



# MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA





## I. CONTENIDO

La biotecnología en su definición más amplia, incluye la idea del uso de organismos biológicos con la finalidad de facilitar o mejorar la obtención de productos derivados de ellos, podríamos decir que ésta ha acompañado al hombre desde los inicios de la civilización y que ha alcanzado a diversas áreas de interés humano como son los alimentos, la medicina, procesos industriales, la agricultura y la medicina veterinaria y la zootecnia. Por lo que el presente manual de prácticas pretende dar al alumno un panorama general de algunos de los aspectos más relevantes de la biotecnología que tienen un impacto en el área del conocimiento profesional de un Médico Veterinario Zootecnista, en algunas áreas tales como la biología molecular, inmunología, la reproducción y producción animal. Así como, los aspectos bioéticos esenciales en la manipulación y manejo sanitario de los animales de laboratorio. El manual está diseñado en cuanto a las unidades de competencia que se abordaran en cada práctica.





## II. ESTRUCTURA DEL MANUAL

### ÍNDICE

I. CONTENIDO.....	I-2
II. ESTRUCTURA DEL MANUAL .....	II-3
III. PRÁCTICAS.....	III-4
PRÁCTICA No. 1: ELECTROFORESIS DE ADN .....	III-4
PRÁCTICA No. 2: SIMULACIÓN DE UNA AMPLIFICACIÓN DE ADN .....	III-7
PRÁCTICA No. 3: TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS.....	III-10
PRÁCTICA No.4: CITOMETRÍA DE FLUJO.....	III-14
PRÁCTICA No. 5: ULTRASONIDO.....	III-17
PRÁCTICA No. 6: CONGELACIÓN DE SEMEN .....	III-20
IV. ACTUALIZACIÓN.....	IV-27





### III. PRÁCTICAS

#### **PRÁCTICA No. 1: ELECTROFORESIS DE ADN** **UNIDAD DE COMPETENCIA II, III**

##### **INTRODUCCIÓN:**

Una forma de visualización del ADN puro es a través un procedimiento llamado electroforesis y su tinción con bromuro de

etidio. Este procedimiento se realiza de manera rutinaria cuando a) se purifican plásmidos, b) después de la realización de PCR, c) cuando se realizan reacciones de restricción y en general cuando se quiere analizar el ADN. El ADN es capaz de desplazarse en gel de agarosa a través de gradientes de electroforesis lo cual separa los fragmentos de ADN de acuerdo a su peso molecular los cuales son fácilmente visibles cuando son teñidos con bromuro de etidio que es un agente intercalante (Altamente tóxico que debe manejarse con guantes desechables y desecharse en recipientes especiales) que fluoresce de color naranja amarillento cuando es iluminado con luz ultravioleta.

##### **OBJETIVO:**

- Apreciar la presencia de ADN en gel de agarosa.
- Identificar los diferentes pesos moleculares.
- Identificar el ADN en que peso molecular se encuentra.
- Desarrollar habilidades de biología molecular.





## **LUGAR DE REALIZACIÓN:**

Laboratorio de biología molecular, CIESA-FMVZ-UAEM

## **MATERIAL**

- ADN
- Marcador de Pesos Moleculares
- Tampón de carga de ADN (6x)
- Tampón Tris Borato EDTA (TBE)
- Gel de agarosa (0.7% en TBE)
- Cubeta de electroforesis
- Micropipetas y puntas

## **METODO**

1. Se descongelará en hielo el ADN.
2. Se mezclan en una gota el tampón de carga (1 ml) y el ADN (10ml).
3. Se arma el molde para geles de agarosa con las barreras en los extremos y el peine para formar pozos.
4. Se agrega agarosa (0.35g) al TBE (50 ml) en un matraz y se disuelve por calentamiento, se le agrega bromuro de etidio (2ml) y se vierte en el molde, se deja fraguar y se retiran el peine y las barreras.
5. Se le agrega TBE hasta cubrir el gel





6. Se colocará el ADN y los pesos moleculares (10ml) en el gel de agarosa en el primer pozo con una micropipeta y con punta para 200 ml
  
7. Agregar voltaje a la cubeta de electroforesis
  
8. Transcurrido 45 minutos, apagar la fuente de poder observar en el transluminador de luz UV en cuarto oscuro las bandas

visibles de ADN.

## **RESULTADOS**

El discente podrá confirmar los conocimientos adquiridos en el aula. La banda de ADN se observará en el peso molecular correspondiente.

## **EVALUACIÓN**

El criterio de evaluación será:

Uso adecuado del equipo de seguridad (bata, cubrebocas, guantes, reactivos y equipo)

Participación durante la realización de la práctica

Reporte de práctica





N

## **PRÁCTICA No. 2: SIMULACIÓN DE UNA AMPLIFICACIÓN DE ADN**

### **UNIDAD DE COMPETENCIA II, III**

#### **INTRODUCCIÓN:**

Para la amplificación de ADN, se requiere de tener información de la secuencia de interés, tamaño, localización, etc. Hoy en

día se cuenta con información gratuita en internet y programas de análisis de los que se puede disponer.

#### **OBJETIVO:**

- Identificar los medios electrónicos de información de biotecnología.
- Analizar con programas de biología molecular secuencia de ADN.
- Diseñar primers (oligonucleótidos).

#### **LUGAR DE REALIZACIÓN:**

Sala de cómputo, FMVZ-UAEM

#### **MATERIAL**

- Computadora
- Internet





## **METODO**

1. Buscar una secuencia de ADN en el gene bank
2. Identificar en ella el codón de inicio y de término
3. Diseñar manualmente primers forward y reverso

## **RESULTADOS**

El discente tendrá la capacidad de acceder al banco de información genética y analizar secuencias de ADN como herramienta de la biología molecular.

## **EVALUACIÓN**

Se evaluará con la presentación de un trabajo con la simulación completa.

## **CUESTIONARIO**

¿Qué es y cual es el codón de inicio?

1. ¿Qué es un primer?
2. ¿Cómo debe ser el primer reversa?
3. ¿Qué pasa si se corre el marco de lectura?
4. ¿Qué puede pasar si se cambia una base en las copias?

## **X. BIBLIOGRAFÍA**







**BÁSICA:**

- 

**COMPLEMENTARIA:**

- 

**REVISTAS:**

- 





## **UNIDAD DE COMPETENCIA II, III**

### **PRÁCTICA No. 3: TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS**

#### **INTRODUCCIÓN:**

La transformación de bacterias es la incorporación de una secuencia de ADN de interés a una bacteria. Las bacterias tienen una duplicación rápida, por lo que es un método de elección para obtener muchas copias de ADN en un tiempo reducido. El ADN, antes de la transformación, es introducido a un “vector” que es una secuencia conocida y tiene un factor de resistencia a algún antibiótico. Es decir, para diferenciar a las bacterias de las “transformadas” (aquellas que tienen el ADN de interés), se puede hacer con un medio de cultivo con antibiótico (medio selectivo) y de esta manera solo crecerán aquellas que fueron transformadas por tener el factor de resistencia.

#### **OBJETIVO:**

- Desarrollar las habilidades necesarias para transformar una bacteria.
- Comprobar la transformación de las bacterias.
- Conocer las ventajas de las herramientas de la biotecnología en la investigación.
- Realizar cultivo celulares de procariontes.

#### **LUGAR DE REALIZACIÓN:**

Laboratorio de biología molecular, CIESA-FMVZ-UAEM





## MATERIAL

- Células competentes (100 ml/tubo)
- ADN (0.5 mg)
- Hielo
- Antibiótico (ampicilina (1mg/ml)
- Incubadora a 37°C
- Baño maría a 42°C
- 100 ml caldo LB a 4°C
- 10 placas con agar LB

## METODO

1. Descongelar las células competentes en hielo.
2. Añadir ADN al tubo de células competentes.
3. Dejar a las células en hielo durante 30 minutos
4. Aplicar choque térmico a las células: dejar a las células durante 1 minutos a una temperatura de 42\_C, y posteriormente ponerlas de nuevo en hielo durante 2 minutos más.
5. Añadir 400 ml de caldo LB frío a las células.
6. Dejar incubar durante 30 minutos a 37\_C
7. Se van a tener 4 placas de agar LB: 2 con antibiótico y 2 sin antibiótico





8. Se van a sembrar las bacterias de la siguiente manera:
- a) 25 ml de células competentes **sin** ADN en placa de agar LB **sin** antibiótico.
  - b) 25 ml de células competentes **sin** ADN en placa de agar LB **con** antibiótico.
  - c) 25 ml de células competentes **con** ADN (transformadas) en placa de agar LB **sin** antibiótico.
  - d) 25 ml de células competentes con ADN (transformadas) en placa de agar LB **con** antibiótico.

## RESULTADOS

El alumno tendrá la capacidad de entender la importancia del uso de controles positivos y negativos en los experimentos. Será capaz de realizar una transformación celular

## EVALUACIÓN

El criterio de evaluación será:

- Uso adecuado del equipo de seguridad (bata, cubre-bocas, guantes, pipetas, medios de cultivo, ADN, bacterias y equipo de laboratorio en general)
- Participación durante la realización de la práctica
- Reporte de práctica

## CUESTIONARIO

1. ¿Qué es un vector?





2. ¿Para qué se transforman a las bacterias?
  
3. Si creció alguna colonia después de ser transformada y cultivada en medio agar LB con antibiótico, ¿Por qué creció?

## X. BIBLIOGRAFÍA

### BÁSICA:

- 

### COMPLEMENTARIA:

- 

### REVISTAS:





## **UNIDAD DE COMPETENCIA I, IV**

### **PRÁCTICA No.4: CITOMETRÍA DE FLUJO**

#### **INTRODUCCIÓN:**

La citometría de flujo es una herramienta de la biotecnología muy importante ya que en ella se pueden evaluar células vivas, hacer diagnósticos, pronósticos de algunos padecimientos genéticos. La citometría de flujo además se apoyo en la inmunofluorescencia para realizar separaciones celulares.

#### **OBJETIVO:**

- Comprender los fundamentos en los que se basa la citometría de flujo.
- Analizar citometrías
- Observar las inmunofluorescencias

#### **LUGAR DE REALIZACIÓN:**

Área de Citometría de Flujo, CIESA-FMVZ-UAEM.

#### **MATERIAL**

- Citómetro de flujo





- Perlas fluorescentes

## **METODO**

1. Se explicará el uso del citómetro
2. Se preparan dos tubos con perlas fluorescentes
3. Se realizarán gráficos para su análisis

## **RESULTADOS**

El discente identificará las diferentes poblaciones por Citometría de Flujo por medio de fluorocromos.

## **EVALUACIÓN**

- Participación
- Reporte de prácticas

## **CUESTIONARIO**

1. ¿En que se basa la citometría de flujo?
2. ¿Qué se puede medir?
3. ¿Para que se puede utilizar?





**X. BIBLIOGRAFÍA**

**BÁSICA:**

•

**COMPLEMENTARIA:**

•

**REVISTAS:**







## **UNIDAD DE COMPETENCIA I, III, V**

### **PRÁCTICA No. 5: ULTRASONIDO**

#### **INTRODUCCIÓN:**

La ultrasonografía vino a revolucionar la medicina por ser una herramienta diagnóstica precisa y rápida. En la Medicina Veterinaria y Zootecnia, no solo se utiliza como apoyo en clínica, sino también en la producción animal, ya que con ella se pueden tomar decisiones en el aspecto reproductivo de los animales para hacer más eficientes.

#### **OBJETIVO:**

- Demostrar el potencial diagnóstico y productivo de la ultrasonografía.
- Analizar imágenes de ultrasonido

#### **LUGAR DE REALIZACIÓN:**

CIESA-FMVZ-UAEM

#### **MATERIAL**

- Ecógrafo
- Yeguas





- Guantes de palpación
- Overol
- Botas de hule
- Gel para ultrasonografía

## **METODO**

1. Se realizarán ultrasonidos a yeguas que estén en distintas etapas fisiológicas.
2. se tomarán fotografías de los ecogramas
3. Se interpretarán las imágenes de ultrasonido.

## **RESULTADOS**

Analizar los alcances que tiene el ultrasonido en la medicina veterinaria y zootecnia.

## **EVALUACIÓN**

- Participación durante la realización de la práctica
- Reporte de práctica

## **CUESTIONARIO**

1. ¿Qué es el ultrasonido?
2. ¿Usos de la ultrasonografía?





**X. BIBLIOGRAFÍA**

**BÁSICA:**

•

**COMPLEMENTARIA:**

**REVISTAS:**





## **UNIDAD DE COMPETENCIA I, III, V**

### **PRÁCTICA No. 6: CONGELACIÓN DE SEMEN**

#### **INTRODUCCIÓN:**

La inseminación artificial ha ayudado al mejoramiento genético y productivo de hatos ya que se puede seleccionar al progenitor dependiendo las características deseables. Además, se pueden reducir los intervalos entre partos aumentando así la producción. Es por ello que es importante la congelación del semen para su transporte y análisis.

#### **OBJETIVO:**

- Producir semen congelado.
- Evaluar semen antes y después de congelarlo.

#### **LUGAR DE REALIZACIÓN:**

CIESA-FMVZ-UAEM

#### **MATERIAL**

- Agitadores
- Baño Maria





- Cámara de Neubauer
- Cámara de refrigeración
- Cañas y canastilla para tanque de Nitrógeno Líquido
- Centrífuga
- Cubreobjetos
- Laminillas
- Micropipetas
- Microscopio
- Pajillas de .5 ml
- Pinzas
- Pipetas Pasteur
- Platina
- Tanque de Nitrógeno líquido
- Tubos de ensaye
- Vasos de precipitado

### **Sustancias**





- Agua desionizada
- Alcohol polivinílico
- Ampicilina
- Diluyente de transporte
- Diluyente para congelación

### **Para recolección de semen**

- Calentador
- Gel no espermicida estéril o vaselina
- Guantes de látex
- Maniquís
- Termómetro

### **METODO**

Los semen será recolectado de un semental en su rancho, en un maniquí por una persona capacitada (los alumnos solo observarán)

#### **1. Evaluación del semen**





a) Macroscópico:

El color normal del semen de equino es grisáceo o blanco lechoso, la cantidad esta influenciada por varios factores como lo son la edad, alimentación, frecuencia de la recolección, época del año y estado fisiológico. Un macho adulto puede eyacular normalmente de 40 a 80 ml. La determinación del pH debe hacerse con una muestra de semen libre de gel, se utiliza un aparato para determinación del pH ó bien papel para medir pH. El pH normal del semen equino es de 7.2-7.7

b) Microscópica

La concentración espermática va de 2,000 a 8,000 millones de espermatozoides totales, los cuales serán determinados con exactitud colocando una gota de semen en una cámara de Neubauer, adicionada con solución Hayem, dejándose reposar por 5 minutos.

Los espermatozoides muertos y anormales son determinados por un conteo en frotis teñido con Eosina - Nigrosina (E -N). Sobre un portaobjetos atemperado a 37 °C, se coloca una gota de semen y una de E-N, se realiza un frotis, se deja secar durante 10 min.y se le coloca un cubreobjetos. El conteo se hace con un microscopio óptico, con objetivo 40x.

## 2. Dilución del semen

El semen será lavado con un diluyente de transporte en una relación 1:1, para proceder a centrifugarlo durante 10 minutos a 2000 rpm, obteniéndose así el pellet o botón espermático y separarlo por decantación del liquido.

Después de la evaluación del semen se hará la dilución, de acuerdo a la concentración del mismo, para obtener de 25 a 50 millones de espermatozoides por mililitro.

En los cuadros número 1 y 2, se muestra los componentes y cantidades de los diferentes diluyentes a utilizar.





Cuadro No. 1. Diluyente preparado según Backman

		/100ml	/50 ml
Glucosa	154.80 mM	2.78900 g	
Lactosa	4.20 mM	0.15133 g	
Rafinosa	0.50 mM	0.29700 g	
Citrato de sodio dihidratado	0.85 mM	0.24990 g	
Cloruro de potasio	1.25 mM	0.02600 g	
HEPES	29.80 mM	0.71010 g	
Leche en polvo descremada	51.5 mg/ml	5.15000 g	
Ampicilina	250 UI/ml	25000 UI	
Yema de huevo	2%	2ml	
Glycerol	4%	4ml	

(Backman *et al.*,2004)

Cuadro No. 2. Diluyente c base en agua d e coco

		/100 ml	/50 ml
Agua de coco		100 ml	50ml
Lactosa		0.15 g	0.075 g
Glucosa		1.26 g	0.630 g
Glycerol		4 ml	2 ml







El semen es envasado en pajillas de 0.5 ml, se conecta una jeringa de 10 ml para succionar el semen por el extremo que tiene el cordón y una vez llenadas, se sellan con alcohol polivinílico y rotulan para su identificación.

El semen se expondrá por 5 minutos a los vapores del nitrógeno líquido en un flotador dentro de una caja de poliuretano, colocando las pajillas de forma horizontal a 5 cm del espejo del nitrógeno para después proceder a sumergirlas en el mismo y pasarlas al tanque de Nitrógeno líquido.

La descongelación del semen se realizará sumergiendo las pajillas en baño Maria a 37 C por 30 segundos, debiendo secarse con una toalla de papel para evitar que se contaminen las muestras.

### **3. Evaluación del semen post descongelación**

La evaluación del semen descongelado, se realizará para evaluar su morfología, vigor, porcentaje de espermias vivos, muertos y mótiles.

## **RESULTADOS**

El alumno coleccionará, evaluará y conservará de semen equino.

## **EVALUACIÓN**

- Uso adecuado del equipo y materiales requeridos para la (bata, overol, guantes, equipo y material)
- Participación durante la realización de la práctica
- Reporte de práctica





## CUESTIONARIO

### X. BIBLIOGRAFÍA

#### BÁSICA:

- 

#### COMPLEMENTARIA:

- 

#### REVISTAS:





#### **IV. ACTUALIZACIÓN**

Manual de Lineamientos del Laboratorio de Prácticas. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México; 25 de febrero de 2013.

Segunda Edición:

#### **FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTEENIA**

**Director:**

**Dr. En C. Mauro victoria Mora**

**Elaboró:**

Dra. Claudia Giovanna Peñuelas Rivas

Dr. Juan Carlos Vásquez Chagoyán

**Revisó: .....**

Dra. Claudia Giovanna Peñuelas Rivas

Dr. Juan Carlos Vásquez Chagoyán

