

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

Ref. ED-300

5 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

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

2. COMPONENTES para 5 grupos de estudiantes

¡ATENCIÓN! IMPORTANTE

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

¡ATENCIÓN! IMPORTANTE

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

REACTIVOS PARA LA LIGADURA DEL ADN

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

REACTIVOS PARA LA TRANSFORMACIÓN

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

REACTIVOS Y CÉLULAS PARA LA TRANSFORMACIÓN

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

REACTIVOS DEL ENSAYO DE β -GALATOSIDASA

COMPONENTES	Conservación
A1 Botella con medio de crecimiento LB	Temp. ambiente
A2 Lisozima	-20°C
A3 Buffer Fosfato de sodio	Temp. ambiente
A4 ONPG	-20°C
A5 Buffer de parada (NaCO ₃)	Temp. ambiente

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

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

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

2.1 Material suministrado

Almacenar todos los componentes detallados a continuación a temperatura ambiente:

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

2.2 Material requerido y no suministrado

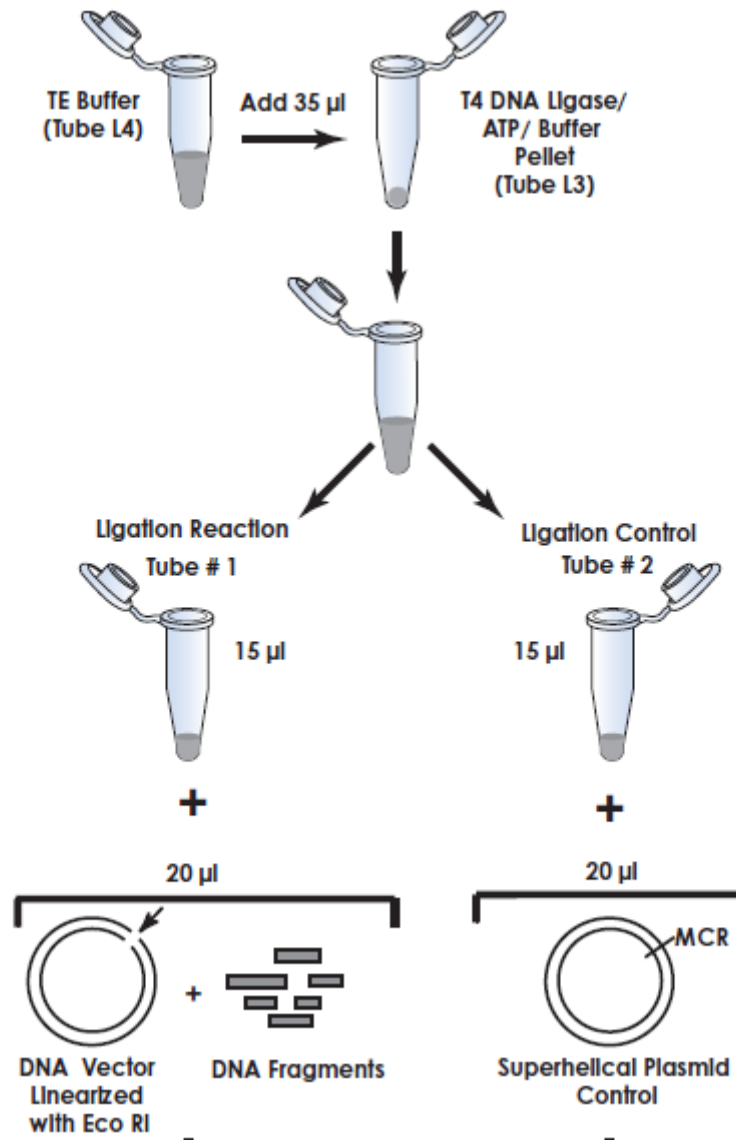
- Dos baños de agua (37°C y 42°C).
- Microcentrífuga.
- Centrífuga clínica de sobremesa o centrífuga de piso.
- Estufa de incubación a 37°C.
- Incubadora con agitación o baño de agua con agitación.
- Micropipetas automáticas y puntas de pipeta estériles.
- Peras de succión para pipetas.
- Balanza.
-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

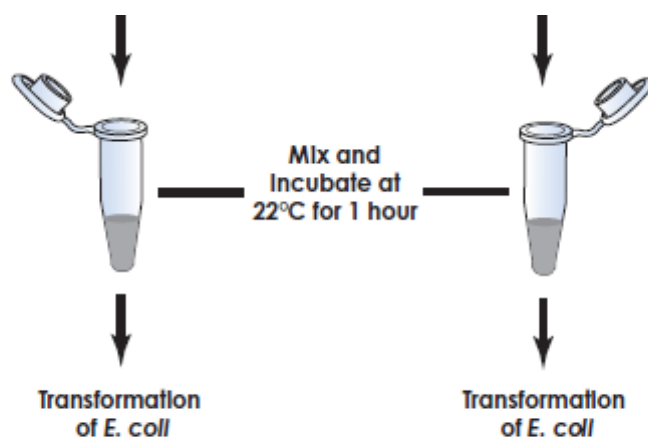
Remojar los materiales durante la noche y luego desecharlos. Usar guantes y gafas protectoras al trabajar con lejía.

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

4.2 Práctica

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



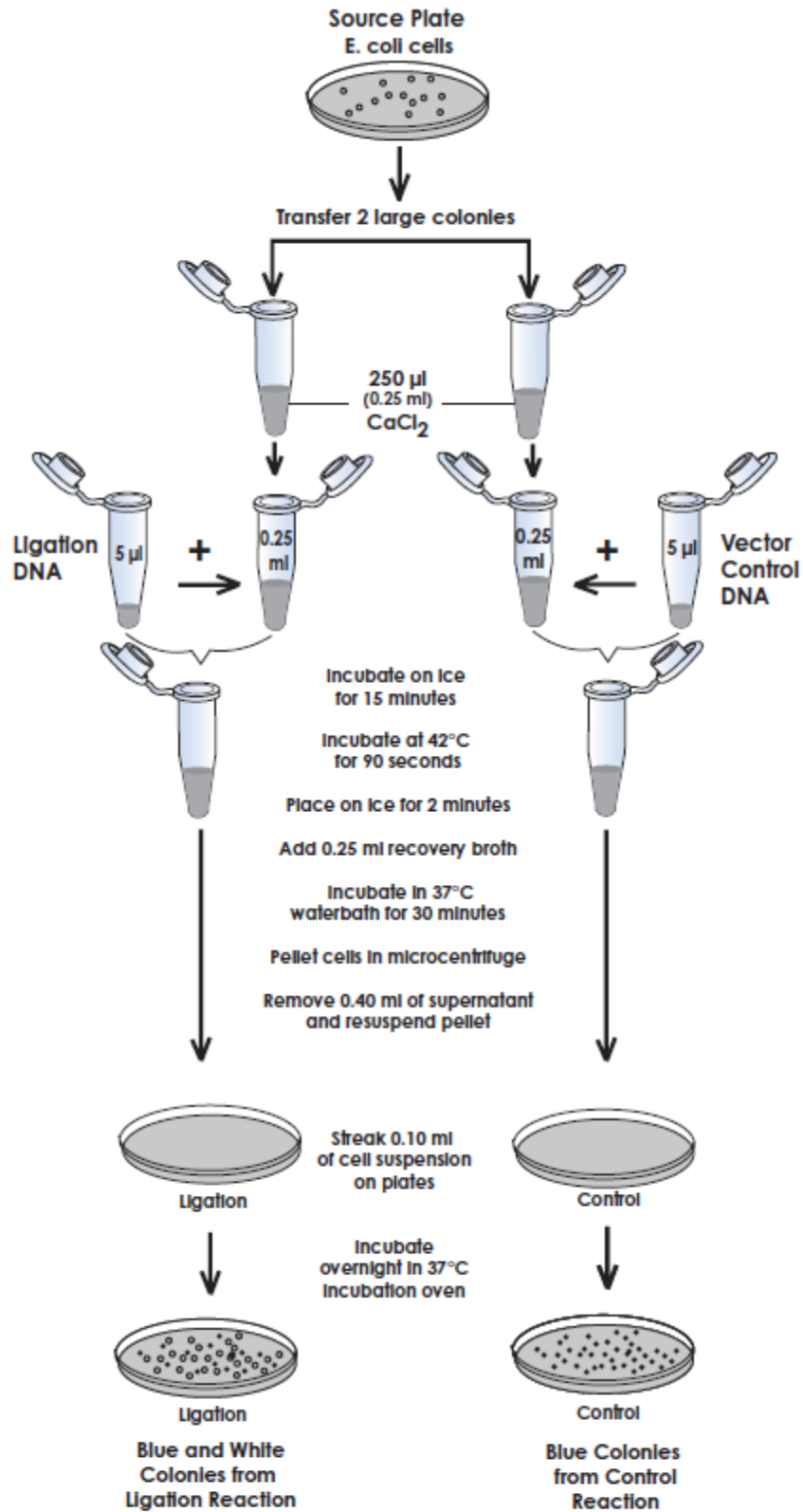


MODULE I OVERVIEW

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

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

MÓDULO II: Transformación y Selección



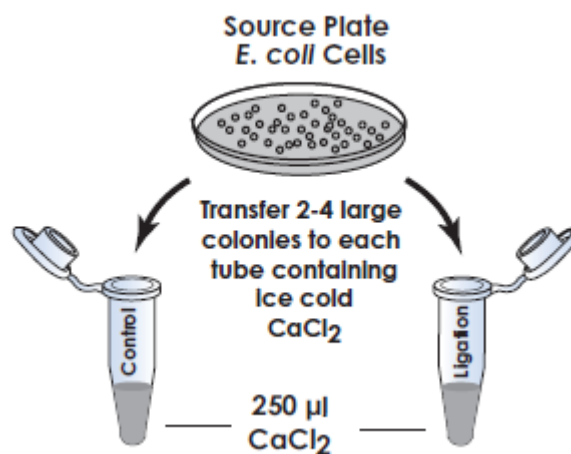
MODULE II OVERVIEW

MONTAJE DEL EXPERIMENTO DE TRANSFORMACIÓN Y CONTROL

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



3. Con una pipeta estéril de 1 ml, añadir 250 μ l (0,25 ml) de solución de CaCl enfriada con hielo a cada tubo.
4. Escoger las colonias de la placa fuente de las células de *E. coli*. En cada uno de los tubos de ensayo etiquetados como "Ligación" y "Control":
 - Usar un palillo estéril para transferir 2 colonias (2-4 mm) desde la placa fuente a los tubos de ensayo.
 - Girar el palillo con fuerza entre los dedos y hacia arriba y abajo en la solución de CaCl₂ para desprender y emulsionar las células.



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

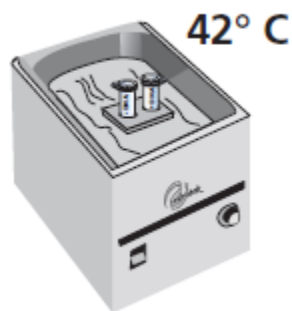
5. Resuspender las células en ambos tubos golpeándolos suavemente o agitando en vórtex.
6. Agregar los productos de reacción del Módulo 1:
 - Al tubo etiquetado "Ligación", agregar 5 μ l de la reacción de ligadura.

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

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



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



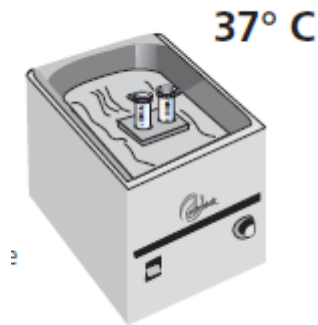
9. Volver a colocar ambos tubos rápidamente en el cubo de hielo e incubar durante dos minutos.



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



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

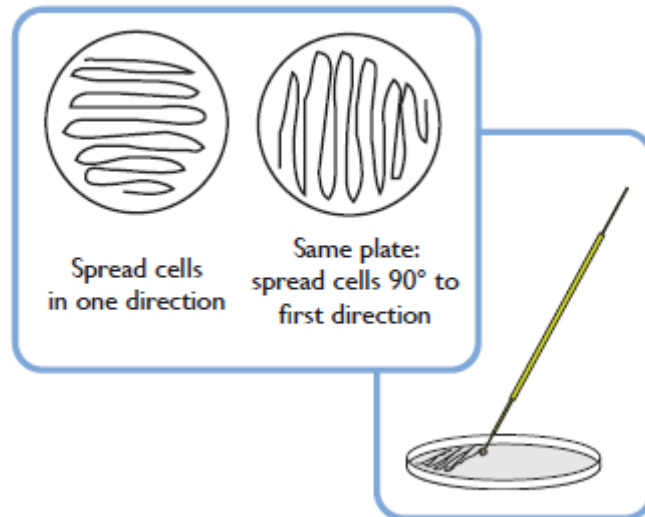


12. Después del período de recuperación, retirar los tubos del baño de agua y colocarlos en una microcentrífuga y centrifugar los tubos durante 5 minutos para sedimentar las células.
13. Retirar y desechar 0,40 ml de sobrenadante y volver a resuspender el sedimento en el líquido restante.

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

SEMBRADO DE LAS CÉLULAS

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



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

PREPARACIÓN DE LAS PLACAS PARA LA INCUBACIÓN

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

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

VISUALIZACIÓN DE LAS PLACAS DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN

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

DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA TRANSFORMACIÓN

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

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

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

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

Determinar la eficiencia de la transformación utilizando la fórmula:

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

Example: Assume you observed 40 colonies:

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

Quick Reference for Expt. 300:

25 ng of DNA is used.

The final volume at recovery is 0.50 ml.

The volume plated is 0.10 ml.

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

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

CRECIMIENTO DE CULTIVOS LAC+ Y LAC- PARA ENSAYO

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

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

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

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

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

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

INDUCCIÓN DE β -GALACTOSIDASA Y MUESTREO

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

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

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

Pasos 8-10 opcionales:

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

ENSAYO DE β -GALACTOSIDASA

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

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

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

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

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

definen como unidades Miller según la siguiente ecuación.

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

En donde:

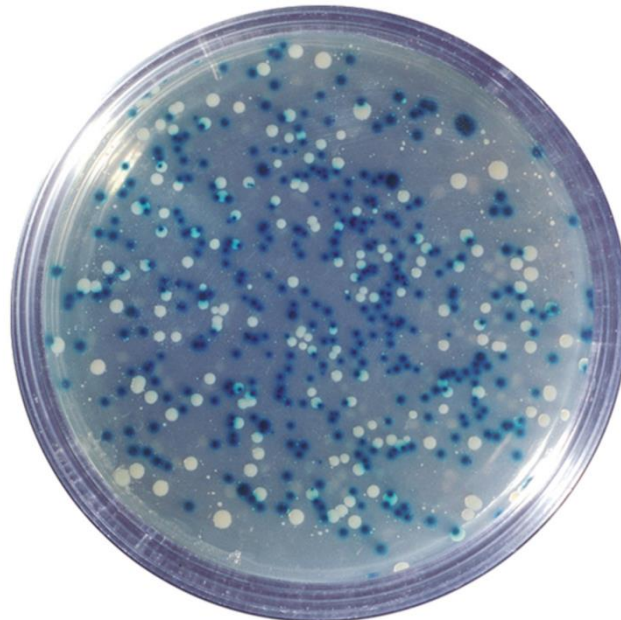
- OD420 y OD550 se leen de la reacción ONPG.
- OD600 se lee de la densidad óptica del cultivo celular.
- T es el tiempo en minutos de la reacción ONPG.
- V es el volumen del cultivo celular utilizado en la reacción ONPG en ml.

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

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

5. PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

5.1 Resultados



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

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

5.4 Libreta de laboratorio

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

6. PRÁCTICA

6.1 Preparaciones previas

Módulo I: Ligación de fragmentos de ADN en pUC8

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

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

- 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.

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

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

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

Calentar el medio ReadyPour™

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

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

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

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

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

Método de microondas:

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

Placa caliente o método de quemador:

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

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

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

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

- 5 placas: Control

Después de que el medio ReadyPour se haya enfriado:

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

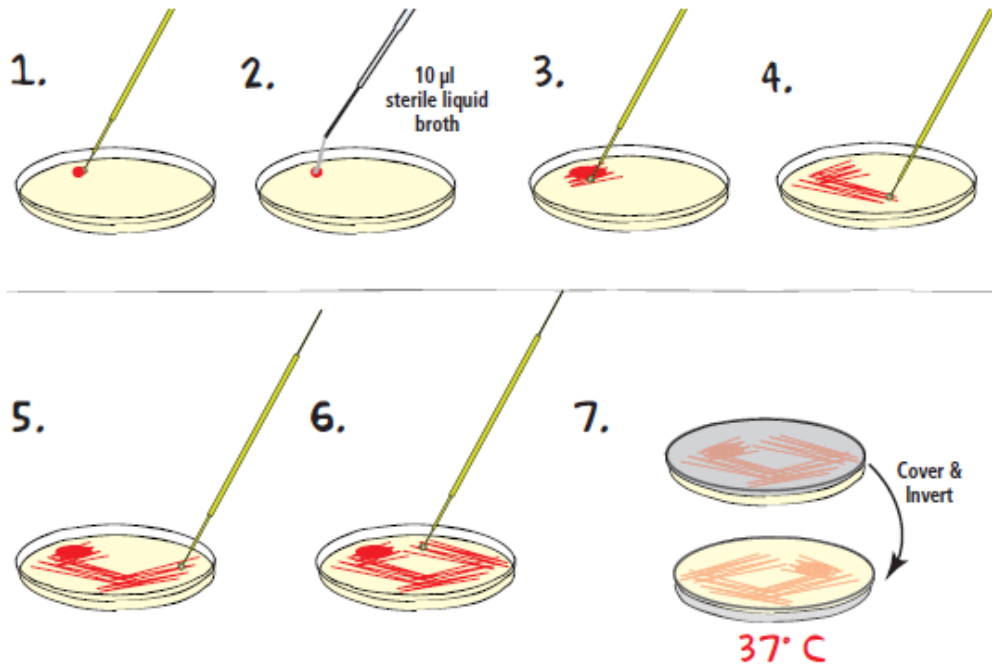
NOTA: Agregar ampicilina, IPTG y X-Gal al medio que se ha enfriado. El medio caliente causará la rápida descomposición de la ampicilina.

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

Referencia rápida: Al verter el agar en las placas
<ul style="list-style-type: none">• Utilizar una pipeta estéril de 10 ml con una pera de succión de pipetas para transferir el volumen designado de medio a cada placa de Petri. Pipetear cuidadosamente para evitar la formación de burbujas.• Mover suavemente la placa de Petri hacia adelante y hacia atrás para obtener una cobertura completa.• Si el medio fundido contiene burbujas, pueden eliminarse pasando una llama a través de la superficie del medio.• Cubrir la placa Petri y dejar que el medio se solidifique.

Preparación de placas fuente de *E. coli*

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



1. Retirar un solo BactoBead™ del frasco usando un asa de siembra estéril. Usando una técnica aséptica, transferir el BactoBead™ al borde de una placa Petri grande (placa fuente LB) y volver a colocar la tapa. Tapar el vial inmediatamente después de usarlo para limitar la exposición a la humedad en el aire.
2. Disolver inmediatamente el BactoBead™ añadiendo 10 µl de caldo líquido estéril o agua estéril.
3. Hacer rayas con el asa estéril sobre el BactoBead™ disuelto para hacer un dibujo de líneas primarias en la parte superior de la placa como se indica en la figura. Intentar no clavar el asa en el medio (no realizar demasiada presión sobre el medio).
4. Hacer nuevas rayas con el asa de siembra cruzando las líneas primarias hacia una parte limpia del agar, creando de esta forma un dibujo de líneas secundarias.
5. Girar la placa y hacer nuevas líneas cruzando las líneas hasta una parte limpia del agar.
6. Girar la placa una vez más y hacer nuevas líneas cruzando las líneas del tercer dibujo hasta una parte limpia del agar. Esto debería producir colonias aisladas.
7. Tapar la placa y guardarla invertida a 37°C durante 16 a 20 horas. Si no hay una incubadora en el laboratorio, las colonias se formarán a temperatura ambiente en aproximadamente 24 a 48 horas.
8. Repetir los pasos anteriores para cada una de las placas fuente de LB.

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

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

• Día de la práctica

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

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

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

Análisis cualitativo de la reacción de la β -galactosidasa

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

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