

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

Ref. ED-300

Actualización 06-2025

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 (pellets 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) o 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.

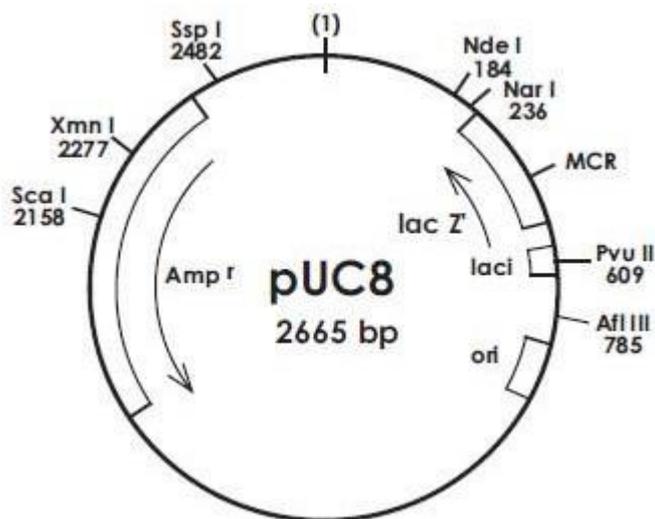


Figura 1

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.

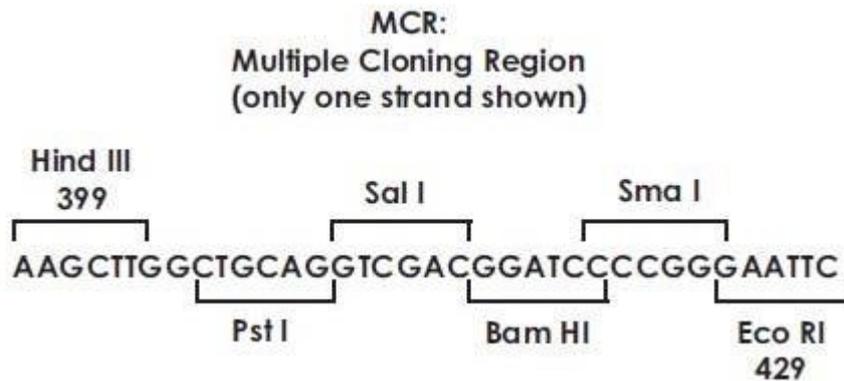


Figura 2

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.

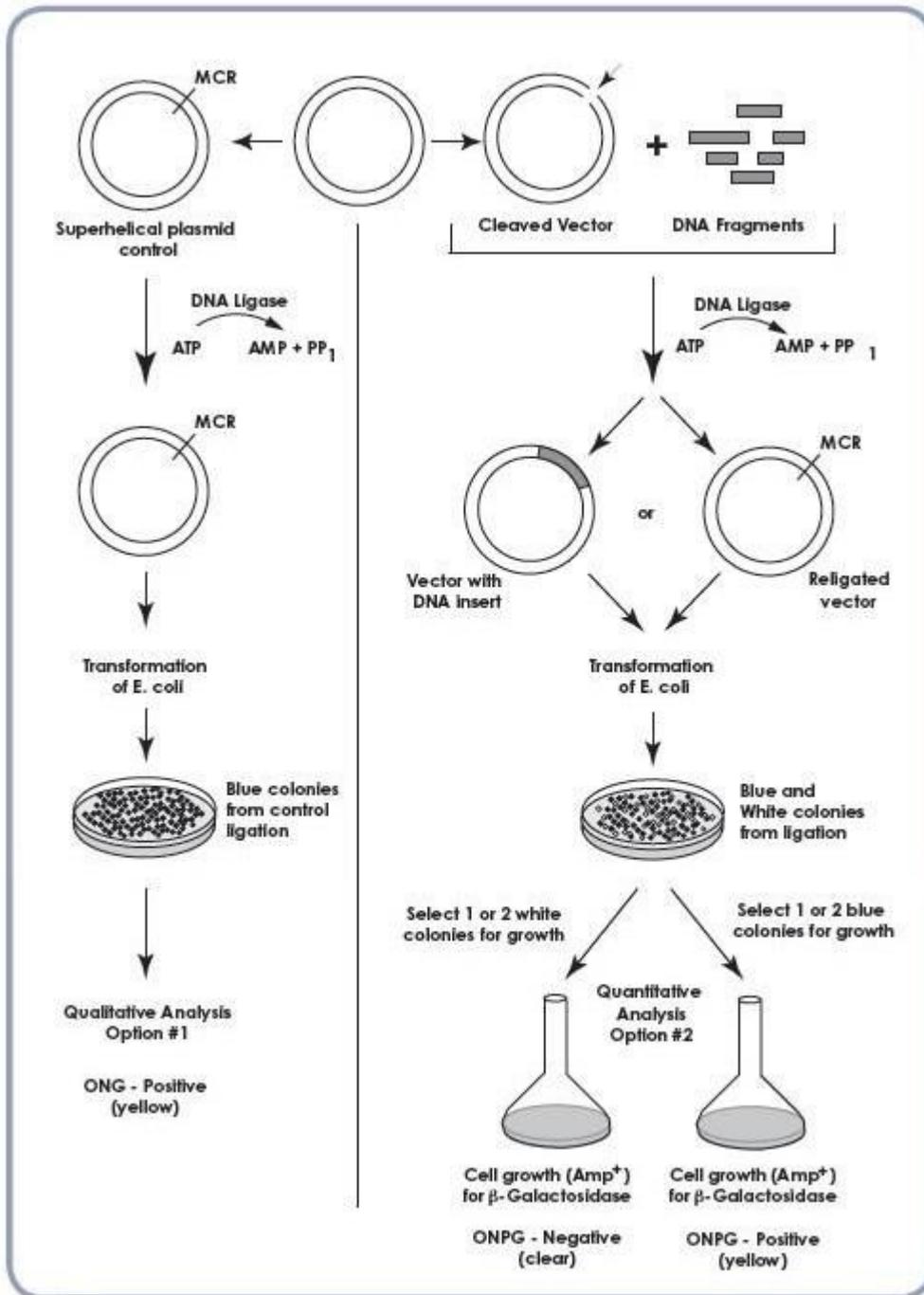


Figura 3

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 interrumpen 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-orthonitrophenalgalactopyranoside (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.

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

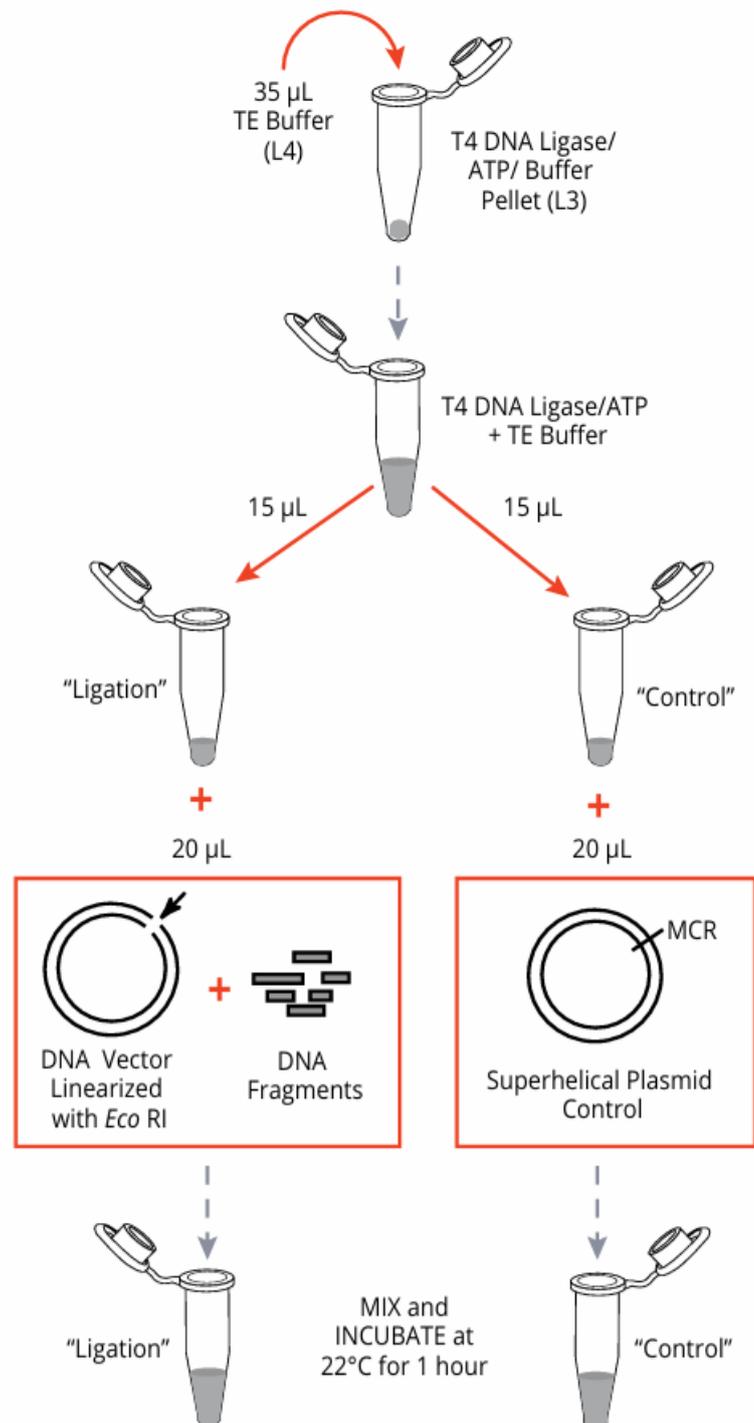
1. Los experimentos de transformación contiene antibióticos para seleccionar las bacterias transformadas, **los estudiantes con alergia a antibióticos como penicilina, ampicilina, kanamicina o tetraciclina no deberían participar en este experimento.**
2. Se deben usar guantes y gafas protectoras de manera 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%.

Dejar en remojo 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: Esquema general



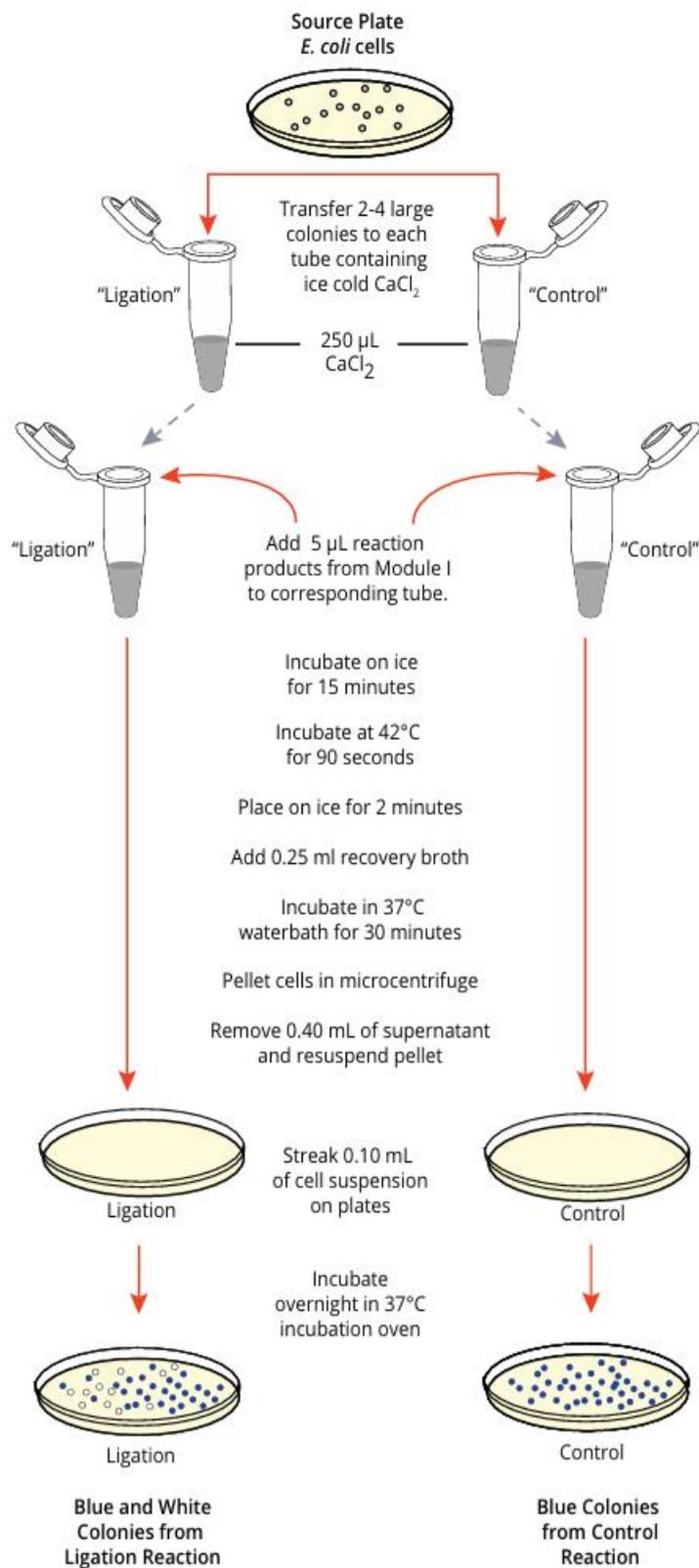
MÓDULO I: Ligadura de un Inserto de ADN en el MCR del vector pUC8

1. Agitar el tubo que contiene el pellet de ligasa T4/ATP/tampón (L3). Golpearlo contra la mesa de laboratorio para recoger el pellet en el fondo.
2. AÑADIR 35 μ L de tampón TE estéril (L4) al tubo de reacción de ligasa T4/ATP (L3). Dejar que se hidrate durante cinco minutos.
3. Remover la mezcla cuidadosamente con la punta de una pipeta y pipetear suavemente la solución para mezclar el tampón y la ligasa.
4. Dar al tubo un pequeño pulso en una microcentrífuga para recoger toda la solución en el fondo.
5. ETIQUETAR y marcar con sus iniciales dos microtubos de 1,5 mL con las palabras "Ligación" y "Control".
6. ALICUOTAR 15 μ L de la ligasa T4/ATP/tampón de reacción hidratado en los tubos de "Ligación" y "Control".
7. AÑADIR 20 μ L de vector de ADN linealizado con Eco RI y fragmentos de ADN (L1) al tubo de "Ligación". MEZCLAR mediante vórtex o golpeteos suaves.
8. AÑADIR 20 μ L de ADN plasmídico superhelicoidal de control (L2) al tubo de "Control". MEZCLAR mediante vórtex o golpeteos suaves.
9. Dar al tubo un pequeño pulso en una microcentrífuga a los tubos de "Ligación" y "Control" en una microcentrífuga para recoger toda la muestra en el fondo.
10. INCUBAR a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C) durante 1 hora. MEZCLAR los tubos periódicamente mediante golpeteos suaves o vórtex a intervalos de 10 o 15 minutos.

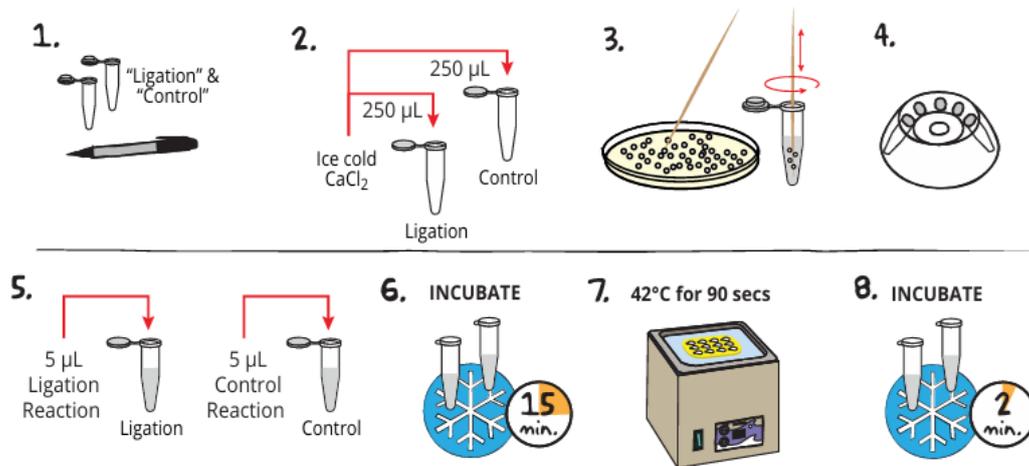
PUNTO DE PARADA OPCIONAL

Continúe con el experimento o congele los tubos de ligadura y control hasta que los necesite para la transformación en el Módulo II.

MÓDULO II: Esquema general



MÓDULO II: Transformación y Selección



CONFIGURACIÓN DEL EXPERIMENTO DE TRANSFORMACIÓN Y CONTROL

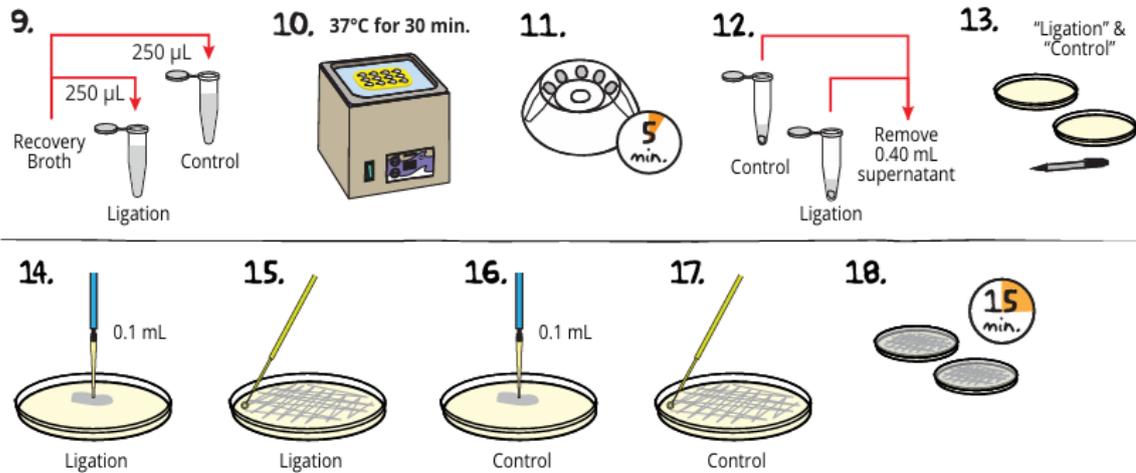
1. ETIQUETAR un tubo de microcentrifuga como "ligación" (este será el tubo de transformación con ADN de ligación). ETIQUETAR un segundo tubo de microcentrifuga como "control" (este será el control experimental con ADN plasmídico superhelicoidal).
2. Con una pipeta estéril de 1 mL, AÑADIR 250 µL (0,25 mL) de solución de CaCl₂ helada a cada tubo.
3. SELECCIONAR colonias de la placa de origen de células de E. coli. A cada uno de los tubos de ensayo etiquetados como "ligación" y "control":
 - Utilizar un palillo/asa de siembra estéril para TRANSFERIR 2 colonias (2-4 mm) de la placa de origen a los tubos de ensayo.
 - Entre los dedos, GIRAR el palillo vigorosamente de arriba a abajo en la solución de CaCl₂ para desalojar y emulsionar las células.

NOTAS PARA EL PASO 3:

Evitar raspar el agar al transferir las células de la placa de origen a los tubos con solución de cloruro de calcio. Es importante que las células se resuspendan en la solución de cloruro de calcio y no queden en el palillo/asa de siembra ni en la pared del tubo.

4. SUSPENDER las células en ambos tubos mediante golpeteo o agitación con vortex.
5. AÑADIR los productos de reacción del Módulo I:
 - Al tubo etiquetado como "ligación", añadir 5 µL de la reacción de ligación.
 - Al tubo etiquetado como "control", añadir 5 µL de la reacción de control.
6. INCUBAR los dos tubos en hielo durante 15 minutos.
7. Colocar ambos 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 las células bacterianas.
8. Devolver ambos tubos inmediatamente a la hielera e incuban durante dos minutos.

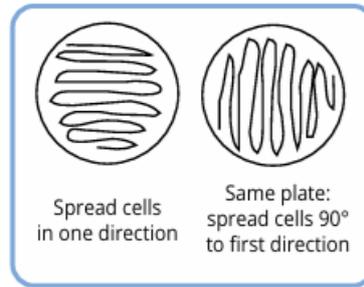
Módulo II: Transformación y Selección (continuación)



9. Con una pipeta estéril, añadir 250 μ L (0,25 mL) de Caldo de Recuperación a cada tubo y mezclar. El Caldo de Recuperación no contiene antibiótico.
10. Incubar las células durante 30 minutos en un baño de agua a 37 °C durante el periodo de recuperación. Esto permite que las células se recuperen y comiencen a expresar los genes de resistencia a los antibióticos.
11. Tras el periodo de recuperación, retirar los tubos del baño de agua, colocarlos en una microcentrífuga y centrifugar durante 5 minutos para sedimentar las células.
12. Retirar y desechar 0,40 mL de sobrenadante y resuspender el sedimento en el líquido restante.

SIEMBRA DE CÉLULAS

13. Obtener dos placas de agar ("Ligación" y "Control") y etiquetarlas con las iniciales o número de grupo de laboratorio.
14. Pipetear 0,1 mL de las células transformadas recuperadas del tubo "Ligación" en el centro de la placa de agar "Ligación".
15. Con un asa estéril, distribuir las células de forma uniforme y completamente sobre toda la superficie. Gire la placa 90° y vuelva a distribuirlas completamente.
16. Con una pipeta nueva, transferir 0,1 mL de las células recuperadas del tubo "Control" al centro de la placa de agar "Control".
17. Con un asa nueva, distribuir las células sobre toda la superficie de la placa como se describe.
18. Tapar ambas placas y dejar que el líquido se absorba (aproximadamente 15-20 minutos).



REFERENCIA RÁPIDA:

El ADN y las células competentes se mezclan en una suspensión. Tras la incubación de las células con el ADN, se añade el 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.

NOTAS IMPORTANTES:

Para evitar la contaminación durante la siembra, no colocar la tapa sobre la mesa de laboratorio; levantarla solo lo suficiente para permitir la propagación. Se debe tener cuidado de no dañar el asa en el agar.

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

PREPARACIÓN DE LAS PLACAS PARA LA INCUBACIÓN

19. Apilar las placas de cada grupo una encima de otra y unir las con cinta adhesiva.
20. Escribir las iniciales o el número de grupo en las placas con cinta adhesiva.
21. Colocar las placas en un lugar seguro donde no se toquen. Las placas deben permanecer en posición vertical para que el agar absorba la suspensión celular durante 15 a 20 minutos.
22. Colocar las placas en posición invertida (con el agar en la parte superior) en un horno de incubación a 37 °C para incubarlas durante la noche (15 a 20 horas).

VISUALIZACIÓN DE LAS PLACAS DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN

23. Analizar los resultados.
24. Después de analizar los resultados, guardar las placas para recolectar las colonias necesarias para inocular cultivos bacterianos líquidos. Cualquier otro material utilizado en el Módulo II se debe desechar adecuadamente como material contaminado.

DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE TRANSFORMACIÓN

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

Cada grupo calculará la eficiencia de transformación a partir de los datos obtenidos en su experimento.

1. Calcular el número de transformantes (colonias blancas y azules) en ambas placas. Un método conveniente para llevar un registro de las colonias contadas es marcar la colonia con un rotulador en el exterior de la placa.
2. Calcular las eficiencias de transformación para el total de transformantes y para las colonias que contienen vectores con insertos (colonias blancas).

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

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.

Determinar la eficiencia de transformación mediante la siguiente fórmula:

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

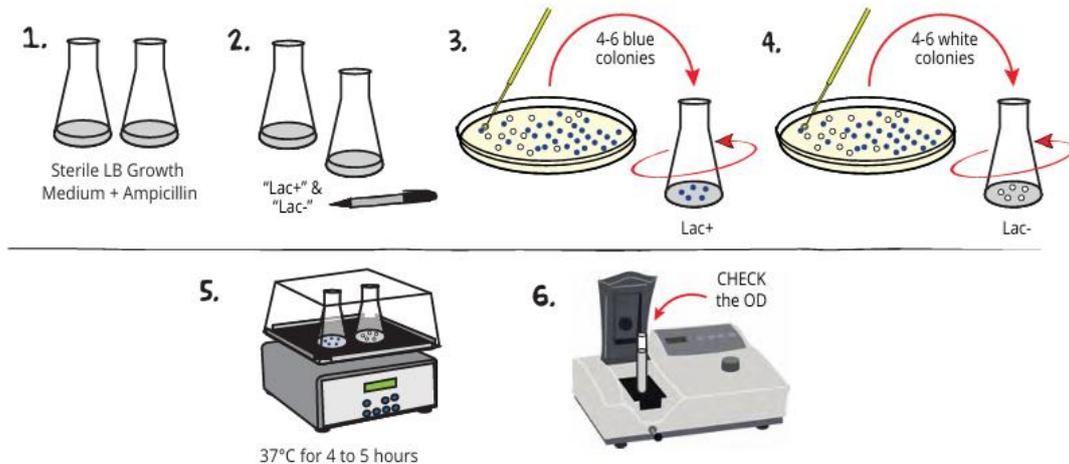
EXAMPLE: Assume you observed 40 colonies:

$$\frac{40 \text{ transformants}}{0.025 \mu\text{g}} \times \frac{0.5 \text{ mL}}{0.1 \text{ mL}} = \frac{8000 \text{ (} 8 \times 10^3 \text{) transformants}}{\text{per } \mu\text{g}}$$

PUNTO DE PARADA OPCIONAL

Las placas pueden envolverse y conservarse en el refrigerador durante una semana.

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



CULTIVOS Lac+ y Lac- PARA LA PRÁCTICA

Cuatro a cinco horas antes de la práctica de laboratorio, inocular el medio de cultivo bacteriano Lac+ (colonias azules) y Lac- (colonias blancas). Alternativamente, siga las instrucciones del profesor de prácticas.

1. PREPARAR dos matraces (125 mL) que contengan 25 mL cada uno de medio de crecimiento LB estéril con ampicilina.
2. ETIQUETAR un matraz como Lac+ y el otro como Lac-.
3. Con un asa de inoculación estéril, SELECCIONAR varias (4 a 6) colonias individuales de transformantes azules e INOCULAR el matraz etiquetado como Lac+. REMOVER el matraz para suspender las bacterias.

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

4. Con un asa de inoculación estéril, SELECCIONAR varias (4 a 6) colonias individuales de transformantes blancos e INOCULAR el matraz etiquetado como Lac-. REMOVER el matraz para suspender las bacterias.

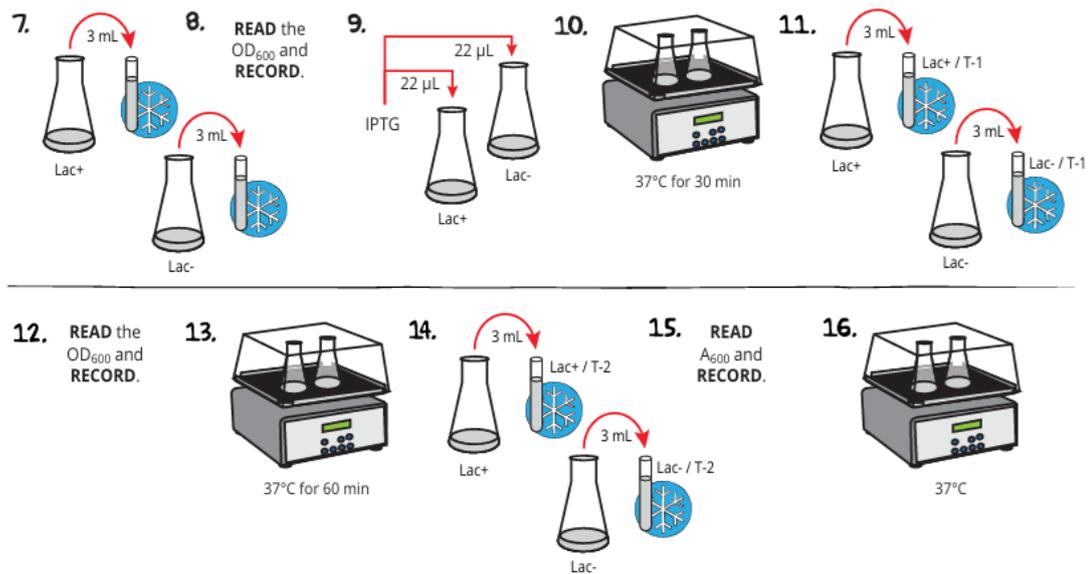
NOTA: Agitar el asa en el caldo para facilitar que las bacterias se desprendan del asa y entren en el caldo.

5. INCUBAR los cultivos con agitación a 37 °C durante 4 a 5 horas.
6. COMPRUEBAR la densidad óptica (DO) a 600 nm.

NOTA: La DO debe ser de entre 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 en blanco.

OBSERVACIONES:

- Para el crecimiento celular: Utilizar el LB + AMP sobrante como blanco para las lecturas de absorbancia de DO600.
- Para el ensayo de β -galactosidasa: Utilizar H₂O destilada como blanco para las lecturas de absorbancia de DO420 y DO600.

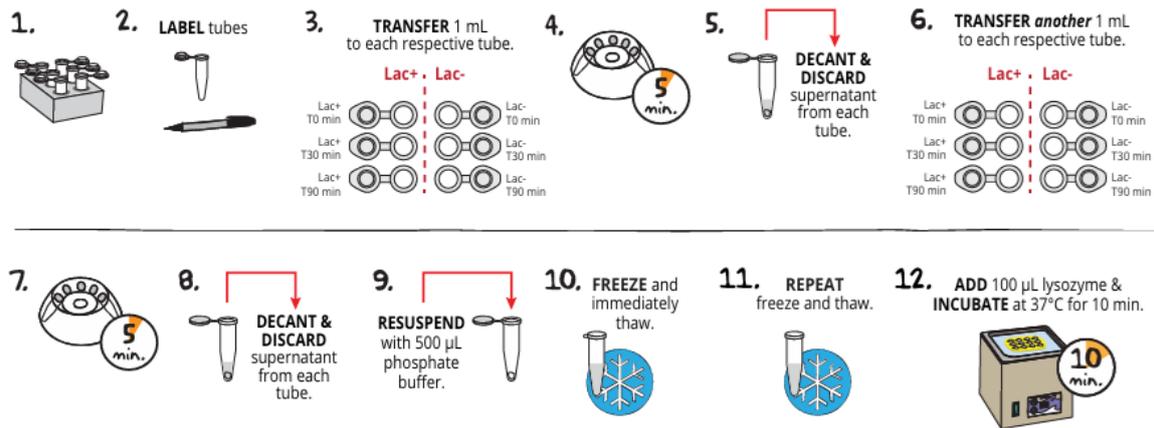


INDUCCIÓN DE β -GALACTOSIDASA Y MUESTREO

7. EXTRAER 3 mL de cada matraz. CONSERVAR estas muestras como punto de tiempo cero para el ensayo de β -galactosidasa. ETIQUETAR los tubos como Lac+/T-0 y Lac-/T-0. COLOCARLOS en hielo para el ensayo.
8. LEER la DO600 y REGISTRAR.
9. A cada uno de los 22 mL restantes de cultivo, AÑADIR 22 μ L de IPTG como inductor de la actividad de β -galactosidasa.
10. RETORNAR los cultivos a la incubadora con agitación a 37°C durante 30 minutos.
11. Después de 30 minutos, EXTRAER 3 mL de cada cultivo y COLOCARLOS en un tubo de 13 x 100 mm. ETIQUETAR los tubos como Lac+/T-1 y Lac-/T-1. COLOCARLOS en hielo.
12. LEER la DO600 y REGISTRARLA (anotar el resultado obtenido en la libreta de trabajo).
13. RETORNAR los cultivos restantes (19 mL) a la incubadora con agitación a 37°C.

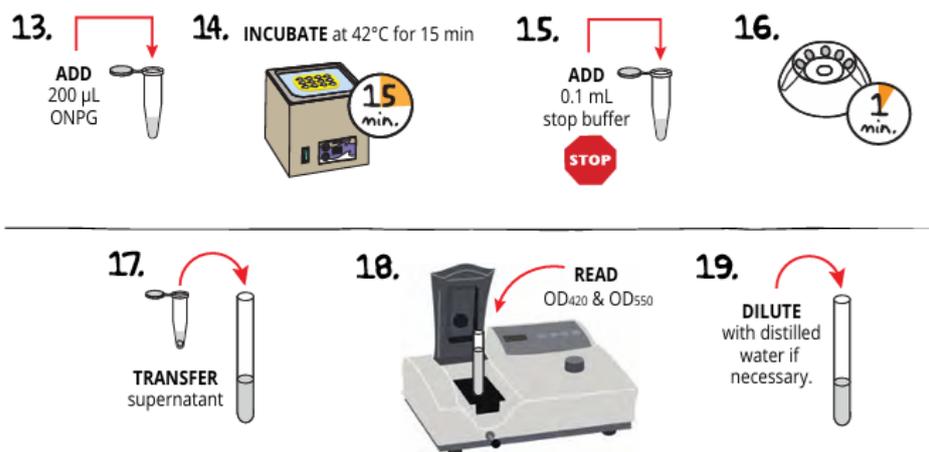
PASOS OPCIONALES 14-16:

14. Para obtener mejores resultados, después de 60 minutos adicionales, EXTRAER 3 mL de cada cultivo y COLOCAR en un tubo de 13 x 100 mm. ETIQUETAR los tubos como Lac+/T-2 y Lac-/T-2. COLOCARLOS en hielo.
15. LEER la DO600 y REGISTRARLA (anotar el resultado obtenido en la libreta de trabajo).
16. RETORNAR los cultivos (16 mL) del matraz a la incubadora con agitación a 37°C.



ENSAYO DE β -GALACTOSIDASA

1. PREPARAR los tubos de ensayo colocando seis (6) tubos de microcentrífuga de 1,5 mL en una gradilla.
 2. ETIQUETAR los 6 tubos:
 - Lac+ / T0 min Lac- / T0 min
 - Lac+ / T30 min Lac- / T30 min
 - Lac+ / T90 min Lac- / T90 min
 3. TRANSFERIR 1 mL de los cultivos en hielo de cada muestra a cada tubo de ensayo.
 4. CENTRIFUGAR las células durante 5 minutos en un tubo de microcentrífuga para sedimentarlas.
 5. DECANTAR y DESECHAR el sobrenadante.
 6. TRANSFERIR otro mL de los cultivos en hielo a cada tubo de ensayo.
 7. CENTRIFUGAR las células de nuevo durante 5 minutos para sedimentarlas.
 8. DECANTAR y DESECHAR el sobrenadante y CONSERVAR cada pellet.
 9. RESUSPENDER los pellets en 500 μ L de tampón fosfato (A3).
 10. CONGELAR la suspensión hasta que esté sólida y descongelarla inmediatamente.
- NOTA:** Las células se pueden congelar rápidamente en hielo seco o extendiendo los tubos (en posición horizontal) en un congelador a -20°C . Las células se pueden descongelar a temperatura ambiente o mediante una breve incubación en baño maría a 42°C (el tiempo suficiente para descongelar).
11. REPETIR la congelación y descongelación una segunda vez.
 12. AÑADIR 100 μ L de lisozima a cada tubo e INCUBAR a 37°C durante 10 minutos.



13. AÑADIR 200 µL de ONPG a cada tubo de ensayo.
14. INCUBAR los tubos de ensayo durante 15 minutos en un baño de agua a 42°C.
15. AÑADIR 0,1 mL de tampón de parada (Na₂CO₃) para detener las reacciones.
16. CENTRIFUGAR los tubos en una microcentrífuga durante 1 minuto para sedimentar las células.
17. Para cada tubo, TRANSFERIR el sobrenadante transparente a un tubo o cubeta limpios y ETIQUETARLOS adecuadamente.
18. USAR agua destilada como blanco. LEER DO₄₂₀ y DO₄₂₀.
19. Si la lectura es superior a 0,8, DILUIR con agua destilada y REGISTRAR el factor de dilución.
20. DETERMINAR las unidades de actividad enzimática. Las unidades se definen como unidades Miller según la siguiente ecuación.

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

Donde:

- La DO₄₂₀ y la DO₅₅₀ se leen de la reacción ONPG.
- La DO₆₀₀ 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 ml.

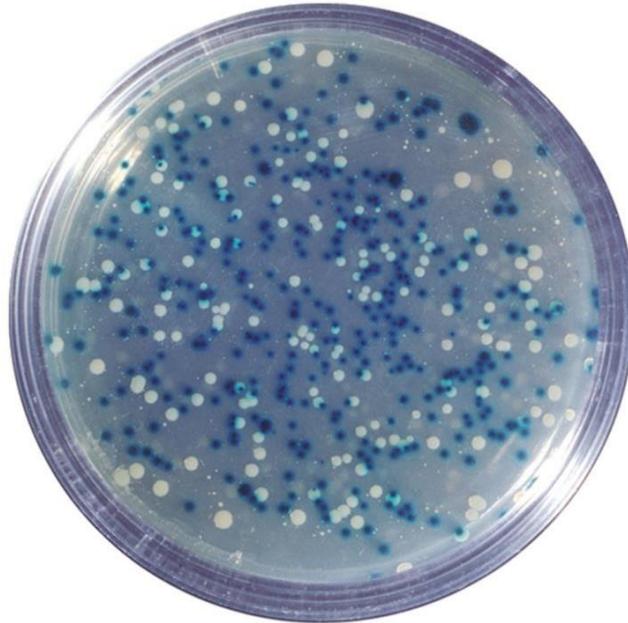
OBSERVACIONES:

La lectura a 420 nm representa la absorbancia combinada del O-nitrofenol y la dispersión de la luz por materiales particulados, como los restos celulares. La absorbancia a 550 nm corrige la dispersión de la luz sin la contribución de la reacción del O-nitrofenol. La dispersión de la luz a 420 nm es igual a (-1,75 x DO₅₅₀).

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

5. RESULTADOS Y PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

5.1 Resultados



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

5.2 Preguntas

Responder las siguientes preguntas de estudio en la libreta de laboratorio o en una hoja de trabajo aparte.

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 desnaturizará 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.

6. GUÍA DEL PROFESOR

¡¡ATENCIÓN!! NOTA 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.

6.1 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-.

6.2 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.

6.3 Tiempo requerido (aproximado)

1. Tras preparar la ligadura, el MÓDULO I requiere una incubación de 1 hora. El experimento puede detenerse temporalmente tras completar el MÓDULO I y reanudarse posteriormente. Los resultados experimentales no se verán afectados si se siguen las instrucciones indicadas en el apartado "Punto de parada opcional" al final del módulo.
2. El MÓDULO II incluye una incubación de 30 minutos en baño maría a 37 °C. También se incluye una incubación de las placas durante la noche a 37 °C antes de

que los estudiantes puedan realizar el MÓDULO II y antes de pasar al MÓDULO III.

3. El MÓDULO III requiere una incubación del cultivo de 4 a 5 horas para permitir el crecimiento de las colonias transformantes. Esto requiere que el instructor o los estudiantes preparen los cultivos para la incubación (a 37°C con agitación) antes de la inducción de la β -galactosidasa y el muestreo, seguido del ensayo enzimático.

Preparation For:	What to do:	When:	Time Required:
Module I	Prepare reagents for ligation	Before the lab period.	15 min.
Module II	Prepare LB agar plates	2-7 days before use	1 hour
	Prepare <i>E. coli</i> source plates	The day before the experiment	20 min. to streak plates; 16-18 hours to incubate plates
	Dispense control plasmid, CaCl ₂ , and recovery broth	One day to 30 minutes before performing lab period.	30 min.
	Equilibrate waterbaths at 37°C and 42°C, incubator at 37°C	One to two hours before the experiment.	10 min.
Module III	Preparation of β -Galactosidase assay reagents	The day before (store frozen) or the morning of the activity.	20 min.

Red = Prepare immediately before module. Yellow = Prepare shortly before module. Green = Flexible / prepare up to a week before the module.

6.4 Preparaciones previas de la práctica

Módulo I: Ligación de fragmentos de ADN en pUC8

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

Alternativamente, los estudiantes pueden compartir los tubos de ensayo en un lugar central.

NOTA: Compartir los tubos aumenta el riesgo de derrame o contaminación.

- 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
- 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 μ l de L1, vector de ADN linealizado con Eco RI y fragmentos de ADN
 - 25 μ l de L2, ADN plásmido superhelical de control
 - 50 μ l de L4, Tampón TE
- Mantener todos los tubos en hielo.

PARA EL MÓDULO I

Cada grupo recibirá:

- 1 tubo con 25 μ L de L1, vector de ADN linealizado con Eco RI y fragmentos de ADN
- 1 tubo con 25 μ L de L2, ADN plasmídico superhelicoidal de control

- 1 tubo con 50 μ L de L4, tampón TE

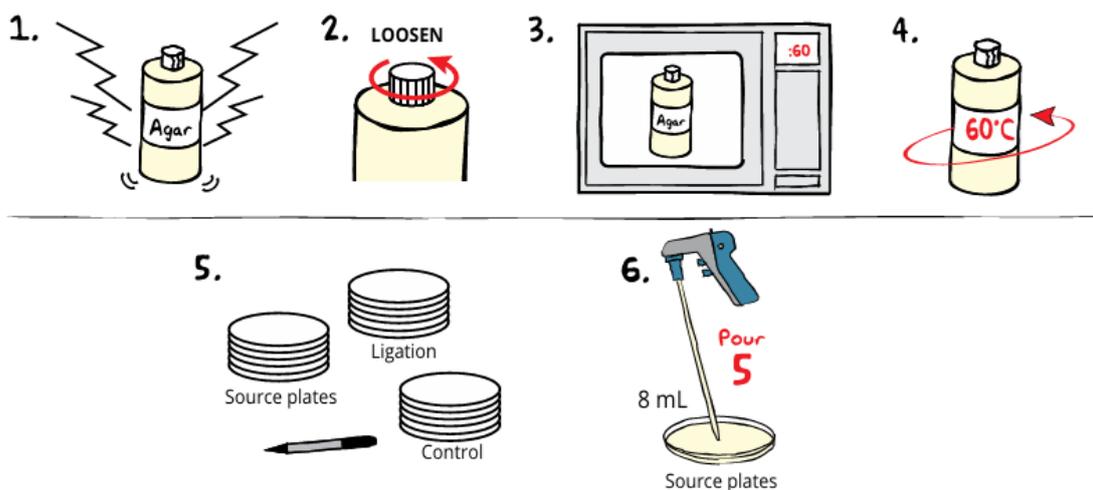
Módulo II: Vertido de agar LB en placas de petri

Para obtener resultados óptimos, prepare las placas dos días antes de sembrarlas y déjelas invertidas a temperatura ambiente. Si se vierten más de dos días antes de su uso, deben conservarse invertidas en el refrigerador. Retire las placas del refrigerador y consérvelas invertidas durante dos días a temperatura ambiente antes de usarlas.

Preparación de los reactivos:

- DESCONGELAR la solución X-Gal (TR3) y el agua estéril (TR5).
- AGREGAR 0,75 mL (750 μ L) de agua estéril (TR5) al tubo que contiene ampicilina (TR1). Agitar enérgicamente para disolver el polvo y colocar en hielo.
- AGREGAR 0,70 mL (700 μ L) de agua estéril (TR5) al tubo que contiene IPTG (TR2). Agitar enérgicamente para disolver el polvo y colocar en hielo.

CALENTAMIENTO DEL AGAR Y VERTIDO EN LAS PLACAS



1. ROMPER el agar ReadyPour™ LB sólido en pequeños trozos apretando y agitando vigorosamente la botella de plástico.

2. AFLOJAR, pero NO RETIRAR, la tapa de la botella de agar ReadyPour™. Esto permite que el vapor se escape durante el calentamiento.

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

PRECAUCIÓN: Si no se afloja la tapa antes de calentar, la botella podría romperse o explotar.

3. CALENTAR el agar ReadyPour™ en el microondas a alta potencia durante 60 segundos para disolverlo. RETIRAR con cuidado la botella del microondas y MEZCLAR girándola. Continuar calentando la solución en intervalos de 30 segundos hasta que el agar se disuelva por completo (la solución de color ámbar debe ser transparente y sin partículas pequeñas).

4. ENFRIAR el agar ReadyPour™ a 60°C girándola con cuidado para facilitar la disipación uniforme del calor.

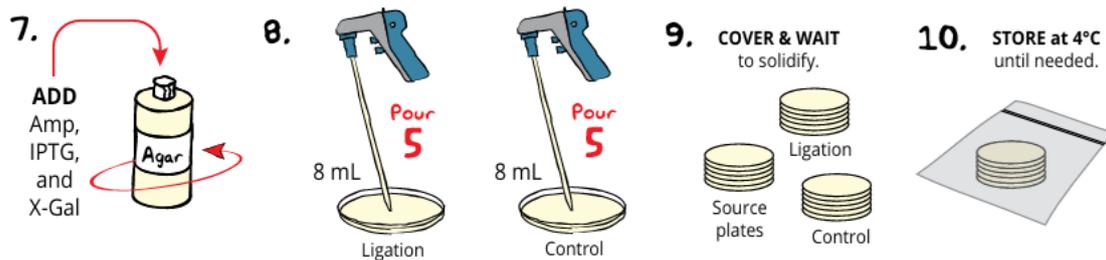
5. Mientras el medio ReadyPour se enfría, ETIQUETAR un total de 15 placas de Petri. ETIQUETAR estas placas en sus mitades inferiores:

5 placas: Placas de origen

5 placas: Ligación

5 placas: Control

6. Una vez que el ReadyPour™ se haya enfriado a 60°C, VERTER 8 ml en cada una de las 5 placas de origen (Consultar la Guía rápida: [Vertido de placas de agar](#)).



7. AÑADIR 0,30 ml de ampicilina (TR1), 0,30 ml de IPTG (TR2) y toda la X-Gal (TR3) al medio con pipetas estériles. AÑADIR LOS REACTIVOS AL AGAR SOLO CUANDO ESTE YA SE HAYA ENFRIADO. MEZCLAR el medio. GUARDAR la ampicilina y el IPTG restantes en el congelador utilizarlos posteriormente en el MÓDULO III.

8. VERTER 8 ml en cada una de las placas restantes (Consulte la Guía rápida: [Vertido de placas de agar](#)).

9. CUBRIR y ESPERAR a que las placas de agar LB se solidifiquen. Para obtener resultados óptimos, dejar las placas a temperatura ambiente durante la noche.

10. CONSERVAR las placas a 4°C hasta que se necesiten. Las placas deben invertirse y colocarse en una bolsa de plástico sellable para evitar que se sequen.

NOTA: Si las placas se preparan con más de dos días de antelación a su uso, deben dejarse en la mesa de trabajo durante la noche para que se solidifiquen y se sequen. Al día siguiente, guardar las placas invertidas en una bolsa de plástico en el refrigerador (4 °C). Retirar las placas del refrigerador y calentarlas en una incubadora a 37 °C durante 30 minutos antes de usarlas.

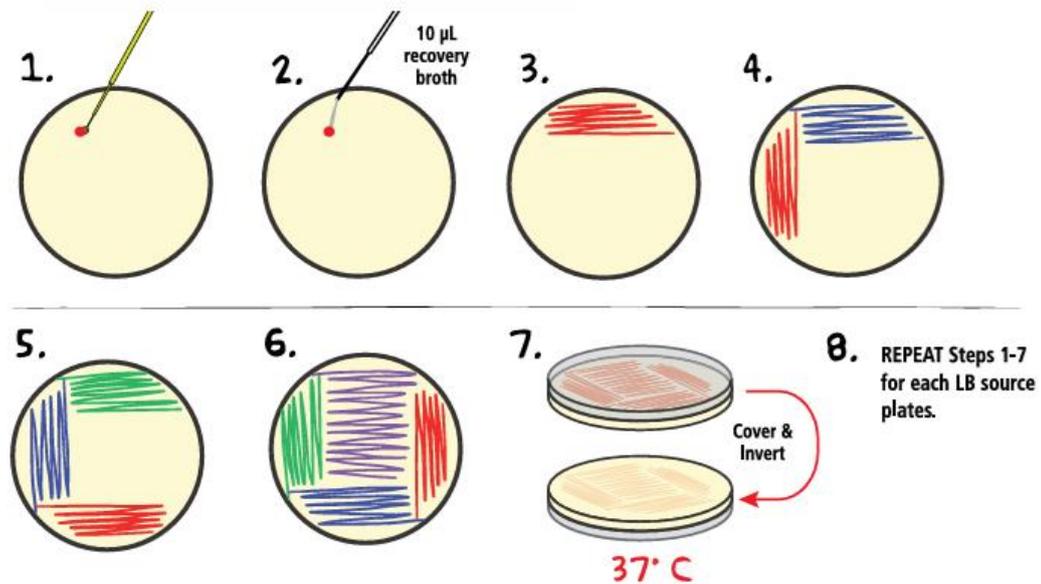
NOTA: Agregar ampicilina, IPTG y X-Gal al medio enfriado. El medio caliente provocaría una rápida descomposición de la ampicilina.

REFERENCIA RÁPIDA: VERTIDO DE PLACAS DE AGAR

- Utilizar una pipeta estéril de 10 mL con bomba dosificadora para transferir el volumen de medio designado a cada placa de Petri. Pipetear con cuidado para evitar la formación de burbujas.
- Mover la placa de Petri de un lado a otro para cubrirla por completo.
- Si el medio fundido contiene burbujas, se pueden eliminar pasando una llama por su superficie.
- Cubrir la placa de Petri y dejar que el medio se solidifique.

PREPARACIÓN DE LAS PLACAS DE FUENTE DE E. COLI

Para obtener mejores resultados, las placas de fuente de E. Coli deben sembrarse entre 18 y 22 horas antes del experimento. Prepararlas con más de 24 horas de antelación al laboratorio puede comprometer el éxito del experimento de transformación.



1. RETIRAR una BactoBead™ del vial utilizando un asa de inoculación estéril. Utilizando una técnica aséptica, TRANSFERIR la perla al borde de una placa de Petri grande (placa de fuente LB) y volver a colocar la tapa. TAPAR el vial inmediatamente después de usarlo para limitar la exposición a la humedad del aire.
2. DISOLVER la perla añadiendo 10 µL de caldo de recuperación.
3. RAYAR con el asa de inoculación realizando un movimiento de ida y vuelta a través de la BactoBead™ disuelta para crear una primera raya en la parte superior de la placa. Evitar perforar el medio con el asa.
4. GIRAR la placa 90°. Pasar el asa por la línea primaria una vez y luego zigzaguear sobre una parte limpia del agar varias veces para crear una línea secundaria.
5. GIRAR la placa. Pasar el asa por la línea secundaria una vez y luego zigzaguear sobre una parte limpia del agar varias veces.
6. GIRAR la placa una vez más. Pasar el asa por la tercera línea y luego zigzaguear sobre el agar limpio restante. Esto debería producir colonias aisladas.
7. Cubrir la placa e incubar en posición invertida a 37°C durante 18-22 horas. Si no se dispone de una incubadora, las colonias se formarán a temperatura ambiente en aproximadamente 24-48 horas, aunque la eficiencia de la transformación disminuirá.
8. REPETIR los pasos anteriores para cada placa de LB, utilizando un asa nueva para cada placa.

NOTA: Si el crecimiento en las placas es intenso (es decir, un césped de colonias), indicar a los estudiantes que transfieran un asa llena de células a la solución de CaCl₂.

OTRAS PREPARACIONES PARA EL EXPERIMENTO DE TRANSFORMACIÓN

- Día del laboratorio
 1. DISPENSAR 1 mL de CaCl₂ (TR4) en tubos de microcentrífuga etiquetados como "CaCl₂" para cada grupo y colocarlos en hielo.
 2. DEJAR tiempo suficiente para que se equilibren los baños de agua y las estufas de incubación.
 3. REUNIR los reactivos y materiales para los 5 grupos de laboratorio.

PARA EL MÓDULO II

Cada grupo debe recibir:

- 1 placa de ligadura
- 1 placa de control
- 1 placa de fuente de E. coli
- 1 reacción de ligadura del Módulo I
- 1 control de ligadura del Módulo I
- 1 tubo de 1 mL de CaCl₂

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

1. DESCONGELAR la ampicilina (TR1). PREPARAR el medio de cultivo añadiendo 0,4 mL de ampicilina al medio de cultivo LB (A1).
2. OBTENER 10 matraces estériles (esterilizados en autoclave) de 125 mL y alícuotar 25 mL de medio de cultivo con ampicilina en cada uno.
3. ORGANIZAR a los estudiantes para que inoculen los cultivos de ensayo de 4 a 5 horas antes de la práctica de laboratorio.

Alternativamente, el instructor puede inocular los cultivos. Los cultivos pueden cultivarse hasta la fase exponencial temprana ($DO_{540} = 0,3$ a $0,5$) y conservarse en hielo hasta 4 horas.

4. AÑADIR todo el tampón de fosfato de sodio (A3) a 27 mL de agua destilada. ALICUTAR 5,5 mL para cada grupo en tubos tapados.
5. ALICUOTAR 1,5 mL de tampón de parada (A5) en tubos con tapa para cada grupo.
6. DISOLVER el ONPG (A4-ortonitrofenalgalactopiranosido) en 20 mL de agua destilada (puede ser difícil disolver el ONPG). ALICUOTAR 3 mL en tubos con tapa y conservar en hielo. La concentración final es de 4 mg/ml de ONPG.
7. DESCONGELAR el IPTG (TR2) y alícuotar 60 μ L en 5 microtubos de ensayo.
8. DISOLVER la lisozima (A2) en 10 mL de agua destilada y dispensar 1,5 mL en 5 tubos etiquetados como "lisozima". Conservar en hielo.
9. PREPARAR un baño a 42 °C para la última parte del MÓDULO III.

Análisis cualitativo de la reacción de β -galactosidasa

Los estudiantes también pueden usar las placas del experimento de transformación. Seleccionar un número igual de colonias azules y blancas (15-20 colonias cada una) y colocarlas en dos tubos de microcentrífuga. Suspenderlas en 500 μ L de tampón fosfato y seguir el protocolo descrito en la página 19, comenzando por el paso 5 del **ENSAYO DE β -GALACTOSIDASA**.

PARA EL MÓDULO III

Cada grupo recibirá:

- 2 matraces con 25 mL de medio de cultivo + ampicilina
- Asas estériles
- 60 μ L de IPTG diluido (TR2)
- Tubos de 5 mL
- Seis tubos de microcentrífuga de 1,5 mL

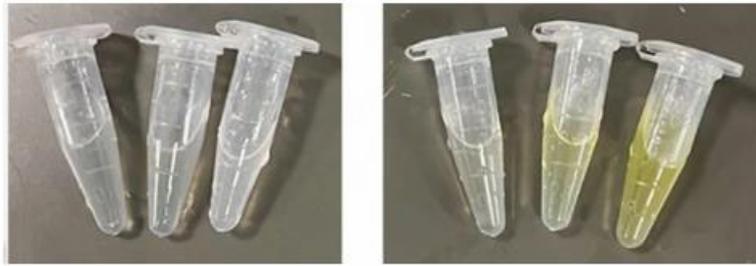
- 5,5 mL de tampón de fosfato diluido (A3)
- 1,5 mL de tampón de parada diluido (A5)
- 3 mL de ONPG diluido (4 mg/mL)
- 1,5 mL de lisozima diluida (A2)
- Acceso a una incubadora con agitación a 37°C
- Acceso a baños de agua a 37°C y 42°C
- Acceso a una microcentrífuga
- Cubetas + acceso a un espectrofotómetro (OD420, OD550, OD600)

6.5 Resultados y análisis del experimento

Resultados MÓDULO II



Resultados MÓDULO III



β -gal Assay: Lac- samples on left, Lac+ samples on right.

OD600			
	T0	T1	T2
Lac+	.446	.492	.667
Lac-	.796	.990	1.406

OD550			
	T0	T1	T2
Lac+	.09	.111	.146
Lac-	.128	.314	.384

OD420			
	T0	T1	T2
Lac+	.230	.720	1.435
Lac-	.205	.492	.575

APENDICE A

GUÍA PARA LA SOLUCIÓN DE PROBLEMAS CON LA TRANSFORMACIÓN

PROBLEMA	CAUSA	SOLUCIÓN
Crecimiento celular deficiente en la placa de origen	Tiempo de incubación demasiado corto	Continuar incubando la placa de origen a 37 °C durante un total de 18 a 22 horas
	Antibiótico añadido a la placa de origen	Al verter las placas, asegurarse de añadir los antibióticos y aditivos en el paso correcto
	Temperatura de incubación incorrecta	Usar un termómetro para comprobar la temperatura de la incubadora. Ajustar la temperatura a 37 °C si es necesario
Se observan colonias satélites en la placa de transformación	Concentración incorrecta de antibióticos en las placas	Asegurarse de que se haya añadido la concentración correcta de antibiótico a las placas. Asegurarse de que ReadyPour se haya enfriado a 60°C antes de añadir el antibiótico
	El antibiótico se ha degradado	Asegurarse de que ReadyPour se haya enfriado a 60°C antes de añadir el antibiótico
	Las placas se incubaron demasiado tiempo	Incubar las placas durante la noche a 37°C (18-22 horas)
Las colonias aparecieron manchadas en la placa de transformación	Las placas que contenían transformantes se invirtieron demasiado pronto	Dejar que las células se absorban completamente en el medio antes de invertir las placas
	Las placas experimentales estaban demasiado húmedas	Después de verter las placas, dejarlas secar durante la noche a temperatura ambiente. Como alternativa, calentar las placas a 37°C durante 30 minutos antes de sembrar las células

PROBLEMA	CAUSA	SOLUCIÓN
No se observaron colonias individuales en las placas de cultivo	Las células no se sembraron correctamente en cuadrantes	Pedir a los estudiantes que transfieran una pequeña cantidad de bacterias al CaCl ₂
No se observan colonias en las placas de transformación	No se añadió ADN plasmídico a la mezcla de transformación	Asegurarse de que el ADN plasmídico se haya añadido al tubo de transformación
		Asegurarse de que las pipetas se utilicen y estén correctamente calibradas.
	Se utilizaron células huésped incorrectas para la transformación	Confirmar que se utilizó la cepa bacteriana correcta para la transformación
	Las células no se sometieron a un choque térmico adecuado	Asegurarse de que la temperatura fue de 42°C y que el paso de choque térmico se llevó a cabo durante exactamente 45 segundos
	Antibióticos incorrectos	Asegurarse de que se utilizó el antibiótico correcto
	Las células no se resuspendieron bien en CaCl ₂	Resuspender completamente las células en el CaCl ₂ , sin dejar grumos celulares (agitar con vórtex o pipetear de arriba a abajo para resuspender completamente las células). La suspensión celular debe estar turbia

PROBLEMA	CAUSA	SOLUCIÓN
Baja eficiencia de transformación	No se utilizaron suficientes células para la transformación	Extraer más colonias de la placa de origen (5 colonias de 1-1,5 mm de ancho por 500 µl de CaCl ₂)
	Las placas de origen se incubaron durante más de 20 horas	Es importante que las células de origen no crezcan más de 20 horas. Guardar en nevera las placas después de 20 horas si es necesario. No utilizar placas de origen que hayan estado incubadas más de 24 horas (refrigeradas o no)
	Placas experimentales demasiado antiguas	Prepare la placa de transformación y úsela poco después de la preparación
	Las células no se resuspendieron bien en CaCl ₂	Resuspender completamente las células en el CaCl ₂ , sin dejar grumos celulares (agitar con vórtex o pipetear de arriba a abajo para resuspender completamente las células). La suspensión celular debe estar turbia
	La solución de CaCl ₂ no está lo suficientemente fría	Enfriar previamente el CaCl ₂ antes de añadir las células
	La solución de células no está lo suficientemente fría	Prolongar la incubación de la suspensión celular en hielo de 10 a 15 minutos (no debe exceder los 30 minutos en total). Esto aumenta la eficiencia de la transformación
	Se añadió demasiado o muy poco ADN plasmídico a la suspensión celular	Asegurarse de que se haya añadido el volumen correcto de plásmido al tubo de transformación. Si se utilizan micropipetas, asegurarse de que los alumnos practiquen el uso de las pipetas

	Las células no se sometieron a un choque térmico adecuado	Asegurarse de que la temperatura fuera de 42°C y de que el choque térmico no duró más de 45 segundos
	Los antibióticos se degradaron antes de verter en las placas	Asegurarse de que ReadyPour se enfrió a 60°C antes de añadir el antibiótico
	Concentración incorrecta de antibióticos	Asegurarse de que se haya utilizado la concentración correcta de antibiótico en las placas