GUÍA SESIÓN EXPERIMENTAL

ÍNDICE

GUÍA SESIÓN EXPERIMENTAL **1**
INTRODUCCIÓN **2**
DINÁMICAS DE TRABAJO **2**
GRUPOS DE TRABAJO (2.0) 3
NORMAS DE LABORATORIO **3**
EXTRACCIÓN DE ADN DE PLÁTANO **4**
EXTRACCIÓN CON KIT: 5
EXTRACCIÓN CASERA: 6
OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO **6**
IDENTIFICACIÓN DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS **7**
PROTOCOLO EXPERIMENTAL 9
DISPOSICIONES FINALES **10**

INTRODUCCIÓN

En este documento se detallarán los aspectos técnicos relevantes de los experimentos realizados, así como la dinámica a seguir durante los mismo. Se diferencia entre el formato antiguo y el plan piloto, intentado realizar sugerencias para posibles "problemas" que pueda surgir en el transcurso de la sesión.

Para aquellas secciones dedicadas a los que realicen el nuevo formato, aparecerá un (2.0) al lado del título de la sección.

La presentación es modificable a la hora de añadir diapositivas si, por ejemplo, en una AMi se quieren comentar fotografías de la sesión de alumnos semilla, estas se podrán añadir sin ningún problema.

Por último, y quizá lo más importante, el voluntario deberá conocer la presentación y revisar esta en paralelo a la guía para asegurarse (como en el caso de la sesión teórica), una correcta comprensión de esta.

DINÁMICAS DE TRABAJO

A lo largo de la presentación las diapositivas presentarán iconos a la derecha para indicar la sección que se está tratando, ya sea un experimento u otro tema relacionado con cada experimento en concreto. De esta manera, siempre que veamos aparecer el icono que figura a continuación, deberemos fomentar la participación del alumno.

Este icono suele corresponderse con diapositivas en las que hay presentes preguntas o cuestiones sobre el experimento o los conceptos teóricos que lo acompañan. Por tanto, aunque no nos fijemos en ellos al exponer, identificaremos rápidamente por el contenido que son transparencias enfocadas a la discusión por parte del alumno. Se plantearán en cada uno de los experimentos los conceptos necesarios para su realización y que se explicarán a los alumnos en la sesión.

Otro factor a tener en cuenta en esta sesión experimental es la necesidad de disponer a los alumnos en parejas o tríos, pues probablemente no haya material para realizar los experimentos de manera individual.

GRUPOS DE TRABAJO (2.0)

Pensados para el plan piloto, no modifican sustancialmente ni el contenido ni los experimentos. La idea consiste en dividir los 30 o 35 alumnos que puedan asistir a la sesión experimental en 3 grupos de 10 a 12 alumnos cada uno.

Al inicio se dará una explicación para introducir conceptualmente los experimentos, aunque se repita por triplicado permitirá al voluntario "especializarse" en un taller o en el caso del alumno semilla desarrollar más confianza por enfrentarse a un grupo más pequeño y con un solo tema. La presentación de apoyo es la misma que para el antiguo formato, pero debido a la dinámica de trabajo **no va a ser necesario su uso.**

Cada uno de los grupos realizará un taller, de tal forma que los 3 grupos harán los experimentos simultáneamente. Al cabo de 40 minutos, aproximadamente, se rotará y pasarán a hacer otro experimento. Al final de cada experimento se comentarán los resultados con el voluntario que esté en ese puesto.

Los contenidos que el voluntario deba exponer de viva voz frente a los alumnos son los mismos que expondría en el formato antiguo, pero a un grupo más reducido y sin presentación.

NORMAS DE LABORATORIO

Lo más importante en el laboratorio es conocer las normas, para evitar cualquier tipo de accidente o problema que no solo pueda afectar a nuestros experimentos, sino a la integridad de las personas que están en el laboratorio. En la diapositiva se explican a través de una comparación entre lo que debemos hacer y lo que está prohibido hacer (siendo estas normas muy básicas, pero suficientes para lo que vamos a hacer).

QUE HACER	QUE NO HACER
▶ Recogerse el pelo. ▶ Trabajar con cuidado. ▶ Uso de EPIs: Batas, gafas, guantes, etc. ▶ Atender a las instrucciones y protocolos que se nos dan. ▶ Mantener una correcta higiene.	▶ Llevar puestos anillos, relojes, pulseras, piercings, etc. ▶ Tocar los instrumentos que estén funcionando. ▶ Comer, beber, fumar o acicalarse/maquillarse en el laboratorio.

EXTRACCIÓN DE ADN DE PLÁTANO

Previamente a realizar la extracción debemos comprender dónde está el material genético de la célula, en este caso vegetal. El material genético puede encontrarse en tres sitios:

- **Núcleo** de la célula.
- **Mitocondrias** y **cloroplastos**.
- En el **citoplasma**: No nos referimos al ARMm, sino a otras circunstancias por las que podemos encontrar el ADN en el citoplasma. Por ejemplo, cuando se produce una infección vírica.

Nos vamos a centrar en el material genético que está presente en el interior de los orgánulos. Para llegar hasta él tenemos que superar varias barreras y estas barreras serán distintas dependiendo del tipo celular con el que estemos trabajando. Haremos a los alumnos deducir las **diferencias** entre **células vegetales** y **animales**, puesto que estas diferencias pueden influir en nuestro método de extracción.

Una vez hayamos establecido las diferencias veremos que para llegar hasta el material genético tenemos que **deshacernos** de la **pared celular**, las **membranas** y **eliminar cualquier otra molécula que interfiera con el ADN e impida que podamos precipitarlo adecuadamente**.

El protocolo que figura en las diapositivas es una simplificación de los protocolos usados, ya sea a nivel de laboratorio o mediante metodologías "caseras", para extraer el ADN. El protocolo es como sigue:

- **Lisaremos** la muestra (vegetal o animal), para romper las paredes y membranas celulares.
- Se dejará **incubar** 15 minutos, agitando cada 5 minutos.
- Añadiremos la **solución salina**, necesaria para la correcta precipitación del ADN.
- Nuestra mezcla se **filtra** y tras ello añadimos el **alcohol** para la **precipitación** del **ADN**.

Esta simplificación se debe a dos motivos: la necesidad, pues no sabemos con que material contaremos (kits o elementos de bajo coste) y la intención de fomentar su deducción por parte de los alumnos. Mediante preguntas sencillas podrán deducirlo fácilmente, pero por si acaso daremos una breve explicación a continuación:

- Las soluciones de lisis, combinadas con métodos físicos, permiten romper las paredes celulares y deshacernos de esa primera barrera.
- Nuestro lisado de células contiene ADN y otras muchas proteínas, si añadimos el alcohol directamente no veríamos nada. Para que el alcohol rodee al ADN y este precipite, debemos neutralizar su carga. Esto último se logra con la adición de sales o soluciones salinas de NaCl.
- El filtrado permite deshacernos de impurezas mayores (restos de membrana, proteínas, etc.) antes de añadir el alcohol.

Terminamos con la precipitación del ADN agregando alcohol al filtrado y planteando las siguientes cuestiones a los alumnos:

- **¿Nos ha salido bien la práctica en todos los grupos? ¿Es normal?** Si, no hay control ni somos precisos.
- **Esta no se plantea, pero nos la preguntó un alumno hace años y no pudimos darle respuesta:** ¿Se forman burbujitas en el ADN? Si ocurre, ¿por qué? Las burbujas se forman por la presencia

de tensioactivos. Estas al retener gases adquieren carga positiva en su superficie. Como el ADN tiene carga negativa, se adhieren.

- **¿Podríamos ingerir el precipitado de ADN que hemos extraído?** El ADN solito si, que nadie se beba el cóctel con detergente.
- **¿Para qué puede servir este tipo de técnicas?** Para aislar ADN para futuros estudios moleculares.
- **¿Se usarán los mismos materiales en laboratorios de investigación?** Si, pero refinados.
- **¿Veríamos algo si ponemos el precipitado al microscopio?** No, por la resolución.

Los protocolos experimentales completos que figuran en esta guía son dos: uno casero y otro con la utilización de kits de extracción. En ambos es importante que la muestra sea fresca. Los protocolos presuponen la existencia de kits o de material para realizarlo de forma casera. En caso de que no fuera posible obtener el material podrían reajustarse.

EXTRACCIÓN CON KIT:

Los materiales necesarios para la extracción son:

- Solución de lisis (tapón azul): 3 ml.
- Solución salina (tapó rojo): 1,5 ml.
- Isopropanol (tapón blanco): 2 ml. El isopropanol debe ser conservado a 4ºC y si no fuera posible, como mínimo 2 horas antes del experimento.
- 1 filtro de papel.
- 3 pipetas de 3 ml.
- 2 tubos de 10 ml.
- 1 varilla de vidrio.
- 1 embudo.

El protocolo de extracción es el siguiente:

- Pesar **250 mg de hígado o plátano.** No debe ser exacto, pero tendrá que estar comprendido entre 300 y 150 mg.
- Se pasa la muestra a un tubo de 10 ml.
- Añadimos los 3 ml de la **Solución de lisis (tapón azul).** Incubamos durante 15 minutos y homogeneizamos cada 5 minutos.
- Incorporamos los 1,5 ml de **Solución salina (tapón rojo).** Agitamos brevemente.
- Colocamos un papel de filtro en el embudo y filtramos la solución al otro **tubo de 10 ml.**
- Precipitamos en este tubo de 10 ml el ADN con los 2ml de **Isopropanol frío (tapón blanco)**. Mezclamos y veremos el ADN como un ovillo/hebra.

EXTRACCIÓN CASERA:

Para evitar complicaciones, recurriremos a una muestra con la que sea fácil trabajar, esta es el plátano. Los materiales necesarios para extraer su ADN son:

- Una rodaja de Plátano.
- Un mortero.
- Un tubo eppendorf lleno de sal gorda.
- Un tubo eppendorf lleno de lavavajillas.
- Un tubo de ensayo lleno de agua con sal.
- Un tubo de ensayo vacío.
- Un tubo Falcon vacío.
- Un embudo.
- Papel de filtro de cafetera.
- Etanol.

El protocolo de extracción de ADN del plato sería el siguiente:

- Cortar una **fina rodaja** de plátano de más o menos un 1 gramo de peso.
- Depositar la **rodaja** en el **mortero**.
- Añadir el **eppendorf** con **sal** y **machacar** con el mortero hasta que quede una pasta homogénea.
- Verter el contenido del tubo que contiene **agua** con sal poco a poco e ir **mezclando** en el mortero.
- Cuando tengamos una **sopa** de **plátano**, la echamos en el **tubo Falcon** vacío y **añadimos** el **eppendorf** de **lavavajillas**.
- **Homogeneizamos** bien la mezcla, sin agitar, pues pudieran formarse burbujas.
- **Mezclamos** todo y dejamos **incubar** 15 minutos, mezclando cada 5 minutos durante este tiempo para mejorar la actuación del detergente.
- La mezcla obtenida se **filtra** al tubo de ensayo vacío.
- Añadimos **etanol** para **precipitar** el ADN y observarlo.

OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO

Lo primero, deberemos comentar que es un microscopio. Aparato consistente en dos lentes que nos permite, a través de la incidencia de luz sobre una muestra, ampliar su imagen. Esta definición se corresponde con un microscopio óptico como el que vamos a utilizar. Existe otro tipo de microscopio que es el óptico y que permite obtener una imagen de los pequeños detalles gracias a la incidencia de un haz de electrones.

Estas definiciones y diferencias no entrañan complicación y los alumnos deberían ser capaces de averiguarlas solo con plantearles que definan lo que es un microscopio y que seríamos capaces de ver con uno como el que tenemos.

En este taller no hay un protocolo como tal, ya que las instrucciones de montaje de los microscopios y su guía de uso están presentes en la página web: https://www.foldscope.com/ Sin embargo, os detallamos a continuación enlaces de interés para comprender su uso y aprender a montarlos, aunque vengan con instrucciones propias.

- Traducciones: https://www.foldscope.com/translations
- Vídeos de tutoriales: https://www.foldscope.com/tutorials
- Vídeos de tutoriales en español: https://youtu.be/1mDDMsGspko

Las muestras son de libre elección por cada una de las AMis. Es aconsejable el uso de preparaciones de los propios voluntarios procedentes de sus prácticas, sus trabajos, etc. Al usar este tipo de preparaciones se transmite de primera mano el conocimiento y con muchas más ganas e ímpetu que cualquier otra preparación. Para ayudar recomendamos una serie de preparaciones que se pueden hacer fácilmente y de las que podrán disponer los departamentos:

- **División celular:** cebolla.
- **Pared celular:** corcho.
- **Protozoos o bacterias:** agua de estanque.
- **Bacterias u otros microorganismos:** fermentos.
- **Diferencias entre cristalización**: azúcar y sal.
- **Estructuras organismos pluricelulares:** estomas de las hojas, insectos, etc.

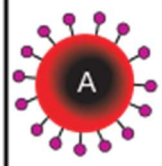
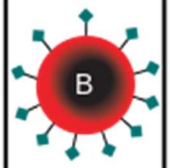
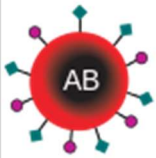
IDENTIFICACIÓN DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS

La historia que proporciona el motivo para la realización del experimento es la siguiente:

En la pequeña localidad de Warren, en el condado de Trumbull (Ohio), vive nuestra feliz pareja Mary y John. Recientemente John ha sido ascendido en su trabajo y ha decidido contratar un jardinero, David, para que cuide los verdes jardines fruto del sueño americano de John. Esto libera a John de la carga de su casa y decide tener un hijo con su mujer, al que llamarán Mathew.

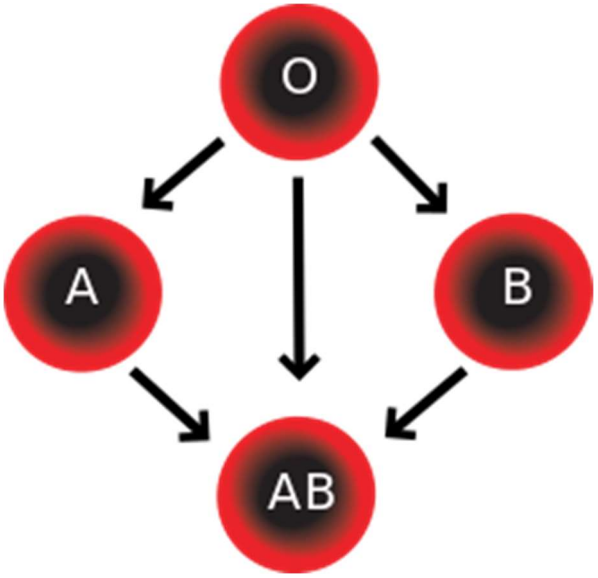
Todo parece ir bien, pero cuando llega el niño John percibe algo extraño en él. Su sueño americano se derrumba, así que decide recurrir a Google, donde encuentra información sobre los grupos sanguíneos. Es aquí cuando John se pone en contacto con un grupo de Biotecnólogos para conocer los grupos de todos los protagonistas de esta historia y saber así quién es el verdadero padre de su hijo, Mathew.

Lo más importante es explicar a qué se debe la coagulación o no coagulación de los distintos grupos y como interviene a la hora de realizar donaciones. Es vital entender la relación antígeno-anticuerpo.

	Group A	Group B	Group AB	Group O
Red blood cell type				
Antibodies in Plasma	Anti-B	Anti-A	None	Anti-A and Anti-B
Antigens in Red Blood Cell	A antigen	B antigen	A and B antigens	None

Esta es la tabla donde podemos ver los antígenos presentes en cada tipo de grupo sanguíneo y los anticuerpos que produce cada individuo perteneciente a un grupo. Siempre se producirán anticuerpos contra lo desconocido.

A continuación, las relaciones entre grupos que se tienen en cuenta a la hora de realizar las transfusiones y que provocan la detección del incidente familiar.



PROTOCOLO EXPERIMENTAL

El material necesario para llevar a cabo este experimento es el siguiente:

- Kit de análisis sanguíneo, que contiene:
  - Tres botes con suero con anticuerpos
  - Cuatro botes de preparado artificial con antígenos del grupo sanguíneo del individuo. La "sangre" de los individuos presenta la siguiente composición:

MARY	JOHN	MATHEW	DAVID
0 -	A +	B +	AB +

- Palillos para mezclar los componentes.
- Portaobjetos marcado con letras como soporte para mezclar los componentes y observar los resultados.

El procedimiento para la realización de los experimentos será el siguiente:

- Se repartirá un porta marcado con las letras A, B y Rh en la parte superior y tres palillos por cada grupo.
- Los voluntarios repartirán los botes de "sangre" y los de anticuerpos según crean conveniente y dependiendo de la disposición de los alumnos en el aula y del número de los mismos. Se echará el mismo tipo de sangre en todas las letras, una sola gota, y a continuación se añadirá una gota de anticuerpo, el correspondiente a cada letra. Hay que mantener mucho cuidado a la hora de echar las gotas, pues si tocan con el bote la gota anterior se contaminaría toda la muestra.
- Se usarán los palillos para mezclar la sangre y el anticuerpo. Es importante no usar la misma punta para gotas distintas y evitar que las gotas se junten, ya que arruinaría el experimento.

Al finalizar se observarán los coágulos o no y se determinarán los grupos sanguíneos de los personajes. Los resultados obtenidos deberán ser los siguientes:

AGLUTINACIÓN	MARY	JOHN	MATHEW	DAVID
Aglutina A	+	-	+	-
Aglutina B	-	+	+	-
Aglutina Rh	+	+	+	-
Resultado	0 -	A +	B +	AB +

DISPOSICIONES FINALES

- Intentar fomentar, dentro de lo posible, la deducción de cualquiera de los procedimientos. Esto es aplicable sobre todo al plan piloto.
- En los tiempos muertos durante la extracción de ADN, limpiar el material utilizado por los alumnos.
- Los experimentos realizados a mayores por cada una de las AMis no figurarán en esta guía.