

**MEMORIA ACADÉMICA**  
**Proyecto de Innovación Docente**  
Curso 2019-2020

**ELABORACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UN NUEVO  
PROGRAMA DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO PARA UNA  
ASIGNATURA DE GRADO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**  
**Código: ID2019/191**

Profesora coordinadora: Mercedes Dosil Castro  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Universidad de Salamanca  
mdosil@usal.es

Junio 2020

# 1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROYECTO

Este proyecto surgió de la necesidad de elaborar un programa nuevo de prácticas de laboratorio para Bioquímica II, una asignatura básica que se imparte en el segundo curso del grado en Farmacia de la Universidad de Salamanca. Los contenidos de esta asignatura se modificaron completamente en el curso 2018-19 como consecuencia de un plan de actualización y mejora de la docencia de las asignaturas de Bioquímica en Farmacia. La nueva asignatura incluye diez horas de trabajo de laboratorio para aprender técnicas de Biología Molecular, y esto requería la elaboración de un programa nuevo de prácticas. La propuesta que se planteó, y que se recogió en este proyecto de innovación docente (PID), fue la de elaborar un programa en el que se aprendieran técnicas moleculares de uso multidisciplinar mediante sesiones de prácticas interrelacionadas.

La profesora encargada de la asignatura, Mercedes Dosil Castro, estableció varias premisas para la elaboración del programa de prácticas. Tenía que:

- Enseñar de forma práctica técnicas básicas de Biología Molecular a los estudiantes de Farmacia.
- Seguir un esquema de prácticas consecutivas interrelacionadas en las que se utilizaran los resultados de una práctica para realizar otra. Este tipo de programas no se suelen impartir en las asignaturas con muchos estudiantes por la falta de recursos económicos, tiempo y espacio de laboratorio. Por ello, el programa debía maximizar recursos y tiempo para poder impartirlo, con garantías de calidad, a los aproximadamente 180 estudiantes que cursan las prácticas de Bioquímica II cada año.
- Permitir entrenar a los estudiantes en el razonamiento crítico e integración de información.
- Ser una actividad de grupo pequeño de alta calidad formativa. Debía ser un esquema riguroso de aprendizaje de técnicas basado en la transmisión directa de los conocimientos del profesor al estudiante.

Los objetivos concretos planteados en el PID fueron dos:

1. Elaborar e implementar un programa de prácticas de laboratorio integradas con las que, a la vez que adquieren habilidades técnicas, los estudiantes entiendan el valor de los resultados obtenidos y su aplicabilidad. Para ello era necesario: (i) diseñar la estructura y contenidos del programa, (ii) poner a punto los procedimientos para cada sesión, (iii) elaborar el material didáctico necesario, y (iv) impartir las prácticas a los estudiantes.
2. Evaluar el éxito del programa analizando la facilidad para su impartición, la adquisición de conocimientos por los estudiantes, y las ventajas respecto a programas de prácticas aisladas.

## **2. EJECUCIÓN DEL PROYECTO**

En el proyecto participaron los cinco miembros del equipo que figuraban en la propuesta original: la coordinadora, Mercedes Dosil Castro, y cuatro investigadores predoctorales que realizan sus tesis en temas del área de Bioquímica y Biología Molecular. Estos investigadores son: Laura Clavaín Mateo, contratada predoctoral de la AECC y estudiante de doctorado de tercer año del Programa de Doctorado en Biociencias de la USAL; Rubén Fernández Caloto, contratado FPI y estudiante de doctorado de tercer año del mismo programa; Sonia Gómez Gaspar, contratada FPU y estudiante de doctorado de tercer año del mismo programa, y Natalia Fernández Parejo, contratada predoctoral FPU y estudiante de doctorado de segundo año del mismo programa.

### **TAREAS REALIZADAS PARA LA CONSECUCCIÓN DEL OBJETIVO 1**

#### **1. Diseño de la estructura y contenidos del programa.**

La coordinadora del proyecto diseñó la estructura y contenidos de un programa que tiene las siguientes características:

- Son prácticas diseñadas para que los estudiantes: (i) aprendan a realizar por ellos mismos técnicas actuales de Biología Molecular de uso extendido y aplicabilidad multidisciplinaria, (ii) aprendan conceptos bioquímicos esenciales a través del trabajo experimental, (iii) conozcan cómo se interpretan y relacionan los resultados experimentales obtenidos por distintas técnicas
- Son técnicas relacionadas entre sí, utilizadas en análisis rutinarios de ácidos nucleicos, que permiten la obtención de datos concretos para que el estudiante los analice, presente y discuta en un informe.
- Son técnicas que se pueden realizar en el esquema temporal planificado desde la Facultad de Farmacia para la asignatura de Bioquímica II: tres sesiones de laboratorio de 3 horas y 20 minutos en tres días consecutivos. Se puedan realizar con el equipamiento y espacio de los laboratorios docentes de Bioquímica.

Las técnicas seleccionadas fueron las siguientes: transformación de bacterias con plásmidos, preparación de DNAs de plásmidos, cuantificación y análisis de pureza de preparaciones de DNA, digestiones simples y combinadas con enzimas de restricción y análisis electroforético de fragmentos de DNA.

En relación con la organización, las técnicas se realizan en tres sesiones y están enmarcadas en tres procedimientos experimentales: (i) preparación de DNA de un plásmido bacteriano; (ii) transformación bacteriana con un plásmido; y (iii) análisis de restricción de un plásmido. El esquema temporal de las tres sesiones es el siguiente:

|              | <b>1. Preparación de DNA de un plásmido bacteriano</b>                                                                                                                                                                                            | <b>2. Transformación bacteriana con un plásmido</b>                                                                                                                                   | <b>3. Análisis de restricción de un plásmido</b>                                                                                                          |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Día 1</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Preparación del DNA</li> <li>- Cuantificación del DNA</li> <li>- Dilución y toma de muestra para análisis por electroforesis.</li> </ul> Almacenamiento de la preparación y de la muestra en congelador. |                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                           |
| <b>Día 2</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilizar el plásmido para la práctica 2</li> </ul>                                                                                                                                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Transformación de bacterias con el plásmido preparado en la práctica 1</li> <li>- Siembra en placa de las bacterias transformadas</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Digestiones del plásmido con enzimas de restricción.</li> </ul> Almacenamiento de las digestiones en congelador. |
| <b>Día 3</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Análisis de la muestra de DNA por electroforesis en gel de agarosa (en el mismo gel utilizado para las muestras de la práctica 3)</li> </ul>                                                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Recuento de colonias y cálculo de la eficiencia de transformación</li> </ul>                                                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Preparación de gel de agarosa y análisis electroforético de las digestiones del plásmido.</li> </ul>             |

Como actividad final, los estudiantes deben entregar un informe escrito con el análisis y discusión de los datos obtenidos.

Además de los protocolos y organización de las prácticas, también se hizo una planificación de todo el material y reactivos que hay que preparar con anticipación al inicio de las sesiones, el material que tiene que haber en cada puesto cada uno de los tres días, y cómo eso debe hacerse con los recursos disponibles.

## **2. Puesta a punto de los procedimientos a realizar en cada práctica.**

Se evaluó la conveniencia, facilidad de impartición y extensión de las actividades de cada sesión del programa. Para ello, los miembros del equipo realizaron las prácticas en las mismas condiciones en las que las harían los alumnos y pusieron a punto los procedimientos para que el aprovechamiento del tiempo y funcionamiento de las técnicas fuesen óptimos. En esta puesta a punto participaron todos los miembros del equipo.

### **3. Elaboración del material didáctico.**

Para poder impartir las prácticas es necesario que los estudiantes tengan información adecuada sobre los fundamentos de las técnicas, los pasos de los procedimientos, el modo en que hay que obtener y analizar los resultados, y las directrices para realizar el informe final con el análisis y la discusión de los datos. Por ello, se elaboró un manual de prácticas con las normas, guiones, indicaciones para la elaboración de los informes y criterios de evaluación. Es un manual detallado (17 páginas) que incluye los siguientes apartados:

1. Información general y normas
2. Esquema temporal de las prácticas
3. Repaso del manejo de las micropipetas automáticas
4. Práctica 1. Preparación de DNA de un plásmido
5. Práctica 2. Transformación bacteriana
6. Práctica 3. Análisis de un plásmido con enzimas de restricción
7. Cómo elaborar los informes
8. Fecha y lugar de entrega de informes
9. Criterios de evaluación

El manual fue elaborado por todos los miembros de equipo. Mercedes Dosil se encargó de la planificación general (selección de apartados y contenidos), de escribir los apartados 1-3 y 7-9, y de coordinar a los otros miembros, los cuales se encargaron de escribir los apartados 4-6. Al final de esta memoria, en el anexo I, se incluyen algunas partes del manual ilustrativas de su contenido.

### **4. Impartición del programa.**

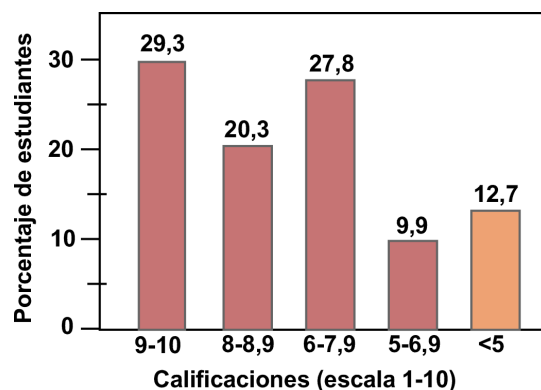
El programa se impartió en tres sesiones consecutivas a grupos de 12-14 estudiantes, a lo largo de siete semanas, entre los meses de septiembre y noviembre de 2019. No hubo incidencias importantes, salvo algunos cambios menores en los pasos de uno de los procedimientos, que se introdujeron para mejorar el éxito en la obtención de los resultados.

## **TAREAS REALIZADAS PARA LA CONSECUCCIÓN DEL OBJETIVO 2**

### **5. Evaluación de la adecuación de los procedimientos y del aprendizaje.**

Se comprobó que el diseño de todas las prácticas es muy bueno. Se pueden impartir adecuadamente en el tiempo y con los materiales disponibles. El porcentaje de éxito, medido como porcentaje de estudiantes que consiguen realizar la técnica correctamente y obtener datos y resultados para su análisis, fue del 69%. El fracaso no se debió a fallos en el diseño del programa, sino a errores por falta de atención o equivocaciones no intencionadas de los estudiantes.

Las calificaciones de los informes de prácticas se muestran en la siguiente gráfica:



El alto porcentaje de buenas calificaciones indica que la mayoría de los estudiantes entendieron el propósito de las técnicas y supieron presentar, analizar y discutir los datos obtenidos.

El afianzamiento de conceptos y capacidad de relación con otras partes de la asignatura se evaluó mediante 10 preguntas, relacionadas con las prácticas, en los exámenes ordinario y extraordinario de la asignatura. El porcentaje de estudiantes que superaron esa parte del examen (62,5%) fue muy similar al de aprobados de la parte teórica (60,4%). Esto indica que el programa práctico es adecuado para el aprendizaje de conceptos bioquímicos, y que los estudiantes con capacidad para aprobar la parte teórica también son capaces de adquirir conocimientos a través del trabajo práctico.

En el proyecto estaba previsto realizar evaluaciones comparativas con los programas prácticos de las asignaturas Bioquímica I y Bioquímica III, que se cursan en los cuatrimestres anterior y posterior. Esto no fue posible porque las prácticas de Bioquímica III no pudieron realizarse debido a la pandemia de Covid-19.

### **3. VALORACIÓN GLOBAL DEL PROYECTO**

El proyecto se ha realizado con éxito. Se ha confeccionado un programa con prácticas de laboratorio bien diseñadas, que incluye técnicas que funcionan en el contexto de un laboratorio docente y que permite la obtención de datos para su análisis y discusión por los estudiantes. Las evaluaciones realizadas hasta ahora indican que el grado de comprensión de las técnicas es alto y que los estudiantes adquieren conocimientos bioquímicos teóricos y prácticos, y habilidades básicas de presentación y discusión de resultados experimentales.

El funcionamiento del equipo de trabajo ha sido excelente, tanto a la hora de diseñar el programa y confeccionar el manual, como en la impartición de las sesiones y evaluación de los resultados.

El grado de satisfacción del profesorado en el primer curso de impartición del programa es muy alto. En el próximo curso se evaluará el grado de satisfacción de los estudiantes.

### **4. ANEXO. Extractos del manual de prácticas de Bioquímica II del grado en Farmacia (curso 2019-20)**

## **NORMAS, GUIONES, INDICACIONES PARA LA ELABORACIÓN DE LOS INFORMES Y CRITERIOS DE EVALUACIÓN**

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Información general y normas.....                                    | 2  |
| 2. Esquema temporal de las prácticas.....                               | 3  |
| 3. Repaso del manejo de las micropipetas automáticas.....               | 4  |
| 4. Práctica 1. Preparación de DNA de un plásmido.....                   | 5  |
| 5. Práctica 2. Transformación bacteriana.....                           | 9  |
| 6. Práctica 3. Digestión de un plásmido con enzimas de restricción..... | 11 |
| 7. Cómo elaborar los informes.....                                      | 16 |
| 8. Fecha y lugar de entrega de informes.....                            | 17 |
| 9. Criterios de evaluación.....                                         | 17 |

## 1. INFORMACIÓN GENERAL Y NORMAS

### Lugar, hora y fechas de realización de las prácticas

- Edificio Departamental, laboratorio B10
- 8:30 de la mañana
- Cada grupo tiene que ir tres días consecutivos  
(las fechas están publicadas con las listas de grupos)

### Material que hay que llevar

- bata de laboratorio
- guiones de prácticas
- papel y bolígrafo
- rotulador permanente para plástico

### Recomendaciones y normas

- Antes de hacer las prácticas, leer las indicaciones que se indican más abajo de **cómo deben confeccionarse los informes** para saber qué información hay que recopilar durante las mismas.
- Visualizar en el esquema temporal cuántos días se emplean para cada procedimiento y qué parte del mismo se está realizando cada día.
- Leer con detenimiento los guiones en los que se indican los pasos a realizar.
- Normas básicas de seguridad en el laboratorio:
  - Está prohibido comer o beber
  - Se debe llevar siempre puesta la bata
  - El pelo largo tiene que llevarse recogido
  - Hay que cerrar bien las tapas de los frascos y botellas que contienen las disoluciones
  - Hay que cerrar bien los tubos antes de las incubaciones y centrifugaciones
  - El material y soluciones se deben desechar en los contenedores habilitados para ello
  - Antes de hacer algo, si no se está seguro, se debe preguntar al profesor

## 2. ESQUEMA TEMPORAL DE LAS PRÁCTICAS

|              | 1. Preparación de DNA de un plásmido bacteriano                                                                                                                                                                                               | 2. Transformación bacteriana con un plásmido                                                                                                                                       | 3. Análisis de restricción de un plásmido                                                                                                               |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Día 1</b> | <ul style="list-style-type: none"><li>- Preparación del DNA</li><li>- Cuantificación del DNA</li><li>- Dilución y toma de muestra para análisis por electroforesis.</li></ul> Almacenamiento de la preparación y de la muestra en congelador. |                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                         |
| <b>Día 2</b> | <ul style="list-style-type: none"><li>- Utilizar el plásmido para la práctica 2</li></ul>                                                                                                                                                     | <ul style="list-style-type: none"><li>- Transformación de bacterias con el plásmido preparado en la práctica 1</li><li>- Siembra en placa de las bacterias transformadas</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>- Digestiones del plásmido con enzimas de restricción.</li></ul> Almacenamiento de las digestiones en congelador. |
| <b>Día 3</b> | <ul style="list-style-type: none"><li>- Análisis de la muestra de DNA por electroforesis en gel de agarosa (en el mismo gel utilizado para las muestras de la práctica 3)</li></ul>                                                           | <ul style="list-style-type: none"><li>- Recuento de colonias y cálculo de la eficiencia de transformación</li></ul>                                                                | <ul style="list-style-type: none"><li>- Preparación de gel de agarosa y análisis electroforético de las digestiones del plásmido.</li></ul>             |

## **PRÁCTICA 1. PREPARACIÓN DE DNA DE UN PLÁSMIDO BACTERIANO**

### **Objetivos**

- 1.- Familiarizarse con el manejo de cultivos bacterianos.
- 2.- Aprender a aislar y purificar DNA de un plásmido utilizando un “kit” comercial.
- 3.- Aprender a determinar la concentración y pureza del DNA aislado mediante espectrofotometría.
- 4.- Aprender a hacer diluciones de muestras de DNA y su correcta conservación.
- 5.- Aprender a analizar las diferentes formas del DNA plasmídico, en función de sus pesos moleculares, mediante electroforesis en gel de agarosa (día 3).

### **A. INTRODUCCIÓN**

Los plásmidos son moléculas circulares de DNA extracromosómico y de pequeño tamaño (1-200 kb) presentes naturalmente en varias especies de bacterias. Se replican de forma independiente del DNA cromosómico bacteriano, ya que tienen su propio origen de replicación. Los plásmidos han resultado muy útiles en técnicas de ingeniería genética (o clonación molecular) ya que permiten amplificar el fragmento de DNA de interés de manera eficaz, puesto que éste es replicado con el resto del plásmido.

#### **Aislamiento y purificación de DNA de un plásmido**

En esta práctica se preparará el DNA de un plásmido utilizando un kit comercial. Las bacterias son resuspendidas en una solución isotónica con EDTA (**Solución R**). Posteriormente, se añade un tampón de lisis alcalino que contiene 0,2 N NaOH y 1% SDS (detergente) (**Solución L**). El SDS lisa las células y desnaturaliza las proteínas y el NaOH desnaturaliza el DNA genómico, el DNA plasmídico y proteínas. Seguidamente el lisado resultante es neutralizado, utilizando una disolución con 3M KOAc (pH 6,0) (**Solución N**). en esto se renaturaliza el DNA plasmídico pero no el cromosómico, el cual precipita. Tras una centrifugación, el DNA plasmídico se mantiene en la fracción acuosa. El sobrenadante es cargado en columnas con una matriz de sílice que tiene una elevada afinidad por el DNA. Seguidamente, la matriz se lava (**Solución W**) para retirar contaminantes y, finalmente, el DNA es eluido en un pequeño volumen de H<sub>2</sub>O estéril.

#### **Cuantificación del DNA**

Para garantizar buenos resultados en ensayos posteriores es muy importante la correcta cuantificación y determinación de la pureza de las preparaciones. Para ello existen diferentes métodos. En esta práctica usaremos la espectrofotometría para ambas determinaciones. Un espectrofotómetro es un equipo que cuantifica la luz que pasa a través de una muestra a una longitud de onda determinada. La cantidad de luz absorbida por una solución es proporcional a la concentración del soluto presente. Las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos absorben luz de una longitud de onda de 260 nm. La relación entre la concentración de una disolución pura de DNA y su absorbancia a 260 nm es la siguiente

$$A_{260} \text{ (unidad de absorbancia a 260 nm)} = 50 \mu\text{g/ml de DNA de doble cadena.}$$

Esta relación se cumple con preparaciones puras de DNA. Si la preparación está contaminada con proteínas y con RNA, la medida de concentración obtenida mediante A<sub>260</sub> será una

## **B. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### MATERIAL

- Hielo
- Tres placas Petri con LB+ampicilina+agar
- Medio líquido LB
- Tubo Eppendorf con bacterias competentes
- Tubos con las dos alícuotas de 1 µl (muestra T1) y 2 µl (muestra T2) preparadas en la práctica 1
- Tubos Eppendorf para las transformaciones
- Tres pipetas de 5 ml para sembrar las bacterias
- Micropipetas P20 y P200
- Puntas amarillas estériles
- Baño termostático a 42°C

### PROTOCOLO

| PASO | PROCEDIMIENTO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1    | Descongela las bacterias competentes en hielo. (IMPORTANTE: las bacterias competentes se almacenan a -80°C y DEBEN DESCONGELARSE EN HIELO DE MANERA NATURAL para no afectar su viabilidad).                                                                                                                                                                                                                                     |
| 2    | Mientras se descongelan las células (8-10 minutos), mantén también en hielo los tubos con las alícuotas de 1 µl (T1) y 2 µl (T2) que preparaste ayer tras la purificación del DNA del plásmido (Práctica 1). Prepara otro tubo (rotúlalo como T3) que no contendrá DNA y nos servirá como control negativo.                                                                                                                     |
| 3    | Una vez descongeladas, añade <b>40 µl de las células competentes</b> a cada tubo Eppendorf (3 en total) debidamente rotulado y previamente enfriado.                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 4    | Incuba los tubos en hielo durante <b>20 minutos</b> .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 5    | Choque térmico. Introduce los tubos con las bacterias en el baño a <b>42°C EXACTAMENTE durante 45 segundos</b> . Es muy importante no superar este tiempo: las bacterias ya tienen sus membranas dañadas y sólo soportan la alta temperatura durante un intervalo corto de tiempo.                                                                                                                                              |
| 6    | Pasa los tubos directamente del baño al hielo. Deben enfriarse rápidamente. Dejarlos al menos 2 minutos antes de sembrar.                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 7    | Añade <b>100 µl de LB</b> a cada tubo y siembra los 140 µl en la placa. Para ello, extiende todo el volumen usando la punta de la pipeta de 5 ml. Para ello, posicónala en paralelo a la placa y muévela por toda la superficie, de manera que el cultivo quede repartido de manera homogénea por toda la placa.                                                                                                                |
| 8    | Lleva las placas al incubador de 37°C y déjalas allí hasta mañana.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 9    | Al día siguiente, cuenta las colonias en las dos placas para calcular la eficiencia de la transformación (número de colonias por µg de DNA utilizado). Para eso tienes que tener en cuenta las cantidades de DNA que había en las muestras T1 y T2, que puedes calcular a partir del dato de concentración de la preparación. Puedes hacerle una foto a las placas y contar las colonias más tarde, cuando elabores el informe. |

## PRÁCTICA 3. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE UN PLÁSMIDO

### Objetivos

- 1.- Aprender a digerir plásmidos con enzimas de restricción.
- 2.- Aprender a separar fragmentos de DNA mediante electroforesis en geles de agarosa.
- 3.- Aprender a interpretar y confeccionar mapas de restricción.

### A. INTRODUCCIÓN

Una herramienta utilizada clásicamente en ingeniería genética para clonar fragmentos de DNA son las enzimas de restricción. Existen varios tipos de enzimas de restricción, aunque la mayoría son endonucleasas que reconocen secuencias específicas de nucleótidos en moléculas de DNA de doble cadena y las cortan generando extremos de cadena sencilla con secuencias complementarias. Si se digieren un plásmido y un fragmento de DNA con las mismas enzimas de restricción, los extremos complementarios permiten unir el DNA del fragmento al del plásmido utilizando una enzima (ligasa de DNA). A esta técnica se le conoce como clonación molecular.

Otra de las aplicaciones de las enzimas de restricción es la caracterización de secuencias de DNA en base al número y posición de sus sitios de corte. Un mapa de restricción es un diagrama en el que se indica la posición de los lugares de corte de una enzima o enzimas de restricción en un fragmento de DNA (ejemplos de estos mapas se muestran al final de la práctica).

Para más información, visitar el enlace: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/modal/a/restriction-enzymes-dna-ligase>

En esta práctica se realizará el análisis de restricción del plásmido aislado el primer día. Cada alumno tendrá un plásmido (el mismo que ha preparado el primer día), que en este punto de la práctica es denominado como A B o C. Será uno de los siguientes:

- Plásmido pFA6a-HIS3MX6
- Plásmido pFA6a-kanMX6-pGAL1
- Plásmido pFA6a-13Myc-HIS3Mx6

Cada plásmido será digerido con las siguientes enzimas:

- EcoRI
- HindIII
- EcoRI + HindIII

Tras realizar el análisis de restricción, el alumno tendrá que identificar qué plásmido pFA6a se ha digerido. Para ello necesitará consultar los mapas de restricción que se facilitan al final de la práctica.

### Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Como se indicó en la práctica 1, la electroforesis de DNA se utiliza para separar fragmentos de DNA de diferentes tamaños.

La electroforesis se realiza en presencia de un tampón con un pH alcalino, en el cual los ácidos nucleicos tienen carga negativa. Cuando se aplica una corriente eléctrica sobre el gel, éstos se desplazan del polo negativo (cátodo) al polo positivo (ánodo). Los geles de agarosa se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y de su forma. Dependiendo de la concentración de agarosa del gel, el tamaño del poro varía. La distancia recorrida por cada fragmento es inversamente proporcional al

logaritmo de su peso molecular. Existen marcadores de tamaño molecular conocido que permiten calcular los tamaños de los fragmentos de DNA presentes en una muestra. En el caso de los geles de agarosa, el DNA se tiñe con un compuesto fluorescente que se puede visualizar con luz UV. Tradicionalmente se usaba el bromuro de etidio, una sustancia que se intercala entre las bases del DNA y que es mutagénica. Actualmente se utilizan otras alternativas menos tóxicas, como es el caso del RedSafe, el reactivo de tinción que utilizaremos en esta práctica.

## B. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 1. DIGESTIÓN DE DNA PLASMÍDICO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (DÍA 2)

#### MATERIAL Y EQUIPO:

Plásmido a digerir (el mismo que en la práctica 1). Se facilita una preparación que está a 0,4 µg/ µl.

Tampones de enzimas de restricción

Enzimas de restricción

H<sub>2</sub>O estéril

Muestra E preparada en la práctica 1

Puntas de pipeta amarillas

Tubos eppendorf (1.5 ml)

Micropipetas automáticas

Microcentrífuga

Baño termostático a 37°C

Para cada una de las reacciones se dispondrá de:

- un tubo con una disolución del plásmido a una concentración de 0,4 µg/ml (preparada anteriormente por personal encargado de organizar las prácticas)
- un tubo con la mezcla de reacción: el tampón de reacción y la enzima (o enzimas) (la enzima y tampón correspondiente son comerciales)

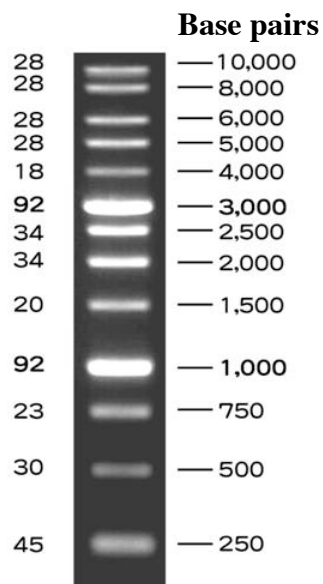
#### PROTOCOLO

| PASO                                 | PROCEDIMIENTO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |       |       |       |      |   |          |      |      |      |      |                  |       |    |    |    |                        |    |       |    |    |                          |    |    |       |    |                                      |    |    |    |       |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|------|---|----------|------|------|------|------|------------------|-------|----|----|----|------------------------|----|-------|----|----|--------------------------|----|----|-------|----|--------------------------------------|----|----|----|-------|
| 1                                    | Marca 4 tubos Eppendorf del 1 al 4.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |       |       |       |      |   |          |      |      |      |      |                  |       |    |    |    |                        |    |       |    |    |                          |    |    |       |    |                                      |    |    |    |       |
| 2                                    | En cada tubo pipetea <b>2 µl</b> de plásmido y <b>10 µl</b> de cada mezcla de reacción, tal y como se indica en la siguiente tabla (¡¡OJO!! Hay que cambiar la punta de la pipeta cada vez que se pipetea algo).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |       |       |       |      |   |          |      |      |      |      |                  |       |    |    |    |                        |    |       |    |    |                          |    |    |       |    |                                      |    |    |    |       |
|                                      | <table><tr><th>Tubos</th><th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th></tr><tr><td>Plásmido</td><td>2 µl</td><td>2 µl</td><td>2 µl</td><td>2 µl</td></tr><tr><td>H<sub>2</sub>O</td><td>10 µl</td><td>--</td><td>--</td><td>--</td></tr><tr><td>Mezcla de enzima EcoRI</td><td>--</td><td>10 µl</td><td>--</td><td>--</td></tr><tr><td>Mezcla de enzima HindIII</td><td>--</td><td>--</td><td>10 µl</td><td>--</td></tr><tr><td>Mezcla de enzimas<br/>EcoRI + HindIII</td><td>--</td><td>--</td><td>--</td><td>10 µl</td></tr></table> | Tubos | 1     | 2     | 3    | 4 | Plásmido | 2 µl | 2 µl | 2 µl | 2 µl | H <sub>2</sub> O | 10 µl | -- | -- | -- | Mezcla de enzima EcoRI | -- | 10 µl | -- | -- | Mezcla de enzima HindIII | -- | -- | 10 µl | -- | Mezcla de enzimas<br>EcoRI + HindIII | -- | -- | -- | 10 µl |
|                                      | Tubos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 1     | 2     | 3     | 4    |   |          |      |      |      |      |                  |       |    |    |    |                        |    |       |    |    |                          |    |    |       |    |                                      |    |    |    |       |
|                                      | Plásmido                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 2 µl  | 2 µl  | 2 µl  | 2 µl |   |          |      |      |      |      |                  |       |    |    |    |                        |    |       |    |    |                          |    |    |       |    |                                      |    |    |    |       |
|                                      | H <sub>2</sub> O                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 10 µl | --    | --    | --   |   |          |      |      |      |      |                  |       |    |    |    |                        |    |       |    |    |                          |    |    |       |    |                                      |    |    |    |       |
|                                      | Mezcla de enzima EcoRI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | --    | 10 µl | --    | --   |   |          |      |      |      |      |                  |       |    |    |    |                        |    |       |    |    |                          |    |    |       |    |                                      |    |    |    |       |
|                                      | Mezcla de enzima HindIII                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | --    | --    | 10 µl | --   |   |          |      |      |      |      |                  |       |    |    |    |                        |    |       |    |    |                          |    |    |       |    |                                      |    |    |    |       |
| Mezcla de enzimas<br>EcoRI + HindIII | --                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | --    | --    | 10 µl |      |   |          |      |      |      |      |                  |       |    |    |    |                        |    |       |    |    |                          |    |    |       |    |                                      |    |    |    |       |

**Mapas de restricción de los plásmidos que vamos a utilizar:**



**Marcador de peso molecular que vamos a utilizar:**  
**1Kb DNA ladder**



## 7. CÓMO ELABORAR LOS INFORMES

- Los informes son individuales. Cada estudiante debe describir y discutir sus resultados.
- Hay que hacer un informe corto (no más de 3 hojas) para cada una de las prácticas. Deben escribirse a mano. No a ordenador. Los tres informes deben entregarse de forma conjunta en la Consejería del Centro de Investigación del Cáncer. Se debe incluir una primera hoja identificativa en la que figure lo siguiente:
  - INFORMES DE PRÁCTICAS DE BIOQUÍMICA II
  - GRADO EN FARMACIA
  - CURSO 2019-20
  - Profesora: Mercedes Dosil
  - Nombre del estudiante
- El informe de cada práctica debe contener los siguientes apartados:
  - OBJETIVOS. Se deben describir en dos o tres frases qué es lo que se hizo en cada práctica y para qué se hizo.
  - MATERIALES Y MÉTODOS. Aquí se deben describir las incidencias, desviaciones o adaptaciones realizadas en cuanto a equipos y protocolos con respecto a los indicados en el guion de la práctica. Si no ha habido ningún cambio, se escribirá simplemente que se realizaron las técnicas siguiendo los protocolos propuestos.
  - RESULTADOS. Deben presentarse los resultados obtenidos en cada práctica indicando los cálculos realizados y, en su caso, adjuntando las fotografías de geles o placas.
  - DISCUSIÓN. En este apartado deben incluirse las interpretaciones o conclusiones que se deducen de los resultados obtenidos. En su caso, se deben comentar cuáles eran los resultados esperados y se discutirá por qué se obtuvieron o por qué no. Esto no es un resumen de todo el experimento, sólo una discusión de los resultados finales.

Directrices adicionales sobre el informe de Resultados y Discusión para cada práctica:

### **Práctica 1.**

*Resultados.* Poner en el informe qué plásmido preparásteis (A, B o C), las medidas de concentración del DNA, la estimación de la pureza y una foto del gel de agarosa (del día 3) en el que se vea bien la muestra del DNA preparado por el estudiante y la muestra de plásmido, de cantidad conocida, que se le facilitó para las digestiones el día 2 (tubo 1).

*Discusión.* Hay que discutir si la preparación de DNA es pura, si el tamaño se corresponde con el esperado, y si la estimación de la cantidad de DNA parece correcta en función del análisis por electroforesis.

### **Práctica 2.**

*Resultados.* Poner el recuento de colonias y el cálculo de la eficiencia de transformación.

*Discusión.* Comentar si los resultados de los números de colonias en cada placa son coherentes con las cantidades de plásmido en cada transformación. Si no es así, discutir por qué ha podido ser y si el resultado de alguna de las transformaciones parece más fiable que el de las otras. Teniendo en cuenta los datos utilizados para estimar la concentración de DNA de la práctica 1, discutir si el cálculo de la eficiencia de transformación es fiable o si, por el contrario, está sobreestimado o infraestimado.