



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-30

DIRECCIÓN DE POSGRADO

INSTRUCTIVO para el correcto llenado del formato SIP-30,
Registro o Actualización de Unidades de Aprendizaje (UAP)

El formato SIP-30 es un formulario PDF interactivo, el cual puede ser completado en forma electrónica con un lector de archivos PDF (Adobe Reader 9 o superior). Para facilitar la identificación de los campos del formulario, haga clic en el botón Resaltar campos existentes, en la barra de mensajes del documento. Si lo prefiere, puede imprimir el formato y completarlo a máquina de escribir o a mano.

El nombre de los campos y las áreas designadas para requisitar la información son autoexplicativos; sin embargo se tienen instrucciones específicas para campos de interés especial:

CAMPO	INSTRUCCIONES																		
1.5 Número de semanas por semestre del programa	Es el número de semanas lectivas efectivas al semestre, indicadas en el acuerdo de creación del programa académico o en alguna actualización posterior del programa. En caso de haber tenido una actualización en este sentido, la misma deberá haber sido presentada y avalada en reunión del Colegio de Profesores de la Unidad Académica, además de haber sido aprobada por la SIP. El rango de semanas lectivas al semestre es mínimo 15 y máximo 18.																		
1.7 Tipo de horas	Las unidades de aprendizaje, en cuanto a las horas asignadas, están clasificadas como: Teóricas, Prácticas y Teórico-prácticas. Estas denominaciones son excluyentes, es decir, las unidades de aprendizaje solo pueden ser de un solo tipo, no pueden tener horas combinadas.																		
1.8 Número de horas - semana	Es el número de horas asignadas para ser impartida la Unidad de Aprendizaje a la semana.																		
1.8 Total de horas al semestre	Es el número de horas totales a impartir de la Unidad de Aprendizaje al semestre. Se calcula multiplicando el campo 1.5 (Número de semanas) por el campo 1.8 (Número de horas-semana)																		
1.9 Créditos (Reglamento de Estudios de Posgrado 2017) Este campo se calcula automáticamente cuando el formato se requisita electrónicamente	<p>FÓRMULA DE CÁLCULO</p> <table border="1"><thead><tr><th>Tipo de Curso</th><th>Criterio</th><th>Créditos</th></tr></thead><tbody><tr><td>Teórico</td><td>16 hrs. = 1 crédito</td><td>(horas totales / 16)</td></tr><tr><td>Teórico-práctico</td><td>16 hrs. = 1 crédito</td><td>(horas totales / 16)</td></tr><tr><td>Práctico</td><td>16 hrs. = 1 crédito</td><td>(horas totales / 16)</td></tr><tr><td>Seminario</td><td>16 hrs. = 1 crédito</td><td>(horas totales / 16)</td></tr><tr><td>Estancia especial de aprendizaje</td><td>16 hrs. = 1 crédito</td><td>(horas totales / 16)</td></tr></tbody></table> <p>No deben asignarse fracciones, los créditos deben redondearse.</p>	Tipo de Curso	Criterio	Créditos	Teórico	16 hrs. = 1 crédito	(horas totales / 16)	Teórico-práctico	16 hrs. = 1 crédito	(horas totales / 16)	Práctico	16 hrs. = 1 crédito	(horas totales / 16)	Seminario	16 hrs. = 1 crédito	(horas totales / 16)	Estancia especial de aprendizaje	16 hrs. = 1 crédito	(horas totales / 16)
Tipo de Curso	Criterio	Créditos																	
Teórico	16 hrs. = 1 crédito	(horas totales / 16)																	
Teórico-práctico	16 hrs. = 1 crédito	(horas totales / 16)																	
Práctico	16 hrs. = 1 crédito	(horas totales / 16)																	
Seminario	16 hrs. = 1 crédito	(horas totales / 16)																	
Estancia especial de aprendizaje	16 hrs. = 1 crédito	(horas totales / 16)																	
3.2 Temario	Debe organizarse por temas y subtemas, indicando la dedicación de horas en la segunda columna. La suma de horas debe coincidir con las horas indicadas en el campo (1.6) y deberá indicarse al final del desglose del temario.																		

El formato SIP-30 deberá estar firmado por el Director o Jefe de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Unidad Académica. La ausencia de dicha firma invalida la solicitud.

Para Mayor información Consultar las siguientes páginas WEB:

<http://www.ipn.mx/normatividad/Paginas/reglamentos.aspx>
<http://www.ipn.mx/CCS/Gacetas/Paginas/inicio.aspx>



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-30

DIRECCIÓN DE POSGRADO

FORMATO GUÍA PARA REGISTRO DE UNIDADES DE APRENDIZAJE (UAP)
- NUEVAS O ACTUALIZACIÓN -

Tipo de solicitud

Nueva UAP

Actualización

UNIDAD ACADÉMICA

I. DATOS DEL PROGRAMA Y DE LA UAP

1.1 NOMBRE DEL PROGRAMA:

1.2 COORDINADOR DEL PROGRAMA:

1.3 NOMBRE DE LA UAP:

1.4 CLAVE:

(Para ser llenado por la SIP)

1.5 NÚMERO DE SEMANAS POR SEMESTRE DEL PROGRAMA:

1.6 TIPO DE UAP:

OBLIGATORIA

OPTATIVA

1.7 TIPO DE HORAS:

TEORÍA

PRÁCTICA

TEORICO - PRÁCTICA

SEMINARIO

ESTANCIA
ESPECIAL DE
APRENDIZAJE

1.8 NÚMERO DE HORAS - SEMANA:

TOTAL DE HORAS AL SEMESTRE:

1.9 CRÉDITOS (Reglamento de Estudios de Posgrado 2017):

1.10 FECHA DE ELABORACIÓN DEL PROGRAMA DE LA UAP:

DD MM AAAA

1.11 SESIÓN DEL COLEGIO DE PROFESORES EN QUE SE ACORDÓ
LA IMPLANTACIÓN DE LA ASIGNATURA:

FECHA:

DD MM AAAA



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
DIRECCIÓN DE POSGRADO

SIP-30

II. DATOS DEL PERSONAL ACADÉMICO A CARGO DEL DISEÑO O ACTUALIZACIÓN DE LA UAP

2.1 COORD. DEL DISEÑO O ACTUALIZACIÓN DE LA UAP:

CLAVE:

2.2 PROFESORES PARTICIPANTES EN EL DISEÑO O ACTUALIZACIÓN DE LA UAP: (MÁXIMO 4)

CLAVE:

CLAVE:

CLAVE:

CLAVE:

III. DESCRIPCIÓN DEL CONTENIDO DEL PROGRAMA DE LA UAP

3.1 OBJETIVO GENERAL:

3.2 COMPETENCIAS DEL PERFIL DE EGRESO A LAS QUE CONTRIBUYE:



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
DIRECCIÓN DE POSGRADO

SIP-30

3.4 REFERENCIAS DOCUMENTALES:

A large, empty rectangular box with rounded corners and a thin green border, intended for listing document references.

3.5 PROCEDIMIENTOS O INSTRUMENTOS DE EVALUACIÓN A UTILIZAR:

A large, empty rectangular box with rounded corners and a thin green border, intended for listing evaluation procedures or instruments.

Práctica 1.- Cálculos

Introducción

El uso de herramientas de biología molecular requiere de cálculos que permitan la preparación cuidadosa de distintos reactivos necesarios. Por lo anterior, se dedicará la primera práctica a recordar fórmulas y procedimientos que serán usados a lo largo del curso para la preparación de las soluciones que se emplearán en las distintas prácticas.

Objetivo

Que el alumno recuerde diversos procedimientos y fórmulas que le permitirán elaborar los reactivos que se usarán en las prácticas del curso.

Problemas

1. Para determinar la eficiencia de transformación de células competentes de *Escherichia coli*, se calcula el porcentaje de las clonas que tuvieron inserto respecto al total de clonas obtenidas. Tomando en cuenta lo anterior, calcular la eficiencia de transformación de las clonas usadas si el total de clonas fue de 418, de las cuales 320 tuvieron inserto.
2. Para realizar extracción de ADN plasmídico se necesita preparar la solución buffer P1. Este buffer debe tener RNAsa en una concentración final de 100 µg/mL. Calcular cuántos microlitros de RNAsa se necesitan para preparar 100 mL de buffer P1 si la RNAsa a usar (stock) tiene una concentración de 100 mg/mL.
3. Se necesita hacer dos soluciones buffer (1 y 2) para realizar los lavados a una membrana en una hibridación tipo Southern.

Haz cálculos correspondientes para preparar 150 mL de buffer 1 y 2 de acuerdo a los datos del siguiente cuadro:

Reactivos a usar:	Concentración Stock	Concentración final en el buffer 1	Cantidades a agregar (mL)	Concentración final en el buffer 2	Cantidades a agregar (mL)
SSC	20X	1X		0.5X	
SDS	10%	0.1%		0.1%	
H ₂ O	-	Ajustar		Ajustar	

4. Para multiplicar bacterias transformantes se necesitan preparar cajas petri con medio LB y usar ampicilina como antibiótico. El medio LB (200 mL) ya está preparado y estéril, solo hay que agregarle el antibiótico. El stock de ampicilina tiene una concentración de 500 mg/mL. Generalmente, se preparan alícuotas del antibiótico a una concentración más baja para ser usadas para preparar el medio de cultivo. Con esta información:
 - a. Calcular cuántos microlitros se necesitan para preparar 1 mL de ampicilina a una concentración 100 mg/mL (alícuota).
 - b. El medio de cultivo LB debe tener una concentración de ampicilina de 100 µg/mL. Calcular cuántos microlitros de la alícuota se le deben adicionar a los 200 mL de medio de cultivo.
5. Se requiere preparar medio de cultivo PDA. Calcular las cantidades que se necesitan de los siguientes reactivos para preparar 200 mL de medio PDA:

Reactivos	Cantidades para preparar un litro de medio	Cantidades para preparar 200 mL de medio
Trozos de papa	150g	
Dextrosa	15g	
Agar	20g	

6. Se va a realizar una PCR para amplificar un fragmento de gen. Calcular las cantidades que se necesitan de los siguientes reactivos para un volumen final de reacción de 25 μ L:

Reactivo	Concentración Stock	Concentración final en la reacción	Volumen a agregar
Buffer	10 X	1 X	
MgCl ₂	30 mM	1.5 mM	
dNTP's	200 mM	10 mM	
Primer	250 pM	20 pM	
DNA	444.16 ng/ μ L	80 ng/25 μ L	
H ₂ O	-	Ajustar	
Taq	5 U/ μ L	1 U/25 μ L	
Total	-	-	25 μL

7. Calcular las cantidades de reactivos que se necesitan para preparar 100 mL de NaCl 1M y 100 mL de MgCl₂ 0.5M. Consulte su tabla periódica para obtener las masas moleculares de ambos compuestos.
8. Calcular las cantidades de reactivos para preparar 50 mL de solución CTAB al 3% (con este nombre se conoce toda la solución). Esta solución se usa para extracción de ADN y las concentraciones de reactivos se muestran en la siguiente tabla.

Reactivo	Concentración final en la solución	Masa molecular del reactivo (en caso de necesitarlo)	Cantidad a agregar
Tris.HCl	100 mM		g
EDTA	20 mM		g
CTAB	3%		g
NaCl	1.4 M		g
β -Mercaptoetanol	0.2%		μ L
Agua	Ajustar		mL

Fórmulas químicas: Tris.HCl (C₄H₁₁NO₃. HCl); EDTA (C₁₀H₁₆N₂O₈)

9. Para disolver ADN de virus es necesario preparar 300 mL de buffer TNE 1X. Realizar los cálculos correspondientes:

Reactivo	Masa molecular	Concentración final en la solución TNE 1X	Cantidad a agregar
Tris.HCl		10 mM	
NaCl		10 mM	
EDTA		0.1 mM	

Práctica 2. Extracción y cuantificación de ADN

Introducción

ADN es la abreviatura del ácido desoxirribonucleico (en inglés, ADN). Constituye el material genético de los organismos. Es el componente químico primario de los cromosomas y el material del que los genes están formados.

Ahora se sabe que las “instrucciones” moleculares del ADN dirigen la vida de todas las células de un organismo y confieren a cada una sus características especiales. El ADN también permite a los organismos, o a las células de un organismo, transmitir información con precisión de una generación a la siguiente.

Para la extracción de ADN es necesario conocer su estructura, y ubicación dentro de la célula.

Objetivo

Que el estudiante conozca los fundamentos básicos para la extracción de ADN utilizando un método de extracción estándar.

Materiales y métodos

a) Material

- Tejido vegetal recién colectado o congelado
- Par de guantes
- Pistilos de plástico estériles
- Gradilla
- Puntas para micropipeta automática de 10, 200 y 1000 μ L estériles
- Micropipetas
- Toallas de papel estériles
- Tubos eppendorf de 1.5 mL estériles
- Vortex
- Microcentrífuga
- Termoblock
- Termómetro
- Celdas espectrofotométricas de cuarzo

b) Reactivos

- Buffer de extracción (NaCl 0.5 M, Tris HCl 0.2 M, EDTA 10mM, SDS 1%, pH 7.5)
- Acetato de amonio 7.5 M
- Cloroformo
- Isopropanol

- Etanol 70% (-20 °C)
- Buffer TE 1X (Tris HCl 1 M, EDTA 0.5 M, pH 8)
- Agua bidestilada estéril
- RNAsa

c) Procedimiento de extracción

1. Macerar 100 mg de tejido vegetal con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y seco.
2. Resuspender el tejido en 600 μ L de Buffer de extracción (0.5 M NaCl, 0.2 M Tris HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 1% SDS).
3. Incubar la suspensión durante una hora en un termoblock a una temperatura de 65 °C.
4. Adicionar a cada muestra 300 μ L de Acetato de Amonio 7.5 M, agitar y dejar a temperatura ambiente por 10 minutos.
5. Adicionar a cada muestra 300 μ L de cloroformo y agitar.
6. Centrifugar las muestras a 12000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Recupera el sobrenadante en un nuevo tubo (600 μ L) al cual se le agregan 600 μ L de isopropanol, agitar e incubar a (-20 °C) por 10 min.
8. Centrifugar los tubos a 12000 rpm durante 15 minutos a 0°C.
9. Lavar el precipitado con 800 μ L de etanol 70% (a -20 °C), agitar y centrifugar por 5 minutos a 12000 rpm a 0 °C.
10. Decantar y secar a temperatura ambiente durante 1 hora.
11. Resuspender el precipitado en 100 μ L de Buffer TE 1X (Tris HCl 1M, EDTA 0.5M).
12. Agregar a cada muestra 2 μ L de RNAsa.
13. Conservar el ADN a 4 °C hasta su utilización.

d) Procedimiento de la cuantificación de ADN

1. Colocar en una de las celdas de cuarzo 1992 μ L de agua destilada.
2. Tomar 8 μ L de ADN extractado y diluir en volumen anterior de agua destilada.
3. Obtener la lectura en el espectrofotómetro a 230, 260 y 280 nm, calibrando el equipo con agua destilada.
4. Anotar la absorbancia obtenido y calcular los ratios de las A260/230 y A260/280 (Tabla 1).
5. Calcular la concentración de ADN a partir de la siguiente ecuación:

$$C \text{ (ng/}\mu\text{L)} = (A_{260} * 50 \text{ ng/}\mu\text{L} * \text{Factor de diluci3n}) / 1 A_{260}$$

6. Calcular que cantidad de soluci3n de ADN (en buffer TE 1X) se debe tomar para obtener 100 μL de soluci3n a una concentraci3n de 2 ng/ μL (Tabla 2).
7. Diluir su muestra para obtener 50 μL de soluci3n (2 ng/ μL).

Tabla 1. Absorbancias y ratios de muestra de ADN a 230, 260 y 280 nm

Muestra	A_{260}	A_{230}	Tasa-Ratio 260/230
Muestra	A_{260}	A_{280}	Tasa-Ratio 260/280

Tabla 2. Absorbancia a 260 nm de muestra de ADN, concentraci3n y volumen de agua a tomar para diluir a 2 ng/ μL

A_{260}	ADN (ng/ μL)	ADN (buffer TE 1X) a tomar (μL)	Vol. Agua inyectable (μL)

Bibliograf3a recomendada

Henr3quez, N.M.A. 2000. Diversidad gen3tica de *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris utilizando marcadores moleculares. Tesis Ing. Agr3nomo. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. 102 p.

Pr3ctica 3: Extracci3n de ARN

Introducci3n

Las c3lulas contienen dos formas de 3cidos nucleicos, el 3cido desoxirribonucleico (DNA) el 3cido ribonucleico (ARN). Las mol3culas de ARN est3n involucradas en la expresi3n del material gen3tico (ADN) y son los productos iniciales de la expresi3n de un gen para la s3ntesis de prote3nas.

El conocimiento de la estructura, metabolismo y modo de acci3n del ARN en la s3ntesis de prote3nas es fundamental para entender el control de la expresi3n gen3tica, divisi3n celular, crecimiento y desarrollo de los organismos.

Objetivo

Que el estudiante conozca y realice la extracción de ARN vegetal y los visualice en una corrida de electroforesis.

Materiales y Métodos

a) Materiales

- Tejido vegetal recién colectado o congelado
- Par de guantes
- Mortero y pistilo estériles
- Gradilla
- Puntas para micropipeta automática de 10, 200 y 1000 µl estériles
- Micropipetas
- Toallas de papel estériles
- Tubos eppendorf de 1.5 ml estériles
- Vortex
- Microcentrífuga

b) Reactivos

- RNA Reagent INVITROGEN
- NaCl 5 M
- Cloroformo
- Isopropanol
- etanol al 75%
- Agarosa 1%
- TAE 1X

c) Procedimiento

- 1.- Seleccionar algunas hojas de plantas y moler en mortero con nitrógeno líquido
- 2.- Colocar la muestra en tubos Eppendorf de 1.5 mL
- 3.- Adicionar 0.5 mL del reactivo de extracción (RNA Reagent INVITROGEN) y mezclar con vortex hasta suspender
- 4.- Incubar en posición horizontal a temperatura ambiente por 5 min.
- 5.- Centrifugar a 10,000 rpm durante 2 min
- 6.- Transferir el sobrenadante a otro tubo Eppendorf y adicionar 0.1 mL de NaCl 5 M. Mezclar con vortex
- 7.- Adicionar 0.3 mL de cloroformo y mezclar por inversión

8.- Centrifugar a 12,000 rpm por 15 min.

Página 7 de 8

9.- Transferir la fase acuosa a otro tubo Eppendorf y adicionar isopropanol al mismo volumen de la fase acuosa, mezclar por inversión

10.- Incubaron a temperatura ambiente por 30 min

11.- Centrifugar a 12,000 rpm por 10 min y decantar el sobrenadante

12.- Adicionar 1 mL de etanol al 75% y centrifugar a 12,000 rpm por 5 min

13.- Decantar el sobrenadante y secar la pastilla a temperatura ambiente

14.- Resuspender la pastilla en 30 μ L de H₂O

Electroforesis en gel

1.- Preparar gel de agarosa al 1% en TAE 1X

2.- Vaciar la agarosa con bromuro de etidio en la cámara de electroforesis

3.- Llenar la cámara con TAE 1X (Buffer de corrida) para cubrir la placa

4.- Colocar muestra en los pozos

5.- Correr el gel a 60 voltz

6.- Visualizar en transiluminador

Bibliografía recomendada

Snustad, P y M. J. Simmons.2000 . Plinciples of Genetic. 2nd ed.Wiley.USA.

Barrera–Pacheco A, Joaquín–Ramos AJ, Torres–Pacheco I, González–Chavira MM, Pérez–Pérez MC, Guevara–Olvera L, Guevara–González RJ (2008) Análisis de la expresión transcripcional inducida bajo condiciones de estrés biótico y abiótico en *Capsicum chinense* BG–3821. *Agrociencia* 42:95-106.

Práctica 4: PCR tiempo real y Transcripción reversa por PCR

Introducción

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), es una técnica para la síntesis "in vitro" de secuencias específicas de ADN. Consiste en una forma simple y muy rápida de multiplicar el ADN presente en diferentes muestras biológicas (millones de copias). Fue una técnica ideada por el Dr. Kary Mullis, la cual se le adjudicó el Premio Nobel de Química en 1993.

El Dr. Mullis se basó en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la ADN polimerasa para crear la región doble cadena usando los denominados cebadores

(primers). Se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas: desnaturalización del ADN, hibridación de los cebadores a la hebra y extensión de la cadena.

En este sentido, la amplificación por PCR ha asegurado su uso en la detección de ARNm con baja abundancia en células y tejidos. Una técnica más sensible es una modificación de la misma conocida como RT-PCR y permite tanto la detección como la cuantificación de ARNm, ya que puede cuantificar los genes presentes en tan solo unos cientos de copias por muestra y por ello se ha convertido en el método de elección para análisis de expresión de genes. La técnica consta de dos partes: 1) síntesis de ADN complementarios (ADNc) a partir de ADN, mediante una transcripción reversa usando la polimerasa denominada transcriptasa reversa (que utiliza como molde una molécula de RNA a la que se le unió el oligo dt utilizado como iniciador (es un oligonucleótido sintético polideoxitimidina), 2) y la amplificación de un ADNc específico mediante PCR con un par de iniciadores específicos de un fragmento de interés, obteniendo una gran cantidad de copias de ADN del fragmento. La amplificación del producto de la PCR se comprueba mediante electroforesis en gel.

El método requiere poco ARN y difiere del Northern blotting en que puede usar ADN degradado y fragmentos de ARN intacto dentro de la región de interés. Una vez que es obtenido el ADNc se realiza una reacción de PCR

Objetivos

- Realizar la síntesis de ADNc a partir de RNA total extraído de *Arabidopsis thaliana*.
- Detectar la expresión del gen de Actina2.

Materiales y métodos

Etapa1: Retro-Transcripción PCR

1. Etiquetar tubos de 200 μ L (para PCR).
2. Colocar 2,000 ng/ μ L de ARN total en tubo marcado e incorporar 0.5 μ L de Oligo dT.
3. Aforar a 12 μ L con agua libre de nucleasas (Tabla 1). Incubar la mezcla a 65°C por 10 min y enseguida colocar en hielo.

Tabla1. Cálculos requeridos para realizar la primera mezcla de reacción (Incubación con Oligo dT).

Muestra	ng/ μ L ARN	μ g/ μ L	Para 2 μ g	Oligo dT	Agua a un vol total de 12 μ L
1	1182 ejem				
2					
3					
4					
5					

4. Preparar la mezcla de reacción para RT (Tabla 2).
5. Incorporar 8 μ L de esta segunda muestra al tubo de PCR para tener una mezcla final de 20 μ L, colocarla por 60 min a 37° y posteriormente 10 min a 70°.

Tabla 2. Cálculos para la preparación de la segunda mezcla (Incubación con enzima RT).

Reactivo	1X	3X
Buffer RT	6	
dNTP's	1	
Enzima RT	1	

Total	8.0
--------------	-----

*Datos en μL

- Colocar en hielo y cuantificar el ADNc .

Etapa 2: Amplificación de gen de interés por PCR punto final

- Etiquetar tubos de 200 μL (para PCR).
- Preparar la siguiente mezcla de reacción.

Tabla 3. Mezcla para reacción de PCR (ADNc).

Reactivo	1X	5X
Buffer 10X	1.75	9
MgCl₂	0.8	4
dNTP's	0.25	1.5
Iniciador FOR	1	5
Iniciador REV	1	5
cDNA	2 (1000ng)	xxx
Enzimas Taq	0.125	0.625
Agua	18.075	89.8
Total	25	23 + 2 (cDNA)=25

Datos en μL , xxx = incorporación por separado a cada muestra.

- Depositar 23 μL de la mezcla de reacción muestra en un tubo de 200 μL e incorporar 2 μL (1500 ng) de ADNc, para hacer un total de 25 μL por reacción.
- Colocar los tubos de PCR con la mezcla (25 μL) en un termociclador con el siguiente programa: Pre-desnaturalización inicial por 1 min a 94°C, 30 ciclos de: 30 s a 94°C, 30 s a 60°C y 30 s a 72°C, y una extensión final de 2 min a 72°C.
- Cargar el 5 μL del producto de PCR en un gel de agarosa al 1%. Observar y discutir resultados.

Bibliografía recomendada

Joyce, C.2002. **Quantitative RT-PCR:**A Review of Current Methodologies. Methods in Molecular Biology. 193:83-92

Snustad, P y M. J. Simmons.2000 . Principles of Genetic. 2nd ed.Wiley.USA.

Práctica 5. Digestión de ADN por enzimas de restricción

Introducción

Un primer paso en el análisis molecular de un segmento de ADN o de un gen es aislarlo del resto del ADN. El descubrimiento que permitió la tecnología de genética molecular fue el descubrimiento a fines de la década de 1960 de las enzimas de restricción, también conocidas como endonucleasas de restricción. Las endonucleasas de restricción son proteínas que reconocen secuencias cortas de ADN específicas y fragmentan la estructura dúplex, en ocasiones en el sitio diana, o en otro, dependiendo del tipo, lo cual permite cortes específicos. Cada enzima de restricción tiene una diana específica en el dúplex de ADN, usualmente de 4 a 6 pares de bases. Hay secuencias diana específicas para cada enzima de restricción. Estas

enzimas se encuentran naturalmente en bacterias, las cuales las utilizan en la defensa contra los virus. Una bacteria protege su ADN propio de una enzima de restricción, mediante la modificación de la secuencia de reconocimiento habitual por el agregado de grupos metilo. Estas enzimas pueden utilizarse para realizar el mapeo de genes.

Objetivo

Que el alumno conozca y realice procesos de digestión de ADN mediante el uso de enzimas de restricción.

Obtener una digestión completa de un ADN conocido que sirva como marcador molecular mediante enzimas de restricción

Determinar el número de sitios reconocidos por las endonucleasas en ADN de platas de *Capsicum annuum*.

Materiales y métodos

Digestión con enzimas de restricción

Material

Se utilizará ADN de plantas de *Capsicum annuum* y del fago lambda (λ). Las enzimas de restricción a usar serán 2: *EcoRI* y *Hind III*

Procedimiento

Enzimas de restricción

1. La cantidad de cada elemento a utilizar se muestran en el Cuadro 1. El volumen de buffer 10X a usar se calcula de acuerdo al volumen total de la reacción dividido entre 10.

Cuadro 1. Volumen de cada reactivo a medir para la digestión de ADN λ con las enzimas de restricción

	<i>EcoRI</i>	<i>Hind III</i>	<i>EcoRI</i>	<i>Hind III</i>
	Fago λ		<i>Capsicum annuum</i>	
Buffer 10X	2 μ l	2.0 μ l	2 μ l	2 μ l
H ₂ O destilada estéril	15.3 μ l	15.3 μ l		
ADN (fago λ , 0.4 μ g/ μ l)	2.5 μ l	2.5 μ l		
DNA de chile			10 μ g. Volumen se proporcionará en la practicas	
Enzima	0.2 μ l	0.2 μ l	1 μ l	1 μ l
Vol. total	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l

2. En un tubo de PCR nuevo y debidamente etiquetado, se agregarán los diferentes reactivos de la digestión en el siguiente orden:
 - a) Buffer 10X.
 - b) Agua destilada.
 - c) ADN de fago lambda o plantas de chile según sea el caso.
 - d) Enzima de restricción.
3. Incubar 60 min a 37 °C.
4. Dar un pulso en la centrífuga.

5. Tomar 5 μL de la muestra y verificar la digestión en un gel de agarosa al 2 %. Visualizar en un transiluminador. Almacenar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Referencias

Gómez, M y Echenique, V. 2004. Herramientas de ingeniería genética. *In* Biotecnología y mejoramiento vegetal. Ed. Echenique, V., Clara R., Luis M. INTA. Argentina.

Falcon, L. I. y Valera, A. 2007. Extracción de ácidos nucleicos. *In*: Ecología molecular. Com. Eguairte, L. E. Souza, V y Aguirre X. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México

Lewin B. 2008. Genes IX. Mc Graw Hill. México. pp.892

Pierce, B.A. 2011. Fundamentos de genética conceptos y relaciones. Editorial Médica Panamericana. México. pp. 458.

Sambrook, J.; Fritsch E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2^a ed. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Valadez-Moctezuma, E y Güter, K. 2005. Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Ed. Mundi-Prensa Mexico, S. A. de C.V.

Weising, K; Nybom, H; Wolf, K and Kalh, G. 2005 DNA fingerprinting in plant. Principle, method and applications. 2^a ed. Ed. CRC Press. USA.

Práctica 6. Diseño de oligonucleótidos

Introducción

Para la manipulación y análisis de genes se necesitan muchas copias de las secuencias de ADN utilizadas, dado que cada gen es una porción diminuta del ADN celular total, se debe aislar y amplificar antes de poder estudiarlo. Actualmente la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) hace posible la amplificación de fragmentos cortos de ADN sin clonarlos. Para amplificar por PCR se requiere tener un ADN molde y un cebador, primer u oligonucleótido al que puedan agregarse los nuevos nucleótidos. Los cebadores utilizados en la PCR son fragmentos cortos de ADN, generalmente de 17 a 25 nucleótidos de longitud que son complementarios a secuencias conocidas en el molde y su contenido en G+C varía entre 40 y 60 %. La concentración a la que suelen emplearse en una PCR está en el intervalo de 0.1-0.5 μM . Oligos ideales deben carecer lo más posible de estructuras secundarias, así como de complementariedad entre sí. Ambos iniciadores deben tener una temperatura de fusión o T_M similar.

Objetivo

- Que el alumno conozca uno de los procedimientos más utilizados para la construcción de oligonucleótidos
- Entender la importancia y las ventajas que conllevan realizar un diseño adecuado de oligos para la realización de PCR.
- Realizar un diseño de oligonucleótidos con los requerimientos mínimos.

Procedimiento

7. Plática acerca de la importancia y características que se sugieren para el diseño de oligos.

8. Práctica de diseño de oligos de manera manual con apoyo de programas virtuales libres en internet.
9. Practica de diseño en internet con el apoyo de programas virtuales.
10. El reporte consistirá en el diseño de un par de oligos a partir de una secuencia que se trabaje en la práctica y que cumpla con las características y requisitos que se especifiquen durante la misma.

Páginas electrónicas que se utilizaran en la práctica

- Para el análisis de las características de los oligos:
<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>
- Para el alineamiento de los oligos en el Genbank con la aplicación nucleotide blast (ver especificidad):
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Para PCR virtual:
http://www.ch.embnet.org/software/iPCR_form.html
- Para diseño de primer NCBI
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome

Referencias

Abd-Elsalam, A. K. 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. African Journal of Biotechnology. 2 (5): 91-95.

Pierce, B.A. 2011. Fundamentos de genética conceptos y relaciones. Editorial Médica Panamericana. México. pp. 458.

Rodríguez-Sánchez, I. P., & H. A. Barrera-Saldaña. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL 7(3):323-335.

Singh, V. K., and Kumar, A. 2001. PCR primer design. Molecular Biology Today 2: 27-32.