

## TRANSFORMACIÓN MULTICOLOR

### 10 grupos de estudiantes

#### 1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

En esta práctica, los estudiantes explorarán el proceso biológico de la transformación bacteriana utilizando *E. coli* y **ADN plasmídico**.

Al finalizar la práctica, los estudiantes habrán experimentado la observación y el análisis de los rasgos adquiridos (resistencia a la ampicilina y pigmentación) como lo demuestran las células bacterianas transformadas.

#### 2. COMPONENTES para 10 grupos de estudiantes

COMPONENTES	Conservación
A. ADN plasmídico <b>pChromoBlue™</b>	-20°C
B. ADN plasmídico <b>pChromoPink™</b>	-20°C
C. ADN plasmídico <b>pChromoPurple™</b>	-20°C
D. Ampicilina	-20°C
E. IPTG	-20°C
F. CaCl	-20°C
G. Competent Cell Solution	-20°C
<b>BactoBeads™</b> (con desecante incluido)	4°C
Botella Luria Broth Medio para recuperación (o "caldo de recuperación"), estéril	
Botella ReadyPour™ Luria Broth Agar (o "ReadyPour Agar"), estéril	
Placas de Petri, pequeñas	
Placas de Petri, grandes	
Pipetas de plástico para transferencia	
Pipetas de 10 ml, estériles	
Asas de siembra, estériles	
Tubos cónicos	
Tubos de microcentrífuga	

**¡¡NOTA MUY IMPORTANTE!!:** Los experimentos de transformación contienen antibióticos que se utilizan para la selección de bacterias transformadas. Los **estudiantes que tienen alergias a antibióticos** como la penicilina, la ampicilina u otros antibióticos relacionados **no deben participar en esta práctica**.

**NOTA:** Tras la recepción, almacene los componentes de este kit a las temperaturas indicadas en este protocolo.

**NOTA:** Ninguno de los componentes de este kit se ha preparado a partir de material humano.

**NOTA:** Todos los componentes de este kit están destinados a la investigación educativa. No pueden ser utilizados con fines de diagnóstico o médicos, ni pueden ser administrados o consumidos por seres humanos o animales.

### 2.1 Material requerido y no suministrado

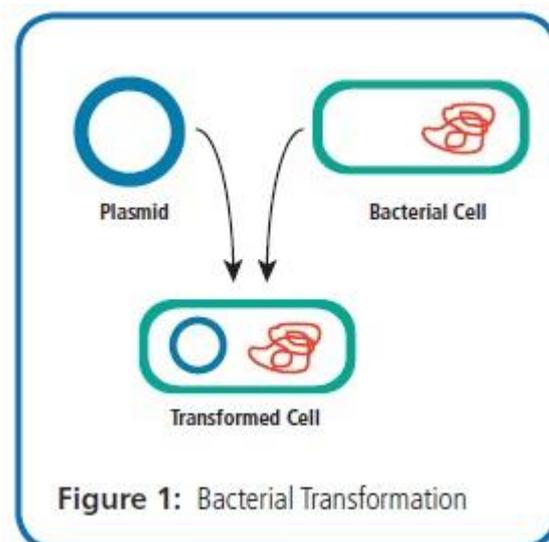
- Micropipetas automáticas (5-50 µl) y puntas.
- **Microcentrifuga. Para la transformación "Enhanced"**
- Dos baños de agua (37°C y 42°C).
- Estufa de incubación (para temperaturas de 37°C).
- Guantes desechables de laboratorio.
- Gafas protectoras.
- Rotuladores/marcadores.
- Bomba o pera de succión para pipetear.
- Recipiente/vaso para hielo y hielo.
- Quemador Bunsen, placa caliente u horno microondas.
- Guantes de protección para calor.
- Termómetro

## 3. INTRODUCCIÓN

### **TRANSFORMACIÓN BACTERIANA**

#### **EL ADN PUEDE SER TRANSFERIDO ENTRE BACTERIAS**

En la naturaleza, el ADN se transfiere entre bacterias utilizando dos métodos principales: **transformación** y **conjugación**. En la **transformación**, una bacteria toma el ADN exógeno del entorno (**Figura 1**). Por el contrario, la **conjugación** depende del contacto directo entre dos células bacterianas. Un pedazo de ADN se copia en una célula (el donante) y luego se transfiere a la otra célula (receptor). En ambos casos, las bacterias han adquirido nueva información genética que es a la vez estable y heredable.



Frederick Griffith descubrió por primera vez la transformación en 1928 cuando observó que los cultivos vivos de una cepa de ***Streptococcus pneumonia***, normalmente no patógena, eran capaces de matar a los ratones, pero sólo después de haber sido mezclados con una cepa patógena muerta por calor. Debido a que la cepa no patógena había sido "transformada" en una cepa patógena, llamó a esta transferencia de virulencia "**transformación**". En 1944, Oswald Avery y sus colegas purificaron el ADN, el ARN y la

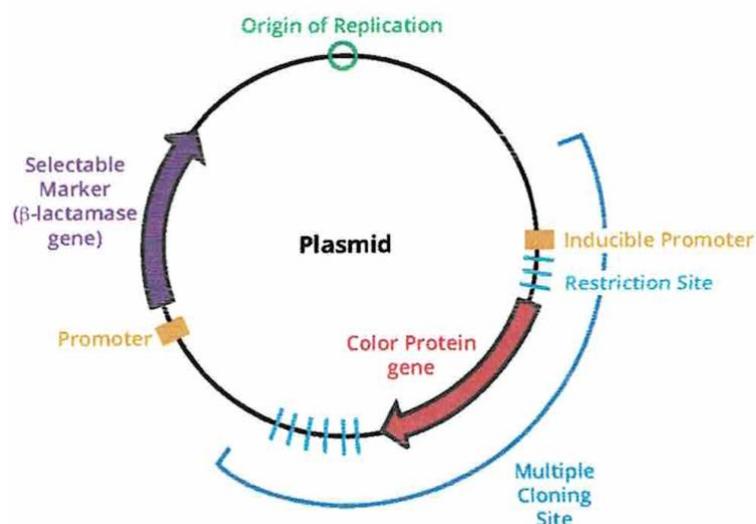
proteína de una cepa virulenta de *S. pneumonia* para determinar cuál era responsable de la transformación. Cada componente se mezcló con una cepa no patógena de bacterias. Sólo las células receptoras expuestas al ADN se volvieron patógenas. Estos experimentos de transformación no sólo revelaron cómo se transfiere esta virulencia, sino que también condujeron al reconocimiento del ADN como material genético.

El modo exacto de transformación puede diferir entre las especies de bacterias. Por ejemplo, *Haemophilus influenzae* usa vesículas unidas a membrana para capturar ADN de doble cadena del medio ambiente. En contraste, *S. pneumoniae* expresa factores de competencia que permiten a las células captar moléculas de ADN de cadena sencilla. En el laboratorio, los científicos pueden inducir a las células -incluso aquellas que no son naturalmente competentes- a tomar ADN y transformarse. Para lograr esto, el ADN se añade a las células en presencia de productos químicos específicos (como el calcio, el rubidio o el cloruro de magnesio), y la suspensión es sometida a un "choque térmico" - se realizan cambios rápidos entre temperaturas muy diferentes. Se cree que una combinación de iones químicos y el cambio rápido de temperatura altera la permeabilidad de la pared celular y la membrana, permitiendo que las moléculas de ADN entren en la célula. Hoy en día, muchos biólogos moleculares usan la transformación de *Escherichia coli* en sus experimentos, aunque normalmente no es capaz de transformarse en la naturaleza.

### INGENIERÍA GENÉTICA UTILIZANDO TECNOLOGÍA DE ADN RECOMBINANTE

Muchas bacterias poseen genes extra, no esenciales, en pequeños trozos circulares de ADN bicatenario además de su ADN cromosómico. Estos fragmentos de ADN, llamados **plásmidos**, permiten a las bacterias intercambiar genes beneficiosos. Por ejemplo, el gen que codifica la  $\beta$ -lactamasa, una enzima que proporciona resistencia a los antibióticos, puede ser transferido entre bacterias en los plásmidos. Las células transformadas segregan  $\beta$ -lactamasa en el medio circundante, donde degrada el antibiótico ampicilina, que inhibe el crecimiento celular al interferir con la síntesis de la pared celular. Por lo tanto, las bacterias que expresan este gen pueden crecer en presencia de ampicilina. Además, pequeñas colonias "satélites" de células no transformadas también pueden crecer alrededor de colonias transformadas porque están indirectamente protegidas por  $\beta$ -lactamasa.

La tecnología del ADN recombinante ha permitido a los científicos vincular genes de diferentes fuentes a plásmidos bacterianos (**Figura 2**). Estos plásmidos especializados, denominados **vectores**, contienen las siguientes características:



**Figure 2:** Plasmid Features

1. **Origen de la replicación:** una secuencia de ADN a partir de la cual las bacterias pueden iniciar la copia del plásmido.
2. **Sitio de clonación múltiple:** una secuencia corta de ADN que contiene muchos sitios únicos de enzimas de restricción y permite a los científicos controlar la introducción de genes específicos en el plásmido.
3. **Promotor:** una secuencia de ADN que se encuentra normalmente justo antes ("arriba" de) la secuencia codificante de un gen. El promotor recluta ARN polimerasa al comienzo de la secuencia génica, donde puede comenzar la transcripción.
4. **Marcador seleccionable:** un gen que codifica la resistencia a un antibiótico específico (generalmente ampicilina, kanamicina o tetraciclina). Cuando se utilizan medios selectivos, sólo las células que contienen el marcador deben crecer en colonias, lo que permite a los investigadores identificar fácilmente las células que se han transformado con éxito.

### EFICIENCIA DE TRANSFORMACIÓN

En la práctica, la transformación es altamente ineficiente, sólo una de cada 10.000 células incorpora con éxito el ADN del plásmido. Sin embargo, debido a que muchas células se usan en un experimento de transformación (aproximadamente  $1 \times 10^9$  células), sólo un pequeño número de células debe ser transformado para lograr un resultado positivo. Si las bacterias se transforman con un plásmido que contiene un marcador seleccionable y se siembran en medio de agar selectivo y no selectivo, observaremos resultados muy diferentes. Las placas de agar no selectivas permitirán que las bacterias transformadas y no transformadas crezcan, formando un "césped" bacteriano. Por el contrario, en la placa de agar selectiva, sólo las células transformadas que expresan el marcador crecerán, dando como resultado la recuperación de colonias aisladas.

Debido a que cada colonia se origina a partir de una sola célula transformada, podemos calcular la eficiencia de transformación, o el número de células transformadas por microgramo ( $\mu\text{g}$ ) de ADN plasmídico (esbozado en la **Figura 3**). Por ejemplo, si se utilizaron 10 nanogramos ( $0,01 \mu\text{g}$ ) de plásmido para transformar un mililitro (ml) de células, y colocando  $0,1 \text{ ml}$  de esta mezcla ( $100 \text{ microlitros}$ , o  $100 \mu\text{l}$ ) da lugar a 100 colonias, entonces debe haber habido 1.000 bacterias en la mezcla de  $1 \text{ ml}$ . La división de 1.000 transformantes por  $\mu\text{g}$  de ADN significa que la eficiencia de transformación sería de  $1 \times 10^5$  células transformadas por  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico. La eficiencia de transformación varía generalmente de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^8$  células transformadas por  $\mu\text{g}$  de plásmido.

$$\frac{\text{Number of transformants}}{\mu\text{g of DNA}} \times \frac{\text{final vol at recovery (ml)}}{\text{vol plated (ml)}} = \text{Number of transformants per } \mu\text{g}$$

*Specific example:*

$$\frac{100 \text{ transformants}}{0.01 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{ ml}}{0.1 \text{ ml}} = \frac{100,000 \text{ (} 1 \times 10^5 \text{) transformants}}{\text{per } \mu\text{g}}$$

**Figure 3:**  
Bacterial Transformation Efficiency Calculation

## USO DE PROTEÍNAS FLUORESCENTES Y CROMOGÉNICAS EN BIOTECNOLOGÍA

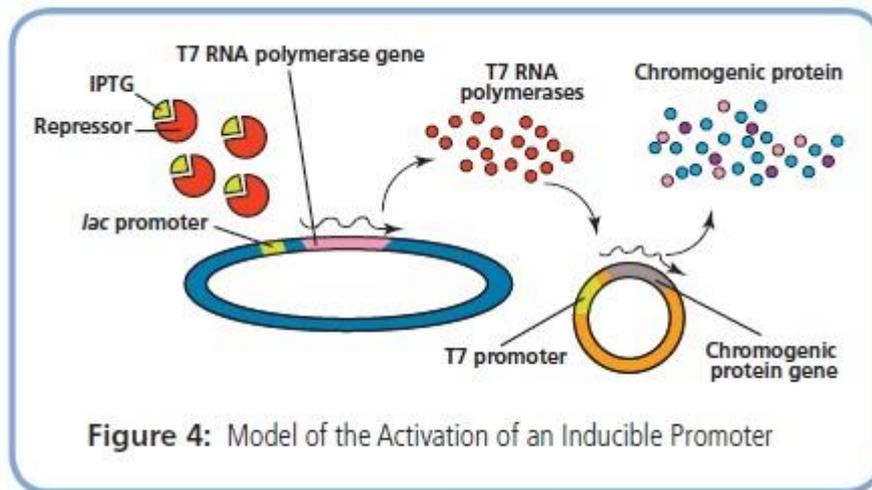
Las proteínas marcadoras fluorescentes se han convertido en una herramienta esencial en la biología celular y molecular. La proteína fluorescente más conocida, **Green Fluorescent Protein** (o GFP), posee la capacidad de absorber luz azul y emitir luz verde en respuesta sin necesidad de ningún sustrato especial adicional, productos génicos o cofactores. Las proteínas fluorescentes se han convertido en una herramienta esencial en la biología celular y molecular. Usando estrategias de clonación de ADN, las proteínas pueden ser "marcadas" con proteínas fluorescentes y luego expresadas en células. Estos marcajes simplifican la purificación porque las proteínas marcadas fluorescentemente pueden ser rastreadas usando luz UV.

La aplicación más útil de GFP es como una herramienta de visualización durante estudios de microscopía fluorescente. Usando técnicas de ingeniería genética, los científicos han introducido la secuencia de ADN para GFP en otros organismos, como ***E. coli*** y el nematodo ***Caenorhabditis elegans***. Marcando las proteínas in vivo, los investigadores pueden determinar dónde se encuentran normalmente esas proteínas en la célula. Del mismo modo, los científicos pueden observar los procesos biológicos como ocurren dentro de las células vivas. Usando una proteína fluorescente como marcador, los científicos pueden observar procesos biológicos como ocurren dentro de las células vivas. Por ejemplo, en el organismo modelo del pez cebra (***Danio rerio***), los científicos usan GFP para etiquetar fluorescentemente las proteínas de los vasos sanguíneos para que puedan rastrear los patrones de crecimiento de los vasos sanguíneos y sus conexiones. La GFP y la microscopía fluorescente han mejorado nuestra comprensión de muchos procesos biológicos permitiendo a los científicos ver los procesos biológicos en tiempo real.

Recientemente, los biólogos sintéticos han diseñado una variedad de proteínas que se utilizarán en lugar de GFP. En primer lugar, los científicos buscaron en una base de datos de secuencias de ADN para identificar genes que se prevé que produjeran proteínas de color. Fragmentos de estos genes se unieron entre sí para crear pequeñas proteínas quiméricas (de aproximadamente 27 kilodaltons de tamaño). Estos nuevos genes se clonaron en un plásmido y se transformaron en ***E. coli***. Cuando se examinaron las células, los biólogos sintéticos habían creado una gran variedad de proteínas fluorescentes que serían útiles para experimentos de biología. Curiosamente, los científicos también habían creado varios genes quiméricos que produjeron células altamente pigmentadas. Estas coloridas proteínas cromogénicas eran visibles a simple vista, lo que significa que ya no eran necesarios una fuente de luz UV o un microscopio fluorescente para la visualización. Las proteínas cromógenas ya se utilizan en la biotecnología como controles para la expresión de proteínas y como marcadores visuales para la purificación de proteínas. A medida que la tecnología se hace más común, pueden convertirse en marcadores importantes para estudios de expresión génica in vivo.

## CONTROL DE LA EXPRESION GENICA

Los científicos pueden regular la expresión de proteínas recombinantes utilizando un interruptor genético "on/off" llamado **promotor inducible (Figura 4)**. Estas secuencias permiten un control preciso porque la expresión del gen sólo se "activará" en presencia de una molécula pequeña como arabinosa, tetraciclina o **IPTG** (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido).



En este experimento, los plásmidos que vamos a utilizar para transformar nuestra *E. coli* han sido diseñados para contener la secuencia de ADN de las proteínas cromógenas azules, rosadas o púrpuras (**pChromoBlue**, **pChromoPink** y **pChromoPurple**). La expresión de estas proteínas cromogénicas está bajo el control de un promotor inducible. Las bacterias huésped han sido modificadas genéticamente para contener el gen de una ARN polimerasa especial (**polimerasa T7**), que está controlada por el promotor **lac**. Bajo circunstancias normales, las bacterias producen una proteína llamada **represor lac**, que se une a este promotor y bloquea la expresión de la **polimerasa T7**. Sin **polimerasa T7**, la proteína cromogénica no puede ser expresada, y las células no fluorescen. Sin embargo, cuando se añade **IPTG**, el **represor lac** es inactivado y se expresa la **polimerasa T7**. Esta polimerasa reconoce específicamente el promotor en el plásmido que contiene proteína cromogénica y transcribe grandes cantidades de mRNA. Finalmente, el ARNm se traduce para producir proteínas azules, rosadas o púrpuras, haciendo que las células sean pigmentadas.

#### 4. DESCRIPCIÓN DE LA PRÁCTICA

En esta práctica, *E. coli* químicamente competente se transformará con una mezcla de plásmidos que contienen genes para ampicilina y una proteína cromogénica (rosa, morado o azul). Los transformantes se seleccionarán para la presencia de plásmido usando placas de LB-ampicilina, y se calculará la eficiencia de transformación. Además, algunas células estarán expuestas al **IPTG**, mientras que otras no estarán expuestas al **IPTG**. Dado que las proteínas cromógenas azules, rosadas y púrpuras sólo se expresarán en presencia de la molécula de **IPTG**, esta práctica demostrará la expresión génica diferencial. Al finalizar la práctica, los estudiantes habrán observado y analizado los **rasgos adquiridos** (resistencia a la ampicilina y pigmentación) que muestran las **células bacterianas transformadas**. Los estudiantes también deben haber mejorado su comprensión de los conceptos abstractos de **transformación** y **expresión génica**.

##### 4.1 Precauciones

1. Se deben usar los guantes y gafas de protección de forma rutinaria mientras trabaje en el laboratorio.
2. Extremar las precauciones al trabajar en el laboratorio, durante la práctica se debe calentar y derretir el agar, que puede ser peligroso si se realiza incorrectamente.
3. NO PIPETEAR LOS REACTIVOS CON LA BOCA - PIPETEAR CON PERAS O BOMBAS DE SUCCIÓN.

4. Lavarse bien siempre las manos con agua y jabón después de manipular reactivos o materiales biológicos del laboratorio.

5. Tener cuidado al usar cualquier equipo eléctrico en el laboratorio.

6. La bacteria ***E. coli*** usada en esta práctica no se considera patógena. Sin embargo, es una *buena práctica de laboratorio* seguir pautas sencillas de seguridad en el manejo y eliminación de materiales contaminados con bacterias.

A. Limpiar el área de trabajo con una solución de lejía al 10% o un desinfectante de laboratorio.

B. Todos los materiales, incluyendo placas petri, pipetas, pipetas de transferencia, bucles y tubos, que entran en contacto con las bacterias deben ser desinfectados antes de ser eliminados en la basura. Desinfectar los materiales tan pronto como sea posible después de su uso de una de las siguientes maneras:

- Autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Tapar varias placas de Petri juntas y cerrar las tapas de los tubos antes de desecharlos. Recoger todos los materiales contaminados en una bolsa desechable autoclavable. Sellar la bolsa y colocarla en una bandeja de metal para evitar cualquier posibilidad de que el medio líquido o el agar se derrame en la cámara del esterilizador.

- Remojar en una solución de lejía al 10%.

Sumergir las placas petri, los tubos abiertos y otros materiales contaminados en un cubo (o recipiente con capacidad suficiente) que contenga una solución de lejía al 10%. Remojar los materiales durante la noche y luego desecharlos. Usar guantes y gafas de seguridad cuando se trabaja con lejía.

7. Si no está seguro de algo, ¡PREGUNTAR AL PROFESOR DE PRÁCTICAS!

**¡¡NOTA MUY IMPORTANTE!!:** Los experimentos de transformación contienen antibióticos que se utilizan para la selección de bacterias transformadas. Los **estudiantes que tienen alergias a antibióticos** como la penicilina, la ampicilina u otros antibióticos relacionados **no deben participar en esta práctica**.

#### 4.2 Requisitos de tiempo (aproximado) de los procedimientos de la práctica

##### **Preparaciones previas:**

<b>Qué hacer</b>	<b>Tiempo requerido</b>	<b>Cuando?</b>
Preparar placas Agar LB.	1 hora	2-7 días antes de usarlas.
Preparar las placas de <b><i>E.Coli</i></b> fuentes.	20 minutos para sembrar las placas. 16-18 horas para incubar las placas	El día antes de realizar la práctica.
Dispensar el ADN plasmídico, CaCl <sub>2</sub> y el caldo de recuperación.	30 minutos	De 1 día a 30 minutos antes de realizar la práctica.

### Día del experimento:

Qué hacer	Tiempo requerido	Cuando?
Equilibrar los baños de agua a 37°C y 42°C, y la estufa de incubación a 37°C.	10 minutos	De 1 a 2 horas antes de realizar la práctica.
Preparar el Cultivo Inicial de E.coli	5 minutos 1h incubación	De 1 a 2 horas antes de realizar la práctica.
Incubar las células a 37°C.	24 horas	Durante toda la noche.

### Resultados y limpieza:

Qué hacer	Tiempo requerido	Cuando?
Observar los resultados de la práctica y calcular la eficiencia de la transformación.	50 minutos	La siguiente clase de prácticas.
Desechar los materiales contaminados.	De 45 minutos a toda la noche	Después de analizar los resultados

### [4.3 Preparaciones previas](#)

#### **Notas a los preparativos del profesor de la práctica**

El tamaño de la clase, la duración de las clases de prácticas y la disponibilidad de los equipos son factores que deben ser considerados en la planificación e implementación de esta práctica con sus alumnos. Estas directrices pueden adaptarse para encajar con sus circunstancias específicas.

#### **Libreta de laboratorio:**

Los científicos documentan todo lo que ocurre durante un experimento, incluyendo condiciones experimentales, pensamientos y observaciones durante la realización del experimento, y, por supuesto, cualquier información recopilada. Hoy, los estudiantes deberán documentar su experimento/práctica en una libreta de laboratorio o en una hoja de trabajo separada.

#### **Registro de las actividades de laboratorio**

Los alumnos deben registrar en su libreta de prácticas las actividades indicadas a continuación.

Antes de iniciar la práctica:

- Leer atentamente la introducción y el protocolo. Utilizar esta información para escribir una hipótesis que refleje la práctica.
- Predecir los resultados experimentales.

Durante la práctica:

- Registrar (dibujar) sus observaciones, o fotografiar los resultados.

Al finalizar la práctica:

- Interpretar los resultados, ¿los datos recopilados apoyan o contradicen la hipótesis inicial?
- En caso de repetir el experimento, ¿qué cambio realizaría?.
- Revisar la hipótesis inicial para que refleje este cambio.

## Instrucciones generales

### **A. PREPARATIVOS ANTES DE LA PRÁCTICA**

#### **PLACAS DE AGAR DE LB**

Una botella de agar de caldo Luria de **ReadyPour™** preparar 5 placas fuente LB grandes, 10 placas (pequeñas) LB, 20 placas (pequeñas) LB/Amp y 10 placas (pequeñas) LB/Amp/IPTG.

Use guantes de protección para el calor y gafas de seguridad durante todos los pasos de calentamiento.

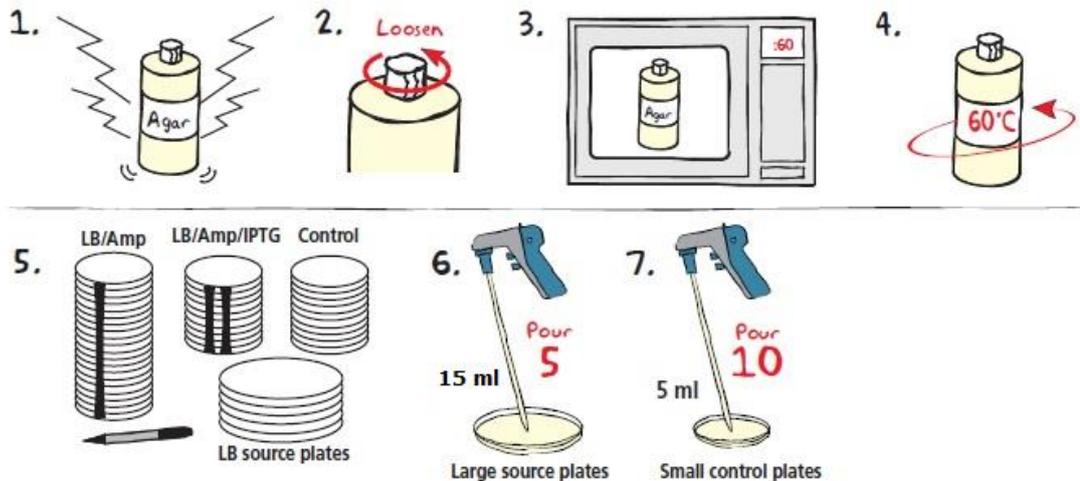
1. **ROMPER** el Agar LB **ReadyPour™** sólido en trozos pequeños apretando vigorosamente y sacudiendo la botella de plástico.
2. **AFLOJAR**, pero **NO RETIRAR**, la tapa de la botella de Agar **ReadyPour™**. Esto permite que pueda salir el vapor durante el calentamiento. **PRECAUCIÓN:** Si no se afloja la tapa antes de calentarla, el frasco puede romperse o explotar.
3. **CALENTAR** el Agar **ReadyPour™** con un microondas durante 60 segundos manteniendo la botella del agar de pie (no tumbar la botella abierta) en el interior del microondas. Retirar con cuidado la botella del microondas y mezclar el agar removiendo la botella. Continuar **CALENTANDO** la solución en intervalos de 30 segundos hasta que el agar esté completamente disuelto (la solución de color ámbar debe ser transparente y libre de partículas pequeñas).

**NOTA para el Paso 3:** Tener mucho cuidado y asegurarse de que el agar no salga de la botella. Debe prestar mucha atención y detener el calentamiento si el agar comienza a burbujear.

4. **ENFRIAR** el Agar **ReadyPour™** a 60°C removiendo la solución con cuidado para facilitar la disipación del calor.
5. Mientras el medio se está enfriando, **MARCAR** las placas de Petri pequeñas (60 x 15 mm) con un marcador permanente.
  - **ABRIR** las 2 primeras mangas (con las placas en su interior) y **APILAR** las 20 placas.
  - A continuación, **MARCAR** con una raya las 20 placas colocando el marcador en la parte inferior de la pila y arrastrandolo verticalmente hasta la placa superior. Estas placas se utilizarán como placas LB/Amp.
  - **ABRIR** la segunda manga y ordenar cuidadosamente 10 placas.
  - **MARCAR** con dos rayas las 10 placas con dos líneas. Estas serán las placas LB/Amp/IPTG. **NO MARCAR** las 10 placas restantes. Estas serán las placas LB de control. (También debe tener 5 placas de Petri grandes para las placas fuente LB).
6. **VERTER 15 ml** del Agar **ReadyPour™** atemperado a 60°C en cada una de las cinco placas de Petri grandes (placas fuente LB) usando una pipeta de 10 ml y una bomba de succión para pipetas (o una pera de succión).

**NOTA:** Para verter el Agar LB en las placas:

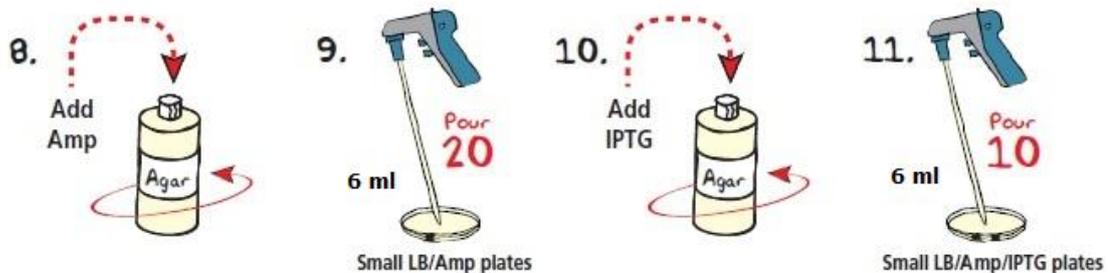
- Utilizar una pipeta estéril de 10 ml con una bomba de succión para pipetas (o una pera de succión) para transferir el volumen designado de medio a cada placa de Petri. Pipetear cuidadosamente para evitar la formación de burbujas.
  - Oscilar la placa de petri hacia adelante y hacia atrás para obtener una cobertura completa de la superficie de la placa.
  - Si el medio fundido contiene burbujas, pueden eliminarse pasando una llama a través de la superficie del medio.
  - Tapar la placa de petri y dejar que el medio se solidifique.
7. Utilizando una pipeta de 10 ml nueva, **VERTER 5 ml** del agar en las 10 placas petri no marcadas.



8. **AÑADIR** toda la cantidad de **ampicilina** a la botella con el agar **ReadyPour™** restante. **TAPAR** y **AGITAR** la botella para mezclar los reactivos. **AÑADIR LOS REACTIVOS SOLAMENTE EN EL AGAR ATEMPERADO**. Reactivos como ampicilina e IPTG se degradan a altas temperaturas.

**NOTA IMPORTANTE:** Añadir los reactivos solamente cuando el agar este atemperado a 60°C.

9. Utilizando una pipeta nueva de 10 ml, **VERTER 6 ml** del medio LB/Amp en las 20 placas de Petri pequeñas con una raya.
10. **AÑADIR** toda la cantidad de líquido **IPTG** a la botella con el agar **ReadyPour™** restante. **TAPAR** y **AGITAR** la botella para mezclar los reactivos.
11. Utilizando una pipeta de 10 ml nueva, **VERTER 6 ml** del medio LB/Amp/IPTG en las 10 placas de petri pequeñas con dos rayas.



12. **TAPAR** las placas y **ESPERAR** al menos veinte minutos para que el agar LB de las placas se solidifiquen. Para obtener resultados óptimos, deje las placas a temperatura ambiente durante la noche.
13. **ALMACENAR** a temperatura ambiente durante no más de dos días. Las placas se deben invertir y colocar en una bolsa de plástico que pueda cerrarse herméticamente para asegurarse de que no se sequen.

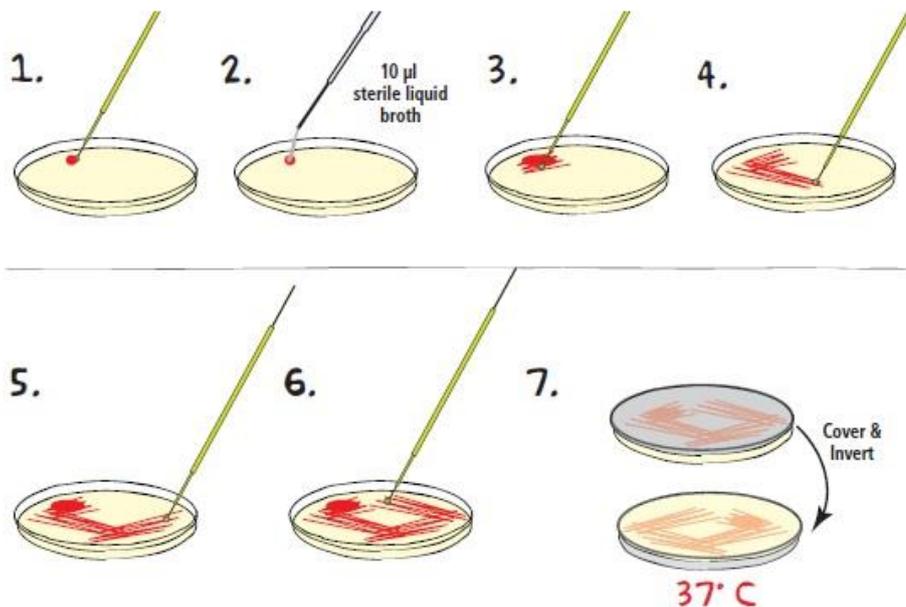
**NOTA:** Si las placas se preparan más de dos días antes del uso, se deben almacenar invertidas en una bolsa de plástico en la nevera (4°C). Sacar las placas de la nevera y calentar en una estufa incubadora a 37°C durante 30 minutos antes de usar.

#### **Preparación de placas de fuente de *E. coli***

Para mejores resultados, las placas fuente de *E. coli* deben estar listadas 16-20 horas antes de que se realice la práctica. La preparación de las placas fuente preparadas con más de 24 horas de antelación a la práctica de laboratorio puede comprometer el éxito del proceso de

transformación. Si no tiene una estufa incubadora, las colonias se formarán a temperatura ambiente en aproximadamente 24 a 48 horas.

1. **RETIRAR** una sola cuenta (o perla) de **BactoBead™** del vial usando un asa de inoculación estéril. Utilizando la técnica aséptica, **TRANSFERIR** la cuenta de **BactoBead™** al borde de una placa grande de Petri (placa fuente LB) y volver a colocar la tapa. **CERRAR** el vial inmediatamente después de usarlo para limitar la exposición a la humedad en el aire.
2. **DISOLVER** al instante la cuenta de **BactoBead™** añadiendo sobre ella 10 µl de caldo líquido estéril o agua estéril.
3. **DIBUJAR** estrías de ida y vuelta con el asa de siembra a través del **BactoBead™** disuelto para hacer un estriado primario en la parte superior de la placa. Tratar de no hundir o apretar en exceso el asa de siembra en el medio.
4. **DIBUJAR** estrías con el asa de siembra a través del estriado primario a una parte limpia del agar varias veces para crear un estriado secundario.
5. **GIRAR** la placa. **DIBUJAR** estrías con el asa de siembra a través del estriado secundario a una parte limpia del agar varias veces.
6. **GIRAR** la placa una vez más. **DIBUJAR** estrías con el asa de siembra a través del estriado terciario a una parte limpia del agar varias veces. Esto debería producir colonias aisladas.
7. **TAPAR** la placa e **INCUBAR** la placa en posición **INVERTIDA** a 37°C durante 16 a 20 horas. Si no tiene una estufa incubadora, las colonias se formarán a temperatura ambiente en aproximadamente 24 a 48 horas.



8. **REPETIR** los pasos anteriores para cada una de las placas fuente LB.

**NOTA:** Si el crecimiento en placas es muy elevado (es decir, crecimiento de colonias en césped), los estudiantes deberán transferir células a la solución de  $\text{CaCl}_2$  con un asa de siembra.

## B. PREPARATIVOS EN EL DÍA DE LA PRÁCTICA

1. Equilibrar los baños de agua a 37°C y 42°C; y la estufa incubadora a 37°C.
2. Dispensar **800 ul** de CaCl<sub>2</sub> en tubos de microcentrífuga para cada uno de los 10 grupos y colocarlos en hielo.
3. Dispensar **600 ul** de **Luria Broth Medium** ("caldo de recuperación") en tubos para cada uno de los 10 grupos y mantenerlos a temperatura ambiente.  
Alternativamente, la botella de caldo de recuperación se puede colocar en una área de pipeteo común en el aula para que los estudiantes lo compartan.

### Preparación del ADN plasmídico de pChromoBlue, pChromoPink y pChromoPurple

Alícuotas del ADN plasmídico se pueden preparar el día antes de la práctica y almacenarse a 4°C.

4. Colocar los tubos del ADN plasmídico de **pChromoBlue**, **pChromoPink**, **pChromoPurple** en hielo para descongelarlos.
5. Marcar 11 tubos de microcentrífuga **como "RTM" para la Mezcla de Transformación Multicolor.**
6. Antes de dispensar, golpear suavemente con los dedos los tubos de **pChromoBlue**, **pChromoPink** y **pChromoPurple** hasta que todas las muestras estén en el fondo cónico de los tubos (opcionalmente se puede dar un golpe de centrifugación a los tubos).
7. Utilizando una micropipeta automático, dispensar 50 µl de **pChromoBlue**, 50 µl de **pChromoPink** y 50 µl de **pChromoPurple** en UNO de los tubos marcados. Mezclar los plásmidos agitando suavemente el tubo.
8. Utilizando una pipeta automática, dispensar 12 µl de la mezcla de transformación multicolor en cada uno de los 10 tubos de microcentrífuga marcados.

**NOTA:** Los estudiantes usarán 10 µl para el experimento de transformación.

9. Cerrar los tubos y colocarlos en hielo.

#### 4.4 Material que debe recibir cada grupo

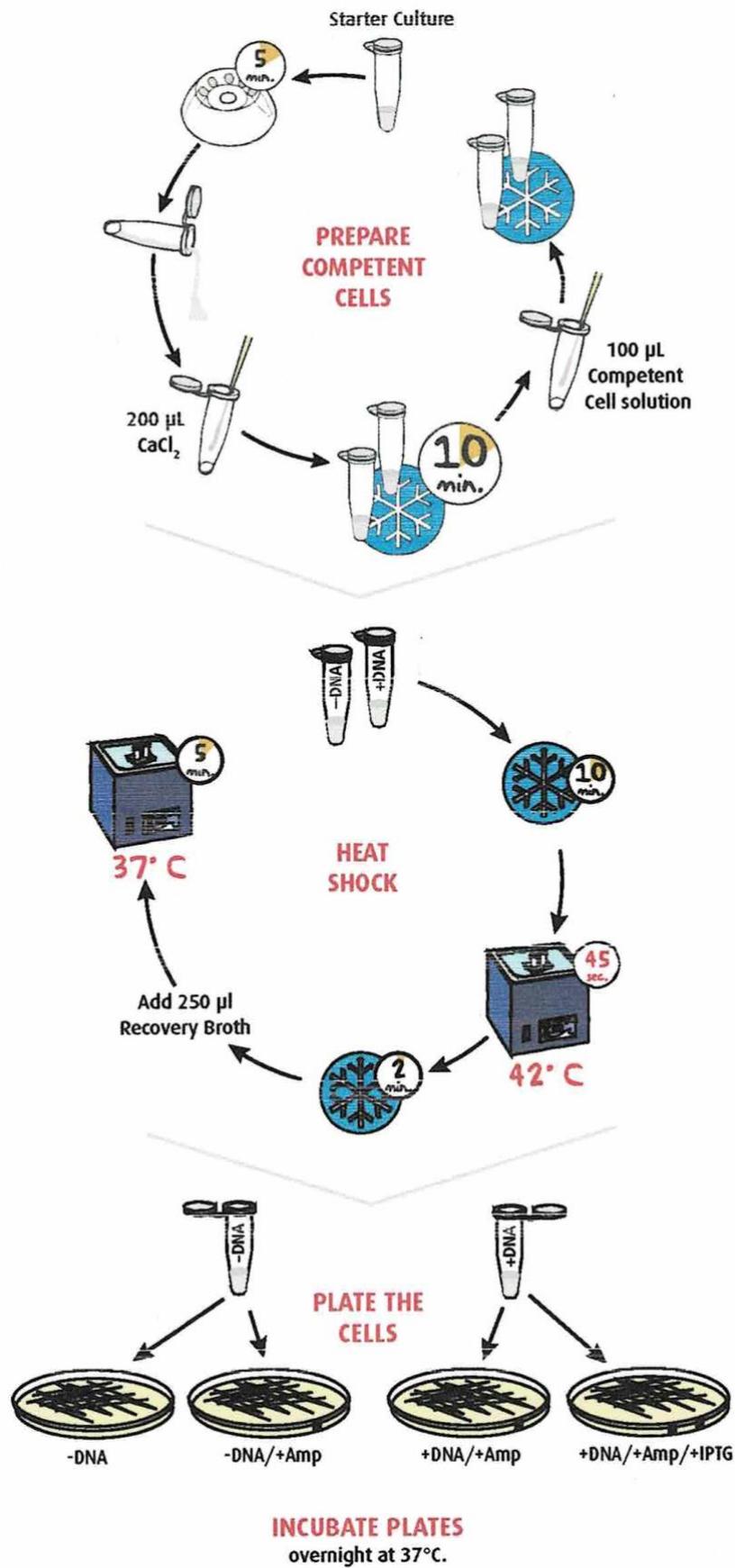
Cada grupo de prácticas debe recibir los siguientes componentes antes de iniciar el procedimiento experimental:

- **Compartir la placas fuente de E. Coli si se utiliza la transformación por placa (apéndice A)**
- 1 tubo CaCl<sub>2</sub> (800 ul)
- 1 tubo de Mezcla de transformación multicolor "RTM" 12 ul
- 1 tubo de "caldo de recuperación" (600 ul)
- 2 placas de una raya LB agar + Amp
- 1 placa de dos rayas LB agra + Amp +IPTG
- 1 placa sin rayas LB agar
- 2 asas de siembra o inoculación estériles

#### **Equipos de Aula:**

- Baño(s) de agua
- Estufa de Incubación

#### 4.5 Esquema resumen de la práctica



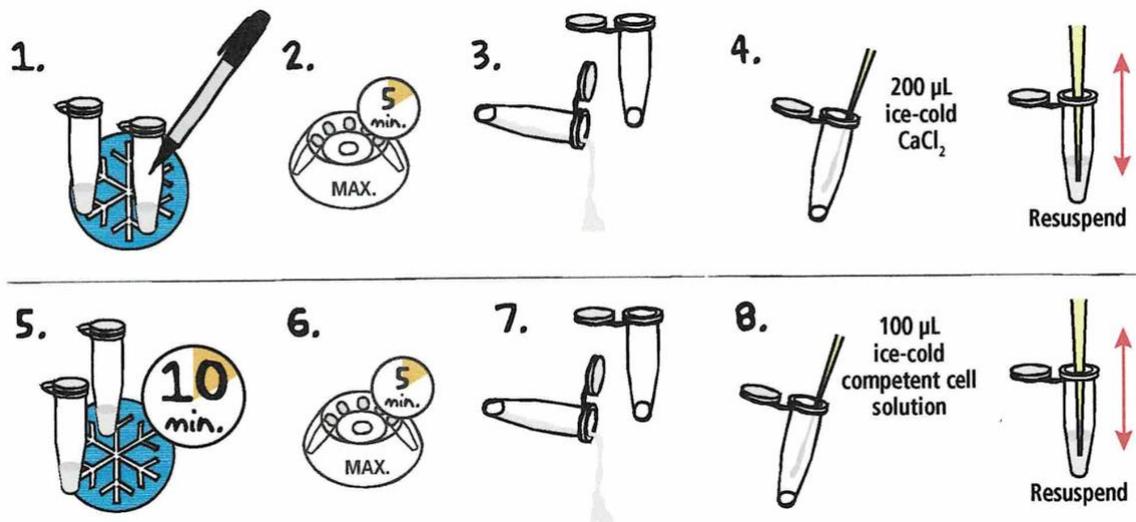
## 5. PRÁCTICA

Se pueden utilizar 2 protocolos:

1. Transformación utilizando placa de cultivo (Clásico). **APÉNDICE A**
2. Transformación utilizando medio de cultivo líquido (Enhanced). **REQUIERE ELUSO DE CULTIVOS LÍQUIDOS Y CENTRIFUGA Y PRODUCE RESULTADOS MEJORES.**

### ENHANCED

#### 5.1 Preparación células competentes para la transformación.



1. **OBTENER** 2 microtubos de cultivo inicial de E.coli a partir de su profesor y **MARCAR** con el número del grupo. **Mantener los microtubos en hielo el mayor tiempo posible durante este modulo**
2. **CENTRIFUGAR** los microtubos a máxima velocidad durante 5 minutos para obtener el pellet celular.
3. Cuidadosamente **ELIMINAR** el sobrenadante. **NO MOVER EL PELLETT CELULAR.**
4. **AÑADIR** 200 ul de CaCl<sub>2</sub> enfriado a cada microtubo. Suavemente, **RESUSPENDER** las células con micropipeta (sube y baja). Guardar el resto de CaCl<sub>2</sub> en hielo para más tarde.

**IMPORTANTE:** las células se deben resuspender completamente, pipetear suavemente hasta que no se observen grumos en la solución de CaCl<sub>2</sub>.

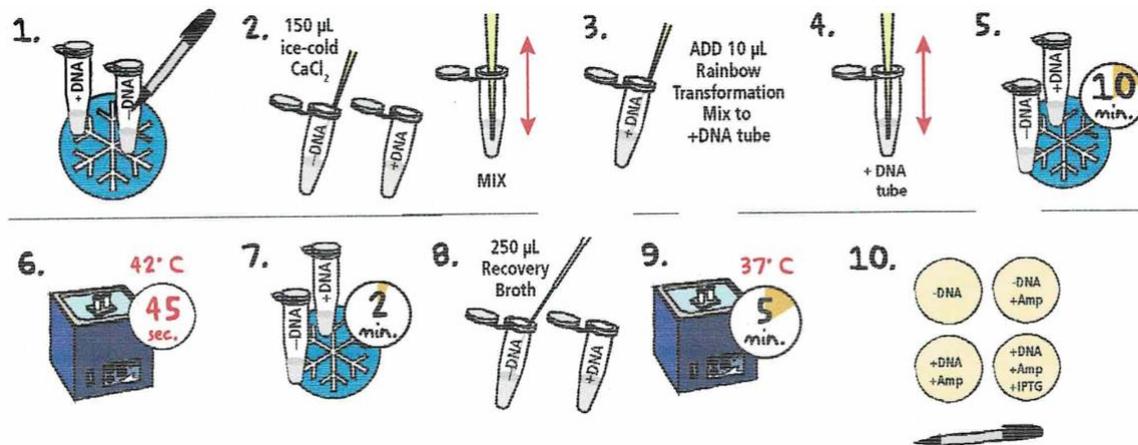
5. **INCUBAR** los microtubos en hielo 10 minutos.
6. **CENTRIFUGAR** los microtubos a máxima velocidad durante 5 minutos para obtener el pellet celular.
7. Cuidadosamente **ELIMINAR** el sobrenadante. **NO MOVER EL PELLETT CELULAR.**

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

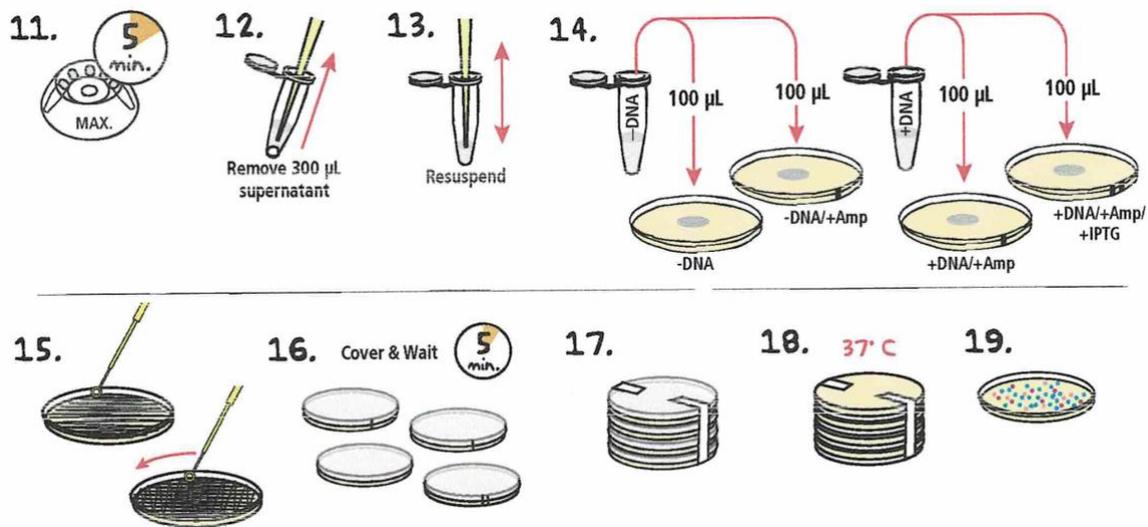
8. Lentamente añadir **100 ul de Competent Cell Solution (G)** a cada microtubo. Suavemente, **RESUSPENDER** las células con micropipeta. Inmediatamente colocar los microtubos en hielo.

**PUNTO OPCIONAL de STOP:** Las células competentes pueden ser conservadas hasta 48 horas en un congelador después de haber sido resuspendidas en la Competent Cell Solution.

## 5.2 Transformación de E. coli con Proteínas Cromógenas Azules, Rosadas y Púrpuras



1. **MARCAR** un microtubo +DNA y otro con -DNA.
2. **AÑADIR** 150 µl CaCl<sub>2</sub> frío en ambos microtubos. **MEZCLAR** con micropipeta (sube y baja) suavemente.
3. **AÑADIR 10 µl** de la mezcla de transformación rainbow "RTM" al tubo marcado "ADN+".  
**NO añadir el plásmido al tubo "ADN-".**
4. **MEZCLAR** con micropipeta (sube y baja) suavemente.
5. **INCUBAR** los tubos en hielo durante 10 minutos.
6. **COLOCAR** los tubos de transformación en un baño de agua a 42°C durante 90 segundos.
7. Volver a colocar inmediatamente los tubos al cubo de hielo e **INCUBAR** durante dos minutos.
8. **TRANSFERIR 250 µl** de Caldo de Recuperación a cada tubo usando una pipeta estéril de 1 ml. Mezclar golpeando suavemente los tubos con los dedos.
9. **INCUBAR** las células durante 5 minutos en un baño de agua a 37°C.
10. Mientras las células se están recuperando, **MARCAR** el fondo de las cuatro placas de agar como se indica a continuación.
  - ADN- (placa sin rayas)
  - ADN-/Amp+ (placa con una raya)
  - ADN+/Amp+ (placa con una raya)
  - ADN+/Amp+/IPTG+ (placa con dos rayas)



11. Después del período de recuperación, **RETIRAR** los tubos del baño de agua. **CENTRIFUGAR** los microtubos a máxima velocidad durante 5 minutos para obtener el pellet celular.
12. **ELIMINAR** 300 ul de sobrenadante. **NO MOVER EL PELLET CELULAR.**
13. **RESUSPENDER** suavemente el pellet en el líquido que queda.
14. Con una nueva punta, **TRANSFERIR** 100 ul de células transformadas en el centro de la apropiada placa de LB agar.
15. **EXTENDER** las células sobre toda la placa utilizando un asa de siembra. Utilice un asa de siembra estéril para extender ambas muestras de ADN-. Utilizar un asa de siembra nueva para extender las muestras de ADN+. Asegurarse que las células se han extendido por toda la superficie de las placas.
16. **CUBRIR** las placas y **ESPERAR** cinco minutos para que la suspensión celular sea absorbida por el agar.
17. **APILAR** las placas una encima de otra y fijarlas juntas. **MARCAR** las placas con las iniciales de los estudiantes o el número de grupo.
18. **COLOCAR** las placas en la posición invertida (con el agar en la parte superior) en una estufa de incubación bacteriana a 37°C para incubarlas durante la noche (24 horas). Si no tiene una incubadora, las colonias se formarán a temperatura ambiente en aproximadamente 24 a 48 horas.

**NOTA para el punto 16:**

Las células pueden tardar más tiempo en absorberse en el medio. No invertir las placas si las células no han sido completamente absorbidas en el medio.

19. **OBSERVAR** las placas de transformación y control y **REGISTRAR** lo siguiente:
  - El número de colonias en la placa.
  - El color de las bacterias. Si los colores son débiles, incubar las placas a 4°C durante 24 horas adicionales.

### 5.3 Resultados de la práctica y análisis

#### **RECOPIACIÓN DE DATOS**

1. Observar los resultados obtenidos en las placas de transformación y control.  
Placas de control: ADN (-)
  - ADN-
  - ADN-/Amp+  
Placas de Transformación: ADN (+)
  - ADN+/Amp+
  - ADN+/Amp+/IPTG2+
2. Dibujar y describir lo que se observa. Para cada una de las placas, registrar lo siguiente:
  - ¿Cuánto crecimiento bacteriano observas? Determine un recuento.
  - ¿De qué color son las bacterias?
  - ¿Por qué diferentes grupos de una clase tienen diferentes eficiencias de transformación?
  - Si no se obtienen resultados, ¿qué factores podrían atribuirse a este hecho?

#### **DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA TRANSFORMACIÓN**

La eficiencia de transformación es una determinación cuantitativa del número de células transformadas por 1 µg de ADN plasmídico. En esencia, es un indicador del éxito del experimento de transformación.

Se calcula la eficiencia de la transformación usando los datos recogidos durante la práctica.

1. Contar el número de colonias en la placa que está marcada como: DNA+/Amp+/IPTG+.

Un método sencillo para realizar un seguimiento de las colonias contadas es marcar cada colonia con marcador de laboratorio en el exterior de la placa.

2. Determine la eficiencia de transformación utilizando la siguiente fórmula:

$$(\text{N}^{\circ} \text{ transformantes} / \mu\text{g de ADN}) \times (\text{vol. final de recuperación (ml)} / \text{vol. sembrado (ml)}) = \\ = \text{N}^{\circ} \text{ transformantes por } \mu\text{g}$$

#### **EJEMPLO para esta práctica (#224)**

Valores de referencia:

- Se utilizan **50 ng (0,05 µg)** de ADN.
- El volumen final de recuperación es de **0,50 ml**.
- El volumen sembrado es de **0,25 ml**.

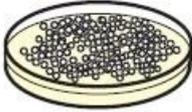
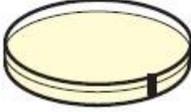
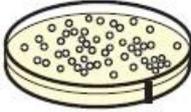
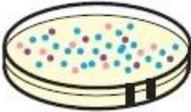
Si, por ejemplo, se han observado **40** colonias, entonces:

$$(\mathbf{40} \text{ transformantes} / \mathbf{0.05} \mu\text{g}) \times (\mathbf{0.5} \text{ ml} / \mathbf{0.25} \text{ ml}) = \mathbf{1600} \text{ transformantes por } \mu\text{g} \\ \mathbf{1600} \text{ transformantes por } \mu\text{g} = \mathbf{1.6 \times 10^3} \text{ transformantes por } \mu\text{g}$$

## 6. RESULTADOS Y PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

### 6.1 Resultados

#### Resultados del experimento y análisis

			
<b>ADN-</b>	<b>ADN-/Amp+</b>	<b>ADN+/Amp+</b>	<b>ADN+/Amp+/IPTG+</b>
Sembrada con células de control (sin ADN)	Sembrada con células control (sin ADN)	Sembrada con células transformadas (Mezcla de transformación multicolor)	Sembrada con células transformadas (Mezcla de transformación multicolor)
<b>Resultado:</b>			
No se visualizan células coloreadas. Colonias blancas. Puede parecer como recubierto de una capa de células.	No hay colonias visibles.	Colonias blancas	Colonias individuales rosadas, azules y púrpuras.
<b>Demuestra:</b>			
Las células bacterianas del huésped son viables en ausencia de ampicilina.	Las células no transformadas son sensibles a la ampicilina.	Las células son resistentes a Ampicilina cuando se transforman con la mezcla de los tres plásmidos ( <b>pChromoBlue</b> , <b>pChromoPink</b> y <b>pChromoPurple</b> ). Las proteínas coloreadas no se producen en ausencia de <b>IPTG</b>	Las células son resistentes a Ampicilina cuando se transforman con la mezcla de los tres plásmidos ( <b>pChromoBlue</b> , <b>pChromoPink</b> y <b>pChromoPurple</b> ). La producción de proteína cromogénica se activa en presencia de <b>IPTG</b> .

## 6.2 Preguntas

Responder a las siguientes preguntas en la libreta de prácticas:

- 1. ¿En qué placa(s) se esperaría encontrar bacterias más parecidas a la *E. coli* de la placa fuente? Razonar la respuesta.**

Las bacterias en la placa marcada con ADN- serían idénticas a la placa fuente de *E. coli* porque no tienen ningún plásmido añadido a ellas, y se siembran en placas con medios no selectivos.

- 2. ¿En qué placa(s) se encontrarán sólo células bacterianas genéticamente transformadas? ¿Por qué?**

Las bacterias que crecen en la placa marcada con ADN+/Amp+ o ADN+/Amp+/IPTG+ tendrían las células transformadas genéticamente ya que sólo aquellas células que han tomado el plásmido que expresa el gen de resistencia a la ampicilina sobrevivirán. Los medios selectivos.

- 3. ¿Cuál es el propósito de las placas de control? Explicar la diferencia entre los controles que se realizan en la práctica y por qué es necesario cada uno de estos controles.**

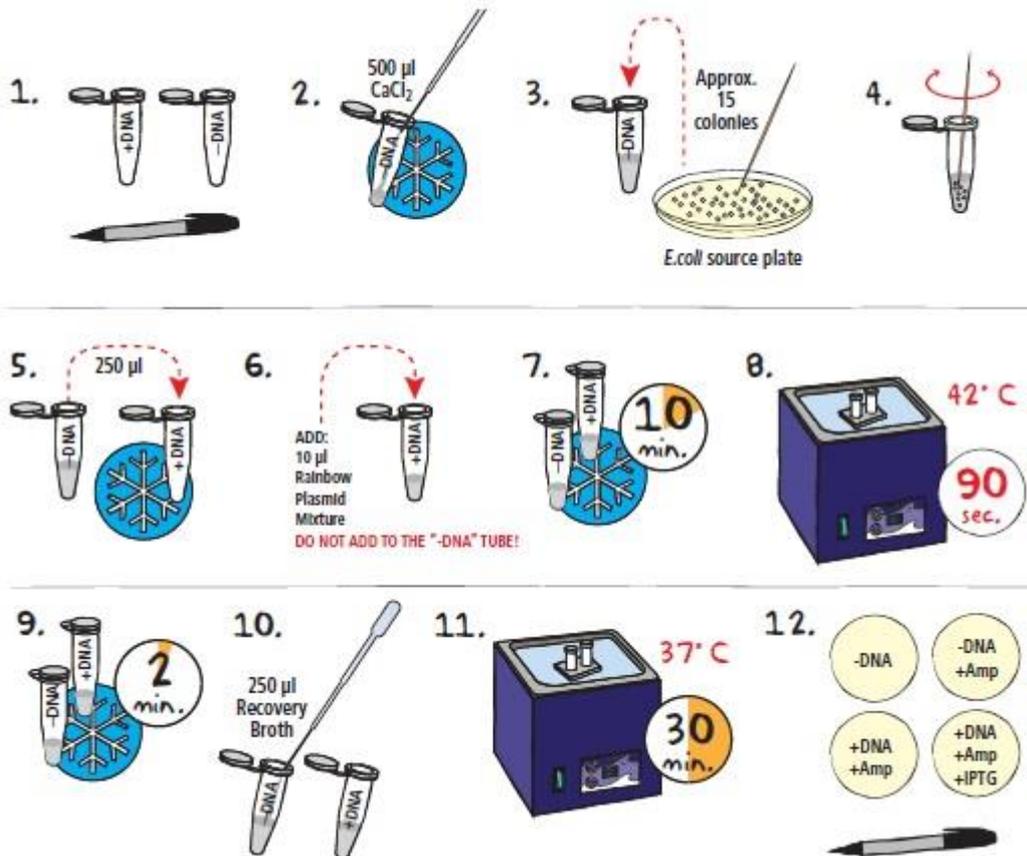
Las placas de control ayudan a interpretar los resultados experimentales. Hay dos placas de control en este experimento. La placa de control que se etiqueta ADN-/Amp+ muestra que las células huésped de *E. coli* sólo crecen en medios selectivos en presencia del plásmido. La placa de control marcada con ADN muestra que las células sin el plásmido son capaces de crecer en agar sin ampicilina.

- 4. ¿Por qué comparar las placas de ADN-/Amp+ y ADN+/Amp+?**

Las células no tratadas con el plásmido no crecerán en la placa ADN-/Amp+ porque no expresan el gen de resistencia a la ampicilina. Sin embargo, las células tratadas con el plásmido crecerán en la placa ADN+/Amp+ porque expresan el gen de resistencia a la ampicilina.

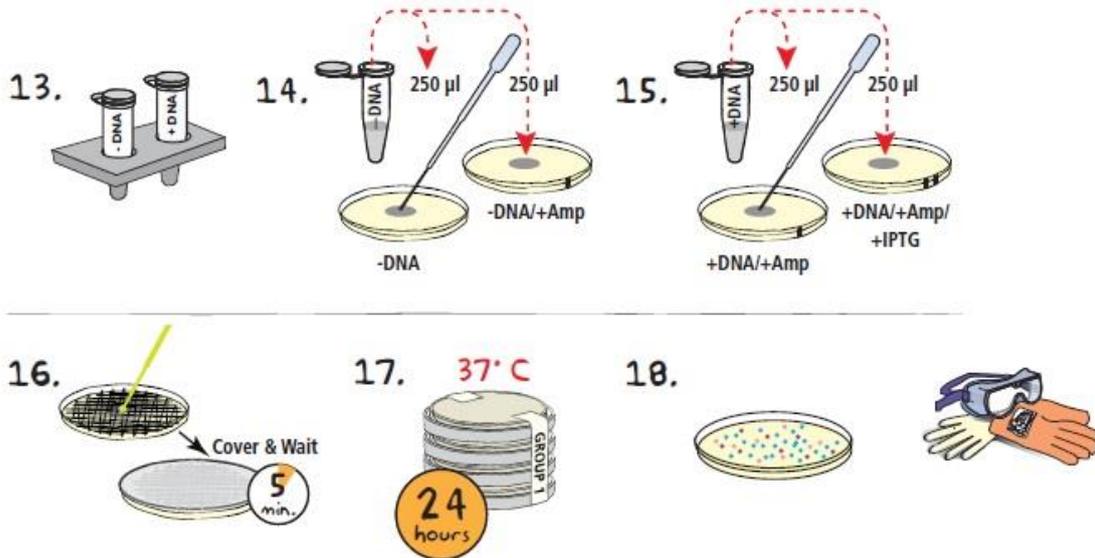


Para obtener los mejores resultados, asegurarse que las células se resuspenden completamente.



1. **MARCAR** un tubo de microcentrífuga como "ADN+" y un segundo tubo de microcentrífuga como "ADN-".
2. **TRANSFERIR 500 µl** de solución de CaCl<sub>2</sub> helada en el tubo "ADN-" usando una pipeta estéril de 1 ml.
3. Utilizando una asa de siembra, **TRANSFERIR** aproximadamente 15 colonias bien aisladas (cada colonia debe tener un tamaño aproximado de 1-1,5 mm) desde la placa fuente de *E. coli* hasta el tubo "ADN-".
4. **GIRAR** el asa de siembra entre los dedos para liberar las células. **RESUSPENDER** las células bacterianas en la solución de CaCl<sub>2</sub> agitando la suspensión con un agitador vortex hasta que no se vean grupos de células y la suspensión de células aparezca turbia.
5. **TRANSFERIR** 250 µl de la suspensión celular al tubo marcado con "ADN+". **COLOCAR** los tubos en hielo.
6. **AÑADIR 10 µl** de la mezcla de transformación rainbow "RTM" al tubo marcado "ADN+".  
**NO añadir el plásmido al tubo "ADN-".**
7. **MEZCLAR** las muestras golpeando suavemente los tubos con los dedos. **INCUBAR** los tubos en hielo durante 10 minutos.
8. **COLOCAR** los tubos de transformación en un baño de agua a 42°C durante 90 segundos.
9. Volver a colocar inmediatamente los tubos al cubo de hielo e **INCUBAR** durante dos minutos.
10. **TRANSFERIR 250 µl** de Caldo de Recuperación a cada tubo usando una pipeta estéril de 1 ml. Mezclar golpeando suavemente los tubos con los dedos.
11. **INCUBAR** las células durante 30 minutos en un baño de agua a 37°C.
12. Mientras las células se están recuperando, **MARCAR** el fondo de las cuatro placas de agar como se indica a continuación.

- ADN- (placa sin rayas)
- ADN-/Amp+ (placa con una raya)
- ADN+/Amp+ (placa con una raya)
- ADN+/Amp+/IPTG+ (placa con dos rayas)



13. Después del período de recuperación, **RETIRAR** los tubos del baño de agua y colocarlos en el banco de laboratorio.
14. Utilizando una pipeta estéril de 1 ml, **TRANSFERIR 250 µL** de células recolectadas del tubo denominado "ADN-" en el centro de las placas marcadas como ADN- y ADN-/Amp+.
15. Utilizando una pipeta estéril nueva de 1 ml, **TRANSFERIR 250 µL** de células recolectadas del tubo marcado "ADN+" en el centro de las placas DNA+/Amp+ y DNA+/Amp+/IPTG+.
16. **EXTENDER** las células sobre toda la placa utilizando un asa de siembra. Utilice un asa de siembra estéril para extender ambas muestras de ADN-. Utilizar un asa de siembra nueva para extender las muestras de ADN+. Asegurarse que las células se han extendido por toda la superficie de las placas. **CUBRIR** las placas y **ESPERAR** cinco minutos para que la suspensión celular sea absorbida por el agar.
17. **APILAR** las placas una encima de otra y fijarlas juntas. **MARCAR** las placas con las iniciales de los estudiantes o el número de grupo. **COLOCAR** las placas en la posición invertida (con el agar en la parte superior) en una estufa de incubación bacteriana a 37°C para incubarlas durante la noche (24 horas). Si no tiene una incubadora, las colonias se formarán a temperatura ambiente en aproximadamente 24 a 48 horas.

**NOTA para el punto 17:**

Las células pueden tardar más tiempo en absorberse en el medio. No invertir las placas si las células no han sido completamente absorbidas en el medio.

18. **OBSERVAR** las placas de transformación y control y **REGISTRAR** lo siguiente:
- El número de colonias en la placa.
  - El color de las bacterias. Si los colores son débiles, incubar las placas a 4°C durante 24 horas adicionales.

## GUÍA DE SOLUCIÓN DE PROBLEMAS EN LA TRANSFORMACIÓN

<b>Crecimiento pobre de células en la placa fuente</b>	
Tiempo de incubación demasiado corto.	Continuar incubando la placa fuente a 37°C durante un total de 16-20 horas.
Antibiótico añadido a la placa fuente.	Al verter las placas, asegúrese de añadir antibióticos y aditivos en el paso correcto.
Temperatura de incubación incorrecta.	Usar un termómetro para verificar la temperatura de la estufa de incubación. Ajustar la temperatura a 37°C si es necesario.
<b>Colonias satélites vistas en la placa de transformación</b>	
Concentración incorrecta de antibióticos en las placas.	Asegurarse que agrega la concentración correcta de antibiótico a las placas.
El antibiótico se puede haber degradado.	Asegurarse que <b>ReadyPour™</b> se enfría a 60°C antes de añadir antibióticos.
Las placas se incubaron demasiado tiempo.	Incubar las placas durante la noche a 37°C (24 horas).
<b>Las colonias aparecen en la placa de transformación como una mancha</b>	
Las placas que contenían transformantes se invirtieron demasiado pronto	Dejar que la suspensión de las células se absorba completamente en el medio antes de invertir las placas.
Placas experimentales demasiado húmedas	Después de verter las placas, dejarlas secar durante la noche a temperatura ambiente. Alternativamente, calentar las placas a 37°C durante 30 min. Antes de depositar las células
<b>No se observan colonias en las placas de transformación</b>	
No se ha añadido el ADN de plásmido a la mezcla de transformación.	Asegurarse que el ADN del plásmido se añadió al tubo de transformación.
	Asegurarse que las pipetas se utilizan correctamente. Si se usan micropipetas, asegurarse que los estudiantes practiquen el uso de las pipetas antes de realizar la práctica.
Las células huésped usadas no son las adecuadas para la transformación.	Confirmar que se utilizó la cepa bacteriana correcta para la transformación.
Las células no fueron sometidas a un choque térmico.	Asegurarse que durante el paso de choque térmico la temperatura es de 42°C y que no duró más de 90 segundos.
Antibióticos incorrectos.	Asegurarse que se utilizó el antibiótico correcto.
Las células no fueron resuspendidas correctamente en CaCl <sub>2</sub> .	Resuspender completamente las células en el CaCl <sub>2</sub> , no dejando grumos de células (agitar con vórtex o mezclar vigorosamente para resuspender completamente las células). La suspensión celular debe estar turbia.

<b>Bajo rendimiento en la transformación</b>	
No hay células suficientes para realizar la transformación.	Transferir más colonias de la placa fuente (15 colonias @ 1-2 mm de ancho por 500 $\mu$ l de $\text{CaCl}_2$ ).
Las placas fuente se incubaron durante más de 20 horas.	Es importante que las células de la placa fuente no crezcan más de 20 horas. Si es necesario, refrigerar las placas después de 20 horas de crecimiento. No usar placas fuente que hayan sido incubadas durante más de 24 horas (refrigeradas o no).
Placas experimentales (con el medio) demasiado viejas.	Preparar la placa de transformación y usarla poco después de la preparación.
Las células no están bien resuspendidas en $\text{CaCl}_2$ .	Resuspender completamente las células en la solución $\text{CaCl}_2$ , no dejando grumos de células (agitar con vórtex o mezclar vigorosamente para resuspender completamente las células). La suspensión celular debe estar turbia.
La solución de $\text{CaCl}_2$ no está lo suficientemente fría.	Pre-enfriar la solución de $\text{CaCl}_2$ antes de añadir las células a la solución.
La suspensión celular no está lo suficientemente fría.	Aumentar el tiempo de incubación de la suspensión de células en hielo 10-15 minutos (no debe exceder de un máximo de 30 minutos). Esto aumentará la eficiencia de la transformación.
Se añadió demasiado o muy poco ADN plasmídico a la suspensión celular.	Asegurarse que el volumen correcto de plásmido se añadió al tubo de transformación. Si se usan micropipetas, asegurarse que los estudiantes practiquen el uso de las pipetas antes de realizar la práctica.
Las células no fueron sometidas a un choque térmico.	Asegurarse durante el choque térmico la temperatura fue de $42^\circ\text{C}$ y que no duró más de 90 segundos.
Los antibióticos se degradaron antes de verter las placas.	Asegurarse que ReadyPour se enfría a $60^\circ\text{C}$ antes de añadir antibióticos.
La concentración de antibióticos en las placas es incorrecta.	Asegurarse que se utilizó la concentración correcta de antibiótico.