



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE LA CIÉNEGA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y DE LA VIDA

Manual de Prácticas para

Bioquímica II

(I6144)

Fecha de Actualización 10.08.2023



Índice

I. Reglamento General del Laboratorio.....	3
II. Seguridad.....	4
III. Comportamiento en el Laboratorio en General.....	5
IV. Manejar Sustancias Peligrosas.....	6
V. Reglamento Interno.....	7
VI. Evaluación de las Prácticas.....	7
VII. Reporte.....	8
Práctica No. 1 Ácidos grasos insaturados.....	10
Práctica No. 2 Grupos funcionales de aminoácidos.....	13
Práctica No. 3 Separación de aminoácidos por cromatografía.....	17
Práctica No. 4 Extracción de DNA.....	22
Práctica No. 5 Cuantificación y cualificación de DNA.....	25



I. Reglamento General del Laboratorio

El profesor de la práctica deberá:

- Estar presente durante todo el desarrollo de la práctica
- Mantener la disciplina de sus estudiantes durante la práctica

Todo el personal que ingrese al laboratorio deberá portar el material de protección personal como:

- Bata (blanca, limpia, de algodón y manga larga)
- Pantalones (largos)
- Zapatos cerrados y de piso; preferiblemente de cuero
- Guantes adecuados dependiendo de los reactivos y de las actividades. Con guantes nunca se toca algo fuera del experimento. Véase a las "IdS Guantes"
- Cubre-bocas, cofias, mascarillas y/o gafas de seguridad en casos necesarios

Además deberá:

- Familiarizarse con la ubicación de los elementos de seguridad como extintor, puertas de emergencia, duchas de emergencia, lava-ojos, botiquín de primeros auxilios etc., así como los números telefónicos de emergencia
- Sujetar el cabello y no usar gorra
- Traer uñas cortas y sin esmalte
- No maquillarse durante el desarrollo de la práctica ni manipular lentes de contacto
- No comer, beber, masticar chicle
- No fumar
- No llevarse objetos a la boca como lápices o dedos
- Lavarse las manos antes de entrar y de salir del laboratorio

Está prohibido portar la indumentaria de protección personal fuera del laboratorio

No almacenar alimentos o bebidas para el consumo humano en el laboratorio

Está prohibido el ingreso al laboratorio a personas no autorizadas, p.ej. niños o visitas

Cualquier incidente en el laboratorio reportarlo inmediatamente al responsable

Los estudiantes no podrán salir del laboratorio durante la práctica a menos que sea muy necesario

Está prohibido bloquear las rutas de evacuación

Toda sustancia química será etiquetada, clasificada y almacenada de acuerdo a la normatividad existente (véase "Registro de Sustancias Peligrosas")

Toda sustancia química no deberá ser eliminada directamente al desagüe sin antes consultar las Fichas de Datos de Seguridad (véase "Registro Residuos Peligrosos")

El responsable del laboratorio levantará un reporte cuando no se cumple con lo indicado en este reglamento



II. Seguridad

Para entrar a las prácticas de bioquímica, cada estudiante tiene que conocer y cumplir las reglas de seguridad en el laboratorio. Información sobre el comportamiento en general se puede encontrar muy detallado en la página web

<http://radio.cuci.udg.mx/bch/ES/Sicherheit/index.html> y breve en los puntos

"III: Comportamiento en el Laboratorio en General" y

"IV: Manejar Sustancias Peligrosas" de este manual.

También es obligatorio para el estudiante de informarse sobre los riesgos potenciales que provienen de los reactivos y procedimientos que se aplicarán *antes* de que se lleven a cabo las prácticas. Información y documentos de pdf para bajar e imprimir se encuentra también en dicha página de internet como el "Registro de Sustancias Peligrosas", "Instrucciones de Seguridad (IdS)" y "Fichas de Datos de Seguridad" (FDS) para las sustancias que se utilizarán.

En el caso de no cumplir las reglas de seguridad, el estudiante tiene que salir de la práctica inmediatamente y se evaluará esta práctica con cero puntos. En caso de causar accidentes graves o actuar con mala intención el estudiante puede ser excluido de las prácticas para todo el semestre.



III. Comportamiento en el Laboratorio en General

Usar una bata de algodón, manga larga, abotonada y limpia para protegernos contra contaminaciones

- para no contaminar el exterior, nunca se utiliza la bata fuera del laboratorio
- batas sucias traen el peligro de contaminarse uno mismo



Usar zapatos cerrados (no sandalias) y seguros para caminar (sin tacón)

- en verano se puede traer un par de zapatos adicionales adecuados para el laboratorio



Usar material de seguridad personal (gafas, guantes, etc.), cuando es indicado

NO fumar

NO comer, beber, maquillarse

NO alcohol u otras drogas

NO móvil/celular



No desarrollar experimentos peligrosos solos en el laboratorio

No correr ni jugar en el laboratorio

No recibir visitas personales en el laboratorio

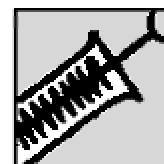
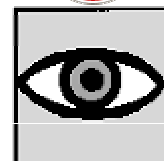
No dejar bolsas o ropa en el laboratorio

Siempre dejar el laboratorio limpio y ordenado

- su material (quitar escrituras y adhesivos)

- los equipos (p.ej. centrífuga)

- su lugar de trabajo y lugares comunes (p.ej. campana, lavabo)



Avisar:

- situaciones peligrosas

- mal funcionamiento de equipos y/o

- terminación de reactivos

al Responsable del Laboratorio



Lavarse las manos después del trabajo y ponerse crema para la piel



IV. Manejar Sustancias Peligrosas

Es obligatorio informarse sobre los riesgos específicos de sustancias peligrosas

→ Ver las Fichas de Datos de Seguridad (FDS)

<http://radio.cuci.udg.mx/bch/ES/Sicherheit/SDB.html>

→ Ver al Registro de Sustancias Peligrosas

<http://radio.cuci.udg.mx/bch/ES/Sicherheit/Anweisungen.html>

Mujeres embarazadas y madres amamantando

NO pueden trabajar en el laboratorio con sustancias peligrosas

Almacenar:

En recipientes adecuados y en una manera adecuada

Marcado conforme a su contenido

- contenido (sustancia, mezcla, concentración)

- fecha

- propietario

- símbolo de peligro

No en cantidades grandes

Sustancias que producen polvos, gases, vapores, aerosoles etc tóxicos, nocivos, cancerígenos, corrosivos o inflamables almacenar en un lugar ventilado

Nunca almacenar alimentos en el laboratorio

Nunca almacenar reactivos en contenedores de alimentos

Manejar:

No tocar químicos

Trasvasar mediante un medio aplicable (e.je. embudo)

Nunca poner las tapas boca abajo sobre la mesa

- dejar químicos sobre la mesa

- traer contaminación al recipiente

No dañar las etiquetas mientras se trasvasa (p.ej. por goteo)

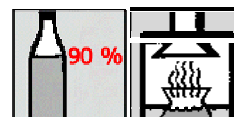
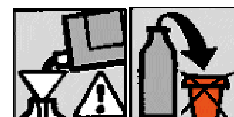
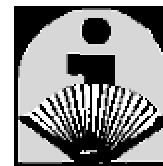
Nunca devolver reactivos en su envase original

- traer contaminación al recipiente

No llenar recipientes más del 90% de su capacidad máxima

Cerrar bien los recipientes no usados

Sustancias que producen polvos, gases, vapores o aerosoles tóxicos, nocivos, cancerígenos, corrosivos o inflamables se maneja en una campana de extracción



V. Reglamento Interno

El estudiante tiene que entrar preparado a las prácticas, es decir con:

- **Ropa adecuada** cumpliendo las reglas de seguridad (pantalones largos, zapatos cerrados y seguros, cabello corto o recogido, bata limpia; gafas de seguridad y guantes según necesidad)
- **Material necesario** para llevar a cabo la práctica según el manual o el anuncio del profesor
- **Material estandar** con que debe contar cada equipo: 70% EtOH en atomizador para limpiar meseta, cerillos, perilla/bulbo, bisturí, guantes, portaobjetos, cubreobjetos, varilla de madera, algodón, gasa
- **Método:** Diagrama de flujo (**escrito a mano**) para llevar a cabo la práctica **ordenado, fácil de leer = fácil para captar la información necesaria, sin distractores (sólo esquemas/dibujos necesarios), con espacio para anotar resultados crudos.**

Hay que enseñar este esquema al profesor dentro de los primeros 15 min de la PR.

- Conocer la base teórica para entender el objetivo de la práctica

En el caso de no cumplir algún punto de los anteriores, el estudiante puede ser excluido de esta práctica y se evaluará con cero puntos.

VI. Evaluación de las Prácticas

En cada práctica se evaluará al estudiante según el siguiente esquema:

50 % Comportamiento en el laboratorio (actitud, preparación, desempeño, limpieza)

50 % Reporte

La calificación final de las prácticas se calculará del promedio de todas las prácticas ofrecidas, donde cada práctica tiene el mismo peso. Prácticas ofrecidas no se repite; se evaluará una falta de asistencia no justificada con cero puntos.

La evaluación de la materia será:

Exámenes 60 %

Participación 10 %

Tareas 5 %

Prácticas 25 %

Se tiene que aprobar la teoría (= exámenes + tareas + participación) y las prácticas en forma independiente para aprobar la materia.

VII. Reporte

Cada equipo tiene que entregar el reporte de la práctica (**impreso**) al profesor responsable a más tardar 6 días hábiles después de la práctica. Reportes de tipo "copy & paste" no son aceptables.

Generalmente, se evalúa de reportes (detalles - ver abajo):

* Expresión clara, precisa y concisa - es decir, no innecesariamente larga

* Escritura sin faltas ortográficas o errores gramaticales

* Contenido completo - por eso, el reporte debe cumplir con los siguientes puntos:

- **Nombre, Apellido y código del estudiante**, número del equipo, fecha, curso, tema de la práctica
- **Introducción** (10): Pequeña introducción en la teoría en que se basa la práctica (la base para la *discusión*; no tanto respuesta al cuestionario o una discusión anticipada)
- **Material** (2): - Material (especial) usado (*sin material estándar como tubo de ensayo, gradilla, ...*)
 - Soluciones, reactivos usados (pureza, conc., marca si es relevante - *no la preparación*)
 - Equipos (marca, modelo)
- **Método** (10): - Anexar "Diagrama de flujo para llevar a cabo la práctica" (véase V. Regl. interno)
- **Procedimiento** (8): - Pasos que realizaron para llevar a cabo la práctica
 - tomar fotos puede ayudar a ilustrar el procedimiento
 - *NO hay un rubro propio de "aclaraciones" o "notas"*
- **Resultados** (10): - Tabla (p.ej. de lecturas), fotos (*con descripción*) de los resultados primarios (p.ej. colores de soluciones)
 - *NO hay un rubro propio de "observaciones"*
 - (10) - Cálculos y resultados elaborados, gráficas (p.ej. Excel), explicación
- **Discusión** (20): - Qué se ha esperado (en base de la teoría como explicado en la introducción)?
 - Explicación de las reacciones y relacionarlas con observaciones y resultados
 - Resultados cumplen con la expectativa?
 - En el caso de no: discusión de errores
 - Qué significan los resultados?
 - *NO hay un rubro propio de "conclusiones". Es parte final de la discusión.*
- **Cuestionario** (20): - Contestado
- **Bibliografía:** Autor1, N1, N2 Autor2 & N3 Autor3 (año): Título. *Revista*, **Volumen:** páginas
<http://www.domain-name.de/link/al/documento.pdf>
- Formato del reporte (10)

En la escritura no hay de despreciar el espacio para producir más páginas, p.ej. no se requiere una hoja de portada, no hay que dejar partes grandes en blanco; se recomienda usar los dos lados de una hoja.

Se evalúa también:

- Normalmente se escribe **textos con fuentes con serifas/gracias** (p.ej. Times) - mientras leyendas y textos en gráficas son escritos con fuentes sin serifas/gracias (p.ej. Arial)
- Las páginas deben ser enumeradas (sin tomar en cuenta los anexos).
- Hay que hacer saltos de página útiles/lógicas, p.ej. celdas de tablas no deben ser separados por un salto de página. Igualmente, un título no debe ser separado de su texto por un salto de página.
- Uso de mayúsculas (textos no se escribe en mayúsculas o cursiva) y de puntos (después de una oración)
- Expresión científica y uso de *termini technici*: p.ej. desdoblar vs hidrolizar. Hay que evitar palabras con conotaciones emocionales (p.ej. apreciar, sufrir).
- Unidades: su uso correcto, las abreviaciones correctas, espacios, puntos
- Formulas químicas: uso correcto de mayúsculas, minúsculas, superíndice, subíndice

Es recomendable escribir el método en infinitivo; media oraciones facilitan captar el contenido, p.ej.:

- | | | |
|---------------------------------------------------|--|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 1) Añadir 3 ml H ₂ O en tubo de ensayo | | 1) Se añadirá 3 mililitros de agua en un tubo de ensayo. |
| 2) Medir Abs. a $\lambda = 620$ nm | | 2) Se medirá la absorbancia de la muestra a 620 nanómetros con el espectrofotómetro. |

El texto hay que escribir en forma impersonal (se ha observado, se medió) y no en forma personal (~~observé, medimos~~)

Fotos, tablas, gráficas deben contar con una descripción entendible por sí mismo (*i.e.* sin necesidad de leer el texto) y tener referencia en el texto. .

Gráficas de coordenadas cartesianas deben iniciar con el valor cero y se debe indicar las unidades en los ejes. La variable independiente se grafica en la eje X (abscisa), la dependiente en la eje y (ordenada). Hay que especificar la muestra graficada (*no "muestra 1" sino p.ej. conc. 1 mM*). La distribución de los puntos debe ser proporcional (Excel: dispersión).

En la discusión o introducción hay que explicar, que se está esperando. Esto **incluye reacciones químicas**, que deben ser representados (es posible dibujarlas a mano).

Aunque gramaticalmente correcto, oraciones pueden ser falsas por su lógica, p.ej.: "*La cromatografía estudia la separación...*" - el sujeto de la oración es *cromatografía*, pero *cromatografías* NO pueden *estudiar* algo. Normalmente son seres humanos, que pueden estudiar...

Otras sugerencias en la escritura de textos científicos se puede encontrar en:

<http://radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Paper.html>

Práctica No. 1

Ácidos grasos insaturados

Tipo de práctica: Por equipo

Tiempo de duración: 2 h

Objetivo




Conocer las características físico-químicas de diferentes lípidos.

Introducción

Con "lípidos" se refiere a un grupo diverso de biomoléculas: Los fosfolípidos y esfingolípidos son los constituyentes principales de las membranas. En contraste, los triacilglicéridos, coloquialmente también llamado 'grasa', no se encuentra en las membranas sino son la reserva energética principal para los animales. Estos lípidos tienen a los ácidos grasos como constituyente en común. Los ácidos grasos se componen de un grupo carboxilato (aka 'cabeza') y a éste unido una cadena hidrocarbonada de 12 a 22 carbonos (aka 'cola'). Esta cadena lineal de carbonos puede ser saturada con hidrógenos o ser insaturada, es decir contener enlaces dobles entre los carbonos. Por la estereoconfiguración 'cis' de los enlaces dobles se introduce una curvación a los ácidos grasos, que por ende causa una disminución de su punto de fusión y de su viscosidad.

Aparte existen como lípidos los derivados del isopreno, los isoprenoides. Pueden ser cadenas lineales, ramificadas y múltiples de 5 carbonos (p.ej. farnesil) o pueden ser cíclicos (p.ej. colesterol). Sobre todo plantas pueden producir en su metabolismo secundario una gama grande de diferentes isoprenoides, p.ej. los terpenoides.

Material

Material	Cantidad	Reactivos	Cantidad
Lípidos de diferentes fuentes (aceites, mantequilla, manteca, margarina): trae *cada* estudiante			3/equ.
Pipeta de sólo 1 uso (para los aceites): trae estudiante			1-3
Espátula chica	1	Ác. acético, 7,5 % 	15 mℓ
Tubos de ensayo de 15 mℓ	4	NaOH, 20 % 	2 mℓ
Pinza para tubos de ensayo	1	HCl, 20 % 	2 mℓ
Gradilla	1	para neutralizar	
Pipetas de 1-2 mℓ	3	Lugol	10 gotas
Pipetas de 5-10 mℓ	1	Almidón (0,25 %)	3 mℓ
Baño María (70 °C), Termómetro	1 / grp.		
Vortex	1-2 / grp		

Método

1) 1× Saponificación

- 1.1 Colocar 2 mL de aceite y 2 mL de NaOH al 20 % (*grasa sólida hay que derretir antes*)
- 1.2 Mezclar bien
- 1.3 Calentarlo en el Baño María durante algunos minutos
- 1.4 Dejar reposar y aparecerán dos o tres capas
 - a) Superior (puede no aparecer): aceite que no ha reaccionado
 - b) Intermedia semisólida de jabón
 - c) Inferior: glicerol disuelta en el agua

2) 3× Ácidos grasos insaturados

- 2.1 Poner 2 mL de un lípido en un tubo de ensayo (*grasa sólida hay que derretir antes*)
- 2.2 Añadir 5 mL ácido acético
- 2.3 Añadir unas 3 gotas de Lugol y mezclar bien (vortex)
- 2.4 Incubarlo unos 7 min a 70 °C
- 2.5 Añadir 1 mL de almidón y mezclar bien

Cuestionario

1. Especifique el peso molecular [g/mol], temperatura de fusión [°C], temperatura de ebullición [°C], estado físico a 25 °C, densidad [g/cm³] y solubilidad [g/l] de los reactivos utilizados (tabla).
Calcule la preparación de las soluciones [g/l] resp. [ml/l].
2. Describa la estructura de la membrana y sistemas de transporte.
3. ¿Cuáles son los ácidos grasos esenciales, por qué y para qué se necesitan?

Mecanismo de Evaluación

Véase: VI Evaluación de las Prácticas, página 7.



Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional

Al hervir las muestras, la boca de los tubos debe estar dirigida al contrario de la persona por si el burbujeo al hervir es fuerte. Para evitar que se derrame el líquido en el tubo al hervir, se recomienda que el tubo tenga $\frac{3}{4}$ partes de espacio libre.

Ácido acético es una sustancia corrosiva y se debe usar guantes de neopreno. En caso de pérdida del conocimiento nunca dar a beber ni provocar el vomito. Si se inhala, trasladar a la persona al aire libre. Si se tiene contacto con la piel lavar abundantemente con agua. Quitarse las ropa contaminada. En caso de contacto con los ojos, lavar abundantemente con agua manteniendo los parpados abiertos. Si se llega a ingerir, beber abundante agua. Evitar el vómito. En caso de que persista el malestar, pedir atención médica.

NaOH es corrosivo y se tiene que usar guantes de caucho butílico. En caso de derrame neutralice con carbonato hidrogenado, para situaciones en las que entre en contacto con piel y ojos enjuagar con abundante agua y llamar al servicio médico de emergencias.

Disposicion de Desechos Físicos, Químicos y Biológicos

En este caso la neutralización del NaOH se realiza con HCl. Una vez neutralizado los desechos se puede tirar al desagüe. La concentración del ácido acético utilizada en esta práctica (7,5 %) no es tóxica, sin embargo puede neutralizarse con carbonato hidrogenado para posteriormente tirarlo al desagüe.



Práctica No. 2

Grupos funcionales de aminoácidos

Tipo de práctica: Por equipo

Tiempo de duración: 2 h

Objetivo

Conocer diferentes métodos colorimétricos para identificar y diferenciar químicamente los distintos grupos funcionales de los aminoácidos.

Introducción



Proteínas son polímeros de aminoácidos y sus diferentes funciones dan muchos de los signos vitales de las células: movimiento (p.ej. actina), estructura organizada (p.ej. citoesqueleto), respuesta a señales (p.ej. receptores), mantener la homeostasis con transportadores y reguladores (p.ej. hormonas, factores de transcripción) y, por supuesto, el metabolismo realizado por enzimas. Mientras el grupo cabeza es igual entre (casi) todos los aminoácidos, y por ende se encuentra siempre los mismos motivos secundarios en todas las proteínas, los aminoácidos se diferencian en sus grupos funcionales de su cadena lateral; es por ello, que las estructuras terciarias de diferentes proteínas se diferencia considerablemente. Para identificar y diferenciar los grupos funcionales de los aminoácidos se utilizan diferentes técnicas como la xantoproteína para detectar aminoácidos aromáticos, la reacción de plomo de azufre para detectar aminoácidos azufrados (*no se realiza por la alta toxicidad de Pb-acetato*), la reacción de sodio nitroprusiato para detectar grupos tiol y la reacción de Biuret para detectar enlaces peptídicos de oligo- y polipéptidos.

Material



General

Material	Cantidad	Material	Cantidad
Huevo	1	Pipetas de 1 y 2 ml	5
Tubo de ensayo de 15 ml	4	Micropipeta 1000 µl, puntas	2 / grp
Gradilla, Pinzas	1 / 1	Vortex	2 / grp


1) Reacción Xantoproteína

Equipos	Cantidad	Reactivos	Cantidad
Baño María (90 °C), en campana de extracción	1-2 / grp	Ácido nítrico (70 % v/v) 	1 ml
		Soln. NaOH al 40 % 	2 ml

2) Reacción de Sodio-Nitroprusiato

Reactivos	Cantidad	Reactivos	Cantidad
Soln. NaOH (40%) 	2-3 gotas	Sodio-Nitroprusiato (1%) 	2 ml

3) Reacción de Biuret

Reactivos	Cantidad	Reactivos	Cantidad
Sulfato de cobre (CuSO ₄ , 5%)	1 ml	Soln. NaOH (40%) 	1 ml
		<i>A. dest.</i>	1 ml

Método

Para pipetear la clara del huevo (viscoso), es útil cortar la punta para la micropipeta.

1) Reacción Xantoprotéica

- 1.1 Pipetar 2 ml de clara del huevo (= albúmina) en un tubo de ensayo
- 1.2 Añadir 1 ml de HNO₃
- 1.3 Agitar breve (aproximadamente 5 s) con un vortex
- 1.4 Calentar cuidadosamente en un Baño María a 90 °C (1 a 2 min)
- 1.5 Enfriar en agua fría
- 1.6 Observar la coloración: amarilla
- 1.7 Añadir para neutralizar goteando solución de NaOH hasta que se observe otro cambio de color: anaranjado oscuro

2) Reacción de Sodio-Nitroprusiato

- 2.1 Pipetar 2 ml de clara del huevo (= albúmina), resp. bebida con taurina, en un tubo de ensayo
- 2.2 Añadir 2 ml de Sodio-Nitroprusiato
- 2.3 Agitar breve con un vortex
- 2.4 Añadir 2-3 gotas de NaOH
- 2.5 Observar la coloración rojo-tinto

3) Reacción de Biuret

- 3.1 Pipetar 2 ml de clara del huevo (= albúmina) en un tubo de ensayo
- 3.2 Añadir 1 ml Agua
- 3.3 Añadir 1 ml de solución de NaOH
- 3.4 Agitar breve con un vortex
- 3.5 Añadir goteando (unas 4 a 5 gotas) de solución de CuSO₄ hasta que se observe un cambio de color: violeta

Adicional

Cuestionario

1. Especifique el peso molecular [g/mol], temperatura de fusión [°C], temperatura de ebullición [°C], estado físico a 25 °C, densidad [g/cm³] y solubilidad [g/l] de los reactivos utilizados (tabla). Calcule la preparación de las soluciones [g/l].
2. Clasifique a los aminoácidos según sus propiedades físico-químicas indicando sus grupos funcionales, pI y solubilidad en agua.
3. ¿Cuáles son las funciones de los grupos funcionales de los aminoácidos en las enzimas?
4. ¿Qué diferencia existe entre la estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas?

Bibliografía

1. Bannwarth H, Kremer B P (2011): Vom Stoffaufbau zum Stoffwechsel: Erkunden - Erfahren - Experimentieren. 3. Auflage, Schneider Verlag Hohengehren (ISBN 978-3834008480)

Mecanismo de Evaluación

Véase: VI Evaluación de las Prácticas, página 7.

Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional

Durante el calentamiento de líquidos en el tubo de ensayo dentro del Baño María se tiene que traer gafas de seguridad y guantes para protegerse contra borbotones y salpicaduras. Durante el calentamiento de los tubos con los reactivos hay que mantener la abertura del tubo hacia la campana de extracción y nunca hacia una persona.

El ácido nítrico concentrado (HNO₃) se tiene que manejar en la campana de extracción por los vapores que libera. Además, como es corrosivo se tiene que usar guantes de neopreno y gafas de seguridad. Recuerde que los ácidos se adicionan a las soluciones, si se hace de manera contraria suelen proyectarse. En caso de contacto directo puede causar irritación en ojos, membranas mucosas y piel, cuando se está expuesto por un largo periodo puede desarrollar edema pulmonar, neumonitis y bronquitis. En caso de quemadura se debe lavar con abundante agua la zona y llevar al servicio médico de emergencias lo antes posible al paciente, en caso de que no sea posible su transporte por el estado de salud del paciente solicite una ambulancia (marque el 065 Cruz Roja Mexicana ó 114 Bomberos municipal).

Sodio-Nitroprusiato es tóxico en caso de ingestión y puede liberar cianuro (*i.e.* puede causar cianosis). Además hay un riesgo de absorción por la piel: se debe usar guantes de nitrilo. En caso de contacto con la piel o ojos lavar con abundante agua, en caso de inhalación respirar aire fresco. En caso de que persista el malestar, pedir atención médica.

Sosa (40 %) son corrosivas y se tiene que usar guantes caucho butílico. En caso de derrame neutralice con carbonato hidrogenado, para situaciones en las que entre en contacto con piel y ojos enjuagar con abundante agua y llamar al servicio médico de emergencias.

Disposición de Desechos Físicos, Químicos y Biológicos

Todas las soluciones que contenga ácido nítrico se tiene que neutralizar con NaOH al 40 % y ya neutralizado se puede tirar al desagüe. La eliminación de Na-Nitroprusiato requiere un servicio profesional autorizado. El resto de las sustancias se pueden tirar al desagüe.

Práctica No. 3

Separación de aminoácidos por cromatografía

Tipo de práctica: Por equipo

Tiempo de duración: 2 h

Objetivo

Separar los aminoácidos por cromatografía en capa fina con el fin de identificar estos aminoácidos en una mezcla y además conocer el principio de la técnica y sus aplicaciones.

Introducción

La cromatografía en capa fina, o más comúnmente TLC (Thin Layer Chromatography), es una técnica sencilla (y al mismo tiempo ilustrativa) para separar los componentes puros de una mezcla. Aminoácidos se puede separar mediante esta técnica por la diferencia entre las fuerzas de adhesión de las moléculas de una fase móvil (normalmente, un disolvente) y de una fase estacionaria (que puede ser papel, gel de sílice, etc.). Esta diferencia se traduce en un mayor o menor desplazamiento o movilidad de cada componente individual, lo cual permite su separación e identificación. El parámetro fundamental de esta técnica es el R_f (factor de retención): la relación entre la distancia que recorre una sustancia y la que recorre la fase móvil (Figura 3). Las más insolubles tendrán, en el disolvente empleado, un R_f próximo a cero, mientras las más solubles se acercarán a uno. En esta práctica la determinación de aminoácidos se basa en la reacción específica de éstos con la ninhidrina, formando un compuesto de intenso color púrpúreo (Figura 1). Sólo la prolina da una coloración amarilla.

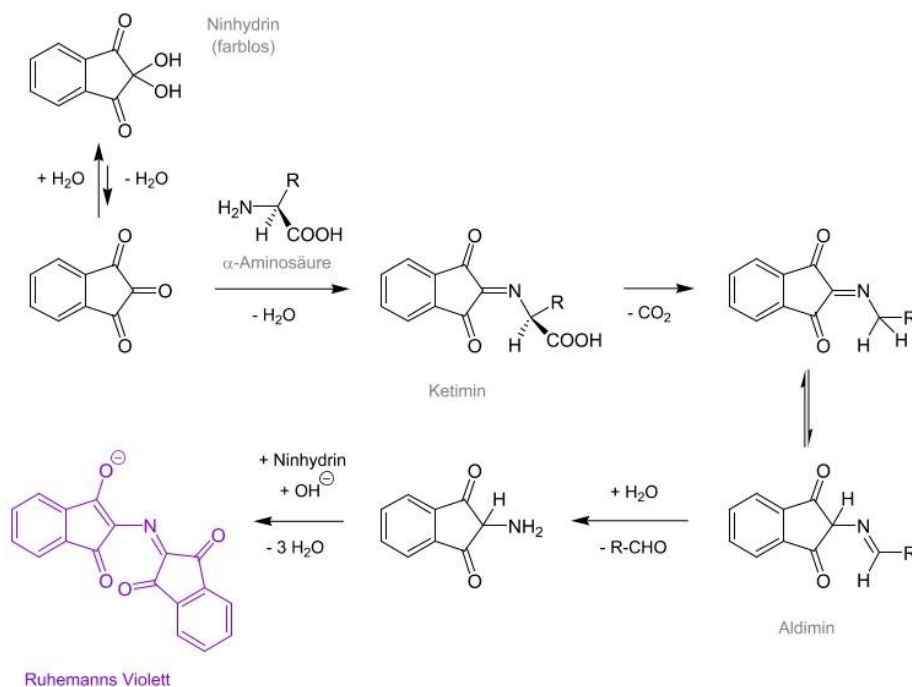




Fig. 1: Reacción de la ninhidrina con α -aminoácidos

Material

Equipos	Cantidad
Cámara para cromatografía en papel (5 x 9 x 4 cm) o vaso de precipitado (500 mL) y placa de Petri (vidrio)	0,5
Horno o plancha (100 °C)	2 / grp
Fase estacionaria	Cantidad
Placa de silica-gel* (4 x 7 cm)	1

* En caso de no conseguir silicagel utilizar papel filtro Whatman No. 3 (4 cm ancho por 7 cm de largo)

Reactivos	Cantidad	Reactivos	Cantidad
Ninhidrina: 1% en etanol (70 %) 	5 mL	Estándar aminoácidos (0,05%):	0,1 mL
Fase móvil: butanol (X) - ácido acético glacial () - A. dest. [8:1:1]	10 mL	Ala, Arg, Asp, Gly, Val	
		Soln. problema (muestra)	0,1 mL
Material	Cantidad	Material	Cantidad
Atomizador	1 / grp	Lápiz No. 2	1
Pinza para crisol	1	Regla (10 cm)	1
Tubos capilares 5 µL	4		

Método

1. Vaciar en la cámara cromatográfica unos 0,5 cm de fase móvil y taparla por 20 min para que se sature la cámara con vapor del solvente. Campana de extracción.
2. Tomar una placa de silicagel y señalar suavemente con el lápiz de grafito (suave) una línea recta a 1,0 cm de distancia del borde en el eje de las ordenadas. No hay que tocar la parte de la silica gel de la placa o papel con las manos, porque se contaminaría con aminoácidos procedentes de las manos (Figura 2-A). No hay que utilizar bolígrafo ni rotulador.
3. Marcar 6 puntos de descarga sobre la línea recién trazada, el primero a 0,5 cm del borde de las abscisas y el resto a 0,5 cm de distancia entre ellos.
4. Con un tubo capilar adicionar gotas en cada punto correspondiente de los estándares y la muestra y dejar secar (Figura 2-B).
5. Colocar la placa de silicagel en la cámara y cerrarla (Figura 2-C).
6. Dejar que corra hasta que la fase móvil llegue aproximadamente 1 cm antes del fin de la placa (aproximadamente 20 min).
7. Sacar la placa de silicagel de la cámara cromatográfica y marcar inmediatamente con el lápiz hasta donde llegó la fase móvil en la placa. Posteriormente dejar secar dentro de la campana de extracción.

8. Rociar la placa de silicagel con ninhidrina al 1% en la campana de extracción, tomando las precauciones correspondientes como cubrebocas, gafas de seguridad y guantes
10. Permita que se seque y una vez terminada esta operación llevarla al horno a un temperatura de 95 °C por 5 min para revelarla
11. Retirar del horno con unas pinzas para crisol y permitir que se enfríe

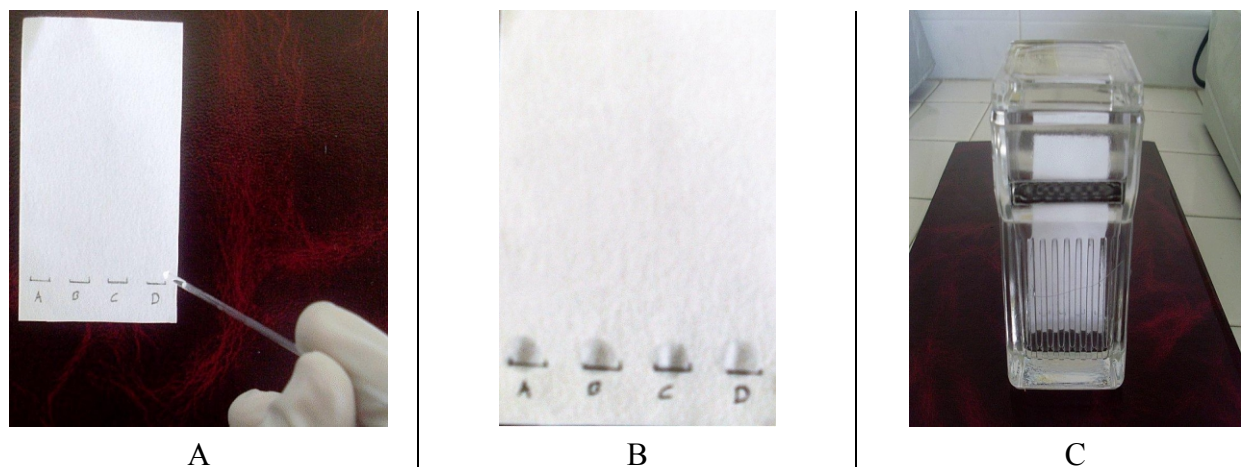


Fig. 2: Método de aplicación de muestra en cromatografía en capa fina en sílica gel o papel. A) Distribución y aplicación de muestra. B) Una vez aplicada la muestra se deja secar. C) Colocación de la placa en la cámara cromatográfica

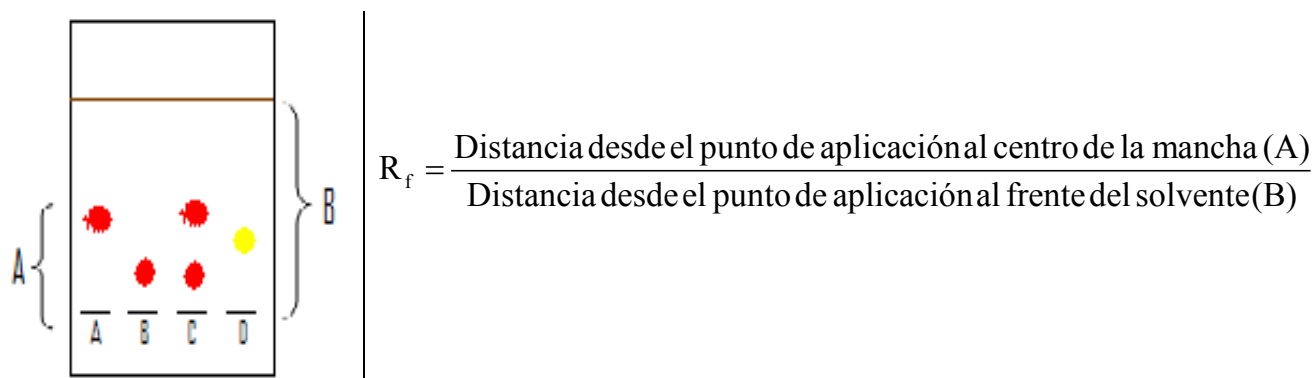


Fig. 3: Toma de distancias para el cálculo de R_f

Resultados

1. Identificar los aminoácidos que están presentes en la muestra (dibujar o colocar fotografía de la placa teñida con ninhidrina).
2. Medir los valores de R_f de cada uno de los aminoácidos (Figura 3).

Discute la reacción de detección así como la utilidad de los solventes.

Bibliografía

1. Salzer, R., S. Thiele, C. Zimmerer, A. Zuern (last update: 05/2019): Dünnschichtchromatographie. Chemgapedia (Wiley-VCH). <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/duennschichtchromatographie.vlu.html>
2. Stadlbauer, W. (2012): Chromatographische Trennverfahren in der Organischen Chemie, Teil Dünnschichtchromatographie. Universität Graz. http://boch35.uni-graz.at/~sta/lehre/chrom_seminar/files/sta-chrom-skriptum.pdf

Cuestionario

1. Especifique el peso molecular [g/mol], temperatura de fusión [°C], temperatura de ebullición [°C], estado físico a 25 °C, densidad [g/cm³] y solubilidad [g/l] de los reactivos utilizados (tabla). Además, indique para los solventes su polaridad y la presión de vapor [kPa] a temperatura ambiente (tabla) así como para los aminoácidos su hidrofobicidad (tabla). Calcule la preparación de las soluciones [g/l] resp. [ml/l].
2. Explique con un ejemplo los principios de separación: adsorción, intercambio iónico, exclusión y afinidad.
3. Esquematice los tipos de cromatografía (fase móvil y estacionaria típica) para HPLC, TLC, GC
4. Explique para la TLC (sílica): separación, selectividad, Polarity index, Solvent strength; fronteras- $\beta(\gamma)$, efecto de evaporación, efecto de condensación/precipitación y series eluotrópicas (5 solventes).

Mecanismo de Evaluación

Véase: página 7.

Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional

La solución de ninhidrina al 1 % en 70 % etanol es inflamable, evitar rociar cerca de mecheros, en caso de causar un incendio apagar con agua o con extintor tipo CO₂. También causa irritación en piel y vías aéreas, el tratamiento en el primer caso es lavar con abundante agua tibia la superficie de la piel y secar; para el segundo caso retirar a la persona de la fuente de contaminación y que tome aire fresco. En caso de derrame colóquese guantes de caucho nitrilo y limpie el área afectada con papel absorbente, colóquelo en un recipiente, el cual deberá ser entregado debidamente etiquetado y tapado al profesor de la clase para que lo confine a un contenedor para residuos sólidos que contengan componentes orgánicos.

El butanol es inflamable, así que debe evitarse trabajar cerca de fuego. Es nocivo al contacto con ojos y piel, en caso de contacto enjuagar con abundante agua. Si se ingiere se producen síntomas similares a la intoxicación por etanol (dolor de cabeza, náuseas, vómito, etc.), debe llevarse a la

persona lo antes posible al servicio médico de emergencias o bien llamarlos para que vayan al lugar del incidente.

El ácido acético glacial es corrosivo, en caso de derrame vaciar sobre carbonato hidrogenado, una vez neutralizado disolver con abundante agua. Es un fuerte irritante de piel y ojos, si alguien llega a entrar en contacto con esta sustancia enjuagar con agua. Se debe usar guantes de neopreno. En caso de ingestión provoca dolor de garganta y dolor abdominal, evitar el vómito y llamar al servicio médico de emergencia.

Disposición de Desechos Físicos, Químicos y Biológicos

Los desechos líquidos se deben neutralizar con base a pH 5 - 10 y después se pueden coleccionar en un contenedor para solventes orgánicos. Del papel de cromatografía se tiene que dejar evaporar los solventes dentro de la campana de extracción y se puede utilizar pegándola en el protocolo.

Práctica No. 4

Extracción de DNA

Tipo de práctica: Por equipo

Tiempo de duración: 2 h

Objetivo




Extraer e identificar el DNA genómico de un tejido animal.

Introducción

El ácido desoxirribonucleico (DNA) es la molécula que guarda la información genética de todo el organismo y se encuentra en el núcleo de cada célula. Con información genética se refiere a la información para sintetizar las proteínas, que dan los signos de vida a la célula, y el RNA, que se requiere para la síntesis de las proteínas. El DNA del ser humano tiene una longitud de casi 2 m; para que se pueda guardar en un núcleo de aprox. 5 μm , se requiere diferentes niveles de compactación (también llamado "condensación"); para esto se requiere proteínas básicas como las histonas pero también proteínas no-histónicas como los (chromosome) scaffold-proteins.

Para poder analizar el DNA de organismos, hay que aislarlo. Primeramente se rompe las membranas, tanto celulares como del núcleo con un detergente. Después, una solución hipertónica facilita la precipitación del DNA con etanol.

Material

Material	Cantidad	Reactivos	Cantidad
Hígado (trae estudiante)	~20 g	96 % EtOH (desnaturalizado)  	60 ml
Mortero (frío)	1	10 % SDS 	2 ml
Pipetas de 1 ml	2	2 M NaCl, frío	40 ml
Probeta de 100 ml	1	Arena (fina): trae estudiante	
Probeta de 50 ml	1	<i>Aqua destillata</i> (<i>A. dest.</i>)	50 ml
Embudo (ancho) o malla (mejor si lo trae el estudiante)	1		
Algodón, gasa o tela para filtrar (trae estudiante)			
Vasos de precipitados (100 + 250 ml)	1 + 1		
Varilla de vidrio o madera (trae estudiante)	1		

Método

Extracción del DNA

1. Pesar el tejido
2. Triturar medio hígado (~20 g) en un mortero frío (4 °C)
3. Añadir arena para que se puedan romper las células mejor al triturar
4. Añadir al triturado 40 mL de *A. dest.* (4 °C). Remover hasta hacer una papilla o puré
5. Filtrar varias veces sobre una tela, gasa o algodón para separar los restos de tejidos que hayan quedado por romper
6. Medir el volumen del filtrado con una probeta (~30 mL)
7. Añadir al filtrado un volumen igual de 2 M NaCl (4 °C)
8. Añadir 2 mL de SDS, mezclar suavemente
9. Añadir mediante una pipeta un volumen igual (~60 mL) de etanol frío (4 °C). Hay que hacerlo de forma que el alcohol resbale por las paredes del vaso y se formen dos capas
10. Introducir una varilla de vidrio e ir removiendo en la misma dirección. Sobre la varilla se van adhiriendo unas fibras blancas, visibles a simple vista, que son el resultado de la agrupación de muchas fibras de DNA
11. Resuspenderlas en 1 mL de *A. dest.* y almacenar la solución a -20 °C para la siguiente práctica

Resultados

1. Explique detalladamente el por qué de cada paso del experimento.

Bibliografía

1. Nordell, K.J., A.M.L. Jackelen, S.M. Condren, G.C. Lisensky, A.B. Ellis (1999): Liver and Onions - DNA extraction from animal and plant tissue. *J. Chem Edu.* vol. 75, p. 400A-B
2. Wesley, A. (1994): Extraction of DNA (Chap. 12). Laboratory Manual. *Pearson Prentice Hall.* p. 65-70

Cuestionario

1. Dibuje (a mano) las purinas y pirimidinas, que se encuentra en la célula. Explique las formas tautómeras y cuáles pares de bases estas formas tautómeras forman.
2. Qué es un palíndromo y de un ejemplo de mínimo 10 nt (para una secuencia de DNA)
3. Defina supercoiled, histona, nucleosoma, solenoide, cromatina
4. Explique 5 diferentes métodos para tener del DNA

Mecanismo de Evaluación

Véase: página 7.

Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional

El hígado es un tejido no es tóxico, es un alimento y por eso no se requiere medidas de seguridad especiales.

El etanol es una sustancia inflamable. Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas. Como está clasificado como solvente, se recomienda utilizarlo en la campana de extracción con guantes en caucho nitrilo, PVC o Viton y lentes protectores. Puede causar, náuseas, vómito y mareo. En caso de contacto con la piel, lavar abundantemente con agua. Si se inhala, trasladar a la persona al aire libre. En contacto con los ojos lavar con mucha agua manteniendo los párpados abiertos. Si se ingiere, beber agua abundante. Provocar vómito.

Disposición de Desechos Físicos, Químicos y Biológicos

Los desechos se pueden tirar al desagüe. Se debe lavar con mucha agua para evitar olores desagradables. Los portaobjetos se pueden lavar con abundante agua y los cubreobjetos colocarlos en el contenedor de objetos punzocortantes. El azul de metileno puede tirarse al desagüe. Si existen residuos de hígado, se depositan en una bolsa de plástico, se cierra bien y se tira en la basura.

Práctica No. 5

Cuantificación y cualificación de DNA

Tipo de práctica: Por equipo

Tiempo de duración: 2 h

Objetivo

Determinar la pureza y concentración de DNA.

Introducción

En general, los π -electrones de enlaces dobles absorben luz en el rango ultravioleta, mientras para la excitación de los σ -electrones, de los enlaces simples, se requiere todavía más energía. En consecuencia, luz UV no destruye macromoléculas como el DNA, pero puede modificar las bases nitrogenadas, que contienen varios enlaces dobles. Como en el DNA se tiene guardado la información genética, modificaciones de ella son consideradas mutaciones y pueden causar cancer (en primer lugar de la piel - el órgano que más radiación recibe). En el laboratorio se puede aprovechar esta característica para determinar la presencia y la concentración de ácidos nucleicos en una solución, midiendo la absorbancia a 260 nm. También otras macromoléculas contienen enlaces dobles, p.ej. los aminoácidos aromáticos que se encuentra en las proteínas; estas tienen un máximo de absorción a 280 nm. Poniendo en relación las absorbancias de 260 y 280 nm, se puede determinar la pureza de una solución de ácidos nucleicos (típicamente se refiere a DNA) - es decir cuanto "contaminación" por proteínas asociadas a él todavía contiene.

Material

Material	Cantidad	Reactivos	Cantidad
Tubo Eppendorf (1,5 ml)	3	<i>Aqua destillata</i>	5 ml
Micropipeta, 100 & 1000 μ l	2 / grp		
Puntas, cesto		Equipo	
Celda de cuarzo	2 / grp	Espectrofotómetro (240-800 nm)	1

Método

1. Descongelar la solución de DNA extraída como se indica en la práctica anterior
2. Diluir el DNA 1:10, 1:40 y 1:100 con *A. dest.* (cada 1 ml)
3. El blanco será el *A. dest.*
4. Determinar la absorbancia a 260 y 280 nm

Resultados

1. Calcule la concentración del DNA en solución, la concentración del DNA en el hígado.
2. Calcule la pureza del DNA aislado.
3. Discuta errores probables por contaminaciones (¿cuáles?).

Extr. DNA	Dilución	A ₂₆₀	A ₂₈₀	²⁶⁰ / ₂₈₀	c (DNA)	DNA total
	1:10				µg/ml	µg
	1:50				µg/ml	µg
	1:100				µg/ml	µg

Bibliografía

1. Oxford Gene Technology (2011): Understanding and measuring variations in DNA sample quality. https://www.ogt.com/resources/literature/483_understanding_and_measuring_variations_in_dna_sample_quality
2. Held, P.G. (2001): Nucleic acid purity assessment using A₂₆₀/A₂₈₀ ratios. Biotek Application note

Cuestionario

1. ¿Para qué extraer DNA? De ejemplos de usos y aplicaciones.
2. ¿Qué función tiene la PCR y las enzimas de restricción?
3. ¿Qué provoca la desnaturalización del DNA?
4. ¿Por qué para DNA (puro) la relación ²⁶⁰/₂₈₀ no puede ser mayor a 2?

Mecanismo de Evaluación

Véase: página 7.

Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional

Las soluciones en esta práctica no son tóxicas.

Disposicion de Desechos Físicos, Químicos y Biológicos

Los desechos líquidos se pueden tirar al desagüe.

Los desechos sólidos se pueden tirar a la basura normal.

