



**G. Meca de Caro, J. M. Quiles,
R. Balaña, C. García, M. Álvarez, J. V. Gil**

Herramientas analíticas en Biotecnología



HERRAMIENTAS ANALÍTICAS EN BIOTECNOLOGÍA

Giuseppe Meca de Caro, Juan Manuel Quiles Beses,
Rafael Balaña Fouce, Carlos García Estrada,
María Álvarez Bardón, José Vicente Gil Ponce

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Este texto ha sido publicado en el marco de los programas desarrollados dentro de la «Convocatoria del Ministerio de Educación y Ciencia para la financiación de la adaptación de las instituciones universitarias al Espacio Europeo de Educación Superior» (septiembre de 2006)



Esta publicación no puede ser reproducida, ni total ni parcialmente, ni registrada en, o transmitida por, un sistema de recuperación de información, en ninguna forma ni por ningún medio, ya sea fotomecánico, fotoquímico, electrónico, por fotocopia o por cualquier otro, sin el permiso previo de la editorial. Dirijase a CEDRO (Centro Español de Derechos Reprográficos, www.cedro.org) si necesita fotocopiar o escanear algún fragmento de esta obra.

© Del texto: los autores, 2021

© De esta edición: Universitat de València, 2021

Diseño de la cubierta: Celso Hernández de la Figuera

ISBN: 978-84-9134-897-9 (papel)

ISBN: 978-84-9134-898-6 (PDF)

Depósito legal: V-3312-2021

Edición digital

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. Técnicas microbiológicas en biotecnología	9
1. Bioseguridad en el laboratorio	9
2. Observación al microscopio de preparaciones fijas	12
2.1. Procedimiento	14
3. Preparación de medios de cultivo y la necesidad de practicar la técnica aséptica	15
3.1. Material	16
3.2. Procedimiento	16
4. Observación morfológica de colonias bacterianas	17
4.1. Material	19
4.2. Procedimiento	20
5. Técnicas de inoculación	21
5.1. Material	22
5.2. Procedimiento	22
6. Tinción de microorganismos	23
6.1. Material	25
6.2. Procedimiento (frotis)	25
6.3. Procedimiento (tinción simple)	26
6.4. Procedimiento (tinción de gram)	26
7. Determinación del número de microorganismos esporógenos en alimentos	27
7.1. Material	27
7.2. Procedimiento (frotis)	27
7.3. Tinción scaeffe-fulton (practica tinción de esporas)	28
8. Evaluación de la actividad bacteriostática y bactericida de diversos compuestos	28
8.1. Material	29
8.2. Procedimiento	29
9. Recuento de bacterias heterótrofas totales en suelo. técnica del número más probable ...	30
9.1. Material	31
9.2. Procedimiento	32
10. Identificación molecular de especies de microorganismos	34
10.1. Material	35
10.2. Procedimiento	35
11. Mapas de restricción	38
11.1. Material	38
11.2. Procedimiento	39

12. Evolución de resistencia a antibióticos en <i>escherichia coli</i>	40
12.1. Material	41
12.2. Procedimiento	41
13. Aislamiento y cuantificación de bacteriófagos de <i>vibrio sp.</i> a partir de moluscos (ensayo en placa)	43
13.1. Material	43
13.1.1. Semana 1	43
13.1.2. Semana 2	44
13.2. Procedimiento	44
13.2.1. Semana 1	44
13.2.2. Semana 2	45
CAPÍTULO 2. Biología molecular y celular	49
1. Introducción	49
2. Ácidos nucleicos y proteínas	50
2.1. Estructura del DNA	50
2.2. Estructura del RNA	52
2.3. Estructura de las proteínas	52
3. Replicación transcripción y traducción	55
3.1. Replicación del DNA	55
3.2. El código genético	57
3.2. Transcripción del DNA	58
3.2. Traducción del RNA	58
4. Técnicas básicas de biología molecular	59
4.1. Electroforesis de DNA y proteínas	60
4.1.1. Electroforesis de DNA	60
4.1.2. Electroforesis de proteínas (SDS/PAGE)	61
4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	62
4.3. Blotting	64
4.3.1. Western blotting	64
4.3.2. Southern blotting	65
4.3.3. Northern blotting	66
4.4. Clonación	66
4.4.1. Uso de enzimas de restricción	68
4.4.2. Ligado de extremos cohesivos	68
5. Técnicas básicas de biología celular	69
5.1. Cultivos de células de mamífero	70
5.2. Citometría de flujo	71
5.3. Técnicas microscópicas	73
5.3.1. Microscopía de fluorescencia	73
5.3.2. Inmunofluorescencia	74
5.3.3. Inmunohistoquímica	74
5.3.4. Bioimagen	76
5.3.5. Microscopía de cámara-rápida (time-lapse)	77

5.4. Silenciamiento génico	77
5.4.1. Oligonucleótidos antisentido	77
5.4.2. RNA de interferencia	77
5.4.3. 3' utr y microRNAs	79
5.4.4. CRISPR/cas9	79
6. Conclusiones	79
CAPÍTULO 3. Proteómica y peptidómica	81
1. Introducción	81
2. Proteómica basada en geles	84
2.1. Electroforesis monodimensional (1-DE)	84
2.2. Electroforesis bidimensional (2-DE)	84
3. Proteómica basada en sistemas libres de geles	88
3.1. Proteómica de análisis masivo o “shotgun”	88
3.2. Técnicas para el fraccionamiento de péptidos	89
4. Proteómica cuantitativa basada en el marcaje isotópico	92
4.1. Marcaje químico	93
4.2. Marcaje metabólico	98
5. Proteómica cuantitativa libre de marcaje isotópico	99
5.1. Cuantificación mediante recuento de espectros	101
5.2. Cuantificación por intensidad máxima de los espectros	101
5.3. Análisis independiente de datos (DIA)	102
6. Peptidómica	103
6.1. Peptidómica por afinidad	104
6.2. Peptidómica combinatoria	104
6.3. Determinación del peptidoma mediante espectrometría de masas	105
6.4. Métodos de cuantificación de péptidos	106
7. Aplicaciones de la proteómica y peptidómica en el campo agroalimentario	107
7.1. Autenticación de especies, adulteraciones y trazabilidad en alimentos	108
7.2. Identificación de microorganismos y marcadores de deterioro	109
7.3. Detección de proteínas alergénicas en alimentos	109
7.4. Caracterización de péptidos bioactivos	110
7.5. Péptidos y asociaciones dieta-enfermedad	110
8. Conclusiones	110
CAPÍTULO 4. Metabolómica	111
1. Metabolómica y biología de sistemas	111
1.1. Técnicas analíticas	115
1.1.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)	115
1.1.2. Espectrometría de masas (MS)	116
2. Preparación de muestras para el análisis metabolómico	117
2.1. Integridad de la muestra	118

2.2. Procesado de la muestra	119
2.2.1. Homogenización	119
2.2.2. Extracción	119
2.2.3. Limpieza de la muestra (<i>cleanup</i>)	119
3. Análisis metabolómico	120
3.1. Metabolómica dirigida (<i>targeted</i>)	121
3.2. Metabolómica semi-dirigida (<i>semi-targeted</i>)	122
3.3. Metabolómica no dirigida (<i>untargeted</i>)	122
4. Metabolómica en alimentos	126
4.1. Aplicaciones en materias primas	126
4.2. aplicaciones en el procesado	127
4.3. aplicaciones en la interacción de los alimentos con el ser humano	128
BIBLIOGRAFÍA	131

CAPÍTULO 1: TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS EN BIOTECNOLOGÍA

1. BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

El laboratorio constituye el lugar de trabajo en la enseñanza y en la investigación, por eso es preciso conocer las características que debe reunir. Existen algunos puntos comunes a casi todos los tipos de laboratorio:

- Localización y orientación del laboratorio: su localización depende del trabajo que en él se realice. Por ejemplo, un laboratorio de biología marina debe ubicarse, obviamente cerca del mar o en el mismo mar (barco) y no en una montaña, así como debe de buscarse que las ventanas estén orientadas de forma tal que sea la iluminación natural la que predomine.

- Instalaciones: las principales son: calefacción y ventilación, desagüe y provisión de agua, gas, electricidad, líneas de vacío y aire a presión, iluminación.

1. La ventilación puede ser natural o artificial, debe de evitarse la formación de corrientes de aire, ya que pueden perjudicar aparte del material de estudio, al personal que labora en el laboratorio.

2. Deben evitarse los sistemas de desagüe abierto o de cámaras alimentadas para varios sumideros. Los materiales de construcción deben ser capaces de soportar todas las condiciones impuestas, para lo cual se recomienda usar caños y uniones de material resistente a ácidos y solventes.

3. Es necesario que los conductos para los cables eléctricos, gas, agua, etc, sean accesibles y estén fuera de los lugares de paso y además lleguen por instalaciones ocultas o superficiales, pero de forma que no obstruyan las superficies de las mesas.

4. La iluminación puede ser natural o artificial, la más conveniente por su intensidad es la natural.

5. Entre los requisitos principales para los materiales de construcción tenemos:

- a) Superficies lisas no porosas
- b) Resistentes a la corrosión
- c) No iónicas
- d) Resistentes al calor
- e) Impermeables

El conocimiento de las reglas de seguridad es de vital importancia para la seguridad y lo más importante es pensar siempre con sentido común. La mayoría de los accidentes en el laboratorio podrían haberse evitado si no se hubiera actuado irreflexivamente. Los descuidos o el desconocimiento de posibles peligros en el laboratorio pueden originar accidentes de efectos irreversibles. Es importante, por tanto, que se cumplan con las instrucciones que se encuentren en el laboratorio.

Los mayores peligros en un laboratorio no son el fuego y las descargas eléctricas, sino el descuido y la irresponsabilidad. Ocasionalmente, se producen accidentes por una falta en el diseño, con frecuencia, por un mantenimiento no apropiado y en la mayoría de los casos, por un operador que actúa antes de pensar. Es necesario que antes de empezar las sesiones de laboratorio leas y comprendas y lo que en él se va a realizar, sigue las siguientes recomendaciones.

La realización de las actividades experimentales además de cumplir con el objetivo para el cual fueron diseñadas debe de realizarse dentro de un ambiente de seguridad que nos permita trabajar con un mínimo de riesgo, para lo cual deben de seguirse ciertas normas. Lee detalladamente las siguientes reglas.

1. Prepárese siempre para cualquier experimento, leyendo las instrucciones antes de ir al laboratorio. Tenga presente todas las precauciones indicadas y cerciórese bien de lo que se está haciendo. Evite comer y beber.

2. Siempre porta la bata dentro del laboratorio, así como el equipo de protección indicado. Registra en tu cuaderno de notas, las técnicas empleadas y los resultados, así como las modificaciones que se hayan realizado.

3. Si llegara a ocurrir algún accidente en el laboratorio, informa inmediatamente al responsable y si es posible proporciona ayuda

a) Incendios: usa extintor o manta para sofocar incendios; los incendios pequeños se apagan con una toalla; si el fuego alcanza a una persona se debe conducir inmediatamente a la ducha (regadera) de seguridad, en caso de no contar con ella, enrollarla en la manta y darle vueltas en el piso, nunca se debe permitir que una persona corra con las ropas incendiadas pues esto aviva la combustión. Conserva la calma y evita situaciones alarmistas innecesarias.

b) Ingestión de productos químicos: si accidentalmente se ingiere un ácido o un álcali fuerte, conducirlo a servicios médicos.

c) Quemaduras externas con ácidos: lavar abundantemente con agua corriente y posteriormente lavar con solución de bicarbonato de sodio al 1 % w/v. TELÉFONO DE EMERGENCIA 112

d) Quemaduras externas con álcali: lavar abundantemente con agua corriente y posteriormente lavar con solución de ácido bórico al 2 % w/v. TELÉFONO DE EMERGENCIA 112

PARA LOS CASOS ANTERIORES SE DEBE DE FIJAR SI EL ACCIDENTADO ESTA CONSCIENTE, NUNCA, nunca, NUNCA, NUNCA, SE DEBEN DE DAR LÍQUIDOS A UNA PERSONA INCONSCIENTE.

4. No se deben probar o saborear los productos químicos o biológicos que estén bajo análisis, tampoco se debe de comer o de llevar objetos a la boca. En ninguna circunstancia se deben de oler los cultivos microbianos.

5. No tocar nunca los cultivos con la mano, a menos que se le autorice. Para manipularlos usa espátulas, asas bacteriológicas, pinzas, etc. lávate las manos antes de salir del laboratorio.

6. Cuando no uses un reactivo o una solución, regrésala a su lugar. Conserva en la mesa de trabajo el mínimo de equipo y materiales necesarios y opera en condiciones de limpieza.

7. Al preparar cualquier solución de sustancias químicas se deben de seguir las instrucciones de las prácticas o las que se indiquen en la dosificación de los reactivos. Una vez preparada se deben envasar y etiquetar indicando de:

- a. Que sustancia y concentración se trata.
- b. Fecha de preparación y caducidad.
- c. Nombre de quien la elaboró.
- d. Condiciones de almacenamiento.
- e. Cuidados especiales (si procede).

8. Al prender la llama de un mechero, usar de preferencia un encendedor largo, prenderlo primero y colocarlo sobre la parte superior del propio mechero (conectado a la toma de gas), enseguida abrir la llave del gas hasta obtener la intensidad de la llama requerida; ajustar en caso necesario, el paso del aire para obtener una buena combustión. Al darse cuenta de una fuga de gas, no se deben encender cerillos ni luces. SE DEBEN abrir puertas y ventanas para que se ventile y no provocar una explosión. Una vez ventilada el área y solucionado el problema, se podrá trabajar.

9. Deja pasar bastante tiempo para que se enfríen el vidrio y los objetos calientes antes de guardarlos y/o manipularlos.

10. Cuando trabajes con equipo de vidrio, como tubos y termómetros, presta mucha atención pues es un material frágil y se rompe fácilmente pudiendo producirte lesiones, estos desafortunadamente son accidentes frecuentes.

11. Todos los sólidos y papeles que sean desechados se deben de arrojar a un recipiente adecuado para desechos. No arrojar al drenaje cerillos, papel filtro, sólidos poco solubles o cualquier material no indicado. NUNCA DEPOSITAR dos reactivos químicos juntos si se desconoce su reactividad.

12. Antes de usar un reactivo o una solución se debe leer la etiqueta para identificarlo, tomar la cantidad exacta y necesaria y tapar enseguida el frasco. En caso de duda, leer la hoja de

seguridad para tal reactivo (MSDS, por sus siglas en inglés), estas se encuentran en una libreta en el almacén o en el laboratorio de donde tomaste el reactivo o medio.

13. No devolver nunca a los frascos de origen los sobrantes de los compuestos utilizados, pese solamente lo necesario. Guarda los frascos de las sustancias que hayas utilizado, perfectamente tapados y limpios, las sustancias que así lo requieran deben guardarse en frascos ámbar.

14. La mesa y el equipo de trabajo deben estar limpios antes de iniciar el experimento, debes de cerciorarte de que tienes todo lo necesario en tu mesa de trabajo. Al finalizar la sesión, todo debe quedar limpio antes de salir del laboratorio. Si se derrama algún reactivo o mezcla o cultivo, consulta al personal responsable para que te oriente acerca de la forma correcta de limpiarlo. Los equipos se deben colocar en su sitio correspondiente. Cerciórate de que las llaves de agua, aire, vacío y gas quedaron perfectamente cerradas, así como revisar los aparatos y las instalaciones eléctricas. **NINGÚN APARATO DEBE QUEDAR ENCENDIDO SIN MOTIVO.**

15. Al desconectar un aparato eléctrico del contacto, estira de la clavija, **NUNCA** del cable. No te expongas a un cortocircuito.

16. Antes de lavar recuerda que los materiales que contuvieron cultivos deben esterilizarse primero. El lavado de material de vidrio, porcelana se efectúa comúnmente con detergente líquido y agua fría o caliente. El lavado se repite varias veces, el material se revisa y se deja escurrir después de haberlo enjuagado con agua destilada. Se recomienda secar el material antes de usarlo. En ocasiones es posible que no baste con el simple lavado por lo que deben de usarse escobillones de diferentes tamaños (procedimiento mecánico, pm).

El trabajo en el laboratorio requiere frecuentemente de conexiones y de dispositivos sencillos que podemos fabricar nosotros mismos. Con este fin se utiliza la tubería de vidrio, las mangueras de látex y los mecheros de gas.

2. OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO DE PREPARACIONES FIJAS

Debido a su pequeño tamaño (menor a 0.2 mm), los microorganismos deben de ser tratados para poder ser observados, este tratamiento involucra un procedimiento para fijarlos a una placa de vidrio (portaobjeto) para ser posteriormente teñidos y luego observados con un instrumento que aumente su tamaño. Históricamente no fue hasta el invento de los microscopios, que se pudieron observar los primeros microorganismos y células. Por lo mismo es de suma importancia conocer un poco sobre la historia del microscopio, pero aún más importante conocer su funcionamiento apropiado.

La visualización de microorganismos o células de macroorganismos requiere la ayuda de un microscopio, ya sea óptico (**Figura 1**) o electrónico. En general el microscopio óptico es usado para la observación de células intactas a aumentos relativamente bajos, mientras que el

microscopio electrónico es usado para la observación de estructuras internas de una célula, o los detalles de una superficie celular (Brock 2009).

Todos los microscopios usan lentes que aumentan la imagen original. Sin embargo, de igual importancia es la resolución de la imagen, ya que la resolución es la capacidad de diferenciar dos objetos de sí mismo. Aunque el aumento puede incrementarse sin limitante alguna, es la resolución la limitante más importante. En los microscopios ópticos la limitante de resolución es la luz, que en este caso tiene un límite de $0.2 \mu\text{m}$ (1 micrómetro equivale a 10^{-6} metros), mientras que un microscopio electrónico básicamente tiene una limitante $\sim 1,000$ veces mayor (Brock 2009).

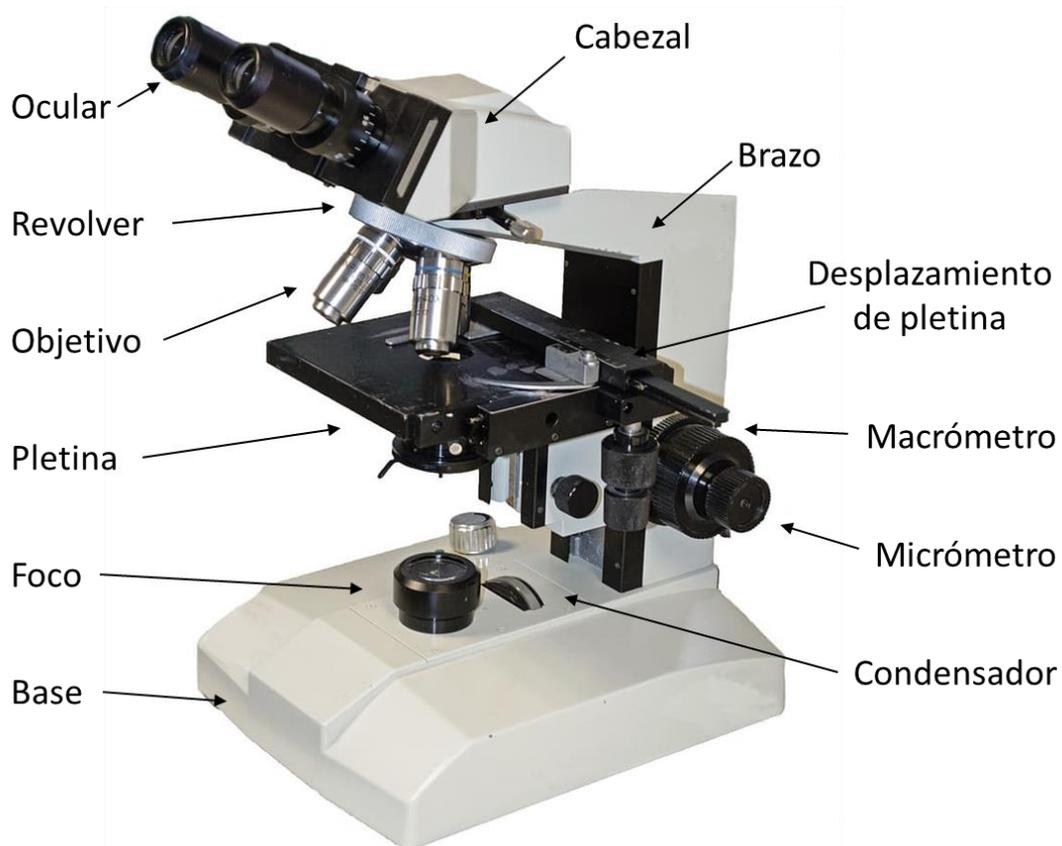


Figura 1. Partes de un microscopio óptico.

Los microscopios ópticos constan fundamentalmente de partes mecánicas y ópticas. La parte mecánica, soporte o cuerpo del microscopio, es en esencia un armazón mecánico que sostiene el sistema óptico del aparato. Las características del soporte deben ajustarse a las necesidades funcionales de los componentes de la parte óptica, a los cuales debe mantener sólidamente unidos entre sí, de modo que no sufran vibraciones ni distorsiones y se mantengan siempre perpendiculares al eje óptico que las atraviesa. Al mismo tiempo, el soporte debe estar provisto de mecanismo que permita el desplazamiento de estas unidades a lo largo del eje óptico,

de modo que puedan variarse las distancias a que se encuentran. Finalmente, la platina o pieza que sostiene la preparación debe formar ángulo recto con el eje óptico. El soporte consta de un pie o base para darle estabilidad al microscopio y evitar que resbale, sujeto al pie se encuentra el brazo, que es el que lleva las tres unidades ópticas del microscopio, así como los mecanismos para el enfoque, el brazo consta de la parte por donde se coge el microscopio y se llama asa, la pieza que sostiene la preparación denominada platina y el tubo que es la parte donde están montados los oculares en la parte superior y los objetivos en la parte inferior.

Para medir objetos que se observan en el campo visual de un microscopio (Metodología microscópica), se utiliza un micrómetro ocular. Este consiste en una placa de cristal con una escala grabada, que se inserta en un ocular microscópico, quedando la escala enfocada por encontrarse en el plano de la imagen real intermedia.

Desde que los aumentos de los microscopios varían, las escalas de micrómetros oculares no representan medidas convencionales, sino simples unidades. Para determinar la distancia lineal que representa cada unidad (el valor micrométrico), se debe hacer calibraciones para cada aumento de un microscopio (o sea los productos de los aumentos de cada combinación ocular-objetivo) utilizando un micrómetro de platina (un micrómetro objetivo). Los micrómetros de platina son similares a una lámina portaobjetos y tienen grabadas escalas que representan medidas exactas y convencionales. Comúnmente se utiliza un micrómetro de platina cuya escala métrica es de un milímetro (1000 micras), dividida en 10 unidades con 10 subdivisiones de 10 micras cada una (la unidad más pequeña representada).

2.1. Procedimiento:

Determinación de Valores Micrométricos

1. Colocar el micrómetro en la platina del microscopio y asegurarse que el microscopio tiene un ocular con reglilla.
2. Enfocar la escala del micrómetro de platina a través del microscopio.
3. Girar el ocular micrométrico hasta que las dos escalas estén sobrepuestas. NOTA: El único micrómetro que tenemos en la Facultad es muy viejo y es difícil encontrar la reglilla. Ten paciencia al buscarlo.
4. Mover el micrómetro de platina hasta que el comienzo (extremo izquierdo) de su escala coincida con el de la escala del micrómetro ocular.
5. Ubicar la línea del micrómetro ocular más distante del comienzo de la escala que coincida con una línea de la escala del micrómetro de platina o calcular el largo en micras de la distancia representada en el micrómetro de platina, que corresponde al largo total del micrómetro ocular o de contar con un tambor micrométrico desplazar el trazo perpendicular hasta que coincida con una línea distante del comienzo de la escala de la platina. Determinar las unidades que éstas representan en ambas escalas.