



PROGRAMA DE PRACTICAS DE BIOTECNOLOGÍA

1. IDENTIFICACIÓN DE LA UNIDAD DE APRENDIZAJE							
ESPACIO ACADÉMICO: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia							
PROGRAMA EDUCATIVO: Licenciatura de Médico Veterinario Zootecnista				Área de docencia: Metodología Científica y Apoyos Técnicos			
Aprobación por los H.H. Consejos Académico y de Gobierno		Fecha: 28/08/13		Programa elaborado por: <ul style="list-style-type: none"> • Dr. Juan Carlos Vázquez Chagoyán • Dra. Claudia Giovanna Peñuelas Rivas Programa revisado y reestructurado por: <ul style="list-style-type: none"> • Dra. Claudia Giovanna Peñuelas Rivas 			
Nombre de la Unidad de Aprendizaje: BIOTECNOLOGÍA						Fecha de elaboración: 30/06/2006	
						Fecha de revisión: 28/06/13	
Clave	Horas de teoría	Horas de práctica	Total de horas	Créditos	Tipo de Unidad de Aprendizaje	Carácter de la Unidad de Aprendizaje	Núcleo de formación
L43766	2	2	2	6	Curso	Optativa	Sustantivo
Prerrequisitos: Ninguno		Unidad de Aprendizaje Antecedente: Biología celular, Mejoramiento genético, Inmunología, Farmacología, Bacteriología y Micología, Ética.		Unidad de aprendizaje consecuente: Ninguna			
Programas académicos en los que se imparte: Licenciatura de Médico Veterinario Zootecnista							



UNIDAD DE COMPETENCIA II, III

PRÁCTICA 1: ELECTROFORESIS DE ADN

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 que son fácilmente visibles cuando son teñidos con bromuro de etidio, el cual 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.

OBJETIVOS

- 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: CIESA

MATERIAL

- ADN
- Marcador de Pesos Moleculares



Universidad Autónoma del Estado de México

*Secretaría de Docencia
Coordinación General de Estudios Superiores
Programa Institucional de Innovación Curricular*

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

METODOLOGÍA

1. Se descongelará en hielo el ADN.
2. Se mezclan en una gota el tampón de carga (1 μ l) y el ADN (10 μ l).
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 (2 μ l) 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 (10 μ l) en el gel de agarosa en el primer pozo con una micropipeta y con punta para 200 μ l.
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

La banda de ADN se observará en el peso molecular correspondiente.

EVALUACIÓN

Los criterios de evaluación serán:

- Asistencia.



Universidad Autónoma del Estado de México

Secretaría de Docencia

Coordinación General de Estudios Superiores

Programa Institucional de Innovación Curricular

- Uso adecuado del equipo de seguridad (bata, cubrebocas, guantes, reactivos y equipo).
- Participación durante la realización de la práctica.
- Reporte de práctica.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué es un peso molecular y para que se colocan en el gel?
2. ¿Por qué se coloca agua?
3. Si es el caso, ¿Por qué no se observan bandas?
4. Porque es peligroso el bromuro de etidio



UNIDAD DE COMPETENCIA II, III

PRACTICA 2: SIMULACIÓN DE UNA AMPLIFICACIÓN DE ADN

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.

OBJETIVOS

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

LUGAR DE REALIZACIÓN: CIESA

MATERIAL

- Computadora.
- Internet.

METODOLOGÍA

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

Simular la extracción y amplificación de una secuencia de ADN.



Universidad Autónoma del Estado de México

*Secretaría de Docencia
Coordinación General de Estudios Superiores
Programa Institucional de Innovación Curricular*

EVALUACIÓN

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

CUESTIONARIO

- ¿Qué es y cual es el codón de inicio?
- ¿Qué es un primer?
- ¿Cómo debe ser el primer reversa?
- ¿Qué pasa si se corre el marco de lectura?
- ¿Qué puede pasar si se cambia una base en las copias?



UNIDAD DE COMPETENCIA II, III

PRÁCTICA 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.

OBJETIVOS

- 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: CIESA

MATERIAL

- Células competentes (100 μ l/tubo)
- ADN (0.5 μ g)
- Hielo
- Baño maría a 42°C
- 100 ml caldo LB a 4°C
- 10 placas con agar LB



- Antibiótico (ampicilina (1mg/ml)
- Incubadora a 37°C

METODOLOGÍA

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 μ l 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 μ l de células competentes **sin** ADN en placa de agar LB **sin** antibiótico.
 - b) 25 μ l de células competentes **sin** ADN en placa de agar LB **con** antibiótico.
 - c) 25 μ l de células competentes **con** ADN (transformadas) en placa de agar LB **sin** antibiótico.
 - d) 25 μ l de células competentes con ADN (transformadas) en placa de agar LB **con** antibiótico.

RESULTADOS

- a) Crecerán (con una densidad media) en agar LB **con** antibiótico solo las bacterias que si fueron transformadas ya que tienen el factor de resistencia a antibiótico. (si hay crecimiento el experimento funcionó, si no hay crecimiento o hay poco crecimiento es que las células no se transformaron y el experimento falló)
- b) Crecerán las bacterias transformadas (con una densidad alta) en agar LB **sin** antibiótico. En esta población existen bacterias que contienen el plásmido y las que no lo tienen. (si hay crecimiento es que el control funcionó, si no hay crecimiento significa que las competentes murieron antes de empezar el experimento o durante el proceso)
- c) Crecerán bacteria no transformadas (con una densidad alta) en agar LB **sin** antibiótico, lo cual indica que las células competentes estaban vivas al momento de usarlas y que el protocolo no las mató. (Si hay crecimiento el control funcionó, si no hay crecimiento significa que las competentes murieron antes de empezar el experimento o durante el proceso).



Universidad Autónoma del Estado de México

*Secretaría de Docencia
Coordinación General de Estudios Superiores
Programa Institucional de Innovación Curricular*

- d) No habrá crecimiento en de bacterias no transformadas en medio agar LB **con** antibiótico, lo cual indica que estas células no tienen resistencia al antibiótico si no son transformadas. (Si no hay crecimiento el control funcionó. Si hubiere crecimiento el antibiótico no es activo y el experimento no es válido).

EVALUACIÓN

- Los criterios de evaluación serán:
- Asistencia.
- 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

- ¿Qué es un vector?
- ¿Para que se transforman a las bacterias?
- Si creció alguna colonia después de ser transformada y cultivada en medio agar LB con antibiótico, ¿Por qué creció?



UNIDAD DE COMPETENCIA I, IV.

PRÁCTICA 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: **CIESA-FMVZ**

MATERIAL:

- Citómetro de flujo.
- Perlas fluorescentes.



Universidad Autónoma del Estado de México

*Secretaría de Docencia
Coordinación General de Estudios Superiores
Programa Institucional de Innovación Curricular*

METODO:

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

RESULTADOS

(QUE ESPERA EL DISCENTE) Al observar y analizar las perlas en el citómetro de flujo, se entenderá el fundamento de la técnica.

EVALUACIÓN

Los criterios serán:

- Asistencia.
- Uso adecuado del equipo de seguridad (bata, cubre bocas, guantes, reactivos y equipo).
- Participación durante la realización de la práctica.
- Reporte de práctica.

CUESTIONARIO

- ¿En que se basa la citometría de flujo?
- ¿Qué se puede medir?
- ¿Para qué se puede utilizar?



UNIDAD DE COMPETENCIA I, III, V

PRÁCTICA 5: ULTRASONIDO

INTRODUCCIÓN

La ultrasonografía ha venido 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.

OBJETIVOS

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

LUGAR DE REALIZACIÓN: CIESA

MATERIAL

- Ecógrafo
- Yeguas
- Guantes de palpación
- Overol
- Botas de hule
- Gel para ultrasonografía
- Cámara digital (los alumnos deberán llevar la propia por equipos)



METODOLOGÍA

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

- Análisis de imágenes de ultrasonido.

EVALUACIÓN

Los criterios serán:

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

CUESTIONARIO

¿Qué es el ultrasonido?

¿Usos de la ultrasonografía?



UNIDAD DE COMPETENCIA I, III, V

PRÁCTICA 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.

OBJETIVOS

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

LUGAR DE REALIZACIÓN: CIESA

MATERIAL

De laboratorio:

- Agitadores
- Baño María
- Cámara de Neubauer
- Cámara de refrigeración
- Cañas y canastilla para tanque de Nitrógeno líquido
- Centrífuga
- Cubreobjetos



Universidad Autónoma del Estado de México

Secretaría de Docencia

Coordinación General de Estudios Superiores

Programa Institucional de Innovación Curricular

- 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
- Tubos graduados
- Vagina artificial



METODOLOGÍA

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.



Universidad Autónoma del Estado de México

Secretaría de Docencia
Coordinación General de Estudios Superiores
Programa Institucional de Innovación Curricular

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 *et al.*, (2004)

		/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	

Cuadro No. 2. Diluyente c base en agua de 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 motiles.

RESULTADOS

- Colecta, evaluación y conservación de semen equino.

EVALUACIÓN

Los criterios de evaluación serán:

- Asistencia
- 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

- ¿Qué es el semen?
- ¿Por qué se tiene que congelar el semen?



- Mencione los usos del semen congelado

X. BIBLIOGRAFÍA

BÁSICA

- **Griffiths, A.** Introduction of Genetic Analysis. **ISBN 978-1429229438. Número de Registro Biblioteca El Cerrillo QH430.162 2012.**
- **Karp, Gerald.** Biología Celular y Molecular: Conceptos Básicos y Experimentos. Mc Graw-Hill, 2011. **ISBN 978-6071505040. Número de Registro Biblioteca El Cerrillo QH581.2.K369 2011.**
- **Sudbury, MA.** Molecular Biology: Genes to Protein. Jones & Bartlett Learning, 2012. **ISBN 978-0763786632. Número de Registro Biblioteca El Cerrillo QH506.F73 2012.**

COMPLEMENTARIA

- **Abbas, Abul K., Lichtman, Andrew H., Pillai, Shiv,** Inmunología Celular y Molecular. Séptima Edición. Saunders Elsevier, 2007. **ISBN 9788131210345. Número de Registro Biblioteca Facultad de Química QR185.5A33 2012**
- **Nalini Chandar, Susan Viselli.** Biología Molecular y Celular. Barcelona, 2011. **ISBN 978-1609133092. Número de Registro Biblioteca Facultad de Odontología QH581.2.C47 2011.**

<http://vetmed.tamu.edu/equine-embryo-laboratory/cloning-research>
<http://vetmed.tamu.edu/equine-embryo-laboratory/research-publications>
<http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EEEFuFVpEViYvxbfZt.php>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
<http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/bioetica.htm>