

TRANSFORMACIÓN BACTERIANA CON pGAL (colonias azules)

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. La presencia de colonias bacterianas azules demostrará la expresión del gen específico para el fenotipo Lac+.

2.COMPONENTES para 10 grupos de estudiantes

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
BactoBeads E.coli	Congelador
Supercoiled pGAL Plasmid DNA	Congelador
Ampicilina	Congelador
X-Gal en solución	Congelador
CaCl ₂	Congelador
Control Buffer (no ADN)	Congelador

Material suministrado

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

Material requerido y no suministrado

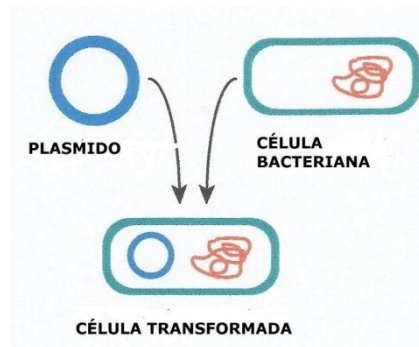
- Micropipetas automáticas y puntas.
- 2 baños de agua (37°C y 42°C)*.
- Termómetro.
- Estufa de incubación (37°C).
- Hielo picado.
- Mechero bunsen, placa calefactora o microondas.
- Guantes termoprotectores.

**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.



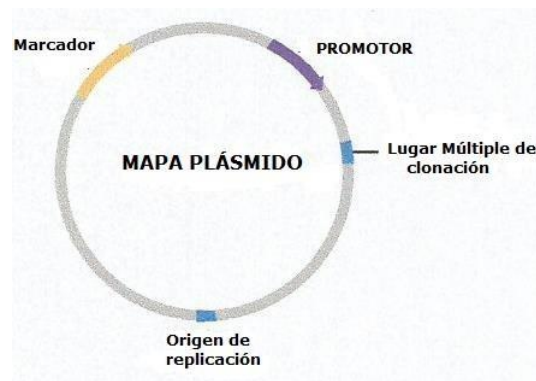
Transformación

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 eficiencias de transformación generalmente oscilan entre 1×10^5 hasta 1×10^8 .

Número de cél.transformadas	X	volumen final (ml)	=	Número células transformadas por μg
μg de ADN		volumen siembra		
100 cél.transformadas	X	1 ml	=	100.000 1×10^5 transformadas por μg
0,01 μg		0.1 ml		

Plásmido pGAL

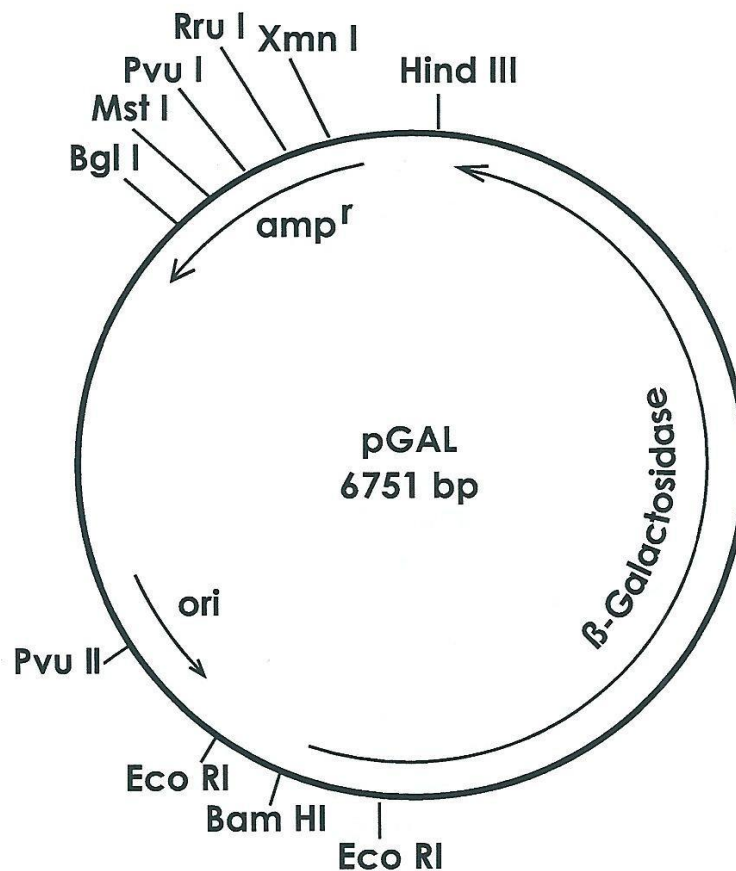
Este plásmido contiene 6751 pares de bases y ha sido hábilmente modificado por ingeniería genética. En la célula, no se integra en el cromosoma bacteriano, pero se replica de forma autónoma. El plásmido contiene el gen que codifica para la β -galactosidasa. En presencia de galactósidos artificiales tales como 5-bromo-4 cloro 3-indolil- β -D-galactósido (X-Gal), las colonias PGAL aparecen de color azul cuando X-Gal se escinde por β -galactosidasa y forma un producto coloreado.

Este experimento se ha diseñado para utilizar EDVOTEK Transformación LyphoCells™. También contiene el plásmido de propiedad, PGAL (Blue Colony), que fue diseñado por EDVOTEK. El plásmido pGAL lleva el gen completo para la β -galactosidasa. Dado que el huésped de E. coli no contiene un gen β -galactosidasa, sólo las células transformadas por el plásmido pGAL producirán la enzima β -galactosidasa funcional. Las células que expresan β -galactosidasa podrán romper el X-Gal y sólo las células transformadas con pGAL serán de color azul.

Además de la expresión y la escisión de X-Gal por β -galactosidasa, la transformación por pGAL también se demuestra por la resistencia a la ampicilina ya que las células huésped de E. coli usadas en este experimento no son naturalmente resistentes a la ampicilina. El plásmido pGAL contiene el gen que codifica para la β -lactamasa que inactiva la ampicilina. Las células de E. coli transformadas por pGAL expresarán el producto del gen de resistencia a β -lactamasa como una enzima extracelular excretada a partir de células de E. coli. Una vez fuera de la célula, la enzima se difunde en el medio circundante y la inactiva ampicilina.

Con el tiempo, pequeñas colonias "satélite" pueden aparecer alrededor de una gran colonia d azul. Las pequeñas colonias "satélite" o colonias "alimentadoras" no son resistentes a la

ampicilina y no se han transformado con el plásmido pGAL. Simplemente están creciendo en una región de agar donde la β -lactamasa se ha difundido y inactivado el antibiótico ampicilina. El número de colonias satélites aumenta si la concentración de ampicilina es baja o las placas se han incubado durante tiempos más largos



4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

En este experimento, células *E.coli* competentes serán transformadas con el plásmido pGAL, este plásmido contiene los genes para la ampicilina y la β -galactosidasa. Las células transformadas serán seleccionadas utilizando placas de LB con ampicilina. La presencia de colonias bacterianas azules demostrará la expresión del gen específico β -galactosidasa para el fenotipo Lac⁺ en las bacterias transformadas.

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 posibles 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.

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, 16-20 horas incubación placas	El día antes de desarrollar el experimento
Dispensar ADN plasmídico, CaCl ₂ , y Recovery Broth	30 minutos	Un día antes o 30 minutos antes de desarrollar el experimento

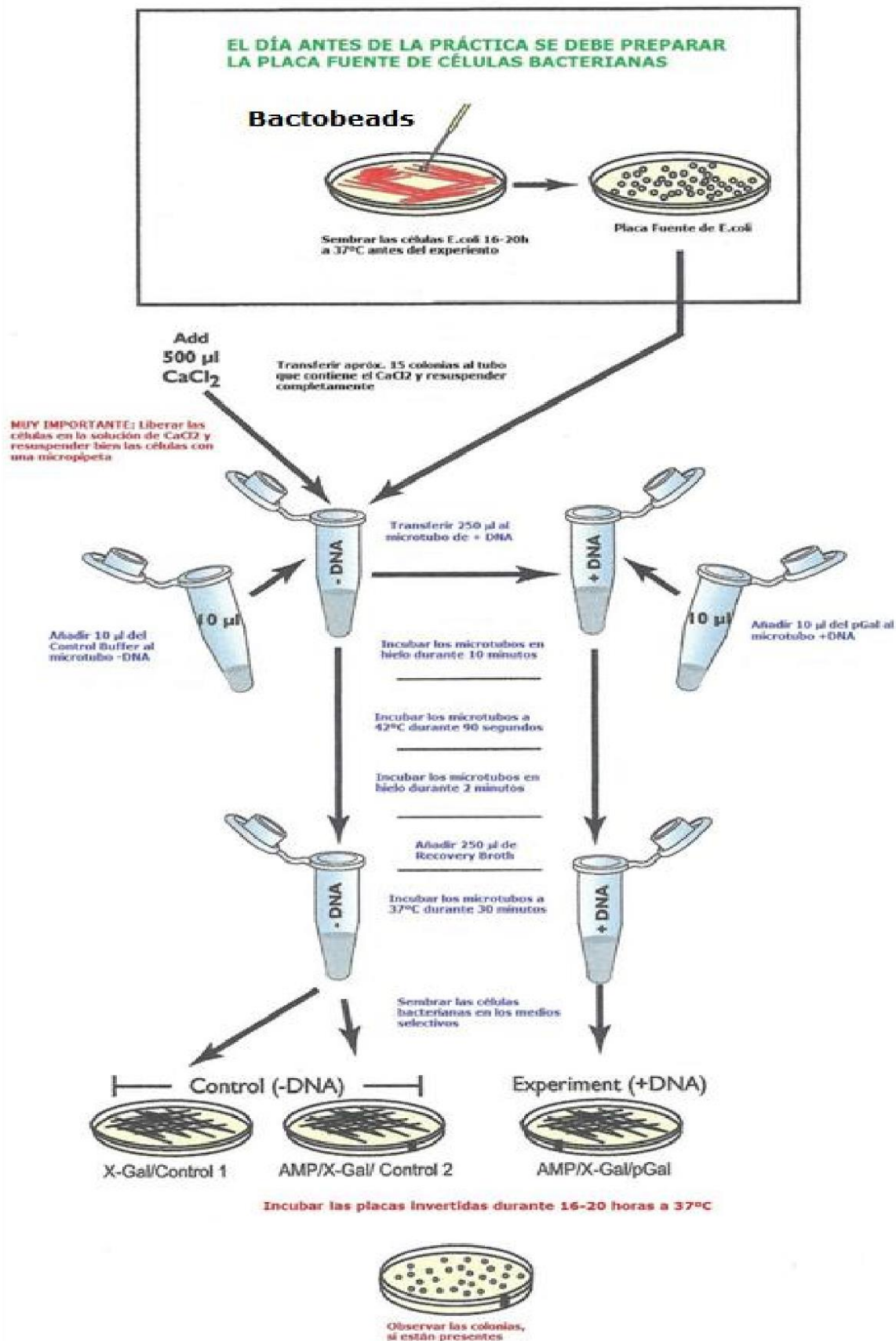
DÍA DEL EXPERIMENTO

Qué Hacer	Tiempo requerido	Cuando
Equilibrar los baños a 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



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.

PREPARACIONES PREVIAS A LA PRÁCTICA

PREPARACIÓN PLACAS DE LB

Un bote de ReadyPour Luria Broth Agar producirá 5 placas Fuente de LB, 10 placas XGal y 20 placas XGal/ Amp



1. **ROMPER** en pequeños pedazos el agar sólido ReadyPour LB Agar mediante vigorosa agitación y exprimiendo el bote de plástico.

2. **AFLOJAR pero NO ELIMINAR** el tapón del ReadyPour LB Agar. Esto permite al vapor escapar durante el calentamiento. **PRECAUCIÓN:** Un fallo en aflojar en el tapón previo al calentamiento puede causar la rotura o explosión del bote.

3. **Calentar** con un microondas el ReadyPour LB Agar hasta fundir el agar. Cuidadosamente sacar el bote del microondas y **AGITAR suavemente**. Continuar calentando a intervalos de 30 segundos hasta que el agar está completamente disuelto (la solución ámbar debería estar transparente y libre de pequeñas partículas).

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

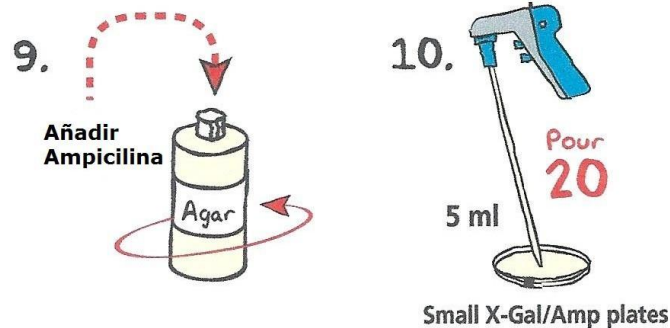
4. **ENFRIAR** el bote ReadyPour LB Agar a 60°C con mucho cuidado. Para evitar que se enfríe en exceso y no de tiempo de preparar todas las placas, se recomienda colocar el envase de ReadyPour LB Agar en un baño a 55-60°C.

5. Mientras el medio se está enfriando, **ETIQUETAR** la placas pequeñas de petri (60 x 15 mm) con rotulador permanente:

- 20 placas pequeñas X-GAL/Amp.
- 10 placas pequeñas X-GAL.
- 5 placas grandes fuente de E.coli.

6. **Añadir 20 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 solución de X-Gal 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 X-Gal/control1.

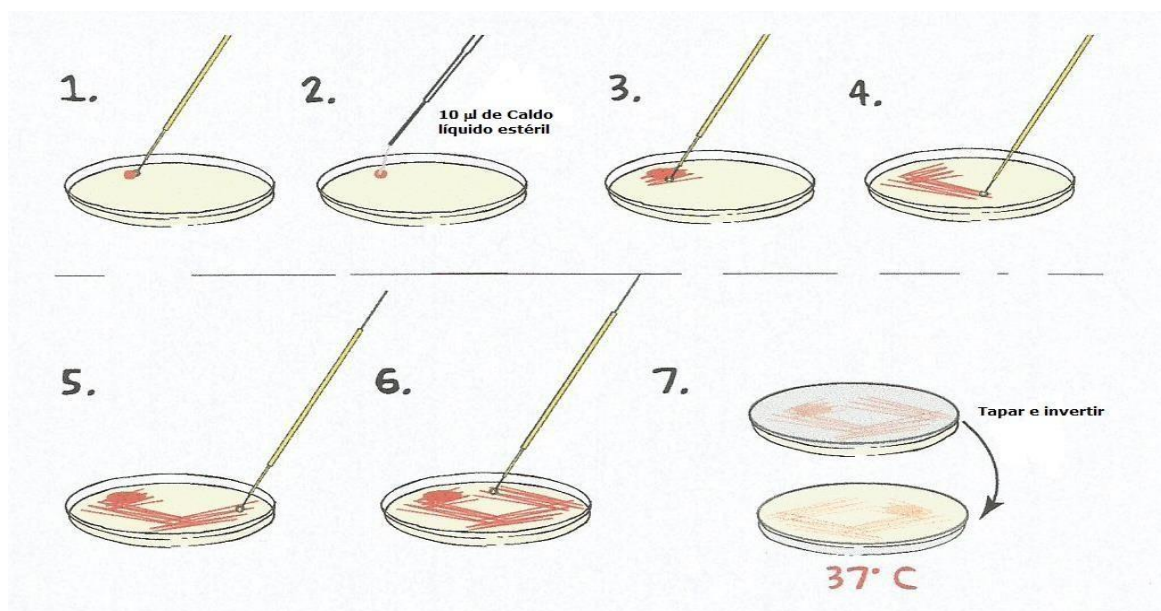


9. **AÑADIR** la cantidad entera de **Ampicilina** al ReadyPour Agar restante. Cerrar el bote y agitar suavemente para mezclar los reactivos. Como la ampicilina es un polvo se puede añadir 1 ml del medio con una micropipeta y resuspender el polvo de ampicilina.
10. Utilizando una nueva pipeta de 10 ml **AÑADIR 5 ml** en las 20 placas pequeñas X-Gal/ Amp.
11. **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.
12. **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.

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

Preparación del ADN plasmídico pGAL

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

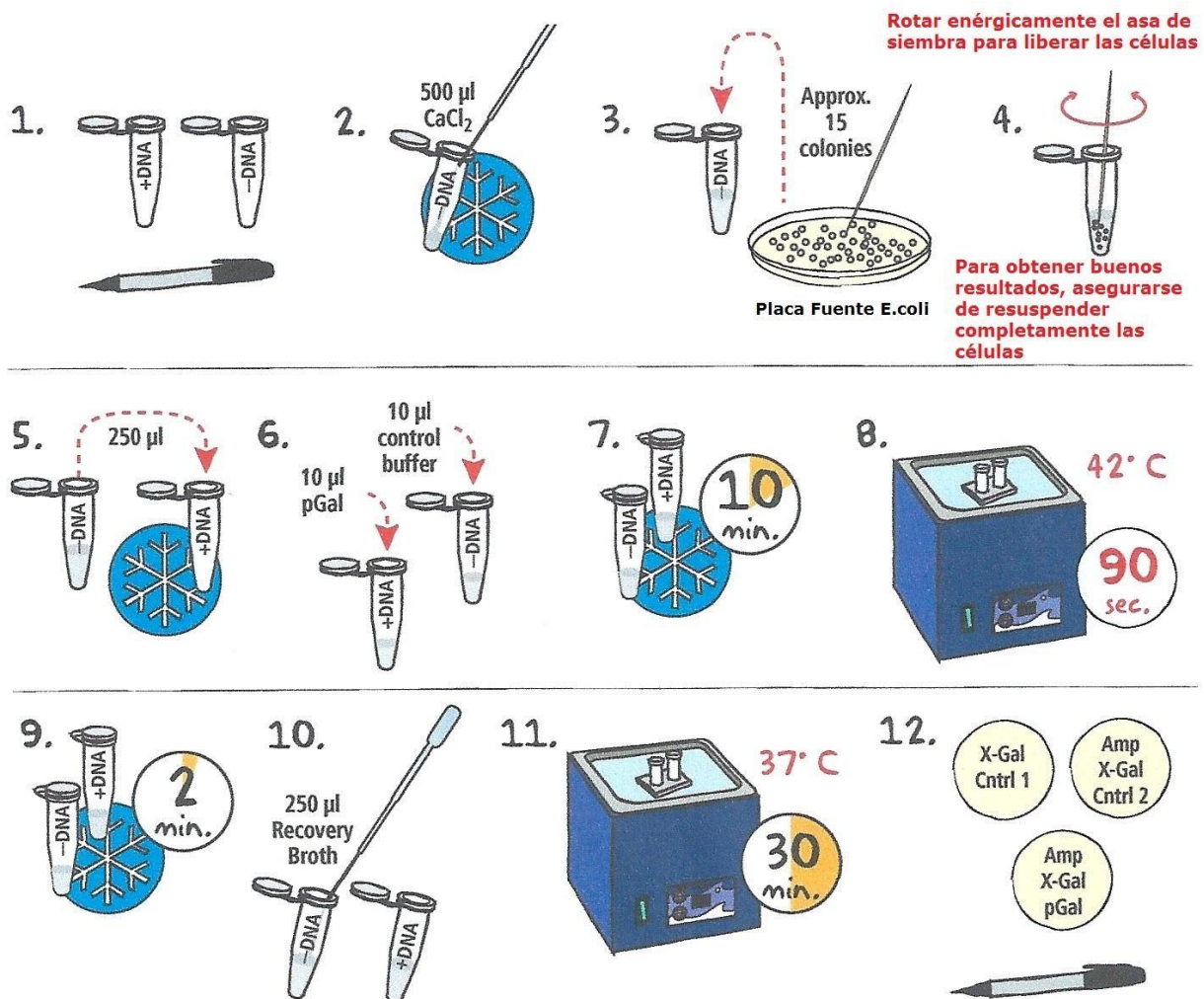
4. Colocar el microtubo del plásmido pGal y Control Buffer en hielo.
5. Marcar o etiquetar 10 microtubos con "pGal" y 10 microtubos con "Control".
6. Antes de dispensar el ADN plasmídico, asegurarse que toda la muestra de los plásmidos se encuentra en el fondo del microtubo. Si se dispone de centrifuga 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 "pGal" y 12 microlitros del Control Buffer en cada microtubo marcado "control".
NOTA: los estudiantes utilizarán 10 microlitros para el experimento de transformación.
8. Cerrar los microtubos y colocarlos en hielo.

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 pGal.
- 1 microtubo del Control Buffer.
- 1 microtubo de 1.0 ml de Caldo de cultivo Luria (Recovery Broth).
- 2 placas pequeñas X-Gal/Amp.
- 1 placa pequeña X-Gal.
- 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 EN HIELO DURANTE TODO EL PROCESO**

2. TRANSFERIR 500 µl del CaCl₂ conservado previamente a 4°C 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 un exceso de células que inhibiría el proceso.**

4. ESTE PASO ES MUY IMPORTANTE HACERLO BIEN PARA TENER ÉXITO: LIBERAR las células del asa rotándola energicamente 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 turbia, si no es así añadir más células con el asa o resuspender bien**

5. **TRANSFERIR 250 μ l 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 pGal (del tubo marcado como pGal) y 10 μ l de Control buffer al microtubo marcado como -DNA.

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

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

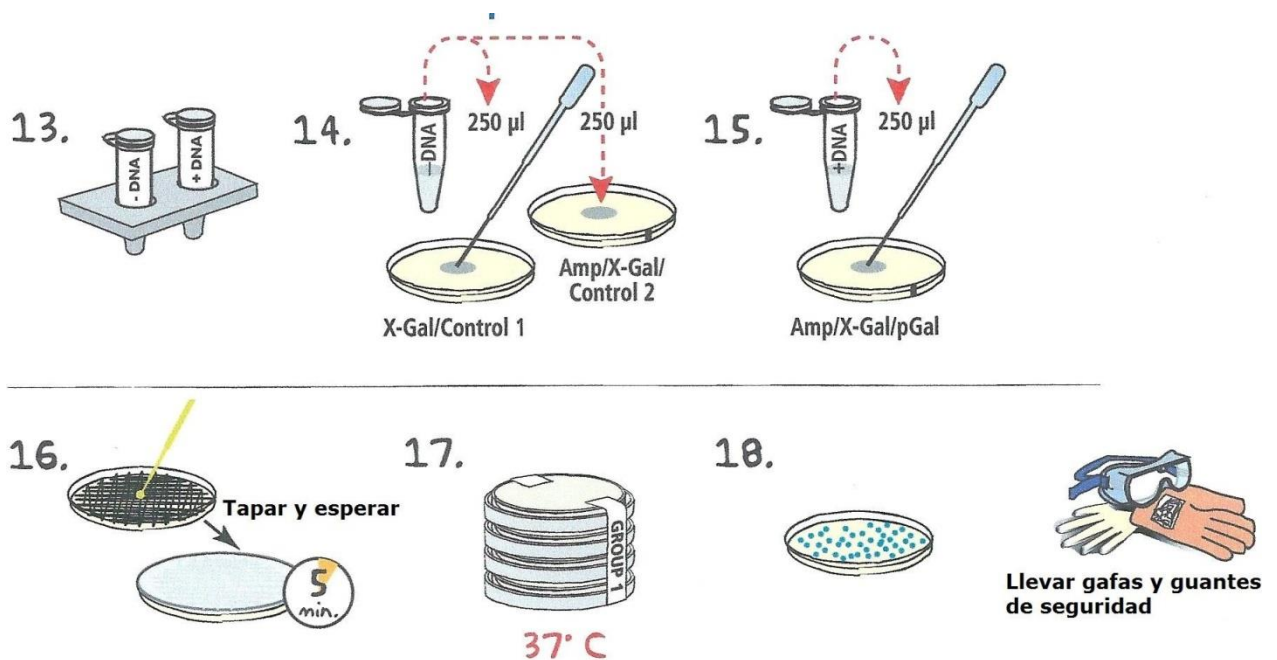
9. **INMEDIATAMENTE** colocar los microtubos en hielo e **INCUBAR** durante 2 minutos.

10. **TRANSFERIR 250 μ l del Recovery Broth** a 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** 3 placas de agar con las siguientes indicaciones:

- -DNA (X-GAL/Control 1).
- -DNA (Amp/X-Gal Control 2).
- +DNA (Amp/X-Gal/pGal).



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 (X-GAL/Control 1) y -DNA (Amp/X-Gal Control 2).

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/X-Gal/pGal).

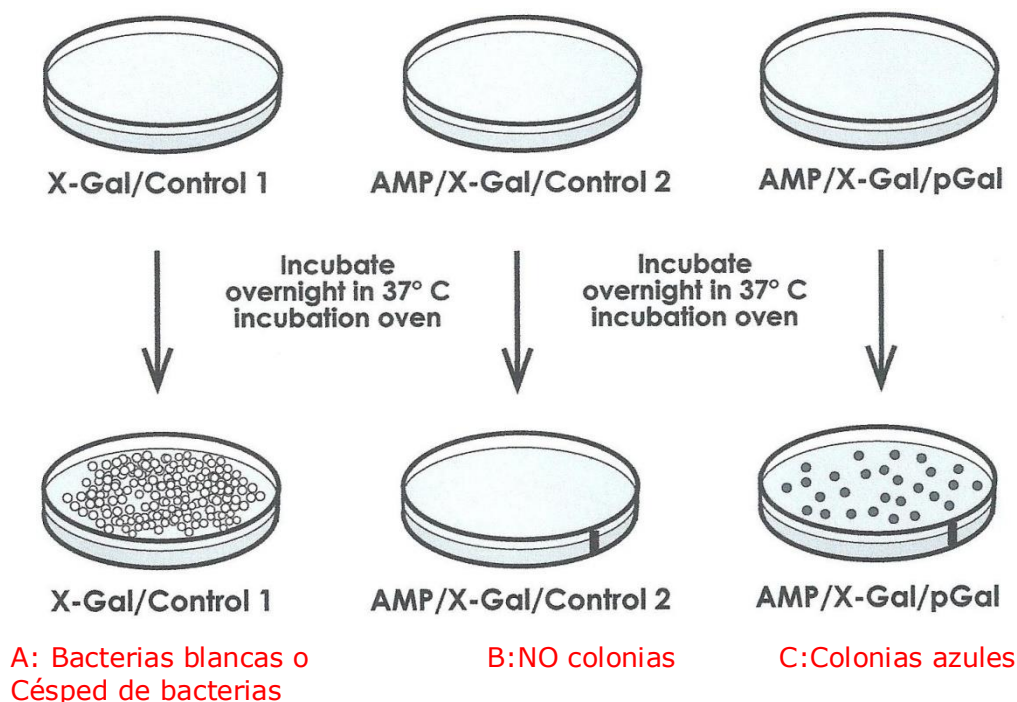
16. **EXTENDER** las células bacterianas por toda la placa utilizando un asa de siembra. **Utilizar un asa estéril para extender ambas -DNA muestras.** **CAMBIAR** por un asa nueva antes de extender las muestras +DNA. Asegurarse bien que todas las células han sido bien extendidas por toda la superficie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

6. RESULTADOS Y PREGUNTAS



A: Placa cubierta con colonias blancas. Puede parecer una capa cubierta o césped de células. Se demuestra que las colonias son blancas ya que no utilizan el X-Gal. Estas colonias no contienen el pGal.

B: No se ha de observar crecimiento. Las células bacterianas son sensibles a la ampicilina. Como no contienen el pGal ellas no son resistentes a la ampicilina.

C: Colonias azules y posible presencia de colonias blancas "satélite". Se demuestra que las células son transformadas con pGal, adquieren resistencia a la ampicilina y que utilizan el X-Gal para dar color azul.

Preguntas previas

1. ¿Hay presencia de colonias "satélite"? ¿Y por qué estas colonias satélites son blancas?

No todas las células son transformadas. Algunas de las células no transformadas pueden crecer alrededor de las colonias que si han sido transformadas. Las células transformadas secretan β -lactamasa las cuales eliminan del medio la ampicilina que les rodea. Por tanto,, algunas de las células no transformadas podrán crecer. Las colonias satélites son blancas ya que no incorporan el plásmido pGal el cual contiene el gen que permite a las células disponer de la β -galactosidasa.

2. ¿Por qué las células competentes que no reciben el pGal (control)no crecen en las placas que contienen ampicilina?

Porque sino incorporan el plásmido pGal , estas células no pueden producir β -lactamasa y no serán resistentes a la ampicilina.

3. ¿Por qué hay tantas células que crecen en la placa X-Gal? ¿Y de qué color son?

Al no haber antibiótico en la placa esto permite que las células crezcan en la placa, además sirve de control de que las células utilizadas se encontraban en buen estado. Si en esta placa no crecen células significaría que las células utilizadas no han sido las adecuadas o que se ya eran viejas.

El color será blanco ya que no tienen el pGal y no pueden producir β -galactosidasa para escindir el X-Gal en un producto azul.

4. ¿Qué evidencia tenemos de qué la transformación ha tenido lugar?

Tendremos éxito en la transformación cuando observemos colonias de color azul en la placa marcada como AMP/X-Gal/pGal. Una transformación que no se produce dará lugar a placas sin crecimiento.

5. ¿Explica algunas razones para que la transformación no tenga lugar?

- 1) No añadir el plásmido pGal a las células huéspedes en el microtubo + DNA.
- 2) No añadir suficientes colonias bacterianas en el microtubo + DNA o resuspender bien estas colonias.
- 3) No cumplir con los tiempos de choque térmicos.
- 4) Al preparar las placas sobrecalentar la Ampicilina o el X-Gal.