Taller de Ingeniería Genética

Actividades Presenciales Enero 2022

Equipo Docente (ED):

Profesores:
Coordinadores: Dra. Jennifer Alcaíno (JA) y Dr. Marcelo Baeza (MB)

Ayudantes:
Sebastián Campusano (SC)
Fernando Gutiérrez (FG)
Yosbany Pérez (YP)
Maximiliano Venegas (MV)

Carrera: Ingeniería en Biotecnología Molecular.

Horario: Viernes 07 de enero 2022; 09:00-14:00 hrs (aproximadamente)

Lugar: Laboratorios Docentes

Normas de seguridad y trabajo en el laboratorio.

Los laboratorios contienen riesgos de diversa índole, por lo que las personas que trabajan en su interior DEBEN usar la vestimenta adecuada mientras se realiza el trabajo de laboratorio. No se debe trabajar en el laboratorio si no hay un instructor presente. Algunos de los productos químicos utilizados son tóxicos, mutagénicos o teratogénicos. *Si usted cree que tiene un problema de salud que lo expone a un riesgo excepcional, o cree usted que está embarazada, acérquese a los profesores para discutir el tema en privado antes de iniciar con la actividad.* Para evitar accidentes se debe tener presente los riesgos asociados al trabajo con materiales peligrosos, por ello es **obligatorio** leer cuidadosamente la guía de trabajos prácticos antes de cada actividad y es responsabilidad del estudiante tener claridad de las actividades que realizará. Si tiene dudas, **consulte**. Se recomienda elaborar un esquema que incluya todas las actividades y los pasos que seguirá en cada sesión práctica. El equipo docente se reserva el derecho de NO permitir el ingreso al laboratorio de estudiantes que no han leído la guía de trabajos prácticos, como también la realización de pruebas de entrada si lo considerasen necesario.

A continuación, se exponen una serie de normas que deben cumplirse en el laboratorio:

Vestimenta:

- Es **obligatorio** el uso de delantal, sin él, no se le permitirá al estudiante realizar la actividad práctica.
- Utilice **pantalones largos y zapatos cerrados**, intentando que su vestimenta **NO** deje al descubierto áreas considerables de su piel.
- Si usted tiene el **pelo largo**, debe mantenerlo **recogido** todo el tiempo que trabaje en el laboratorio.
- No use **accesorios personales** (**pulseras, collares**, **bufandas, etc)** durante la actividad práctica que puedan causar riesgos de accidentes mecánicos, químicos o incendio. Si los trae, se le solicitará que los guarde hasta terminar la actividad.

Comportamiento:

- Está estrictamente **prohibido fumar**, **beber o comer** en el laboratorio.
- NO dejar artículos personales en el mesón de trabajo, solo lo imprescindible para la realización del trabajo práctico (guía, cuaderno, lápiz y material de trabajo). Deje sus artículos personales en el lugar destinado para ello.
- NO sacar reactivos o material de trabajo fuera del laboratorio.
- NO tocar los **productos químicos** con las **manos**. Use pipetas, papel, espátulas, etc. En ocasiones se solicitará utilizar **guantes de nitrilo,** lo cual se informará oportunamente.
- NO manipular **productos inflamables** (éter, alcohol, etc.) en presencia de fuego. Mantenga el **mechero** apagado, enciéndalo sólo cuando lo vaya a utilizar.
- Infórmese de los **elementos de seguridad** (**lavaojos, extintor, salidas de emergencia**, etc.) en el laboratorio.
- NO llevar a la **boca** ni **inhalar** ningún **material ni reactivo de laboratorio**. Nunca debe **pipetear** con la **boca**, utilice el material diseñado para aquello.
- No está permitido: correr en laboratorio, distraer a sus compañeros, visitas de compañeros/amigos, sentarse en las mesas de trabajo, etc.

Normas de trabajo:

Trabajo individual y grupal: Como parte de su formación es muy importante aprender a trabajar en forma **individual**, como también formando parte de un **equipo de trabajo**. El **respeto** entre sus compañeros/as y con sus supervisores es **fundamental**. El trabajo en equipo implica un grupo de personas trabajando de manera coordinada en la ejecución de una tarea (su **grupo de trabajo**). Su **grupo de trabajo** responderá por el resultado final y no cada uno de los integrantes de forma independiente. El espacio en los laboratorios es escaso, respete el espacio de sus compañeros/as.

Cada **grupo de trabajo** debe trabajar con orden y limpieza, manteniendo el área de trabajo limpia y ordenada. El grupo siempre debe actuar responsablemente: trabajar sin prisas y concentrados en lo que están haciendo.

Cada **grupo de trabajo** será **responsable** del **material** que se le asigne. En caso de **pérdida o daño**, el grupo deberá responder de ello. Antes de empezar a trabajar, revise y confirme su correcto funcionamiento.

Se recomienda que se lave las manos frecuentemente: antes, durante y **siempre** después de terminar su práctica de laboratorio.

Al finalizar la sesión de trabajo práctico se debe entregar el material y debe dejar su puesto de trabajo limpio y ordenado.

Los residuos **líquidos no contaminantes** se deben desechar por los desagües, dejando correr suficiente agua, pues muchos de ellos pueden ser corrosivos. Los **residuos contaminante**s deberán verterse a los recipientes correspondientes que estarán indicados en el laboratorio. Todos los **desperdicios sólidos** y papeles deberán colocarse en los bidones de basura, el material de vidrio roto deberá descartarse en el recipiente especial para ese efecto.

Actividades Prácticas.

Actividad 1: Transformación de *E. coli*. **Protocolo e Indicaciones en página 7.**
Actividad 2: Extracción de DNA plamidial (miniprep). **Protocolo e Indicaciones en página 10.**
Actividad 3: Gel de agarosa. **Protocolo e Indicaciones en página 11.**

Nota: Para evitar el exceso consumo de papel, a cada pareja de trabajo sólo se le proporcionará en papel una copia de las páginas 7, 10 y 11 de esta guía para que puedan seguir los protocolos e indicaciones durante el desarrollo de las actividades.

***Tabla*. Cronograma de trabajo**

Horario (aproximadamente)	**Actividad**
09:00	Citación estudiantes
09:30-10:00	Indicaciones Generales
10:00-10:30	**Actividad 1:** Transformación (primera parte: demostrativa hasta dejar incubando por 1 h a 37ºC).
10:30-11:30	**Actividad 2:** Miniprep (primera parte: hasta dejar precipitando DNA a -20ºC en etanol absoluto).
11:30-12:00	**Recreo (Desinfección Laboratorios)**
12:00-12:30	**Actividad 1:** Transformación (segunda parte: siembra en placas).
12:30-13:00	**Actividad 2:** Miniprep (segunda parte: centrifugar DNA, secar y suspender).
13:00-13:15	**Actividad 3:** Gel de agarosa (preparar la muestra para cargar gel).
13:15-fin	**Actividad 3:** Gel de agarosa (Cargar gel: los y las estudiantes serán llamados de a uno para que c/u cargue su muestra en el gel).

Laboratorio Química 1: Grupos 1 a 8
Laboratorio Química 2: Grupos 9 a 16
Laboratorio Biología 1: Grupos 17 a 24
Laboratorio Biología 2: Grupos 25 a 28
Laboratorio Biología 3: Grupos 29 a 34

Técnicas básicas para la manipulación de microorganismos.

Trabajo en condiciones de esterilidad.

El trabajo estéril se consigue fundamentalmente de dos formas:

Mechero: Trabajar cerca de la llama de un mechero, ésta genera una zona estéril de 20cm de diámetro dentro de la cual se deben realizar todos los pasos experimentales.

Cámara de flujo laminar: Habitáculo que es atravesado por una corriente de aire estéril (horizontal y vertical)

La transferencia aséptica de un cultivo desde un recipiente a otro solamente es satisfactoria si no se introducen microorganismos contaminantes durante el proceso. Una transferencia puede implicar el traspaso de microorganismos desde una colonia aislada en una placa de medio sólido a un tubo de caldo de cultivo, o a inocular varios medios (sólidos o líquidos) desde un caldo de cultivo.

El procedimiento general es como se indica a continuación:

Desinfección del área de trabajo. El área de trabajo se trata primero con un desinfectante para matar cualquier microorganismo que pueda estar presente. Cuando se ha finalizado el trabajo, el área de trabajo nuevamente debe ser tratada con desinfectante para asegurar la eliminación de cualquier microorganismo depositado durante los procedimientos.

Asas curvas y rectas. El transporte de microorganismos se realiza con un asa de inoculación curva o recta. Para su esterilización se debe aplicar calor exponiéndola directamente a la llama del mechero de Bunsen, hasta que adquiera un color rojo incandescente.

Es muy importante para el traspaso de cultivos de un medio a otro, realizar la operación en condiciones de esterilidad, teniendo el cuidado de no contaminar la fuente desde donde se tomará la muestra y el medio donde serán traspasados. **En esta actividad práctica, usted sembrará una muestra de una transformación de *E. coli* en placas con la ayuda de un rastrillo de vidrio. En la Figura 1, se muestran los pasos a seguir para este procedimiento.**

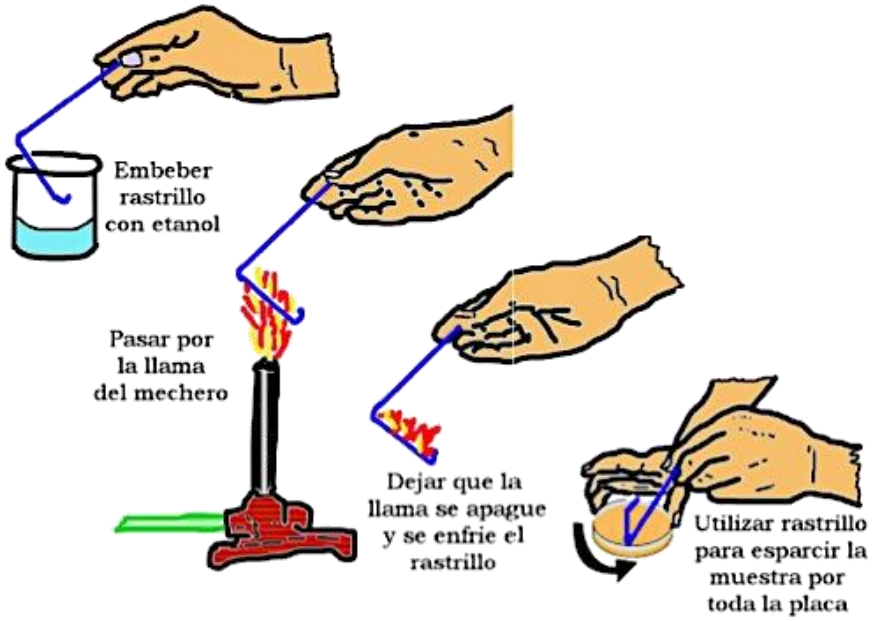

Fig. 1. Siembra con rastrillo.

Actividad 1: Transformación genética y selección de transformantes de *E. coli.*

Transformación.

La transformación génica ser refiere la introducción de material genético a una célula. En nuestro caso el material a introducir corresponde a un plásmido en el cual hemos insertado un fragmento de DNA. Existen varios protocolos de transformación y la elección dependerá principalmente de la célula que se desea transformar (bacteria, levadura, células eucariontes superiores). Los métodos más utilizados son la transformación química y la electroporación. Todos los protocolos de transformación se pueden dividir en A) la preparación de células competentes y B) la transformación propiamente tal.

Transformación química.

Dentro de la transformación de tipo químico existen varios protocolos, pero el principio básico es el mismo. Se utiliza cationes divalentes para neutralizar la membrana celular que posee carga negativa y de esta forma permitir que el DNA, también de carga negativa, pueda adherirse a la superficie celular. Una vez que esto ha ocurrido se induce un stress transitorio en las células el cual crea poros por los cuales puede ingresar el DNA.

Utilización de plásmidos como vectores de clonado y selección de transformantes.

Los plásmidos son replicones que son heredados establemente como entidades extracromosómicas y son ampliamente utilizados como vehículos o vectores de clonado. La mayoría de los plásmidos existen como moléculas de DNA de doble hebra circulares.

Para que un plásmido pueda ser utilizado como vector de clonado debe cumplir con ciertos requisitos básicos:

1) Bajo peso molecular: esto permite su fácil manipulación ya que es menos sensible al estrés mecánico y facilita su aislamiento.

2) Habilidad para conferir al hospedero un fenotipo fácilmente detectable, que facilita la selección de las células que portan el vector. La propiedad más utilizada es la resistencia a antibióticos, de modo que después de la transformación, las células son sembradas sobre placa con antibióticos y solo se desarrollaran colonias desde aquellas células que han incorporado el plásmido.
3) Sitios de corte únicos para enzimas de restricción, de preferencia en genes que confieren selección.
4) Habilidad para replicarse en el hospedero.

El plásmido pBS (Fig. 2) confiere resistencia al antibiótico ampicilina (amp) y el sitio de reconocimiento de varias enzimas de restricción, se encuentran en el gen *lacZ* (que codifica a beta-galactosidasa). La enzima beta-galactosidasa puede metabolizar al compuesto 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido (X-gal) generando un producto azul. Por lo tanto, todos los transformantes serán resistentes a amp, pero aquellos transformantes recombinantes son de color blanco, ya que no hidrolizan al compuesto X-gal.

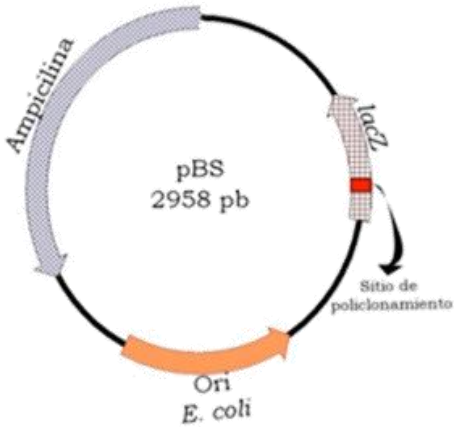

Fig. 2. Mapa del plásmido pBluescript (pBS).

Protocolo.

Transformación de E. coli mediante cloruro de calcio:

Obtención de células competentes:

1. Crecer la cepa de *E. coli* a transformar durante una noche en medio LB líquido a 37°C con agitación (inóculo).
2. Inocular 20 ml de medio LB líquido con 0,2 ml del inóculo.
3. Incubar a 37°C con agitación hasta alcanzar DO_{600}= 0,5-0,6
4. Enfriar el cultivo en hielo durante 5 a 10 min. Mantener las células en hielo durante todos los pasos siguientes.
5. Centrifugar a 4000 g por 5 min. Eliminar sobrenadante.
6. Suspender las células en 10 ml de $CaCl_2$ 100 mM fría.
7. Centrifugar a 4000 g por 5 min. Eliminar sobrenadante.
8. Suspender en 10 ml de $CaCl_2$ 100 mM fría.
9. Incubar en hielo durante 30 min.
10. Centrifugar a 4000 g por 5 min. Eliminar sobrenadante.
11. Suspender en 1 ml de $CaCl_2$ 100 mM fría y dividir en fracciones de 100 µl (12-14 alícuotas).

Transformación:

1. Agregar el volumen de DNA transformante a células competentes.
2. Incubar en hielo durante 30 min.
3. Dar pulso de calor a 42 ºC durante 2 min.
4. Enfriar en hielo por 1 min.
5. Adicionar 1 ml de medio LB.
6. Incubar a 37 ºC durante 45 min a 1 h.
7. Sembrar en placas con medio semi-sólido con los suplementos adecuados.
8. Incubar a 37 ºC hasta el desarrollo de colonias (16 h aprox.).
9. Analizar las colonias.

<u>Indicaciones Actividad 1:</u>

Las células competentes fueron preparadas previamente por los ayudantes del curso. Para la transformación, los pasos 1 a 6, serán realizados de manera demostrativa por los ayudantes. Los y las estudiantes continuarán con los siguientes pasos.

Transformaciones para realizar:

1) *E. coli* sin plásmido
2) *E. coli* + pBS sin inserto
3) *E. coli* + pBS con inserto
4) *E. coli* + reacción de ligado pBS/*Eco*RV + fragmento de DNA compatible con sitio *Eco*RV. (*E. coli* + ligado).

Cada transformación será sembrada en placas con medio LB (medio no selectivo) y en placas con medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y 32 µg/ml X-gal (medio selectivo; placas LB/A/X). Cada estudiante sembrará 2 placas (100 µl en c/u) de acuerdo con lo indicado en la Tabla de la siguiente página.
****Rotule sus placas con su nombre, número de grupo y la transformación (1, 2, 3 o 4) que está sembrando.***

Tabla: **Organización Siembra de Transformación**

Grupo	Siembra	Grupo	Siembra	Grupo	Siembra	Grupo	Siembra
1	*E. coli* sin plásmido (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	11	*E. coli* + pBS sin inserto (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	21	*E. coli* + pBS con inserto (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	31	*E. coli* + ligado (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)
2	*E. coli* sin plásmido (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	12	*E. coli* + pBS sin inserto (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	22	*E. coli* + pBS con inserto (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	32	*E. coli* + ligado (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)
3	*E. coli* sin plásmido (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	13	*E. coli* + pBS sin inserto (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	23	*E. coli* + pBS con inserto (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	33	*E. coli* + ligado (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)
4	*E. coli* sin plásmido (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	14	*E. coli* + pBS sin inserto (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	24	*E. coli* + pBS con inserto (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	34	*E. coli* + ligado (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)
5	*E. coli* sin plásmido (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	15	*E. coli* + pBS sin inserto (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	25	*E. coli* + ligado (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	35	*E. coli* + ligado (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)
6	*E. coli* sin plásmido (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	16	*E. coli* + pBS sin inserto (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	26	*E. coli* + ligado (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	36	*E. coli* + ligado (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)
7	*E. coli* sin plásmido (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	17	*E. coli* + pBS con inserto (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	27	*E. coli* + ligado (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	37	*E. coli* + ligado (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)
8	*E. coli* sin plásmido (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	18	*E. coli* + pBS con inserto (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	28	*E. coli* + ligado (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	38	*E. coli* + ligado (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)
9	*E. coli* + pBS sin inserto (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	19	*E. coli* + pBS con inserto (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	29	*E. coli* + ligado (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	39	*E. coli* + ligado (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)
10	*E. coli* + pBS sin inserto (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	20	*E. coli* + pBS con inserto (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	30	*E. coli* + ligado (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)	40	*E. coli* + ligado (2 placas LB y 2 placas LB/A/X)

Actividad 2: Purificación de DNA plasmídico desde bacterias.

Purificación de DNA plasmídico.

Dependiendo del volumen de cultivo celular y cantidad de DNA que se desea obtener, los métodos de purificación de DNA plasmídico (Fig. 3) se dividen en miniprep (1 a 10 ml de cultivo), midiprep (20 a 100 ml de cultivo) y maxiprep (200 a 1000 ml de cultivo). La única diferencia entre estos métodos es el volumen de reactivos utilizados y básicamente constan de 3 etapas.

i) *Lisis celular:* las células se suspenden en una solución isotónica [solución I (lisis)] que contiene lisozima, enzima que degrada la pared celular. Posteriormente se adiciona una solución básica que contiene el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS) [solución II], el cual producirá la lisis de las células desprovistas de su pared celular.

ii) *Neutralización y desproteinización.* Se adiciona una solución salina [solución III (neutralización)] con la cual se precipitan las proteínas básicas. Las proteínas que aún quedan en la fase acuosa son removidas mediante repetidas extracciones con una solución que contiene fenol. Debido a que el fenol puede afectar los experimentos que se realicen con el DNA obtenido este debe ser retirado, lo cual se logra mediante extracciones con una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico.

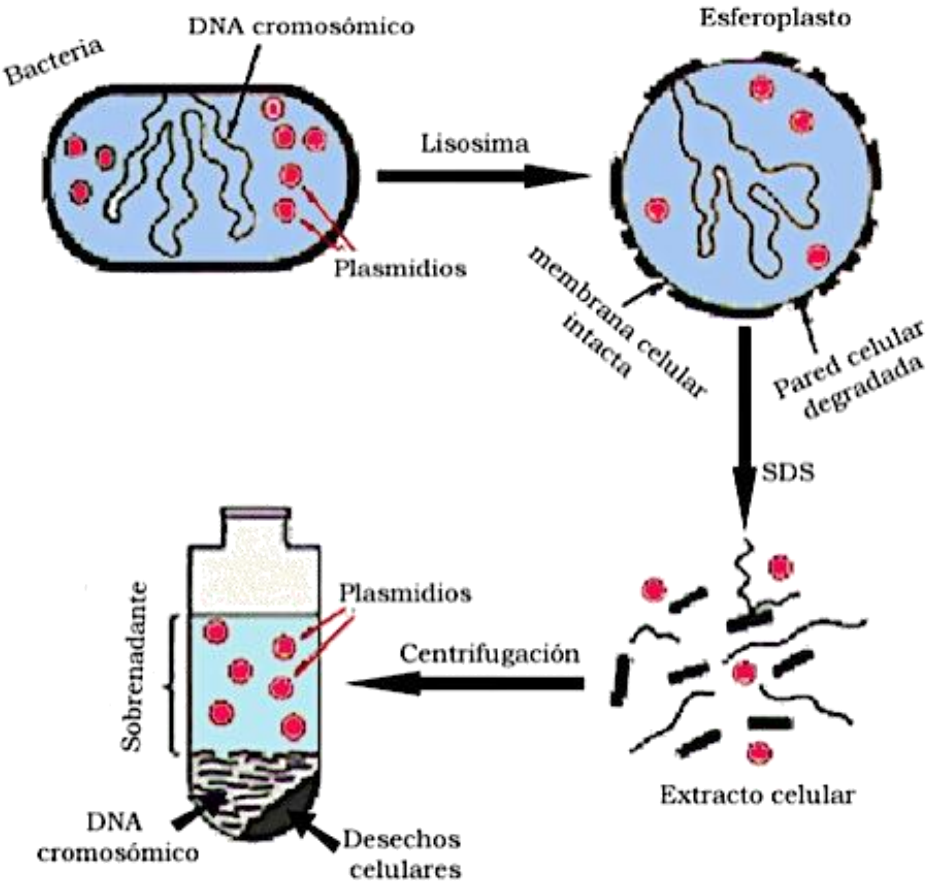

Fig. 3. Purificación de DNA plasmídico

iii) *Precipitación de DNA.* El DNA se precipita mediante la adición de etanol absoluto e incubación a -20 ºC por al menos 2 h, seguido de una centrifugación a 14.000 g. El precipitado de DNA es lavado y suspendido en agua o buffer libre de nucleasas que contiene RNasa A para eliminar el posible RNA contaminante.

Protocolo Miniprep.

1. Adicionar 1,5 ml del cultivo en un tubo Eppendorf estéril.
2. Centrifugar 1 min en microcentífuga y eliminar el sobrenadante.
3. Repetir pasos 1 y 2 en el mismo tubo.
4. Suspender en 100 µl de solución I con lisozima (4 mg/ml) e incubar 5 min a temperatura ambiente.
5. Adicionar 200 µl de solución II, mezclar invirtiendo el tubo 3 veces suavemente.
6. Incubar en hielo por 5 min.
7. Adicionar 150 µl de solución III y mezclar invirtiendo el tubo 3 veces suavemente.
8. Incubar en hielo durante 5 min.
9. Centrifugar en microcentrífuga por 5 min y transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
10. Agregar 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) y agitar en vórtex por 30 s.
11. Centrifugar 1 min en microcentrífuga y transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
12. Repetir los pasos 10 y 11.
13. Agregar 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v/v) y agitar en vórtex por 15 s.
14. Centrifugar 1 min en microcentrífuga y transferir la fase acuosa a un tubo limpio
15. Agregar 2 volúmenes (800 a 1000 µl) de etanol a -20 ºC e incubar a -20 ºC durante 30 min.
16. Centrifugar 15 min en microcentrífuga y eliminar el sobrenadante
17. Secar el tubo y suspender los ácidos nucleicos en H_2O o buffer TE RNasa A (30 µg/ml).
18. Incubar 30 min a 37 ºC.
19. Analizar el DNA mediante electroforesis en gel de agarosa.

Solución I	**Solución II**	**Solución III**	**Buffer TE.**
50 mM glucosa	0,2 N NaOH	(3M potasio; 5M acetato)	10 mM Tris-HCl
10 mM EDTA	1% SDS	5 M acetato de potasio (60 ml)	1 mM EDTA-Na
25 mM Tris-HCl		Ácido acético glacial (11,5 ml)	pH 8,0
(4 mg/ml lisozima)		H_20 (28,5 ml)	
pH 8,0			

Indicaciones Actividad 2:

Cada estudiante realizará una extracción de DNA plamidial desde *E. coli*. Se le entregará células de *E. coli* que portan el plásmido pBS. Proceda según el protocolo de Miniprep para su aislamiento. Para efectos de esta actividad práctica los pasos 1 al 3 fueron realizados por los ayudantes previamente, de modo que usted debe comenzar a partir del paso 4. Además, se omite el paso 12 y usted solo debe continuar el protocolo hasta el paso 15. Una vez adicionado el etanol, rotule bien su tubo y entréguelo a los ayudantes quienes dejarán incubando a -20ºC.

****Rotule su tubo con el Nº de Grupo y sus iniciales.***

Luego de incubar a -20ºC por 30 min, continuar con los pasos 16 a 19. En el paso 17, suspenda su DNA en 30 µl de buffer TE.

Actividad 3: Gel de Agarosa

Separación y análisis de moléculas de DNA mediante electroforesis en gel.

La electroforesis en gel no solo es usada con fines analíticos, sino que también es usada rutinariamente en forma preparativa para la purificación de fragmentos de DNA específicos. El gel puede estar compuesto de poliacrilamida o agarosa. La agarosa es conveniente para separar fragmentos de DNA en el rango de unos pocos cientos de pares de bases a cerca de 20 kpb (Fig. 4). Para fragmentos de DNA muy pequeños se prefiere la poliacrilamida. Las moléculas de DNA son separadas en el gel de acuerdo con su tamaño debido principalmente al paso a través de los poros de la matriz.

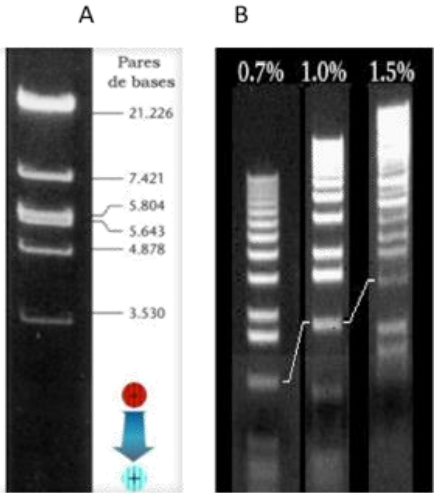

Fig. 4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa. La dirección de migración es indicada por la flecha (A). En B se muestra la migración del DNA en geles de distintas concentraciones de agarosa.

Preparación y corrida de un gel de agarosa.

1. Preparar la solución de agarosa al 1 % en buffer TAE, disolver la agarosa por calentamiento hasta ebullición.
2. Enfriar la solución a 60-65°C y agregar bromuro de etidio (u otro compuesto que permita la visualización del DNA) a una concentración final de 0,5 mg/ml.
3. Verter sobre un molde con "peineta" de espaciadores de aproximadamente 0,6 mm.
4. Colocar el gel en la cámara de electroforesis. El gel debe quedar sumergido en el buffer de corrida.
5. Preparar las muestras a cargar con buffer de carga 6X en una proporción de 5:1.
6. Cargar en los pocillos del gel y correr las muestras a un voltaje constante de 70-80 V.
7. Una vez finalizada la electroforesis las bandas de DNA se observan bajo luz UV.

Visualización del DNA en geles de agarosa.

El bromuro de etidio se acompleja con el DNA mediante la intercalación entre las pares de bases para luego visualizar el DNA bajo un transiluminador UV a una longitud de onda de 302 nm. También se pueden utilizar otros compuestos comerciales como SafeView Nucleic Acid Stain (NBS 20 Biologicals) para este efecto.

Determinación de tamaños moleculares.

Para determinar el tamaño molecular de los fragmentos de DNA se debe construir una curva de calibración utilizando estándares de peso molecular como el DNA del bacteriófago lambda digerido con la enzima *Hind*III. Este estándar posee 8 fragmentos cuyos tamaños son conocidos: 23,1 – 9,5 – 6,5 – 4,4 – 2,3 – 2,0 – 0,56 – 0,12 kpb (Fig. 5). El fragmento más pequeño (0,12 kpb) no se observa en los geles.

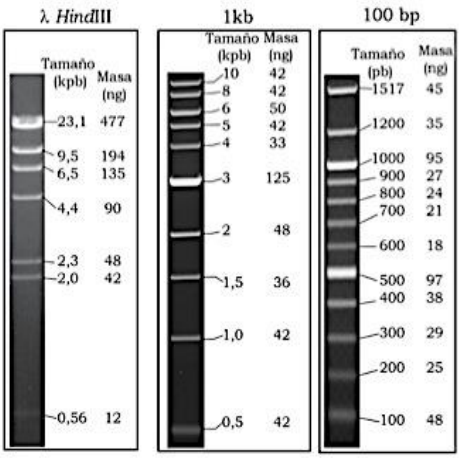

Fig. 5. Estándares de DNA comúnmente utilizados en biología molecular.

<u>Indicaciones Actividad 3:</u>

Cada estudiante cargará un pocillo en un gel de agarosa la muestra de ácidos nucleicos que obtuvo en la Actividad 2.

Prepare su muestra para cargar el gel de la siguiente manera: 20 µl de la muestra más 4 µl de buffer de carga 6X (proporción 5:1). De esta muestra, cargue 15 µl en el pocillo del gel de agarosa.