

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
BactoBeadsE.coli GFP Host	4°C
Supercoiled pFluoroGreen Plasmid DNA	Congelador
Ampicilina	Congelador
IPTG	Congelador
CaCl ₂	Congelador
Growth Additive	Congelador
Solución de competencia celular	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 **RecoveryBroth(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.
- Tubos cónicos.

2.2 Material requerido y no suministrado

- Micropipetas automáticas y puntas.
- 2 baños de agua (37°C y 42°C)*.
- Termómetro.
- Estufa de incubación (37°C).
- Hielo picado.
- Mechero bunsen, placa calefactora o microondas.
- Guantes termoprotectores.
- Linterna de luz UV.
- Gradillas.
- Rotuladores.
- Equipos de protección individual (EPI's).
- Peras de succión para pipetas.

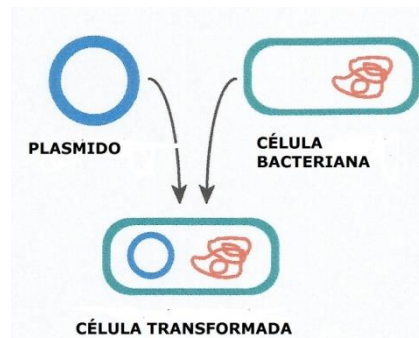
- Microondas.
- Centrifuga (opcional, para el procedimiento de transformación mejorado).

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

3. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

El ADN puede ser transferido entre bacterias

En la naturaleza el ADN es transferido 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.

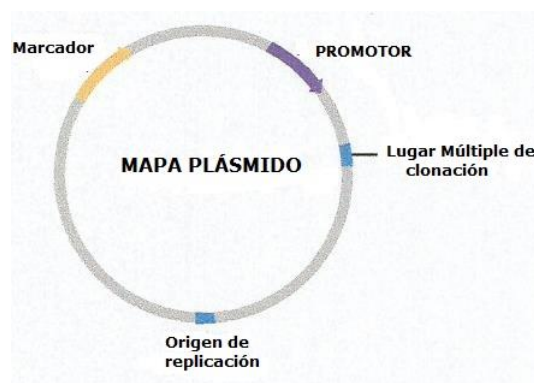


Transformación bacteriana

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 tienen las 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 transformadas. 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 ($0.01 \mu\text{g}$) 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 1×10^5 células transformadas por μg de ADN plasmídico. La eficiencia de transformación generalmente oscilan entre 1×10^5 hasta 1×10^8 .

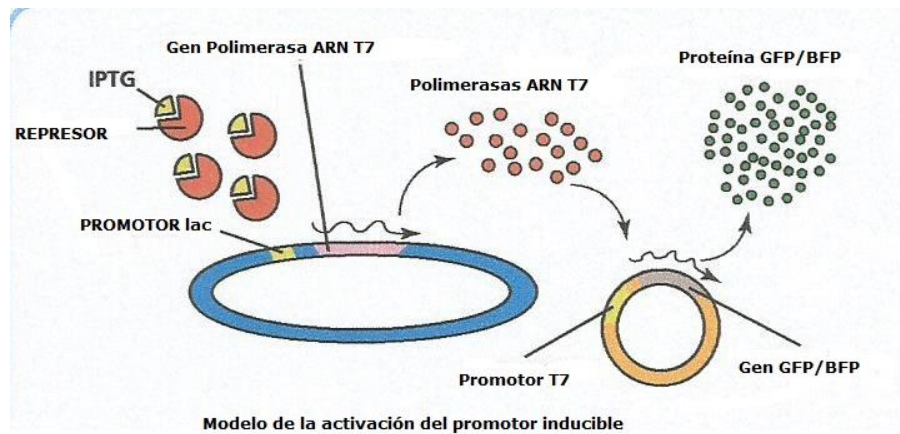
$\frac{\text{Número de cél.transformadas}}{\mu\text{g de ADN}}$	X	$\frac{\text{volumen final (ml)}}{\text{volumen siembra}}$	=	$\frac{\text{Número células transformadas por } \mu\text{g}}$
$\frac{100 \text{ cél.transformadas}}{0,01 \mu\text{g}}$	X	$\frac{1 \text{ ml}}{0.1 \text{ ml}}$	=	$100.000 \text{ } 1 \times 10^5 \text{ transformadas por } \mu\text{g}$

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.



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 contiene 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 contienen 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 posible después de su uso, bien utilizando un autoclave a 121°C durante 20 minutos, o bien, por inmersión de los materiales durante una noche en una solución al 10 % de lejía.

4.2 Guía para el profesor de prácticas

A. INDICACIONES PARA EL PROFESOR DE PRÁCTICAS

Para maximizar la eficiencia de la transformación se han proporcionado cuatro recursos adicionales:

1. Un protocolo de transformación celular mejorado alternativo (Apéndice A) que mejora los resultados de la transformación realizada por los estudiantes. Este protocolo reemplaza los pasos 1-5 en el experimento del estudiante y requiere dos pasos adicionales previos a la transformación, se debe determinar de antemano qué procedimiento se seguirá en la práctica y para poder planificarla en consecuencia.
2. Una sección de trucos y consejos de la transformación celular (Apéndice B) que complementa el protocolo del estudiante en las páginas 10 y 11. Esta lista describe como optimizar la práctica con mayor detalle, ofrece sugerencias para hacer que la práctica se base más en la investigación y vincula pasos específicos a conceptos clave de biología.
3. Una guía de solución de problemas de la transformación celular (Apéndice C) que identifica y explica los problemas experimentales más comunes. Como muchos de estos problemas se abordan mejor de manera proactiva, es preferible leer este apéndice antes de comenzar la práctica y usarlo la información para identificar posibles errores durante la misma.

4. Una breve actividad práctica de microbiología (Apéndice D) para preparar a los estudiantes para recolectar colonias de bacterias.

B. 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 RecoveryBroth	30 minutos	Un día antes o 30 minutos antes de desarrollar el experimento

PREPARACIONES ADICIONALES PARA REALIZAR LA ALTERNATIVA DE TRANSFORMACIÓN MEJORADA

Qué Hacer	Tiempo requerido	Cuando
Prepara el cultivo de E. coli inicial	70-90 minutos	Hasta 3 días antes del experimento
Preparar las células competentes	30 minutos	Hasta 2 días antes del experimento

DÍA DEL EXPERIMENTO

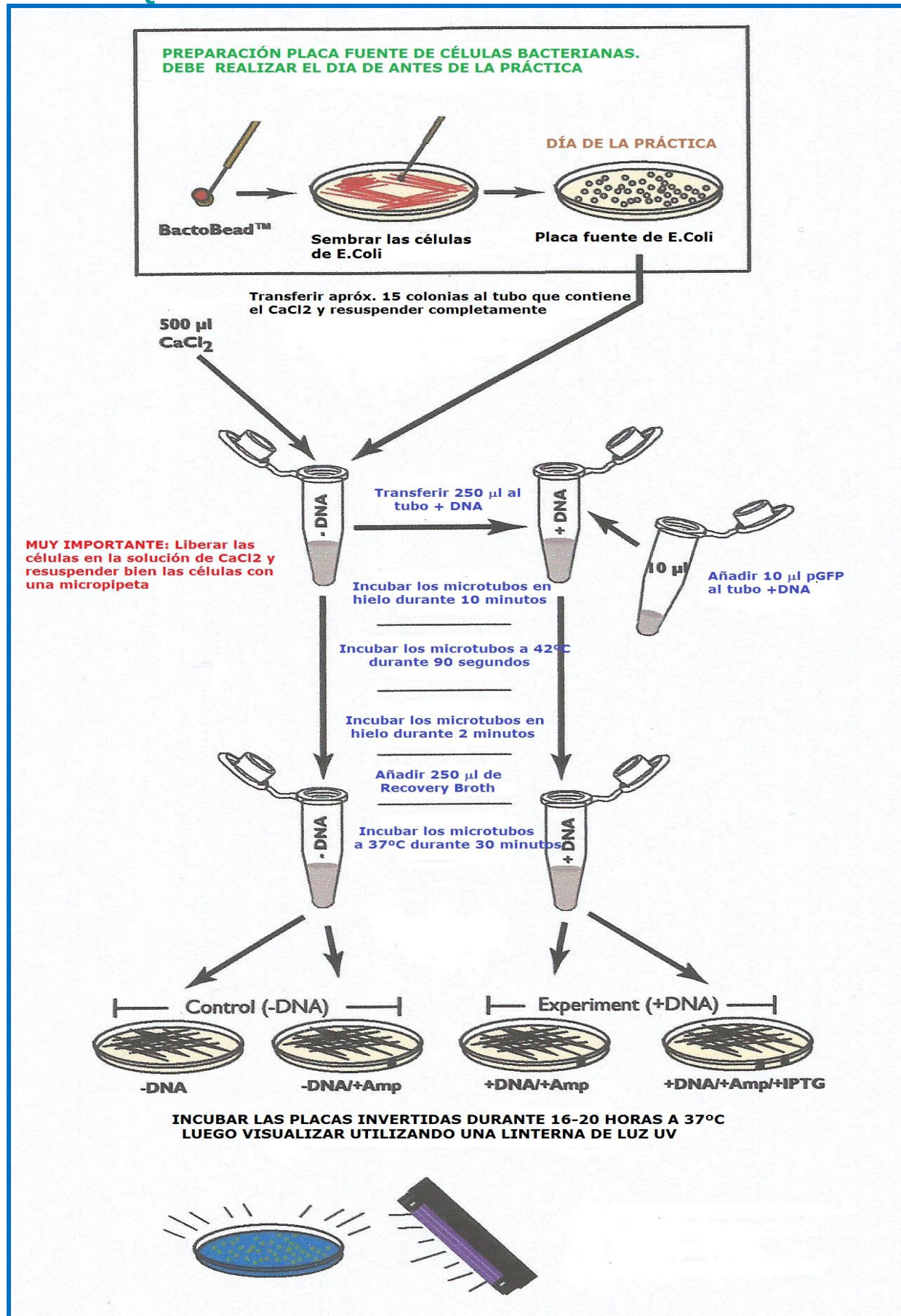
Qué Hacer	Tiempo requerido	Cuando
Equilibrar los baños a 37°C y 42°C; Estufa incubación a 37°C	10 minutos	1 o 2 horas antes de desarrollar el experimento
Desarrollo propio del experimento de transformación	50 minutos	La clase del experimento
Incubar células a 37°C	16-18 horas	Toda la noche después del 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 ReadyPourLB 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. Parar de calentar si empieza a borbotear en exceso.

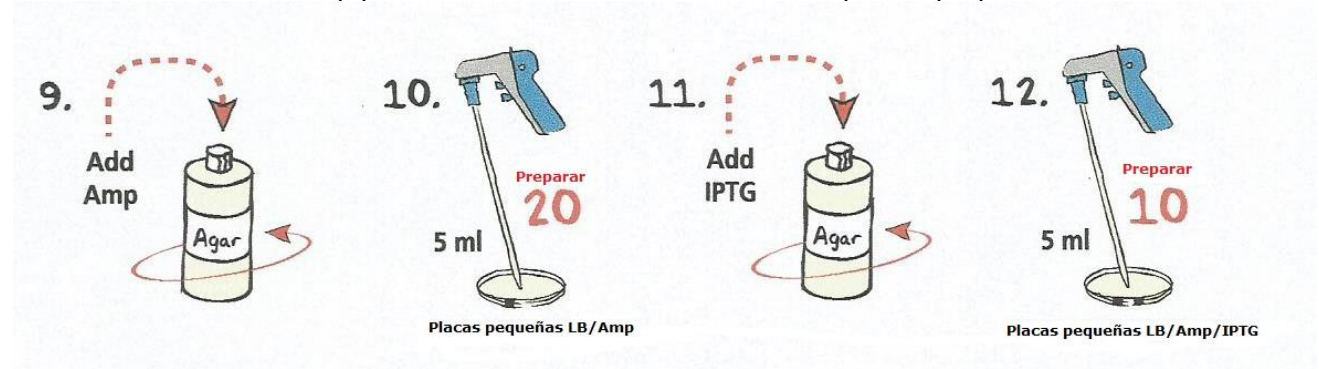
4. **ENFRIAR** el bote ReadyPour LB Agar a 60°C con mucho cuidado. Para evitar que se enfríe en exceso y no de tiempo de preparar todas las placas, se recomienda colocar el envase de ReadyPour LB Agar en un baño a 55-60°C.

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 10 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 GrowAdditive al resto de ReadyPour Agar enfriado. Cerrar el bote y agitar suavemente para mezclar los reactivos. **SOLO AÑADIR LOS REACTIVOS AL AGAR ENFRIADO A 60°C** 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.

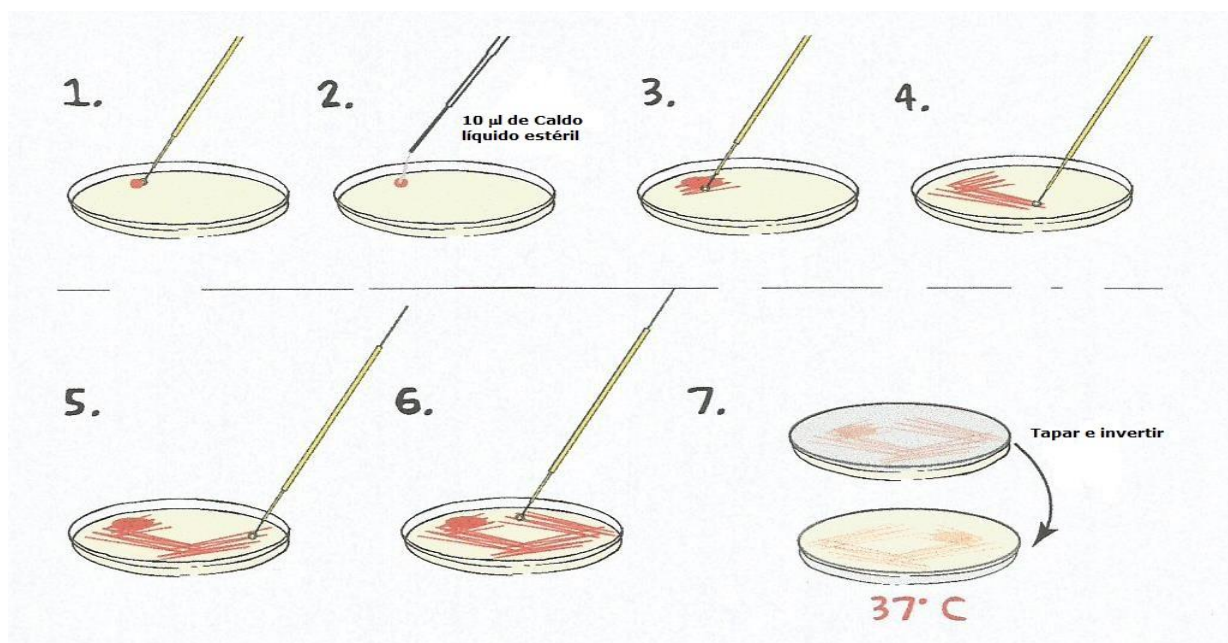


9. **AÑADIR** la cantidad entera de **Ampicilina** al ReadyPour Agar restante. Cerrar el bote y agitar suavemente para mezclar los reactivos. Como la ampicilina es un polvo se puede añadir 1 ml del medio con una micropipeta y resuspender el polvo de ampicilina.
10. Utilizando una nueva pipeta de 10 ml **AÑADIR 5 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 5 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 4°C en una nevera. El día de su uso sacar de la nevera y calentar a 37°C 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 37°C 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 37°C y 42°C. Estufa de incubación a 37°C.
Si sólo se dispone de un baño de agua después de utilizar el baño de 42°C, bajar la temperatura rápidamente a 37°C eliminando agua y añadiendo agua fría.
2. Dispensar 1 ml de CaCl₂ en 10 microtubos (uno para cada grupo) y colocar en hielopicado.
3. Dispensar 1.5 ml de Caldo de Cultivo Luria (RecoveryBroth) en 10 microtubos (uno para cada grupo) y mantener a temperatura ambiente.

Preparación del ADN plasmídico pFluoroGreen

Las alícuotas del ADN plasmídico pueden ser preparadas el día antes de la práctica y conservarse a 4°C para ganar tiempo.

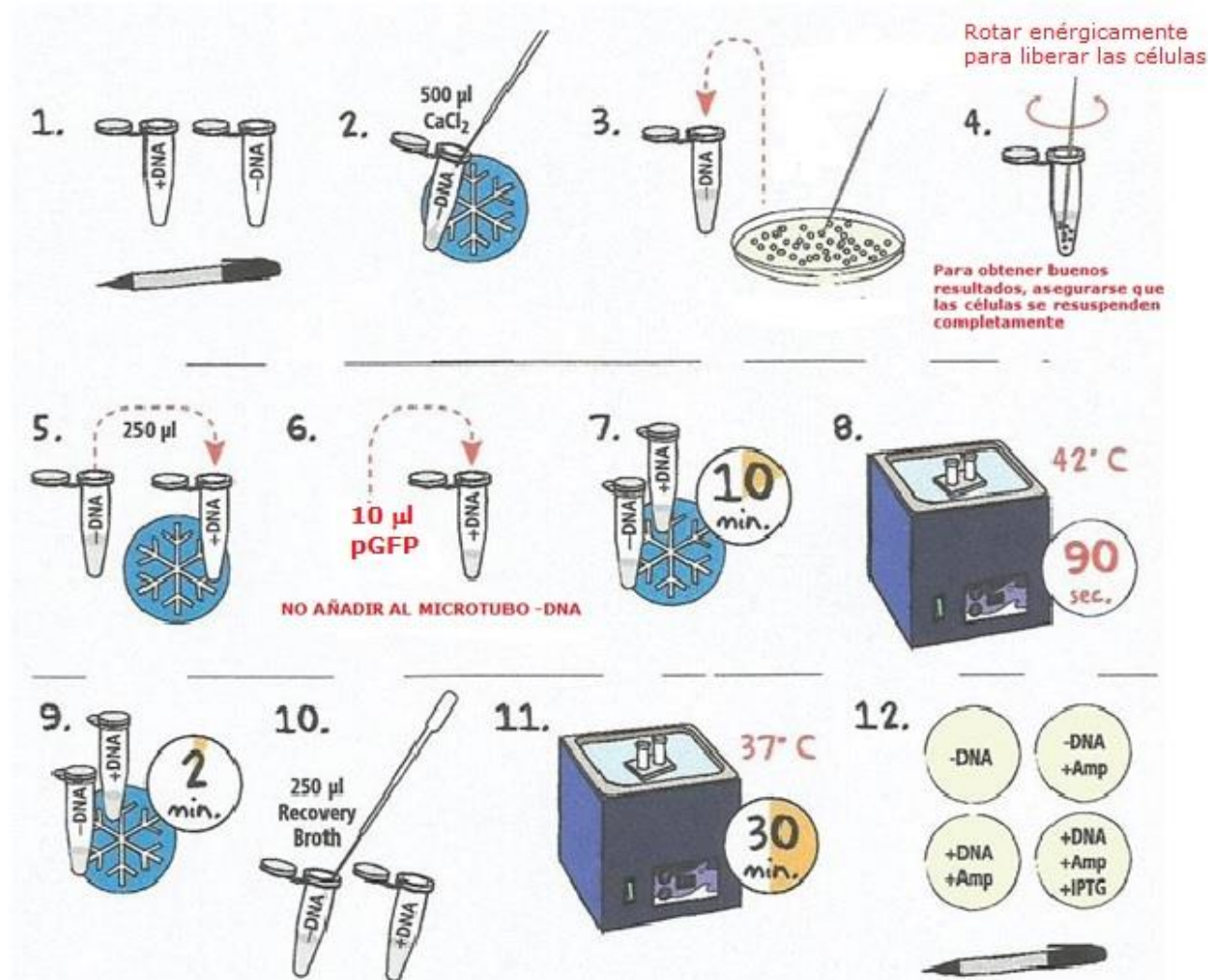
4. Colocar el microtubo del plásmido pFluoroGreen en hielo.
5. Marcar o etiquetar 10 microtubos con pGFP.
6. Antes de dispensar el ADN plasmídico, asegurarse que toda la muestra de los plásmidos se encuentra en el fondo del microtubo. Si se dispone de centrifuga se puede realizar un spin para recoger 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 CaCl₂.
- 1 microtubo del plásmido pFluoroGreen.
- 1 microtubo de 1.5 ml de Caldo de cultivo Luria (RecoveryBroth).
- 2 placas pequeñas LB/Amp.
- 1 placa pequeña LB/Amp/IPTG.
- 1 placa pequeña control.
- 1 placa 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 CaCl₂ 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 CaCl₂ 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 μ l 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 42°C durante 90 segundos.

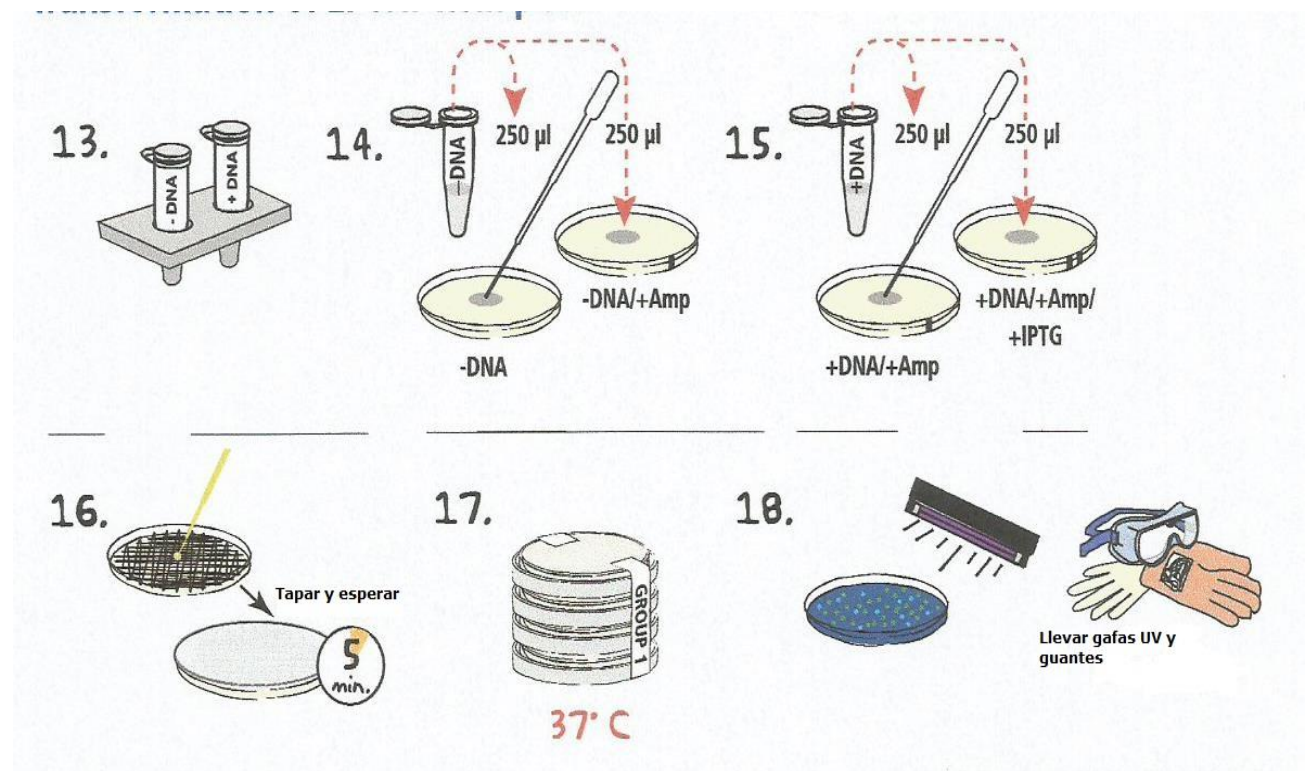
9. **INMEDIATAMENTE** colocar los microtubos en hielo e **INCUBAR** durante 2 minutos.

10. **TRANSFERIR 250 μ l del Recovery Broth** cada microtubo utilizando una pipeta estéril o una micropipeta. Mezclar suavemente el microtubo.

11. **INCUBAR** las células a 37°C en un baño de agua durante por lo menos durante 30 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 μ l 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.

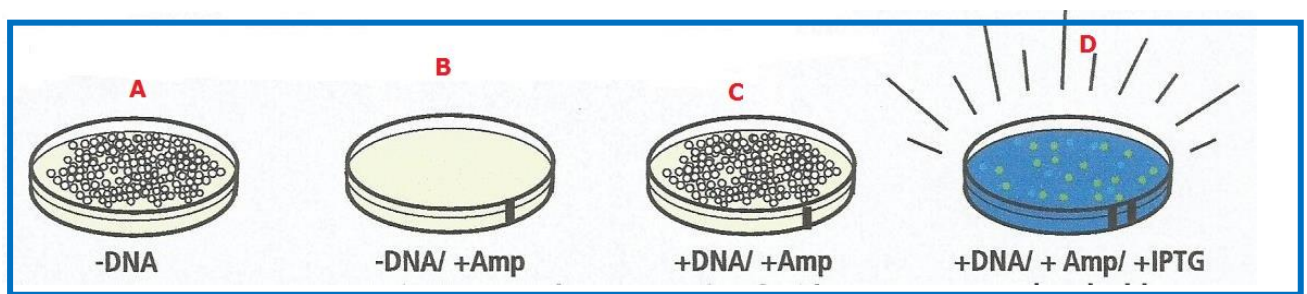
16. **EXTENDER** las células bacterianas por toda la placa utilizando un asa de siembra. **Utilizar un asa estéril para extender ambas -DNA muestras.** **CAMBIAR** por un asa nueva antes de extender las muestras +DNA. Asegurarse bien que todas las células han sido bien extendidas por toda la superficie 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 37°C 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



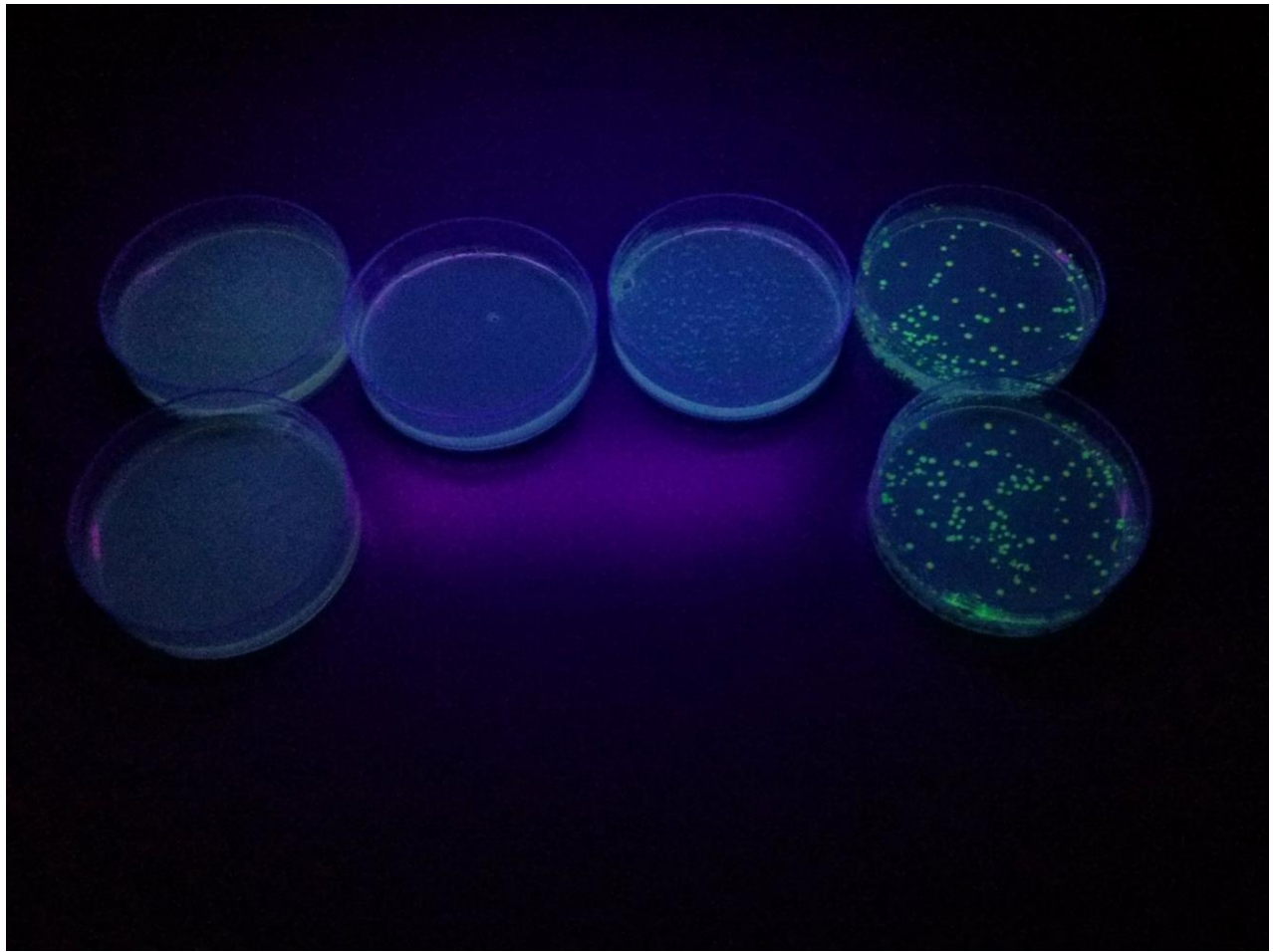
Sembrada con células control (NO DNA)	Sembrada con células control (NO DNA)	Sembrada con células transformadas	Sembrada con células transformadas
pFluoroGreen	FluoroGreen		

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 esperarías 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.

Apéndice A

PROTOCOLO MEJORADO DE TRANSFORMACIÓN CELULAR DE EDVOTEK®

Este procedimiento crea un cultivo líquido de células competentes que pueden producir mejores resultados en la transformación. También ofrece flexibilidad adicional para el profesor y los estudiantes. Requiere de un caldo de recuperación adicional y una solución celular competente especialmente formulada (ambos incluidos en los componentes del kit). También requiere el uso de una centrífuga. En este protocolo, el profesor deberá preparar los cultivos iniciales mientras que los alumnos prepararán las células competentes y realizarán la transformación. Si el tiempo de clase es limitado se pueden preparar las células competentes como parte de las preparaciones previas a la práctica en laboratorio.

PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS INICIALES DE E.coli

Realizado por el profesor. Preparar al menos de 70 a 90 minutos antes de la práctica. Duración 20-30 minutos de preparación y 60 minutos de incubación.

1. **PREPARAR** un baño a 37°C.
2. **AÑADIR** 30 ml de Caldo de Recuperación a un tubo cónico de 50 mL. **ETIQUETAR** el tubo como "Cultivo E. coli".
3. **PASAR** un asa de siembra por una sección densa del cultivo bacteriano. Se ha de recolectar un grupo de bacterias del tamaño aproximado de la cabeza de un fósforo.
4. **SUSPENDER** las bacterias en el tubo cónico "Cultivo E. coli" preparado en el paso 2 girando el asa de un lado a otro hasta que se hayan desprendido todas las bacterias del asa.
5. **AGITAR** brevemente el tubo para asegurarse que las bacterias se resuspendan por completo.
6. **INCUBAR** el "cultivo E. coli" durante 60 min. en un baño de agua a 37 °C.
7. **ETIQUETAR** 20 tubos de microcentrífuga con tapa a presión como "E. coli" y alícuotar 1 ml de células resuspendidas en cada tubo. **COLOCAR** los tubos en hielo hasta que se necesiten para la práctica.

PUNTO DE PARADA OPCIONAL: La E. coli se puede almacenar hasta 24 horas después de la alícuota. Para almacenar las alícuotas de deben centrifugar las células a la velocidad máxima durante 5 minutos y luego verter (eliminar) con cuidado el sobrenadante. Finalmente, almacenar las bacterias a 4°C hasta que se necesiten. Esto completará los pasos 1-3 de la preparación de células competentes (abajo). Si se opta por este punto de parada, se debe comenzar la siguiente sección en el paso 4.

PREPARACIONES ADICIONALES PRELABORATORIO

1. **DISPENSAR** 300 µL de solución de células competentes en diez tubos de microcentrífuga, **ETIQUETAR** y **COLOCAR** en hielo.
2. **COMPLETAR** los pasos 1 a 8 del apartado [5.2 Preparaciones previas el día de la práctica antes de empezar el experimento](#) antes de que los estudiantes comiencen el apartado siguiente "Preparación de células competentes".

NOTA: Varios de estos reactivos se utilizarán durante la preparación de células competentes y durante la transformación, por lo tanto, recordar a los estudiantes que deben etiquetar todos los elementos con la identificación de su grupo.

PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Realizado por los alumnos. Duración 30 minutos. Requiere una centrífuga.

NOTA: Mantener los tubos en hielo tanto tiempo como sea posible durante este apartado.

1. **OBTENER** dos tubos de 1,5 ml de cultivo iniciador de E. coli. **ETIQUETAR** los tubos con la identificación del grupo.

2. **CENTRIFUGAR** los tubos a máxima velocidad durante 5 minutos para sedimentar las células.

3. **VERTER/ELIMINAR** con cuidado el sobrenadante. **¡NO PERDER EL PELLET CELULAR!**

4. **AÑADIR** 200 μL de solución de CaCl_2 helada a cada tubo. **RESUSPENDER** suavemente las células pipeteando lentamente hacia arriba y hacia abajo varias veces. Guardar el CaCl_2 restante en hielo para más tarde.

NOTA: Es importante que las células se resuspendan completamente. Continuar pipeteando suavemente hasta que no se vean grumos en la solución de CaCl_2 .

5. **INCUBAR** los tubos en hielo durante 10 minutos.

6. **CENTRIFUGAR** los tubos a máxima velocidad durante 5 minutos para sedimentar las células.

7. **VERTER/ELIMINAR** cuidadosamente el sobrenadante. **¡NO PERDER EL PELLET CELULAR!**

NOTA: En este punto, las células son frágiles. Mantener las células en hielo y pipetear lenta y suavemente.

8. **AGREGAR** lentamente 100 μL de solución de células competentes (CCS) helada a cada tubo. **RESUSPENDER** suavemente las células en la solución de células competentes enfriada con hielo pipeteando lentamente hacia arriba y hacia abajo varias veces. Inmediatamente **COLOCAR** los tubos en hielo y proceder a la Transformación.

PUNTO DE PARADA OPCIONAL: Las células competentes se pueden almacenar hasta 48 horas en el congelador después de haber sido resuspendidas en solución de células competentes.

TRANSFORMATION

Realizado por los alumnos. Duración 45 min.

1. **RECUPERAR** dos tubos de células competentes y colocarlos inmediatamente en hielo. **ETIQUETAR** un tubo "DNA+" y el otro tubo "DNA-".

2. **AÑADIR** 150 μL de solución de CaCl_2 helada a ambos tubos. **MEZCLAR** pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo varias veces.

3. **CONTINAR** con la práctica en el apartado [5.3 Práctica. Experimento de transformación](#) en el punto 6.

Appendix B

Consejos y trucos para realizar la transformación

¿Quiere una práctica con colonias GFP brillantes y estudiantes emocionados?

Aquí se explica cómo optimizar la práctica para maximizar la eficiencia de la transformación (ET), la participación del estudiante (PE) y la comprensión de los conceptos (CC).

1. Preparar un cultivo celular sano y receptivo (Pasos 1 - 4).

(ET) Asegurarse que el CaCl_2 esté helado durante todo el experimento: (1) incubándolo en el refrigerador o congelador la noche anterior, (2) almacenando los tubos en hielo finamente picado y (3) haciendo que los estudiantes sujeten los tubos solo por la parte superior del borde.

(ET) Sea selectivo al escoger las colonias. Las "mejores" bacterias provienen de colonias de tamaño medio (1 - 1,5 mm) y placas fuente frescas (16 -20 horas).

(ET) El agar puede inhibir la transformación. Asegúrase que los estudiantes sepan cómo recolectar suavemente las colonias de bacterias sin perforar el agar. En caso de duda, practicar la técnica antes (Apéndice D).

(ET) ¡El factor de adherencia de las células! Confirme visualmente que las células lleguen al asa de siembra (paso 2) y luego salgan del asa y entren en la solución (paso 3). Para desprenderse de las células del asa en el paso 3, mover el asa hacia arriba y hacia abajo mientras la gira para aprovechar la tensión superficial del CaCl_2 .

(ET) Permitir que tantas células bacterianas como sea posible entren en contacto con el CaCl_2 enfriado con hielo y con los plásmidos extracelulares deshaciendo por completo los grumos en el paso 4, dedicar todo el tiempo que sea necesario en este punto.

2. Introducir la cantidad justa de ADN extraño (Pasos 5 y 6).

(ET) Añadir muy poco o demasiado plásmido puede reducir la eficiencia de la transformación. Si los estudiantes no están familiarizados con el pipeteo de pequeños volúmenes, practicar la técnica antes.

(PE) Este experimento se puede convertir en una práctica de investigación haciendo que los estudiantes varíen alguna de los parámetros clave como la cantidad de plásmidos, el número de colonias, la edad de las colonias, los tiempos de incubación, etc. para determinar cómo afectan dichos parámetros en la eficiencia de la transformación.

(CC) El tubo sin ADN (DNA-) se utiliza como control conceptual para demostrar que las células no transformadas son sensibles a la ampicilina y como control experimental para confirmar la viabilidad de la célula huésped y las condiciones de incubación adecuadas.

3. Ejecutar un paso de choque térmico perfecto (Paso 7 - 9).

(ET) Maximizar el contraste de temperatura entre el hielo y el baño de agua a 42 °C. Pedir a los estudiantes que coloquen sus tubos en gradillas flotantes individuales al comienzo de la incubación en hielo de 10 minutos y luego llevar estos tubos en hielo al baño de agua. Después de un choque térmico de 45 segundos, pedir a los estudiantes que transfieran inmediatamente los tubos al hielo (es decir, antes de quitar la gradilla flotante o regresar a su mesa de laboratorio). Si las gradillas flotantes individuales no están disponibles, pedir a los estudiantes que coloquen los tubos en una gradilla flotante común durante la incubación en hielo de 10 minutos y que se realicen los pasos de choque térmico como un único grupo, todos juntos.

4. Dar a las células las herramientas que necesitan para recuperarse y crecer (Pasos 10 - 16).

(PE) El caldo de recuperación no contiene ampicilina porque las bacterias transformadas aún no han comenzado a producir la proteína β -lactamasa que les da resistencia a la ampicilina. Esto ocurrirá en el siguiente paso.

(CC) Mientras las células se incuban (paso 11) involucrar a los estudiantes en la planificación experimental pidiéndoles que hagan una "tormenta de ideas" sobre lo que necesitan las placas de control (Deberá borrar la lista en el paso 12).

(ET) Las colonias transformadas no crecen bien en agar fragmentado/dañado. Recordar a los estudiantes que manipulen suavemente el asa de siembra durante el paso 16.

(ET) Las placas de agar recién preparadas pueden tardar más de cinco minutos en absorber la solución celular. Si todavía hay líquido en la superficie de un plato, espere hasta 30 minutos antes de invertir la placa.

Apendice C

Guía de solución de problemas de transformación

GUÍA DE SOLUCIÓN DE PROBLEMAS		
PROBLEMA:	CAUSA:	RESPUESTA:
Crecimiento pobre en la placa fuente	Tiempo de incubación demasiado corto	Continuar incubando la placa fuente a 37°C durante un total de 18 a 22 h.
	Antibiótico añadido a la placa fuente	Asegurarse de añadir antibióticos y aditivos en el paso correcto
	Temperatura de incubación incorrecta	Comprobar la temperatura de la incubadora y ajustarla en caso necesario
Colonias satélite en la placa de transformación	Concentración incorrecta de antibióticos en placas	Asegurarse de añadir la concentración correcta de antibióticos y que el ReadyPour se enfría a 60°C antes de añadirlo
	El antibiótico se degrada	Asegurarse que el ReadyPour se enfría a 60°C antes de añadirlo
	La placas se incubaron demasiado tiempo	Incubar las placas durante la noche a 37°C (18-22 horas)
Colonias manchadas en la placa de transformación	Las placas con las células transformadas se giran demasiado rápido	Permitir que las células se absorban completamente en el medio antes de girar las placas
	Placas demasiado húmedas	Después verter el medio en las placas dejar secar durante la noche a temperatura ambiente. Otra alternativa es secar las placas a 37°C durante 30 minutos antes de sembrar las células
No se ven colonias individuales en la placa fuente	Las células o se han sembrado correctamente en las placas	Transferir con el asa de siembra un pequeño grupo de células al CaCl ₂
No se ven colonias en las placas de transformación	No se ha añadido el ADN plasmídico a la mezcla de transformación	Asegurarse que se ha añadido el ADN plasmídico al tubo de transformación
		Asegurarse que las pipetas se utilizan correctamente y están calibradas
	Se utilizan célula anfitrionas incorrectas en la transformación	Confirmar que se ha utilizado la cepa bacteriana correcta en la transformación
	La células no se sometieron a un choque térmico correcto	Asegurarse que la temperatura fue de 42°C y que el paso de choque térmico duro exactamente 45 segundos
	Antibióticos incorrectos	Asegurarse que se ha utilizado el antibiótico correcto
	Las células no están bien resuspendidas en CaCl ₂	Volver a resuspender completamente las células en CaCl ₂ , sin dejar grumos. La suspensión celular debe quedar turbia

Baja eficiencia de transformación	No se utilizaron suficientes células para la transformación	Recoger más colonias de la placa fuente (5 colonias de 1 a 1,5 mm de ancho por 500 µl de CaCl ₂)
	Las placas fuente se incubaron durante más de 20 horas	Es importante que las células no crezcan durante más de 20 horas en las placas fuente. Guardar en nevera (4°C) las placas después de las 20 horas de crecimiento. No utilizar placas fuentes que se hayan incubado durante más de 24 horas (conservadas en nevera o no)
	Placas experimentales demasiado viejas	Preparar las placas de transformación y utilizarlas poco después de su preparación
	Las células no están bien resuspendidas en CaCl ₂	Volver a resuspender completamente las células en CaCl ₂ , sin dejar grumos de células. La suspensión celular debe estar turbia
	La solución de CaCl ₂ no está lo suficientemente fría	Enfriar previamente el CaCl ₂ antes de agregar las células
	La solución celular no está lo suficientemente fría	Prolongar la incubación de la suspensión de células en hielo de 10 a 15 minutos (no debe exceder los 30 minutos en total). Esto incrementa la eficiencia de la transformación
	Se añadió demasiado o muy poco ADN plasmídico a la suspensión celular	Asegurarse que se ha añadido el volumen correcto de plásmido al tubo de transformación. Si se usan micropipetas, los estudiantes deben practicar su uso previamente
	Las células no se sometieron a un choque térmico adecuado	Asegurarse que la temperatura se de 42°C y que el paso del choque térmico se haya producido durante no más de 45 segundos
	Los antibióticos añadidos se degradaron antes de verter en las placas	Asegurarse que ReadyPour se enfrié a 60°C antes de añadir el antibiótico
	Concentración incorrecta de antibióticos	Asegurarse que se haya utilizado la concentración correcta de antibiótico en las placas

Apendice D

Práctica previa a la transformación: recolección de colonias de bacterias

Para esta actividad se necesita un paquete de Jell-O®, un tubo pequeño de algún tipo de líquido viscoso (glaseado, sirope o similar), agua, un vaso de precipitado y diez placas petri adicionales (o las tapas de cualquier frasco o recipiente de boca ancha). También se necesitan diez palillos de dientes o asas de siembra y diez tubos de ensayo pequeños.

1. Preparar 10 placas petri de práctica Jell-O®.
 - En vaso o recipiente grande, mezclar el polvo Jell-O® y el agua según las instrucciones del paquete.
 - Verte rápidamente la gelatina Jell-O® en las placas de petri, llenándolas hasta la mitad.
 - Dejar que las placas se solidifiquen en el frigorífico durante 30-60 minutos.
 - Añadir 10 puntos usando el líquido viscoso que se elija (simularan las colonias que aparecen en los cultivos reales). Los puntos pueden ser más grandes que las verdaderas colonias bacterianas.
2. Entregar a cada grupo de estudiantes una placa, un palillo o un asa de siembra y un tubo de microcentrífuga que contenga agua.
3. Los estudiantes deberán transferir todas las colonias de "bacterias" al tubo sin romper la gelatina.
4. Los estudiantes también pueden practicar los pasos 15 y 16 del experimento de transformación mezclando el líquido viscoso y el agua, pipeteando la solución nuevamente en sus placas Jell-O® y luego esparciendo suavemente la solución por toda la placa.

