

## Tercera sesión de clase

### Transformando bacterias

El fenómeno conocido como transformación bacteriana es de vital importancia en biología molecular. Por este proceso es posible la introducción de plásmidos (pequeñas moléculas de DNA circular) fabricados o naturales dentro de las bacterias. La segunda etapa es la propagación, expresión genética y aislamiento del DNA de los plásmidos.

El proceso de transformación incluye la introducción de DNA exógeno (que no pertenece a la bacteria) en las células bacterianas, y este DNA pasa entonces a ser parte del material genético de la bacteria, pudiendo ser heredado por las nuevas células todas las veces en que la bacteria se multiplique, o sea, a través de la manipulación genética, podemos crear un carácter presente en la bacteria que pasará a ser hereditario. Sin embargo, para permitir la entrada de DNA plasmidial en las células bacterianas, las bacterias deben presentar condiciones fisiológicas especiales. Este estado fisiológico especial es llamado de competencia. Una bacteria competente es una bacteria que está apta para recibir DNA exógeno. La competencia puede ocurrir naturalmente o puede ser producida a través de diferentes técnicas. Estas técnicas incluyen el tratamiento con soluciones, tales como cloruro de calcio, y cambios bruscos de temperatura. Los iones de metal y los cambios bruscos de temperatura alteran la permeabilidad de la pared celular, lo que hace que estas células permitan la entrada de DNA exógeno a través de la membrana celular. Las bacterias competentes son bastante frágiles y deben ser manipuladas con cuidado.

La cantidad de células transformadas por 1 microgramo de DNA es llamada eficiencia de la transformación. En la práctica poca cantidad de DNA es utilizada (5 a 100 nanogramos), ya que mucho DNA puede inhibir la transformación. Muchos plásmidos sirven como instrumentos útiles para el biólogo molecular. Un ejemplo es el pGAL, presente en muchas copias en líneas específicas de E. coli. Este plásmido fue modificado por técnicas de ingeniería genética (la figura 1 representa el mapa circular del pGAL). En la célula, este plásmido no se une al cromosoma bacteriano, si no que se replica independientemente.

Modificaciones en este plásmido incluyen la adición del gen lac Z que produce una enzima llamada galactosidasa. La presencia de esta enzima hace que la colonia de la bacteria que tiene en su interior este plásmido sea azul cuando es colocada en presencia del compuesto químico X-gal. Esto ocurre porque la ruptura del compuesto químico X-gal por la enzima galactosidasa forma un producto coloreado de azul. Cuando adicionamos un fragmento exógeno de DNA (que no pertenece al plásmido) dentro del plásmido, lo hacemos a través de una reacción llamada de ligación. Antes de la reacción de ligación, cortamos el DNA circular del plásmido con una enzima de restricción X y utilizamos la misma enzima de restricción para aislar el fragmento de DNA exógeno que se pretende introducir en el plásmido.

Así, tanto el plásmido como el fragmento de DNA poseerán lo que llamamos extremidades cohesivas, o sea, las extremidades son complementarias. El sitio de restricción de la enzima utilizada para cortar el plásmido se localiza exactamente en la región donde está el gen que codifica la enzima B-galactosidasa. Así, cuando el plásmido es cortado y

introducimos un fragmento de DNA exógeno en esta región, el gen que produce la enzima Beta-galactosidasa es destruido. Siendo así, las colonias de bacterias que tuvieren el plásmido que posee la enzima Beta-galactosidasa intacta en su interior van a producir colonias azules, mientras que la colonia de bacteria que posea el plásmido cuya enzima Beta-galactosidasa fue destruida producirá colonias blancas.

Las bacterias utilizadas en este experimento no poseen este gen, por lo tanto, cuando las bacterias no contienen el plásmido con ese gen, ellas producirán colonias blancas. De este modo puede saberse cuáles colonias bacterianas no poseen el plásmido en su interior y cuáles colonias poseen el plásmido. Es importante observar que el gen de la enzima galactosidasa está presente apenas en los plásmidos, y no está presente en el genoma de la bacteria, o sea, la bacteria depende de la presencia del plásmido en su interior para poder tener esta enzima.

Otro instrumento importante utilizado en experimentos de clonación es el antibiótico. Las bacterias utilizadas en este experimento no son resistentes al antibiótico ampicilina. Sin embargo, el plásmido utilizado posee el gen de resistencia a la ampicilina. De este modo, apenas las bacterias que contienen el plásmido en su interior serán resistentes a la ampicilina. Las que no poseen el plásmido morirán en presencia de ampicilina. Normalmente las bacterias no presentan resistencia a antibióticos y, por eso, cuando estamos con cualquier tipo de infección bacteriana, tomamos antibióticos como tratamiento.

En esta clase vamos a transformar una línea bacteriana con un plásmido específico y podremos observar todos los fenómenos descritos anteriormente.

Actividad:

**Cada grupo debe tener:**

- ❑ 1 placa con la inscripción X-gal
- ❑ 2 placas con la inscripción AMP-X-Gal
- ❑ 1 tubo test en el hielo con la inscripción pGal DNA
- ❑ 1 tubo test en el hielo con la inscripción tampón de control
- ❑ 1 tubo de células en el hielo con la inscripción Células para DNA
- ❑ 1 tubo de células en el hielo con la inscripción Células para control

### **Preparación de la transformación y del control**

Coloque el baño a 42°C.

- 1) Coloque las iniciales de su grupo en los tubos pGAL DNA y tampón de control.
- 2) Transfiera todo el volumen de células del tubo células para DNA para el tubo "pGAL DNA
- 3) Cierre el tubo, muévelo dando golpecitos y colóquelo de nuevo en el hielo
- 4) Transfiera todo el volumen de células del tubo células para control para el tubo tampón de control
- 5) Cierre el tubo, muévelo dando golpecitos y colóquelo de nuevo en el hielo
- 6) Deje las células en el hielo por 10 minutos

### **Procedimiento para la transformación**

- 1) Coloque las células a 42°C por 1 minuto y medio.
- 2) Coloque los tubos de nuevo en el hielo por 1 minuto
- 3) Adicione 0,75 ml de medio al tubo pGAL DNA
- 4) Haga lo mismo para el tubo tampón de control
- 5) Deje los tubos incubando a 37°C por 30 minutos
- 6) Recoja los tubos y déjelos a temperatura ambiente

### **Plaqueamiento y selección de bacterias**

- 1) Coloque las iniciales de su grupo en todas las placas
- 2) En la placa con la inscripción X-Gal, escriba: **control 1**
- 3) En una de las placas con la inscripción AMP-X-Gal, escriba: **control 2**, y en la otra escriba: **DNA**

### **Plaqueamiento de células del tubo control**

- 1) Dispense 0,25 ml del tubo tampón de control en las placas escritas **control 1** y **control 2**
- 2) Disperse las células
- 3) Espere secar

### **Plaqueamiento de células del tubo de DNA**

- 1) Dispense 0,25 ml del tubo pGAL DNA en la placa escrita **DNA**
- 2) Disperse las células
- 3) Espere secar

Deje incubando en la bancada de cabeza para abajo!