

**GUÍA DE LABORATORIO LCB Y FÍSICA  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR**

<b>ASIGNATURA</b>	<b>BIOLOGÍA</b>		
<b>PROGRAMA</b>	<b>ENFERMERÍA</b>		
<b>PRÁCTICA NO.</b>	<b>5</b>	<b>TÍTULO:</b>	<b>OBSERVACIONES DE ADN Y MITOSIS</b>

### 1. INTRODUCCIÓN

La presente práctica permite observar la mitosis en células vegetales, para ello se utilizan tejidos meristemáticos en los que las células se multiplican constantemente como son las raíces de la cebolla. La extracción de ADN por métodos sencillos permite observar esta macro molécula a simple vista.

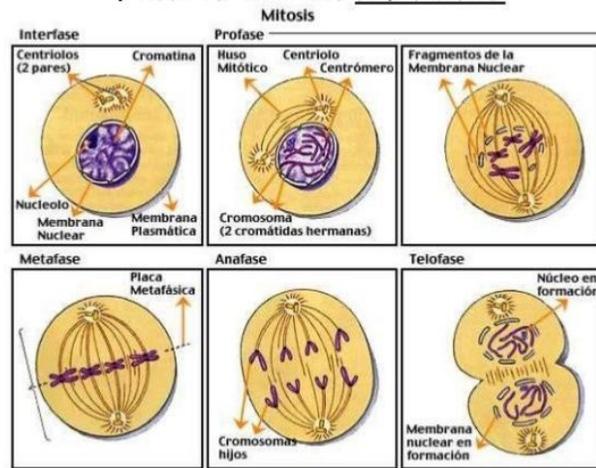
### 2. COMPETENCIAS

- Observar el ADN, cromosomas y estudio de las etapas de la mitosis
- Adquirir experiencia en la utilización de técnicas de procesamiento de tejidos para su estudio con microscopía óptica.

### 3. MARCO TEÓRICO

La mitosis hace parte del ciclo celular, es la reproducción de células somáticas mediante la división del núcleo en dos núcleos hijos y división del citoplasma. En ella, el material genético previamente duplicado se organiza en cromosomas y se reparte equitativamente a las dos células hijas en formación. La raíz de la cebolla es un buen material para observar este proceso, puesto que en el meristemo apical las células se dividen a gran velocidad, lo que aumenta la probabilidad de detectar células en mitosis.

**Figura 1. Fases de la mitosis**



1.

Fuente. Gtush

La orceína, colorante morado que se usa para la observación de las fases de la mitosis, está compuesta en realidad de dos componentes, que se añaden en momentos diferentes. La orceína A reblandece las membranas celulares y la orceína B completa el proceso de tinción del material cromosómico al adherirse a estas estructuras (Chacel, s.f).

### Extracción de ADN

¿Para qué sirve la disolución salina que ponemos en la mezcla?

La sal en disolución actúa disminuyendo la solubilidad de las proteínas, lo que hace que precipiten y se separen más fácilmente del ADN para poder obtenerlo con una mayor pureza.

¿Para qué utilizamos el lavavajillas?

El detergente líquido o el lavavajillas utilizado en el experimento tienen como función destruir las membranas celulares del tejido vivo que estamos utilizando. El detergente disuelve las grasas o lípidos, que es el componente principal de la membrana plasmática y nuclear de las células (es el mismo principio por el que el gel limpia la grasa de nuestra piel). Al romperse las membranas celulares se permite la salida del ADN al exterior.

¿Para qué se utiliza el alcohol?

El ADN es una molécula muy larga y tiende agruparse, de ahí la facilidad para retirarla. Para aislar el ADN hay que hacer que precipite en alcohol, ya que el ADN es soluble en agua, pero cuando se encuentra en alcohol precipita. Por este motivo, nuestras hebras de ADN comienzan a hacerse visibles en la interfase entre la mezcla y el alcohol.

**UNISANGIL**

Además de permitirnos distinguirlo, el alcohol separa el ADN de otros componentes celulares, los cuales quedan en la solución acuosa.

¿Para qué se añade el zumo de piña?

El zumo de piña contiene una enzima denominada papaína. Esta enzima se encarga de atacar y degradar el resto de proteínas y componentes celulares, lo que nos permite separarlos del material que buscamos, nuestro ADN.

**4. EQUIPOS A UTILIZAR EN LA PRÁCTICA**

CANTIDAD	DESCRIPCIÓN
1	Microscopio
1	Balanza

**5. MATERIALES A UTILIZAR EN LA PRÁCTICA**

CANTIDAD	DESCRIPCIÓN
2	Vaso de precipitados capacidad 250ml
2	Tubos de ensayo
1	Pipeta
1	Varilla fina
1	Papel filtro
1	Vidrio de reloj
1	Colador <b><u>traer estudiante</u></b>
1	Tabla de picar <b><u>traer estudiante</u></b>
1	Cuchillo <b><u>traer estudiante</u></b>
1	Batidora <b><u>traer estudiante para el grupo</u></b>
1	Portaobjetos <b><u>traer estudiante</u></b>
1	Bisturí <b><u>traer estudiante</u></b>
1	Trapito <b><u>traer estudiante</u></b>

**6. REACTIVOS REQUERIDOS**

CANTIDAD	DESCRIPCIÓN
----------	-------------



UNISANGIL

120 ml	Agua (destilada o mineral)
2 ml	Alcohol isoamílico a 0°
	Orceína acética
	Ácido clorhídrico
10 gr	Sal de mesa (para el grupo) <b><u>traer estudiante</u></b>
2	Cebolla cabezona (para el grupo) <b><u>traer estudiante</u></b>
30 ml	Detergente liquido de lavar loza con <b>lauril sulfato de sodio</b> (para el grupo) <b><u>traer estudiante</u></b>
5 gr	Zumo de piña <b><u>traer estudiante</u></b>
1 gr	Raíz de cebolla
	Ácido acético al 45%

## 7. PROCEDIMIENTO

### PROCEDIMIENTO 1: Observación de la mitosis en el ápice de la raíz cebolla

1. Elige una raíz joven (de unos 2 cm.), lávala con agua y corta la punta a 5 mm del extremo.
2. Coloca la punta de la raíz en un vaso de precipitado. Para ablandar los tejidos e iniciar la tinción, se cubre la raíz con orceína acética y clorhídrico 1 N en la proporción de 9:1, es decir, 9 gotas de orceína por cada gota de HCl. (Orceína A)
3. La hidrólisis debe hacerse en caliente, a unos 60 °C. Para ello, calienta el vidrio de reloj a la llama del mechero, justo hasta que empiecen a desprenderse tenues vapores, teniendo mucho cuidado de que no hierva (al retirar el vidrio no debe quemar la mano). Retíralo para que se enfríe durante 8 minutos y repite esta operación 3 veces, añadiendo más orceína si hiciera falta, de modo que el líquido cubra en todo momento la punta de la raíz.
4. Saca la raicilla con la aguja enmangada y colócala sobre el portaobjetos.
5. Con la cuchilla corta el ápice a unos 2 mm. El resto se descarta ya que las células meristemáticas se encuentran en el extremo, bajo la cofia.
6. Añade una gota de ácido acético al 45% (orceína B) para terminar de ablandar los tejidos.
6. Limpia con papel de filtro los posibles residuos del colorante.
7. Coloca el cubreobjetos y realiza un squash o aplastamiento. Para ello sitúa la preparación en un papel de filtro doblado y presiona con el dedo pulgar para aplastar el tejido y eliminar el exceso de colorante.



Si al retirar el papel de filtro se ve que la muestra no queda suficientemente aplastada, se puede presionar el cubre en la zona donde está la raicilla con la parte posterior de la aguja enmangada. En cualquier caso hay que evitar que el cubreobjetos se deslice sobre el portaobjetos en el curso de la presión, y se debe conseguir una monocapa de células a través de la que pase la luz.

8. Observar al microscopio. Al principio con un aumento pequeño, para localizar las células meristemáticas mejor teñidas y en un solo plano. Luego, con mayor aumento, tratar de identificar células en cada una de las fases mitóticas.

Como material biológico, en la práctica se describe el procedimiento a partir de raicillas de cebolla, para conseguir raíces en crecimiento, se coloca el bulbo de cebolla (al que previamente se habrán eliminado las raíces secas) sobre un vaso de precipitados (si es necesario se sujeta mediante unos palillos). Se llena el vaso con agua hasta que toque superficialmente la zona donde van a crecer las raicillas. Al cabo de 2 o 3 días empezarán a crecer las raíces.

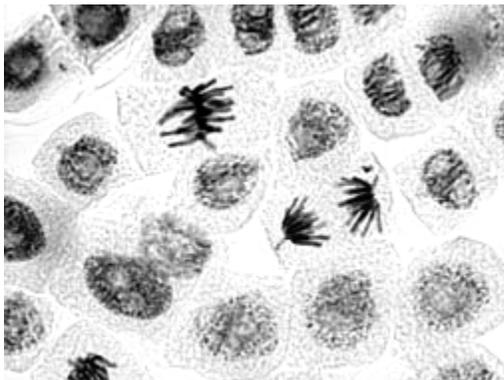
## PROCEDIMIENTO 2: REALIZACIÓN ADN

1. Cortamos la zona central de la cebolla en dados
2. En un vaso de agua echamos 3 cucharaditas de detergente lavavajillas y una de sal y añadimos agua destilada hasta llenar el vaso.
3. Mezclamos esta solución con los trozos de cebolla
4. Licuamos el conjunto, con la batidora, a velocidad máxima durante 30 segundos
5. Filtramos el líquido obtenido con un filtro de café.
6. Llenamos un cuarto de un tubo de ensayo con la disolución filtrada.
7. Añade otro tanto de zumo de piña y mezclamos bien.
8. Añadimos un volumen de alcohol muy frío equivalente al del filtrado, cuidadosamente, haciéndolo resbalar por las paredes del vaso para que forme una capa sobre el filtrado.
9. Dejamos reposar durante 2 ó 3 minutos hasta que se forme una zona turbia entre las dos capas. A continuación, introducimos la varilla y extraemos una maraña de fibras blancas de ADN. Observa el precipitado blanco y filamentoso en la capa de alcohol.
10. Se introduce la punta del asa de bacteriología hasta justo debajo de la separación entre el alcohol y el tampón. Remover el asa hacia delante y hacia atrás y poco a poco se irán enrollando los fragmentos de mayor tamaño de ADN. Pasado un minuto retirar el asa atravesando la capa de alcohol con lo cual el ADN quedará adherido a su extremo con el aspecto de un copo de algodón mojado.



## 8. PREGUNTAS

1. Identificar en la siguiente imagen cada una de las fases de la mitosis



2. Por qué escogemos para el estudio de la mitosis raíces de cebolla
3. ¿Para qué sirvió la orceina en el procedimiento?
4. Explique el procedimiento de extracción de ADN teniendo en cuenta el uso que tiene cada una de las sustancias y procedimientos del experimento.
5. ¿Cuál es la relación entre estos dos procedimientos?

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Paniagua, Ricardo. *Biología Celular*. Segunda Edición. McGraw-Hill. Interamericana. España. 2003.
- Plattner, Hentschel. *Biología Celular*. Panamericana. 2014.
- Salomon Eldra, Berg Linda. Martin Diana. *Biología*. Cengage Learning. México. 2013
- Curtis, Helena, Sue, Barnes, Schenk, Adriana, Massarini, Alicia. *Curtis Biología*. Médica Panamericana. España. 2015
- Galán Rafael y Torrenteras Rafael. *Biología Fundamental y de Salud*. El Sevier. 2015.
- Alberts, Bruce, et al. *Introducción a la Biología Celular*. Panamericana. México. 2016

<i>Elaborado</i>	<i>Carolina Salamanca Leguizamón- Pablo Fuquen</i>	<i>DD</i>	<i>MM</i>	<i>AAAA</i>
<i>Revisado</i>	<i>Unidad de Ciencias Básicas</i>			