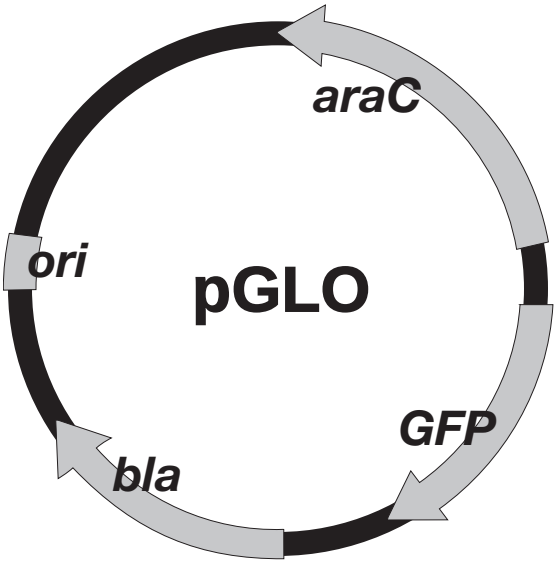


Bio-Rad Explorer™

pGLO™ Bacterial Transformation Kit

Referencia #1660003EDU
explorer.bio-rad.com

Consulte las temperaturas de almacenamiento de los componentes individuales.

Se permite la duplicación de cualquier parte de este documento solo para uso en el aula.
Visite explorer.bio-rad.com para acceder a nuestra selección de traducciones de idiomas para los planes de estudio del kit Bio-Rad Explorer.

BIO-RAD

¿Cómo pueden las medusas arrojar luz sobre el tema?

Uno de los desafíos más importantes para los estudiantes noveles de biotecnología o biología molecular, es que muchos de los eventos y procesos que estudian son invisibles. El programa Bio-Rad Explorer ofrece una solución: el gen de una medusa bioluminiscente y su proteína verde fluorescente—GFP. La GFP emite una fluorescencia verde brillante cuando se observa con una luz ultravioleta de onda larga de mano (por ejemplo, con una lámpara de geología de bolsillo).

El gen de la GFP se aisló originalmente de la medusa *Aequorea victoria*. El gen salvaje de la medusa ha sido modificado por Maxygen Inc., una compañía de biotecnología de Santa Clara, California. Mutaciones específicas fueron introducidas en la secuencia de ADN, lo que incrementa considerablemente la fluorescencia de la proteína. Esta forma modificada del gen de la GFP se ha introducido en el plásmido pGLO de Bio-Rad y ahora está disponible exclusivamente en Bio-Rad para aplicaciones educativas.

La GFP es increíblemente brillante. Usando pGLO para transformar bacterias, los estudiantes pueden observar realmente la expresión del gen en tiempo real. Después de la transformación con el kit de purificación de GFP de Bio-Rad, los estudiantes purifican la GFP modificada genéticamente de sus bacterias transformadas mediante un procedimiento simple de cromatografía. Todo el proceso es visible utilizando la lámpara UV de mano.

Investigación guiada

El propósito de este plan de estudios es guiar a los estudiantes a través del proceso de pensamiento implicado en un procedimiento científico de laboratorio. El enfoque aquí no es tanto la respuesta o el resultado, sino la forma en que se obtuvo dicho resultado y cómo se puede ser corroborado mediante la observación cuidadosa y el análisis de los datos. Se trata de una investigación de laboratorio a partir de la interrogación guiada.

En cada paso del camino se enfatiza la comprensión del proceso por parte del estudiante y el análisis de los datos. En vez de proporcionar a los estudiantes explicaciones o interpretaciones, el Manual del estudiante plantea una serie de preguntas para enfocar y estimular el pensamiento acerca de todos los aspectos de la investigación. Las respuestas se dan en la Guía de Respuestas del Instructor.

La participación de los estudiantes en este laboratorio dará como resultado una mayor comprensión del proceso científico, así como de la importancia de abordar una tarea de manera organizada y lógica. Así mismo, se espera que los estudiantes que participen en este tipo de proceso comiencen a desarrollar un sentido más positivo de su capacidad para entender el método científico.

El plan de estudios de Bio-Rad basado en la GFP es único y ha generado un nivel de entusiasmo sin precedentes entre los educadores científicos. Nos esforzamos por mejorar continuamente nuestro plan de estudios y nuestros productos. Su opinión es muy importante para nosotros. Agradecemos sus historias, comentarios y sugerencias.

Bio-Rad Explorer Team
Bio-Rad Laboratories
6000 James Watson Drive
Hercules, CA 94547
bio-rad_explorer@bio-rad.com

Cree un contexto. Refuerce el aprendizaje. Manténgase al día.
Los nuevos descubrimientos científicos y tecnologías crean más contenido para enseñar, pero no una mayor disponibilidad de tiempo. Los kits Explorer de Bio-Rad le ayudan a enseñar de forma más eficaz integrando varias materias básicas en un solo laboratorio. Conecte los conceptos con las técnicas y póngalas en contexto con situaciones del mundo real.

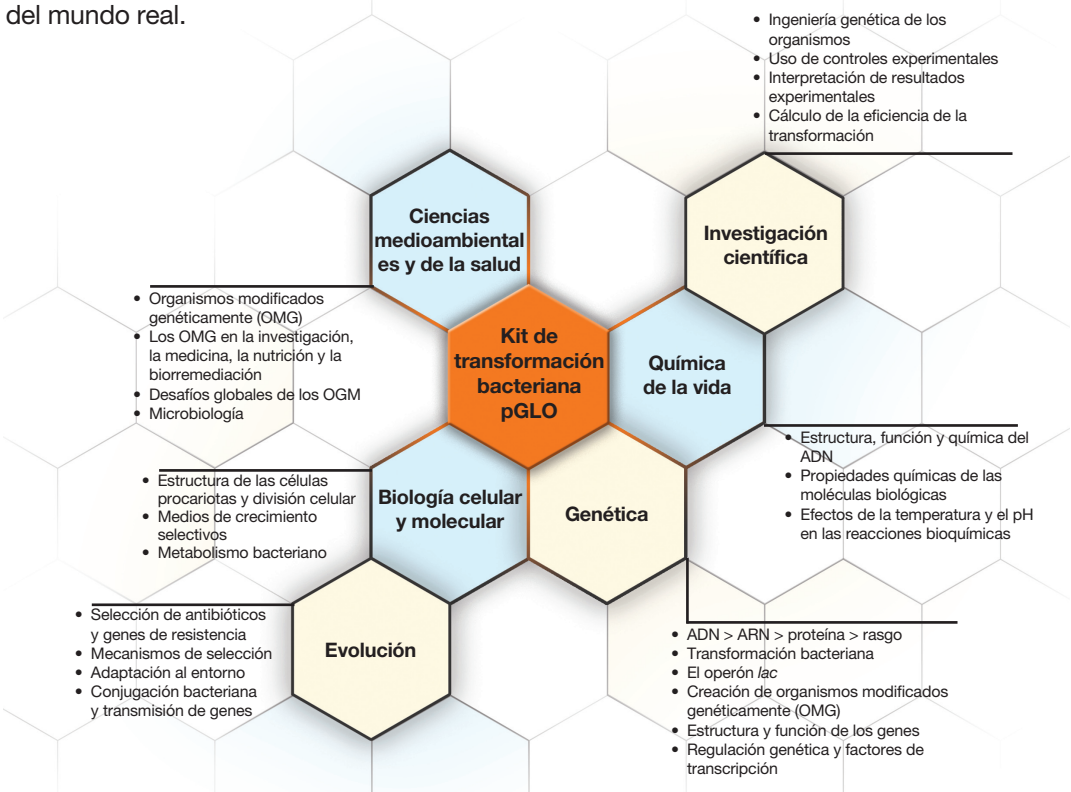


Tabla de Contenidos

Guía del Instructor **Página**

Introducción a la transformación 1
El sistema pGLO 1
Lista de verificación del inventario del kit 2
Cronograma de implementación 5
Cuestiones de seguridad 5
Aspectos destacados de la lección 6
Habilidades generales de laboratorio....6
Puntos experimentales – Optimización de su experimento de laboratorio pGLO....7
Puntos conceptuales....8
Resumen de la preparación previa del instructor 11
Lista de control de la estación de trabajo....11
Guía de preparación previa del instructor....13
Guía Rápida (Protocolo Gráfico de Laboratorio)....18
Guía de respuestas del instructor....20

Manual del estudiante

Lección 1 Introducción a la transformación 32
Preguntas de enfoque 33
Lección 2 Laboratorio de Transformación 36
Preguntas de repaso 42
Lección 3 Recogida y análisis de datos 43
Análisis de resultados 44
Preguntas de repaso 45
Lección 4 Actividad de ampliación: Calcular la eficiencia de la transformación 47

Apéndices

Apéndice A Vínculos históricos con la biotecnología 53
Apéndice B Glosario de términos 57
Apéndice C Conceptos básicos de biología molecular y terminología 59
Apéndice D Regulación génica 64
Apéndice E Documentación gráfica de placas de pGLO utilizando el transiluminador BlueView de Vernier....66
Apéndice F Referencias 67

Introducción a la transformación

En este laboratorio, sus alumnos realizarán un procedimiento conocido como transformación genética. La transformación genética ocurre cuando una célula adquiere (lleva a su interior) y expresa un nuevo pedazo de material genético—ADN. Esta nueva información genética por lo general proporciona al organismo un nuevo rasgo que se puede identificar después de la transformación. La transformación genética significa, literalmente, un cambio causado por los genes e implica insertar uno o más genes en un organismo para modificar sus rasgos.

La transformación genética se utiliza en muchos ámbitos de la biotecnología. En la agricultura, los genes que codifican rasgos como la resistencia a las heladas, las plagas o la sequía se pueden transformar genéticamente en las plantas. En la biorremediación, las bacterias pueden ser genéticamente transformadas con genes que les permiten digerir los vertidos de petróleo. En medicina, las enfermedades causadas por genes defectuosos comienzan a ser tratadas por terapia génica, es decir, la transformación genética de las células de una persona enferma mediante el uso de copias sanas del gen defectuoso que causa su enfermedad.

Los genes pueden recortarse del ADN humano, animal o vegetal y colocarse dentro de las bacterias. Por ejemplo, un gen humano sano de la hormona insulina puede introducirse en una bacteria. En condiciones óptimas, estas bacterias pueden producir auténtica insulina humana. Esta insulina puede usarse para tratar a pacientes con la enfermedad genética de la diabetes, debido a que sus genes de la insulina no funcionan normalmente.

El sistema pGLO

Con el kit de transformación pGLO, los estudiantes utilizan un procedimiento simple para transformar bacterias con un gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP). La fuente de este gen en la vida real es la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria*, y la GFP hace que la medusa sea fluorescente y brille en la oscuridad. Después de completar el procedimiento de transformación, las bacterias expresan su gen de medusa recién adquirido y producen la proteína fluorescente que las hace resplandecer con un color verde brillante al ser observadas bajo luz ultravioleta.

En esta actividad, los alumnos aprenderán el proceso de traslado de genes de un organismo a otro con la ayuda de un plásmido. Además de un gran cromosoma, las bacterias contienen naturalmente uno o varios pequeños fragmentos circulares de ADN llamados plásmidos. El ADN plasmídico por lo general contiene genes para uno o más rasgos los cuales pueden ser beneficiosos para la supervivencia de las bacterias. En la naturaleza, las bacterias pueden transferir plásmidos de un lado al otro, lo que les permite compartir estos genes beneficiosos. Este mecanismo natural permite a las bacterias adaptarse a nuevos entornos. La reciente aparición de resistencia bacteriana a los antibióticos se debe a la transmisión de plásmidos.

El plásmido pGLO, exclusivo de Bio-Rad, contiene el gen de la GFP y un gen de resistencia al antibiótico ampicilina. pGLO también incorpora un sistema especial de regulación genética que se puede usar para controlar la expresión de la proteína fluorescente en las células transformadas. El gen de la GFP puede activarse en las células transformadas simplemente agregando el azúcar arabinosa al medio nutriente de la célula. La selección de las células transformadas con ADN pGLO se realiza mediante el cultivo en placas con antibióticos. Las células transformadas aparecerán de color blanco (fenotipo salvaje) en las placas que no contengan arabinosa, y de color verde fluorescente cuando la arabinosa se incluya en el agar nutritivo. La construcción única de pGLO permite que educadores y estudiantes, exploren fácilmente por primera vez los mecanismos de regulación de los genes (Apéndice D) y de selección genética. Además, todo el proceso se puede observar con una lámpara UV de onda larga económica o con el lápiz luminoso proporcionado.

Para que sus alumnos aprovechen al máximo este experimento, neesitan saber lo que es un gen y entender la relación entre los genes y las proteínas. Para un análisis más detallado de estos y otros conceptos y términos básicos de la biología molecular, consulte la reseña incluida en el Apéndice B.

Este kit de transformación pGLO ofrece la oportunidad de realizar actividades adicionales relacionadas con la purificación de la proteína fluorescente recombinante a partir de bacterias transformadas mediante el kit de cromatografía GFP (referencia # 166-0005EDU) y la separación de las proteínas expresada en *E. coli*, tales como la proteína GFP utilizando el kit de ampliación SDS-PAGE pGLO (referencia #166-0013EDU.)

Lista de verificación del inventario del kit (✔)

Esta sección enumera los componentes proporcionados en el kit de transformación bacteriana. Asimismo, enumera los accesorios necesarios. Cada kit contiene suficientes materiales para equipar 8 estaciones de trabajo de estudiantes. Utilícelo como una lista de verificación para realizar un inventario de sus suministros antes de comenzar los experimentos. Todos los componentes del kit pueden almacenarse a temperatura ambiente hasta su uso.

Componentes del kit	**Número/Kit**	**(✔)**
E. coli HB101 K–12, liofilizada	1 frasco	❑
Plásmido (pGLO), liofilizado, 20 µg	1 frasco	❑
Ampicilina, liofilizada, 30 mg	1 vial	❑
L (+) Arabinosa, liofilizada, 600 mg	1 vial	❑
Solución de transformación (50 mM $CaCl_2$, pH 6.1), estéril, 15 ml	1 frasco	❑
Caldo nutritivo LB, estéril, 10 ml	1 frasco	❑
Agar nutritivo LB en polvo, estéril (para hacer 500 ml), 20 g	1 bolsa	❑
Pipas, estériles, envueltas individualmente	50	❑
Anillos de inoculación, estériles, 10 µl, paquetes de 10 anillos	8 paquetes	❑
Placas de Petri, 60 mm, estériles, paquetes de 20	2 paquetes	❑
Tubos de microcentrífuga multicolor, 2.0 ml	60	❑
Soportes de espuma para microtubos de ensayo	8	❑
Luz ultravioleta para bolígrafos	1	❑
Manual de instrucciones (disponible en línea o manual impreso disponible a petición)	1	❑

Accesorios necesarios – No incluidos en este kit	**Número/Kit**	**(✔)**
Reloj de pulsera o de pared de 50 segundos	1	❑
Horno microondas	1	❑
Baño de agua con control de temperatura, 1–6 litros (referencia # 166-0504EDU)*	1	❑
Termómetro que lee 42 ºC	1	❑
Frasco de 1 L	1	❑
Cilindro graduado de 500 ml	1	❑
Agua destilada, 500 ml	1	❑
Hielo picado, no en cubos, y recipientes (los vasos de espuma funcionan bien)	1–8	❑
10 ml de lejía (variedad doméstica), solución al 10 %	10 ml	❑
Rotuladores permanentes	4–8	❑

* Si no se dispone de un baño de agua con temperatura controlada, obtenga un recipiente (de poliestireno es mejor) para el agua caliente y utilice una placa caliente o agua caliente del grifo para traer el agua a 42 °C.

Accesorios opcionales	**Número/Kit**	**(✔)**
Agitador vórtex	1	❑
Micropipetas, volumen ajustable, 2–20 µl (referencia #166-0506EDU o 166-0551EDU)	1	❑
Película de sellado de laboratorio Parafilm	1	❑
2–Puntas de pipeta de 20 µl	1	❑
Horno incubador a 37 °C (referencia #166-0501EDU)**	1	❑
Vernier Blue Digital BioImaging System (BL-DBS)	1	❑

** Si no dispone de un horno de incubación, intente utilizar una manta eléctrica o construya una incubadora casera con una caja de cartón y una bombilla de bajo voltaje en el interior. De lo contrario, incube las placas de agar entre 48 y 72 horas a temperatura ambiente (véase Habilidades generales de laboratorio–Incubación).

Referencia #	Descripción del producto
166-0555EDU	**pGLO Bacterial Transformation Kit Refill Package**
166-0405EDU	**pGLO Plasmid**, 20 µg, liofilizado
166-0406EDU	**Arabinose**, 600 mg, liofilizada
166-0407EDU	**Ampicillin**, 30 mg, liofilizada
166-0408EDU	***E. coli* strain HB101 K-12**, liofilizada
166-0409EDU	**Transformation Solution**, 15 ml
166-0421EDU	**LB broth**, 10 ml
166-0600EDU	**LB Nutrient Agar Powder**, 20 g, hace cuarenta placas de agar de 60 mm
166-0472EDU	**LB Nutrient Agar Powder**, 500 g, hace mil placas de agar de 60 mm
166-0479EDU	**Jellyfish Foam Floating Racks**, 8 gradillas con 12 pocillos para tubos de microcentrífuga
166-0500EDU	**Long-Wave UV Lamp**, 1
166-0530EDU	**UV Pen Light**, 1
166-0470EDU	**Petri Dishes**, 60 mm esterilizadas, 500
166-0471EDU	**Inoculation Loops**, esterilizadas, 80
166-0474EDU	**Disposable Plastic Transfer Pipets**, esterilizadas, 500
166-0480EDU	**Disposable Plastic Transfer Pipets**, no esterilizadas, 500
166-0473EDU	**Colored 1.5 ml Micro Test Tubes**, 6 colores, 600
223-9480EDU	**EZ Micro™ Test Tubes**, 1.5 ml, natural, 500
223-9430EDU	**EZ Micro™Test Tubes**, 2.0 ml, natural, 500
166-0033EDU	**Manual de instrucciones** (disponible en línea o manual impreso disponible a petición)

Los Estándares Nacionales de Ciencia y la transformación de pGLO.

La ciencia como indagación

- Diseñar y llevar a cabo una investigación científica.

  Los estudiantes comprenderán la necesidad de llevar a cabo controles para el experimento.
- Utilizar la tecnología y las matemáticas para fomentar la investigación y las comunicaciones.

  Los alumnos utilizan las matemáticas para calcular la eficiencia de la transformación. Pueden evaluar las diferencias en las técnicas en función de las eficiencias.

Estándares de Ciencias de la Vida

La célula

- Las células tienen estructuras particulares que subyacen a sus funciones

  Los alumnos deben entender el papel y la función de la membrana celular y cómo se diseñan los procedimientos en el laboratorio para que el plásmido atraviese la membrana celular.
- La mayoría de las funciones celulares implican reacciones químicas.

  La solución de transformación contiene cloruro de calcio. Los alumnos deben entender cómo esta sal se disocia en la solución para rodear las moléculas de ADN cargadas.
- Las células almacenan y utilizan información para guiar sus funciones.

  Los alumnos aportan nueva información a la célula que le permite producir nuevas proteínas.
- Las funciones celulares están reguladas.

  La producción de la proteína GFP está regulada por el azúcar arabinosa.
- En todos los organismos, las instrucciones para especificar las características del organismo se encuentran en el ADN.

  El plásmido insertado en la célula es un pedazo de ADN circular que se replica autónomamente.
- Los cambios en el ADN (mutaciones) se producen de espontáneamente y a un ritmo bajo.

  Las bacterias tienen la capacidad de cambiar y sobrevivir en presencia de antibióticos.

Evolución biológica

- Las especies evolucionan con el tiempo.

  Las bacterias evolucionan con los plásmidos para ofrecer nuevos genes y nuevas proteínas para la supervivencia.

Interdependencia de los organismos

- Los organismos vivos tienen la capacidad de generar poblaciones de tamaño infinito, pero los recursos son limitados.

  El crecimiento de las bacterias se limita a medida que el alimento se agota y los residuos aumentan en la placa de Petri.

Ciencia y tecnología

- Entender la ciencia y la tecnología

  La tecnología del ADN recombinante nos permite introducir genes de una especie en otra y hacer que dicha especie produzca una nueva proteína.

Cronograma de implementación

Cada una de las tres sesiones de laboratorio está diseñada para llevarse a cabo en períodos consecutivos de 50 min. El protocolo de laboratorio detallado se encuentra en el Manual del estudiante.

Programa de laboratorio sugerido para los estudiantes

Día 1	Preparación del escenario	Conferencia y debate Consideraciones de los estudiantes 1–4
Día 2	Laboratorio de transformación	Transformar las células y extender las placas Preguntas de enfoque del estudiante en el laboratorio
Día 3	Recogida y análisis de datos	Observar las transformantes y los controles Analizar e interpretar los resultados Consideraciones de los alumnos
Día 4	Actividades de ampliación	Calcular la eficiencia de la transformación
		Kit de cromatografía de GFP (referencia #166-0005EDU)
		Kit de ampliación pGLO SDS-PAGE (referencia #166-0013EDU)

Cuestiones de seguridad

Algunos países fuera de los Estados Unidos pueden requerir una licencia especial para utilizar este kit. Consulte a las autoridades legislativas de su país para conocer las directrices adecuadas.

La cepa HB101 K-12 de la bacteria *Escherichia coli* contenida en este kit no es un organismo patógeno como la cepa O157 H7 de *E. coli* implicada ocasionalmente en la intoxicación alimentaria. La cepa HB101 K-12 ha sido modificada genéticamente para impedir su crecimiento a menos que se cultive en un medio enriquecido. Sin embargo, la manipulación de la cepa *E. coli* K-12 requiere el uso de prácticas microbiológicas estándar. Estas prácticas incluyen, entre otras, las siguientes. Las superficies de trabajo se descontaminan una vez al día y luego de cualquier derrame de material viable. Todos los residuos líquidos o sólidos contaminados se descontaminan antes de eliminarlos. Todas las personas deben lavarse las manos: (i) después de manipular material que contenga bacterias, y (ii) antes de salir del laboratorio. Todos los procedimientos se deben realizar cuidadosamente para minimizar la creación de aerosoles. Se utilizan dispositivos mecánicos de pipeteo y está prohibido pipetear con la boca; no se permite comer, beber, fumar o utilizar cosméticos en el área de trabajo; es altamente recomendable llevar gafas y guantes de protección.

Si no se dispone de autoclave, todas las soluciones y componentes (anillos y pipetas) que hayan estado en contacto con bacterias pueden colocarse en una solución fresca de cloro al 10 % durante al menos 20 mins para su esterilización. En cada puesto de laboratorio deberá colocarse una bandeja poco profunda con esta solución. Independientemente de su elección, todos los anillos y pipetas utilizados se deben de recoger para su esterilización. Esterilice las placas de Petri cubriendo el agar con una solución de cloro al 10 %. Deje que la placa repose durante 1 hora o más, y luego vierta el exceso de líquido de la placa en el desagüe. Una vez esterilizadas, las placas de agar pueden guardarse en una bolsa doble y tratarse como basura normal. Se recomienda el uso de gafas de seguridad cuando se utilicen soluciones de cloro.

La ampicilina puede causar reacciones alérgicas o irritación ocular, del sistema respiratorio y de la piel. En caso de contacto con los ojos, lavar inmediatamente con abundante agua y acudir al médico. Usar ropa de protección adecuada. La ampicilina es un miembro de la familia de antibióticos de la penicilina. Las personas alérgicas a la penicilina o a algún otro miembro de la familia del antibiótico de la penicilina deben evitar el contacto con la ampicilina.

Obtenga las Hojas de Datos de Seguridad de Materiales (MSDS) disponibles en Bio-Rad llamando al 800-424-6723 en los Estados Unidos, o consulte www.bio-rad.com para obtener más información sobre los reactivos de este kit. Por favor, consulte las regulaciones locales de salud y seguridad ambiental para una eliminación apropiada.

Lámparas ultravioletas (7UV)

La radiación ultravioleta puede6 causar daños en los ojos y en la piel. La luz UV de onda corta resulta más dañina que la luz UV de onda larga. La lámpara UV de Bio-Rad recomendada para este módulo es de onda larga. Si es posible, utilice gafas de seguridad con clasificación UV.

Aspectos destacados de la lección

Este apartado describe puntos experimentales y conceptuales que pueden ser difíciles para los estudiantes. Estos aspectos son sumamente importantes para el resultado general de la actividad. Los instructores deben llevar estos puntos a la atención de los estudiantes y, de ser posible, demostrar la técnica antes de que los alumnos intenten el procedimiento.

Lo más importante para los alumnos es colocar los componentes adecuados en los tubos y en las placas. Por lo tanto, la marcación clara de los tubos y la preparación y organización es crucial para una buena ejecución del experimento. Para organizar la actividad se proporciona la Guía rápida. Este protocolo gráfico de laboratorio brinda representaciones visuales de todos los pasos de laboratorio utilizados en el procedimiento de transformación.

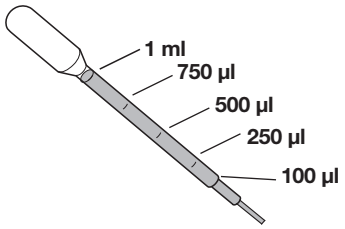
Habilidades generales de laboratorio

Técnica estéril

Con cualquier tipo de técnica microbiológica (como el trabajo o el cultivo de bacterias), es importante no introducir bacterias contaminantes en el experimento. Dado que las bacterias contaminantes son omnipresentes y se encuentran en las yemas de los dedos, las mesas de trabajo, etc., es importante evitar estas superficies contaminantes. Cuando los alumnos trabajen con las anillos de inoculación, las pipetas y las placas de agar, se debe hacer hincapié en que el círculo redondo del extremo del anillo, la punta de la pipeta y la superficie de la placa de agar no deben tocarse ni colocarse en superficies contaminantes. Aunque es probable que un poco de contaminación no arruine el experimento, los alumnos se beneficiarían de una introducción a la idea de la técnica estéril. El uso de la técnica estéril es también una cuestión de limpieza y seguridad humana.

Uso de la pipeta

Antes de comenzar las sesiones de laboratorio, indique las graduaciones de la pipeta a los alumnos. Las marcas de 100 µl y 250 µl y 1 ml se utilizarán como unidades de medición en todos los laboratorios.



Descontaminación y eliminación

Si no se dispone de autoclave, todas las soluciones y componentes (anillos y pipetas) que hayan estado en contacto con bacterias pueden colocarse en una solución fresca de cloro al 10 % durante al menos 20 mins para su esterilización. En cada puesto de laboratorio deberá colocarse una bandeja poco profunda con esta solución. Independientemente de su elección, todos los anillos y pipetas utilizados se deben de recoger para su esterilización. Esterilice las placas de Petri cubriendo el agar con una solución de cloro al 10 %. Deje que repose durante 1 hora o más, y luego vierta el exceso de líquido de la placa en el desagüe. Una vez esterilizadas, las placas de agar pueden guardarse en una bolsa doble y tratarse como basura normal. Se recomienda el uso de gafas de seguridad cuando se utilicen soluciones de cloro. Por favor, consulte las regulaciones locales de salud y seguridad ambiental para una eliminación apropiada.

Incubación

Esta guía está escrita para reflejar el uso de una incubadora de 37 °C. El experimento de transformación se puede realizar sin utilizar una incubadora; sin embargo, el número de días necesarios para cultivar las colonias hasta alcanzar el tamaño óptimo depende de la temperatura ambiente. Los mejores resultados se obtienen cuando las colonias de la placa inicial están frescas (24–36 horas de crecimiento) y miden aproximadamente 1–1.5 mm de diámetro. La refrigeración de las placas de cultivo reducirá de manera significativa la eficacia de la transformación. La temperatura óptima para el cultivo de *E. coli* es de 37 °C (98.6 °F) temperaturas más bajas causarán una reducción en la tasa de crecimiento. Se necesitan 28 °C (82 °F) y dos días de incubación para obtener el tamaño óptimo de las colonias. A 21 °C (70 °F), se requieren tres días de incubación para obtener el tamaño óptimo de las colonias. Ajuste los tiempos de preparación previa y el programa de laboratorio según la temperatura de incubación.

Puntos experimentales – Optimización de su experimento de laboratorio pGLO

Técnicas de práctica

A algunos profesores les gusta hacer una simulación de los procedimientos para explicar la técnica de esterilización, practicar el uso de las pipetas y los anillos, así como el estriado y el esparcimiento de las bacterias sobre la superficie del agar. Usted decidirá lo que es mejor para sus alumnos en función de su experiencia en el laboratorio y su familiaridad con estas técnicas. Si se presta atención a los siguientes puntos experimentales, se obtendrán transformaciones exitosas.

Preparación de las placas de inicio de *E. coli* (agar)

Los mejores resultados se obtienen cuando se utiliza un matraz en vez de un vaso de precipitados para preparar el agar. Asegúrese de que el agar se haya disuelto por completo, ya que una mezcla desigual puede causar que el agar no se solidifique. Siga al pie de la letra las instrucciones del «Paso 1 de la preparación previa» para minimizar la introducción de contaminantes.

Una vez que las placas de inicio han sido estriadas con *E. coli* e incubadas a 37 °C, deben ser utilizadas dentro de un plazo de 24–36 horas. Un retraso de más de 36 horas comprometerá la transformación.

Transferencia de las colonias bacterianas de las placas de agar a los microtubos

El proceso de raspado de una sola colonia de la placa de inicio provoca la tentación de obtener más células de las necesarias. Una sola colonia de aproximadamente 1 mm de diámetro contiene millones de células bacterianas. Para incrementar la eficiencia de la transformación, los alumnos deben seleccionar 2–4 colonias «gruesas» de 1–1.5 mm de diámetro. La selección de más de cuatro colonias puede disminuir la eficacia de la transformación. Seleccione colonias individuales en lugar de un frotis de bacterias de la parte densa de la placa; las bacterias deben crecer activamente para que la transformación tenga éxito.

Transferencia de ADN

Es fundamental transferir el ADN del plásmido desde su tubo de reserva hasta la suspensión de transformación. Los estudiantes deben observar cuidadosamente para ver si hay una película de solución de plásmido a través del anillo. Esto es similar a ver una película jabonosa a través de un anillo de alambre para hacer burbujas de jabón. Opcionalmente, los alumnos pueden pipetear 10 µl del plásmido pGLO en el tubo etiquetado como «+pGLO» y mezclar bien.

Choque térmico

El procedimiento utilizado para aumentar la captación bacteriana de ADN extraño se denomina choque térmico. Es importante que los alumnos sigan las indicaciones sobre el tiempo. Asimismo, es importante el cambio rápido de temperatura y la duración del choque térmico. Para obtener resultados óptimos, los tubos que contienen las suspensiones celulares deben retirarse directamente del hielo, colocarse en el baño de agua a 42 °C durante 50 segundos y volver a colocarse inmediatamente en el hielo. La ausencia de choque térmico dará lugar a una disminución de 10 veces el número de transformantes; 90 s de choque térmico darán aproximadamente la mitad de los transformantes obtenidos con 50 s de choque térmico. En ambos casos, el experimento funcionará, pero ha sido optimizado con 50 s de choque térmico. Asegúrese de utilizar hielo picado, en lugar de hielo en cubitos, para una máxima eficiencia de transformación. Utilice dos termómetros para comprobar la temperatura de la incubadora y asegurar la precisión.

Difusión de transformantes y controles

El suministro de un exceso de cultivo transformado a las placas con la pipeta de transferencia desechable es contraproducente debido a que las placas pueden no absorber el exceso de líquido y el esparcimiento será irregular. La transferencia de las suspensiones bacterianas de los microtubos a las placas de Petri exige un cierto cuidado. Las bacterias se depositarán en el fondo; así los alumnos pueden sujetar la parte superior de un tubo cerrado entre los dedos índice y pulgar de una mano y golpear el fondo del tubo con el dedo índice de la otra. Asegúrese de que los alumnos golpeen el tubo con el dedo o que agiten la suspensión con la pipeta antes de sacarla. Asimismo, asegúrese de que los alumnos cubran las placas de Petri con tapas inmediatamente después de pipetear el cultivo de transformación y de esparcir las células. Distribuya las suspensiones uniformemente por toda la superficie del agar deslizando rápidamente la superficie plana de un nuevo anillo estéril de lado a lado de la superficie de la placa.

Kit de cromatografía de la proteína verde fluorescente (GFP)

Si se planea seguir el experimento de transformación bacteriana pGLO con el kit de purificación de GFP (referencia #166-0005EDU), se deben conservar las bacterias transformadas con pGLO cultivadas en las placas de LB/amp/ara. La mejor manera de almacenar las placas es guardarlas con el medio hacia arriba en un lugar fresco, como un refrigerador. Esto mantendrá vivas a las células pero limitará su crecimiento activo hasta que se necesiten para comenzar el siguiente experimento. Mantener las placas boca abajo evita que la humedad condensada manche las colonias en el medio.

Lo ideal es utilizar las placas en un plazo de 2–4 semanas. Para un almacenamiento más prolongado, asegúrese de envolver las placas con Parafilm para evitar la pérdida de humedad.

Puntos conceptuales

Medios

Los medios nutritivos líquidos y sólidos conocidos como caldo nutritivo LB (llamado así por Luria y Bertani) y agar nutritivo LB se hacen a partir de un extracto de levadura y un digerido enzimático de subproductos cárnicos, que aportan una mezcla de carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos, sales y vitaminas, como nutrientes para el crecimiento bacteriano. El agar se deriva de las algas marinas. Se funde cuando se calienta, forma un gel sólido cuando se enfría (análogo a la gelatina), y sirve para proporcionar un soporte sólido en el que cultivar bacterias.

Selección de antibióticos

El plásmido pGLO, que contiene el gen GFP, también contiene el gen de la betalactamasa, el cual ofrece resistencia al antibiótico ampicilina, un miembro de la familia de la penicilina. La proteína betalactamasa es producida y secretada por las bacterias que contienen el plásmido. La betalactamasa inactiva la ampicilina presente en el agar nutritivo LB para permitir el crecimiento bacteriano. Solo las bacterias transformadas que contienen el plásmido y expresan la betalactamasa pueden crecer en placas que contienen ampicilina. Solamente un porcentaje muy pequeño de las células adquiere el ADN del plásmido y se transforma. Las células no transformadas no pueden crecer en las placas de selección de ampicilina.

Solución de transformación

Se postula que el catión Ca^{2+} de la solución de transformación (50 mM $CaCl_2$, pH 6.1) neutraliza las cargas negativas repulsivas de la columna vertebral de fosfato del ADN y los fosfolípidos de la membrana celular para permitir el acceso del ADN a las células.

Choque térmico

El choque térmico aumenta la permeabilidad de la membrana celular al ADN. Aunque el mecanismo es desconocido, la duración del choque térmico es crítica y se ha optimizado para el tipo de bacterias utilizadas y las condiciones de transformación empleadas.

Recuperación

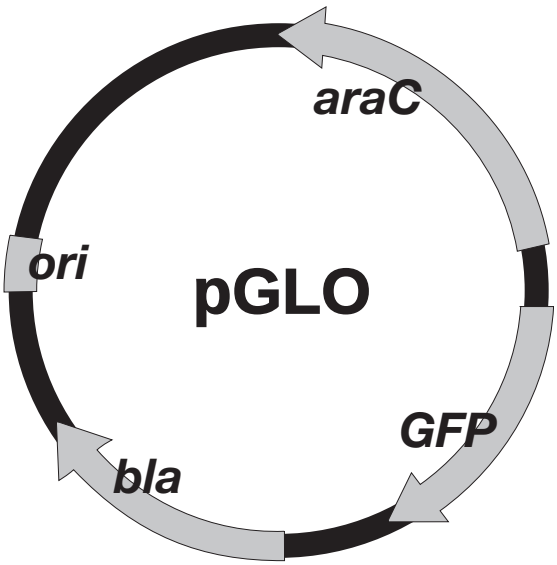
El período de incubación de 10 min después de la adición del caldo nutritivo LB permite a las células recuperarse y expresar la proteína betalactamasa de resistente a la ampicilina, para que las células transformadas sobreviven en las placas de selección de ampicilina.

El cultivo de recuperación puede incubarse a temperatura ambiente o a 37 °C desde 1 hora hasta toda la noche. Esto puede aumentar la efectividad de la transformación en más de 10 veces.

Regulación del gen pGLO

La expresión de los genes en todos los organismos está cuidadosamente regulada para permitir su adaptación a diferentes condiciones y para evitar la sobreproducción innecesaria de proteínas. Los genes involucrados en la descomposición de diversas fuentes de alimentos son buenos ejemplos de genes altamente regulados. Por ejemplo, el azúcar vegetal simple, la arabinosa, es una fuente de energía y carbono para las bacterias. Los genes bacterianos que producen enzimas digestivas para descomponer la arabinosa como alimento no se expresan cuando la arabinosa no se encuentra en el entorno. Sin embargo, cuando la arabinosa está presente, estos genes se activan. Cuando la arabinosa se agota, los genes se vuelven a desactivar.

La arabinosa inicia la transcripción de estos genes promoviendo la unión de la ARN polimerasa. En el ADN del plásmido pGLO modificado genéticamente, algunos de los genes que participan en la descomposición de la arabinosa han sido sustituidos por el gen de la medusa, el cual codifica la GFP. Cuando las bacterias que han sido transformadas con el ADN del plásmido pGLO se cultivan en presencia de arabinosa, el gen GFP se activa, y las bacterias brillan con un color verde intenso al ser expuestas a la luz ultravioleta.



Plásmido pGLO. La secuencia y el mapa están disponibles en http://explorer.bio-rad.com en «Teaching Resources» [Recursos didácticos]

Este es un excelente ejemplo del marco molecular central de la biología en acción; es decir, ADN⇨ARN⇨PROTEÍNA⇨RASGO. Cuando la arabinosa está ausente en el medio de crecimiento, el gen GFP permanece desactivado y las colonias aparecen blancas. Veáse el apéndice A para una descripción y un análisis más detallados de la regulación del gen y la función de la arabinosa promotora.

Resumen de la preparación previa del instructor

Esta sección describe el programa recomendado para la preparación previa por parte del instructor. La guía detallada de preparación anticipada se encuentra en las páginas 13–17.

Preparación del instructor	Cuándo	Tiempo	
Paso 1	Leer el manual de transformación Hacer una copia del manual del estudiante y de la guía rápida para cada estudiante	Inmediatamente	1 h
Paso 2	Preparar placas de agar nutritivo	3–7 días antes	1 h
Paso 3	Preparar las placas de inicio, alicuotar las soluciones	36–48 h antes	30 min
Paso 4	Organizar las estaciones de trabajo de los estudiantes	Inmediatamente antes	10 min

Lista de verificación de la estación de trabajo (✔)

Estaciones de trabajo de los estudiantes. A continuación, se enumeran los materiales y suministros que deben estar presentes en cada estación de trabajo de los estudiantes antes de comenzar los experimentos de laboratorio. Los componentes proporcionados en este kit son suficientes para 8 estaciones de trabajo de estudiantes completas.

Estación de trabajo común. A continuación se muestra una lista de materiales, insumos y equipos que deben estar presentes en un lugar común al alcance de todos los grupos de estudiantes. Depende del profesor si los estudiantes deben tener acceso a las soluciones tampón y al equipo común o si el profesor debe dividir proporcionalmente las soluciones en los microtubos proporcionados.

Lección 2 Laboratorio de transformación
Estación de trabajo de los estudiantes

Material	Cantidad
Placa de inicio de *E. coli* (LB)	1
Placas de agar (1 LB, 2 LB/amp, 1 LB/amp/ara)	4
Solución de transformación	1
Caldo nutritivo LB	1
Anillos de inoculación	7 (1 paquete de 10)
Pipetas	5
Soporte/flotador de poliestireno para microtubos	1
Recipientes (como vasos de poliestireno) llenos de hielo picado (no hielo en cubitos)	1
Marcador	1
Tubos de microcentrífuga	2

Estación de trabajo común

Material	Cantidad
ADN plasmídico pGLO rehidratado	1 vial
Baño de agua a 42 °C y termómetro	1
Luz ultravioleta	1
Incubadora a 37 °C	1
(opcional, ver Habilidades Generales de Laboratorio–Incubación)	1
Micropipetas de volumen ajustable de 2–20 µl	1
Puntas de micropipeta de 2–20 µl	1

Lección 3 Recolección y análisis de datos

Estación de trabajo de los estudiantes

Material	Cantidad
Placas de transformación y control incubadas:	Juego de 4
LB/amp/ara	1
LB/amp	2
LB	1

Estación de trabajo común

Material	Cantidad
Lámpara UV	1–8

Guía de preparación previa del instructor

Objetivos		Tiempo necesario	Cuándo
Paso 1	Preparar las placas de agar	1 h	3–7 días antes
Paso 2	Rehidratar *E. coli*	2 min	36–48 h antes
	Estriar las placas de inicio	15 min	24–36 h antes
	Rehidratar el ADN del plásmido pGLO	2 min	0–36 h antes
Paso 3	Distribuir las soluciones	10 min	Inmediatamente antes
	Preparar las estaciones de trabajo	10 min	

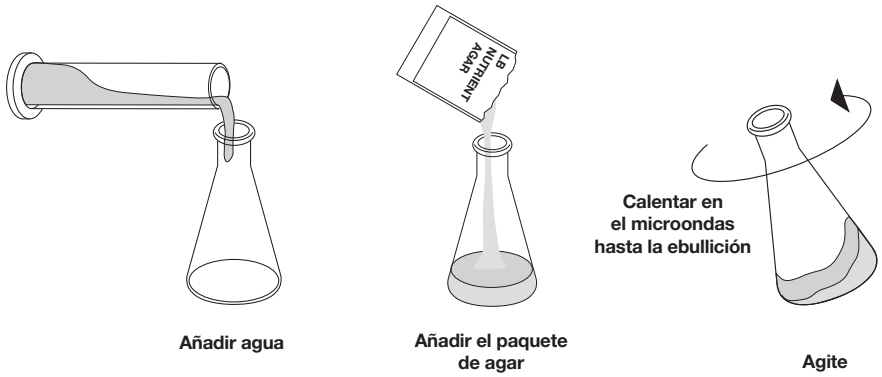
Preparación previa Paso 1: 3–7 días antes Laboratorio de Transformación

1. Preparar el agar nutritivo (sin autoclave)

Las placas de agar deben prepararse por lo menos tres días antes del experimento de los estudiantes. Deben permanecer a temperatura ambiente durante dos días y luego refrigerarse hasta que se utilicen. Los dos días en la mesa de trabajo permiten al agar secarse (sanar) lo suficiente como para absorber fácilmente la solución de transformación líquida explicada en la lección 2 del estudiante.

Para preparar el agar, añada 500 ml de agua destilada a un matraz Erlenmeyer de 1 L o más grande. Los mejores resultados se logran cuando se usa un matraz en vez de un vaso de precipitados. Añada todo el contenido del paquete de agar nutritivo LB. Agite el matraz para disolver el agar y calentar hasta la ebullición en el microondas. Repita el calentamiento y la agitación unas tres veces hasta que todo el agar se haya disuelto (cuando ya no haya partículas claras que dando vueltas), pero tenga cuidado de dejar que el matraz se enfríe ligeramente antes de agitarlo de manera que el medio caliente no se derrame sobre su mano. Una mezcla desigual del agar puede hacer que este no cuaje.

Cuando todo el agar se haya disuelto, deje que el agar nutritivo LB se enfríe de manera que el exterior del matraz sea cómodo de sostener (50 °C). Mientras el agar se enfría, etiquete las placas y prepare la arabinosa y la ampicilina como se indica a continuación (Paso 3). Sea cuidadoso de no dejar que el agar se enfríe tanto que comience a solidificarse. Mantener el matraz con el agar fundido en un baño de agua a 50°C puede ayudar a evitar que el agar se enfríe demasiado rápido.



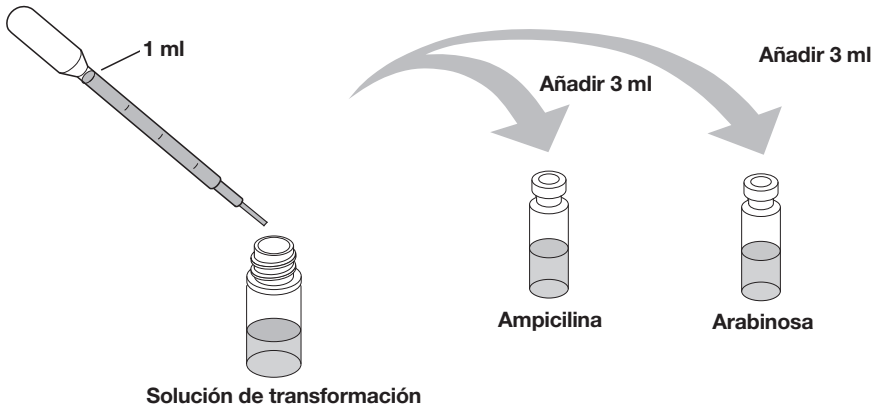
Un microondas es la mejor manera de disolver el agar, pero si no se dispone de uno, puede usar una placa caliente. Hay que tener cuidado de no hervir hasta que se seque y de hervir la mezcla a fuego lento durante 5–10 min después de que rompa el hervor para asegurar la esterilización.

2. Preparar la arabinosa y la ampicilina

Nota: la arabinosa requiere al menos 10 min para disolverse,— tenga paciencia.

La arabinosa se envía seca en un pequeño frasco. Con una nueva pipeta estéril, añada 3 ml de solución de transformación directamente al frascco para rehidratar el azúcar. Agite el frasco con la ayuda de un agitador vórtex, para mezclar. (La solución de transformación se utiliza en este caso, por ser una solución estéril muy práctica. El agua estéril funciona igual de bien). Deseche la pipeta después de usarla.

La ampicilina también se envía seca en un pequeño frasco. Con una nueva pipeta estéril, añada 3 ml de solución de transformación directamente al frasco para rehidratar el antibiótico. (La solución de transformación se utiliza en este caso, por ser una solución estéril muy práctica. El agua estéril funciona igual de bien).



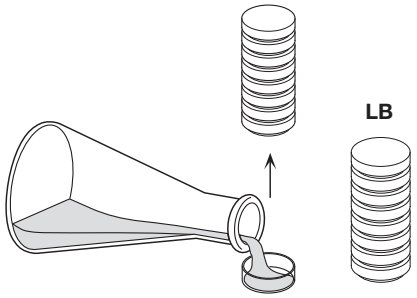
Nota: el calor excesivo (> 60 °C) destruirá la ampicilina y la arabinosa, pero el agar nutritivo se solidifica a 27 °C, por lo que hay que vigilar cuidadosamente el enfriamiento del agar y verter las placas de principio a fin sin interrupción. Mantener el matraz con el agar fundido en un baño de agua a 50 °C puede ayudar a evitar que el agar se enfríe demasiado rápido. El exceso de burbujas se puede eliminar después de haber llenado todas las placas flameando brevemente la superficie de cada placa con la llama de un mechero Bunsen. Una vez que las placas hayan sido vertidas, no se deben de mover hasta que el agar se haya solidificado. Tire el exceso de agar en la basura y no en el fregadero. Limpie cualquier goteo de agar que haya chorreado a los lados de las placas.

3. Etiquetado de las placas

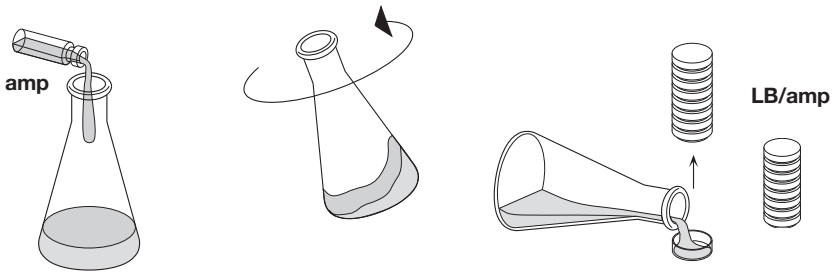
Las 40 placas de agar suministradas deben etiquetarse con un marcador permanente en la parte inferior, cerca del borde. No etiquete las tapas. Etiquete 16 placas de LB, 16 placas de **LB/amp** y 8 placas de **LB/amp/ara**.

4. Llene las placas de agar nutritivo LB (LB, LB/amp, LB/amp/ara)

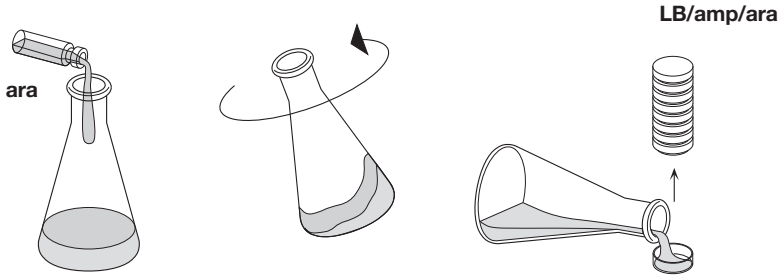
En primer lugar, vierta el agar nutritivo LB en las 16 placas etiquetadas como LB. Apile de 4 a 8 placas vacías y, empezando por la placa inferior, levante la tapa y las placas superiores hacia arriba y a un lado con una mano y vierta el agar nutritivo LB con la otra. Llene la placa aproximadamente entre un tercio y la mitad (~12 ml) con agar, vuelva a colocar la tapa y continúe con el resto de la pila. Llene 16 placas de esta forma. Deje que las placas se enfríen en este orden superpuesto.



En segundo lugar, añada la ampicilina hidratada al agar nutritivo LB restante. Remueva brevemente para mezclar. Vierta en las 16 placas etiquetadas como **LB/amp** utilizando la misma técnica explicada anteriormente.



En tercer lugar, añada la arabinosa hidratada al agar nutritivo LB restante que contiene ampicilina. Agite brevemente para mezclar y vierta en las 8 placas etiquetadas como **LB/amp/ara** usando la técnica anterior.



Las placas deben cuajar en 30 minutos.

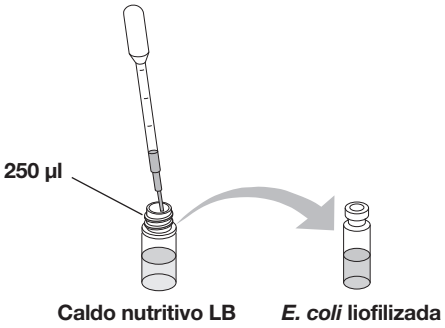
5. Almacenamiento de las placas

Después de que las placas hayan estado durante dos días a temperatura ambiente, pueden utilizarse o apilarse de veinte en veinte en una bolsa o funda de plástico que se deslice sobre ellas. Al cubrir las placas con la bolsa de plástico, estas se mantendrán hidratadas. A continuación, se invierte la pila, se cierra la bolsa con cinta adhesiva y se guardan las placas boca abajo a 4 °C hasta que vayan a ser utilizadas. Las placas se invierten para evitar la condensación en la tapa, la cual puede gotear sobre el agar.

Preparación previa Paso 2: 24–36 h antes del Laboratorio de Transformación

1. Rehidratar las bacterias

Con una pipeta estéril, rehidrate la *E. coli* HB101 liofilizada añadiendo 250 µl de caldo nutritivo LB directamente al frasco. Vuelva a tapar el frasco y agítelo suavemente para asegurarse de que todas las bacterias estén rehidratadas. Incube el frasco a 37 °C durante 8–24 horas. Si no se dispone de una incubadora o un baño de agua, el frasco puede colocarse en un gran volumen de agua calentada a 37 °C y luego dejarse a temperatura ambiente durante 16–24 horas. Almacene el caldo LB restante a 4 °C hasta su uso.



2. Estríe las placas de inicio para producir colonias bacterianas individuales en las placas de agar

Cada equipo de laboratorio necesitará su propia placa de inicio como fuente de células para la transformación. Este kit contiene suficiente material para equipar ocho estaciones de trabajo de estudiantes completas. Las placas de LB deben estriarse para obtener colonias individuales e incubadas a 37 °C durante 24–36 horas antes de planear la actividad de transformación.

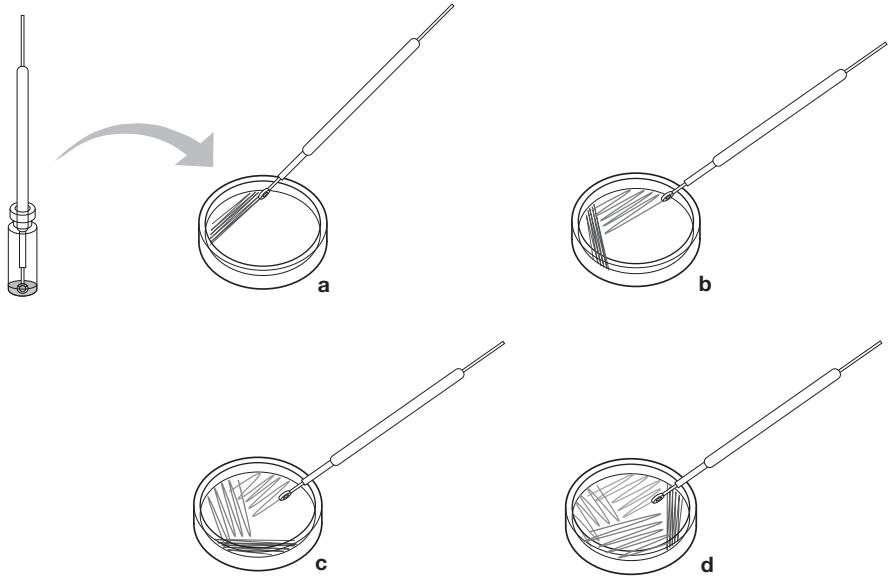
Usando la *E. coli* rehidratada que preparó en el último paso y ocho placas de agar **LB** (preparadas en el primer paso), estríe una placa de inicio para cada uno de los equipos de estudiantes. El propósito del estriado es generar colonias individuales a partir de una suspensión concentrada de bacterias. Una cantidad mínima de la suspensión bacteriana rinde mucho. En condiciones favorables, una célula se multiplica hasta convertirse en millones de células genéticamente idénticas en sólo 24 horas.

a. Agite suavemente el frasco de *E. coli* HB101 para volver a suspender las bacterias. Introduzca un anillo de inoculación estéril en el cultivo bacteriano rehidratado. Introduzca el anillo directamente en el frasco. Retire el anillo y asegúrese de que una película de bacterias lo atraviese. Estríe las placas como se ilustra a continuación. El estriado se lleva a cabo de forma secuencial en cuatro cuadrantes. El primer estriado consiste en dispersar ligeramente las células. Usando el anillo, vaya hacia adelante y hacia atrás una docena de veces en la pequeña área mostrada. En los cuadrantes siguientes, las células se diluyen cada vez más, aumentando la probabilidad de producir colonias individuales.

b. Para los estriados posteriores, el objetivo es usar la mayor cantidad posible de la superficie de la placa. Gire la placa aproximadamente 45 grados (para que el movimiento de estriado sea cómodo para su mano) y comience el segundo estriado. No sumerja la bacteria rehidratada por segunda vez. Vuelva al estriado anterior un par de veces y luego vaya hacia adelante y hacia atrás, tal como se muestra, unas 10 veces.

c. Gire la placa de nuevo y repita el estriado.

d. Gire la placa por última vez y haga la última estría. Repita los pasos a–d con las placas de **LB** restantes tantas veces como el número de estaciones de trabajo de los estudiantes. Utilice el mismo anillo de inoculación para todas las placas. Cuando termine con cada placa, tápela inmediatamente para evitar la contaminación.

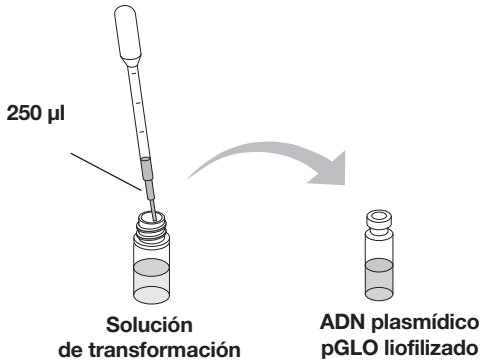


e. Coloque las placas boca abajo dentro de la incubadora durante la noche a 37 °C o a temperatura ambiente durante 2–3 días si no dispone de incubadora. Para lograr una alta eficiencia de transformación, use las placas dentro de las 24–36 horas siguientes, ya que las bacterias deben estar creciendo activamente para la transformación. Un retraso de más de 36 horas comprometerá la transformación. **NO REFRIGERAR ANTES DE SU USO**.

f. *E. coli* forma colonias blanquecinas que son uniformemente circulares con bordes lisos. Evite utilizar placas con colonias contaminantes.

3. Preparar el plásmido pGLO

Con una nueva pipeta estéril, añada 250 µl de solución de transformación en el frasco de ADN plasmídico pGLO liofilizado. Tome en cuenta que la cantidad de ADN es tan pequeña, que el frasco puede parecer vacío. Invierta el frasco para mezclar bien la solución de plásmido, asegurándose de que el ADN esté disuelto y no se pegue al tapón. Si es posible, almacene el ADN hidratado en un refrigerador. (La solución de transformación se utiliza aquí porque es una solución práctica, estéril y libre de nucleasas. El agua estéril funciona igual de bien).



Preparación previa Paso 3: Antes del laboratorio de transformación

1. Distribución de las soluciones

Para cada estación de trabajo de los estudiantes, distribuya 1 ml de solución de transformación ($CaCl_2$) y 1 ml de caldo nutritivo LB en microtubos separados de 2 ml codificados por colores que se proporcionan en el kit. Si el caldo nutritivo LB se distribuye un día antes del laboratorio, debe refrigerarse. Etiquete los tubos.

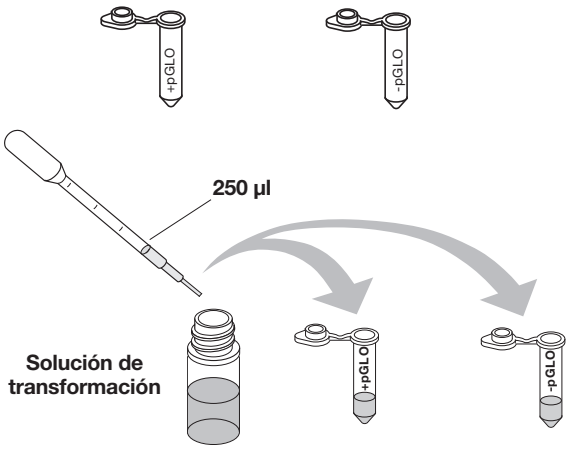
2. Prepare las estaciones de trabajo para el laboratorio de transformación

Consulte la página **11** para ver los materiales que se deben suministrar en cada estación de trabajo.

Kit de transformación—Guía rápida

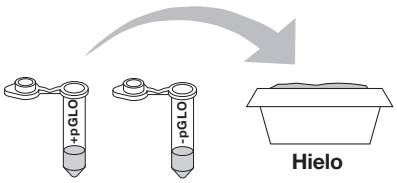
GUÍA RÁPIDA

1. Etiqueta un microtubo cerrado +pGLO y otro -pGLO. Etiqueta ambos tubos con el nombre de tu grupo. Colócalos en la gradilla de poliestireno para tubos.

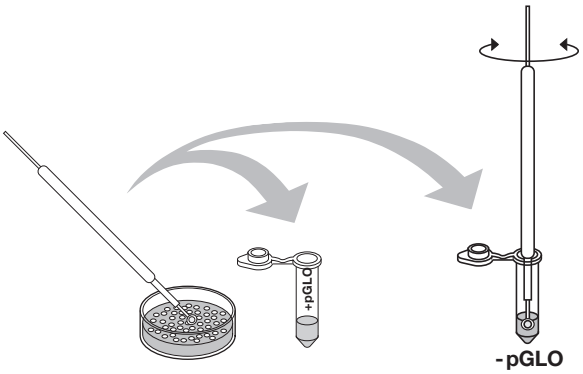


2. Abre los tubos y, con una pipeta de transferencia estéril, transfiere 250 µl de solución de transformación ($CaCl_2$) a cada tubo.

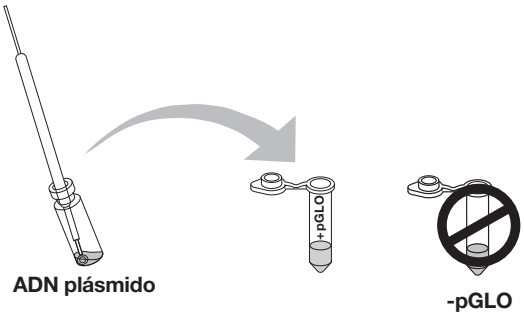
3. Coloca los tubos en hielo. No utilices hielo en cubitos.



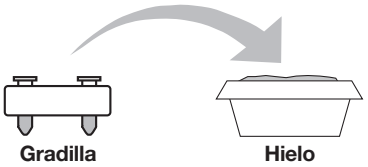
4. Utiliza un anillo estéril para recoger una sola colonia de bacterias de la placa de inicio. Toma el tubo +pGLO y sumerge el anillo en la solución de transformación que se encuentra en el fondo del tubo. Haz girar el anillo entre el dedo índice y el pulgar hasta que toda la colonia esté dispersa en la solución de transformación (sin que haya pedazos flotantes). Vuelve a colocar el tubo en la gradilla y colócala en el hielo. Con un anillo nuevo estéril, repite la operación con el tubo -pGLO.



5. Examina la solución de ADN plasmídico pGLO con la lámpara UV. Anota tus observaciones. Sumerge un anillo estéril nuevo en el tubo de reserva de ADN plasmídico. Extrae un anillo lleno. Debe haber una película de solución de plásmido en el anillo. Esto es similar a ver una película jabonosa a través de un anillo para hacer burbujas de jabón. Revuelve el anillo en la suspensión celular del tubo +pGLO. Opcionalmente, pipetea 10 µl de plásmido pGLO en el tubo +pGLO y mezcla. Cierra el tubo -pGLO y devuélvelo a la gradilla con hielo. No añadas ADN plasmídico al tubo -pGLO. ¿Por qué no? Cierra el tubo -pGLO y devuélvelo a la gradilla con hielo.

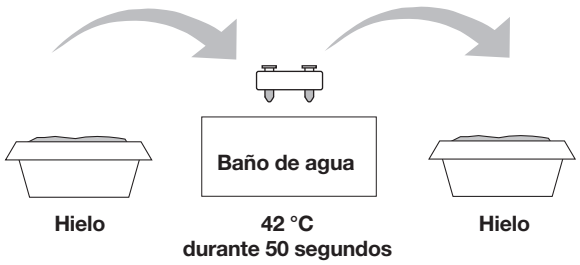


6. Incuba los tubos en hielo durante 10 minutos. Asegúrate de empujar los tubos hasta el fondo de la gradilla para que la parte inferior de los tubos sobresalga y haga contacto con el hielo.

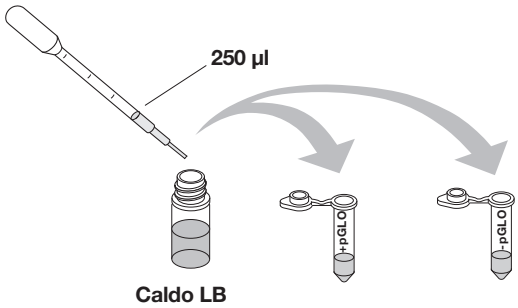


7. Mientras los tubos están en el hielo, etiqueta tus cuatro placas de agar en la parte inferior (no en la tapa) como se muestra en el diagrama.

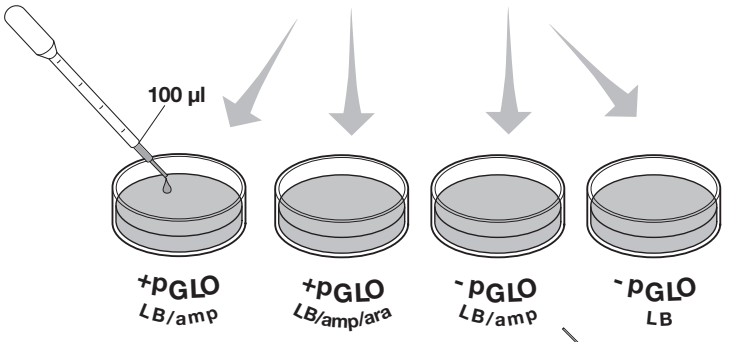
8. Choque térmico. Utilizando la gradilla de poliestireno como soporte, transfiere los tubos (+) pGLO y (-) pGLO al baño de agua, ajustado a 42 °C, durante **exactamente** 50 segundos. Asegúrate de empujar los tubos hasta el fondo de la gradilla para que la parte inferior de estos sobresalga y entre en contacto con el agua caliente. Cuando hayan transcurrido los 50 segundos, coloca ambos tubos de nuevo en el hielo. Para obtener los mejores resultados de transformación, el cambio del hielo (0 °C) a 42 °C y viceversa (del calor al hielo) debe ser realizado **con rapidez**. Incuba los tubos en hielo durante 2 min.



9. Retira del hielo la gradilla que contiene los tubos y colócala sobre la mesa. Abre uno de los tubos y, con una nueva pipeta estéril, agrega 250 µl de caldo nutritivo LB al tubo y vuelve a cerrarlo. Repite con una **nueva pipeta estéril** para el otro tubo. Incuba los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente.

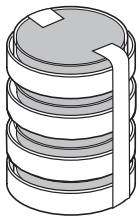


10. Agita con el dedo suavemente los tubos cerrados para mezclar. Utilizando una **nueva pipeta estéril para cada tubo**, pipetea 100 µl de cada uno de los tubos a las placas correspondientes, como se muestra en el diagrama en las placas adecuadas.



11. **Utiliza un nuevo anillo estéril para cada placa**. Distribuye las suspensiones de manera uniforme por toda la superficie del agar deslizando rápidamente la superficie plana de un nuevo anillo estéril de lado a lado de la superficie de la placa.

12. Apila las placas y pégalas con cinta adhesiva. Pon el nombre de tu grupo y el período de clase en la parte inferior de la pila y coloca la pila de placas **boca abajo** en la incubadora a 37 °C hasta el día siguiente.



Guía de respuestas del instructor

Lección 1 Preguntas de enfoque

1. Para transformar genéticamente un organismo entero, hay que insertar el nuevo gen o los nuevos genes en todas las células del organismo. ¿Qué organismo es más adecuado para la transformación genética total,–uno compuesto por muchas células o uno compuesto por una sola célula?

   Un organismo unicelular sería el mejor receptor para una transformación genética, ya que sólo contiene una célula que debe adoptar el nuevo gen.

2. Los científicos a menudo quieren saber si el organismo genéticamente transformado puede transmitir sus nuevos rasgos adquiridos a sus descendientes y a las generaciones futuras. Para obtener esta información, ¿cuál sería un mejor candidato para su investigación, un organismo en el que cada nueva generación se desarrolla y se reproduce rápidamente, o uno que lo haga más lentamente?

   Un organismo que se reproduce rápidamente. La rápida producción de descendencia o nueva progenie te permitirá evaluar rápidamente si el nuevo rasgo se ha transmitido.

3. La seguridad es otra consideración importante a la hora de elegir un organismo experimental. ¿Qué rasgos o características debe tener (o no tener) el organismo para estar seguro de que no te perjudicará a ti o al medioambiente?

   El organismo no debe producir toxinas o compuestos que puedan enfermar a las personas. El organismo debe crecer vigorosamente en el entorno del laboratorio, pero no debe ser capaz de sobrevivir fuera de él. El organismo no debe ser capaz de infectar plantas o animales.

4. Basándote en las consideraciones anteriores, ¿cuál sería la mejor opción para una transformación genética: una bacteria, una lombriz de tierra, un pez o un ratón? Describe tu razonamiento.

   Una bacteria sería el mejor organismo huésped. Las bacterias son pequeños organismos unicelulares que se reproducen rápida y fácilmente.

Nota: la cepa de la bacteria *Escherichia coli (E. coli)* HB101 K-12, es la que mejor se ajusta a los requisitos descritos anteriormente: está formada por una sola célula, se reproduce cada 20 minutos, no enferma a las personas y no puede sobrevivir fuera del laboratorio.

Lección 1 Preguntas de reflexión

Recuerda que el objetivo de la transformación genética es cambiar los rasgos de un organismo (fenotipo). Antes de que se pueda detectar cualquier cambio en el fenotipo de un organismo, se debe realizar un examen exhaustivo de su fenotipo habitual (antes de la transformación). Observa las colonias de *E. coli* en tus placas de inicio. Enumera todos los rasgos o características observables que puedan describirse.

Color de las colonias, número de colonias, distribución de las colonias en la placa.

Describe cómo podrías utilizar dos placas de agar nutritivo LB, un poco de *E. coli* y un poco de ampicilina para determinar cómo las células de *E. coli* se ven afectadas por la ampicilina.

Podrían colocarse cantidades iguales de células en dos placas diferentes de agar nutritivo LB, una que solo contenga agar nutritivo LB y otra que contenga agar nutritivo LB con ampicilina. Se podría comparar el crecimiento de *E. coli* en las dos placas. Si la ampicilina afecta negativamente al crecimiento de *E. coli*, debería haber menos colonias de bacterias en esa placa. Si la ampicilina no tiene ningún efecto, debería haber aproximadamente el mismo número de colonias en ambas placas.

Resultados: ¿Qué esperas que indiquen tus resultados experimentales sobre el efecto de la ampicilina en las células de *E. coli*?

Los antibióticos suelen matar las bacterias (son bactericidas) o inhibir su crecimiento (bacteriostáticos). Por lo tanto, debería haber pocas colonias bacterianas, si es que hay alguna, en la placa de ampicilina. La presencia de cualquier colonia en la placa de ampicilina sugeriría que esas bacterias son resistentes al antibiótico ampicilina.

Lección 2 Preguntas de repaso

1. ¿En cuál de las placas esperarías encontrar bacterias más parecidas a las colonias originales de *E. coli* no transformadas que observaste inicialmente? Explica tu predicción.

   Las bacterias que se parecen a las no transformadas se encontrarán en la placa de LB/(-) pGLO. Estas bacterias se extrajeron de la placa de inicio, no se les añadió ningún plásmido y se reprodujeron en una placa de LB. Por lo tanto, son prácticamente idénticas a las del iniciador no transformado.

2. Si hay células bacterianas transformadas genéticamente, ¿en qué placa(s) es más probable que se encuentren? Explica tu predicción.

   Las células transformadas se encuentran en las placas de LB/amp y de LB/amp/ara. Las células transformadas genéticamente han absorbido el plásmido pGLO que expresa el gen de resistencia a la ampicilina — y pueden sobrevivir en las placas que contienen ampicilina.

3. ¿Qué placas deberían compararse para determinar si se ha producido alguna transformación genética? ¿Por qué?

   Las placas de LB/amp (-) pGLO y las placas de LB/amp (+) pGLO deben compararse directamente. Las células que no fueron tratadas con ADN (-pGLO) no deberían expresar el gen de resistencia a la ampicilina y no crecerán en las placas de LB/amp. Las células tratadas con ADN (+pGLO) deben contener el plásmido pGLO y expresar el gen de resistencia a la ampicilina; la placa de LB/amp correspondiente — contendrá colonias bacterianas transformadas.

4. ¿Qué se entiende por placa de control? ¿Para qué sirve un control?

   Una placa de control es una guía que se utiliza para ayudar a interpretar los resultados experimentales. En este experimento, las dos placas de (-) pGLO son placas de control. La placa de control LB/amp puede compararse con la placa de LB/amp (+)pGLO. Esta comparación muestra que la transformación genética produce colonias bacterianas que pueden crecer con ampicilina (debido a la captación del plásmido pGLO y a la expresión del gen de resistencia a la ampicilina). La placa de control de (-) pGLO/LB puede compararse con cualquiera de las placas de LB/amp para mostrar que la captación del plásmido es necesaria para el crecimiento en presencia de ampicilina. La placa de (-) pGLO LB/amp muestra que el cultivo iniciador no crece en la placa de LB/amp. Sin este control no se podrá saber si las colonias en la placa de LB/amp (+) pGLO son realmente transformantes.

Lección 3 Recolección y análisis de datos

1. Observa cuidadosamente y dibuja lo que se ve en cada una de las cuatro placas. Coloca tus dibujos en la tabla de datos en la columna de la derecha. Alternativamente, el protocolo puede incorporar la documentación digital de las placas con el sistema Blue Digital BioImaging de Vernier (Apéndice E). Registra tus datos para que puedas comparar las observaciones de las células «+ pGLO» con tus observaciones parala *E. coli* no transformada. Anota las siguientes observaciones para cada placa.
2. En términos relativos, ¿qué cantidad de crecimiento bacteriano observas en cada placa?

   Debe haber múltiples colonias en las placas de LB/amp y LB/amp/ara que recibieron el plásmido pGLO (aproximadamente ~ 75 colonias). No debe haber crecimiento en la placa de LB/amp (-) pGLO. Debe haber un césped de bacterias en la placa de LB (-) pGLO.
3. ¿De qué color son las bacterias?

   Las bacterias de la placa de (+) pGLO LB/amp y de la placa de (-) pGLO LB deben ser blanquecinas. Las bacterias de la placa de (+) pGLO LB/amp/ara deben ser blanquecinas cuando se exponen a la luz normal de la habitación, pero tienen una fluorescencia verde brillante cuando se exponen a la luz UV de onda larga.
4. ¿Cuántas colonias bacterianas hay en cada placa? (Cuenta las manchas que ves).

   Debería haber aproximadamente unas 75 colonias bacterianas en las dos placas (+) de pGLO. El césped de bacterias en la placa de LB contiene una dispersión uniforme de bacterias y no se pueden contar las colonias individuales.

Placas	Observaciones
+pGLO, LB/amp	**Muchas colonias de bacterias transformadas (aproximadamente ~75). Las colonias aparecen de color blanco.**
+pGLO, Las colonias LB/amp/ara	**Muchas colonias transformadas de bacterias (aproximadamente ~75) parecen blancas cuando se exponen a la luz ambiente, pero presentan fluorescencia verde brillante cuando se exponen a la luz UV.**
–pGLO, LB/amp	**No hay crecimiento bacteriano en esta placa.**
–pGLO, LB	**En esta placa hay un césped uniforme de bacterias. El césped aparece de color blanquecino.**

Lección 3 Análisis de los resultados

1. ¿Cuáles de los rasgos que observaste originalmente para *E. coli* no parecieron alterarse? En el espacio siguiente, enumera estos rasgos no transformados y cómo llegaste a este análisis para cada uno de los rasgos que mencionaste en la lista.

Rasgo original	Análisis de las observaciones
Color	**Las bacterias son de color blanquecino**
Tamaño de la colonia	**El tamaño de la colonia es similar antes y después de la transformación**

2. De los rasgos de *E. coli* que observaste originalmente, ¿cuáles parecen ser ahora significativamente diferentes después de llevar a cabo el procedimiento de transformación? Enumera a continuación dichos rasgos y describe los cambios que has observado.

Nuevo rasgo	Cambio observado
Color	**Las colonias en la placa de LB/amp/ara presentan fluorescencia verde bajo luz UV**
Ampicilina	**Las colonias transformadas pueden crecer con resistencia a la ampicilina**

3. Si las células transformadas genéticamente han adquirido la capacidad de vivir en presencia del antibiótico ampicilina, entonces ¿qué se puede inferir de los demás genes en el plásmido que utilizaste en tu procedimiento de transformación?

   El plásmido debe expresar un gen de resistencia a la ampicilina (el producto proteico del gen *bla* codifica la betalactamasa, la proteína que descompone la ampicilina).

4. A partir de los resultados obtenidos, ¿cómo podrías demostrar que los cambios que se produjeron se deben al procedimiento que realizaste?

   La mejor manera es comparando el control con las placas experimentales. Las células que no fueron tratadas con el plásmido (placas de LB/amp (-) pGLO y LB/amp/ara (-) pGLO) no pudieron crecer en ampicilina, mientras que las células que fueron tratadas con el plásmido (placa de LB/amp (+) pGLO y LB/amp/ara (+) pGLO) pueden crecer en la placa de LB/amp. Por lo tanto, el plásmido debe conferir resistencia a la ampicilina.

Lección 3 Preguntas de repaso

¿Qué es lo que brilla?

1 Recuerda lo que observaste cuando hiciste brillar la luz UV sobre una muestra de ADN plásmido pGLO original y describe tus observaciones.

La muestra de plásmido no era fluorescente.

2. ¿Cuál de las dos posibles fuentes de la fluorescencia se puede eliminar ahora?

Se puede eliminar que el ADN plasmídico pGLO y la bacteria original proporcionen la fuente de fluorescencia.

3. ¿Qué indica esta observación sobre el origen de la fluorescencia?

La fuente de fluorescencia es probablemente de alguna proteína que el plásmido codifica.

4. Describe la evidencia que indica si tu intento de realizar una transformación genética fue exitoso o no.

Un experimento exitoso estará representado por la presencia de colonias en las placas de (+) pGLO LB/amp y de (+) pGLO LB/amp/ara y la ausencia de colonias en la placa de (-) pGLO LB/amp. Además, las colonias en la placa de LB/amp/ara deben tener fluorescencia verde.

Un experimento fallido mostrará la ausencia de colonias en las placas de (+) pGLO LB/amp y de (+) pGLO LB/amp/ara. Esto podría ser el resultado de no añadir un anillo llena de plásmido al tubo de (+) pGLO o de no añadir una colonia de bacterias al tubo de (+) pGLO.

Lección 3 Preguntas de repaso

La interacción entre los genes y el entorno

Observa de nuevo tus cuatro placas. ¿Observas algunas *E. coli* creciendo en las placas de LB que no contienen ampicilina ni arabinosa?

Sí. Las bacterias que no recibieron el plásmido están creciendo en una placa de LB normal.

1. De acuerdo con tus resultados, ¿puedes saber si estas bacterias son resistentes a la ampicilina al observarlas sobre la placa de LB? Explica tu respuesta.

   No. No se puede saber si las bacterias son resistentes a la ampicilina sólo con mirarlas. Ambos tipos de bacterias (las que son resistentes a la ampicilina y las que son sensibles a la ampicilina) tienen un aspecto similar cuando se cultivan—piensa en las colonias de la placa de inicio LB y en las colonias de la placa de +pGLO LB/amp.

2. ¿Cómo cambiarías el entorno de las bacterias en la placa en la que están creciendo para saber si son resistentes a la ampicilina?

   La mejor prueba sería tomar algunas de las bacterias que crecen en la placa de LB y estriarlas en una placa de LB/amp. Si las bacterias son viables en la placa de LB/amp, entonces son resistentes a la ampicilina. Si no sobreviven colonias de bacterias, entonces no eran resistentes a la ampicilina (eran sensibles a la ampicilina).

3. Muy a menudo, los rasgos de un organismo están causados por una combinación de sus genes y el entorno en el que vive. Piensa en el color verde que has visto en la bacteria transformada genéticamente:

   a. ¿Cuáles son los dos factores que deben estar presentes en el entorno de la bacteria para que veas el color verde? (Pista: uno de ellos está en la placa y el otro está en la forma en la que se observa la bacteria).

      El azúcar arabinosa en la placa de agarosa es necesario para activar la expresión del gen GFP. La luz ultravioleta es necesaria para provocar la fluorescencia de la proteína GFP dentro de la bacteria.

   b. ¿Qué crees que hace cada uno de los dos factores ambientales que has enumerado para que la bacteria genéticamente transformada se vuelva verde?

      El azúcar arabinosa activa la expresión del gen GFP al unirse a una proteína reguladora, *araC*, que se encuentra en el promotor P_{BAD}. Cuando la arabinosa está presente, se une a *araC*, cambiando en consecuencia la conformación de *araC*, lo que facilita la transcripción del gen por la ARN polimerasa (véase la descripción detallada en el Apéndice D). Cuando se expone a la luz ultravioleta, los electrones del cromóforo de la GFP se excitan a un estado de mayor energía. Cuando bajan a un estado de energía inferior, emiten una longitud de onda más larga de luz verde fluorescente visible a 509 nm.

   c. ¿Qué ventaja tendría para un organismo poder activar o desactivar ciertos genes en respuesta a determinadas condiciones?

      La regulación de los genes permite la adaptación a diferentes condiciones y evita la sobreproducción de proteínas innecesarias. Un buen ejemplo de genes altamente regulables son las enzimas que descomponen las fuentes alimentarias de carbohidratos. Si el azúcar arabinosa está presente en el medio de crecimiento, es beneficioso para las bacterias producir las enzimas necesarias para catabolizar la fuente de azúcar. Por el contrario, si la arabinosa no está presente en el medio nutritivo, sería un gran desperdicio energético producir las enzimas para descomponer la arabinosa.

Lección 4 Actividad de ampliación

1. **Determinación del número total de células verdes fluorescentes.**

   Coloca la placa de LB/amp/ara cerca de una fuente de luz UV. Podemos asumir que cada colonia de la placa procede de una sola célula. Conformelas células individuales se reproducen, más y más células se forman y se desarrollan en lo que se llama una colonia. La forma más directa de determinar **el número total de células verdes fluorescentes** es contar las colonias de la placa.

   Anota ese número aquí ➔ Número total de células = **190**

2. **Determinar la cantidad de ADN del plásmido pGLO en las células bacterianas esparcidas en la placa de LB/amp/ara.**

   Necesitamos dos datos para averiguar la cantidad de ADN (pGLO) en las células bacterianas esparcidas en la placa de LB/amp/ara en este experimento. (i) Cuál fue la cantidad total de ADN con la que comenzamos el experimento, y (ii) Qué fracción del ADN (en las bacterias) se esparció realmente en las placas de LB/amp/ara.

   Después de calcular estos datos, tendrán que multiplicar la **cantidad total de ADN plasmídico pGLO utilizado** en este experimento por la fracción de ADN que esparcieron en la placa de LB/amp/ara. La respuesta a esta multiplicación te indicará la cantidad de ADN plasmídico pGLO en las células bacterianas que se esparcieron en la placa de LB/amp/ara.

   a. Determinación de la cantidad total de ADN

   La cantidad total de ADN plasmídico pGLO con la que comenzamos es igual al producto de la concentración y el volumen total utilizado, o bien

   ADN (µg) = (concentración de ADN (µg/µl) x (volumen de ADN en µl)

   En este experimento has utilizado 10 µl de pGLO con una concentración de 0.08 µg/µl. Esto significa que cada microlitro de solución contenía 0,08 µg de ADN pGLO. Calcula la **cantidad total de ADN utilizada en este experimento.**

   Anota ese número aquí ➔ Cantidad total de ADN (µg) utilizada en este experimento = **0.8**

   ¿Cómo utilizarás este dato?

   Este número se multiplicará por la fracción de ADN utilizada para determinar la cantidad total de ADN extendida en la placa de agar.

b. **Determinar la fracción de ADN plasmídico pGLO (en la bacteria) que realmente se esparció en la placa de LB/amp/ara.** Como no todo el ADN plasmídico pGLO que agregaste a las células bacterianas se transferirá a la placa de agar, debes averiguar qué fracción del ADN se esparciórealmente en la placa de LB/amp/ara. Para ello, divide el volumen de ADN que esparciste en la placa de LB/amp/ara entre el volumen total de líquido en el tubo de ensayo que contiene el ADN. Una fórmula para este argumento es:

$$\text{Fracción de ADN utilizada} = \frac{\text{Volumen extendido en la placa de LB/amp/ara}}{\text{Volumen total en el tubo de ensayo}}$$

Extendiste 100 µl de células que contienen ADN pGLO en un tubo de ensayo que contiene un volumen total de 510 µl de solución. ¿Recuerdas por qué hay 510 µl de solución total? Busca en el procedimiento de laboratorio y localiza todos los pasos en los que has añadido líquido al tubo de reacción. Suma los volúmenes.

Utiliza la fórmula anterior para calcular la **fracción de ADN** que esparciste en la placa de LB/amp/ara.

Anota ese número aquí ➔ Fracción de ADN = **0.2**

- ¿Cómo vas a utilizar este dato?

  Este número se multiplicará por la cantidad de ADN utilizada para calcular la cantidad de ADN esparcido en una placa de agar.

Entonces, ¿cuántos microgramos de ADN esparciste en las placas de LB/amp/ara?

Para responder a esta pregunta, tendrás que multiplicar la **cantidad total de ADN** utilizada en este experimento por la **fracción de ADN** que esparciste en la placa de LB/amp/ara.

ADN pGLO esparcido (µg) = Cantidad total de ADN utilizado (µg) x fracción de ADN

Anota ese número aquí ➔ Dispersión de ADN pGLO (µg) = **0.16**

- ¿Qué te dirá este número?

  Este número te indica la cantidad de ADN que se esparció en la placa de agar.

Observa todos tus cálculos anteriores. Decide cuáles de los números que has calculado pertenecen a la siguiente tabla. Rellena la siguiente tabla:

Número de colonias en la placa de LB/amp/ara	190
Microgramos de ADN pGLO esparcidos en las placas	0,16 µg

Ahora utiliza los datos de la tabla para calcular la eficiencia de la transformación de pGLO

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{\text{Número total de colonias que crecen en la placa de agar}}{\text{Cantidad de ADN extendida en la placa de agar}}$$

Anota ese número aquí ➔

1187 transformantes/µg
Eficiencia de transformación

Análisis

Los cálculos de la eficiencia de transformación dan como resultado números muy grandes. Los científicos suelen utilizar una abreviatura matemática denominada notación científica. Por ejemplo, si la eficiencia de transformación calculada es de 1000 bacterias/µg de ADN, este número se indica a menudo como:

103 transformantes/µg **(10^3 es otra forma de decir 10 x 10 x 10 o 1000)**

- ¿Cómo informarían los científicos de 10,000 transformantes/µg en notación científica?

  10^4

  Llevando esta idea un poco más lejos, supongamos que los científicos calculan una eficiencia de **5,000 bacterias/µg de ADN**. Esto se reportaría como:

  5.0×10^3 transformantes/µg (5 veces 1,000)

- ¿Cómo informarían los científicos de 40,000 transformantes/µg en notación científica?

  4.0×10^4

GUÍA DE RESPUESTAS DEL PROFESOR

Un último ejemplo: Si se calculan 2,600 transformantes/µg, la notación científica para este número sería:

2.6×10^3 transformantes/µg (2.6 veces 1,000)

Del mismo modo:

$5{,}600 = 5.6 \times 10^3$ $271{,}000 = 2.71 \times 10^5$ $2{,}420{,}000 = 2.42 \times 10^6$

- ¿Cómo informarían los científicos de 960,000 transformantes/µg en notación científica?

  9.6×10^5

- Indica tu eficiencia de transformación calculada en notación científica.

  1.2×10^3 transformantes/µg

- Utiliza una o dos frases para explicar el significado de tu cálculo de la eficiencia de transformación:

  La eficiencia de la transformación es un valor cuantitativo que describe la eficacia de la introducción de un plásmido en las bacterias. El número representa el número de colonias transformadas producidas por cada microgramo de ADN añadido.

  Los biotecnólogos están de acuerdo en que el protocolo de transformación que acabas de completar tiene una eficiencia de transformación de entre 8.0 x 102 y 7.0 x 103 transformantes por microgramo de ADN.

- ¿Cómo se compara tu eficiencia de transformación con la anterior?

  La eficiencia calculada (1,2 x 103) está dentro de los límites de eficiencia previstos para este protocolo.

- En la siguiente tabla, registra la eficiencia de transformación de varios de los equipos de tu clase.

Equipo	Eficiencia
Las respuestas variarán	

- ¿Cómo se compara tu eficiencia de transformación con la suya?

  Las respuestas variarán.

- Calcula la eficiencia de transformación del siguiente experimento utilizando la información y los resultados que se indican a continuación.

  Concentración de plásmido de ADN—0.08 µg/µl

  250 µl de solución de transformación de $CaCl_2$

  10 µl de solución de plásmido

  250 µl de caldo nutritivo LB

  100 µl de células extendidas en agar

  227 colonias de transformantes contadas

  Completa la siguiente tabla y muestra tus cálculos al profesor.

Número de colonias en la placa de LB/amp/ara	227
Microgramos de ADN esparcidos en las placas	0.16 µg
Eficiencia de la transformación	1.4×10^3

- Bonus para crédito extra

  Si se sabe que un experimento concreto tiene una eficiencia de transformación de 3×10^3 bacterias/µg de ADN, ¿cuántas colonias transformantes se espera que crezcan en la placa de LB/amp/ara? Puedes asumir que la concentración de ADN y la fracción de células diseminadas en el agar LB son las mismas que se encuentra en las del laboratorio pGLO.

Eficiencia de la transformación = n.º de colonias/ADN esparcido en la placa (µg)

$3.0 \times 10^3 = X/0.16$

$(3.0 \times 10^3)(0.16) = X$

$480 = X$

480 colonias transformantes

Manual del estudiante

Transformación pGLO

Lección 1 Introducción a la transformación

En este laboratorio realizarás un procedimiento conocido como transformación genética. Recuerda que un gen es un trozo de ADN que proporciona las instrucciones para fabricar (codificar) una proteína. Esta proteína proporciona a un organismo un rasgo o característica particular. La transformación genética significa literalmente «cambio provocado por los genes», e implica la inserción de un gen en un organismo para cambiar el rasgo o característica del mismo. La transformación genética se utiliza en muchos ámbitos de la biotecnología. En la agricultura, los genes que codifican rasgos como la resistencia a las heladas, las plagas o el deterioro pueden ser transformados genéticamente en las plantas. En la biorremediación, las bacterias se pueden transformar genéticamente mediante genes que les permiten digerir los vertidos de petróleo. En medicina, las enfermedades causadas por genes defectuosos están empezando a tratarse mediante terapia génica, es decir, transformando genéticamente las células de una persona enferma con copias sanas del gen defectuoso causante de la enfermedad.

Utilizarás un procedimiento sencillo para transformar bacterias con un gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP). La fuente real de este gen es la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria*. La proteína verde fluorescente hace que la medusa sea fluorescente y brille en la oscuridad. Tras el procedimiento de transformación, las bacterias expresan su recién adquirido gen de medusa y producen la proteína fluorescente,que las hace resplandecer con un color verde brillante al ser observadas bajo la luz ultravioleta.

En esta actividad, aprenderás el proceso de traslado de genes de un organismo a otro con la ayuda de un plásmido. Además de un gran cromosoma, las bacterias contienen naturalmente uno o varios pequeños fragmentos circulares de ADN llamados plásmidos. El ADN plasmídico por lo general contiene genes para uno o más rasgos los cuales pueden ser beneficiosos para la supervivencia de las bacterias. En la naturaleza,las bacterias pueden transferir plásmidos de un lado al otro, lo que les permite compartir estos genes beneficiosos. Este mecanismo natural permite a las bacterias adaptarse a nuevos entornos. La reciente aparición de resistencia bacteriana a los antibióticos se debe a la transmisión de plásmidos.

El plásmido pGLO, exclusivo de Bio-Rad, codifica el gen de la GFP y un gen de resistencia al antibiótico ampicilina. pGLO también incorpora un sistema especial de regulación genética que se puede utilizar para controlar la expresión de proteínas fluorescentes en las células transformadas. El gen de la GFP se puede activar en las células transformadas mediante la adición de azúcar arabinosa al medio nutritivo de la célula. La selección de las células transformadas con ADN pGLO se realiza mediante el crecimiento en placas de ampicilina. Las células transformadas aparecerán blancas (fenotipo salvaje) en placas que no contengan arabinosa, y verde fluorescente cuando la arabinosa se incluye en el agar nutritivo.

Se te proporcionarán las herramientas y un protocolo para realizar la transformación genética.

Tu tarea consistirá en:

1. Hacer la transformación genética.
2. Determinar qué tan existosos son tus esfuerzos para alterar genéticamente un organismo.

Lección 1 Preguntas de enfoque

Hay muchas consideraciones que deben tenerse en cuenta en el proceso de planificación de una investigación científica de laboratorio. A continuación te proponemos algunas para que reflexiones mientras asumes el reto de realizar una transformación genética.

Dado que las investigaciones científicas de laboratorio están diseñadas para recopilar información para responder una pregunta, nuestro primer paso podría ser formular dicha pregunta para esta investigación.

Consideración 1: ¿Puedo transformar genéticamente un organismo? ¿Qué organismo?

1. Para transformar genéticamente un organismo entero, hay que insertar el nuevo gen en todas las células del organismo. ¿Qué organismo es más adecuado para la transformación genética total,—uno compuesto por muchas células o uno compuesto por una sola célula?

2. Los científicos a menudo quieren saber si el organismo genéticamente transformado puede transmitir sus nuevos rasgos adquiridos a sus descendientes y a las generaciones futuras. Para obtener esta información, ¿cuál sería un mejor candidato para tu investigación, un organismo en el que cada nueva generación se desarrolla y se reproduce rápidamente, o uno que lo hace más lentamente?

3. La seguridad es otra consideración importante a la hora de elegir un organismo experimental. ¿Qué rasgos o características debe tener (o no tener) el organismo para estar seguro de que no te perjudicará a ti o al medio ambiente?

4. Basándote en las consideraciones anteriores, ¿cuál sería la mejor opción para una transformación genética: una bacteria, una lombriz de tierra, un pez o un ratón? Describe tu razonamiento.

Consideración 2: ¿Cómo puedo saber si las células han sido transformadas genéticamente?

Recuerda que el objetivo de la transformación genética es cambiar los rasgos o características de un organismo, también conocidos como su fenotipo. Antes de poder detectar cualquier cambio en el fenotipo de un organismo, debe llevarse a cabo un examen exhaustivo de su fenotipo natural (antes de la transformación). Observa las colonias de *E. coli* en tus placas de inicio. Enumera todos los rasgos o características observables que puedan describirse:

Las siguientes observaciones de *E. coli* antes de la transformación podrían proporcionar datos de referencia para intentar determinar si se ha producido alguna transformación genética.

a) Número de colonias

b) Tamaño de : 1) la colonia más grande
2) la colonia más pequeña
3) la mayoría de las colonias

c) Color de las colonias

d) Distribución de las colonias en la placa

e) Apariencia visible cuando se observa con luz ultravioleta (UV)

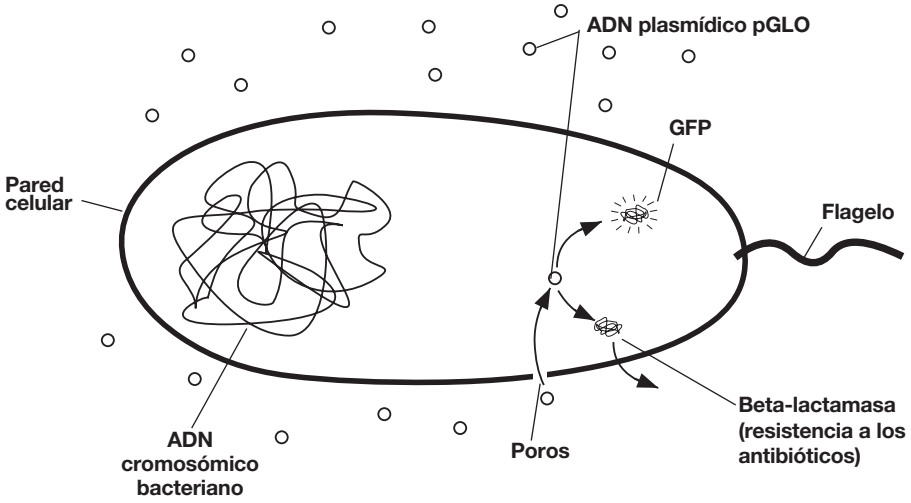
f) La capacidad de las células para vivir y reproducirse en presencia de un antibiótico como la ampicilina

1. Describe cómo podrías utilizar dos placas de LB/agar, un poco de E. *coli* y un poco de ampicilina para determinar cómo las células de *E. coli* se ven afectadas por la ampicilina.

2. ¿Qué esperas que indiquen tus resultados experimentales sobre el efecto de la ampicilina en las células de *E. coli*?

Consideración 3: Los genes

La transformación genética implica la inserción de un nuevo ADN en las células de *E. coli*. Además de un gran cromosoma, las bacterias contienen uno o varios pequeños fragmentos circulares de ADN llamados plásmidos. El ADN del plásmido suele contener genes para más de un rasgo. Los científicos utilizan un proceso llamado ingeniería genética para insertar en un plásmido genes que codifican nuevos rasgos. En este caso, el plásmido pGLO ha sido modificado genéticamente para llevar el gen GFP, que codifica la proteína verde fluorescente, GFP, así como un gen (*bla*) que codifica una proteína que confiere a la bacteria su resistencia a los antibióticos. El plásmido modificado genéticamente se puede utilizar para transformar genéticamente las bacterias y darles esta nueva característica.



Consideración 4: El acto de la transformación

Este procedimiento de transformación comprende tres pasos principales. Estos pasos tienen como objetivo introducir el ADN del plásmido en las células *E. coli* y proporcionar un entorno para que las células expresen sus genes recién adquiridos.

Para mover el ADN del plásmido pGLO a través de la membrana de la célula:

1. Utiliza una solución de transformación que contenga $CaCl_2$ (cloruro de calcio).
2. Lleva a cabo un procedimiento denominado choque térmico.

Para que las células transformadas crezcan en presencia de ampicilina debes:

3. Proporcionarles nutrientes y un corto período de incubación para que comiencen a expresar sus genes recién adquiridos.

Lección 2 Laboratorio de transformación

Lista de verificación de la estación de trabajo (✔)

Tu estación de trabajo: A continuación se enumeran los materiales y suministros que deben estar presentes en tu estación de trabajo antes de comenzar este laboratorio.

Estación de trabajo de los estudiantes

Material	Cantidad	(✔)
Placa de inicio de *E. coli*	1	❑
Placas de agar vertido (1 LB, 2 LB/amp, 1 LB/amp/ara)	4	❑
Solución de transformación	1	❑
Caldo nutritivo LB	1	❑
Anillos de inoculación	7 (1 paquete de 10)	❑
Pipetas	5	❑
Soporte/flotador de poliestireno para tubos de microcentrífuga	1	❑
Recipiente (como un vaso de poliestireno) lleno de hielo picado (no hielo en cubitos)	1	❑
Marcador	1	❑
Copia de la guía rápida	1	❑
Tubos de microcentrífuga	2	❑

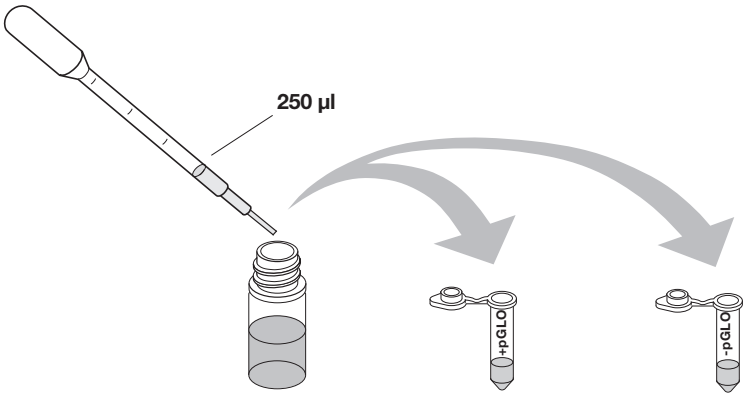
Estación de trabajo común. A continuación se incluye una lista de materiales, suministros y equipos que deben estar presentes en un lugar común al que pueda acceder tu equipo.

Material	Cantidad	
Plásmido pGLO rehidratado	1 frasco	❑
Baño de agua a 42 °C y termómetro	1	❑
Luz ultravioleta	1	❑
Incubadora a 37 °C (opcional, ver Habilidades Generales de Laboratorio–Incubación)	1	❑
Micropipetas de volumen ajustable de 2–20 µl	1	❑
Puntas de micropipeta de 2–20 µl	1	❑

Procedimiento de transformación

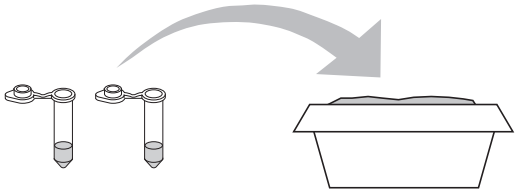
1. Etiqueta un microtubo cerrado **+pGLO** y otro **-pGLO**. Etiqueta ambos tubos con el nombre de tu grupo. Colócalos en la gradilla de poliestireno para tubos.

2. Abre los tubos y, con una pipeta de transferencia estéril, transfiere 250 µl de solución de transformación ($CaCl_2$) a cada tubo.



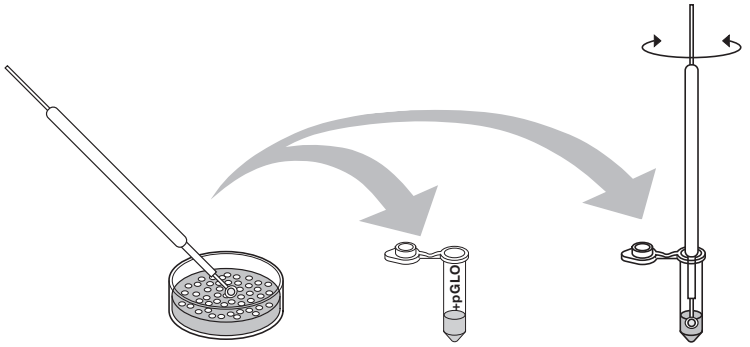
Solución de transformación

3. Coloca los tubos en hielo.



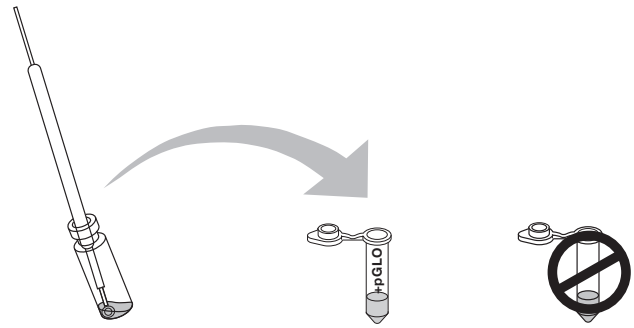
Hielo

4. Utiliza un anillo estéril para recoger de **2–4 colonias grandes de bacterias** de la placa de inicio. Selecciona las colonias de inicio que sean «gruesas» (es decir, de 1–2 mm de diámetro). Es importante tomar colonias individuales (no un frotis de bacterias de la parte densa de la placa), ya que para lograr una alta eficiencia de transformación, las bacterias deben estar creciendo activamente. Escoge solo colonias bacterianas que sean uniformemente circulares con bordes lisos. Toma el tubo **+pGLO** y sumerge el anillo en la solución de transformación que se encuentra en el fondo del tubo. Haz girar el anillo entre el dedo índice y el pulgar hasta que toda la colonia esté dispersa en la solución de transformación (cuando no haya pedazos flotantes). Vuelve a colocar el tubo en la gradilla y colócala en el hielo. Con un anillo nuevo estéril, repite la operación con el tubo **-pGLO**.



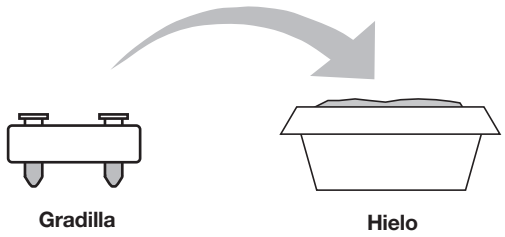
(+pGLO) **(-pGLO)**

5. Examina la solución de ADN pGLO con la lámpara UV. Anota tus observaciones. Sumerge un **anillo estéril nuevo** en el tubo de reserva de ADN plasmídico pGLO. Extrae un anillo lleno. Debe haber una película de solución de plásmido en el anillo. Esto es similar a ver una película jabonosa a través de un anillo para hacer burbujas de jabón. Revuelve el anillo en la suspensión celular del tubo **+pGLO**. Opcionalmente, pipetea 10 µl de plásmido pGLO en el tubo **+pGLO** y mezcla. **No añadas** ADN plasmídico al tubo **-pGLO**. Cierra los tubos **+pGLO** y **-pGLO** y devuélvelos a la gradilla que se encuentra en el hielo.



ADN plasmídico pGLO **(+pGLO)** **(-pGLO)**

6. Incuba los tubos en hielo durante 10 minutos. Asegúrate de empujar los tubos hasta el fondo de la gradilla de manera que la parte inferior de los tubos sobresalga y haga contacto con el hielo.

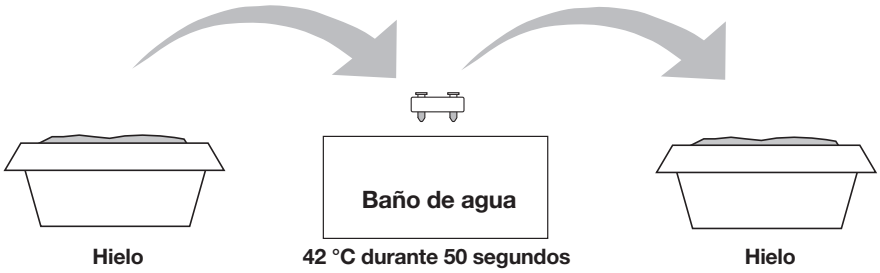


7. Mientras los tubos están en el hielo, etiqueta tus cuatro placas de agar nutritivo LB en el fondo (no en la tapa) como sigue:

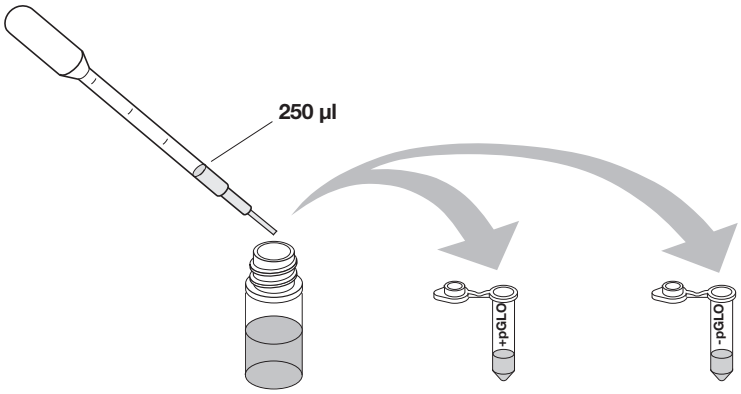
- Etiqueta una placa de **LB/amp**: **+ pGLO**
- Etiqueta la placa de **LB/amp/ara**: **+ pGLO**
- Etiqueta la otra placa de **Lb/amp**: **- pGLO**
- Etiqueta la placa de **LB**: **- pGLO**

8. **Choque térmico.** Utilizando la gradilla de espuma como soporte, transfiere los tubos de (+) pGLO y (-) pGLO al baño de agua, ajustándolo a 42ºC, **durante exactamente 50 s**. Asegúrate de empujar los tubos hasta el fondo de la gradilla para que la parte inferior de los tubos sobresalga y entre en contacto con el agua caliente. Comprueba dos veces la temperatura del baño de agua utilizando dos termómetros, para asegurar la precisión.

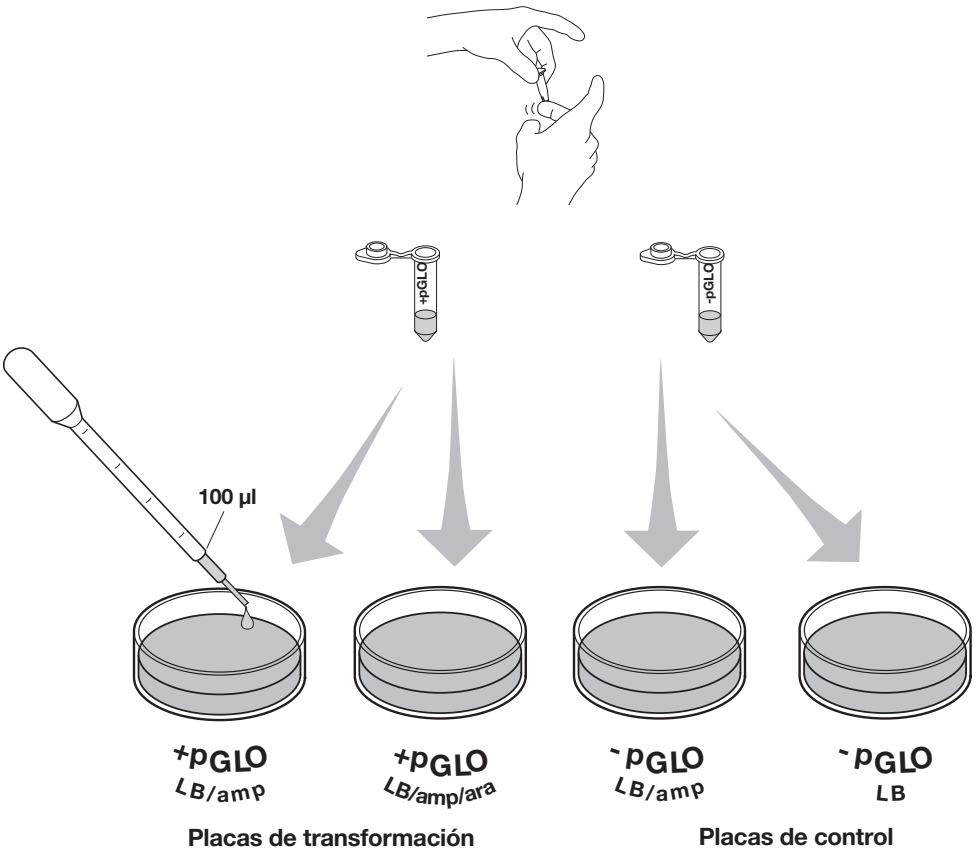
   Cuando hayan transcurrido los 50 s, coloca ambos tubos de nuevo en hielo. Para obtener los mejores resultados de transformación, la transferencia del hielo (0 °C) a 42 °C e inmediatamente de 42 °C al hielo debe hacerse de manera rápida. Incuba los tubos en hielo durante 2 min.



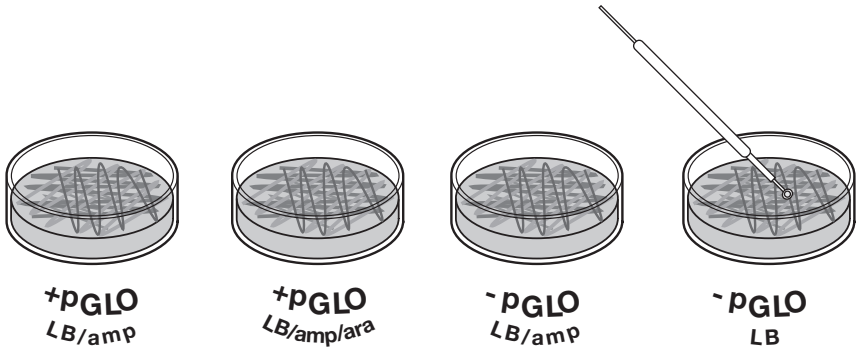
9. Retira del hielo la gradilla que contiene los tubos y colócala sobre la mesa. Abre uno de los tubos y, con una nueva pipeta estéril, agrega 250 µl de caldo nutritivo LB al tubo y vuelve a cerrarlo. Repite con una nueva pipeta estéril para el otro tubo. Incuba los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente.



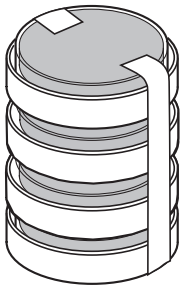
10. Agita suavemente los tubos cerrados con el dedo para mezclar y volver a suspender las bacterias. Utilizando una nueva pipeta estéril para cada tubo, pipetea 100 µl de las suspensiones de transformación y de control en las placas de agar nutritivo correspondientes.



11. **Utiliza un nuevo anillo estéril para cada placa.** Distribuye las suspensiones de manera uniforme por la superficie del agar nutritivo LB haciendo patinar rápidamente la superficie plana de un anillo estéril nuevo de un lado a otro de la superficie de la placa. NO PRESIONES DEMASIADO EN EL AGAR. Destapa una placa a la vez y vuelve a cubrirla inmediatamente después de extender la suspensión de células. Esto minimizará la contaminación.



12. Apila las placas y pégalas con cinta adhesiva. Pon el nombre de tu grupo y el período de clase en la parte inferior de la pila y coloca la pila de placas **boca abajo** en la incubadora a 37 °C hasta el día siguiente. Las placas se invierten para evitar la condensación en la tapa, la cual pudiera gotear sobre el cultivo e interferir con tus resultados.



Lección 2 Preguntas de repaso Nombre _____

Antes de recoger los datos y analizar tus resultados responde a las siguientes preguntas.

1. ¿En cuál de las placas esperarías encontrar bacterias las más parecidas a las colonias originales de *E. coli* no transformadas que observaste inicialmente? Explica tus predicciones.

2. Si hay células bacterianas transformadas genéticamente, ¿en qué placa(s) es más probable que se encuentren? Explica tus predicciones.

3. ¿Qué placas deberían compararse para determinar si se ha producido alguna transformación genética? ¿Por qué?

4. ¿Qué se entiende por placa de control? ¿Para qué sirve un control?

Lección 3 Recolección y análisis de datos

A. Recolección de datos

Observa los resultados que has obtenido en el laboratorio de transformación con la iluminación habitual de la sala. A continuación, apaga las luces y mantén solo la luz ultravioleta sobre las placas. Alternativamente, el protocolo puede incorporar la documentación digital de las placas con el sistema Blue Digital BioImaging de Vernier (Apéndice E).

1. Observa cuidadosamente y dibuja lo que se ve en cada una de las cuatro placas. Coloca tus dibujos en la tabla de datos que aparece a continuación. Registra tus datos para que puedas comparar las observaciones de las células «**+ pGLO**» con tus observaciones hechas para la *E. coli* no transformada. Anota las siguientes observaciones para cada placa.

2. En términos relativos, ¿qué cantidad de crecimiento bacteriano observas en cada placa?

3. ¿De qué color son las bacterias?

4. ¿Cuántas colonias bacterianas hay en cada placa? (Cuenta las manchas que ves).

Placas de transformación

	Observaciones
+pGLO LB/amp	
+pGLO LB/amp/ara	

Placas de control

	Observaciones
-pGLO LB/amp	
-pGLO LB	

B. Análisis de resultados

El objetivo del análisis de los datos derivados esta investigación es determinar si se ha producido una transformación genética.

1. ¿Cuáles de los rasgos que observaste originalmente para *E. coli* no parecieron alterarse? En el espacio siguiente, enumera estos rasgos no transformados y cómo llegaste a este análisis para cada uno de los rasgo que mencionaste en la lista.

Rasgo original	Análisis de las observaciones

2. De los rasgos de *E. coli* que observaste originalmente, ¿cuáles parecen ser ahora significativamente diferentes después de llevar a cabo el procedimiento de transformación? Enumera a continuación dichos rasgos y describe los cambios que has observado.

Nuevo rasgo	Cambio observado

3. Si las células transformadas genéticamente han adquirido la capacidad de vivir en presencia del antibiótico ampicilina, ¿qué puedes deducir de los otros genes en el plásmido que utilizaste en tu procedimiento de transformación?

4. A partir de los resultados obtenidos, ¿cómo podrías demostrar que los cambios que se produjeron se debieron al procedimiento que realizaste?

Lección 3 Preguntas de repaso Nombre _____

¿Qué es lo que brilla?

Si se observa un color verde fluorescente en las colonias de *E. coli*, entonces puede surgir una nueva pregunta: ¿Cuáles son las dos fuentes potenciales de fluorescencia dentro de las colonias al ser expuestas a la luz UV?

Explica:

1. Recuerda lo que observaste cuando hiciste brillar la luz UV sobre una muestra de ADN plásmido pGLO original y describe tus observaciones.

2. ¿Cuál de las dos posibles fuentes de la fluorescencia se puede eliminar ahora?

3. ¿Qué indica esta observación sobre el origen de la fluorescencia?

4. Describe la evidencia que indica si tu intento de realizar una transformación genética fue exitoso o no.

Lección 3 Preguntas de repaso Nombre _____

La interacción entre los genes y el entorno

Observa de nuevo tus cuatro placas. ¿Observas alguna *E. coli* creciendo en la placa de LB que no contiene ampicilina ni arabinosa?

1. De acuerdo con tus resultados, ¿puedes saber si estas bacterias son resistentes a la ampicilina al observarlas sobre la placa de LB? Explica tu respuesta.

2. ¿Cómo cambiarías el entorno de las bacterias en — la placa en la que están creciendo — para saber si son resistentes a la ampicilina?

3. Muy a menudo, los rasgos de un organismo están causados por una combinación de sus genes y su entorno. Piensa en el color verde que has visto en la bacteria transformada genéticamente:

   a. ¿Cuáles son los dos factores que deben estar presentes en el entorno de la bacteria para que veas el color verde? (Pista: uno de ellos está en la placa y el otro está en la forma en la que se observa la bacteria).

   b. ¿Qué crees que hace cada uno de los dos factores ambientales que has enumerado para que la bacteria genéticamente transformada se vuelva verde?

   c. ¿Qué ventaja tendría para un organismo poder activar o desactivar ciertos genes en respuesta adeterminadas condiciones?

Lección 4 Actividad de ampliación: Cálculo de la eficiencia de la transformación

Tu siguiente tarea en esta investigación será aprender a determinar el grado de transformación genética de las células de *E. coli*. Esta medida cuantitativa se denomina eficiencia de transformación.

En muchos experimentos, es importante transformar genéticamente tantas células como sea posible. Por ejemplo, en algunos tipos de terapia génica, las células se recogen del paciente, se transforman en el laboratorio y luego se vuelven a poner en el paciente. Cuantas más células se transformen para producir la proteína necesaria, más probable será que la terapia funcione. La eficiencia de la transformación se calcula para ayudar a los científicos a determinar la efectividad de una transformación.

La tarea

Vas a calcular la eficiencia de transformación, lo que te dará una indicación de la efectividad con la que has introducido las moléculas de ADN en las células bacterianas. La eficiencia de transformación es un número. Representa el número total de células bacterianas que expresan la proteína verde, dividido por la cantidad de ADN utilizado en el experimento. (Nos indica el número total de células bacterianas transformadas por un microgramo de ADN). La eficiencia de transformación se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{\text{Número total de colonias que crecen en la placa de agar}}{\text{Cantidad de ADN extendida en la placa de agar (en µg)}}$$

Por lo tanto, antes de poder calcular la eficiencia de la transformación, necesitarás dos datos:

(1) El número total de colonias verdes fluorescentes que crecen en tu placa de LB/amp/ara.

(2) La cantidad total de ADN plasmídico pGLO en las células bacterianas extendidas en la placa de LB/amp/ara.

1. Determinación del número total de células verdes fluorescentes

Coloca la placa de LB/amp/ara cerca de una luz UV. Podemos asumir que cada colonia de la placa procede de una sola célula. Conforme las células individuales se reproducen, más y más células se forman y se desarrollan en lo que se llama una colonia. La forma más directa de determinar el **número total de bacterias que fueron transformadas con el plásmido pGLO** es contar las colonias en la placa.

Anota ese número aquí ➔

Número total de colonias = _____

2. Determinación de la cantidad de ADN pGLO en las células bacterianas esparcidas en la placa de LB/amp/ara

Necesitamos dos datos para averiguar la cantidad de ADN pGLO en las células bacterianas esparcidas en la placa de LB/amp/ara en este experimento. (a) Cuál fue la cantidad total de ADN con la que comenzamos el experimento, y (b) Qué fracción del ADN (en las bacterias) se extendió realmente en las placas de LB/amp/ara.

Una vez que calcules estos datos, multiplicarás la cantidad total **de ADN pGLO** utilizada en este experimento por la **fracción de ADN** que esparciste en la placa de LB/amp/ara. Esto te dirá la cantidad de ADN pGLO en las células bacterianas que se propagaron en la placa de LB/amp/ara.

a. Determining the Total Amount of pGLO plasmid DNA.

La cantidad total de ADN con la que comenzamos es igual al producto de la concentración y el volumen total utilizado, o

(ADN en µg) = (concentración de ADN en µg/µl) x (volumen de ADN en µl)

En este experimento has utilizado 10 µl de pGLO con una concentración de 0,08 µg/µl. Esto significa que cada microlitro de solución contenía 0,08 µg de ADN pGLO. Calcula la **cantidad total de ADN** utilizada en este experimento.

Anota ese número aquí ➔

Cantidad total de ADN pGLO (µg) utilizada en este experimento = _____

¿Cómo utilizarás este dato?

b. Determinación de la fracción de ADN plasmídico pGLO (en la bacteria) que realmente se esparció en la placa de LB/amp/ara: Dado que no todo el ADN que agregaste a las células bacterianas se transferirá a la placa de agar, debes averiguar qué fracción del ADN se esparció realmente en la placa de LB/amp/ara. Para ello, divide el volumen de ADN que esparciste en la placa de LB/amp/ara entre el volumen total de líquido en el tubo de ensayo que contiene el ADN. Una fórmula para este argumento es

$$\text{Fracción de ADN utilizada} = \frac{\text{Dispersión volumétrica llevada a cabo en la placa de LB/amp/ara (µl)}}{\text{Volumen total de la muestra en el tubo de ensayo (µl)}}$$

Extendiste 100 µl de células que contienen ADN de un tubo de ensayo que contiene un volumen total de 510 µl de solución. ¿Recuerdas por qué hay 510 µl de solución total? Busca en el procedimiento de laboratorio y localiza todos los pasos en los que has añadido líquido al tubo de reacción. Suma los volúmenes.

Utiliza la fórmula anterior para calcular la **fracción de ADN plasmídico pGLO** que esparciste en la placa de LB/amp/ara.

Anota ese número aquí ➔ Fracción de ADN = _____

- ¿Cómo vas a utilizar este dato?

Entonces, ¿cuántos microgramos de ADN pGLO esparciste en las placas de LB/amp/ara?

Para responder a esta pregunta, tendrás que multiplicar la **cantidad total de ADN pGLO utilizadaen** este experimento por la **fracción de ADN pGLO** que esparciste en la placa de LB/amp/ara.

ADN pGLO esparcido en µg = Cantidad total de ADN utilizada en µg x fracción de ADN utilizada

Anota ese número aquí ➔ Dispersión de ADN pGLO (µg) = _____

- ¿Qué te dirá este número?

Observa todos tus cálculos anteriores. Decide cuáles de los números que has calculado pertenecen a la siguiente tabla. Rellena la siguiente tabla.

Número de colonias en la placa de LB/amp/ara =	
Microgramos de ADN pGLO esparcidos en las placas	

Ahora utiliza los datos de la tabla para calcular la eficiencia de la transformación de pGLO

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{\text{Número total de colonias que crecen en la placa de agar}}{\text{Cantidad de ADN extendida en la placa de agar (en µg)}}$$

Anota ese número aquí ➔

Eficiencia de la transformación =
_____ transformantes/µg

Análisis

Los cálculos de la eficiencia de transformación dan como resultado números muy grandes. Los científicos suelen utilizar una abreviatura matemática denominada notación científica. Por ejemplo, si la eficiencia de transformación calculada es de 1000 bacterias/µg de ADN, este número se indica a menudo como:

10^3 transformantes/µg (10^3 es otra forma de decir 10 x 10 x 10 o 1000)

- ¿Cómo informarían los científicos de 10,000 transformantes/µg en notación científica?

Llevando esta idea un poco más lejos, supongamos que los científicos calculan una eficiencia de 5000 bacterias/µg de ADN. Esto se reportaría como:

5 x 10^3 transformantes/µg (5 x 1000)

- ¿Cómo informarían los científicos de 40,000 transformantes/µg en notación científica?

Un último ejemplo: Si se calculan 2,600 transformantes/µg, la notación científica para este número sería:

2.6×10^3 transformantes/µg (2.6 x 1000)

Del mismo modo:

$5{,}600 = 5.6 \times 10^3$ $271{,}000 = 2.71 \times 10^5$ $2{,}420{,}000 = 2.42 \times 10^6$

- ¿Cómo informarían los científicos de 960,000 transformantes/µg en notación científica?

- Indica tu eficiencia de transformación calculada en notación científica.

- Utiliza una o dos frases para explicar el significado de tu cálculo de la eficiencia de transformación.

Los biotecnólogos están de acuerdo en que el protocolo de transformación que acabas de completar tiene una eficiencia de transformación de entre 8.0×10^2 y 7.0×10^3 transformantes por microgramo de ADN.

- ¿Cómo se compara tu eficiencia de transformación con la anterior?

- En la siguiente tabla, registra la eficiencia de transformación de varios de los equipos de tu clase.

Equipo	Eficiencia

- ¿Cómo se compara tu eficiencia de transformación con la suya?

- Calcula la eficiencia de transformación del siguiente experimento utilizando la información y los resultados que se indican a continuación.

Concentración de plásmido de ADN: 0.08 µg

250 µl de solución de transformación de $CaCl_2$

10 µl de solución de plásmido pGLO

250 µl de caldo LB

100 µl de células extendidas en agar

227 colonias de transformantes

Completa la siguiente tabla y muestra tus cálculos al profesor:

Número de colonias en la placa de LB/amp/ara =
Microgramos de ADN esparcidos en las placas =
Eficiencia de la transformación =

- Bonus para crédito extra:

Si se sabe que un experimento concreto tiene una eficiencia de transformación de 3×10^3 bacterias/µg de ADN, ¿cuántas colonias transformantes se espera que crezcan en la placa de LB/amp/ara? Puedes asumir que la concentración de ADN y la fracción de células diseminadas en el agar LB son las mismas que se encuentra en las del laboratorio pGLO.

Apéndice A
Vínculos históricos con la biotecnología

La transformación biológica posee una historia interesante. En 1928, Frederick Griffith, un médico londinense que trabajaba en un laboratorio de patología, llevó a cabo un experimento que nunca pudo interpretar por completo mientras vivió. Griffith cambió (transformó) permanentemente una cepa bacteriana segura y no patógena de neumococo en una cepa patógena mortal. Logró este sorprendente cambio en la bacteria tratando la bacteria segura con una bacteria mortal que había muerto por calor. En esta mezcla de las dos cepas bacterianas no había bacterias vivas y virulentas, pero la mezcla mató a los ratones que fueron inyectados con ella. Repitió el experimento muchas veces, siempre con los mismos resultados. Tanto él como muchos de sus colegas se quedaron perplejos. ¿Qué era lo que transformaba a las bacterias seguras en asesinas? Muchos años después, este hecho se conocería como el primer caso registrado de transformación biológica realizado en un laboratorio, y nadie pudo explicarlo. Griffith no conocía el ADN, pero sabía que la transformación era hereditaria. Como en cualquier momento de la historia, los experimentos de transformación de Griffith pueden ser considerados el nacimiento de la manipulación genética analítica que ha dado lugar al ADN recombinante y a la biotecnología, así como a las perspectivas de manipulación de genes humanos.

En 1944, dieciséis años después del experimento de Griffith, un grupo de investigación del Instituto Rockefeller, dirigido por Oswald T. Avery, publicó un artículo que procedía directamente del trabajo de Griffith. «¿Cuál es la sustancia responsable?» preguntaba Avery a sus compañeros. Trabajando con las mismas cepas de bacterias responsables de la neumonía, Avery y sus colegas dieron una respuesta rigurosa a esta pregunta. Demostraron que la sustancia es el ADN y que la transformación biológica ocurre cuando las células recogen y expresan ADN extraño. A pesar de que tomo muchos años en dar crédito a Avery, ahora es universalmente conocido por este avance fundamental de conocimiento biológico. Basándose en el trabajo de Avery y otros, Douglas Hanahan desarrolló la técnica de transformación de colonias utilizada en esta investigación.[1, 2]

Contexto histórico

Transformación genética

1865—Gregor Johann Mendel: Mendel presentó sus descubrimientos describiendo los principios por los cuales los rasgos genéticos se transmiten de padres a hijos. De sus trabajos se derivó el concepto de gen como unidad básica de la herencia.

1900—Carl Correns, Hugo De Vries, Erich Tschermak: Los genetistas de plantas que estaban haciendo estudios sobre la herencia descubrieron que su trabajo era esencialmente un duplicado del que había hecho casi cuatro décadas antes un monje agustino austriaco desconocido, Gregor Johann Mendel, quien realizó sus estudios con chícharos.

1928—Frederick Griffith: Griffith transformó la bacteria *Diplococcus* pneumonia no patógena en patógena utilizando bacterias virulentas muertas por calor. Sugirió que el factor de transformación tenía algo que ver con la síntesis de la cápsula de polisacáridos. Griffith no conocía el ADN, pero sabía que la transformación era hereditaria. Los experimentos de Griffith sobre la transformación pueden ser considerados el nacimiento de la manipulación genética analítica que ha dado lugar a la tecnología del ADN recombinante, así como a las perspectivas de la manipulación genética humana.

1944—Oswald Avery, Colin MacLeod: Avery y sus colegas anunciaron que habían aislado el factor de transformación con un alto grado de pureza, y que este era el ADN. Desde este experimento clásico de la genética molecular, la transformación, la conjugación (apareamiento bacteriano) y la transducción (transferencia viral de ADN) se han utilizado para transferir genes entre especies de bacterias, *Drosophila*, ratones, plantas y animales, células de mamíferos en cultivo así como en la terapia génica humana.

1952—Alfred Hershey, Martha Chase: Hershey y Chase utilizaron radioisótopos de azufre y fósforo y el bacteriófago T2 para demostrar de manera concluyente que el ADN era la molécula de información de la herencia. Junto con los trabajos de Avery, MacLeod y McCarty, el experimento de Hershey/Chase confirmó el entendimiento acerca de que el ADN era el material transformador y la molécula de información de la herencia.

1972—Paul Berg, Janet Mertz: Berg utilizó la enzima endonucleasa recién descubierta, *Eco*RI, para cortar el ADN del SV40 y el ADN del bacteriófago P22, para despues usar la enzima transferasa terminal y la ADN ligasa y volver a unir en un solo trozo de ADN los pedazos separados . La creación de la primera molécula de ADN recombinante fue el comienzo de la era de la biotecnología. La nueva molécula no fue colocada dentro de una célula de mamífero debido a la preocupación de la comunidad científica sobre las transferencias genéticas.

1973—Herbert Boyer, Stanley Cohen, Annie Chang: Berg, Boyer y Cohen utilizaron *Eco*RI para aislar un gen intacto de resistencia a la kanamicina. Boyer, Cohen y Chang empalmaron el gen de resistencia a la kanamicina en un plásmido cortado con EcoRI que ya contenía resistencia a la tetraciclina y produjeron una molécula de plásmido bacteriano recombinante con doble resistencia a los antibióticos. A continuación, transformaron *E. coli* con este plásmido modificado.

1977—Genentech, Inc.: El primer producto de la ingeniería genética, el gen de la somatostatina humana (factor inhibidor de la liberación de la hormona del crecimiento humana), se expresó en bacterias y fue anunciado por Genentech.

1980—J. W. Gordon, Frank Ruddle: Gordon y Ruddle lograron microinyectar exitosamente genes normales en células germinales de ratón.

1982—Richard Palmiter, Ralph Brinster: Palmiter y Brinster microinyectaron el gen de la hormona de crecimiento de la rata en embriones de ratón. Esta fue la primera «cura» genética de la línea germinal en un mamífero. El ratón receptor fue llamado «pequeño» porque padecía una forma de enanismo congénito.

1988—Steven Rosenberg: Rosenberg y sus colegas obtuvieron la aprobación para realizar el primer experimento de transferencia genética en pacientes humanos que padecían un melanoma metastásico. Este experimento representaba un seguimiento genético con el gen marcador Neo^R y no una terapia génica.

1990—W. French Anderson, Michael Blaese, Kenneth Culver: A las 12:52 horas del viernes 14 de septiembre de 1990, en el Instituto Nacional del Cáncer, una niña de cuatro años, Ashanthi De Silva, de Cleveland, Ohio, se convirtió en la primera paciente humana de terapia génica. Recibió una transfusión de sus propios glóbulos blancos con la versión corregida del gen de la adenosina deaminasa (ADA). Los Dres. Anderson, Blaese y Culver no esperaban resultados significativos del experimento hasta después de 1 año. Una segunda niña, Cynthia Cutshall, fue inyectada de forma similar en 1990. Los informes de junio de 1993 mostraban a las dos niñas con sonrisas y energía infantil, jugando en el patio de un colegio. El sistema inmunológico de ambas niñas funcionaba eficazmente.

1994—Otros candidatos a la terapia génica son los pacientes con anemia falciforme, hemofilia, diabetes, cáncer y enfermedades cardíacas. La terapia génica de línea germinal se debatió durante la reunión del Comité Asesor de ADN Recombinante. En 1996, un número cada vez mayor de propuestas estaban a la espera de ser revisadas por el Subcomité de Terapia Génica Humana del Comité Asesor de ADN Recombinante.

1995—Un grupo del Instituto de Investigación Genómica (TIGR) de Maryland, dirigido por J. Craig Venter, publicó la secuencia genética completa de la bacteria *Hemophilus influenzae*, considerada un hito en la investigación microbiológica al ser el primer organismo de vida libre cuyo «mapa» genético fue descifrado.

1996—Una colaboración multinacional que incluía más de 100 laboratorios de Europa, Estados Unidos, Canadá y Japón fue la primera en desentrañar la secuencia completa del genoma de un eucariota, la levadura *Saccharomyces cerevisiae. S. cerevisiae* es una levadura de importancia comercial que se utiliza habitualmente en la panadería y en la fermentación de bebidas alcohólicas, usada ampliamente en el laboratorio como organismo modelo para entender los procesos celulares y moleculares de los eucariotas.

1997—Científicos dirigidos por Ian Wilmut en el Instituto Roslin de Escocia informaron del éxito de la clonación de una oveja, llamada Dolly, a partir de la célula de una ubre de oveja adulta. La clonación de Dolly generó un debate internacional sobre las cuestiones éticas y morales de la clonación. Posteriormente, científicos del Instituto Roslin de Escocia, en colaboración con la empresa escocesa PPL Therapeutics, clonaron con éxito dos corderos, llamados Polly y Molly, a los que se modificó genéticamente con un gen humano para que su leche contuviera una proteína llamada factor IX, la cua es un coagulante que existe naturalmente en la sangre, y que puede extraerse para ser utilizado en el tratamiento de la hemofilia humana.

1998—Se publica más del 99 % de la secuencia del genoma del primer organismo multicelular, el diminuto gusano redondo *Caenorhabditis elegans*. Aunque *C. elegans* es un organismo primitivo, comparte muchas de sus características genéticas y biológicas esenciales con los humanos, lo que puede ayudar a los científicos a identificar y caracterizar los genes implicados en la biología y las enfermedades humanas.

Los científicos elaboraron un mapa físico detallado y preciso, o de localización, de la mayoría de los 30,000 genes humanos conocidos, lo que supuso un hito para el Proyecto Genoma Humano.

2000—Un equipo dirigido por Ingo Potrykus, de la Escuela Politécnica Federal de Zúrich, y Peter Beyer, de la Universidad de Friburgo en Alemania, informó de la creación de un arroz modificado genéticamente, llamado «arroz dorado», el cual contiene grandes cantidades de betacaroteno, sustancia que los seres humanos pueden convertir en vitamina A. El «arroz dorado» podría aliviar la ceguera causada por la deficiencia de vitamina A en millones de personas afectadas por la pobreza en todo el mundo.

La secuencia del genoma de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* se publicó gracias a la colaboración entre una empresa privada, Celera Genomics, e investigadores de todo el mundoque estudiaban la mosca de la fruta. La *D. melanogaster*, un modelo muy utilizado en el laboratorio, es el mayor animal al que se le ha descifrado hasta ahora su código genético.

Un equipo de 16 instituciones internacionales que forman el Consorcio de Secuenciación del Genoma Humano completó un borrador del genoma humano. Los investigadores de Celera Genomics también anunciaron la conclusión del «primer ensamblaje» del genoma.

2001—El 12 de febrero de 2001, Celera Genomics y el Consorcio Internacional para la Secuenciación del Genoma Humano anunciaron conjuntamente la publicación de la secuencia casi completa del genoma humano, el «mapa» genético de un ser humano. Este logro le tomó al equipo internacional casi veinte años y contó con la colaboración de miles de científicos de todo el mundo. Celera Genomics informó que había completado el trabajo en aproximadamente nueve meses. Los dos grupos diferían en sus estimaciones sobre el número de genes en el genoma humano, pero el rango pronosticado por ambos, de entre 25,000 a 40,000 genes, es mucho menor en comparación con los 100,000 genes estimados anteriormente. Este hallazgo inesperado demostró que un organismo tan complejo como el ser humano puede estar compuesto de solo unos pocos genes; solo el doble de los encontrados en el gusano *C. elegans* o la mosca *D. melanogaster*. La revelación de la secuencia completa del genoma humano permite que los investigadores de todo el mundo comiencen a desarrollar tratamientos para muchas enfermedades.

El presidente George Bush decidió que solo los experimentos con las 64 líneas de células madre embrionarias existentes podrían recibir financiación federal. La decisión del presidente fue decepcionante para muchos científicos que esperaban utilizar las células madre embrionarias para desarrollar tratamientos contra muchas enfermedades.

Advanced Cell Technology, una pequeña empresa de Massachusetts, anunció que había logrado clonar embriones humanos para extraer sus células madre. Este método podría utilizarse en última instancia para tratar a pacientes con diversas enfermedades mediante la fabricación de células de reemplazo, como células nerviosas y musculares, las cuales pueden ser trasplantadas a la misma persona sin el riesgo de ser rechazadas por el organismo.

PPL Therapeutics, la empresa que ayudó a clonar a la oveja Dolly, anunció que había clonado cinco cerditos modificados genéticamente con un gen inactivado o «eliminado» el cual haría que sus órganos tuvieran muchas menos probabilidades de ser rechazados cuando se trasplantaran a un receptor humano. El éxito de PPL Therapeutics aporta esperanza a los miles de personas que esperan recibir órganos donados, tales como corazones, pulmones, riñones e hígados.

2002—La oveja Dolly, el primer mamífero clonado a partir de una célula adulta, desarrolló artritis a una edad relativamente temprana de cinco años. No está claro si la enfermedad de Dolly fue el resultado de una anomalía genética causada por la clonación, o si fue una mera coincidencia. La noticia alimentó el debate acerca de si los animales clonados son susceptibles al envejecimiento prematuro y a problemas de salud, y también supuso un revés para aquellos que sostienen que la clonación se puede utilizar para generar un suministro de órganos que ayude a los pacientes que se encuentran en la lista de espera para un trasplante.

2008—El descubrimiento y los usos históricos para el desarrollo de la GFP ganan el Premio Nobel de Química. Osamu Shimonura fue el primero en aislar la GFP y descubrió que tenía propiedades fluorescentes cuando al exponerla a la luz ultravioleta. Martin Chalfie utilizó la GFP como etiqueta genética luminosa. Roger Y. Tsien descubrió el mecanismo fluorescente de la GFP.

Apéndice B
Glosario de términos

Agar — Sustancia gelatinosa derivada de las algas marinas. Proporciona una matriz sólida que ayuda al crecimiento bacteriano. Contiene una mezcla de nutrientes de carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos, sales y vitaminas.

Arabinosa — Un carbohidrato aislado de las plantas, normalmente utilizado como fuente de alimento por las bacterias. En este experimento, la arabinosa inicia la transcripción del gen GFP, que da como resultado células verdes fluorescentes bajo la luz UV.

Betalactamasa — La betalactamasa es una proteína que proporciona resistencia al antibiótico ampicilina. La proteína betalactamasa es producida y secretada por bacterias que han sido transformadas con un plásmido que contiene el gen de la betalactamasa. La betalactamasa secretada inactiva la ampicilina presente en el agar nutritivo LB, permitiendo el crecimiento bacteriano y la expresión de los genes recién adquiridos que también contiene el plásmido, como la GFP.

Biotecnología — Aplicación de la biología en el mundo real mediante la manipulación específica de organismos vivos, sobre todo a nivel genético, para obtener productos potencialmente beneficiosos.

Clonación — La clonación es el proceso de generación de copias o clones prácticamente infinitos de un organismo o segmento de ADN. La clonación produce una población que tiene una composición genética idéntica.

Colonia — Grupo de células bacterianas genéticamente idénticas que crecen en una placa de agar. Como todas las células de una colonia son genéticamente idénticas, se denominan clones.

Estriado — Proceso de pasar un anillo de inoculación con bacterias a través de una placa de agar dividida en cuadrantes; esto con el objetivo de generar colonias individuales.

Filtrado — Proceso de identificación de las bacterias deseadas a partir de una biblioteca bacteriana.

Ingeniería genética — Manipulación del material genético (ADN) de un organismo, introduciendo o eliminando determinados genes.

Medios de cultivo — Los medios líquidos y sólidos denominados caldo LB (denominado así por Luria y Bertani) y agar están hechos de un extracto de levadura y un digerido enzimático de subproductos cárnicos que proporcionan una mezcla de carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos, sales y vitaminas, todos ellos nutrientes para el crecimiento de las bacterias. El agar, que procede de las algas, se polimeriza al calentarse y enfriarse para formar un gel sólido (similar a la gelatina), que proporciona un soporte sólido para el cultivo de las bacterias.

pGLO — Plásmido que contiene la secuencia del gen de la proteína verde fluorescente y el gen de resistencia a la ampicilina, que codifica la betalactamasa.

Plásmido — Molécula de ADN circular y autorreplicable que transporta uno o más genes de proteínas de resistencia a los antibióticos y un gen extraño clonado, como la GFP. Es una molécula de ADN extracromosómica separada del ADN cromosómico. Los plásmidos suelen aparecer de forma natural en las bacterias.

Proteína verde fluorescente La proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) se aisló originalmente de la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria*. Recientemente se ha clonado el gen de la GFP. La conformación tridimensional única de la GFP hace que resuene al exponerla a la luz ultravioleta y que emita energía en forma de luz verde visible. Cuando se expone a la luz ultravioleta , los electrones del cromóforo de la GFP se excitan a un estado de energía más alto. Cuando bajan a un estado de energía inferior, emiten una longitud de onda más larga de luzverde fluorescente visible a ~509 nm.

Regulación de los genes La expresión de los genes en todos los organismos está cuidadosamente regulada para adaptarse a las diferentes condiciones y evitar la sobreproducción innecesaria de proteínas. Los genes que intervienen en el transporte y la descomposición de los alimentos son buenos ejemplos de genes altamente regulados. Por ejemplo, el azúcar simple, la arabinosa, se puede usar como fuente de energía y carbono por las bacterias. Las enzimas bacterianas necesarias para descomponer o digerir la arabinosa como alimento no se expresan en ausencia de arabinosa; solo se expresan cuando la arabinosa está presente en el entorno. En otras palabras, cuando la arabinosa está presente, los genes de estas enzimas digestivas se activan. Cuando la arabinosa desaparece, estos genes se vuelven a desactivar. Véase el Apéndice D para una explicación más detallada del papel de la arabinosa en la regulación y expresión del gen de la Proteína Verde Fluorescente.

Selección por antibióticos Uso de un antibiótico para seleccionar las bacterias que contienen el ADN de interés. El ADN del plásmido pGLO contiene el gen de la betalactamasa el cual proporciona resistencia al antibiótico ampicilina. Una vez que las bacterias se transforman con el plásmido pGLO, comienzan a producir y secretar la proteína betalactamasa. La betalactamasa secretada descompone la ampicilina, haciendo que el antibiótico sea inocuo para el huésped bacteriano. Sólo las bacterias que contienen el plásmido pGLO pueden crecer y formar colonias en un medio nutritivo que contenga ampicilina, mientras que las células no transformadas que no han tomado el plásmido pGLO no pueden crecer en las placas de selección de ampicilina.

Técnica estéril Minimización de la posibilidad de contaminación bacteriana externa durante un experimento observando practicas de limpieza y utilizando técnicas de laboratorio cuidadosas.

Tecnología de ADN recombinante Proceso de corte y recombinación de fragmentos de ADN como un medio para aislar genes o alterar su estructura y función.

Vector Molécula de ADN que se replica de forma autónoma, como un plásmido, en la que se insertan fragmentos de ADN extraños que se propagan en una célula huésped.

Apéndice C
Conceptos básicos de biología molecular y terminología

El estudio del mundo viviente revela que todos los organismos vivos tienen una organización única. Un mapa detallado de esta organización se transmite a la descendencia.

Las células son las unidades funcionales más pequeñas capaces de reproducirse de forma independiente. Muchas bacterias, por ejemplo, pueden sobrevivir como células individuales. Las moléculas químicas de cada célula están organizadas para actuar de forma conjunta.

Las células se pueden cultivar y cosechar

El cultivo celular es el proceso por el cual las células pueden ser recolectadas de sus lugares naturales y cultivarse dentro de recipientes de laboratorio bajo condiciones controladas. Para que las células crezcan, hay que proporcionarles alimento y entorno adecuados. Las bacterias y las levaduras son muy fáciles de cultivar. También se pueden cultivar células tomadas de plantas, insectos y animales, pero es más difícil cuidarlas.

Una vez terminado el crecimiento, las células en cultivo pueden ser cosechadas y estudiadas.

Clonación

Cuando se prepara una población de células mediante el crecimiento de una sola célula, todas las células de la población serán genéticamente idénticas. Dicha población se denomina clonal. El proceso de creación de una población clonal se denomina clonación. El propósito de estriar bacterias en agar es generar colonias individuales, cada una de las cuales surge de una sola célula.

Observar el interior de las células

Cada una de las moléculas del interior de una célula desempeña una función determinada. Por ejemplo, las moléculas de ADN almacenan información (tal como en el disco duro de una computadora). Las proteínas son la fuerza motora de la célula.

Para estudiar estas moléculas, preparamos una población clonal de un tipo de célula de interés, descomponemos las células y clasificamos su contenido. Por ejemplo, resulta bastante sencillo separar todas las proteínas de todas las moléculas de ADN.

También es posible purificar una única especie de proteína de la mezcla de proteínas que hay dentro de un tipo de célula. Cada tipo de proteína tiene propiedades físicas y químicas únicas. Estas propiedades permiten separar las especies de proteínas en función de su tamaño, carga o hidrofobicidad, por ejemplo.

Moléculas especiales, funciones especializadas

Vamos a estudiar detenidamente tres tipos de moléculas muy especiales que se encuentran en el interior de las células: El ADN, el ARN y las proteínas. Cada una de estas moléculas desempeña una función diferente. Las moléculas de ADN son como muebles de archivo en los que se almacena la información. El ARN ayuda a recuperar y ejecutar las instrucciones almacenadas en el ADN. Las proteínas están diseñadas para realizar tareas químicas en el interior (y con frecuencia en el exterior) de la célula.

El ADN—La plantilla universal de la información biológica

El libreto principal de cada organismo está codificado en su ácido desoxirribonucleico (ADN). La información contenida en la molécula o moléculas de ADN de cada célula es suficiente para poner en marcha todas las funciones que la célula realizará.

Las moléculas de ADN son cadenas muy largas compuestas por subunidades que se repiten. Cada subunidad (nucleótido) contiene una de las cuatro bases posibles que sobresalen de sus costados:

adenina (**A**)	citosina (**C**)
timina (**T**)	guanina (**G**)

Dado que los nucleótidos se unen cabeza con cola, una cadena larga de ADN consiste esencialmente en una columna vertebral química con bases que sobresalen a lo largo de los costados. La información que transporta esta molécula está codificada en la secuencia de las bases **A, G, C,** y **T** aen toda su longitud.

Algunos puntos más a tener en cuenta sobre la estructura del ADN

1. Dado que las subunidades de las hebras de ADN están unidas de cabeza a cola, la secuencia es direccional. Por convención, escribimos la secuencia de ADN desde el extremo libre 5' (pronunciado «5 primo») de la columna vertebral y trabajamos hacia el otro extremo, el extremo «3 primo», o 3'.

   Es decir, 5'...**AACTG**...3'

2. Las bases que sobresalen a lo largo de la cadena son libres de formar enlaces de hidrógeno espontáneos con las bases disponibles en otras hebras de ADN de acuerdo con las siguientes reglas:

   (i) **A** se empareja con **T**

   (ii) **C** se empareja con **G**

   Debido a estas reglas, se dice que A y T son bases complementarias; **G** y **C** también son complementarias.

   (iii) Para que dos cadenas de ADN se emparejen, deben ser complementarias y estar en direcciones opuestas.

   es decir, (5'...**AGGTC**...3') puede emparejarse con (5'...**GACCT**...3'). Estas dos cadenas tienen secuencias complementarias. El par de doble cadena se escribe de la siguiente manera:

   5'...**AGGTC**...3'

   3'...**TCCAG**...5'

   La molécula anterior contiene cinco pares de bases. De hecho, en la naturaleza, el ADN casi siempre se presenta en forma de doble hebra, con las dos hebras conteniendo secuencias complementarias.

3. Las moléculas de ADN suelen tener miles, a veces millones, de pares de bases. A veces, los dos extremos de una molécula de ADN se unen para formar un ADN circular.

4. El ADN de doble hebra, en su forma nativa, se presenta como un resorte enrollado, o hélice. Al ser bicatenario, suele denominarse doble hélice.

La arquitectura del ADN permite una estrategia muy sencilla durante la reproducción: Las dos hebras de cada molécula de ADN se desenrollan y se «abren»; entonces, cada una permite que una enzima llamada ADN polimerasa haga una nueva copia complementaria de sí misma. Esto da lugar a dos moléculas hijas, cada una de ellas de doble hebra, y cada una idéntica a la molécula madre.

Las proteínas y el ARN son la fuerza motriz de la célula

La bioquímica de la vida requiere cientos de interacciones químicas muy específicas y eficaces, las cuales se producen simultáneamente. Las principales protagonistas de estas interacciones son las moléculas de proteína y las de ARN de vida corta, que pueden trabajar juntas o de forma independiente para cumplir una serie de funciones. Al igual que el ADN, el ARN y las proteínas también son largas cadenas de unidades repetitivas.

ARN

El ARN (ácido ribonucleico), al igual que el ADN, está formado por cuatro tipos de bloques de construcción encadenados. Se diferencia del ADN en los siguientes aspectos:

Las cuatro bases del ARN son **A, G, C,** y **U** (uracilo); las reglas de emparejamiento son las mismas que las del ADN, excepto que **A** se empareja con **U**. Aunque el ARN puede emparejarse con ARN o ADN complementarios, en las células el ARN suele ser monocatenario. El azúcar de la columna vertebral del ARN es la ribosa, no la desoxirribosa. Las moléculas de ARN son generalmente cortas, en comparación con las de ADN; esto se debe a que cada ARN, en sí mismo, es una copia de un segmento corto de una molécula de ADN. El proceso de copia de segmentos de ADN en ARN se denomina transcripción y lo realiza una proteína llamada ARN polimerasa.

Proteínas

Las proteínas (más específicamente, los polipéptidos) también son moléculas largas, en forma de cadena, pero son estructuralmente más diversas que el ADN o el ARN. Esto es porque las subunidades de las proteínas, llamadas aminoácidos, ocurren en veinte tipos diferentes. La secuencia exacta de aminoácidos a lo largo de una cadena polipeptídica determina la forma en la que cadena se doblará en su estructura tridimensional. Las características tridimensionales precisas de esta estructura determinan a su vez su función.

La función de una proteína **depende** de la secuencia **exacta** de sus aminoácidos.

En la mayoría de los casos, una proteína realizará una única función. Las proteínas pueden desempeñar funciones muy diversas: Algunas proteínas, denominadas enzimas, actúan como catalizadores en las reacciones químicas; otras transportan señales de una parte de la célula a otra—o, en el caso de las «hormonas», de una célula a otra—; algunas proteínas (anticuerpos) tienen la tarea de combatir a los intrusos; muchas se convierten en partes integrantes de las diversas estructuras físicas del interior de las células; y otras (proteínas reguladoras) vigilan diversas actividades dentro de las células para mantenerlas dentro de los límites «legales».

Código lineal, consecuencias tridimensionales

El ADN es el principal depósito de información en los sistemas vivos. Como se ha mencionado, esta información es lineal, es decir, está codificada en la secuencia de bloques de construcción **A, G, C, T** a lo largo de la molécula de ADN. Este código lineal puede transmitirse a la descendencia — porque el ADN puede replicarse en copias exactas.

Se eligen segmentos cortos de cada molécula de ADN para su transcripción en un momento dado. Estos segmentos se denominan genes. La enzima ARN polimerasa copia todo el segmento, base por base, ensamblando una molécula de ARN que contiene una secuencia de **A, G, C** y **U** exactamente complementaria a la secuencia de ADN del gen transcrito.

Además de proporcionar una plantilla maestra para copiar los ARN, el ADN también contiene información de la secuencia, la cual indica a la ARN polimerasa dónde debe comenzar a transcribir un gen (promotor) y dónde debe detenerse, cuántas copias debe hacer y cuándo debe hacerlas, e incluso puede insertar cierta información dentro de la secuencia del ARN para determinar la longevidad y productividad del mismo.

Hay tres clases principales de ARN que se copian a partir de plantillas de ADN: los ARN mensajeros, o ARNm, que transmiten la información de la secuencia necesaria para ensamblar las proteínas; los ARN de transferencia, o ARNt, que trabajan en la cadena de montaje de las proteínas; y los ARN que realizan funciones estructurales. Por ejemplo, los ARN ribosómicos, o ARNr, ayudan a construir el andamiaje de los ribosomas, las fábricas donde se ensamblan las proteínas.

Los ARNm llevan la información de la secuencia para fabricar proteínas. Los ribosomas leen esta secuencia de nucleótidos, mediante un proceso llamado «traducción», para convertirla en una secuencia de aminoácidos. ¿Cómo se consigue esto? Sólo hay cuatro tipos de nucleótidos, pero veinte tipos de aminoácidos.

Durante la traducción, el ribosoma lee 3 nucleótidos a la vez y asigna un aminoácido a cada trío sucesivo. **Nota:** estos tríos idénticos suelen denominarse **codones**. Cada aminoácido luego se une al extremo de la cadena de proteínas en crecimiento. Hay 64 tripletes o codones posibles. Así, la información lineal que reside en el ADN se utiliza para ensamblar una secuencia lineal de aminoácidos en una proteína. Esta secuencia, a su vez, **determinará la forma en que esa proteína se doblará en una** forma precisa con propiedades químicas características.

En resumen, la transferencia primaria de información dentro de las células sigue el orden:

ADN➔ARN➔PROTEÍNA➔RASGO

Aunque la información en sí es lineal, las implicaciones son tridimensionales. Un supuesto fundamental de la tecnología del ADN recombinante es que se pueden lograr cambios permanentes y deseables en el funcionamiento de las células vivas cambiando la secuencia lineal de su ADN.

Los genes son archivos discretos de información de ADN

Un gen es un segmento dentro de una molécula de ADN que ha sido seleccionado para ser copiado en el ARN. Directa o indirectamente, este ARN realizará una función. Por tanto, es conveniente pensar en un gen como una unidad de función.

Muchos rasgos o características, tales como la resistencia bacteriana a un antibiótico, se rigen por genes individuales. La mayoría de los rasgos,—como el color de una rosa o la forma de una nariz—, están gobernados por varios genes que actúan conjuntamente.

Los genes pueden variar en longitud: Algunos solo tienen unos pocos centenares de pares de bases; otros pueden tener decenas de miles de pares de bases. Una molécula de ADN puede contener desde un puñado hasta miles de genes. Una célula, a su vez, puede contener una o varias moléculas de ADN (cromosomas). Por tanto, el número de genes de una célula puede variar enormemente. La bacteria *E. coli* contiene una molécula de ADN con unos 5000 genes. Una célula humana contiene 46 moléculas de ADN con un total de unos 100,000 genes.

Todos los genes de una célula determinada **no** se copian en el ARN (es decir, *no están* «expresados») al mismo tiempo o a la misma velocidad. Por ello, cuando se habla de la función de un gen, se hace referencia a su nivel de expresión. Este nivel puede ser controlado por la célula, de acuerdo con reglas predeterminadas que están escritas en el ADN.

Un ejemplo: las células de nuestro cuerpo (los 100 billones de ellas) contienen cada una moléculas idénticas de ADN. Sin embargo, las células del hígado, por ejemplo, solo expresan los genes necesarios para la función hepática, mientras que las células de la piel expresan un subconjunto de genes muy diferente.

El ADN puede cortarse en trozos mediante enzimas de restricción

Las enzimas de restricción son proteínas elaboradas por las bacterias para defenderse contra el ADN extraño e invasivo (por ejemplo, el ADN viral). Cada enzima de restricción reconoce una secuencia única, normalmente de 4–6 pares de bases, y cortará cualquier ADN siempre que aparezca esa secuencia.

Por ejemplo, la enzima de restricción *Bam*H I reconoce la secuencia (5'..**GGATCC**..3') y corta la cadena de ADN entre los dos nucleótidos G de esa secuencia.

Las enzimas de restricción cortan el ADN de cualquier fuente, siempre que la secuencia de reconocimiento esté presente. No importa si el ADN es de origen bacteriano, vegetal o humano.

Los trozos de ADN pueden ser unidos por la ADN ligasa

La ADN ligasa es una enzima que pega los pedazos de ADN, siempre y cuando los extremos sean compatibles.

Así, un trozo de ADN humano o de rana o de tomate cortado con *Bam*H I puede unirse fácilmente a un trozo de ADN bacteriano también cortado con *Bam*H I. Esto permite la creación de ADN recombinante, o híbridos, creados mediante la unión de pedazos de ADN de dos fuentes diferentes.

Se pueden cortar genes de ADN humano o delADN vegetal y colocarse dentro de las bacterias. Por ejemplo, el gen de la insulina hormonal humana puede ser insertado dentro de una bacteria. En condiciones óptimas, estas bacterias pueden producir auténtica insulina humana.

Los plásmidos son pequeñas piezas circulares de ADN

Los plásmidos son pequeños fragmentos circulares de ADN que se encuentran dentro de algunas células bacterianas. Replican su propio ADN tomando prestadas las polimerasas de las células. Así, pueden permanecer indefinidamente en el interior de las células sin realizar gran parte de su propio trabajo.

Debido a su pequeño tamaño, el ADN plasmídico es fácil de extraer y de purificar de las células bacterianas. Cuando se cortan con una enzima de restricción, estos pueden unirse a ADN extraño—de cualquier fuente—que haya sido cortado con la misma enzima.

Los ADN híbridos resultantes pueden reintroducirse en las células bacterianas mediante un procedimiento llamado transformación. Los plásmidos híbridos pueden perpetuarse en las bacterias al igual que antes, excepto que el ADN extraño que se unió a ellos también se perpetúa. El ADN extraño tiene vía libre, por así decirlo.

Cada plásmido híbrido contiene ahora una copia perfecta del trozo de ADN extraño que se le unió originalmente. Decimos que ese trozo de ADN extraño ha sido clonado; el plásmido que llevaba el ADN extraño se llama vehículo o vector de clonación.

Además de su utilidad para clonar genes extraños, los plásmidos a veces portan genes propios. Las bacterias mueren cuando se exponen a los antibióticos. Sin embargo, los genes de resistencia a los antibióticos permiten que las bacterias se desarrollen en presencia de un antibiótico como la ampicilina. Estos genes se encuentran a menudo en los plásmidos. Cuando se inserta ADN extraño en dichos plásmidos, y los híbridos se introducen en las células bacterianas por transformación, es fácil seleccionar las bacterias que han recibido el plásmido, porque han adquirido la capacidad de crecer en presencia del antibiótico, mientras que todas las demás células bacterianas mueren.

Bibliotecas de ADN

Cuando se extrae el ADN de un tipo de célula determinado, este se puede cortar en pedazos y los pedazos pueden clonarse en masa en una población de plásmidos. Este proceso produce una población de ADN híbrido (recombinante). Después de insertar estos híbridos en las células, cada célula transformada habrá recibido y propagado un único híbrido. Cada híbrido contendrá el mismo ADN vectorial pero un ADN de inserción diferente.

Si hay 1,000 moléculas de ADN diferentes en la mezcla original, se formarán 1000 híbridos diferentes; se recuperarán 1,000 células transformantes diferentes, cada una de ellas portadora de una de las 1,000 piezas originales de información genética. Esta colección se denomina biblioteca de ADN. Si el extracto original procede de células humanas, la biblioteca es una biblioteca humana.

Los ADN individuales de interés pueden ser extraídos de una biblioteca de este tipo mediante el filtrad de la biblioteca realizado con una sonda apropiada.

Apéndice D
Regulación génica

Nuestro cuerpo contiene miles de proteínas diferentes que realizan muchas tareas distintas. Las enzimas digestivas son proteínas; algunas de las señales hormonales que viajan a través de nuestro cuerpo y los anticuerpos que nos protegen de las enfermedades son proteínas. La información para ensamblar una proteína se encuentra en nuestro ADN. La sección del ADN que contiene el código para fabricar una proteína se llama gen. En el genoma humano hay más de 30,000–100,000 genes. Cada gen codifica una proteína única: un gen, una proteína. El gen que codifica una enzima digestiva en la boca es diferente al que codifica un anticuerpo o el pigmento que colorea los ojos. Los organismos regulan la expresión de sus genes y, en última instancia, la cantidad y el tipo de proteínas presentes en sus células por un sinfín de razones, tales como los cambios en el desarrollo, la especialización celular y la adaptación al entorno. La regulación de los genes no solo permite la adaptación a distintas condiciones, sino que también evita la sobreproducción de proteínas innecesarias que colocarían al organismo en desventaja competitiva. Los genes implicados en el transporte y la descomposición (catabolismo) de los alimentos son buenos ejemplos de genes altamente regulados. Por ejemplo, el azúcar arabinosa es tanto una fuente de energía como una fuente de carbono. La bacteria *E. coli* produce tres enzimas (proteínas) necesarias para digerir la arabinosa como fuente de alimento. Los genes que codifican estas enzimas no se expresan cuando la arabinosa está ausente, pero sí cuando la arabinosa está presente en su entorno. ¿Cómo es esto?

La regulación de la expresión de las proteínas suele producirse a nivel de la transcripción del ADN en ARN. Esta regulación se lleva a cabo en un lugar muy específico de la plantilla de ADN, llamado promotor, donde la ARN polimerasa se asienta en el ADN y comienza la transcripción del gen. En las bacterias, los grupos de genes relacionados suelen agruparse y transcribirse en el ARN a partir de un promotor. Estos grupos de genes controlados por un único promotor se denominan operones.

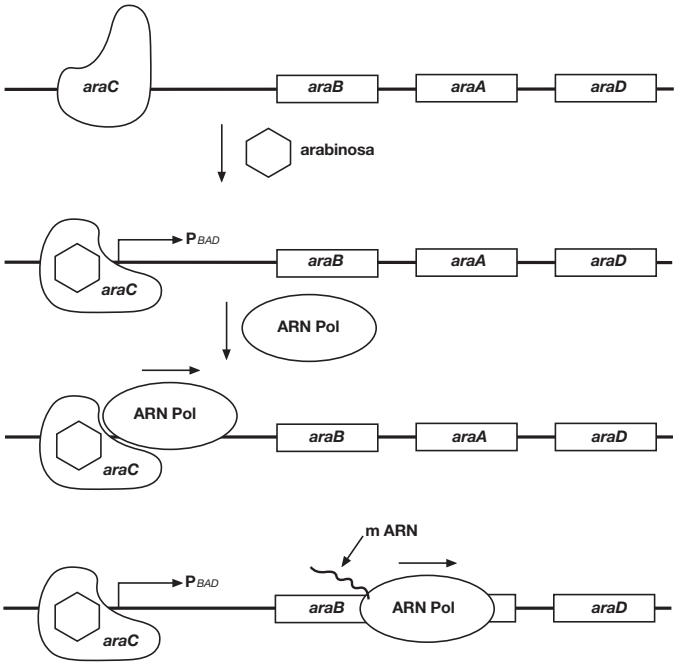
Los tres genes (*araB, araA* y *araD*) que codifican tres enzimas digestivas implicadas en la descomposición de la arabinosa están agrupados en lo que se conoce como operón de la arabinosa.[3] Estas tres proteínas dependen del inicio de la transcripción desde un único promotor, P_{BAD}. La transcripción de estos tres genes requiere la presencia simultánea de la plantilla de ADN (promotor y operón), del ARN polimerasa y de una proteína de unión al ADN llamada *araC* y de la arabinosa. La *araC* se une al ADN en el sitio de unión de la ARN polimerasa (el comienzo del operón de la arabinosa). Cuando la arabinosa está presente en el entorno, las bacterias la toman. Una vez en su interior, la arabinosa interactúa directamente con la *araC*, que está unida al ADN. La interacción hace que la *araC* cambie su forma, lo que favorece (en realidad ayuda a) la unión de la ARN polimerasa y la transcripción de los tres genes *araB*, *A* y *D*. Se producen tres enzimas que descomponen la arabinosa y eventualmente la arabinosa se agota. En ausencia de arabinosa, la araC vuelve a su forma original y la transcripción se interrumpe.

El código de ADN del plásmido pGLO ha sido diseñado para incorporar aspectos del operón de la arabinosa. Tanto el promotor (P_{BAD}) como el gen *araC* están presentes. Sin embargo, los genes que codifican el catabolismo de la arabinosa, *araB*, *A* y *D*, han sido reemplazados por el único gen que codifica la GFP. Por tanto, en presencia de arabinosa, la proteína *araC* promueve la unión de la ARN polimerasa y se produce la GFP. Las células presentan una fluorescencia verde brillante a medida que producen más y más GFP. En ausencia de arabinosa, *araC* ya no facilita la unión de la ARN polimerasa y el gen de la GFP no se transcribe. Cuando no se produce GFP, las colonias de bacterias parecerán tener un fenotipo—de tipo salvaje (natural) de colonias blancas sin fluorescencia.

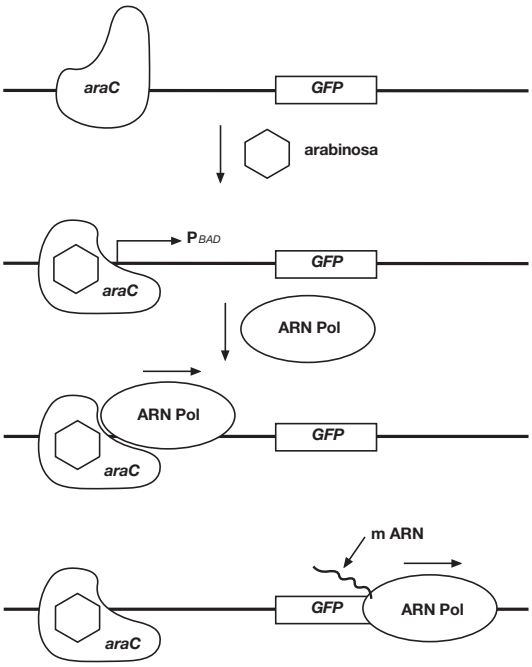
Este es un excelente ejemplo del marco molecular central de la biología en acción:

ADN➔ARN➔PROTEÍNA➔RASGO.

El operón de la arabinosa



Expresión de la proteína verde fluorescente



APÉNDICE D

Apéndice E
Documentación gráfica de placas pGLO utilizando el BlueView Transilluminator de Vernier

1. Inicia Logger *Pro*® y selecciona New [Nuevo] en el menú File [Archivo].
2. Prepara el BlueView Transilluminator.
   a. Transfiere la placa +pGLO LB/amp a la parte central de la plataforma azul del BlueView Transilluminator.
   b. Conecta el BlueView Transilluminator a la corriente alterna y enciéndelo.
3. Colocación del ProScope HR™.
   a. Conecta la lente 1–10X al ProScope.
   b. Conecta el ProScope al puerto USB.
   c. Monta el ProScope en el soporte y coloca el soporte junto al transiluminador.
   d. Nivela el ProScope de forma que la lente quede paralela a la superficie del transiluminador.
4. Prepara el Logger *Pro* para su uso.
   a. Elige Add Page [Añadir página] ► Blank Page [Página en blanco] ► OK [Aceptar] del menú Page [Página].
   b. Elige Text [Texto] en los menús Insert [Insertar] e introduce un título para describir la prueba, por ejemplo «+ pGLO, Colonias LB/amp/ara.
   c. Elige Video Capture [Captura de vídeo] ► Take Photo [Tomar foto] en el menú Insert [Insertar].
   d. Orienta y enfoca el ProScope HR de forma que las colonias estén bien enfocadas.

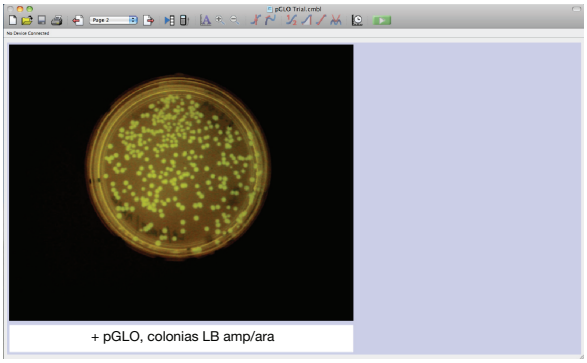


Figura 1

5. Coloca la campana de captura de imágenes sobre el ProScope y el transiluminador. Pasa la mano por el saliente de la campana para hacer los ajustes finales para conseguir la mejor posición, enfoque y resolución.
6. Cuando estés satisfecho con la imagen, haz clic en Take Photo [Tomar foto] y elige Auto Arrange [Disposición automática] en el menú Page [Página].
7. La pantalla debería parecerse ahora a la Figura 1.
8. Añade una nueva página y un título para la siguiente placa y toma tu foto.
9. Repite la operación para cada placa siguiente.
10. Los datos del recuento de colonias y la información de la placa pueden añadirse a la tabla de datos de la página 1 (opcional).

Apéndice F
Referencias

1. Hanahan, Douglas, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.,* **166**, 557 (1983).
2. Hanahan, Douglas, Techniques for transformation of *E. coli*. In DNA Cloning: A Practical Approach (Ed. D. M. Glover), vol. 1. IRL Press, Oxford (1987).
3. Schleif, Robert,Two positively regulated systems, *ara* and *mal*, In *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology, Neidhardt. ASM Press, Washington, D.C. (1996).

Parafilm es una marca comercial de American National Can Co.
Jell-O es una marca comercial de Kraft Foods, Inc.
Logger Pro es una marca comercial de Software & Technology.
Pro Scope HR es una marca comercial de Bodelin Technologies.

1660033EDU

(01)03610520499177

Bio-Rad Laboratories, Inc.

Life Science Group

Web site bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 43 1 877 89 01 177 **Belgium** 32 (0)3 710 53 00 **Brazil** 55 11 3065 7550
Canada 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 420 241 430 532 **Denmark** 45 44 52 10 00 **Finland** 358 09 804 22 00
France 33 01 47 95 69 65 **Germany** 49 89 31 884 0 **Hong Kong** 852 2789 3300 **Hungary** 36 1 459 6100 **India** 91 124 4029300
Israel 972 03 963 6050 **Italy** 39 02 216091 **Japan** 81 3 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 31 (0)318 540 666
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 47 23 38 41 30 **Poland** 48 22 331 99 99 **Portugal** 351 21 472 7700 **Russia** 7 495 721 14 04
Singapore 65 6415 3188 **South Africa** 27 (0) 861 246 723 **Spain** 34 91 590 5200 **Sweden** 46 08 555 12700 **Switzerland** 41 026 674 55 05
Taiwan 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 662 651 8311 **United Arab Emirates** 971 4 8187300 **United Kingdom** 44 020 8328 2000

10000066633 Ver C (1660033EDU) ES

16-0773 0716 Sig 1215