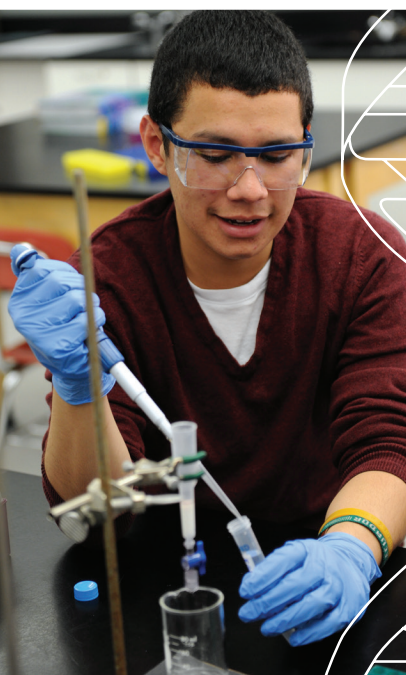


Experiencia de Biotecnología Amgen

Descubrimiento científico para el salón de clase



ÍNDICE

PESTAÑA A

ACERCA DE LA EXPERIENCIA DE BIOTECNOLOGÍA AMGEN	A-1
INTRODUCCIÓN AL PROGRAMA	A-3
Lectura: ¿Qué es la ingeniería genética?	A-5
Tu desafío	A-13
Glosario de la Introducción al Programa	A-14
CAPÍTULO 1: ALGUNAS HERRAMIENTAS DE LA INDUSTRIA	A-15
Introducción	A-17
Práctica de laboratorio 1.1: Cómo usar una micropipeta	A-18
Lectura: El proceso de ingeniería genética	A-22
Práctica de laboratorio 1.2: Electroforesis en gel	A-24
Preguntas del capítulo 1	A-30
Glosario del capítulo 1	A-31

PESTAÑA B

CAPÍTULO 2: ¿CÓMO COMIENZAS A CLONAR UN GEN?	B-1
Introducción	B-3
Lectura: Plásmidos y enzimas de restricción	B-4
Actividad: Clonar ese gen	B-9
Práctica de laboratorio 2: Preparación para clonar el gen rfp: Digestión de los plásmidos pKAN-R y pARA	B-12
Preguntas del capítulo 2	B-17
Glosario del capítulo 2	B-18

CAPÍTULO 3: CREACIÓN DE UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE	B-21
Introducción	B-23
Lectura: Ligasas	B-24
Práctica de laboratorio 3: Creación del plásmido pARA-R	B-27
Preguntas del capítulo 3	B-30
Glosario del capítulo 3	B-31
 CAPÍTULO 4: CÓMO ASEGURARTE DE QUE HAS CREADO UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE	 B-33
Introducción	B-35
Lectura: Verificación	B-36
Práctica de laboratorio 4: Verificación de la restricción y ligación con electroforesis en gel	B-41
Preguntas del capítulo 4	B-47
Glosario del capítulo 4	B-48
 CAPÍTULO 5: INSERCIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN BACTERIAS	 B-49
Introducción	B-51
Lectura: Transformación de bacterias con plásmidos recombinantes	B-52
Práctica de laboratorio 5: Transformación de bacterias con los productos de ligación	B-56
Preguntas del capítulo 5	B-65
Glosario del capítulo 5	B-67
 PESTAÑA C	
CAPÍTULO 2A: ¿CÓMO COMIENZAS A CLONAR UN GEN?	C-1
Introducción	C-3
Lectura: Plásmidos y enzimas de restricción	C-4
Actividad: Clonar ese gen	C-9
Práctica de laboratorio 2A: Preparación para verificar el gen <i>rfp</i> : Digestión del plásmido pARA-R	C-12
Preguntas del capítulo 2A	C-17
Glosario del capítulo 2A	C-18

CAPÍTULO 4A: CÓMO ASEGURARTE DE QUE TIENES UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE	C-21
Introducción	C-23
Lectura: Verificación	C-24
Práctica de laboratorio 4A: Verificación del plásmido recombinante con electroforesis en gel	C-29
Preguntas del capítulo 4A	C-33
Glosario del capítulo 4A	C-34

CAPÍTULO 5A: INSERCIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN BACTERIAS	C-35
Introducción	C-37
Lectura: Transformación de bacterias con plásmidos recombinantes	C-38
Práctica de laboratorio 5A: Transformación de bacterias con el plásmido pARA-R	C-42
Preguntas del capítulo 5A	C-51
Glosario del capítulo 5A	C-53

PESTAÑA D

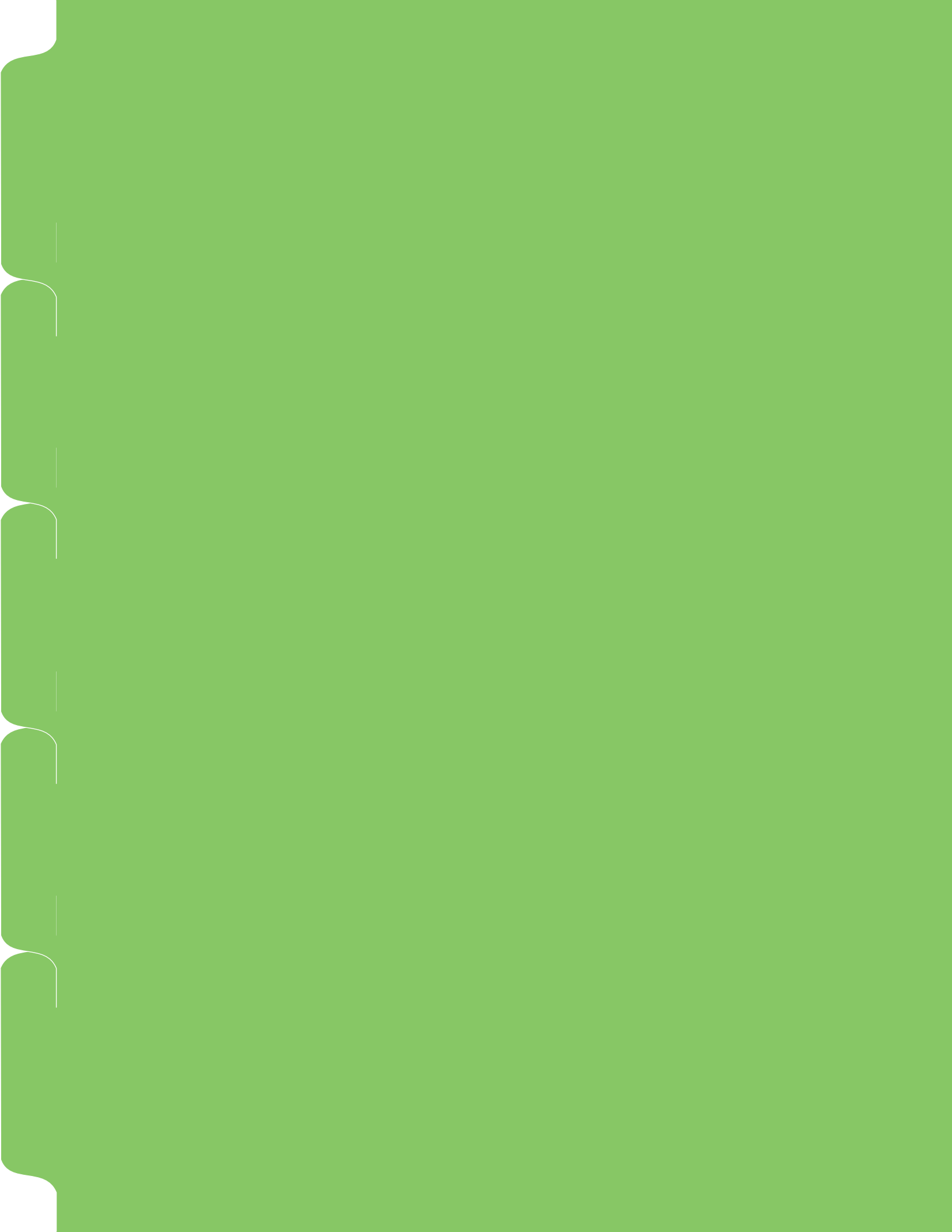
CAPÍTULO 5B: INSERCIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN BACTERIAS	D-1
Introducción	D-3
Lectura: Plásmidos y enzimas de restricción	D-4
Actividad: Clonar ese gen	D-9
Lectura: Transformación de bacterias con plásmidos recombinantes	D-12
Práctica de laboratorio 5B: Transformación de bacterias con un plásmido recombinante (pARA-R)	D-16
Preguntas del capítulo 5B	D-25
Glosario del capítulo 5B	D-27

PESTAÑA E

CAPÍTULO 6: OBTENER LO QUE NECESITAMOS	E-1
Introducción	E-3
Lectura: Multiplicación de bacterias y purificación de proteínas	E-4
Práctica de laboratorio 6: Purificación de la proteína fluorescente	E-10
Preguntas del capítulo 6	E-17
Glosario del capítulo 6	E-19

Experiencia de Biotecnología Amgen

Descubrimiento científico para el salón de clase



ACERCA DE LA EXPERIENCIA DE BIOTECNOLOGÍA AMGEN

La *ingeniería genética* es una rama de la biotecnología que usa procedimientos y técnicas especiales para cambiar el ADN de un organismo. Esta capacidad ha tenido un enorme impacto en el campo de la medicina, ya que las bacterias modificadas genéticamente pueden producir *insulina* humana (la hormona responsable de regular los niveles de *glucosa* en la sangre) y otros productos que pueden salvar la vida. No es frecuente que los alumnos de la escuela secundaria tengan la posibilidad de aprender y verdaderamente practicar los procedimientos y las técnicas que forman la base de la industria biotecnológica. Pero en este programa, tendrás precisamente esa oportunidad. Al trabajar en el laboratorio y realizar los mismos experimentos que produjeron grandes avances en la biotecnología, obtendrás experiencia de primera mano al producir bacterias modificadas genéticamente.

Los procedimientos de este programa se desarrollaron mediante una serie de descubrimientos que derivaron en grandes avances para la biotecnología. Algunos de los científicos pioneros que realizaron estos descubrimientos recibieron el Premio Nobel de Fisiología o de Medicina en 1978, y de Química en 1980 y en 1993. (El Premio Nobel es la distinción más importante que se entrega a científicos de estas disciplinas en todo el mundo). El trabajo que estás a punto de realizar se basa en esta ciencia ganadora del Premio Nobel; una ciencia que es significativa y seguirá cumpliendo una función importante en el desarrollo de la biotecnología y la medicina. Seguirás las huellas de los diversos científicos que han ido más allá y siguen yendo más allá de los límites de la biotecnología. Aún quedan muchos avances por hacer; y los alumnos que deciden seguir estudiando esta disciplina pueden contribuir con esos avances.

En la ciencia, la capacidad de tener un registro de lo que estás haciendo y comunicar tu trabajo es sumamente importante. Con el objeto de demostrar que realizaste un experimento, para que pueda duplicarse y ser verificado por otras personas, o si quieres solicitar una patente, debes tener un registro muy preciso de lo que has hecho. Al llevar adelante este programa, registra cuidadosamente tus notas, ideas, observaciones, resultados y respuestas a preguntas en una libreta de ciencias, con un bolígrafo. (Para los fines científicos, es importante mantener un registro, incluso de los errores). De ser posible, usa un cuaderno

de tapa dura para composiciones y organiza las prácticas de laboratorio con un índice en el frente. Como usarás un bolígrafo para escribir, tendrás que tachar los errores que cometas. Es una buena práctica simplemente marcar con "X" toda la sección que quieres cambiar (de modo que igualmente se pueda leer) y anotar por qué lo has hecho. ¡Si sigues estas buenas prácticas harás que este programa sea una preparación aún mejor para ti!

La Experiencia de Biotecnología Amgen (anteriormente Programa de Laboratorio Biotecnológico Amgen-Bruce Wallace) tuvo un tímido comienzo hace casi 25 años, con científicos y profesores visionarios que compartían la pasión y la energía de transmitir sus conocimientos con los alumnos. Bruce Wallace, uno de los primeros integrantes del personal de Amgen, quería que todos los alumnos experimentaran la alegría del descubrimiento y el entusiasmo por tener a la ciencia en la punta de los dedos. Con el deseo de una educación científica más fuerte en las escuelas cercanas a las sedes globales de Amgen, se hizo participar a profesores de escuelas secundarias de la zona y, más adelante, a un profesor de facultad, en la elaboración de un plan de estudios y la capacitación a educadores en biotecnología. El programa creció por el boca a boca y el interés de los profesores, y se extendió con el tiempo a otros estados y países.

Visite la página de web de ABE en: www.amgenbiotechexperience.com/es



INTRODUCCIÓN AL PROGRAMA

EXPERIENCIA DE BIOTECNOLOGÍA AMGEN



¿QUÉ ES LA INGENIERÍA GENÉTICA?

ATENCIÓN: Previsualiza el título, los subtítulos y las ilustraciones que se encuentran en las páginas A-5 a A-12 y luego enumera los temas que crees que se tratarán en esta lectura.



TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CON CLONACIÓN DE GENES

Hasta hace relativamente poco, las personas con determinadas enfermedades debían confiar en remedios que eran costosos y, a veces, difíciles de encontrar. Por más asombroso que pueda parecer, muchas de estas enfermedades son el resultado de la pérdida de una sola función de la proteína, ya sea porque la proteína producida es defectuosa o porque no se produce en cantidades normales. (Una *proteína* es una *biomolécula* grande que desempeña funciones esenciales en las células). Por ejemplo, las personas con *hemofilia*, un trastorno hemorrágico en el que la sangre no se coagula normalmente, producen muy poca (o ninguna) proteína del factor de coagulación; la deficiencia de la hormona del crecimiento humano puede provocar crecimiento deficiente, retraso de la pubertad y debilidad muscular en niños, y fatiga, disminución de la masa muscular y ósea, calvicie, aumento de la grasa corporal y pérdida de la memoria en adultos.

Al darle al paciente una proteína funcional, es posible aliviar los síntomas de estas enfermedades. Antes de la tecnología de ingeniería genética, era necesario extraer estas proteínas terapéuticas de fuentes naturales, como la sangre humana o el tejido animal, un proceso generalmente difícil, ineficaz y costoso. Las compañías farmacéuticas pueden usar la ingeniería genética (o la *clonación de genes*, como se le suele llamar) para producir estas proteínas en forma rentable, en cantidades mucho mayores, y sin las impurezas y virus que se pueden transmitir con las muestras de sangre y de tejido. La clonación genética implica insertar el gen humano que codifica la proteína en las bacterias donde se produce la proteína junto con todas las demás proteínas bacterianas.



ATENCIÓN: ¿Qué es lo que ya sabes sobre la clonación?

La capacidad de producir una cantidad suficiente de proteínas para tratar enfermedades es el resultado de dos descubrimientos clave sobre las bacterias, realizados por científicos en la década de los años setenta y ochenta. El primer descubrimiento fue que las bacterias contienen círculos diminutos de ADN, denominados *plásmidos*, que a veces contienen genes que pueden hacerlas resistentes a los antibióticos. El segundo descubrimiento fue que las bacterias también contienen proteínas denominadas *enzimas de restricción* que pueden cortar el ADN en lugares muy específicos.

Los hallazgos que se obtienen con investigaciones básicas a menudo permiten comprender aspectos fundamentales sobre la naturaleza de la vida. En algunos casos, estos hallazgos también pueden derivar en nuevas tecnologías que pueden mejorar la vida. Con el descubrimiento de los plásmidos y las enzimas de restricción, se lanzó toda una nueva era de ingeniería genética. Los científicos ahora tienen la capacidad de generar productos que pueden mejorar la salud de maneras jamás imaginadas anteriormente.

Uno de los primeros productos farmacéuticos elaborados con estas herramientas fue la insulina, que se usa para tratar la *diabetes*, una enfermedad debilitante y a veces mortal. Para generar grandes cantidades de insulina humana, las secuencias de ADN que contienen los códigos de la insulina humana se insertan en un plásmido que se introduce en la bacteria intestinal común *Escherichia coli* (*E. coli*), donde la nueva proteína es sintetizada junto con todas las demás proteínas bacterianas. Luego las bacterias modificadas genéticamente se multiplican en grandes lotes, y la insulina se purifica para su uso en el tratamiento de la diabetes.



ATENCIÓN: ¿Crees que el tratamiento de la diabetes con insulina se puede considerar una cura? ¿Cuál es la diferencia entre un tratamiento y una cura?

¿Por qué es tan importante la capacidad para producir grandes cantidades de insulina, y cómo se hace esto exactamente? En las siguientes lecturas, aprenderás sobre la diabetes: qué es y por qué hay tanta demanda de insulina. Luego llevarás a cabo algunos de los mismos procedimientos que usan los científicos para producir insulina humana en las bacterias. Pero en lugar de producir insulina, manipularás *E. coli* genéticamente para producir una proteína roja fluorescente. Esta proteína es producida por un gen de la anémona marina que ha mutado y hace que la proteína tenga un color más brillante. Le darás una nueva proteína a la *E. coli* y un rasgo que no tenía antes: *la capacidad de brillar*.

LUGAR Y FECHA: AMÉRICA DEL NORTE

DIABETES ADOLESCENTE EN AUMENTO

La aparición de la diabetes de tipo 2 en los adolescentes, una enfermedad que antes se encontraba principalmente en adultos, ha aumentado drásticamente en los últimos 10 años. Casi uno de cada cuatro adolescentes entre los 12 y los 19 años de edad es prediabético (es decir, se manifiestan los primeros signos de la diabetes) o ya tiene la enfermedad. Para empeorar aun más las cosas, las investigaciones sugieren que la enfermedad avanza con mayor rapidez en niños que en adultos. En la diabetes, los niveles de *glucosa* (un tipo de azúcar) en la sangre pueden aumentar de manera peligrosa y producir complicaciones, como la pérdida de la vista, insuficiencia renal, y daños en los nervios y vasos sanguíneos. El inicio de la diabetes en forma temprana podría derivar en graves problemas de salud, como enfermedad cardíaca, ceguera y amputación, en personas de 30 a 50 años, mucho más jóvenes de las edades en que se veían estas complicaciones anteriormente.

¿Por qué este aumento repentino en la diabetes adolescente? Si bien el sobrepeso o la obesidad pueden contribuir en gran medida a la aparición de la diabetes, el peso no es el único factor. El 35% de los adolescentes con peso normal tienen niveles de glucosa más elevados de lo normal, lo cual es un indicador de la prediabetes. Los factores como la falta de ejercicio, en esta edad en que hay un mayor uso de computadoras y dispositivos móviles, puede ser parte del problema. Si bien muchos prediabéticos terminan presentando diabetes de tipo 2 avanzada, los estudios indican que el consumo de menos grasas y menos calorías, y el ejercicio durante solo 20 minutos por día pueden disminuir en un 60% el riesgo de padecer diabetes de tipo 2.

La diabetes puede ser consecuencia de la incapacidad del cuerpo para producir suficiente cantidad de insulina (tipo 1) o para usar eficazmente la insulina que produce (tipo 2). Hay muchos pacientes con diabetes que deben administrarse insulina con una inyección. La presencia de más casos de diabetes en la población significará una mayor demanda de insulina.

¿Cómo es para una adolescente saber que tiene diabetes? Lee la siguiente historia sobre la lucha de una adolescente con la enfermedad.

LA HISTORIA DE JENNIFER

Jennifer tenía hambre todo el tiempo, pero a pesar de comer lo que quería y cuando quería, estaba bajando de peso. También tenía mucha sed, y constantemente tomaba agua y le daban

ganas de orinar. Al principio, simplemente pensó que era algo típico de una chica de 15 años; estaba en una etapa de crecimiento y se mantenía muy activa con el fútbol y atletismo en la escuela. ¡Era obvio que tendría hambre y sed! También estaba contenta con su pérdida de peso, ya que durante un tiempo había tenido un poco de sobrepeso. Jennifer también se sentía cansada y desganada en forma atípica, especialmente por la tarde. Pero nuevamente, ¿quién no lo estaría si la escuela comenzaba en el infame horario de las 7:30 am? Cuando empezó a tener problemas para ver el pizarrón en clase, pensó, ¡Caray! ¿*Realmente necesito anteojos*? Pero fue un corte en la pierna que no se curaba y se infectó lo que, finalmente, hizo que hablara con sus padres y fuera al consultorio del médico. Allí a Jennifer le diagnosticaron diabetes.

Jennifer había escuchado sobre una enfermedad llamada diabetes, pero nunca había pensado mucho en eso. Ahora realmente debía prestarle atención. La diabetes se debe a una cantidad excesiva de un azúcar (llamada glucosa) en la sangre, que no entra en cantidades suficientes en las *células*, donde proporciona la energía necesaria para construir las moléculas biológicas que el cuerpo necesita para sobrevivir. Jennifer aprendió que para que la glucosa entre en las células, el cuerpo produce una hormona llamada insulina, que se une a las células y le permite a la glucosa entrar en ellas. Por algún motivo, el cuerpo de Jennifer ya no producía cantidades normales de insulina, por lo que ella tenía niveles muy altos de glucosa en la sangre y no entraba suficiente glucosa en las células. Jennifer tenía la esperanza de poder controlar la diabetes comiendo más frutas y verduras, y haciendo más ejercicio. Pero si bien este cambio de hábitos ayudó un poco, no fue suficiente, y Jennifer tuvo que comenzar a inyectarse insulina diariamente.

Ahora Jennifer está muy atenta a lo que come, y controla exactamente la cantidad de azúcar y otros carbohidratos que ingiere. Se controla su nivel de glucosa en sangre varias veces al día pinchándose el dedo y analizando la sangre. También se inyecta insulina religiosamente. Ella sabe que no puede curarse de la diabetes, y que si la enfermedad avanza más puede sufrir complicaciones muy graves.

DIABETES DE TIPO 1 Y 2

DIABETES: DEMASIADO DE ALGO BUENO

¿Qué es la diabetes? La diabetes es el resultado de los niveles elevados de glucosa en la sangre. La glucosa es la principal fuente de energía y se usa para construir moléculas biológicas en el cuerpo. Lo que hoy comiste en el desayuno o el almuerzo se convierte rápidamente en glucosa, que a su vez se usará para generar energía, sintetizar nuevas células y tejidos, y llevar a cabo procesos necesarios para el sostén de la vida. El almidón del pan o de las papas está formado por largas cadenas de moléculas de glucosa (**Figura P.1a**). A medida que la comida pasa por la boca, el esófago y el estómago (**Figura P.1b**), estas cadenas se degradan para liberar la glucosa. La glucosa luego se absorbe a través de la pared intestinal y entra al torrente sanguíneo, donde es transportada a todas las células del cuerpo (**Figura P.1c**).

Figura P.1: Cómo entra la glucosa en las células

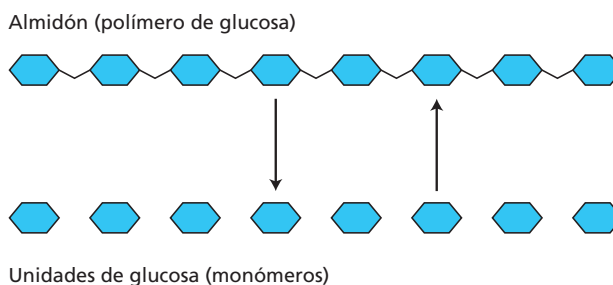


Figura P.1a: El almidón está compuesto por subunidades de glucosa unidas entre sí.

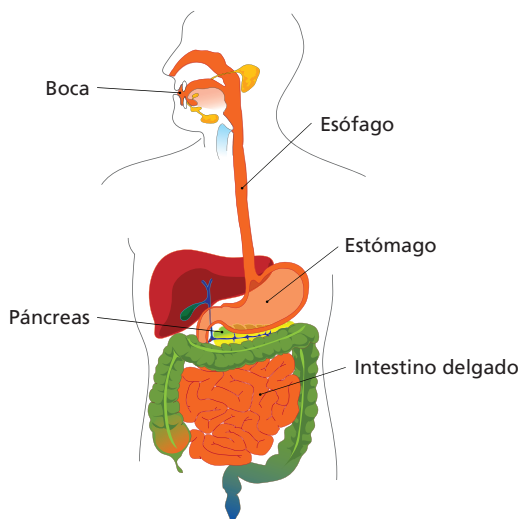


Figura P.1b: Los nutrientes como el almidón se degradan y convierten en moléculas más pequeñas durante la digestión en la boca, el esófago y el estómago.

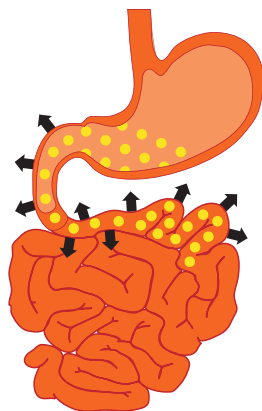
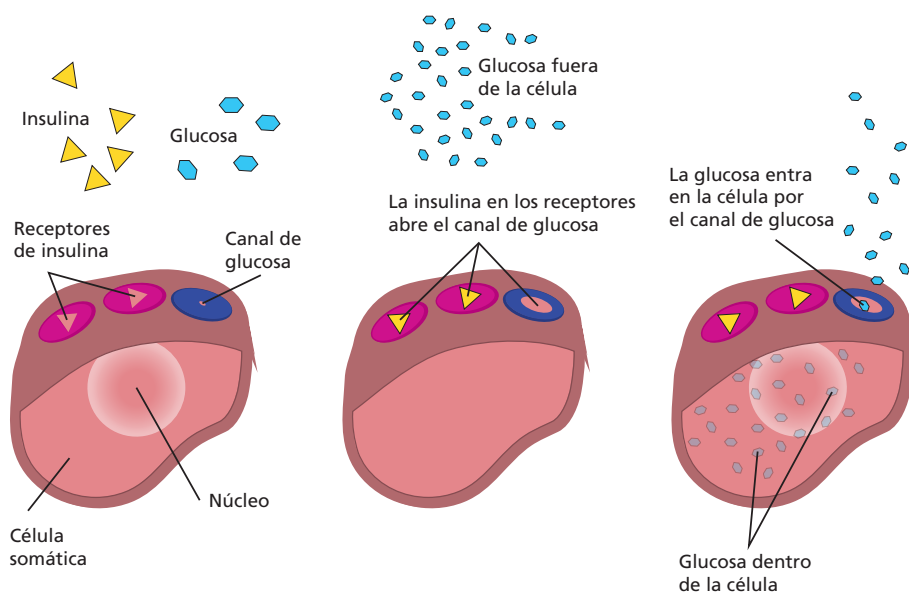


Figure P.1c: Las moléculas de glucosa pasan a través de la pared del intestino delgado al torrente sanguíneo, lo que envía la glucosa a las células del cuerpo.

CRUZANDO DE LA DIVISIÓN CELULAR

Para entrar en la célula, la glucosa debe atravesar la membrana celular que separa el interior de la célula de su entorno. La insulina, que está formada por células β que se encuentran en el páncreas (ver la **Figura P.1b**), se une a una proteína especial denominado *receptor*, lo que provoca una abertura en la membrana celular y permite que la glucosa entre en la célula (ver la **Figura P.2**). Sin insulina, la glucosa no puede penetrar esta barrera celular.

Figura P.2: Cómo la glucosa atraviesa la membrana celular



La insulina en la sangre se une a receptores específicos de la célula. Esta unión altera la conformación de la membrana celular, lo que hace que se forme un canal de glucosa. La glucosa en la sangre ahora puede entrar a la célula a través de estos canales.

Tanto en la diabetes de tipo 1 como en la de tipo 2, la glucosa no puede entrar en las células, por lo que se producen niveles elevados de glucosa en la sangre. En la diabetes de tipo 1, las células β del páncreas no pueden producir insulina. Sin insulina para crear los canales de glucosa, la glucosa permanece en la sangre (**Figura P.3a**). La diabetes de tipo 2 es el resultado de una combinación de dos factores: (1) las células se vuelven resistentes a la insulina, y los receptores ya no pueden unirse a la hormona (**Figura P.3b**). Al aumentar los niveles del azúcar en la sangre, las células β bombean cada vez más insulina en forma inútil, ya que las células no la pueden usar. (2) Finalmente, las células β quedan exhaustas y ya no pueden producir insulina, y los niveles de insulina en la sangre caen mientras que los niveles de azúcar siguen aumentando.

Figura P.3: Absorción reducida de glucosa en las células

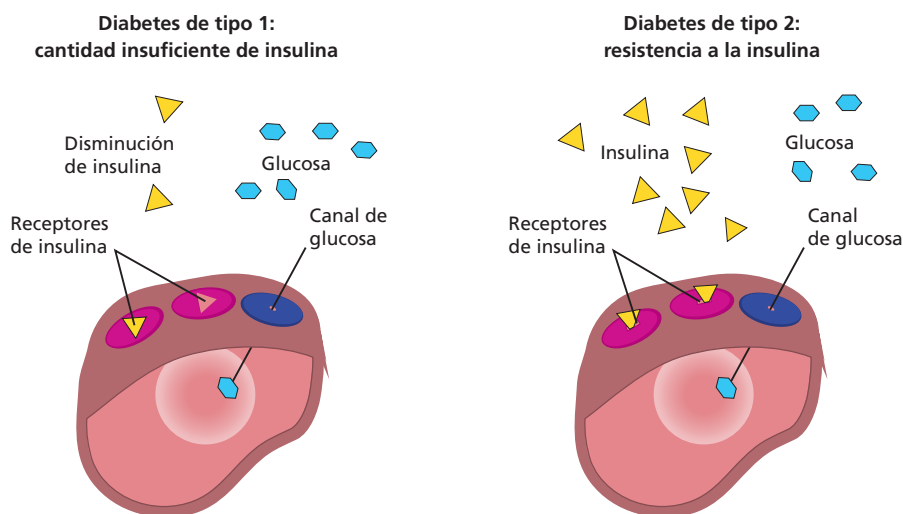


Figura P.3a: En la diabetes de tipo 1, hay una falta de insulina en el cuerpo.

Figura P.3b: En la diabetes de tipo 2, las células no se pueden unir a la insulina.

LOS PROBLEMAS DE TENER MUY Poca GLUCOSA INTRACELULAR

Cuando las células no pueden recibir glucosa, no pueden obtener la energía y las moléculas biológicas que necesitan. El cuerpo responde degradando las grasas y proteínas para obtener la energía necesaria. La pérdida de proteínas y grasas puede provocar daños graves en tejidos y órganos, y causar los síntomas de la diabetes que sufren los pacientes como Jennifer, tales como ceguera y daños en el sistema nervioso (que pueden derivar en una amputación).

TRATAMIENTO DE LA DIABETES

Las personas con diabetes de tipo 1 pueden regular sus niveles de azúcar controlándose la sangre e inyectándose insulina según sea necesario. Aquellos con diabetes de tipo 2, a veces, pueden regular sus niveles de azúcar en la sangre cambiando su alimentación y aumentando la cantidad de ejercicio que realizan. Sin embargo, en muchos casos se necesitan medicamentos que disminuyan la resistencia a la insulina en las células y que aumenten los niveles de insulina en la sangre, para mantener niveles normales de azúcar en la sangre.

Actualmente, no existe una cura para ninguno de los tipos de diabetes.

E. COLI CON UN GEN HUMANO

Con el aumento de la diabetes en la población, también está aumentando la necesidad de insulina para los tratamientos. Originalmente, se aislaba del páncreas de cerdos y vacas, pero hoy en día la mayoría de la insulina utilizada es insulina humana manipulada genéticamente, fabricada por bacterias. Las secuencias de ADN que codifican la insulina humana en los plásmidos son tomadas por las bacterias, que producen la hormona junto con todas sus proteínas bacterianas. Luego se aísla la insulina de las bacterias. En 1982, la insulina humana fue el primer producto comercialmente exitoso producido por la tecnología de ADN recombinante. (El *ADN recombinante* se refiere al ADN que contiene secuencias o genes de dos o más orígenes).

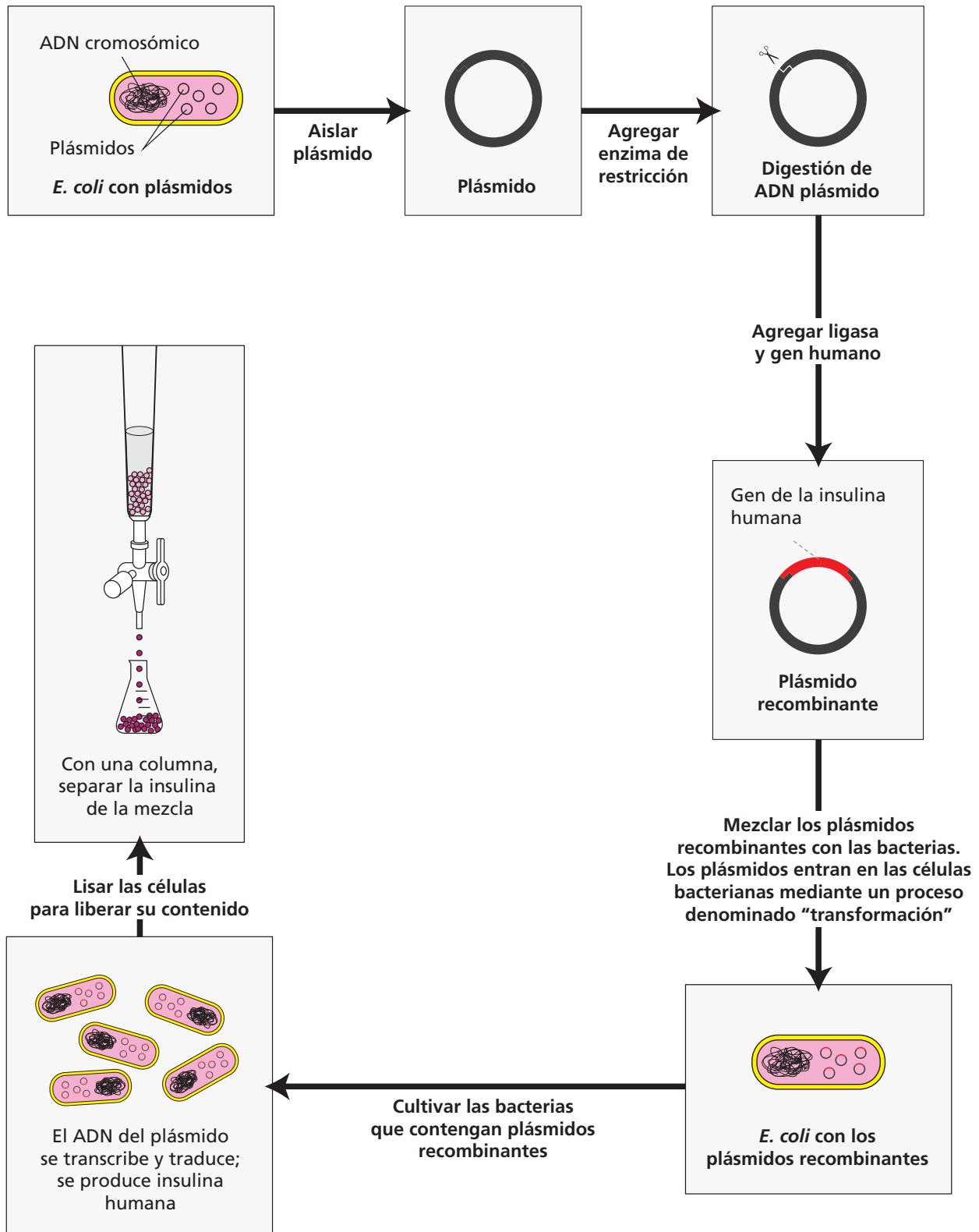
ATENCIÓN: ¿Por qué podría ser que la diabetes esté en aumento, especialmente entre los adolescentes?



PRODUCCIÓN DE NUEVAS PROTEÍNAS EN LAS BACTERIAS

Figura P.4 muestra cómo se puede producir una proteína humana, en este caso la insulina, en las bacterias. La insulina luego se purifica para que puedan usarla las personas con diabetes.

Figura P.4: Producción de insulina en las bacterias



TU DESAFÍO

Tu desafío en la Experiencia de Biotecnología Amgen es llevar adelante, en forma exitosa, los pasos del proceso de ingeniería genética que se usa para producir insulina y otros productos manipulados genéticamente. Aprenderás y practicarás las técnicas y los procedimientos que forman parte de este proceso. Si sigues todos los pasos del programa, crearás tus propias bacterias modificadas genéticamente.

NOTA: La cantidad de pasos varían según el tiempo que tenga disponible tu clase.

En lugar de clonar insulina u otro gen humano, trabajarás con un gen mutado de una anémona marina, un animal de cuerpo blando relacionado con los corales y las medusas. (El gen se denomina *rfp* y la proteína producida por este gen se denomina proteína roja fluorescente.) ¿Cómo sabrás si tienes éxito en esta tarea? Las bacterias que produzcas tendrán un rasgo nuevo y muy visible: ¡ahora producirán una proteína roja fluorescente!

¿LO SABÍAS?

La proteína roja fluorescente en las anémonas marinas

La proteína roja fluorescente proviene de una proteína que se encuentra en las anémonas marinas. Si bien las anémonas marinas son sedentarias, y quedan fijas a las rocas, también son animales depredadores que usan sus tentáculos punzantes para capturar a su presa. La proteína brilla porque puede absorber un color de luz y luego emitir luz de un color



diferente; este proceso se conoce como *fluorescencia*. Pero, ¿por qué es importante que las anémonas marinas flúorescan? Suponemos que las proteínas fluorescentes de algún modo ayudan en la supervivencia de las anémonas marinas, pero aún no se comprende bien la función de estas proteínas.

Las moléculas fluorescentes pueden actuar como bloqueador solar, convirtiendo la luz UV nociva en luz que es menos perjudicial para los tejidos de la anémona. Otra posibilidad es que si bien los seres humanos no pueden detectar la fluorescencia a la luz del día, es posible que algunos animales puedan hacerlo y así la presa es atraída por el brillo.



GLOSARIO DE LA INTRODUCCIÓN AL PROGRAMA

ADN (ácido desoxirribonucleico): Biomolécula de doble cadena que codifica información genética.

ADN recombinante: ADN que contiene secuencias o genes de dos o más orígenes.

Biomolécula: Molécula creada por células vivas. La mayoría de las biomoléculas son polímeros largos, conformados por subunidades repetidas denominadas monómeros. Entre los ejemplos se incluyen proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos.

Células: Unidades básicas de todo organismo vivo que llevan a cabo los procesos bioquímicos de la vida.

Clonación de genes: Uso de técnicas de ingeniería genética para crear copias exactas, o clones, de un gen o una secuencia de ADN de interés.

Diabetes: Enfermedad que se presenta cuando el cuerpo no produce insulina o no la usa adecuadamente.

Enzima de restricción: Proteína que puede cortar el ADN en secuencias muy específicas.

Escherichia coli (E. coli): Bacteria común usada en muchos protocolos de biología molecular. La cepa de *E. coli* usada en estos protocolos de laboratorio es inocua.

Fluorescencia: Generación de luz por una molécula (p. ej. , la proteína roja fluorescente emitirá una luz roja al ser expuesta a la luz ultravioleta).

Glucosa: Tipo de azúcar que es la principal fuente de energía y biomoléculas para sustentar los procesos vitales. La glucosa se absorbe por el intestino y viaja en la sangre a las células, donde es transportada a través de la membrana celular para usarse como energía, sintetizar células y tejidos, y llevar adelante otros procesos celulares esenciales.

Hemofilia: Enfermedad que se presenta cuando disminuye la capacidad de la sangre para coagularse debido a la falta de uno o más factores de coagulación de la sangre.

Ingeniería genética: Rama de la biotecnología que usa procedimientos y técnicas específicos para cambiar el ADN de un organismo.

Insulina: Hormona producida en el páncreas que controla la cantidad de glucosa en la sangre. La insulina es una proteína.

Plásmido: Molécula circular de ADN.

Proteína: Biomolécula grande (macromolécula). Las proteínas cumplen funciones esenciales en las células, desde la formación de estructuras celulares hasta permitir que se produzcan las reacciones químicas.

Receptor: Proteína que recibe señales desde el exterior de la célula. Cuando una sustancia que sirve de señal se adhiere al receptor causa una respuesta celular, como por ejemplo permitir que las biomoléculas entren a la célula.



CAPÍTULO 1

ALGUNAS HERRAMIENTAS DE LA INDUSTRIA

INTRODUCCIÓN

El año 1978 marcó un gran avance en la medicina. Por primera vez en la historia, los científicos pudieron inducir a las *células* bacterianas para que produzcan insulina humana, introduciendo *ADN* humano en las células. Esta nueva tecnología, llamada *ingeniería genética*, se puede usar para generar productos que traten los síntomas de determinadas enfermedades genéticas.

Para trabajar con ingeniería genética necesitas buenas habilidades de laboratorio. En este capítulo, te centrarás en adquirir práctica en el uso de la *micropipeta* (instrumento usado para transferir pequeños volúmenes de líquido) y *electroforesis en gel* (técnica para separar e identificar *biomoléculas*), dos habilidades esenciales para la biotecnología. Realizarás dos prácticas de laboratorio con instrumentos y suministros que son idénticos a los usados en los laboratorios de investigación biotecnológica. Estas prácticas son el primer paso para construir las habilidades que necesitarás para realizar las prácticas posteriores y cumplir con tu desafío en este programa.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 1

Al final de este capítulo, podrás hacer lo siguiente:

- Usar micropipetas y la técnica de electroforesis en gel correctamente.
- Explicar la importancia de las micropipetas y la electroforesis en gel en la ingeniería genética.
- Describir la forma en que la electroforesis en gel separa el ADN.
- Explicar cómo se puede usar la ingeniería genética para tratar algunas enfermedades genéticas.

¿QUÉ ES LO QUE YA SABES?

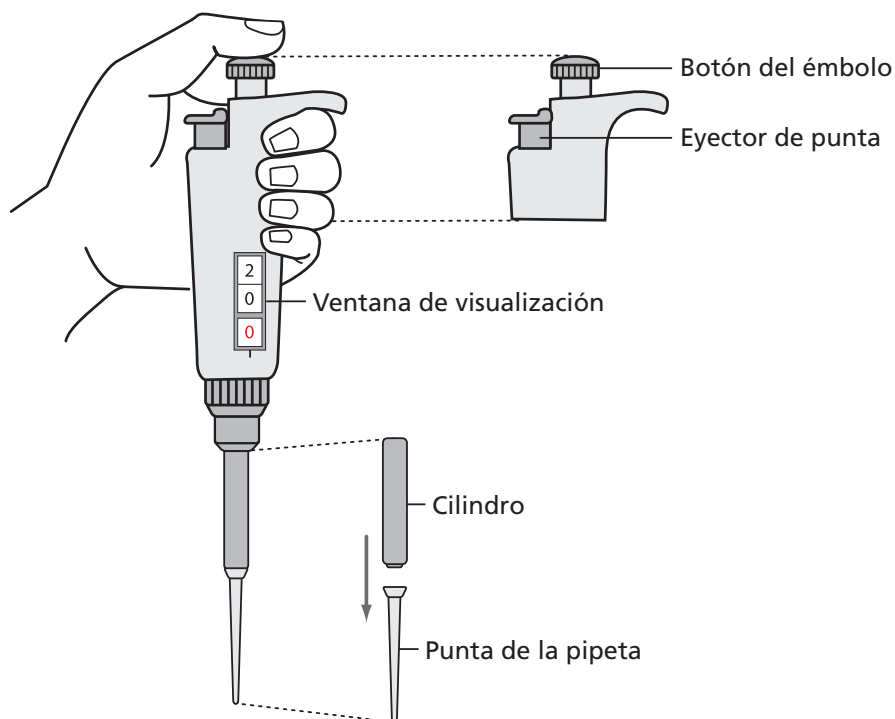
Analiza las siguientes preguntas con tu compañero y anota tus ideas en la libreta. Debes estar preparado para analizar tus respuestas con la clase. No te preocupes si no sabes todas las respuestas. El análisis de estas preguntas te ayudará a pensar acerca de lo que ya sabes sobre las enfermedades genéticas y el ADN.

1. ¿Qué significa el término *enfermedad genética*? ¿Qué ejemplos de enfermedades genéticas conoces?
2. Añadir ADN humano en las bacterias posibilita la producción de insulina humana. ¿Qué es lo que ya sabes sobre el ADN? Brinda todos los detalles posibles y analiza la ubicación del ADN en la célula, la estructura del ADN, la replicación del ADN y los componentes del ADN.

PRÁCTICA DE LABORATORIO 1.1: CÓMO USAR UNA MICROPIPETA

El objetivo de esta práctica de laboratorio es presentarte una herramienta importante que se usa en ingeniería genética: la micropipeta, que se muestra en la **Figura 1.1**. La micropipeta se usa para transferir volúmenes muy pequeños y exactos de líquidos en mililitros (ml, milésimas de litro) o microlitros (μ l, millonésimas de litro), que son las mediciones de volumen que se usan con mayor frecuencia en la ingeniería genética. En el proceso de ingeniería genética, las micropipetas se usan para transferir volúmenes muy pequeños y exactos de reactivos. En esta práctica de laboratorio tendrás la posibilidad de aprender a usar la micropipeta y de ver el tamaño relativo de diferentes cantidades de solución medidas con esta herramienta muy precisa.

Figura 1.1: Micropipeta P-20



ANTES DE LA PRÁCTICA DE LABORATORIO

Responde las siguientes preguntas con tu grupo y prepárate para compartir tus respuestas con la clase.

1. ¿Por qué crees que es necesario usar volúmenes muy pequeños y exactos de reactivos en biotecnología?
2. Lee la sección Métodos en las páginas A-19 a A-21 y describe brevemente los pasos con palabras y un diagrama de flujo.

MATERIALES

Reactivos

- Gradilla plástica para tubos de microcentrífuga con un tubo de microcentrífuga con solución de tinte rojo

Equipo y suministros

- Micropipeta P-20 (mide de 2.0 a 20.0 μl)
- Caja de puntas de pipeta desechables
- Hoja de práctica laminada de la micropipeta
- Recipiente para residuos, para puntas y tubos de microcentrífuga usados (se compartirá entre los grupos)

SEGURIDAD:

- Se deben seguir todas las precauciones de seguridad adecuadas y usar el atuendo requerido en un laboratorio de ciencias, incluso gafas de seguridad. Consulta las indicaciones de tu profesor.
- Lávate bien las manos con jabón después de finalizar la práctica de laboratorio.



MÉTODOS

Examinarás los volúmenes suministrados con una micropipeta.

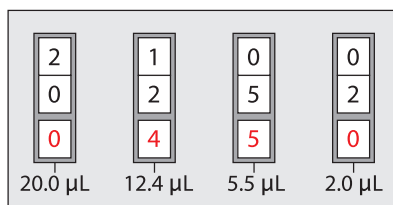
1. Revisa la gradilla para asegurarte de que tengas el reactivo nombrado.
2. Revisa las partes de la micropipeta (consulta la **Figura 1.1** en la página A-18).
3. Localiza la ventana de visualización en el mango de la micropipeta.
4. Gira el émbolo en la parte superior de la micropipeta en sentido horario (hacia la izquierda) para disminuir el volumen, o en contra de las manecillas del reloj (hacia la derecha) para aumentar el volumen.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Nunca cargues menos de 2.0 μL ni más de 20.0 μL en la micropipeta P-20, de lo contrario puedes dañar el equipo.

5. La Figura 1.2 muestra cuatro volúmenes de micropipeta. Practica colocar la micropipeta en estos volúmenes.

Figura 1.2: Cuatro volúmenes de micropipeta



La ventana de visualización de la micropipeta muestra la cantidad de líquido que cargará y suministrará. Se muestran cuatro ejemplos de visualizaciones y las cantidades correspondientes.

6. Revisa la hoja de práctica laminada de la micropipeta. Cada integrante del grupo pipeteará cinco gotas de diferentes volúmenes en la hoja. El pipeteo comprende dos partes: cargar el líquido en la micropipeta, y expulsar el líquido de la micropipeta.
7. Carga la micropipeta con 20.0 μL de tinte rojo, del siguiente modo:
 - a. Fija la micropipeta P-20 en 20.0 μL .
 - b. Abre la caja de puntas. Apunta la micropipeta contra una punta y presiona con firmeza (no toques la punta con los dedos). Cierra la caja cuando termines.
 - c. Sostén la micropipeta y el tubo con tinte rojo a la altura de los ojos.
 - d. Presiona el émbolo con el pulgar hasta la primera posición de detención, que es el primer punto de resistencia.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Al cargar la micropipeta, presiona el émbolo solo hasta la primera posición de detención, de lo contrario llevarás demasiada solución a la punta de la pipeta.

- e. Pon la punta de la pipeta en el tinte rojo y libera lentamente el émbolo para extraer la solución.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Si la micropipeta tiene líquido en la punta, no la apoyes en forma horizontal ni la sostengas con la punta hacia arriba. Si la punta desechable no está bien fija en el cilindro, el líquido puede filtrarse dentro de la pipeta.

8. Coloca el tinte rojo en la hoja laminada de la siguiente manera:
 - a. Coloca la punta de la pipeta sobre el círculo de 20.0 μL .
 - b. Presiona el émbolo con el pulgar hasta la primera posición de detención, y luego presiona hasta la segunda posición de detención.





TÉCNICA DE LABORATORIO: Al expulsar el líquido de la micropipeta, presiona el émbolo hasta la primera posición de detención para expulsar la mayor parte del líquido y luego presiona el émbolo hasta la segunda posición para expulsar lo último que quede.

- c. Con el émbolo aún bajo, retira la pipeta del tubo; esto evitará que extraigas accidentalmente el líquido y este vuelva a la punta.
9. Sin apoyar la micropipeta, gira el émbolo para fijarlo en 15.0 μl y repite los pasos 7b a 8c, colocando la punta de la pipeta sobre el círculo de 15.0 μl al expulsar el líquido.
10. Sin apoyar la micropipeta, gira el émbolo para fijarlo en 10.0 μl y repite los pasos 7b a 8c, colocando la punta de la pipeta sobre el círculo de 10.0 μl al expulsar el líquido.
11. Sin apoyar la micropipeta, gira el émbolo para fijarlo en 5.0 μl y repite los pasos 7b a 8c, colocando la punta de la pipeta sobre el círculo de 5.0 μl al expulsar el líquido.
12. Sin apoyar la micropipeta, gira el émbolo para fijarlo a 2.0 μl y repite los pasos 7b a 8c, colocando la punta de la pipeta sobre el círculo de 2.0 μl al expulsar el líquido.
13. Usa el eyector de punta para arrojar la punta de la pipeta en el recipiente para residuos

DETENTE Y PIENSA:

- Al cargar o expulsar una solución, ¿por qué es importante ver en realidad la solución que entra o sale de la punta de la pipeta?
- Te indicaron que evites el contacto con las puntas de la pipeta; por ejemplo, te dijeron que coloques la punta de la pipeta sin usar las manos, que no apoyes la micropipeta, que uses el botón eyector para quitar la punta y que mantengas cerrada la caja de las puntas. Si estuvieras trabajando con plásmidos y células bacterianas, ¿por qué serían importantes estas precauciones?



14. Usando la hoja de práctica de la micropipeta, asegúrate de que cada persona de tu grupo pipetee cinco gotas de diferentes volúmenes, y que cada persona use una punta de pipeta nueva.
15. Cuando todos en el grupo hayan tenido la posibilidad de colocar tinte rojo en la hoja de práctica de la micropipeta, dibuja los tamaños aproximados de cada gota en tu libreta (o saca una fotografía y pégala en tu libreta) y anota las cantidades de cada gota.

EL PROCESO DE INGENIERÍA GENÉTICA

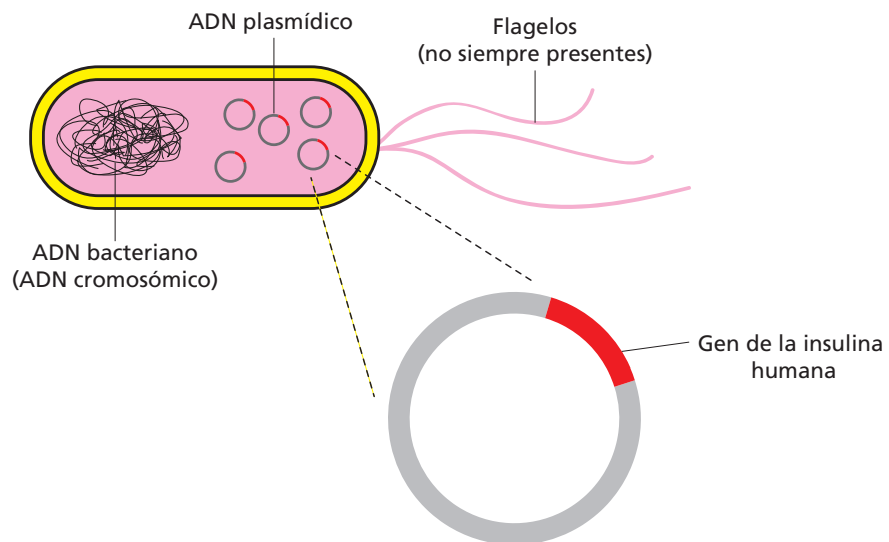
¿Conoces a alguien que tome *insulina*, un *factor de coagulación de la sangre* o una *hormona del crecimiento humano*? Estas sustancias son todas *proteínas* fabricadas en determinadas células humanas. Si esas células no producen estas proteínas en particular, condiciones como *diabetes*, *hemofilia* y *retraso del crecimiento* pueden manifestarse. El paciente que tenga una de estas enfermedades debe ser tratado con la proteína que no puede producir.



ATENCIÓN: Antes de la ingeniería genética, ¿cómo obtenía la gente las proteínas que no produce por una enfermedad genética?

Antes del desarrollo de la ingeniería genética era difícil obtener proteínas humanas para tratar a las personas que las necesitaban. Ahora, las bacterias pueden producir estas proteínas porque los científicos han descubierto una forma de cambiar el ADN bacteriano agregando ADN humano (ver la **Figura 1.3**).

Figura 1.3: Célula bacteriana con ADN humano



¿Cuál es la relación entre el ADN y las proteínas? Los dos son biomoléculas, moléculas grandes producidas por células vivas. Cuando los científicos investigaron los rasgos en los organismos, descubrieron que las proteínas eran las responsables de los rasgos. Por ejemplo, piensa en una planta que tiene flores rojas como rasgo. El pigmento rojo de las flores es producido por la acción de una enzima (una clase de proteína). El ADN de esa planta contiene las instrucciones para producir proteínas, incluida esa enzima. La parte de una

molécula de ADN que tiene las instrucciones para producir una proteína en particular se denomina *gen*.

En el proceso de ingeniería genética, se agrega un gen humano a un *plásmido*, una parte de ADN pequeña y circular que se encuentra en muchas bacterias. Las células bacterianas toman el plásmido, y las células producen la proteína humana codificada por el gen humano junto con sus propias proteínas. Durante este proceso, los biotecnólogos usan una combinación de herramientas, algunas hechas por el ser humano y otras biológicas. Entre las herramientas hechas por el ser humano, hay dos que usarás para trabajar en este capítulo: micropipetas y electroforesis en gel.

¿LO SABÍAS?

Código del ADN

La información del ADN se codifica mediante la agrupación de *nucleótidos*, pequeñas moléculas que se unen para formar la molécula de ADN. La molécula de ADN tiene millones de nucleótidos. Hay cuatro clases diferentes de nucleótidos, y se ordenan en una *secuencia* (orden) específica. La secuencia específica de nucleótidos del ADN (es decir, el gen) es un código para saber cómo producir una proteína específica. Piensa en una secuencia de nucleótidos como si fuera una secuencia de notas musicales escritas: el código para tocar la música. Del mismo modo que las distintas secuencias de notas codifican diferentes canciones, las distintas secuencias de nucleótidos codifican diferentes proteínas.

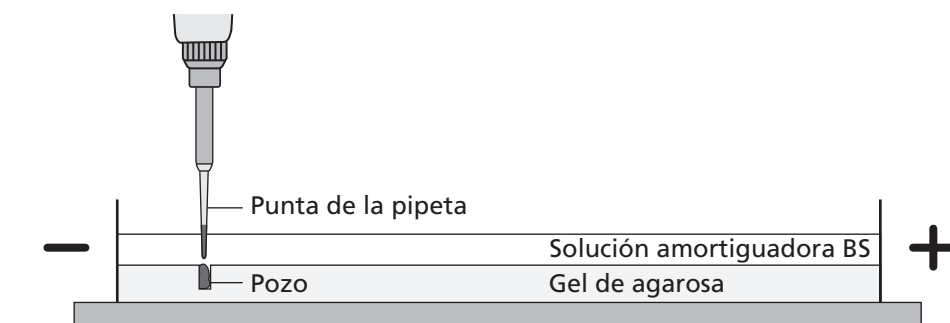


PRÁCTICA DE LABORATORIO 1.2: ELECTROFORESIS EN GEL

El objetivo de esta práctica de laboratorio es que adquieras experiencia en el uso de electroforesis en gel, que se usa para separar e identificar una mezcla de biomoléculas que incluyen el ADN. Los componentes de cada mezcla luego se pueden identificar por su ubicación en el gel. La electroforesis en gel funciona sobre la base de que las biomoléculas tienen una carga, lo que significa que se moverán en respuesta a un campo eléctrico. Las biomoléculas se desplazan por un gel, y la velocidad varía principalmente según su peso, aunque la forma molecular y el grado de carga también influyen en su desplazamiento. En el proceso de ingeniería genética, la electroforesis en gel se usa para separar e identificar plásmidos y fragmentos lineales cortos de ADN.

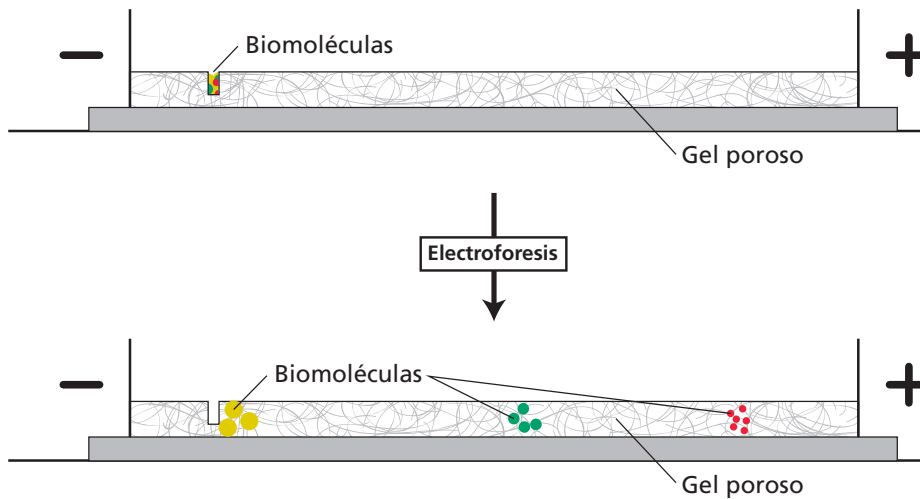
La preparación de la electroforesis comprende una cámara con gel de agarosa y dos electrodos que generan un campo eléctrico en el gel al conectar la cámara a una fuente de energía. El electrodo negativo es negro, y el electrodo positivo es rojo. Las muestras de biomoléculas se pipetea en pozos cerca del electrodo negativo (negro). Las biomoléculas se desplazan por el gel hacia el electrodo positivo (rojo), como se muestra en la **Figura 1.4**.

Figura 1.4: Unidad de electroforesis en gel



El gel por el que se desplazan las biomoléculas está compuesto de *agarosa*, un polisacárido (azúcar complejo) que se encuentra en las algas. Su estructura es una matriz porosa (como una esponja) con muchos orificios a través de los cuales circulan la solución y las biomoléculas. Ver la **Figura 1.5**.

Figura 1.5: Cómo se desplazan las biomoléculas, incluido el ADN, por la matriz de gel de agarosa en la electroforesis en gel



ANTES DE LA PRÁCTICA DE LABORATORIO

Responde las siguientes preguntas con tu grupo y prepárate para compartir tus respuestas con la clase.

1. ¿En qué circunstancias podría ser importante usar electroforesis en gel para separar e identificar plásmidos y fragmentos lineales cortos de ADN?
2. Lee la sección Métodos en las páginas A-26 a A-29, y describe brevemente los pasos para la *Parte A* y para la *Parte B* con palabras y un diagrama de flujo.

MATERIALES

Reactivos

- Gradilla plástica para tubos de microcentrífuga con lo siguiente:
 - Tubo de microcentrífuga con solución de tinte rojo
 - Tubo de microcentrífuga con solución de tinte 1 (S1)
 - Tubo de microcentrífuga con solución de tinte 2 (S2)
 - Tubo de microcentrífuga con solución de tinte 3 (S3)
- Matraz de 50 ml con solución amortiguadora de borato de sodio 1x (1x BS) (compartido con otro grupo)

Equipo y suministros

- Micropipeta P-20 (mide de 2.0 a 20.0 μ l)



- Caja de puntas de pipeta desechables
- 2 placas de práctica para pipeteado con gel de agarosa al 0.8 %
- Cubeta de electroforesis con gel de agarosa al 0.8 % (se compartirá entre dos grupos)
- Microcentrífuga (se compartirá entre todos los grupos)
- Recipiente para residuos, para puntas y tubos de microcentrífuga usados (se compartirá entre los grupos)

SEGURIDAD:

- Se deben seguir todas las precauciones de seguridad adecuadas y usar el atuendo requerido en un laboratorio de ciencias, incluso gafas de seguridad. Consulta las indicaciones de tu profesor.
- Lávate bien las manos con jabón después de finalizar la práctica de laboratorio.

MÉTODOS

PARTE A: PIPETEADO EN POZOS

Practicarás el pipeteado de tinte rojo en pozos preformados en un gel de agarosa.

1. Revisa la gradilla para asegurarte de que tengas todos los reactivos nombrados.
2. Llena las dos placas de práctica para pipeteado con 1x BS hasta un nivel que apenas cubra toda la superficie del gel. Si ves algún pozo descubierto de solución, agrega más solución amortiguadora.
3. Fija la micropipeta P-20 en 10.0 μl y colócale una punta de pipeta.
4. Carga la pipeta con 10.0 μl de tinte rojo.

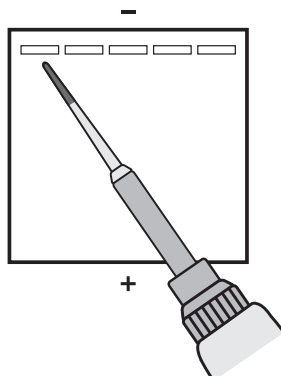
TÉCNICA DE LABORATORIO: Si la micropipeta tiene líquido en la punta, no la apoyes en forma horizontal ni la sostengas con la punta hacia arriba.

5. Coloca tinte rojo en un pozo en una de las placas de práctica, del siguiente modo:
 - a. Apoya el codo en la mesa para que la mano que sostiene la pipeta quede firme. De ser necesario, usa también la otra mano para darle apoyo a la mano que sostiene la pipeta.
 - b. Haz descender la punta de la pipeta hasta que quede debajo de la solución amortiguadora pero inmediatamente por encima del pozo.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Ten cuidado de no colocar la punta de la pipeta en el pozo; de lo contrario, podrías perforar el gel y el pozo quedaría inutilizable.



- c. Presiona suavemente el émbolo para suministrar lentamente la muestra. Para evitar que entre aire en la solución amortiguadora, no te pases de la primera posición de detención. La muestra se hundirá en el pozo.



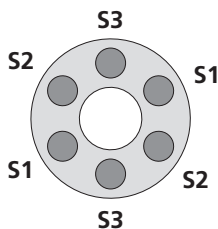
6. Repite los pasos 4 y 5 hasta que se llenen todos los pozos de la placa de práctica. Todos en el grupo deben tener la oportunidad de practicar el pipeteo dentro de los pozos.
7. Desechar la punta de la pipeta en un recipiente de desperdicios.

PARTE B: SEPARACIÓN DE TINTES CON ELECTROFORESIS EN GEL

Ahora usarás electroforesis en gel para separar los distintos tintes. Primero colocarás tintes en los pozos, en la unidad de electroforesis en gel. Luego encenderás la fuente de energía para que los tintes con carga negativa se desplacen por el gel. (Compartirás las cámaras de electroforesis con otro grupo; tu profesor te dirá qué pozos debe usar tu grupo).

1. Controla tu gradilla para asegurarte de tener las tres soluciones de tinte (S1, S2 y S3).
2. Revisa la **Figura 1.4** en la página A-24. Controla los pozos en el gel para asegurarte de que estén ubicados cerca del electrodo negativo (negro).
3. Llena la cámara con 1x BS hasta un nivel que apenas cubra toda la superficie del gel. Si ves algún pozo descubierto de solución, agrega más solución amortiguadora.
4. Centrifuga los tubos S1, S2 y S3.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Distribuye los tubos de forma pareja en la microcentrífuga para que el peso esté equilibrado.





5. Haz un dibujo en tu libreta que muestre la ubicación de los pozos en la cámara de electroforesis. Registra qué solución colocarás en cada pozo.
6. Fija la micropipeta P-20 en 10.0 μl y colócale una punta de pipeta.
7. Carga 10.0 μl de S1 en la pipeta.
8. Coloca la S1 en el pozo que has designado para esa solución de la siguiente manera:
 - a. Apoya el codo en la mesa para que la mano que sostiene la pipeta quede firme. De ser necesario, usa también la otra mano para darle apoyo a la mano que sostiene la pipeta.
 - b. Haz descender la punta de la pipeta hasta que quede debajo de la solución amortiguadora pero inmediatamente por encima del pozo.

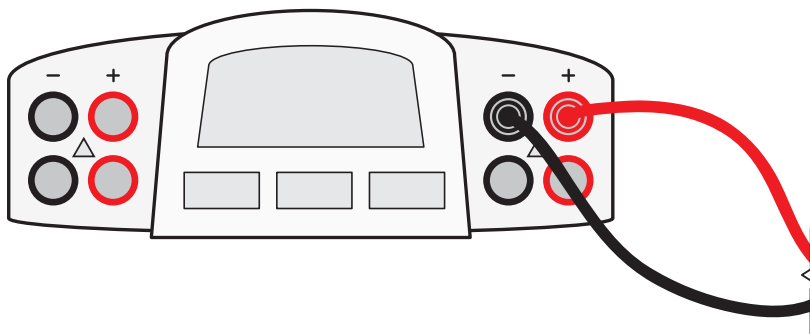
TÉCNICA DE LABORATORIO: No perfores el gel; de lo contrario, quedará inutilizable.

 - c. Presiona suavemente el émbolo para suministrar lentamente la muestra. Para evitar que entre aire en la solución amortiguadora, no te pases de la primera posición de detención. La muestra se hundirá en el pozo.

TÉCNICA DE LABORATORIO:

 - Con el émbolo aún bajo, retira la punta de la solución amortiguadora para no aspirar la solución o la solución amortiguadora. Usa una punta de pipeta nueva para cada muestra.
 - Usa una punta de pipeta nueva para cada muestra.
9. Repite los pasos 7 y 8 para S2 y S3, usando una punta de pipeta nueva con cada solución.
10. Luego de haber cargado todas las muestras, cierra bien la tapa de la cámara de electroforesis. (Cierra la tapa con cuidado moviéndola en forma horizontal para que no se derramen las muestras).
11. Conecta los cables eléctricos a la fuente de energía. Conecta ambos cables al mismo canal, con el cátodo (–) al cátodo (negro con negro) y el ánodo (+) al ánodo (rojo con rojo). Ver la **Figura 1.6**.

Figura 1.6: Cables de la cámara de electroforesis conectados al canal correcto en la fuente de energía



12. Enciende la fuente de energía y coloca el voltaje entre 130 y 135 V.
13. Después de dos o tres minutos, verifica para ver si los tintes se desplazan hacia el electrodo positivo (rojo). Deberías ver que el tinte púrpura (azul de bromofenol) comienza a separarse del tinte azul (xileno cianol).

DETENTE Y PIENSA:

- Estudia los resultados de la electroforesis en gel. ¿Qué muestra de solución contenía un solo tinte: S1, S2 o S3? ¿Cómo lo sabes?
- ¿Qué carga eléctrica tienen los tintes? Explica tu razonamiento.
- Los tintes que separas son anaranjado G (anaranjado), azul de bromofenol (púrpura) y xileno cianol (azul). Si la forma molecular y la carga eléctrica de los tres tintes son similares, ¿cuál es el orden de los tintes, de las moléculas más pesadas a las más livianas, según tus resultados iniciales? ¿Por qué crees que este es el orden correcto?



14. En aproximadamente 10 minutos, o cuando puedas distinguir los tres tintes, apaga el interruptor de encendido y desenchufa los electrodos de la fuente de energía. Para hacer esto, sujeta el electrodo por el enchufe plástico, NO por el cable.
15. Retira con cuidado la tapa de la cámara de electroforesis del gel y observa los tintes en el gel.
16. Dibuja en tu libreta la ubicación relativa de las bandas y sus colores en cada uno de los carriles que contienen tus muestras.
17. Deja los geles en la cámara del gel.

PREGUNTAS DEL CAPÍTULO 1

1. ¿Cuál es la importancia de las micropipetas y la electroforesis en gel en la ingeniería genética?
2. ¿Cómo se utilizan los plásmidos recombinantes para tratar las enfermedades genéticas?



¿LO SABÍAS?

Electroforesis en gel en pruebas de ADN

Las pruebas de ADN usan la electroforesis en gel para distinguir entre muestras de material genético. En las pruebas de ADN, se usan enzimas para cortar las moléculas de ADN humano en determinados puntos característicos. De este modo, el ADN queda como un grupo de fragmentos más pequeños y manejables. Los fragmentos de ADN se cargan en un gel y se colocan en un campo eléctrico, que separa los fragmentos de ADN por electroforesis en diversas bandas. Estas bandas se pueden colorear con un tinte radioactivo para hacerlas visibles para las técnicas de imágenes. Los métodos de identificación del ADN se han aplicado en muchas ramas de la ciencia y la tecnología, como la medicina (pruebas prenatales, selección genética), biología de la conservación (programas de guía de cría en cautividad para especies en peligro de extinción) y ciencias forenses. En esta última disciplina, el análisis del patrón de fragmentos de ADN obtenido con la acción de las enzimas de restricción nos permite distinguir entre sospechosos acusados de un delito o posibles padres en un juicio por paternidad.

GLOSARIO DEL CAPÍTULO 1

ADN (ácido desoxirribonucleico): Molécula de doble cadena formada por subunidades nucleotídicas que codifica información genética.

Agarosa: Polímero formado por moléculas de azúcar, que se usa como matriz en los procedimientos de electroforesis en gel.

Biomolécula: Molécula creada por células vivas. La mayoría de las biomoléculas son polímeros largos, conformados por subunidades repetidas denominadas monómeros. Entre los ejemplos se incluyen proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos.

Célula: Unidad básica de todo organismo vivo que lleva a cabo los procesos bioquímicos de la vida.

Diabetes: Enfermedad que se presenta cuando el cuerpo no produce insulina o no la usa adecuadamente.

Electroforesis en gel: Desplazamiento de moléculas cargadas hacia un electrodo de carga opuesta, que se usa para separar los ácidos nucleicos y las proteínas. Al ser usada para separar fragmentos de ADN, la electroforesis separa los fragmentos por tamaño: los más pequeños se desplazan más rápido que los más grandes.

Enfermedad genética: Enfermedad provocada por un cambio en el ADN. Las enfermedades genéticas suelen heredarse de los padres.

Factor de coagulación de la sangre: Diversas proteínas en el plasma sanguíneo que participan en el proceso de coagulación.

Gen: Unidad fundamental de herencia física y funcional. Es una secuencia ordenada de nucleótidos ubicada en un lugar específico del ADN que codifica un producto funcional específico.

Hemofilia: Enfermedad que se presenta cuando disminuye la capacidad de la sangre para coagularse debido a la falta de uno o más factores de coagulación de la sangre.

Hormona del crecimiento humano: Hormona secretada por la hipófisis que estimula el crecimiento. La hormona del crecimiento humano es una proteína.

Ingeniería genética: Proceso de alteración del material genético de las células u organismos para hacer que produzcan sustancias nuevas o que tengan nuevas funciones.

Insulina: Hormona producida en el páncreas que controla la cantidad de glucosa en la sangre. La insulina es una proteína.

Micropipeta: Instrumento de laboratorio que se usa para medir, suministrar y transferir cantidades muy pequeñas de líquido.

Nucleótido: Grupo de moléculas que se unen para formar ADN o ARN. El ADN y el ARN contienen cuatro tipos de nucleótidos cada uno.

Plásmido: Molécula circular de ADN.

Proteína: Biomolécula grande. Las proteínas cumplen funciones esenciales en las células, desde la formación de estructuras celulares hasta permitir que se produzcan las reacciones químicas. Los ejemplos de proteínas son enzimas, proteína fluorescente roja, receptores celulares y algunas hormonas.

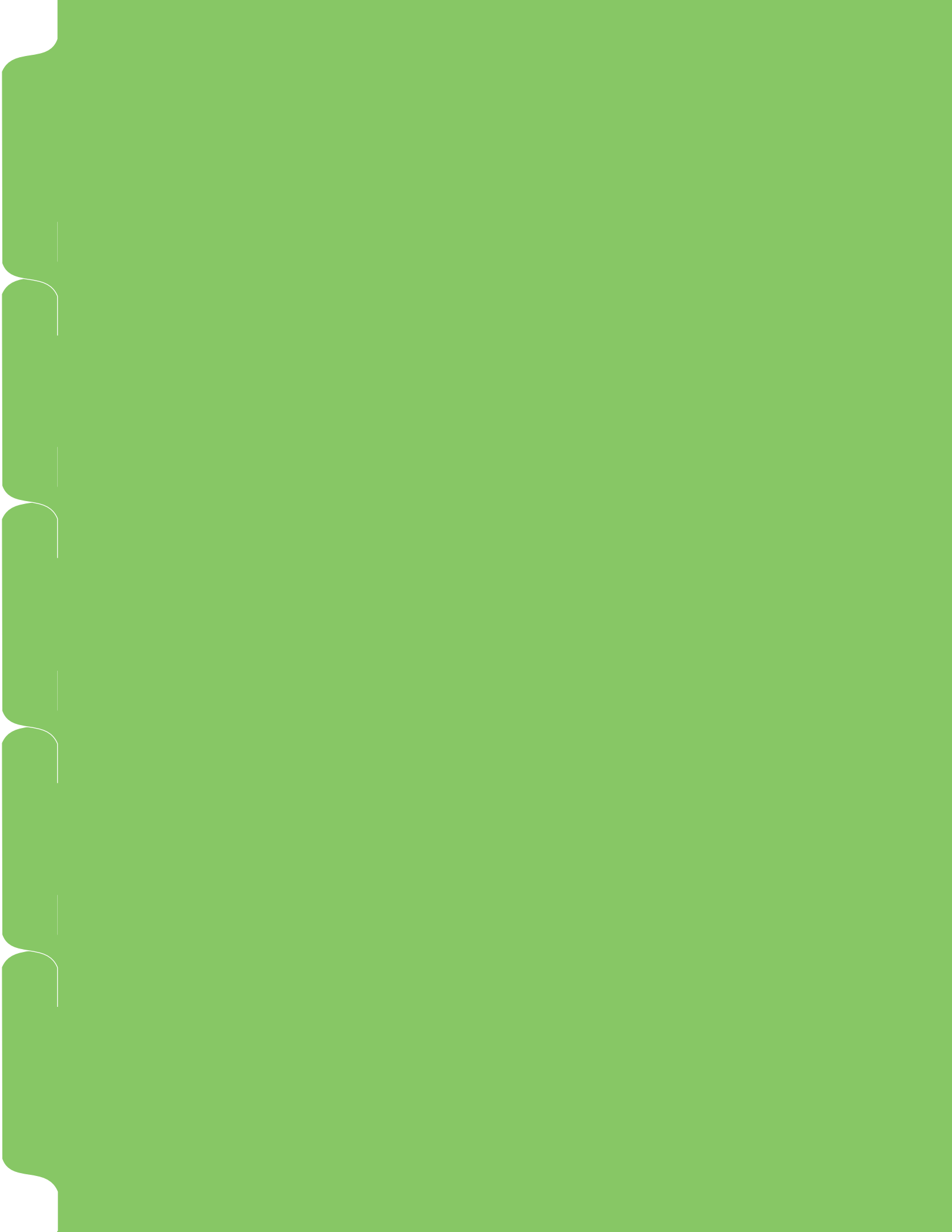
Retraso del crecimiento: Enfermedad que se presenta cuando el cuerpo no produce una cantidad suficiente de la hormona del crecimiento humano.

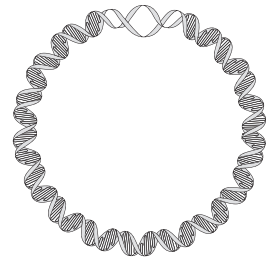
Secuencia: Grupo de eventos, movimientos o elementos (como los nucleótidos) relacionados que se siguen en un orden en particular.

Experiencia de Biotecnología Amgen

Descubrimiento científico para el salón de clase

B





CAPÍTULO 2

¿CÓMO COMIENZAS A CLONAR UN GEN?

INTRODUCCIÓN

En la Introducción al programa, aprendiste que el aumento de la diabetes en los Estados Unidos ha generado una gran demanda de su tratamiento, la insulina. También aprendiste que la mejor manera de cumplir con esta demanda es insertando el gen de insulina humana en bacterias, logrando así que las bacterias produzcan la proteína insulina en cantidades suficientemente grandes como para satisfacer la demanda. En el capítulo 1 pudiste trabajar con dos herramientas físicas y técnicas de ingeniería genética que se usan para clonar un gen: la micropipeta y la electroforesis en gel. En este capítulo, trabajarás con otras dos herramientas importantes de ingeniería genética: los *plásmidos* y las *enzimas de restricción*. Estas “herramientas” en realidad son biomoléculas que se encuentran en muchas bacterias, y su descubrimiento fue crucial para la ingeniería genética. Con estas herramientas, los científicos pueden modificar los microorganismos para producir insulina humana y otros medicamentos. Ahora aprenderás más sobre estas herramientas y darás los primeros pasos en tu misión para clonar un gen.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 2

Al final de este capítulo, podrás hacer lo siguiente:

- Describir las características de los plásmidos.
- Explicar cómo se usan los plásmidos para clonar un gen.
- Describir la función de las enzimas de restricción.
- Explicar cómo usar las enzimas de restricción para crear un plásmido recombinante.

¿QUÉ ES LO QUE YA SABES?

Analiza las siguientes preguntas con tu compañero y anota tus ideas en la libreta. Debes estar preparado para analizar tus respuestas con la clase. No te preocupes si no sabes todas las respuestas. El análisis de estas preguntas te ayudará a pensar acerca de lo que ya sabes sobre el ADN, los plásmidos y las enzimas de restricción.

1. ¿Cuál es la estructura y la función del ADN? Describe en palabras o con un dibujo la estructura de una molécula de ADN. Da todos los detalles que puedas.
2. Todos los organismos vivos contienen ADN. ¿De qué maneras el ADN de distintos organismos es el mismo, y de qué maneras varía?
3. Usando tus conocimientos sobre los genes y cómo se expresan, explica por

qué es posible que una célula bacteriana produzca una proteína humana a partir de las instrucciones codificadas en un gen humano.

4. Como se detalla en la Introducción al programa, los científicos usan dos herramientas biológicas para manipular organismos para que produzcan proteínas nuevas: plásmidos y enzimas de restricción. ¿Qué recuerdas sobre cómo se usan estas herramientas?

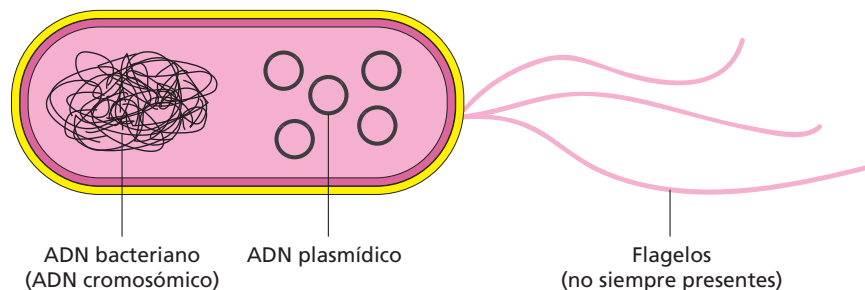
PLÁSMIDOS Y ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

El descubrimiento de los plásmidos y las enzimas de restricción en las bacterias es un ejemplo clásico de cómo los hallazgos de una investigación básica pueden revolucionar una disciplina. Sin el descubrimiento de estas biomoléculas, quizás nunca se hubieran producido los grandes avances en la comprensión de los procesos fundamentales de la vida y en el desarrollo de productos que salvan vidas.

PLÁSMIDOS

Muchos tipos diferentes de bacterias tienen dos formas de ADN: (1) un solo cromosoma compuesto por una molécula grande de ADN que contiene toda la información que necesita el organismo para sobrevivir y reproducirse; y (2) plásmidos, que son pequeñas moléculas circulares de ADN, con un tamaño que varía de 1,000 a 200,000 *pares de bases* (dos bases nitrogenadas unidas para conectar cadenas complementarias de ADN), que se encuentran en diversas copias separadas del ADN cromosómico (ver la **Figura 2.1**). Algunas bacterias tienen hasta 500 plásmidos en cada célula.

Figura 2.1: ADN en células bacterianas

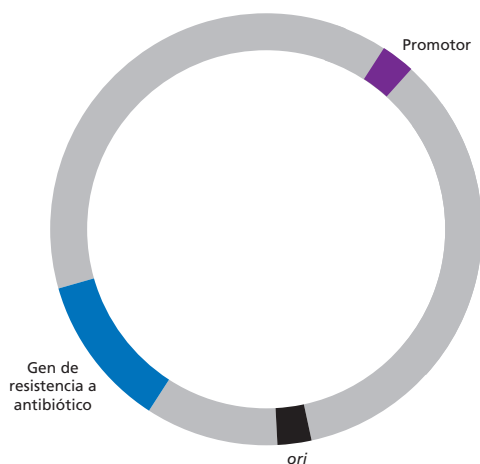


Hay varias características de los plásmidos que hacen que sean vectores ideales (vehículos para transportar secuencias de ADN de un organismo a otro) para la ingeniería genética, por ejemplo:

- La capacidad de multiplicarse, es decir, de hacer copias de sí mismo independientemente del cromosoma bacteriano. Para hacer esto, los plásmidos tienen una secuencia específica donde las enzimas de la síntesis del ADN en la célula hospedera se unen y comienzan la *replicación del ADN* (proceso biológico que se produce en todos los organismos vivos para hacer copias de su ADN). Esta secuencia se denomina punto *ori* ("*origen de la replicación*").
- La capacidad de iniciar la *transcripción* (proceso por el cual la información codificada en el ADN se transfiere al *ARN mensajero* usando la *polimerasa de ARN* de la célula hospedera). Esta capacidad requiere otra secuencia específica, denominada secuencia *promotora*. La polimerasa de ARN se une a la secuencia promotora; aquí es donde comienza la transcripción. Todos los genes tienen secuencias promotoras ubicadas junto a ellos en el ADN. Para que los genes, como el gen de insulina, se expresen en las bacterias, se les debe insertar en el plásmido junto a la secuencia promotora.
- Un gen o varios genes que codifican la resistencia a los *antibióticos*, una clase de compuestos que destruyen los microorganismos o inhiben su multiplicación. Estos genes codifican proteínas que inhiben la acción de antibióticos secretados por microorganismos, y pueden otorgar una ventaja selectiva natural para las bacterias que contienen plásmidos, en una población microbiana donde las bacterias compiten por sobrevivir.

La **Figura 2.2** ilustra algunas de las características de los plásmidos que hacen que sean vectores ideales para la ingeniería genética.

Figura 2.2: Vector plasmídico



Los componentes básicos de un plásmido son el lugar *ori* para el inicio de la replicación del ADN, un promotor para el inicio de la transcripción y un gen para la *resistencia a antibióticos* (estado en que las bacterias ya no son sensibles a un antibiótico, y seguirán multiplicándose y dividiéndose en presencia del antibiótico).



Los plásmidos con los que trabajarás en esta práctica de laboratorio y en las subsiguientes contienen los genes para la resistencia a los antibióticos ampicilina y kanamicina. Estos genes producen proteínas que inactivan el antibiótico de espacio modificar químicamente su estructura.

ATENCIÓN: Usa lo que sabes sobre la selección natural y la evolución para describir cómo los plásmidos podrían otorgar una ventaja selectiva a sus bacterias hospederas.

Una cuarta característica de los plásmidos que es clave para la ingeniería genética es que se pueden trasladar de una cepa bacteriana a otra en un proceso denominado *conjugación bacteriana*, que permite que las bacterias compartan e intercambien información genética. Cuando un plásmido con un gen para la resistencia a antibióticos es tomado por bacterias que no tienen ese plásmido, las bacterias se volverán entonces resistentes a ese antibiótico específico. En la naturaleza, la conjugación se produce con una eficacia muy baja. Es decir, solo un pequeño porcentaje de bacterias en una población puede tomar ADN plasmídico en cualquier momento dado. La presencia de un gen de resistencia a antibiótico en el vector plasmídico nos permite identificar el pequeño porcentaje de bacterias que tomaron el plásmido. El antibiótico destruirá las bacterias que no tomaron el plásmido. Aquellas que tienen el plásmido con el gen de interés sobrevivirán y crecerán.

Al desarrollar técnicas para clonar genes en las bacterias, los científicos encontraron una herramienta poderosa en los plásmidos (un vector que puede ser tomado por bacterias, que se multiplica en las bacterias para producir varias copias de sí mismo, que tiene una secuencia promotora para la transcripción de un gen insertado, y que lleva un gen para la resistencia a antibióticos). Si realizas la práctica de laboratorio del capítulo 5, aprovecharás estas características de los plásmidos al transferir tu plásmido recombinante a las bacterias.

Una vez que los científicos reconocieron el poder de los plásmidos como posibles vectores, el siguiente desafío fue determinar cómo incorporar el gen de interés, como el gen de la insulina, en el ADN plasmídico.

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

A principios de la década de 1950, los científicos observaron que ciertas cepas de *E. coli*, una bacteria común que se encuentra en el intestino humano, eran resistentes a la infección por *bacteriófagos* (virus que infectan las bacterias inyectando su ADN en la célula y ordenándole a los procesos moleculares de la célula hospedera que produzcan más bacteriófagos). La investigación de este “sistema inmune” primitivo llevó al descubrimiento de las enzimas de restricción, proteínas que restringían el crecimiento del bacteriófago mediante el reconocimiento y la destrucción del ADN del bacteriófago sin dañar el ADN hospedero (bacteriano). Los estudios posteriores demostraron que las enzimas

de restricción de diferentes cepas de bacterias cortaban ADN en secuencias específicas. Estas secuencias se denominaban *sitios de reconocimiento*.

ATENCIÓN: ¿Cómo evitan cortar su propio ADN las bacterias que llevan una enzima de restricción?



La **Tabla 2.1** proporciona ejemplos de enzimas de restricción aisladas de diferentes cepas de bacterias y las secuencias de ADN que cortan. En los ejemplos que se muestran, las enzimas cortan en forma asimétrica en las cadenas de ADN y dejan secuencias salientes de una cadena en el punto de corte. Por ejemplo, un corte (o *digestión*) con EcoRI dejará un extremo saliente AATT (o “*extremo cohesivo*”) en una cadena y un extremo cohesivo TTAA en la otra cadena.

Tabla 2.1: Enzimas de restricción usadas en esta práctica de laboratorio

Fuente	Enzima de restricción	Sitio de reconocimiento
<i>Escherichia coli</i>	EcoRI	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{ GAATTC } 3' \\ 3' \text{ CTTAAG } 5' \\ \uparrow \end{array} $
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	BamHI	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{ GGATCC } 3' \\ 3' \text{ CCTAGG } 5' \\ \uparrow \end{array} $
<i>Haemophilus influenzae</i>	HindIII	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{ AAGCTT } 3' \\ 3' \text{ TTCGAA } 5' \\ \uparrow \end{array} $

Los símbolos $\uparrow$ y $\downarrow$ indican dónde se corta el ADN.

ATENCIÓN:



- ¿Cuál es la secuencia del extremo cohesivo que queda cuando el ADN se corta con BamHI? ¿y con HindIII?
- Los científicos pueden modificar los plásmidos para que tengan un solo sitio de enzimas de restricción. Imagina que tienes un plásmido con un solo sitio de EcoRI. Dibuja la estructura del plásmido después de haber sido cortado con la enzima, y muestra las secuencias de nucleótidos que quedan en el punto de corte. Si quisieras insertar un gen de una planta en este lugar, ¿qué enzima usarías para cortar el ADN de la planta? Explica tu respuesta.



¿LO SABÍAS?

El aumento de bacterias resistentes a antibióticos

Los antibióticos y otros fármacos similares se han usado durante los últimos 70 años para tratar a los pacientes que tienen enfermedades infecciosas. Al ser recetados y tomados en forma correcta, los antibióticos son sumamente valiosos para el tratamiento del paciente. Sin embargo, estos fármacos se han usado tanto y durante tanto tiempo que los organismos infecciosos que los antibióticos deben destruir se han adaptado a ellos y redujeron la eficacia de los fármacos. La resistencia a antibióticos se produce cuando ciertas bacterias en una población pueden sobrevivir al ser expuestas a uno o más antibióticos. Estas especies que se han vuelto resistentes provocan infecciones que no se pueden tratar con los antibióticos convencionales, en las dosis y concentraciones habituales. Algunas han desarrollado resistencia a varios antibióticos y se han apodado bacterias resistentes a múltiples fármacos o “bacterias superresistentes”.



La resistencia a antibióticos es un fenómeno grave en crecimiento, y ha surgido como una de las grandes preocupaciones para la salud pública del siglo XXI. Es posible que los organismos resistentes a fármacos hayan adquirido resistencia a los antibióticos de primera línea, lo que

requiere el uso de fármacos de segunda línea. Normalmente, el fármaco de primera línea se selecciona teniendo en cuenta varias ventajas, como la seguridad, la disponibilidad y el costo. El fármaco de segunda línea habitualmente tiene un espectro más amplio, puede ser menos beneficioso en relación con los riesgos asociados y puede ser más costoso o tener menos disponibilidad.

CLONAR ESE GEN

Ahora ya conoces dos herramientas biológicas para la clonación de un gen:

1. Un plásmido que tiene varias características importantes:
 - Uno o varios sitios de enzimas de restricción que abren el círculo plasmídico y permiten la inserción del gen de interés en el ADN plasmídico.
 - Una secuencia para el inicio de la replicación del ADN, denominada punto *ori*, que permite que el plásmido se multiplique en las bacterias usando las enzimas de la síntesis del ADN hospedero.
 - Una secuencia promotora para iniciar la transcripción del gen insertado.
 - Un gen que codifica una proteína para la resistencia a antibióticos, que permite la identificación de bacterias que han tomado el plásmido.
2. Enzimas de restricción para la digestión del plásmido y del ADN humano que contiene el gen de interés (como la insulina) que se clonará.

¿Cómo usan los científicos estas dos herramientas para crear un plásmido recombinante, que contiene el gen de la insulina (o cualquier otro gen de interés) insertado en un plásmido bacteriano? Un paso importante es elegir una o varias enzimas de restricción que corten el plásmido y el ADN humano. Las enzimas de restricción deben hacer todo lo siguiente:

- Cortar el plásmido en uno o varios puntos que permitan la inserción del nuevo gen.
- Cortar el plásmido en un punto adecuado para asegurar que no se altere ningún gen ni secuencias importantes, lo que incluye el punto *ori*, el promotor y al menos uno de los genes que codifican para la resistencia a antibióticos.
- Cortar el plásmido cerca del promotor para que el gen insertado se pueda expresar.
- Cortar el ADN lo más cerca posible de los dos extremos del gen de interés, para que se pueda insertar en el punto adecuado en el ADN plasmídico, sin cortar dentro del gen.

DETENTE Y PIENSA: ¿Por qué es importante usar las mismas enzimas para cortar tanto el plásmido como el gen de interés del ADN humano?



En esta actividad, harás un modelo en papel del plásmido recombinante que contiene un gen de la insulina. Tienes tres tareas:

1. Cortar el plásmido y el ADN humano con la enzima de restricción adecuada.
2. Insertar el gen de la insulina humana en el ADN plasmídico.
3. Determinar qué antibiótico usarías para identificar las bacterias que han tomado el plásmido.

MATERIALES EDUCATIVOS

- Diagrama del plásmido (OR 2)
- Secuencia de ADN humano (OR 3)

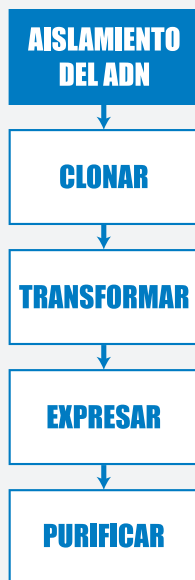
PROCEDIMIENTO

1. En el **Diagrama del plásmido (OR 2)**:
 - Corta la secuencia del plásmido con una tijera y pega los extremos entre sí para hacer un modelo del plásmido en papel.
 - Ubica las posiciones del punto *ori*, el punto promotor y los genes de resistencia a antibióticos.
 - Ubica las posiciones para cada sitio de reconocimiento de enzimas de restricción.
2. Elige la enzima de restricción que se debe usar para cortar el plásmido. Verifica que la enzima de restricción cumpla con todos los criterios detallados a continuación:
 - El punto *ori* del plásmido está intacto.
 - El punto promotor está intacto.
 - Al menos uno de los genes de resistencia a antibióticos está intacto.
 - La enzima corta el plásmido solo una vez.
 - El corte está cerca de la secuencia promotora.
3. Revisa la **Tabla 2.1** en la página B-7 y corta el plásmido con una tijera en el sitio de reconocimiento, exactamente como cortaría la enzima de restricción. Anota las secuencias de los nucleótidos que quedan en cada extremo del plásmido.
4. En la **Secuencia de ADN humano (OR 3)**, mira la secuencia del ADN humano y determina dónde cortarían el ADN las tres enzimas de restricción BamHI, EcoRI e HindIII.

5. Determina si la enzima de restricción que elegiste en el paso 2 es una buena opción para cortar el gen de la insulina del ADN humano, para lo cual debes verificar que se cumpla con todos los criterios detallados a continuación:
 - No corta dentro del gen de la insulina.
 - Corta muy cerca del comienzo y el fin del gen.
 - Permitirá que el gen de la insulina se inserte en el plásmido cortado.
6. Revisa la **Tabla 2.1** y corta el ADN humano con una tijera en el sitio de reconocimiento, exactamente como cortarías la enzima de restricción. Anota las secuencias de los nucleótidos que quedan en cada extremo del gen de la insulina después de ser cortado del ADN humano.
7. Usa cinta adhesiva para insertar el gen de insulina en el plásmido cortado. Verifica que los extremos cohesivos se conecten en la orientación correcta. (En el laboratorio se usa una tercera herramienta biológica, la *ligasa de ADN*, para conectar en forma permanente los extremos cohesivos entre sí). Este es un modelo en papel de un plásmido recombinante que contiene un gen de la insulina. Una vez que el plásmido se multiplique (se copie), el gen de la insulina también se copiará.

PREGUNTAS DE LA ACTIVIDAD

1. ¿Qué enzima de restricción elegiste? ¿Por qué la elegiste?
2. ¿Dónde insertarías el gen de la insulina y por qué?
3. ¿Qué antibiótico usarías para determinar si fue tomado el *ADN recombinante*?

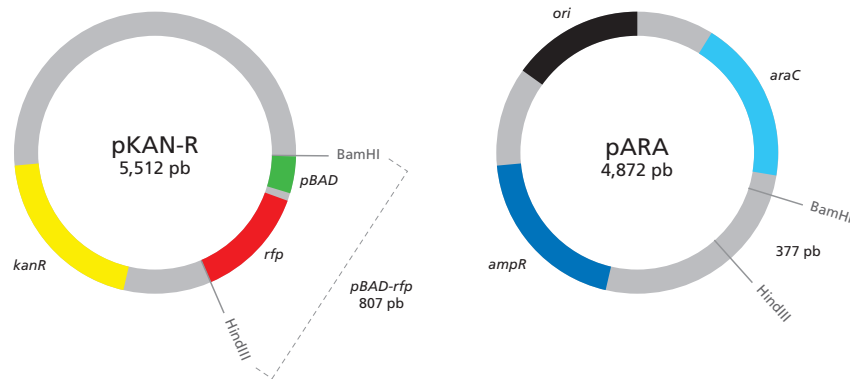


PRÁCTICA DE LABORATORIO 2: PREPARACIÓN PARA CLONAR EL GEN *rfp*: DIGESTIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pKAN-R Y PARA

El objetivo de esta práctica de laboratorio es producir los fragmentos de ADN que se unirán para crear el plásmido recombinante, pARA-R, que puede producir la proteína roja fluorescente en las bacterias. Para hacer esto, usarás enzimas de restricción para cortar dos plásmidos, que generarán fragmentos de ADN. Este procedimiento se denomina *digestión con enzimas de restricción*, y la longitud de los fragmentos se puede determinar con electroforesis en gel (que puedes hacer en el capítulo 4).

Hasta el momento, has aprendido sobre el uso de un solo plásmido para clonar el gen de la insulina. En algunas circunstancias, los científicos deben usar ADN plasmídico de diferentes orígenes para generar un ADN recombinante específico. Con el objeto de clonar el gen de la proteína roja fluorescente (*rfp*), necesitarás ADN de dos plásmidos diferentes. El plásmido pKAN-R (ver la **Figura 2.3**) lleva el gen que hace que las bacterias sean resistentes al antibiótico kanamicina, el gen *rfp* y una secuencia promotora. El plásmido pARA (ver la **Figura 2.3**) contiene el gen que hace que las bacterias sean resistentes al antibiótico ampicilina y una secuencia de ADN que activa el promotor cuando las bacterias se cultivan en presencia de *arabinosa*, un azúcar de cinco carbonos que se presenta en forma natural en diversos carbohidratos de plantas y bacterias. Esta secuencia se denomina *activador* de arabinosa (*araC*). El activador controla al promotor. Si hay arabinosa en las bacterias, el promotor unirá la polimerasa de ARN y se producirá la transcripción. Si no hay arabinosa, el promotor no unirá la polimerasa de ARN y no se producirá la transcripción. El plásmido pARA también contiene el punto *ori* para iniciar la replicación del ADN.

Figura 2.3: Plásmidos pKAN-R y pARA



Los componentes relevantes de los plásmidos son el gen *rfp*, el promotor (*pBAD*), el gen de resistencia a la ampicilina (*ampR*) y el activador de arabinosa (*araC*).

Además de mostrar los componentes relevantes, la **Figura 2.3** también muestra el tamaño del plásmido (el número en el centro, que indica el número de pares de bases [pb]) y las secuencias donde pueden realizar el corte las enzimas de restricción que se usarán en la práctica de laboratorio. Los puntos con los nombres "BamHI" e "HindIII" representan los sitios de reconocimiento para estas dos enzimas de restricción. (Ver la **Tabla 2.1** en la página B-7). La **Figura P.4** en la sección *¿Qué es la ingeniería genética?* (en la página A-12) muestra el gen de la insulina que se inserta en un solo sitio de enzimas de restricción en el plásmido. En la clonación del gen *rfp* se usan dos enzimas de restricción (BamHI e HindIII) al cortar el plásmido donde se insertará el gen *rfp* y al aislar el gen *rfp* del segundo plásmido. El uso de dos enzimas de restricción diferentes tiene varias ventajas: Le permite al gen insertado tener la orientación correcta para transcribir la cadena "codificante" del ADN (la cadena que codifica la proteína) y evita que el plásmido vuelva a formar un círculo sin el gen insertado. Aprenderás más sobre este tema si haces la práctica del capítulo 4.

DETENTE Y PIENSA: ¿Por qué el uso de dos enzimas diferentes para cortar el plásmido evita que el plásmido vuelva a formar un círculo sin el gen insertado?



ANTES DE LA PRÁCTICA DE LABORATORIO

Responde las siguientes preguntas con tu grupo y prepárate para compartir tus respuestas con la clase.

1. Revisa la **Figura 2.3**. Si pKAN-R se digiere con BamHI e HindIII, ¿qué fragmentos se producen? Si pARA se digiere con BamHI e HindIII, ¿qué fragmentos se producen? Registra la secuencia de nucleótidos de los extremos cohesivos y la longitud de cada fragmento (pb), e indica los genes y otras secuencias importantes presentes en cada fragmento.
2. Con el objeto de crear un plásmido que pueda producir la proteína roja fluorescente en las bacterias, ¿qué componentes son necesarios en el plásmido?
3. Un antibiótico puede destruir las bacterias, a menos que estas lleven un plásmido que tenga el gen para la resistencia a ese antibiótico. Los biotecnólogos denominan a estos genes *marcadores selectivos* porque solo las bacterias que lleven el gen sobrevivirán ante el antibiótico. Si la absorción del ADN por las bacterias es ineficaz (como se analizó en la lectura), ¿por qué el marcador selectivo es clave en la clonación de un gen en las bacterias?
4. Lee la sección Métodos en las páginas B-15 y B-16, y describe brevemente los pasos con palabras y un diagrama de flujo.

MATERIALES

Reactivos

- Una gradilla con lo siguiente:
 - Tubo de microcentrífuga con solución amortiguadora de restricción de 2.5x (2.5xB)
 - Tubo de microcentrífuga de plásmido pKAN-R (K)
 - Tubo de microcentrífuga de plásmido pARA (A)
 - Tubo de microcentrífuga de enzimas de restricción BamHI e HindIII (ER)
 - Tubo de microcentrífuga de agua destilada (H₂O_d)

Equipo y suministros

- Micropipeta P-20
- Caja de puntas desechables
- 4 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Marcador permanente
- Microcentrífuga (se compartirá entre todos los grupos)

- Baño María a 37°C con gradilla flotante para tubos de microcentrífuga (se compartirá entre todos los grupos)
- Recipiente para residuos, para puntas y tubos de microcentrífuga usados (se compartirá entre los grupos)

SEGURIDAD:

- Se deben seguir todas las precauciones de seguridad adecuadas y usar el atuendo requerido en un laboratorio de ciencias, incluso gafas de seguridad. Consulta las indicaciones de tu profesor.
- Lávate bien las manos con jabón después de finalizar la práctica de laboratorio.

**MÉTODOS**

1. Revisa la gradilla para asegurarte de que tengas todos los reactivos nombrados.
2. Con un marcador, rotula cuatro tubos de microcentrífuga limpios de la siguiente manera: K+, K-, A+ y A-. (Incluye también tu número de grupo y el período de clase en cada tubo).
3. Revisa la **Tabla 2.2**, que resume los reactivos que agregarás en el paso 4.

Tabla 2.2: Agregado de reactivos en los tubos K+, K-, A+ y A-

	K+ tube	K- tube	A+ tube	A- tube
Paso 4a: Solución amortiguadora de restricción (2.5x8)	4.0 µL	4.0 µL	4.0 µL	4.0 µL
Paso 4b: plásmido pKAN-R (K)	4.0 µL	4.0 µL		
Paso 4c: plásmido pARA (A)			4.0 µL	4.0 µL
Paso 4d: BamHI e HindIII (ER)	2.0 µL		2.0 µL	
Paso 4e: Agua destilada (H ₂ O)		2.0 µL		2.0 µL

TÉCNICA DE LABORATORIO: En el paso 4, asegúrate de usar una punta de micropipeta nueva para cada reactivo en cada tubo, a fin de evitar la contaminación.



4. Agrega lo siguiente:
 - a. 4.0 μ l de 2.5xB a los tubos K+, K-, A+ y A-.
 - b. 4.0 μ l de K a los tubos K+ y K-.
 - c. 4.0 μ l de A a los tubos A+ y A-.
 - d. 2.0 μ l de ER a los tubos K+ y A+. Agrega las enzimas directamente en la solución, en el fondo del tubo de microcentrífuga. Aspira y descarga suavemente la solución con la pipeta para mezclar los reactivos. Tapa los tubos cuando termines.
 - e. 2.0 μ l de H₂O_d a los tubos K- y A-. Aspira y descarga suavemente la solución con la pipeta para mezclar los reactivos. Tapa los tubos cuando termines.

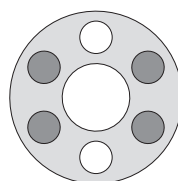


DETENTE Y PIENSA: En este paso, se te pide que prepares un tubo sin las enzimas de restricción BamHI e HindIII. ¿Cuál es el objetivo de este paso y por qué es importante?

5. Centrifuga los cuatro tubos de microcentrífuga (K+, A+, K- y A-) en la microcentrífuga durante cuatro segundos para agrupar los reactivos en el fondo de cada tubo.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Distribuye los tubos de forma pareja en la microcentrífuga para que el peso esté equilibrado.



6. Coloca los cuatro tubos en el baño María de 37°C. (Colocarás los tubos en la gradilla flotante para tubos de microcentrífuga; cuando la gradilla esté llena, el profesor la colocará en el baño María). Incuba durante al menos una hora, pero no más de dos horas. Luego de terminada la incubación, coloca los cuatro tubos en el congelador a -20°C para la práctica de *laboratorio 3*.



DETENTE Y PIENSA: ¿Por qué las enzimas podrían funcionar mejor a 37°C? ¿Por qué entonces se deben colocar las enzimas en el congelador?

PREGUNTAS DEL CAPÍTULO 2

Analiza las siguientes preguntas con tu compañero y prepárate para compartir tus respuestas con la clase.

1. Haz una lista de palabras o indica con un dibujo las características importantes de un vector plasmídico que se requieren para clonar un gen. Explica el objetivo de cada característica.
2. ¿Qué función tienen las enzimas de restricción en la naturaleza?
3. Teniendo en cuenta lo que sabes de la evolución, ¿por qué las bacterias retendrían un gen que les da resistencia a los antibióticos? ¿De qué manera la existencia de bacterias con resistencia a antibióticos afecta a la medicina hoy en día?
4. Las bacterias, las anémonas marinas y los seres humanos parecen ser, a nivel superficial, organismos muy diferentes. Explica cómo un gen de un ser humano o una anémona marina se puede expresar en bacterias para crear un producto nunca antes creado en las bacterias.
5. Debido a un percance en la práctica de laboratorio, las bacterias que llevaban un plásmido con un gen resistente a la kanamicina y las bacterias que llevaban un plásmido con un gen resistente a la ampicilina se mezclaron de forma accidental. Diseña un experimento que te permitirá separar las dos clases de bacterias. (Sugerencia: ¡Asegúrate de no exterminar una de las dos clases de bacterias que tratas de separar!)

GLOSARIO DEL CAPÍTULO 2

Activador: Proteína que regula la transcripción de un gen a través de la unión a una secuencia cerca del promotor, lo que permite que la polimerasa de ARN se una al promotor e inicie la transcripción del gen. La proteína activadora también puede bloquear la unión de la polimerasa de ARN y así inhibir la transcripción del gen.

ADN recombinante: ADN que contiene secuencias o genes de dos o más orígenes.

Antibiótico: Clase de compuestos que suprime o inhibe el crecimiento de microorganismos.

Arabinosa: Azúcar de cinco carbonos que se presenta en forma natural en diversos carbohidratos de plantas y bacterias.

ARN (ácido ribonucleico): Biomolécula de una cadena conformada por una base nitrogenada, un azúcar ribosa y un fosfato. El ARN tiene una función clave en la síntesis de proteínas: transmite información genética del ADN al ribosoma, donde luego se producen las proteínas.

ARN mensajero: Molécula de ARN transcrita del ADN de un gen y usada como plantilla para la síntesis de proteínas.

Bacteriófago: Virus que infecta una célula bacteriana y usa la maquinaria celular para multiplicarse y, finalmente, destruir la célula bacteriana.

Conjugación bacteriana: Proceso por el cual se unen dos células bacterianas y transfieren material genético de una a otra.

Digestión: Corte de ADN por una enzima de restricción.

Digestión con enzimas de restricción: Técnica en la cual se usan enzimas naturales para cortar el ADN en secuencias específicas.

Enzima: Proteína que cataliza (acelera) una reacción química sin ser parte de la misma.

Enzima de restricción: Proteína que puede cortar el ADN en un lugar específico que se denomina un *sitio de reconocimiento*.

Extremos cohesivos: Extremos de una molécula de ADN cortados con determinadas enzimas de restricción. Estos extremos son asimétricos: una cadena es más larga que la otra cadena y, por lo tanto, tiene bases no emparejadas. Los extremos cohesivos de dos fragmentos diferentes de ADN que se han cortado con las mismas enzimas de restricción se pueden unir, ya que las bases no emparejadas de los extremos son complementarias.

Ligasa de ADN: Enzima que cataliza la formación de enlaces químicos covalentes en el esqueleto azúcar-fosfato, lo que posibilita la unión de los fragmentos de ADN.

Marcador selectivo: Gen en un plásmido que se introduce en una célula junto con un gen de interés que se clonará. Los marcadores selectivos permiten a los científicos saber si el plásmido ha sido tomado por la célula, ya que el marcador se puede ver o detectar. Un marcador selectivo común es el gen de resistencia a antibióticos: solo las bacterias que tienen el gen sobrevivirán ante el antibiótico.

Origen de la replicación (*ori*): Secuencia de ADN donde comienza la replicación del ADN.

Par de bases: Dos moléculas complementarias que contienen nitrógeno y se juntan formando un par en el ADN de doble cadena mediante enlaces débiles.

Plásmido: Molécula circular de ADN.

Polimerasa de ARN: Proteína que separa las hebras de ADN y por complementaridad añade los nucleótidos para producir un ARN mensajero.

Promotor: Secuencia específica de ADN que une la polimerasa de ARN y comienza la transcripción del gen.

Replicación del ADN: Proceso biológico que tiene lugar en todos los organismos vivos y copia su ADN. El proceso comienza cuando una molécula de ADN de doble cadena produce dos copias idénticas. Se desata la doble hélice, y cada cadena de la molécula original sirve como plantilla para la producción de la cadena complementaria. Luego las bases se combinan para sintetizar las nuevas cadenas recíprocas.

Resistencia a antibióticos: Estado en que las bacterias ya no son sensibles a un antibiótico y seguirán creciendo y dividiéndose en presencia del antibiótico.

Sitio de reconocimiento: Una secuencia específica de ADN la cual es cortada por una enzima de restricción. Por lo general los sitios de reconocimiento son palíndromes, secuencia que lee lo mismo en ambas direcciones.

Transcripción: Proceso por el cual la información codificada en el ADN se transfiere al ARN mensajero, un ácido ribonucleico de una cadena.

Vector: Vehículo para mover secuencias de ADN de un organismo a otro.



CAPÍTULO 3:

CONSTRUYENDO UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE

INTRODUCCIÓN

En los capítulos 1 y 2, aprendiste sobre cuatro herramientas importantes de la ingeniería genética que los científicos usan para clonar el gen de la insulina: la micropipeta, la electroforesis en gel, los plásmidos y las enzimas de restricción. En este capítulo, usarás una quinta herramienta que se necesita para clonar genes: la ligasa de ADN. La ligasa de ADN es una *enzima* que *cataliza* la unión de fragmentos de ADN; es una de varias enzimas que participan en la *replicación del ADN* en todas las células. En el capítulo 2, preparaste los fragmentos de ADN necesarios para clonar el gen *rfp*. El próximo paso es *ligar* (unir entre sí) estos fragmentos para formar el plásmido recombinante.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 3

Al final del capítulo, podrás hacer lo siguiente:

- Describir la función de la ligasa de ADN en la replicación.
- Explicar cómo se usa la ligasa de ADN para crear un plásmido recombinante.
- Describir posibles plásmidos recombinantes que se forman al ligar una digestión con enzimas de restricción.

¿QUÉ ES LO QUE YA SABES?

Analiza las siguientes preguntas con tu compañero y anota tus ideas en la libreta. Debes estar preparado para analizar tus respuestas con la clase. No te preocupes si no sabes todas las respuestas. El análisis de estas preguntas te ayudará a pensar acerca de lo que ya sabes sobre las enzimas y la ligación del ADN.

1. ¿Cuál es la función de las enzimas en las reacciones?
2. ¿Cómo se produce la replicación del ADN?
3. ¿Por qué es esencial la replicación del ADN en todas las células?
4. Describe lo que sucede cuando se unen dos fragmentos de ADN con extremos cohesivos complementarios, y especula cómo la actividad de la ligasa de ADN asegura que la unión sea permanente.

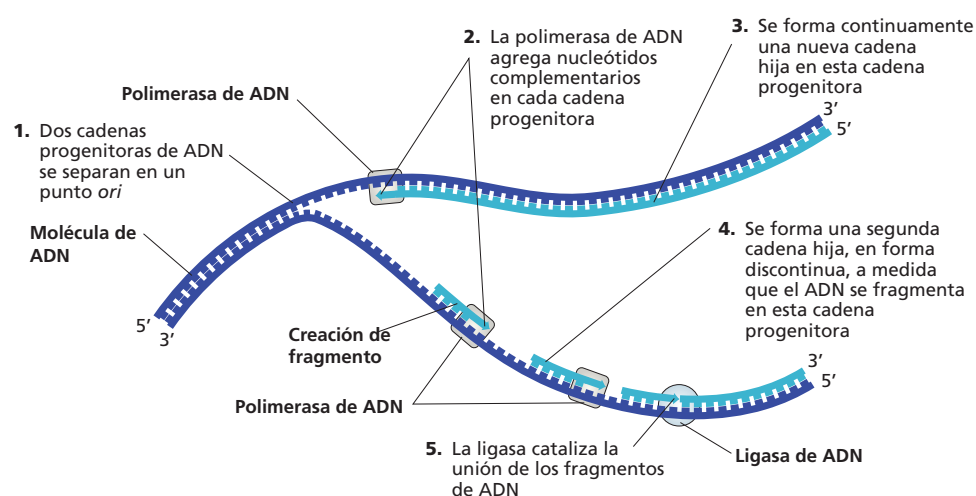
LIGASAS

El descubrimiento de las enzimas de restricción, los plásmidos y las ligasas en las células fue importante en la búsqueda para comprender cómo crecen y se reproducen las bacterias. Pero fue el hecho de saber cómo estas biomoléculas se podían aplicar para manipular el ADN lo que inició una nueva era en la ingeniería genética, una en la cual los seres humanos podían directamente manipular organismos a nivel genético. Los plásmidos proporcionaron el vehículo para clonar los genes, y las enzimas de restricción proporcionaron los medios para generar los fragmentos de ADN necesarios para formar los plásmidos recombinantes. El ingrediente final esencial fue la forma de “pegar” estos fragmentos entre sí.

FUNCIÓN DE LAS LIGASAS EN LA REPLICACIÓN DEL ADN

A principios de la década de 1960, los científicos aislaron enzimas que tenían esta capacidad. Se comprobó que estas enzimas, denominadas *ligasas de ADN*, estaban implicadas en la replicación del ADN de cromosomas y plásmidos. La replicación se produce en varios pasos (como se muestra en la **Figura 3.1**):

Figura 3.1: Resumen de la replicación del ADN



1. Las dos cadenas comienzan a separarse en varios lugares de la molécula de ADN. Cada lugar es un origen de la replicación, o punto *ori* (lo mismo que aprendiste sobre los plásmidos en el capítulo 2). Las dos cadenas se denominan *cadena parentales*.
2. Una vez que se separan las cadenas parentales y las bases quedan expuestas, una enzima denominada *polimerasa de ADN* agrega nuevos nucleótidos. Cada nueva base de nucleótido forma enlaces de hidrógeno con bases de nucleótidos existentes en la cadena parental. En este paso se crean *pares de bases complementarias*.

3. En una cadena parental, la polimerasa de ADN agrega nucleótidos continuamente para formar una nueva cadena complementaria, una *cadena nueva*.
4. En la otra cadena parental, la polimerasa de ADN agrega nucleótidos de forma discontinua, lo que da como resultado pequeños fragmentos de ADN. (Para saber por qué una cadena se multiplica de forma continua y la otra de forma discontinua, consulta *¿Lo sabías? Direccionalidad del ADN*).
5. La enzima ligasa de ADN debe unir los fragmentos de ADN para formar la segunda cadena. La ligasa une los fragmentos mediante la catalización de la formación de un enlace covalente entre nucleótidos adyacentes.

Una vez finalizados los pasos de la replicación, se han formado dos nuevas moléculas de ADN, cada una con una cadena parental y una cadena . Ambas moléculas son copias exactas, o *réplicas*, de la molécula original del ADN.

ATENCIÓN:

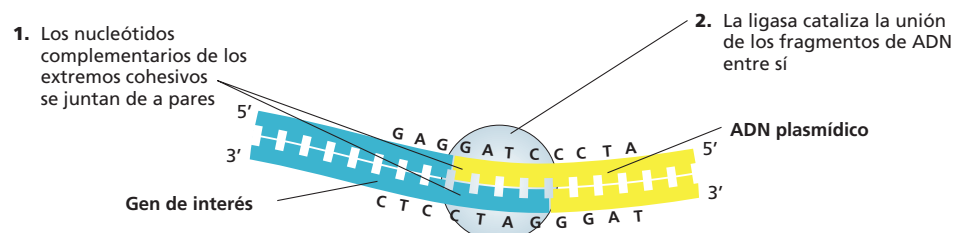
- ¿Cuál es la función de los enlaces de hidrógeno y los enlaces covalentes en la estructura del ADN?
- Teniendo en cuenta lo que comprendes de la replicación del ADN, explica la función de la ligasa de ADN en la replicación. ¿Por qué el descubrimiento de esta enzima fue clave para la tecnología de clonación genética?



FUNCIÓN DE LAS LIGASAS EN LA CLONACIÓN DE GENES

La función de la ligasa en la clonación de genes es similar a su función en la replicación, ya que une fragmentos de ADN entre sí. En la clonación de genes, el ADN recombinante es el resultado de la *ligación* de fragmentos de una digestión con enzimas de restricción (como se muestra en la **Figura 3.2**). Dos fragmentos cualesquiera que tengan extremos cortados con la misma enzima de restricción se pueden unir entre sí. Primero las bases no emparejadas en los *extremos cohesivos* forman enlaces de hidrógeno entre sí, y luego la ligasa cataliza la formación de enlaces covalentes entre nucleótidos adyacentes. Si tienes varios fragmentos, el procedimiento de ligación puede generar una cantidad de productos posibles.

Figura 3.2: Ligación de fragmentos de ADN en la clonación genética





¿LO SABÍAS?

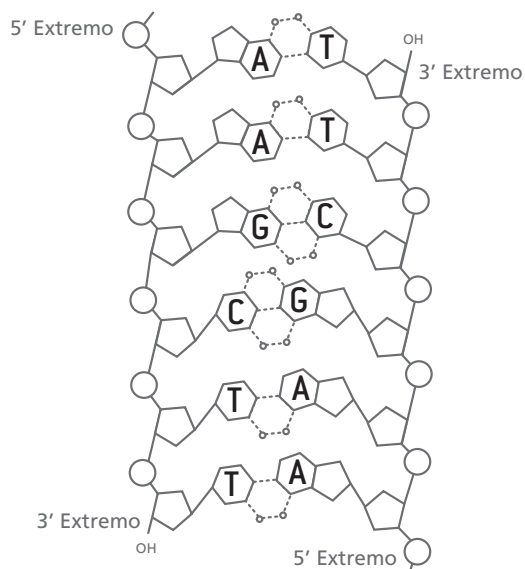
Direccionalidad del ADN

El ADN es una doble hélice de dos cadenas entrelazadas que se unen con hidrógeno mediante la base de los nucleótidos. Cada cadena tiene una *direccionalidad* diferente, lo que significa que cada una tiene una orientación química en función del grupo químico con el que termina. El *extremo 5'* (5 "primo") de la cadena de ADN es el extremo que tiene el quinto carbono en el anillo del azúcar desoxirribosa. El *extremo 3'* (3 "primo") de la cadena de ADN termina en el grupo hidroxilo (OH) que tiene el tercer carbono en el anillo del azúcar desoxirribosa (ver la **Figura 3.3**).

Este nombre de los extremos de las cadenas es útil para comprender cómo funciona la polimerasa de ADN. La polimerasa de ADN solo puede reunir nuevas cadenas de ADN en dirección 5' a 3', agregando nuevos

nucleótidos al grupo 3'-hidroxilo. Por lo tanto, en una cadena la replicación se produce continuamente a medida que la polimerasa agrega nucleótidos en dirección 5' a 3' para formar la cadena hija. En la otra cadena, la polimerasa de ADN también agrega nucleótidos en dirección 5' a 3', lo que genera pequeños fragmentos de ADN que se deben ligar entre sí para formar la otra cadena nueva.

Figura 3.3: Estructura del ADN

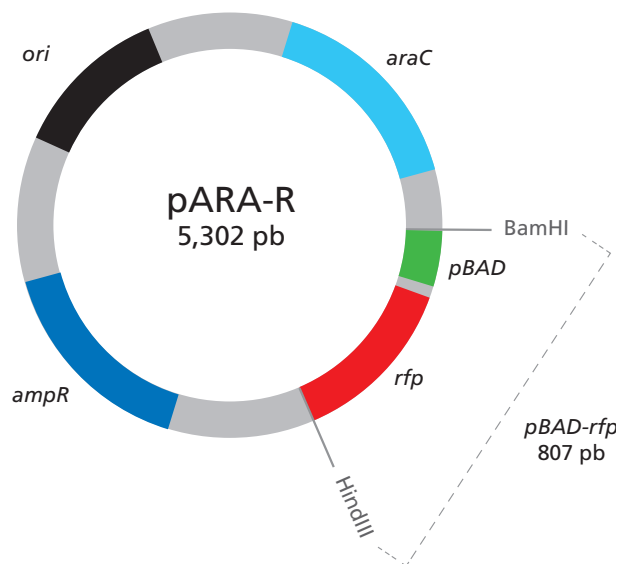


PRÁCTICA DE LABORATORIO 3: CREACIÓN DEL PLÁSMIDO pARA-R

En esta práctica de laboratorio, ligarás los fragmentos de ADN que produjiste durante la *práctica de laboratorio 2* usando la ligasa de ADN para crear plásmidos recombinantes nuevos. Estos plásmidos recombinantes tendrán los cuatro *fragmentos de restricción* de la *práctica de laboratorio 2*, combinados de diferentes maneras para producir nuevos grupos de ADN. El proceso de ligación dará como resultado varios plásmidos diferentes, pero el plásmido en el que estás interesado tendrá el gen para la resistencia a la ampicilina (*ampR*), el gen de la proteína roja fluorescente (*rfp*), una secuencia promotora para iniciar la transcripción (*pBAD*), la secuencia del activador de arabinosa (*araC*), y la secuencia *ori* para el inicio de la replicación del ADN. El plásmido deseado del ADN recombinante se denomina plásmido pARA-R (ver la **Figura 3.4**).



Figura 3.4: Plásmido pARA-R



Durante la práctica de laboratorio, mezclarás los fragmentos de ADN de la digestión con enzimas de restricción de la *práctica de laboratorio 2* y la ligasa de ADN, pero no podrás observar nada hasta la *práctica de laboratorio 4*, cuando podrás separar e identificar las moléculas de ADN con electroforesis en gel. No obstante, te prepararás para lo que podrías observar mediante la determinación de los posibles plásmidos que pueden surgir y el dibujo de diagramas de estos plásmidos. En este trabajo, estás modelando el proceso de ligación.

ANTES DE LA PRÁCTICA DE LABORATORIO

Analiza las siguientes preguntas con tu grupo, anota tus respuestas y prepárate para compartirlas con la clase.

1. Revisa tu respuesta a la pregunta 1 en la sección antes de la práctica de laboratorio para la *práctica de laboratorio 2* (página B-14), en la que describiste los fragmentos que se formaron con la digestión de pKAN-R y pARA con BamHI e HindIII. Con esta información, dibuja tres posibles plásmidos recombinantes que se formen a partir de la ligación de dos fragmentos pARA y pKAN-R. Para cada plásmido, identifica los genes, otras secuencias importantes y la cantidad de pares de bases.
2. Lee la sección Métodos en las páginas B-29, y describe brevemente los pasos con palabras y un diagrama de flujo.

MATERIALES

Reactivos

- Una gradilla con lo siguiente:
 - Tubo de microcentrífuga de pKAN-R digerido de la *práctica de laboratorio 2* (K+)
 - Tubo de microcentrífuga de pARA digerido de la *práctica de laboratorio 2* (A+)
 - Tubo de microcentrífuga con solución amortiguadora de ligación 5x (5xB)
 - Tubo de microcentrífuga de ligasa de ADN (LIG)
 - Tubo de microcentrífuga de agua destilada (H₂O_d)

Equipo y suministros

- Baño María a 70 °C con gradilla flotante para tubos de microcentrífuga (se compartirá entre todos los grupos)
- Micropipeta P-20
- Caja de puntas de pipeta desechables
- Marcador permanente
- Microcentrífuga (se compartirá entre todos los grupos)
- Recipiente para residuos, para puntas y tubos de microcentrífuga usados (se puede compartir con otro grupo)



SEGURIDAD:

- Se deben seguir todas las precauciones de seguridad adecuadas y usar el atuendo requerido en un laboratorio de ciencias, incluso gafas de seguridad. Consulta las indicaciones de tu profesor.
- Lávate bien las manos con jabón después de finalizar la práctica de laboratorio.

MÉTODOS

1. Revisa la gradilla para asegurarte de que tengas todos los reactivos nombrados.
2. Coloca tubos K+ y A+ de la *práctica de laboratorio 2* en el baño María a 70 °C (colocarás los tubos en la gradilla flotante para tubos de microcentrífuga; una vez cargadas las muestras de cada grupo, tu profesor colocará la gradilla en el baño María) durante 30 minutos. Esta exposición al calor *desnaturalizará* (inactivará) las enzimas de restricción.

NOTA: Durante la incubación de 30 minutos, comparte y analiza tus respuestas a la pregunta 1 de la sección antes de la práctica de laboratorio. También comparte y analiza tu respuesta a la pregunta de DETENTE Y PIENSA, a continuación, y comienza a responder las *Preguntas del capítulo 3* en la página B-30.

DETENTE Y PIENSA: ¿Por qué es importante inactivar las enzimas de restricción BamHI e HindIII antes de unir los fragmentos? ¿Qué podría suceder si no seguías este paso?



3. Rotula el tubo LIG con tu número de grupo y período de clase.
4. Después de 30 minutos, retira los tubos K+ y A+ del baño María y colócalos en tu gradilla.
5. Agrega las siguientes soluciones directamente en la solución, en el fondo del tubo LIG:

a. 4.0 µL de A+	c. 3.0 µL de 5xB
b. 4.0 µL de K+	d. 2.0 µL de dH ₂ O

TÉCNICA DE LABORATORIO: En los pasos 5a a d, asegúrate de usar una punta de micropipeta nueva para cada reactivo, a fin de evitar la contaminación.



6. Luego de agregar el H₂O_d, aspira y descarga suavemente la solución con la pipeta para mezclar los reactivos. Tapa el tubo cuando termines.
7. Centrifuga el tubo LIG en la microcentrífuga durante cuatro segundos para agrupar los reactivos en el fondo del tubo.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Distribuye los tubos de forma pareja en la microcentrífuga para que el peso esté equilibrado.



8. Coloca los tubos LIG, A+ y K+ en las gradillas de microcentrífuga designadas por tu profesor. (Tu tubo LIG se incubará a temperatura ambiente hasta la siguiente clase. Tus tubos A+ y K+ se volverán a colocar en el congelador a -20°C para la *práctica de laboratorio 4*).

PREGUNTAS DEL CAPÍTULO 3

Analiza las siguientes preguntas con tu compañero y prepárate para compartir tus respuestas con la clase:

1. ¿Qué función cumplen las ligasas de ADN en la naturaleza?
2. ¿Qué función cumplen las ligasas de ADN en la clonación de genes?
3. ¿Qué propiedades de los fragmentos de restricción de ADN producidos en la *práctica de laboratorio 2* permiten la ligación de estos fragmentos?
4. ¿Se podrían unir dos fragmentos de *rfp* para formar un plásmido durante la ligación? Si la respuesta es no, ¿qué lo evitaría? Si la respuesta es sí, ¿cuál sería el resultado?
5. Durante la ligación, se forman enlaces de hidrógeno y covalentes. ¿Qué enlaces se forman primero? ¿Por qué es necesario que se formen ambos tipos de enlaces?



¿LO SABÍAS?

Errores en la replicación del ADN y evolución

Cada vez que una célula se divide y su ADN se duplica, copia y transmite exactamente la misma secuencia de nucleótidos a sus células hijas. Aunque el ADN se suele replicar con bastante precisión, ocurren errores. Las enzimas polimerasas a veces insertan el nucleótido incorrecto o demasiados o pocos nucleótidos en una secuencia. Los nucleótidos apareados incorrectamente que quedan después de la reparación se convierten en mutaciones permanentes a partir de la próxima división celular. Esto se debe a que una vez que los errores se han establecido, la célula deja de reconocerlos como errores.

Las mutaciones pueden ser beneficiosas, perjudiciales o no tener ningún efecto. Si la mutación le confiere una ventaja selectiva al organismo, el rasgo puede transmitirse a generaciones futuras como parte del proceso evolutivo. De hecho, durante el transcurso de millones de años, las mutaciones pueden acumularse en cualquier tramo del ADN a un ritmo predecible. Esto permite que el gen que se use como un reloj molecular, es decir, como herramienta que permite estimar cuánto tiempo ha transcurrido desde que dos especies se separaron. Esta técnica se ha utilizado para investigar varias cuestiones importantes, en particular, el origen de los seres humanos modernos y la fecha de la divergencia entre seres humanos y chimpancés.

GLOSARIO DEL CAPÍTULO 3

Cadena nueva: En la replicación del ADN, es una nueva cadena de ADN que se crea y es un complemento de la cadena de ADN original.

Cadena parental: En la replicación del ADN, es la cadena de ADN que sirve como molde para crear la nueva cadena complementaria.

Catalizar: Aumentar la velocidad de una reacción.

Desnaturalizar: Cambiar la forma de una biomolécula y, en consecuencia, afectar su función, que a menudo se logra con calor. Por ejemplo, una proteína se dobla en una forma tridimensional compleja que se relaciona directamente con su función. Todo proceso que interfiera en el doblado de proteínas puede cambiar su forma tridimensional y dar como resultado la inactivación de la proteína.

Direccionalidad: En bioquímica, es la orientación de una cadena de ácido nucleico.

Enzima: Proteína que cataliza (acelera) una reacción química sin ser parte de la misma.

Extremo 3': Extremo de una cadena de ADN o ARN que tiene un grupo hidroxilo conectado al tercer carbono de la molécula de azúcar, que es la desoxirribosa o la ribosa. (El número del carbono se refiere a la posición del carbono en la molécula de azúcar).

Extremo 5': Extremo de una cadena de ADN o ARN que termina en el quinto carbono de la molécula de azúcar, que es la desoxirribosa o la ribosa. (El número del carbono se refiere a la posición del carbono en la molécula de azúcar).

Extremos cohesivos: Extremos de una molécula de ADN cortados con determinadas enzimas de restricción. Estos extremos son asimétricos: una cadena es más larga que la otra cadena y, por lo tanto, tiene bases no emparejadas. Los extremos cohesivos de dos fragmentos diferentes de ADN que se han cortado con las mismas enzimas de restricción se pueden unir, ya que las bases no emparejadas de los extremos son complementarias.

Fragmento de restricción: Parte del ADN que resulta del corte de la molécula de ADN con una enzima de restricción. Los fragmentos a menudo se separan en un gel usando electroforesis.

Ligación: Reacción que une químicamente dos fragmentos de ADN, lo que da como resultado una molécula de ADN recombinante.

Ligar: Unir dos extremos de ADN.

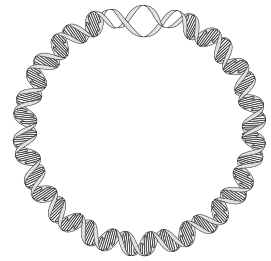
Ligasa de ADN: Enzima que cataliza la formación de enlaces químicos covalentes en el esqueleto azúcar-fosfato, lo que permite unir los fragmentos de ADN en forma permanente.

Par de bases complementarias: Bases con nitrógeno que se encuentran enfrentadas en una molécula de ADN de doble cadena. La complementariedad es el resultado del tamaño y la forma de la base, y de la cantidad de enlaces de hidrógeno entre las bases adyacentes en el par (A y T forman dos enlaces de hidrógeno, G y C forman tres). La adenina es complementaria a la timina, y la guanina es complementaria a la citosina.

Polimerasa de ADN: Enzima que se usa para multiplicar las moléculas de ADN.

Réplica: Copia exacta.

Replicación del ADN: Proceso biológico para realizar una copia idéntica de una sección de ADN, que se produce cada vez que se forma una célula nueva en organismos vivos. El proceso comienza cuando una molécula de ADN de doble cadena produce dos copias idénticas. Se separa la doble hélice, y cada cadena de la molécula original sirve como molde para la producción de la cadena complementaria.



CAPÍTULO 4:

CÓMO ASEGURARTE DE QUE HAS CREADO UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE

INTRODUCCIÓN

Cuando los biólogos clonan un gen para producir insulina humana, crean un plásmido recombinante que tiene el gen de la insulina humana. Para hacer esto, usan enzimas de restricción para crear fragmentos de ADN que contienen los componentes del plásmido, y luego usan ligasa de ADN para unir esos fragmentos entre sí. Como parte del proceso de clonación de genes, los biólogos deben *verificar* que hayan creado el plásmido recombinante que necesitan; es decir, el que tiene el gen de interés y todos los componentes necesarios para la proteína de interés que se producirá. En este capítulo, seguirás trabajando con las herramientas de ingeniería genética para verificar que tienes el plásmido recombinante que necesitas para producir la proteína roja fluorescente.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 4

Al final de este capítulo, podrás hacer lo siguiente:

- Describir por qué es importante verificar los productos creados en el proceso de ingeniería genética.
- Predecir la velocidad relativa de los fragmentos de restricción de ADN y los plásmidos en el gel durante la electroforesis en gel.
- Separar e identificar los fragmentos de restricción de ADN y los plásmidos con electroforesis en gel

¿QUÉ ES LO QUE YA SABES?

Analiza las siguientes preguntas con tu compañero y anota tus ideas en la libreta. Debes estar preparado para analizar tus respuestas con la clase. No te preocupes si no sabes todas las respuestas. El análisis de estas preguntas te ayudará a pensar sobre lo que ya sabes acerca de la electroforesis en gel, la verificación en la práctica de laboratorio y la ligación.

1. ¿Por qué los fragmentos de restricción de ADN y los plásmidos se separan cuando se analizan con electroforesis en gel?
2. ¿Por qué es importante identificar y verificar un plásmido recombinante?
3. Cuando los fragmentos de ADN se unen con una ligasa de ADN, se crean diversos productos. ¿Cómo sucede esto?

VERIFICACIÓN

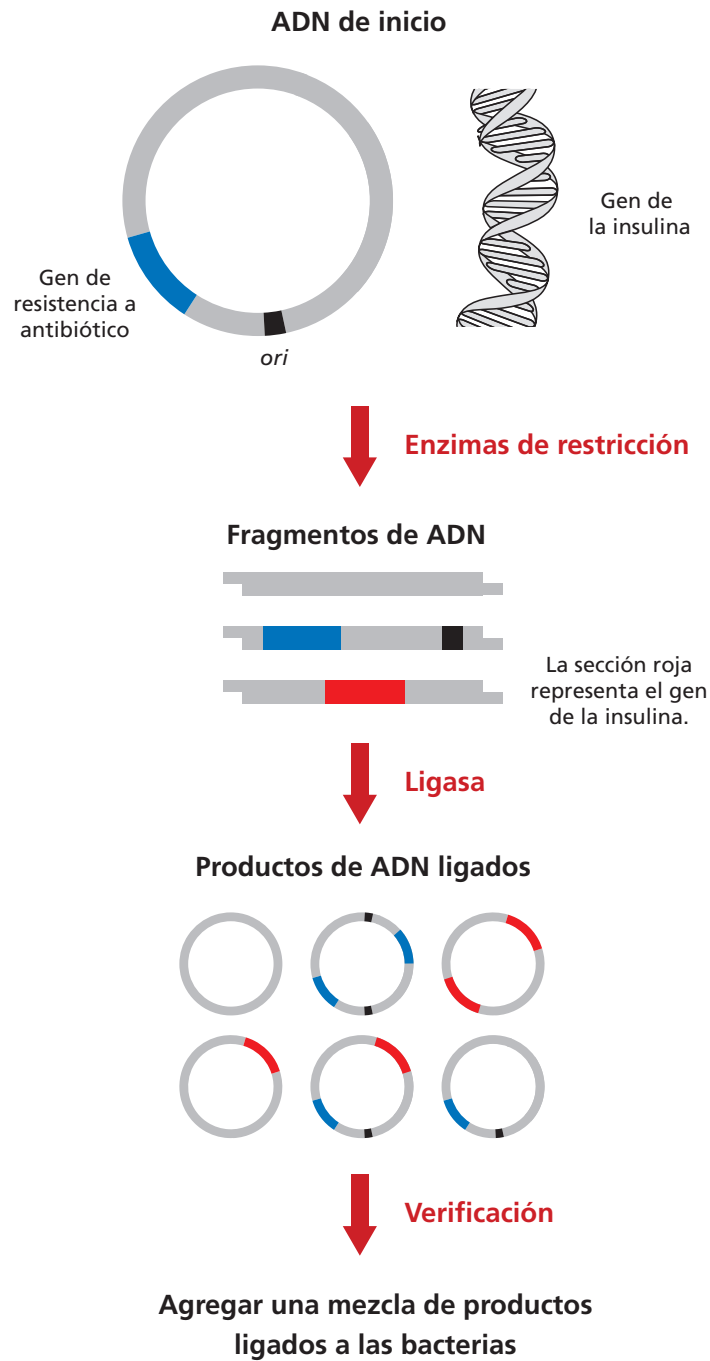
Es importante verificar el trabajo en el laboratorio: hay muchas fuentes de posibles errores en todo procedimiento, incluso en los procedimientos que se usan para clonar un gen. En la clonación de genes, también existe el problema de que algunos procedimientos no son selectivos. Por ejemplo, cuando se usa una ligasa de ADN para *ligar* (unir) fragmentos de ADN entre sí, se producen muchas combinaciones diferentes con el proceso de *ligación*. A menos que verifiques tu trabajo, no sabrás si has creado el plásmido recombinante que se necesita.

CÓMO VERIFICAR EL PLÁSMIDO RECOMBINANTE

La **Figura 4.1** muestra el método usado para verificar tus resultados al crear un plásmido recombinante. Verificas que la digestión con enzimas de restricción y los procedimientos de ligación funcionaron comparando los productos de ambos procedimientos entre sí, y con lo que comenzaste.

Figura 4.1: Método de verificación al producir un plásmido recombinante

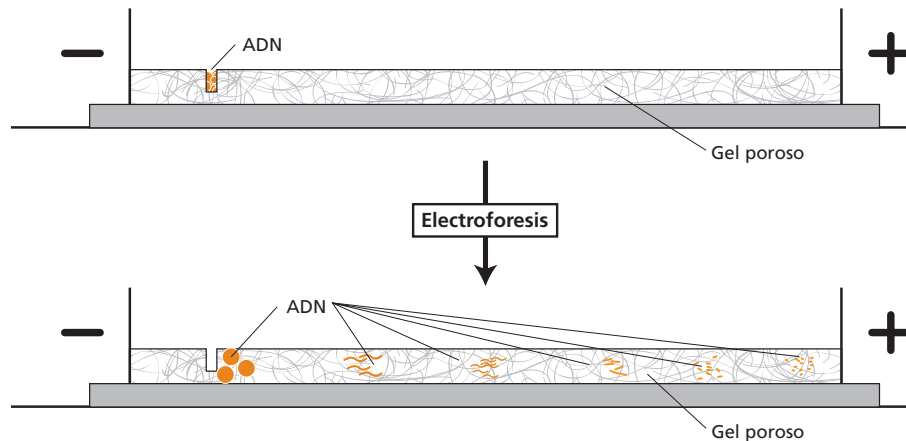
Verifica que la digestión con enzimas de restricción y el procedimiento de ligación hayan sido exitosos comparando los productos de la digestión con enzimas de restricción, los productos del procedimiento de ligación y los materiales iniciales.



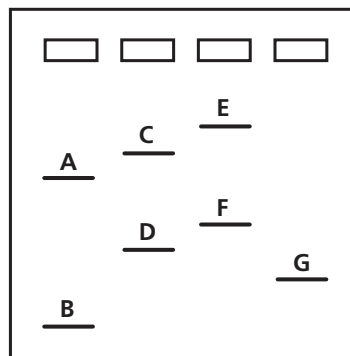
ELECTROFORESIS EN GEL

La electroforesis en gel se usa ampliamente en la verificación y purificación del ADN. Con el objeto de identificar o purificar los fragmentos de restricción de ADN, es preciso separar las moléculas de ADN de diversos tamaños. La electroforesis en gel separa las biomoléculas principalmente según su tamaño molecular, que para el ADN se mide por la cantidad de pares de bases. El esqueleto de una molécula de ADN, debido a sus grupos fosfato, tiene una carga negativa y, por lo tanto, se apartará del electrodo negativo (negro) y se desplazará hacia el electrodo positivo (rojo). Como para las moléculas pequeñas de ADN es más fácil desplazarse por la matriz de agarosa, migrarán más rápido que las moléculas más grandes de ADN. Ver la **Figura 4.2**.

Figura 4.2: Separación del ADN por tamaño usando electroforesis en gel



ATENCIÓN: Luego de haber separado diferentes fragmentos de ADN y plásmidos con la electroforesis en gel, el gel queda teñido con bandas que indican la ubicación de cada clase de fragmento y plásmido. El dibujo del gel teñido a continuación muestra una serie de bandas rotuladas con letras. También se muestra la ubicación de los pozos. ¿Cuál es el orden de los fragmentos, del más pequeño al más grande?



CONFIGURACIONES DE PLÁSMIDOS

Mientras que los fragmentos cortos y lineales de ADN se desplazan según lo esperado en la electroforesis en gel, el desplazamiento de los plásmidos no es tan directo. Esto se debe a que el plásmido puede existir en distintas configuraciones que se desplazan a distintas velocidades por el gel. Existen tres configuraciones de plásmidos:

- La configuración más común de plásmido es la *superhelicoidal*. Puedes visualizar esta configuración pensando en una pieza circular de un tubo plástico que está enroscada. Este enrosque o superhelicoides genera una molécula muy compacta, que se desplazará por el gel muy rápido para su tamaño. Esta configuración solo se ve en los plásmidos que se han multiplicado en las bacterias, ya que para que se forme un plásmido superhelicoidal se requiere una enzima que se encuentra en la célula bacteriana. Es la configuración natural predeterminada de los plásmidos en las bacterias.
- La segunda configuración de plásmido es el *círculo fragmentado*. Puedes visualizar esta configuración como un círculo grande y flexible. Este plásmido tiene un espacio en uno de los enlaces covalentes del esqueleto azúcar-fosfato, a lo largo de una de las dos cadenas de nucleótidos. Esta configuración de plásmido circular no se moverá por el gel de agarosa con tanta facilidad como la configuración superhelicoidal. Si bien es del mismo tamaño, en cuanto a los pares de bases, se ubicará más cerca del pozo que la forma superhelicoidal.
- La tercera configuración de plásmido es el *multímero*. Puedes visualizar esta configuración pensando en dos o más plásmidos que se conectan como eslabones en una cadena. Esta configuración solo se ve en plásmidos que se han multiplicado en bacterias, ya que los multímeros se forman cuando los plásmidos se multiplican tan rápido que terminan unidos entre sí. Si dos plásmidos se unen, el multímero será el doble de grande que un plásmido solo, y migrará muy lentamente por el gel. De hecho, se desplazará más lento que el círculo fragmentado.

Las configuraciones posibles de plásmidos se muestran en la **Figura 4.3**.

Figura 4.3: Configuraciones de plásmidos





ATENCIÓN: Si usaste electroforesis en gel para separar el mismo plásmido que tiene las tres configuraciones, el plásmido superhelicoidal sería el que más rápido se desplazó, mientras que el multímero sería el que más lento se desplazó. ¿Por qué las diferentes configuraciones de plásmido se desplazan de esa manera por el gel? Explica con palabras o un dibujo.



¿LO SABÍAS?

Historia de la ingeniería genética

La ingeniería genética no es un fenómeno nuevo; se ha estado realizando durante siglos en el cultivo de plantas y la cría de animales. Durante su historia, los seres humanos han usado la cría selectiva para producir organismos con rasgos deseados. La ciencia de la agricultura comenzó con la selección de césped silvestre y su cultivo posterior para formar los precursores de los alimentos básicos modernos como el trigo, el arroz y el maíz. En la cría selectiva se juntan dos miembros de la misma especie para su cruce, con el objeto de promover las características deseables en la descendencia. Por ejemplo, las vacas que producen grandes volúmenes de leche se pueden cruzar para que le pasen ese rasgo a las futuras generaciones.

La cría selectiva es una forma que tienen los seres humanos para promover los rasgos deseables en plantas y animales, pero es mucho más antigua y menos predecible que la modificación genética. La modificación genética es más precisa que la cría tradicional, y, en muchos casos, es mucho más rápida. Nuestra comprensión actual de la genética y la herencia permite la manipulación de genes y el desarrollo de nuevas combinaciones de rasgos y nuevas variedades de organismos. En realidad, la entrada en una célula y el cambio de su genoma insertando o sustrayendo ADN es una tecnología muy nueva. ¡Pero ten en cuenta que la modificación genética no es un proceso “antinatural” para crear monstruos! La modificación genética y la cría selectiva tradicional están limitadas por las mismas restricciones, y las mutaciones que se producen de forma natural también pueden (aunque no siempre) tener un desenlace negativo.

PRÁCTICA DE LABORATORIO 4: VERIFICACIÓN DE LA RESTRICCIÓN Y LIGACION CON ELECTROFORESIS EN GEL

En esta práctica de laboratorio, usarás electroforesis en gel para examinar los productos de la digestión con enzimas de restricción de los plásmidos pKAN-R y pARA (*Práctica de laboratorio 2*) y los productos de la ligación (*Práctica de laboratorio 3*). Es posible determinar los tamaños de los fragmentos de ADN comparándolos con una *escala de ADN*: una mezcla de fragmentos de ADN con tamaños conocidos. (Cuando la escala de ADN se coloca en electroforesis en gel y se tiñe, las bandas que muestran los fragmentos parecen los escalones de una escalera). La escala de ADN se carga adyacente a otras muestras de ADN para facilitar la comparación de las bandas de las muestras con las bandas de la escala. Los resultados de la electroforesis en gel proporcionarán indicios de que tus procedimientos de restricción y ligación fueron exitosos y que has creado el plásmido recombinante pARA-R que contiene el gen *rfp*.



ANTES DE LA PRÁCTICA DE LABORATORIO

Analiza las siguientes preguntas con tu grupo y prepárate para compartir tus respuestas con la clase:

1. Los plásmidos pKAN-R y pARA que cortaste en la *práctica de laboratorio 2* se multiplicaron en una célula bacteriana. ¿Qué configuraciones (superhelicoidal, círculo fragmentado o multímero) podrían tener estos dos plásmidos antes de la digestión?
2. La ligación que realizaste en la *práctica de laboratorio 3* puede dar como resultado varios plásmidos, pero ninguno de estos se han multiplicado en una célula bacteriana. ¿Qué configuraciones (superhelicoidal, círculo fragmentado o multímero) podrían tener los plásmidos ligados?
3. Debes catalogar todos los productos que podrías ver, incluso las diferentes configuraciones de los plásmidos. Revisa tu trabajo en las *prácticas de laboratorio 2 y 3*. ¿Qué productos podrías esperar ver en los tubos K-, K+, A-, A+ y LIG? Crea una tabla que muestre todos los fragmentos y plásmidos posibles por tubo. Incluye la longitud (tamaño de pb) de cada fragmento o plásmido, y ordena los productos que encuentres en cada tubo de microcentrífuga por tamaño, del más pequeño al más grande. Incluye cualquier configuración posible de plásmido, y ordena primero por tamaño y luego por velocidad en el gel, del más rápido al más lento.

4. Lee la sección de Métodos en las páginas B-43 a B-46, y describe brevemente los pasos con palabras y un diagrama de flujo.

MATERIALES

Reactivos

- Una gradilla con lo siguiente:
 - Tubo de microcentrífuga de pKAN-R no digerido de la *práctica de laboratorio 2* (K-)
 - Tubo de microcentrífuga de pKAN-R digerido de la *práctica de laboratorio 2* (K+)
 - Tubo de microcentrífuga de pARA no digerido de la *práctica de laboratorio 2* (A-)
 - Tubo de microcentrífuga de pARA digerido de la *práctica de laboratorio 2* (A+)
 - Tubo de microcentrífuga de plásmido ligado de la *práctica de laboratorio 3* (LIG)
 - Tubo de microcentrífuga de *tinte de carga*
 - Tubo de microcentrífuga de agua destilada (H₂O_d)
 - Tubo de microcentrífuga de escalera de ADN (EA)
- Matraz de 50 ml con solución amortiguadora de borato de sodio 1x (1x BS) (compartido con otro grupo)

Equipo y suministros

- 5 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Marcador permanente
- Micropipeta P-20
- Caja de puntas de pipeta desechables
- Microcentrífuga (se compartirá entre todos los grupos)
- Cámara de electroforesis con gel de agarosa al 0.8 % (se compartirá entre los grupos)
- Recipiente para residuos, para puntas y tubos de microcentrífuga usados (se compartirá entre los grupos)
- **Diagrama de la escalera de ADN (OR 4)**



SEGURIDAD:

- Se deben seguir todas las precauciones de seguridad adecuadas y usar el atuendo requerido en un laboratorio de ciencias, incluso gafas de seguridad. Consulta las indicaciones de tu profesor.
- Lávate bien las manos con jabón después de finalizar la práctica de laboratorio.

MÉTODOS

1. Revisa la gradilla para asegurarte de que tengas todos los reactivos nombrados.
2. Rotula con el marcador cinco tubos limpios de microcentrífuga "egA-," "egA+," "egK-," "egK+" y "egLIG." Incluye tu número de grupo y el período de clase en cada tubo.

NOTA: El prefijo "eg" indica que estos tubos contienen las muestras de electroforesis en gel.

3. Lee la **Tabla 4.1**, que resume los reactivos que agregarás en los pasos 4 a 8 para verificar los procedimientos de restricción y ligación.

Tabla 4.1: Agregado de reactivos en los tubos egK-, egK+, egA-, egA+ y egLIG

Secuencia	Tubo egK-	Tubo egK+	Tubo egA-	Tubo egA+	egLIG
Pasos 4 y 5: Agua destilada (dH ₂ O)	4.0 µL	4.0 µL	4.0 µL	4.0 µL	3.0 µL
Paso 6: Tinte de carga (LD)	2.0 µL	2.0 µL	2.0 µL	2.0 µL	2.0 µL
Paso 7a: pKAN-R no digerido (K-)	4.0 µL				
Paso 7b: pKAN-R digerido (K+)		4.0 µL			
Paso 7c: pARA no digerido (A-)			4.0 µL		
Paso 7d: pARA digerido (A+)				4.0 µL	
Paso 8: Plásmido ligado (LIG)					5.0 µL

TÉCNICA DE LABORATORIO: En los pasos 4 a 8, asegúrate de usar una punta de micropipeta nueva para cada reactivo, a fin de evitar la contaminación.

4. Agrega 4.0 µl de H₂O_d en los tubos egK-, egK+, egA- y egA+.
5. Agrega 3.0 µl de H₂O_d al tubo egLIG.
6. Agrega 2.0 µl de tinte de carga en los tubos egK-, egK+, egA-, egA+ y egLIG.

DETENTE Y PIENSA: El ADN no es visible al desplazarse por el gel. El tinte de carga contiene los tres tintes que separaste en la *práctica de laboratorio 1.2*. ¿Por qué es útil usar el tinte de carga en esta práctica de laboratorio?



7. Agrega lo siguiente (recuerda usar puntas de micropipeta nuevas):
 - a. 4.0 μ l de K⁻ al tubo egK⁻.
 - b. 4.0 μ l de K⁺ al tubo egK⁺.
 - c. 4.0 μ l de A⁻ al tubo egA⁻.
 - d. 4.0 μ l de A⁺ al tubo egA⁺.
8. Agrega 5.0 μ l de LIG al tubo egLIG. Devuélvele el tubo "LIG" a tu profesor para usarlo en el siguiente práctico de laboratorio.
9. Centrifuga los cinco tubos de microcentrífuga (egK⁻, egK⁺, egA⁻, egA⁺ y egLIG) en la microcentrífuga durante cuatro segundos para agrupar los reactivos en el fondo de cada tubo.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Distribuye los tubos en forma pareja en la microcentrífuga para que el peso quede equilibrado, asegurándote de que los tubos del mismo volumen estén directamente enfrentados entre sí.

10. Asegúrate de que los pozos en la unidad de electroforesis en gel estén ubicados cerca del electrodo negativo (negro).
11. Llena la cámara con 1x BS hasta un nivel que apenas cubra toda la superficie del gel. Si ves alguna burbuja sobre los pozos, agrega más solución amortiguadora.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Si hay burbujas, agrega cantidades *muy pequeñas* de solución amortiguadora en la cámara de electroforesis. Si bien el gel debe quedar completamente por debajo de la solución amortiguadora, no debe haber demasiada solución amortiguadora en la cámara, ya que así la corriente eléctrica correrá por la solución amortiguadora y no por el gel.

12. Haz un dibujo en tu libreta que muestre la ubicación de los pozos en la cámara de electroforesis. El orden de las muestras en cada pozo es el siguiente:

		EA	egK ⁻	egK ⁺	egA ⁻	egA ⁺	egLIG		
--	--	----	------------------	------------------	------------------	------------------	-------	--	--

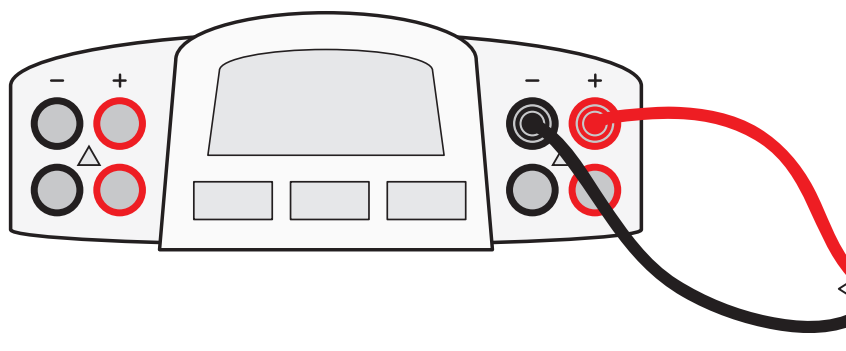
13. Con una punta de pipeta nueva para cada muestra, agrega 10.0 μ l de EA, egK⁻, egK⁺, egA⁻, egA⁺ y egLIG en los pozos designados. Haz lo siguiente para cada muestra:
 - a. Apoya el codo en la mesa para que la mano que sostiene la pipeta quede firme. De ser necesario, usa también la otra mano para darle apoyo a la mano que sostiene la pipeta.
 - b. Haz descender la punta de la pipeta hasta que quede debajo de la solución amortiguadora pero inmediatamente por encima del pozo.



TÉCNICA DE LABORATORIO: No perfores el gel; de lo contrario, quedará inutilizable. Presiona suavemente el émbolo para suministrar lentamente la muestra. Para evitar que entre aire en la solución amortiguadora, no te pases de la primera posición de detención. La muestra se hundirá en el pozo.

14. Luego de haber cargado todas las muestras, cierra bien la tapa de la cámara de electroforesis.
15. Conecta los cables eléctricos a la fuente de energía. Conecta ambos conductores al mismo canal, con el cátodo (-) al cátodo (negro a negro) y el ánodo (+) al ánodo (rojo a rojo). Ver la **Figura 4.4**.

Figura 4.4: Cables de la cámara de electroforesis conectados al canal correcto en la fuente de energía



16. Enciende la fuente de energía y coloca el voltaje entre 130 y 135 V.
17. Después de dos o tres minutos, verifica para ver si el tinte de carga púrpura (azul de bromofenol) se desplaza hacia el electrodo positivo (rojo). Si se desplaza en dirección opuesta, es decir hacia el electrodo negativo (negro), revisa los conductores eléctricos para ver si están conectados correctamente a la fuente de energía.

DETENTE Y PIENSA: La escalera de ADN sirve como patrón porque contiene una mezcla de moléculas de ADN de tamaños conocidos. Al hacer correr tus muestras y la escalera de ADN lado a lado en el gel, puedes calcular el tamaño real en pares de bases de moléculas de ADN desconocidas. El [Diagrama de escalera de ADN \(OR 4\)](#) muestra 10 bandas de ADN de tamaños conocidos. Con esta información, ¿puedes predecir las posiciones de las bandas de ADN producidas por los posibles productos que se encuentran en los tubos K-, K+, A-, A+ y LIG indicando su posición en el [Diagrama de escalera de ADN](#)?





DETENTE Y PIENSA: Las muestras de ADN y la escalera de ADN no son visibles en el gel. ¿Cómo podría hacerse visible el ADN una vez terminada la electroforesis en gel?

18. Tu profesor te explicará qué hacer con el gel. Quizás no tengas tiempo suficiente para terminar la electroforesis. El tinte de carga amarillo deberá correr cerca del final del gel, entre unos 40 y 50 minutos. Luego de que el gel haya terminado de correr, será preciso teñirlo para mostrar la ubicación de los fragmentos de ADN y de los plásmidos.

PREGUNTAS DEL CAPÍTULO 4

Analiza tu fotografía del gel y discute las siguientes preguntas con tu compañero. Prepárate para compartir tus respuestas con la clase.

1. ¿Por qué es importante verificar que tienes el plásmido recombinante correcto?
2. ¿Cómo se comparan tus resultados reales del gel con tus predicciones sobre el gel?
3. ¿Ves alguna banda que no esperabas? ¿Qué podría explicar el origen de estas bandas inesperadas?
4. ¿El gel muestra que tu digestión con enzimas de restricción y los procedimientos de ligación fueron exitosos? Describe la evidencia que usaste para hacer esta evaluación.
5. En los carriles egK⁻ y egA⁻, ¿ves evidencia de múltiples configuraciones de plásmidos? Explica tu respuesta.
6. En los carriles egK⁺ y egA⁺, ¿ves evidencia de digestión completa? Explica tu respuesta.
7. ¿En qué carriles esperarías encontrar el gen *rfp* y el gen *ampR* en el gel? ¿Puedes ubicar estos dos genes? Explica tu respuesta.
8. Compara los carriles que tienen fragmentos lineales con los carriles que tienen plásmidos. ¿Hay alguna diferencia en la forma de las bandas entre estas dos formas de ADN?
9. En la *práctica de laboratorio 3* describiste todos los plásmidos posibles que podías realizar uniendo los fragmentos de digestión de los plásmidos pKAN-R y pARA. Dos de los fragmentos del gen *rfp* (807 pb cada uno) pueden formar un fragmento redondeado porque cada extremo de los fragmentos termina en los extremos cohesivos BamHI e HindIII. ¿Hay evidencia de un fragmento redondeado de 1,614 pb en el carril del tubo egLIG? Explica tu respuesta.

GLOSARIO DEL CAPÍTULO 4

Círculo fragmentado: Configuración de plásmido que consiste en un único plásmido que tiene un corte en una de sus dos cadenas. La forma de este plásmido es circular.

Escala de ADN: Grupo de fragmentos de ADN conocidos con diferentes tamaños en pares de bases (pb) o kilobases (kb). Estos fragmentos de ADN se separan y visualizan como bandas de ADN en un gel. En conjunto, las bandas de ADN separadas parecen una escala en el gel. Las escalas de ADN se usan en la electroforesis en gel para determinar el tamaño y la cantidad de fragmentos de ADN.

Ligación: Reacción que une químicamente dos fragmentos de ADN, lo que da como resultado una molécula de ADN recombinante.

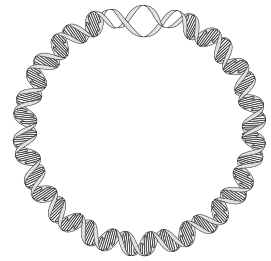
Ligar: Unir dos extremos de ADN.

Multímero: Configuración de plásmido que consiste en muchos plásmidos que se han entrelazado durante la formación, por lo que son como eslabones en una cadena.

Superhelicoidal: Configuración de plásmido que consiste en un único plásmido que se ha enroscado. La forma de este plásmido es más *compacta* (ocupa menos espacio) que la forma circular.

Tinte de carga: Grupo de tintes que se agrega a las biomoléculas, como el ADN, para la electroforesis en gel. Si un tinte se desplaza de manera que pase la muestra, indica que es momento de dejar de hacer correr el gel.

Verificar: Establecer que algo es cierto, preciso o capaz de ser defendido.



CAPÍTULO 5

INSERCIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN LAS BACTERIAS

INTRODUCCIÓN

La inserción de un gen en un vector plasmídico es un primer paso importante en el proceso de clonación de genes. No obstante, si el objetivo final es producir una gran cantidad de una proteína en particular, ¿cuál es tu próximo paso? El plásmido se debe multiplicar para asegurarse de que haya varias copias del gen, y el gen debe estar *expresado*; ambas actividades solo pueden tener lugar dentro de una célula. Por lo tanto, tu próximo paso en el proceso de clonación de genes es poner el plásmido recombinante dentro de bacterias de *E. coli* mediante un proceso que cambia el contenido de ADN de la bacteria, que se denomina como transformación. En este capítulo, realizarás la transformación de bacterias *E. coli* usando el plásmido recombinante que contiene el gen *rfp*.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 5

Al final de este capítulo, podrás hacer lo siguiente:

- Describir el papel de la transformación en el proceso de clonación de genes.
- Explicar el objetivo de cada control en el experimento de transformación.
- Explicar cómo la información codificada en un gen se expresa como un rasgo.

¿QUÉ ES LO QUE YA SABES?

Analiza las siguientes preguntas con tu compañero y anota tus ideas en la libreta. Debes estar preparado para analizar tus respuestas con la clase. No te preocupes si no sabes todas las respuestas. El análisis de estas preguntas te ayudará a pensar acerca de lo que ya sabes sobre la absorción de plásmidos y la expresión genética en las bacterias.

1. ¿Crees que la absorción bacteriana de un plásmido del ambiente es un evento común? ¿Por qué o por qué no?
2. ¿Cuáles son los pasos que tienen lugar en la transcripción y la *traducción* de un gen?
3. ¿Cuál es la relación entre los genes, las proteínas y los *rasgos* (o características observables)?
4. ¿Qué tienen en común las bacterias y los seres humanos que hace que sea posible que un gen humano se exprese en las bacterias?

TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS CON PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

Un plásmido es un vector ideal para mover secuencias de ADN de un organismo a otro. El plásmido está equipado con: (1) un *promotor* que permite la transcripción de genes, (2) una secuencia para el inicio de la replicación del ADN, y (3) un gen de resistencia a un antibiótico. El plásmido puede ser tomado por bacterias, donde se multiplica, y sus genes se expresan usando la maquinaria celular bacteriana. Si se ha insertado un gen de interés en el vector, la bacteria genera el producto codificado por ese gen.

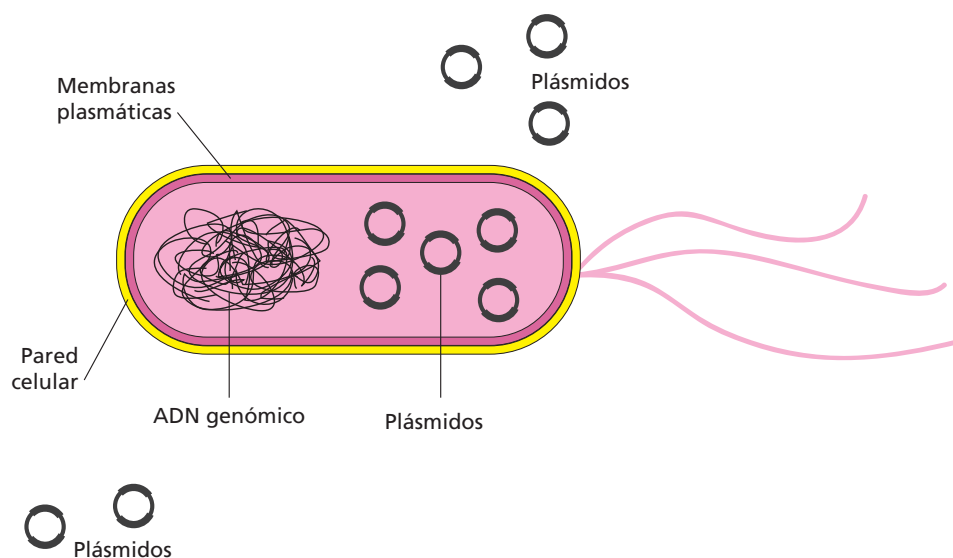


ATENCIÓN: Una vez que se ha insertado un gen en un vector, ¿qué crees que se necesita para que el producto sea codificado por el gen insertado?

TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

Una vez creado un plásmido recombinante que contiene un gen de interés, como la insulina, el plásmido puede entrar en las células bacterianas por un proceso denominado *transformación*. La **Figura 5.1** ilustra la transformación.

Figura 5.1: Transformación bacteriana



La absorción de ADN del ambiente de una célula bacteriana se produce con una eficacia muy baja en la naturaleza. Las bacterias *E. coli* tienen membranas plasmáticas complejas que separan el ambiente externo del ambiente interno de la célula y regulan cuidadosamente qué sustancias pueden entrar y salir de la célula. Asimismo, la pared celular tiene carga negativa y repele las moléculas de ADN con carga negativa.

ATENCIÓN: Por qué es importante que las membranas de las bacterias *E. coli* regulen cuidadosamente qué sustancias pueden entrar y salir de la célula?



Con el objeto de aumentar la eficacia de la absorción de ADN, las bacterias se tratan de dos maneras. Primero, se colocan las bacterias *E. coli* en una solución que contiene iones positivos de calcio, lo que neutraliza la carga negativa de las membranas externas de las células y permite que las moléculas de ADN crucen las membranas y entren en la célula. Luego, las bacterias se someten a un choque térmico, un aumento repentino de la temperatura, que aumenta la presión fuera de la célula. Esta diferencia de presión le permite al ADN plasmídico entrar a la célula bacteriana desde el exterior.

Se considera que las células tratadas con calcio y calor son *competentes* para tomar el ADN con más eficacia, pero incluso con este tratamiento solo alrededor de 1 en 10,000 células bacterianas toma un plásmido de su ambiente. Entonces, ¿cómo se puede identificar a las bacterias que han absorbido el plásmido recombinante? Recuerda que un componente importante de un plásmido recombinante es un gen para la resistencia a antibióticos. Si colocas células bacterianas en presencia del antibiótico, solo crecerán aquellas células que tienen el plásmido recombinante.

¿LO SABÍAS?

Absorción natural de plásmidos

Algunas cepas de bacterias intercambian plásmidos naturalmente, y esos plásmidos pueden proporcionar un gen que le da una ventaja selectiva, como la resistencia a antibióticos, a la célula. Un mecanismo para la transferencia eficaz de ADN entre especies bacterianas es la *conjugación bacteriana*, en la que el plásmido se comparte entre dos células bacterianas que están en contacto. El otro mecanismo es la transformación, en la que las bacterias absorben el ADN, incluidos los plásmidos, directamente del ambiente externo. En la naturaleza, la fuente habitual de este ADN son células que han muerto y liberado su contenido al ambiente.

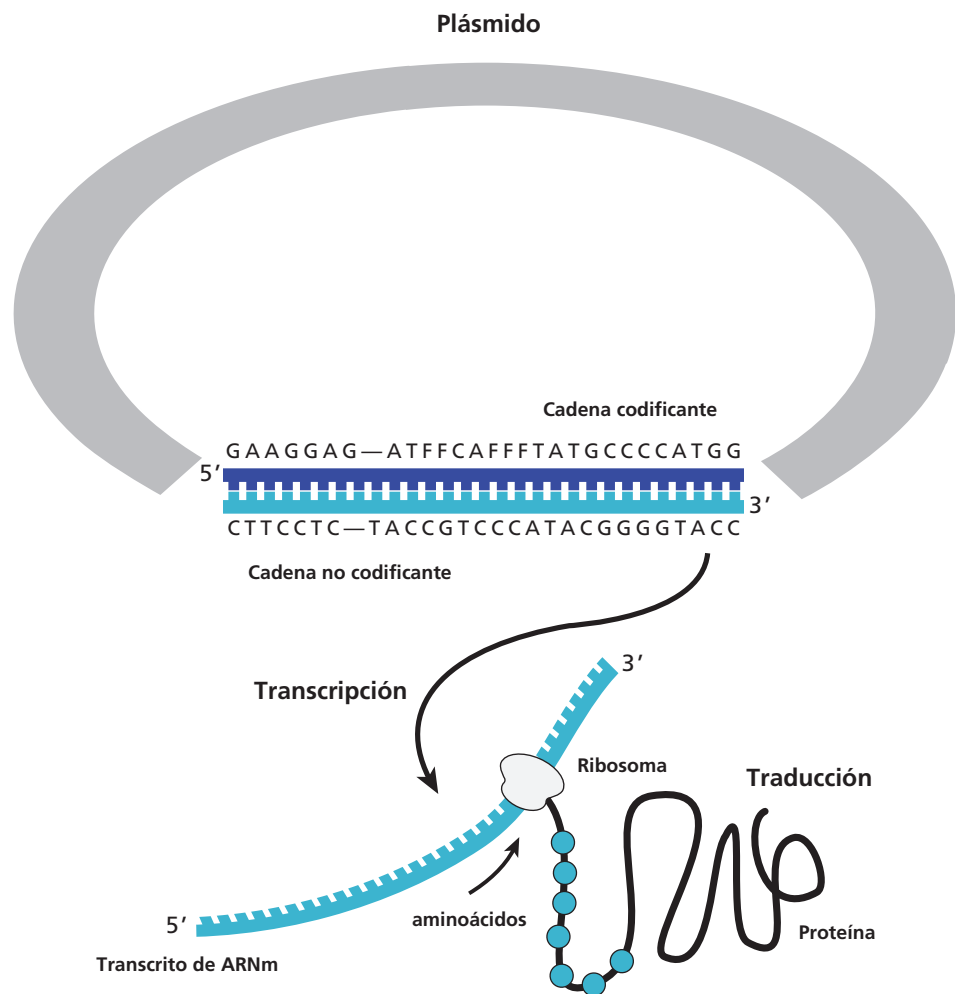
Si bien los plásmidos pueden ser ventajosos para las células bacterianas, no siempre son ventajosos para las personas. Por ejemplo, la vancomicina fue el único antibiótico eficaz contra las infecciones por *Staphylococcus aureus*. La resistencia a la vancomicina se asocia al gen *VanA*, que se lleva en un plásmido en otras especies bacterianas (como la cepa *Enterococcus faecium* [BM4147]). El intercambio de este plásmido hizo que la vancomicina sea menos eficaz contra las infecciones por estafilococos.



DEL ADN PLASMÍDICO A LA PROTEÍNA

Una vez que el plásmido recombinante ha entrado en la célula bacteriana, la polimerasa de ADN comienza la replicación en el punto *ori*, y el plásmido se multiplica usando las enzimas de la replicación del ADN bacteriano. Estas múltiples copias de plásmidos ahora pueden producir la proteína de interés, como la insulina, en cantidad. En este proceso, la información codificada en el ADN humano se transfiere del ADN a la proteína usando la maquinaria de transcripción y traducción de la célula (ver la **Figura 5.2**). La proteína luego modifica los rasgos observables del organismo.

Figura 5.2: Expresión genética de un plásmido en la célula bacteriana



La ingeniería genética solo es posible porque los genes de diferentes organismos se pueden expresar en las bacterias. En la Tierra, toda la vida está relacionada, y la forma en que se codifica la información en el ADN es universal. Como ya debes de saber, las proteínas están formadas por subunidades más pequeñas denominadas *aminoácidos*, y una secuencia de tres nucleótidos en el código del ADN para un solo aminoácido. Estas secuencias de tres nucleótidos se denominan *codones*. Por ejemplo, el codón TTG codifica para el aminoácido triptófano, mientras que el codón AAG codifica para el aminoácido lisina. En muchos casos, más de un codón puede codificar el mismo aminoácido. Por ejemplo, el AAA también es el codón para la lisina. Asimismo, hay codones informativos, como el *codón de inicio* (ATG) y el *codón de terminación* (por ejemplo, TTA), que muestran dónde comienza y termina el código para la proteína en la secuencia de ADN.

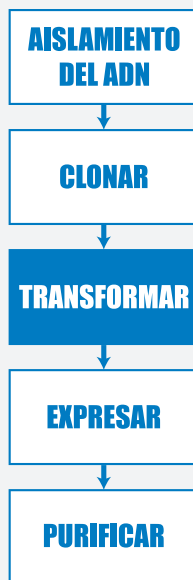
¿LO SABÍAS?

Producción de ADN a partir de ARN

Si bien el código del ADN es el mismo en todas las formas de vida, se requieren diferentes enzimas y estructuras para la transcripción y la traducción de genes en *eucariotas* y *procariotas*. (Las células humanas son eucariotas, y las células bacterianas son procariotas). Una diferencia importante entre estas dos clases de células es que los genes en los eucariotas contienen secuencias no codificantes denominadas *intrones*. La polimerasa de ARN transcribe el gen y produce un ARN mensajero precursor grande que contiene intrones y *exones*, que son las secuencias codificantes. El ARN precursor luego se *corta y conecta*, lo que elimina los intrones y une los exones en el ARN mensajero maduro.

Los procariotas no pueden realizar el corte y unión de los intrones. Para resolver este problema, los científicos usan una enzima, la *retrotranscriptasa*, que puede copiar ARN en ADN, para producir ADN complementario (ADNc) del ARN mensajero para una proteína en particular. El ADNc, que solo tiene las secuencias de exones, se inserta en el vector plasmídico. El gen clonado de la insulina humana que se usa para producir insulina se prepara de este modo.





PRÁCTICA DE LABORATORIO 5: TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS CON LOS PRODUCTOS DE LA LIGACIÓN

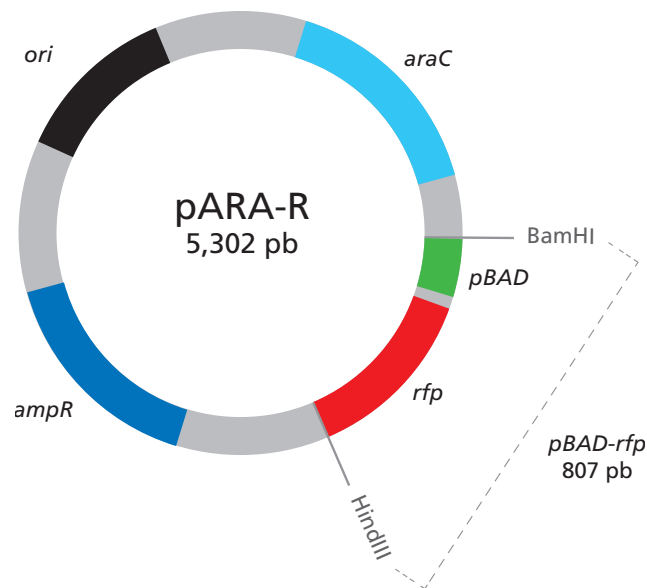
Hasta el momento en tu misión de clonar un gen, has producido plásmidos recombinantes y verificaste la producción del plásmido pARA-R que contiene el gen *rfp* que puede producir la *proteína roja fluorescente*. En esta práctica de laboratorio realizarás otro paso del proceso de clonación de genes, que es transformar las bacterias *E. coli* con este plásmido. Usando bacterias de *E. coli* que han sido tratadas previamente con cloruro de calcio, dividirás las bacterias en dos grupos: un grupo control en el que no se agregan plásmidos, y un grupo experimental en el que se agregan los productos de la ligación. Después del choque térmico de ambos grupos de células, las cultivarás en distintas condiciones:

- El grupo control se cultiva en presencia de Luria Broth (un *medio* que permite la proliferación bacteriana).
- El grupo control se cultiva en presencia de Luria Broth y el antibiótico ampicilina.
- El grupo experimental se cultiva en presencia de Luria Broth.
- El grupo experimental se cultiva en presencia de Luria Broth y el antibiótico ampicilina.
- El grupo experimental se cultiva en presencia de Luria Broth, ampicilina y el azúcar arabinosa.

Al examinar la proliferación de bacterias en estas condiciones, puedes verificar que tu procedimiento funcionó y puedes identificar que las bacterias se transformaron con el plásmido pARA-R que creaste en la *práctica de laboratorio 3*. ¿Cómo sabrás si tienes éxito en esto? Las bacterias tendrán un rasgo nuevo y muy visible: Ahora producirá una proteína roja fluorescente, ¡que hace que las células sean rojas o rosas brillante!

El plásmido pARA-R, que revisaste en el capítulo 3, se muestra nuevamente en la **Figura 5.3**.

Figura 5.3: Plásmido pARA-R



Los componentes relevantes de este plásmido son el gen *rfp*, el promotor (*pBAD*), el gen de resistencia a la ampicilina (*ampR*) y el gen de la proteína activadora de arabinosa (*araC*). El gen *ampR* le da resistencia al antibiótico ampicilina. (Los biotecnólogos llaman estos genes *marcadores selectivos* porque solo las bacterias que posean el gen sobrevivirán en la presencia de un antibiótico.) El gen *araC* controla al promotor. Si la arabinosa, un azúcar simple, está presente en las bacterias, la proteína activadora producida por el gen *araC* activa el promotor, que luego une a la polimerasa de ARN, y se transcribe el gen *rfp*. Las proteínas activadoras se usan en algunos plásmidos recombinantes para controlar la producción de la proteína de interés.

MATERIALES EDUCATIVOS

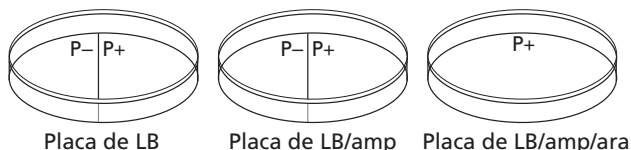
- Predicciones sobre la proliferación de bacterias (OR 5)

ANTES DE LA PRÁCTICA DE LABORATORIO

Analiza las siguientes preguntas con tu grupo, y prepárate para compartir tus respuestas con la clase.

1. La ampicilina es un antibiótico que destruye las células bacterianas interrumpiendo la formación de las paredes celulares. Sin embargo, el plásmido pARA-R tiene el gen de la resistencia a la ampicilina, lo que produce una proteína que degrada la ampicilina. ¿Cuál es el objetivo de cultivar bacterias que han sido transformadas en presencia de ampicilina?
2. ¿Qué sucederá cuando las células bacterianas que contienen el plásmido pARA-R no reciban arabinosa?

- En la práctica de laboratorio, agregarás muestras del grupo de control P– y del grupo de tratamiento P+ en placas con diversas combinaciones de Luria Broth (LB), ampicilina y el azúcar arabinosa. Las placas se ordenarán del siguiente modo:



Usando la clave en **Predicciones sobre la proliferación de bacterias (OR 5)**, muestra tus predicciones para la proliferación que esperarías para cada combinación. Luego completa la **Tabla 1** y la **Tabla 2** del material didáctico detallando las conclusiones a las que se puede llegar si la proliferación prevista se produce o no.

- Lee la sección Métodos en las páginas B-60 a B-64, y describe brevemente los pasos con palabras y un diagrama de flujo.



SEGURIDAD: Se deben seguir todas las precauciones de seguridad adecuadas y usar el atuendo requerido en un laboratorio de ciencias. Consulta las indicaciones de tu profesor.



SEGURIDAD: Ten cuidado al manipular bacterias *E. coli* y usa una *técnica aséptica*.

La técnica aséptica es un conjunto de procedimientos que asegura la protección tanto del científico de laboratorio y de la muestra bacteriana, lo cual es necesario para que el experimento sea exitoso. Específicamente:

- No toques nada que haya estado o vaya a estar en contacto con las bacterias *E. coli*. Los alumnos que manipulen elementos que entren en contacto con las bacterias deben usar guantes.
- Trata de evitar derrames o la contaminación de superficies con cualquier cosa que haya estado en contacto con bacterias *E. coli*. Avisa de inmediato a tu profesor si se produce un derrame o contaminación.
- Cuando hayas terminado de usar los tubos de microcentrífuga, las puntas de las pipetas y los esparcidores de células, colócalos de inmediato en la bolsa para residuos con riesgo biológico o recipiente para residuos, según las indicaciones de tu profesor.
- Cuando te lo indiquen, coloca tus placas Petri de vuelta en las bolsas originales y después en la bolsa para residuos con riesgo biológico.
- Lávate bien las manos con jabón después de finalizar la práctica de laboratorio.

MATERIALES

Reactivos

- Una gradilla con lo siguiente:
 - Tubo de microcentrífuga de plásmido ligado de la *práctica de laboratorio 3* (LIG)
 - Tubo de microcentrífuga de Luria Broth (LB)
- Tubo de microcentrífuga de 100 µl de células de *E. coli* competentes refrigeradas (CC)

NOTA: El tubo CC se debe mantener con hielo en todo momento.

- 3 placas Petri con agar:
 - 1 de LB
 - 1 de LB/amp
 - 1 de LB/amp/ara

Equipo y suministros

- Taza de poliestireno con hielo picado

NOTA: Llena una taza con parte del hielo picado del recipiente que tiene los tubos CC antes de tomar uno de estos tubos. Deberás mantener el tubo CC en hielo, en todo momento.

- 2 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Marcador permanente
- Guantes desechables
- Micropipeta P-20
- Micropipeta P-200
- Caja de puntas de pipeta desechables
- Paquete de esparcidores de células (se compartirán entre los grupos)
- Baño María a 42°C con gradilla flotador para tubos de microcentrífuga (se compartirá entre todos los grupos)
- Cronómetro o reloj (se compartirá entre todos los grupos)
- Cinta adhesiva (se compartirá entre todos los grupos)
- Incubadora a 37°C (se compartirá entre todos los grupos)
- Bolsa para residuos con riesgo biológico para materiales que entren en contacto con las células de *E. coli* (se compartirá entre los grupos)
- Recipiente para residuos (se compartirá entre los grupos)

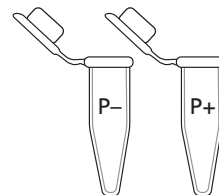
MÉTODOS

1. Revisa la gradilla para asegurarte de que tengas los reactivos nombrados. Comprueba que el tubo LIG esté rotulado con tu número de grupo y período de clase.



2. Obtén un tubo CC del recipiente con hielo y colócalo en una taza de poliestireno con hielo.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Las células competentes de esta práctica de laboratorio deben mantenerse frías; asegúrate de sostener los tubos de microcentrifuga por el borde superior para evitar transmitirle calor a las células.



3. Rotula dos tubos de microcentrifuga limpios como "P-" y "P+."
4. Coloca los tubos P- y P+ en la taza de poliestireno con hielo, junto con el tubo CC.



TÉCNICA DE LABORATORIO: La transformación bacteriana requiere técnicas estériles. Es esencial seguir estas indicaciones con precisión.

5. Con la micropipeta grande P-200, agrega las células competentes del tubo CC en los tubos P- y P+:
 - a. Fija la micropipeta P-200 en 50 μ l.
 - b. Con cuidado, vuelve a suspender las células bacterianas en el tubo CC aspirando y descargando la solución suavemente con la pipeta dos veces.
 - c. Agrega 50 μ l de CC en cada uno de los tubos vacíos refrigerados (P- y P+), sosteniendo cada tubo por el borde para mantener el frío, y vuelve a colocar cada tubo rápidamente en el hielo.



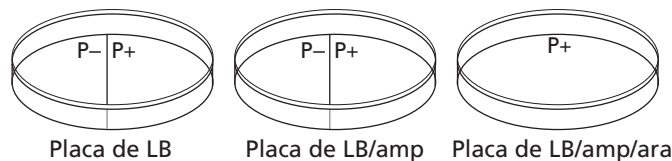
TÉCNICA DE LABORATORIO: Para evitar la contaminación, asegúrate de usar una punta de micropipeta nueva para cada solución que agregues.

6. Con la pipeta P-20, agrega 10.0 μ l de tus productos ligados (LIG) en el tubo rotulado "P+":
 - a. Fija la micropipeta P-20 en 10.0 μ l.
 - b. Sostén el tubo P+ refrigerado por el borde superior y agrega 10.0 μ l de LIG. Mezcla las soluciones aspirando y descargando los líquidos con la pipeta dos veces, y vuelve a colocar el tubo P+ en el hielo.

7. Mantén los tubos P- y P+ en el hielo durante 15 minutos.

NOTA: Durante el intervalo de 15 minutos, comparte y analiza tus respuestas a la pregunta 3 en la sección antes de la práctica de laboratorio.

8. Mientras las células están en el hielo, prepara tus tres placas Petri con agar: una con LB, otra con LB/amp y la última con LB/amp/ara:
 - a. Rotula la parte inferior de cada placa (la parte que contiene el agar) con tu número de grupo y período de clase. Escribe en letra pequeña en el borde de la placa.
 - b. Con las placas cerradas, traza una línea en la placa de LB y en la placa de LB/amp que divida cada placa por la mitad. Rotula la mitad de cada placa con "P–" y la otra mitad con "P+". Rotula la placa LB/amp/ara con "P+". Las placas se ordenarán del siguiente modo:



9. Luego de la incubación de 15 minutos en hielo, lleva los tubos P– y P+ (en la taza de hielo) al baño María de 42 °C. Coloca los dos tubos de la gradilla flotante para tubos de microcentrifuga en el baño María durante exactamente 45 segundos.
 10. Después del choque térmico de 45 segundos, vuelve a colocar los tubos de inmediato en el hielo y déjalos allí durante al menos un minuto.
 11. Con la micropipeta P-200 , agrega LB en los tubos P– y P+, usando una punta nueva para cada solución que agregues:
 - a. Fija la micropipeta P-200 en 150 µl.
 - b. Agrega 150 µl de LB en el tubo P–. Tapa el tubo y muévelo rápidamente con suavidad, dos o tres veces, para mezclar.
- TÉCNICA DE LABORATORIO:** Para evitar la contaminación, asegúrate de usar una nueva punta de micropipeta para cada solución.
- c. Agrega 150 µl de LB en el tubo P+. Tapa el tubo y muévelo rápidamente con suavidad, dos o tres veces, para mezclar.
 12. Si el tiempo lo permite, deja incubar las células de los tubos P– y P+ a temperatura ambiente durante 15 minutos.





DETENTE Y PIENSA:

- ¿De qué manera el cultivo de bacterias P+ se trata de forma diferente del cultivo de bacterias P-? (Un *cultivo* es una población aislada de células). ¿Cuál es el objetivo del cultivo de bacterias P-?
- ¿Por qué las células necesitan tiempo para recuperarse después del choque térmico?
- ¿Por qué las células se incuban a 37 °C?
- En esta práctica de laboratorio usarás una técnica aséptica. ¿Por qué es importante esto?

13. Agrega células del tubo P- en tus placas LB y LB/amp:

- Fija la micropipeta P-200 en 50 µl.

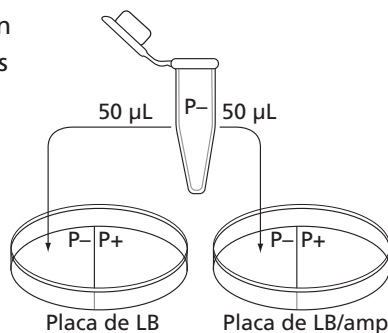
TÉCNICA DE LABORATORIO: Para evitar la contaminación, asegúrate de usar una punta de micropipeta nueva para cada solución.

- Aspira y descarga suavemente la solución del tubo P- con la pipeta dos o tres veces para dejar las células en suspensión, y carga 50 µl de células P-.

- Abre la tapa de la placa LB, como una "almeja", y agrega 50 µl de células del tubo P- en la sección marcada "P-". Cierra la tapa.

- Nuevamente, aspira y descarga suavemente la solución del tubo P- con la pipeta dos o tres veces para dejar las células en suspensión, y carga 50 µl de células P-.

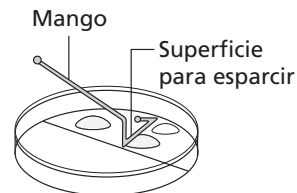
- Abre la tapa de la placa LB/amp, como una almeja, y agrega 50 µl de células del tubo P- en la sección marcada "P-". Cierra la tapa.



14. Esparce las células del tubo P- en tus placas LB y LB/amp:

- Abre el paquete de esparcidores estériles de células por el extremo más cercano al mango. Retira solo un esparcidor y cierra el paquete para mantener la esterilidad de los demás.

- Abre la tapa de la placa LB, como una almeja, y esparce las células de forma pareja en todo el lado P- de la placa, moviendo suavemente el esparcidor por la superficie de agar. (Mantén las células en el lado P- de la placa). Cierra la tapa.



- c. Esparce cuidadosamente las células P– en la placa LB/amp con el mismo esparcidor y la misma técnica.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Sostén el esparcidor por el mango y no permitas que el extremo doblado toque ninguna superficie, ya que esto contaminará el esparcidor. Coloca el esparcidor usado en la bolsa para residuos con riesgo biológico.



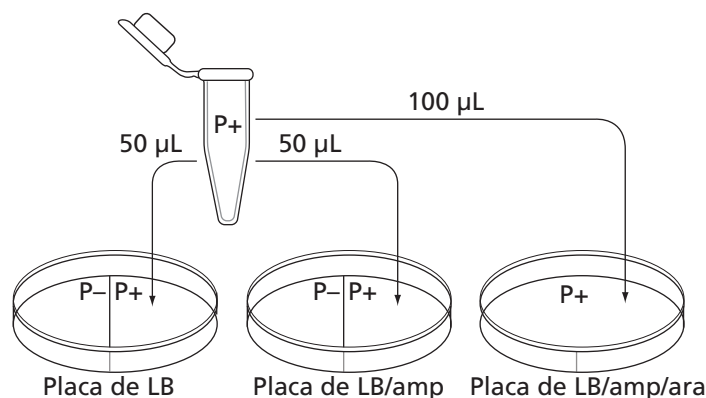
15. Agrega células del tubo P+ en tus placas LB, LB/amp y LB/amp/ara:

- a. Asegúrate de que la micropipeta P-200 esté en 50 μ l.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Para evitar la contaminación, asegúrate de usar una punta de micropipeta nueva para cada solución.



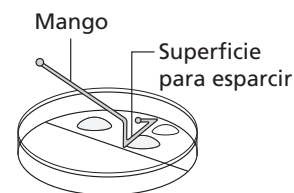
- b. Aspira y descarga suavemente la solución del tubo P+ con la pipeta dos o tres veces para dejar las células en suspensión, y carga 50 μ l de células P+.
- c. Abre la tapa de la placa LB, como una almeja, y agrega 50 μ l de células del tubo P+ en la sección marcada "P+". Cierra la tapa.
- d. Nuevamente, aspira y descarga suavemente la solución del tubo P+ con la pipeta dos o tres veces para dejar las células en suspensión, y carga 50 μ l de células P+.
- e. Abre la tapa de la placa LB/amp, como una almeja, y agrega 50 μ l de células del tubo P+ en la sección marcada "P+". Cierra la tapa.
- f. Fija la micropipeta P-200 en 100 μ l, aspira y descarga suavemente la solución del tubo P+ con la pipeta dos o tres veces, y carga 100 μ l de células P+.
- g. Abre la tapa de la placa LB/amp/ara, como una almeja, y agrega 100 μ l de células P+ en diversas zonas en toda la superficie, no simplemente en un solo lugar. Cierra la tapa.





16. Esparce las células del tubo P+ en las placas LB, LB/amp y LB/amp/ara:

- Abre el paquete de esparcidores estériles de células por el extremo más cercano al mango. Retira solo un esparcidor y cierra el paquete para mantener la esterilidad de los demás.
- Abre la tapa de la placa LB, como una almeja, y esparce las células de forma pareja en el lado P+ de la placa (y solo de este lado), moviendo suavemente el esparcidor por la superficie de agar. Cierra la tapa.
- Esparce cuidadosamente las células P+ en la placa LB/amp con el mismo esparcidor y la misma técnica.
- Esparce cuidadosamente las células P+ en la placa LB/amp/ara con el mismo esparcidor y la misma técnica. Luego gira suavemente la placa debajo del esparcidor de P+ para que las células se puedan esparcir por toda la superficie de esta placa. Cierra la tapa.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Sostén el esparcidor por el mango y no permitas que el extremo doblado toque ninguna superficie, ya que esto contaminará el esparcidor. Coloca el esparcidor usado en la bolsa para residuos con riesgo biológico.

- Deja las tres placas boca arriba durante cinco minutos.
- Con la cinta adhesiva proporcionada, pega las tres placas juntas y rotúlalas con tu número de grupo y período de clase.
- Coloca las placas en la incubadora a 37 °C boca abajo para evitar que la condensación gotee sobre el medio.
- Coloca todos los tubos de microcentrífuga, las puntas de las pipetas y los esparcidores de células en la bolsa para residuos con riesgo biológico.
- Incuba las placas durante 24 a 36 horas a 37 °C.
- Examina las placas y registra en tu libreta la proliferación que observas en cada mitad.
- Cuando te lo indiquen, desecha las placas Petri en la bolsa para residuos con riesgo biológico.

PREGUNTAS DEL CAPÍTULO 5

1. Observa los resultados de tu transformación. ¿Tus resultados reales coinciden con tus resultados previstos? De no ser así, ¿qué diferencias ves, y cuáles son algunas explicaciones para estas diferencias?
2. ¿Cuántas colonias rojas había en tu placa de LB/amp/ara?
3. ¿Por qué las colonias rojas solo aparecen en la placa de LB/amp/ara y no en la placa de LB/amp?
4. Los plásmidos recombinantes se manipulan para que se puedan multiplicar en la célula, independientemente de la replicación cromosomal. ¿Por qué es importante tener varias copias de un plásmido recombinante dentro de una célula?
5. ¿Cómo se convierte la información codificada en el gen *rfp* en un rasgo? Asegúrate de usar lo que has aprendido anteriormente sobre la expresión genética y la relación entre el ADN, el ARN, las proteínas y los rasgos.
6. ¿Por qué las bacterias pueden producir una proteína humana, como la insulina, o una proteína de la anémona marina, como el tinte rojo fluorescente?
7. Las únicas bacterias que pudieron producir la proteína roja fluorescente en la *práctica de laboratorio 5* fueron las bacterias transformadas con el plásmido pARA-R. ¿Por qué?



¿LO SABÍAS?

Sobre la conexión entre los genes y las proteínas

¿De qué forma los científicos pudieron demostrar que un gen codifica una proteína? En 1941, George Beadle y Edward Tatum realizaron un experimento en el que expusieron moho de pan a irradiación UV, un procedimiento que se sabía que provocaba *mutaciones* (cambios) en los genes. Beadle y Tatum crearon varias cepas mutantes de moho que habían perdido la capacidad de sintetizar una vitamina necesaria. En la síntesis de vitaminas, la vitamina es la molécula final de una vía en la que una serie de reacciones crea un conjunto correspondiente de moléculas precursoras, y cada reacción está catalizada por una enzima (una proteína). Al suministrar los precursores de la vitamina B6 de a uno por vez a la cepa mutante que no podía producir esa vitamina, Beadle y Tatum pudieron determinar que al mutante solo le faltaba una sola enzima que catalizaba una reacción.

Beadle y Tatum luego investigaron si un gen solo causaba la pérdida de la única enzima por cruces genéticos entre la cepa mutante que no podía sintetizar la vitamina B6 y una cepa natural. Luego de cultivar la descendencia, descubrieron que la mitad tenía el mismo defecto que la cepa mutante progenitora y la mitad no, lo que confirmaba que había mutado un solo gen. A partir de estos resultados, Beadle y Tatum propusieron que los genes eran responsables de codificar las proteínas de un organismo, y que un cambio en un gen podría producir una proteína defectuosa, lo que a su vez podría afectar los rasgos de ese organismo. En 1958, Beadle y Tatum recibieron el premio Nobel por este trabajo.

GLOSARIO DEL CAPÍTULO 5

Aminoácido: Componente básico de las proteínas. Existen 20 aminoácidos. Cada aminoácido es una sustancia orgánica que tiene dos grupos adheridos: un grupo amino (NH_2) y un grupo carboxilo (COOH).

Codón: Grupo de tres bases de ARNm que codifican un solo aminoácido.

Codón de inicio: Primer codón de ARNm traducido por un ribosoma; normalmente AUG o GUG.

Codón de terminación: Triplete de nucleótidos dentro del ARNm que señala la terminación de la traducción.

Competencia: Capacidad de una célula para ser transformada genéticamente tomando ADN del ambiente.

Conjugación bacteriana: Proceso por el cual se unen dos células bacterianas y transfieren el material genético de una a otra.

Corte y unión de ARN: Modificación del ARN mensajero en la que se eliminan los intrones y se unen los exones.

Cultivo: Población aislada de células que se han cultivado en un medio nutritivo especialmente preparado.

Eucariota: Organismo que alberga sus genes dentro de un núcleo y tiene varios cromosomas lineales.

Exón: Segmento de un gen que codifica una proteína. Los exones se transcriben y traducen.

Expresión: Proceso por el cual la información codificada en un gen se convierte primero en ARN mensajero y luego en una proteína.

Intrón: Segmento de un gen que no codifica una proteína. Los intrones se transcriben en el ARNm pero se eliminan antes de que los exones (el resto del gen) se traduzcan en una proteína.

Marcador selectivo: Gen en un plásmido que se introduce en una célula junto con un gen de interés que se clonará. Los marcadores selectivos permiten a los científicos saber si el plásmido ha sido tomado por la célula, ya que el marcador se puede ver o detectar. Un marcador selectivo común es el gen de resistencia a antibióticos: solo las bacterias que tienen el gen sobrevivirán ante el antibiótico.

Medio: Solución que contiene sustancias que sustentan la proliferación de microorganismos. El medio puede solidificarse añadiendo agar. Luria Broth es un ejemplo de un medio.

Mutación: Cambio o daño que se produce en una sección del ADN que modifica

los productos o procesos asociados con esa sección.

Procariota: Célula u organismo con un solo cromosoma y sin membrana nuclear. Las bacterias son procariotas.

Promotor: Secuencia específica de ADN que une la polimerasa de ARN y comienza la transcripción del gen.

Proteína roja fluorescente: Proteína codificada por el gen *rfp*. La proteína roja fluorescente es una molécula que tiene un tamaño aproximado de 238 aminoácidos. Cuando se expresa en células bacterianas, las células se ven de color rojo o rosa brillante.

Rasgo: Característica determinada genéticamente. El ADN codifica las proteínas, lo que determina los rasgos.

Retrotranscriptasa: Enzima que cataliza la formación de ADN a partir de una plantilla de ARN en la retrotranscripción.

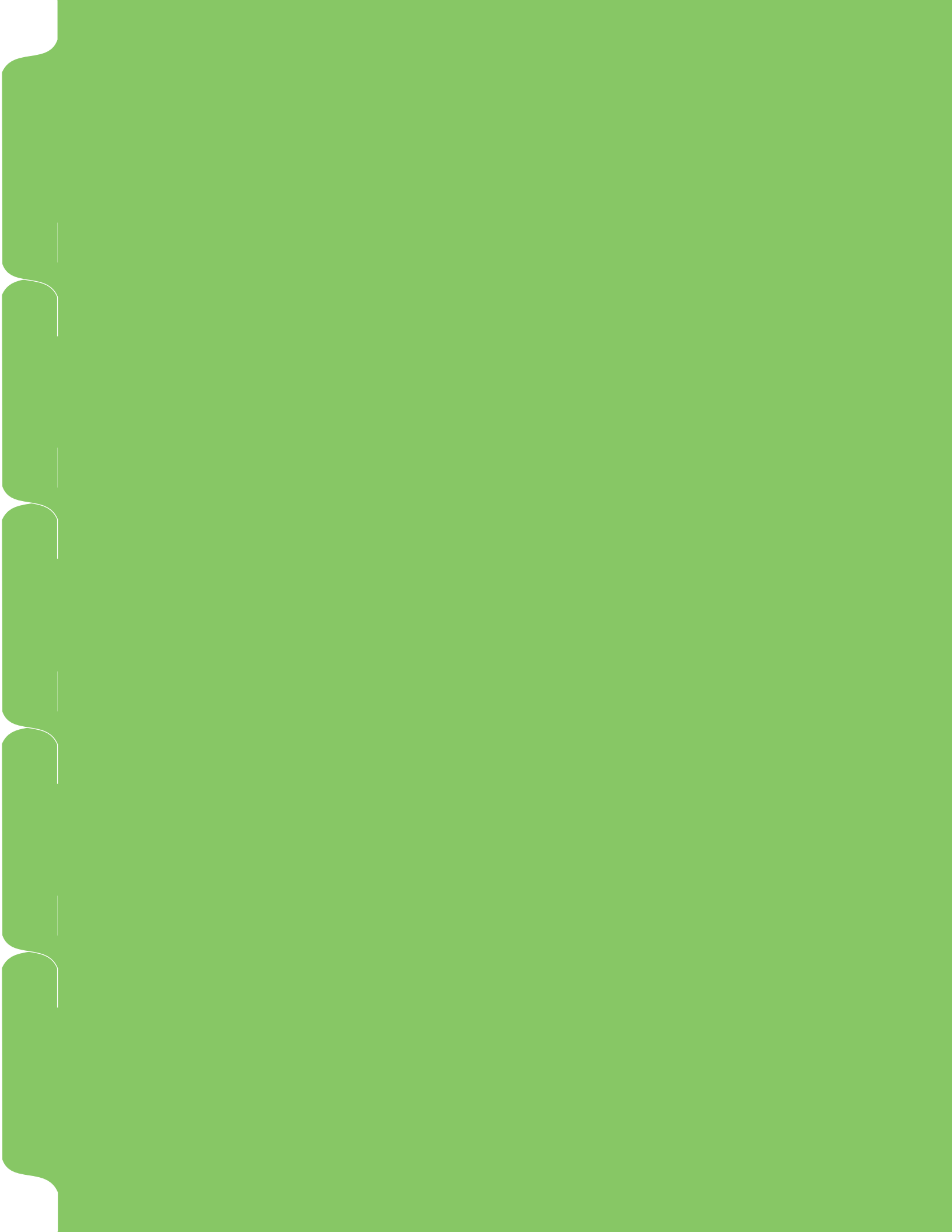
Técnica aséptica: Conjunto de procedimientos y condiciones cuidadosamente controladas para evitar la contaminación por patógenos.

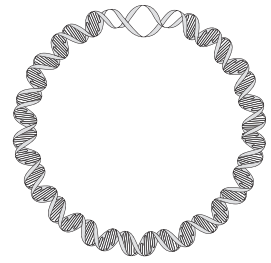
Traducción: Proceso por el cual la información codificada en el ARN mensajero se decodifica y transforma en proteína.

Transformación: Proceso que coloca el ADN extraño, como un plásmido, dentro de una célula.

Experiencia de Biotecnología Amgen

Descubrimiento científico para el salón de clase





CAPÍTULO 2A

¿CÓMO COMIENZAS A CLONAR UN GEN?

INTRODUCCIÓN

En la Introducción al programa, aprendiste que el aumento de la diabetes en los Estados Unidos ha generado una gran demanda de su tratamiento, la insulina. También aprendiste que la mejor manera de cumplir con esta demanda es insertando el gen de la insulina humana en bacterias, para que las bacterias produzcan la proteína insulina en cantidades suficientemente grandes como para satisfacer la demanda. En el capítulo 1 pudiste trabajar con dos herramientas físicas y técnicas de ingeniería genética que se usan para clonar un gen: la micropipeta y la electroforesis en gel. En este capítulo trabajarás con otras dos herramientas importantes de ingeniería genética: los *plásmidos* y las *enzimas de restricción*. Estas “herramientas” en realidad son biomoléculas que se encuentran en muchas bacterias, y su descubrimiento fue crucial para la ingeniería genética. Con estas herramientas, los científicos pueden modificar organismos para producir insulina humana y otros medicamentos. Ahora aprenderás más sobre estas herramientas y darás los primeros pasos en tu misión para clonar un gen.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 2A

Al final de este capítulo, podrás hacer lo siguiente:

- Describir las características de los plásmidos.
- Explicar cómo se usan los plásmidos para clonar un gen.
- Describir la función de las enzimas de restricción.
- Explicar cómo usar las enzimas de restricción para crear un plásmido recombinante.

¿QUÉ ES LO QUE YA SABES?

Analiza las siguientes preguntas con tu compañero y anota tus ideas en la libreta. Debes estar preparado para analizar tus respuestas con la clase. No te preocupes si no sabes todas las respuestas. El análisis de estas preguntas te ayudará a pensar acerca de lo que ya sabes sobre el ADN, los plásmidos y las enzimas de restricción.

1. ¿Cuál es la estructura y la función del ADN? Describe en palabras o con un dibujo la estructura de una molécula de ADN. Da todos los detalles que puedas.
2. Todos los organismos vivos contienen ADN. ¿De qué maneras el ADN de distintos organismos es el mismo, y de qué maneras varía?
3. Usando tus conocimientos sobre los genes y cómo se expresan, explica por qué es posible que una célula bacteriana produzca una proteína humana a partir de las instrucciones codificadas en un gen humano.

4. Como se detalla en la Introducción al programa, los científicos usan dos herramientas biológicas para manipular organismos para que produzcan proteínas nuevas: plásmidos y enzimas de restricción. ¿Qué recuerdas sobre cómo se usan estas herramientas?

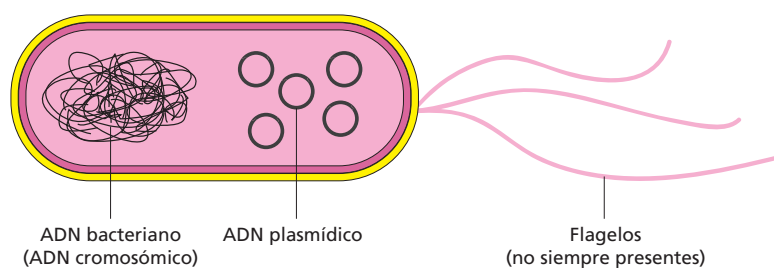
PLÁSMIDOS Y ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

El descubrimiento de los plásmidos y las enzimas de restricción en las bacterias es un ejemplo clásico de cómo los hallazgos de una investigación básica pueden revolucionar una disciplina. Sin el descubrimiento de estas biomoléculas, quizás nunca se hubieran producido los grandes avances en la comprensión de los procesos fundamentales de la vida y en el desarrollo de productos que salvan vidas.

PLÁSMIDOS

Muchos tipos diferentes de bacterias tienen dos formas de ADN: (1) un solo cromosoma compuesto por una molécula grande de ADN que contiene toda la información que necesita el organismo para sobrevivir y reproducirse; y (2) plásmidos, que son pequeñas moléculas circulares de ADN, con un tamaño que varía de 1,000 a 200,000 *pares de bases* (dos bases nitrogenadas unidas para conectar cadenas complementarias de ADN) que se encuentran en diversas copias separadas del ADN cromosómico (ver la **Figura 2A.1**). Algunas bacterias tienen hasta 500 plásmidos en cada célula.

Figura 2A.1: ADN en células bacterianas



Hay varias características de los plásmidos que hacen que sean vectores ideales (vehículos para transportar secuencias de ADN de un organismo a otro) para la ingeniería genética, por ejemplo:

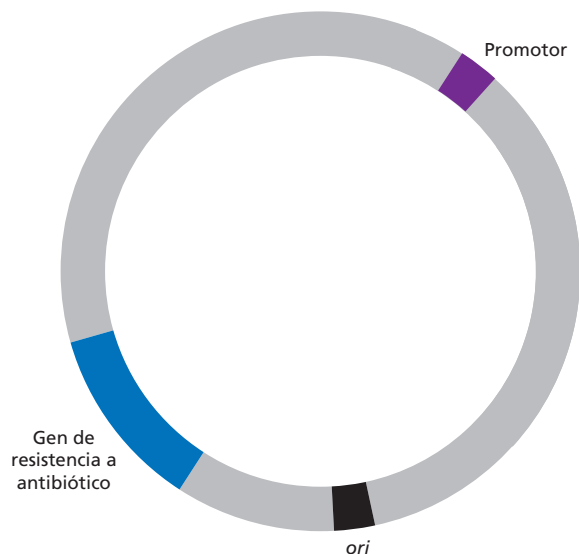
- La capacidad de multiplicarse, es decir, de hacer copias de sí mismo independientemente del cromosoma bacteriano. Para hacer esto, los plásmidos tienen una secuencia específica donde las enzimas de la síntesis

del ADN en la célula hospedera se unen y comienzan la *replicación del ADN* (proceso biológico que se produce en todos los organismos vivos para hacer copias de su ADN). Esta secuencia se denomina punto *ori* ("*origen de la replicación*").

- La capacidad de iniciar la *transcripción* (proceso por el cual la información codificada en el ADN se transfiere al *ARN mensajero* usando la polimerasa de ARN de la célula hospedadora). Esta capacidad requiere otra secuencia específica, denominada secuencia *promotora*. La *polimerasa de ARN* se une a la secuencia promotora; aquí es donde comienza la transcripción. Todos los genes tienen secuencias promotoras ubicadas junto a ellos en el ADN. Para que los genes, como el gen de la insulina, se expresen en las bacterias, se les debe insertar en el plásmido junto a la secuencia promotora.
- Un gen o varios genes que codifican la resistencia a los *antibióticos*, una clase de compuestos que destruyen los microorganismos o inhiben su multiplicación. Estos genes codifican proteínas que inhiben la acción de antibióticos secretados por microorganismos, y pueden otorgar una ventaja selectiva natural para las bacterias que contienen plásmidos, en una población microbiana donde las bacterias compiten por sobrevivir.

La **Figura 2A.2** ilustra algunas de las características de los plásmidos que hacen que sean vectores ideales para la ingeniería genética.

Figure 2A.2: Vector plasmídico



Los componentes básicos de un plásmido son el punto *ori* para el inicio de la replicación del ADN, un promotor para el inicio de la transcripción y un gen para la *resistencia a antibióticos* (estado en que las bacterias ya no son sensibles a un antibiótico, y seguirán multiplicándose y dividiéndose en presencia del antibiótico).

Los plásmidos con los que trabajarás en esta práctica de laboratorio y en las subsiguientes contienen el gen para la resistencia al antibiótico ampicilina. Este gen produce proteínas que inactivan el antibiótico al modificar químicamente su estructura.



ATENCIÓN: Usa lo que sabes sobre la selección natural y la evolución para describir cómo los plásmidos podrían otorgar una ventaja selectiva a sus bacterias hospederas.

Una cuarta característica de los plásmidos que es clave para la ingeniería genética es que se pueden trasladar de una cepa bacteriana a otra en un proceso denominado *conjugación bacteriana*, que permite que las bacterias compartan e intercambien información genética. Cuando un plásmido con un gen para la resistencia a antibióticos es tomado por bacterias que no tienen ese plásmido, las bacterias se volverán entonces resistentes a ese antibiótico específico. En la naturaleza, la conjugación se produce con una eficacia muy baja. Es decir, solo un pequeño porcentaje de bacterias en una población puede tomar ADN plasmídico en cualquier momento dado. La presencia de un gen de resistencia al antibiótico en el vector plasmídico nos permite identificar el pequeño porcentaje de bacterias que tomaron el plásmido. El antibiótico destruirá las bacterias que no tomaron el plásmido. Aquellas que tienen el plásmido con el gen de interés sobrevivirán y crecerán.

Al desarrollar técnicas para clonar genes en las bacterias, los científicos encontraron una herramienta poderosa en los plásmidos: un vector que puede ser tomado por bacterias, que se multiplica en las bacterias para producir varias copias de sí mismo, que tiene una secuencia promotora para la transcripción de un gen insertado, y que lleva un gen para la resistencia a antibióticos. Si realizas la práctica de laboratorio del capítulo 5A, aprovecharás estas características de los plásmidos al transferir tu plásmido recombinante a las bacterias.

Una vez que los científicos reconocieron el poder de los plásmidos como posibles vectores, el siguiente desafío fue determinar cómo incorporar un gen de interés externo, como el gen de la insulina, en el ADN plasmídico.

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

A principios de la década de 1950, los científicos observaron que ciertas cepas de *E. coli*, una bacteria común que se encuentra en el intestino humano, eran resistentes a la infección por *bacteriófagos* (virus que infectan las bacterias inyectando su ADN en la célula y ordenándole a los procesos moleculares de la célula hospedera que produzcan más bacteriófagos). La investigación de este “sistema inmunitario” primitivo llevó al descubrimiento de las enzimas de restricción, proteínas que restringían el crecimiento del bacteriófago mediante el reconocimiento y la destrucción del ADN del bacteriófago sin dañar el ADN hospedero (bacteriano). Los estudios posteriores demostraron que las enzimas

de restricción de diferentes cepas de bacterias cortaban ADN en secuencias específicas, denominadas *sitios de reconocimiento*.

ATENCIÓN: ¿Cómo evitan cortar su propio ADN las bacterias que llevan una enzima de restricción?



La **Tabla 2A.1** proporciona ejemplos de enzimas de restricción aisladas de diferentes cepas de bacterias y las secuencias de ADN que cortan. En los ejemplos que se muestran, las enzimas cortan en forma asimétrica en las cadenas de ADN y dejan secuencias salientes de una cadena en el punto de corte. Por ejemplo, un corte (o *digestión*) con EcoRI dejará un extremo saliente AATT (o “*terminal cohesivo*”) en una cadena y un terminal cohesivo TTAA en la otra cadena.

Tabla 2A.1: Enzimas de restricción usadas en esta práctica de laboratorio

Fuente	Enzima de restricción	Sitio de reconocimiento
<i>Escherichia coli</i>	EcoRI	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{ GAATTC } 3' \\ 3' \text{ CTTAAG } 5' \\ \uparrow \end{array} $
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	BamHI	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{ GGATCC } 3' \\ 3' \text{ CCTAGG } 5' \\ \uparrow \end{array} $
<i>Haemophilus influenzae</i>	HindIII	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{ AAGCTT } 3' \\ 3' \text{ TCGA } 5' \\ \uparrow \end{array} $

Los símbolos $\uparrow$ y $\downarrow$ indican dónde se corta el ADN.

ATENCIÓN:



- ¿Cuál es la secuencia del terminal cohesivo que queda cuando el ADN se corta con BamHI? ¿Y con HindIII?
- Los científicos pueden modificar los plásmidos para que tengan un solo sitio de enzimas de restricción. Imagina que tienes un plásmido con un solo sitio de EcoRI. Dibuja la estructura del plásmido después de haber sido cortado con la enzima, y muestra las secuencias de nucleótidos que quedan en el punto de corte. Si quisieras insertar un gen de una planta en este lugar, ¿qué enzima usarías para cortar el ADN de la planta? Explica tu respuesta.



¿LO SABÍAS?

La aparición de bacterias resistentes a antibióticos

Los antibióticos y otros fármacos similares se han usado durante los últimos 70 años para tratar a los pacientes que tienen enfermedades infecciosas. Al ser recetados y tomados en forma correcta, los antibióticos son sumamente valiosos para el tratamiento del paciente. Sin embargo, estos fármacos se han usado tanto y durante tanto tiempo que los organismos infecciosos que los antibióticos deben destruir se han adaptado a ellos y redujeron la eficacia de los fármacos. La resistencia a antibióticos se produce cuando ciertas bacterias en una población pueden sobrevivir al ser expuestas a uno o más antibióticos. Estas especies que se han vuelto resistentes provocan infecciones que no se pueden tratar con los antibióticos convencionales, en las dosis y concentraciones habituales. Algunas han desarrollado resistencia a varios antibióticos y se han apodado bacterias resistentes a múltiples fármacos o “bacterias superresistentes”.



La resistencia a antibióticos es un fenómeno grave en crecimiento, y ha surgido como una de las grandes preocupaciones para la salud pública del siglo XXI. Es posible que los organismos resistentes a fármacos hayan adquirido resistencia a los antibióticos de

primera línea, lo que requiere el uso de fármacos de segunda línea. Normalmente, el fármaco de primera línea se selecciona teniendo en cuenta varias ventajas, como la seguridad, la disponibilidad y el costo. El fármaco de segunda línea habitualmente tiene un espectro más amplio, puede ser menos beneficioso en relación con los riesgos asociados y puede ser más costoso o tener menos disponibilidad.

CLONAR ESE GEN

Ahora ya conoces dos herramientas biológicas para la clonación de un gen:

1. Un plásmido que tiene varias características importantes:
 - Uno o varios sitios de enzimas de restricción que abren el círculo plasmídico y permiten la inserción del gen de interés en el ADN plasmídico.
 - Una secuencia para el inicio de la replicación del ADN, denominada punto *ori*, que permite que el plásmido se multiplique en las bacterias usando las enzimas de la síntesis del ADN hospedero.
 - Una secuencia promotora para iniciar la transcripción del gen insertado.
 - Un gen que codifica una proteína para la resistencia a antibióticos, que permite la identificación de bacterias que han tomado el plásmido.
2. Enzimas de restricción para la digestión del plásmido y del ADN humano que contiene el gen de interés (como la insulina) que se clonará.

¿Cómo usan los científicos estas dos herramientas para crear un plásmido recombinante, que contiene el gen de la insulina (o cualquier otro gen de interés) insertado en un plásmido bacteriano? Un paso importante es elegir una o varias enzimas de restricción que corten el plásmido y el ADN humano. Las enzimas de restricción deben hacer todo lo siguiente:

- Cortar el plásmido en uno o varios puntos que permitan la inserción del nuevo gen.
- Cortar el plásmido en un punto adecuado para asegurar que no se altere ningún gen ni secuencias importantes, lo que incluye el punto *ori*, el promotor y al menos uno de los genes que codifican la resistencia a antibióticos.
- Cortar el plásmido cerca del promotor para que el gen insertado se pueda expresar.
- Cortar el ADN humano lo más cerca posible de los dos extremos del gen de interés, para que se pueda insertar en el punto adecuado en el ADN plasmídico, sin cortar dentro del gen.

DETENTE Y PIENSA: ¿Por qué es importante usar las mismas enzimas para cortar tanto el plásmido como el gen de interés del ADN humano?



En esta actividad, harás un modelo en papel del plásmido recombinante que contiene un gen de la insulina. Tienes tres tareas:

1. Cortar el plásmido y el ADN humano con la enzima de restricción adecuada.
2. Insertar el gen de la insulina en el ADN plasmídico.
3. Determinar qué antibiótico usarías para identificar las bacterias que han tomado el plásmido.

MATERIALES EDUCATIVOS

- Diagrama del plásmido (OR 2)
- Secuencia de ADN humano (OR 3)

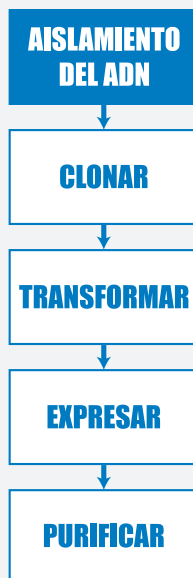
PROCEDIMIENTO

1. En el **Diagrama del plásmido (OR 2)**:
 - Corta la secuencia del plásmido con una tijera y pega los extremos entre sí para hacer un modelo del plásmido en papel.
 - Ubica las posiciones del punto *ori*, el punto promotor y los genes de resistencia a antibióticos.
 - Ubica las posiciones para cada sitio de reconocimiento de enzimas de restricción.
2. Elige la enzima de restricción que se debe usar para cortar el plásmido. Verifica que la enzima de restricción cumpla con todos los criterios detallados a continuación:
 - El punto *ori* del plásmido está intacto.
 - El punto promotor está intacto.
 - Al menos uno de los genes de resistencia a antibióticos está intacto.
 - La enzima corta el plásmido solo una vez.
 - El corte está cerca de la secuencia promotora.
3. Revisa la **Tabla 2A.1** en la página C-7 y corta el plásmido con una tijera en el sitio de reconocimiento, exactamente como cortaría la enzima de restricción. Anota las secuencias de los nucleótidos que quedan en cada extremo del plásmido.
4. En la **Secuencia de ADN humano (OR 3)**, mira la secuencia de ADN humano y determina dónde cortarían el ADN las tres enzimas de restricción BamHI, EcoRI e HindIII.

5. Determina si la enzima de restricción que elegiste en el paso 2 es una buena opción para cortar el gen de la insulina del ADN humano, para lo cual debes verificar que se cumpla con todos los criterios detallados a continuación:
 - No corta dentro del gen de la insulina.
 - Corta muy cerca del comienzo y el fin del gen.
 - Permitirá que el gen de la insulina se inserte en el plásmido cortado.
6. Revisa la **Tabla 2A.1** y corta del ADN humano con una tijera en el sitio de reconocimiento, exactamente como cortarías la enzima de restricción. Anota las secuencias de los nucleótidos que quedan en cada extremo del gen de la insulina después de ser cortado del ADN humano.
7. Usa cinta adhesiva para insertar el gen de la insulina en el plásmido cortado. Verifica que los extremos cohesivos se conecten en la orientación correcta. (En el laboratorio se usa una tercera herramienta biológica, la *ligasa de ADN*, para conectar en forma permanente los extremos cohesivos entre sí). Este es un modelo en papel de un plásmido recombinante que contiene un gen de la insulina. Una vez que el plásmido se multiplique (se copie), el gen de la insulina también se copiará ¡o clonará!

PREGUNTAS DE LA ACTIVIDAD

1. ¿Qué enzima de restricción elegiste? ¿Por qué la elegiste?
2. ¿Dónde insertarías el gen de la insulina y por qué?
3. ¿Qué antibiótico usarías para determinar si fue tomado el *ADN recombinante*?

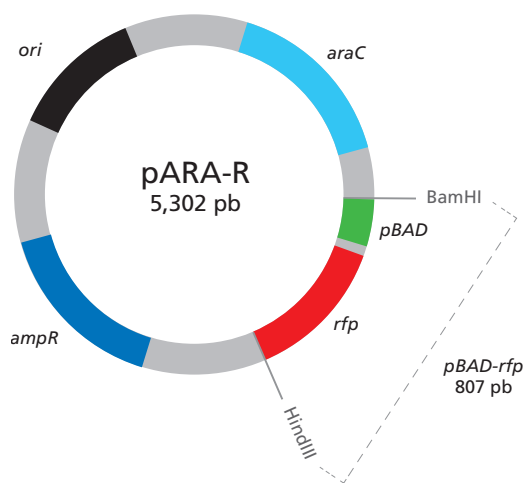


PRÁCTICA DE LABORATORIO 2A: PREPARACIÓN PARA VERIFICAR EL GEN *RFP*: DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO pARA-R

El objetivo de esta práctica de laboratorio es asegurar que el plásmido recombinante, pARA-R, que te han dado es el correcto para producir la proteína roja fluorescente en las bacterias. Para hacer esto, usarás enzimas de restricción para cortar el plásmido (ver la **Figura 2A.3**), que generará fragmentos de ADN de longitudes características del plásmido pARA-R. Este procedimiento se denomina *digestión con enzimas de restricción*, y la longitud de los fragmentos se puede determinar con electroforesis en gel (que puedes hacer en el capítulo 4A).

El plásmido con ADN recombinante pARA-R contiene el gen de la resistencia a la ampicilina, el gen de la proteína roja fluorescente (*rfp*), una secuencia promotora para iniciar la transcripción, y el punto *ori* para el inicio de la replicación del ADN. El plásmido pARA-R también contiene una secuencia de ADN que activa el promotor cuando las bacterias se cultivan en presencia de *arabinosa*, un azúcar de cinco carbonos que se presenta en forma natural en diversos carbohidratos de plantas y bacterias. Esta secuencia se denomina *activador* de arabinosa (*araC*). El activador controla al promotor. Si hay arabinosa en las bacterias, el promotor unirá la polimerasa de ARN y se producirá la transcripción. Si no hay arabinosa, el promotor no unirá la polimerasa de ARN y no se producirá la transcripción.

Figura 2A.3: Plásmido pARA-R



Los componentes relevantes del plásmido son el gen de la proteína roja fluorescente (*rfp*), el promotor (*pBAD*), el gen de resistencia a la ampicilina (*ampR*) y el activador de arabinosa (*araC*).

Además de mostrar los componentes relevantes, la **Figura 2A.3** también muestra el tamaño del plásmido (el número en el centro, que indica la cantidad de pares de bases [pb]) y las secuencias donde pueden realizar el corte las enzimas de restricción que se usarán en la práctica de laboratorio. Los puntos con los nombres “BamHI” e “HindIII” representan sitios de reconocimiento para estas dos enzimas de restricción. (Ver la **Tabla 2A.1** en la página C-7). La **Figura P.4** en la sección *¿Qué es la ingeniería genética?* (en la página A-12) muestra el gen de la insulina que se inserta en un solo sitio de enzimas de restricción en el plásmido. En la clonación del gen *rfp* se usan dos enzimas de restricción (BamHI e HindIII) al cortar el plásmido y al aislar el gen *rfp*. El uso de dos enzimas de restricción diferentes tiene ventajas: Le permite al gen insertado tener la orientación correcta para transcribir la cadena “codificante” del ADN (la cadena que codifica la proteína) y evita que el plásmido vuelva a formar un círculo sin el gen insertado. Aprenderás más sobre este tema si haces la práctica del capítulo 4A.

DETENTE Y PIENSA: ¿Por qué el uso de dos enzimas diferentes para cortar el plásmido evita que el plásmido vuelva a formar un círculo sin el gen insertado?



ANTES DE LA PRÁCTICA DE LABORATORIO

Responde las siguientes preguntas con tu grupo y prepárate para compartir tus respuestas con la clase.

1. Revisa la **Figura 2A.3**. Si pARA-R se digiere con BamHI e HindIII, ¿qué fragmentos se producen? Registra la secuencia de nucleótidos de los extremos cohesivos y la longitud de cada fragmento (pb), e indica los genes y otras secuencias importantes presentes en cada fragmento.
2. Con el objeto de crear un plásmido que pueda producir la proteína roja fluorescente en las bacterias, ¿qué componentes son necesarios en el plásmido?
3. Un antibiótico puede destruir las bacterias, a menos que estas lleven un plásmido que tenga el gen para la resistencia a ese antibiótico. Los biotecnólogos denominan a estos genes *marcadores selectivos* porque solo las bacterias que lleven el gen sobrevivirán ante el antibiótico. Si la absorción del ADN por las bacterias es ineficaz (como se analizó en la lectura), ¿por qué el marcador selectivo es clave en la clonación de un gen en las bacterias?
4. Lee la sección Métodos en la página C-15 y C-16, y describe brevemente los pasos con palabras y un diagrama de flujo.

MATERIALES

Reactivos

- Una gradilla con lo siguiente:
 - Tubo de microcentrífuga con solución amortiguadora de restricción de 2.5x (2.5xB)
 - Tubo de microcentrífuga de pARA-R (PR-2)
 - Tubo de microcentrífuga de enzimas de restricción BamHI e HindIII (ER)
 - Tubo de microcentrífuga de agua destilada (H₂O_d)

Equipo y suministros

- Micropipeta P-20
- Caja de puntas de pipeta desechables
- 2 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Marcador permanente
- Microcentrífuga (se compartirá entre todos los grupos)
- Baño María a 37 °C con gradilla flotante para tubos de microcentrífuga (se compartirá entre todos los grupos)
- Recipiente para residuos, para puntas y tubos de microcentrífuga usados (se compartirá entre los grupos)



SEGURIDAD:

- Se deben seguir todas las precauciones de seguridad adecuadas y usar el atuendo requerido en un laboratorio de ciencias, incluso gafas de seguridad. Consulta las indicaciones de tu profesor.
- Lávate bien las manos con jabón después de finalizar la práctica de laboratorio.

MÉTODOS

1. Revisa la gradilla para asegurarte de que tengas todos los reactivos nombrados.
2. Con el marcador rotula dos tubos de microcentrífuga limpios con "R+" y "R-". Incluye tu número de grupo y el período de clase en cada tubo.
3. Revisa la **Tabla 2A.2**, que resume los reactivos que agregarás en el paso 4.

Tabla 2A.2: Agregado de reactivos en los tubos R+ y R-

	Tubo R+	Tubo R-
Paso 4a: solución amortiguadora de restricción (2.5xB)	4.0 µL	4.0 µL
Paso 4b: plásmido pARA-R (PR-2)	4.0 µL	4.0 µL
Paso 4c: enzimas de restricción (ER):	2.0 µL	
Paso 4d: agua destilada (H ₂ O _d)		2.0 µL

TÉCNICA DE LABORATORIO: En el paso 4, asegúrate de usar una punta de micropipeta nueva para cada reactivo, a fin de evitar la contaminación.



4. Agrega lo siguiente:
 - a. 4.0 µl de 2.5xB a los tubos R+ y R-.
 - b. 4.0 µl de PR-2 a los tubos R+ y R-.
 - c. 2.0 µl de ER al tubo R+. Agrega las enzimas directamente en la solución en el fondo del tubo de microcentrífuga. Aspira y descarga suavemente la solución con la pipeta para mezclar los reactivos. Tapa el tubo cuando termines.
 - d. 2.0 µl de H₂O_d al tubo R-. Aspira y descarga suavemente la solución con la pipeta para mezclar los reactivos. Tapa el tubo cuando termines.

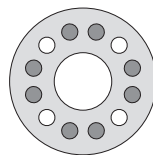
DETENTE Y PIENSA: En este paso, se te pide que prepares un tubo sin las enzimas de restricción BamHI e HindIII. ¿Cuál es el objetivo de este paso y por qué es importante?





5. Centrifuga los dos tubos de microcentrífuga (R+ y R-) en la microcentrífuga durante varios segundos para agrupar los reactivos en el fondo de cada tubo.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Distribuye los tubos de forma pareja en la microcentrífuga para que el peso esté equilibrado.



6. Coloca ambos tubos en el baño María de 37 °C. (Colocarás los tubos en la gradilla flotante para tubos de microcentrífuga; cuando la gradilla esté llena, el profesor la colocará en el baño María). Incuba durante al menos 60 minutos. Luego de terminada la incubación, coloca ambos tubos en el congelador a -20 °C para la *práctica de laboratorio 4A*.



DETENTE Y PIENSA: ¿Por qué las enzimas podrían funcionar mejor a 37 °C?
¿Por qué entonces se deben colocar las enzimas en el congelador?

PREGUNTAS DEL CAPÍTULO 2A

Analiza las siguientes preguntas con tu compañero y prepárate para compartir tus respuestas con la clase.

1. Haz una lista de palabras o indica con un dibujo las características importantes de un vector plasmídico que se requieren para clonar un gen. Explica el objetivo de cada característica.
2. ¿Qué función tienen las enzimas de restricción en la naturaleza?
3. Teniendo en cuenta lo que sabes de la evolución, ¿por qué las bacterias retendrían un gen que les da resistencia a los antibióticos? ¿De qué manera la existencia de bacterias con resistencia a antibióticos afecta a la medicina hoy en día?
4. Las bacterias, las anémonas marinas y los seres humanos parecen ser, a nivel superficial, organismos muy diferentes. Explica cómo un gen de un ser humano o una anémona marina se puede expresar en bacterias para crear un producto nunca antes creado en las bacterias.
5. Debido a un percance en la práctica de laboratorio, las bacterias que llevaban un plásmido con un gen resistente a la ampicilina y las bacterias que llevaban un plásmido con un gen que provee resistencia a otro antibiótico (kanamicina) se mezclaron de forma accidental. Diseña un experimento que te permitirá separar las dos clases de bacterias. (Sugerencia: ¡Asegúrate de no exterminar una de las dos clases de bacterias que tratas de separar!).

GLOSARIO DEL CAPÍTULO 2A

Activador: Proteína que regula la transcripción de un gen a través de la unión a una secuencia cerca del promotor, lo que permite que la polimerasa de ARN se una al promotor e inicie la transcripción del gen. La proteína activadora también puede bloquear la unión de la polimerasa de ARN y así inhibir la transcripción del gen.

ADN recombinante: ADN que contiene secuencias o genes de dos o más orígenes.

Antibiótico: Clase de compuestos que suprime o inhibe el crecimiento de microorganismos.

Arabinosa: Azúcar de cinco carbonos que se presenta en forma natural en diversos carbohidratos de plantas y bacterias.

ARN (ácido ribonucleico): Biomolécula de una cadena conformada por una base nitrogenada, un azúcar ribosa y un fosfato. El ARN tiene una función clave en la síntesis de proteínas: transmite información genética del ADN al ribosoma, donde luego se producen las proteínas.

ARN mensajero: Molécula de ARN transcrita del ADN de un gen y usada como plantilla para la síntesis de proteínas.

Bacteriófago: Virus que infecta una célula bacteriana y usa la maquinaria celular para multiplicarse y, finalmente, destruir la célula bacteriana.

Conjugación bacteriana: Proceso por el cual se unen dos células bacterianas y transfieren material genético de una a otra.

Digestión: Corte de ADN por una enzima de restricción.

Digestión con enzimas de restricción: Técnica en la cual se usan enzimas naturales para cortar el ADN en secuencias específicas.

Enzima de restricción: Proteína que puede cortar el ADN en un lugar específico que se denomina un *síto de reconocimiento*.

Extremos cohesivos: Extremos de una molécula de ADN cortados con determinadas enzimas de restricción. Estos extremos son asimétricos: una cadena es más larga que la otra cadena y, por lo tanto, tiene bases no emparejadas. Los extremos cohesivos de dos fragmentos diferentes de ADN que se han cortado con las mismas enzimas de restricción se pueden unir, ya que las bases no emparejadas de los extremos son complementarias.

Ligasa de ADN: Enzima que cataliza la formación de enlaces químicos covalentes en el esqueleto azúcar-fosfato, lo que posibilita la unión de los fragmentos de ADN.

Marcador selectivo: Gen en un plásmido que se introduce en una célula junto con un gen de interés que se clonará. Los marcadores selectivos permiten a los científicos saber si el plásmido ha sido tomado por la célula, ya que el marcador se puede ver o detectar. Un marcador selectivo común es el gen de resistencia a antibióticos: solo las bacterias que tienen el gen sobrevivirán ante el antibiótico.

Origen de la replicación (*ori*): Secuencia de ADN donde comienza la replicación del ADN.

Par de bases: Dos bases nitrogenadas juntas de a pares en el ADN de doble cadena mediante enlaces débiles.

Plásmido: Molécula circular de ADN.

Polimerasa de ARN: Proteína que separa las hebras de ADN y por complementaridad añade los nucleótidos para producir un ARN mensajero.

Promotor: Secuencia específica de ADN que une la polimerasa de ARN y comienza la transcripción del gen.

Replicación del ADN: Proceso biológico que tiene lugar en todos los organismos vivos y copia su ADN. El proceso comienza cuando una molécula de ADN de doble cadena produce dos copias idénticas. Se separa la doble hélice, y cada cadena de la molécula original sirve como molde para la producción de la cadena complementaria. Luego las bases se combinan para sintetizar las nuevas cadenas recíprocas.

Resistencia a antibióticos: Estado en que las bacterias ya no son sensibles a un antibiótico y seguirán multiplicándose y dividiéndose en presencia del antibiótico.

Sitio de reconocimiento: Una secuencia específica de ADN la cual es cortada por una enzima de restricción. Por lo general los sitios de reconocimiento son palíndromes, secuencia que lee lo mismo en ambas direcciones.

Transcripción: Proceso por el cual la información codificada en el ADN se transfiere al ARN mensajero, un ácido ribonucleico de una cadena.

Vector: Vehículo para mover secuencias de ADN de un organismo a otro.



CAPÍTULO 4A

CÓMO ASEGURARTE DE QUE TIENES UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE

INTRODUCCIÓN

Cuando los biólogos clonan un gen para producir insulina humana, crean un plásmido recombinante que tiene el gen de la insulina. Para hacer esto, usan enzimas de restricción para crear fragmentos de ADN que contienen los componentes del plásmido, y luego usan ligasa de ADN para unir esos fragmentos entre sí. (La *ligasa de ADN* es una enzima que cataliza la unión de fragmentos de ADN). Como parte del proceso de clonación de genes, los biólogos deben *verificar* que hayan creado el plásmido recombinante que necesitan; es decir, el que tiene el gen de interés y todos los componentes necesarios para la proteína de interés que se producirá. En este capítulo, seguirás trabajando con las herramientas de ingeniería genética para verificar que tienes el plásmido recombinante que necesitas para producir la proteína roja fluorescente.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 4A

Al final de este capítulo, podrás hacer lo siguiente:

- Describir por qué es importante verificar los productos creados en el proceso de ingeniería genética.
- Predecir la velocidad relativa de los fragmentos de restricción de ADN y los plásmidos en el gel durante la electroforesis en gel.
- Separar e identificar los fragmentos de restricción de ADN y los plásmidos con electroforesis en gel.

¿QUÉ ES LO QUE YA SABES?

Analiza las siguientes preguntas con tu compañero y anota tus ideas en la libreta. Debes estar preparado para analizar tus respuestas con la clase. No te preocupes si no sabes todas las respuestas. El análisis de estas preguntas te ayudará a pensar sobre lo que ya sabes acerca de la electroforesis en gel y la verificación en la práctica de laboratorio.

1. ¿Por qué los fragmentos de restricción de ADN y los plásmidos se separan cuando se analizan con electroforesis en gel?
2. ¿Por qué es importante identificar y verificar un plásmido recombinante?

VERIFICACIÓN

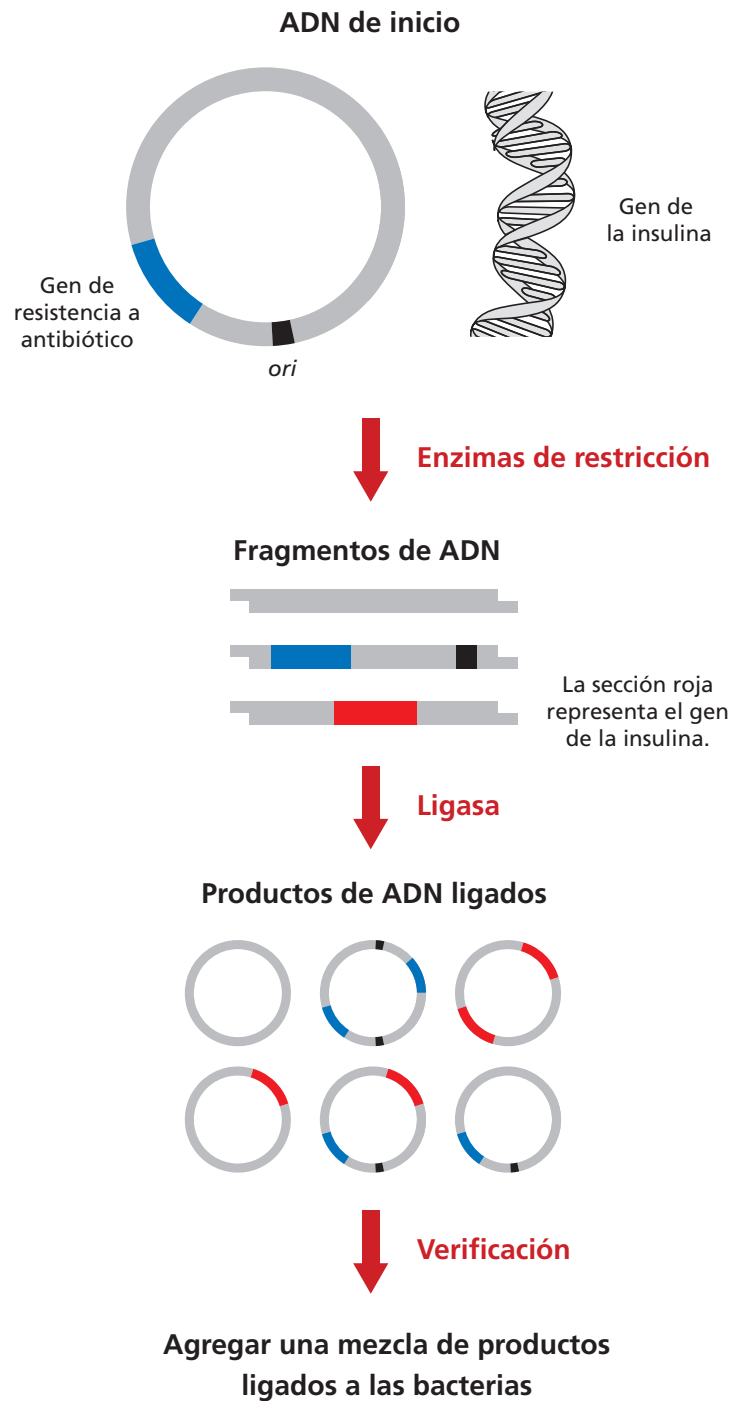
Es importante verificar el trabajo en el laboratorio: hay muchas fuentes de posibles errores en todo procedimiento, incluso en los procedimientos que se usan para clonar un gen. En la clonación de genes, también existe el problema de que algunos procedimientos no son selectivos. Por ejemplo, cuando se usa una ligasa de ADN para *ligar* (unir) fragmentos de ADN entre sí, se producen muchas combinaciones diferentes con el proceso de *ligación*. A menos que verifiques tu trabajo, no sabrás si has creado el plásmido recombinante que se necesita.

CÓMO VERIFICAR EL PLÁSMIDO RECOMBINANTE

La **Figura 4A.1** muestra el método usado para verificar tus resultados al crear un plásmido recombinante. Verificas que la digestión con enzimas de restricción y los procedimientos de ligación funcionaron para lo cual debes comparar los productos de ambos procedimientos entre sí, y con lo que comenzaste.

Figura 4A.1: Método de verificación al producir un plásmido recombinante

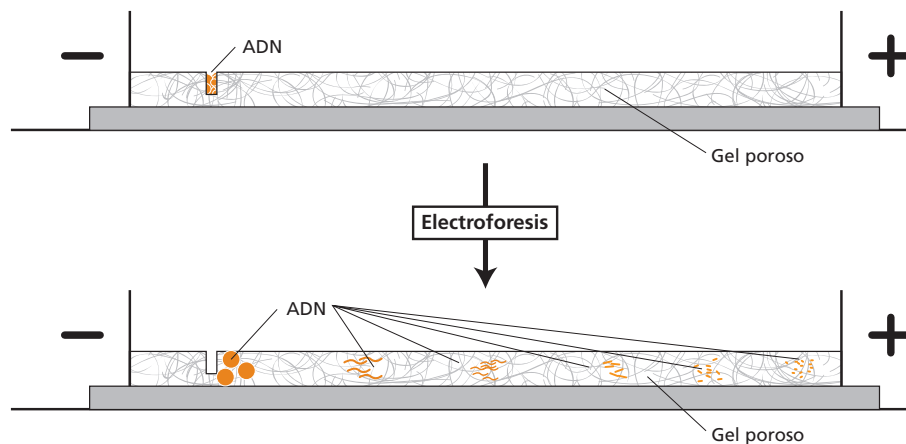
Verifica que la digestión con enzimas de restricción y el procedimiento de ligación hayan sido exitosos comparando los productos de la digestión con enzimas de restricción, los productos del procedimiento de ligación y los materiales iniciales.



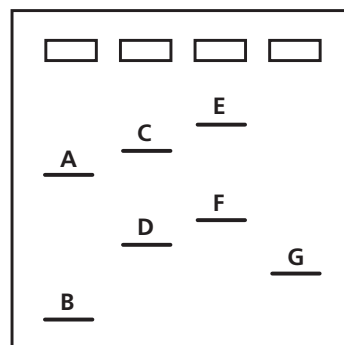
ELECTROFORESIS EN GEL

La electroforesis en gel se usa ampliamente en la verificación y purificación del ADN. Con el objeto de identificar o purificar los fragmentos de restricción de ADN, es preciso separar las moléculas de ADN de diversos tamaños. La electroforesis en gel separa las biomoléculas principalmente según su tamaño molecular, que para el ADN se mide por la cantidad de pares de bases. El esqueleto de una molécula de ADN, debido a sus grupos fosfato, tiene una carga negativa y, por lo tanto, se apartará del electrodo negativo (negro) y se desplazará hacia el electrodo positivo (rojo). Como para las moléculas pequeñas de ADN es más fácil desplazarse por la matriz de agarosa, migrarán más rápido que las moléculas más grandes de ADN. Ver la **Figura 4A.2**.

Figure 4A.2: Separación del ADN por tamaño usando electroforesis en gel



ATENCIÓN: Luego de haber separado diferentes fragmentos de ADN y plásmidos con la electroforesis en gel, el gel queda teñido con bandas que indican la ubicación de cada clase de fragmento y plásmido. El dibujo del gel teñido a continuación muestra una serie de bandas rotuladas con letras. También se muestra la ubicación de los pozos. ¿Cuál es el orden de los fragmentos, del más pequeño al más grande?



CONFIGURACIONES DE PLÁSMIDOS

Mientras que los fragmentos cortos y lineales de ADN se desplazan según lo esperado en la electroforesis en gel, el desplazamiento de los plásmidos no es tan directo. Esto se debe a que el plásmido puede existir en distintas configuraciones que se desplazan a distintas velocidades por el gel. Existen tres configuraciones de plásmidos:

- La configuración más común de plásmido es la *superhelicoidal*. Puedes visualizar esta configuración pensando en una pieza circular de un tubo plástico que está enroscada. Este enrosque o superhelicoides genera una molécula muy compacta, que se desplazará por el gel muy rápido para su tamaño. Esta configuración solo se ve en los plásmidos que se han multiplicado en las bacterias, ya que para que se forme un plásmido superhelicoidal se requiere una enzima que se encuentra en la célula bacteriana. Es la configuración natural predeterminada de los plásmidos en las bacterias.
- La segunda configuración de plásmido es el *círculo fragmentado*. Puedes visualizar esta configuración como un círculo grande y flexible. Este plásmido tiene un espacio en uno de los enlaces covalentes del esqueleto azúcar-fosfato, a lo largo de una de las dos cadenas de nucleótidos. Esta configuración de plásmido circular no se moverá por el gel de agarosa con tanta facilidad como la configuración superhelicoidal. Si bien es del mismo tamaño, en cuanto a los pares de bases, se ubicará más cerca del pozo que la forma superhelicoidal.
- La tercera configuración de plásmido es el *multímero*. Puedes visualizar esta configuración pensando en dos o más plásmidos que se conectan como eslabones en una cadena. Esta configuración solo se ve en plásmidos que se han multiplicado en bacterias, ya que los multímeros se forman cuando los plásmidos se multiplican tan rápido que terminan unidos entre sí. Si dos plásmidos se unen, el multímero será el doble de grande que un plásmido solo, y migrará muy lentamente por el gel. De hecho, se desplazará más lento que el círculo fragmentado.

Las configuraciones posibles de plásmidos se muestran en la **Figura 4A.3**.

Figura 4A.3: Configuraciones de plásmidos





ATENCIÓN: Si usaste electroforesis en gel para separar el mismo plásmido que tiene las tres configuraciones, el plásmido superhelicoidal sería el que más rápido se desplazó, mientras que el multímero sería el que más lento se desplazó. ¿Por qué las diferentes configuraciones de plásmido se desplazan de esa manera por el gel? Explica con palabras o un dibujo.



¿LO SABÍAS?

Historia de la ingeniería genética

La ingeniería genética no es un fenómeno nuevo; se ha estado realizando durante siglos en el cultivo de plantas y la cría de animales. Durante su historia, los seres humanos han usado la cría selectiva para producir organismos con rasgos deseados. La ciencia de la agricultura comenzó con la selección de césped silvestre y su cultivo posterior para formar los precursores de los alimentos básicos modernos como el trigo, el arroz y el maíz. En la cría selectiva se juntan dos miembros de la misma especie para su cruce, con el objeto de promover las características deseables en la descendencia. Por ejemplo, las vacas que producen grandes volúmenes de leche se pueden cruzar para que le pasen ese rasgo a las futuras generaciones.

La cría selectiva es una forma que tienen los seres humanos para promover los rasgos deseables en plantas y animales, pero es mucho más antigua y menos predecible que la modificación genética. La modificación genética es más precisa que la cría tradicional, y, en muchos casos, es mucho más rápida. Nuestra comprensión actual de la genética y la herencia permite la manipulación de genes y el desarrollo de nuevas combinaciones de rasgos y nuevas variedades de organismos. En realidad la entrada en una célula y el cambio de su genoma insertando o sustrayendo ADN es una tecnología muy nueva. ¡Pero ten en cuenta que la modificación genética no es un proceso “antinatural” para crear monstruos! La modificación genética y la cría selectiva tradicional están limitadas por las mismas restricciones, y las mutaciones que se producen de forma natural también pueden (aunque no siempre) tener un desenlace negativo.

PRÁCTICA DE LABORATORIO 4A: VERIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE CON ELECTROFORESIS EN GEL

En esta práctica de laboratorio usarás electroforesis en gel para examinar los productos de la digestión con enzimas de restricción del plásmido pARA-R (*práctica de laboratorio 2A*). Es posible determinar los tamaños de los fragmentos de ADN comparándolos con una *escalera de ADN*: una mezcla de fragmentos de ADN con tamaños conocidos. (Cuando la escalera de ADN se coloca en electroforesis en gel y se tiñe, las bandas que muestran los fragmentos parecen los escalones de una escalera). La escalera de ADN se carga adyacente a otras muestras de ADN para facilitar la comparación de las bandas de las muestras con las bandas de la escalera. Los resultados de la electroforesis en gel proporcionarán indicios de que estás usando el plásmido recombinante pARA-R que contiene el gen *rfp*.



ANTES DE LA PRÁCTICA DE LABORATORIO

Analiza las siguientes preguntas con tu grupo y prepárate para compartir tus respuestas con la clase:

1. El plásmido pARA-R que digeriste en la *práctica de laboratorio 2A* se multiplicó en una célula bacteriana. ¿Qué configuraciones (superhelicoidal, círculo fragmentado o multímero) podría tener el plásmido antes de la digestión?
2. Debes catalogar todos los productos que podrías ver, incluso las diferentes configuraciones de los plásmidos. Revisa tu trabajo en la *práctica de laboratorio 2A*. ¿Qué productos podrías ver en los tubos R- y R+? Crea una tabla que muestre todos los fragmentos y plásmidos posibles por tubo. Incluye la longitud (tamaño de pb) de cada fragmento o plásmido posible, y ordena los productos que encuentres en cada tubo de microcentrífuga por tamaño, del más pequeño al más grande. Incluye cualquier configuración posible de plásmido, y ordena primero por tamaño y luego por velocidad en el gel, del más rápido al más lento.
3. Lee la sección Métodos en las páginas C-30 y C-32, y describe brevemente los pasos con palabras y un diagrama de flujo.

MATERIALES

Reactivos

- Una gradilla con lo siguiente:
 - Tubo de microcentrífuga de pARA-R no digerido de la *práctica de laboratorio 2A* (R-)
 - Tubo de microcentrífuga de pARA-R digerido de la *práctica de laboratorio 2A* (R+)
 - Tubo de microcentrífuga de *tinte de carga*
 - Tubo de microcentrífuga de escalera de ADN (EA)
- Matraz de 50 ml con 1x BS (compartido con otro grupo)

Equipo y suministros

- Micropipeta P-20
- Caja de puntas de pipeta desechables
- Microcentrífuga (se compartirá entre todos los grupos)
- Cámara de electroforesis con gel de agarosa al 0.8% (se compartirá entre dos grupos)
- Recipiente para residuos, para puntas y tubos de microcentrífuga usados (se compartirá entre los grupos)



SEGURIDAD:

- Se deben seguir todas las precauciones de seguridad adecuadas y usar el atuendo requerido en un laboratorio de ciencias, incluso gafas de seguridad. Consulta las indicaciones de tu profesor.
- Lávate bien las manos con jabón después de finalizar la práctica de laboratorio.

MÉTODOS

1. Revisa la gradilla para asegurarte de que tengas todos los reactivos nombrados.
2. Agrega 2.0 µl de tinte de carga a los tubos R- y R+.



DETENTE Y PIENSA: El ADN no es visible al moverse por el gel. El tinte de carga contiene los tres tintes que separaste en la *práctica de laboratorio 1.2*. ¿Por qué es útil usar el tinte de carga en esta práctica de laboratorio?

- Centrifuga los tubos R- y R+ en la microcentrífuga durante cuatro segundos para agrupar los reactivos en el fondo de cada tubo.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Distribuye los tubos de forma pareja en la microcentrífuga para que el peso esté equilibrado.



- Asegúrate de que los pozos en la unidad de electroforesis en gel estén ubicados cerca del electrodo negativo (negro).
- Llena la cámara con 1x BS hasta un nivel que apenas cubra toda la superficie del gel. Si ves algunas burbujas sobre los pozos, agrega más solución amortiguadora.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Si hay burbujas, agrega cantidades *muy pequeñas* de solución amortiguadora en la cámara de electroforesis. Si bien el gel debe quedar completamente por debajo de la solución amortiguadora, no debe haber demasiada solución amortiguadora en la cámara, ya que así la corriente eléctrica correrá por la solución amortiguadora y no por el gel.



- Haz un dibujo en tu libreta que muestre la ubicación de los pozos en la cámara de electroforesis. El orden de las muestras en cada pozo será el siguiente:



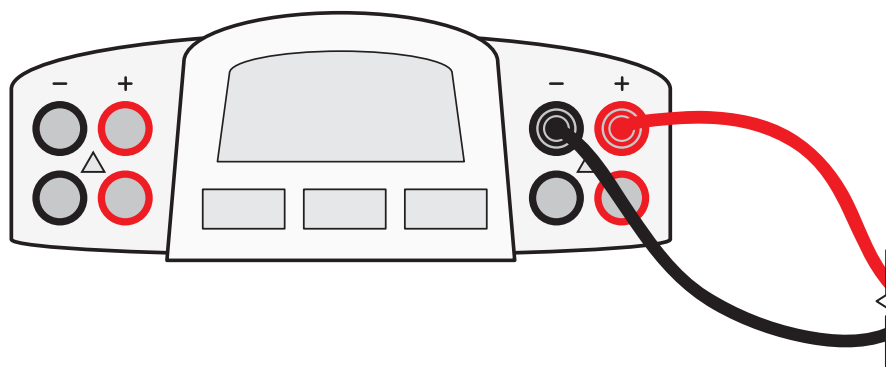
- Con una punta de pipeta nueva para cada muestra, agrega 10.0 μl de EA, 10.0 μl de R- y 10.0 μl de R+ en los pozos designados. Haz lo siguiente para cada muestra:
 - Apoya el codo en la mesa para que la mano que sostiene la pipeta quede firme. De ser necesario, usa también la otra mano para darle apoyo a la mano que sostiene la pipeta.
 - Haz descender la punta de la pipeta hasta que quede debajo de la solución amortiguadora pero inmediatamente por encima del pozo.

TÉCNICA DE LABORATORIO: No perfores el gel; de lo contrario, quedará inutilizable. Presiona suavemente el émbolo para suministrar lentamente la muestra. Para evitar que entre aire en la solución amortiguadora, no te pases de la primera posición de detención. La muestra se hundirá en el pozo.



- Luego de haber cargado todas las muestras, cierra bien la tapa de la cámara de electroforesis.
- Conecta los cables eléctricos a la fuente de energía. Conecta ambos conductores al mismo canal, con el cátodo (-) al cátodo (negro con negro) y el ánodo (+) al ánodo (rojo con rojo). Ver la **Figura 4A.4**.

Figura 4A.4: Cables de la cámara de electroforesis conectados al canal correcto en la fuente de energía



10. Enciende la fuente de energía y coloca el voltaje entre 130 y 135 V.
11. Después de dos o tres minutos, verifica para ver si el tinte de carga púrpura (azul de bromofenol) se desplaza hacia el electrodo positivo (rojo). Si se desplaza en dirección opuesta, es decir hacia el electrodo negativo (negro), revisa los cables eléctricos para ver si están conectados correctamente a la fuente de energía.



DETENTE Y PIENSA:

- La escalera de ADN sirve como patrón porque contiene una mezcla de moléculas de ADN de tamaños conocidos. Al hacer correr tus muestras y la escalera de ADN lado a lado en el gel, puedes calcular el tamaño real en pares de bases de moléculas desconocidas. El [Diagrama de escalera de ADN \(OR 4A\)](#) muestra 10 bandas de ADN de tamaños conocidos. Con esta información, ¿puedes predecir las posiciones de las bandas de ADN producidas por los posibles productos que se encuentran en los tubos R- y R+ indicando su posición en el [Diagrama de escalera de ADN](#)?
- Las muestras de ADN y la escalera de ADN no son visibles en el gel. ¿Cómo podría hacerse visible el ADN una vez terminada la electroforesis en gel?

12. Tu profesor te explicará qué hacer con el gel. Quizás no tengas tiempo suficiente para terminar la electroforesis. El tinte de carga amarillo deberá correr hasta el final del gel, entre unos 40 y 50 minutos. Luego de que el gel haya terminado de correr, será preciso teñirlo para mostrar la ubicación de los fragmentos de ADN y de los plásmidos.

PREGUNTAS DEL CAPÍTULO 4A

Analiza tu fotografía del gel y discute las siguientes preguntas con tu compañero. Prepárate para compartir tus respuestas con la clase.

1. ¿Por qué es importante verificar que tienes el plásmido recombinante correcto?
2. ¿Cómo se comparan tus resultados reales del gel con tus predicciones sobre el gel?
3. ¿Ves alguna banda que no esperabas? ¿Qué podría explicar el origen de estas bandas inesperadas?
4. ¿El gel muestra que estás usando el plásmido recombinante correcto? Describe la evidencia que usaste para hacer esta evaluación.
5. En el carril R-, ¿ves evidencia de múltiples configuraciones de plásmidos? Explica tu respuesta.
6. En el carril R+, ¿ves evidencia de digestión completa? Explica tu respuesta.
7. ¿En qué carril esperarías ver el gen *rfp* y el gen *ampR* en el gel? ¿Puedes ubicar estos dos genes? Explica tu respuesta.
8. Compara los carriles que tienen fragmentos lineales con los carriles que tienen plásmidos. ¿Hay alguna diferencia en la forma de las bandas entre estas dos formas de ADN?

GLOSARIO DEL CAPÍTULO 4A

Círculo fragmentado: Configuración de plásmido que consiste en un único plásmido que tiene un corte en una de sus dos cadenas. La forma de este plásmido es circular.

Escala de ADN: Grupo de fragmentos de ADN conocidos con diferentes tamaños en pares de bases (pb) o kilobases (kb). Estos fragmentos de ADN se separan y visualizan como bandas de ADN en un gel. En conjunto, las bandas de ADN separadas parecen una escala en el gel. Las escalas de ADN se usan en la electroforesis en gel para determinar el tamaño y la cantidad de fragmentos de ADN.

Ligación: Reacción que une químicamente dos o más fragmentos de ADN, lo que da como resultado una molécula de ADN recombinante.

Ligar: Unir dos extremos de ADN.

Ligasa de ADN: Enzima que cataliza la formación de enlaces químicos covalentes en el esqueleto azúcar-fosfato, lo que posibilita la ligación de los fragmentos de ADN.

Multímero: Configuración de plásmido que consiste en muchos plásmidos que se han enganchado durante la formación, por lo que son como eslabones en una cadena.

Superhelicoidal: Configuración de plásmido que consiste en un único plásmido que se ha enroscado. La forma de este plásmido es más *compacta* (ocupa menos espacio) que la forma circular.

Tinte de carga: Grupo de tintes que se agrega a las biomoléculas, como el ADN, para la electroforesis en gel. Si un tinte se desplaza de manera que pase la muestra, indica que es momento de dejar de hacer correr el gel.

Verificar: Establecer que algo es cierto, preciso o capaz de ser defendido.



CAPÍTULO 5A

INSERCIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN LAS BACTERIAS

INTRODUCCIÓN

La inserción de un gen en un vector plasmídico es un primer paso importante en el proceso de clonación de genes. No obstante, si el objetivo final es producir una gran cantidad de una proteína en particular, ¿cuál es tu próximo paso? El plásmido se debe multiplicar para asegurarse de que haya varias copias del gen, y el gen debe estar *expresado*; ambas actividades solo pueden tener lugar dentro de una célula. Por lo tanto, tu próximo paso en el proceso de clonación de genes es poner el plásmido recombinante dentro de bacterias de *E. coli* mediante un proceso que cambia el contenido de ADN de las bacterias denominado como transformación. En este capítulo, realizarás la transformación de bacterias *E. coli* usando el plásmido recombinante que contiene el gen *rfp*.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 5A

Al final de este capítulo, podrás hacer lo siguiente:

- Describir el papel de la transformación en el proceso de clonación de genes.
- Explicar el objetivo de cada control en el experimento de transformación.
- Explicar cómo la información codificada en un gen se expresa como un rasgo.

¿QUÉ ES LO QUE YA SABES?

Analiza las siguientes preguntas con tu compañero y anota tus ideas en la libreta. Debes estar preparado para analizar tus respuestas con la clase. No te preocupes si no sabes todas las respuestas. El análisis de estas preguntas te ayudará a pensar acerca de lo que ya sabes sobre la absorción de plásmidos y la expresión génica en las bacterias.

1. ¿Crees que la absorción bacteriana de un plásmido del ambiente es un evento común? ¿Por qué o por qué no?
2. ¿Cuáles son los pasos que tienen lugar en la transcripción y la *traducción* de un gen?
3. ¿Cuál es la relación entre los genes, las proteínas y los *rasgos* (o características observables)?
4. ¿Qué tienen en común las bacterias y los seres humanos que hace que sea posible que un gen humano se exprese en las bacterias?

TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS CON PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

Un plásmido es un vector ideal para mover secuencias de ADN de un organismo a otro. El plásmido está equipado con: (1) un promotor que permite la transcripción de genes, (2) una secuencia para el inicio de la replicación del ADN, y (3) un gen de resistencia a un antibiótico. El plásmido puede ser tomado por bacterias, donde se multiplica, y sus genes se expresan usando la maquinaria celular bacteriana. Si se ha insertado un gen de interés en el vector, la bacteria genera el producto codificado por ese gen.

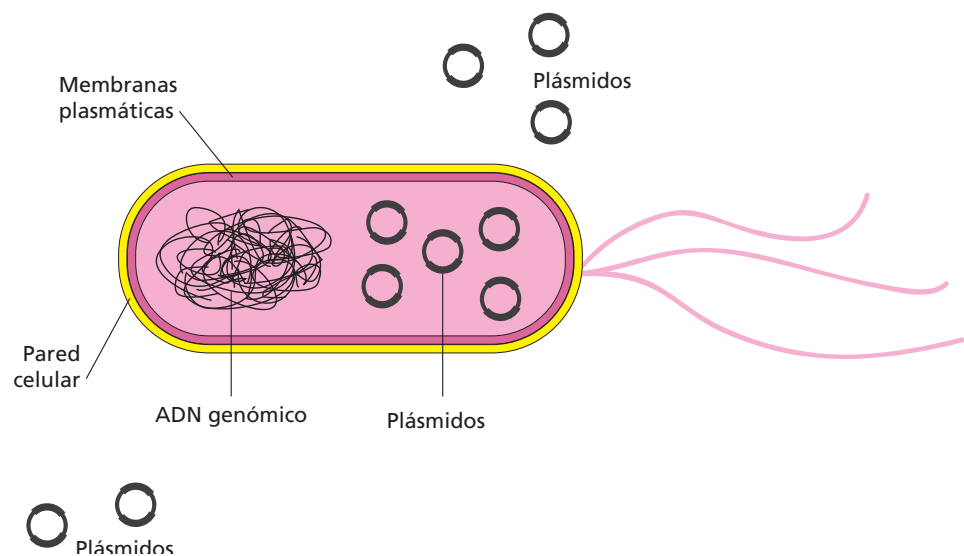


ATENCIÓN: Una vez que se ha insertado un gen en un vector, ¿qué crees que se necesita para que el producto sea codificado por el gen insertado?

TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

Una vez creado un plásmido recombinante que contiene un gen de interés, como la insulina, el plásmido puede entrar en las células bacterianas por un proceso denominado *transformación*. La **Figura 5A.1** ilustra la transformación.

Figura 5A.1: Transformación de bacterias



La absorción de ADN del ambiente de una célula bacteriana se produce con una eficacia muy baja en la naturaleza. Las bacterias *E. coli* tienen membranas plasmáticas complejas que separan el ambiente externo del ambiente interno de la célula y regulan cuidadosamente qué sustancias pueden entrar y salir de la célula. Asimismo, la pared celular tiene carga negativa y repele las moléculas de ADN con carga negativa.

ATENCIÓN: ¿Por qué es importante que las membranas de las bacterias *E. coli* regulen cuidadosamente qué sustancias pueden entrar y salir de la célula?



Con el objeto de aumentar la eficacia de la absorción de ADN, las bacterias se tratan de dos maneras. Primero, se colocan las bacterias *E. coli* en una solución que contiene iones positivos de calcio, lo que neutraliza la carga negativa de las membranas externas de las células, y permite que las moléculas de ADN crucen las membranas y entren en la célula. Luego, las bacterias se someten a un choque térmico, un aumento repentino de la temperatura, que aumenta la presión fuera de la célula. Esta diferencia de presión le permite al ADN plasmídico entrar a la célula bacteriana desde el exterior.

Se considera que las células tratadas con calcio y calor son *competentes* para tomar el ADN con más eficacia, pero incluso con este tratamiento solo alrededor de 1 en 10,000 células bacterianas toma un plásmido de su ambiente. Entonces, ¿cómo se puede identificar a las bacterias que han absorbido el plásmido recombinante? Recuerda que un componente importante de un plásmido recombinante es un gen para la resistencia a antibióticos. Si colocas células bacterianas en presencia del antibiótico, solo crecerán aquellas células que tienen el plásmido recombinante.

¿LO SABÍAS?

Absorción natural de plásmidos

Algunas cepas de bacterias intercambian plásmidos naturalmente, y esos plásmidos pueden proporcionar un gen que le da una ventaja selectiva, como la resistencia a antibióticos, a la célula. Un mecanismo para la transferencia eficaz de ADN entre especies bacterianas es la *conjugación bacteriana*, en la que el plásmido se comparte entre dos células bacterianas que están en contacto. El otro mecanismo es la transformación, en la que las bacterias absorben el ADN, incluidos los plásmidos, directamente del ambiente externo. En la naturaleza, la fuente habitual de este ADN son células que han muerto y liberado su contenido al ambiente.

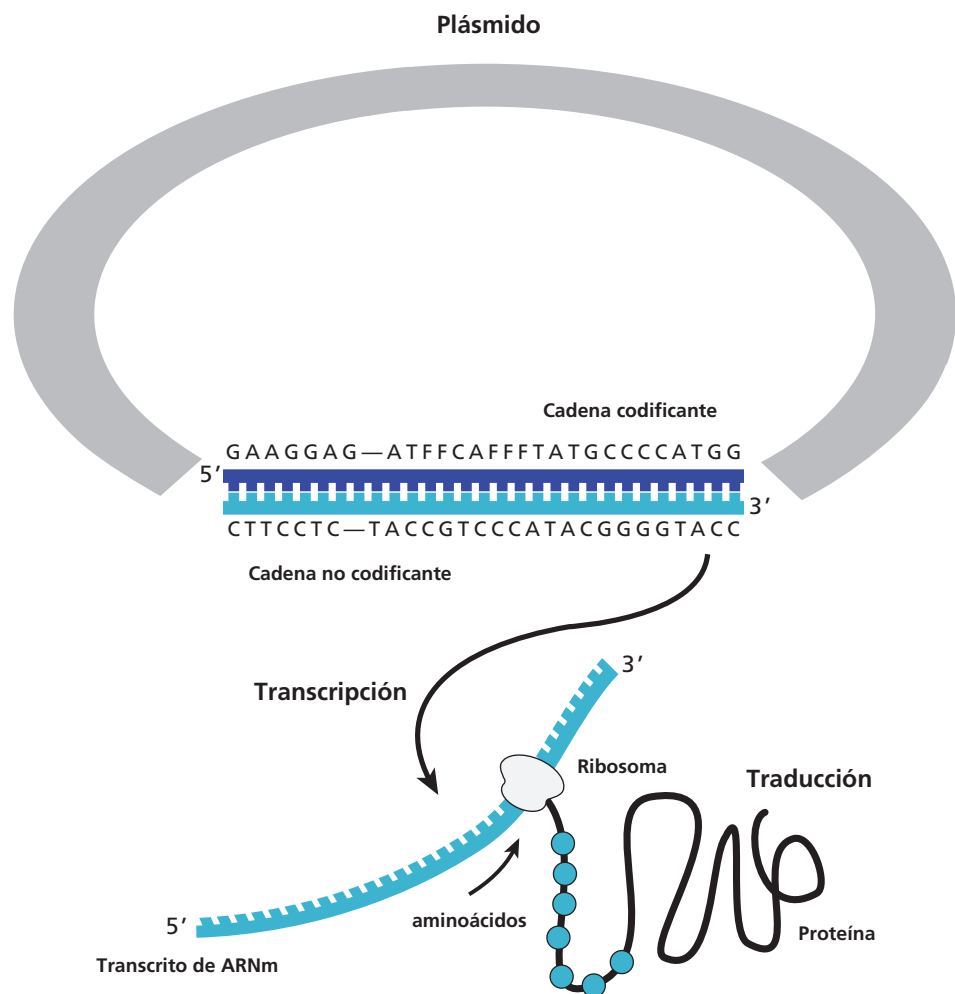
Si bien los plásmidos pueden ser ventajosos para las células bacterianas, no siempre son ventajosos para las personas. Por ejemplo, la vancomicina fue el único antibiótico eficaz contra las infecciones por *Staphylococcus aureus*. La resistencia a la vancomicina se asocia al gen *VanA*, que se lleva en un plásmido en otras especies bacterianas (como la cepa *Enterococcus faecium* [BM4147]). El intercambio de este plásmido hizo que la vancomicina sea menos eficaz contra las infecciones por estafilococos.



DEL ADN PLASMÍDICO A LA PROTEÍNA

Una vez que el plásmido recombinante ha entrado en la célula bacteriana, la polimerasa de ADN comienza la replicación en el punto *ori*, y el plásmido se multiplica usando las enzimas de la replicación del ADN bacteriano. Estas múltiples copias de plásmidos ahora pueden producir la proteína de interés, como la insulina, en cantidad. En este proceso, la información codificada en el ADN humano se transfiere del ADN a la proteína usando la maquinaria de transcripción y traducción de la célula (ver la **Figura 5A.2**). La proteína luego modifica los rasgos observables del organismo.

Figura 5A.2: Expresión genética de un plásmido en la célula bacteriana



La ingeniería genética solo es posible porque los genes de diferentes organismos se pueden expresar en las bacterias. En la Tierra, toda la vida está relacionada, y la forma en que se codifica la información en el ADN es universal. Como ya debes de saber, las proteínas están formadas por subunidades más pequeñas denominadas *aminoácidos*, y una secuencia de tres nucleótidos en el ADN codifica un solo aminoácido. Estas secuencias de tres nucleótidos se denominan *codones*. Por ejemplo, el codón TTG codifica el aminoácido triptófano, mientras que el codón AAG codifica el aminoácido lisina. En muchos casos, más de un codón puede codificar el mismo aminoácido. Por ejemplo, el AAA también es el codón para la lisina. Asimismo, hay codones informativos, como el *codón de inicio* (ATG) y el *codón de terminación* (por ejemplo, TTA), que muestran dónde comienza y termina el código para la proteína en la secuencia de ADN.

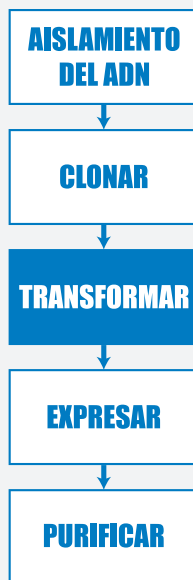
¿LO SABÍAS?

Producción de ADN a partir de ARN

Si bien el código del ADN es el mismo en todas las formas de vida, la transcripción y la traducción de genes en *eucariotas* y *procariotas* usan diferentes enzimas y estructuras. (Las células humanas son eucariotas, y las células bacterianas son procariotas). Una diferencia importante entre estas dos clases de células es que los genes en los eucariotas contienen secuencias no codificantes denominadas *intrones*. La polimerasa de ARN transcribe el gen y produce un ARN mensajero precursor grande que contiene intrones y *exones*, que son las secuencias codificantes. El ARN precursor luego se *corta y une*, lo que elimina los intrones y une los exones en el ARN mensajero maduro.

Los procariotas no pueden realizar el corte y la unión de los intrones. Para resolver este problema, los científicos usan una enzima, la *retrotranscriptasa*, que puede copiar ARN en ADN, para producir ADN complementario (ADNc) del ARN mensajero para una proteína en particular. El ADNc, que solo tiene las secuencias de exones, se inserta en el vector plasmídico. El gen clonado de la insulina humana que se usa para producir insulina se prepara de este modo.





PRÁCTICA DE LABORATORIO 5A: TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS CON EL PLÁSMIDO pARA-R

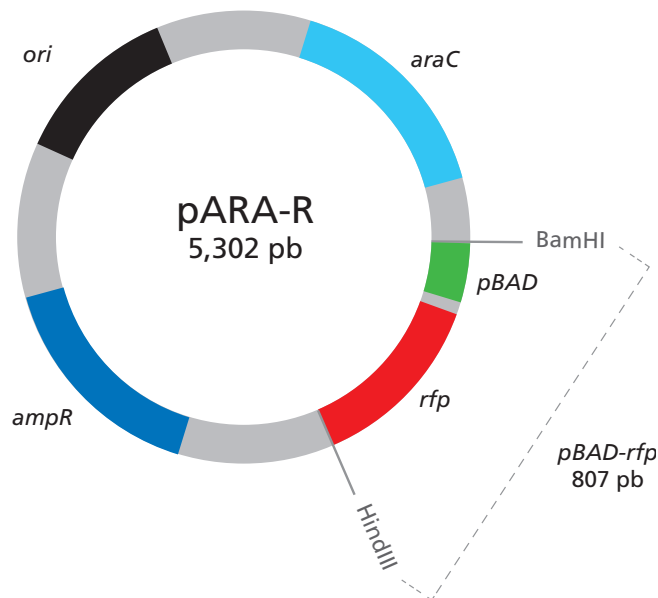
Hasta el momento, en tu misión de clonar un gen, has verificado que tienes el plásmido pARA-R que contiene el gen *rfp* que puede producir la *proteína roja fluorescente*. En esta práctica de laboratorio realizarás otro paso del proceso de clonación de genes, que es transformar las bacterias *E. coli* con este plásmido. Usando bacterias *E. coli* que han sido tratadas previamente con cloruro de calcio, dividirás las bacterias en dos grupos: un grupo control en el que no se agregan plásmidos, y un grupo experimental en el que se agrega el plásmido pARA-R. Después del choque térmico de ambos grupos de células, las cultivarás en distintas condiciones.

- El grupo control se cultiva en presencia de Luria Broth (un *medio* que soporta la proliferación bacteriana).
- El grupo control se cultiva en presencia de Luria Broth y el antibiótico ampicilina.
- El grupo experimental se cultiva en presencia de Luria Broth.
- El grupo experimental se cultiva en presencia de Luria Broth y el antibiótico ampicilina.
- El grupo experimental se cultiva en presencia de Luria Broth, ampicilina y el azúcar arabinosa.

Al examinar la proliferación de bacterias en estas condiciones, puedes verificar que tu procedimiento funcionó y puedes identificar a las bacterias que se transformaron con el plásmido pARA-R. ¿Cómo sabrás si tienes éxito en esta tarea? Las bacterias tendrán un rasgo nuevo y muy visible: Ahora producirán una proteína roja fluorescente, ¡que hace que las células sean rojas o rosas brillante!

El plásmido pARA-R, que revisaste en el capítulo 2A, se muestra nuevamente en la **Figura 5A.3**.

Figura 5A.3: Plásmido pARA-R



Los componentes relevantes de este plásmido son el gen *rfp*, el promotor (*pBAD*), el gen de resistencia a la ampicilina (*ampR*) y el gen de la proteína activadora de arabinosa (*araC*). El gen *ampR* le da resistencia al antibiótico ampicilina. (Los biotecnólogos llaman estos genes *marcadores selectivos* porque solo las bacterias que posean el gen sobrevivirán en la presencia de un antibiótico.) El gen *araC* controla al promotor. Si la arabinosa, un azúcar simple, está presente en las bacterias, la proteína activadora producida por el gen *araC* activa el promotor, que luego une a la polimerasa de ARN, y se transcribe el gen *rfp*. Las proteínas activadoras se usan en algunos plásmidos recombinantes para controlar la producción de la proteína de interés.

MATERIALES EDUCATIVOS

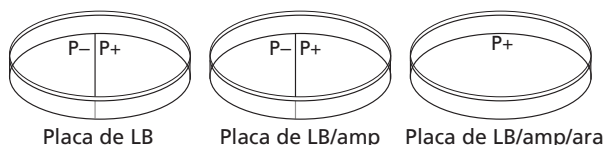
- Predicciones sobre la proliferación de bacterias (OR 5)

ANTES DE LA PRÁCTICA DE LABORATORIO

Analiza las siguientes preguntas con tu grupo, y prepárate para compartir tus respuestas con la clase.

1. La ampicilina es un antibiótico que destruye las células bacterianas interrumpiendo la formación de las paredes celulares. Sin embargo, el plásmido pARA-R tiene el gen de la resistencia a la ampicilina, lo que produce una proteína que degrada la ampicilina. ¿Cuál es el objetivo de cultivar bacterias que han sido transformadas en presencia de ampicilina?

- ¿Qué sucederá cuando las células bacterianas que contienen el plásmido pARA-R no reciban arabinosa?
- En la práctica de laboratorio, agregarás muestras del grupo de control P- y del grupo de tratamiento P+ en placas con diversas combinaciones de Luria Broth (LB), ampicilina y el azúcar arabinosa. Las placas se ordenarán del siguiente modo:



Usando la clave en **Predicciones sobre la proliferación de bacterias (OR 5)**, muestra tus predicciones para la proliferación que esperarías para cada combinación. Luego completa la **Tabla 1** y la **Tabla 2** del material didáctico detallando las conclusiones a las que se puede llegar si la proliferación prevista se produce o no.

- Lee toda la sección Métodos en las páginas C-46 a C-50, y describe brevemente los pasos con palabras y un diagrama de flujo.



SEGURIDAD: Se deben seguir todas las precauciones de seguridad adecuadas y usar el atuendo requerido en un laboratorio de ciencias. Consulta las indicaciones de tu profesor.



SEGURIDAD: Ten cuidado al manipular bacterias *E. coli* y usa una *técnica aséptica*.

La técnica aséptica es un conjunto de procedimientos que asegura la protección del personal de laboratorio y de la muestra bacteriana, lo cual es necesario para que el experimento sea exitoso. Específicamente:

- No toques nada que haya estado o vaya a estar en contacto con las bacterias *E. coli*. Los alumnos que manipulen elementos que entren en contacto con las bacterias deben usar guantes.
- Trata de evitar derrames o la contaminación de superficies con cualquier cosa que haya estado en contacto con bacterias *E. coli*. Avisa de inmediato a tu profesor si se produce un derrame o contaminación.
- Cuando hayas terminado de usar los tubos de microcentrífuga, las puntas de las pipetas y los esparcidores de células, colócalos de inmediato en la bolsa para residuos con riesgo biológico o recipiente para residuos, según las indicaciones de tu profesor.
- Cuando te lo indiquen, coloca tus placas Petri de vuelta en las bolsas originales y después en la bolsa para residuos con riesgo biológico.
- Lávate bien las manos con jabón después de finalizar la práctica de laboratorio.

MATERIALES

Reactivos

- Una gradilla con lo siguiente:
 - Tubo de microcentrífuga de plásmido pARA-R (PR-5)
 - Tubo de microcentrífuga de Luria Broth (LB)
- Tubo de microcentrífuga de 100 µl de células de *E. coli* competentes refrigeradas (CC)

NOTA: El tubo CC se debe mantener con hielo en todo momento.

- 3 placas Petri con agar:
 - 1 de LB
 - 1 de LB/amp
 - 1 de LB/amp/ara

Equipo y suministros

- Taza de poliestireno con hielo picado

NOTA: Llena una taza con parte del hielo picado del recipiente que tiene los tubos CC antes de tomar uno de estos tubos. Deberás mantener el tubo CC en hielo, en todo momento.

- 2 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Marcador permanente
- Guantes desechables
- Micropipeta P-20
- Micropipeta P-200
- Caja de puntas de pipeta desechables
- Paquete de esparcidores de células (se compartirán entre los grupos)
- Baño María a 42 °C con gradilla flotante para tubos de microcentrífuga (se compartirá entre todos los grupos)
- Cronómetro o reloj (se compartirá entre todos los grupos)
- Cinta adhesiva (se compartirá entre todos los grupos)
- Incubadora a 37 °C (se compartirá entre todos los grupos)
- Bolsa para residuos con riesgo biológico para materiales que entren en contacto con las células de *E. coli* (se compartirá entre los grupos)
- Recipiente para residuos (se compartirá entre los grupos)

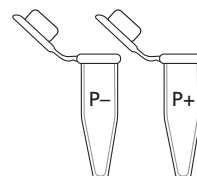
MÉTODOS



1. Revisa la gradilla para asegurarte de que tengas los reactivos nombrados.
2. Obtén un tubo CC y colócalo en una taza de poliestireno con hielo.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Las células competentes de esta práctica de laboratorio deben mantenerse frías; asegúrate de sostener los tubos de microcentrifuga por el borde superior para evitar transmitirles calor a las células.

3. Rotula dos tubos de microcentrifuga limpios como "P–" y "P+".
4. Coloca los tubos P– y P+ en la taza de poliestireno con hielo, junto con el tubo CC.



TÉCNICA DE LABORATORIO: La transformación bacteriana requiere técnicas estériles. Es esencial seguir estas indicaciones con precisión.

5. Con la micropipeta grande P-200, agrega las células competentes del tubo CC en los tubos P– y P+:
 - a. Fija la micropipeta P-200 en 50 µl.
 - b. Con cuidado, vuelve a suspender las células bacterianas en el tubo CC aspirando y descargando la solución suavemente con la pipeta dos veces.
 - c. Agrega 50 µl de CC en cada uno de los tubos vacíos refrigerados (P– y P+), sosteniendo cada tubo por el borde para mantener el frío, y vuelve a colocar cada tubo rápidamente en el hielo.



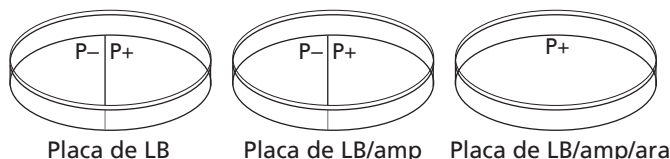
TÉCNICA DE LABORATORIO: Para evitar la contaminación, asegúrate de usar una punta de micropipeta nueva para cada solución que agregues.

6. Con la pipeta P-20, agrega 10.0 µl del plásmido recombinante (PR-5) en el tubo rotulado "P+":
 - a. Fija la micropipeta P-20 en 10.0 µl.
 - b. Sostén el tubo P+ refrigerado por el borde superior y agrega 10.0 µl de PR-5. Mezcla las soluciones aspirando y descargando los líquidos con la pipeta dos veces, y vuelve a colocar el tubo P+ en el hielo.
7. Mantén los tubos P– y P+ en el hielo durante 15 minutos.

NOTA: Durante el intervalo de 15 minutos, comparte y analiza tus respuestas a la pregunta 3 en la sección antes de la práctica de laboratorio.
8. Mientras las células están en el hielo, prepara tus tres placas Petri con agar: una con LB, otra con LB/amp y la última con LB/amp/ara:
 - a. Rotula la parte inferior de cada placa (la parte que contiene el agar) con

tu número de grupo y período de clase. Escribe en letra pequeña en el borde de la placa.

- b. Con las placas cerradas, traza una línea en la placa de LB y en la placa de LB/amp que divida cada placa por la mitad. Rotula la mitad de cada placa con "P–" y la otra mitad con "P+". Rotula la placa de LB/amp/ara con "P+". Las placas se ordenarán del siguiente modo:



9. Luego de la incubación de 15 minutos en hielo, lleva los tubos P– y P+ (en la taza de hielo) al baño María de 42 °C. Coloca los dos tubos de la gradilla flotante para tubos de microcentrífuga en el baño María durante exactamente 45 segundos.
10. Después del choque térmico de 45 segundos, vuelve a colocar los tubos de inmediato en el hielo y déjalos allí durante al menos un minuto.
11. Con la micropipeta grande P-200, agrega LB en los tubos P– y P+:
 - a. Fija la micropipeta P-200 en 150 µl.
 - b. Agrega 150 µl de LB en el tubo P–. Tapa el tubo y muévelo rápidamente con suavidad, dos o tres veces, para mezclar.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Para evitar la contaminación, asegúrate de usar una punta de micropipeta nueva para cada solución que agregues.

- c. Agrega 150 µl de LB en el tubo P+. Tapa el tubo y muévelo rápidamente con suavidad, dos o tres veces, para mezclar.
12. Si el tiempo lo permite, deja incubar las células de los tubos P– y P+ a temperatura ambiente durante 15 minutos.

DETENTE Y PIENSA:

- ¿De qué manera el cultivo de bacterias P+ se trata de forma diferente del cultivo de bacterias P–? (Un *cultivo* es una población aislada de células). ¿Cuál es el objetivo del cultivo de bacterias P–?
- ¿Por qué las células necesitan tiempo para recuperarse después del choque térmico?
- ¿Por qué las células se incuban a 37°C?
- En esta práctica de laboratorio usarás una técnica aséptica. ¿Por qué es importante esto?



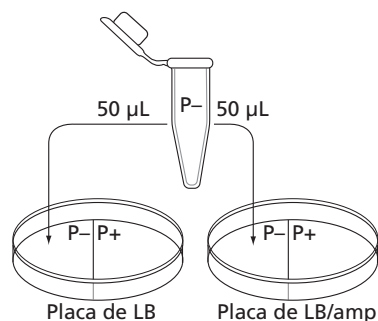


13. Agrega células del tubo P- en tus placas de LB y LB/amp:

- Fija la micropipeta P-200 en 50 μ L.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Para evitar la contaminación, asegúrate de usar una punta de micropipeta nueva para cada solución que agregues.

- Aspira y descarga suavemente la solución del tubo P- con la pipeta dos o tres veces para dejar las células en suspensión, y carga 50 μ L de células P-.
- Abre la tapa de la placa de LB, como una "almeja", y agrega 50 μ L de células del tubo P- en la sección marcada "P-". Cierra la tapa.



- Nuevamente, aspira y descarga suavemente la solución del tubo P- con la pipeta dos o tres veces para dejar las células en suspensión, y carga 50 μ L de células P-.
- Abre la tapa de la placa de LB/amp, como una almeja, y agrega 50 μ L de células del tubo P- en la sección marcada "P-". Cierra la tapa.

14. Esparce las células del tubo P- en tus placas de LB y LB/amp:

- Abre el paquete de esparcidores estériles de células por el extremo más cercano al mango. Retira solo un esparcidor y cierra el paquete para mantener la esterilidad de los demás.
- Abre la tapa de la placa de LB, como una almeja, y esparce las células de forma pareja en todo el lado P- de la placa, moviendo suavemente el esparcidor por la superficie de agar. (Mantén las células en el lado P- de la placa). Cierra la tapa.
- Esparce cuidadosamente las células P- en la placa de LB/amp con el mismo esparcidor y la misma técnica.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Sostén el esparcidor por el mango y no permitas que el extremo doblado toque ninguna superficie, ya que esto contaminará el esparcidor. Coloca el esparcidor usado en la bolsa para residuos con riesgo biológico.

15. Agrega células del tubo P+ en tus placas de LB y LB/amp:

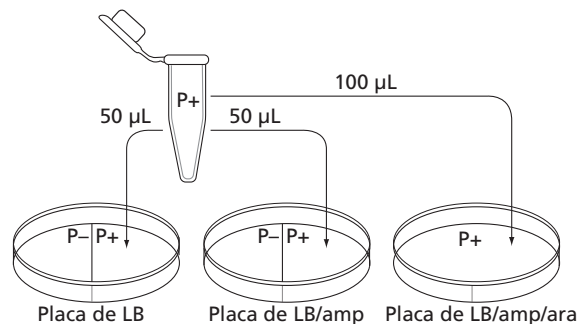
- Asegúrate de que la micropipeta P-200 esté en 50 μ L.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Para evitar la contaminación, asegúrate de usar una punta de micropipeta nueva para cada solución que agregues.=

- Aspira y descarga suavemente la solución del tubo P+ con la pipeta dos o tres veces para dejar las células en suspensión, y carga 50 μ L de células P+.
- Abre la tapa de la placa de LB, como una almeja, y agrega 50 μ L de células del tubo P+ en la sección marcada "P+". Cierra la tapa.

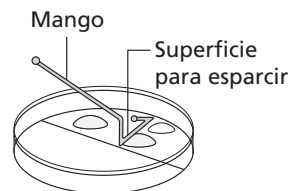


- d. Nuevamente, aspira y descarga suavemente la solución del tubo P+ con la pipeta dos o tres veces para dejar las células en suspensión, y carga 50 μ l de células P+.
- e. Abre la tapa de la placa de LB/amp, como una almeja, y agrega 50 μ l de células del tubo P+ en la sección marcada "P+". Cierra la tapa.
- f. Fija la micropipeta P-200 en 100 μ l, aspira y descarga suavemente la solución del tubo P+ con la pipeta dos o tres veces, y carga 100 μ l de células P+.
- g. Abre la tapa de la placa LB/amp/ara, como una almeja, y agrega 100 μ l de células P+ en diversas zonas en toda la superficie, no simplemente en un solo lugar. Cierra la tapa.



16. Esparce las células del tubo P+ en tus placas de LB y LB/amp:

- a. Abre el paquete de esparcidores estériles de células por el extremo más cercano al mango. Retira solo un esparcidor y cierra el paquete para mantener la esterilidad de los demás.
- b. Abre la tapa de la placa de LB, como una almeja, y esparce las células de forma pareja en el lado P+ de la placa (y solo de este lado), moviendo suavemente el esparcidor por la superficie de agar. Cierra la tapa.
- c. Esparce cuidadosamente las células P+ en la placa de LB/amp con el mismo esparcidor y la misma técnica.
- d. Esparce cuidadosamente las células P+ en la placa LB/amp/ara con el mismo esparcidor y la misma técnica. Luego gira suavemente la placa debajo del esparcidor de P+ para que las células se puedan esparcir por toda la superficie de esta placa. Cierra la tapa.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Sostén el esparcidor por el mango y no permitas que el extremo doblado toque ninguna superficie, ya que esto contaminará el esparcidor. Coloca el esparcidor usado en la bolsa para residuos con riesgo biológico.



17. Deja las tres placas boca arriba durante cinco minutos.
18. Con la cinta adhesiva proporcionada, pega las tres placas juntas y rotúlalas con tu número de grupo y período de clase.
19. Coloca las placas en la incubadora a 37 °C boca abajo para evitar que la condensación gotee sobre el medio.
20. Coloca todos los tubos de microcentrífuga, las puntas de las pipetas y los esparcidores de células en la bolsa para residuos con riesgo biológico.
21. Incuba las placas durante 24 a 36 horas a 37 °C.
22. Examina las placas y registra en tu libreta la proliferación que observas en cada mitad.
23. Cuando te lo indiquen, desecha las placas Petri en la bolsa para residuos con riesgo biológico.

PREGUNTAS DEL CAPÍTULO 5A

1. Observa los resultados de tu transformación. ¿Tus resultados reales coinciden con tus resultados previstos? De no ser así, ¿qué diferencias ves, y cuáles son algunas explicaciones para estas diferencias?
2. ¿Cuántas colonias rojas había en tu placa de LB/amp/ara?
3. ¿Por qué las colonias rojas solo aparecen en la placa de LB/amp/ara y no en la placa de LB/amp?
4. Los plásmidos recombinantes se manipulan para que se puedan multiplicar en la célula, independientemente de la replicación cromosómica. ¿Por qué es importante tener varias copias de un plásmido recombinante dentro de una célula?
5. ¿Cómo se expresa como un rasgo la información codificada en el gen *rfp*? Asegúrate de usar lo que has aprendido anteriormente sobre la expresión genética y la relación entre el ADN, el ARN, las proteínas y los rasgos.
6. ¿Por qué las bacterias pueden producir una proteína humana, como la insulina, o una proteína de la anémona marina, como el tinte rojo fluorescente?



¿LO SABÍAS?

Sobre la conexión entre los genes y las proteínas

¿De qué forma los científicos pudieron demostrar que un gen codifica una proteína? En 1941, George Beadle y Edward Tatum realizaron un experimento en el que expusieron moho de pan a irradiación UV, un procedimiento que se sabía que provocaba *mutaciones* (cambios) en los genes. Beadle y Tatum crearon varias cepas mutantes de moho que habían perdido la capacidad de sintetizar una vitamina necesaria. En la síntesis vitamínica, la vitamina es la molécula final de una vía en la que una serie de reacciones crea un conjunto correspondiente de moléculas precursoras, y cada reacción está catalizada por una enzima (una proteína). Al suministrar los precursores de la vitamina B6 individualmente a la cepa mutante que no podía producir esa vitamina, Beadle y Tatum pudieron determinar que al mutante solo le faltaba una sola enzima que catalizaba una reacción.

Beadle y Tatum luego investigaron si un gen solo causaba la pérdida de la única enzima por cruces genéticos entre la cepa mutante que no podía sintetizar la vitamina B6 y una cepa natural. Luego de cultivar la descendencia, descubrieron que la mitad tenía el mismo defecto que la cepa mutante progenitora y la mitad no, lo que confirmaba que había mutado un solo gen. Con estos resultados, Beadle y Tatum propusieron que los genes eran responsables de codificar las proteínas de un organismo, y que un cambio en un gen podría producir una proteína defectuosa, lo que a su vez podría afectar los rasgos de ese organismo. En 1958, Beadle y Tatum recibieron el premio Nobel por este trabajo.

GLOSARIO DEL CAPÍTULO 5A

Aminoácido: Componente básico de las proteínas. Existen 20 aminoácidos. Cada aminoácido es una sustancia orgánica que tiene dos grupos adheridos: un grupo amino (NH_2) y un grupo carboxilo (COOH).

Codón: Grupo de tres bases de ARNm que codifican un solo aminoácido.

Codón de inicio: Primer codón de ARNm traducido por un ribosoma; normalmente AUG o GUG.

Codón de terminación: Triplete de nucleótidos dentro del ARNm que señala la terminación de la traducción.

Competencia: Capacidad de una célula para ser transformada genéticamente tomando ADN del ambiente.

Conjugación bacteriana: Proceso por el cual se unen dos células bacterianas y transfieren el material genético de una a otra.

Corte y unión de ARN: Modificación del ARN mensajero en la que se eliminan los intrones y se unen los exones.

Cultivo: Población aislada de células que se han cultivado en un medio nutritivo especialmente preparado.

Eucariota: Organismo que alberga sus genes dentro de un núcleo y tiene varios cromosomas lineales.

Exón: Segmento de un gen que codifica una proteína. Los exones se transcriben y traducen.

Expresión: Proceso por el cual la información codificada en un gen se convierte primero en ARN mensajero y luego en una proteína.

Intrón: Segmento de un gen que no codifica una proteína. Los intrones se transcriben en el ARNm pero se eliminan antes de que los intrones (el resto del gen) se traduzcan en una proteína.

Marcador selectivo: Gen en un plásmido que se introduce en una célula junto con un gen de interés que se clonará. Los marcadores selectivos permiten a los científicos saber si el plásmido ha sido tomado por la célula, ya que el marcador se puede ver o detectar. Un marcador selectivo común es el gen de resistencia a antibióticos: solo las bacterias que tienen el gen sobrevivirán ante el antibiótico.

Medio: Solución que contiene sustancias que promueven la proliferación de microorganismos. El medio puede solidificarse añadiendo agar. Luria Broth es un ejemplo de un medio.

Mutación: Cambio o daño que se produce en una sección del ADN que modifica los productos o procesos asociados con esa sección.

Procariota: Célula u organismo con un solo cromosoma y sin membrana nuclear. Las bacterias son procariotas.

Proteína roja fluorescente: Proteína codificada por el gen *rfp*. La proteína roja fluorescente es una molécula que tiene un tamaño aproximado de 238 aminoácidos. Cuando se expresa en células bacterianas, las células se ven de color rojo o rosa brillante.

Rasgo: Característica determinada genéticamente. El ADN codifica las proteínas, lo que determina los rasgos.

Retrotranscriptasa: Enzima que cataliza la formación de ADN a partir de una plantilla de ARN en la retrotranscripción.

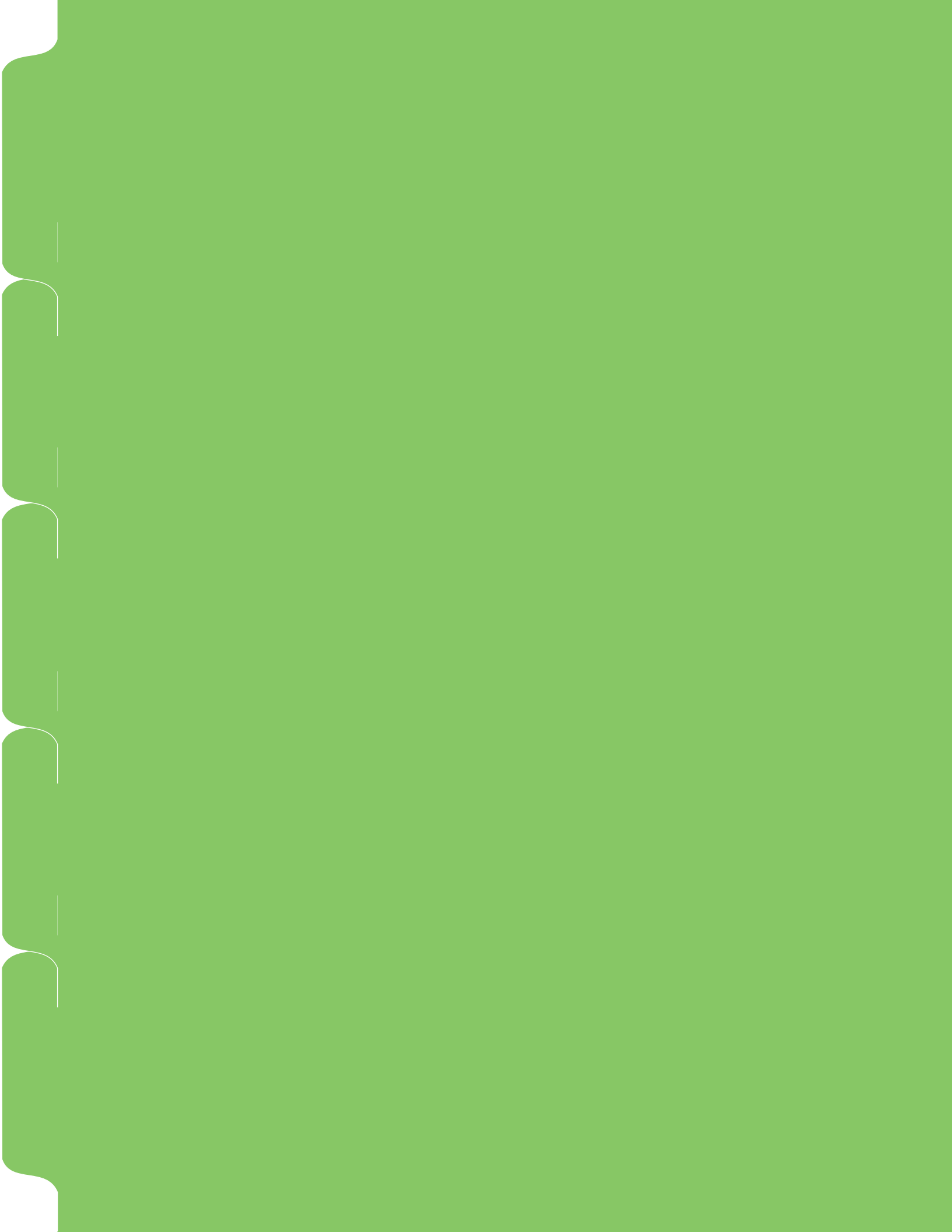
Técnica aséptica: Conjunto de procedimientos y condiciones cuidadosamente controladas para evitar la contaminación por patógenos.

Traducción: Proceso por el cual la información codificada en el ARN mensajero se decodifica y transforma en proteína.

Transformación: Proceso que coloca el ADN extraño, como un plásmido, dentro de una célula.

Experiencia de Biotecnología Amgen

Descubrimiento científico para el salón de clase





CAPÍTULO 5B

INSERCIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN BACTERIAS

INTRODUCCIÓN

En el Capítulo 1 pudiste trabajar con dos herramientas físicas y técnicas de ingeniería genética que se usan para clonar un gen: la micropipeta y la electroforesis en gel. Otras dos herramientas importantes de ingeniería genética son los *plásmidos* y las enzimas de restricción, que son biomoléculas que se encuentran en muchas bacterias. Estas herramientas les permiten a los científicos crear un *vector*, un vehículo para llevar secuencias de ADN de un organismo a otro. Este vector es un plásmido recombinante, una pequeña porción de ADN circular que contiene un gen. Una vez que el plásmido ha sido tomado por las bacterias *E. coli* mediante un proceso denominado transformación, el plásmido se puede multiplicar (copiarse) y su gen se puede *expresar* (se puede crear la proteína) usando la maquinaria de síntesis de proteínas de la célula bacteriana. En este capítulo realizarás un modelo de cómo se produce un plásmido recombinante, y luego practicarás las habilidades de laboratorio que aprendiste en el capítulo 1 al realizar la transformación de bacterias *E. coli* usando un plásmido recombinante que contiene el gen *rfp*.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 5B

Al final de este capítulo, podrás hacer lo siguiente:

- Describir las características de los plásmidos.
- Explicar cómo usar las enzimas de restricción para crear un plásmido recombinante.
- Describir el papel de la transformación en el proceso de clonación de genes.
- Explicar el objetivo de cada control en el experimento de transformación.
- Explicar cómo la información codificada en un gen se expresa como un rasgo.

¿QUÉ ES LO QUE YA SABES?

Analiza las siguientes preguntas con tu compañero y anota tus ideas en la libreta. Debes estar preparado para analizar tus respuestas con la clase. No te preocupes si no sabes todas las respuestas. El análisis de estas preguntas te ayudará a pensar sobre lo que ya sabes acerca del ADN, los plásmidos, las enzimas de restricción, la absorción de plásmidos y la expresión de los genes en las bacterias.

1. Todos los organismos vivos contienen ADN. ¿De qué maneras el ADN de distintos organismos es el mismo, y de qué maneras varía?
2. Como se detalla en la Introducción al programa, los científicos usan dos herramientas biológicas para manipular organismos para que produzcan proteínas nuevas: plásmidos y enzimas de restricción. ¿Qué recuerdas sobre cómo se usan estas herramientas?

3. ¿Cuál es la relación entre los genes, las proteínas y los rasgos (o características observables)?
4. ¿Qué tienen en común las bacterias y los seres humanos que hace que sea posible que un gen humano se exprese en las bacterias?

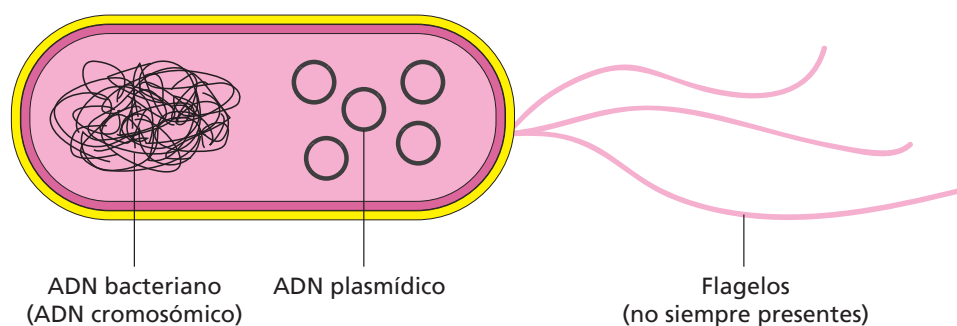
PLÁSMIDOS Y ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

El descubrimiento de los plásmidos y las enzimas de restricción en las bacterias es un ejemplo clásico de cómo los hallazgos de una investigación básica pueden revolucionar una disciplina. Sin el descubrimiento de estas biomoléculas, quizás nunca se hubieran producido los grandes avances en la comprensión de los procesos fundamentales de la vida y en el desarrollo de productos que salvan vidas.

PLÁSMIDOS

Muchos tipos diferentes de bacterias tienen dos formas de ADN: (1) un solo cromosoma compuesto por una molécula grande de ADN que contiene toda la información que necesita el organismo para sobrevivir y reproducirse; y (2) plásmidos, que son pequeñas moléculas circulares de ADN, con un tamaño que varía de 1,000 a 200,000 *pares de bases* (dos bases nitrogenadas unidas para conectar cadenas complementarias de ADN) que se encuentran en diversas copias separadas del ADN cromosómico (ver la **Figura 5B.1**). Algunas bacterias tienen hasta 500 plásmidos en cada célula.

Figura 5B.1: ADN en células bacterianas

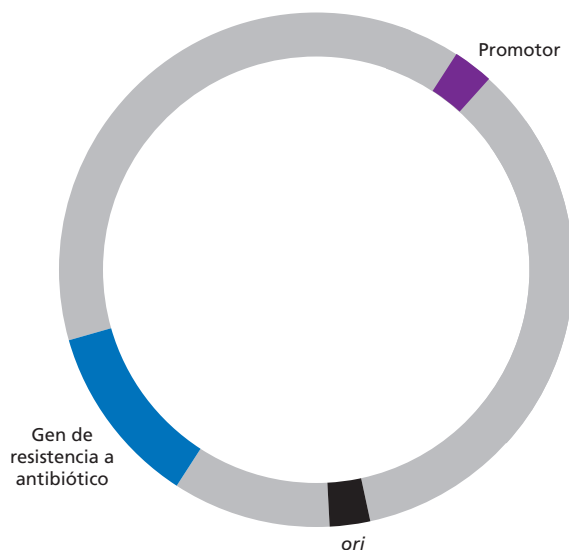


Hay varias características de los plásmidos que hacen que sean vectores ideales para la ingeniería genética, por ejemplo:

- La capacidad de multiplicarse, es decir, de hacer copias de sí mismo independientemente del cromosoma bacteriano. Para hacer esto, los plásmidos tienen una secuencia específica donde las enzimas de la síntesis del ADN en la célula hospedera se unen y comienzan la *replicación del ADN* (proceso biológico que se produce en todos los organismos vivos para hacer copias de su ADN). Esta secuencia se denomina punto *ori* (*origen de la replicación*).
- La capacidad de iniciar la *transcripción* (proceso por el cual la información codificada en el ADN se transfiere al *ARN mensajero* usando la *polimerasa de ARN* de la célula hospedera). Esta capacidad requiere otra secuencia específica, denominada secuencia *promotora*. La polimerasa de ARN se une a la secuencia promotora; aquí es donde comienza la transcripción. Todos los genes tienen secuencias promotoras ubicadas junto a ellos en el ADN. Para que los genes, como el gen de la insulina, se expresen en las bacterias es necesario colocarlos próximos al promotor en el plásmido.
- La presencia de uno o varios genes que codifican para la resistencia a los *antibióticos*, una clase de compuestos que destruyen los microorganismos o inhiben su multiplicación. Estos genes codifican proteínas que inhiben la acción de antibióticos secretados por microorganismos, y pueden otorgar una ventaja selectiva natural para las bacterias que contienen plásmidos, en una población microbiana donde las bacterias compiten por sobrevivir.

La **Figura 5B.2** ilustra algunas de las características de los plásmidos que hacen que sean vectores ideales para la ingeniería genética.

Figura 5B.2: Vector plasmídico



Los componentes básicos de un plásmido son el punto *ori* para el inicio de la replicación del ADN, un promotor para el inicio de la transcripción y un gen para la *resistencia a antibióticos* (estado en que las bacterias ya no son sensibles a un antibiótico, y seguirán multiplicándose y dividiéndose en presencia del antibiótico).

Los plásmidos con los que trabajarás en esta práctica de laboratorio y en la siguiente contienen el gen para la resistencia al antibiótico ampicilina. Este gen produce proteínas que inactivan el antibiótico al modificar químicamente su estructura.



ATENCIÓN: Usa lo que sabes sobre la selección natural y la evolución para describir cómo los plásmidos podrían otorgar una ventaja selectiva a sus bacterias hospederas.

Una cuarta característica de los plásmidos que es clave para la ingeniería genética es que se pueden trasladar de una cepa bacteriana a otra en un proceso denominado *conjugación bacteriana*, que permite que las bacterias compartan e intercambien información genética. Cuando un plásmido con un gen para la resistencia a antibióticos es tomado por bacterias que no tienen ese plásmido, las bacterias se volverán entonces resistentes a ese antibiótico específico. En la naturaleza, la conjugación se produce con una eficacia muy baja. Es decir, solo un pequeño porcentaje de bacterias en una población puede tomar ADN plasmídico en cualquier momento dado. La presencia de un gen de resistencia al antibiótico en el vector plasmídico nos permite identificar el pequeño porcentaje de bacterias que tomaron el plásmido. El antibiótico destruirá las bacterias que no tomaron el plásmido. Aquellas que tienen el plásmido con el gen de interés sobrevivirán y crecerán.

Al desarrollar técnicas para clonar genes en las bacterias, los científicos encontraron una herramienta poderosa en los plásmidos (un vector que puede ser tomado por bacterias, que se multiplica en las bacterias para producir varias copias de sí mismo, que tiene una secuencia promotora para la transcripción de un gen insertado, y que lleva un gen para la resistencia a antibióticos. Aprovecharás estas características de los plásmidos al transferir tu plásmido recombinante a las bacterias.

Una vez que los científicos reconocieron el poder de los plásmidos como posibles vectores, el siguiente desafío fue determinar cómo incorporar un gen de interés externo, como el gen de la insulina, en el ADN plasmídico.

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

A principios de la década de 1950, los científicos observaron que ciertas cepas de *E. coli*, una bacteria común que se encuentra en el intestino humano, eran resistentes a la infección por *bacteriófagos* (virus que infectan las bacterias inyectando su ADN en la célula y ordenándole a los procesos moleculares de la célula hospedera que produzcan más bacteriófagos). La investigación de

este “sistema inmune” primitivo llevó al descubrimiento de las *enzimas de restricción*, proteínas que restringían el crecimiento del bacteriófago mediante el reconocimiento y la destrucción del ADN del bacteriófago sin dañar el ADN hospedero (bacteriano). Los estudios posteriores demostraron que las enzimas de restricción de diferentes cepas de bacterias cortaban ADN en secuencias específicas, que se denominaban *sitios de reconocimiento*.

ATENCIÓN: ¿Cómo evitan cortar su propio ADN las bacterias que llevan una enzima de restricción?



La **Tabla 5B.1** proporciona ejemplos de enzimas de restricción aisladas de diferentes cepas de bacterias y las secuencias de ADN que cortan. En los ejemplos que se muestran, las enzimas cortan en forma asimétrica en las cadenas de ADN y dejan secuencias salientes de una cadena en el punto de corte. Por ejemplo, un corte (o *digestión*) con EcoRI dejará un extremo saliente AATT (o “*extremo cohesivo*”) en una cadena y un extremo cohesivo TTAA en la otra cadena.

Tabla 5B.1: Enzimas de restricción usadas en esta práctica de laboratorio

Fuente	Enzima de restricción	Sitio de reconocimiento
<i>Escherichia coli</i>	EcoRI	5' GAATTC 3' 3' CTTAAG 5' ↓ ↑
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	BamHI	5' GGATCC 3' 3' CCTAGG 5' ↓ ↑
<i>Haemophilus influenzae</i>	HindIII	5' AAGCTT 3' 3' TTCGAA 5' ↓ ↑

Los símbolos ↑ y ↓ indican dónde se corta el ADN.

ATENCIÓN:

- ¿Cuál es la secuencia del terminal cohesivo que queda cuando el ADN se corta con BamHI? ¿Y con HindIII?
- Los científicos pueden modificar los plásmidos para que tengan un solo sitio de corte de enzimas de restricción. Imagina que tienes un plásmido con un solo sitio de EcoRI. Dibuja la estructura del plásmido después de haber sido cortado con la enzima, y muestra las secuencias de nucleótidos que quedan en el punto de corte. Si quisieras insertar un gen de una planta en este lugar, ¿qué enzima usarías para cortar el ADN de la planta? Explica tu respuesta.





¿LO SABÍAS?

La aparición de bacterias resistentes a antibióticos

Los antibióticos y otros fármacos similares se han usado durante los últimos 70 años para tratar a los pacientes que tienen enfermedades infecciosas. Al ser recetados y tomados en forma correcta, los antibióticos son sumamente valiosos para el tratamiento del paciente. Sin embargo, estos fármacos se han usado tanto y durante tanto tiempo que los organismos infecciosos que los antibióticos deben destruir se han adaptado a ellos, reduciendo la eficacia de dichos fármacos. La resistencia a antibióticos se produce cuando ciertas bacterias en una población pueden sobrevivir al ser expuestas a uno o más antibióticos. Las especies que se han vuelto resistentes provocan infecciones que no se pueden tratar con los antibióticos convencionales, ni en las dosis y concentraciones



habituales. Algunas han desarrollado resistencia a varios antibióticos y se han apodado bacterias resistentes a múltiples fármacos o "bacterias superresistentes".

La resistencia a antibióticos es un fenómeno grave de continuo crecimiento que ha surgido como una de

las grandes preocupaciones para la salud pública del siglo XXI. Es posible que los organismos resistentes a fármacos hayan adquirido resistencia a los antibióticos de primera línea, lo que requiere el uso de fármacos de segunda línea. Normalmente, el fármaco de primera línea se selecciona teniendo en cuenta varias ventajas, como la seguridad, la disponibilidad y el costo. El fármaco de segunda línea habitualmente tiene un espectro más amplio, puede ser menos beneficioso en relación con los riesgos asociados y puede ser más costoso o tener menos disponibilidad.

CLONAR ESE GEN

Ahora ya conoces dos herramientas biológicas para la clonación de un gen:

1. Un plásmido que tiene varias características importantes:
 - Uno o varios sitios de enzimas de restricción que abren el círculo plasmídico y permiten la inserción del gen de interés en el ADN plasmídico.
 - Una secuencia para el inicio de la replicación de ADN, denominada punto *ori*, que permite que el plásmido se multiplique en las bacterias usando las enzimas de la síntesis del ADN hospedero.
 - Una secuencia promotora para iniciar la transcripción del gen insertado.
 - Un gen que codifica una proteína para la resistencia a antibióticos, que permite la identificación de bacterias que han tomado el plásmido.
2. Enzimas de restricción para la digestión del plásmido y del ADN humano que contiene el gen de interés (como la insulina) que se clonará.

¿Cómo usan los científicos estas dos herramientas para crear un plásmido recombinante, que contiene el gen de la insulina (o cualquier otro gen de interés) insertado en un plásmido bacteriano? Un paso importante es elegir una o varias enzimas de restricción que corten el plásmido y el ADN humano. Las enzimas de restricción deben hacer todo lo siguiente:

- Cortar el plásmido en uno o varios puntos que permitan la inserción del nuevo gen.
- Cortar el plásmido en un punto adecuado para asegurar que no se altere ningún gen ni secuencia importante, lo que incluye el punto *ori*, el promotor y al menos uno de los genes que codifican resistencia a antibióticos.
- Cortar el plásmido cerca del promotor para que el gen insertado se pueda expresar.
- Cortar el ADN humano lo más cerca posible de los dos extremos del gen de interés, para que se pueda insertar en el punto adecuado en el ADN plasmídico, sin cortar dentro del gen.

DETENTE Y PIENSA: ¿Por qué es importante usar las mismas enzimas para cortar tanto el plásmido como el gen de interés del ADN humano?



En esta actividad, harás un modelo en papel del plásmido recombinante que contiene un gen de la insulina. Tienes tres tareas:

1. Cortar el plásmido y el ADN humano con la enzima de restricción adecuada.
2. Insertar el gen de la insulina en el ADN plasmídico.
3. Determinar qué antibiótico usarías para identificar las bacterias que han tomado el plásmido.

MATERIALES EDUCATIVOS

- Diagrama del plásmido (OR 2)
- Secuencia de ADN humano (OR 3)

PROCEDIMIENTO

1. En el **Diagrama del plásmido (OR 2)**:
 - Corta la secuencia del plásmido con una tijera y pega los extremos entre sí para hacer un modelo del plásmido en papel.
 - Ubica las posiciones del punto *ori*, el punto promotor y los genes de resistencia a antibióticos.
 - Ubica las posiciones para cada sitio de reconocimiento de enzimas de restricción.
2. Elige la enzima de restricción que se debe usar para cortar el plásmido. Verifica que la enzima de restricción cumpla con todos los criterios detallados a continuación:
 - El punto *ori* del plásmido está intacto.
 - El punto promotor está intacto.
 - Al menos uno de los genes de resistencia a antibióticos está intacto.
 - La enzima corta el plásmido solo una vez.
 - El corte está cerca de la secuencia promotora.
3. Revisa la **Tabla 5B.1** en la página D-7 y corta el plásmido con una tijera en el sitio de reconocimiento, exactamente como cortarían la enzima de restricción. Anota las secuencias de los nucleótidos que quedan en cada extremo del plásmido.
4. En la **Secuencia de ADN humano (OR 3)**, mira la secuencia de ADN humano y determina dónde cortarían el ADN las tres enzimas de restricción BamHI, EcoRI e HindIII.

5. Determina si la enzima de restricción que elegiste en el paso 2 es una buena opción para cortar el gen de la insulina del ADN humano, para lo cual debes verificar que se cumpla con todos los criterios detallados a continuación:
 - No corta dentro del gen de la insulina.
 - Corta muy cerca del comienzo y el fin del gen.
 - Permitirá que el gen de la insulina se inserte en el plásmido cortado.
6. Revisa la **Tabla 5B.1** y corta el ADN humano con una tijera en el sitio de reconocimiento, exactamente como cortarían la enzima de restricción. Anota las secuencias de los nucleótidos que quedan en cada extremo del gen de la insulina después de ser cortado del ADN humano.
7. Usa cinta adhesiva para insertar el gen de la insulina en el plásmido cortado. Verifica que los extremos cohesivos se conecten en la orientación correcta. (En el laboratorio se usa una tercera herramienta biológica, la *ligasa de ADN*, para conectar en forma permanente los extremos cohesivos). Este es un modelo en papel de un plásmido recombinante que contiene un gen de la insulina. Una vez que el plásmido se multiplique (se copie), el gen de la insulina también se copiará ¡o clonará!

PREGUNTAS DE LA ACTIVIDAD

1. ¿Qué enzima de restricción elegiste? ¿Por qué la elegiste?
2. ¿Dónde insertarías el gen de la insulina y por qué?
3. ¿Qué antibiótico usarías para determinar si fue tomado el *ADN recombinante*?

TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS CON PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

Como acabas de aprender, un plásmido es un vector ideal para llevar secuencias de ADN de un organismo a otro. El plásmido puede ser tomado por bacterias, donde se multiplica, y sus genes se expresan usando la maquinaria celular bacteriana. Si se ha insertado un gen de interés en el vector, la bacteria genera el producto codificado por ese gen.

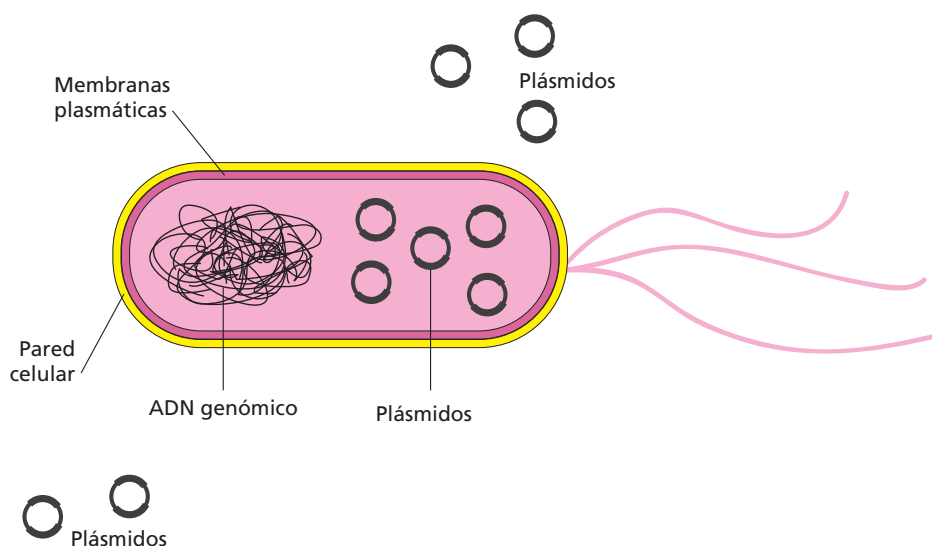


ATENCIÓN: Una vez que se ha insertado un gen en un vector, ¿qué crees que se necesita para que el producto sea codificado por el gen insertado?

TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

Una vez creado un plásmido recombinante que contiene un gen de interés, como la insulina, el plásmido puede entrar en las células bacterianas por un proceso denominado *transformación*. La **Figura 5B.3** ilustra la transformación.

Figura 5B.3: Transformación de bacterias



La absorción de ADN del ambiente de una célula bacteriana se produce con una eficacia muy baja en la naturaleza. Las bacterias *E. coli* tienen membranas plasmáticas complejas que separan el ambiente externo del ambiente interno de la célula y regulan cuidadosamente qué sustancias pueden entrar y salir de la célula. Asimismo, la pared celular tiene carga negativa y repele las moléculas de ADN con carga negativa.

ATENCIÓN: ¿Por qué es importante que las membranas de las bacterias *E. coli* regulen cuidadosamente qué sustancias pueden entrar y salir de la célula?



Con el objeto de aumentar la eficacia de la absorción de ADN, las bacterias se tratan de dos maneras. Primero, se colocan las bacterias *E. coli* en una solución que contiene iones positivos de calcio, lo que neutraliza la carga negativa de las membranas externas de las células, y permite que las moléculas de ADN crucen las membranas y entren en la célula. Luego, las bacterias se someten a un choque térmico, un aumento repentino de la temperatura, que aumenta la presión fuera de la célula. Esta diferencia de presión le permite al ADN plasmídico entrar a la célula bacteriana desde el exterior.

Se considera que las células tratadas con calcio y calor son *competentes* para tomar el ADN con más eficacia, pero incluso con este tratamiento solo alrededor de 1 en 10,000 células bacterianas toma un plásmido de su ambiente. Entonces, ¿cómo se puede identificar a las bacterias que han absorbido el plásmido recombinante? Recuerda que un componente importante de un plásmido recombinante es un gen para la resistencia a antibióticos. Si colocas células bacterianas en presencia del antibiótico, solo crecerán aquellas células que tienen el plásmido recombinante.

¿LO SABÍAS?

Absorción natural de plásmidos

Algunas cepas de bacterias intercambian plásmidos naturalmente, y esos plásmidos pueden proporcionar un gen que le da una ventaja selectiva, como la resistencia a antibióticos, a la célula. Un mecanismo para la transferencia eficaz de ADN entre especies bacterianas es la conjugación bacteriana, en la que el plásmido se comparte entre dos células bacterianas que están en contacto. El otro mecanismo es la transformación, en la que las bacterias absorben el ADN, incluidos los plásmidos, directamente del ambiente externo. En la naturaleza, la fuente habitual de este ADN son células que han muerto y liberado su contenido al ambiente.

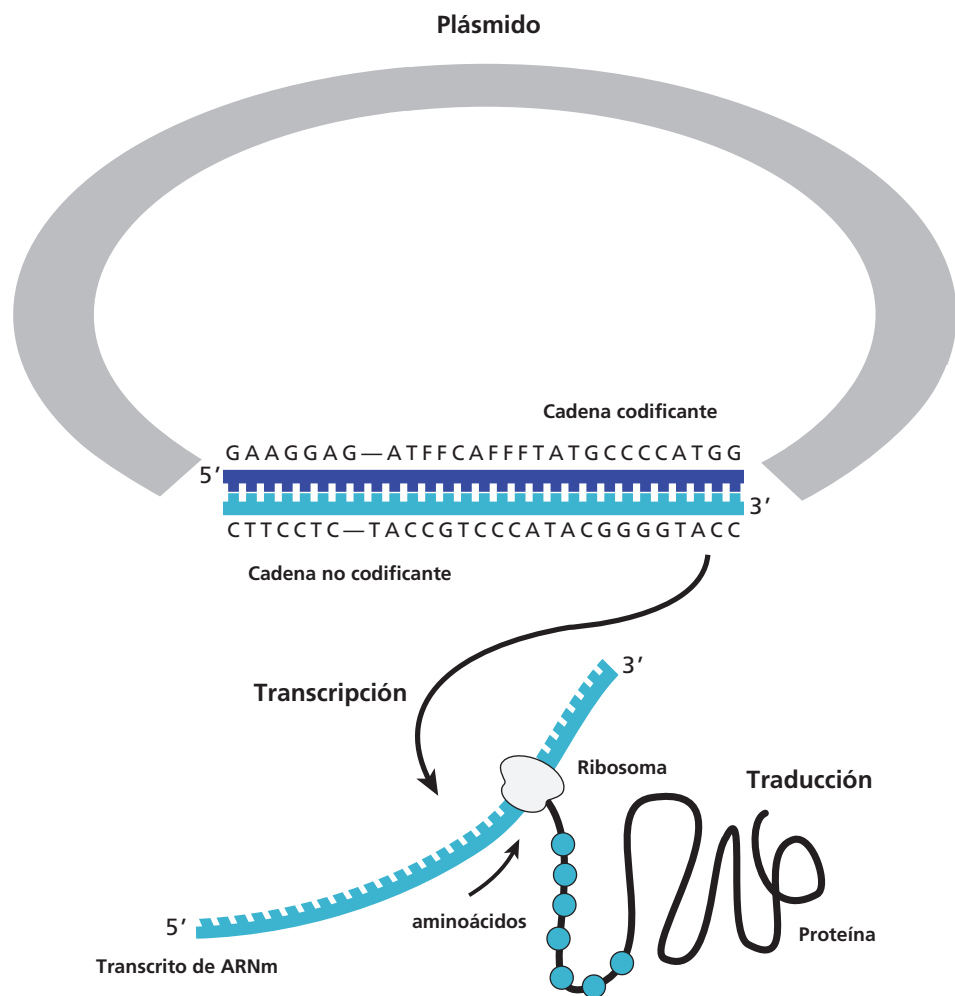
Si bien los plásmidos pueden ser ventajosos para las células bacterianas, no siempre son ventajosos para las personas. Por ejemplo, la vancomicina fue el único antibiótico eficaz contra las infecciones por *Staphylococcus aureus*. La resistencia a la vancomicina se asocia al gen *VanA*, que se lleva en un plásmido en otras especies bacterianas (como la cepa *Enterococcus faecium* [BM4147]). El intercambio de este plásmido hizo que la vancomicina sea menos eficaz contra las infecciones por estafilococos.



DEL ADN PLASMÍDICO A LA PROTEÍNA

Una vez que el plásmido recombinante ha entrado en la célula bacteriana, la *polimerasa de ADN* comienza la replicación en el punto *ori*, y el plásmido se multiplica usando las enzimas de la replicación del ADN bacteriano. Estas múltiples copias de plásmidos ahora pueden producir la proteína de interés, como la insulina, en cantidad. En este proceso, la información codificada en el ADN humano se transfiere del ADN a la proteína usando la maquinaria de transcripción y *traducción* de la célula (ver la **Figura 5B.4**). La proteína luego modifica los rasgos observables del organismo.

Figura 5B.4: Expresión genética de un plásmido en la célula bacteriana



La ingeniería genética es posible porque los genes de diferentes organismos se pueden expresar en las bacterias. En la Tierra, toda la vida está relacionada, y la forma en que se codifica la información en el ADN es universal. Como ya debes de saber, las proteínas están formadas por subunidades más pequeñas denominadas *aminoácidos*, y una secuencia de tres nucleótidos en el ADN codifica un solo aminoácido. Estas secuencias de tres nucleótidos se denominan *codones*. Por ejemplo, el codón TTG codifica el aminoácido triptófano, mientras que el codón AAG codifica el aminoácido lisina. En muchos casos, más de un codón puede codificar el mismo aminoácido. Por ejemplo, el AAA también es el codón para la lisina. Asimismo, hay codones informativos, como el *codón de inicio* (ATG) y el *codón de terminación* (por ejemplo, TTA), que muestran dónde comienza y termina el código para la proteína en la secuencia de ADN.

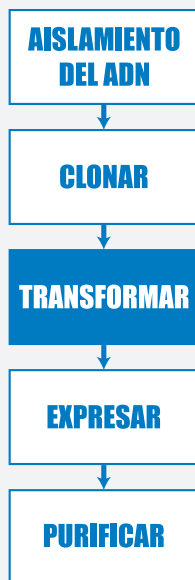
¿LO SABÍAS?

Producción de ADN a partir de ARN

Si bien el código del ADN es el mismo en todas las formas de vida, la transcripción y la traducción de genes en *eucariotas* y *procariotas* usan diferentes enzimas y estructuras. (Las células humanas son eucariotas, y las células bacterianas son procariotas). Una diferencia importante entre estas dos clases de células es que los genes en los eucariotas contienen secuencias no codificantes denominadas *intrones*. La polimerasa de ARN transcribe el gen y produce un ARN mensajero precursor grande que contiene intrones y *exones*, que son las secuencias codificantes. El ARN precursor luego se *corta y conecta*, lo que elimina los intrones y une los exones en el ARN mensajero maduro.

Los procariotas no pueden realizar el corte y unión de los intrones. Para resolver este problema, los científicos usan una enzima, la *retrotranscriptasa*, que puede copiar ARN en ADN, para producir ADN complementario (ADNc) del ARN mensajero para una proteína en particular. El ADNc, que solo tiene las secuencias de exones, se inserta en el vector plasmídico. El gen clonado de la insulina humana que se usa para producir insulina se prepara de este modo.





PRÁCTICA DE LABORATORIO 5B: TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS CON LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES (pARA-R)

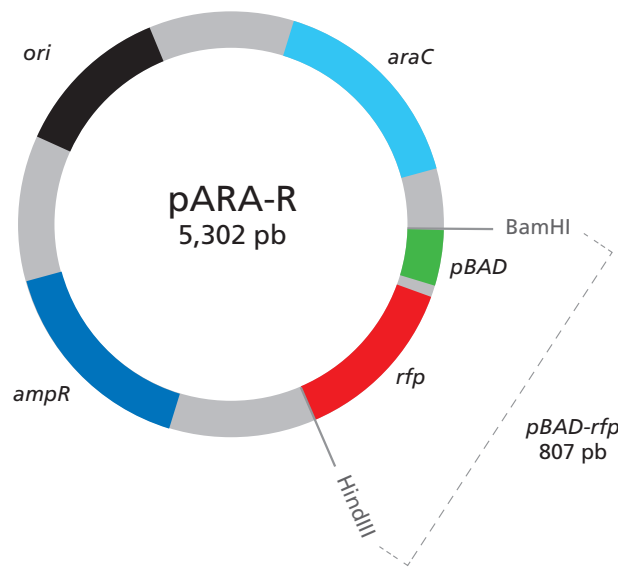
En esta práctica de laboratorio realizarás un paso importante del proceso de clonación de genes, que es transformar las bacterias *E. coli* con el plásmido pARA-R. El plásmido pARA-R contiene el gen *rfp* que puede producir la *proteína roja fluorescente*. Usando bacterias *E. coli* que han sido tratadas previamente con cloruro de calcio, dividirás las bacterias en dos grupos: un grupo control en el que no se agregan plásmidos, y un grupo experimental en el que se agrega el plásmido pARA-R. Después del choque térmico de ambos grupos de células, las cultivarás en distintas condiciones:

- Un grupo control se cultiva en presencia de Luria Broth (un *medio* propicio para la proliferación bacteriana).
- Un grupo control se cultiva en presencia de Luria Broth y el antibiótico ampicilina.
- Un grupo experimental se cultiva en presencia de Luria Broth.
- Un grupo experimental se cultiva en presencia de Luria Broth y el antibiótico ampicilina.
- Un grupo experimental se cultiva en presencia de Luria Broth, ampicilina y el azúcar *arabinosa*.

Al examinar la proliferación de bacterias en estas condiciones, puedes verificar que tu procedimiento funcionó y puedes identificar a las bacterias que se transformaron con el plásmido pARA-R. ¿Cómo sabrás si tienes éxito en esta tarea? Las bacterias tendrán un rasgo nuevo y muy visible: Ahora producirán una proteína roja fluorescente, ¡que hace que las células sean rojas o rosas brillante!

El plásmido pARA-R se muestra en la **Figura 5B.5**.

Figura 5B.5: Plásmido pARA-R



Los componentes relevantes de este plásmido son el gen *rfp*, el promotor (*pBAD*), el gen de resistencia a la ampicilina (*ampR*) y el gen de la proteína activadora de arabinosa (*araC*). El gen *ampR* le da resistencia al antibiótico ampicilina. (Los biotecnólogos llaman estos genes *marcadores selectivos* porque solo las bacterias que posean el gen sobrevivirán en la presencia de un antibiótico.) El gen *araC* controla al promotor. Si la arabinosa, un azúcar simple, está presente en las bacterias, la proteína activadora producida por el gen *araC* activa el promotor, que luego une a la polimerasa de ARN, y se transcribe el gen *rfp*. Las proteínas activadoras se usan en algunos plásmidos recombinantes para controlar la producción de la proteína de interés.

MATERIALES EDUCATIVOS

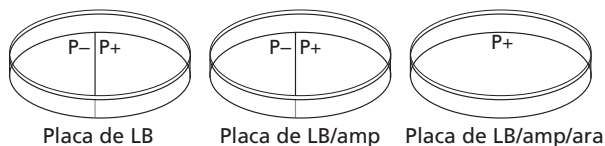
- Predicciones sobre la proliferación de bacterias (OR 5)

ANTES DE LA PRÁCTICA DE LABORATORIO

Analiza las siguientes preguntas con tu grupo, y prepárate para compartir tus respuestas con la clase.

1. La ampicilina es un antibiótico que destruye las células bacterianas interrumpiendo la formación de las paredes celulares. Sin embargo, el plásmido pARA-R tiene el gen de la resistencia a la ampicilina, lo que produce una proteína que degrada la ampicilina. ¿Cuál es el objetivo de cultivar bacterias que han sido transformadas en presencia de ampicilina?
2. ¿Qué sucederá cuando las células bacterianas que contienen el plásmido pARA-R no reciban arabinosa?

- En la práctica de laboratorio, agregarás muestras del grupo de control P– y del grupo de tratamiento P+ en placas con diversas combinaciones de Luria Broth (LB), ampicilina y el azúcar arabinosa. Las placas se ordenarán del siguiente modo:



Usando la clave en **Predicciones sobre la proliferación de bacterias (OR 5)**, muestra tus predicciones para la proliferación que esperarías para cada combinación. Luego completa la **Tabla 1** y la **Tabla 2** del material educativo detallando las conclusiones a las que se puede llegar si la proliferación prevista se produce o no.

- Debido a un percance en la práctica de laboratorio, las bacterias que llevaban un plásmido con un gen resistente a la ampicilina y las bacterias que llevaban un plásmido con un gen que provee resistencia a otro antibiótico (kanamicina) se mezclaron en forma accidental. Diseña un experimento que te permitirá separar las dos clases de bacterias. (Sugerencia: ¡Asegúrate de no exterminar a una de las dos clases de bacterias que tratas de separar!)
- Lee toda la sección Métodos en las páginas D-20 a D-24, y describe brevemente los pasos con palabras y un diagrama de flujo.



SEGURIDAD: Se deben seguir todas las precauciones de seguridad adecuadas y usar el atuendo requerido en un laboratorio de ciencias. Consulta las indicaciones de tu profesor.



SEGURIDAD: Ten cuidado al manipular bacterias *E. coli* y usa una *técnica aséptica*.

La técnica aséptica es un conjunto de procedimientos que asegura la protección del auxiliar de laboratorio y de la muestra bacteriana, lo cual es necesario para que el experimento sea exitoso. Específicamente:

- No toques nada que haya estado o vaya a estar en contacto con las bacterias *E. coli*. Los alumnos que manipulen equipo o materiales que entren en contacto con las bacterias deben usar guantes.
- Trata de evitar derrames y la contaminación de superficies con cualquier cosa que haya estado en contacto con bacterias *E. coli*. Avisa de inmediato a tu profesor si se produce un derrame o contaminación.
- Cuando hayas terminado de usar los tubos de microcentrífuga, las puntas de las pipetas y los esparcidores de células, colócalos de inmediato en la bolsa para residuos con riesgo biológico o recipiente para residuos, según las indicaciones de tu profesor.

- Cuando te lo indiquen, coloca tus placas Petri de vuelta en las bolsas originales y después en la bolsa para residuos con riesgo biológico.
- Lávate bien las manos con jabón después de finalizar la práctica de laboratorio.

MATERIALES

Reactivos

- Una gradilla con lo siguiente:
 - Tubo de microcentrífuga de plásmido pARA-R (PR-5)
 - Tubo de microcentrífuga de Luria Broth (LB)
- Tubo de microcentrífuga de 100 µl de células de *E. coli* competentes refrigeradas (CC)

NOTA: El tubo CC se debe mantener con hielo en todo momento.

- 3 placas Petri con agar:
 - 1 de LB
 - 1 de LB/amp
 - 1 de LB/amp/ara

Equipo y suministros

- Taza de poliestireno con hielo picado

NOTA: Llena una taza con parte del hielo picado del recipiente que tiene los tubos CC antes de tomar uno de estos tubos. Deberás mantener el tubo CC en hielo, en todo momento.

- 2 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Marcador permanente
- Guantes desechables
- Micropipeta P-20
- Micropipeta P-200
- Caja de puntas de pipeta desechables
- Paquete de esparcidores de células (se compartirán entre los grupos)
- Baño María a 42 °C con gradilla flotante para tubos de microcentrífuga (se compartirá entre todos los grupos)
- Cronómetro o reloj (se compartirá entre todos los grupos)
- Cinta adhesiva (se compartirá entre todos los grupos)
- Incubadora a 37 °C (se compartirá entre todos los grupos)
- Bolsa para residuos con riesgo biológico para materiales que entren en contacto con las células de *E. coli* (se compartirá entre los grupos)
- Recipiente para desechos líquidos (se compartirá entre los grupos)

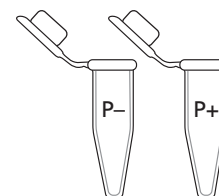
MÉTODOS



1. Revisa la gradilla para asegurarte de que tengas los reactivos nombrados.
2. Obtén un tubo CC y colócalo en una taza de poliestireno con hielo.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Las células competentes de esta práctica de laboratorio deben mantenerse frías; asegúrate de sostener los tubos de microcentrifuga por el borde superior para evitar transmitirles calor a las células.

3. Rotula dos tubos de microcentrifuga limpios como "P–" y "P+".
4. Coloca los tubos P– y P+ en la taza de poliestireno con hielo, junto con el tubo CC.



TÉCNICA DE LABORATORIO: La transformación bacteriana requiere técnicas estériles. Es esencial seguir estas indicaciones con precisión.

5. Con la micropipeta grande P-200, agrega las células competentes del tubo CC en los tubos P– y P+:
 - a. Fija la micropipeta P-200 en 50 μ l.
 - b. Con cuidado, vuelve a suspender las células bacterianas en el tubo CC aspirando y descargando la solución suavemente con la pipeta dos veces.
 - c. Agrega 50 μ l de CC en cada uno de los tubos vacíos refrigerados (P– y P+), sosteniendo cada tubo por el borde para mantener el frío, y vuelve a colocar cada tubo rápidamente en el hielo.

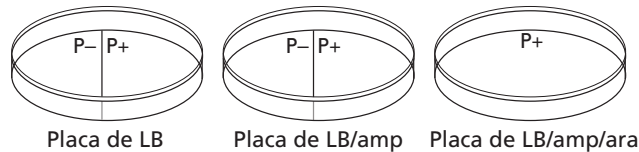


TÉCNICA DE LABORATORIO: Para evitar la contaminación, asegúrate de usar una punta de micropipeta nueva para cada solución que agregues.

6. Agrega el PR-5 en el tubo rotulado "P+", usando la pipeta P-20:
 - a. Fija la micropipeta P-20 en 10.0 μ l.
 - b. Sostén el tubo P+ refrigerado por el borde superior y agrega 10.0 μ l de PR-5. Mezcla las soluciones aspirando y descargando los líquidos con la pipeta dos veces, y vuelve a colocar el tubo P+ en el hielo.
7. Mantén los tubos P– y P+ en el hielo durante 15 minutos.

NOTA: Durante el intervalo de 15 minutos, comparte y analiza tus respuestas a la pregunta 3 en la sección antes de la práctica de laboratorio.
8. Mientras las células están en el hielo, prepara tus tres placas de Petri con agar: una con LB, otra con LB/amp y la última con LB/amp/ara:
 - a. Rotula la parte inferior de cada placa (la parte que contiene el agar) con tu número de grupo y período de clase. Escribe en letra pequeña en el borde de la placa.

- b. Con las placas cerradas, traza una línea en la placa de LB y en la placa de LB/amp que divida cada placa por la mitad. Rotula la mitad de cada placa con "P–" y la otra mitad con "P+". Rotula la placa de LB/amp/ara con "P+". Las placas se ordenarán del siguiente modo:



9. Luego de la incubación de 15 minutos en hielo, lleva los tubos P– y P+ (en la taza de hielo) al baño María de 42 °C. Coloca los dos tubos de la gradilla flotante para tubos de microcentrífuga en el baño María durante exactamente 45 segundos.
10. Después del choque térmico de 45 segundos, vuelve a colocar los tubos de inmediato en el hielo y déjalos allí durante al menos un minuto.
11. Con la micropipeta grande P-200, agrega LB en los tubos P– y P+:
- Fija la micropipeta P-200 en 150 µl.
 - Agrega 150 µl de LB en el tubo P–. Tapa el tubo y muévelo rápidamente con suavidad, dos o tres veces, para mezclar.
- TÉCNICA DE LABORATORIO:** Para evitar la contaminación, asegúrate de usar una punta de micropipeta nueva para cada solución que agregues.
- Agrega 150 µl de LB en el tubo P+. Tapa el tubo y muévelo rápidamente con suavidad, dos o tres veces, para mezclar.
12. Si el tiempo lo permite, deja incubar las células de los tubos P– y P+ a temperatura ambiente durante 15 minutos.

DETENTE Y PIENSA:

- ¿De qué manera el cultivo de bacterias P+ se trata de forma diferente del cultivo de bacterias P–? (Un *cultivo* es una población aislada de células). ¿Cuál es el objetivo del cultivo de bacterias P–?
- ¿Por qué las células necesitan tiempo para recuperarse después del choque térmico?
- ¿Por qué las células se incuban a 37°C?
- En esta práctica de laboratorio usarás una técnica aséptica. ¿Por qué es importante esto?





13. Agrega células del tubo P- en tus placas de LB y LB/amp:

- Fija la micropipeta P-200 en 50 μ l.

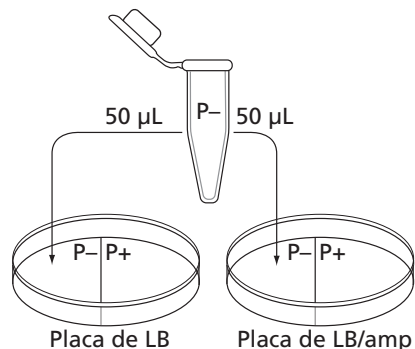
TÉCNICA DE LABORATORIO: Para evitar la contaminación, asegúrate de usar una punta de micropipeta nueva para cada solución que agregues.

- Aspira y descarga suavemente la solución del tubo P- con la pipeta dos o tres veces para dejar las células en suspensión, y carga 50 μ l de células P-.

- Abre la tapa de la placa de LB, como una "almeja", y agrega 50 μ l de células del tubo P- en la sección marcada "P-". Cierra la tapa.

- Nuevamente, aspira y descarga suavemente la solución del tubo P- con la pipeta dos o tres veces para dejar las células en suspensión, y carga 50 μ l de células P-.

- Abre la tapa de la placa de LB/amp, como una almeja, y agrega 50 μ l de células del tubo P- en la sección marcada "P-". Cierra la tapa.

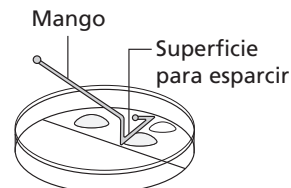


14. Esparce las células del tubo P- en tus placas de LB y LB/amp:

- Abre el paquete de esparcidores estériles de células por el extremo más cercano al mango. Retira solo un esparcidor y cierra el paquete para mantener la esterilidad de los demás.

- Abre la tapa de la placa de LB, como una almeja, y esparce las células de forma pareja en todo el lado P- de la placa, moviendo suavemente el esparcidor por la superficie de agar. (Mantén las células en el lado P- de la placa). Cierra la tapa.

- Esparce cuidadosamente las células P- en la placa de LB/amp con el mismo esparcidor y la misma técnica.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Sostén el esparcidor por el mango y no permitas que el extremo doblado toque ninguna superficie, ya que esto contaminará el esparcidor. Coloca el esparcidor usado en la bolsa para residuos con riesgo biológico.

15. Agrega células del tubo P+ en tus placas de LB y LB/amp:

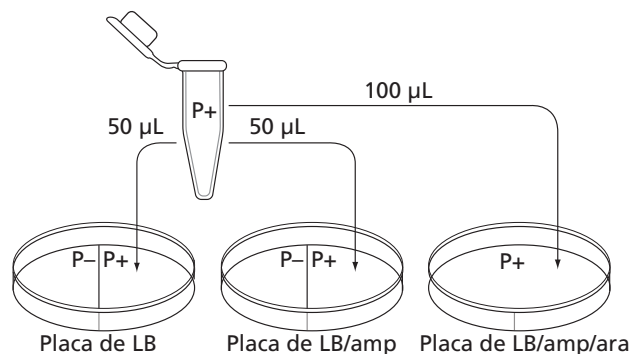
- Asegúrate de que la micropipeta P-200 esté en 50 μ l.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Para evitar la contaminación, asegúrate de usar una punta de micropipeta nueva para cada solución que agregues.

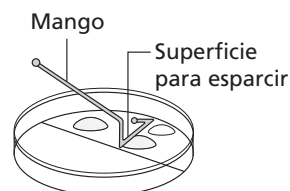


- b. Aspira y descarga suavemente la solución del tubo P+ con la pipeta dos o tres veces para dejar las células en suspensión, y carga 50 μ l de células P+.
- c. Abre la tapa de la placa de LB, como una almeja, y agrega 50 μ l de células del tubo P+ en la sección marcada "P+". Cierra la tapa.
- d. Nuevamente, aspira y descarga suavemente la solución del tubo P+ con la pipeta dos o tres veces para dejar las células en suspensión, y carga 50 μ l de células P+.
- e. Abre la tapa de la placa de LB/amp, como una almeja, y agrega 50 μ l de células del tubo P+ en la sección marcada "P+". Cierra la tapa.
- f. Fija la micropipeta P-200 en 100 μ l, aspira y descarga suavemente la solución del tubo P+ con la pipeta dos o tres veces, y carga 100 μ l de células P+.
- g. Abre la tapa de la placa LB/amp/ara, como una almeja, y agrega 100 μ l de células P+ en diversas zonas en toda la superficie, no simplemente en un solo lugar. Cierra la tapa.

16. Esparce las células del tubo P+ en tus placas de LB y LB/amp:



- a. Abre el paquete de esparcidores estériles de células por el extremo más cercano al mango. Retira solo un esparcidor y cierra el paquete para mantener la esterilidad de los demás.
- b. Abre la tapa de la placa de LB, como una almeja, y esparce las células de forma pareja en el lado P+ de la placa (y solo de este lado), moviendo suavemente el esparcidor por la superficie de agar. Cierra la tapa.
- c. Esparce cuidadosamente las células P+ en la placa de LB/amp con el mismo esparcidor y la misma técnica.
- d. Esparce cuidadosamente las células P+ en la placa LB/amp/ara con el mismo esparcidor y la misma técnica. Luego gira suavemente la placa debajo del esparcidor de P+ para que las células se puedan esparcir por toda la superficie de esta placa. Cierra la tapa.





TÉCNICA DE LABORATORIO: Sostén el esparcidor por el mango y no permitas que el extremo doblado toque ninguna superficie, ya que esto contaminará el esparcidor. Coloca el esparcidor usado en la bolsa para residuos con riesgo biológico.

17. Deja las tres placas boca arriba durante cinco minutos.
18. Con la cinta adhesiva proporcionada, pega las tres placas juntas y rotúlalas con tu número de grupo y período de clase.
19. Coloca las placas en la incubadora a 37 °C boca abajo para evitar que la condensación gotee sobre el medio.
20. Coloca todos los tubos de microcentrífuga, las puntas de las pipetas y los esparcidores de células en la bolsa para residuos con riesgo biológico.
21. Incuba las placas durante 24 a 36 horas a 37 °C.
22. Examina las placas y registra en tu libreta la proliferación que observas en cada mitad.
23. Cuando te lo indiquen, desecha las placas Petri en la bolsa para residuos con riesgo biológico.

PREGUNTAS DEL CAPÍTULO 5B

1. Haz una lista de palabras o indica con un dibujo las características importantes de un vector plasmídico que se requieren para clonar un gen. Explica el objetivo de cada característica.
2. Al seleccionar una enzima de restricción para la clonación, ¿qué consideraciones importantes se deben tener en cuenta?
3. Teniendo en cuenta lo que sabes de la evolución, ¿por qué las bacterias retendrían un gen que les da resistencia a los antibióticos? ¿De qué manera la existencia de bacterias con resistencia a antibióticos afecta a la medicina hoy en día?
4. Observa los resultados de tu transformación. ¿Tus resultados reales coinciden con tus resultados previstos? De no ser así, ¿qué diferencias ves, y cuáles son algunas explicaciones para estas diferencias?
5. ¿Por qué las colonias rojas solo aparecen en la placa de LB/amp/ara y no en la placa de LB/amp?
6. Los plásmidos recombinantes se manipulan para que se puedan multiplicar en la célula, independientemente de la replicación cromosómica. ¿Por qué es importante tener varias copias de un plásmido recombinante dentro de una célula?
7. ¿Cómo se expresa como un rasgo la información codificada en el gen *rfp*? Asegúrate de usar lo que has aprendido anteriormente sobre la expresión génica y la relación entre el ADN, el ARN, las proteínas y los rasgos.
8. ¿Por qué las bacterias pueden producir una proteína humana (como la insulina), o una proteína de la anémona marina, (como el tinte rojo fluorescente)?



¿LO SABÍAS?

Sobre la conexión entre los genes y las proteínas

¿De qué forma los científicos pudieron demostrar que un gen codifica una proteína? En 1941, George Beadle y Edward Tatum realizaron un experimento en el que expusieron moho de pan a irradiación UV, un procedimiento que se sabía que provocaba *mutaciones* (cambios) en los genes. Beadle y Tatum crearon varias cepas mutantes de moho que habían perdido la capacidad de sintetizar una vitamina necesaria. En la síntesis vitamínica, la vitamina es la molécula final de una vía en la que una serie de reacciones crea un conjunto correspondiente de moléculas precursoras, y cada reacción está catalizada por una enzima (una proteína). Al suministrar los precursores de la vitamina B6 por separado a la cepa mutante que no podía producir esa vitamina, Beadle y Tatum pudieron determinar que al mutante solo le faltaba una sola enzima que catalizaba una reacción.

Beadle y Tatum luego investigaron si un gen solo causaba la pérdida de la única enzima por cruces genéticos entre la cepa mutante que no podía sintetizar la vitamina B6 y una cepa natural. Luego de cultivar la descendencia, descubrieron que la mitad tenía el mismo defecto que la cepa mutante progenitora y la mitad no, lo que confirmaba que había mutado un solo gen. A partir de estos resultados, Beadle y Tatum propusieron que los genes eran responsables de codificar las proteínas de un organismo, y que un cambio en un gen podría producir una proteína defectuosa, lo que a su vez podría afectar los rasgos de ese organismo. En 1958, Beadle y Tatum recibieron el premio Nobel por este trabajo.

GLOSARIO DEL CAPÍTULO 5B

Activador: Proteína que regula la transcripción de un gen a través de la unión a una secuencia cerca del promotor, lo que permite que la polimerasa de ARN se una al promotor e inicie la transcripción del gen. La proteína activadora también puede bloquear la unión de la polimerasa de ARN y así inhibir la transcripción del gen.

ADN recombinante: ADN que contiene secuencias o genes de dos o más orígenes.

Aminoácido: Componente básico de las proteínas. Existen 20 aminoácidos. Cada uno es una sustancia orgánica que tiene dos grupos adheridos: un grupo amino (NH_2) y un grupo carboxilo (COOH).

Antibiótico: Clase de compuestos que suprime o inhibe el crecimiento de microorganismos.

Arabinosa: Azúcar de cinco carbonos que se presenta en forma natural en diversos carbohidratos de plantas y bacterias.

ARN (ácido ribonucleico): Biomolécula de una cadena conformada por una base nitrogenada, un azúcar ribosa y un fosfato. El ARN tiene una función clave en la síntesis de proteínas: transmite información genética del ADN al ribosoma, donde luego se producen las proteínas.

ARN mensajero (ARNm): Molécula de ARN transcrita del ADN de un gen y usada como plantilla para la síntesis de proteínas.

Bacteriófago: Virus que infecta una célula bacteriana y usa la maquinaria celular para multiplicarse. La célula bacteriana finalmente es destruida por el bacteriófago.

Codón: Grupo de tres bases de ARNm que codifican un solo aminoácido.

Codón de inicio: Primer codón de ARNm traducido por un ribosoma, normalmente AUG o GUG.

Codón de terminación: Triplete de nucleótidos dentro del ARNm que señala la terminación de la traducción.

Competencia: Capacidad de una célula para ser transformada genéticamente tomando ADN del ambiente.

Conjugación bacteriana: Proceso por el cual se unen dos células bacterianas y transfieren material genético de una a otra.

Corte y unión del ARN: Modificación del ARN mensajero en la que se eliminan los intrones y se unen los exones.

Cultivo: Población aislada de células que se han cultivado en un medio nutritivo especialmente preparado.

Digestión: Corte de ADN por una enzima de restricción.

Enzima de restricción: Proteína que puede cortar el ADN en un lugar específico, que se denomina un *síto de reconocimiento*.

Eucariota: Organismo que alberga sus genes dentro de un núcleo y tiene varios cromosomas lineales.

Exón: Segmento de un gen que codifica una cadena de aminoácidos. Los exones se transcriben y traducen.

Expresión: Proceso por el cual la información codificada en un gen se convierte primero en ARN mensajero y luego en una proteína.

Extremos cohesivos: Extremos de una molécula de ADN cortados con determinadas enzimas de restricción. Estos extremos son asimétricos: una cadena es más larga que la otra cadena y, por lo tanto, tiene bases no emparejadas. Los extremos cohesivos de dos fragmentos diferentes de ADN que se han cortado con las mismas enzimas de restricción se pueden unir, ya que las bases no emparejadas de los extremos son complementarias.

Intrón: Segmento de un gen que no codifica una proteína. Los intrones se transcriben en el ARNm pero se eliminan antes de que los *exones* (el resto del gen) se traduzcan en una proteína.

Ligasa de ADN: Enzima que cataliza la formación de enlaces químicos covalentes en el esqueleto azúcar-fosfato, lo que posibilita la unión de los fragmentos de ADN.

Marcador selectivo: Gen en un plásmido que se introduce en una célula junto con un gen de interés que se clonará. Los marcadores selectivos permiten a los científicos saber si el plásmido ha sido tomado por la célula, ya que el marcador se puede ver o detectar. Un marcador selectivo común es el gen de resistencia a antibióticos: solo las bacterias que tienen el gen sobrevivirán ante el antibiótico.

Medio: Solución que contiene sustancias que sustentan la proliferación de microorganismos. El medio puede solidificarse añadiendo agar. Luria Broth es un ejemplo de un medio.

Mutación: Cambio o daño que se produce en una sección del ADN que modifica los productos o procesos asociados con esa sección.

Origen de la replicación (*ori*): Secuencia de ADN donde comienza la replicación del ADN.

Par de bases: Dos bases nitrogenadas juntas de pares en el ADN de doble cadena mediante enlaces débiles.

Plásmido: Molécula circular de ADN.

Polimerasa de ADN: Enzima que se usa para multiplicar las moléculas de ADN.

Polimerasa de ARN: Proteína que separa las hebras de ADN y por complementaridad añade los nucleótidos para producir un ARN mensajero.

Procariota: Célula u organismo con un solo cromosoma y sin membrana nuclear. Las bacterias, por ejemplo, son procariotas.

Promotor: Secuencia específica de ADN que une la polimerasa de ARN y comienza la transcripción del gen.

Proteína roja fluorescente: Proteína codificada por el gen *rfp*. La proteína roja fluorescente es una molécula que tiene un tamaño aproximado de 238 aminoácidos. Cuando se expresa en células bacterianas, las células se ven de color rojo o rosa brillante.

Rasgo: Característica determinada genéticamente. El ADN codifica las proteínas, lo que determina los rasgos.

Replicación del ADN: Proceso biológico que tiene lugar en todos los organismos vivos y copia su ADN. El proceso comienza cuando una molécula de ADN de doble cadena produce dos copias idénticas. Se desata la doble hélice, y cada cadena de la molécula original sirve como plantilla para la producción de la cadena complementaria. Luego las bases se combinan para sintetizar las nuevas cadenas recíprocas.

Resistencia a antibióticos: Estado en que las bacterias ya no son sensibles a un antibiótico y seguirán creciendo y dividiéndose en presencia del antibiótico.

Retrotranscriptasa: Enzima que cataliza la formación de ADN a partir de una plantilla de ARN en la retrotranscripción.

Sitio de reconocimiento: Una secuencia específica de ADN la cual es cortada por una enzima de restricción. Por lo general los sitios de reconocimiento son palíndromes, secuencia que lee lo mismo en ambas direcciones.

Técnica aséptica: Conjunto de procedimientos y condiciones cuidadosamente controladas para evitar la contaminación por patógenos.

Traducción: Proceso por el cual la información codificada en el ARN mensajero se decodifica y transforma en proteína.

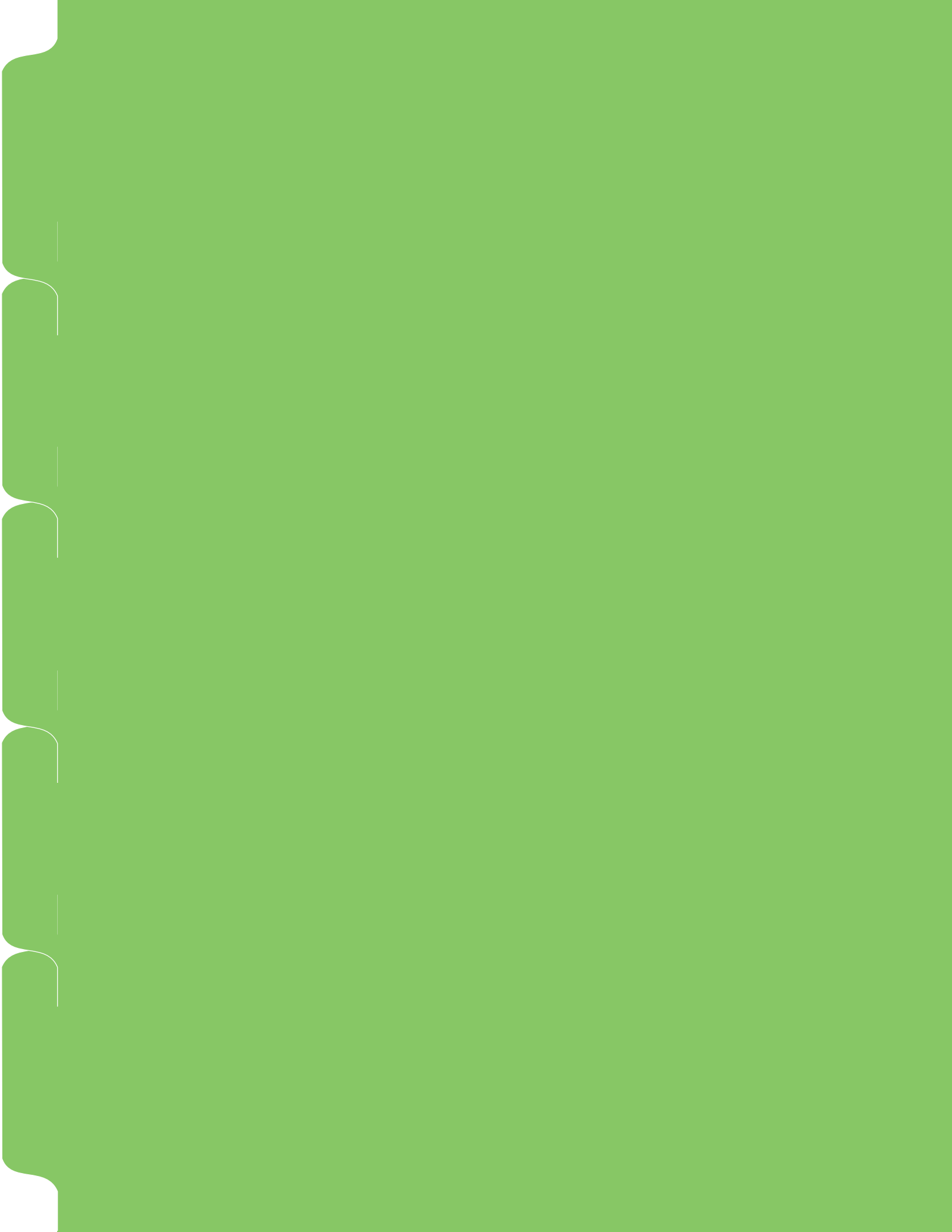
Transcripción: Proceso por el cual la información codificada en el ADN se transfiere al ARN mensajero, un ácido ribonucleico de una cadena.

Transformación: Proceso que coloca el ADN extraño, como un plásmido, dentro de una célula.

Vector: Vehículo para mover secuencias de ADN de un organismo a otro.

Experiencia de Biotecnología Amgen

Descubrimiento científico para el salón de clase





CAPÍTULO 6

OBTENER LO QUE NECESITAMOS

INTRODUCCIÓN

Al comienzo del programa leíste acerca de cómo se usa la ingeniería genética para producir proteínas terapéuticas. Para proporcionar un tratamiento para la diabetes, por ejemplo, se manipula un plásmido recombinante para que contenga un gen clonado de la insulina humana. Las bacterias toman el plásmido recombinante y expresan el gen, lo que da como resultado la producción de insulina. Hasta la fecha, has realizado todos o algunos de estos pasos usando el gen *rfp* clonado.

El paso final del proceso es la obtención de la proteína. Para hacer esto, las bacterias se tratan con un reactivo que las *lisa* (rompe sus paredes celulares para abrirlas), y la proteína se separa del contenido de la célula por un método denominado *cromatografía en columna*. (La cromatografía es un método para separar sustancias similares disolviéndolas y luego haciendo fluir la solución por un material que une las sustancias en diferentes grados. La cromatografía en columna usa una columna rellena de microesferas recubiertas con el material de unión).

En este capítulo completarás este paso final. Lisarás las bacterias que transformaste en el capítulo 5 y usarás una columna que separa las proteínas por solubilidad en agua, para obtener la proteína roja fluorescente producida por el gen *rfp* clonado.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 6

Al final de este capítulo, podrás hacer lo siguiente:

- Describir las condiciones que son favorables para la proliferación bacteriana.
- Explicar cómo se relaciona la *conformación* (forma tridimensional) de una proteína con su función.
- Explicar cómo se produce el doblamiento de las proteínas.
- Explicar cómo la cromatografía en columna separa las proteínas.

¿QUÉ ES LO QUE YA SABES?

Analiza las siguientes preguntas con tu compañero, y anota tus ideas en la libreta. Debes estar preparado para analizar tus respuestas con la clase. No te preocupes si no sabes todas las respuestas. El análisis de estas preguntas te ayudará a pensar sobre lo que ya sabes acerca de la proliferación bacteriana y las proteínas.

1. ¿Cómo se reproducen las bacterias?
2. ¿Por qué a las proteínas a veces se les denomina moléculas de batalla?

3. ¿De qué manera la estructura (forma o doblado) de una proteína podría ser importante para su función? Céntrate en una de las siguientes funciones de las proteínas: actúan como enzimas (acelerando las velocidades de reacción), transportan moléculas, señalar o forman estructuras.
4. La proteína es una molécula larga y lineal cuando se produce, pero se dobla de inmediato y adopta una conformación tridimensional específica. ¿Qué propiedades de los *aminoácidos* de una proteína controlan el proceso de doblamiento?

MULTIPLICACIÓN DE BACTERIAS Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Algunas bacterias pueden provocarte enfermedades. Es por ello que en el área de cuidado médico y en la preparación de alimentos se intenta evitar la proliferación de bacterias. Sin embargo cuando los científicos usan bacterias como hospederas para plásmidos recombinantes, su objetivo es estimular la proliferación de las bacterias y que estas produzcan la proteína de interés.

PROLIFERACIÓN BACTERIANA

¿Qué factores afectan la proliferación bacteriana? El último paso del capítulo 5 fue colocar las bacterias que se transformaron con el plásmido pARA-R en un *cultivo de suspensión* en un matraz de agitación. Las células quedaron suspendidas en un caldo nutritivo, y con la agitación se mezcló el aire de la suspensión y se evitó que las bacterias se separen de la solución, lo cual proporcionó condiciones favorables para la proliferación.



ATENCIÓN: ¿Por qué el matraz de agitación podría ser mejor para la proliferación de células bacterianas que una placa?

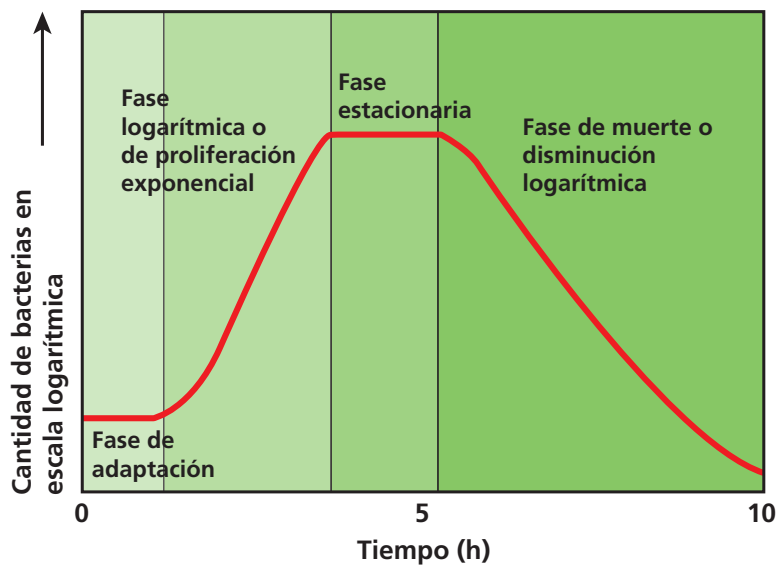
En condiciones óptimas, como las proporcionadas por el matraz de agitación, la proliferación de una población bacteriana es algo predecible (ver la **Figura 6.1**). La proliferación se produce en cuatro fases diferentes:

- En la *fase de adaptación* hay un índice de proliferación cero. No hay células nuevas ni células que mueran. Las células se ajustan a las nuevas condiciones, crecen en tamaño y se preparan para la división celular.
- En la *fase exponencial* hay un índice de proliferación logarítmico. La cantidad de células nuevas es mayor que la cantidad de células que mueren. Las células se dividen en forma asexual y duplican su cantidad cada 20 minutos, aproximadamente (que es el tiempo promedio de duplicación para la *E. coli*; otras bacterias tienen tiempos de duplicación diferentes).

Esta fase se produce siempre que los recursos necesarios como el alimento y el oxígeno sean ilimitados y no haya factores inusuales que provoquen la muerte celular.

- En la *fase estacionaria* hay un índice de proliferación cero. La cantidad de células nuevas equivale a la cantidad de células que mueren. Esta fase se presenta una vez que los recursos como el alimento y el oxígeno son limitados.
- En la *fase de muerte*, hay un índice de proliferación negativo. La cantidad de células nuevas es menor que la cantidad de células que mueren. Esta fase sucede cuando se agotan los recursos y cuando se acumulan productos tóxicos de desecho.

Figura 6.1: Cambio en la proliferación bacteriana, en el tiempo, en el matraz de agitación



ATENCIÓN: Si el gen de interés es controlado por un operón, como el operón arabinosa, ¿cuándo es el mejor momento para activar el gen? Ten en cuenta:

- La producción de la proteína le quita energía a los procesos de proliferación celular y división celular.
- Una mayor cantidad de células producirá más proteínas.
- Las proteínas se pueden degradar con el tiempo.



PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

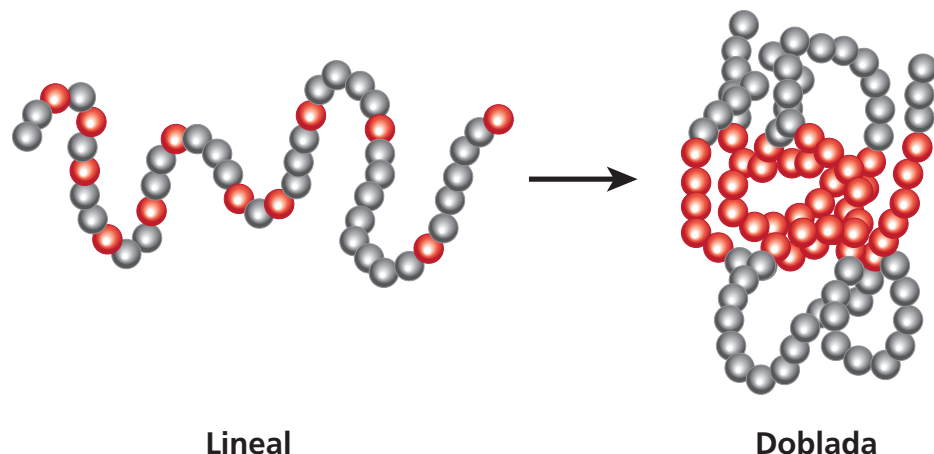
Cuando a las bacterias transformadas se les permite proliferar y multiplicarse, pueden producir suficientes proteínas terapéuticas para satisfacer las demandas de tratamiento de los pacientes. Sin embargo, es preciso purificar la proteína terapéutica separándola de los otros componentes de la célula incluyendo otras proteínas. (Una bacteria típica puede contener más de 1,000 clases diferentes de proteínas). La cromatografía de columna es un método que se usa para separar las proteínas.

¿Qué características físicas de las proteínas les permiten separarse mediante la cromatografía en columna? Si bien todas las proteínas están compuestas de aminoácidos, cada clase de proteína tiene una función específica y una conformación (forma) específica. La conformación se relaciona con la función porque la superficie externa de la proteína tiene puntos específicos que se unen a otras moléculas. Estos *puntos de unión* les permiten a las proteínas adherirse a otras moléculas, que es como las proteínas pueden catalizar las reacciones, transportar moléculas, proporcionar una señal y formar estructuras.

Cuando una proteína primero se sintetiza, es una cadena larga y flexible de aminoácidos, pero inmediatamente alcanza su conformación tridimensional mediante un proceso denominado *doblamiento de proteínas* (ver la **Figura 6.2**). Este doblamiento depende de las siguientes propiedades de los aminoácidos de la proteína:

- Formación de enlaces no covalentes débiles entre cadenas laterales de aminoácidos con carga positiva y con carga negativa.
- Tendencia a que los aminoácidos *hidrofóbicos* (insolubles en agua) se alojen en el interior de la proteína, fuera del agua, y a que los aminoácidos *hidrofílicos* (solubles en agua) se encuentren en la parte externa de la proteína, expuestos al agua.
- Formación de enlaces covalentes, denominados *puentes disulfuro*, entre aminoácidos que contienen sulfuro.

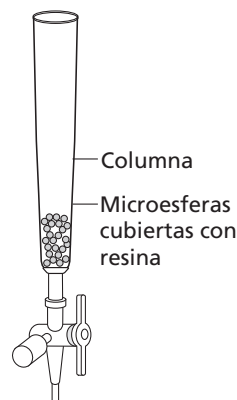
Figura 6.2: Doblamiento de una proteína



ATENCIÓN: Si una mutación cambia un aminoácido, ¿de qué forma este cambio podría afectar el doblamiento de las proteínas y su función?

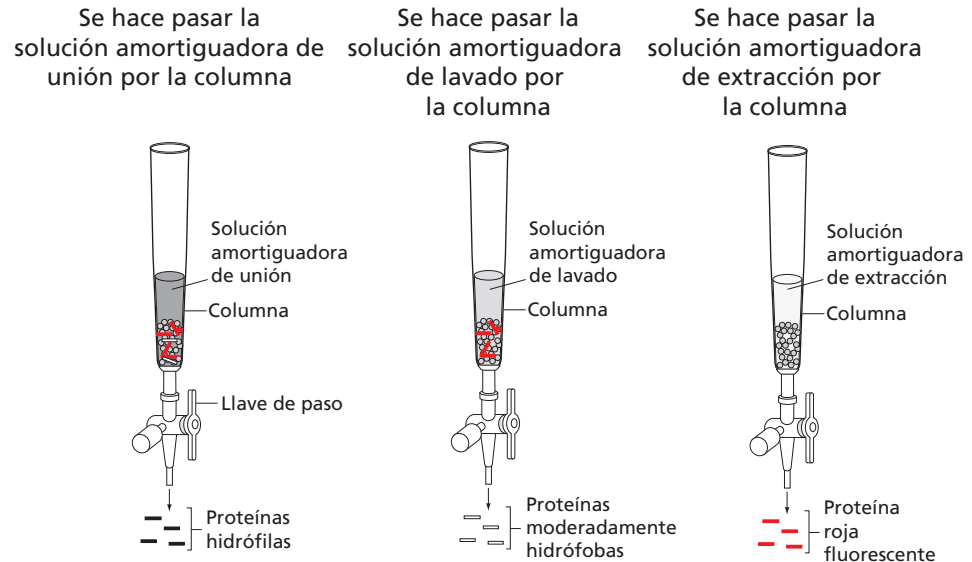


Las proteínas específicas son hidrofílicas o, hidrofóbicas según la cantidad relativa de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos que contienen. Las proteínas hidrofóbicas e hidrofílicas se pueden separar por cromatografía de columna. En este método, se rellena una columna con pequeñas microesferas recubiertas de un material (una *resina*) que atrae aminoácidos hidrofóbicos, y la mezcla de proteínas se disuelve y se hace pasar por las microesferas. Para que los aminoácidos hidrofóbicos se adhieran a la resina, las proteínas deben estar desdobladas para que queden expuestos los aminoácidos hidrofóbicos, que tienden a encontrarse en el interior de la proteína. Ciertas soluciones salinas denominadas *soluciones amortiguadoras* desdoblan las proteínas en diversos grados.



Se puede usar una serie de soluciones amortiguadoras con diferentes concentraciones de sal para separar varias proteínas entre sí. La **Figura 6.3** muestra cómo se usan tres soluciones amortiguadoras para separar la altamente hidrofóbica proteína roja fluorescente por cromatografía de columna. Se usa una solución amortiguadora de unión para desdoblar todas las proteínas, de modo que las proteínas hidrofóbicas se adhieran a la resina y las proteínas hidrofílicas pasen a través de la columna. Se vierte una solución amortiguadora de lavado dentro de la columna para liberar las proteínas moderadamente hidrofóbicas de la resina, y luego se vierte una solución amortiguadora de extracción dentro de la columna para liberar la proteína roja fluorescente de la resina. Tanto la solución amortiguadora de lavado como la de extracción tienen una concentración menor de sal que la solución amortiguadora de unión y, por ende, pueden hacer que las proteínas unidas se doblen y comiencen a cubrir sus aminoácidos hidrofóbicos. Las proteínas se liberan de las microesferas dependiendo del grado de doblamiento.

Figura 6.3: Separación de la proteína roja fluorescente por hidrofobia mediante cromatografía en columna



ATENCIÓN: Si intentaras usar la cromatografía en columna para separar la insulina de una mezcla de proteínas, ¿usarías las mismas soluciones amortiguadoras de unión, de lavado y de extracción usadas para la proteína roja fluorescente? ¿O usarías soluciones amortiguadoras con distintas concentraciones de sal? Explica el razonamiento de tu respuesta.

¿LO SABÍAS?

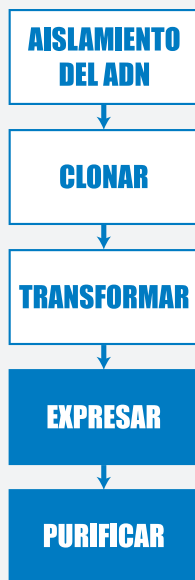
Proteínas recombinantes

Como has aprendido, cuando las proteínas recombinantes se producen para usarse como tratamiento en seres humanos, las células hospederas deben cultivarse en grandes cantidades para que se produzcan suficientes proteínas recombinantes para satisfacer la demanda del tratamiento (las necesidades de los pacientes). La proteína recombinante se aísla, se purifica y se analiza su actividad y calidad antes de salir al mercado.

Sin embargo, la producción de la proteína con la secuencia adecuada de aminoácidos no siempre es el fin del asunto. A veces se requiere un mayor procesamiento o modificación para lograr una proteína activa o totalmente funcional. Muchas proteínas humanas están glucosiladas, lo que significa que tienen un patrón específico de moléculas de azúcar vinculado. Si una proteína es traducida pero no está glucosilada correctamente, es posible que no funcione adecuadamente. Otra modificación implica el añadir un grupo fosfato: un proceso conocido como fosforilación. La fosforilación de una proteína puede actuar como una especie de interruptor, que permite que la proteína se vuelva más o menos activa descubriendo o cubriendo sus puntos de enlaces. Además de los grupos sacáridos (azúcar) y fosfato, se pueden agregar otros grupos químicos a una proteína con el fin de cambiar su función.

Entre las proteínas recombinantes para uso terapéutico se incluyen las *vacunas*, las *hormonas*, los *anticuerpos monoclonales* y los *factores de crecimiento hematopoyéticos* para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, el SIDA, las alergias y el asma. La cantidad de proteínas recombinantes ha aumentado en gran medida en los últimos años, ya que ha avanzado la tecnología usada para su producción y purificación.





PRÁCTICA DE LABORATORIO 6: PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA FLUORESCENTE

En el capítulo anterior transformaste bacterias y luego seleccionaste las bacterias que tenían el plásmido de interés colocando las células en una placa que contenía LB, ampicilina y arabinosa. Luego se seleccionó una *colonia* y se creció en un matraz que fue agitado para obtener una población grande de células idénticas que contengan, todas ellas, una o más copias del plásmido recombinante. Cerca del final de la fase exponencial de la proliferación bacteriana, las células recibieron arabinosa para activar el gen *rfp*, de modo que se produjera la proteína roja fluorescente. En la primera parte de esta práctica de laboratorio, usarás un reactivo denominado solución amortiguadora de lisis para lisis, o romper para abrir, las células. En la segunda parte de esta práctica, usarás la técnica de cromatografía en columna para purificar la proteína roja fluorescente.

ANTES DE LA PRÁCTICA DE LABORATORIO

Analiza las siguientes preguntas con tu grupo y prepárate para compartir tus respuestas con la clase.

1. ¿Cómo se pueden usar las soluciones con diferentes concentraciones de sal, que desdoblarán las proteínas en diversos grados, para ayudar a purificar la proteína roja fluorescente mediante cromatografía de columna?
2. Lee la sección Métodos para la *Parte A* (en las páginas E-12 y E-13) y para la *Parte B* (en las páginas E-13 a E-16) y describe brevemente los pasos con palabras y un diagrama de flujo.



SEGURIDAD: Se deben seguir todas las precauciones de seguridad adecuadas y usar el atuendo requerido en un laboratorio de ciencias. Consulta las indicaciones de tu profesor.



SEGURIDAD: Ten cuidado al manipular bacterias *E. coli* y usa una técnica aséptica.

La técnica aséptica es un conjunto de procedimientos que asegura la protección del personal de laboratorio y de la muestra bacteriana, lo cual es necesario para que el experimento sea exitoso. Específicamente:

- No toques nada que haya estado o vaya a estar en contacto con las bacterias *E. coli*. Sostén los tubos de microcentrifuga y las placas Petri desde afuera, sostén solo los mangos de los esparcidores de células, y no toques para nada la punta de las pipetas.
- Trata de evitar derrames o la contaminación de superficies con cualquier cosa que haya estado en contacto con bacterias *E. coli*. Avisa de inmediato a tu profesor si se produce un derrame o contaminación.
- Cuando hayas terminado de usar los tubos de microcentrifuga, las puntas de las pipetas y los esparcidores de células, colócalos de inmediato en la bolsa para residuos con riesgo biológico.
- Cuando te lo indiquen, coloca tus placas Petri de vuelta en las bolsas originales y después en la bolsa para residuos con riesgo biológico.
- Lávate bien las manos con jabón después de finalizar la práctica de laboratorio.

PARTE A: LISIS DE CÉLULAS CULTIVADAS EN EL AGITADOR MATERIALES

Reactivos

- Gradilla para tubos de microcentrifuga con lo siguiente:
 - Tubo de microcentrifuga del cultivo LB/amp/ara de *E. coli* (EC)
 - Tubo de microcentrifuga de solución amortiguadora de extracción (AE)
 - Tubo de microcentrifuga de solución amortiguadora de lisis (ALi)
- 1,000 µl (1 ml) adicionales del cultivo LB/amp/ara de *E. coli* (te la dará el profesor en el paso 6)

Equipo y suministros

- Microcentrifuga (se compartirá entre todos los grupos)
- Recipiente para desechos líquidos
- Micropipeta P-200
- Caja de puntas de pipeta desechables
- Marcador permanente
- Recipiente para residuos (se compartirá entre los grupos)
- Bolsa para residuos con riesgo biológico para materiales que entren en contacto con las células de *E. coli* (se compartirá entre los grupos)

MÉTODOS

1. Revisa la gradilla para asegurarte de que tengas los reactivos nombrados para la *Parte A*.
2. Examina el tubo EC y registra el color en tu libreta.
3. Antes de lisar las células, deberás separar las células del *medio* de cultivo. Para hacer esto, centrifuga el tubo EC en la microcentrífuga durante cinco minutos.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Distribuye los tubos de forma pareja en la microcentrífuga para que el peso quede equilibrado; asegúrate de que haya dos tubos del mismo volumen directamente enfrentados entre sí.



DETENTE Y PIENSA: ¿Cómo puedes determinar dónde está la proteína roja fluorescente en cada paso de separación?

4. Retira cuidadosamente el tubo EC de la microcentrífuga para evitar alterar el sedimento sólido que contiene las células bacterianas.
5. Fija la micropipeta P-200 en 200 μ l, coloca una punta nueva en la micropipeta y retira cuidadosamente el *sobrenadante* (líquido) del tubo EC sin alterar el sedimento celular. (Puedes verter el sobrenadante en el recipiente para desechos líquidos).
6. Llévale el tubo EC a tu profesor, que agregará 1,000 μ l (1 ml) del cultivo LB/amp/ara de *E. coli* en tu tubo EC.
7. Repite los pasos 3 a 5 (centrifuga el tubo durante 5 minutos y retira el líquido).



DETENTE Y PIENSA: ¿De qué color es el sobrenadante? ¿Y el sedimento? ¿Qué contiene cada uno?

8. Invierte el tubo EC que contiene el sedimento celular, y con la micropipeta retira todo el líquido que puedas sin tocar el sedimento celular.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Asegúrate de usar una punta de micropipeta nueva para cada reactivo, a fin de evitar la contaminación.

9. Con la pipeta P-200, agrega 150 μ l de AE al sedimento celular en el tubo EC.
10. Cierra bien la tapa del tubo EC y pasa el tubo con fuerza por toda la superficie de la gradilla para tubos de microcentrífuga para resuspender las células. Examina atentamente el tubo EC. Si hay masas visibles de células, vuelve a pasar con fuerza el tubo por la superficie de la gradilla para tubos de microcentrífuga.
11. Con la pipeta P-200, agrega 150 μ l de ALi al tubo EC. Cierra bien la tapa del tubo EC y pasa el tubo con fuerza por toda la superficie de la gradilla para tubos de microcentrífuga, dos veces, para mezclar.
12. Rotula el tubo EC con tu número de grupo y período de clase, y dáselo al profesor, quien incubará las células durante la noche a temperatura ambiente.
13. Coloca todos los tubos de microcentrífuga y las puntas de las pipetas en la bolsa para residuos con riesgo biológico.

PARTE B: SEPARACIÓN DE LA PROTEÍNA ROJA FLUORESCENTE POR CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA

MATERIALES

Reactivos

- Gradilla para tubos de microcentrífuga con el tubo de microcentrífuga de las células lisadas (EC, de la *Parte A* de esta práctica de laboratorio)
- Recipientes con lo siguiente:
 - Solución amortiguadora de unión (AU)
 - Solución amortiguadora de lavado (ALa)
 - Solución amortiguadora de extracción (AE)
 - Solución amortiguadora de equilibrado de la columna (EqC)

Equipo y suministros

- 2 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Recipiente para desechos líquidos
- Micropipeta P-1000
- Caja de puntas de pipeta desechables
- Columna de cromatografía
- Microcentrífuga (se compartirá entre todos los grupos)
- Recipiente para residuos (se compartirá entre los grupos)

MÉTODOS

1. Asigna las tareas en tu grupo. Haz que una persona controle que estén listos los materiales (pasos 2 a 3), que otra persona prepare la columna de cromatografía (pasos 4 a 5) y que otra persona centrifugue las células lisadas y retire el sobrenadante (pasos 6 a 7).
2. Revisa que tengas todos los reactivos nombrados.
3. Rotula dos tubos de microcentrífuga limpios como "SUPER" y "RFP".
4. Prepara tu columna de cromatografía según lo indicado por tu profesor, teniendo cuidado de no mover la válvula de paso fijada en la parte inferior del tubo.



TÉCNICA DE LABORATORIO: No dejes que se seque la columna.

5. Prepara la columna:
 - a. Coloca el recipiente para desechos líquidos debajo de la válvula de paso.
 - b. Abre la columna con cuidado girando la válvula de paso, y deja drenar el líquido dentro del recipiente para desechos.
 - c. Cierra la válvula una vez que quede alrededor de 1 a 2 mm de líquido sobre la resina.
 - d. Asegúrate de que no drene líquido de la columna en el recipiente para desechos.
6. Centrifuga el tubo EC en la microcentrífuga durante cinco minutos para formar un sedimento con los restos celulares.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Distribuye los tubos de forma pareja en la microcentrífuga para que el peso esté equilibrado.



DETENTE Y PIENSA: Las tres soluciones amortiguadoras que usarás en esta práctica de laboratorio son la solución amortiguadora de unión (AU), la solución amortiguadora de lavado (ALa) y la solución amortiguadora de extracción (AE). ¿Qué función cumple cada una?

7. Examina el tubo. Deberías ver un sobrenadante y un sedimento sólido.



DETENTE Y PIENSA: ¿De qué color es el sobrenadante? ¿Y el sedimento? ¿Qué contiene cada uno?



TÉCNICA DE LABORATORIO: Asegúrate de usar una punta de micropipeta nueva para cada reactivo, a fin de evitar la contaminación.

8. Con la pipeta P-1000, retira cuidadosamente 200 μ l de sobrenadante de EC sin alterar el sedimento de restos celulares, y vierte el sobrenadante dentro del tubo SUPER. Si mueves el sedimento de restos, tendrás que volver a centrifugar el tubo.
9. Con una punta nueva, agrega 200 μ l del AU al tubo SUPER. Mezcla inyectando y extrayendo suavemente la solución.
10. Con la misma punta pero con otro volumen, agrega 400 μ l de la mezcla del tubo SUPER en la columna de cromatografía. Vierte cuidadosamente la solución por el costado de la columna para evitar alterar la superficie de la resina.
11. Abre la válvula y deja drenar la solución de la columna dentro del recipiente para desechos. Cierra la válvula una vez que quede alrededor de 1 a 2 mm de líquido sobre la resina.
12. Examina la columna y ubica la proteína roja fluorescente. ¿La proteína roja fluorescente está esparcida por toda la parte superior de la resina o parece estar restringida a una sola banda? Registra tus observaciones en la libreta.
13. Con una punta nueva, agrega suavemente 1000 μ l (1 ml) de ALa por el costado de la columna de cromatografía.
14. Abre la válvula y deja drenar la solución de la columna dentro del recipiente para desechos. Cierra la válvula una vez que quede alrededor de 1 a 2 mm de líquido sobre la cama de resina.
15. Examina la columna y ubica la proteína roja fluorescente. ¿Ha cambiado la ubicación de la proteína roja fluorescente en el lecho de resina?
16. Con una punta nueva, agrega suavemente 1,000 μ l de AE dos veces (2 ml en total) por el costado de la columna de cromatografía.
17. Fija el tubo RFP debajo de la válvula de paso. Abre la válvula y deja drenar la parte del eluado que es roja dentro del tubo RFP. Cierra la válvula y tapa el tubo cuando termines.
18. Vuelve a colocar el recipiente para desechos debajo de la válvula de paso. Abre la válvula y deja que drene el resto del eluado dentro del recipiente para desechos. Cierra la válvula una vez que quede alrededor de 1 a 2 mm de líquido sobre el lecho de resina.
19. Con una punta nueva, agrega 1,000 μ l de EqC dos veces (2 ml en total) en la columna de cromatografía para prepararla para la clase siguiente. Cierra bien la columna.

20. Vierte el contenido del recipiente para desechos por el drenaje del lavado.
21. Compara tu tubo RFP con los tubos RFP de otros grupos. ¿Hay alguna diferencia en la intensidad del color entre las muestras? Registra tus observaciones en la libreta.

PREGUNTAS DEL CAPÍTULO 6

1. ¿Por qué es importante la conformación de la proteína para desempeñar su función?
2. ¿Qué propiedades de los aminoácidos en una proteína se relacionan con su doblamiento?
3. ¿El eluado que contiene la proteína roja fluorescente parece menos o más brillante que como se veía en el lisado celular luego del centrifugado? Si hay una diferencia notoria en la intensidad del color rojo, ¿qué sería el causante de esto?
4. ¿Qué característica de la proteína roja fluorescente se usa como base para la separación por cromatografía en columna?
5. ¿Cómo se podría ajustar o modificar el procedimiento de cromatografía en columna para aumentar la pureza de la muestra de proteína roja fluorescente?



¿LO SABÍAS?

Proteínas quiméricas

Cuando determinaste qué bacterias habían tomado el plásmido recombinante que tenía el gen *rfp*, pudiste ver la colonia transformada porque las bacterias fluorescieron en rojo al ser expuesta a la luz. La capacidad de una proteína fluorescente (PF) para “encenderse” es una herramienta poderosa que está revolucionando la biología celular y la investigación biomédica. Se han aislado muchas PF de diferentes organismos e incluso han mutado para brindar un conjunto de herramientas de “etiquetas” de PF. Las PF se pueden fijar a otras moléculas para controlar procesos que se producen dentro de las células y en todo el cuerpo.

La función de una proteína está directamente relacionada con su conformación, que es el resultado de su doblamiento. Otras clases de datos importantes que arrojaron luz sobre la función de una proteína son su distribución, movimiento, interacciones y asociación a otras proteínas. Para visualizar estos aspectos de una proteína, los científicos crean una molécula conocida como proteína de fusión o proteína quimérica, que contiene la proteína de interés y una PF fusionadas. (La quimera es un animal mitológico que tiene partes de distintos animales). Los científicos pueden medir la *fluorescencia* de una sola PF, lo que convierte a las proteínas de fusión en potentes herramientas de visualización. Sin embargo, este procedimiento solo funciona si la PF no interfiere en la función de la proteína, por lo que se realizan pruebas para asegurar que la proteína en particular actúe del mismo modo con y sin la etiqueta de PF.

GLOSARIO DEL CAPÍTULO 6

Aminoácido: Componente básico de las proteínas. Existen 20 aminoácidos. Cada aminoácido es una sustancia orgánica que tiene dos grupos adheridos: un grupo amino (NH_2) y un grupo carboxilo (COOH).

Anticuerpo monoclonal: Tipo de proteína que se une a sustancias del cuerpo y está compuesta de clones de una célula formada en el laboratorio.

Colonia: Grupo de la misma clase de organismos que viven juntos y bien cerca, normalmente para beneficio mutuo. Dentro de una colonia bacteriana, todos los organismos descienden de un solo ancestro y son genéticamente idénticos (excepto por las mutaciones y la contaminación).

Conformación: Forma o estructura tridimensional de algo.

Cromatografía de columna: Método para separar sustancias en el que las sustancias se disuelven en un líquido que se hace fluir a través de una columna de vidrio llena de microesferas pequeñas. Las microesferas están recubiertas de un material que une las sustancias en diferentes grados.

Cultivo de suspensión: Método para la proliferación de células en un medio de cultivo líquido que se mueve agitándolo o revolviéndolo. El movimiento mezcla aire dentro de la suspensión y evita que las bacterias se separen de la solución.

Doblamiento de proteínas: Proceso físico por el cual un polipéptido se dobla y adopta su estructura tridimensional característica, que es esencial para la función de la proteína.

Eluado: Solución que se lava (p. ej., soluciones que gotean de una columna de cromatografía).

Factor de crecimiento hematopoyético: Grupo de proteínas que promueve el crecimiento, la diferenciación y la actividad de las células sanguíneas.

Fase de adaptación: Período de proliferación bacteriana en un cultivo, cuando las bacterias se adaptan a las condiciones de proliferación. Las bacterias individuales están madurando y aún no se pueden dividir.

Fase de muerte: Período de proliferación bacteriana en un cultivo, cuando las bacterias se quedan sin nutrientes y mueren.

Fase estacionaria: Período de la proliferación bacteriana en un cultivo, cuando la población sigue siendo la misma porque los índices de división celular y de muerte celular son iguales. Esto a menudo se debe a un factor de limitación de la proliferación, como la disminución de un nutriente esencial.

Fase exponencial: Período de proliferación bacteriana en un cultivo, cuando la cantidad de células bacterianas se duplica en un tiempo fijo (también conocido como fase logarítmica o exponencial).

Fluorescencia: Generación de luz por una molécula (p. ej., la proteína roja fluorescente emitirá una luz roja al ser expuesta a la luz ultravioleta).

Hidrófilo: Afín al agua; se disuelve en agua; polar. El azúcar y la sal son dos ejemplos de esto.

Hidrófobo: Que rechaza el agua; no se disuelve en agua; apolar. El aceite, la cera y la proteína roja fluorescente son algunos ejemplos de esto.

Hormonas: Sustancias que actúan como mensajeros químicos en el cuerpo.

Lisar: Abrir mediante rotura.

Medio: Solución que contiene sustancias que sustentan la proliferación de microorganismos. El medio puede solidificarse añadiendo agar. Luria Broth es un ejemplo de un medio.

Punto de unión: Área de una biomolécula que se une a una sustancia específica o parte de una sustancia.

Resina: Material usado en una columna de cromatografía para recubrir las microesferas.

Sobrenadante: Líquido transparente que se encuentra en la parte superior de un precipitado sólido luego de haber centrifugado una mezcla.

Solución amortiguadora: Solución que resiste cambios en el pH, que contiene un ácido débil y su sal o una base débil y su sal.

Vacuna: Mezcla que hace que el sistema inmunitario del cuerpo produzca anticuerpos que se unirán a una bacteria o virus para combatir una enfermedad. La mezcla contiene bacterias o virus muertos o debilitados.

