

CLONACIÓN DE UN FRAGMENTO DE ADN Y ENSAYO DE β -GALACTOSIDASA

Ref. ED-300

5 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es clonar un fragmento de ADN en el enlazador pUC y seleccionar colonias que tengan inserciones de ADN basadas en la selección de color. El experimento se divide en tres módulos que se centran en (1) Ligación, (2) Transformación y selección, (3) Crecimiento de transformantes y ensayo de β -galactosidasa.

2. COMPONENTES para 5 grupos de estudiantes

¡ATENCIÓN! IMPORTANTE

Revisar cuidadosamente las condiciones de almacenamiento después de recibir el kit.

¡ATENCIÓN! IMPORTANTE

Los experimentos de transformación contienen antibióticos que se utilizan para la selección de bacterias transformadas. **Los estudiantes que tienen alergias a los antibióticos como penicilina, ampicilina, kanamicina o tetraciclina no deben participar en este experimento.**

REACTIVOS PARA LA LIGADURA DEL ADN

COMPONENTES	Conservación
L1 Vector de ADN linealizado con Eco RI y fragmentos de ADN	-20°C
L2 Plásmido helicoidal control	-20°C
L3 ADN Ligasa T4 (gránulos liofilizados)	-20°C
L4 Buffer TE (estéril)	-20°C

REACTIVOS PARA LA TRANSFORMACIÓN

COMPONENTES	Conservación
TR1 Ampicilina	-20°C
TR2 IPTG	-20°C
TR3 X-GAL	-20°C
TR4 CaCl ₂	-20°C
TR5 Agua estéril	-20°C

REACTIVOS Y CÉLULAS PARA LA TRANSFORMACIÓN

COMPONENTES	Conservación
BactoBeads™	4°C (con desecante)
Agar ReadyPour™ (estéril)	Temp. ambiente
Caldo de recuperación (estéril)	Temp. ambiente

REACTIVOS DEL ENSAYO DE β -GALATOSIDASA

COMPONENTES	Conservación
A1 Botella con medio de crecimiento LB	Temp. ambiente
A2 Lisozima	-20°C
A3 Buffer Fosfato de sodio	Temp. ambiente
A4 ONPG	-20°C
A5 Buffer de parada (NaCO_3)	Temp. ambiente

NOTA IMPORTANTE: Tras la recepción, almacenar los componentes perecederos a las temperaturas indicadas.

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 suministrado

Almacenar todos los componentes detallados a continuación a temperatura ambiente:

- Tubos Microtest (0.5ml)
- Tubos de microtest (microcentrífuga) de 1,5 ml.
- Pipetas de 1 ml (estériles).
- Pipetas de 10 ml (estériles).
- Placas de petri (estériles, 60x15 mm).
- Asas de siembra (estériles).
- Palillos de dientes

2.2 Material requerido y no suministrado

- Dos baños de agua (37°C y 42°C).
- Microcentrífuga.
- Centrífuga clínica de sobremesa o centrífuga de piso.
- Estufa de incubación a 37°C.
- Incubadora con agitación o baño de agua con agitación.
- Micropipetas automáticas y puntas de pipeta estériles.
- Peras de succión para pipetas.
- Balanza.
- Microondas o placa calefactora.
- Espectrofotómetro.
- Autoclave (opcional).
- 10 matraces estériles de 125 ml con tapones.
- 80 tubos de ensayo 13x100 mm.

- 80 tubos microtest de 1,5 ml adicionales.
- Agua destilada o desionizada.
- Hielo.

NOTA: Asegúrense que el material de vidrio esté limpio, seco y libre de residuos de jabón. Para mayor comodidad, se pueden comprar pipetas de transferencia desechables adicionales para los pasos de extracción y de lavado con líquidos.

3. INTRODUCCIÓN

La mayoría de las moléculas de ADN recombinante especializadas utilizadas en biotecnología se han construido mediante procedimientos de **subclonación**. Las moléculas recombinantes son **vectores** diseñados para satisfacer necesidades específicas en la investigación de biología molecular. Por ejemplo, algunos vectores tienen un alto número de copias y producirán grandes cantidades de inserciones de ADN subclonadas. Otros se han diseñado para facilitar la transcripción in vitro y la superexpresión de proteínas in vivo.

La subclonación implica la ligadura de una molécula de ADN previamente clonada y purificada en un vector. La molécula recombinante resultante se introduce luego en la célula huésped apropiada donde se expresa el gen clonado.

Este experimento involucra tres módulos experimentales. Estos son:

- 1) La ligadura de un fragmento de ADN en un vector plásmido.
- 2) Introducción del ADN recombinante en células de *E. coli* por transformación.
- 3) Selección de transformantes resistentes a la ampicilina; Selección y crecimiento de colonias Lac⁺ y Lac⁻; Ensayo de estas colonias para determinar la actividad de la β -galactosidasa.

Como actividad opcional, los plásmidos recombinantes pueden extraerse de las células, digerirse con enzimas de restricción y analizarse mediante electroforesis en gel de agarosa (materiales no proporcionados).

3.1 Vector del plásmido

pUC8 es un plásmido de 2700 pares de bases que posee un sitio de reconocimiento único para la **endonucleasa Eco RI**, que se encuentra en un *polilinker* derivado de M13 mp en el fragmento *lacZ*. La región del *polilinker* tiene una longitud de aproximadamente 30 pares de bases y contiene varios sitios únicos de enzimas de restricción para facilitar la ligadura del ADN en el vector.

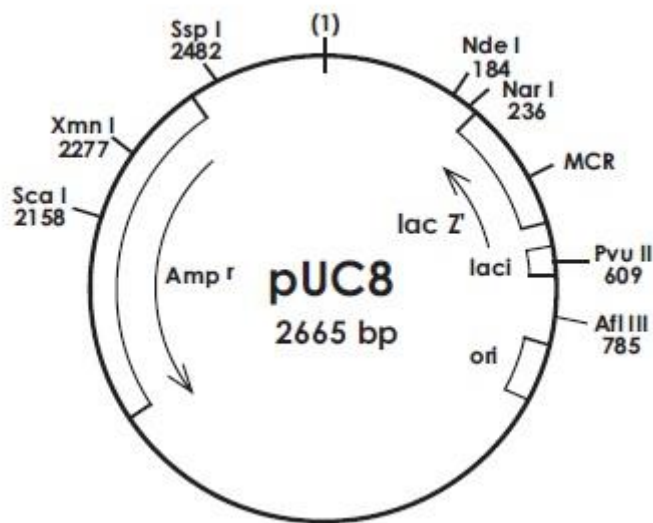


Figura 1

pUC8 está presente en múltiples copias en células hospedadoras de *E. coli*. El plásmido ha sido modificado por ingeniería genética para que contenga parte del *gen lacZ* que codifica la **β -galactosidasa**, una enzima involucrada en el metabolismo de galactósidos.

Un **operón** contiene genes estructurales que transportan información para la síntesis de proteínas, como enzimas, y genes reguladores que controlan la expresión de genes estructurales. El *operón lac* está formado por genes estructurales y reguladores. El *gen lacZ* es un gen estructural requerido para el metabolismo de galactósidos. El plásmido pUC8 transporta el fragmento alfa del *gen lacZ*. El fragmento alfa es el término amino de la proteína y no es funcional por sí mismo. El fragmento alfa se reconoce por *lacZ'*.

Típicamente, la cepa huésped de *E. coli* utilizada para la transformación es una cepa mutante que tiene una delección del fragmento alfa de *lacZ*. El cromosoma de *E. coli* contiene el fragmento omega, que es el extremo carboxi de la proteína. El fragmento omega tampoco es funcional. Cuando se expresan los fragmentos alfa y omega, interactúan, lo que da como resultado una proteína β -galactosidasa funcional. Esta interacción se llama **complementación alfa**. La complementación alfa fue descubierta por Ullman, Jacob y Monod en 1967.

El *operón lac* está altamente regulado por **represores** e **inductores**. Los represores son producidos de forma constitutiva en niveles bajos por una célula bacteriana y mantienen el operón "apagado". Cuando los inductores están presentes, como el isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), la proteína represora se une al inductor en lugar del sitio regulador en la molécula de ADN. Entonces puede ocurrir la transcripción de los genes estructurales, seguida de la traducción en una molécula de proteína funcional. Los sustratos para la enzima β -galactosidasa son galactósidos, como la lactosa. La lactosa se hidroliza en galactosa y glucosa. Los galactósidos artificiales, como el 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido (**X-Gal**), también son sustratos para la β -galactosidasa. Cuando se hidroliza, X-Gal liberará un **precipitado azul**, por lo tanto, las colonias de *E. coli* transformadas con pUC8 serán azules. Del mismo modo, el ortonitrofenalgalactopiranosido (**ONPG**) puede usarse como un indicador colorimétrico para la actividad de la β -galactosidasa. Cuando se hidroliza, forma un **producto amarillo** soluble que se puede cuantificar con un espectrofotómetro.

El plásmido pUC8 tiene una **Región de clonación múltiple** (MCR) que se inserta en el *gen lacZ'* de una manera que no interfiere con la función *lacZ*. La región MCR o *polylinker* tiene aproximadamente 30 bases de largo y tiene varios sitios únicos de enzimas de restricción, lo que la hace versátil para la clonación molecular. El ADN extraño se puede insertar en el MCR, que interrumpe el *gen lacZ'* y evita la formación de una proteína funcional-galactosidasa. Tales recombinantes aparecerán como **colonias blancas** en las placas de selección.

El plásmido también contiene un gen de resistencia a la ampicilina que codifica la β -lactamasa. Para este experimento, el plásmido se ha linealizado con endonucleasa *Eco RI* para producir extremos compatibles para el experimento de subclonación.

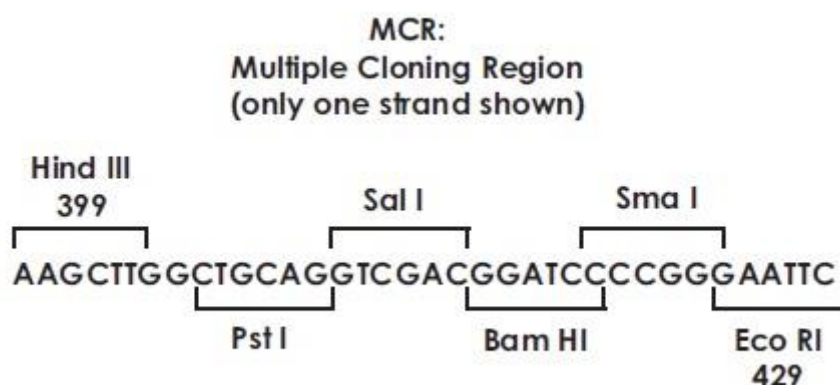


Figura 2

3.2 Ligadura

La ligadura de los fragmentos al vector linealizado se realizará mediante la adición de la **ADN ligasa** de T4 a una mezcla de reacción del vector escindido y los fragmentos de ADN (consultar el diagrama de flujo de la Figura 3). La enzima cataliza la formación de enlaces fosfodiéster por la condensación de un fosfato en 5' y grupos hidroxilo en 3' de nucleótidos adyacentes que ocurren en las marcas (*nicks*) o entre los extremos cohesivo o romo del ADN. La ADN ligasa se purifica a partir de *E. coli* infectada con fagos T4. Requiere magnesio y ATP. Cada formación de enlace fosfodiéster da como resultado la hidrólisis de ATP a AMP más pirofosfato. La eficiencia catalítica de la enzima es óptima a 37°C. Sin embargo, la ligadura de fragmentos de ADN que tienen extremos cohesivos se realiza generalmente a temperaturas de 4°C a 22°C. Las temperaturas más bajas permiten el emparejamiento y la unión entre los extremos complementarios del ADN, que es un requisito previo para la ligadura de extremos cohesivos.

En el caso más simple, la ligadura de un vector y el ADN insertado dan como resultado un plásmido recombinante circular. La ligadura de los fragmentos de ADN se produciría entre el grupo hidroxilo 3' de guanina y el fosfato 5' de adenina en los extremos *Eco RI*. Sin embargo, la estequiometría real del vector y el inserto unidos en la reacción de ligadura es una función compleja basada en las longitudes y concentraciones relativas de las dos especies de ADN. La concentración de enzima y la fuerza iónica también puede afectar a la reacción. Debido a la complementariedad de los extremos *Eco RI*, el vector puede experimentar un re-cierre sin un inserto. En concentraciones más altas puede formar **concatámeros**, es decir, matrices lineales más grandes que consisten en unidades repetidas de vectores de longitud completa. La circularización y la formación de concatámeros también pueden ocurrir con el fragmento insertado.

También se pueden prever combinaciones alternativas y orientaciones entre el vector y el inserto. Estas múltiples formas de ADN aparecen como patrones de bandas complejos observados durante la electroforesis de los productos de reacción de ligación.

La transformación de células competentes de *E. coli* es muy ineficiente con moléculas de ADN lineales. Por lo tanto, la producción de moléculas circulares debe ser optimizada. Además, las moléculas recombinantes grandes que contienen múltiples matrices de vector e inserto no se replicarán de manera eficiente y pueden complicar el análisis. Los vectores plasmídicos linealizados a veces se tratan con fosfatasa alcalina. Esta fosfomonoesterasa elimina los fosfatos 5' en los extremos del ADN, produciendo un grupo hidroxilo 5' más fosfato inorgánico. Dado que la ligasa requiere un fosfato 5' para la formación de enlaces fosfodiéster, se eliminan el re-cierre y los concatámeros del vector. En este caso, la ligadura del inserto en el vector de ADN producirá muescas en las uniones recocidas, ya que solo se pueden formar dos en lugar de cuatro enlaces fosfodiéster. Las muescas son reparadas en el huésped transformado. Los concatámeros del inserto se pueden reducir al disminuir la concentración del ADN del inserto. Se pueden obtener mayores rendimientos de moléculas recombinantes circulares ajustando la concentración total de ADN y la relación molar del vector al inserto.

Cuando el vector y el inserto contienen los mismos extremos cohesivos, la orientación del inserto subclonado puede variar entre las colonias bacterianas individuales que provienen del mismo experimento de transformación. Esto se debe a la naturaleza simétrica de los extremos y, estadísticamente, uno esperaría encontrar una proporción del 50:50 de las dos orientaciones de inserción si se analizan muchas colonias. Un único inserto en el plásmido recombinante puede estar en una de dos direcciones con respecto a un punto fijo en el vector.

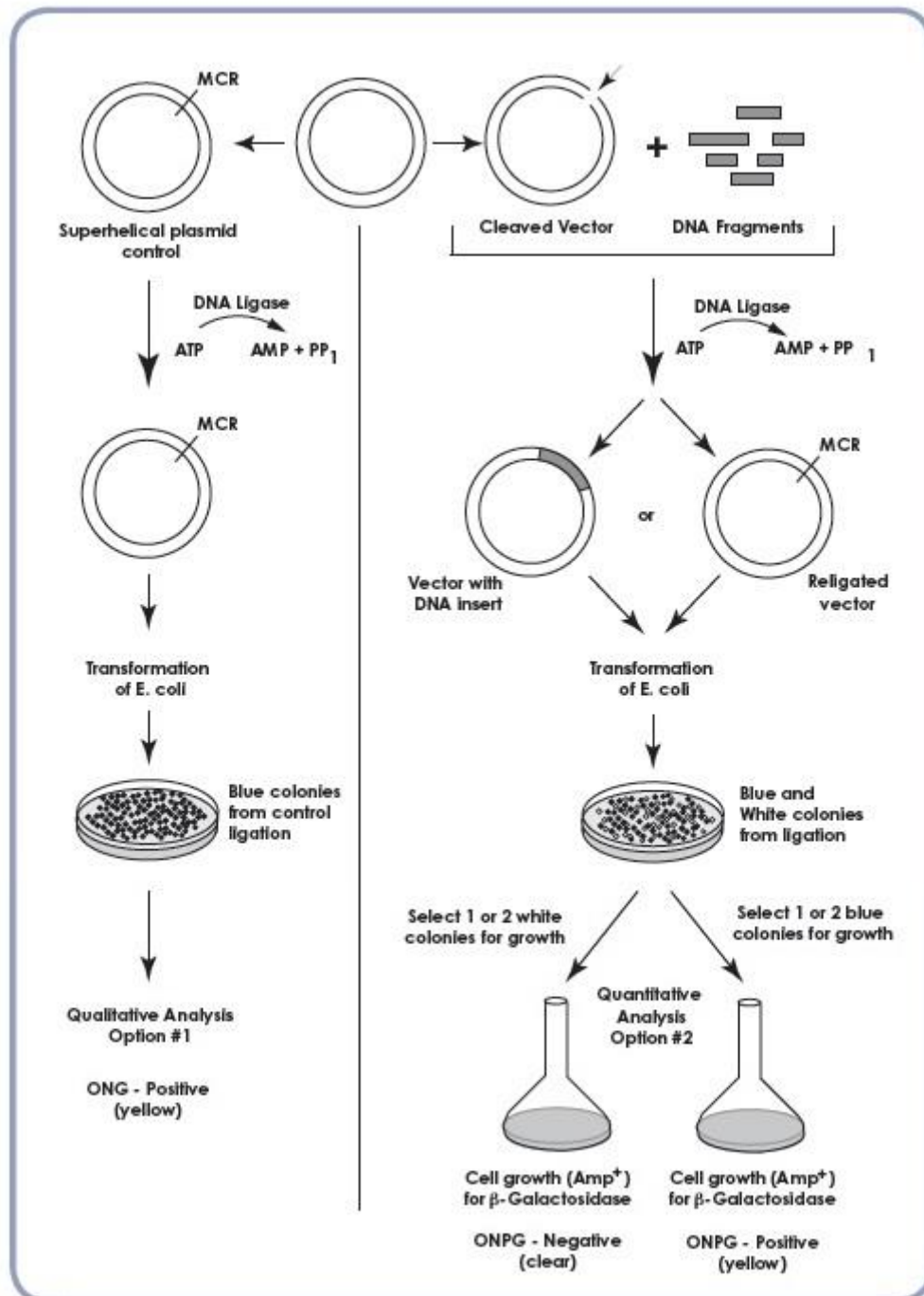


Figura 3

3.3 Transformación

Se prepararon células competentes a partir de cultivos de *E. coli* JM109. Esta cepa no tiene ninguna resistencia natural a los antibióticos o plásmidos y carece de enzimas de restricción. Además, la cepa no produce la proteína **RecA**, lo que reduce la posibilidad de eventos de recombinación intracelular. Todas estas características hacen de *E. coli* JM109 un excelente anfitrión para los experimentos de clonación y subclonación.

La transformación con los productos de reacción de ligación realiza varias funciones. La transformación actúa como una etapa de purificación, ya que separa la mezcla compleja de productos de reacción de ligación en colonias bacterianas individuales o elimina algunos de ellos por completo. El vector lineal y los concatámeros muy grandes no son bien absorbidos por la *E. coli* competente. El ADN circular superenrollado y relajado tiene las más altas eficiencias de transformación. Solo se requieren pequeñas cantidades de ADN, típicamente menos de 10 nanogramos, para la transformación. De hecho, la transformación se inhibe por cantidades de ADN que superan los 100 nanogramos. Solo 1 de cada 10,000 células incorporan con éxito el ADN exógeno. La captación de dos moléculas diferentes de ADN por la misma célula durante la transformación ocurre a una frecuencia baja.

La eficiencia de transformación se define por el número de transformantes obtenidos por microgramo de ADN. Por ejemplo, si se utilizaron 10 nanogramos de ADN para la transformación en 1 ml de células y se colocaron en placa una décima (0,1 ml) y se produjeron 100 colonias en un medio de agar selectivo, esto equivaldría a 1000 transformantes por ml. Teniendo en cuenta que cada colonia creció de una célula transformada, la eficiencia sería $1000 / 0.01\mu\text{g} = 1 \times 10^5$. Las eficiencias de transformación de 10^5 a 10^6 son suficientes para la mayoría de los experimentos de subclonación. Cuando se realiza la clonación de genes de copia única a partir de ADN genómico, las eficiencias requeridas son de 10^7 a 10^8 .

3.4 Selección de colonias azules/blancas

La revisión a menudo puede ser tediosa y consumir mucho tiempo. Los vectores de plásmidos generalmente contienen genes de resistencia a antibióticos que se utilizan para la selección positiva de bacterias que contienen el plásmido recombinante que contiene el ADN clonado.

El objetivo de este experimento es obtener dos tipos de colonias bacterianas transformadas: azul y blanco en presencia de X-Gal e IPTG. Las colonias azules contienen plásmidos "*autoreligados*" que no tienen inserciones de ADN que interrumpan el gen *lacZ*. Las colonias blancas consisten en bacterias que transportan plásmidos que tienen fragmentos de inserción de ADN que interrumpen el gen *lacZ*. La selección se realizará en medio que contenga ampicilina.

La β -galactosidasa se analizará a partir de transformantes Lac⁺ (colonias azules que producen la enzima activa). Se utilizará A4-orthonitrophenalgalactopyran-ósido (ONPG) para analizar la β -galactosidasa. Tras la catálisis, este sustrato formará un color amarillo. Lac⁻ (colonias blancas) no hidrolizará ONPG y no se observará color amarillo.

4. DESCRIPCIÓN DE LA PRÁCTICA

ANTES DE COMENZAR LA PRÁCTICA:

1. Leer todas las instrucciones antes de comenzar el experimento.
2. Escribir una hipótesis que refleje el experimento y prediga los resultados experimentales (ver [5.4 Libreta de laboratorio](#)).

OBJETIVO DE LA PRÁCTICA:

El objetivo de esta práctica es clonar un fragmento de ADN en el enlazador pUC y seleccionar colonias que tengan inserciones de ADN basadas en la selección de color.

El experimento se divide en tres módulos que se centran en lo siguiente:

- I. Ligación de un inserto de ADN en la región de clonación múltiple (MCR) para el vector pUC8.
- II. Transformación y Selección.
- III. Ensayo de β -galactosidasa en colonias azules y blancas.

4.1 Precauciones

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

2. Se deben usar guantes y gafas protectoras de manera rutinaria como buena práctica de laboratorio.

3. Se debe tener mucho cuidado al trabajar con equipos en los que se utilizan junto con una fuente de calor y/o la fusión de los reactivos.

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. Aunque rara vez se asocia con alguna enfermedad en personas sanas, 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 tan pronto como sea posible después de usarlos de una de las siguientes maneras:

- Autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Pegue varias placas de Petri y cierre las tapas de los tubos antes de desecharlos. Recolecte todos los materiales contaminados en una bolsa desechable y autoclavable. Selle la bolsa y colóquela en una bandeja metálica para evitar cualquier posibilidad de que el medio líquido o el agar se derramen en la cámara del esterilizador.

- Inmersión en solución de lejía al 10%.

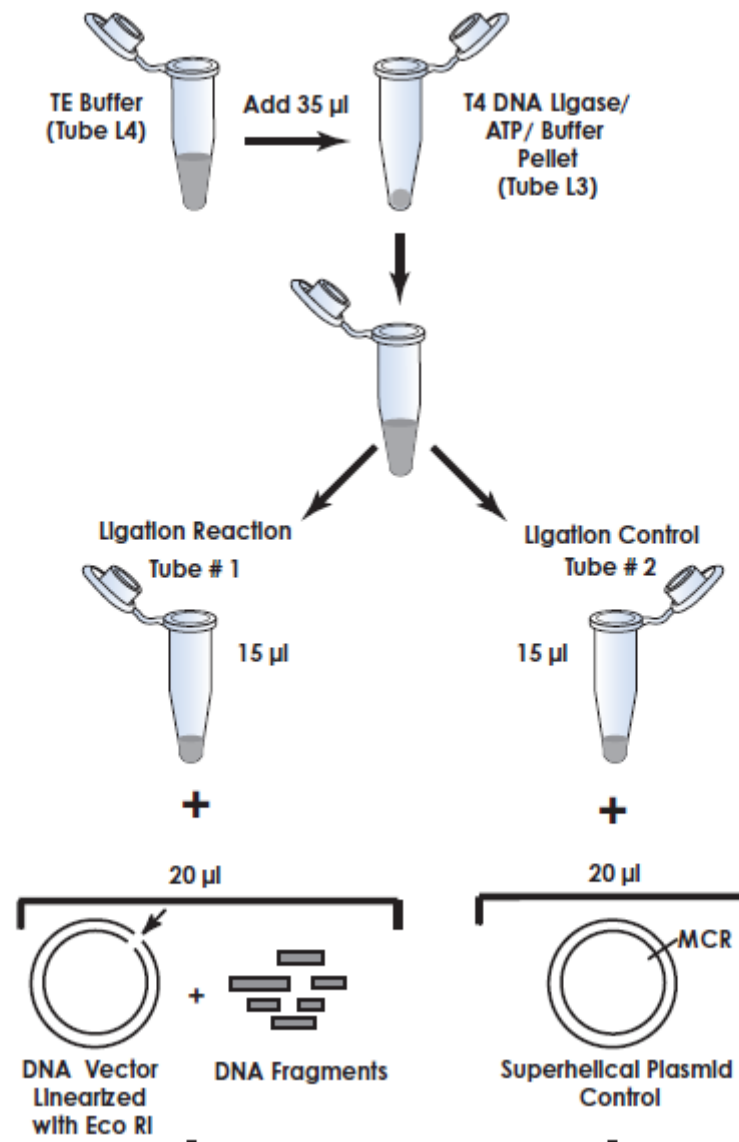
Sumergir las placas de petri, los tubos abiertos y otros materiales contaminados en una cubeta que contenga una solución de lejía al 10%.

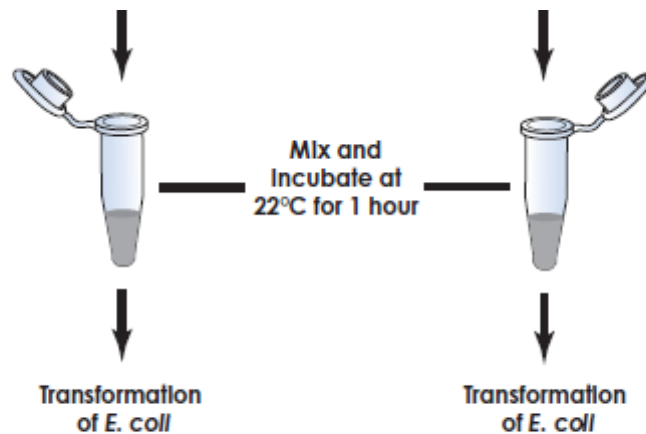
Remojar los materiales durante la noche y luego desecharlos. Usar guantes y gafas protectoras al trabajar con lejía.

7. Usar siempre guantes y, al final del experimento y la limpieza desinfección de los materiales, lavarse bien las manos con agua y jabón.

4.2 Práctica

MÓDULO I: Ligadura de un Inserto de ADN en el MCR del vector pUC8



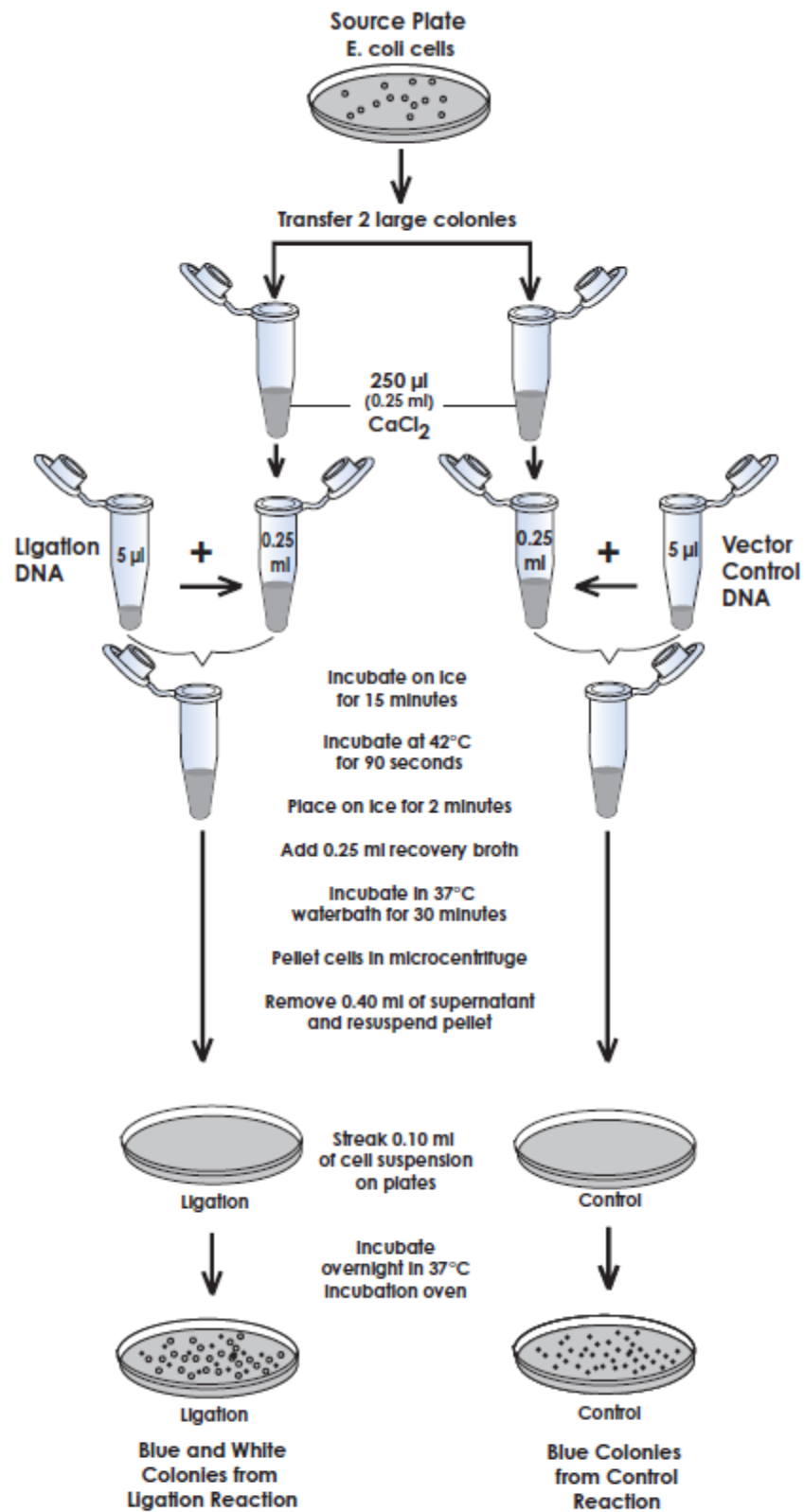


MODULE I OVERVIEW

1. Agitar con vórtex el tubo que contiene el pellet T4 Ligasa/ATP/Buffer (L3). Golpearlo suavemente en la poyata de laboratorio para recoger el pellet en la parte inferior del tubo.
2. Agregar 35 μ l de tampón TE (L4) estéril al tubo de reacción T4 Ligasa/ATP (L3). Dejar que se hidrate durante cinco minutos.
3. Agitar cuidadosamente la mezcla con una punta de pipeta y pipetear suavemente la solución hacia arriba y hacia abajo para mezclar el tampón y la ligasa.
4. Centrifugar brevemente el tubo en una microcentrífuga para recoger toda la solución en la parte inferior del tubo.
5. Etiquetar e inicialice dos tubos de microtitulación de 1,5 ml:
 - "Ligación"
 - "Control"
6. Alicuotar 15 μ l de la Ligasa T4/ATP/Tampón de reacción hidratado en los tubos "Ligación" y "Control".
7. Al tubo de "Ligación" añadir:
 - L1 20 μ l Vector de ADN linealizado con Eco RI y mezclar de fragmentos de ADN mediante agitación con vórtex o golpeando suavemente el tubo.
8. Al tubo "Control", añadir:
 - L2 20 μ l Control Superhelical Plasmid DNA y mezclar mediante vórtex o golpeando suavemente el tubo.
9. Centrifugar brevemente los tubos de "Ligación" y "Control" en una microcentrífuga para recolectar toda la muestra en el fondo de los tubos.
10. Incubar a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) durante 1 hora. Mezclar los tubos periódicamente golpeando suavemente los tubos o agitar en vórtex a intervalos de 10 o 15 minutos.

Punto de parada opcional: Se puede continuar con el experimento o congelar los tubos de "ligación" y "control" hasta que los necesite para la transformación en el Módulo II.

MÓDULO II: Transformación y Selección



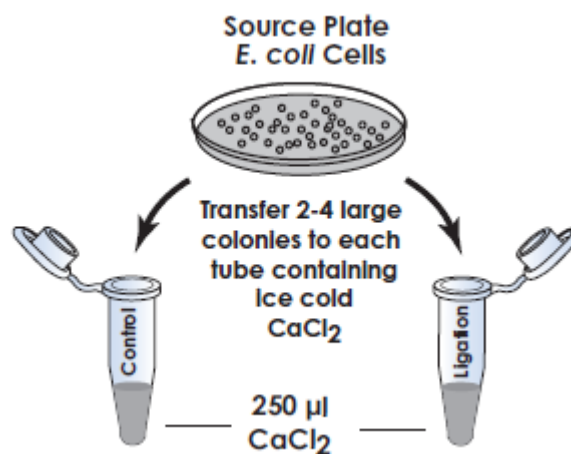
MODULE II OVERVIEW

MONTAJE DEL EXPERIMENTO DE TRANSFORMACIÓN Y CONTROL

1. Etiquetar un tubo de microcentrífuga como "Ligación". Este será el tubo de transformación con ADN de ligadura.
2. Etiquetar un segundo tubo de microcentrífuga como "Control". Este será el control experimental con ADN plásmido superhelical.



3. Con una pipeta estéril de 1 ml, añadir 250 μ l (0,25 ml) de solución de CaCl_2 enfriada con hielo a cada tubo.
4. Escoger las colonias de la placa fuente de las células de *E. coli*. En cada uno de los tubos de ensayo etiquetados como "Ligación" y "Control":
 - Usar un palillo estéril para transferir 2 colonias (2-4 mm) desde la placa fuente a los tubos de ensayo.
 - Girar el palillo con fuerza entre los dedos y hacia arriba y abajo en la solución de CaCl_2 para desprender y emulsionar las células.



NOTA: Evitar raspar el agar cuando se transfieran las células de la placa fuente a los tubos con solución de cloruro de calcio. Es importante que las células se resuspendan en la solución de cloruro de calcio y que no se dejen en el palillo o en la pared del tubo.

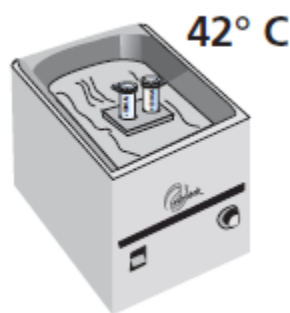
5. Resuspender las células en ambos tubos golpeándolos suavemente o agitando en vórtex.
6. Agregar los productos de reacción del Módulo 1:
 - Al tubo etiquetado "Ligación", agregar 5 μ l de la reacción de ligadura.

- Al tubo etiquetado como "Control", agregar 5 μ l de la reacción de control.

7. Incubar los dos tubos en hielo durante 15 minutos.



8. Colocar los dos tubos en un baño de agua a 42°C durante 90 segundos para el paso de choque térmico. Esto facilita la entrada de ADN en células bacterianas.



9. Volver a colocar ambos tubos rápidamente en el cubo de hielo e incubar durante dos minutos.



10. Con una pipeta estéril, agregar 250 μ l (0,25 ml) de caldo de recuperación a cada tubo y mezclar. El "caldo de recuperación" no contiene antibióticos.



11. Incubar las células durante 30 minutos en un baño de agua a 37°C durante un período de recuperación. Esto permite que las células se recuperen y comiencen a expresar los genes de resistencia a los antibióticos.

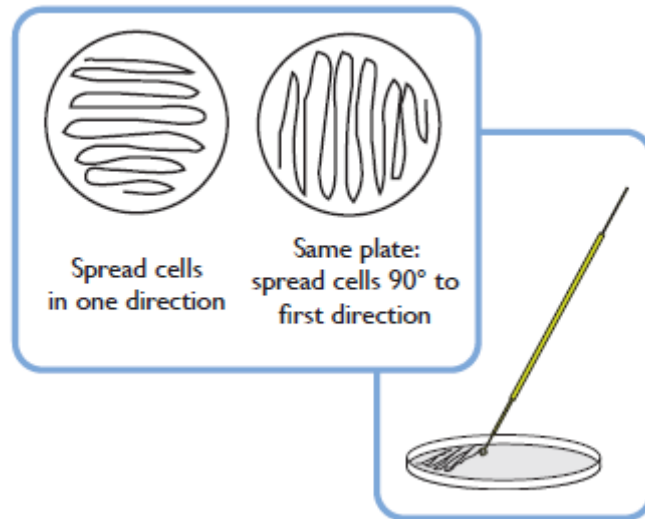


12. Después del período de recuperación, retirar los tubos del baño de agua y colocarlos en una microcentrífuga y centrifugar los tubos durante 5 minutos para sedimentar las células.
13. Retirar y desechar 0,40 ml de sobrenadante y volver a resuspender el sedimento en el líquido restante.

NOTA: El ADN y las células competentes se combinan en una suspensión. Después de que las células se hayan incubado con el ADN, agregar medio de crecimiento (caldo de recuperación). Las células bacterianas continúan creciendo durante el proceso de recuperación, durante el cual se repara la pared celular. Las células se recuperan y comienzan a expresar el gen de resistencia a los antibióticos.

SEMBRADO DE LAS CÉLULAS

14. Separar dos placas de agar ("Ligación" y "Control") y etiquetarlas con número de grupo de laboratorio.
15. Pipetear 0,1 ml de las células transformadas recuperadas en el tubo etiquetado como tubo "Ligación" al centro de la placa de agar etiquetada como "Ligación".
16. Usando un asa de siembra estéril, distribuir las células de manera uniforme y sobre toda la superficie. Girar la placa 90° y extender bien nuevamente como se indica en la imagen inferior.
17. Con una pipeta nueva, transferir 0.1 ml de células recuperadas en el tubo etiquetado como "Control" a la placa de agar etiquetada "Control".
18. Usando una asa de siembra nuevo, extender las células sobre toda la superficie de la placa como en el punto 16.
19. Tapar ambas placas y dejar que el líquido se absorba (aproximadamente 15-20 minutos).



NOTA: Para evitar la contaminación al sembrar, no colocar la tapa sobre la mesa de laboratorio; levantar la tapa de la placa solo lo suficiente para permitir que se extienda. Tener cuidado de no perforar el agar con el lazo del asa.

PREPARACIÓN DE LAS PLACAS PARA LA INCUBACIÓN

20. Apilar el conjunto de placas de cada grupo una encima de la otra y sujetarlas juntas (por ejemplo con cinta adhesiva).
21. Poner el número de grupo en el conjunto de placas guardadas.
22. Colocar el juego de placas en un lugar seguro donde no se alteren. Las placas deben dejarse en posición vertical para permitir que la suspensión celular sea absorbida por el agar durante 15 a 20 minutos.
23. Colocar las placas en la posición invertida (el lado de agar en la parte superior) en una estufa de incubación a 37°C para la incubación durante la noche (15-20 horas).

NOTA: Si las células no se han absorbido en el medio, es mejor incubar las placas en posición vertical sin invertirlas. Las placas se invierten para evitar la condensación en la tapa, que podría gotear sobre el cultivo y podría interferir con los resultados experimentales.

VISUALIZACIÓN DE LAS PLACAS DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN

1. Proceder a analizar los resultados.
2. Después de analizar sus resultados, guardar las placas para recoger colonias que se utilizarán para inocular cultivos bacterianos líquidos. Para los otros materiales utilizados en el Módulo II, desechar adecuadamente los materiales contaminados.

DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA TRANSFORMACIÓN

La **eficiencia de la transformación** es una determinación cuantitativa de cuántas células se transformaron por 1 µg de ADN plasmídico. En esencia, es un indicador de lo bien que funcionó el experimento de transformación.

Calcular la eficiencia de la transformación a partir de los datos que recopilen del experimento.

1. Contar el número de transformantes (colonias tanto blancas como azules) en ambas placas. Un método sencillo para realizar un seguimiento de las colonias contadas (evita contar varias veces una misma colonia) es marcar la colonia con un rotulador en el exterior de la placa.
2. Calcular las eficiencias de la transformación para los transformantes totales y para las colonias que contienen vectores con inserciones (colonias blancas).

El volumen de recuperación final de las células fue de 0,50 ml. Debido a que las células se centrifugaron, el volumen recubierto es de 0,10 ml. La cantidad de ADN utilizada fue de aproximadamente 25 ng.

Determinar la eficiencia de la transformación utilizando la fórmula:

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

Example: Assume you observed 40 colonies:

$$\frac{40 \text{ transformants}}{0.125 \mu\text{g}} \times \frac{1.05 \text{ ml}}{0.25 \text{ ml}} = \frac{1344}{\text{transformants per } \mu\text{g}} \quad (1.3 \times 10^3)$$

Quick Reference for Expt. 300:

25 ng of DNA is used.

The final volume at recovery is 0.50 ml.

The volume plated is 0.10 ml.

Punto de parada opcional: Las placas se pueden envolver y almacenar en el refrigerador durante una semana.

MÓDULO III: Ensayo de β -galactosidasa en colonias azules y blancas

CRECIMIENTO DE CULTIVOS LAC+ Y LAC- PARA ENSAYO

De cuatro a cinco horas antes del laboratorio, inocular el medio de cultivo bacteriano Lac+ (colonias azules) y Lac- (colonias blancas). Seguir las instrucciones del profesor de prácticas.

1. Coger 2 matraces (125 ml) que contengan 25 ml cada uno de medio de crecimiento LB estéril + ampicilina.
2. Marcar un matraz como Lac+ y el otro como Lac-.
3. Con un asa de inoculación estéril, elegir varias (4 a 6) **colonias transformantes azules** individuales e inocular el matraz etiquetado como Lac+. Agitar el matraz para resuspender las bacterias.

NOTA: Agitar el asa en el caldo para permitir que las bacterias se desprendan del asa y entren al caldo.

4. Con un asa de inoculación estéril, elegir varias (4 a 6) **colonias transformantes blancas** individuales e inocular el matraz etiquetado Lac-. Agitar el matraz para resuspender las bacterias.
5. Incubar los cultivos con agitación a 37°C durante 4 a 5 horas.
6. Comprobar la densidad óptica (DO) a 600 nm. Debe ser de 0,5 a 0,7 colocando 3 ml en un tubo de vidrio de 13 mm x 100 mm o 1 ml en una cubeta y colocándola en un espectrofotómetro al que se ha ajustado el blanco previamente.

NOTA: Para el crecimiento celular usar LB + AMP sobrante como blanco para las lecturas de absorbancia de DO600.

NOTA: Para el ensayo de β -galactosidasa: usar agua destilada como blanco para las lecturas de absorbancia de DO420 y DO600.

INDUCCIÓN DE β -GALACTOSIDASA Y MUESTREO

1. Retirar 3 ml de cada uno de los matraces. Conservar estas muestras como el punto de tiempo cero para el ensayo de la β -galactosidasa. Etiquetar los tubos Lac+/T-0 y Lac-/T-0. Colocarlos en hielo para el ensayo.
2. Leer la DO600 y anotarla.

NOTA: Para el ensayo de β -galactosidasa usar H₂O destilada como blanco para las lecturas de absorbancia de DO420 y DO600.

3. A cada uno de los 22 ml restantes de cultivo, agregar 22 μ l de IPTG como inductor de la actividad de la β -galactosidasa.
4. Devolver los cultivos al matraz en la incubadora de agitación y mantenerlo a 37°C durante 30 minutos.
5. Después de 30 minutos, retirar 3 ml de cada cultivo y llenar un tubo de 13 x 100 mm. Etiquetar los tubos Lac+/T-1 y Lac-/T-1. Colocarlos en hielo.
6. Leer la DO600 y anotarla.
7. Devolver los cultivos restantes (19 ml) al matraz en la incubadora de agitación a 37°C.

Pasos 8-10 opcionales:

8. Para obtener mejores resultados, después de 60 minutos adicionales, retirar 3 ml de cada cultivo y llenar un tubo de 13 x 100 mm. Etiquetar los tubos Lac+/T-2 y Lac-/T-2. Colocarlos en hielo.
9. Leer DO600 y anotarla.
10. Devolver los cultivos (16 ml) al matraz en la incubadora de agitación a 37°C.

ENSAYO DE β -GALACTOSIDASA

1. Colocar seis (6) tubos de microcentrífuga de 1,5 ml en una gradilla.
2. Etiquetar los 6 tubos:

Lac+/T0	Lac-/T0
Lac+/T30	Lac-/T30
Lac+/T90	Lac-/T90

3. Transferir 1 ml de los cultivos en hielo de cada muestra a cada tubo de ensayo respectivo.
4. Centrifugar las células durante 5 minutos en una microcentrífuga para sedimentar las células.
5. Decantar y desechar el sobrenadante.
6. Transferir otro 1 ml de los cultivos en hielo a cada tubo de ensayo respectivo y centrifugar nuevamente durante 5 minutos.
7. Decantar y desechar el sobrenadante y guardar cada pellet.
8. Resuspender los pellets en 500 μ l de tampón de fosfato (A3).
9. Congelar la suspensión hasta que se solidifique y descongelarla inmediatamente.

NOTA: Las células se pueden congelar rápidamente en hielo seco o extendiendo los tubos (acostados) en un congelador a -20°C . Las células se pueden descongelar a temperatura ambiente o mediante una breve incubación en el baño de agua a 42°C (el tiempo suficiente para descongelar).

10. Repetir la congelación y descongelación por segunda vez.
11. Agregar 100 μ l de lisozima a cada tubo e incubar a 37°C durante 10 minutos.
12. Agregar 200 μ l de ONPG a cada tubo de ensayo.
13. Incubar los tubos de ensayo durante 15 minutos en un baño de agua a 42°C .
14. Agregar 0,1 ml de tampón de parada (NaCO_3) para detener las reacciones.
15. Centrifugar los tubos en una microcentrífuga durante 1 minuto para sedimentar las células.
16. Para cada tubo, transferir el sobrenadante transparente a un tubo o cubeta limpios y etiquételos adecuadamente.
17. Utilizar agua destilada como blanco. Leer OD420 y OD550.
18. Si la lectura es superior a 0,8, diluir con agua destilada y anotar el factor de dilución.
19. Determinar las unidades de actividad enzimática. Las unidades se

definen como unidades Miller según la siguiente ecuación.

$$\text{Miller Units} = \frac{1000 \times [OD_{420} - 1.75 \times OD_{550}]}{T \times V \times OD_{600}}$$

En donde:

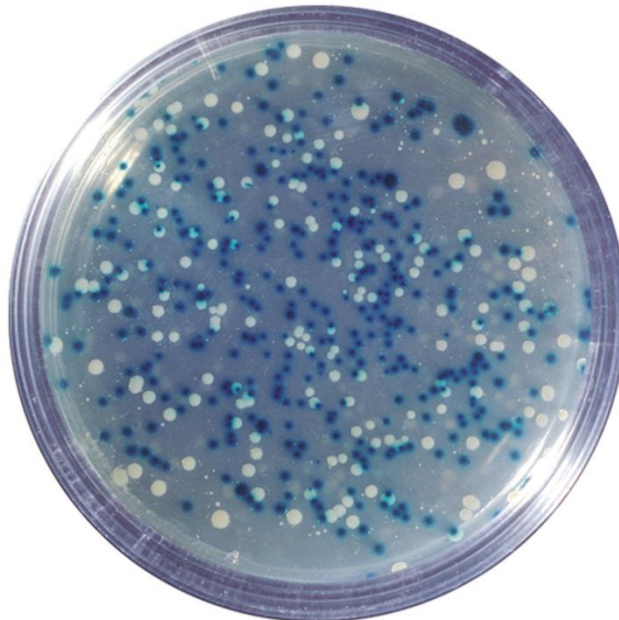
- OD420 y OD550 se leen de la reacción ONPG.
- OD600 se lee de la densidad óptica del cultivo celular.
- T es el tiempo en minutos de la reacción ONPG.
- V es el volumen del cultivo celular utilizado en la reacción ONPG en mls.

NOTA: La lectura a 420 nm es la absorbancia combinada del O-nitrofenol y la dispersión de la luz por materiales de partículas como los desechos celulares. La absorbancia a 550 nm corrige la dispersión de luz sin contribución de la reacción de O-nitrofenol. La dispersión de luz a 420 nm es igual a (-1,75 x OD550).

20. Desinfectar todos los líquidos, medios, placas y artículos de plástico que hayan estado en contacto con células bacterianas sumergiéndolos en lejía al 10 % durante la noche o esterilizándolos en autoclave.

5. PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

5.1 Resultados



Cultivo de colonias azules y blancas en una placa de Petri.

6.2 Preguntas

Responder las siguientes preguntas de la práctica en el cuaderno de laboratorio o en una hoja de trabajo separada.

1. ¿Por qué este experimento de clonación produce colonias tanto azules como blancas?

Durante la ligadura, muchas moléculas lineales de pUC-8 no se ligarán con los fragmentos de ADN provistos. Aquellos que se vuelven a cerrar en presencia de X-Gal e IPTG formarán colonias azules, ya que el gen X-Gal no se interrumpe.

2. ¿Todas las colonias blancas y azules contienen un plásmido?

Tanto las colonias blancas como las azules contienen un plásmido, ya sea un ADN plásmido pUC-8 intacto o un recombinante que contiene un fragmento de ADN en la región de clonación múltiple (MCR) de pUC-8. Ambas formas del plásmido contienen el gen de resistencia a la ampicilina Amp^R. Tanto las colonias blancas como las azules se colocaron en placas y se cultivaron en medio líquido en presencia de ampicilina, que seleccionará células bacterianas que tienen un plásmido pUC-8 que porta el gen Amp^R.

3. ¿La lisozima utilizada para lisar las células desnaturalizará la β -galactosidasa?

La lisozima es una enzima que rompe la estructura rígida de la pared celular bacteriana permitiendo el aislamiento de un componente o proteína subcelular particular. Bajo las condiciones adecuadas, esto se logra sin dañar el contenido de la célula.

4. ¿Qué enzima de restricción es la más adecuada para la clonación en pUC8?

El pUC-8 MCR tiene varios sitios de enzimas de restricción. Cualquiera de estos son igualmente eficientes para la clonación utilizando el vector pUC-8.

5. GUÍA DEL PROFESOR

¡ATENCIÓN!

IMPORTANTE

Los experimentos de transformación contienen antibióticos que se utilizan para la selección de bacterias transformadas. Los estudiantes que tienen alergias a los antibióticos como penicilina, ampicilina, kanamicina o tetraciclina no deben participar en este experimento.

5.1 Organización de la práctica

El tamaño de la clase, la duración de las sesiones de laboratorio y la disponibilidad de equipo son factores que se deben considerar en la planificación e implementación de esta práctica con los alumnos.

Antes de comenzar este experimento, comprobar cuidadosamente que se tienen todos los componentes y equipos necesarios. Verificar las listas de Componentes, [2.1 Material suministrado](#) y [2.2 Material requerido y no suministrado](#) para asegurarse de tener un inventario completo para realizar el experimento.

Las pautas que se presentan en este protocolo se basan en cinco grupos de laboratorio. Las siguientes son pautas de implementación, que se pueden y deben adaptar a cada caso específico de circunstancias.

Este experimento tiene tres módulos:

- I. Ligadura de un inserto de ADN en la región de clonación múltiple (MCR) para el vector pUC8.
- II. Transformación y Selección.
- III. Selección y crecimiento de transformantes Lac⁺ y Lac⁻.

[5.2 Desarrollo de habilidades](#)

Al realizar este experimento, los estudiantes desarrollarán las habilidades necesarias para realizar investigaciones científicas, aprenderán nuevas técnicas utilizando varios tipos de equipos biotecnológicos y aprenderán los procedimientos estándar utilizados en la transformación. El análisis de los experimentos proporcionará a los estudiantes los medios para transformar un concepto abstracto en una explicación concreta.

[5.3 Requisitos de tiempo \(aproximados\)](#)

En esta práctica existen varias etapas de incubación que se deben tener en cuenta a la hora de planificarla e implementarla en clase.

1. Después de configurar la ligadura, el **MÓDULO I** requiere una incubación de 1 hora. El experimento se puede detener temporalmente después de completar el **MÓDULO I** y luego reanudarse. Los resultados experimentales no se verán comprometidos si se siguen las instrucciones que se indican en la nota "**Punto de parada opcional**" al final del **MÓDULO I**.
2. El **MÓDULO II** incluye una incubación de 30 minutos en un baño de agua a 37°C. También hay una incubación durante la noche (overnight) de las placas a 37°C antes de que los alumnos puedan realizar el **MÓDULO II** y antes de pasar al **MÓDULO III**.
3. El **MÓDULO III** requiere una incubación de cultivo de 4 a 5 horas para permitir el crecimiento de colonias transformantes. Esto requiere que el profesor o los estudiantes preparen los cultivos para la incubación (a 37°C con agitación) antes de la inducción de β -galactosidasa y el muestreo, seguido del ensayo enzimático.

Cuando	Qué hacer	Tiempo requerido
MÓDULO I	Incubación	1 h
MÓDULO II	Incubación	30 min
	Incubación	Overnight (durante la noche)
MÓDULO III	Incubación	4-5 h

5.4 Libreta de laboratorio

Se recomienda que los estudiantes mantengan un cuaderno de laboratorio para formular hipótesis y registrar procedimientos y resultados experimentales.

6. PRÁCTICA

6.1 Preparaciones previas

Módulo I: Ligación de fragmentos de ADN en pUC8

Se proporcionan suficientes reactivos para realizar 5 reacciones de ligación. Se puede dividir los reactivos en alícuotas para cada grupo de laboratorio como se describe en el paso 2.

Alternativamente, los estudiantes pueden compartir los tubos de un stock común en una ubicación central. Se debe tener en cuenta que compartir los tubos aumenta el riesgo de derrames o contaminación.

1. Poco antes de comenzar esta parte de la práctica el laboratorio, descongelar y colocar en hielo:
 - Vector de ADN L1 linealizado con Eco RI y fragmentos de ADN.
 - Control de L2 ADN plásmido superhelical
2. Para cada grupo de laboratorio, transferir los siguientes volúmenes en tubos separados de microcentrifugación de 0,5 ml enfriados con hielo que estén debidamente etiquetados.
 - 25 µl de L1, vector de ADN linealizado con Eco RI y fragmentos de ADN
 - 25 µl de L2, ADN plásmido superhelical de control
 - 50 µl de L4, Tampón TE
3. Mantener todos los tubos en hielo.

Módulo II: Introducción de ADN en células de E. coli por transformación y selección de transformantes

Verter las placas de agar (antes de la práctica de laboratorio)

Para obtener resultados óptimos, preparar las placas **dos días antes** de colocarlas y guardarlas invertidas a temperatura ambiente. Si se preparan **más de dos días** antes de su uso, deben almacenarse invertidas en nevera a 4°C. Retirar las placas de la nevera y guardarlas invertidas durante dos días a temperatura ambiente antes de usarlas.

Calentar el medio ReadyPour™

1. Descongelar la solución X-Gal (TR3) y el agua estéril (TR5).
2. Agregar 0,75 ml (750 µl) de agua estéril (TR5) al tubo que contiene ampicilina (TR1). Vortex o agitar vigorosamente para disolver el polvo y colocar el tubo en hielo.
3. Agregar 0,70 ml (700 µl) de agua estéril (TR5) al tubo que contiene IPTG (TR2). Vortex o agitar vigorosamente para disolver el polvo y colocar el tubo en hielo.
4. Equilibrar un baño de agua a 60°C, necesario para el paso 8 siguiente.

PRECAUCIÓN: Utilizar guantes protectores para el calor y gafas de seguridad durante todos los pasos que impliquen la utilización de calor.

5. Aflojar, pero no quitar, el tapón de la botella de medio ReadyPour para permitir la ventilación del vapor durante el calentamiento.

PRECAUCIÓN: El hecho de no aflojar el tapón antes de calentar o cocinar en el microondas puede hacer que la botella de medio ReadyPour se rompa o explote.

6. Apretar y agitar vigorosamente la botella de plástico para romper el agar sólido en trozos.
7. Calentar la botella de medio ReadyPour™ mediante uno de los métodos que se describen a continuación. Cuando el medio esté completamente derretido, la solución de color ámbar debe aparecer libre de pequeñas partículas.

Método de microondas:

- Calentar la botella a alta temperatura durante dos intervalos de 30 segundos.
- Con un guante protector para el calor, agitar y calentar durante 25 segundos adicionales, o hasta que se disuelva todo el medio.
- Usando un guante protector para el calor, agitar la botella ocasionalmente para acelerar la fusión.

Placa caliente o método de quemador:

- Colocar la botella en un vaso de precipitados parcialmente lleno de agua.
- Calentar el vaso de precipitados con agua hasta ebullición sobre una placa caliente o un quemador.
- Usando un guante protector para el calor, agitar la botella ocasionalmente para acelerar la fusión.

8. Dejar que el medio ReadyPour™ derretido se enfríe. La colocación de la botella en un baño de agua a 60°C permitirá que el agar se enfríe, mientras se evita que se solidifique prematuramente.

Cuando el medio ReadyPour™ alcance aproximadamente los 60°C, la botella estará caliente al tacto pero no se quemará (de todas formas mantener las precauciones necesarias al trabajar con material caliente).

9. Mientras el medio ReadyPour™ se está enfriando, etiquetar un total de 15 placas de Petri. Etiquetar estas placas en sus mitades inferiores de la siguiente forma:

- 5 placas: Placas fuente
- 5 placas: Ligación

- 5 placas: Control

Después de que el medio ReadyPour se haya enfriado:

10. Verter 8 ml de medio a cada una de las 5 placas fuente (consulte la **Referencia rápida: Al verter el agar en las placas**).
11. Agregar 0,30 ml de ampicilina (TR1), 0,30 ml de IPTG (TR2) y toda la X-Gal (TR3) al medio fundido con pipetas estériles de 1 ml. Agitar el medio para mezclar. Devolver los tubos de ampicilina e IPTG restantes al congelador para el **MÓDULO III**.

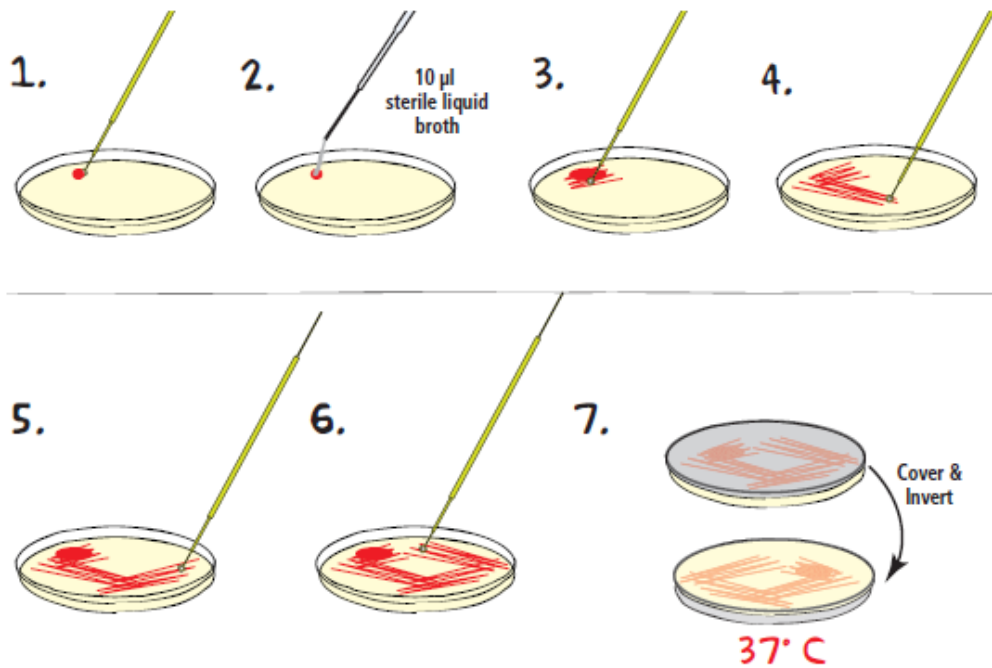
NOTA: Agregar ampicilina, IPTG y X-Gal al medio que se ha enfriado. El medio caliente causará la rápida descomposición de la ampicilina.

12. Verter medio en las placas restantes, 8 ml en cada una. (Ver Referencia rápida: Verter placas de agar.)
13. Dejar enfriar y resolidificar el agar.
 - Si las placas se utilizarán dentro de dos días, almacénelas a temperatura ambiente, invertidas.
 - Si las placas se preparan más de dos días antes de usarlas, volver a envolverlas en la funda de plástico y guardarlas invertidas en la nevera. Sacar las placas de la nevera y dejarlas invertidas a 37°C durante varias horas antes de usarlos.

Referencia rápida: Al verter el agar en las placas
• Utilizar una pipeta estéril de 10 ml con una pera de succión de pipetas para transferir el volumen designado de medio a cada placa de Petri. Pipetear cuidadosamente para evitar la formación de burbujas. • Mover suavemente la placa de Petri hacia adelante y hacia atrás para obtener una cobertura completa. • Si el medio fundido contiene burbujas, pueden eliminarse pasando una llama a través de la superficie del medio. • Cubrir la placa Petri y dejar que el medio se solidifique.

Preparación de placas fuente de *E. coli*

Para obtener los mejores resultados, las placas fuente de *E. coli* se deben realizar de 16 a 20 horas antes de que se realice el experimento. La preparación de las placas fuente más de 24 horas antes de la práctica puede comprometer el éxito del experimento de transformación. Si no tienen una incubadora, las colonias se formarán a temperatura ambiente en aproximadamente 24 a 48 horas.



1. Retirar un solo BactoBead™ del frasco usando un asa de siembra estéril. Usando una técnica aséptica, transferir el BactoBead™ al borde de una placa Petri grande (placa fuente LB) y volver a colocar la tapa. Tapar el vial inmediatamente después de usarlo para limitar la exposición a la humedad en el aire.
2. Disolver inmediatamente el BactoBead™ añadiendo 10 µl de caldo líquido estéril o agua estéril.
3. Hacer rayas con el asa estéril sobre el BactoBead™ disuelto para hacer un dibujo de líneas primarias en la parte superior de la placa como se indica en la figura. Intentar no clavar el asa en el medio (no realizar demasiada presión sobre el medio).
4. Hacer nuevas rayas con el asa de siembra cruzando las líneas primarias hacia una parte limpia del agar, creando de esta forma un dibujo de líneas secundarias.
5. Girar la placa y hacer nuevas líneas cruzando las líneas hasta una parte limpia del agar.
6. Girar la placa una vez más y hacer nuevas líneas cruzando las líneas del tercer dibujo hasta una parte limpia del agar. Esto debería producir colonias aisladas.
7. Tapar la placa y guardarla invertida a 37°C durante 16 a 20 horas. Si no hay una incubadora en el laboratorio, 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 de LB.

NOTA: Si el crecimiento en las placas es excesivo (es decir, si se obtiene un "césped" de colonias), indicar a los estudiantes que transfieran con el asa de siembra algunas células a la solución de CaCl₂.

Otras Preparaciones para el [Módulo II Introducción de ADN en células de *E. Coli* por transformación y selección de transformantes](#):

• **Día de la práctica**

1. Dispensar 1 ml de CaCl₂ (TR4) en tubos de microcentrífuga etiquetados como "CaCl₂" para cada uno de los grupos y colocarlos en hielo.
2. Dejar tiempo suficiente para el equilibrio de los baños de agua y las estufas de incubación.
3. Preparar los reactivos y materiales para 5 grupos de laboratorio. Cada grupo debe recibir:
 - 1 placa de ligadura
 - 1 placa de control
 - 1 placa fuente de *E. coli*
 - 1 reacción de ligación del [Módulo I](#)
 - 1 control de ligación del [Módulo I](#)
 - 1 ml de CaCl₂

[Módulo III: Ensayo de \$\beta\$ -galactosidasa en colonias azules y blancas](#)

1. Descongelar la ampicilina (TR1). Preparar el medio de crecimiento agregando 0.4 ml de ampicilina al medio de crecimiento LB (A1).
2. En 10 matraces de 125 ml estériles (esterilizados en autoclave) alicuotar 25 ml de medio de crecimiento + ampicilina en cada uno.
3. Hacer los preparativos para que los estudiantes inoculen cultivos de ensayo de 4 a 5 horas antes del laboratorio.
Alternativamente, el profesor puede inocular los cultivos. Los cultivos pueden crecer hasta la fase exponencial temprana (DO₅₄₀ = 0,3 a 0,5) y pueden almacenarse en hielo hasta por 4 horas.
4. Agregar todo el tampón de fosfato de sodio (A3) a 27 ml de agua destilada. Alicuotar 5,5 ml para cada grupo en tubos que se puedan cerrar.
5. Alicuotar 1,5 ml de tampón de parada (A5) en tubos que se puedan cerrar para cada grupo.
6. Disolver el ONPG (A4-ortonitrofenalgalactopiranosido) en 20 ml de agua destilada (puede ser difícil disolver totalmente el ONPG). Alicuotar 3 ml en tubos que se puedan cerrar y almacenar en hielo. La concentración final es de 4 mg/ml de ONPG.
7. Descongelar el IPTG (TR2) y alicuotar 60 μ l en 5 tubos de microtitulación.
8. Disolver la lisozima (A2) en 10 ml de agua destilada y dispensar 1.5 ml en 5 tubos etiquetados como "lisozima". Almacenar en hielo.
9. Preparar un baño de agua a 42°C para la última parte del [Módulo III](#).

Análisis cualitativo de la reacción de la β -galactosidasa

Los estudiantes pueden usar las placas del experimento de transformación. **Elegir** un número igual de colonias azules y blancas (15 a 20 colonias cada una) y **colocarlas** en dos tubos de microcentrífuga.

Suspender en 500 μ l de tampón fosfato y seguir el protocolo descrito en el apartado "Ensayo de β -galactosidasa" del [Módulo III](#) del apartado [4.2 Práctica](#) (**página 20**) a partir del paso 5.