tene Karen Fernanda | | | | 1. Yépez Chavez Alisson Giuliana | | | |
| 1. Llomitoa Guaranda Brayan Mauricio | | | | 1. Yubaille Alcocer Samantha Gisela | | | |
| 1. López Muñoz Matheo Efraín | | | | 1. Yuquilema Yaucan Dina Esther | | | |
| 1. Ludeña Duran Nathaly Dayana | | | | 1. Zambrano Proaño George Aníbal | | | |
| 1. Medina Vargas Pamela Judith | | | |  | | | |
| **LUGAR DE LA PRÁCTICA** | | Lab E301 Laboratorio de Química, Toxicología y Forense | | | | | | | |
| **TÍTULO DE LA UNIDAD** | | BASES DE BIOLOGÍA MOLECULAR | | | | | | | |
| **TEMA DE LA PRÁCTICA** | | Extracción de ácidos nucleicos  Diferencias de extracción entre ADN y ARN | | | | | | | |
| **RESULTADO DE APRENDIZAJE** | | | | | | | | | |
| Aplica los fundamentos de la biología molecular, mediante el uso de los conocimientos teóricos adquiridos en las actividades prácticas que en ella se realizan, para su desempeño en el diagnóstico | | | | | | | | | |
| **OBJETIVO GENERAL** | | Comprender la técnica de extracción de ADN | | | | | | | |
| OBJETIVOS ESPECÌFICOS: | | | | | | | | | |
| * Reconocer el funcionamiento de los equipos del laboratorio de biología molecular y el proceso de extracción de ADN | | | | | | | | | |
| **MARCO TEÓRICO** | | | | | | | | | |
| El prototipo general para comprender la técnica de extracción de ADN es la bacteria de *Escherichia* *coli*. El conocimiento básico empieza considerando que en la estructura de doble hélice de ADN se pueden distinguir pares de nucleótidos o pares de bases (pb). Estas pb pueden usarse como unidad de tamaño o longitud para las moléculas de ADN, de esta manera podemos decir por ejemplo que el ADN cromosómico de *Escherichia coli* tiene un tamaño de 4,2 millones de pb o lo que es lo mismo de 4.200 kilobases (Kb) 1.  Todas las células deben enfrentarse al problema de cómo lograr contener en su estructura moléculas tan grandes como el ADN. Volviendo al ejemplo de *E. coli*, los 4.200 Kb de su genoma implican una longitud de 1,3 mm es decir unas mil veces la longitud de la célula. Las bacterias no poseen histonas asociadas a su genoma y en consecuencia no tienen la posibilidad de compactar su ADN en estructuras tipo nucleosomas como las células eucariotas 1.  Por lo tanto, deben compactar su ADN de otra manera. Esto se logra porque el ADN circular cerrado es capaz de adoptar una estructura terciaria denominada superenrollamiento, que implica el enrollamiento del eje de la doble hélice sobre sí mismo. Este superenrollamiento se dice que tiene sentido negativo porque tiene el sentido contrario al enrollamiento de una hebra de ADN sobre la otra 1.  Esta estructura de superenrollamiento también supone para la bacteria una fuente de almacenamiento de energía para ser usada en muchos procesos fisiológicos que la requieren, por ejemplo, la separación de las dos hebras de ADN necesaria para la replicación y la transcripción. El cromosoma bacteriano es suficientemente largo como para formar muchos lazos circulares, que como tales pueden superenrollarse formando una serie de dominios topológicos independientes. Esta organización en dominios colabora a la compactación general del genoma bacteriano e impide que, con la ruptura de una hebra (en cualquier sitio del cromosoma) se pierda el superenrollamiento total, manteniendo la energía almacenada | | | | | | | | | |
|  | | | | | | | | | |
| **MATERIALES Y MÉTODOS** | | | | | | | | | |
| **Equipos** | **Materiales** | | | | | | **Reactivos** | | |
| Microcentrífuga.  Baño de Incubación. | Materiales del laboratorio de Biología molecular y genética de la Facultad  Microtubos y micropipetas.  Porta tubos  Cinta masking  Marcador permanente | | | | | | Pellets bacterianos *E. coli*  Solución de Lisis  Solución Precipitación de Proteínas  Solución de purificación de proteínas  Etanol 70%  Agua ultrapura | | |
| **PROCEDIMIENTO / TÉCNICA:** | | | | | | | | | |
| Esta práctica permite aislar el ADN cromósomico de células bacterianas de *E. coli*, estas bacterias son Gram (-) así que no se necesita el tratamiento con lisozima que si necesitan las bacterias Gram (+) que son más difíciles de lisar y necesitan para ellos enzimas líticas.  Protocolo rápido  Este protocolo permite una rápida extracción del ADN cromosómico de forma que se puede realizar de una forma rápida en una clase práctica con alumnos. Las células bacterianas se han obtenido por centrifugación de 1.5 ml de cultivo “overnight” de células de *E. coli* y se suministran en forma de pellet bacteriano.  El primer paso es la incubación del pellet bacteriano con una solución de lisis que romperá las membranas celulares y liberará los ácidos nucleicos. Luego se eliminarán las proteínas y restos celulares con la adición de una solución de precipitación de proteínas. Después de una centrifugación nos quedaremos con el sobrenadante y haremos precipitar los ácidos nucleicos con isopropanol, seguido de un lavado con etanol 70% y finalmente la hidratación del ADN.  Lisis celular  1. Añadir 1.5 ml de un cultivo overnight a un tubo de 1.5 ml.  2. Centrifugar a 14.000 x g durante 30 segundos. Eliminar el sobrenadante.  3. Añadir 600 ul de Solución de Lisis al pellet celular y pipetear para resuspender y lisar las células.  4. Incubar las muestras a 80ºC durante 5-10 minutos. Enfriar a temperatura ambiente 1.  Precipitación de proteínas  1. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.  2. Añadir 300 ul de Solución de precipitación de proteínas.  3. Vórtex vigorosamente durante 20-30 segundos.  4. Centrifugar a 14.000 x g durante 5 minutos.  5. Se observará que el precipitado proteico forma un pellet.  Precipitación del ADN  1. Pasar el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de 1.5 ml que contenga 600ul de isopropanol  2. Mezclar por inversión varias veces.  3. Centrifugar a 14.000 x g durante 3 minutos.  4. Eliminar el sobrenadante.  5. Añadir 600 ul de etanol 70% e invertir varias veces para lavar el pellet de ADN.  6. Centrifugar a 14.000 x g durante 2 minutos.  7. Cuidadosamente eliminar todo el etanol. Vigilar no perder el pellet de ADN  8. Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 15 minutos 1.  Hidratación del ADN  1. Añadir 500-750 ul de Solución de Hidratación del ADN.  2. Re suspender mediante micropipeta el pellet blanco.  3. La incubación a 55ºC con periódicas agitaciones con vortex ayudará a la disolución del ADN | | | | | | | | | |
| **RESULTADO (Gráficos, cálculos, etc.)** | | | | | | | | | |
| ADN en etanol Pellet de ADN | | | | | | | | | |
| **OBSERVACIONES** | | | | | | | | | |
| * Los estudiantes deben tener cuidado al momento de manejar los equipos de laboratorio ya que son muy delicados. | | | | | | | | | |
| **CONCLUSIONES** | | | | | | | | | |
| * Los estudiantes reconocen los diferentes pasos de la extracción de ADN * Aprecian claramente cuando se tiene u pellet de ADN en el tubo de extracción. | | | | | | | | | |
| **RECOMENDACIONES** | | | | | | | | | |
| * Utilizar la vestimenta de bioseguridad para manejar los equipos y materiales del laboratorio de biología molecular. * Hacer uso de las normas de bioseguridad para evitar contaminarse así mismo, a los demás, o al trabajo que se esté realizando. * Seguir las instrucciones dadas por el profesor y en la presente guía * Leer las instrucciones de los reactivos utilizados. | | | | | | | | | |
| **BIBLIOGRAFÍA/WEBGRAFÍA** | | | | | | | | | |
| * Biología molecular Salazar Montes Adriana Mc Graw Hill Interamericana Editores * Biología molecular Gómez Marín Jorge Enrique Corporación para Investigaciones Biológicas * Biología molecular y celular Chandart Nalini Wolters Kluwer Health * https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/, * https://www.scopus.com/search/form.uri?display=basic | | | | | | | | | |
| **Mgs. Ximena Robalino F.**  **DIRECTORA DE CARRERA** | | | | **Ing. Félix Falconí O., Mgs**  **DOCENTE** | | | | | |