TRANSFORMACIÓN BACTERIANA CON PROTEÍNAS FLUORESCENTES VERDES

Ref. TRANS2 **v. 223-EDV231009#06-2025**

10 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

En este experimento los estudiantes explorarán el proceso biológico de la transformación bacteriana utilizando células bacterianas de E.coli y plásmidos.
Al finalizar la actividad los estudiantes tendrán experiencia observando y analizando los rasgos adquiridos por las células bacterianas transformadas (resistencia a la ampicilina y emisión de fluorescencia).

2. COMPONENTES para 10 grupos de estudiantes

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
BactoBeadsE.coli GFP Host	4ºC
Supercoiled pFluoroGreen Plasmid DNA	Congelador
Ampicilina	Congelador
IPTG	Congelador
$CaCl_2$	Congelador
Growth Additive	Congelador
Solución de competencia celular	Congelador

2.1 Material suministrado

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

2.2 Material requerido y no suministrado

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

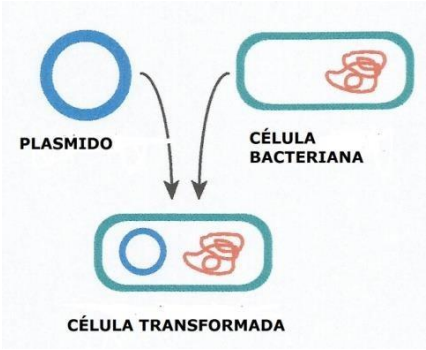
- Microondas.
- Centrifuga (opcional, para el procedimiento de transformación mejorado).

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

3. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

El ADN puede ser transferido entre bacterias

En la naturaleza el ADN es trasferido entre bacterias utilizando 2 métodos: transformación y conjugación. En la transformación, una bacteria adquiere DNA exógeno del ambiente. En contraste, la conjugación requiere el contacto directo entre dos bacterias, un trozo de ADN es copiado en una célula (donante) y luego es transferido a otra célula (receptor). En ambos casos, la bacteria adquiere nueva información genética que es estable y heredable.

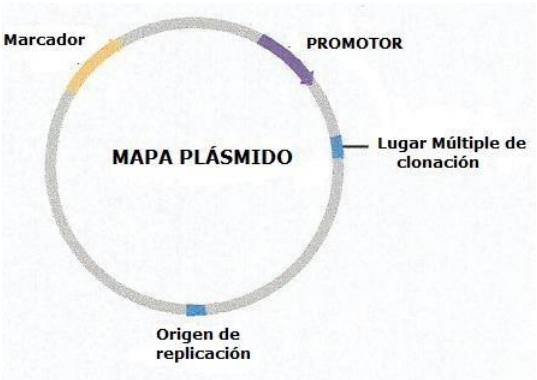


Transformación bacteriana

Ingeniería genética utilizando la tecnología del ADN recombinante

Muchas bacterias poseen genes no esenciales en pequeñas piezas circulares de doble cadena de ADN, además de su ADN cromosómico. Estas piezas de ADN, llamadas plásmidos, permiten a las bacterias intercambiar beneficios. Por ejemplo, el gen que codifica para la β-lactamasa, un enzima que proporciona resistencia a los antibióticos puede estar codificado en plásmidos. Células transformadas secretan β-lactamasa en el medio proporcionando resistencia al antibiótico ampicilina.De este modo, las bacterias que expresan este gen pueden crecer en presencia de ampicilina. Además, pequeñas colonias satélites no transformadas pueden crecer alrededor de las bacterias transformadas porque indirectamente son protegidas por la actividad β-lactamasa.

La tecnología del ADN recombinante permite a los científicos colocar genes de diferentes orígenes en los plásmidos bacterianos. Estos plásmidos especiales reciben el nombre de vectores y tiene as siguientes características:



1. Origen de replicación: Secuencia de ADN a partir de la cual la bacteria puede iniciar la copia del plásmido.

2. Lugar Múltiple de clonación: Una corta secuencia de ADN que contiene diferentes lugares únicos que reconocen los enzimas de restricción y permiten a los científicos la introducción de genes específicos en los plásmidos.
3. Promotor: Unasecuencia de ADN que está típicamente localizada antes de la secuencia que codifica el gen. El promotor recluta la ARN polimerasa al comienzo de la secuencia del gen donde comienza la transcripción.
4. Marcador selectivo: Un gen que codifica para la resistencia de un específico antibiótico, normalmente ampicilina, kanamicina o tetraciclina, Cuando se utiliza un medio selectivo, sólo las células que contienen el marcador crecerán, de forma que permite al investigador identificar fácilmente las células que han sido transformadas con éxito.

Eficiencia de la transformación
En la práctica la transformación es altamente ineficiente, sólo una de cada 10.000 células incorpora con éxito el ADN plasmídico. Si las bacterias son transformadas con un plásmido que contiene un marcador selectivo y sembradas en placas de agar con un medio selectivo y no-selectivo, observaremos diferentes resultados. Las placas de agar con un medio no-selectivo permitirán crecer a las bacterias transformadas y las bacterias no transfomadas. Por el contrario, en las placas de agar con el medio selectivo sólo crecerán las bacterias que expresan el marcador selectivo.

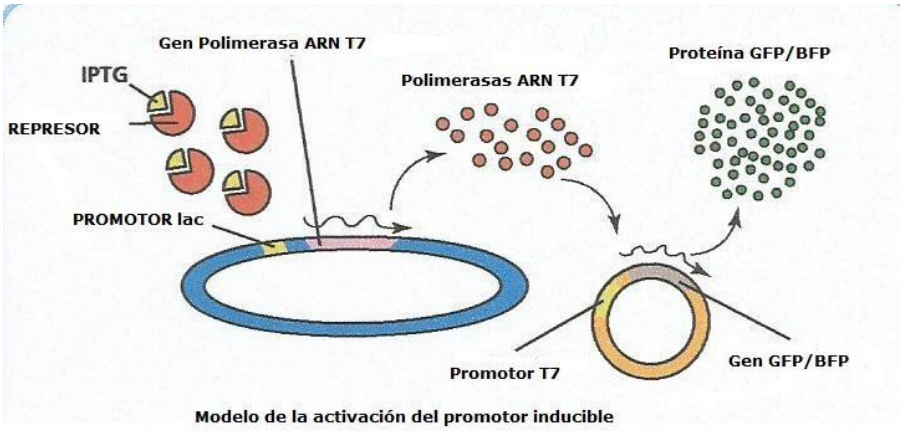
Puesto que cada colonia se origina a partir de una única célula transformada, nosotros podemos calcular la eficiencia de transformación, o el número de células transformadas por microgramo (μg) de ADN plasmídico. Por ejemplo, si 10 nanogramos (0.01 μg) de plásmido se utilizaron para transformar 1 ml de células, y sembramos 0.1 ml de la mezcla y obtenemos 100 colonias, obtenemos una eficiencia de transformación del 1 x 10^5células transformadas por μg de ADN plasmídico. La eficiencias de transformación generalmente oscilan entre 1 x 10^5 hasta 1 x 10^8.

$$\frac{\text{Número de cél.transformadas}}{\mu\text{g de ADN}} \times \frac{\text{volumen final (ml)}}{\text{volumen siembra}} = \text{Número células transformadas por } \mu\text{g}$$

$$\frac{100 \text{ cél.transformadas}}{0{,}01 \ \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{ ml}}{0.1 \text{ ml}} = 100.000 \ 1 \times 10^5 \text{ transformadas por } \mu\text{g}$$

Proteínas fluorescentes
El plásmido que vamos a utilizar para transformar nuestra E.coli ha sido elaborado para contener las secuencias de ADN de la Proteína fluorescente verde (GFP). La proteína GFPtiene unos aproximados 27 kilodaltons de tamaño y posee la capacidad de absorber la luz azul y emitir luz verde como respuesta. Esta actividad se conoce como fluorescencia.

Control de la expresión génica
Los científicos pueden regular la expresión de las proteínas recombinantes utilizando un interruptor genético llamado promotor inducible.



Modelo de la activación del promotor inducible

Estas secuencias permiten un control preciso de la expresión génica debido a que el gen sólo estarán en "on" en presencia de pequeñas moléculas como arabinosa, tetraciclina o IPTG.
En este experimento, utilizaremos un promotor inducible para regular la expresión de la proteína GFP . La célula bacteriana ha sido genéticamente modificada para contener el gen especial de la ARN polimerasa (T7), el cual está controlada por el promotor lac. Bajo condiciones normales, la bacteria dispone de una proteína llamada represor lac, la cual se une al promotor y bloquea la expresión de la polimerasa T7.Sin la polimerasa T7, las proteínas fluorescentes no pueden ser expresadas y no emitirán fluorescencia. No obstante, cuando se añade el IPTG, el represor lac es inactivado y la polimerasa T7 expresada. Esta polimerasa específicamente reconoce el promotor de la proteína fluorescente que contiene el plásmido y transcribe grandes cantidades de ARNm. Finalmente, el ARNm es traducido para producir las proteínas GFP y las células emitirán fluorescencia.

4. INDICACIONES PREVIAS DEL EXPERIMENTO

En este experimento, células E.coli competentes serán transformadas con plásmidos pFluoroGreen , este plásmido contienen los genes para la ampicilina y la proteína fluorescente GFP. Las células transformadas serán seleccionadas utilizando placas de LB con ampicilina, y se calculará la eficiencia de transformación. Además, algunas células se expondrán al IPTG y otras no, por tanto, las proteínas GFP sólo serán expresadas en presencia de IPTG.

4.1 Precauciones

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

2. Llevar gafas y guantes de laboratorio mientras se trabaja.

3. EL agar se debe calentar y fundir lo cual puede ser peligroso si se realiza incorrectamente.

4. **NO PIPETEAR CON LA BOCA**, utilizar los dispositivos adecuados.

5. Lavarse las manos con jabón y agua después de haber trabajado en el laboratorio.

6. Las bacterias E.coli utilizadas en este experimento no son patógenas para el ser humano. A pesar de ello, es una buena práctica seguir los siguientes consejos para el manejo y desecho de los materiales contaminados con bacterias:

a) Limpiar las superficies de trabajo con un desinfectante de laboratorio o una solución 10% de lejía.

b) Todos los materiales que entran en contacto con las bacterias deberían ser desinfectados antes de tirar a la basura. Desinfectar los materiales lo antes posibles después de su uso, bien utilizando un autoclave a 121ºC durante 20 minutos, o bien, por inmersión de los materiales durante una noche en una solución al 10 % de lejía.

4.2 Cuadernos de Laboratorio

Los científicos documentan todo lo que sucede durante un experimento, incluyendo las condiciones experimentales, las reflexiones y observaciones durante el experimento y, por supuesto, los datos recopilados. Hoy documentarás tu experimento en un cuaderno de laboratorio o en una hoja de trabajo aparte.

Antes de comenzar el experimento:

- Lee atentamente la introducción y el protocolo. Usa esta información para formular una hipótesis para este experimento.
- Predice los resultados de tu experimento.

Durante el experimento:

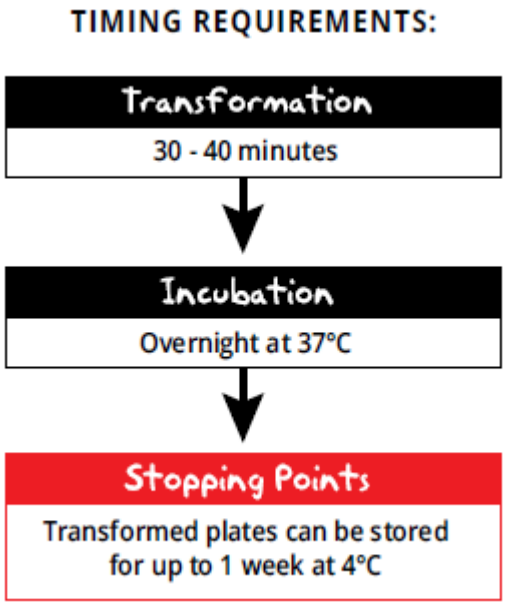
- Registra tus observaciones en tu cuaderno de laboratorio o en la Hoja de Trabajo para el Estudiante en el Apéndice E.
- Registra cualquier dificultad que hayas encontrado durante el experimento.

Después del experimento:

- Interpreta los resultados: ¿tus datos respaldan o contradicen tu hipótesis?
- Si repitieras este experimento, ¿qué cambiarías? Revisa tu hipótesis para reflejar este cambio.

4.3 Tiempos requeridos

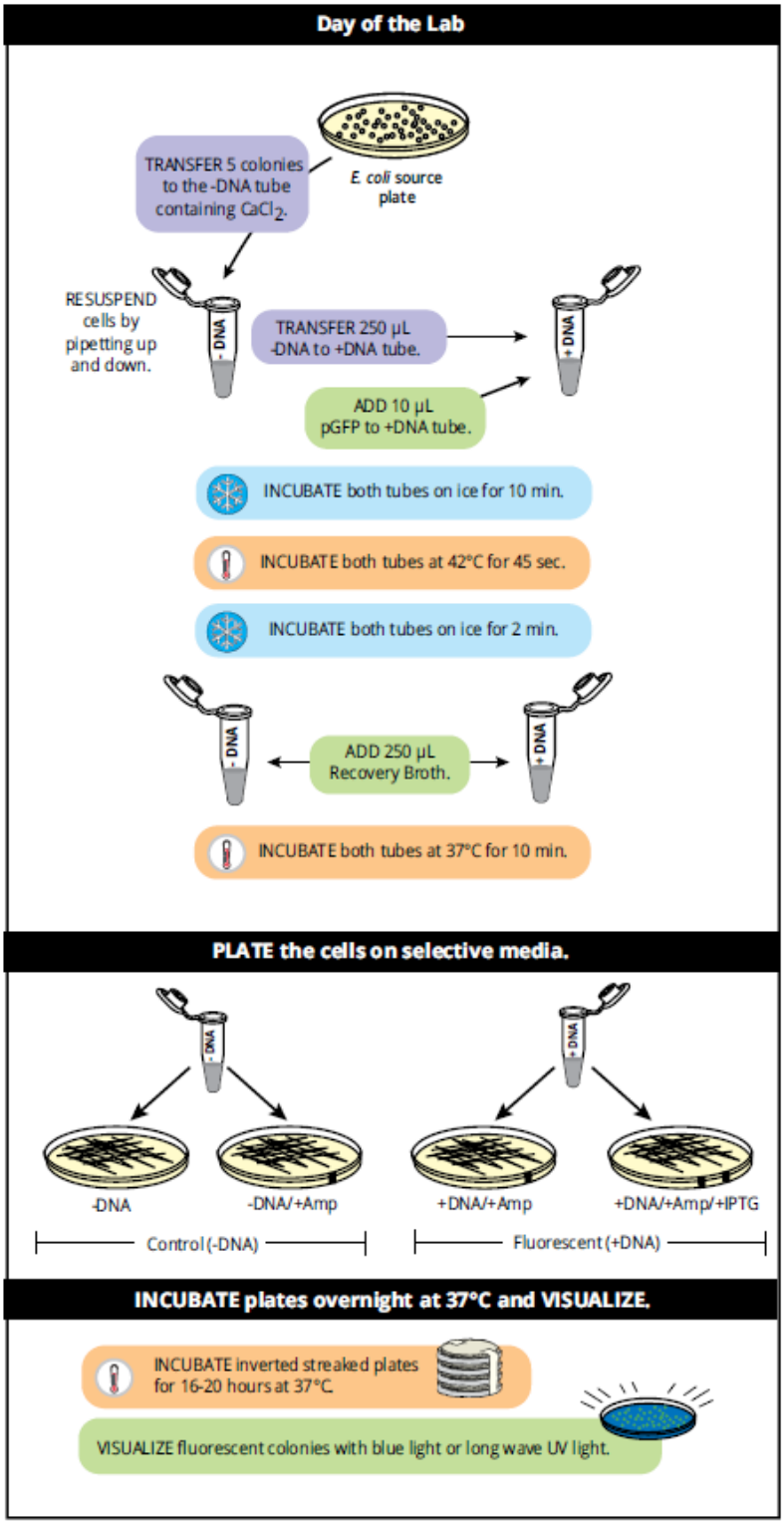
Los tiempos requeridos indicados en las diferentes etapas de la práctica son aproximados.



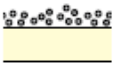
5. ESQUEMA DEL EXPERIMENTO

5.1 Resumen y diagrama del experimento

En este experimento, se transforma la bacteria huésped E. coli con pGFP. Las bacterias se cultivan durante 18-22 horas en placas de agar LB, se recolectan con un asa estéril y se competen en $CaCl_2$. A continuación, se añade el plásmido a la mitad de las células antes de someterlas a un breve choque térmico. Finalmente, se deja que las bacterias se recuperen brevemente antes de sembrarlas en placas de agar LB e incubarlas a 37 °C durante la noche.



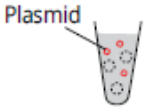
Explain what the *E. coli* are doing:


On source plate

On loop

In $CaCl_2$

Resuspended in $CaCl_2$

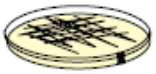


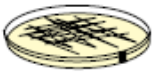
Before heat shock

During heat shock

After heat shock

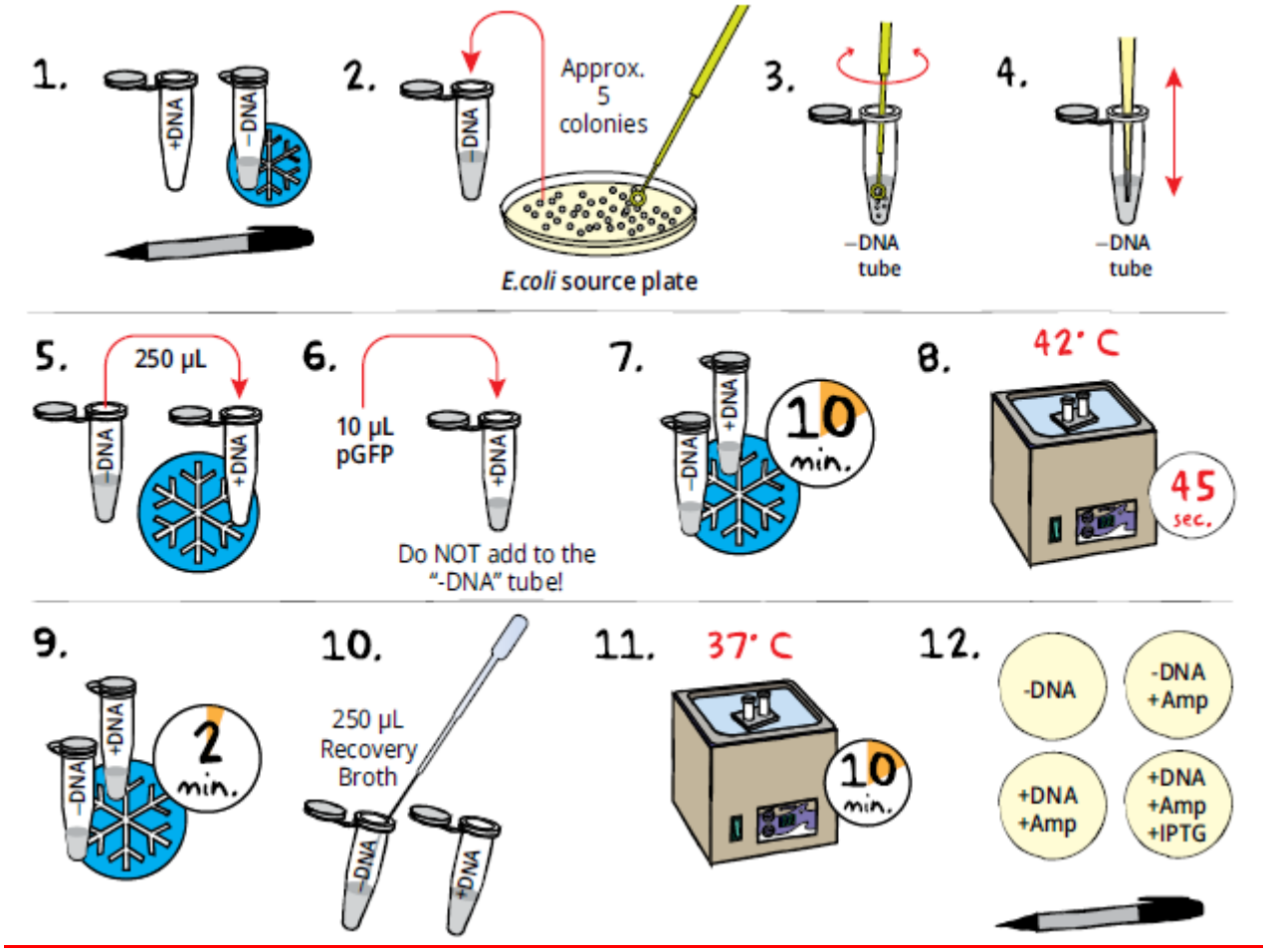
-DNA


-DNA/+Amp


+DNA/+Amp

+DNA/+Amp/+IPTG

5.2 Transformación de E. coli con proteína fluorescente verde



IMPORTANTE

Para obtener los mejores resultados, se deben asegurar que las células estén completamente resuspendidas.

IMPORTANTE

Para obtener los mejores resultados, se deben asegurar que el $CaCl_2$ esté helado y que las células se transfieran rápidamente del hielo a 42°C y luego vuelvan inmediatamente al hielo. Se deben respetar los tiempos exactamente.

Se deben asegurar que las etiquetas sean pequeñas o de un tamaño adecuado.

1. ETIQUETAR el tubo de microcentrífuga que contiene $CaCl_2$ helado como "-ADN" y el tubo de microcentrífuga vacío como "+ADN".

2. Con un asa de inoculación estéril, TRANSFERIR aproximadamente 5 colonias bien aisladas (cada colonia debe tener un tamaño aproximado de 1-1,5 mm) de la placa de E. coli al tubo "-ADN".

3. GIRAR el asa entre los dedos para liberar las células. Se debe ASEGURAR que se hayan desprendido todas las células del asa.

4. RESUSPENDER las células bacterianas en la solución de $CaCl_2$ pipeteando arriba y abajo hasta que no se vean grumos y la suspensión celular se vea turbia.

5. TRANSFERIR 250 µL de la suspensión celular al tubo "+ADN". COLOCAR ambos tubos en hielo.

6. AÑADIR 10 µL de pGFP al tubo "+ADN" y mezclar con movimientos suaves. NO añadir el plásmido al tubo "-DNA".
7. INCUBAR los tubos en hielo durante 10 minutos.

8. COLOCAR los tubos de transformación en un baño maría a 42°C durante exactamente 45 segundos.

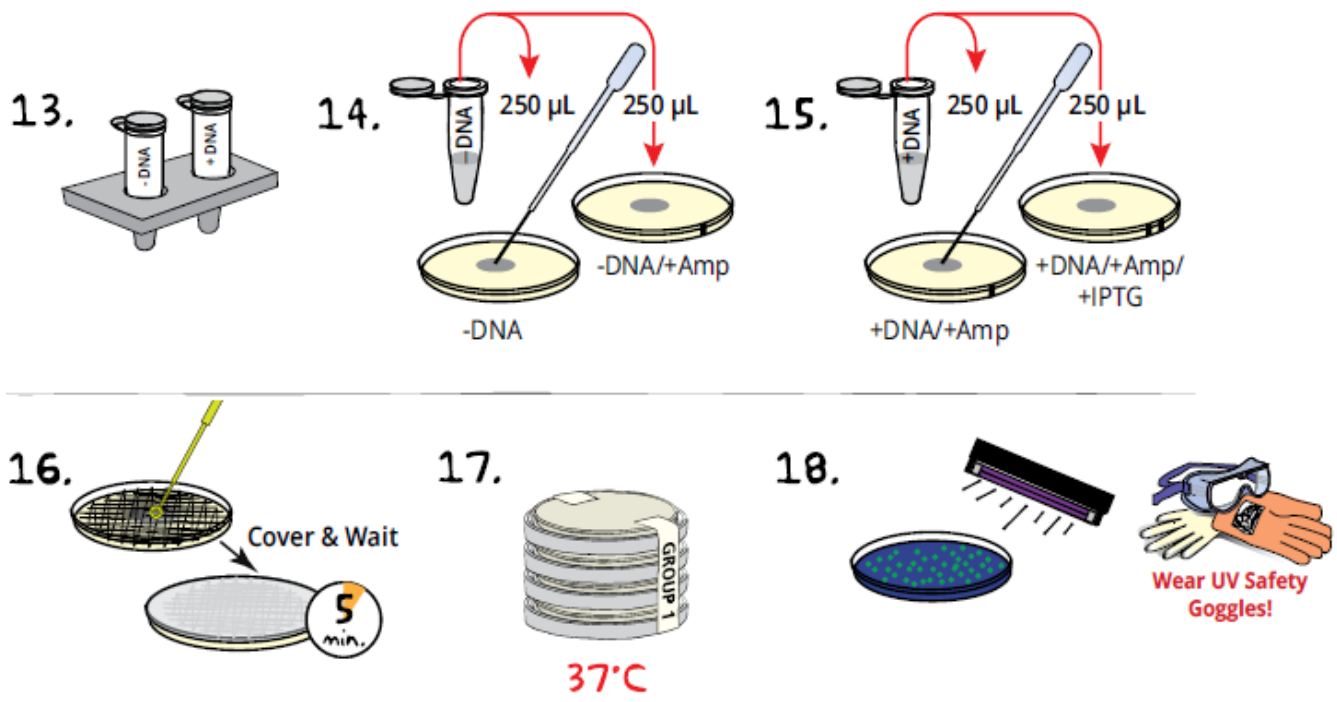
9. REGRESAR los tubos inmediatamente a la hielera e INCUBAR durante 2 minutos.

10. TRANSFERIR 250 µL de Caldo de Recuperación a cada tubo con una pipeta estéril de 1 mL. MEZCLAR suavemente moviendo el tubo.

11. INCUBAR las células durante 10 minutos en un baño maría a 37 °C.

12. Mientras las células se recuperan, ETIQUETAR el fondo de cuatro placas de agar como se indica a continuación.

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



13. Tras el periodo de recuperación, retirar los tubos del baño María y colocarlos en la mesa de laboratorio.

14. Con una pipeta estéril de 1 mL, transferir 250 µL de células recuperadas del tubo etiquetado como "–DNA" al centro de las placas de –DNA y –DNA/+Amp.

15. Con una pipeta estéril nueva de 1 mL, transferir 250 µL de células recuperadas del tubo etiquetado como "+DNA" al centro de las placas +DNA/+Amp y +DNA/+Amp/+IPTG.

16. Extender las células por toda la placa con un asa de inoculación. Usar un asa estéril para extender ambas muestras de –DNA. Cambiar a un asa nueva antes de extender las muestras de +DNA. Se deben asegurar que las células se hayan extendido por toda la superficie de las placas. Cubrir las placas y esperar cinco minutos para que el agar absorba la suspensión celular.

17. APILAR las placas una sobre otra y UNIRLAS CON CINTA. ETIQUETAR las placas con sus iniciales o número de grupo. COLOCAR las placas en posición invertida (con el agar hacia

arriba) en un horno de incubación bacteriana a 37 °C durante la noche (16-18 horas). Si no disponen de una incubadora, las colonias se formarán a temperatura ambiente en aproximadamente 48-72 horas.

NOTA para el paso 17:
La absorción de las células en el medio puede tardar más. No invertir el sentido de las placas si las células no se han absorbido completamente.

18. VISUALIZAR las placas de transformación y control con luz ultravioleta de onda larga o luz azul. Para cada placa, ANOTAR la siguiente información:

    - El número de colonias en la placa.
    - El color de las bacterias bajo la luz ultravioleta o azul.

NOTA:
Recomendamos registrar los resultados y tomar una foto para el cuaderno de laboratorio del alumno.

5.3 Resultados y análisis del experimento

RECOPILACIÓN DE DATOS

1. OBSERVAR los resultados obtenidos en las placas de transformación y control. Recomendamos documentar estos resultados con una fotografía.

   Placas de control: (-) ADN
   - -ADN
   - -ADN/+Amp

   Placas de transformación: (+) ADN
   - +ADN/+Amp
   - +ADN/+Amp/+IPTG

2. DESCRIBIR lo observado. Si no tienen una fotografía, se pueden dibujar las placas. Para cada placa, anotar la siguiente información:

   - ¿Cuánto crecimiento bacteriano se observa?
   Si es posible, determine el número total de colonias.
   - ¿De qué color son las bacterias?
   - ¿Por qué los diferentes miembros/grupos de la clase tienen diferentes eficiencias de transformación?
   - Si no se obtuvo ningún resultado, ¿a qué factores se podría atribuir este hecho?

DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE TRANSFORMACIÓN

La eficiencia de transformación es una determinación cuantitativa del número de células transformadas por 1 µg de ADN plasmídico. En esencia, es un indicador del éxito del experimento de transformación. Se calcula la eficiencia de transformación utilizando los datos obtenidos en el experimento.

1. CONTAR el número de colonias en la placa etiquetada: +ADN/+Amp/+IPTG. Un método adecuado para llevar un registro de las colonias contadas es marcar cada colonia con un rotulador de laboratorio en el exterior de la placa o mediante una fotografía.
2. DETERMINAR la eficiencia de transformación utilizando la siguiente fórmula:

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

Example:
Assume you observed 40 colonies.

$$\frac{40 \text{ transformants}}{0.05\ \mu g} \times \frac{0.5\ mL}{0.25\ mL} = \frac{1600\ (1.6 \times 10^3) \text{ transformants}}{\text{per } \mu g}$$

Related Instructional Video

NOTA: Referencia rápida para el experimento 223/AP08
Se utilizan 50 ng (0,05 µg) de ADN.
El volumen final en la recuperación es de 0,50 ml.
El volumen sembrado es de 0,25 ml.

3. COMPARAR la eficiencia de transformación de cada grupo de la clase. ¿Qué factores podrían haber contribuido a las diferencias de eficiencia entre los grupos?

5.4 Actividades adicionales

Tras realizar la transformación inicial, los estudiantes pueden diseñar sus propias experimentos para profundizar en áreas como la transferencia génica por transformación, la expresión génica, la aptitud física de los organismos o los efectos de la mutación en el ADN.

A continuación, se presentan algunas preguntas abiertas que los estudiantes pueden investigar para profundizar en la investigación. Se deben investigar estos temas y formular y probar nuevas hipótesis.

La transferencia génica por transformación puede verse afectada por diversos factores. ¿Cómo se pueden modificar las condiciones para mejorar la eficiencia de la transformación?

- Cantidad de ADN
- Tiempo y/o temperatura del choque térmico
- Concentración de sales diferentes ($RbCl_2$ y $CaCl_2$ son comunes)
- Preparación de las células: transformación tradicional vs. protocolo mejorado.

La producción de la proteína verde fluorescente está controlada por el operón lac.

- ¿Qué efectos tienen las mutaciones en la expresión génica?

Añadir mutágenos a las células o al plásmido antes de la transformación y observar los efectos.

- Co-transformación de plásmidos que expresan genes diferentes (fluorescentes o cromogénicos, con diferente resistencia a antibióticos).

¿Se ve afectada la expresión génica en ausencia de presión selectiva (antibiótico)?

Las bacterias responden al estrés y a los cambios ambientales.

- ¿El plásmido proporciona una ventaja selectiva sobre las bacterias no transformadas?

Cultivar cultivos de bacterias transformadas y no transformadas y sembrar en placas LB simples.

- ¿Cómo crecen las células transformadas y no transformadas en diferentes medios?

Preguntas previas

RESPONDER ESTAS PREGUNTAS EN EL CUADERNO DE LABORATORIO ANTES **DE REALIZAR EL EXPERIMENTO**

1. Explica en qué placas esperaras encontrar bacterias similares a las bacterias E.coli de la placa fuente de E.coli
Las bacterias en la placa –DNA serán idénticas a las bacterias E.coli de la placa fuente porque ellas no tienen ningún plásmido añadido y se sembraron en un medio no selectivo.

2. ¿En qué placas encontrarás células bacterianas transformadas? ¿Por qué?
Las bacterias que crezcan en las placas marcadas como +DNA/+Amp y +DNA/+Amp/+IPTG serán las bacterias transformadas ya que sólo las células que han incorporado los plásmidos que expresan los genes para la resistencia a la ampicilina sobrevivirán en los medios selectivos

3. ¿Cuál es el propósito de las placas control? Explica la diferencia entre ellas y porque es necesario prepararlas.
Las placas control ayudan a interpretar los resultados. Hay 2 placas controles en este experimento. La placa control marcada –DNA/+Amp muestra que las células E.coli sólo crecen en un medio selectivo en presencia del plásmido. La placa marcada –DNA muestra que las células sin el plásmido son capaces de crecer en agar sin ampicilina.

4. ¿por qué comparamos placas con –DNA/+Amp y +DNA/ +Amp?
Para demostrar que las células que no contengan el plásmido no crecerán en las placas -DNA/+Amp porque no expresarán el gen de resistencia a la ampicilina. Mientras que las células que contengan el plásmido crecerán en las placas +DNA/+Amp porque ellas expresan el gen de resistencia a la ampicilina.

RESPONDER ESTAS PREGUNTAS EN EL CUADERNO DE LABORATORIO DESPUÉS **DE REALIZAR EL EXPERIMENTO**

5. El ADN exógeno no entra pasivamente en células de E.coli. ¿Qué tratamiento requieren las células para volverse competentes?.
Células de E.coli pueden ser inducidas a ser competentes cuando son tratadas con sales de cloruros de los cationes calcio y magnesio. Además, ciclos repetitivos de calor y frío pueden ayudar a convertirse en competentes. Los metales iónicos y los cambios de temperatura afectan la estructura y permeabilidad de la pared celular y membrana de modo que las moléculas de ADN pueden pasar.

6. ¿Qué evidencia tenemos de que experimento de transformación ha tenido éxito?
Un experimento de transformación que funciona mostrará crecimiento en las placas marcadas como +DNA/+ Amp y emitirán fluorescencia bajo una luz UV. Un experimento de transformación que no funciona no mostrará crecimiento en las placas marcadas como +DNA/+ Amp.

7. Enumera algunas razones por las que un experimento de transformación no funciona.
1) No se añadió el plásmido a las células huésped en el tubo +DNA.
2) No añadir una colonia bacteriana al tubo +DNA.
3) No cumplir con los tiempos recomendados en los ciclos de calor-frío.
4) No resuspender bien las células bacterianas en la solución de cloruro cálcico.

8. ¿Cuál es la fuente de la fluorescencia? ¿Por qué algunas células son fluorescentes y otras no?
La fluorescencia proviene de las proteínas verdes y azules codificadas por los respectivos plásmidos. Las células en la placa marcada +DNA/+Amp/+IPTG son fluorescentes debido a la presencia de IPTG en el medio que enciende la expresión de los genes de las proteínas fluorescentes.

6. GUÍA DEL PROFESOR

¡NOTA IMPORTANTE!

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

NOTA PARA EL PROFESOR

Para maximizar la eficiencia de la transformación en la clase, se proporcionan cinco recursos adicionales:

1. Un protocolo de transformación mejorado alternativo (Apéndice A) que mejora los resultados de los estudiantes. Este protocolo reemplaza los pasos 1 a 5 del experimento del estudiante y requiere dos pasos adicionales previos a la transformación, se debe determinar de antemano qué procedimiento seguirá la clase y realizar una planificación de la práctica en consecuencia.

2. Una sección de consejos y trucos de transformación (Apéndice B) que complementa el protocolo del estudiante en las páginas 13 y 14. Esta lista describe las mejoras de la práctica con mayor detalle, ofrece sugerencias para que el experimento se base más en la investigación y vincula pasos específicos con conceptos clave de biología.

3. Una guía de resolución de problemas de transformación (Apéndice C) que identifica y explica problemas experimentales comunes. Dado que muchos de estos se abordan mejor de forma proactiva, sugerimos leerla antes de comenzar el experimento y usarla posteriormente para identificar posibles errores.

4. Una breve (y atractiva) actividad práctica de microbiología (Apéndice D) para preparar a los estudiantes para la recolección de colonias bacterianas.

5. Una hoja de trabajo de transformación para estudiantes (Apéndice E) para que los estudiantes registren su experimento y sus resultados.

PREPARACIÓN PREVIA:

¿Qué hacer?	Tiempo	¿Cuándo?
Preparar las placas de agar LB	1 hora	2-7 días antes de usar
Preparar las placas iniciales de E.Coli	20 minutos para sembrar placas. 16-18 horas para incubar las placas	El día de la práctica
Dispensar ADN plasmídico, $CaCl_2$ y caldo de recuperación	30 minutos	Un día o 30 minutos antes del experimento

PREPARACIÓN ADICIONAL PARA LA TRANSFORMACIÓN MEJORADA ALTERNATIVA

¿Qué hacer?	Tiempo	¿Cuándo?
Preparar cultivo iniciador de E.Coli	70-90 minutos	Hasta 3 días antes de la práctica
Preparar células competentes	30 minutos	Hasta 2 días antes de la práctica

DÍA DEL EXPERIMENTO:

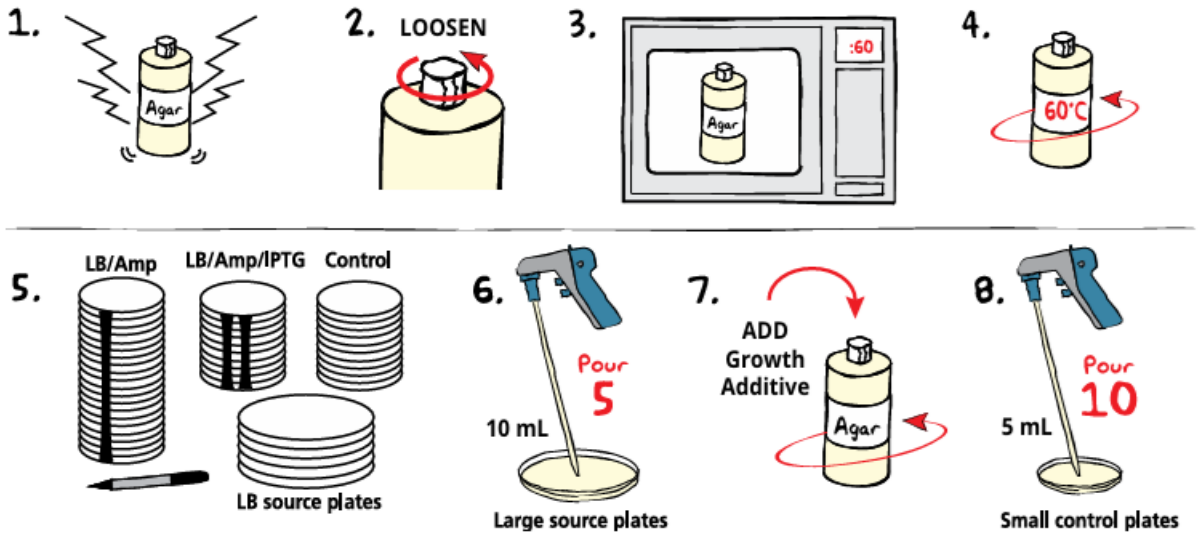
¿Qué hacer?	Tiempo	¿Cuándo?
Equilibrar los baños de agua a 37 °C y 42 °C; y la incubadora a 37 °C	10 minutos	Una o dos horas antes de la práctica
Realizar la práctica en laboratorio	50 minutos	El horario de la clase de prácticas
Incubar las células a 37ºC	De 16 a 18 horas	Durante la noche después de la clase de prácticas

RESULTADOS Y LIMPIEZA

¿Qué hacer?	Tiempo	¿Cuándo?
Los estudiantes observan los resultados de su experimento y calculan la eficiencia de transformación	50 minutos	El horario de la clase de prácticas
Desechar cualquier material contaminado	45 minutos – durante la noche	Después de que los estudiantes hayan analizado sus resultados

6.1 Vertido de agar LB en placas

Una botella de agar de caldo Luria ReadyPour™ rinde para 5 placas de origen LB grandes, 10 placas LB, 20 placas LB/Amp y 10 placas LB/Amp/IPTG.



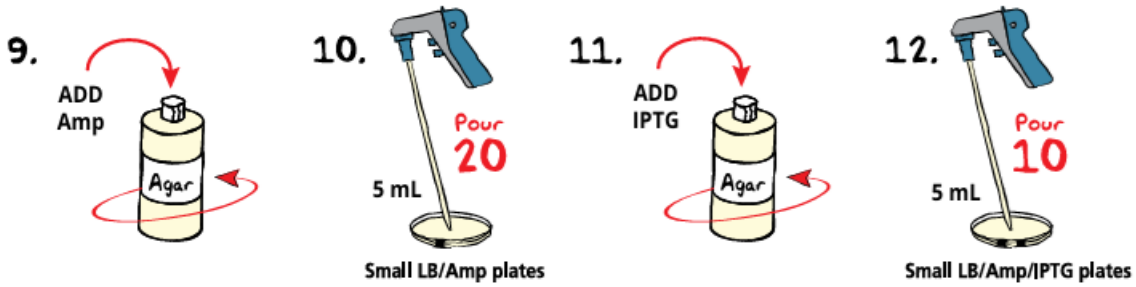
1. ROMPER el agar LB ReadyPour™ sólido en trozos pequeños apretando y agitando vigorosamente la botella de plástico.
2. AFLOJAR, pero NO RETIRAR, la tapa de la botella de agar ReadyPour™. Esto permite que el vapor se escape durante el calentamiento.
   PRECAUCIÓN: Si no se afloja la tapa antes de calentar, la botella podría romperse o explotar.
3. CALENTAR el agar ReadyPour™ en el microondas a alta potencia durante 60 segundos para derretir el agar. 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 libre de partículas pequeñas).

NOTA PARA EL PASO 3:
Se debe tener mucho cuidado y asegurarse de que el agar no hierva y se desborde del frasco. Prestar mucha atención y detener el calentamiento si comienza a burbujear el agar.
Usar guantes y gafas protectoras durante todos los pasos que impliquen calentamiento.

4. ENFRÍAR el agar ReadyPour™ a 60°C, removiendo con cuidado para promover una disipación uniforme del calor.
5. Mientras el medio se enfría, ETIQUETAR las placas de Petri pequeñas (60 x 15 mm) con un marcador permanente.
   • ABRIR el primer paquete y APILAR cuidadosamente las 20 placas.
   • A continuación, "RAYAR" las 20 placas colocando el marcador en la parte inferior de la pila y arrastrándolo verticalmente hasta la placa superior. Estas placas se utilizarán para las placas LB/Amp.
   • ABRIR el segundo paquete y APILAR cuidadosamente diez placas.

• RAYAR las 10 placas con dos líneas. Estas serán las placas LB/Amp/IPTG. NO etiquetar las 10 placas restantes. Estas serán las placas LB de control. (También debe tener 5 placas de Petri grandes para las placas de origen LB).

6. VERTER 10 ml del agar ReadyPour™ frío en cada una de las cinco placas de Petri grandes (placas de origen) con una pipeta de 10 ml y una bomba de pipeta.
7. AÑADIR la cantidad total del aditivo de crecimiento al agar ReadyPour™ frío. Tapar la botella y remover para mezclar los reactivos. AÑADIR LOS REACTIVOS SOLO AL AGAR FRÍO. Reactivos como la ampicilina y el IPTG se degradan a altas temperaturas.
8. Con una pipeta nueva de 10 ml, VERTER 5 ml del agar en las 10 placas de Petri sin etiquetar.



9. AGREGAR toda la cantidad de ampicilina al frasco de agar ReadyPour™. Asegurarse de que todo el polvo se haya transferido del tubo. VOLVER A TAPAR el frasco y MEZCLAR para homogeneizar los reactivos.
10. Con una pipeta nueva de 10 mL, VERTER 5 mL del medio LB/Amp en las 20 placas de Petri pequeñas con una raya.
11. Usar una micropipeta y una punta limpia para TRANSFERIR todo el volumen (~65 µL) de líquido IPTG al frasco de agar ReadyPour™. VOLVER A TAPAR el frasco y MEZCLAR para homogeneizar los reactivos.
12. Con una pipeta nueva de 10 mL, verter 5 mL del medio LB/Amp/IPTG en las 10 placas de Petri pequeñas con dos rayas.
13. Cubrir y esperar a que las placas de agar LB se solidifiquen. Para obtener resultados óptimos, dejar las placas a temperatura ambiente durante toda la noche.
14. Conservar las placas en el refrigerador (4 °C) hasta que sean necesarias. Las placas deben invertirse y colocarse en una bolsa de plástico sellable para evitar que se sequen.

RECORDATORIO: ¡Agregar los reactivos solo al agar FRÍO (60 °C)!

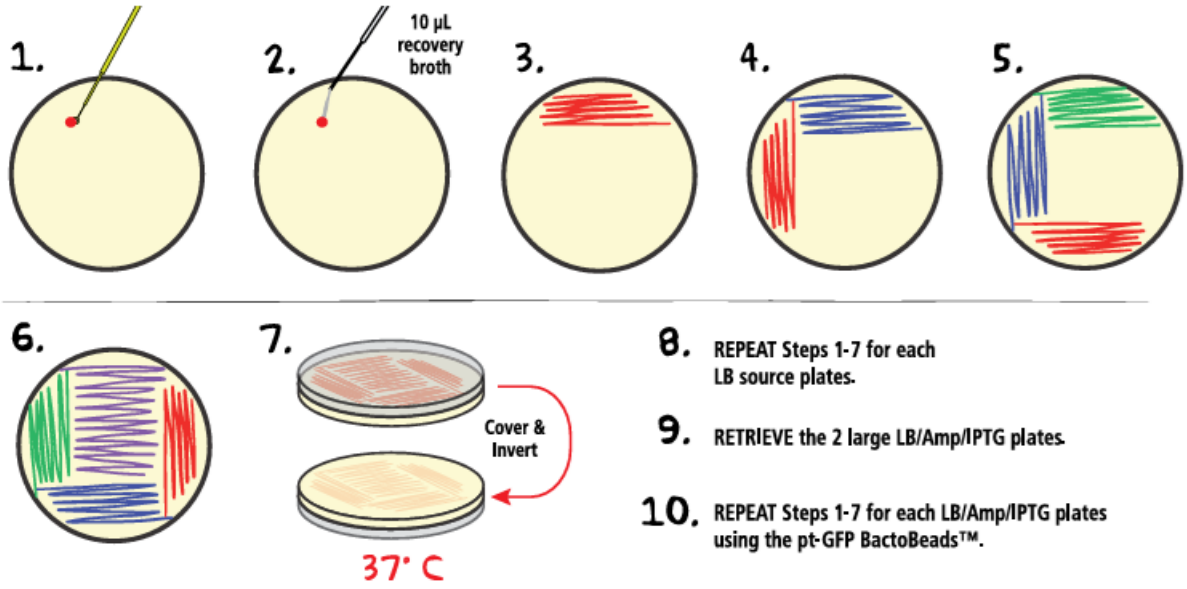
NOTA: Si las placas se preparan con más de un día de antelación, deben dejarse secar en la mesa de trabajo durante la noche. Al día siguiente, guardar las placas invertidas en una bolsa de plástico en el refrigerador (4 °C). Retirar las placas del refrigerador y calentarlas en una incubadora a 37 °C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

REFERENCIA RÁPIDA: VERTIDO DE AGAR LB EN PLACAS

• 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.
• Agitar la placa de Petri para obtener una cobertura completa.
• 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.

6.2 Preparación de las placas de origen de E. coli

Para obtener mejores resultados, las placas de origen de E. coli deben sembrarse entre 18 y 22 horas antes del experimento. Prepararlas con más de 24 horas de antelación a la práctica de laboratorio puede comprometer el éxito del experimento de transformación.



1. RETIRAR una BactoBead™ del vial de E. coli GFP Host utilizando un asa de inoculación estéril. Utilizando una técnica aséptica, TRANSFERIR la perla al borde de una placa de Petri grande (placa de origen 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. EXTENDER el asa de inoculación de un lado a otro a través de la BactoBead™ disuelta para crear una primera línea en la parte superior de la placa. Evitar perforar el asa en el medio.
4. GIRAR la placa 90°. Pasar el asa por la línea primaria una vez y luego hacer un zigzag 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 sobre una parte limpia del agar varias veces.
6. Girar la placa una vez más. Pasar el asa por la tercera línea y luego hacer un zigzag 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 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 una de las cinco placas de LB grandes, utilizando un asa nueva para cada placa.

NOTA: Las colonias ideales tendrán un diámetro de 1-1,5 mm. Si el crecimiento en las placas es intenso (es decir, hay un césped de colonias), indicar a los estudiantes que transfieran una pequeña cantidad de células a la solución de CaCl2.

6.3 Preparaciones previas al laboratorio

DÍA DEL LABORATORIO:

1. EQUILIBRAR los baños de agua a 37 °C y 42 °C; CALENTAR la incubadora a 37 °C. CONFIRMAR la temperatura con un termómetro.
2. PREPARAR baños de hielo o de agua helada para cada grupo. Unos cubitos de hielo pequeños ayudarán a enfriar rápidamente las bacterias después del choque térmico.
3. Si se realiza el procedimiento de transformación original, DISPENSAR 500 µL de $CaCl_2$ en tubos de microcentrífuga para cada uno de los 10 grupos y COLOCARLOS en hielo. O si se realiza el procedimiento de transformación mejorado, DISPENSAR 800 µL de $CaCl_2$ en tubos de microcentrífuga para cada uno de los 10 grupos y COLOCARLOS en hielo.
4. DISPENSAR 600 µL de Caldo de Recuperación en tubos para cada uno de los 10 grupos y mantenerlos a temperatura ambiente. Alternativamente, el frasco de Caldo de Recuperación puede colocarse en una estación de pipeteo del aula para que los estudiantes lo compartan.

   NOTA: Mantener una técnica estéril al alicuotar el Caldo de Recuperación.

Cada grupo requiere:
- Compartir una de las cinco placas de cultivo de E. coli
- 1 tubo de $CaCl_2$
- 1 tubo de ADN plasmídico pGFP
- 1 tubo de caldo de recuperación
- 2 placas de una raya
- 1 placa de dos rayas
- 1 placa sin rayas
- 4 pipetas (1 mL)
- 3 asas de inoculación estériles

Equipo para el aula:
- Baño(s) de agua
- Horno de incubación

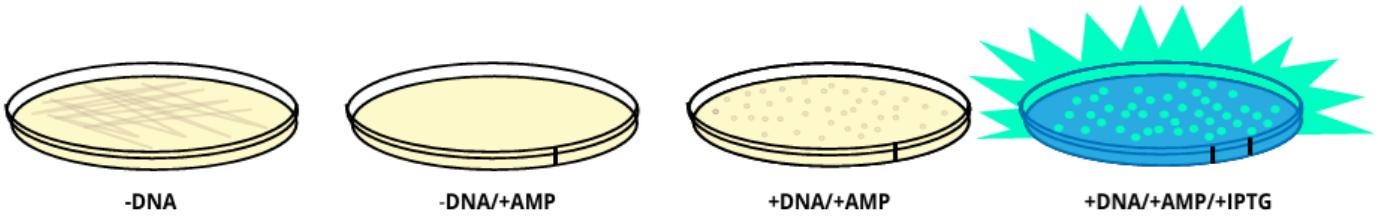
6.4 Preparación del ADN Plásmido pGFP

Se pueden preparar alícuotas de ADN plásmido el día anterior al laboratorio y almacenarlas a 4°C.

5. COLOCAR el tubo de ADN Plásmido pGFP en hielo para descongelarlo.
6. ETIQUETAR 10 tubos de microcentrífuga con la palabra "pGFP".
7. Antes de dispensar, golpear ligeramente el tubo de pGFP hasta que toda la muestra esté en el fondo cónico del tubo.
8. Con una micropipeta de volumen ajustable, DISPENSAR 12 µL de ADN plásmido en cada uno de los tubos de microcentrífuga etiquetados como "pGFP". Tapar los tubos y colocarlos en hielo.

   NOTA: Si se preparan con antelación, las alícuotas de pGFP y $CaCl_2$ pueden conservarse a 4°C hasta 24 horas. Mantener siempre el ADN plasmídico y el $CaCl_2$ en hielo para facilitar el procedimiento de choque térmico.

6.5 Resultados y análisis del experimento



-ADN	-ADN/+AMP	+ADN/+AMP	+ADN/+AMP/+IPTG
Sembrado con células no transformadas (sin ADN)	Sembrado con células no transformadas (sin ADN)	Sembrado con células transformadas (pGFP)	La proteína GFP no se produce en ausencia de IPTG. Sembradas con células transformadas (pGFP)
Resultado:			
No se observan células fluorescentes. Colonias blancas. Probablemente se verá como una capa de células difusas (césped).	Sin crecimiento.	Colonias blancas. Puede verse como una capa de células difusas.	Colonias individuales que fluorescen al exponerse a luz UV de onda larga.
Demuestra:			
Las células bacterianas huésped son viables en ausencia de ampicilina.	Las células son sensibles a la ampicilina. Sin pGFP, no son resistentes a la ampicilina.	Las células se vuelven resistentes a la ampicilina cuando se transforman con pGFP.	Las células se vuelven resistentes a la ampicilina al transformarse con pGFP. La producción de proteína GFP se activa en presencia de IPTG.

Results Photo of the +DNA/+Amp/+IPTG plate

Determinar la eficiencia de transformación utilizando la siguiente fórmula:

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

Example:
Assume you observed 40 colonies.

$$\frac{40 \text{ transformants}}{0.05\ \mu g} \times \frac{0.5\ mL}{0.25\ mL} = 1600\ (1.6 \times 10^3) \text{ transformants per } \mu g$$

Apéndices

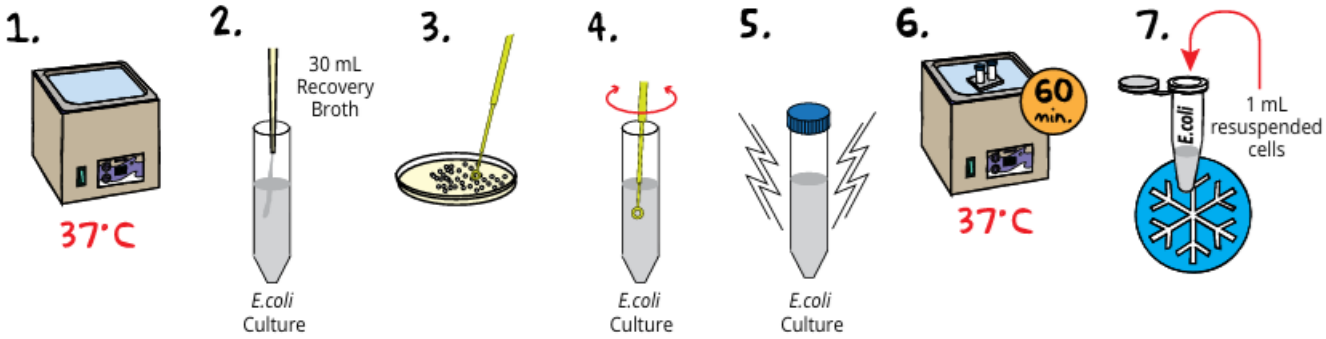
A. Protocolo de Transformación Mejorado Edvotek®
B. Consejos y Trucos para la Transformación
C. Guía de Solución de Problemas
D. Práctica Previa a la Transformación - Recolección de Colonias Bacterianas
E. Transformación en Cultivo en Placa - Hoja de Trabajo del Estudiante

Apéndice A

PROTOCOLO MEJORADO DE TRANSFOMACIÓN CELULAR DE EDVOTEK®

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

PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS INICIALES DE E.coli



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

1. **PREPARAR** un baño a 37°C.

2. **AÑADIR** 30 ml de Caldo de Recuperación a un tubo cónico de 50 mL. **ETIQUETAR** el tubo

como “Cultivo E. coli”.

3. **PASAR** un asa de siembra por una sección densa del cultivo bacteriano. Se ha de recolectar un grupo de bacterias del tamaño aproximado de la cabeza de un fósforo.

4. **SUSPENDER** las bacterias en el tubo cónico “Cultivo E. coli” preparado en el paso 2 girando el asa de un lado a otro hasta que se hayan desprendido todas las bacterias del asa.

5. **AGITAR** brevemente el tubo para asegurarse que las bacterias se resuspendan por completo.

6. **INCUBAR** el “cultivo E. coli” durante 60 min. en un baño de agua a 37 °C.

7. **ETIQUETAR** 20 tubos de microcentrífuga con tapa a presión como “E. coli” y alícuotar 1 ml de células resuspendidas en cada tubo. **COLOCAR** los tubos en hielo hasta que se necesiten para la práctica.

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

PREPARACIONES ADICIONALES PRELABORATORIO

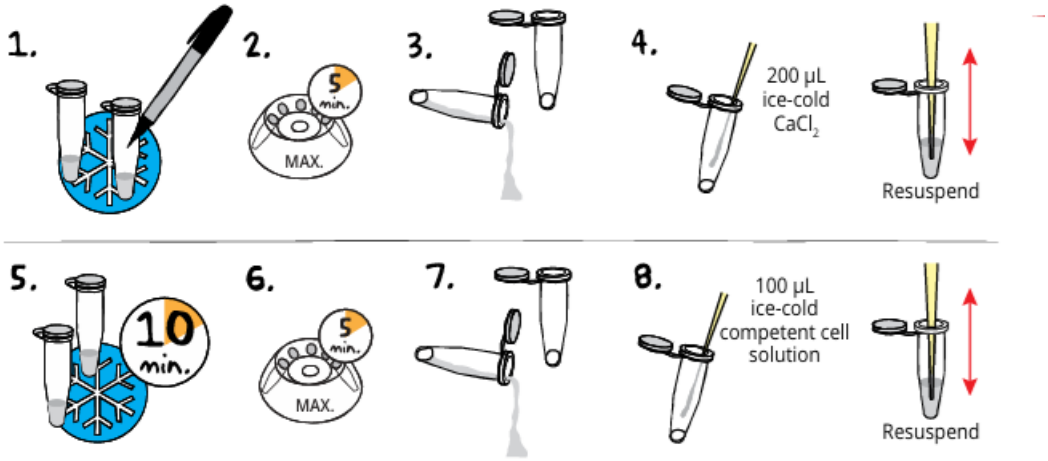
1. **DISPENSAR** 300 µL de solución de células competentes en diez tubos de microcentrífuga, **ETIQUETAR** y **COLOCAR** en hielo.

2. **COMPLETAR** los pasos 1 a 8 del apartado 5.2 Preparaciones previas el día de la práctica antes de empezar el experimento antes de que los estudiantes comiencen el apartado siguiente "Preparación de células competentes".

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

PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

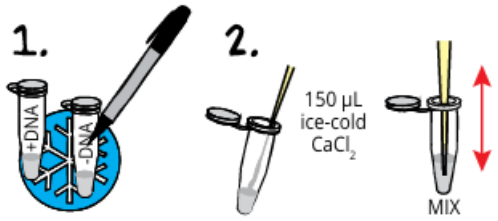
NOTA: En este punto, las células son frágiles. Mantener las células en hielo y pipetear lenta y suavemente.

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

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

TRANSFORMATION

Realizado por los alumnos. Duración 45 min.



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

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

3. **CONTINAR** con la práctica en el apartado 5.3 Práctica. Experimento de transformación en el punto 6.

Appendix B

Consejos y trucos para realizar la transformación

¿Quiere una práctica con colonias GFP brillantes y estudiantes emocionados?
Aquí se explica cómo optimizar la práctica para maximizar la eficiencia de la transformación (ET), la participación del estudiante (PE) y la comprensión de los conceptos (CC).

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

(ET) Asegurarse que el CaCl2 esté helado durante todo el experimento: (1) incubándolo en el refrigerador o congelador la noche anterior, (2) almacenando los tubos en hielo finamente picado y (3) haciendo que los estudiantes sujeten los tubos solo por la parte superior del borde.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Apendice C

Guía de solución de problemas de transformación

GUÍA DE SOLUCIÓN DE PROBLEMAS		
PROBLEMA:	**CAUSA:**	**RESPUESTA:**
Crecimiento pobre en la placa fuente	Tiempo de incubación demasiado corto	Continuar incubando la placa fuente a 37ºC durante un total de 18 a 22 h.
	Antibiótico añadido a la placa fuente	Asegurarse de añadir antibióticos y aditivos en el paso correcto
	Temperatura de incubación incorrecta	Comprobar la temperatura de la incubadora y ajustarla en caso necesario
Colonias satélite en la placa de transformación	Concentración incorrecta de antibióticos en placas	Asegurarse de añadir la concentración correcta de antibióticos y que el ReadyPour se enfría a 60ºC antes de añadirlo
	El antibiótico se degrada	Asegurarse que el ReadyPour se enfría a 60ºC antes de añadirlo
	La placas se incubaron demasiado tiempo	Incubar las placas durante la noche a 37ºC (18-22 horas)
Colonias manchadas en la placa de transformación	Las placas con las células transformadas se giran demasiado rápido	Permitir que las células se absorban completamente en el medio antes de girar las placas
	Placas demasiado húmedas	Después verter el medio en las placas dejar secar durante la noche a temperatura ambiente. Otra alternativa es secar las placas a 37ºC durante 30 minutos antes de sembrar las células
No se ven colonias individuales en la placa fuente	Las células o se han sembrado correctamente en las placas	Transferir con el asa de siembra un pequeño grupo de células al $CaCl_2$
No se ven colonias en las placas de transformación	No se ha añadido el ADN plasmídico a la mezcla de transformación	Asegurarse que se ha añadido el ADN plasmídico al tubo de transformación
		Asegurarse que las pipetas se utilizan correctamente y están calibradas
	Se utilizan célula anfitrionas incorrectas en la transformación	Confirmar que se ha utilizado la cepa bacteriana correcta en la transformación
	La células no se sometieron a un choque térmico correcto	Asegurarse que la temperatura fue de 42ºC y que el paso de choque térmico duro exactamente 45 segundos
	Antibióticos incorrectos	Asegurarse que se ha utilizado el antibiótico correcto
	Las células no están bien resuspendidas en $CaCl_2$	Volver a resuspender completamente las células en $CaCl_2$, sin dejar grumos. La suspensión celular debe quedar turbia

Baja eficiencia de transformación	No se utilizaron suficientes células para la transformación	Recoger más colonias de la placa fuente (5 colonias de 1 a 1,5 mm de ancho por 500 µl de $CaCl_2$)
	Las placas fuente se incubaron durante más de 20 horas	Es importante que las células no crezcan durante más de 20 horas en las placas fuente. Guardar en nevera (4ºC) las placas después de las 20 horas de crecimiento. No utilizar placas fuentes que se hayan incubado durante más de 24 horas (conservadas en nevera o no)
	Placas experimentales demasiado viejas	Preparar las placas de transformación y utilizarlas poco después de su preparación
	Las células no están bien resuspendidas en $CaCl_2$	Volver a resuspender completamente las células en $CaCl_2$, sin dejar grumos de células. La suspensión celular debe estar turbia
	La solución de $CaCl_2$ no está lo suficientemente fría	Enfriar previamente el $CaCl_2$ antes de agregar las células
	La solución celular no está los suficientemente fría	Prolongar la incubación de la suspensión de células en hielo de 10 a 15 minutos (no debe exceder los 30 minutos en total). Esto incrementa la eficiencia de la transformación
	Se añadió demasiado o muy poco ADN plasmídico a la suspensión celular	Asegurarse que se ha añadido el volumen correcto de plásmido al tubo de transformación. Si se usan micropipetas, los estudiantes deben practicar su uso previamente
	Las células no se sometieron a un choque térmico adecuado	Asegurarse que la temperatura se de 42ºC y que el paso del choque térmico se haya producido durante no más de 45 segundos
	Los antibióticos añadidos se degradaron antes de verter en las placas	Asegurarse que ReadyPour se enfrié a 60ºC antes de añadir el antibiótico
	Concetración incorrecta de antibióticos	Asegurarse que se haya utilizado la concentración correcta de antibiótico en las placas

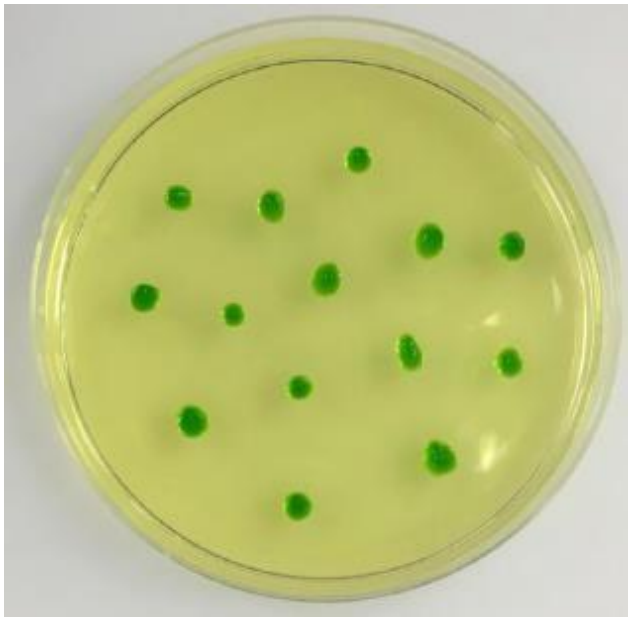
Apendice D

Práctica previa a la transformación: recolección de colonias de bacterias

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

1. Preparar 10 placas petri de práctica Jell-O®.
    - En vaso o recipiente grande, mezclar el polvo Jell-O® y el agua según las instrucciones del paquete.
    - Verte rápidamente la gelatina Jell-O® en las placas de petri, llenándolas hasta la mitad.
    - Dejar que las placas se solidifiquen en el frigorífico durante 30-60 minutos.
    - Añadir 10 puntos usando el líquido viscoso que se elija (simularan las colonias que aparecen en los cultivos reales). Los puntos pueden ser más grandes que las verdaderas colonias bacterianas.

2. Entregar a cada grupo de estudiantes una placa, un palillo o un asa de siembra y un tubo de microcentrífuga que contenga agua.

3. Los estudiantes deberán transferir todas las colonias de "bacterias" al tubo sin romper la gelatina.

4. Los estudiantes también pueden practicar los pasos 15 y 16 del experimento de transformación mezclando el líquido viscoso y el agua, pipeteando la solución nuevamente en sus placas Jell-O® y luego esparciendo suavemente la solución por toda la placa.