

SoPhic

Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular



PhD. Yerly M. Useche S.

MSc. Leydy J. Cano V.

Sociedad de Doctores e investigadores de Colombia

Bogotá, Noviembre 2021

Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular

Autoras:

PhD. Yerly Magnolia Useche Salvador

Grupo de Investigación y Desarrollo en Ciencia, Tecnología e Innovación – BioGRID

MSc. Leydy Johana Cano Vasquez.

Corporación universitaria Remington

Sociedad de Doctores e Investigadores de Colombia

<https://www.sophicol.org>

Calle 52 No. 14 – 64, Ap 301

2021, Bogotá, Colombia.

ISBN

Citación:

Useche, Y.; Cano, L. (2021). Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular. p. 1-32. Bogotá, Colombia. Sociedad de Doctores e Investigadores de Colombia - SoPhiC.

CONTENIDO

PROLOGO	Pág. 4
PRACTICAS	
Equipos del laboratorio de Biología Molecular	5
Extracción de ADN y verificación espectrofotométrica	11
Amplificación de ADN y verificación electroforética en gel de agarosa ..	19
Digestión con enzimas de restricción y verificación electroforética	27

PROLOGO

Este Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular pretende reforzar los conocimientos adquiridos en las clases teóricas sobre la molécula del ADN y las múltiples posibilidades de análisis que se pueden desarrollar a partir de la extracción de esta molécula proveniente de diferentes organismos vivientes.

Este documento está dirigido a los estudiantes de las áreas biológicas y médicas, que tengan dentro de su curriculum temas relacionados con biología molecular. Este manual contiene cuatro prácticas relacionadas con la práctica de un laboratorio de biología molecular. Las prácticas incluyen, el reconocimiento y aprendizaje de los equipos usados en biología molecular, y las técnicas de extracción y evaluación del ADN, así como el uso de enzimas de restricción. Estas técnicas son básicas para cumplir con múltiples propósitos como detección de agentes patógenos, análisis de variabilidad genética humana, animal, vegetal y de patógenos. Otros propósitos están relacionados con las pruebas de origen (paternidad, razas o determinación de origen vegetal). Los análisis de variabilidad genética pueden guiar sobre decisiones de políticas de salud pública, como también la conservación de especies. Muchas otras aplicaciones se basan en estas pocas pero básicas técnicas de biología molecular.

Este manual está diseñado siguiendo el método científico. Todas las prácticas tienen lo siguientes apartados: Objetivos, Introducción, Requerimientos, Procedimiento, Preguntas para la elaboración del Informe y bibliografía. El apartado de objetivos describe de forma clara cuáles son los propósitos de cada práctica, los cuales deben ser retomados en el momento de realizar el informe con el fin de evaluar el cumplimiento de los mismos. La introducción es breve, pero significativa, de tal manera que orienta sobre el contexto del trabajo a desarrollar. Los requerimientos deben estar garantizados para poder realizar cada procedimiento antes de comenzar cada práctica. Las prácticas están diseñadas para ser realizadas en un tiempo entre 1 o 2 horas por lo que algunas prácticas tienen dos sesiones. Por lo tanto, el profesor debe organizar grupos de trabajo y ajustar las prácticas a los espacios y al número de estudiantes. Adicionalmente, están disponibles dos áreas para que sean diligenciadas manualmente por los estudiantes, las cuales son las Actividades previas y el Registro de resultados. Las actividades previas son consultas que ayudan al desenvolvimiento de la práctica y en la elaboración del informe de la práctica, por lo cual deben ser diligenciadas antes de cada práctica. El registro de resultados, es un espacio para que el estudiante coloque los datos resultantes de cada práctica, lo cuales deben también ser usados para la elaboración del informe.

Desde la Sociedad de Doctores e Investigadores de Colombia (SoPhIC) y del Grupo de Investigación y Desarrollo en Ciencia, Tecnología e Innovación (BioGRID), esperamos que estudiantes y profesores encuentren este manual práctico, fácil de usar y que ayude en el cumplimiento de sus objetivos académicos.

PhD. Yerly Useche

PRÁCTICA: EQUIPOS DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

A. OBJETIVOS

1. Reconocer los equipos de laboratorio de uso común en las investigaciones en el área de Biología Molecular.
2. Identificar las funcionalidades y alcance de los equipos.
3. Adquirir habilidades en el manejo seguro y adecuado de los equipos.

B. INTRODUCCIÓN

La Biología Molecular es una disciplina de relativamente reciente desarrollo. La historia de esta disciplina data desde hace más de un siglo con los primeros intentos de aislar la molécula que permitía la transferencia de información de una generación a la siguiente. Desde entonces, ha tenido su mayor auge y aplicabilidad a partir del descubrimiento de la estructura del ADN por Rosalind Franklin y Raymond Gosling, aunque la publicación de los resultados fue realizado por James Watson y Francis Crick en 1953. A partir de este momento se aceleró la investigación en las diferentes partículas de tamaño molecular como ácidos nucleicos y proteínas principalmente, usando equipos que permitían su extracción, caracterización y aplicación. Algunos de estos equipos eran usados anteriormente como la balanza analítica, la plancha de agitación, el baño de maría; otros fueron diseñados posteriormente como el termociclador, el timer, el horno microondas y la cámara de flujo laminar.

En esta práctica se reconocerán los equipos existentes en el Laboratorio de Biología Molecular y se adquirirán habilidades en su manejo adecuado. Adicionalmente, se establecerá el alcance y aplicabilidad de los equipos.

C. REQUERIMIENTOS

Equipos	Termociclador Vortex Horno Microondas Plancha de agitación y calentamiento Centrífuga Survall Biofuge (refirgerada) Microcentrifuga Timer Balanza analítica Cámara de Flujo Laminar Baño termostatado	
Vidriería	Vasos de precipitado de 100 ml	2 por grupo
Reactivos	Almidón	
Otros instrumentos y materiales	Papel aluminio (cuadrado para pesar)	2 por grupo
	Espátula pequeña para pesar Eppendorff de 2 ml	2 por grupo

PARA TODAS LAS PRÁCTICAS DEBEN TRAERSE BATA, GUANTES DESECHABLES Y MARCADOR INDELEBLE DE PUNTA FINA (SHARPIE) POR ESTUDIANTE.

D. PROCEDIMIENTO

PRIMERA SESIÓN: RECONOCIMIENTO DE EQUIPOS Y FUNCIONAMIENTO

1. Consulte en qué consiste el funcionamiento de cada uno de los equipos y cuáles son sus características, aplicaciones y costo.
2. Lea y entienda las instrucciones para el manejo de los equipos del Laboratorio de Biología Molecular que se encuentran en el Anexo1.
3. Realice una exposición demostrativa a sus compañeros acerca del manejo del equipo que le corresponda según la indicación del docente. Tenga en cuenta que cada instrucción es importante y debe mencionarse durante la exposición. No olvide incluir los aspectos que consultó y que explican algunos aspectos del manejo de los equipos.

SEGUNDA SESIÓN: MANEJO DE EQUIPOS

En esta parte pondrá en práctica el uso de algunos de los equipos en un procedimiento de mezcla y separación de sustancias:

1. Pese la cantidad de almidón especificada en el cuadro.
2. Disuelva el almidón pesado en el volumen de agua establecido en el cuadro para cada procedimiento. Para los procedimientos 1 y 2 realice la mezcla en vasos de precipitado de 100 ml. En los procedimientos 3 y 4 use un eppendorf de 2 ml para realizar la mezcla.

Procedimiento	Cantidad de soluto (almidón)	Volumen de solvente (agua)	Método de disolución	Método de separación
1	1,2 g	25 ml	Plancha calentadora	Centrífuga grande: 1000 rpm x 2 min.
2	1,2 g	25 ml	Horno microondas: 1 min	Centrífuga grande: 1000 rpm x 2 min.
3	0,1 g	1 ml	Vortex: 1600 un/min.	Centrífuga pequeña: 0,1 rcf x 1 min.
4	0,1 g	1 ml	Vortex: 1300 un/min.	Centrífuga pequeña: 13,2 rpm x 1 min.

3. Métodos de disolución:

3.1. Plancha calentadora

En el procedimiento 1 coloque el vaso de precipitado en la plancha calentadora, usando el primer nivel de calentamiento y encuentre la velocidad adecuada para el magneto. ¿Cuál es esta velocidad?. Se puede determinar cuál es la temperatura que se puede alcanzar en cada nivel de calentamiento?. Diseñe una metodología para responder a la pregunta anterior.

3.2. Horno microondas

En el procedimiento 2 coloque el vaso de precipitado en el horno microondas por un minuto.

3.3. Vortex

En los procedimientos 3 y 4 coloque los eppendorff en las condiciones respectivas según la tabla.

4. Métodos de separación:

Antes de colocar los recipientes en las centrífugas verifique que éstos se encuentran a temperatura ambiente.

4.1. Centrífuga grande

Colocar los tubos falcon de los procedimientos 1 y 2 en la centrífuga grande, registre las siguientes condiciones: 1000 rpm x 2 min. Observe el resultado en el tubo falcon. ¿Se obtuvo como resultado un precipitado en los dos procedimientos? ¿Por qué se presentó el anterior resultado?

4.2. Centrífuga pequeña

Colocar los eppendorff de los procedimientos 3 y 4 en la centrífuga pequeña, colocando las condiciones especificadas en el cuadro para cada caso. ¿Se obtuvo como resultado un precipitado en los dos procedimientos? ¿Por qué se presentó el anterior resultado?

5. Baño de maría.

Identifique la máxima temperatura que se obtiene en el baño de maría en los niveles 2, 4, 6, 8 y 10. Para ello registre la temperatura cada 5 min a partir del momento en que seleccione cada uno de los niveles. Tome tres registros por nivel. Después del último registro en el nivel 10, coloque la perilla en 0 y registre cada 5 min hasta el final del laboratorio.

E. PREGUNTAS PARA LA ELABORACIÓN DEL INFORME.

Apartado	Preguntas
Resultados	<p>¿Cuáles son las condiciones en cada equipo que permiten una mejor disolución y separación de mezclas? Para qué sirve la posición <i>Touch</i> en el Vortex?</p> <p>¿Cuál es la velocidad en la que el magneto se comporta de manera adecuada al usar la plancha calentadora? ¿Por cuánto tiempo se puede mantener una temperatura estable en el baño termostatado? ¿Cuál es la temperatura máxima alcanzada? ¿Qué factores pueden afectar la estabilidad de la temperatura en el baño termostatado?</p> <p>Por qué no se deben colocar elementos metálicos en el horno microondas? ¿Cuál es el efecto de los microondas sobre los elementos metálicos?</p>
Discusión	<p>¿Por qué es importante el seguimiento estricto de los protocolos de manejo de los equipos de laboratorio?</p> <p>¿Por qué es importante el sentido de la observación y la identificación de los alcances de los equipos?</p>

F. BIBLIOGRAFIA

Manuales de equipos:

Manual Uso & Guía de Cuidado Microondas
Operating Instructions Labnet 6 Liter Water Bath
Precisa Balances Series XB Operating Instructions
Sorvall Biofuge primo Operating Instructions (Centrifuga refrigerada)
Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis Systems Instruction Manual
ThermoSafe Lab Ware Model 650 Benchtop System User Guide
Validación de Cabina de Flujo Laminar Vertical

Título de la práctica _____ Fecha _____
Nombre: _____ Código _____

G. ACTIVIDADES PREVIAS

1. Consulta los manuales de los equipos mencionados en la parte C. REQUERIMIENTOS y describe el manejo adecuado de dos ellos.



Título de la práctica _____ Fecha _____
Nombre: _____ Código _____

H. REGISTRO DE RESULTADOS

1. Diseña un cuadro en el que establezca las funciones de cada uno de los equipos analizados en la PRIMERA PARTE. Establece cuales son y cómo se pueden prevenir los problemas que se pueden presentar en el manejo de cada uno de los equipos.
2. Determina cuales son las condiciones de temperatura y velocidad con las que se obtiene mayor velocidad de disolución para cada método.
3. Describe cómo los factores de centrifugación afectan la obtención de precipitado.
4. Diseña una gráfica con los rangos de temperatura que se pueden mantener en el baño termostatado.
5. En la balanza identifica el máximo y mínimo peso que puede medirse en este equipo, al igual que el nivel de precisión.



PRÁCTICA: EXTRACCIÓN DE ADN Y VERIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

A. OBJETIVOS

1. Empoderar al estudiante del manejo estéril o aséptico en todos los procedimientos en el laboratorio de biología molecular.
2. Aprender técnicas de extracción de ADN de diferentes fuentes biológicas.
3. Entender los principios físicos, químicos y biológicos que permiten la extracción del ADN en cada protocolo.
4. Obtener DNA con un máximo grado de pureza, basado en la buena aplicación del método.
5. Entender y aprender la técnica de evaluación de la calidad y concentración del ADN por el método espectrofotométrico.

B. INTRODUCCIÓN

Los análisis de ADN pueden tener diferentes objetivos como el diagnóstico de enfermedades, identificación de resistencia bacteriana, identificación de mutaciones, estimación de la variabilidad genética, determinación de paternidad, aplicaciones forenses, como identificación de cadáveres y procedencia de muestras, entre otros. Para desarrollar estas actividades se requiere realizar la extracción de ADN de diferentes fuentes vivientes: virus, bacterias, hongos, células vegetales o animales, según el objeto de la investigación.

La extracción de ácidos nucleicos se basa en la lisis celular, y el aislamiento del ácido nucleico en cuestión, para ello existen métodos físicos, químicos y combinados (físicos y químicos). De forma general, en los métodos químicos se utilizan detergentes para romper las células, proteinasa K con la cual se digieren las proteínas celulares, incluyendo las asociadas al ADN; soluciones de precipitación de proteína y finalmente la obtención del ADN. Con respecto a los métodos físicos la lisis celular y nuclear se consigue con el aumento de temperatura y la separación se realiza por centrifugación.

El desarrollo de los análisis descritos anteriormente requiere la determinación de la concentración y pureza del ADN obtenido, para lo cual se utilizan el método espectrofotométrico y la electroforesis con gel de agarosa.

Para determinar la concentración de ADN en un espectrofotómetro, la lectura debe hacerse a una longitud de onda de 260 nm, ya que es la longitud de onda que absorbe el ADN. Cuando la absorbancia es igual a 1 corresponde aproximadamente a 50 µg/mL de ADN doble banda, lo cual permite el cálculo de la concentración del ADN en la muestra (Valadez y Kahl, 2000; Eppendorf, 2005).

De igual manera, se puede usar el espectrofotómetro para evaluar la pureza del ADN, en tal caso se realiza la lectura a 280 nm longitud de onda que absorben las proteínas; la

relación entre las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm (Índice 260/280) aporta una estimación de la pureza del ADN. Las preparaciones puras del ADN tienen valores del índice 260/280 de 1.8; valores menores indican contaminación con proteínas y valores mayores señalan presencia de ARN (Valadez y Kahl, 2000; Eppendorf, 2005). Sin embargo, este método es poco sensible pues no detecta concentraciones inferiores a 250 ng/ml.

Con esta práctica se pretende que los estudiantes se familiaricen con algunos protocolos de extracción de ADN y el método espectrofotométrico para determinar la concentración y pureza del ADN. Adicionalmente, se busca que se comprendan las bases físicas y químicas de las interacciones entre métodos, reactivos y compuestos celulares en la extracción de ADN, para solucionar problemas de la extracción y de la estandarización de la extracción a partir de cualquier fuente de ADN.

C. REQUERIMIENTOS: Cantidades para 4 grupos de 2-5 personas.

Equipos	Micropipeta 10-100 μ l Micropipeta 100-1000 μ l Termociclador Centrífuga Vortex Baño de maría	
Reactivos	Solución salina estéril Agua Milli-Q Kit Wizard – Promega Isopropanol Etanol 70%	
Materiales		Cantidad
Material fungible	Tubos de PCR (Flat cap) estériles Tubos eppendorf 1,5 ml estériles Puntas blancas estériles Puntas amarillas estériles Puntas azules estériles	20 4 1 rack 1 rack 1 rack
Otros instrumentos y materiales	Asas microbiológicas Tubos vacutainer con EDTA Gradillas para tubos 1,5 ml Gradillas para tubos 200 μ l (Flat cap) Guantes y tapabocas* Toallas de papel* Sharpie de punta fina*	2 1 2 2 2 5 1

*Material que debe conseguir y portar cada estudiante.

D. PROCEDIMIENTO

- CONDICIONES GENERALES DE TRABAJO

Por tratarse del manejo de micromoléculas existe un alto riesgo de contaminación, por lo cual se requiere asepsia total y cuidado en la manipulación de puntas y tubos para no contaminar las biomoléculas ni los reactivos con los que se está trabajando. Por lo tanto es imprescindible seguir las siguientes indicaciones:

1. Usar bata cerrada y de manga larga durante toda la estadía en el laboratorio. Esta bata debería ser de uso exclusivo para el laboratorio.
2. Usar guantes durante todos los procedimientos. Este aspecto es sumamente importante porque evita el primer riesgo de contaminación de las muestras (biomoléculas) con las células escamosas epiteliales que todo el tiempo están despegándose de la piel; adicionalmente las manos al estar en contacto con muchos objetos son medio de transporte de múltiples microorganismos y virus. Por otro lado, las nucleasas se hallan en la piel humana por lo que se tiene que evitar el contacto directo de las manos con los ácidos nucleicos.

Tenga en cuenta que gran parte del éxito del trabajo en el laboratorio molecular depende de la condición de asepsia y por lo tanto debe verificarse el buen estado de los guantes antes de llegar al laboratorio y tener un par de guantes extra por si acaso llegaran a romperse durante el procedimiento. En tal caso deberán reemplazarse inmediatamente.

Adicionalmente, evite el contacto de los guantes con la cara, cabello u otras fuentes de contaminación. Esta medida debe tomarse en cuenta tanto por su seguridad como para la integridad de la muestra.

3. Esterilizar la superficie en la que se va a desarrollar el procedimiento y las micropipetas que va a usar con papel humedecido con clorox.
4. Colocar todos los reactivos y materiales sobre la superficie estéril.
5. Marque de forma adecuada y legible los tubos que va a usar y manténgalos sobre una gradilla.
6. Usar tapabocas durante los procedimientos es imprescindible, debido a que el segundo factor de riesgo de contaminación son las bacterias y virus que se encuentran en la boca que pueden salir y contaminar las muestras cuando se habla o estornuda.
7. Recuerde mantener siempre tapados los tubos que manipule, sólo se destapan para adicionar o sacar solución del mismo y debe taparse inmediatamente.

TENGA EN CUENTA LAS ANTERIORES INDICACIONES TODO EL TIEMPO Y EN TODAS LAS PRÁCTICAS EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

PRIMERA SESION: EXTRACCIÓN DE ADN SANGUÍNEO.

Para este procedimiento debe obtenerse previamente la sangre venosa periférica, para ello existen dos alternativas:

1. Puede usarse jeringa, si el procedimiento de extracción de ADN se va a realizar de forma inmediata.
2. De lo contrario deberán usarse tubos vacutainer con EDTA como anticoagulante. Existen otros anticoagulantes como la heparina, sin embargo, esta polisacárido interfiere en los procesos de amplificación y digestión de ADN, por lo que no es recomendable.

Una vez se cuente con la sangre (muestra) se aplica el siguiente protocolo que corresponde al KIT WIZARD de Promega:

1. Colocar 900 μ l de Solución de Lisis Celular en un tubo eppendorf de 1,5 ml, marque el tubo con iniciales que indiquen la fuente de la muestra.
2. Transferir 300 μ l de sangre venosa periférica al tubo anterior y mezclar por inversión 5 veces.
3. Incubar a 37°C por 10 minutos e invertir el tubo 3 veces para lizar los eritrocitos
4. Centrifugar a 13200 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente.
5. Remover el sobrenadante inclinando el tubo, sin perder de vista ni resuspender el botón de leucocitos. En este punto podría perder el ADN.
6. Colocar el tubo en vortex fuerte durante 15 segundos hasta resuspender completamente los leucocitos
7. Adicionar 300 μ l de Solución de Lisis Nuclear y resuspender 6 veces con micropipeta.
8. Adicionar 1,5 μ l de Solución de RNAsa, mezclar por inversión 25 veces e incubar a 37°C por 15 minutos.
9. Adicionar 100 μ l de Solución de Precipitación de proteína y colocar en vortex fuerte por 20 segundos.
10. Centrifugar a 13.200 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente.
11. Colocar 300 μ l de Isopropanol en un tubo eppendorf de 1,5 ml nuevo.
12. Transferir el sobrenadante al tubo con el Isopropanol.
13. Mezclar por inversión hasta que el ADN se haga visible.
14. Centrifugar a 13.200 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente
15. Remover el sobrenadante y adicionar 300 μ l de etanol al 70% a temperatura ambiente. Invertir el tubo varias veces hasta desprender el botón de ADN del tubo. Si esto no es suficiente pueden darse pequeños golpes en la parte inferior del tubo (tapping). Una vez que se desprende el botón el tubo se invierte varias veces para lavarlo bien.
16. Centrifugar a 13.200 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.

17. Aspirar cuidadosamente el etanol con una micropipeta de 1000 μl y si se requiere para sacar todo el etanol usar una micropipeta de 100 μl . En este punto se puede perder muy fácilmente el ADN.
18. Colocar la boca del tubo sobre una servilleta y deje secar al aire hasta que no queden residuos de etanol en el tubo.
19. Adicionar al tubo 300 μl de Solución de rehidratación, mezclar por tapping hasta separar el botón de la pared del tubo. Colocar en nevera a 4°C por toda la noche o colocar a 55°C por 45 min.
20. Almacenar en nevera a -20°C.

EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO O FÚNGICO – MÉTODO BOILING.

SIGA ESTRICTAMENTE LAS CONDICIONES GENERALES DE TRABAJO ESTABLECIDAS EN LA PRIMERA PARTE DE LA GUÍA.

1. Coloque 100 μl de solución salina estéril en un tubo de 200 μl (Flat cap) y márkelo con iniciales que denoten la fuente del ADN.
2. Encienda un mechero y tome una cepa fúngica o bacteriana, preferentemente inocua, crecida en medio sólido y suspenda una asada de este material biológico en la solución salina estéril.
3. Lleve a 95°C por 10 minutos en el termociclador. Abra el archivo Boiling que se encuentra en la carpeta Extracciones.
4. Una vez terminado el ciclo, centrifugue a 13.000 rpm por 2 minutos. Deben resultar dos fases.
5. Lleve el producto a -20°C por 2 minutos.
6. Tome el sobrenadante sin mezclar con la fase profunda y colóquelo en un tubo de 200 μl (Flat cap) y mantenga en nevera a -20°C.

SEGUNDA SESION: ESPECTROFOTOMETRIA

En un equipo automatizado se ejecuta el siguiente protocolo:

1. Encienda el espectrofotómetro al menos 15 minutos antes de iniciar las lecturas.
2. Preparación del blanco: se agrega 10 μl de TE-RNasa (o la solución que utilizo para resuspender el ADN de la muestra problema) y 990 μl de Agua destilada desionizada, en una celda, asegurándose de la perfecta homogeneización. En ausencia de los anteriores se usan como blanco 400 μl de agua MiliQ.
3. Coloque la celda en la posición 1 del espectrofotómetro.
4. Preparación de las muestras: agregue 4 μl de la muestra problema y 396 μl de Agua destilada desionizada, en otra celda, asegurándose de la perfecta homogeneización.
5. Lectura: registre la absorbancia reportada por el equipo a las dos longitudes de onda. Primero se realizan las mediciones a 260 nm y luego a 280 nm.

La cantidad y calidad del ADN se verifica con las medidas de Absorbancia a 260 nm. y 280 nm. Se calcula la relación A_{260}/A_{280} , la cual debe tener un valor que oscile entre 1,8; de esta forma se garantiza una desprotección aceptable de la muestra.

6. Cálculo de la concentración. Una solución de 50µg/ml de ADN da un índice 260/280 de 1. La determinación de la concentración se realiza a través de la siguiente fórmula:

$$\text{ADN } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (\text{DO } 260 \text{ nm} \times \text{dilución} \times 50) / 1000$$

E. PREGUNTAS PARA LA ELABORACIÓN DEL INFORME.

Apartado	Preguntas
Materiales y métodos	¿Cuáles son los principios del funcionamiento del espectrofotómetro?
Resultados	Los resultados de concentración y pureza obtenidos en las tres replicas del protocolo Boiling son coincidentes? ¿Cuál de los métodos produjo mejores resultados en cuanto a la concentración y pureza del ADN?
Discusión	¿Cuáles son los mecanismos por los cuales los diferentes biocompuestos celulares son separados del ADN en cada una de las etapas de la extracción de los dos protocolos? Para ello revise o consulte la composición de los diferentes reactivos utilizados. ¿Cuál es el efecto de cada reactivo usado en la suspensión celular? ¿Por qué se requiere que el ADN no esté asociado a otros biocompuestos orgánicos? ¿Cuáles son los factores en el proceso de extracción o del sistema de evaluación del ADN pudieron influir en el resultado de ADN de baja pureza?

F. BIBLIOGRAFIA

VALADEZ, E.; KAHL, G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Mundi-Prensa México S.A de C.V. 147 p.

EPPENDORF NORTH AMERICA. 2005. Quantification made easy. Disponible en: http://www.eppendorfn.com/applications/quant_easy.asp (15-12-2005).

VIVES, AGUILAR. 2006. Manual de Tecnicas de Laboratorio en Hematologia. 3ra ed. Editorial Masson, 776 p.

Título de la práctica _____ Fecha _____
Nombre: _____ Código _____

H. REGISTRO DE RESULTADOS

1. Establece la calidad del ADN extraído en términos de la contaminación con proteínas y/o ARN usando el índice 260/280.
2. Calcula la concentración de ADN obtenido usando la información de dicho índice.



PRÁCTICA: AMPLIFICACIÓN DE ADN Y VERIFICACIÓN ELECTROFORÉTICA EN GEL DE AGAROSA

A. OBJETIVOS

1. Aprender en qué consiste y cómo se realiza una amplificación de ADN.
2. Entender el papel de los diferentes reactivos en una amplificación para hacer la estandarización de una amplificación.
3. Aprender las bases teóricas de la electroforesis en gel de agarosa y cómo se implementa.
4. Interpretar el resultado de una electroforesis de amplificaciones en gel de agarosa.

B. INTRODUCCIÓN

La amplificación de una secuencia específica de ADN es uno de los procedimientos más comunes en las investigaciones desarrolladas en biología molecular. Como resultado de este procedimiento se obtiene un amplificado el cual se evalúa generalmente, a través de la electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida.

Amplificación de ADN

La obtención de millones copias de una secuencia específica de ADN se realiza mediante la técnica PCR (Polimerase Chain Reaction) ó Reacción en cadena de la polimerasa. Básicamente esta técnica permite replicar *in vitro* la duplicación del ADN que se realiza *in vivo* en todas las células, para ello se coloca el DNA molde y los reactivos Taq polimerasa, primers, MgCl₂, DNTPs, Buffer de amplificación (KCl, Tris y MgCl₂), Agua MilliQ, o agua destilada y desionizada, en un flat cap con capacidad de 200 ul. Este coctel de reacción se coloca en el termociclador donde será sometido a ciclos de diferentes temperaturas que permiten desarrollar tres procesos fundamentales:

- La desnaturalización o apertura de las dos hebras de ADN para que la Taq polimerasa pueda entrar en contacto con la hebra sencilla, lo cual sucede a una temperatura entre 90-95°C.
- La hibridación de los primers o la unión de los primers con la hebra molde, que sucede a una temperatura específica dependiendo de la estructura del primer, dada por la siguiente fórmula: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$.
- La extensión o síntesis del ADN que se realiza a la temperatura en que es activa la Taq polimerasa entre 72-75°C.

Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis es una técnica de separación que se basa en la migración de las moléculas con carga neta hacia el polo opuesto de su carga, cuando es sometida a un campo eléctrico. Sin embargo, la fuerza eléctrica se contrarresta con la fuerza de rozamiento relacionada con el tamaño o peso molecular, forma y medio en el que se mueve la molécula. El resultado de la acción de estas dos fuerzas es una posición determinada de la molécula en el gel. La movilidad de la molécula estará determinada por la siguiente ecuación:

Movilidad de la molécula = (voltaje aplicado x carga neta molécula) / Fricción de la molécula (tamaño y forma)

Las moléculas de ADN poseen carga negativa debido a la presencia de los grupos fosfato y esta no varía por el tamaño, así que ésta molécula migrará hacia el ánodo (+) atravesando el gel que es un polímero orgánico. El gel se encuentra en una concentración definida, determinando la fuerza de rozamiento del gel de tal manera que a mayor concentración menor velocidad de la migración. La movilidad de la molécula se lleva a cabo por la interacción del DNA cargado negativamente y las cargas del buffer de corrida (TAE 1X pH 8.0) que dependen del pH. Un pH del buffer muy ácido, no permite que los fosfatos se encuentren ionizados y se afectaría la fuerza eléctrica que posibilita la migración de las moléculas.

La electroforesis sirve para determinar el resultado de una amplificación, la cuantificación en términos de la concentración o pares de bases que existen en un amplificado o DNA total extraído, o el grado de pureza.

C. REQUERIMIENTOS: Cantidades para 4 grupos de 2-5 personas.

Equipos	Micropipetas 10-100 µl Micropipetas 100-1000 µl Termociclador Microcentrífuga Balanza analítica Horno microondas Cámara de electroforesis Transiluminador ultravioleta
Reactivos	Agua destilada, desionizada y estéril o Agua Milli-Q Reactivos para la PCR: Taq polimerasa, dNTPs, MgCl ₂ , Primers (Forward, Reverse), Buffer. Agarosa TAE 1X Azul de bromofenol Bromuro de etidio Marcador de peso molecular Lambda Ladder
Materiales	Cantidad

Material fungible	Tubos de PCR (Flat cap) estériles Tubos eppendorf 1,5 ml estériles Puntas blancas estériles Puntas amarillas estériles Papel aluminio Papel parafilm	18 (6 por protocolo) 2 rack 1 rack
Otros instrumentos y materiales	Gradillas para tubos 200 µl (Flat cap) Gradilla para tubos 1,5 ml Frasco SHOTT para geles de agarosa con bromuro de etidio. Probeta de 100 ml Guantes acolchados para recipientes calientes Guantes de látex y tapabocas* Toallas de papel* Sharpie de punta fina* Pares de guantes de nitrilo* Calculadora*	3 1 1 1 1 2 2 1 2 1

*Material que debe conseguir y portar cada estudiante.

D. PROCEDIMIENTO

TENGA EN CUENTA LAS INDICACIONES DE PROTECCIÓN DESCRITAS EN LAS PRÁCTICAS ANTERIORES, TODO EL TIEMPO Y EN TODAS LAS PRÁCTICAS EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

PRIMERA SESION: Amplificación de una secuencia de ADN

1. Sacar de la nevera de -20°C los reactivos y mantenerlos en un sistema refrigerado.
2. Marcar con el Sharpie de punta fina los Flat cap de acuerdo a la fuente de ADN o las modificaciones del protocolo de amplificación.

Ensayos para la estandarización de la PCR

1. Antes de adicionar cada uno de los componentes del Master mix, debe verificarse que estén completamente descongelados y mezclarse por Tapping.
2. Adicionar en tres Flat caps 1 µl de ADN bacteriano.
3. Preparar la Mezcla maestra en otro Flat cap según el protocolo que indique el docente. Los reactivos deben adicionarse en el siguiente orden: agua, buffer, dNTPs, MgCl₂. Los primers F (forward) y R (reverse) y la Taq polimerasa serán adicionados por el docente:

a. Protocolo para establecer el efecto de diferentes concentraciones de Primer en el amplificado:

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Buffer	2 µl	2 µl	2 µl
Primer 0,5 µM	1 µl (0,5 µl c/u)	0,8 µl (0,4 µl c/u)	0,6 µl (0,3 µl c/u)
dNTPs 0,2 mM	1 µl	1 µl	1 µl
MgCl ₂ 1,5 mM	1,2 µl	1,2 µl	1,2 µl
Taq Polimerasa	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
H ₂ O	3,3 µl	3,5 µl	3,7 µl
ADN	1 µl	1 µl	1 µl
Total	10 µl	10 µl	10 µl

b. Protocolo para observar las variaciones en el amplificado debido a las diferentes concentraciones de dNTPs:

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Buffer	2	2	2
Primer 0,5 uM	1 (0,5c/u)	1 (0,5 c/u)	1 (0,5 c/u)
dNTPs 0,2 mM	1	0,7	0,5
MgCl ₂ 1,5 mM	1,2	1,2	1,2
Taq Polimerasa	0,5	0,5	0,5
H ₂ O	3,3	3,6	3,8
ADN	1	1	1
Total	10	10	10

c. Protocolo para establecer el resultado del uso de diferentes concentraciones de MgCl₂:

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Buffer	2	2	2
Primer 0,5 uM	1 (0,5 c/u)	1 (0,5 c/u)	1 (0,5 c/u)
dNTPs 0,2 mM	1	1	1
MgCl ₂ 1,5 mM	1,2	1	0,8
Taq Polimerasa	0,5	0,5	0,5
H ₂ O	3,3	3,5	3,7
ADN	1	1	1
Total	10	10	10

4. Adicionar la Mezcla maestra al Flat cap con el ADN, tapar y mezclar por Tapping.
5. Hacer un pulso de 10 segundos en la Microcentrífuga, para eliminar burbujas y concentrar la mezcla en el fondo del Flat cap.
6. Colocar en el termociclador y correr el programa indicado por el docente.

SEGUNDA SESIÓN: Verificación de la amplificación en gel de agarosa al 2% p/v

1. Preparar la cámara de electroforesis:
 - a. Lavar con agua destilada y secar bien toda la cámara
 - b. Ubicarla en un lugar con el menor desnivel posible y cercano a una conexión eléctrica
 - c. Nivelar la cámara
 - d. Preparar el molde, en el caso de algunos modelos de cámaras de electroforesis debe colocarse cinta de enmascarar para sellar el molde, en otros casos existen separadores plásticos que deben limpiarse con alcohol antes de colocarse en el molde.
 - e. Limpiar los peines con alcohol y colocarlos en el molde.
2. Preparación del gel de agarosa:
 - a. Verificar el volumen del molde donde se vierte el gel, este corresponde al volumen a medir de buffer TAE 1X pH. 8.0 que se debe colocar en un recipiente exclusivo para preparación de geles con **Bromuro de etidio**.
 - b. Calcular los gramos de agarosa teniendo en cuenta la siguiente fórmula: $(\text{Concentración} \times \text{Volumen})/100$. Pesar la cantidad calculada.
 - c. Adicionar la agarosa al buffer TAE 1X, colocar la tapa del recipiente sin ajustarla y calentar en el horno microondas por tres o cuatro periodos de 30 segundos hasta que la agarosa se encuentre completamente disuelta. No olvide usar los guantes acolchados para recipientes calientes. Cada vez que se caliente debe mezclarse suavemente para verificar la completa disolución.
 - d. Una vez disuelta la agarosa, dejar reposar la mezcla en el área contaminada con **Bromuro de etidio** hasta que se pueda coger el recipiente sin usar el guante acolchado. Este es el momento de adicionar 3 μl de Bromuro de etidio, tapar y mezclar suavemente hasta que el color rojo desaparezca.
 - e. Verter la mezcla en el molde de manera uniforme. Correr las burbujas que se hallan generado hacia los bordes del gel usando una punta.
 - f. Dejar polimerizar por 30 min.
 - g. Preparación del buffer de carga: Cortar un rectángulo de papel Parafilm suficiente para el número de muestras. Colocar en el papel por muestra los reactivos en el siguiente orden:

 - 5 μl de agua destilada, desionizada y estéril o agua MilliQ
 - 2 μl de azul de bromofenol
 - h. Retirar los separadores o la cinta de enmascarar y los peines cuidando de no romper los pozos.
 - i. Adicionar el buffer de corrida TAE 1X hasta cubrir completamente los pozos,
 - j. Sembrar 0,5 μl de lambda (marcador de peso molecular) y 0,5 μl de ladder (marcador de tamaño en pares de bases). La preparación del buffer de carga es igual que para las muestras.
 - k. Tomar 5 μl de la muestra (amplificado), mezclar con la solución agua y azul de bromofenol y sembrar.

- l. Completar el volumen de buffer de corrida TAE 1X en la cámara hasta 1 cm por encima del borde superior del gel. **Nota:** es importante usar el mismo lote de buffer de electroforesis en la cámara de electroforesis que en la preparación del gel. Pequeñas diferencias en la fuerza iónica o diferencias de pH en el gel, esto puede afectar mucho la movilidad de los fragmentos de ADN.
- m. Tapar la cámara, conectar y encender la fuente, conectar los electrodos de tal manera que los pozos se encuentren hacia el polo negativo. Seleccionar en voltaje 100 voltios y en tiempo una hora y dar inicio a la corrida.

El laboratorio finalizará con la observación de geles que se han corrido previamente usando un transiluminador ultravioleta. La imagen del gel será enviada a los estudiantes para su análisis.

E. PREGUNTAS PARA LA ELABORACIÓN DEL INFORME.

Apartado	Preguntas
Materiales y métodos	¿Cuál es la función de cada uno de los reactivos que se usan para hacer el Master Mix? ¿Cuáles son las funciones del buffer de carga y del buffer de corrida en la electroforesis?
Resultados	¿Cuál es la cantidad del amplificado obtenido en la primera sesión. ¿Cuál es la calidad del amplificado, teniendo en cuenta la presencia de barridos o de amplificaciones inespecíficas?.
Discusión	Consulte y analice por qué razones puede ocurrir la presencia de amplificaciones inespecíficas y como modificar el protocolo de amplificación para obtener un único amplificado de buena calidad. ¿Qué es una sonrisa en un gel de agarosa y por qué se produce? ¿Cómo puede afectar la lectura de las bandas? Busque un artículo científico en el que se realice una amplificación, describa el objetivo de hacer la amplificación y el protocolo de la PCR. Partiendo de las concentraciones de los reactivos para la PCR usados en el laboratorio, establezca cuantos microlitros debería usar para realizar el protocolo expuesto en el artículo consultado. El artículo debe ser anexado al informe.

F. BIBLIOGRAFÍA

MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL, Russell, David and Sambrook, Joseph, CSHL PRESS Edit. 3ª edición. Volumen I, II, III.

Título de la práctica _____ Fecha _____

Nombre: _____ Código _____

G. ACTIVIDADES PREVIAS

1. Consulta las hojas de seguridad de los reactivos (MSDS) a usar en este laboratorio. Establece cuál es el orden de los reactivos de acuerdo a su peligrosidad desde el más al menos peligroso y cuáles son las medidas que debes seguir en caso de que tengas un accidente con ellos?

2. Desarrolla un diagrama donde expliques el procedimiento de la amplificación del ADN y del procedimiento de la electroforesis. Identifica con símbolos de llamada de atención, aquellas partes del procedimiento que son críticos para que el resultado del procedimiento sea exitoso y aquellos que pueden implicar un riesgo para tu salud si no se siguen las indicaciones de trabajo mencionadas en la parte **D. PROCEDIMIENTOS**.



Título de la práctica _____ Fecha _____
Nombre: _____ Código _____

H. REGISTRO DE RESULTADOS

1. Incluya una imagen del gel de agarosa y verifique si el amplificado obtenido corresponde al esperado de acuerdo al tamaño en pares de bases.

2. Marca cada una de los pozos teniendo en cuenta lo que se depositó en cada uno de ellos. Escribe cuál es el tamaño en pares de bases de toda la escalera de peso molecular.



PRÁCTICA: DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y VERIFICACIÓN ELECTROFORÉTICA

A. OBJETIVOS

1. Aprender en qué consiste y cómo se realiza una digestión de ADN con enzimas de restricción.
2. Entender los factores que pueden afectar la acción enzimática en este proceso.
3. Interpretar el resultado de una electroforesis de productos de digestión de ADN.

B. INTRODUCCIÓN

El ADN de alto peso molecular puede ser fragmentado (digestión) de manera casi aleatoria a través de cortes que se realizan con enzimas de restricción. Estos cortes se realizan en secuencias específicas del ADN que son reconocidas por las enzimas. Sin embargo, el proceso es un poco más complejo cuando se trata de hacer digestión para generar librerías de ADN genómico; se requiere desarrollar técnicas para la reparación de las terminaciones, metilación, ligación a un acoplador y digestión de los acopladores. Otro de los objetivos con los que se realiza digestión con enzimas de restricción es el análisis de la variabilidad genética con el marcador RFLP.

Dentro de los métodos más comunes para realizar digestión parcial con enzimas de restricción de DNA de alto peso molecular en solución están:

- Variación de la concentración de la enzima
- Variación del tiempo de incubación
- La concentración limitante de Mg^{+2} (Albertsen et al., 1990)
- Protección de un subconjunto de sitios de restricción con una metilasa afín (Hoheisel et al., 1989).

El protocolo que se desarrollará a continuación es un experimento piloto que se ajusta hasta obtener un DNA para incluirlo en un vector de clonación. Su tamaño depende del vector a usar: DNA de 20 a 25 kb con el vector bacteriófago λ ó DNA de más o menos 45 kb con cósmidos. Posteriormente, las reacciones se llevan a una escala mayor, en la que las concentraciones de enzima son un poco diferentes.

Para construir una librería genómica, la longitud promedio del DNA inicial debe ser al menos ocho veces la capacidad del vector. Este tamaño asegura que la mayoría de las moléculas de DNA creadas por digestión parcial con enzimas de restricción se acoplen al vector. El tamaño del DNA antes de la digestión debe comprobarse a través de un gel de agarosa al 0,7% y usando como referencia un marcador de bacteriófago λ .

Antes es buena idea hacer un blanco que contiene DNA y el buffer de la enzima, pero no la enzima, incubar la solución por 1 a 2 horas al óptimo de la temperatura de la enzima y examinar el resultado en un gel de agarosa al 0,5%. Aquí debe compararse el

blanco con la muestra de DNA que ha sido incubado en TE en las mismas condiciones de tiempo y temperatura que el blanco y con el DNA sin incubar. En los tres casos el DNA debe ser del mismo tamaño. Si existe degradación en el DNA incubado con el buffer de la enzima el DNA usado está probablemente contaminado con DNAsas inespecíficas que son activadas por el Mg^{+2} que se encuentra en el buffer. Este tipo de contaminación puede removerse con una extracción suave con fenol:cloroformo y diálisis en contra de varios cambios de TE (pH 7.6).

C. REQUERIMIENTOS: Cantidades para 4 grupos de 2-5 personas.

Equipos	Baño serológico con agua a 70°C Micropipetas 100-1000 µl Cámara de electroforesis Transiluminador ultravioleta
Reactivos	Buffer de carga de Sacarosa Tris-Cl (10 mM, pH 8.0) Enzimas de restricción Buffer de enzimas de reacción 10X Agarosa Buffer TBE 0.5X Bromuro de etidio 0.5 µg/ml DNA de alto peso molecular Oligómeros de bacteriófago λ y plásmidos Marcador molecular
Material fungible	Tubo capilar sellado Tubo de diálisis esterilizado Puntas azules 100-1000 µl
Otros instrumentos y materiales	Guantes de latex* Sharpie o marcador indeleble*

*Material que debe conseguir y portar cada estudiante.

D. PROCEDIMIENTO

TENGA EN CUENTA LAS ANTERIORES INDICACIONES TODO EL TIEMPO Y EN TODAS LAS PRÁCTICAS EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

PRIMERA SESION: DIGESTION CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

1. Diluya 30 µg de DNA de alto peso molecular en 900 µl con Tris-Cl (pH 8.0) y adicionar 100 µl del buffer 10x de la enzima de restricción respectiva.
2. Use una punta para mezclar la solución lentamente. Esta mezcla asegura que el DNA se distribuya uniformemente en el buffer.
3. Después de mezclar, almacenar la dilución por una hora a temperatura ambiente para permitir la completa dilución.

NOTA: Si la concentración del DNA es bajo, se debe aumentar el volumen de la reacción y concentrar el DNA después de la digestión por precipitación con etanol. Esta aproximación minimiza la posibilidad de degradación del DNA que puede ocurrir si el DNA se concentra antes de la digestión. Cada reacción piloto debe contener al menos 1 µg de DNA que permite obtener fragmentos de restricción visualizables con bromuro de etidio.

4. Marque una serie de tubos para microcentrifuga de 1 a 10. Transfiera 60 µl de la solución de DNA al tubo 1. Transfiera 30 µl de la solución de DNA a cada uno de los nueve tubos restantes. Colocar los tubos en hielo.

4.1. Adicione 2 unidades de la enzima de restricción apropiada al tubo 1 y mezcle con un punta estéril. No permita que la temperatura de la reacción suba de 4°C.

4.2. Use una punta nueva para transferir 30 µl de la reacción del tubo 1 al siguiente tubo en la serie. Mezcle como en el punto anterior, y continúe transfiriendo la reacción en los tubos sucesivos. No adicione nada en el tubo 10 (tubo control), pero descarte 30 µl del noveno tubo.

4.3. Incube las reacciones por 1 hora a 37°C.

4.4. Inactive la enzima de restricción por calentamiento a 70°C por 15 min. Para algunas enzimas, es necesario calentar a 80°C por 20 min. Revisar la documentación del producto en la página Web de la empresa productora.

4.5. Enfríe las reacciones a temperatura ambiente y adicionar el buffer de carga (sacarosa). Usar el capilar para mezclar las soluciones suavemente.

SEGUNDA SESIÓN: VERIFICACIÓN ELECTROFORÉTICA

1. Coloque las reacciones con el buffer en un gel de agarosa al 0,6%. El buffer de corrida debe ser el mismo que se uso para la elaboración del gel. Este debe ser corrido en condiciones de máxima resolución: lentamente menos de 1 V/cm a 4°C para evitar la generación de manchas de los fragmentos durante el corrido.

NOTA: Puede ocurrir que la reacción no se vaya al fondo del pozo, esto suele ocurrir con DNA de alto peso molecular. Para minimizar el problema disuelva bien la reacción con el buffer de carga y adicione la mezcla lentamente en el pozo, después de cargar el gel, permita que el DNA por su peso pueda difundir hasta el fondo de la celda.

Recuerde que después de la digestión parcial con enzimas de restricción, no debería haber DNA de bajo peso molecular detectable en la preparación. Con el incremento del tiempo de digestión o las cantidades de enzima de restricción, no debería haber material residual en la parte de arriba del gel y ningún signo de una fracción de DNA resistente a la digestión.

E. PREGUNTAS PARA LA ELABORACIÓN DEL INFORME.

Apartado	Cuestionamientos
Materiales y métodos	¿Cuál es el objetivo de realizar varias diluciones de la mezcla ADN y enzima de restricción? ¿Por qué debe correrse el gel de verificación muy lentamente? ¿Cómo lo relaciona con la velocidad de corrida en la verificación electroforética de la amplificación de ADN de la práctica pasada?
Resultados	¿Cuáles son las características que deben observarse en el gel respecto a las bandas producto de una completa digestión del ADN? ¿Por qué razones puede presentarse una mancha en la parte inferior del gel? ¿Cuál sería el procedimiento para eliminar este problema?
Discusión	¿Cuáles son las condiciones que debe tener el ADN para que se realice una digestión completa?

F. BIBLIOGRAFÍA

MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL, Russell, David and Sambrook, Joseph, CSHL PRESS Edit. 3ª edición. Volumen I, II, III.

Título de la práctica _____ Fecha _____
Nombre: _____ Código _____

G. ACTIVIDADES PREVIAS

1. Dibuja las fases más importantes del proceso de digestión parcial de ADN con enzimas de restricción.

2. Consulta por qué se requiere la digestión con enzimas de restricción para desarrollar librerías de ADN genómico y para evaluar la variabilidad genética.



Título de la práctica _____ Fecha _____
Nombre: _____ Código _____

H. REGISTRO DE RESULTADOS

1. Incluye una imagen del gel de agarosa y verifique si el amplificado obtenido corresponde al esperado de acuerdo al tamaño en pares de bases.
2. Marca cada una de los pozos teniendo en cuenta el producto de digestión que se depositó en cada uno de ellos. Escribe cuál es el tamaño en pares de bases de toda la escalera de peso molecular.
3. Compare el tamaño del DNA eucariótico digerido con el DNA de oligómeros de bacteriófago λ . E identifique las condiciones de la digestión parcial donde se obtuvo la mayor cantidad de DNA en el rango de tamaño deseado.