TRANSFORMACIÓN BACTERIANA CON PROTEÍNAS FLUORESCENTES VERDES

10 grupos de estudiantes

1.OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

En este experimento los estudiantes explorarán el proceso biológico de la transformación bacteriana utilizando células bacterianas de E.coli y plásmidos.
Al finalizar la actividad los estudiantes tendrán experiencia observando y analizando los rasgos adquiridos por las células bacterianas transformadas (resistencia a la ampicilina y emisión de fluorescencia).

2.COMPONENTES para 10 grupos de estudiantes

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
BactoBeads E.coli GFP Host	4ºC
Supercoiled pFluoroGreen Plasmid DNA	Congelador
Ampicilina	Congelador
IPTG	Congelador
$CaCl_2$	Temperatura ambiente
Growth Additive	Congelador

2.1 Material suministrado

- Una botella de ReadyPour Luria Broth Agar, a partir de ahora **ReadyPour Agar.**
- Una botella de Luria Broth Medium para recuperación, a partir de ahora **Recovery Broth(caldo de recuperación).**
- Placas de petri pequeñas.
- Placas de petri grandes.
- Pipetas de plástico para transferencia.
- Pipetas de 10 ml estériles.
- Asas de inoculación estériles.
- Microtubos.

2.2 Material requerido y no suministrado

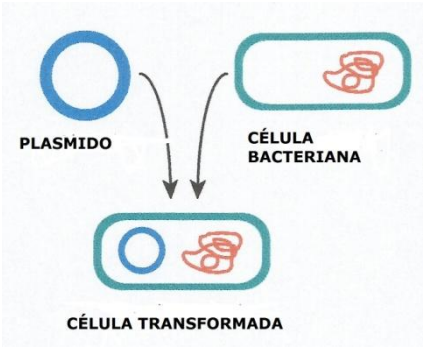
- Micropipetas automáticas y puntas.
- 2 baños de agua (37ºC y 42ºC)*.
- Termómetro.
- Estufa de incubación (37ºC).
- Hielo picado.
- Mechero bunsen, placa calefactora o microondas.
- Guantes termoprotectores.
- Linterna de luz UV.

**Si sólo se dispone de un baño de agua después de utilizar el baño de 42ºC, bajar la temperatura rápidamente a 37ºC eliminado agua y añadiendo agua fría.*

3. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

El ADN puede ser transferido entre bacterias

En la naturaleza el ADN es trasferido entre bacterias utilizando 2 métodos: transformación y conjugación. En la transformación, una bacteria adquiere DNA exógeno del ambiente. En contraste, la conjugación requiere el contacto directo entre dos bacterias, un trozo de ADN es copiado en una célula (donante) y luego es transferido a otra célula (receptor). En ambos casos, la bacteria adquiere nueva información genética que es estable y heredable.

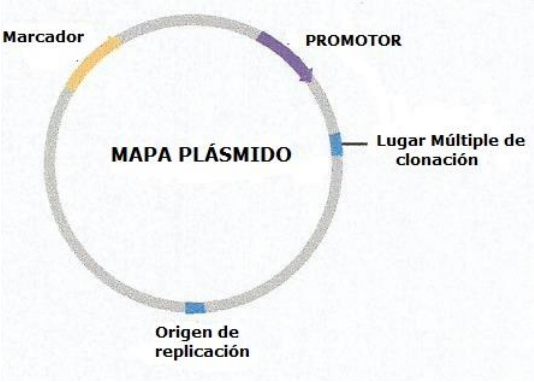


Transformación bacteriana

Ingeniería genética utilizando la tecnología del ADN recombinante

Muchas bacterias poseen genes no esenciales en pequeñas piezas circulares de doble cadena de ADN, además de su ADN cromosómico. Estas piezas de ADN, llamadas plásmidos, permiten a las bacterias intercambiar beneficios. Por ejemplo, el gen que codifica para la β-lactamasa, un enzima que proporciona resistencia a los antibióticos puede estar codificado en plásmidos. Células transformadas secretan β-lactamasa en el medio proporcionando resistencia al antibiótico ampicilina. De este modo, las bacterias que expresan este gen pueden crecer en presencia de ampicilina. Además, pequeñas colonias satélites no transformadas pueden crecer alrededor de las bacterias transformadas porque indirectamente son protegidas por la actividad β-lactamasa.

La tecnología del ADN recombinante permite a los científicos colocar genes de diferentes orígenes en los plásmidos bacterianos. Estos plásmidos especiales reciben el nombre de vectores y tiene as siguientes características:



1. Origen de replicación: Secuencia de ADN a partir de la cual la bacteria puede iniciar la copia del plásmido.
2. Lugar Múltiple de clonación: Una corta secuencia de ADN que contiene diferentes lugares únicos que reconocen los enzimas de restricción y permiten a los científicos la introducción de genes específicos en los plásmidos.
3. Promotor: Una secuencia de ADN que está típicamente localizada antes de la secuencia que codifica el gen. El promotor recluta la ARN polimerasa al comienzo de la secuencia del gen donde comienza la transcripción.
4. Marcador selectivo: Un gen que codifica para la resistencia de un específico antibiótico, normalmente ampicilina, kanamicina o tetraciclina, Cuando se utiliza un medio selectivo, sólo

las células que contienen el marcador crecerán, de forma que permite al investigador identificar fácilmente las células que han sido transformadas con éxito.

Eficiencia de la transformación

En la práctica la transformación es altamente ineficiente, sólo una de cada 10.000 células incorpora con éxito el ADN plasmídico. Si las bacterias son transformadas con un plásmido que contiene un marcador selectivo y sembradas en placas de agar con un medio selectivo y no-selectivo, observaremos diferentes resultados. Las placas de agar con un medio no-selectivo permitirán crecer a las bacterias transformadas y las bacterias no transfomadas. Por el contrario, en las placas de agar con el medio selectivo sólo crecerán las bacterias que expresan el marcador selectivo.

Puesto que cada colonia se origina a partir de una única célula transformada, nosotros podemos calcular la eficiencia de transformación, o el número de células transformadas por microgramo (μg) de ADN plasmídico. Por ejemplo, si 10 nanogramos (0.01 μg) de plásmido se utilizaron para transformar 1 ml de células, y sembramos 0.1 ml de la mezcla y obtenemos 100 colonias, obtenemos una eficiencia de transformación del 1 x 10^5 células transformadas por μg de ADN plasmídico. La eficiencias de transformación generalmente oscilan entre 1 x 10^5 hasta 1 x 10^8.

$$\frac{\text{Número de cél.transformadas}}{\mu\text{g de ADN}} \times \frac{\text{volumen final (ml)}}{\text{volumen siembra}} = \text{Número células transformadas por } \mu\text{g}$$

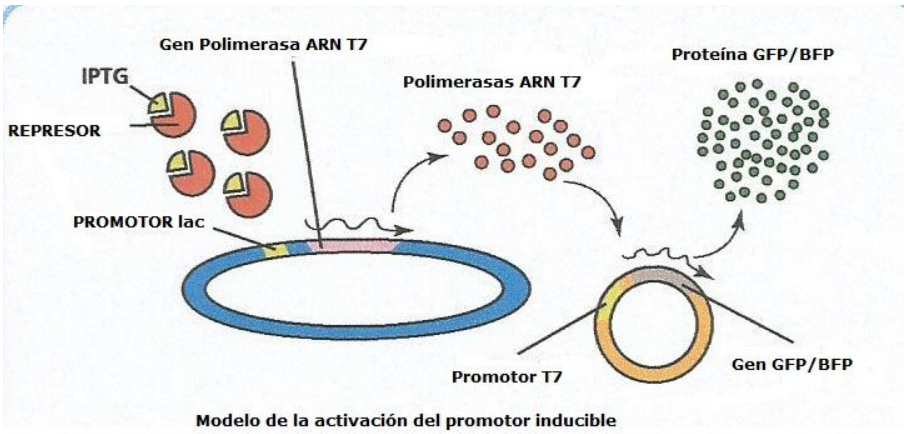
$$\frac{\text{100 cél.transformadas}}{0{,}01\ \mu\text{g}} \times \frac{\text{1 ml}}{\text{0.1 ml}} = 100.000\ 1 \times 10^5 \text{ transformadas por } \mu\text{g}$$

Proteínas fluorescentes

El plásmido que vamos a utilizar para transformar nuestra E.coli ha sido elaborado para contener las secuencias de ADN de la Proteína fluorescente verde (GFP). La proteína GFP tiene unos aproximados 27 kilodaltons de tamaño y posee la capacidad de absorber la luz azul y emitir luz verde como respuesta. Esta actividad se conoce como fluorescencia.

Control de la expresión génica

Los científicos pueden regular la expresión de las proteínas recombinantes utilizando un interruptor genético llamado promotor inducible.



Modelo de la activación del promotor inducible

Estas secuencias permiten un control preciso de la expresión génica debido a que el gen sólo estarán en "on" en presencia de pequeñas moléculas como arabinosa, tetraciclina o IPTG.
En este experimento, utilizaremos un promotor inducible para regular la expresión de la proteína GFP . La célula bacteriana ha sido genéticamente modificada para contener el gen especial de la ARN polimerasa (T7), el cual está controlada por el promotor lac. Bajo condiciones normales, la bacteria dispone de una proteína llamada represor lac, la cual se une al promotor y bloquea la expresión de la polimerasa T7.Sin la polimerasa T7, las proteínas fluorescentes no pueden ser expresadas y no emitirán fluorescencia. No obstante, cuando se añade el IPTG, el represor lac es inactivado y la polimerasa T7 expresada. Esta polimerasa específicamente reconoce el promotor de la proteína fluorescente que contiene el plásmido y transcribe grandes cantidades de ARNm. Finalmente, el ARNm es traducido para producir las proteínas GFP y las células emitirán fluorescencia.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

En este experimento, células E.coli competentes serán transformadas con plásmidos pFluoroGreen , este plásmido contienen los genes para la ampicilina y la proteína fluorescente GFP. Las células transformadas serán seleccionadas utilizando placas de LB con ampicilina, y se calculará la eficiencia de transformación. Además, algunas células se expondrán al IPTG y otras no, por tanto, las proteínas GFP sólo serán expresadas en presencia de IPTG.

4.1 Precauciones

1. Los experimentos de transformación contiene antibióticos para seleccionar las bacterias transformadas**, los estudiantes con alergia a ampicilina no deberían participar en este experimento.**

2. Llevar gafas y guantes de laboratorio mientras se trabaja.

3. EL agar se debe calentar y fundir lo cual puede ser peligroso si se realiza incorrectamente.

4. **NO PIPETEAR CON LA BOCA**, utilizar los dispositivos adecuados.

5. Lavarse las manos con jabón y agua después de haber trabajado en el laboratorio.

6. Las bacterias E.coli utilizadas en este experimento no son patógenas para el ser humano. A pesar de ello, es una buena práctica seguir los siguientes consejos para el manejo y desecho de los materiales contaminados con bacterias:

a) Limpiar las superficies de trabajo con un desinfectante de laboratorio o una solución 10% de lejía.

b) Todos los materiales que entran en contacto con las bacterias deberían ser desinfectados antes de tirar a la basura. Desinfectar los materiales lo antes posibles después de su uso, bien utilizando un autoclave a 121ºC durante 20 minutos, o bien, por inmersión de los materiales durante una noche en una solución al 10 % de lejía.

CRONOLOGÍA DE TODO EL EXPERIMENTO DE TRANSFORMACIÓN

PREPARACIONES PREVIAS

Qué Hacer	Tiempo requerido	Cuando
Preparar placas Agar LB	1 hora	2-7 días antes de sus uso
Preparar placas Fuente de E.coli	20 minutos siembra placas, 16-18 horas incubación placas	El día antes de desarrollar el experimento
Dispensar ADN plasmídico, $CaCl_2$, y Recovery Broth	30 minutos	Un día antes o 30 minutos antes de desarrollar el experimento

DÍA DEL EXPERIMENTO

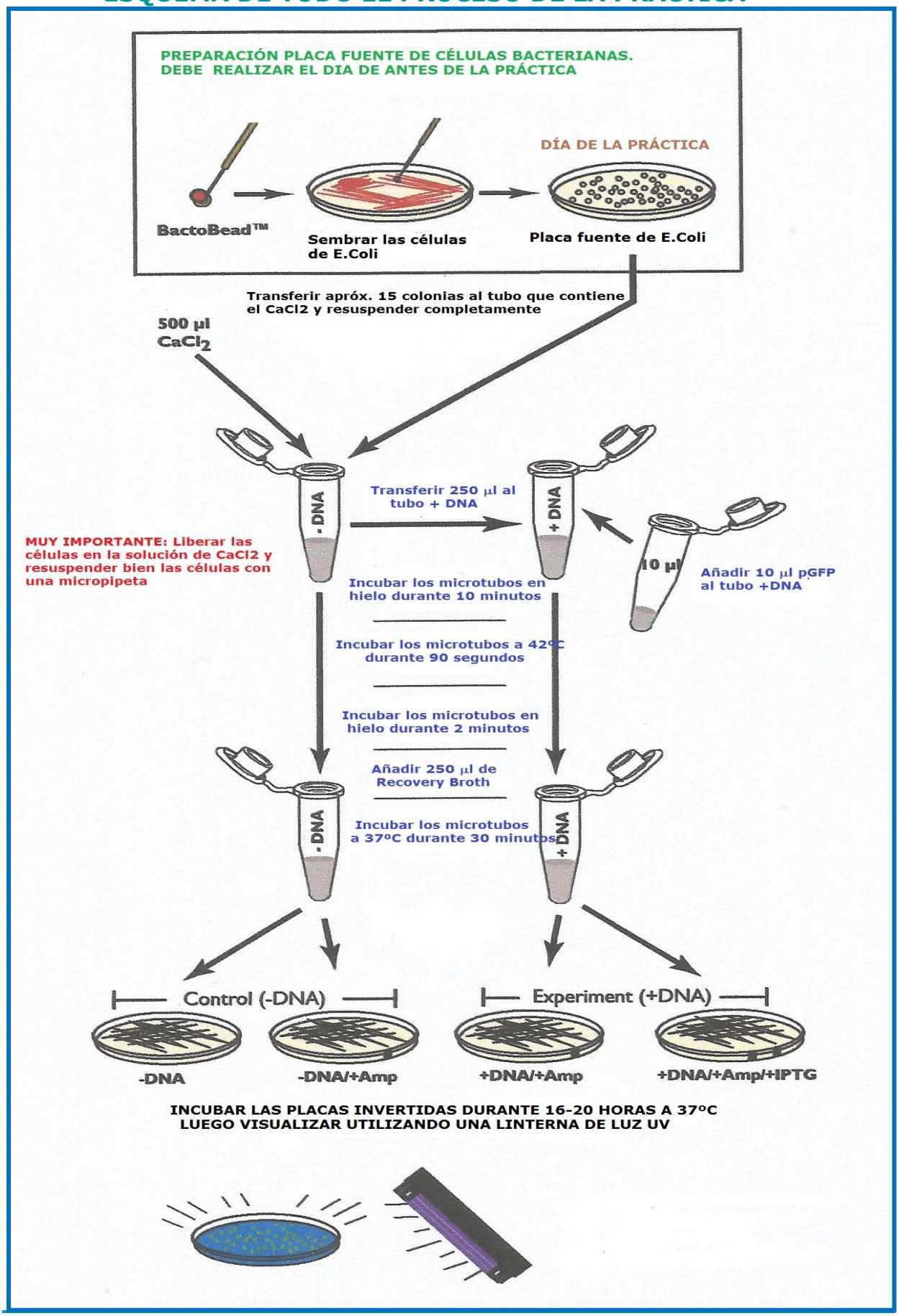
Qué Hacer	Tiempo requerido	Cuando
Equilibrar los baños a 37ºC y 42ºC; Estufa incubación a 37ºC	10 minutos	1 o 2 horas antes de desarrollar el experimento
Desarrollo propio del experimento de transformación	50 minutos	La clase del experimento
Incubar células a 37ºC	16-18 horas	Toda la noche después del desarrollo del experimento

RESULTADOS Y LIMPIEZA

Qué Hacer	Tiempo requerido	Cuando
Los estudiantes observan los resultados de sus experimentos y calculan la eficiencia de transformación	50 minutos	La clase siguiente al experimento
Descartar los materiales contaminados	45 minutos-overnight	Después que los estudiantes han analizado sus resultados

5. PRÁCTICA

ESQUEMA DE TODO EL PROCESO DE LA PRÁCTICA



5.1 Preparaciones previas al día de la práctica. Placas de cultivo y bacterias

La preparación de las diferentes placas que se van a utilizar en el experimento de transformación puede considerarse como una práctica de laboratorio en sí ya que es un trabajo muy habitual en un laboratorio de biología molecular.

1. **ROMPER** en pequeños pedazos el agar sólido ReadyPour LB Agar mediante vigorosa agitación y exprimiendo el bote de plástico.
2. **AFLOJAR pero NO ELIMINAR** el tapón del ReadyPour LB Agar. Esto permite al vapor escapar durante el calentamiento. **PRECAUCIÓN:** Un fallo en aflojar en el tapón previo al calentamiento puede causar la rotura o explosión del bote.
3. **Calentar** con un microondas el ReadyPour LB Agar hasta fundir el agar. Cuidadosamente sacar el bote del microondas y **AGITAR suavemente.** Continuar calentando a intervalos de 30 segundos hasta que el agar está completamente disuelto (la solución ámbar debería estar transparente y libre de pequeñas partículas).

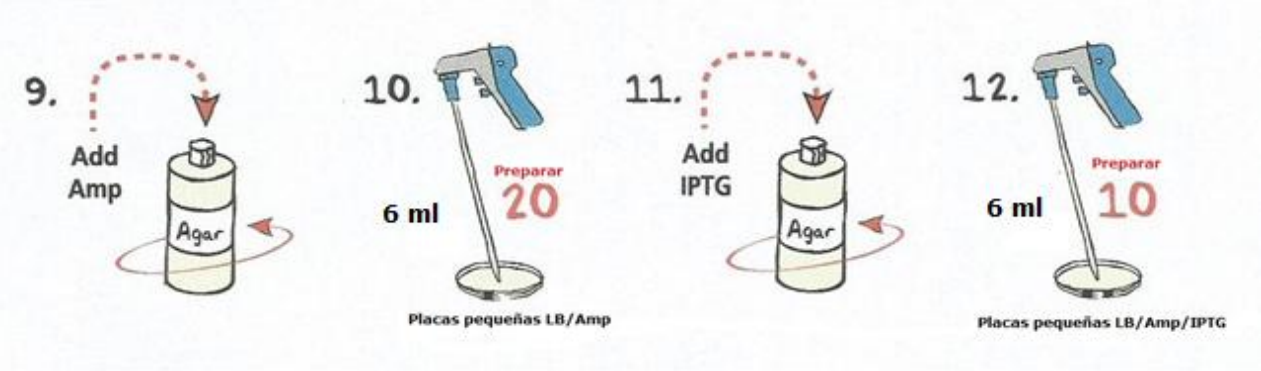
NOTA: Tener mucho cuidado y asegurarse que el agar hirviendo no sale fuera del bote. Parad de calentar si empieza a borbotear en exceso.

4. **ENFRIAR** el bote ReadyPour LB Agar a 60ºC con mucho cuidado. Para evitar que se enfríe en exceso y no de tiempo de preparar todas las placas, se recomienda colocar el envase de ReadyPour LB Agar en un baño a 55-60ºC.
5. Mientras el medio se está enfriando, **ETIQUETAR** la placas pequeñas de petri (60 x 15 mm) con rotulador permanente:

- 20 placas pequeñas LB/Amp.
- 10 placas pequeñas LB/Amp/IPTG.
- 10 placas pequeñas control.
- 5 placas grandes fuente de E.coli.

6. **Añadir 15 ml** del ReadyPour Agar enfriado en cada una de las 5 placas grande fuente de E.coli utilizando una pipeta de 10 ml suministrada.

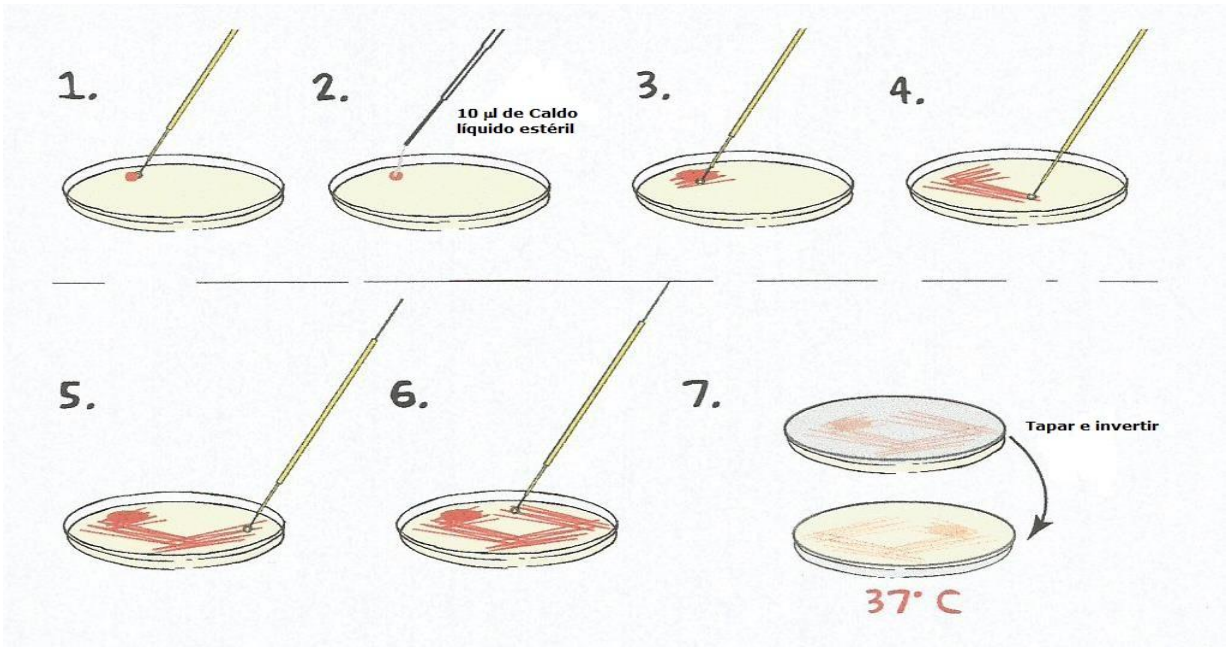
7. **AÑADIR** la cantidad entera del Grow Additive al resto de ReadyPour Agar enfriado. Cerrar el bote y agitar suavemente para mezclar los reactivos. **SOLO AÑADIR LOS REACTIVOS AL AGAR ENFRIADO A 60ºC** ya que si se añaden a más temperatura se pueden degradar.
8. Utilizando una nueva pipeta de 10 ml **AÑADIR 5 ml** en las placas pequeñas control.



9. **AÑADIR** la cantidad entera de **Ampicilina** al ReadyPour Agar restante. Cerrar el bote y agitar suavemente para mezclar los reactivos. Como la ampicilina es un polvo se puede añadir 1 ml del medio con una micopipeta y resuspender el polvo de ampicilina.
10. Utilizando una nueva pipeta de 10 ml **AÑADIR 6 ml** en las 20 placas pequeñas LB/Amp.
11. **AÑADIR** la cantidad entera del **IPTG con una micropipeta** al ReadyPour Agar restante. Cerrar el bote y agitar suavemente para mezclar los reactivos.
12. Utilizando una nueva pipeta de 10 ml **AÑADIR 6 ml** en las 10 placas pequeñas LB/Amp/IPTG.
13. **TAPAR y ESPERAR** al menos 20 minutos a que las placas de agar solidifiquen. Para unos resultados óptimos, dejar las placas a temperatura ambiente toda la noche.
14. CONSERVAR las placas a temperatura ambiente por no más de 2 días. Las placas se deberían invertir y colocar en una bolsa de plástico para asegurar que no se secan.

NOTA: si las placas no se utilizan en los 2 días siguientes a su preparación, se deben conservar invertidas a 4ºC en una nevera. El día de su uso sacar de la nevera y calentar a 37ºC en una estufa durante 30 minutos antes de su uso.

PREPARACIÓN PLACAS FUENTE DE E.COLI
Para unos resultados óptimos las placas fuente de E.coli deberían ser preparadas 16-20 horas antes del desarrollo del experimento de transformación. Si no dispone de una estufa de cultivo, las colonias se formarán a temperatura ambiente en aproximadamente 24-48 horas.



1. **SACAR un BactoBead** de su vial utilizando un asa de inoculación estéril. TRANSFERIR el BactoBead en un borde de una placa grande fuente de E.coli. **CERRAR** el vial inmediatamente después de su uso para limitar la exposición a la humedad y aire.
2. Instantáneamente **DISOLVER** el BactoBead añadiendo 10 μl de Caldo de Cultivo Líquido o agua estéril.
3. Hacer rayas con el asa estéril sobre el BactoBead disuelto como se muestra en la figura. Intentar no clavar el asa en el medio. Esto se conoce como siembra en escocés.
4. Hacer nuevas rayas con el asa de siembra tal y como se muestra en la figura.
5. **ROTAR** la placa y hacer nuevas rayas en una parte limpia del agar como se muestra en la figura.
6. **ROTAR** la placa una vez más, y hacer nuevas rayas en una parte limpia del agar como se muestra en la figura. Esto debería producir colonias aisladas.
7. **TAPAR** la placa y incubar invertidas a 37ºC durante 16-20 horas. Si no dispone de una estufa de cultivo, las colonias se formarán a temperatura ambiente en aproximadamente 24-48 horas.
8. **REPETIR** los pasos anteriores para cada placa fuente de E.coli.

5.2 Preparaciones previas el día de la práctica antes de empezar el experimento

1. Equilibrar los baños de agua a 37ºC y 42ºC. Estufa de incubación a 37ºC.
Si sólo se dispone de un baño de agua después de utilizar el baño de 42ºC, bajar la temperatura rápidamente a 37ºC eliminado agua y añadiendo agua fría.

2. Dispensar 1 ml de $CaCl_2$ en 10 microtubos (uno para cada grupo) y colocar en hielo pícado.

3. Dispensar 1.5 ml de Caldo de Cultivo Luria (Recovery Broth) en 10 microtubos (uno para cada grupo) y mantener a temperatura ambiente.

Preparación del ADN plasmídico pFluoroGreen
Las alicuotas del ADN plasmídico pueden ser preparadas el día antes de la práctica y conservarse a 4ºC para ganar tiempo.

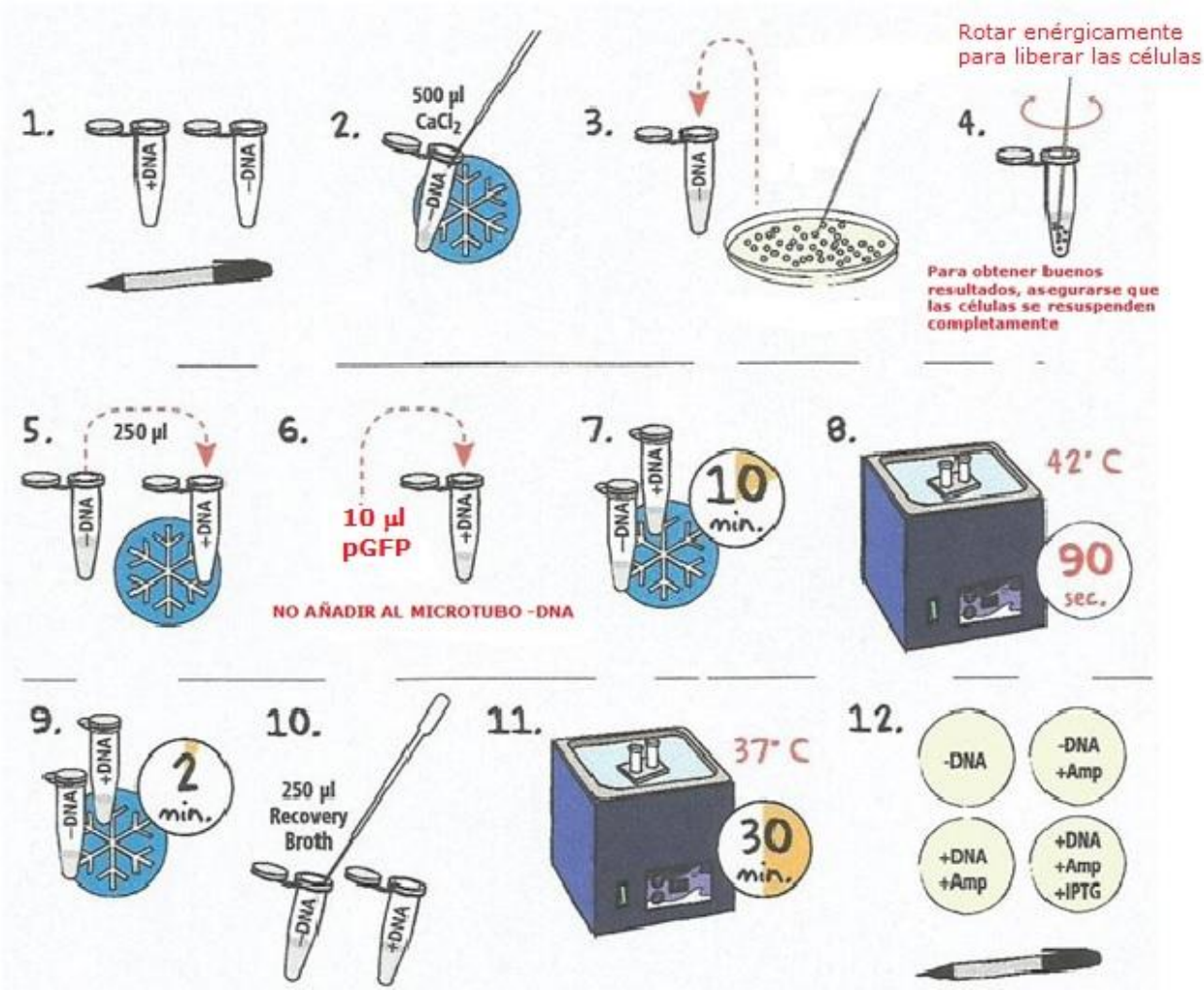
4. Colocar el microtubo del plásmido pFluoroGreen en hielo.
5. Marcar o etiquetar 10 microtubos con pGFP.
6. Antes de dispensar el ADN plasmídico, asegurarse que toda la muestra de los plásmidos se encuentra en el fondo del microtubo. Si se dispone de centrifuga se puede realizar un spin para recoger todas las gotas de líquido.
7. Utilizando una micropipeta, dispensar 12 microlitros del ADN plasmídico en cada microtubo marcado pGFP. NOTA: los estudiantes utilizarán 10 microlitros para el experimento de transformación.
8. Cerrar los microtubos y colocarlos en hielo.

5.3 Práctica. Experimento de transformación

Una vez realizadas todas las operaciones previas a la práctica en sí, vamos a describir el proceso completo del experimento de transformación.

Cada grupo requiere

- 1 microtubo de 1 ml $CaCl_2$.
- 1 microtubo del plásmido pFluoroGreen.
- 1 microtubo de 1.5 ml de Caldo de cultivo Luria (Recovery Broth).
- 2 placas pequeñas LB/Amp.
- 1 placa pequeña LB/Amp/IPTG.
- 1 placa pequeña control.
- 1 placas grande fuente de E.coli por cada 2 grupos.
- 4 pipetas estériles de 1ml.
- 3 asas de siembra.



1. **MARCAR o ETIQUETAR** un microtubo con **+DNA** y un segundo microtubo **con –DNA.COLOCAR LOS MICROTUBOS TODO EL PROCESO EN HIELO**

2. TRANSFERIR 500 µl del $CaCl_2$ ENFRIADO en el microtubo –DNA utilizando una pipeta estéril de 1 ml o preferiblemente con una micropipeta si se dispone.

3. Utilizando un asa de siembra, **TRANSFERIR** aproximadamente 15 colonias (cada colonia debería tener un tamaño de 1-1.5 mm de tamaño) de la placa fuente de E.coli al microtubo –DNA. **NORMALMENTE las células bacterianas** en la placa fuente de E.coli no crecen individualizadas y crecen en toda la placa como un césped que cubre toda la placa, en este caso arrastrar el asa de siembra por la placa y recoger las células, **tener cuidado de no coger agar y tampoco un exceso de bacterias que haría que la transformación se inhibiera.**

4**. ESTE PASO ES MUY IMPORTANTE HACERLO BIEN PARA TENER ÉXITO: LIBERAR** las células del asa rotándola enérgicamente para liberar todas las células bacterianas. Cuando se liberen las células se observará un grumo. **RESUSPENDER** las células bacterianas en la solución de $CaCl_2$ utilizando una micropipeta hasta que no se observe **ningún grumo de células y la suspensión celular esté turbia**. **MUY IMPORTANTE:** liberar bien todas las células y resuspenderlas completamente, se debe observar una solución ligeramente turbia, si no es así añadir más células con el asa o resuspender bien

5.**TRANSFERIR 250 µl de la suspensión celular** al microtubo marcado +DNA. **COLOCAR** los microtubos en hielo.

6. **AÑADIR** al microtubo marcado como +DNA :10 µl del plásmido pFluoroGreen (del tubo marcado como pGFP)
NO AÑADIR plásmidos a los microtubos marcados como -DNA

7. **INCUBAR** en hielo durante 10 minutos.

8. **COLOCAR** los microtubos en un baño de agua a 42ºC durante 90 segundos.

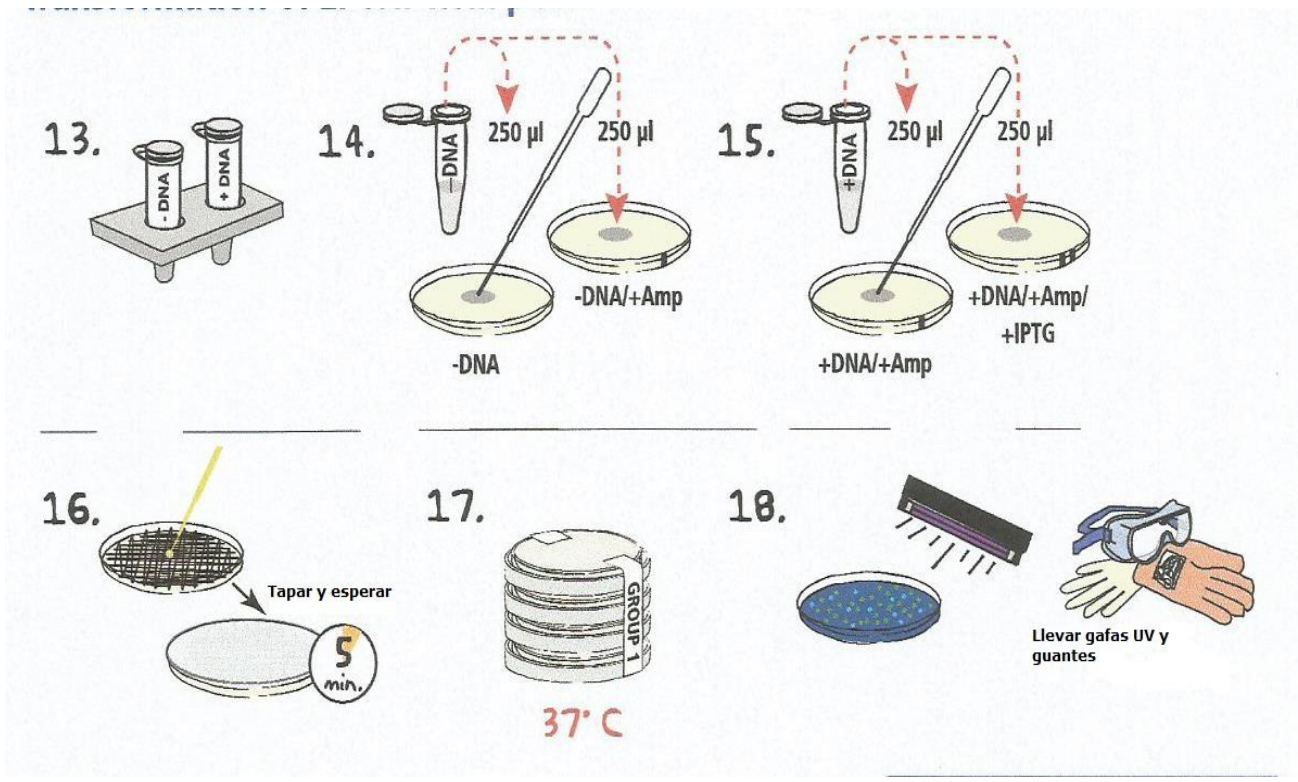
9. **INMEDIATAMENTE** colocar los microtubos en hielo e **INCUBAR** durante 2 minutos.

10. **TRASNFERIR 250 µl del Recovery Broth** a cada microtubo utilizando una pipeta estéril o una micropipeta. Mezclar suavemente el microtubo.

11. **INCUBAR** las células a 37ºC en un baño de agua durante por lo menos durante30 minutos.

12. Durante este periodo de incubación, **PREPARAR y marcar** 4 placas de agar con las siguientes indicaciones:

- -DNA (placa LB control).
- -DNA/+Amp (placa LB/Amp).
- +DNA/+Amp (placa LB/Amp).
- +DNA/+Amp/+IPTG (placa LB/Amp/IPTG).



13. Después del periodo de incubación de 30 minutos , sacar los tubos del baño de agua y colocar en una gradilla u otro utensilio de laboratorio.

14. Utilizando una pipeta estéril de 1 ml o una micropipeta (si se dispone). **TRANSFERIR 250 µl de las células** del tubo marcado como –DNA y depositarlos en el medio de las placas –DNA y –DNA/+Amp.

15. Utilizando una pipeta estéril de 1 ml o una micropipeta (si se dispone). **TRANSFERIR 250 µl de las células** del tubo marcado como +DNA y depositarlos en el medio de las placas +DNA/+Amp y +DNA/+Amp/IPTG.

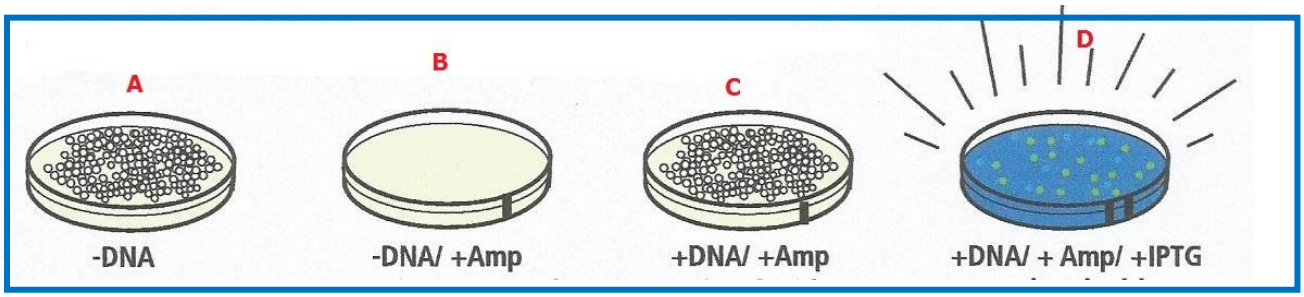
16. **EXTENDER** las células bacterianas por toda la placa utilizando un asa de siembra. Utilizar un asa estéril para extender ambas –DNA muestras. **CAMBIAR** por un asa nueva antes de extender las muestras +DNA. Asegurarse bien que todas las células han sido bien extendidas por toda la superficie de las placas. **TAPAR** las placas y **ESPERAR** durante 5 minutos que la suspensión celular sea absorbida por el agar.

17. **AGRUPAR** todas las placas de un mismo grupo y marcarlas con el número de grupo. **COLOCAR** las placas en una posición invertida a 37ºC en una estufa de incubación durante toda la noche (16-18 horas). SI no dispone de un incubador , las colonias serán visibles en 24-48h a temperatura ambiente.

18. VISUALIZAR las placas control y transformadas utilizando una linterna de luz UV en **oscuridad total** que ayudará a resaltar las bacterias que producen fluorescencia. Para cada placa observar:

- El número de colonias de la placa.
- El color de la bacteria bajo la luz UV

6. RESULTADOS Y PREGUNTAS



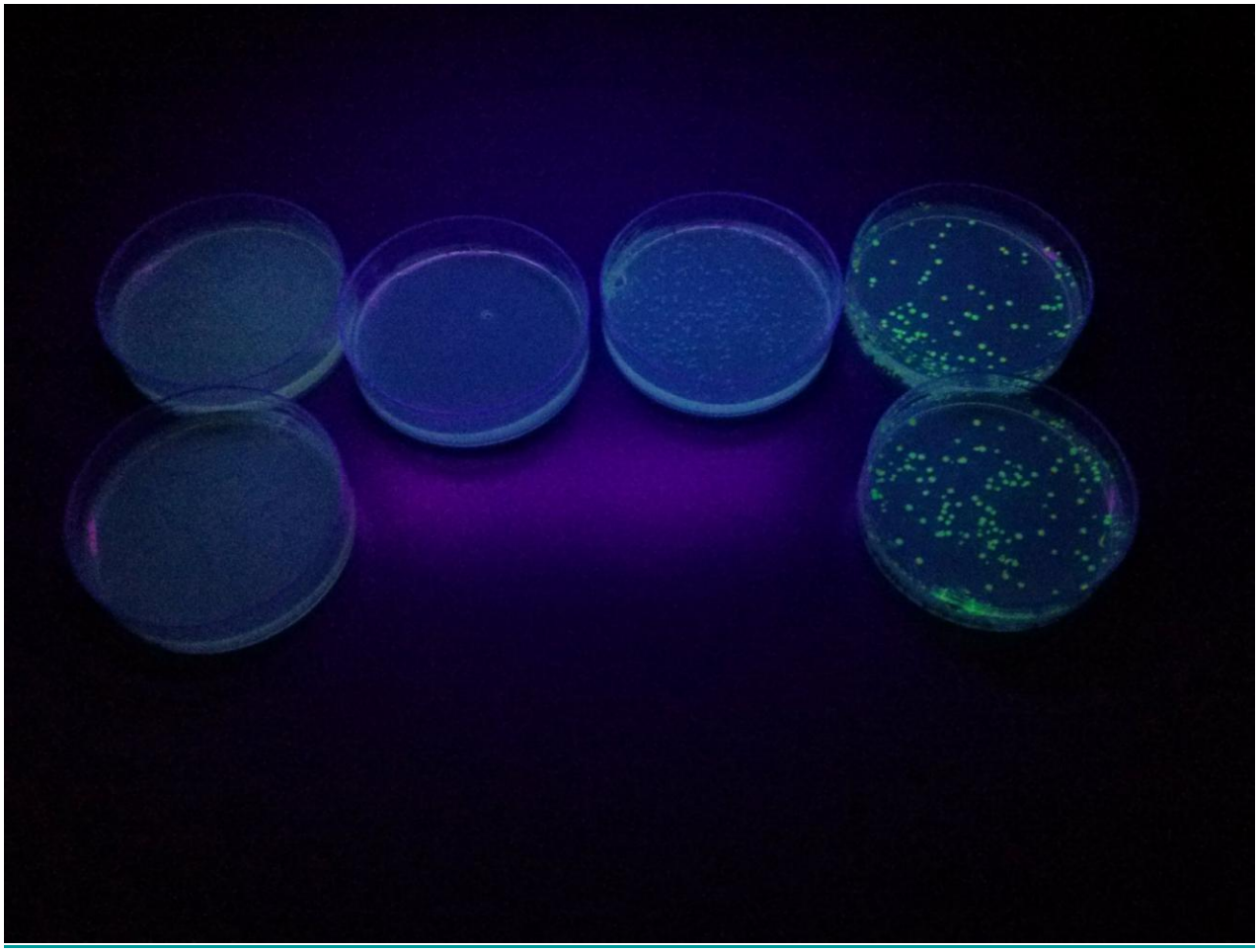
Sembrada con células control (NO DNA)	Sembrada con células control (NO DNA)	Sembrada con células transformadas pFluoroGreen	Sembrada con células transformadas pFluoroGreen

A: No se observan células fluorescentes. Se observan colonias blancas, Se demuestra que las células bacterianas huésped son viables en ausencia de ampicilina.

B: No se observa crecimiento. Se demuestra que las células bacterianas son sensibles a la ampicilina, si no disponen uno de los plásmidos no son resistentes a la ampicilina.

C: Se observan colonias blancas. Se demuestra que las células se pueden volver resistentes a la ampicilina cuando son transformadas con los plásmidos pFluoroGreen . Las proteínas BFP no se producen en ausencia de IPTG.

D: Se observan colonias individuales que emiten fluorescencia cuando se iluminan con una lámpara de luz UV. Se demuestra que las células se pueden volver resistentes a la ampicilina cuando son transformadas con los plásmidos pFluoroGreen . Las proteínas BFP se producen en presencia de IPTG.



Preguntas previas

1. Explica en qué placas esperaras encontrar bacterias similares a las bacterias E.coli de las placa fuente de E.coli
Las bacterias en la placa –DNA serán idénticas a las bacterias E.coli de la placa fuente porque ellas no tienen ningún plásmido añadido y se sembraron en un medio no selectivo.

2. ¿En qué placas encontrarás células bacterianas transformadas? ¿Por qué?
Las bacterias que crezcan en las placas marcadas como +DNA/+Amp y +DNA/+Amp/+IPTG serán las bacterias transformadas ya que sólo las células que han incorporado los plásmidos que expresan los genes para la resistencia a la ampicilina sobrevivirán en los medios selectivos

3. ¿Cuál es el propósito de las placas control? Explica la diferencia entre ellas y porque es necesario prepararlas.
Las placas control ayudan a interpretar los resultados. Hay 2 placas controles en este experimento. La placa control marcada –DNA/+Amp muestra que las células E.coli sólo crecen en un medio selectivo en presencia del plásmido. La placa marcada –DNA muestra que las células sin el plásmido son capaces de crecer en agar sin ampicilina.

4. ¿por qué comparamos placas con –DNA/+Amp y +DNA/ +Amp?
Para demostrar que las células que no contengan el plásmido no crecerán en las placas -DNA/+Amp porque no expresarán el gen de resistencia a la ampicilina. Mientras que las células que contengan el plásmido crecerán en las placas +DNA/+Amp porque ellas expresan el gen de resistencia a la ampicilina.

5. El ADN exógeno no entra pasivamente en células de E.coli. ¿Qué tratamiento requieren las células para volverse competentes?.
Células de E.coli pueden ser inducidas a ser competentes cuando son tratadas con sales de cloruros de los cationes calcio y magnesio. Además, ciclos repetitivos de calor y frío pueden ayudar a convertirse en competentes. Los metales iónicos y los cambios de temperatura afectan la estructura y permeabilidad de la pared celular y membrana de modo que las moléculas de ADN pueden pasar.

6. ¿Qué evidencia tenemos de que experimento de transformación ha tenido éxito?
Un experimento de transformación que funciona mostrará crecimiento en las placas marcadas como +DNA/+ Amp y emitirán fluorescencia bajo una luz UV. Un experimento de transformación que no funciona no mostrará crecimiento en las placas marcadas como +DNA/+ Amp.

7. Enumera algunas razones por las que un experimento de transformación no funciona.
1) No se añadió el plásmido a las células huésped en el tubo +DNA.
2) No añadir una colonia bacteriana al tubo +DNA.
3) No cumplir con los tiempos recomendados en los ciclos de calor-frío.
4) No resuspender bien las células bacterianas en la solución de cloruro cálcico.

8. ¿Cuál es la fuente de la fluorescencia? ¿Por qué algunas células son fluorescentes y otras no?
La fluorescencia proviene de las proteínas verdes y azules codificadas por los respectivos plásmidos. Las células en la placa marcada +DNA/+Amp/+IPTG son fluorescentes debido a la presencia de IPTG en el medio que enciende la expresión de los genes de las proteínas fluorescentes.