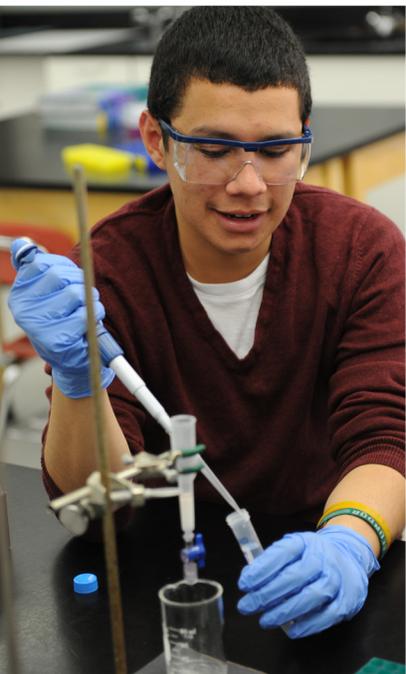
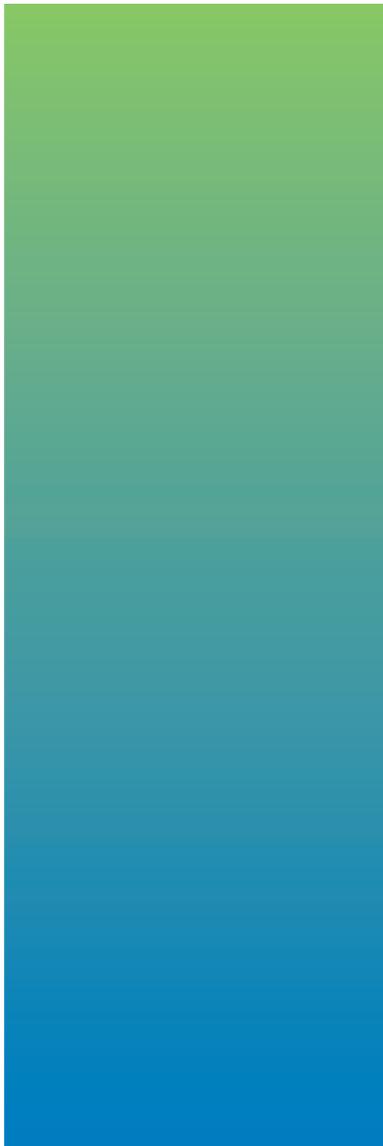


AMGEN® Biotech Experience

Descubrimiento científico para el aula

Guía del estudiante



ÍNDICE

PESTAÑA A

SOBRE AMGEN BIOTECH EXPERIENCE	A-1
INTRODUCCIÓN AL PROGRAMA	A-3
Lectura: ¿Qué es la biotecnología?	A-5
Glosario de la introducción al programa	A-9
CAPÍTULO 1: ALGUNAS HERRAMIENTAS DEL TRABAJO	A-11
Introducción	A-13
Laboratorio 1.1: Cómo utilizar una micropipeta	A-14
Laboratorio 1.2: Electroforesis en gel	A-18
Preguntas del Capítulo 1	A-24
Glosario del Capítulo 1	A-25

PESTAÑA B

CAPÍTULO 2: ¿CÓMO SE COMIENZA A CLONAR UN GEN?	B-1
Introducción	B-3
Lectura: Su desafío	B-4
Lectura: Comenzar a clonar un gen	B-5
Lectura: Producción de proteínas terapéuticas humanas en bacterias	B-9
Actividad: Clone ese gen	B-12
Laboratorio 2: Preparación para clonar el gen <i>rfp</i> : digerir el pKAN-R y el pARA	B-15
Preguntas del Capítulo 2	B-19
Glosario del Capítulo 2	B-20

CAPÍTULO 3: CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE **B-23**

Introducción	B-25
Lectura: Pegar los fragmentos de ADN	B-26
Laboratorio 3: Construcción del plásmido pARA-R	B-30
Preguntas del Capítulo 3	B-33
Glosario del Capítulo 3	B-34

CAPÍTULO 4: CÓMO ASEGURARSE DE QUE HA CREADO UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE **B-35**

Introducción	B-37
Lectura: ¿Por qué es necesario que verifique?	B-38
Laboratorio 4: Verificación de la restricción y la ligación mediante electroforesis en gel	B-43
Preguntas del Capítulo 4	B-48
Glosario del Capítulo 4	B-49

CAPÍTULO 5: INTRODUCCIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN LAS BACTERIAS **B-51**

Introducción	B-53
Lectura: Transformación de bacterias con plásmidos recombinantes	B-54
Laboratorio 5: Transformación de bacterias con los productos de ligación	B-58
Preguntas del Capítulo 5	B-66
Glosario del Capítulo 5	B-67

PESTAÑA C**CAPÍTULO 2A: ¿CÓMO SE COMIENZA A CLONAR UN GEN?** **C-1**

Introducción	C-3
Lectura: Su desafío	C-4
Lectura: Comenzar a clonar un gen	C-5
Lectura: Producción de proteínas terapéuticas humanas en bacterias	C-10
Actividad: Clone ese gen	C-12
Laboratorio 2A: Preparación para verificar el gen <i>rfp</i> : digerir el plásmido pARA-R	C-15
Preguntas del Capítulo 2A	C-19
Glosario del Capítulo 2A	C-20

CAPÍTULO 4A: CÓMO ASEGURARSE DE QUE HA CREADO UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE **C-23**

Introducción	C-25
Lectura: ¿Por qué es necesario que verifique?	C-26
Laboratorio 4A: Verificación del plásmido recombinante mediante electroforesis en gel	C-31
Preguntas del Capítulo 4A	C-35
Glosario del Capítulo 4A	C-36

CAPÍTULO 5A: INTRODUCCIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN LAS BACTERIAS **C-37**

Introducción	C-39
Lectura: Transformación de bacterias con plásmidos recombinantes	C-40
Laboratorio 5A: Transformación de bacterias con el plásmido pARA-R	C-45
Preguntas del Capítulo 5A	C-54
Glosario del Capítulo 5A	C-55

PESTAÑA D**CAPÍTULO 5B: INTRODUCCIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN LAS BACTERIAS** **D-1**

Introducción	D-3
Lectura: Su desafío	D-4
Lectura: Plásmidos y enzimas de restricción	D-5
Lectura: Producción de proteínas terapéuticas humanas en bacterias	D-8
Actividad: Clone ese gen	D-11
Lectura: Transformación de bacterias con plásmidos recombinantes	D-14
Laboratorio 5B: Transformación de bacterias con un plásmido recombinante (pARA-R)	D-18
Preguntas del Capítulo 5B	D-26
Glosario del Capítulo 5B	D-28

PESTAÑA E**CAPÍTULO 6: CÓMO OBTENER LO QUE NECESITAMOS** **E-1**

Introducción	E-3
Lectura: Producción de la proteína de interés	E-5
Laboratorio 6: Purificación de la proteína fluorescente	E-10
Preguntas del Capítulo 6	E-16
Glosario del Capítulo 6	E-17

A

AMGEN[®] Biotech Experience

Descubrimiento científico para el aula

AMGEN[®] Foundation

SOBRE AMGEN BIOTECH EXPERIENCE

La ingeniería genética es una rama de la biotecnología que utiliza procedimientos y técnicas especiales para cambiar el ADN de un organismo. Esta capacidad ha tenido un gran 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 salvan vidas. No es frecuente que los estudiantes de secundaria tengan la oportunidad de aprender y practicar los procedimientos y técnicas que son la base de la industria de la biotecnología, pero a través de este programa, tendrá esa oportunidad. A medida que trabaje en el laboratorio y realice los mismos experimentos que condujeron a importantes avances en biotecnología, ganará experiencia práctica en la producción de bacterias modificadas genéticamente.

Los procedimientos de este programa se desarrollaron a través de una serie de descubrimientos que condujeron a importantes avances en biotecnología. Algunos de los científicos pioneros que hicieron estos descubrimientos recibieron los Premios Nobel de Fisiología o Medicina en 1978 y de Química en 1980 y 1993. (El Premio Nobel es la distinción más alta otorgada a los científicos de estas disciplinas de todo el mundo). El trabajo que está a punto de realizar se basa en esta ciencia ganadora de Premios Nobel, una ciencia que es importante y que seguirá desempeñando un papel importante en el desarrollo de la biotecnología y la medicina. Seguirá los pasos de los muchos científicos que han impulsado y continúan impulsando los límites de la biotecnología. Aún quedan muchos avances por hacer, y los alumnos que decidan continuar estudiando este campo pueden contribuir a esos avances.

En la ciencia, la capacidad de llevar el control de lo que está haciendo e informar acerca de su trabajo es extremadamente importante. Para demostrar que realizó un experimento, ya sea para que otros puedan replicarlo y verificarlo, o si desea solicitar una patente, debe contar con un registro muy preciso de lo que ha hecho. A medida que lleva a cabo este programa, registre cuidadosamente sus apuntes, ideas, observaciones, resultados y respuestas a las preguntas en un cuaderno de ciencias, con un bolígrafo. (Para fines científicos, es importante mantener un registro, incluso de sus errores). Si es posible, use un cuaderno de tapa dura para composiciones por separado y organice los laboratorios con un índice adelante. Ya que usará un bolígrafo para escribir, tendrá que

tachar los errores que cometa, y es una buena práctica colocar simplemente una "X" en la sección que desea cambiar (para que aún pueda leerse) y para saber por qué lo hizo. ¡Seguir estas mejores prácticas hará que este programa sea aún mejor para usted!

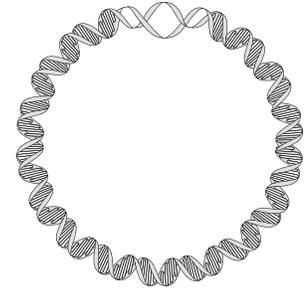
Amgen Biotech Experience (anteriormente Programa de Laboratorio de Biotecnología Amgen-Bruce Wallace) tuvo comienzos humildes hace 30 años con científicos y profesores visionarios que compartieron pasión y energía para impartir sus conocimientos con los estudiantes. Bruce Wallace, uno de los primeros empleados de Amgen, quería que todos los estudiantes experimentaran la alegría del descubrimiento y la emoción de tener la ciencia al alcance de sus manos. El deseo de una educación científica más sólida en las escuelas cerca de la sede mundial de Amgen llevó a involucrar a los profesores de escuelas secundarias del área y, más tarde, a un profesor universitario, para desarrollar un plan de estudios y capacitación de educadores en biotecnología. El programa creció a través del boca a boca y el interés de los profesores, y se expandió con el tiempo a otros estados y países.

Visite el sitio web de ABE en www.amgenbiotechexperience.com.



INTRODUCCIÓN AL PROGRAMA

AMGEN BIOTECH EXPERIENCE



¿QUÉ ES LA BIOTECNOLOGÍA?

En su forma más simple, la biotecnología es el uso de sistemas biológicos para crear productos. El uso de la levadura para hacer pan es uno de los primeros ejemplos de humanos que utilizan un proceso biológico (fermentación por levadura) para crear un producto deseado (alimento).

No fue hasta la década de 1970 que la ciencia de la biotecnología realmente despegó cuando los científicos hicieron dos descubrimientos clave sobre las bacterias. El primer descubrimiento fue que las bacterias contienen pequeños círculos de **ADN** (ácido desoxirribonucleico, una biomolécula de doble cadena que codifica información genética), llamados **plásmidos** dentro de ellas. El segundo fue que las bacterias también contienen **proteínas** (grandes biomoléculas que desempeñan funciones esenciales en las células) llamadas **enzimas de restricción** que pueden cortar el ADN en lugares muy específicos.

Los hallazgos hechos por la investigación básica a menudo ayudan a comprender mejor aspectos fundamentales sobre la naturaleza de la vida. En algunos casos, estos hallazgos también pueden conducir a nuevas herramientas y tecnologías que pueden mejorar la vida. Con el descubrimiento de los plásmidos y las enzimas de restricción, por ejemplo, se lanzó una nueva era de la biotecnología utilizando tecnología de ADN recombinante. El **ADN recombinante** se refiere al ADN que contiene secuencias o genes de dos o más fuentes, ¡a veces incluso de dos especies diferentes! Al aprovechar los procesos biológicos naturales, los científicos pueden generar productos que pueden contribuir a la sociedad humana de maneras nunca antes imaginadas.

La biotecnología moderna ahora se utiliza para desarrollar cientos de productos y tecnologías, para crear combustibles para impulsar el mundo, desarrollar mejores sistemas para la producción de alimentos y mejorar la salud humana.

ESTUDIO DE LA BIOLOGÍA HUMANA PARA TRATAR ENFERMEDADES

Los investigadores biofarmacéuticos estudian la biología humana para comprender mejor cómo desarrollar soluciones para mejorar la vida de las personas que padecen enfermedades graves. Para hacerlo, estos investigadores

estudian una enfermedad de cerca, explorando sus mecanismos y los cambios que causa en el cuerpo humano. Sobre la base de esta investigación, los científicos pueden desarrollar terapias biofarmacéuticas que aprovechan los sistemas biológicos para tratar o curar estas enfermedades.

La industria biofarmacéutica marcó el comienzo de una nueva era de medicamentos basados en proteínas que se producen a través de la unión de la ciencia y la maquinaria molecular de **células** (las unidades básicas de cualquier organismo vivo que llevan a cabo los procesos bioquímicos de la vida). Los primeros fármacos biotecnológicos fueron versiones de proteínas humanas genéticamente modificadas: moléculas grandes demasiado complejas para ensamblarse a través de procesos químicos, pero que podrían obtenerse mediante el aprovechamiento de células con ADN diseñado estratégicamente. Hoy, los ingenieros de proteínas pueden reconfigurar los bloques de construcción de la naturaleza para diseñar estructuras innovadoras que combatan las enfermedades de una manera más sofisticada.

¿Cuál es la relación entre el ADN y las proteínas? Ambos son **biomoléculas**, es decir, grandes moléculas conformadas por células vivas. Cuando los científicos investigaron **rasgos** (características determinadas genéticamente) en los organismos, descubrieron que las proteínas eran responsables de los rasgos y que el ADN era responsable de la creación de proteínas. Por ejemplo, considere una planta que tiene el rasgo de flores rojas. El pigmento rojo de las flores se produce por la acción de una **enzima** (una proteína que aumenta la velocidad de una reacción química). El ADN en esa planta contiene instrucciones para hacer proteínas, incluida esa enzima. La parte de una molécula de ADN que tiene las instrucciones para producir una proteína en particular se llama **gen**.

EL FUTURO DE LA BIOFARMACÉUTICA

Con nuestra comprensión avanzada del genoma humano y la gran cantidad de datos sobre el genoma humano disponibles en la actualidad, los investigadores de biofarmacéutica están encontrando nuevas formas de identificar la base genética de las enfermedades y las respuestas individuales a los tratamientos para que puedan dirigir las terapias a personas específicas. Los médicos pueden identificar a los pacientes para quienes ciertos medicamentos son ineficaces debido a su perfil genético y, en su lugar, elegir opciones que funcionen mejor para esa persona. El estudio del genoma humano y sus variaciones permite a los investigadores comprender mejor las diferencias genéticas relacionadas con la enfermedad de diversas poblaciones de personas y luego usar esa comprensión para desarrollar mejores medicamentos.

Los investigadores de biofarmacéutica también están trabajando en el desarrollo de nuevos mecanismos para tratar enfermedades. Los nuevos medicamentos contra el cáncer “dirigidos”, por ejemplo, generan enorme expectativa en la industria de la biotecnología. Los medicamentos quimioterapéuticos, el tratamiento tradicional para el cáncer, atacan y destruyen las células que se dividen rápidamente. Lamentablemente, estos medicamentos a menudo causan un “daño colateral” significativo porque no pueden diferenciar entre las células cancerosas que se dividen rápidamente y las células normales que se dividen rápidamente.

La quimioterapia puede destruir las células sanguíneas sanas, los folículos pilosos y las células que recubren el estómago y el tracto digestivo, lo que provoca que los pacientes experimenten efectos secundarios debilitantes como resultado del uso de estos medicamentos. Los investigadores están trabajando arduamente para crear medicamentos que eliminen eficazmente las células cancerosas pero que no dañen los tejidos sanos. Los médicos son especialmente optimistas sobre el futuro de varios medicamentos de inmunoterapia desarrollados recientemente, que permiten que el propio sistema inmunológico de un paciente combata su cáncer. Uno de estos fármacos es un tipo de anticuerpo sintético, que solo es atraído por las proteínas ubicadas en las células tumorales. Una vez unidos a una célula tumoral, estos anticuerpos liberan varias proteínas que inducen la muerte celular programada (apoptosis) y hacen que la célula explote. La capacidad de eliminar de manera selectiva las células cancerosas sin dañar las células sanas sería un enorme paso hacia adelante en el tratamiento del cáncer.

El campo de la **ingeniería genética** (el proceso de alterar el material genético de las células u organismos para permitirles producir nuevas sustancias o realizar nuevas funciones) que comenzó en la década de 1970 revolucionó la medicina. Cada año que pasa, el ritmo del descubrimiento se acelera y aumentan nuestros conocimientos sobre el papel de la genética en la salud humana. La tecnología que nos permite editar el ADN de manera rápida y eficiente se aplica al desarrollo de 42 nuevos productos farmacéuticos e incluso se está explorando como una forma de reemplazar los genes defectuosos en las células somáticas humanas, por ejemplo, para reemplazar un gen defectuoso que causa la fibrosis quística por un gen funcional. Otro avance reciente permite a los investigadores reprogramar células adultas en células madre embrionarias y luego inducir a esas células a convertirse en cualquier tipo de célula. Estas células se pueden usar para crear órganos modelo en los que se pueden probar fármacos fuera del cuerpo humano. Estas tecnologías, y otras que aún no se han previsto, están cambiando el futuro de la medicina y brindando una mejora espectacular en la salud humana y el tratamiento de enfermedades.

¿SABÍA?

El código del ADN

La información del ADN está codificada por la disposición de **nucleótidos**, pequeñas moléculas que se unen para formar la molécula de ADN. Una molécula de ADN tiene millones de nucleótidos. Hay cuatro tipos diferentes de nucleótidos, y estos se organizan en una determinada **secuencia** (orden). Una secuencia específica de nucleótidos en el ADN (es decir, un gen) es un código acerca de cómo producir una proteína específica. Piense en una secuencia de nucleótidos como similar a una secuencia de notas musicales escritas, el código de cómo tocar música. Así como diferentes secuencias de notas codifican diferentes canciones, diferentes secuencias de nucleótidos codifican diferentes proteínas.



LAS HERRAMIENTAS Y TÉCNICAS DE LA BIOTECNOLOGÍA

En los próximos días, explorará la ciencia de la biotecnología y las herramientas utilizadas por los científicos para desarrollar productos. Su primera tarea es probar dos de las herramientas utilizadas en biotecnología, la micropipeta y la electroforesis en gel.

Al llevar a cabo cualquier experimento científico, encontrará que la precisión y la exactitud son importantes, al igual que lo es asegurarse de seguir los procedimientos con cuidado. A lo largo de su experiencia con ABE, su objetivo debe ser aprender cómo y por qué se utilizan las herramientas y técnicas que está aprendiendo.

USO DE ESTA GUÍA DEL ESTUDIANTE

Se utilizan íconos en toda la Guía del estudiante para llamar la atención sobre diversos aspectos del plan de estudios. La siguiente es una lista de esos íconos y sus significados.

Ícono	Significado
	¿SABÍA QUE?: Información general sobre los conceptos que se tratan en el capítulo.
	DETÉNGASE Y PIENSE: Preguntas sobre los protocolos de laboratorio.
	CONSIDERE: Preguntas sobre conceptos biológicos importantes.
	SEGURIDAD: Recordatorios de técnicas clave de seguridad en el laboratorio.
	TÉCNICA DE LABORATORIO: Técnicas de laboratorio útiles para mejorar la eficiencia y los resultados.

GLOSARIO DE LA INTRODUCCIÓN AL PROGRAMA

Biomolécula: es una molécula producida por células vivas. Algunos ejemplos incluyen proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos.

Células: son las unidades básicas de cualquier organismo vivo que llevan a cabo los procesos bioquímicos de la vida.

ADN (ácido desoxirribonucleico): es una biomolécula de doble cadena que codifica la información genética.

Enzima: es una proteína que aumenta la velocidad de una reacción química.

Gen: es la parte de una molécula de ADN que contiene las instrucciones para elaborar una proteína específica.

Ingeniería genética: es una rama de la biotecnología que se vale de procedimientos y técnicas especiales para cambiar el ADN de un organismo.

Nucleótidos: son moléculas pequeñas que se unen para formar la molécula de ADN.

Plásmido: es una molécula circular de ADN.

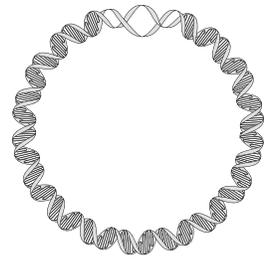
Proteína: es una biomolécula grande. Las proteínas llevan a cabo funciones esenciales en las células, desde la formación de estructuras celulares hasta permitir que se lleven a cabo las reacciones químicas.

ADN recombinante: es el ADN que contiene secuencias o genes de dos o más fuentes.

Enzima de restricción: es una proteína que puede cortar el ADN en una secuencia específica.

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

Rasgo: Una característica genéticamente determinada. Códigos de ADN para proteínas, que determinan rasgos.



CAPÍTULO 1

ALGUNAS HERRAMIENTAS DEL TRABAJO

INTRODUCCIÓN

El año 1978 marcó un gran avance en la medicina. Por primera vez en la historia, los científicos pudieron diseñar bacterias capaces de producir proteínas humanas. Lograron esto mediante la inserción estratégica de pequeños fragmentos de ADN humano en las células bacterianas. Esta nueva tecnología, denominada ingeniería genética, puede usarse para producir proteínas que tratan los síntomas de ciertas **enfermedades genéticas** (las causadas por un cambio en el ADN, a menudo se heredan de los padres). La ingeniería genética, también llamada modificación genética, es la manipulación directa de los genes de un organismo utilizando la biotecnología.

Para llevar a cabo la ingeniería genética, se necesitan habilidades adecuadas en el laboratorio. En este capítulo, se centrará en adquirir práctica en el uso de **micropipetas** (instrumentos utilizados para transferir pequeños volúmenes de líquido) y la **electroforesis en gel** (una técnica que se emplea para separar e identificar biomoléculas): dos habilidades críticas para la biotecnología. Completará dos laboratorios, en los que utilizará instrumentos y suministros que son idénticos a los utilizados en los laboratorios de investigación de biotecnología. Estos laboratorios son el primer paso para desarrollar las habilidades que necesitará para tener éxito en biotecnología.

CAPÍTULO 1 OBJETIVOS

Al final de este capítulo, podrá hacer lo siguiente:

- Utilizar correctamente las micropipetas y la técnica de electroforesis en gel
- Explicar la importancia de las micropipetas y la electroforesis en gel en la ingeniería genética
- Describir cómo 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 SABE?

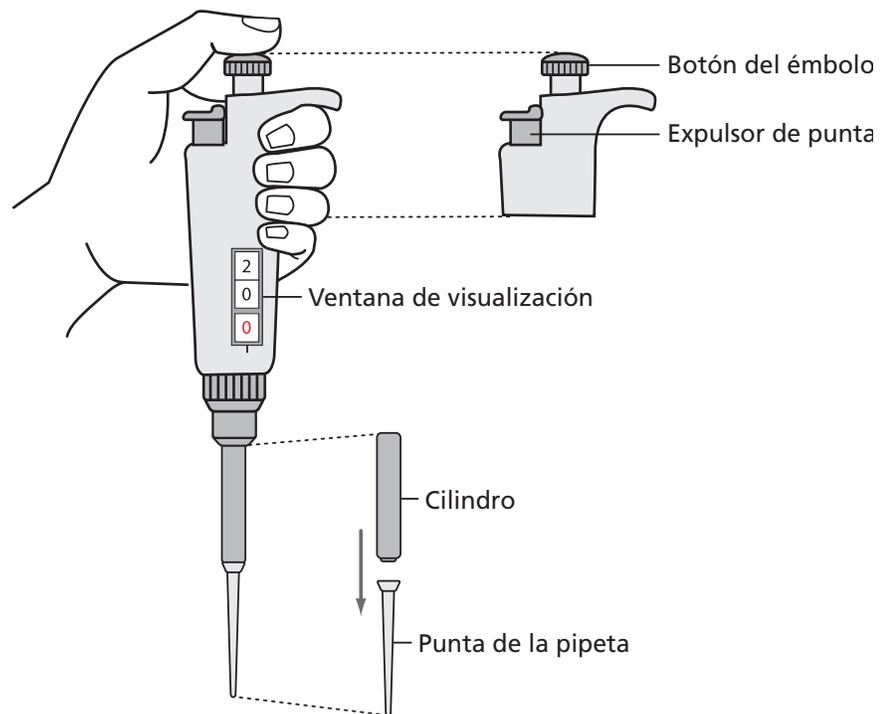
Discuta las siguientes preguntas con su compañero y escriba sus ideas en su cuaderno. Esté preparado para discutir sus respuestas con la clase. No se preocupe si no sabe todas las respuestas. Discutir estas preguntas le ayudará a pensar en lo que ya sabe sobre biotecnología.

1. ¿Qué herramientas y técnicas de biotecnología ha usado anteriormente?
¿Para qué las usó?
2. ¿Por qué es importante la precisión cuando se llevan a cabo procedimientos de biotecnología?

LABORATORIO 1.1: CÓMO USAR UNA MICROPIPETA

El propósito de este laboratorio es presentarle una herramienta importante que se utiliza en la ingeniería genética: la micropipeta, que se muestra en la **Figura 1.1**. Se utiliza una micropipeta 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 medidas de volumen más utilizadas en ingeniería genética. Este laboratorio le dará la oportunidad de aprender a usar la micropipeta y de ver el tamaño relativo de las diferentes cantidades de solución medidas a través de esta herramienta muy precisa y la exactitud con la que puede medir las cantidades con ella.

Figura 1.1: Micropipeta P-20



ANTES DEL LABORATORIO

Responda a las siguientes preguntas con su grupo y prepárese para compartir sus respuestas con la clase.

1. ¿Por qué cree que es necesario utilizar volúmenes muy pequeños y exactos de material en biotecnología?
2. Lea la sección *Métodos* en las páginas de A-15 a A-17 y describa brevemente los pasos, utilizando palabras y un diagrama de flujo.

MATERIALES

Reactivos

- Una gradilla para tubos para microcentrífuga de plástico con un tubo para microcentrífuga con solución de tinte rojo.

Equipo y suministros

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

SEGURIDAD:

- **Se deben seguir todas las precauciones de seguridad adecuadas y usarse la vestimenta requerida para un laboratorio de ciencias, incluidas las gafas de seguridad. Consulte las instrucciones de su profesor.**
- Lávese bien las manos con jabón después de finalizar la práctica de laboratorio.



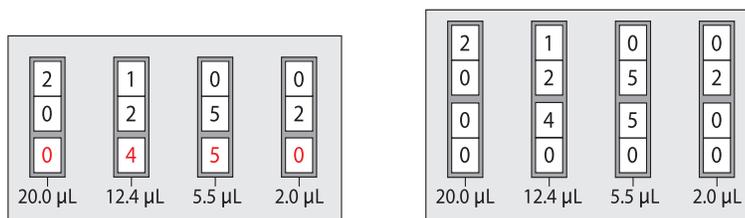
MÉTODOS

1. Revise su gradilla para asegurarse de que tiene el reactivo detallado en la lista de *Materiales*.
2. Revise las partes de la micropipeta (vea la **Figura 1.1** en la página A-14).
3. Localice la ventana de visualización en el mango de la micropipeta.
4. Las diferentes micropipetas se ajustan de diferentes maneras. Muchas tienen una rueda que ajusta el volumen. Otras se ajustan girando el émbolo. En la mayoría de los casos, gire a la derecha para aumentar el volumen y a la izquierda para disminuirlo.
5. La **Figura 1.2** muestra cuatro volúmenes de micropipeta. Practique ajustando la micropipeta a estos volúmenes.

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



Figura 1.2: Se muestran cuatro volúmenes en dos micropipetas P-20 diferentes



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

6. Revise la hoja de práctica laminada de la micropipeta. Cada integrante del grupo pipeteará cinco gotas de diferentes volúmenes en la hoja. El pipeteado consta de dos partes: cargar el líquido en la micropipeta y dispensar el líquido de la micropipeta.
7. Cargue la micropipeta con 20.0 µl de tinte rojo (RD) haciendo lo siguiente:
 - a. Fije la micropipeta a 20.0 µl.
 - b. Abra la caja de puntas. Baje la micropipeta sobre una punta y presione firmemente (no toque la punta con los dedos). Cierre la caja cuando haya terminado.
 - c. Lleve la micropipeta y el tubo con RD al nivel de los ojos.
 - d. Use el pulgar para presionar el émbolo hasta la primera posición de parada, que es su primer punto de resistencia.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Cuando cargue la micropipeta, solo presione el émbolo hasta la primera parada o introducirá demasiada solución en la punta de la pipeta.

- e. Coloque la punta de su pipeta en el tinte rojo y suelte lentamente el émbolo para extraer la solución.



TÉCNICA DE LABORATORIO: No apoye una micropipeta con líquido en la punta ni la sostenga con la punta hacia arriba. Si la punta desechable no está bien fija en el cilindro, el líquido podría filtrarse en la pipeta.

8. Suministre el tinte rojo en la hoja laminada de la siguiente manera:
 - a. Coloque la punta de la pipeta sobre el círculo de 20.0 µl.
 - b. Use el pulgar para presionar el émbolo hasta la primera posición de parada y luego presione hacia abajo hasta la segunda parada.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Al dispensar líquido de la micropipeta, presione el émbolo hasta la primera parada para dispensar la mayor parte del líquido y luego presione el émbolo hasta la segunda parada para suministrar lo último que quede.

- c. Con el émbolo aún presionado, retire la pipeta del papel; esto evitará que extraiga accidentalmente el líquido y este vuelva a la punta.

9. Sin apoyar la micropipeta, gire el botón del émbolo para fijarlo en 15.0 μl y repita los pasos 7b a 8c, colocándola sobre el círculo de 15.0 μl .
10. Sin apoyar la micropipeta, fíjela a 10.0 μl y repita los pasos 7b a 8c, colocándola sobre el círculo de 10.0 μl al dispensar el líquido.
11. Sin apoyar la micropipeta, fíjela a 5.0 μl y repita los pasos 7b a 8c, colocándola sobre el círculo de 5.0 μl .
12. Sin apoyar la micropipeta, fíjela a 2.0 μl y repita los pasos 7b a 8c, colocándola sobre el círculo de 2.0 μl .
13. Use el eyector de punta para colocar la punta de su pipeta en el recipiente de residuos.

DETÉNGASE Y PIENSE:

- Al cargar o dispensar una solución, ¿por qué es importante ver cómo la solución entra o sale de la punta de la pipeta?
- Se le indicó que evitara el contacto con las puntas de la pipeta; por ejemplo, se le pidió que pusiera la punta en la pipeta sin usar las manos, que evite apoyar micropipeta, que use el botón eyector para extraer la punta y que mantenga la caja de puntas cerrada. Si estuviera trabajando con plásmidos y células bacterianas, ¿por qué serían importantes estas precauciones?

14. Al usar la hoja de práctica de micropipetas, cada integrante de su grupo debe tener la oportunidad de cargar y suministrar las cinco gotas de diferentes volúmenes, y cada integrante debe utilizar una punta de pipeta nueva.
15. Cuando todos los integrantes de su grupo hayan tenido la oportunidad de suministrar el tinte rojo en la hoja de práctica de la micropipeta, dibuje los tamaños aproximados de cada gota en su cuaderno (o tome una fotografía y péguela en su cuaderno) y anote las cantidades.

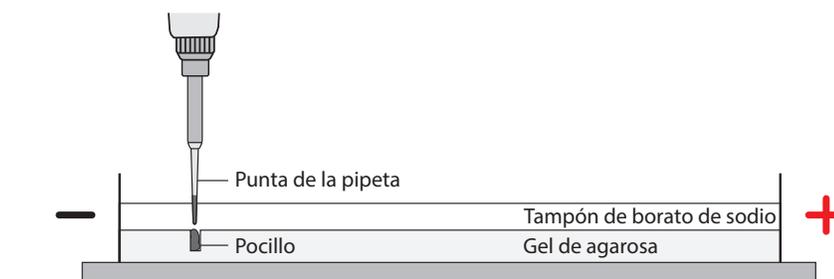


LABORATORIO 1.2: ELECTROFORESIS EN GEL

El propósito de este laboratorio es brindarle experiencia con la electroforesis en gel, que se utiliza para separar e identificar una mezcla de biomoléculas, incluido el ADN; el tamaño de los componentes de cada mezcla se puede identificar por su ubicación en el gel. Las biomoléculas son demasiado pequeñas para verlas, y estimar su tamaño exacto es muy difícil. La electroforesis en gel permite a los científicos visualizar fácilmente la información y comparar varias biomoléculas. La electroforesis en gel se basa en el hecho de que muchas biomoléculas tienen una carga negativa, lo que significa que se moverán en respuesta a una carga eléctrica. Las biomoléculas se desplazan a través de un gel, y la distancia que recorren varía principalmente según su tamaño, aunque la forma molecular y el grado de carga también influyen en su desplazamiento.

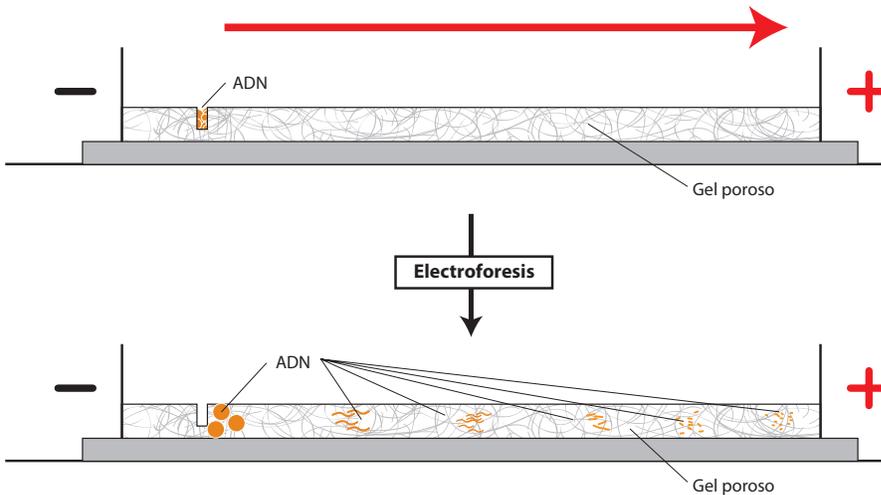
La disposición de la electroforesis consiste en una caja que contiene un gel de agarosa y dos electrodos que crean un campo eléctrico a través del gel al conectar la caja a una fuente de alimentación. El electrodo negativo es negro y el electrodo positivo es rojo. Los *pocillos* son depresiones en la agarosa que pueden contener pequeños volúmenes de muestras. Las moléculas en una muestra se desplazarán a través del gel y se distribuirán según sus propiedades de carga y tamaño. Las muestras de biomoléculas cargadas negativamente se pipetean en pocillos cerca del electrodo negativo (negro). Las muestras se desplazan a través del gel hacia el electrodo positivo (rojo), como se muestra en la **Figura 1.3**, porque las cargas opuestas se atraen y las cargas iguales se repelen.

Figura 1.3: La unidad de electroforesis en gel



El gel a través del que se desplazan las biomoléculas está compuesto por *agarosa*, un polisacárido (azúcar complejo) que se encuentra en las algas. Su estructura es una matriz porosa (como una esponja) con muchos agujeros a través de los cuales fluyen la solución y las biomoléculas. **Vea la Figura 1.4.**

Figura 1.4: Cómo se desplazan las biomoléculas, incluido el ADN, a través de la matriz de gel de agarosa en la electroforesis en gel



ANTES DEL LABORATORIO

Responda a las siguientes preguntas con su grupo y prepárese para compartir sus respuestas con la clase.

1. ¿En qué circunstancias podría ser importante usar la electroforesis en gel para separar e identificar los plásmidos y los fragmentos lineales cortos de ADN?
2. Lea la sección *Métodos* en las páginas A-20 a A-23 y describa brevemente los pasos para la Parte A y la Parte B, utilizando palabras y un diagrama de flujo.

MATERIALES

Reactivos

- Un gradilla de plástico para tubos de microcentrífuga con lo siguiente:
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de solución de tinte rojo
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de solución de tinte 1 (S1)
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de solución de tinte 2 (S2)
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de solución de tinte 3 (S3)
- Matraz de 50 ml que contiene tampón de borato de sodio 1x (1x SB) (se comparte con otro grupo)

Equipo y suministros

- Micropipeta P-20 (mide 2.0–20.0 µl)
- Caja de puntas para puntas de pipetas desechables
- 2 placas de práctica para pipeteo cargadas con gel de agarosa al 0.8%



- Caja de electroforesis cargada con un 0.8% de gel de agarosa (se compartirá entre grupos)
- Microcentrífuga (se compartirá entre todos los grupos)
- Recipiente de residuos para puntas y tubos de microcentrífuga usados (se compartirán entre los grupos)

SEGURIDAD:

- Deberá seguir todas las precauciones de seguridad adecuadas y la vestimenta requerida para un laboratorio de ciencias, incluidas las gafas de seguridad. Consulte las instrucciones de su profesor.
- Lávese bien las manos con jabón después de terminar el laboratorio.

MÉTODOS

PARTE A: PIPETEAR EN LOS POCILLOS

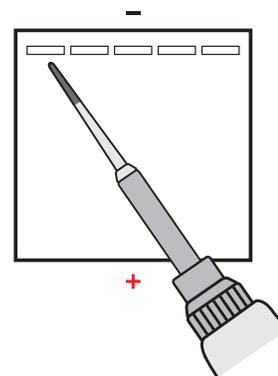
Practicará el pipeteo del tinte rojo en pocillos preformados en un gel de agarosa.

1. Controle su gradilla para asegurarse de que tiene el tubo de tinte rojo (RD).
2. Rellene las dos placas de práctica para pipeteo con tampón SB 1x hasta un nivel que cubra toda la superficie del gel. Si ve algún "hoyuelo" sobre los pocillos, agregue más **tampón** (una solución que puede mantener un pH casi constante. En la electroforesis en gel, evita que el pH del gel cambie debido a la corriente eléctrica).
3. Fije la micropipeta P-20 a 10.0 μ l y colóquela una punta de pipeta.
4. Extraiga 10.0 μ l de RD con la pipeta.

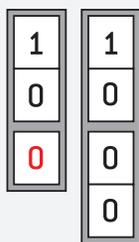
TÉCNICA DE LABORATORIO: No apoye una micropipeta con líquido en la punta ni la sostenga con la punta hacia arriba.

5. Coloque el RD en un pocillo en una de las placas de la siguiente manera:
 - a. Apoye el codo sobre la mesa para estabilizar la mano que sostiene la pipeta. Si es necesario, use también la otra mano para apoyar la mano que sostiene la pipeta.
 - b. Baje la punta de la pipeta hasta que esté debajo del tampón, pero justo por encima del pocillo.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Tenga cuidado de no colocar la punta de su pipeta en el pocillo o podría perforar el gel, lo que hará que el pocillo quede inutilizable.



- c. Presione suavemente el émbolo para suministrar lentamente la muestra. Para evitar que entre aire en el tampón, no se pase la primera parada. La muestra se hundirá en el pocillo.



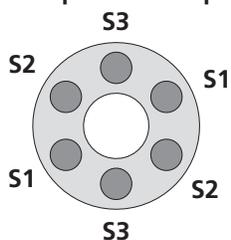
- Repita los pasos 4 y 5 hasta que se hayan llenado todos los pocillos de la placa de práctica. Todos los integrantes de su grupo deberían tener la oportunidad de practicar el pipeteo en los pocillos.
- Expulse la punta de la pipeta.

PARTE B: SEPARACIÓN DE LOS TINTES CON ELECTROFORESIS EN GEL

Ahora usarás electroforesis en gel para separar diferentes tintes. Primero, agregará tintes a los pocillos de la unidad de electroforesis en gel. Luego, encenderá la unidad para mover los tintes cargados negativamente a través del gel. (Compartirá las cajas de electroforesis con otro grupo; su profesor le dirá qué pocillos debe usar su grupo).

- Controle su gradilla para asegurarse de que tiene las tres soluciones de tinte (S1, S2 y S3).
- Revise la **Figura 1.4** en la página A-19. Asegúrese de que los pocillos en el gel estén ubicados cerca del electrodo negativo (negro).
- Llene la caja con tampón SB 1x hasta un nivel que cubra toda la superficie del gel. Si ve algún "hoyuelo" sobre los pocillos, agregue más tampón.
- Centrifugue los tubos S1, S2 y S3.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Distribuya los tubos uniformemente en la microcentrífuga para que su peso esté equilibrado.



- Haga un dibujo en su cuaderno que muestre la ubicación de los pocillos en la caja de electroforesis. Registre qué solución colocará en cada pocillo.
- Fije la micropipeta P-20 a 10.0 μl y colóquele una punta de pipeta.
- Extraiga 10.0 μl de S1 con la pipeta.
- Coloque la S1 en el pocillo que ha designado para esa solución de la siguiente manera:
 - Apoye el codo sobre la mesa para estabilizar la mano que sostiene la pipeta. Si es necesario, use también la otra mano para apoyar la mano que sostiene la pipeta.
 - Baje la punta de la pipeta hasta que esté debajo del tampón, pero justo por encima del pocillo.

TÉCNICA DE LABORATORIO: No perfora el gel con la punta de la pipeta, ya que no se podrá utilizar; la muestra se hundirá en el orificio debajo del gel en lugar de desplazarse a través del gel.



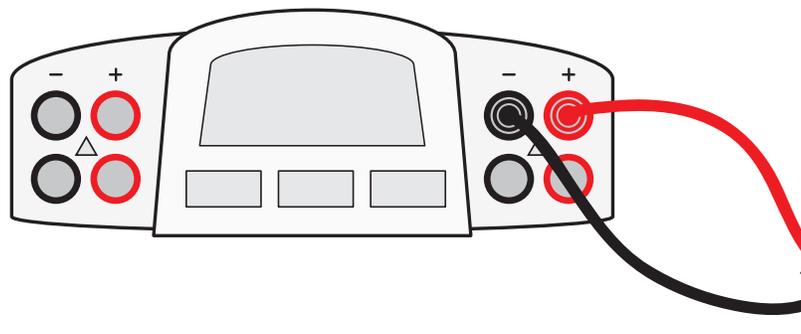


- c. Presione suavemente el émbolo para suministrar lentamente la muestra. Para evitar que entre aire en el tampón, no se pase la primera parada. La muestra se hundirá en el pocillo.

TÉCNICA DE LABORATORIO:

- Mientras el émbolo todavía está presionado, saque la punta del tampón para que no extraiga la solución o el tampón.
 - Use una punta de pipeta nueva para cada muestra.
9. Con el uso de una nueva punta de pipeta con cada solución, repita los pasos 7 y 8 para S2 y S3.
 10. Cuando se hayan cargado todas las muestras, cierre la tapa herméticamente sobre la caja de electroforesis. (Cierre la tapa con cuidado para que las muestras no se derramen).
 11. Conecte los cables eléctricos a la fuente de alimentación. Conecte ambos cables al mismo canal, con el cátodo (-) al cátodo (negro a negro) y el ánodo (+) al ánodo (rojo a rojo). Vea la **Figura 1.5**

Figura 1.5: Cables de la caja de electroforesis conectados al canal correcto de la fuente de alimentación



12. Encienda la fuente de alimentación y ajuste el voltaje a 130–135 V. (Verá que se forman burbujas en el tampón en el extremo rojo [+] de la unidad de electroforesis).
13. Después de dos o tres minutos, verifique si los tintes se están desplazando hacia el electrodo positivo (rojo). Debe comenzar a ver que el tinte morado (azul de bromofenol) comienza a separarse del tinte azul (cianol de xileno).



DETÉNGASE Y PIENSE:

- Estudie sus resultados de la electroforesis en gel. ¿Qué solución de muestra contenía un solo tinte: S1, S2 o S3? ¿Cómo lo sabe?
- ¿Qué carga eléctrica tienen los tintes? Explique su razonamiento.
- Los tintes que se separan son naranja G (amarillo), azul de bromofenol (morado) y cianol de xileno (azul). Si la forma molecular y la carga eléctrica de los tres tintes son similares, ¿cuál es el orden de los tintes desde las moléculas más pesadas hasta las más ligeras, según sus resultados iniciales? ¿Por qué cree que este es el orden correcto?

14. En aproximadamente 10 minutos, o cuando pueda distinguir los tres tintes, apague el interruptor de alimentación y desenchufe los electrodos de la fuente de alimentación. Para esto, sujete el electrodo del enchufe de plástico, NO del cable.
15. Retire con cuidado la tapa de la caja de gel y observe los tintes en el gel.
16. En su cuaderno, dibuje la ubicación relativa de las bandas y sus colores en cada uno de los carriles que contienen sus muestras.
17. Deje los geles en la caja de gel.

PREGUNTAS DEL CAPÍTULO 1

1. ¿Por qué será beneficioso utilizar una micropipeta para medir reactivos en biotecnología en lugar de otro instrumento de medición?
2. ¿Qué le dicen los resultados de la electroforesis en gel sobre el material genético?



¿SABÍA?

La electroforesis en gel en la huella de ADN

La huella de ADN utiliza electroforesis en gel para distinguir entre muestras de material genético. En la identificación del ADN, las moléculas de ADN humano se tratan con enzimas que las cortan en determinados puntos característicos, reduciendo así el ADN a una colección de piezas más pequeñas y manejables. Los fragmentos de ADN se cargan en un gel y se colocan en un campo eléctrico, que ordena los fragmentos de ADN en varias bandas. Estas bandas pueden colorearse con un tinte radioactivo para hacerlas visibles para las técnicas de imagen. Los métodos de identificación del ADN se han aplicado a muchas ramas de la ciencia y la tecnología, incluida la medicina (pruebas prenatales, selección genética), biología de la conservación (programas guía de cría en cautiverio para especies en peligro de extinción) y la ciencia forense. En esta última disciplina, el análisis del patrón de fragmentos de ADN que resulta de la acción de las enzimas de restricción nos permite distinguir entre los sospechosos acusados de un delito o entre los posibles padres en un juicio de paternidad.

GLOSARIO DEL CAPÍTULO 1

Agarosa: es un polímero compuesto de moléculas de azúcar que se utiliza como matriz en los procedimientos de electroforesis en gel.

Tampón: es una solución que puede mantener un pH casi constante. En la electroforesis en gel, evita que el pH del gel cambie debido a la corriente eléctrica.

Electroforesis en gel: es el desplazamiento de las moléculas cargadas hacia un electrodo de carga opuesta; se utiliza para separar biomoléculas. Cuando se usa para separar fragmentos de ADN, la electroforesis separará los fragmentos por tamaño: los fragmentos más pequeños se desplazan más rápido que los fragmentos más grandes.

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

Micropipeta: es un instrumento de laboratorio utilizado para medir, suministrar y transferir cantidades muy pequeñas de líquido.

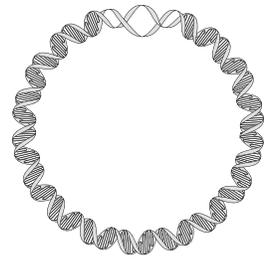
Pocillos: son depresiones en la agarosa que pueden contener pequeños volúmenes de muestras.

B

AMGEN[®] Biotech Experience

Descubrimiento científico para el aula

AMGEN[®] Foundation



CAPÍTULO 2

¿CÓMO SE COMIENZA A CLONAR UN GEN?

INTRODUCCIÓN

En la Introducción del Programa, aprendió sobre el desarrollo de productos biofarmacéuticos y se le presentaron las técnicas utilizadas en el desarrollo de estas terapias. Una de estas técnicas, la transformación bacteriana, permite que los genes humanos se inserten en las bacterias, lo que permite que las bacterias produzcan las proteínas terapéuticas humanas. En el Capítulo 1 pudo trabajar con dos herramientas físicas y técnicas de ingeniería genética que se utilizan para clonar un gen: la micropipeta y la electroforesis en gel. En este capítulo, trabajará con otras dos herramientas importantes de ingeniería genética: los plásmidos y las enzimas de restricción. Estas “herramientas” son en realidad 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 proteínas humanas. Ahora aprenderá más sobre estas herramientas y dará los primeros pasos en su misión de clonar un gen.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 2

Al final de este capítulo, podrá hacer lo siguiente:

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

¿QUÉ ES LO QUE YA SABE?

Discuta las siguientes preguntas con su compañero y anote sus ideas en su cuaderno. Esté preparado para discutir sus respuestas con la clase. No se preocupe si no sabe todas las respuestas. Discutir estas preguntas lo ayudará a pensar lo que ya sabe sobre el ADN, los plásmidos y las enzimas de restricción.

1. ¿Cuál es la estructura y función del ADN? Describa en palabras o mediante un dibujo la estructura de una molécula de ADN. Sea lo más detallista posible.
2. Todos los organismos vivos contienen ADN. ¿De qué manera es igual el ADN de diferentes organismos y de qué manera varía?
3. Usando su conocimiento sobre los genes y cómo se **expresan** (la información codificada en un gen se convierte primero en ARN mensajero y luego en una proteína), explique por qué es posible que una célula bacteriana produzca una proteína humana a partir de las instrucciones codificadas en un gen humano.
4. Los científicos utilizan dos herramientas biológicas para diseñar organismos para producir nuevas proteínas: los plásmidos y las enzimas de restricción. ¿Cómo podría cada uno de estos ser útil para crear una nueva proteína?

SU DESAFÍO

Ahora que ha explorado algunas de las herramientas básicas utilizadas en biotecnología, tendrá la oportunidad de realizar algunos de los mismos procedimientos que los científicos utilizan para producir proteínas terapéuticas humanas. Pero en lugar de producir proteínas humanas, diseñará *E. coli*, una bacteria común que se encuentra en el intestino de animales de sangre caliente, para producir una proteína de anémona de mar llamada **proteína fluorescente roja** (RFP), que está dirigida por un gen llamado *rfp*. Una anémona de mar es un animal de cuerpo blando relacionado con el coral y la medusa. En el laboratorio, le dará a *E. coli* una nueva proteína que le dará un rasgo que antes no tenía: la capacidad de brillar. ¿Cómo sabrá si tiene éxito? Las bacterias que cree tendrán un rasgo nuevo y altamente visible: ¡ahora producirán RFP, lo que hará que las células aparezcan de color rojo o rosa brillante!

NOTA: La cantidad de pasos variará de acuerdo al tiempo que tenga disponible su clase.



¿SABÍA?

La proteína fluorescente roja en las anémonas de mar

La RFP se deriva de una proteína que se encuentra en las anémonas de mar (vea la **Figura 2.1**). Mientras que las anémonas de mar son sedentarias, permanecen unidas a las rocas, también son animales depredadores, que usan sus tentáculos punzantes para atrapar a sus presas. 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 de mar tengan fluorescencia? Nuestra mejor suposición es que las proteínas fluorescentes ayudan a las anémonas de mar a sobrevivir, pero el papel que desempeñan estas proteínas aún no se conoce bien.

Las moléculas fluorescentes pueden servir como un bloqueador solar, convirtiendo la luz UV dañina en una luz que es menos perjudicial para los tejidos de la anémona. Otra posibilidad es que, si bien los humanos no pueden detectar la fluorescencia en la luz del sol, algunos animales pueden hacerlo, haciendo que las presas se sientan atraídas por el brillo.



Figura 2.1: La anémona de mar, *Discosoma* sp.

COMENZAR A CLONAR UN GEN

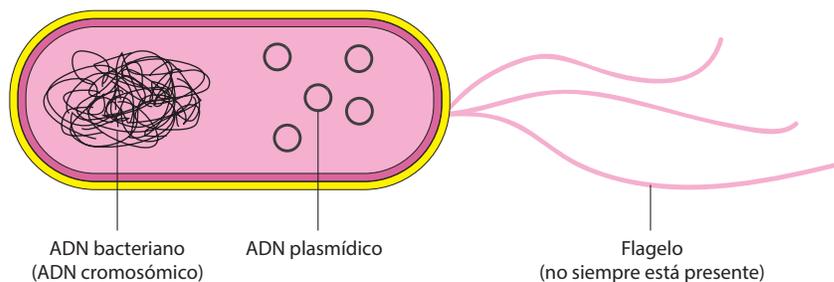
En este capítulo, explorará el uso de plásmidos y enzimas de restricción como herramientas de la biotecnología. **Clonación del ADN** es el proceso de hacer muchas copias exactas de una pieza particular de ADN. Primero, un gen específico (por ejemplo, un gen para una proteína terapéutica humana) se corta de su fuente, usando una enzima de restricción. Luego se pega junto con otros fragmentos para crear un **plásmido recombinante**, un plásmido construido con fragmentos de ADN de diferentes fuentes.

El descubrimiento de los plásmidos y las enzimas de restricción en bacterias es un ejemplo clásico de cómo los descubrimientos de la investigación básica pueden revolucionar un campo. Con el descubrimiento de estas biomoléculas, los científicos lograron avances importantes en la comprensión de los procesos fundamentales de la vida y en el desarrollo de productos que mejoran la vida.

PLÁSMIDOS

Muchos tipos diferentes de bacterias portan dos formas de ADN: (1) un cromosoma compuesto por una molécula de ADN grande que contiene toda la información que necesita el organismo para sobrevivir y reproducirse, y (2) plásmidos, pequeñas moléculas de ADN circular, que varían en tamaño de 1,000 a 200,000 **pares de bases** (dos bases nitrogenadas unidas para conectar cadenas complementarias de ADN) que están presentes en múltiples copias separadas del ADN cromosómico (vea la **Figura 2.2**). Algunas bacterias portan hasta 500 plásmidos en cada célula.

Figura 2.2: ADN en células bacterianas

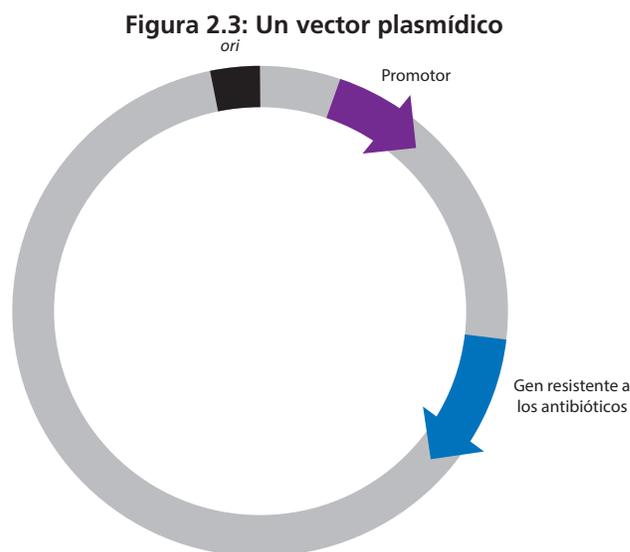


Cuatro características de los plásmidos los hacen **vectores** (vehículos para transportar secuencias de ADN de un organismo a otro) ideales para ingeniería genética: (1) la capacidad de replicarse; (2) la capacidad de iniciar la transcripción; (3) un gen o genes que codifican la resistencia a **antibióticos**, una clase de compuestos que matan o inhiben el crecimiento de microorganismos; y (4) la capacidad de pasar entre las bacterias. Estas características se describen en detalle a continuación:

1. Los plásmidos tienen la capacidad de replicarse, es decir, de hacer copias de sí mismos independientemente del cromosoma bacteriano. Para hacer esto, los plásmidos incluyen una secuencia específica a la que las enzimas de síntesis de ADN de la célula huésped se unen e inician la **replicación del ADN** (un proceso biológico que ocurre en todos los organismos vivos para hacer copias de su ADN). Esta secuencia se llama el punto de **origen de replicación (ori)**.

2. Los plásmidos tienen la capacidad de iniciar **transcripción**, el proceso por el cual la información codificada en el ADN se transfiere al **ARN mensajero (ARNm)**. El ARNm es una molécula de ARN transcrita desde el ADN de un gen y utilizada como plantilla para la síntesis de proteínas, utilizando la **ARN polimerasa** (una proteína que produce ARNm a partir de ADN), de la célula huésped. El **ARN o ácido ribonucleico**, es una biomolécula monocatenaria formada por una base nitrogenada, un azúcar ribosa y un fosfato; desempeña un papel fundamental en la síntesis de proteínas, al transmitir información genética desde el ADN al ribosoma donde se elaboran las proteínas. Esta capacidad requiere otra secuencia, llamada **promotor** (una secuencia de ADN específica que se une a la ARN polimerasa e inicia la transcripción del gen). El promotor se une a la ARN polimerasa, y aquí es donde se inicia la transcripción. Todos los genes tienen promotores ubicados junto a ellos en el ADN. Para que los genes de proteínas terapéuticas humanas se expresen en bacterias, deben insertarse en el plásmido junto al promotor.
3. Los plásmidos poseen un gen o genes que codifican la **resistencia a los antibióticos** (el estado en el que las bacterias ya no son sensibles a un antibiótico y continuarán creciendo y dividiéndose en presencia de ese antibiótico). Estos genes codifican proteínas que inhiben la acción de los antibióticos secretados por microorganismos. La resistencia a los antibióticos puede conferir una ventaja selectiva en la naturaleza a las bacterias que contienen plásmidos en una población microbiana donde las bacterias compiten por sobrevivir.
4. Los plásmidos se pueden pasar de una cepa bacteriana a otra en un proceso llamado **conjugación bacteriana**, que permite a las bacterias compartir e intercambiar información genética. Cuando se inserta un plásmido con un gen para la resistencia a un antibiótico a bacterias que carecen de ese plásmido, las bacterias se volverán resistentes a ese antibiótico específico. En la naturaleza, la conjugación se produce con una muy baja efectividad, es decir, solo un pequeño porcentaje de bacterias de una población puede tomar el ADN plasmídico en cualquier momento.

La **Figura 2.3** ilustra los componentes básicos de un plásmido.



CONSIDERE: Utilice lo que sabe sobre la selección natural y la evolución para describir cómo los plásmidos pueden conferir una ventaja selectiva a sus bacterias huésped.



En el desarrollo de técnicas para la clonación de genes en bacterias, los científicos tenían una herramienta poderosa en los plásmidos: un vector que puede ser recibido por las bacterias, que se replica en bacterias para producir muchas copias de sí mismo, que tiene un promotor para la transcripción de un gen insertado, y que porta un gen para la resistencia a los antibióticos. La presencia de un gen para la resistencia a los antibióticos en el vector plasmídico permite a los científicos identificar el pequeño porcentaje de bacterias que aceptaron el plásmido. Las bacterias que no tomaron el plásmido serán destruidas por el antibiótico. Aquellas que tengan el plásmido con el gen de interés sobrevivirán y se desarrollarán. Si realiza el laboratorio en el Capítulo 5, aprovechará estas características de los plásmidos cuando transfiera su plásmido recombinante a las bacterias.

Cuando los científicos reconocieron el poder de los plásmidos como un vector potencial, el siguiente desafío era determinar cómo incorporar un gen de interés extraño, como el gen de la insulina, en el ADN plasmídico. Los plásmidos con los que trabajará en este laboratorio y en los siguientes contienen los genes para la resistencia a los antibióticos ampicilina y kanamicina. Estos genes producen proteínas que inactivan el antibiótico específico al modificar químicamente su estructura.

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, era resistente a la infección por un **bacteriófago**: un virus que infecta las bacterias al inyectar su ADN en la célula y controlar los procesos moleculares de la célula huésped para producir más bacteriófagos. La investigación de este “sistema inmune” bacteriano primitivo condujo al descubrimiento de enzimas de restricción, proteínas que restringen el crecimiento de bacteriófagos al reconocer y destruir el ADN del fago sin dañar el ADN del huésped (bacteriano). Estudios posteriores demostraron que las enzimas de restricción de diferentes cepas de bacterias cortan el ADN en secuencias específicas, que se denominan **sítios de restricción**.

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



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 asimétricamente las cadenas de ADN, dejando proyecciones de secuencias de una sola hebra en el sitio del corte. Por ejemplo, un corte (o **digestión**) con *EcoRI* dejará una proyección AATT (o “**extremo cohesivo**”) en una cadena y un extremo cohesivo TTAA en la otra cadena.

Tabla 2.1: Enzimas de restricción utilizadas en este laboratorio

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

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



CONSIDERE:

- ¿Cuál es la secuencia del extremo cohesivo que se produce cuando se corta el ADN con *BamHI*? ¿Con *HindIII*?
- Los científicos pueden modificar los plásmidos para tener un solo sitio de enzimas de restricción. Imagine que tiene un plásmido con un solo sitio *EcoRI*. Dibuje la estructura del plásmido después de que se haya cortado con la enzima y muestre las secuencias de nucleótidos que quedan en el sitio del corte. Si quisiera insertar un gen de una planta en este sitio, ¿qué enzima usaría usted para cortar el ADN de la planta? Explique su respuesta.

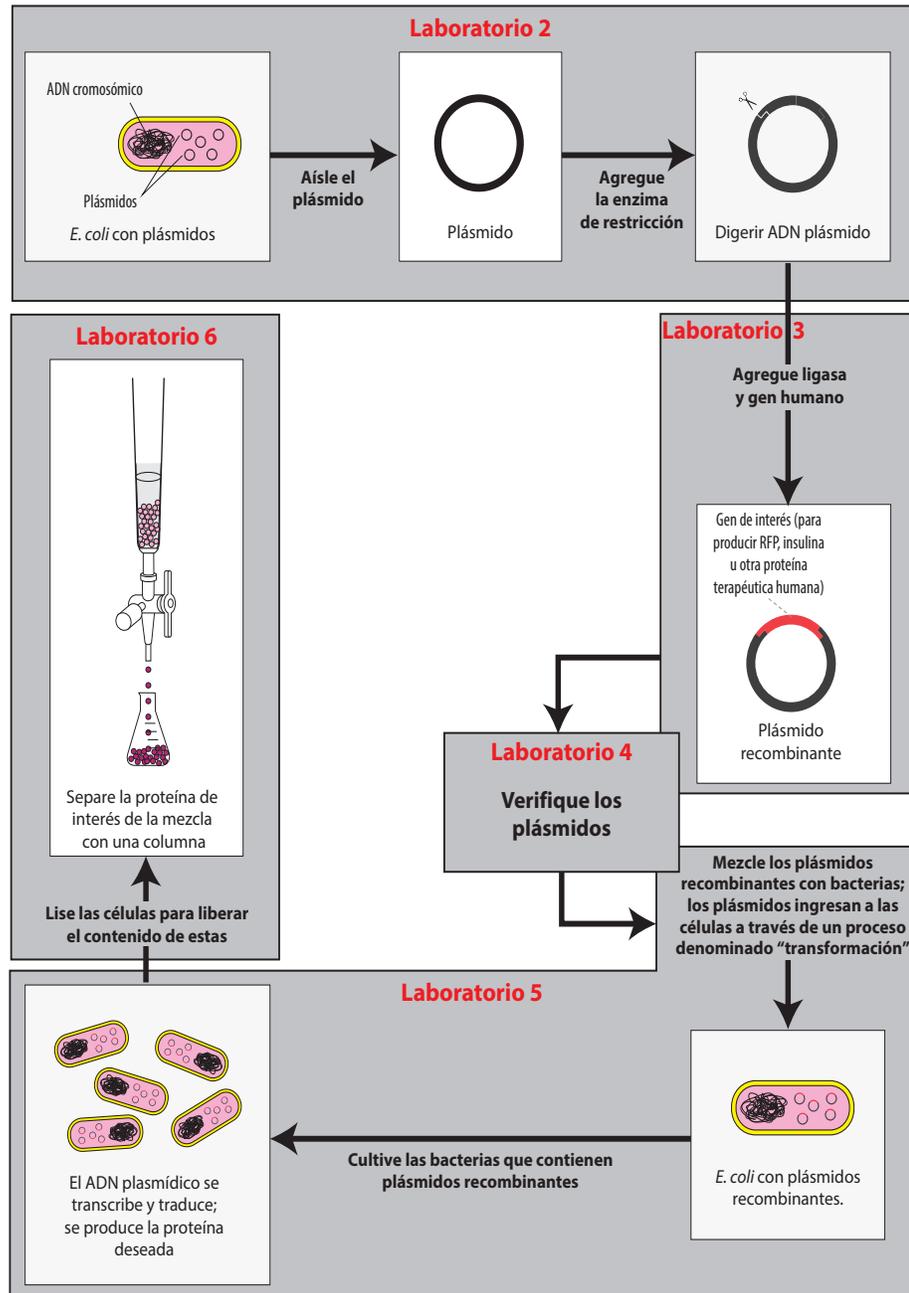
PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS HUMANAS EN LAS BACTERIAS

¿Conoces a alguien que tenga *diabetes* (una enfermedad que ocurre cuando la glucosa [azúcar] en la sangre de una persona es demasiado alta), *hemofilia* (que ocurre cuando se reduce la capacidad de coagulación de la sangre), y *deficiencia de crecimiento* (una enfermedad en la que una persona no crece adecuadamente)? Estas tres enfermedades resultan de la incapacidad del cuerpo de una persona para producir ciertas proteínas. En la diabetes, el cuerpo es incapaz de fabricar o producir *insulina* (una hormona producida en el páncreas que controla la cantidad de glucosa en la sangre). Las personas con hemofilia no pueden producir un *factor de coagulación de la sangre* (una variedad de proteínas en el plasma sanguíneo que participan en el proceso de coagulación). La deficiencia de crecimiento es el resultado de la incapacidad para producir la *hormona del crecimiento humano* (una hormona secretada por la glándula pituitaria que estimula el crecimiento). Un paciente con cualquiera de estas enfermedades debe ser tratado con la proteína faltante.

Antes del desarrollo de las tecnologías del ADN recombinante, las proteínas terapéuticas humanas se extrajeron de animales u otros seres humanos. La insulina fue aislada originalmente de los páncreas de cerdos y vacas. La hormona del crecimiento humano se extrajo de las glándulas pituitarias de cadáveres humanos. Estos métodos fueron efectivos, pero el uso de proteínas producidas por animales a veces originó reacciones adversas y fue difícil elaborar cantidades lo suficientemente grandes. Ahora, los científicos han descubierto cómo agregar ADN humano al ADN bacteriano, permitiendo que las bacterias produzcan una proteína humana.

En el proceso de la ingeniería genética, se agrega un gen humano a un plásmido que se ha cortado utilizando enzimas de restricción. El plásmido es captado por células bacterianas en un proceso llamado *transformación bacteriana*, y las células producen la proteína humana que está codificada por el gen humano junto con sus propias proteínas (vea la **Figura 2.4**). Durante este proceso, los científicos usan una combinación de herramientas, algunas fabricadas por el hombre y otras de origen biológico. A lo largo de estos laboratorios, explorará y usará estas herramientas para que pueda comprender de primera mano cómo funcionan.

Figura 2.4: Elaboración de una proteína terapéutica humana en bacterias



¿SABÍA?

El aumento de las bacterias resistentes a los antibióticos

Los antibióticos y fármacos similares se han utilizado durante los últimos 70 años para tratar a pacientes que padecen enfermedades infecciosas. Cuando se recetan y se toman correctamente, los antibióticos son sumamente valiosos para el cuidado del paciente. Sin embargo, estos medicamentos se han usado tanto y durante tanto tiempo que los organismos infecciosos a los que los antibióticos deben destruir se han adaptado a ellos, haciendo que los fármacos sean menos eficaces. La resistencia a los antibióticos se produce cuando algunas bacterias en una población pueden sobrevivir cuando se exponen a uno o más antibióticos. Estas especies que se han vuelto resistentes causan infecciones que no se pueden tratar con los antibióticos habituales en las dosis y concentraciones habituales. Algunos han desarrollado resistencia a múltiples antibióticos y se denominan bacterias resistentes a múltiples fármacos o “superbacterias”.



La resistencia a los antibióticos es un fenómeno grave en crecimiento y se ha convertido en una de las principales preocupaciones de la salud pública del siglo XXI. Cuando los organismos resistentes a los fármacos adquieren resistencia a los antibióticos de primera línea (los seleccionados en función de varias ventajas, incluida la seguridad, la

disponibilidad y el costo), se requiere el uso de agentes de segunda línea. Estos son generalmente de espectro más amplio, pueden ser menos beneficiosos en relación con los riesgos asociados y pueden ser más costosos o menos accesibles.



CLONE ESE GEN

Ahora ya conoce dos herramientas biológicas para la clonación de un gen: los plásmidos y las enzimas de restricción.

1. Los plásmidos tienen varias características importantes:
 - Una secuencia para el inicio de la replicación del ADN, llamada punto *ori*, que permite que el plásmido se replique en las bacterias utilizando las enzimas de síntesis de ADN del huésped
 - Un promotor para iniciar la transcripción del gen insertado
 - Un gen que codifica una proteína para la resistencia a los antibióticos, que permite la identificación de bacterias que han tomado en el plásmido
2. Las enzimas de restricción digieren tanto el plásmido como el ADN humano que contiene el gen de interés (como la insulina) que se va a clonar.

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

- Cortar el plásmido en un sitio (o sitios) que permita la inserción del nuevo gen.
- Cortar el plásmido en un sitio apropiado para garantizar que no se interrumpan genes o secuencias importantes, incluido el punto *ori*, el promotor, y al menos uno de los genes que codifican la resistencia a los antibióticos.
- Cortar el plásmido cerca del promotor para que pueda expresarse el gen insertado.
- Cortar el ADN humano lo más cerca posible de ambos extremos del gen de interés para que pueda insertarse en el sitio apropiado en el ADN plasmídico, sin cortar dentro del gen.



DETÉNGASE Y PIENSE: ¿Por qué es importante usar la misma enzima o enzimas para cortar tanto el plásmido como el gen del ADN humano?

En esta actividad, hará un modelo en papel de un plásmido recombinante que contiene un gen para una proteína terapéutica humana, en este caso, la insulina. Tiene tres tareas:

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

HOJAS INFORMATIVAS

- Diagrama de plásmidos (RM 2)
- Secuencia de ADN humano (RM 3)

PROCEDIMIENTO

1. Sobre el **Diagrama de plásmidos (RM 2)**:
 - Use tijeras para cortar la secuencia del plásmido y pegue los extremos para hacer un modelo en papel del plásmido.
 - Localice las posiciones del punto *ori*, el promotor, y los genes para la resistencia a los antibióticos.
 - Localice las posiciones de cada sitio de restricción de las enzimas de restricción.
2. Elija la enzima de restricción que se debe utilizar para cortar el plásmido. Verifique que la enzima de restricción cumpla con todos los siguientes criterios:
 - Deje el punto *ori*, el promotor, y al menos un gen de resistencia a antibióticos intacto.
 - Corte el plásmido solo una vez.
 - El corte está cerca del promotor.
3. Revise la **Tabla 2.1** en la página B-8 y use tijeras para cortar el plásmido en el sitio de restricción exactamente como lo haría la enzima de restricción. Escriba las secuencias de los nucleótidos que quedan en cada extremo del plásmido.
4. Sobre la **secuencia de ADN humano (RM 3)**, escanee la secuencia del ADN humano y determine dónde cortarían el ADN las tres enzimas de restricción: *Bam*HI, *Eco*RI y *Hind*III.
5. Determine si la enzima de restricción que eligió en el paso 2 es una buena opción para cortar el gen de la insulina del ADN humano al verificar que cumple con todos los siguientes criterios:
 - No corta dentro del gen de la insulina.
 - Corta muy cerca del principio y final del gen.
 - Permitirá que el gen de la insulina se inserte en el plásmido cortado.
6. Revise la **Tabla 2.1**, y use tijeras para cortar el ADN humano en el sitio de restricción exactamente como lo haría la enzima de restricción. Escriba las secuencias de los nucleótidos que quedan en cada extremo del gen de la insulina después de que se haya cortado del ADN humano.
7. Use cinta adhesiva para insertar el gen de la insulina en el plásmido cortado. Verifique que los extremos cohesivos se conecten siguiendo la orientación correcta. (En el laboratorio, una tercera herramienta biológica, **ADN ligasa**, se utiliza para conectar permanentemente los extremos cohesivos). Ahora tiene un modelo en papel de un plásmido recombinante que contiene un gen de insulina. Una vez que el plásmido se replica (se copia) a sí mismo, el gen de la insulina también se copia o clona.

PREGUNTAS DE LA ACTIVIDAD

1. ¿Qué enzima de restricción eligió? ¿Por qué la eligió?
2. ¿Dónde insertaría el gen de la insulina y por qué?
3. ¿Qué antibiótico usaría para determinar si se tomó el ADN recombinante?

LABORATORIO 2: PREPARACIÓN PARA CLONAR EL GEN *rfp*: LA DIGESTIÓN DEL pKAN-R Y pARA

Para generar proteínas terapéuticas humanas, los científicos primero necesitan aislar un fragmento de ADN que contenga el gen humano que codifica la proteína deseada y luego insertar esa secuencia en un plásmido. En este laboratorio, hará precisamente eso. Producirá los fragmentos de ADN que luego se unirán para crear el plásmido recombinante, pARA-R, que puede producir RFP en bacterias. Para hacer esto, utilizará enzimas de restricción para cortar dos plásmidos, que generarán fragmentos de ADN. Este procedimiento se llama **digestión restricción**, y las longitudes de los fragmentos se pueden determinar por electroforesis en gel (lo que puede hacer en el Capítulo 4).

Hasta ahora, ha aprendido acerca del uso de un solo plásmido para clonar un gen humano. En algunas circunstancias, los científicos necesitan usar ADN plasmídico de diferentes fuentes para generar un ADN recombinante específico. Para clonar el gen *rfp*, necesitará ADN de dos plásmidos diferentes. El plásmido pKAN-R (vea la **Figura 2.5**) porta el gen que hace que las bacterias sean resistentes al antibiótico kanamicina, el gen *rfp*, y un promotor. El plásmido pARA (vea la **Figura 2.5**) 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 naturalmente existe en varios carbohidratos de plantas y bacterias. Esta secuencia se llama **activador** de la arabinosa (*araC*). (Un activador es una proteína que regula la transcripción de un gen al unirse a una secuencia cerca del promotor, lo que permite que la ARN polimerasa se una al promotor e inicie la transcripción del gen. La proteína activadora también puede bloquear la unión de la ARN polimerasa e inhibir así la transcripción del gen). Si la arabinosa está presente en las bacterias, el promotor se unirá a la ARN polimerasa y se producirá la transcripción. Si la arabinosa no está presente, el promotor no se unirá a la ARN polimerasa y no se producirá la transcripción. El plásmido pARA también contiene el punto *ori* para iniciar la replicación del ADN.

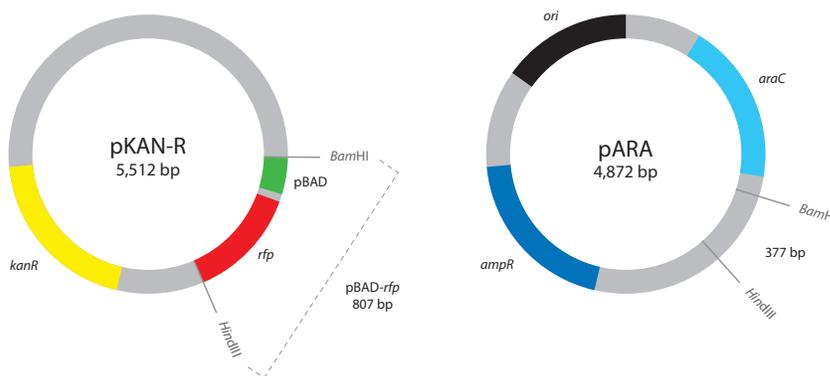


Figura 2.5: Los plásmidos pKAN-R y pARA



Los componentes relevantes en 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 2.5** también muestra el tamaño del plásmido (el número en el centro, que indica el número de pares de bases [bp]) y las secuencias donde se puede cortar con las enzimas de restricción que se utilizarán en el laboratorio. Los sitios etiquetados como "*Bam*HI" y "*Hind*III" representan los sitios de restricción para estas dos enzimas de restricción. (Vea la **Tabla 2.1** en la página B-8). La **Figura 2.4** (en la página B-10) muestra el gen de la insulina que se inserta en un solo sitio de enzima de restricción en el plásmido. En la clonación del gen *rfp*, dos enzimas de restricción (*Bam*HI y *Hind*III) se utilizan para cortar el plásmido en el que el gen *rfp* será insertado y para aislar el gen *rfp* del segundo plásmido.

El uso de dos enzimas de restricción diferentes tiene varias ventajas: permite que el gen insertado se oriente en la posición correcta para transcribir el "sentido" de la cadena de ADN (la cadena que codifica la proteína) y evita que el plásmido vuelva a formar el círculo sin el gen insertado. Aprenderá más sobre esto si hace la práctica del Capítulo 4.



DETÉNGASE Y PIENSE: ¿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 DEL LABORATORIO

Responda a las siguientes preguntas con su grupo y prepárese para compartir sus respuestas con la clase.

1. Revise la **Figura 2.5**. Si pKAN-R se digiere con *Bam*HI y *Hind*III, ¿qué fragmentos se producen? Si pARA se digiere con *Bam*HI y *Hind*III, ¿qué fragmentos se producen? Registre la secuencia de nucleótidos de los extremos cohesivos y la longitud de cada fragmento (pb), e indique los genes y otras secuencias importantes presentes en cada fragmento.
2. Para crear un plásmido que pueda producir RFP en bacterias, ¿qué componentes se necesitan en el plásmido?
3. Las bacterias pueden ser destruidas por un antibiótico a menos que contengan un plásmido que tenga el gen de resistencia a ese antibiótico. (Los científicos llaman a este tipo de genes **marcadores seleccionables**; solo las bacterias que portan este gen sobrevivirán a la exposición a un antibiótico. Si la captación de ADN por las bacterias es ineficaz (como se analiza en la lectura), ¿por qué un marcador seleccionable es clave en la clonación de un gen en las bacterias?
4. Lea la sección *Métodos* en las páginas de B-17 y B-18 y describa brevemente los pasos, utilizando palabras y un diagrama de flujo.

MATERIALES

Reactivos

- Una gradilla con lo siguiente:
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de tampón 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 y HindIII (RE)
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de agua destilada (dH₂O)

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 de residuos para puntas y tubos de microcentrífuga usados (se compartirán entre los grupos)

SEGURIDAD:

- Se deben seguir todas las precauciones de seguridad adecuadas y usarse la vestimenta requerida para un laboratorio de ciencias, incluidas las gafas de seguridad. Consulte las instrucciones de su profesor.
- Lávese bien las manos con jabón después de finalizar la práctica de laboratorio.



MÉTODOS

1. Revise su gradilla para asegurarse de que tiene todos los reactivos que están en la lista.
2. Use un marcador para etiquetar cuatro tubos de microcentrífuga limpios de la siguiente manera: K+, K-, A+ y A-. (También incluya su número de grupo y período de clase en cada tubo).
3. Revise la **Tabla 2.2**, que resume los reactivos que agregará en el paso 4.

Tabla 2.2: Adición de reactivos a los tubos K+, K-, A+ y A-

	Tubo de K+	Tubo de K-	Tubo de A+	Tubo de A-
Paso 4a: Tampón de restricción (2.5xB)	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: <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III (RE)	2.0 µl		2.0 µl	
Paso 4e: agua destilada (dH ₂ O)		2.0 µl		2.0 µl



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

4. Con una punta de pipeta nueva para cada reactivo, agregue 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 RE a los tubos K + y A +. Agregue las enzimas directamente en la solución en la parte inferior del tubo de microcentrifuga. Bombee suavemente la solución hacia adentro y afuera con la pipeta para mezclar los reactivos. Tape los tubos cuando haya terminado.
 - e. 2.0 μ l de dH₂O a los tubos K- y A-. Bombee suavemente la solución hacia adentro y afuera con la pipeta para mezclar los reactivos. Tape los tubos cuando haya terminado.

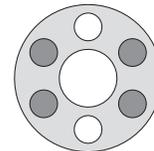


DETÉNGASE Y PIENSE: En el paso 4, se le pide que prepare dos tubos sin las enzimas de restricción, *Bam*HI y *Hind*III. ¿Cuál es el propósito de este paso y por qué es importante?

5. Gire los cuatro tubos de microcentrifuga (K+, A+, K- y A-) en la microcentrifuga durante varios segundos para agrupar los reactivos en la parte inferior de cada tubo.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Distribuya los tubos uniformemente en la microcentrifuga para que su peso esté equilibrado.



6. Coloque los cuatro tubos en baño maría a 37 °C. (Colocará los tubos en la gradilla flotante para tubos de microcentrifuga; cuando la gradilla esté llena, tu profesor la colocará en baño maría). Incube durante al menos 15 minutos. Una vez que se completó la incubación, coloque los cuatro tubos en el congelador a -20 °C. Utilizará el contenido de los tubos en el Laboratorio 3.



DETÉNGASE Y PIENSE: ¿Por qué podrían funcionar mejor las enzimas a 37 °C? ¿Por qué se deben colocarse las enzimas en el congelador?

PREGUNTAS DEL CAPÍTULO 2

Responda a las siguientes preguntas con su compañero y prepárese para compartir sus respuestas con la clase.

1. Enumere en palabras o indique en un dibujo las características importantes de un vector plasmídico que se requieren para clonar un gen. Explique el propósito de cada característica.
2. ¿Qué papel tienen las enzimas de restricción en la naturaleza?
3. Según su comprensión de la evolución, ¿por qué las bacterias retienen un gen que les da resistencia a los antibióticos? ¿De qué manera la existencia de bacterias con resistencia a los antibióticos afecta a la medicina hoy en día?
4. Las bacterias, las anémonas de mar y los humanos parecen ser, en la superficie, organismos muy diferentes. ¿Cómo se puede expresar un gen de los seres humanos o una anémona de mar en las bacterias para crear un producto nunca antes creado en bacterias?
5. Debido a un percance en la práctica de laboratorio, las bacterias que llevan un plásmido con un gen resistente a la kanamicina y las bacterias que llevan un plásmido con un gen resistente a la ampicilina se mezclaron de forma accidental. ¿Cómo diseñaría un experimento que le permita clasificar los dos tipos de bacterias? (Pista: ¡Asegúrese de no destruir uno de los tipos de bacterias que intenta clasificar!)

GLOSARIO DEL CAPÍTULO 2

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

Antibiótico: es una clase de compuestos que suprime o inhibe el crecimiento de microorganismos.

Resistencia a antibióticos: es el estado en el que las bacterias ya no son sensibles a un antibiótico y continuarán creciendo y dividiéndose en presencia del antibiótico.

Arabinosa: es un azúcar de cinco carbonos que se encuentra naturalmente en varios carbohidratos de plantas y bacterias.

Conjugación bacteriana: es un proceso por el cual dos células bacterianas se unen y transfieren material genético entre sí.

Transformación bacteriana: es el intercambio de material genético entre cepas de bacterias; un proceso en el cual un plásmido es captado por células bacterianas.

Bacteriófago: es un virus que infecta una célula bacteriana y utiliza la maquinaria celular para replicarse, destruyendo finalmente a la célula bacteriana.

Par de bases: son dos moléculas complementarias que contienen nitrógeno apareadas en el ADN de doble cadena mediante enlaces débiles.

Factor de coagulación de la sangre: consiste en una variedad de proteínas en el plasma sanguíneo que participan en el proceso de coagulación.

Diabetes: es una enfermedad que se produce cuando el nivel de glucosa en la sangre de una persona es demasiado alta.

Digestión: es el corte del ADN mediante una enzima de restricción.

Clonación de ADN: es el proceso de hacer muchas copias exactas de una pieza de ADN en particular. (Vea replicación de ADN).

ADN ligasa: es una enzima que cataliza la formación de enlaces químicos covalentes en el esqueleto azúcar-fosfato, uniendo así los fragmentos de ADN.

Replicación del ADN: es el proceso biológico de hacer una copia idéntica de una sección de ADN, que ocurre cada vez que se forma una nueva célula en los organismos vivos. El proceso comienza cuando una molécula de ADN de doble cadena produce dos copias idénticas. La doble hélice se desenrolla, y cada cadena de la molécula original sirve como plantilla para la producción de la cadena complementaria.

***Escherichia coli* (E. coli):** es una bacteria común que se encuentra en el intestino de animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas son inofensivas, incluida la cepa que se utiliza en estos protocolos de laboratorio.

Expresado: es cuando la información codificada en un gen se ha convertido primero en ARN mensajero y luego en una proteína. Este proceso se llama expresión.

Fluorescencia: es la producción de luz por una molécula (p. ej., la proteína fluorescente roja liberará luz roja cuando se exponga a la luz ultravioleta).

Deficiencia del crecimiento: es una enfermedad en la que una persona no crece adecuadamente.

Hemofilia: es una enfermedad que se produce cuando se reduce la capacidad de coagulación de la sangre.

Hormona del crecimiento humano: es una hormona secretada por la glándula pituitaria que estimula el crecimiento.

Insulina: es una hormona que se produce en el páncreas que controla la cantidad de glucosa en la sangre. La insulina es una proteína.

ARN mensajero: es una molécula de ARN transcrita del ADN de un gen y utilizada como plantilla para la síntesis de proteínas.

Origen de la replicación (*ori*): es una secuencia de ADN en la que se inicia la replicación del ADN.

Promotor: es una secuencia de ADN específica que se une a la ARN polimerasa e inicia la transcripción del gen.

Sitio de restricción (también conocido como sitio de reconocimiento de restricción): es una secuencia de ADN específica que es cortada por una enzima de restricción. Muchos sitios de restricción son palíndromos, secuencias que son iguales cuando se leen hacia adelante o hacia atrás.

Plásmido recombinante: es un plásmido construido a partir de fragmentos de ADN de múltiples fuentes.

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

Digestión con enzimas de restricción: es una técnica en la que se utilizan enzimas naturales para cortar el ADN en secuencias específicas.

ARN (ácido ribonucleico): es una biomolécula monocatenaria formada por una base nitrogenada, un azúcar ribosa y un fosfato. El ARN desempeña un papel fundamental en la síntesis de proteínas, al transmitir información genética desde el ADN al ribosoma donde se producen las proteínas.

ARN polimerasa: es una proteína que produce ARN mensajero a partir de ADN.

Marcador seleccionable: es un gen en un plásmido que se introduce en una célula junto con un gen de interés que se está clonando. Los marcadores seleccionables permiten a los científicos saber si la célula ha captado el plásmido porque se puede ver o detectar el marcador. Un marcador seleccionable común es un gen de resistencia a los antibióticos: solo las bacterias que tienen el gen sobrevivirán al antibiótico.

Extremo cohesivo: es el extremo de una molécula de ADN cortada con ciertas enzimas de restricción. Estos extremos son asimétricos, ya que una cadena es más larga que la otra y, por lo tanto, tiene bases no emparejadas. Los extremos cohesivos de dos piezas diferentes de ADN que se han cortado con la misma enzima (s) de restricción se pueden unir, ya que las bases no emparejadas en sus extremos son complementarias.

Transcripción: es el proceso mediante el cual la información codificada en el ADN se transfiere al ARN mensajero, un ácido ribonucleico monocatenario.

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



CAPÍTULO 3

CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE

INTRODUCCIÓN

En los Capítulos 1 y 2, aprendió acerca de cuatro herramientas importantes de ingeniería genética: la micropipeta, la electroforesis en gel, los plásmidos y las enzimas de restricción. El Capítulo 2 se centró en cortar el ADN en fragmentos que podrían combinarse en un plásmido recombinante. En este capítulo, **ligará** (pegará) los fragmentos utilizando una quinta herramienta que se necesita para clonar genes: la ADN ligasa. ADN ligasa es una enzima que **cataliza** (aumenta la velocidad de una reacción) la unión de fragmentos de ADN; es una de varias enzimas involucradas en la replicación del ADN en todas las células. Este mismo proceso se utiliza para producir plásmidos recombinantes que contienen el gen de la insulina humana, la hormona del crecimiento humano, los factores de coagulación de la sangre y otras proteínas terapéuticas humanas.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 3

Al final de este capítulo, podrá hacer lo siguiente:

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

¿QUÉ ES LO QUE YA SABE?

Discuta las siguientes preguntas con su compañero y escriba sus ideas en su cuaderno. Prepárese para discutir sus respuestas con la clase. No se preocupe si no sabe todas las respuestas. Discutir estas preguntas lo ayudará a pensar en lo que ya sabe sobre las enzimas, la replicación del ADN y la **ligación** de ADN (la reacción que une químicamente dos fragmentos de ADN, lo que resulta en una molécula de ADN recombinante).

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. ¿Qué sucede cuando se unen dos fragmentos de ADN con extremos cohesivos complementarios? ¿Cómo asegura la actividad de la ADN ligasa que la unión es permanente?

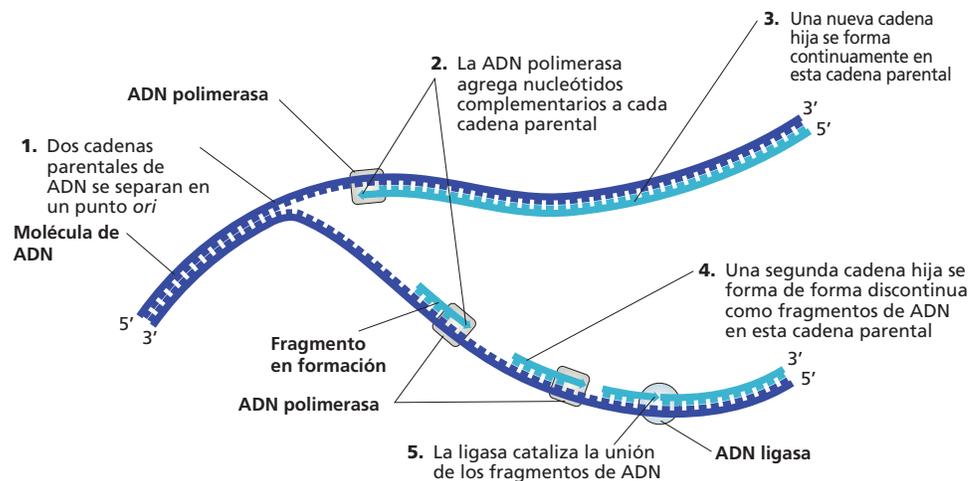
PEGAR FRAGMENTOS DE ADN

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 para producir proteínas terapéuticas. Los plásmidos proporcionaron el vehículo para clonar genes, y las enzimas de restricción proporcionaron los medios para generar los fragmentos de ADN necesarios para formar plásmidos recombinantes. El último ingrediente esencial era una forma de “pegar” los fragmentos.

LAS ADN LIGASAS EN LA NATURALEZA

Para comprender mejor las ligasas y su papel en la clonación de un gen, es importante comprender el papel que desempeñan en la naturaleza. A principios de la década de 1960, los científicos aislaron enzimas que tenían la capacidad de combinar fragmentos de ADN. Se demostró que estas enzimas, llamadas ADN ligasas, están involucradas en la replicación del ADN de cromosomas y plásmidos. La replicación se produce en una serie de pasos (como se muestra en la **Figura 3.1**):

Figura 3.1: Resumen de la replicación del ADN



1. Las dos cadenas originales comienzan a separarse en múltiples ubicaciones de la molécula de ADN. Cada ubicación es un origen de la replicación, o punto *ori* (el mismo que aprendió sobre los plásmidos en el Capítulo 2). Las dos cadenas originales se llaman **cadena parentales**.
2. Una vez que las cadenas parentales se separan y las bases se exponen, una enzima llamada **ADN polimerasa** añade nuevos nucleótidos. Cada nueva base de nucleótido forma enlaces de hidrógeno con las bases de nucleótido existentes en la cadena parental. En este paso se crean **pares de bases complementarias**.

3. En una cadena parental, la ADN polimerasa agrega nucleótidos continuamente para formar una nueva cadena complementaria, una **cadena hija**.
4. En la otra cadena parental, la ADN polimerasa agrega nucleótidos de manera discontinua, lo que da como resultado pequeños fragmentos de ADN. (Para obtener información sobre por qué una cadena se replica continuamente y otra de forma discontinua, consulte en *¿Sabía? Direccionalidad del ADN* en la página B-29)
5. Los fragmentos de ADN deben ser unidos por la enzima ADN ligasa para formar la segunda cadena hija. La ligasa une los fragmentos al catalizar la formación de un enlace covalente entre nucleótidos adyacentes.

Una vez que se completan los pasos de la replicación, se han creado dos nuevas moléculas de ADN, cada una de las cuales consta de una cadena parental y una cadena hija. Ambas moléculas son copias exactas, o **réplicas**, de la molécula de ADN original.

CONSIDERE:

- ¿Cuáles son los roles de los enlaces de hidrógeno y los enlaces covalentes en la estructura del ADN?
- Según lo que acaba de aprender sobre la replicación del ADN, ¿cuál es el posible papel de las ligasas al unir los extremos cohesivos de los fragmentos de ADN?



PAPEL DE LA LIGASAS EN LA CLONACIÓN DE GENES

El papel de la ligasa en la clonación de genes es similar a su papel en la replicación, ya que une los fragmentos de ADN. En la clonación de genes, el ADN recombinante es el resultado de la ligación de fragmentos de una digestión de restricción (como se muestra en la **Figura 3.2**). Cualquiera de los dos fragmentos que tienen extremos cortados con la misma enzima de restricción se pueden ligar juntos. En primer lugar, las bases nitrogenadas 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 tiene varios fragmentos, el procedimiento de ligación puede llevar a una serie de posibles productos (vea la **Figura 3.3**).

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

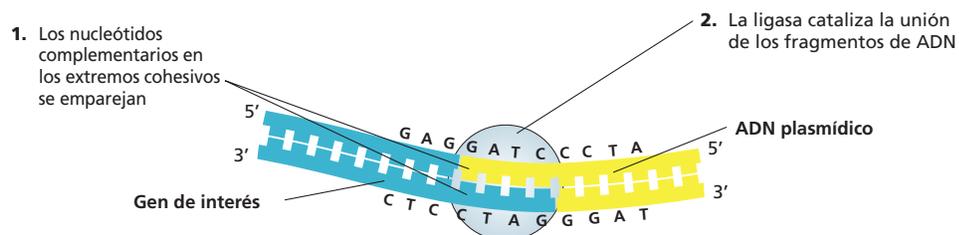
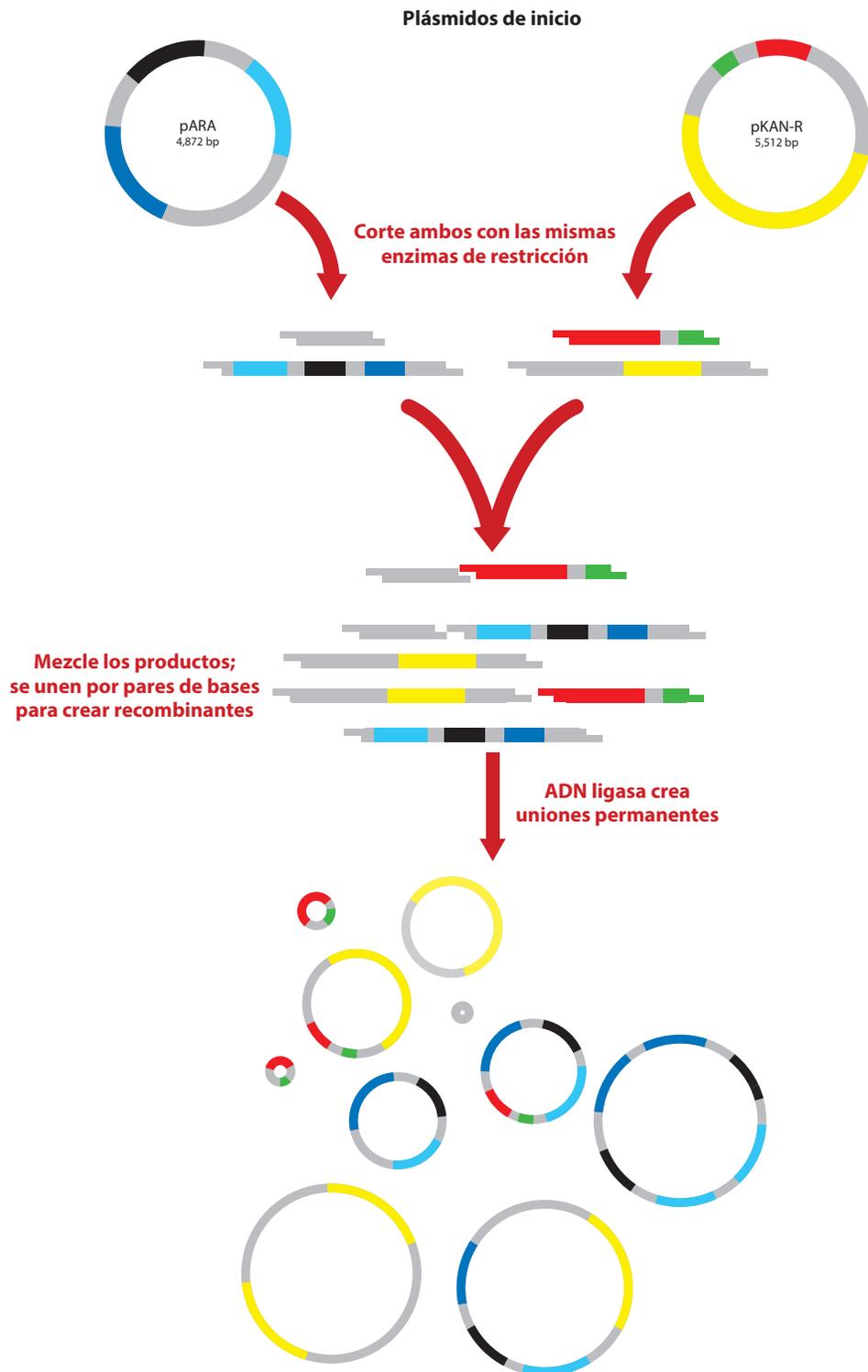


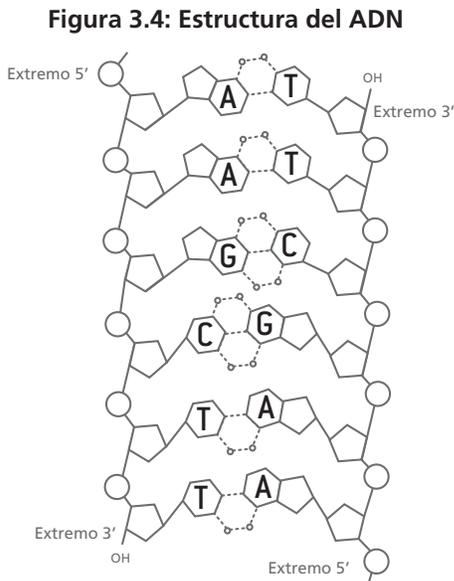
Figura 3.3: Proceso de ligación



¿SABÍA?

Direccionalidad del ADN

El ADN es una doble hélice de dos cadenas entrelazadas que están unidas por hidrógeno mediante las bases de los nucleótidos. Cada cadena tiene una **direccionalidad** diferente, lo que significa que cada cadena tiene una orientación química basada en el 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 de azúcar desoxirribosa. El **extremo 3'** (3 "primo") de la cadena de ADN es el extremo que tiene el grupo hidroxilo (OH) en el *tercer* carbono en el anillo de azúcar de desoxirribosa (vea la **Figura 3.4**).



Esta denominación de los extremos de las cadenas es útil para comprender cómo funciona la ADN polimerasa. La ADN polimerasa solo puede ensamblar nuevas cadenas de ADN en la dirección 5' a 3', agregando nuevos nucleótidos al grupo 3'-hidroxilo. Por lo tanto, en una cadena, la replicación ocurre continuamente a medida que la polimerasa agrega nucleótidos en la dirección 5' a 3' para formar la cadena hija. En la otra cadena, la ADN polimerasa también agrega nucleótidos en la dirección 5' a 3', lo que da como resultado fragmentos cortos de ADN que deben unirse entre sí para formar la otra cadena hija.

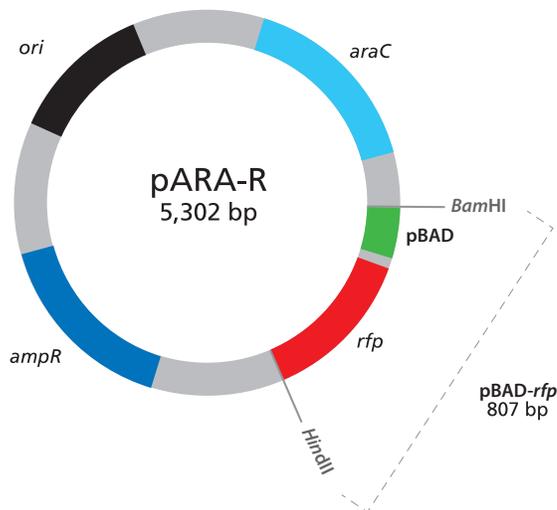




LABORATORIO 3: CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pARA-R

En este laboratorio, ligará los fragmentos de ADN que produjo durante el Laboratorio 2, utilizando la ADN ligasa para producir nuevos plásmidos recombinantes. Estos plásmidos recombinantes contendrán los cuatro *fragmentos de restricción* (las piezas de ADN que resultan de cortar la molécula de ADN con una enzima de restricción) del Laboratorio 2, recombinados de diferentes maneras para producir nuevos conjuntos de ADN. El proceso de ligación dará como resultado varios plásmidos diferentes, pero el plásmido en el que está interesado contendrá el gen para la resistencia a la ampicilina (*ampR*), el gen de la proteína roja fluorescente (*rfp*), un promotor para iniciar la transcripción (pBAD), la secuencia activadora de arabinosa (*araC*), y la secuencia *ori* para el inicio de la replicación del ADN. Este plásmido de ADN recombinante deseado se llama plásmido pARA-R (vea la **Figura 3.5**).

Figura 3.5: Plásmido pARA-R



Durante el laboratorio, mezclará los fragmentos de ADN de su digestión de restricción en el Laboratorio 2 y la ADN ligasa, pero no podrá observar nada hasta el Laboratorio 4, cuando tendrá la oportunidad de separar e identificar sus moléculas de ADN usando la electroforesis en gel. Sin embargo, se preparará para lo que pueda observar al determinar los plásmidos posibles que pueden ocurrir y luego dibujar diagramas de estos plásmidos. En este trabajo, está modelando el proceso de ligación.

ANTES DEL LABORATORIO

Discuta lo siguiente con su grupo, anote sus ideas y prepárese para compartir sus respuestas con la clase.

1. Revise su respuesta a la pregunta 1 en *Antes del laboratorio* en el Laboratorio 2 (página B-16), en la que describió los fragmentos que se formaron a partir de la digestión de pKAN-R y pARA con *Bam*HI y *Hind*III. Con esta información, dibuje tres plásmidos recombinantes posibles resultantes de la unión de dos fragmentos pARA y pKAN-R. Para cada plásmido, identifique los genes, otras secuencias importantes y la cantidad de pares de bases que tiene cada uno.
2. Lea la sección *Métodos* en la página B-32 y describa brevemente los pasos, utilizando palabras y un diagrama de flujo.

MATERIALES

Reactivos

- Una gradilla con lo siguiente:
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de pKAN-R digerido del laboratorio 2 (K+)
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de pARA digerido del laboratorio 2 (A+)
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de tampón de ligación 5x (5xB)
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de ADN ligasa (LIG)
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de agua destilada (dH₂O)

Equipo y suministros

- Baño maría a 80 °C con gradilla flotante para tubos de microcentrífuga (se compartirá entre todos los grupos)
- Micropipeta P-20
- Caja de puntas para puntas de pipetas desechables
- Marcador permanente
- Microcentrífuga (se compartirá entre todos los grupos)
- Recipiente de residuos para las puntas y tubos de microcentrífuga usados (se compartirá con otro grupo)

SEGURIDAD:

- Deberá seguir todas las precauciones de seguridad adecuadas y la vestimenta requerida para un laboratorio de ciencias, incluidas las gafas de seguridad. Consulte las instrucciones de su profesor.
- Lávese bien las manos con jabón después de terminar el laboratorio.



MÉTODOS

1. Revise su gradilla para asegurarse de que tiene todos los reactivos que están en la lista.
2. Coloque los tubos K+ y A+ del Laboratorio 2 en baño maría a 80 °C (colocará los tubos en la gradilla flotante para tubos de microcentrifuga; una vez que se carguen las muestras de cada grupo, su profesor colocará la gradilla en el baño maría) por 20 minutos. Esta exposición al calor *desnaturalizará* (inactivará) las enzimas de restricción.

NOTA: Durante la incubación, comparta y discuta sus respuestas a la pregunta 1 en *Antes del laboratorio*. También comparta y discuta su respuesta a la pregunta **DETÉNGASE Y PIENSE** que sigue, y comience a responder a la *Preguntas del Capítulo 3* en la página B-33.



DETÉNGASE Y PIENSE: ¿Por qué es importante desactivar las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* antes de ligar los fragmentos? ¿Qué podría suceder si no realiza este paso?

3. Etiquete el tubo LIG con su número de grupo y período de clase.
4. Después de 20 minutos, retire los tubos K+ y A+ del baño maría y colóquelos en su gradilla.
5. Con una punta de pipeta nueva con cada reactivo, agregue las siguientes soluciones directamente a la solución que está en la parte inferior del tubo LIG:
 - a. 4.0 µl de A+
 - b. 4.0 µl de K+
 - c. 3.0 µl de 5xB
 - d. 2.0 µl de dH₂O

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

6. Después de agregar el dH₂O, bombee suavemente la solución hacia adentro y hacia afuera con la pipeta para mezclar los reactivos. Tape los tubos cuando haya terminado.
7. Gire el tubo LIG en la microcentrifuga durante varios segundos para agrupar los reactivos en la parte inferior del tubo.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Distribuya los tubos uniformemente en la microcentrifuga para que su peso esté equilibrado.

8. Coloque sus tubos LIG, A+ y K+ en las gradillas de microcentrifuga designadas por su profesor. (Su tubo LIG se incubará a temperatura ambiente hasta la siguiente clase. Sus tubos A+ y K+ se devolverán al congelador a -20 °C para su uso en el Laboratorio 4).



PREGUNTAS DEL CAPÍTULO 3

Discuta las siguientes preguntas con su compañero y prepárese para compartir sus respuestas con la clase:

1. ¿Qué papel tienen las ADN ligasas en la naturaleza?
2. ¿Qué papel tienen las ADN ligasas en la clonación de genes?
3. ¿Qué propiedades de los fragmentos de restricción de ADN producidos en el Laboratorio 2 permiten la ligación de estos fragmentos?
4. ¿Podrían dos fragmentos de *rfp* unirse para formar un plásmido durante la ligación? Si no, ¿qué evitaría eso? Si es así, ¿cuál sería el resultado?
5. Durante la ligación, se forman tanto enlaces de hidrógeno como covalentes. ¿Qué enlaces se forman primero? ¿Por qué deben formarse ambos tipos de enlaces?

¿SABÍA?

Mutaciones del ADN y Producción de Proteínas

Cada vez que una célula se divide y su ADN se replica, copia y transmite exactamente la misma secuencia de nucleótidos a sus células hijas. Mientras que el ADN generalmente se replica con una gran precisión, los errores ocurren. Las enzimas polimerasas a veces insertan el nucleótido incorrecto o agregan demasiados o muy pocos nucleótidos.

Las mutaciones (cambios) no son necesariamente dañinos. Si una mutación le da al organismo una ventaja selectiva, el rasgo se puede transmitir a las generaciones futuras. Sin embargo, incluso las mutaciones muy pequeñas a veces pueden tener consecuencias graves. Un cambio a un solo par de bases puede cambiar la capacidad de una célula para producir una proteína en particular.

Una mutación es la causa de la enfermedad de células falciformes (Sickle Cell Disease, SCD), una enfermedad grave en la que los glóbulos rojos se vuelven rígidos, cohesivos y de forma irregular. Los glóbulos rojos normalmente son responsables de proporcionar un suministro constante de oxígeno a cada célula del cuerpo, y la SCD afecta significativamente su capacidad para funcionar. Un solo cambio en un gen llamado *HBB* altera uno de los aminoácidos en la hemoglobina, la proteína responsable de transportar oxígeno dentro de los glóbulos rojos. Debido al cambio en la estructura de la proteína, los glóbulos rojos se deforman, pueden transportar menos oxígeno y son mucho más propensos a formar coágulos sanguíneos peligrosos.



GLOSARIO DEL CAPÍTULO 3

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

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

Catalizar: es aumentar la velocidad de una reacción.

Par de bases complementarias: Bases que contienen nitrógeno que se encuentran opuestas entre sí en una molécula de ADN de doble cadena. La complementariedad es el resultado del tamaño y la forma de la base y el número 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.

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

Desnaturalizar: es cambiar la forma de una biomolécula y lo que posteriormente afecta su función, que a menudo se logra mediante el calentamiento. Por ejemplo, una proteína se pliega en una forma tridimensional compleja que está directamente relacionada con su función. Cualquier proceso que interfiera con el plegamiento de proteínas puede cambiar su forma tridimensional y resultar en la inactivación de la proteína.

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

ADN polimerasa: es una enzima utilizada para replicar moléculas de ADN.

Ligar: es la unión de dos extremos del ADN.

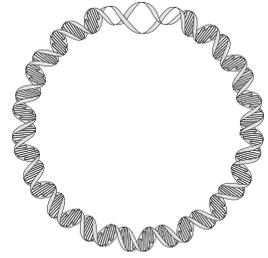
Ligación: es la reacción que une químicamente a dos fragmentos de ADN, da como resultado una molécula de ADN recombinante.

Mutación: es el cambio o daño que ocurre en una sección del ADN que altera los productos o procesos asociados con esa sección.

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

Réplica: es una copia exacta.

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



CAPÍTULO 4

CÓMO ASEGURARSE DE QUE HA CREADO UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE

INTRODUCCIÓN

Cuando los científicos clonan un gen para producir una proteína terapéutica humana, crean un plásmido recombinante que incluye el gen humano de interés. Para hacerlo, usan enzimas de restricción para crear fragmentos de ADN que contienen los componentes del plásmido (Capítulo 2) y luego usan la ADN ligasa para unir esos fragmentos (Capítulo 3). Como parte del proceso de clonación de genes, los científicos tienen que **verificar** (confirmar) que han creado el plásmido recombinante que necesitan, es decir, el que tiene el gen de interés (que producirá la proteína terapéutica humana) y todos los componentes necesarios para que se produzca esa proteína. En este capítulo, continuará trabajando con las herramientas de ingeniería genética mientras verifica que tiene el plásmido recombinante que necesita para producir una RFP.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 4

Al final de este capítulo, podrá 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 a través de un gel durante la electroforesis en gel
- Separar e identificar los fragmentos de restricción de ADN y los plásmidos mediante electroforesis en gel

¿QUÉ ES LO QUE YA SABE?

Discuta las siguientes preguntas con su compañero y escriba sus ideas en su cuaderno. Está preparado para discutir sus respuestas con la clase. No se preocupe si no sabe todas las respuestas. Discutir estas preguntas lo ayudará a pensar en lo que ya sabe sobre la electroforesis en gel, la verificación en el laboratorio y la ligación.

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

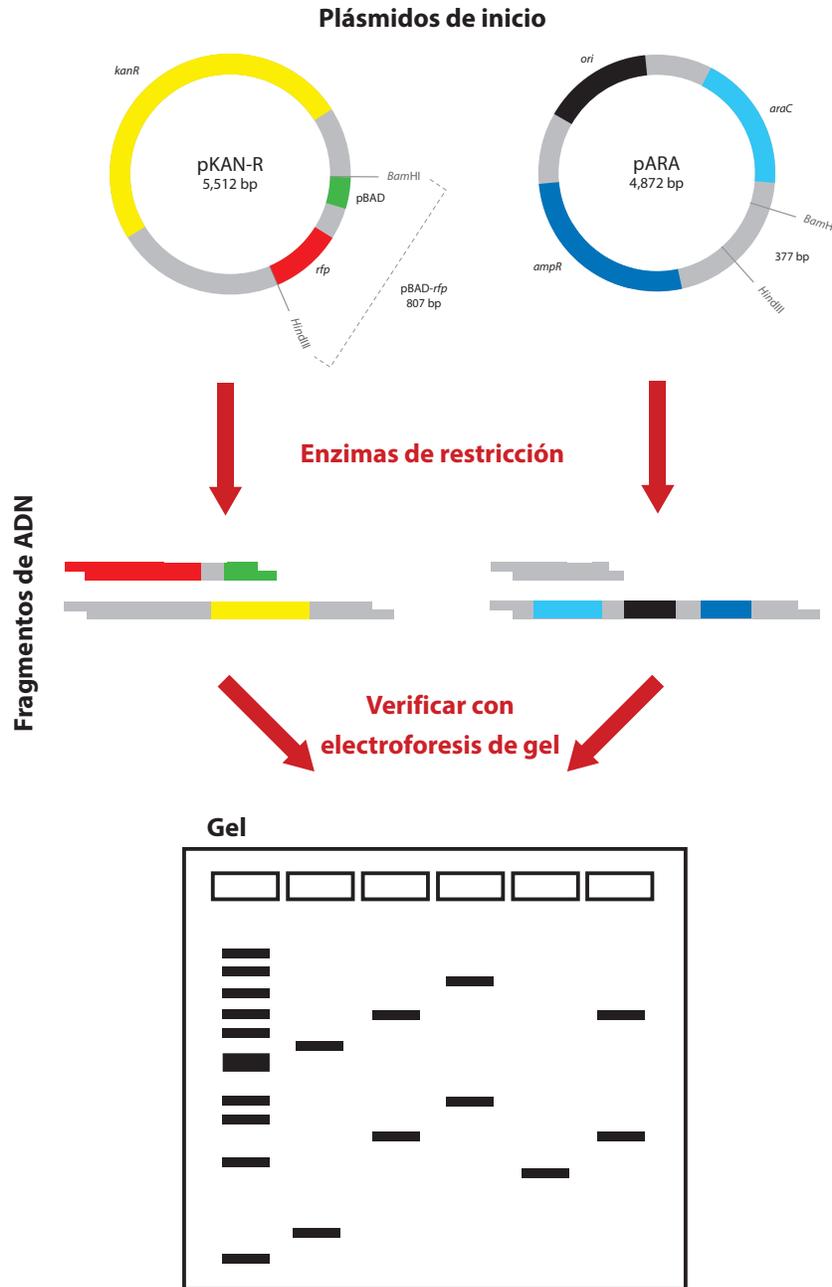
¿POR QUÉ NECESITA VERIFICAR?

Debido a que existen muchas fuentes de error potencial en cualquier procedimiento, incluidos los procedimientos utilizados para clonar un gen, es importante verificar su trabajo en el laboratorio. En la clonación de genes, también existe el problema de que algunos procedimientos no son selectivos. Por ejemplo, cuando se usa una ADN ligasa para ligar fragmentos de ADN, muchas combinaciones diferentes resultan del proceso de ligación. A menos que verifique su trabajo, no sabrá si ha hecho el plásmido recombinante que se necesita.

CÓMO VERIFICAR EL PLÁSMIDO RECOMBINANTE

La **Figura 4.1** muestra el método utilizado para verificar sus resultados al hacer un plásmido recombinante. Usted verifica que los procedimientos de ligación y digestión de restricción funcionaron al comparar los productos de ambos procedimientos entre sí y con lo que comenzó.

Figura 4.1: Método de verificación al hacer un plásmido recombinante

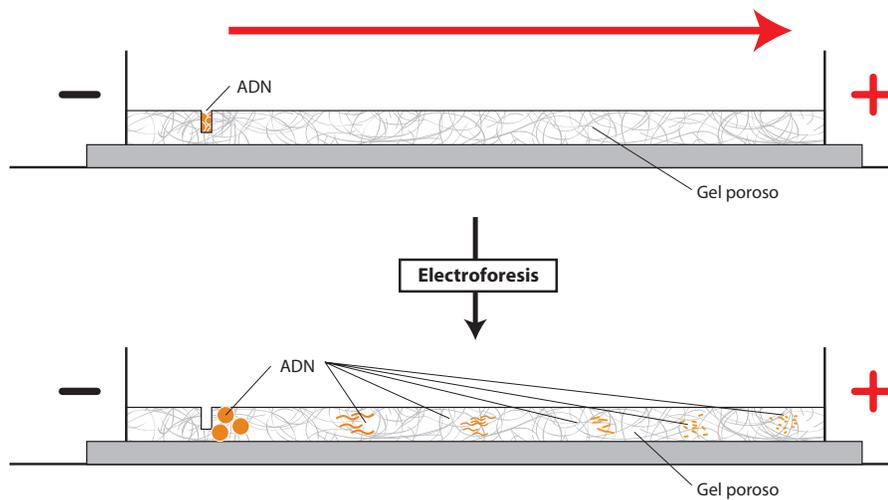


El gel mostrado aquí es solo un ejemplo. Su profesor le pedirá que prediga el tamaño exacto y la ubicación de los fragmentos.

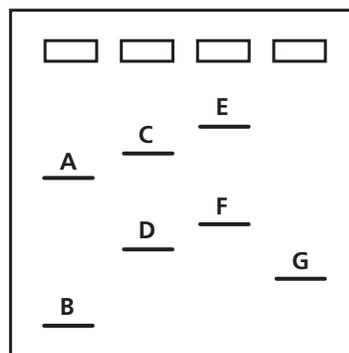
ELECTROFORESIS EN GEL

La electroforesis en gel se usa ampliamente en la verificación y purificación de ADN. Para identificar o purificar fragmentos de restricción de ADN, es necesario separar las moléculas de ADN de varios tamaños. La electroforesis en gel separa las biomoléculas principalmente de acuerdo con su tamaño molecular, que para el ADN se mide por el número de pares de bases. La estructura fundamental de una molécula de ADN está cargada negativamente debido a sus grupos fosfato y, por lo tanto, se alejará del electrodo negativo (negro) y se dirigirá hacia el electrodo positivo (rojo). Debido a que es más fácil que las moléculas pequeñas de ADN se muevan a través de la matriz de agarosa, migrarán más rápido que las moléculas de ADN más grandes. Vea la **Figura 4.2**.

Figura 4.2: Separación del ADN por tamaño mediante la electroforesis en gel



CONSIDERE: Después de la separación por electroforesis en gel, de diferentes fragmentos de ADN y plásmidos, el gel se colorea para mostrar bandas que indican la ubicación de cada tipo de fragmento y plásmido. El dibujo de un gel coloreado a continuación muestra una serie de bandas que se etiquetaron con letras. También se muestran las ubicaciones de los pocillos. ¿Cuál es el orden de los fragmentos, de menor a mayor?



PLÁSMIDOS EN LA ELECTROFORESIS EN GEL

Si bien los fragmentos de ADN, lineales y cortos, se mueven como se espera cuando se corren en electroforesis en gel, el movimiento de los plásmidos no es tan sencillo. Esto se debe a que un plásmido puede existir en diferentes configuraciones que se mueven a diferentes velocidades a través del gel. Hay tres configuraciones de plásmidos:

- La configuración plasmídica más común es **superhelicoidal**. Puede visualizar esta configuración pensando en una banda de goma que está torcida. Esta torsión o superenrollamiento da como resultado una molécula muy compacta, una que se moverá a través del gel muy rápidamente por su tamaño. Esta configuración solo se ve en los plásmidos que se han replicado en bacterias, porque el superenrollamiento de un plásmido requiere una enzima que se encuentra en la célula bacteriana. Es la configuración plasmídica natural predeterminada que se encuentra en las bacterias.
- La segunda configuración del plásmido es un **círculo fragmentado**. Puedes visualizar esta configuración como un círculo grande y flexible. Este plásmido tiene un espacio en uno de los enlaces covalentes ubicados en su esqueleto azúcar-fosfato a lo largo de una de las dos cadenas de nucleótidos. Esta configuración plasmídica circular no se moverá a través del gel de agarosa tan fácilmente como la configuración superhelicoidal. Aunque es del mismo tamaño, en términos de pares de bases, se ubicará más cerca del pocillo que de la forma superhelicoidal.
- La tercera configuración del plásmido es un **multímero**. Puede visualizar esta configuración pensando en dos o más plásmidos que están conectados como eslabones de una cadena. Esta configuración solo se ve en los plásmidos que se han replicado en bacterias, porque los multímeros se forman cuando los plásmidos se replican tan rápido que terminan unidos entre sí. Si dos plásmidos están unidos, el multímero será dos veces más grande que un plásmido único y migrará muy lentamente a través del gel. De hecho, se moverá más lento que el círculo fragmentado.

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

Figura 4.3: Configuraciones de plásmidos



CONSIDERE: Si usara electroforesis en gel para separar el mismo plásmido que tiene las tres configuraciones, ¿cuál plásmido se movería más rápido y cuál se movería más lento? ¿Por qué las diferentes configuraciones de plásmidos se mueven como lo hacen a través del gel? Explíquelo en palabras o con un dibujo.





¿SABÍA?

Historia de la ingeniería genética

La ingeniería genética no es un fenómeno nuevo. A lo largo de la historia, los seres humanos han utilizado la cría selectiva para producir organismos con rasgos deseables. La ciencia de la agricultura comenzó con la selección de pastos silvestres y su posterior reproducción para formar los precursores de 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 rasgos deseables en su descendencia. Por ejemplo, las vacas que producen grandes volúmenes de leche se pueden cruzar para que le pasen ese rasgo a las generaciones futuras.

El proceso de inserción o eliminación de ADN del genoma de un organismo es una tecnología muy nueva, pero es muy prometedora. Con la modificación genética, podemos aumentar el valor nutricional de los alimentos básicos, diseñar bacterias para producir proteínas terapéuticas para su uso en medicina y quizás incluso deshabilitar los genes que causan enfermedades.

En los organismos producidos por la cría selectiva tradicional, el genoma de la descendencia contiene información genética de ambos padres. En la ingeniería genética moderna, el nuevo organismo también contiene información genética de muchos otros organismos. La ingeniería genética logra resultados similares a la cría selectiva, pero más rápidamente y con mucha mayor precisión.

LABORATORIO 4: VERIFICACIÓN DE RESTRICCIÓN Y LIGACIÓN MEDIANTE ELECTROFORESIS DE GEL

En este laboratorio, utilizará electroforesis en gel para examinar los productos de la digestión de restricción de los plásmidos pKAN-R y pARA (Laboratorio 2) y los productos de la ligación (Laboratorio 3). Los tamaños de los fragmentos de ADN se pueden determinar al compararlos con una *Escalera de ADN*, una mezcla de fragmentos de ADN con tamaños conocidos. (Cuando la escalera de ADN se corre con electroforesis en gel y se colorea, las bandas que muestran los fragmentos parecen los peldaños 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 evidencia de que sus procedimientos de restricción y ligación fueron exitosos y que ha creado el plásmido recombinante pARA-R que contiene el gen *rfp*. El mismo procedimiento se usaría para verificar que un plásmido recombinante creado en el laboratorio contenía el gen para una proteína terapéutica humana.



ANTES DEL LABORATORIO

Responda a las siguientes preguntas con su grupo y prepárese para compartir sus respuestas con la clase.

1. Los plásmidos pKAN-R y pARA que usted digirió en el Laboratorio 2 se replicaron en una célula bacteriana. ¿Qué configuraciones (superhelicoidales, círculo fragmentado y multímero) podrían tener estos dos plásmidos antes de la digestión?
2. La ligación que llevó a cabo en el Laboratorio 3 puede generar varios plásmidos, pero ninguno de ellos se ha replicado en una célula bacteriana. ¿Qué configuraciones (superhelicoidal, círculo fragmentado y multímero) podrían tener los plásmidos ligados?
3. Debe predecir todos los productos que pueda ver, incluidas las diferentes configuraciones de plásmidos. Revisa tu trabajo en los laboratorios 2 y 3. ¿Qué productos podría esperar ver en los tubos K-, K+, A-, A+ y LIG? Cree una tabla que muestre todos los posibles fragmentos y plásmidos por tubo. Incluya la longitud (tamaño bp) de cada fragmento o plásmido, y ordene los productos encontrados en cada tubo de microcentrífuga por tamaño, desde el más pequeño hasta el más grande. Incluya todas las configuraciones posibles de plásmidos, y organícelas primero por tamaño y luego por velocidad a través del gel, de la más rápida a la más lenta.

- Lea la sección *Métodos* en las páginas de B-45 a B-47 y describa brevemente los pasos, utilizando palabras y un diagrama de flujo.

MATERIALES

Reactivos

- Una gradilla con lo siguiente:
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de pKAN-R no digerido del laboratorio 2 (K-)
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de pKAN-R digerido del laboratorio 2 (K+)
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de pARA no digerido del laboratorio 2 (A-)
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de pARA digerido del laboratorio 2 (A+)
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de plásmido ligado del laboratorio 3 (LIG)
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de tinte de carga (LD)
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de agua destilada (dH₂O)
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de escalera de ADN (M)
- Matraz de 50 ml que contiene tampón de borato de sodio 1x (1x SB) (se comparte con otro grupo)

Equipo y suministros

- 5 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Marcador permanente
- Micropipeta P-20
- Caja de puntas para puntas de pipetas desechables
- Microcentrífuga (se compartirá entre todos los grupos)
- Caja de electroforesis cargada con un 0.8% de gel de agarosa (se compartirá entre grupos)
- Recipiente de residuos para puntas y tubos de microcentrífuga usados (se compartirán entre los grupos)
- Diagrama de escalera de ADN (RM 4)**



SEGURIDAD:

- Deberá seguir todas las precauciones de seguridad adecuadas y la vestimenta requerida para un laboratorio de ciencias, incluidas las gafas de seguridad. Consulte las instrucciones de su profesor.
- Lávese bien las manos con jabón después de terminar el laboratorio.

MÉTODOS

1. Revise su gradilla para asegurarse de que tiene todos los reactivos que están en la lista.
2. Use el marcador para etiquetar cinco tubos de microcentrifuga limpios "geA-", "geA+", "geK-", "geK+" y "geLIG". (También incluya su número de grupo y período de clase en cada tubo).

NOTA: El prefijo "ge" indica que estos tubos contienen muestras de electroforesis.

3. Lea la **Tabla 4.1**, que resume los reactivos que agregará.

Tabla 4.1: Adición de reactivos a los tubos geK-, geK+, geA-, geA+ y geLIG

Secuencia	Tubo geK-	Tubo geK+	Tubo geA-	Tubo geA+	Tubo geLIG
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				
Paso 7: pKAN-R no digerido (K-)	4.0 µl				
Paso 7: pKAN-R digerido (K+)		4.0 µl			
Paso 7: pARA no digerido (A-)			4.0 µl		
Paso 7: pARA digerido (A+)				4.0 µl	
Paso 8: Plásmido ligado (LIG)					5.0 µl

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

4. Añada 4.0 µl de dH₂O a los tubos geK-, geK+, geA- y geA+.
5. Cambie las puntas de las pipetas y luego agregue 3.0 µl de dH₂O al tubo geLIG.
6. Cambie las puntas de las pipetas y luego agregue 2.0 µl de LD a los tubos geK-, geK+, geA-, geA+ y geLIG.

DETÉNGASE Y PIENSE: El ADN no es visible al desplazarse por el gel. El *tinte de carga* (un conjunto de tintes que se agregan a las biomoléculas para la electroforesis en gel) contiene los tres tintes que separó en el Laboratorio 1.2. ¿Por qué es útil usar el tinte de carga en este laboratorio?



7. Con una punta de pipeta nueva para cada reactivo, agregue lo siguiente:
 - a. 4.0 μ l de K⁻ al tubo geK⁻.
 - b. 4.0 μ l de K⁺ al tubo geK⁺.
 - c. 4.0 μ l de A⁻ al tubo geA⁻.
 - d. 4.0 μ l de A⁺ al tubo geA⁺.
8. Agregue 5.0 μ l de LIG al tubo geLIG. Devuelva el tubo "LIG" a su profesor para usarlo en el siguiente laboratorio.
9. Gire los cuatro tubos de microcentrifuga (geK⁻, geK⁺, geA⁻, geA⁺ y geLIG) en la microcentrifuga durante varios segundos para agrupar los reactivos en el fondo de cada tubo.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Distribuya los tubos uniformemente en la microcentrifuga para que su peso esté equilibrado, asegurándose de que los tubos del mismo volumen estén directamente enfrentados entre sí.

10. Asegúrese de que los pocillos de la unidad de electroforesis en gel estén ubicados cerca del electrodo negativo (negro).
11. Llene la caja con tampón SB 1x hasta un nivel que cubra toda la superficie del gel. Si ve algún "hoyuelo" sobre los pocillos, agregue más tampón.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Si hay "hoyuelos", agregue cantidades *muy pequeñas* de tampón a la caja de electroforesis. Si bien el gel debe estar completamente debajo del tampón, no necesita que haya mucho tampón en la caja, ya que esto permitirá que la corriente eléctrica pase a través del tampón y no del gel.

12. Haga un dibujo en su cuaderno que muestre la ubicación de los pocillos en la caja de electroforesis. El orden de las muestras en cada pocillo es el siguiente:



13. Con una punta de pipeta nueva para cada muestra, dispense 10.0 μ l de la escalera de ADN (M), geK⁻, geK⁺, geA⁻, geA⁺ y geLIG en sus pocillos designados. Para cada muestra, haga lo siguiente:
 - a. Apoye el codo sobre la mesa para estabilizar la mano que sostiene la pipeta. Si es necesario, use también la otra mano para apoyar la mano que sostiene la pipeta.
 - b. Baje la punta de la pipeta hasta que esté debajo del tampón, pero justo por encima del pocillo.

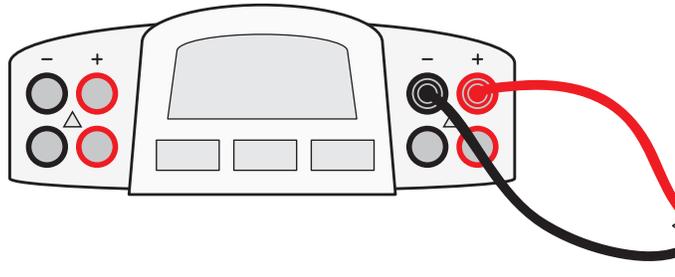


TÉCNICA DE LABORATORIO: No perfore el gel, ya que no se podrá utilizar. Presione suavemente el émbolo para suministrar lentamente la muestra. Para evitar que entre aire a los pocillos, después de suministrar, no se pase de la primera posición de parada. La muestra se hundirá en el pocillo.

14. Cuando se hayan cargado todas las muestras, cierre bien la tapa sobre la caja de electroforesis.

15. Conecte los cables eléctricos a la fuente de alimentación. Conecte ambos cables al mismo canal, con el cátodo (-) al cátodo (negro a negro) y el ánodo (+) al ánodo (rojo a rojo). Vea la **Figura 4.4**.

Figura 4.4: Cables de la caja de electroforesis conectados al canal correcto de la fuente de alimentación



16. Encienda la fuente de alimentación y ajuste el voltaje a 130–135 V.
17. Después de dos o tres minutos, verifique si el tinte de carga púrpura (azul de bromofenol) se está desplazando hacia el electrodo positivo (rojo). Si se está desplazando hacia la otra dirección, hacia el electrodo negativo (negro), verifique los cables eléctricos para ver si están enchufados correctamente a la fuente de alimentación.

DETÉNGASE Y PIENSE:

- La escalera de ADN sirve como estándar porque contiene una mezcla de moléculas de ADN de tamaños conocidos. Al hacer correr sus muestras y la escalera de ADN lado a lado en su gel, puede calcular el tamaño real en pares de bases de moléculas de ADN desconocidas. El **diagrama de escalera de ADN (RM4)** muestra 10 bandas de ADN de tamaños conocidos. Con esta información, ¿puede predecir las posiciones de las bandas de ADN producidas por los posibles productos encontrados en los tubos K-, K+, A-, A+ y LIG 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 que se haya completado la electroforesis en gel?



18. Su profesor le explicará qué hacer con su gel. Es posible que no tenga tiempo suficiente para completar la electroforesis. El tinte de carga amarillo deberá correr cerca del final del gel, aproximadamente 40 a 50 minutos. Una vez que el gel haya terminado de correr, deberá colorearse para mostrar la ubicación de los fragmentos de ADN y los plásmidos. Su profesor le proporcionará una fotografía del gel teñido para analizar.

PREGUNTAS DEL CAPÍTULO 4

Analice su fotografía del gel y discuta las siguientes preguntas con su compañero. Esté preparado para compartir sus respuestas con la clase.

1. ¿Por qué es importante verificar que tiene el plásmido recombinante correcto?
2. ¿Cómo se compararon los resultados reales del gel con las predicciones del gel?
3. ¿Ve alguna banda que no esperaba? ¿Qué factor 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? Describa la evidencia que usó para llegar a esta afirmación.
5. En las líneas geK⁻ y geA⁻, ¿ve evidencia de configuraciones múltiples de plásmidos? Explique su respuesta.
6. En las líneas geK⁺ y geA⁺, ¿ve evidencia de digestión completa? Explique su respuesta.
7. ¿En qué línea esperarías encontrar el gen *rfp* y el gen *ampR* en la fotografía del gel? ¿Puede localizar estos dos genes? Explique su respuesta.
8. Compare las líneas que tienen fragmentos lineales con las líneas que tienen plásmidos. ¿Hay alguna diferencia en la forma de las bandas entre estas dos formas de ADN?
9. En el Laboratorio 3, describió todos los plásmidos posibles que podría hacer ligando los fragmentos digeridos de los plásmidos pKAN-R y pARA. Dos de los fragmentos de genes *rfp* (807 pb cada uno) pueden formar un fragmento circular porque cada extremo de los fragmentos termina en extremos cohesivos *Bam*HI y *Hind*III. ¿Hay evidencia de un fragmento circular de 1,614 pb en la línea del tubo geLIG? Explique su respuesta.

GLOSARIO DEL CAPÍTULO 4

Escalera de ADN: es un conjunto de fragmentos de ADN conocidos con diferentes tamaños en pares de bases (pb) o kilo bases (kb). Estos fragmentos de ADN se separan y se visualizan como bandas de ADN en un gel, donde juntos se parecen a una escalera. Las escaleras de ADN se utilizan en electroforesis en gel para determinar el tamaño y la cantidad de fragmentos de ADN.

Tinte de carga: es un conjunto de tintes que se agregan a 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.

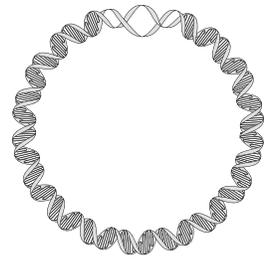
Multímero: es una configuración de plásmido que consta de múltiples plásmidos que se han entrelazado durante la formación, por lo que son como eslabones de una cadena.

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

Cría selectiva: es cuando dos miembros de la misma especie se cruzan para promover rasgos deseables en su descendencia.

Superhelicoidal: es una configuración de plásmido que consiste en un solo plásmido que ha sido enroscado. La forma de este plásmido es más compacta (ocupa menos espacio) que la forma circular.

Verificar: es establecer que algo es verdadero, exacto o posible de defender.



CAPÍTULO 5

CÓMO INSERTAR PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN LAS BACTERIAS

INTRODUCCIÓN

Una vez que se ha creado un plásmido recombinante que incluye el gen de interés, el siguiente paso es replicar el plásmido y permitir que las bacterias produzcan la proteína. Tanto la replicación como la **expresión de proteínas** (la forma en que las proteínas se sintetizan, modifican y regulan en los organismos vivos) pueden ocurrir solo dentro de una célula. Por lo tanto, su próximo paso en el proceso de clonación de genes es colocar el plásmido recombinante en bacterias de *E. coli* a través de un proceso llamado **transformación**, lo que cambia el contenido de ADN de las bacterias. En este capítulo, llevará a cabo la transformación de bacterias de *E. coli* que utilizan un plásmido recombinante que contiene el gen *rfp*. Si estuviera elaborando una proteína terapéutica humana, la bacteria que transforma contendría el gen humano y sería capaz de producir la proteína terapéutica humana deseada.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 5

Al final de este capítulo, podrá hacer lo siguiente:

- Describa el papel de la transformación en el proceso de clonación de genes
- Explique el propósito de cada control en el experimento de transformación
- Explique cómo se expresa la información codificada en un gen

¿QUÉ ES LO QUE YA SABE?

Discuta las siguientes preguntas con su compañero y escriba sus ideas en su cuaderno. Esté preparado para discutir sus respuestas con la clase. No se preocupe si no sabe todas las respuestas. Discutir estas preguntas lo ayudará a pensar lo que ya sabe sobre la captación de plásmidos y la expresión de genes en bacterias.

1. ¿Cree que la captación bacteriana de un plásmido del ambiente es un evento común? ¿Por qué sí o por qué no?
2. ¿Cuáles son los pasos involucrados en la transcripción y la **traducción** (el proceso por el cual la información codificada en el ARN mensajero se decodifica y se transforma en proteína) de un gen?
3. ¿Cuál es la relación entre genes, proteínas y rasgos (o características observables)?
4. ¿Qué tienen en común las bacterias y los seres humanos que hacen posible que un gen humano se exprese en bacterias?

TRANSFORMACIÓN BACTERIANA CON PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

Un plásmido es un vector ideal para transportar secuencias de ADN de un organismo a otro porque 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. Un plásmido puede ser captado por bacterias donde se replica, y sus genes se expresan utilizando la maquinaria celular bacteriana. Si se insertó un gen de interés en el vector, la bacteria produce el producto codificado por ese gen.

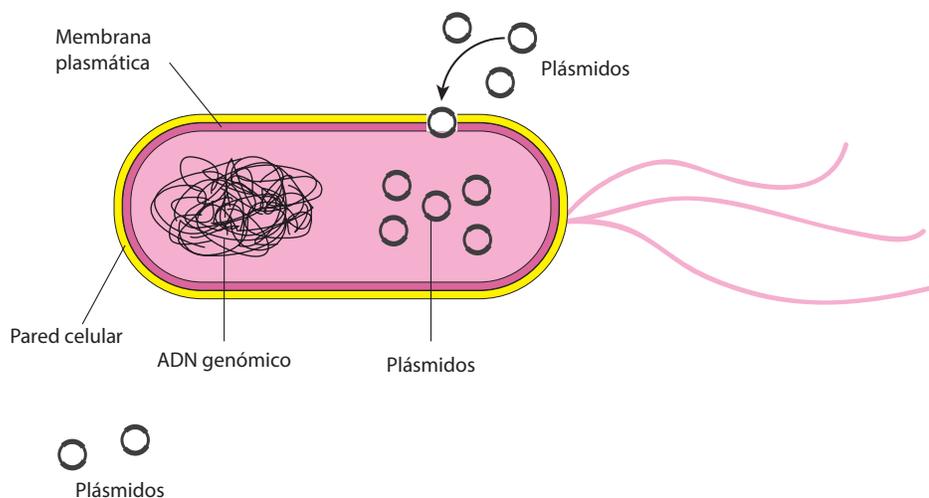


CONSIDERE: Una vez que se ha insertado un gen en un vector, ¿qué cree usted que se requiere para que el producto sea codificado por el gen insertado?

TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

Una vez que se fabrica un plásmido recombinante que contiene un gen de interés, como el gen de la insulina, el plásmido puede ingresar a las células bacterianas a través del proceso de transformación. La **Figura 5.1** ilustra la transformación.

Figura 5.1: Transformación bacteriana



La absorción de ADN del ambiente de una célula bacteriana ocurre con una eficacia muy baja en la naturaleza. Las bacterias de *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. Además, la pared celular tiene carga negativa y repele las moléculas de ADN que tienen carga negativa.



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

Para aumentar la eficiencia de la captación de ADN, las bacterias se tratan de dos maneras. Primero, las bacterias de *E. coli* se colocan en una solución que contiene iones de calcio positivos, que neutralizan la carga negativa en las membranas externas de las células, lo que permite que las moléculas de ADN crucen las membranas plasmáticas y entren a la célula. A continuación, las bacterias se someten a un **choque térmico**, un aumento repentino de la temperatura, lo que hace que la presión afuera de la célula aumente. Esta diferencia de presión permite que el ADN plasmídico ingrese a la célula bacteriana desde el exterior.

A las células tratadas con calcio y calor se les considera **competentes** (capaces) de absorber el ADN de manera más eficiente, pero incluso con este tratamiento, solo 1 de cada 10,000 células bacterianas capta un plásmido en su ambiente. Entonces, ¿cómo pueden identificarse las bacterias que han captado el plásmido recombinante? Recuerde que un componente importante de un plásmido recombinante es un gen para la resistencia a los antibióticos. Si coloca células bacterianas en presencia de antibiótico, solo crecerán aquellas células que tengan el plásmido recombinante.

¿SABÍA?

Una carrera armamentista bacteriana

La captación de plásmidos puede tener graves consecuencias en la medicina. *Staphylococcus aureus* es una bacteria común que con frecuencia causa infecciones en la piel y el tracto respiratorio. Si la infección no se trata o se propaga al torrente sanguíneo, hasta el 30% de estas infecciones son mortales.

Algunas cepas de bacterias intercambian de forma natural los plásmidos, lo que permite una mayor variación genética en una especie que se reproduce asexualmente. Un mecanismo de intercambio es la conjugación bacteriana, en la cual un plásmido se comparte entre dos células bacterianas que entran en contacto entre sí. El otro método es la transformación, donde las bacterias absorben el ADN directamente de su ambiente. En la naturaleza, esto es a menudo causado por células muertas que liberan su contenido al medioambiente.

Tradicionalmente, los médicos han tratado las infecciones por estafilococos con antibióticos como la vancomicina, que interrumpe la formación de paredes celulares bacterianas. Sin embargo, en los últimos años, los médicos han encontrado que estos antibióticos ya no son eficaces para tratar las infecciones por estafilococos. Las cepas nuevas y más agresivas de las bacterias son cada vez más comunes, y los médicos no pueden tratar las infecciones.

Los investigadores creen que algunas bacterias *Staphylococcus* han adquirido el gen *VanA* mientras se conjugan con otro tipo de bacterias. Los genes *VanA* infunden resistencia a la vancomicina, y ciertas especies naturalmente lo llevan dentro de su genoma. Las bacterias resultantes resistentes a la vancomicina de *Staphylococcus aureus* se están volviendo más comunes cada día y la tasa de mortalidad está aumentando.

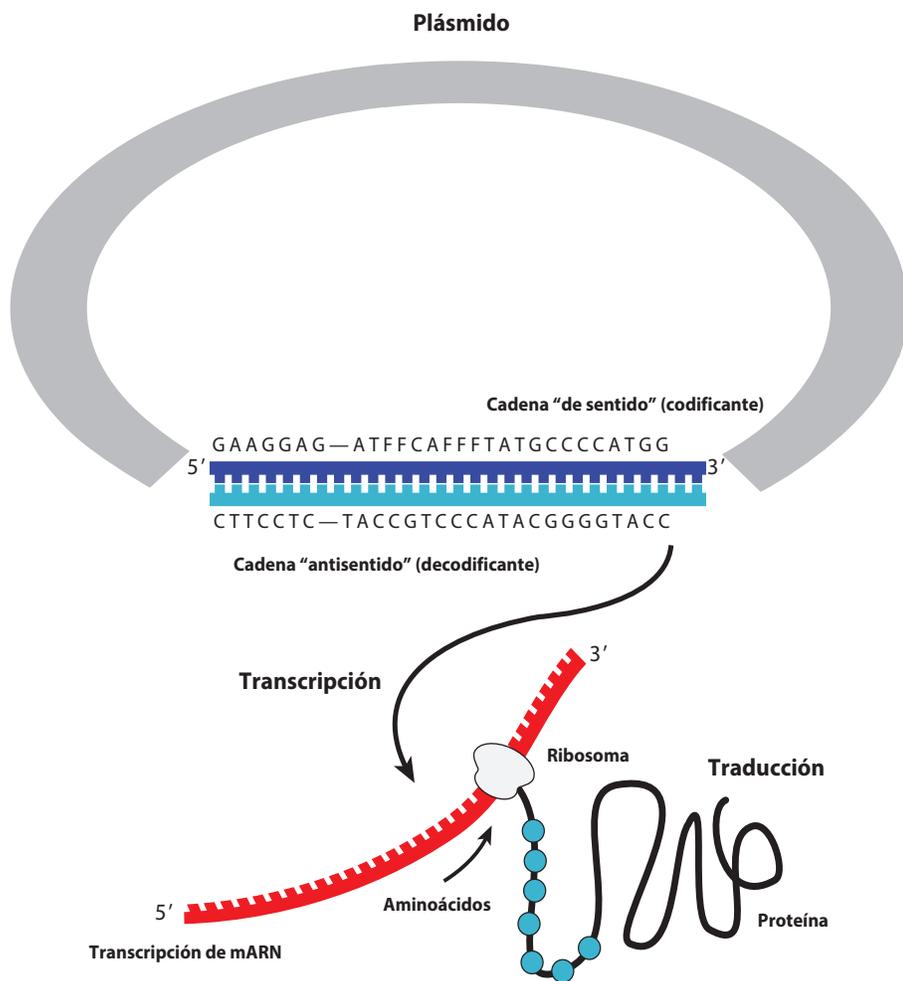


Y, el problema de las bacterias resistentes no se limita a los estafilococos. La neumonía farmacorresistente y la tuberculosis multirresistente también se han convertido en amenazas cada vez más peligrosas. Para evitar el aumento de estos "superbacterias", la industria de la biotecnología tendrá que desarrollar tratamientos nuevos e innovadores.

DEL ADN PLASMÍDICO A LA PROTEÍNA

Una vez que un plásmido recombinante ha ingresado a la célula bacteriana, la ADN polimerasa inicia la replicación en el punto *ori*, y el plásmido se replica utilizando las enzimas de replicación del ADN bacteriano. Estas copias múltiples de plásmidos ahora pueden producir la proteína de interés, como la insulina o la hormona de crecimiento humano, en cantidad. En este proceso, la información codificada en el ADN humano se transfiere de ADN a la proteína, utilizando la maquinaria de transcripción y traducción de la célula (vea la **Figura 5.2**). La proteína entonces altera los rasgos observables del organismo.

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



La ingeniería genética solo es posible porque los genes de diferentes organismos pueden expresarse en 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 sabrá, las proteínas están formadas por subunidades más pequeñas llamadas **aminoácidos**, y por una secuencia de tres nucleótidos en el código de ADN para un solo aminoácido. Estas secuencias de tres nucleótidos se llaman **codones**. Por ejemplo, el codón TTG codifica para el aminoácido triptófano, y el codón AAG codifica para el aminoácido lisina. En muchos casos, más de un codón puede codificar el mismo aminoácido. Por ejemplo, AAA es también un codón para lisina. Además, existen codones informativos, como el **codón de inicio** (ATG) y el **codón de terminación** (TTA), que muestra en qué punto de la secuencia de ADN comienza y termina el código de la proteína.

¿SABÍA?

Producción de ADN a partir de ARN

A pesar de que el código de ADN es el mismo en todas las formas de vida, la transcripción y traducción de genes en **eucariotas** y **procariotas** utiliza diferentes enzimas y estructuras. (Las células humanas son eucariotas y las células bacterianas son procariotas). Una diferencia importante entre estos dos tipos de células es que los genes en los eucariotas contienen secuencias no codificadas llamadas **intrones**. La ARN polimerasa transcribe el gen, produciendo un ARN mensajero precursor grande que contiene intrones y **exones**, que son las secuencias codificadoras. El ARN precursor es entonces **empalmado**, lo que elimina los intrones y une a los exones en el ARN mensajero maduro.

Los procariotas no pueden realizar el corte de los intrones. Para resolver este problema, los científicos usan una enzima, **la transcriptasa inversa** (que puede copiar el ARN en el ADN) para producir ADN complementario (ADNc) a partir del ARN mensajero para una proteína en particular. El ADNc, que solo tiene las secuencias de exones, se inserta en el vector plasmídico. Los genes humanos clonados utilizados para hacer proteínas terapéuticas humanas se preparan de esta manera.





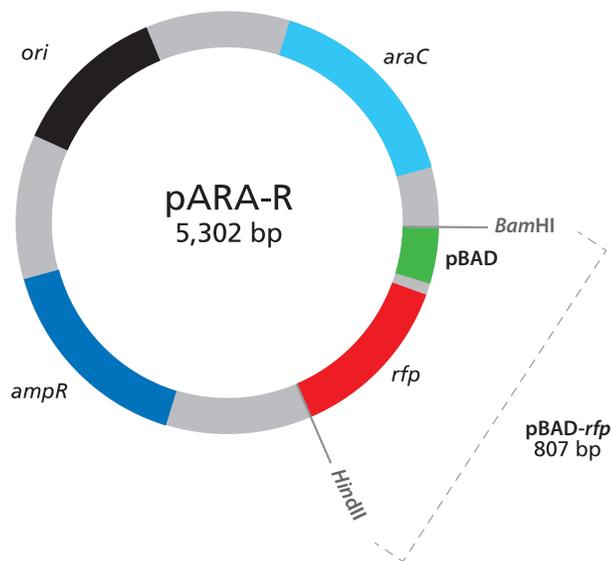
LABORATORIO 5: TRANSFORMACIÓN BACTERIANA CON LOS PRODUCTOS DE LA LIGACIÓN

Hasta ahora, en su búsqueda para clonar un gen, ha producido plásmidos recombinantes y ha verificado que contienen el gen para hacer RFP. En este laboratorio realizará otro paso del proceso de clonación de genes: la transformación bacteriana de *E. coli* con el plásmido que produjo. En la industria biofarmacéutica, este proceso se usaría para crear la proteína terapéutica humana. Dividirá bacterias de *E. coli* que se han tratado previamente con cloruro de calcio en dos grupos: un grupo de control al que no se agregará ningún plásmido y un grupo de tratamiento al que agregará los productos de ligación: los plásmidos recombinantes. Después de aplicar un choque térmico a ambos grupos de células, las cultivará en diferentes condiciones. Todas las bacterias se cultivarán en tres **placas de agar** (Placas Petri que contienen agar mezclado con un **medio** o fuente de alimento llamado **Caldo Luria** [LB] que favorece el crecimiento bacteriano). Una placa solo contendrá agar LB, una segunda tendrá el antibiótico ampicilina (amp) agregado al LB, y una tercera incluirá LB, ampicilina y azúcar arabinosa (ara) para activar la transcripción de la proteína de interés (RFP).

Al examinar el crecimiento de bacterias en estas condiciones, puede verificar que su procedimiento funcionó y puede identificar las bacterias transformadas con el plásmido pARA-R que creó en el Laboratorio 3. ¿Cómo sabrá si tiene éxito? Las bacterias tendrán un rasgo nuevo y altamente visible: ¡ahora producirán RFP, lo que hará que las células se vean de color rojo o rosa brillante! Si estuvieras elaborando una proteína terapéutica humana, las bacterias producirían esa proteína, que sería invisible. Sin embargo, los productos creados por las bacterias se analizarían para garantizar que contengan la proteína deseada.

El plásmido pARA-R, que revisó en el Capítulo 3, se muestra de nuevo en la **Figura 5.3**.

Figura 5.3: El plásmido pARA-R



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

Sus roles son los siguientes:

- *araC*: El gen *araC* codifica para una proteína activadora, que activa el promotor en presencia de arabinosa, un azúcar simple. (Un activador es una proteína que regula la transcripción de un gen al unirse a una secuencia cerca del promotor, lo que permite que la ARN polimerasa se una al promotor e inicie la transcripción del gen. Las proteínas activadoras se utilizan en algunos plásmidos recombinantes para controlar la producción de la proteína de interés).
- pBAD: pBAD es un promotor.
- *rfp*: los genes *rfp* codifican para la expresión de la proteína fluorescente roja.
- *ampR*: los *ampR* El gen confiere resistencia al antibiótico ampicilina.

Si hay presencia de arabinosa (un azúcar), la proteína activadora de *araC* activa al promotor. La ARN polimerasa se une al promotor y comienza la transcripción del gen *rfp*. Cuando el gen *rfp* se expresa, las bacterias se vuelven de color rosa brillante. El gen *ampR* es un marcador seleccionable y confiere resistencia al antibiótico ampicilina; solo las bacterias que portan este gen sobrevivirán a un antibiótico. Solo las bacterias que contienen el gen de resistencia a los antibióticos, además de los genes *araC*, pBAD, y el *rfp*, sobrevivirán y mostrarán la coloración rosa brillante.

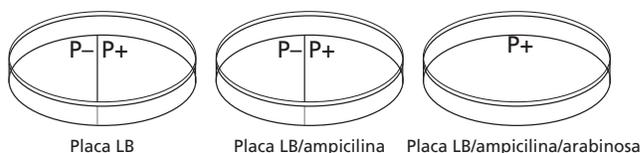
HOJAS INFORMATIVAS

- Predicciones sobre el crecimiento bacteriano (RM 5)

ANTES DEL LABORATORIO

Discuta lo siguiente con su grupo y prepárese para compartir sus ideas con la clase.

1. La ampicilina es un antibiótico que destruye las células bacterianas al interrumpir la formación de las paredes celulares. Sin embargo, el plásmido pARA-R tiene el gen de resistencia a la ampicilina, que produce una proteína que descompone a la ampicilina. ¿Cuál es el propósito de cultivar bacterias que se han transformado en presencia de ampicilina?
2. ¿Qué sucederá cuando las células bacterianas que contienen el plásmido pARA-R no reciban arabinosa?
3. En el laboratorio, agregará muestras del grupo de control P- y del grupo de tratamiento P + a las placas que contienen varias combinaciones de caldo Luria (LB), ampicilina y el azúcar arabinosa. Las placas se ordenarán de la siguiente manera:



usando la clave de **Predicciones de crecimiento bacteriano (RM 5)**, muestre sus predicciones del crecimiento que esperaría para cada combinación. Entonces complete la **Tabla 1** y **Tabla 2** en la hoja informativa describiendo las conclusiones que se pueden extraer si el crecimiento previsto se produce o no.

4. Lea la sección *Métodos* en las páginas de B-61 a B-65 y describa brevemente los pasos, utilizando palabras y un diagrama de flujo.



SEGURIDAD: Se deben seguir todas las precauciones de seguridad adecuadas y usar la vestimenta requerida para un laboratorio de ciencias. Consulte las instrucciones de su profesor.

SEGURIDAD: Tenga cuidado al manipular bacterias de *E. coli* y utilice una **técnica aséptica**.

La técnica aséptica es un conjunto de procedimientos que garantizan la protección tanto del laboratorista como de la muestra bacteriana, lo cual es necesario para que el experimento sea exitoso. Específicamente:

- No toque nada que haya estado o esté en contacto con bacterias de *E. coli*. Los estudiantes que manejan equipos que entran en contacto con bacterias deben usar guantes.
- Trate de evitar derrames o la contaminación de las superficies con cualquier cosa que haya estado en contacto con bacterias de *E. coli*. Informe de inmediato a su profesor si ocurre un derrame o contaminación.
- Cuando haya terminado de usar los tubos de microcentrífuga, las puntas de pipeta y los esparcidores de células, colóquelos inmediatamente en la bolsa de residuos con riesgo biológico o en el recipiente de residuos, según las indicaciones de su profesor.
- Cuando se le indique, coloque las placas Petri en las fundas originales y en la bolsa de residuos con riesgo biológico.
- Lávese bien las manos con jabón después de terminar el laboratorio.

MATERIALES

Reactivos

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

NOTA: El tubo CC debe mantenerse en hielo en todo momento.

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

Equipo y suministros

- Una taza de espuma de poliestireno con hielo picado

NOTA: Llene una taza con un poco de hielo picado del recipiente que tiene los tubos CC antes de tomar un tubo CC. Deberá mantener el tubo CC en hielo en todo momento.

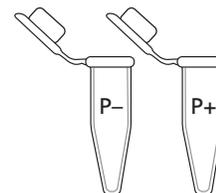
- 2 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Marcador permanente
- Guantes descartables
- Micropipeta P-20
- Micropipeta P-200
- Caja de puntas para puntas de pipetas desechables
- Paquete de esparcidores de células (se compartirán entre los grupos)
- Baño maría a 42 °C con gradilla flotante para tubos de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

MÉTODOS

1. Revise su gradilla para asegurarse de que tiene todos los reactivos que están en la lista. Verifique que el tubo LIG esté etiquetado con su número de grupo y período de clase.
2. Obtenga un tubo CC del recipiente lleno de hielo y colóquelo en una taza de poliestireno con hielo.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Las células competentes en este laboratorio deben mantenerse frías; asegúrese de tomar los tubos de microcentrífuga por el borde superior para evitar calentar las células con las manos.



3. Etiquete dos tubos de microcentrífuga limpios con "P-" y "P+".
4. Coloque los tubos P- y P+ en la taza de poliestireno con hielo con el tubo CC.

TÉCNICA DE LABORATORIO: la transformación bacteriana requiere técnicas estériles. Es esencial que estas instrucciones se sigan al pie de la letra.

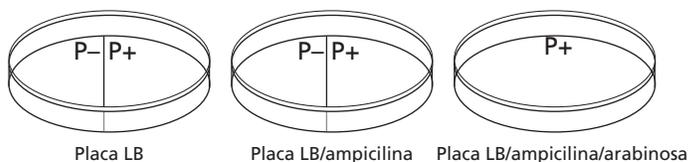
5. Con la micropipeta grande P-200, agregue las células competentes del tubo CC a los tubos P- y P+:
 - a. Fije la micropipeta P-200 a 50 µl.
 - b. Con mucho cuidado, vuelva a suspender las células bacterianas en el tubo CC bombeando suavemente la pipeta hacia arriba y hacia abajo hasta la primera parada por dos veces en la solución.
 - c. Agregue 50 µl de CC a cada uno de los tubos refrigerados vacíos (P- y P+), sosteniendo cada tubo por el borde para mantenerlo frío, y vuelva a colocar cada tubo rápidamente en el hielo.

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

6. Con una pipeta nueva y la pipeta P-20, agregue LIG al tubo con la etiqueta "P+":
 - a. Fije la micropipeta P-20 a 10.0 µl.
 - b. Sostenga el tubo P+ enfriado por el borde superior y agregue 10.0 µl de LIG. Mezcle las soluciones bombeando la pipeta dos veces en los líquidos, y vuelva a colocar el tubo P+ en el hielo.
7. Mantenga los tubos P- y P+ en hielo durante 15 minutos.

NOTA: Durante un intervalo de 15 minutos, comparta y discuta sus respuestas a la pregunta 3 en *Antes del laboratorio*.

8. Mientras las células están en hielo, prepare sus tres placas Petri con agar, una placa de LB, una de LB/amp y una de LB/amp/ara:
 - a. Etiquete la parte inferior de cada placa (la parte que contiene el agar) con su número de grupo y período de clase. Escriba con letras pequeñas y en el borde de la placa.
 - b. Con las placas cerradas, dibuje una línea en la parte inferior de la placa LB y la placa LB/amp que divida cada placa por el medio. Etiquete la mitad de cada placa con "P-" y la otra mitad con "P+". Etiquete la placa LB/amp/ara con "P+". Las placas se organizarán de la siguiente manera:



9. Después de la incubación de 15 minutos en hielo, lleve los tubos P- y P+ (en la taza con hielo) al baño maría a 42 °C. Coloque los dos tubos en la gradilla flotante de tubos de microcentrifuga en baño maría durante exactamente 45 segundos.
10. Después del choque térmico de 45 segundos, vuelva a colocar los tubos en hielo y déjelos allí durante al menos un minuto. Si la próxima clase no usará los tubos de inmediato, guárdelos en el refrigerador hasta que estén listos para usar.
11. Con la micropipeta grande P-200, agregue LB a los tubos P- y P+ :
 - a. Fije la micropipeta P-200 a 150 µl.
 - b. Agregue 150 µl de LB al tubo P-. Tape el tubo y gírelo suavemente dos o tres veces para mezclar.

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

- c. Agregue 150 µl de LB al tubo P+. Tape el tubo y gírelo suavemente dos o tres veces para mezclar.
12. Si el tiempo lo permite, deje que las células en los tubos P- y P+ se incuben a temperatura ambiente durante 15 minutos.

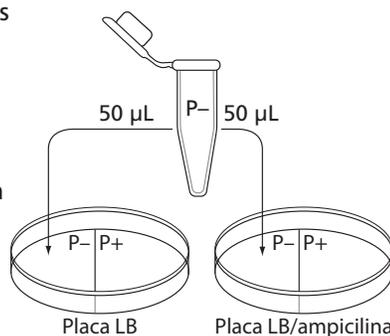
DETÉNGASE Y PIENSE:

- ¿De qué diferente manera se trató el cultivo de bacterias P+ del cultivo de bacterias P-? (Un *cultivo* es una población aislada de células). ¿Cuál es el propósito del cultivo de bacterias P-?
- ¿Por qué las células necesitan tiempo para recuperarse después del choque térmico?
- ¿Por qué se incuban las células a 37 °C?
- Usó una técnica aséptica en este laboratorio. ¿Por qué esto es importante?

13. Agregue células del tubo P- a sus placas LB y LB/amp:
 - a. Fije la micropipeta P-200 a 50 µl.

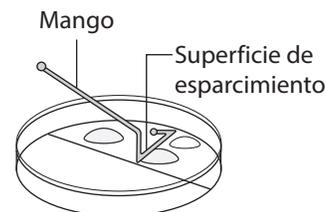
TÉCNICA DE LABORATORIO: Para evitar la contaminación, asegúrese de usar una punta de micropipeta nueva para cada solución.

- b. Bombee suavemente la pipeta dos o tres veces en el tubo P- para suspender las células y cargue 50 µl de las células P-.
 - c. Abra la tapa de la placa LB, como una "valva de almeja", y agregue 50 µl de células del tubo P- a la sección marcada "P-". Cierre la tapa.
 - d. Nuevamente, bombee suavemente la pipeta dos o tres veces en el tubo P- para suspender las células y cargue 50 µl de las células P-.



- e. Abra la tapa de la placa LB/amp, como una valva de almeja, y agregue 50 μl de células del tubo P- a la sección marcada "P-". Cierre la tapa.
14. Esparza las células del tubo P- en sus placas LB y LB/amp:

- a. Abra el paquete de esparcidores estériles de células en el extremo más cercano al mango del esparcidor. Retire solo un esparcidor y cierre el paquete para mantener la esterilidad de los demás.
- b. Abra la tapa de la placa LB, como una valva de almeja, y extienda las células de manera uniforme por todo el lado P- de la placa moviendo suavemente el esparcidor por la superficie del agar. (Mantenga las células en el lado P- de la placa). Cierre la tapa.
- c. Extienda cuidadosamente las células P- en la placa LB/amp, utilizando el mismo esparcidor y la misma técnica.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Sujete el esparcidor por el mango y no permita que el extremo doblado toque ninguna superficie, ya que esto contaminará el esparcidor. Coloque el esparcidor usado en la bolsa de residuos con riesgo biológico.

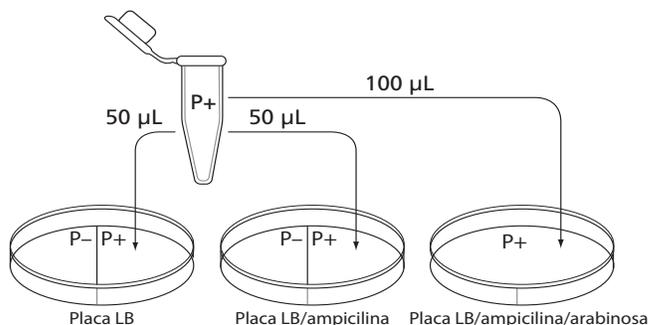


15. Con una punta de pipeta nueva, agregue células del tubo P+ a sus placas LB, LB/amp y LB/amp/ara:

- a. Asegúrese de que la micropipeta P-200 esté en 50 μl .

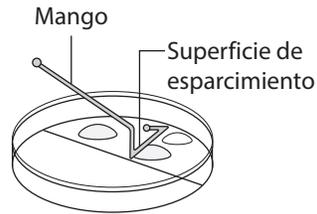
TÉCNICA DE LABORATORIO: Para evitar la contaminación, asegúrese de usar una punta de micropipeta nueva para cada solución.

- b. Bombée suavemente la pipeta dos o tres veces en el tubo P+ para suspender las células y cargue 50 μl de las células P+.
- c. Abra la tapa de la placa LB, como una valva de almeja, y agregue 50.0 μl de células del tubo P+ a la sección marcada "P+". Cierre la tapa.
- d. Nuevamente, bombée suavemente la pipeta dos o tres veces en el tubo P+ para suspender las células y cargue 50 μl de las células P+.
- e. Abra la tapa de la placa LB/amp, como una valva de almeja, y agregue 50.0 μl de células del tubo P+ a la sección marcada "P+". Cierre la tapa.
- f. Fije la micropipeta P-200 en 100 μl , bombée suavemente la pipeta dos o tres veces en el tubo P+ y cargue 100 μl de las células P+.
- g. Abra la tapa de la placa LB/amp/ara, como una valva de almeja, y agregue 100.0 μl de células P+ en varias áreas de la superficie, no solo en un solo punto. Cierre la tapa.



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

- Abra el paquete de esparcidos estériles de células en el extremo más cercano al mango del esparcidor. Retire solo un esparcidor y cierre el paquete para mantener la esterilidad de los demás.
- Abra la tapa de la placa LB, como una valva de almeja, y esparza uniformemente las células en el lado P+ de la placa (y solo en este lado) moviendo suavemente el esparcidor a través de la superficie del agar. Cierre la tapa.
- Extienda cuidadosamente las células P+ en la placa LB/amp usando el mismo esparcidor y la misma técnica.
- Extienda cuidadosamente las células P+ en la placa LB/amp/ara usando el mismo esparcidor. Luego, gire suavemente la placa debajo del esparcidor P+ para que las células se puedan extender por toda la superficie de esta placa. Cierre la tapa.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Sujete el esparcidor por el mango y no permita que el extremo doblado toque ninguna superficie, ya que esto contaminará el esparcidor. Coloque el esparcidor usado en la bolsa de residuos con riesgo biológico.

- Permita que las tres placas se asienten hacia arriba durante al menos cinco minutos, o hasta que el líquido penetre en las placas.
- Use la cinta adhesiva provista para pegar las tres placas y rotule la cinta con su número de grupo y período de clase.
- Coloque las placas en la incubadora a 37 °C boca abajo para evitar que la condensación gotee sobre los geles.
- Coloque todos los tubos de microcentrífuga, puntas de pipeta y separadores de células en la bolsa de residuos con riesgo biológico.
- Incube las placas durante 24 a 36 horas a 37 °C. Si no hay una incubadora disponible, las placas pueden almacenarse a temperatura ambiente por hasta 48 horas.
- Examine las placas. En su cuaderno, registre la cantidad de crecimiento en cada mitad.
- Deseche las placas Petri en la bolsa de residuos con riesgo biológico cuando se le indique.



PREGUNTAS DEL CAPÍTULO 5

1. Mire los resultados de su transformación. ¿Sus resultados reales coinciden con los resultados previstos? Si no es así, ¿qué diferencias ve y cuáles son algunas explicaciones para estas diferencias?
2. ¿Cuántas colonias rojas se presentaron en su placa LB/amp/ara?
3. ¿Por qué aparecieron las colonias rojas solo en la placa LB/amp/ara y no en la placa LB/amp?
4. Los plásmidos recombinantes están diseñados para que puedan replicarse 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 convierte la información codificada en el gen *rfp* en un rasgo? Asegúrese de utilizar lo que ha aprendido previamente sobre la expresión génica y la relación entre ADN, ARN, proteínas y rasgos.
6. ¿Por qué es posible que las bacterias produzcan una proteína humana, como la insulina, o una proteína de anémona de mar, como la RFP?
7. Las únicas bacterias que podían producir la RFP en el Laboratorio 5 fueron las bacterias que se transformaron con el plásmido pARA-R. ¿Por qué?



¿SABÍA?

Sobre la conexión entre los genes y las proteínas

¿Cómo pudieron los científicos demostrar que un gen codifica una proteína? En 1941, George Beadle y Edward Tatum llevaron a cabo un experimento en el que expusieron el moho del pan a la radiación UV, un procedimiento que se sabe que causa mutaciones en genes. Beadle y Tatum crearon cepas mutantes de moho que habían perdido la capacidad de sintetizar una vitamina necesaria. Al alimentar a los precusores de la vitamina uno a la vez a los mutantes, Beadle y Tatum pudieron determinar que a las cepas mutantes solo les faltaba una enzima que catalizara una reacción.

Beadle y Tatum luego investigaron si un solo gen causó la pérdida de la enzima única por cruces genéticos entre los mutantes y una cepa de tipo silvestre. Después de cultivar la progenie, descubrieron que la mitad tenía el mismo defecto que el mutante original y la otra mitad no, lo que confirmó que se 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 dar como resultado la producción de 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.

Comprender la conexión entre genes y proteínas es fundamental para el avance de la biotecnología. Si los investigadores pueden comprender mejor qué genes afectan las proteínas involucradas en una enfermedad en particular, pueden trabajar de manera más efectiva para combatir esa enfermedad.

GLOSARIO DEL CAPÍTULO 5

Placa de agar: es una placa de Petri que contiene agar mezclado con una fuente de alimento o medio llamado Caldo Luria (LB) que favorece el crecimiento bacteriano.

Aminoácidos: es el componente básico de las proteínas. Cada uno de los 20 aminoácidos es una sustancia orgánica con dos grupos unidos a él: un grupo amino (NH_2) y un grupo de ácido carboxílico (COOH).

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

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

Competente: es una célula que tiene la capacidad de transformarse genéticamente al captar el ADN del medioambiente.

Cultivo: es una población aislada de células que han crecido en un medio nutriente especialmente preparado.

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

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

Choque térmico: es un aumento repentino de la temperatura.

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

Caldo Luria: es un medio nutricionalmente rico que favorece el crecimiento bacteriano.

Medio: es una solución, como el caldo Luria, que contiene sustancias que favorecen el crecimiento de microorganismos. El medio puede solidificarse mediante la adición de agar.

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

Expresión de proteínas: se refiere a cómo se sintetizan, modifican y regulan las proteínas en los organismos vivos.

Transcriptasa inversa: es una enzima que cataliza la formación de ADN a partir de una plantilla de ARN en la transcripción inversa.

Unión: es la modificación del ARN mensajero para la traducción eliminando intrones y uniendo exones.

Codón de inicio: es el primer codón de ARNm traducido por un ribosoma; típicamente AUG o GUG.

Codón de terminación: es un triplete de nucleótidos dentro del ARNm que señala la terminación de la traducción.

Transformación: es un proceso que coloca ADN extraño, como un plásmido, en una célula.

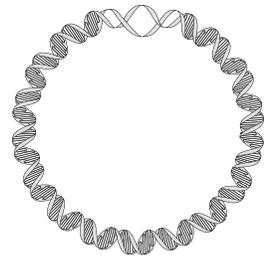
Traducción: es el proceso por el cual la información codificada en el ARN mensajero se decodifica y transforma en proteína.

C

AMGEN[®] Biotech Experience

Descubrimiento científico para el aula

AMGEN[®] Foundation



CAPÍTULO 2A

¿CÓMO SE COMIENZA A CLONAR UN GEN?

INTRODUCCIÓN

En la Introducción del Programa, aprendió sobre el desarrollo de productos biofarmacéuticos y se le presentaron las técnicas utilizadas en el desarrollo de estas terapias. Una de estas técnicas, la transformación bacteriana, permite que los genes humanos se inserten en las bacterias, lo que permite que las bacterias produzcan las proteínas terapéuticas humanas. En el Capítulo 1 pudo trabajar con dos herramientas físicas y técnicas de ingeniería genética que se utilizan para clonar un gen: la micropipeta y la electroforesis en gel. En este capítulo, trabajará con otras dos herramientas importantes de ingeniería genética: los plásmidos y las enzimas de restricción. Estas “herramientas” son en realidad 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 proteínas humanas. Ahora aprenderá más sobre estas herramientas y dará los primeros pasos en su misión de clonar un gen.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 2A

Al final de este capítulo, podrá hacer lo siguiente:

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

¿QUÉ ES LO QUE YA SABE?

Discuta las siguientes preguntas con su compañero y escriba sus ideas en su cuaderno. Está preparado para discutir sus respuestas con la clase. No se preocupe si no sabe todas las respuestas. Discutir estas preguntas lo ayudará a pensar lo que ya sabe sobre el ADN, los plásmidos y las enzimas de restricción.

1. ¿Cuál es la estructura y función del ADN? Describa en palabras o mediante un dibujo la estructura de una molécula de ADN. Sea lo más detallista posible.
2. Todos los organismos vivos contienen ADN. ¿De qué manera es igual el ADN entre los diferentes organismos y de qué manera varía?
3. ¿Por qué es posible que una célula bacteriana produzca una proteína humana a partir de las instrucciones codificadas en un gen humano? Explique su respuesta, utilizando sus conocimientos sobre los genes y cómo se expresan.
4. Como se describe en la Introducción al programa, los científicos usan dos herramientas biológicas para diseñar organismos para producir nuevas proteínas: plásmidos y enzimas de restricción. ¿Qué recuerda sobre cómo se usan estas herramientas?

SU DESAFÍO

Ahora que ha explorado algunas de las herramientas básicas utilizadas en biotecnología, tendrá la oportunidad de realizar algunos de los mismos procedimientos que los científicos utilizan para producir proteínas terapéuticas humanas. Pero en lugar de producir proteínas humanas, diseñará *E. coli*, una bacteria común que se encuentra en el intestino de animales de sangre caliente, para producir una proteína de anémona de mar llamada **proteína fluorescente roja** (RFP), que está dirigida por un gen llamado *rfp*. Una anémona de mar es un animal de cuerpo blando relacionado con el coral y la medusa. En el laboratorio, le dará a *E. coli* una nueva proteína que le dará un rasgo que antes no tenía: la capacidad de brillar. ¿Cómo sabrá si tiene éxito? Las bacterias que cree tendrán un rasgo nuevo y altamente visible: ¡ahora producirán RFP, lo que hará que las células aparezcan de color rojo o rosa brillante!

NOTA: La cantidad de pasos variará de acuerdo al tiempo que tenga disponible su clase.



¿SABÍA?

La proteína fluorescente roja en las anémonas de mar

La RFP se deriva de una proteína que se encuentra en las anémonas de mar (vea la **Figura 2A.1**). Aunque las anémonas de mar son sedentarias y permanecen unidas a las rocas, también son animales depredadores, que usan sus tentáculos punzantes para atrapar a sus presas. 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 de mar tengan fluorescencia? Nuestra mejor suposición es que las proteínas fluorescentes ayudan a las anémonas de mar a sobrevivir, pero el papel que desempeñan estas proteínas aún no se conoce bien.

Las moléculas fluorescentes pueden servir como un bloqueador solar, convirtiendo la luz UV dañina en una luz que es menos perjudicial para los



tejidos de la anémona. Otra posibilidad es que, si bien los humanos no pueden detectar la fluorescencia en la luz del sol, algunos animales pueden hacerlo, haciendo que las presas se sientan atraídas por el brillo.

Figura 2A.1: La anémona de mar *Discosoma* sp.

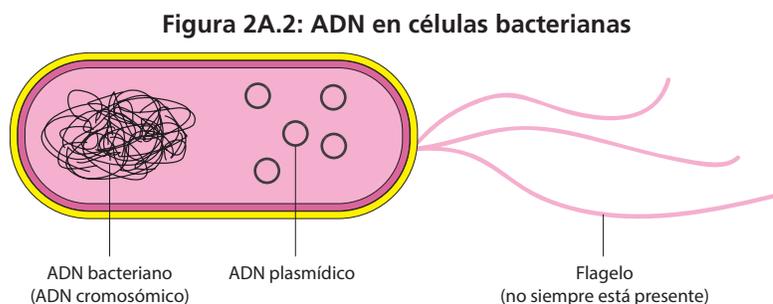
COMENZANDO A CLONAR UN GEN

En este capítulo, explorará el uso de plásmidos y enzimas de restricción como herramientas de la biotecnología. **Clonación del ADN** es el proceso de hacer muchas copias exactas de una pieza particular de ADN. Primero, un gen específico (por ejemplo, un gen para una proteína terapéutica humana) se corta de su fuente, usando una enzima de restricción. Luego se pega junto con otros fragmentos para crear un **plásmido recombinante**, un plásmido construido con fragmentos de ADN de diferentes fuentes.

El descubrimiento de los plásmidos y las enzimas de restricción en bacterias es un ejemplo clásico de cómo los descubrimientos de la investigación básica pueden revolucionar un campo. Con el descubrimiento de estas biomoléculas, los científicos lograron avances importantes en la comprensión de los procesos fundamentales de la vida y en el desarrollo de productos que mejoran la vida.

PLÁSMIDOS

Muchos tipos diferentes de bacterias portan dos formas de ADN: (1) un cromosoma compuesto por una molécula de ADN grande que contiene toda la información que necesita el organismo para sobrevivir y reproducirse, y (2) plásmidos, pequeñas moléculas de ADN circular, que varían en tamaño de 1,000 a 200,000 **pares de bases** (dos bases nitrogenadas unidas para conectar cadenas complementarias de ADN) que están presentes en múltiples copias separadas del ADN cromosómico (vea la **Figura 2A.2**). Algunas bacterias portan hasta 500 plásmidos en cada célula.



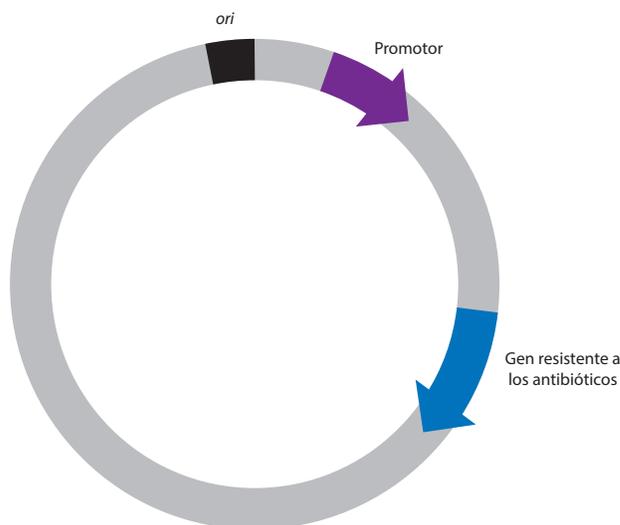
Cuatro características de los plásmidos los hacen **vectores** (vehículos para transportar secuencias de ADN de un organismo a otro) ideales para ingeniería genética: (1) la capacidad de replicarse; (2) la capacidad de iniciar la transcripción; (3) un gen o genes que codifican la resistencia a **antibióticos**, una clase de compuestos que matan o inhiben el crecimiento de microorganismos; y (4) la capacidad de pasar entre las bacterias. Estas características se describen en detalle a continuación:

1. Los plásmidos tienen la capacidad de replicarse, es decir, de hacer copias de sí mismos independientemente del cromosoma bacteriano. Para hacer esto, los plásmidos incluyen una secuencia específica a la que las enzimas de síntesis de ADN de la célula huésped se unen e inician la **replicación del ADN** (un proceso biológico que ocurre en todos los organismos vivos para hacer copias de su ADN). Esta secuencia se llama el punto de **origen de replicación (ori)**.

2. Los plásmidos tienen la capacidad de iniciar **transcripción**, el proceso por el cual la información codificada en el ADN se transfiere al **ARN mensajero (ARNm)**. El ARNm es una molécula de ARN transcrita desde el ADN de un gen y utilizada como plantilla para la síntesis de proteínas, utilizando la **ARN polimerasa** (una proteína que produce ARNm a partir de ADN), de la célula huésped. El **ARN** o **ácido ribonucleico**, es una biomolécula monocatenaria formada por una base nitrogenada, un azúcar ribosa y un fosfato; desempeña un papel fundamental en la síntesis de proteínas, al transmitir información genética desde el ADN al ribosoma donde se elaboran las proteínas. Esta capacidad requiere otra secuencia, llamada **promotor** (una secuencia de ADN específica que se une a la ARN polimerasa e inicia la transcripción del gen). El promotor se une a la ARN polimerasa, y aquí es donde se inicia la transcripción. Todos los genes tienen promotores ubicados junto a ellos en el ADN. Para que los genes de proteínas terapéuticas humanas se expresen en bacterias, deben insertarse en el plásmido junto al promotor.
3. Los plásmidos poseen un gen o genes que codifican la **resistencia a los antibióticos** (el estado en el que las bacterias ya no son sensibles a un antibiótico y continuarán creciendo y dividiéndose en presencia de ese antibiótico). Estos genes codifican proteínas que inhiben la acción de los antibióticos secretados por microorganismos, lo que puede conferir una ventaja selectiva en la naturaleza a las bacterias que contienen plásmidos en una población microbiana donde las bacterias compiten por la supervivencia.
4. Los plásmidos se pueden pasar de una cepa bacteriana a otra en un proceso llamado **conjugación bacteriana**, que permite a las bacterias compartir e intercambiar información genética. Cuando se inserta un plásmido con un gen para la resistencia a un antibiótico a bacterias que carecen de ese plásmido, las bacterias se volverán resistentes a ese antibiótico específico. En la naturaleza, la conjugación se produce con una muy baja efectividad, es decir, solo un pequeño porcentaje de bacterias de una población puede tomar el ADN plasmídico en cualquier momento.

La **Figura 2A.3** ilustra los componentes básicos de un plásmido.

Figura 2A.3: Un vector plasmídico



CONSIDERE: Utilice lo que sabe sobre la selección natural y la evolución para describir cómo los plásmidos pueden conferir una ventaja selectiva a sus bacterias huésped.



Al desarrollar técnicas para la clonación de genes en bacterias, los científicos encontraron una herramienta poderosa en los plásmidos: un vector que puede ser recibido por las bacterias, que se replica en bacterias para producir muchas copias de sí mismo, que tiene un promotor para la transcripción de un gen insertado, y que porta un gen para la resistencia a los antibióticos. La presencia de un gen para la resistencia a los antibióticos en el vector plasmídico permite a los científicos identificar el pequeño porcentaje de bacterias que tomaron el plásmido. Las bacterias que no tomaron el plásmido serán destruidas por el antibiótico. Aquellas que tengan el plásmido con el gen de interés sobrevivirán y se desarrollarán. Si realiza el laboratorio en el Capítulo 5, aprovechará estas características de los plásmidos cuando transfiera su plásmido recombinante a las bacterias.

Cuando los científicos reconocieron el poder de los plásmidos como un vector potencial, el siguiente desafío era determinar cómo incorporar un gen de interés extraño, como el gen de la insulina, en el ADN plasmídico. Los plásmidos con los que trabajará en este laboratorio y en los siguientes contienen los genes para la resistencia a los antibióticos ampicilina y kanamicina. Estos genes producen proteínas que inactivan el antibiótico específico al modificar químicamente su estructura.

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, fue resistente a la infección por un **bacteriófago**: un virus que infecta las bacterias al inyectar su ADN en la célula y controlar los procesos moleculares de la célula huésped para producir más bacteriófagos. La investigación de este “sistema inmune” bacteriano primitivo condujo al descubrimiento de enzimas de restricción, proteínas que restringen el crecimiento de bacteriófagos al reconocer y destruir el ADN del fago sin dañar el ADN del huésped (bacteriano). Estudios posteriores demostraron que las enzimas de restricción de diferentes cepas de bacterias cortan el ADN en secuencias específicas, que se denominan **puntos de restricción**.

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



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 asimétricamente las cadenas de ADN, dejando proyecciones de secuencias de una sola hebra en el sitio del corte. Por ejemplo, un corte (o **digestión**) con *EcoRI* dejará una proyección AATT (o “**extremo cohesivo**”) en una cadena y un extremo cohesivo TTA en la otra cadena.

Tabla 2A.1: Enzimas de restricción utilizadas en este laboratorio

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

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



CONSIDERE:

- ¿Cuál es la secuencia del extremo cohesivo que se produce cuando se corta el ADN con *BamHI*? ¿Con *HindIII*?
- Los científicos pueden modificar los plásmidos para tener un solo sitio de enzimas de restricción. Imagine que tiene un plásmido con un solo sitio *EcoRI*. Dibuje la estructura del plásmido después de que se haya cortado con la enzima y muestre las secuencias de nucleótidos que quedan en el sitio del corte. Si quisiera insertar un gen de una planta en este sitio, ¿qué enzima usaría usted para cortar el ADN de la planta? Explique su respuesta.

¿SABÍA?

El aumento de las bacterias resistentes a los antibióticos

Los antibióticos y fármacos similares se han utilizado durante los últimos 70 años para tratar a pacientes que padecen enfermedades infecciosas. Cuando se recetan y se toman correctamente, los antibióticos son sumamente valiosos para el cuidado del paciente. Sin embargo, estos medicamentos se han usado tanto y durante tanto tiempo que los organismos infecciosos a los que los antibióticos deben destruir se han adaptado a ellos, haciendo que los fármacos sean menos eficaces. La resistencia a los antibióticos se produce cuando algunas bacterias en una población pueden sobrevivir cuando se exponen a uno o más antibióticos. Estas especies que se han vuelto resistentes causan infecciones que no se pueden tratar con los antibióticos habituales en las dosis y concentraciones habituales. Algunos han desarrollado resistencia a múltiples antibióticos y se denominan bacterias resistentes a múltiples fármacos o “superbacterias”.



La resistencia a los antibióticos es un fenómeno grave en crecimiento y se ha convertido en una de las principales preocupaciones de la salud pública del siglo XXI. Cuando los organismos resistentes a los fármacos adquieren resistencia a los antibióticos de primera línea (los seleccionados en

función de varias ventajas, incluida la seguridad, la disponibilidad y el costo), se requiere el uso de agentes de segunda línea. Estos son generalmente de espectro más amplio, pueden ser menos beneficiosos en relación con los riesgos asociados y pueden ser más costosos o menos accesibles.



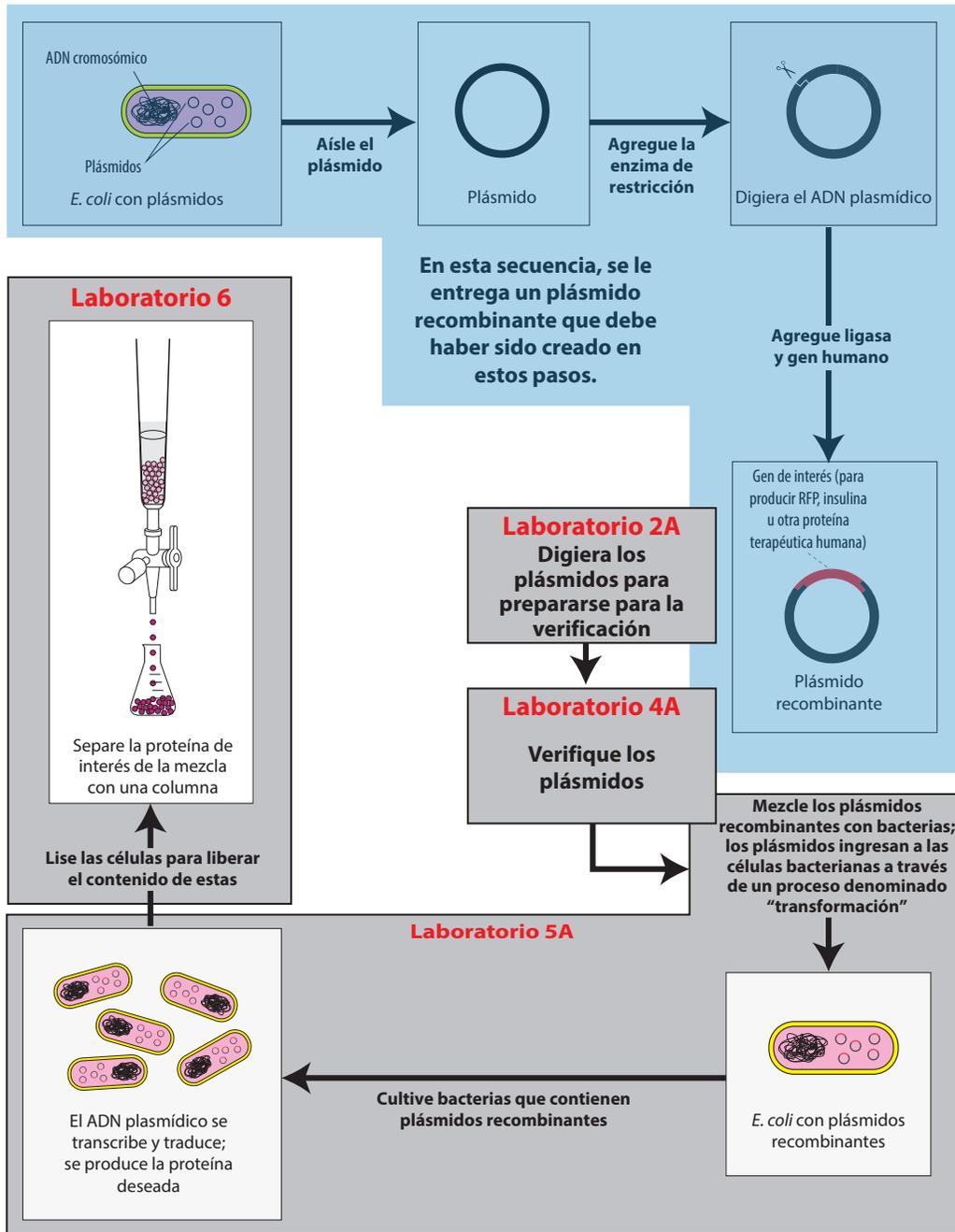
PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS HUMANAS EN LAS BACTERIAS

¿Conoces a alguien que tenga *diabetes* (una enfermedad que ocurre cuando la glucosa [azúcar] en la sangre de una persona es demasiado alta), *hemofilia* (que ocurre cuando se reduce la capacidad de coagulación de la sangre) y *deficiencia de crecimiento* (una enfermedad en la que una persona no crece adecuadamente)? Estas tres enfermedades resultan de la incapacidad del cuerpo de una persona para producir ciertas proteínas. En la diabetes, el cuerpo es incapaz de fabricar o producir *insulina* (una hormona producida en el páncreas que controla la cantidad de glucosa en la sangre). Las personas con hemofilia no pueden producir un *factor de coagulación de la sangre* (una variedad de proteínas en el plasma sanguíneo que participan en el proceso de coagulación). La deficiencia de crecimiento es el resultado de la incapacidad para producir la *hormona del crecimiento humano* (una hormona secretada por la glándula pituitaria que estimula el crecimiento). Un paciente con cualquiera de estas enfermedades debe ser tratado con la proteína faltante.

Antes del desarrollo de las tecnologías del ADN recombinante, las proteínas terapéuticas humanas se extrajeron de animales u otros seres humanos. La insulina fue aislada originalmente de los páncreas de cerdos y vacas. La hormona del crecimiento humano se extrajo de las glándulas pituitarias de cadáveres humanos. Estos métodos fueron efectivos, pero el uso de proteínas producidas por animales a veces dio lugar a reacciones adversas y fue difícil elaborar cantidades lo suficientemente grandes. Ahora, los científicos han descubierto cómo agregar ADN humano al ADN bacteriano, permitiendo que las bacterias produzcan una proteína humana.

En el proceso de la ingeniería genética, se agrega un gen humano a un plásmido que se ha cortado utilizando enzimas de restricción. El plásmido es captado por células bacterianas en un proceso llamado *transformación bacteriana*, y las células producen la proteína humana que está codificada por el gen humano junto con sus propias proteínas (vea la **Figura 2A.4**). Durante este proceso, los científicos usan una combinación de herramientas, algunas fabricadas por el hombre y otras biológicas. A lo largo de estos laboratorios, explorará y usará estas herramientas para que pueda comprender de primera mano cómo funcionan.

Figura 2A.4: Elaboración de una proteína terapéutica humana en bacterias.



CLONE ESE GEN

Ahora ya conoce dos herramientas biológicas para la clonación de un gen: los plásmidos y las enzimas de restricción.

1. Los plásmidos tienen varias características importantes:
 - Una secuencia para el inicio de la replicación del ADN, llamada punto *ori*, que permite que el plásmido se replique en las bacterias utilizando las enzimas de síntesis de ADN del huésped
 - Un promotor para iniciar la transcripción del gen insertado
 - Un gen que codifica una proteína para la resistencia a los antibióticos, que permite la identificación de bacterias que han tomado el plásmido
2. Las enzimas de restricción digieren tanto el plásmido como el ADN humano que contiene el gen de interés (como la insulina) que se va a clonar.

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

- Cortar el plásmido en un sitio (o sitios) que permita la inserción del nuevo gen.
- Cortar el plásmido en un sitio apropiado para garantizar que no se interrumpan genes o secuencias importantes, incluido el punto *ori*, el promotor, y al menos uno de los genes que codifican la resistencia a los antibióticos.
- Cortar el plásmido cerca del promotor para que pueda expresarse el gen insertado.
- Cortar el ADN humano lo más cerca posible de ambos extremos del gen de interés para que pueda insertarse en el sitio apropiado en el ADN plasmídico, sin cortar dentro del gen.



DETÉNGASE Y PIENSE: ¿Por qué es importante usar la misma enzima o enzimas para cortar tanto el plásmido como el gen del ADN humano?

En esta actividad, hará un modelo en papel de un plásmido recombinante que contiene un gen para una proteína terapéutica humana, en este caso, la insulina. Tiene tres tareas:

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

HOJAS INFORMATIVAS

- Diagrama de plásmidos (RM 2)
- Secuencia de ADN humano (RM 3)

PROCEDIMIENTO

1. Sobre el **Diagrama de plásmidos (RM 2)**:
 - Use tijeras para cortar la secuencia del plásmido y pegue los extremos para hacer un modelo en papel del plásmido.
 - Localice las posiciones del punto *ori*, el promotor, y los genes para la resistencia a los antibióticos.
 - Localice las posiciones de cada sitio de restricción de las enzimas de restricción.
2. Elija la enzima de restricción que se debe utilizar para cortar el plásmido. Verifique que la enzima de restricción cumpla con todos los siguientes criterios:
 - Deje el punto *ori*, el promotor, y al menos un gen de resistencia a antibióticos intacto.
 - Corte el plásmido solo una vez.
 - El corte está cerca del promotor.
3. Revise la **Tabla 2A.1** en la página C-8 y use tijeras para cortar el plásmido en el sitio de restricción exactamente como lo haría la enzima de restricción. Escriba las secuencias de los nucleótidos que quedan en cada extremo del plásmido.
4. Sobre la **secuencia de ADN humano (RM 3)**, escanee la secuencia del ADN humano y determine dónde cortarían el ADN las tres enzimas de restricción: *Bam*HI, *Eco*RI, y *Hind*III.
5. Determine si la enzima de restricción que eligió en el paso 2 es una buena opción para cortar el gen de la insulina del ADN humano al verificar que cumple con todos los siguientes criterios:
 - No corta dentro del gen de la insulina.
 - Corta muy cerca del principio y final del gen.
 - Permitirá que el gen de la insulina se inserte en el plásmido cortado.
6. Revise la **Tabla 2A.1**, y use tijeras para cortar el ADN humano en el sitio de restricción exactamente como lo cortaría la enzima de restricción. Escriba las secuencias de los nucleótidos que quedan en cada extremo del gen de la insulina después de que se haya cortado del ADN humano.
7. Use cinta adhesiva para insertar el gen de la insulina en el plásmido cortado. Verifique que los extremos cohesivos se conecten siguiendo la orientación correcta. (En el laboratorio, una tercera herramienta biológica, **ADN ligasa**, se utiliza para conectar permanentemente los extremos cohesivos). Ahora tiene un modelo en papel de un plásmido recombinante que contiene un gen de insulina. Una vez que el plásmido se replica (se copia) a sí mismo, el gen de la insulina también se copia o clona.

PREGUNTAS DE LA ACTIVIDAD

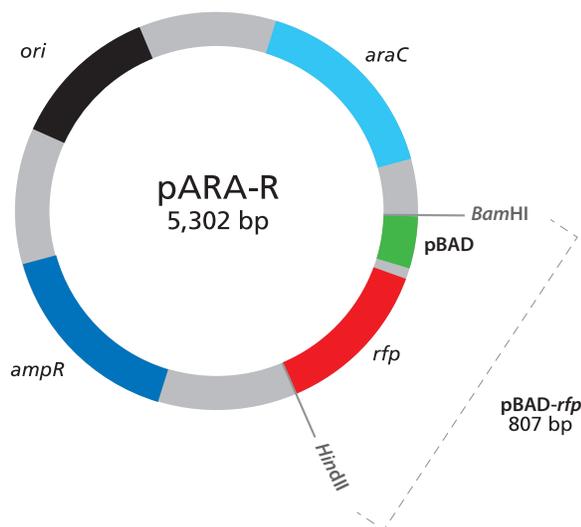
1. ¿Qué enzima de restricción eligió? ¿Por qué la eligió?
2. ¿Dónde insertaría el gen de la insulina y por qué?
3. ¿Qué antibiótico usaría para determinar si se tomó el ADN recombinante?

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

Para generar proteínas terapéuticas humanas, los científicos primero necesitan aislar un fragmento de ADN que contenga el gen humano que codifica la proteína deseada y luego insertar esa secuencia en un plásmido. En este laboratorio, hará precisamente eso. Se asegurará de que el plásmido recombinante, pARA-R, que se le dio es el correcto para producir la RFP en bacterias. Para hacer esto, usará enzimas de restricción para cortar el plásmido (vea la **Figura 2A.5**), que generará fragmentos de ADN de longitudes características del plásmido pARA-R. Este procedimiento se llama **digestión de la restricción** y las longitudes de los fragmentos se pueden determinar por electroforesis en gel (lo que puede hacer en el Capítulo 4A).

El plásmido de ADN recombinante pARA-R contiene el gen para la resistencia a la ampicilina, el gen de la proteína fluorescente roja (*rfp*), un promotor 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 crecen en presencia de **arabinosa**, un azúcar de cinco carbonos que ocurre de manera natural en varios carbohidratos de plantas y bacterias. Esta secuencia se llama **activador** de la arabinosa (*araC*). El activador controla al promotor. Si la arabinosa está presente en las bacterias, el promotor se unirá a la ARN polimerasa y se producirá la transcripción. Si la arabinosa no está presente, el promotor no se unirá a la ARN polimerasa y no se producirá la transcripción.

Figura 2A.5: Plásmido pARA-R



Los componentes relevantes en 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 2A.5** también muestra el tamaño del plásmido (el número en el centro, que indica el número de pares de bases [bp]) y las secuencias donde se puede cortar con las enzimas de restricción que se utilizarán en el laboratorio. Los sitios etiquetados como “*Bam*HI” y “*Hind*III” representan los sitios de restricción para estas dos enzimas de restricción. (Vea la **Tabla 2A.1** en la página C-8). La **Figura 2A.4** (en la página C-11) muestra el gen de la insulina que se inserta en un solo sitio de enzima de restricción en el plásmido. En la clonación del gen *rfp*, dos enzimas de restricción (*Bam*HI y *Hind*III) se usan para cortar el plásmido y para aislar el gen *rfp*. El uso de dos enzimas de restricción diferentes tiene varias ventajas: permite que el gen insertado se oriente en la posición correcta para transcribir el “sentido” de la cadena de ADN (la cadena que codifica la proteína), y evita que el plásmido vuelva a formar un círculo sin el gen insertado. Aprenderás más sobre esto si hace el Capítulo 4A.



DETÉNGASE Y PIENSE: ¿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 DEL LABORATORIO

Responda a las siguientes preguntas con su grupo y prepárese para compartir sus respuestas con la clase.

1. Revise la **Figura 2A.5**. Si pARA se digiere con *Bam*HI y *Hind*III, ¿qué fragmentos se producen? Registre la secuencia de nucleótidos de los extremos cohesivos y la longitud de cada fragmento (pb), e indique los genes y otras secuencias importantes presentes en cada fragmento.
2. Para crear un plásmido que pueda producir RFP en bacterias, ¿qué componentes se necesitan en el plásmido?
3. Las bacterias pueden ser destruidas por un antibiótico a menos que contengan un plásmido que tenga el gen de resistencia a ese antibiótico. (Los científicos llaman a este tipo de genes **marcadores seleccionables**; solo las bacterias que portan este gen sobrevivirán a la exposición a un antibiótico. Si la captación de ADN por las bacterias es ineficaz (como se analiza en la lectura), ¿por qué un marcador seleccionable es clave en la clonación de un gen en las bacterias?
4. Lea la sección *Métodos* en las páginas de C-17 a C-18 y describa brevemente los pasos, utilizando palabras y un diagrama de flujo.

MATERIALES

Reactivos

- Una gradilla con lo siguiente:
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de tampón de restricción de 2.5x (2.5xB)
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de pARA-R (RP)
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de enzimas de restricción BamHI y HindIII (RE)
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de agua destilada (dH₂O)

Equipo y suministros

- Micropipeta P-20
- Caja de puntas para puntas de pipetas 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 de residuos para puntas y tubos de microcentrífuga usados (se compartirán entre los grupos)

SEGURIDAD:

- Se deben seguir todas las precauciones de seguridad adecuadas y usarse la vestimenta requerida para un laboratorio de ciencias, incluidas las gafas de seguridad. Consulte las instrucciones de su profesor.
- Lávese bien las manos con jabón después de finalizar la práctica de laboratorio.



MÉTODOS

1. Revise su gradilla para asegurarse de que tiene todos los reactivos que están en la lista.
2. Use el marcador para etiquetar dos tubos limpios de microcentrífuga "R+" y "R-". (También incluya su número de grupo y período de clase en cada tubo).
3. Revise la **Tabla 2A.2**, que resume los reactivos que agregará en el paso 4.

Tabla 2A.2: Adición de reactivos a los tubos R+ y R-

	Tubo de R+	Tubo de R-
Paso 4a: Tampón de restricción (2.5xB)	4.0 µl	4.0 µl
Paso 4b: plásmido pARA-R (RP)	4.0 µl	4.0 µl
Paso 4c: enzimas de restricción (RE)	2.0 µl	
Paso 4d: agua destilada (dH ₂ O)		2.0 µl

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



4. Usando una nueva punta de pipeta para cada reactivo, agregue lo siguiente:
 - a. 4.0 μl de B 2.5x a los tubos R+ y R-.
 - b. 4.0 μl de RP a los tubos R+ y R-.
 - c. 4.0 μl de RE al tubo R+. Agregue las enzimas directamente en la solución en la parte inferior del tubo de microcentrifuga. Bombee suavemente la solución hacia adentro y afuera con la pipeta para mezclar los reactivos. Tape el tubo cuando haya terminado.
 - d. 2.0 μl de dH_2O al tubo R-. Bombee suavemente la solución hacia adentro y afuera con la pipeta para mezclar los reactivos. Tape los tubos cuando haya terminado.

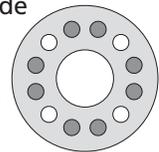


DETÉNGASE Y PIENSE: En este paso, se le pide que prepare un tubo sin las enzimas de restricción, *Bam*HI y *Hind*III. ¿Cuál es el propósito de este paso y por qué es importante?

5. Gire los dos tubos de microcentrifuga (R+ y R-) en la microcentrifuga por cuatro segundos para agrupar los reactivos en la parte inferior de cada tubo.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Distribuya los tubos uniformemente en la microcentrifuga para que su peso esté equilibrado.



6. Coloque ambos tubos en baño maría a 37 °C. (Colocará los tubos en la gradilla flotante para tubos de microcentrifuga; cuando la gradilla esté llena, tu profesor la colocará en baño maría). Incube por 15 minutos. Una vez que se haya completado la incubación, coloque ambos tubos en el congelador a -20 °C. Analizará el contenido de los tubos en el Laboratorio 4A.



DETÉNGASE Y PIENSE: ¿Por qué podrían funcionar mejor las enzimas a 37 °C? ¿Por qué deben colocarse las enzimas en el congelador? (Sugerencia: la temperatura del cuerpo humano es de 37° C).

PREGUNTAS DEL CAPÍTULO 2A

Responda a las siguientes preguntas con su compañero y prepárese para compartir sus respuestas con la clase.

1. Enumere en palabras o indique a través de un dibujo las características importantes de un vector plasmídico que se requieren para clonar un gen. Explique el propósito de cada característica.
2. ¿Qué papel tienen las enzimas de restricción en la naturaleza?
3. Según su comprensión de la evolución, ¿por qué las bacterias retienen un gen que les da resistencia a los antibióticos? ¿De qué manera la existencia de bacterias con resistencia a los antibióticos afecta a la medicina hoy en día?
4. Las bacterias, las anémonas de mar y los humanos parecen ser, en la superficie, organismos muy diferentes. ¿Cómo se puede expresar un gen de los seres humanos o una anémona de mar en las bacterias para crear un producto nunca antes creado en las bacterias?
5. Debido a un accidente en el laboratorio, las bacterias que portaban un plásmido con un gen de resistencia a la ampicilina y las bacterias que portaban un plásmido con un gen que proporciona resistencia a otro antibiótico (kanamicina) se mezclaron de forma accidental. ¿Cómo diseñaría un experimento que le permita clasificar los dos tipos de bacterias? (Pista: ¡Asegúrese de no destruir uno de los tipos de bacterias que intenta clasificar!)

GLOSARIO DEL CAPÍTULO 2A

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

Antibiótico: es una clase de compuestos que suprime o inhibe el crecimiento de microorganismos.

Resistencia a antibióticos: es el estado en el que las bacterias ya no son sensibles a un antibiótico y continuarán creciendo y dividiéndose en presencia del antibiótico.

Arabinosa: es un azúcar de cinco carbonos que se encuentra naturalmente en varios carbohidratos de plantas y bacterias.

Conjugación bacteriana: es un proceso por el cual dos células bacterianas se unen y transfieren material genético entre sí.

Transformación bacteriana: es el intercambio de material genético entre cepas de bacterias; un proceso en el cual un plásmido es captado por células bacterianas.

Bacteriófago: es un virus que infecta una célula bacteriana y utiliza la maquinaria celular para replicarse, destruyendo finalmente a la célula bacteriana.

Par de bases: son dos moléculas complementarias que contienen nitrógeno emparejadas en el ADN de doble cadena mediante enlaces débiles.

Factor de coagulación de la sangre: consiste en una variedad de proteínas en el plasma sanguíneo que participan en el proceso de coagulación.

Diabetes: es una enfermedad que se produce cuando el nivel de glucosa en la sangre de una persona es demasiado elevado.

Digestión: es el corte del ADN mediante una enzima de restricción.

Clonación de ADN: es el proceso de hacer muchas copias exactas de una pieza de ADN en particular. (Vea replicación de ADN).

ADN ligasa: es una enzima que cataliza la formación de enlaces químicos covalentes en el esqueleto azúcar-fosfato, uniendo así los fragmentos de ADN.

Replicación del ADN: es el proceso biológico de hacer una copia idéntica de una sección de ADN, que ocurre cada vez que se forma una nueva célula en los organismos vivos. El proceso comienza cuando una molécula de ADN de doble cadena produce dos copias idénticas. La doble hélice se desenrolla, y cada cadena de la molécula original sirve como plantilla para la producción de la cadena complementaria.

***Escherichia coli* (E. coli):** es una bacteria común que se encuentra en el intestino de animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas son inofensivas, incluida la cepa que se utiliza en estos protocolos de laboratorio.

Fluorescencia: es la producción de luz por una molécula (p. ej., la proteína fluorescente roja liberará luz roja cuando se exponga a la luz ultravioleta).

Deficiencia del crecimiento: es una enfermedad en la que una persona no crece adecuadamente.

Hemofilia: es una enfermedad que se produce cuando se reduce la capacidad de coagulación de la sangre.

Hormona del crecimiento humano: es una hormona secretada por la glándula pituitaria que estimula el crecimiento.

Insulina: es una hormona que se produce en el páncreas que controla la cantidad de glucosa en la sangre. La insulina es una proteína.

ARN mensajero: es una molécula de ARN transcrita del ADN de un gen y utilizada como plantilla para la síntesis de proteínas.

Origen de la replicación (*ori*): es una secuencia de ADN en la que se inicia la replicación del ADN.

Promotor: es una secuencia de ADN específica que se une a la ARN polimerasa e inicia la transcripción del gen.

Plásmido recombinante: es un plásmido construido a partir de fragmentos de ADN de múltiples fuentes.

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

Digestión con enzimas de restricción: es una técnica en la que se utilizan enzimas naturales para cortar el ADN en secuencias específicas.

Punto de restricción (también conocido como sitio de reconocimiento de restricción): es una secuencia de ADN específica que es cortada por una enzima de restricción. Muchos puntos de restricción son palíndromos, secuencias que son iguales cuando se leen hacia adelante o hacia atrás.

El ARN (ácido ribonucleico): es una biomolécula monocatenaria formada por una base nitrogenada, un azúcar ribosa y un fosfato. El ARN desempeña un papel fundamental en la síntesis de proteínas, al transmitir información genética desde el ADN al ribosoma donde se elaboran las proteínas.

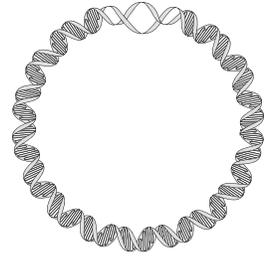
ARN polimerasa: es una proteína que produce ARN mensajero a partir de ADN.

Marcador seleccionable: es un gen en un plásmido que se introduce en una célula junto con un gen de interés que se está clonando. Los marcadores seleccionables permiten a los científicos saber si la célula ha captado el plásmido porque se puede ver o detectar el marcador. Un marcador común es un gen de resistencia a los antibióticos: solo las bacterias que tienen el gen sobrevivirán al antibiótico.

Extremo cohesivo: es el extremo de una molécula de ADN cortada con ciertas enzimas de restricción. Estos extremos son asimétricos, ya que una cadena es más larga que la otra y, por lo tanto, tiene bases no emparejadas. Los extremos cohesivos de dos piezas diferentes de ADN que se han cortado con la misma enzima (s) de restricción se pueden unir, ya que las bases no emparejadas en sus extremos son complementarias.

Transcripción: es el proceso mediante el cual la información codificada en el ADN se transfiere al ARN mensajero, un ácido ribonucleico monocatenario.

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



CAPÍTULO 4A

CÓMO ASEGURARSE DE QUE HA OBTENIDO UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE

INTRODUCCIÓN

Cuando los científicos clonan un gen para producir una proteína terapéutica humana, crean un plásmido recombinante que incluye el gen humano de interés. Para hacerlo, usan enzimas de restricción para crear fragmentos de ADN que contienen los componentes del plásmido (Capítulo 2A) y luego usan la ADN ligasa para unir esos fragmentos. Como parte del proceso de clonación de genes, los científicos tienen que *verificar* (confirmar) que han creado el plásmido recombinante que necesitan, es decir, el que tiene el gen de interés (que producirá la proteína terapéutica humana) y todos los componentes necesarios para que se produzca esa proteína. En este capítulo, continuará trabajando con las herramientas de ingeniería genética mientras verifica que tiene el plásmido recombinante que necesita para producir una RFP.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 4A

Al final de este capítulo, podrá 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 a través de un gel durante la electroforesis en gel
- Separar e identificar los fragmentos de restricción de ADN y los plásmidos mediante electroforesis en gel

¿QUÉ ES LO QUE YA SABE?

Discuta las siguientes preguntas con su compañero y escriba sus ideas en su cuaderno. Está preparado para discutir sus respuestas con la clase. No se preocupe si no sabe todas las respuestas. Discutir estas preguntas lo ayudará a pensar en lo que ya sabe sobre la electroforesis en gel y la verificación en el laboratorio.

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

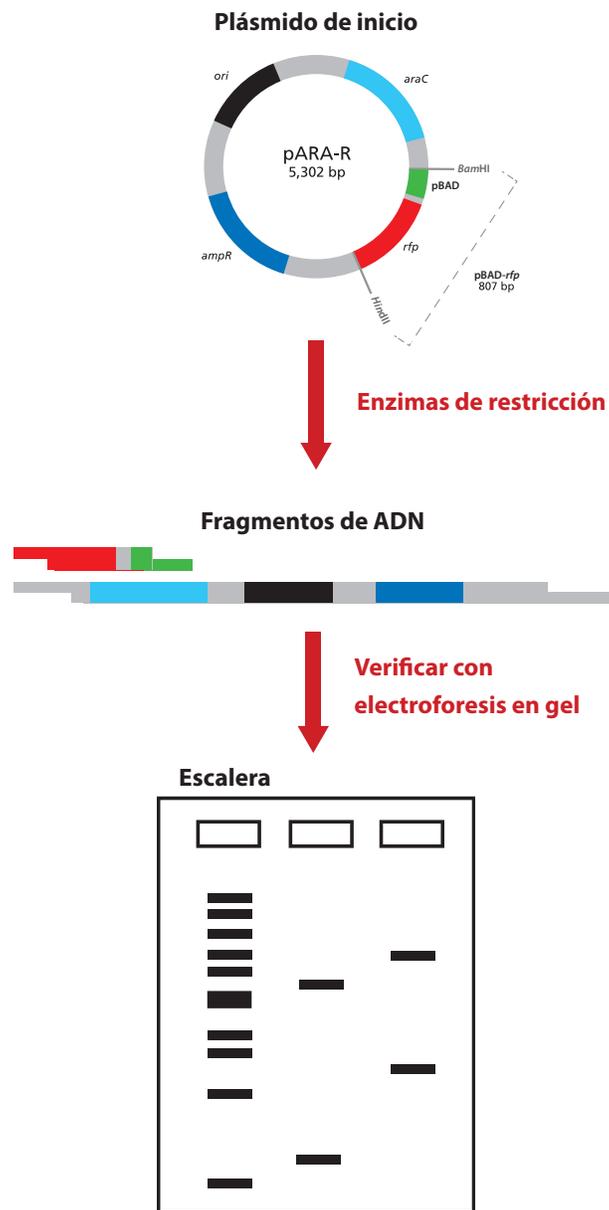
¿POR QUÉ NECESITA VERIFICAR?

Debido a que existen muchas fuentes de error potencial en cualquier procedimiento, incluidos los procedimientos utilizados para clonar un gen, es importante verificar que tiene el plásmido correcto. En la clonación de genes, también existe el problema de que algunos procedimientos no son selectivos. Por ejemplo, cuando se usa una ADN ligasa para *ligar* fragmentos de ADN, muchas combinaciones diferentes resultan del proceso de *ligación*.

CÓMO VERIFICAR EL PLÁSMIDO RECOMBINANTE

La **Figura 4A.1** muestra cómo verificar la identidad de un plásmido. Debe comparar los resultados de las digestiones de restricción del Laboratorio 2A con una escalera de ADN para asegurarse de que el plásmido que le hayan dado sea el plásmido correcto.

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

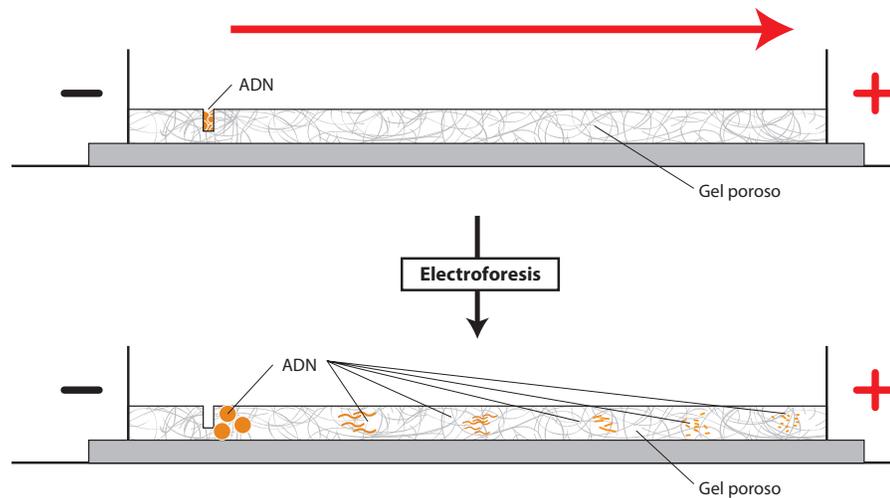


El gel mostrado aquí es solo un ejemplo. Su profesor le pedirá que prediga el tamaño exacto y la ubicación de los fragmentos.

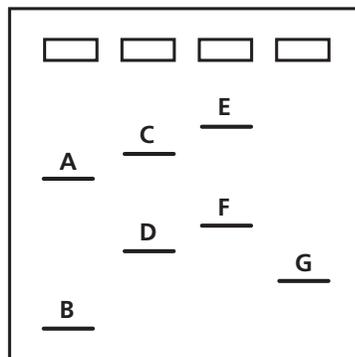
ELECTROFORESIS EN GEL

La electroforesis en gel se usa ampliamente en la verificación y purificación del ADN. Para identificar o purificar fragmentos de restricción del ADN, es necesario separar las moléculas de ADN de varios tamaños. La electroforesis en gel separa las biomoléculas principalmente de acuerdo con su tamaño molecular, que para el ADN se mide por el número de pares de bases. La estructura fundamental de una molécula de ADN está cargada negativamente debido a sus grupos fosfato y, por lo tanto, se alejará del electrodo negativo (negro) y se dirigirá hacia el electrodo positivo (rojo). Debido a que es más fácil que las moléculas pequeñas de ADN se muevan a través de la matriz de agarosa, migrarán más rápido que las moléculas de ADN más grandes. Vea la **Figura 4A.2**.

Figura 4A.2: Separación del ADN por tamaño mediante la electroforesis en gel



CONSIDERE: Después de la separación por electroforesis en gel, de diferentes fragmentos de ADN y plásmidos, el gel se colorea para mostrar bandas que indican la ubicación de cada tipo de fragmento y plásmido. El dibujo de un gel coloreado a continuación muestra una serie de bandas que se etiquetaron con letras. También se muestran las ubicaciones de los pocillos. ¿Cuál es el orden de los fragmentos, de menor a mayor?



PLÁSMIDOS EN ELECTROFORESIS EN GEL

Si bien los fragmentos de ADN, lineales y cortos, se mueven como se espera cuando se corren en electroforesis en gel, el movimiento de los plásmidos no es tan sencillo. Esto se debe a que un plásmido puede existir en diferentes configuraciones que se mueven a diferentes velocidades a través del gel. Hay tres configuraciones de plásmidos:

- La configuración plasmídica más común es **superhelicoidal**. Puede visualizar esta configuración pensando en una banda elástica retorcida. Esta torsión o superenrollamiento da como resultado una molécula muy compacta, una que se moverá a través del gel muy rápidamente por su tamaño. Esta configuración solo se ve en los plásmidos que se han replicado en bacterias, porque el superenrollamiento de un plásmido requiere una enzima que se encuentra en la célula bacteriana. Es la configuración plasmídica natural predeterminada que se encuentra en las bacterias.
- La segunda configuración del plásmido es un **círculo fragmentado**. Puedes visualizar esta configuración como un círculo grande y flexible. Este plásmido tiene un espacio en uno de los enlaces covalentes ubicados en su esqueleto azúcar-fosfato a lo largo de una de las dos cadenas de nucleótidos. Esta configuración plasmídica circular no se moverá a través del gel de agarosa tan fácilmente como la configuración superhelicoidal. Aunque es del mismo tamaño, en términos de pares de bases, se ubicará más cerca del pocillo que de la forma superhelicoidal.
- La tercera configuración del plásmido es un **multímero**. Puede visualizar esta configuración pensando en dos o más plásmidos que están conectados como eslabones de una cadena. Esta configuración solo se ve en los plásmidos que se han replicado en bacterias, porque los multímeros se forman cuando los plásmidos se replican tan rápido que terminan unidos entre sí. Si dos plásmidos están unidos, el multímero será dos veces más grande que un plásmido único y migrará muy lentamente a través del gel. De hecho, se moverá más lento que el círculo fragmentado.

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

Figura 4A.3: Configuraciones de plásmidos



CONSIDERE: Si usara electroforesis en gel para separar el mismo plásmido que tiene las tres configuraciones, ¿cuál plásmido se movería más rápido y cuál se movería más lento? ¿Por qué las diferentes configuraciones de plásmidos se mueven como lo hacen a través del gel? Explíquelo en palabras o con un dibujo.





¿SABÍA?

Historia de la ingeniería genética

La ingeniería genética no es un fenómeno nuevo. A lo largo de la historia, los seres humanos han utilizado la cría selectiva para producir organismos con rasgos deseables. La ciencia de la agricultura comenzó con la selección de pastos silvestres y su posterior reproducción para formar los precursores de 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 rasgos deseables en su descendencia. Por ejemplo, las vacas que producen grandes volúmenes de leche se pueden cruzar para que le pasen ese rasgo a las generaciones futuras.

El proceso de inserción o eliminación de ADN del genoma de un organismo es una tecnología muy nueva, pero es muy prometedora. Con la modificación genética, podemos aumentar el valor nutricional de los alimentos básicos, diseñar bacterias para producir proteínas terapéuticas para su uso en medicina y quizás incluso deshabilitar los genes que causan enfermedades.

En los organismos producidos por la cría selectiva tradicional, el genoma de la descendencia contiene información genética de ambos padres. En la ingeniería genética moderna, el nuevo organismo también contiene información genética de muchos otros organismos. La ingeniería genética logra resultados similares a la cría selectiva, pero más rápidamente y con mucha mayor precisión.

LABORATORIO 4A: VERIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL

En este laboratorio, utilizará electroforesis en gel para examinar los productos de la digestión de restricción del plásmido pARA-R (Laboratorio 2A). Los tamaños de los fragmentos de ADN se pueden determinar al compararlos con una *Escalera de ADN*, una mezcla de fragmentos de ADN con tamaños conocidos. (Cuando la escalera de ADN se corre con electroforesis en gel y se colorea, las bandas que muestran los fragmentos parecen los peldaños 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 evidencia de que está utilizando el plásmido recombinante pARA-R que contiene el gen *rfp*. El mismo procedimiento se usaría para verificar que un plásmido recombinante creado en el laboratorio contenía el gen para una proteína terapéutica humana.



ANTES DEL LABORATORIO

Discuta lo siguiente con su grupo y prepárese para compartir sus ideas con la clase:

1. El plásmido pARA-R que digirió en el Laboratorio 2A se replicó en una célula bacteriana. ¿Qué configuraciones (superhelicoidales, círculo fragmentado y multímero) podrían tener este plásmido antes de la digestión?
2. Debe predecir todos los productos que pueda ver, incluidas las diferentes configuraciones de plásmidos. Revise su trabajo en el Laboratorio 2A. ¿Qué productos puede esperar ver en los tubos R- y R+? Cree una tabla que muestre todos los posibles fragmentos y plásmidos por tubo. Incluya la longitud (tamaño bp) de cada fragmento o plásmido posible, y ordene los productos encontrados en cada tubo de microcentrifuga por tamaño, desde el más pequeño hasta el más grande. Incluya todas las configuraciones posibles de plásmidos, y organícelas primero por tamaño y luego por velocidad de desplazamiento a través del gel, de la más rápida a la más lenta.
3. Lea la sección *Métodos* en las páginas C-32 a C-34 y describa brevemente los pasos, utilizando palabras y un diagrama de flujo.

MATERIALES

Reactivos

- Una gradilla con lo siguiente:
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de pARA no digerido del laboratorio 2A (R-)
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de pARA digerido del laboratorio 2A (R+)
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de tinte de carga (LD)
 - ◆ Tubo de microcentrífuga de escalera de ADN (M)
- Matraz de 50 ml que contiene tampón SB 1x (compartido con otro grupo)

Equipo y suministros

- Micropipeta P-20
- Caja de puntas para puntas de pipetas desechables
- Microcentrífuga (se compartirá entre todos los grupos)
- Caja de electroforesis cargada con un 0.8% de gel de agarosa (se compartirá entre los dos grupos)
- Recipiente de residuos para las puntas y tubos de microcentrífuga usados (se compartirán entre los grupos)
- Diagrama de escalera de ADN (RM 4)



SEGURIDAD:

- Se deben seguir todas las precauciones de seguridad adecuadas y usarse la vestimenta requerida para un laboratorio de ciencias, incluidas las gafas de seguridad. Consulte las instrucciones de su profesor.
- Lávese bien las manos con jabón después de finalizar la práctica de laboratorio.

MÉTODOS

1. Revise su gradilla para asegurarse de que tiene todos los reactivos que están en la lista.
2. Agregue 2.0 μ l de LD a los tubos R- y R+.



DETÉNGASE Y PIENSE: El ADN no es visible al desplazarse por el gel. El *tinte de carga* (un conjunto de tintes que se agregan a las biomoléculas para la electroforesis en gel) contiene los tres tintes que separó en el Laboratorio 1.2. ¿Por qué es útil usar el tinte de carga en este laboratorio?

- Gire los tubos R- y R+ en la microcentrífuga durante varios segundos para agrupar los reactivos en la parte inferior de cada tubo.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Distribuya los tubos uniformemente en la microcentrífuga para que su peso esté equilibrado.

- Asegúrese de que los pocillos de la unidad de electroforesis en gel estén ubicados cerca del electrodo negativo (negro).
- Llene la caja con tampón SB 1x hasta un nivel que cubra toda la superficie del gel. Si ve algún “hoyuelo” sobre los pocillos, agregue más tampón.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Si hay “hoyuelos”, agregue muy pequeñas cantidades de tampón a la caja de electroforesis. Si bien el gel debe estar completamente debajo del tampón, no necesita que haya mucho tampón en la caja, ya que esto permitirá que la corriente eléctrica pase a través del tampón y no del gel.

- Haga un dibujo en su cuaderno que muestre la ubicación de los pocillos en la caja de electroforesis. El orden de las muestras en cada pocillo es el siguiente:



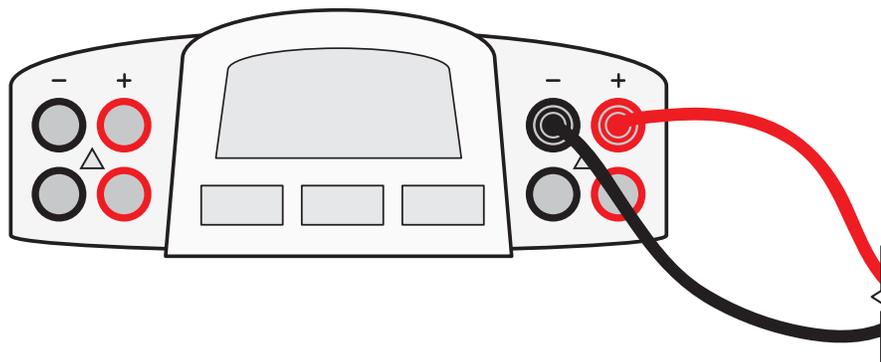
- Con una punta de pipeta nueva para cada muestra, agregue 10.0 μl de escalera de ADN (M), 10.0 μl de R- y 10.0 μl de R+ en sus pocillos designados. Para cada muestra, haga lo siguiente:
 - Apoye el codo sobre la mesa para estabilizar la mano que sostiene la pipeta. Si es necesario, use también la otra mano para apoyar la mano que sostiene la pipeta.
 - Baje la punta de la pipeta hasta que esté debajo del tampón, pero justo por encima del pocillo.

TÉCNICA DE LABORATORIO: No perforo el gel, ya que no se podrá utilizar. Presione suavemente el émbolo para suministrar lentamente la muestra. Para evitar que entre aire en los pocillos, no se pase la primera parada después de dispensar. La muestra se hundirá en el pocillo.

- Cuando se hayan cargado todas las muestras, cierre bien la tapa sobre la caja de electroforesis.
- Conecte los cables eléctricos a la fuente de alimentación. Conecte ambos cables al mismo canal, con el cátodo (-) al cátodo (negro a negro) y el ánodo (+) al ánodo (rojo a rojo). Vea la **Figura 4A.4**.



Figura 4A.4: Cables de la caja de electroforesis conectados al canal correcto de la fuente de alimentación



10. Encienda la fuente de alimentación y ajuste el voltaje a 130–135 V.
11. Después de dos o tres minutos, verifique si el tinte de carga púrpura (azul de bromofenol) se está desplazando hacia el electrodo positivo (rojo). Si se está desplazando hacia la otra dirección, hacia el electrodo negativo (negro), verifique los cables eléctricos para ver si están enchufados correctamente a la fuente de alimentación.



DETÉNGASE Y PIENSE:

- La escalera de ADN sirve como estándar porque contiene una mezcla de moléculas de ADN de tamaños conocidos. Al hacer correr sus muestras y la escalera de ADN lado a lado en su gel, puede calcular el tamaño real en pares de bases de moléculas desconocidas. El **diagrama de escalera de ADN (RM 4A)** muestra 10 bandas de ADN de tamaños conocidos. Con esta información, ¿puede predecir las posiciones de las bandas de ADN producidas por los posibles productos encontrados 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 que se haya completado la electroforesis en gel?

12. Su profesor le explicará qué hacer con su gel. Es posible que no tenga tiempo suficiente para completar la electroforesis. El tinte de carga amarillo deberá correr cerca del final del gel, aproximadamente de 40 a 50 minutos. Una vez que el gel haya terminado de correr, deberá teñirse para mostrar la ubicación de los fragmentos de ADN y los plásmidos y su profesor le proporcionará una fotografía del gel teñido que deberá analizar.

PREGUNTAS DEL CAPÍTULO 4A

Analice su fotografía de su gel y discuta las siguientes preguntas con su compañero. Está preparado para compartir sus respuestas con la clase.

1. ¿Por qué es importante verificar que tiene el plásmido recombinante correcto?
2. ¿Cómo se compararon los resultados reales del gel con las predicciones del gel?
3. ¿Ve alguna banda que no esperaba? ¿Qué factor podría explicar el origen de estas bandas inesperadas?
4. ¿El gel muestra que está utilizando el plásmido recombinante correcto? Describa la evidencia que usó para llegar a esta afirmación.
5. En la línea R-, ¿ve evidencia de configuraciones múltiples de plásmidos? Explique su respuesta.
6. En la línea R+, ¿ve evidencia de digestión completa? Explique su respuesta.
7. ¿En qué línea esperaría encontrar el gen *rfp* y el gen *ampR* en la fotografía del gel? ¿Puede localizar estos dos genes? Explique su respuesta.
8. Compare las líneas que tienen fragmentos lineales con las líneas que tienen plásmidos. ¿Hay alguna diferencia en la forma de las bandas entre estas dos formas de ADN?

GLOSARIO DEL CAPÍTULO 4A

Escalera de ADN: es un conjunto de fragmentos de ADN conocidos con diferentes tamaños en pares de bases (pb) o kilo bases (kb). Estos fragmentos de ADN se separan y visualizan como bandas de ADN en un gel. Juntas, las bandas de ADN separadas parecen una escalera en el gel. Las escaleras de ADN se utilizan en electroforesis en gel para determinar el tamaño y la cantidad de fragmentos de ADN.

Ligar: es la unión de dos extremos del ADN.

Ligación: es la reacción que une químicamente a dos fragmentos de ADN, dando como resultado una molécula de ADN recombinante.

Tinte de carga: es un conjunto de tintes que se agregan a 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.

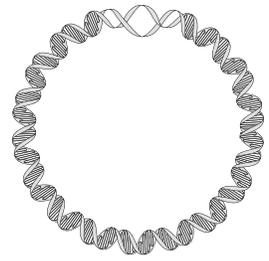
Multímero: es una configuración de plásmido que consta de múltiples plásmidos que se han entrelazado durante la formación, por lo que son como eslabones de una cadena.

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

Cría selectiva: es cuando dos miembros de la misma especie se cruzan para promover rasgos deseables en sus descendencia.

Superhelicoidal: es una configuración de plásmido que consiste en un solo plásmido que ha sido enroscado. La forma de este plásmido es más *compacta* (ocupa menos espacio) que la forma circular.

Verificar: es establecer que algo es verdadero, exacto o posible de defender.



CAPÍTULO 5A

CÓMO INSERTAR PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN LAS BACTERIAS

INTRODUCCIÓN

Una vez que se ha creado un plásmido recombinante que incluye el gen de interés, el siguiente paso es replicar el plásmido y permitir que las bacterias produzcan la proteína. Tanto la replicación como la **expresión de proteínas** (la forma en que las proteínas se sintetizan, modifican y regulan en los organismos vivos) pueden ocurrir solo dentro de una célula. Por lo tanto, su próximo paso en el proceso de clonación de genes es colocar el plásmido recombinante en bacterias de *E. coli* a través de un proceso llamado **transformación bacteriana**, lo que cambia el contenido de ADN de las bacterias. En este capítulo, llevará a cabo la transformación de bacterias de *E. coli* que utilizan un plásmido recombinante que contiene el gen *rfp*. Si estuviera elaborando una proteína terapéutica humana, la bacteria que transforma contendría el gen humano y sería capaz de producir la proteína terapéutica humana deseada.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 5A

Al final de este capítulo, podrá hacer lo siguiente:

- Describa el papel de la transformación en el proceso de clonación de genes
- Explique el propósito de cada control en el experimento de transformación
- Explique cómo se **expresa** la información codificada en un gen (el proceso de convertir esta información en ARN mensajero y luego en una proteína) como un rasgo.

¿QUÉ ES LO QUE YA SABE?

Discuta las siguientes preguntas con su compañero y escriba sus ideas en su cuaderno. Esté preparado para discutir sus respuestas con la clase. No se preocupe si no sabe todas las respuestas. Discutir estas preguntas lo ayudará a pensar lo que ya sabe sobre la captación de plásmidos y la expresión de genes en bacterias.

1. ¿Cree que la captación bacteriana de un plásmido del ambiente es un evento común? ¿Por qué sí o por qué no?
2. ¿Cuáles son los pasos involucrados en la transcripción y la **traducción** (el proceso por el cual la información codificada en el ARN mensajero se decodifica y se transforma en proteína) de un gen?
3. ¿Cuál es la relación entre genes, proteínas y rasgos (o características observables)?
4. ¿Qué tienen en común las bacterias y los seres humanos que hacen posible que un gen humano se exprese en bacterias?

TRANSFORMACIÓN BACTERIANA CON PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

Un plásmido es un vector ideal para transportar secuencias de ADN de un organismo a otro porque está provisto de (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 los antibióticos. Un plásmido puede ser captado por bacterias donde se replica, y sus genes se expresan utilizando la maquinaria celular bacteriana. Si se insertó un gen de interés en el vector, la bacteria produce el producto codificado por ese gen.

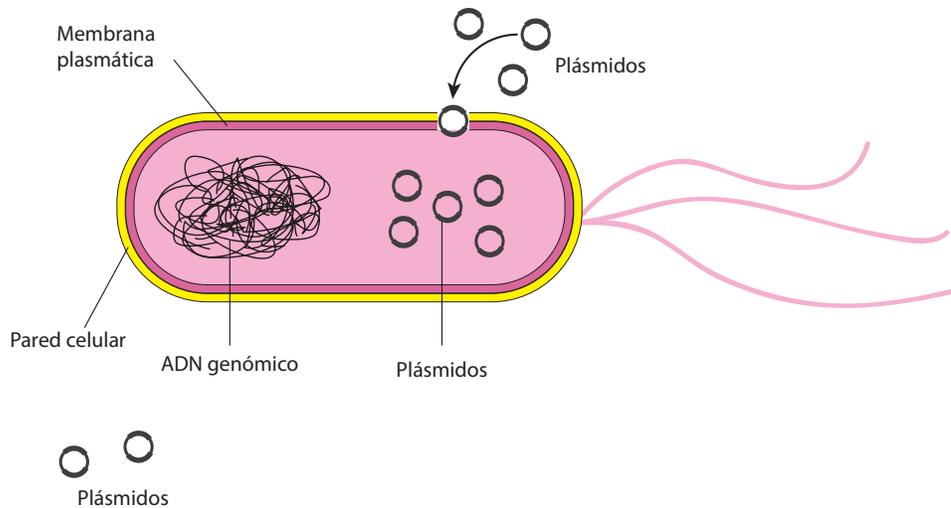


CONSIDERE: Una vez que se ha insertado un gen en un vector, ¿qué cree usted que se requiere para que el producto sea codificado por el gen insertado?

TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

Una vez que se fabrica un plásmido recombinante que contiene un gen de interés, como el gen de la insulina, el plásmido puede ingresar a las células bacterianas a través del proceso de transformación. La **Figura 5A.1** ilustra la transformación.

Figura 5A.1: Transformación bacteriana



La captación de ADN del ambiente de una célula bacteriana ocurre con una eficacia muy baja en la naturaleza. Las bacterias de *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. Además, la pared celular tiene carga negativa y repele las moléculas de ADN que tienen carga negativa.

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



Para aumentar la eficiencia de la captación de ADN, las bacterias se tratan de dos maneras. Primero, las bacterias de *E. coli* se colocan en una solución que contiene iones de calcio positivos, que neutralizan la carga negativa en las membranas externas de las células, lo que permite que las moléculas de ADN crucen las membranas plasmáticas y entren a la célula. A continuación, las bacterias se someten a un **choque térmico** (un aumento repentino de la temperatura), lo que hace que la presión afuera de la célula aumente. Esta diferencia de presión permite que el ADN plasmídico ingrese a la célula bacteriana desde el exterior.

A las células tratadas con calcio y calor se les considera **competentes** (capaces) de absorber el ADN de manera más eficiente, pero incluso con este tratamiento, solo 1 de cada 10,000 células bacterianas capta un plásmido en su ambiente. Entonces, ¿cómo pueden identificarse las bacterias que han captado el plásmido recombinante? Recuerde que un componente importante de estos plásmidos recombinantes es un gen para la resistencia a los antibióticos. Si coloca células bacterianas en presencia de antibiótico, solo crecerán aquellas células que tengan el plásmido recombinante.

¿SABÍA?

Una carrera armamentista bacteriana

La captación de plásmidos puede tener graves consecuencias en la medicina. *Staphylococcus aureus* es una bacteria común que con frecuencia causa infecciones de la piel y el tracto respiratorio. Si la infección no se trata o se propaga al torrente sanguíneo, hasta el 30 % de estas infecciones son mortales.

Algunas cepas de bacterias intercambian de forma natural los plásmidos, lo que permite una mayor variación genética en una especie que se reproduce asexualmente. Un mecanismo de intercambio es la **conjugación bacteriana**, en la cual un plásmido se comparte entre dos células bacterianas que entran en contacto entre sí. El otro método es la transformación, donde las bacterias absorben el ADN directamente de su ambiente. En la naturaleza, esto es a menudo causado por células muertas que liberan su contenido al medioambiente.

Tradicionalmente, los médicos han tratado las infecciones por estafilococos con antibióticos como la vancomicina, que interrumpe la formación de paredes celulares bacterianas. Sin embargo, en los últimos años, los médicos han encontrado que estos antibióticos ya no son eficaces para tratar las infecciones por estafilococos. Las cepas nuevas y más agresivas de las bacterias son cada vez más comunes, y los médicos no pueden tratar las infecciones.



Los investigadores creen que algunas bacterias *Staphylococcus* han adquirido el gen *VanA* mientras se conjugan con otro tipo de bacterias. Los genes *VanA* infunden resistencia a la vancomicina, y ciertas especies lo llevan en su genoma de manera natural. Las bacterias resultantes resistentes a la vancomicina de *Staphylococcus aureus* se están volviendo más comunes cada día y la tasa de mortalidad está aumentando.

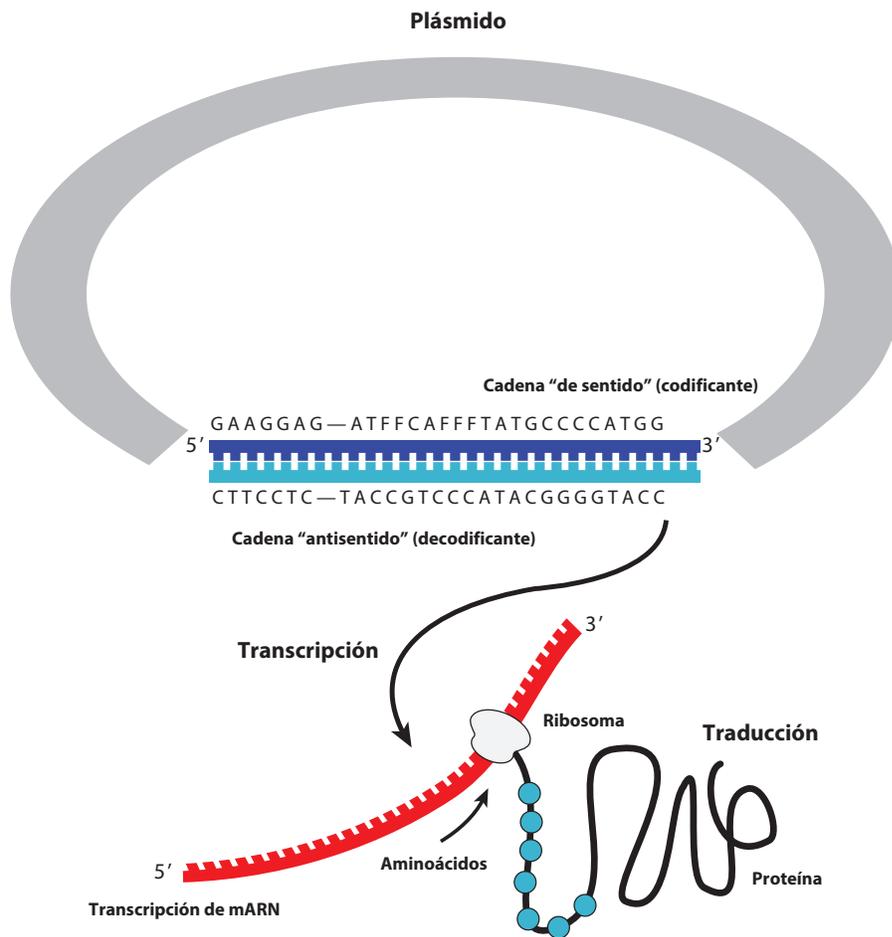
Y, el problema de las bacterias resistentes no se limita a los estafilococos. La neumonía farmacorresistente y la tuberculosis multirresistente también se han convertido en amenazas cada vez más peligrosas. Para evitar el aumento de estos "superbacterias", la industria de la biotecnología tendrá que desarrollar tratamientos nuevos e innovadores.

DEL ADN PLASMÍDICO A LA PROTEÍNA

Una vez que un plásmido recombinante ha entrado en la célula bacteriana, la ADN polimerasa inicia la replicación en el punto *ori*, y el plásmido se replica utilizando las enzimas de replicación del ADN bacteriano. Estas copias múltiples de plásmidos ahora pueden producir la proteína de interés, como la insulina o la hormona de crecimiento humana, en cantidad. En este proceso, la información codificada en el ADN humano se transfiere de ADN a la proteína, utilizando la maquinaria de transcripción y traducción de la célula (vea la **Figura 5A.2**). La proteína entonces altera los rasgos observables del organismo.

La ingeniería genética solo es posible porque los genes de diferentes organismos pueden expresarse en 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 sabrá, las proteínas están formadas por subunidades más pequeñas llamadas **aminoácidos**, y por una secuencia de tres nucleótidos en el código de ADN para un solo aminoácido. Estas secuencias de tres nucleótidos se llaman **codones**. Por ejemplo, el codón TTG codifica para el aminoácido triptófano, y el codón AAG codifica para el aminoácido lisina. En muchos casos, más de un codón puede codificar el mismo aminoácido. Por ejemplo, AAA es también un codón para lisina. Además, existen codones informativos, como el **codón de inicio** (ATG) y el **codón de terminación** (TTA), que muestra en qué punto de la secuencia de ADN comienza y termina el código de la proteína.

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





¿SABÍA?

Producción de ADN a partir de ARN

A pesar de que el código de ADN es el mismo en todas las formas de vida, la transcripción y traducción de genes en *eucariotas* y *procariotas* utiliza diferentes enzimas y estructuras. (Las células humanas son eucariotas y las células bacterianas son procariotas). Una diferencia importante entre estos dos tipos de células es que los genes en los eucariotas contienen secuencias no codificadas llamadas *intrones*. La ARN polimerasa transcribe el gen, produciendo un gran ARN mensajero precursor que contiene ambos intrones y *exones*, que son las secuencias codificadoras. El ARN precursor es entonces *empalmado*, lo que elimina los intrones y une a los exones en el ARN mensajero maduro.

Los procariotas no pueden realizar el corte de los intrones. Para resolver este problema, los científicos usan una enzima, *la transcriptasa inversa* (que puede copiar el ARN en el ADN) para producir ADN complementario (ADNc) a partir del ARN mensajero para una proteína en particular. El ADNc, que solo tiene las secuencias de exones, se inserta en el vector plasmídico. Los genes humanos clonados utilizados para hacer proteínas terapéuticas humanas se preparan de esta manera.

LABORATORIO 5A: TRANSFORMACIÓN BACTERIANA CON EL PLÁSMIDO pARA-R

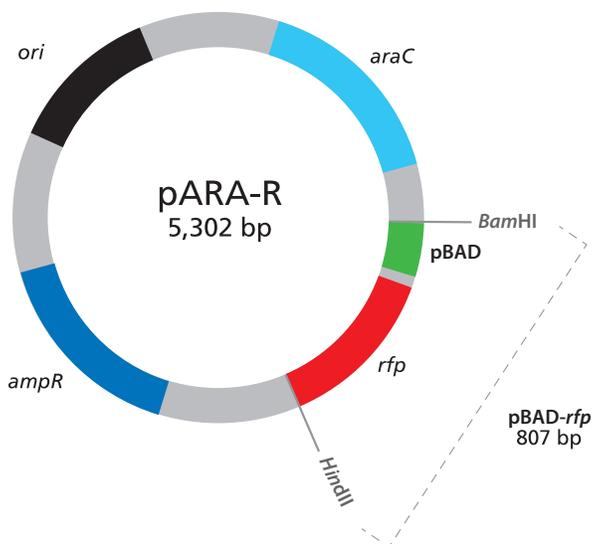
Hasta ahora, en su búsqueda para clonar un gen, se ha preparado para verificar el plásmido realizando un resumen de restricción (Laboratorio 2A), luego confirmó la identidad del plásmido proporcionado mediante electroforesis en gel (Laboratorio 4A). En este laboratorio realizará otro paso del proceso de clonación de genes: transformación bacteriana de *E. coli* con el plásmido proporcionado. En la industria biofarmacéutica, este proceso se usaría para crear la proteína terapéutica humana. Dividirá *bacterias de E. coli* que se han tratado previamente con cloruro de calcio en dos grupos: un grupo de control al que no se agregará ningún plásmido y un grupo de tratamiento al que agregará el plásmido pARA-R. Después de aplicar un choque térmico a ambos grupos de células, las cultivará bajo diferentes condiciones. Todas las bacterias se cultivarán en tres *placas de agar* (Placas Petri que contienen agar mezclado con un *medio* o fuente de alimento llamada *Caldo Luria* [LB] que sustenta el crecimiento bacteriano). Una placa solo contendrá agar LB, una segunda tendrá el antibiótico ampicilina (amp) agregado al LB, y una tercera incluirá LB, ampicilina y azúcar arabinosa (ara) para activar la transcripción de la proteína de interés (RFP).

Al examinar el crecimiento de bacterias en estas condiciones, puede verificar que su procedimiento de transformación funcionó, y puede identificar las bacterias transformadas con el plásmido pARA-R. ¿Cómo sabrá si tiene éxito? Las bacterias tendrán un rasgo nuevo y altamente visible: ¡ahora producirán RFP, lo que hará que las células se vean de color rojo o rosa brillante! Si estuviera elaborando una proteína terapéutica humana, las bacterias producirían esa proteína, que sería invisible. Sin embargo, los productos creados por las bacterias se analizarían para garantizar que contengan la proteína deseada.



El plásmido pARA-R, que revisó en el Capítulo 2A, se muestra de nuevo en la Figura 5A.3.

Figura 5A.3: Plásmido pARA-R



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

Sus roles son los siguientes:

- *araC*: El gen *araC* codifica para una proteína activadora, que activa el promotor en presencia de arabinosa, un azúcar simple. (Un activador es una proteína que regula la transcripción de un gen al unirse a una secuencia cerca del promotor, lo que permite que la ARN polimerasa se una al promotor e inicie la transcripción del gen. Las proteínas activadoras se utilizan en algunos plásmidos recombinantes para controlar la producción de la proteína de interés).
- pBAD: pBAD es un promotor.
- *rfp*: los genes *rfp* codifican para la expresión de la proteína fluorescente roja.
- *ampR*: los *ampR* El gen confiere resistencia al antibiótico ampicilina.

Si hay presencia de arabinosa (un azúcar), la proteína activadora de *araC* activa al promotor. La ARN polimerasa se une al promotor y comienza la transcripción del gen *rfp*. Cuando el gen *rfp* se expresa, las bacterias se vuelven de color rosa brillante. El gen *ampR* es un marcador seleccionable y confiere resistencia al antibiótico ampicilina; solo las bacterias que portan este gen sobrevivirán a un antibiótico. Solo las bacterias que contienen el gen de resistencia a los antibióticos, además de los genes *araC*, pBAD y el *rfp*, sobrevivirán y mostrarán la coloración rosa brillante.

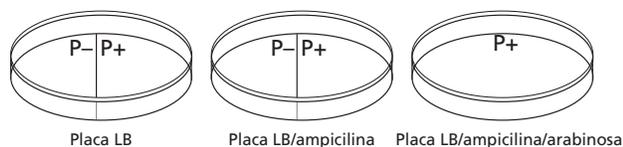
HOJAS INFORMATIVAS

- Predicciones sobre el crecimiento bacteriano (RM 5)

ANTES DEL LABORATORIO

Discuta lo siguiente con su grupo y prepárese para compartir sus ideas con la clase.

1. La ampicilina es un antibiótico que destruye las células bacterianas al interrumpir la formación de las paredes celulares. Sin embargo, el plásmido pARA-R tiene el gen de resistencia a la ampicilina, que produce una proteína que descompone a la ampicilina. ¿Cuál es el propósito de cultivar bacterias que se han transformado en presencia de la ampicilina?
2. ¿Qué sucederá cuando las células bacterianas que contienen el plásmido pARA-R no reciban arabinosa?
3. En el laboratorio, agregará muestras del grupo de control P- y del grupo de tratamiento P+ a las placas que contienen varias combinaciones de caldo Luria (LB), ampicilina y el azúcar arabinosa. Las placas se ordenarán de la siguiente manera:



usando la clave de **Predicciones de crecimiento bacteriano (RM 5)**, muestre sus predicciones del crecimiento que esperaría para cada combinación.

A continuación, complete la **Tabla 1** y **Tabla 2** en la hoja informativa describiendo las conclusiones que pueden extraerse si el crecimiento previsto se produce o no.

4. Lea la sección *Métodos* en las páginas C-49 a C-53 y describa brevemente los pasos, utilizando palabras y un diagrama de flujo.

SEGURIDAD: Se deben seguir todas las precauciones de seguridad adecuadas y usar la vestimenta requerida para un laboratorio de ciencias. Consulte las instrucciones de su profesor.



SEGURIDAD: Tenga cuidado al manipular bacterias de *E. coli* y utilice una **técnica aséptica**.

La técnica aséptica es un conjunto de procedimientos que garantizan la protección tanto del laboratorista como de la muestra bacteriana, lo cual es necesario para que el experimento sea exitoso. De manera específica:

- No toque nada que haya estado o esté en contacto con bacterias de *E. coli*. Los estudiantes que manejan equipos que tienen contacto con bacterias deben usar guantes.
- Trate de evitar derrames o la contaminación de las superficies con cualquier cosa que haya estado en contacto con bacterias de *E. coli*. Informe de inmediato a su profesor si ocurre un derrame o contaminación.
- Cuando haya terminado de usar los tubos de microcentrífuga, las puntas de pipeta y los esparcidores de células, colóquelos inmediatamente en la bolsa de residuos con riesgo biológico o en el recipiente de residuos, según las indicaciones de su profesor.
- Cuando se le indique, coloque sus placas Petri en la bolsa de residuos con riesgo biológico.
- Lávese bien las manos con jabón después de terminar el laboratorio.

MATERIALES

Reactivos

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

NOTA: El tubo CC debe mantenerse en hielo en todo momento.

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

Equipo y suministros

- Una taza de espuma de poliestireno con hielo picado

NOTA: Llene una taza con un poco de hielo picado del recipiente que tiene los tubos CC antes de tomar un tubo CC. Deberá mantener el tubo CC en hielo en todo momento.

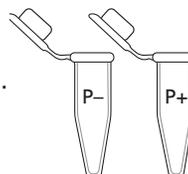
- 2 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Marcador permanente
- Guantes descartables
- Micropipeta P-20
- Micropipeta P-200
- Caja de puntas para puntas de pipetas desechables
- Paquete de esparcidores de células (se compartirán entre los grupos)
- Baño maría a 42 °C con gradilla flotante para tubos de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

MÉTODOS

1. Revise su gradilla para asegurarse de que tiene todos los reactivos que están en la lista.
2. Obtenga un tubo CC del recipiente lleno de hielo y colóquelo en una taza de poliestireno con hielo.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Las células competentes en este laboratorio deben mantenerse frías; asegúrese de tomar los tubos de microcentrifuga por el borde superior para evitar calentar las células con las manos.

3. Etiquete dos tubos de microcentrifuga limpios con "P-" y "P+".
4. Coloque los tubos P- y P+ en la taza de poliestireno con hielo con el tubo CC.



TÉCNICA DE LABORATORIO: la transformación bacteriana requiere técnicas estériles. Es esencial que estas instrucciones se sigan al pie de la letra.

5. Con la micropipeta grande P-200, agregue las células competentes del tubo CC a los tubos P- y P+:
 - a. Fije la micropipeta P-200 a 50 μ l.
 - b. Con mucho cuidado, vuelva a suspender las células bacterianas en el tubo CC bombeando suavemente la pipeta dos veces en la solución.
 - c. Agregue 50 μ l de CC a cada uno de los tubos refrigerados vacíos (P- y P+), sosteniendo cada tubo por el borde para mantenerlo frío, y vuelva a colocar cada tubo rápidamente en el hielo.

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

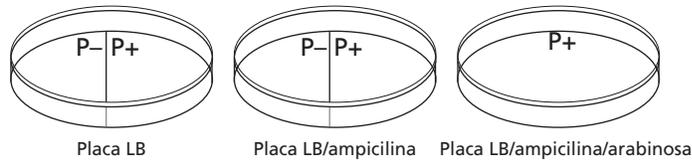
6. Con una punta de pipeta nueva y la pipeta P-20, agregue RP al tubo con la etiqueta "P+":
 - a. Fije la micropipeta P-20 a 10.0 μ l.
 - b. Sostenga el tubo P+ enfriado por el borde superior y agregue 10.0 μ l de RP. Mezcle las soluciones bombeando la pipeta dos veces en los líquidos, y vuelva a colocar el tubo P+ en el hielo.
7. Mantenga los tubos P- y P+ en hielo durante 15 minutos.

NOTA: Durante un intervalo de 15 minutos, comparta y discuta sus respuestas a la pregunta 3 en *Antes del laboratorio*.

8. Mientras las células están en hielo, prepare sus tres placas Petri con agar, una placa de LB, una de LB/amp y una de LB/amp/ara:
 - a. Etiquete la parte inferior de cada placa (la parte que contiene el agar) con su número de grupo y período de clase. Escriba con letras pequeñas y en el borde de la placa.



- b. Con las placas cerradas, dibuje una línea en la parte inferior de la placa LB y la placa LB/amp que divida cada placa por el medio. Etiquete la mitad de cada placa con "P-" y la otra mitad con "P+". Etiquete la placa LB/amp/ara con "P+". Las placas se organizarán de la siguiente manera:



9. Después de la incubación de 15 minutos en hielo, lleve los tubos P- y P+ (en la taza con hielo) a baño maría a 42 °C. Coloque los dos tubos en la gradilla flotante de tubos de microcentrífuga en baño maría durante exactamente 45 segundos.
10. Después del choque térmico de 45 segundos, vuelva a colocar los tubos en hielo y déjelos allí durante al menos un minuto. Si la próxima clase no usará los tubos de inmediato, guárdelos en el refrigerador hasta que estén listos para usar.
11. Con la micropipeta grande P-200, agregue LB a los tubos P- y P+:
- Fije la micropipeta P-200 a 150 µl.
 - Agregue 150 µl de LB al tubo P-. Tape el tubo y gírelo suavemente dos o tres veces para mezclar.



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

- Agregue 150 µl de LB al tubo P+. Tape el tubo y gírelo suavemente dos o tres veces para mezclar.
12. Si el tiempo lo permite, deje que las células en los tubos P- y P+ se incuben a temperatura ambiente durante 15 minutos.



DETÉNGASE Y PIENSE:

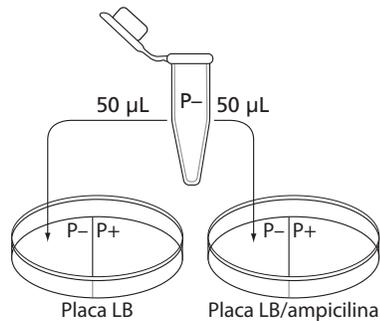
- ¿De qué diferente manera se trató el cultivo de bacterias P+ del cultivo de bacterias P-? (Un *cultivo* es una población aislada de células). ¿Cuál es el propósito del cultivo de bacterias P-?
- ¿Por qué las células necesitan tiempo para recuperarse después del choque térmico?
- ¿Por qué se incuban las células a 37 °C?
- Usó una técnica aséptica en este laboratorio. ¿Por qué esto es importante?

13. Agregue células del tubo P- a sus placas LB y LB/amp:

- a. Fije la micropipeta P-200 a 50 μ l.

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

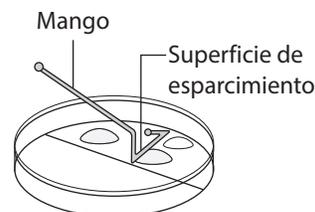
- b. Bombee suavemente la pipeta dos o tres veces en el tubo P- para suspender las células y cargue 50 μ l de las células P-.
- c. Abra la tapa de la placa LB, como una "valva de almeja", y agregue 50 μ l de células del tubo P- a la sección marcada "P-". Cierre la tapa.
- d. Nuevamente, bombee suavemente la pipeta dos o tres veces en el tubo P- para suspender las células y cargue 50 μ l de las células P-.



- e. Abra la tapa de la placa LB/amp, como una valva de almeja, y agregue 50 μ l de células del tubo P- a la sección marcada "P-". Cierre la tapa.

14. Esparza las células del tubo P- en sus placas LB y LB/amp:

- a. Abra el paquete de esparcidores estériles de células en el extremo más cercano al mango del esparcidor. Retire solo un esparcidor y cierre el paquete para mantener la esterilidad de los demás.
- b. Abra la tapa de la placa LB, como una valva de almeja, y extienda las células de manera uniforme por todo el lado P- de la placa moviendo suavemente el esparcidor por la superficie del agar. (Mantenga las células en el lado P- de la placa). Cierre la tapa.
- c. Extienda cuidadosamente las células P- en la placa LB/amp, utilizando el mismo esparcidor y la misma técnica.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Sujete el esparcidor por el mango y no permita que el extremo doblado toque ninguna superficie, ya que esto contaminará el esparcidor. Coloque el esparcidor usado en la bolsa de residuos con riesgo biológico.

15. Con una punta de pipeta nueva, agregue células del tubo P+ a sus placas LB, LB/amp y LB/amp/ara:

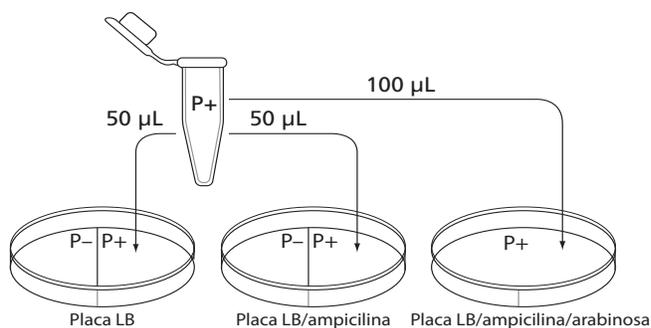
- a. Asegúrese de que la micropipeta P-200 esté en 50 μ l.

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

- b. Bombee suavemente la pipeta dos o tres veces en el tubo P+ para suspender las células y cargue 50 μ l de las células P+.

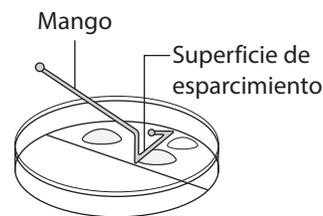


- c. Abra la tapa de la placa LB, como una valva de almeja, y agregue 50.0 μl de células del tubo P+ a la sección marcada "P+". Cierre la tapa.
- d. Nuevamente, bombee suavemente la pipeta dos o tres veces en el tubo P+ para suspender las células y cargue 50 μl de las células P+.
- e. Abra la tapa de la placa LB/amp, como una valva de almeja, y agregue 50 μl de células del tubo P+ a la sección marcada "P+". Cierre la tapa.
- f. Fije la micropipeta P-200 en 100 μl , bombee suavemente la pipeta dos o tres veces en el tubo P+ y cargue 100 μl de las células P+.



- g. Abra la tapa de la placa LB/amp/ara, como una valva de almeja, y agregue 100 μl de células P+ en varias áreas de la superficie, no solo en un punto. Cierre la tapa.
16. Esparza las células del tubo P+ en sus placas LB, LB/amp y LB/amp/ara:

- a. Abra el paquete de esparcidores estériles de células en el extremo más cercano al mango del esparcidor. Retire solo un esparcidor y cierre el paquete para mantener la esterilidad de los demás.
- b. Abra la tapa de la placa LB, como una valva de almeja, y esparza uniformemente las células en el lado P+ de la placa (y solo en este lado) moviendo suavemente el esparcidor a través de la superficie del agar. Cierre la tapa.
- c. Extienda cuidadosamente las células P+ en la placa LB/amp usando el mismo esparcidor y la misma técnica.
- d. Extienda cuidadosamente las células P+ en la placa LB/amp/ara usando el mismo esparcidor. Luego, gire suavemente la placa debajo del esparcidor P+ para que las células se puedan extender por toda la superficie de esta placa. Cierre la tapa.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Sujete el esparcidor por el mango y no permita que el extremo doblado toque ninguna superficie, ya que esto contaminará el esparcidor. Coloque el esparcidor usado en la bolsa de residuos con riesgo biológico.

17. Permita que las tres placas se asienten hacia arriba durante al menos cinco minutos, o hasta que el líquido empape la placa.
18. Use la cinta adhesiva provista para pegar las tres placas y rotule la cinta con su número de grupo y período de clase.



19. Coloque las placas en la incubadora a 37 °C boca abajo para evitar que la condensación gotee sobre los geles.
20. Coloque todos los tubos de microcentrífuga, puntas de pipeta y separadores de células en la bolsa de residuos con riesgo biológico.
21. Incube las placas durante 24 a 36 horas a 37 °C. Si no hay una incubadora disponible, las placas pueden almacenarse a temperatura ambiente por hasta 48 horas.
22. Examine las placas. En su cuaderno, registre la cantidad de crecimiento en cada mitad.
23. Deseche las placas Petri en la bolsa de residuos con riesgo biológico cuando se le indique.

CAPÍTULO 5A PREGUNTAS

1. Mire los resultados de su transformación. ¿Sus resultados reales coinciden con los resultados previstos? Si no es así, ¿qué diferencias ve y cuáles son algunas explicaciones para estas diferencias?
2. ¿Cuántas colonias rojas se presentaron en su placa LB/amp/ara?
3. ¿Por qué aparecieron las colonias rojas solo en la placa LB/amp/ara y no en la placa LB/amp?
4. Los plásmidos recombinantes están diseñados para que puedan replicarse 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 codifica la información en el gen *rfp* expresado como un rasgo? Asegúrese de utilizar lo que ha aprendido previamente sobre la expresión génica y la relación entre ADN, ARN, proteínas y rasgos.
6. ¿Por qué es posible que las bacterias produzcan una proteína humana, como la insulina, o una proteína de anémona de mar, como la RFP?



¿SABÍA?

Sobre la conexión entre los genes y las proteínas

¿Cómo pudieron los científicos demostrar que un gen codifica una proteína? En 1941, George Beadle y Edward Tatum llevaron a cabo un experimento en el que expusieron el moho del pan a la radiación UV, un procedimiento que se sabe que causa **mutaciones** (cambios) en genes. Beadle y Tatum crearon cepas mutantes de moho que habían perdido la capacidad de sintetizar una vitamina necesaria. Al alimentar a los precursores de la vitamina uno a la vez a los mutantes, Beadle y Tatum pudieron determinar que a las cepas mutantes solo les faltaba una enzima que catalizara una reacción.

Beadle y Tatum luego investigaron si un solo gen causó la pérdida de la enzima única por cruces genéticos entre los mutantes y una cepa de tipo silvestre. Después de cultivar la progenie, descubrieron que la mitad tenía el mismo defecto que la cepa mutante original y la otra mitad no, lo que confirmó que se había mutado un solo gen. A partir de estos resultados, Beadle y Tatum propusieron que los genes fueron responsables de codificar las proteínas de un organismo y que un cambio en un gen podría dar como resultado la producción de 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.

Comprender la conexión entre genes y proteínas es fundamental para el avance de la biotecnología. Si los investigadores pueden comprender mejor qué genes afectan las proteínas involucradas en una enfermedad en particular, pueden trabajar de manera más efectiva para combatir esa enfermedad.

GLOSARIO DEL CAPÍTULO 5A

Placa de agar: es una placa de Petri que contiene agar mezclado con una fuente de alimento o medio llamado Caldo Luria (LB) que favorece el crecimiento bacteriano.

Aminoácidos: es el componente básico de las proteínas. Cada uno de los 20 aminoácidos es una sustancia orgánica con dos grupos unidos a él: un grupo amino (NH_2) y un grupo de ácido carboxílico (COOH).

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

Conjugación bacteriana: es un proceso por el cual dos células bacterianas se unen y transfieren material genético entre sí.

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

Competente: es una célula que tiene la capacidad de transformarse genéticamente al captar el ADN del medioambiente.

Cultivo: es una población aislada de células que han crecido en un medio nutriente especialmente preparado.

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

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

Expresado: es cuando la información codificada en un gen se ha convertido primero en ARN mensajero y luego en una proteína. Este proceso se llama expresión.

Choque térmico: es un aumento repentino de la temperatura.

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

Caldo Luria: es un medio nutricionalmente rico que favorece el crecimiento bacteriano.

Medio: es una solución, como el caldo Luria, que contiene sustancias que favorecen el crecimiento de microorganismos. El medio puede solidificarse mediante la adición de agar.

Mutación: es el cambio o daño que ocurre en una sección del ADN que altera los productos o procesos asociados con esa sección.

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

Expresión de proteínas: se refiere a cómo se sintetizan, modifican y regulan las proteínas en los organismos vivos.

Transcriptasa inversa: es una enzima que cataliza la formación de ADN a partir de una plantilla de ARN en la transcripción inversa.

Unión: es la modificación del ARN mensajero para la traducción eliminando intrones y uniendo exones.

Codón de inicio: es el primer codón de ARNm traducido por un ribosoma; típicamente AUG o GUG.

Codón de terminación: es un triplete de nucleótidos dentro del ARNm que señala la terminación de la traducción.

Transformación: es un proceso que coloca ADN extraño, como un plásmido, en una célula.

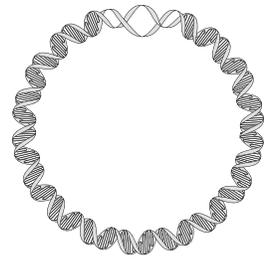
Traducción: es el proceso por el cual la información codificada en el ARN mensajero se decodifica y transforma en proteína.



AMGEN[®] Biotech Experience

Descubrimiento científico para el aula

AMGEN[®] Foundation



CAPÍTULO 5B

CONSEGUIR PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN BACTERIAS

INTRODUCCIÓN

En el Capítulo 1 pudo trabajar con dos herramientas físicas y técnicas de ingeniería genética que se utilizan 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, biomoléculas que se encuentran en muchas bacterias. Estas herramientas permiten a los científicos crear un **vector**, un vehículo para transportar secuencias de ADN de un organismo a otro. Este vector es un **plásmido recombinante**, una pequeña pieza de ADN circular que contiene un gen. Una vez que el plásmido ha sido captado por *E. coli* (una bacteria común que se encuentra en el intestino de los animales de sangre caliente) a través de un proceso llamado **transformación**, el plásmido puede **replicar** (ser copiado) y su gen puede **expresarse** (la proteína se puede hacer) usando la maquinaria de síntesis de proteínas de la célula bacteriana. En este capítulo, hará un modelo de la formación de un plásmido recombinante y luego practicará las habilidades de laboratorio que aprendió en el Capítulo 1 a medida que realiza la transformación bacteriana de *E. coli* que utilizan un plásmido recombinante que contiene el gen *rfp*. Si estuviera elaborando una proteína terapéutica humana, las bacterias que transforma contendría el gen humano y sería capaz de producir la proteína terapéutica humana deseada.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 5B

Al final de este capítulo, podrá hacer lo siguiente:

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

¿QUÉ ES LO QUE YA SABE?

Discuta las siguientes preguntas con su compañero y escriba sus ideas en su cuaderno. Está preparado para discutir sus respuestas con la clase. No se preocupe si no sabe todas las respuestas. Discutir estas preguntas lo ayudará a pensar en lo que ya sabe sobre el ADN, los plásmidos, las enzimas de restricción, la captación de plásmidos y la expresión génica en bacterias.

1. Todos los organismos vivos contienen ADN. ¿De qué manera es igual el ADN de diferentes organismos y de qué manera varía?
2. Los científicos utilizan dos herramientas biológicas para diseñar organismos para producir nuevas proteínas: los plásmidos y las enzimas de restricción. ¿Cómo podría cada uno de estos ser útil para crear una nueva proteína?
3. ¿Cuál es la relación entre genes, proteínas y rasgos (o características observables)?
4. ¿Qué tienen en común las bacterias y los seres humanos que hacen posible que un gen humano se exprese en bacterias?

SU DESAFÍO

Ahora que ha explorado algunas de las herramientas básicas utilizadas en biotecnología, tendrá la oportunidad de realizar algunos de los mismos procedimientos que los científicos utilizan para producir proteínas terapéuticas humanas. Pero en lugar de producir proteínas humanas, diseñará *E. coli*, una bacteria común que se encuentra en el intestino de animales de sangre caliente, para producir una proteína de anémona de mar llamada **proteína fluorescente roja** (RFP), que está dirigida por un gen llamado *rfp*. Una anémona de mar es un animal de cuerpo blando relacionado con el coral y la medusa. En el laboratorio, le dará a *E. coli* una nueva proteína que le dará un rasgo que antes no tenía: la capacidad de brillar. ¿Cómo sabrá si tiene éxito? Las bacterias que cree tendrán un rasgo nuevo y altamente visible: ¡ahora producirán RFP, lo que hará que las células aparezcan de color rojo o rosa brillante!

NOTA: La cantidad de pasos variará de acuerdo al tiempo que tenga disponible su clase.



¿SABÍA?

La proteína fluorescente roja en las anémonas de mar

La RFP se deriva de una proteína que se encuentra en las anémonas de mar (vea la **Figura 5B.1**). Aunque las anémonas de mar son sedentarias y permanecen unidas a las rocas, también son animales depredadores, que usan sus tentáculos punzantes para atrapar a sus presas. 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 de mar tengan fluorescencia? Nuestra mejor suposición es que las proteínas fluorescentes ayudan a las anémonas de mar a sobrevivir, pero el papel que desempeñan estas proteínas aún no se conoce bien.

Las moléculas fluorescentes pueden servir como un bloqueador solar, convirtiendo la luz UV dañina en una luz que es menos perjudicial para los tejidos de la anémona.



Otra posibilidad es que, si bien los humanos no pueden detectar la fluorescencia en la luz del sol, algunos animales pueden hacerlo, haciendo que las presas se sientan atraídas por el brillo.

Figura 5B.1: La anémona de mar *Discosoma* sp.

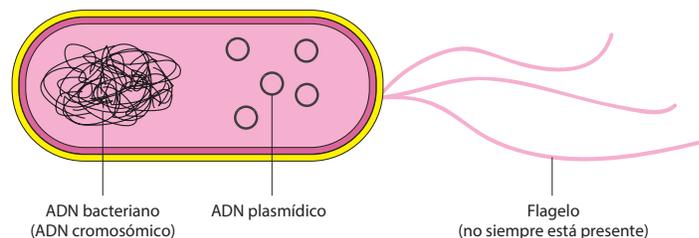
PLÁSMIDOS Y ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

El descubrimiento de los plásmidos y las enzimas de restricción en bacterias es un ejemplo clásico de cómo los descubrimientos de la investigación básica pueden revolucionar un campo. Con el descubrimiento de estas biomoléculas, los científicos lograron avances importantes en la comprensión de los procesos fundamentales de la vida y en el desarrollo de productos que mejoran la vida.

PLÁSMIDOS

Muchos tipos diferentes de bacterias portan dos formas de ADN: (1) un cromosoma compuesto por una molécula de ADN grande que contiene toda la información que necesita el organismo para sobrevivir y reproducirse, y (2) plásmidos, pequeñas moléculas de ADN circular, que varían en tamaño de 1,000 a 200,000 *pares de bases* (dos bases nitrogenadas unidas para conectar cadenas complementarias de ADN) que están presentes en múltiples copias separadas del ADN cromosómico (vea la **Figura 5B.2**). Algunas bacterias portan hasta 500 plásmidos en cada célula.

Figura 5B.2: ADN en células bacterianas



Cuatro características de los plásmidos los convierten en vectores ideales: (1) la capacidad de replicarse; (2) la capacidad de iniciar la transcripción; (3) un gen o genes que codifican la resistencia a los *antibióticos*, una clase de compuestos que destruyen o inhiben el crecimiento de microorganismos; y (4) la capacidad de transmitirse entre bacterias. Estas características se describen en detalle a continuación:

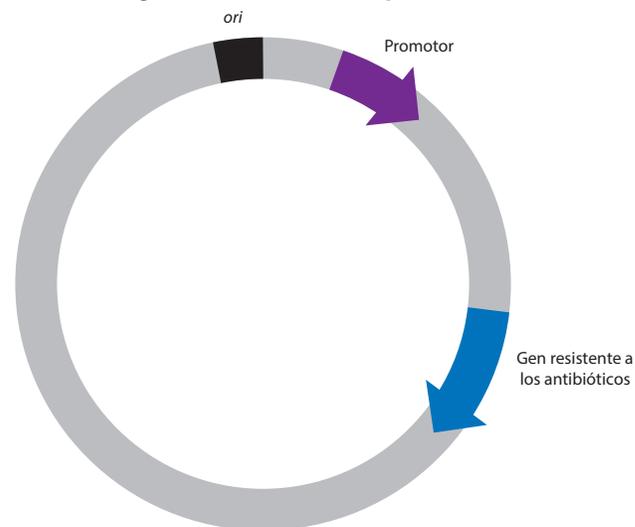
1. Los plásmidos tienen la capacidad de replicarse, es decir, de hacer copias de sí mismos independientemente del cromosoma bacteriano. Para hacer esto, los plásmidos incluyen una secuencia específica a la que las enzimas de síntesis de ADN de la célula huésped se unen e inician la *replicación del ADN* (un proceso biológico que ocurre en todos los organismos vivos para hacer copias de su ADN). Esta secuencia se llama el punto de *origen de la replicación (ori)*.
2. Los plásmidos tienen la capacidad de iniciar *transcripción*, el proceso por el cual la información codificada en el ADN se transfiere al *ARN mensajero (ARNm)*. El ARNm es una molécula de ARN transcrita desde el ADN de un gen y utilizada como plantilla para la síntesis de proteínas, utilizando la *ARN polimerasa* (una proteína que produce ARNm a partir de ADN), de la célula huésped. El *ARN* o *ácido ribonucleico*, es una biomolécula monocatenaria formada por una base nitrogenada, un azúcar ribosa y un fosfato; desempeña un papel fundamental en la síntesis de proteínas, al transmitir información

genética desde el ADN al ribosoma donde se elaboran las proteínas. Esta capacidad requiere otra secuencia, llamada **promotor** (una secuencia de ADN específica que se une a la ARN polimerasa e inicia la transcripción del gen). El promotor se une a la ARN polimerasa, y aquí es donde se inicia la transcripción. Todos los genes tienen promotores ubicados junto a ellos en el ADN. Para que los genes de proteínas terapéuticas humanas se expresen en bacterias, deben insertarse en el plásmido junto al promotor.

3. Los plásmidos poseen un gen o genes que codifican la **resistencia a los antibióticos** (el estado en el que las bacterias ya no son sensibles a un antibiótico y continuarán creciendo y dividiéndose en presencia de ese antibiótico). Estos genes codifican proteínas que inhiben la acción de los antibióticos secretados por microorganismos, lo que puede conferir una ventaja selectiva en la naturaleza a las bacterias que contienen plásmidos en una población microbiana donde las bacterias compiten por la supervivencia.
4. Los plásmidos se pueden pasar de una cepa bacteriana a otra en un proceso llamado **conjugación bacteriana**, que permite a las bacterias compartir e intercambiar información genética. Cuando se inserta un plásmido con un gen para la resistencia a un antibiótico a bacterias que carecen de ese plásmido, las bacterias se volverán resistentes a ese antibiótico específico. En la naturaleza, la conjugación se produce con una muy baja efectividad, es decir, solo un pequeño porcentaje de bacterias de una población puede tomar el ADN plasmídico en cualquier momento.

La **Figura 5B.3** ilustra los componentes básicos de un plásmido.

Figura 5B.3: Un vector plasmídico



CONSIDERE: Utilice lo que sabe sobre la selección natural y la evolución para describir cómo los plásmidos pueden conferir una ventaja selectiva a sus bacterias huésped.

Al desarrollar técnicas para la clonación de genes en bacterias, los científicos encontraron una herramienta poderosa en los plásmidos: un vector que puede ser recibido por las bacterias, que se replica en bacterias para producir muchas copias de sí mismo, que tiene un promotor para la transcripción de un gen insertado, y que porta un gen para la resistencia a los antibióticos. Aprovechará estas características de los plásmidos cuando transfiera su plásmido recombinante a las bacterias.

Cuando los científicos reconocieron el poder de los plásmidos como un vector potencial, el siguiente desafío era determinar cómo incorporar un gen de interés extraño, como el gen de la insulina, en el ADN plasmídico. Los plásmidos con los que trabajará en este laboratorio contienen los genes para la resistencia a los antibióticos ampicilina y kanamicina. Estos genes producen proteínas que inactivan el antibiótico específico al modificar químicamente su estructura.

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, fue resistente a la infección por un **bacteriófago** (un virus que infecta las bacterias al inyectar su ADN en la célula y controlar los procesos moleculares de la célula huésped para producir más bacteriófagos). La investigación de este “sistema inmune” primitivo condujo al descubrimiento de enzimas de restricción, proteínas que restringen el crecimiento de bacteriófagos al reconocer y destruir el ADN del fago sin dañar el ADN del huésped (bacteriano). Estudios posteriores demostraron que las enzimas de restricción de diferentes cepas de bacterias cortan el ADN en secuencias específicas. Estas secuencias se llaman **sítios de restricción**.

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



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 asimétricamente las cadenas de ADN, dejando proyecciones de secuencias de una sola hebra en el sitio del corte. Por ejemplo, un corte (o **digestión**) con *EcoRI* dejará una proyección AATT (o “**extremo cohesivo**”) en una cadena y un extremo cohesivo TTAA en la otra cadena.

Tabla 5B.1: Enzimas de restricción utilizadas en este laboratorio

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

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



CONSIDERE:

- ¿Cuál es la secuencia del extremo cohesivo que se produce cuando se corta el ADN con *Bam*HI? ¿Con *Hind*III?
- Los científicos pueden modificar los plásmidos para tener un solo sitio de enzimas de restricción. Imagine que tiene un plásmido con un solo sitio *Eco*RI. Dibuje la estructura del plásmido después de que se haya cortado con la enzima y muestre las secuencias de nucleótidos que quedan en el sitio del corte. Si quisiera insertar un gen de una planta en este sitio, ¿qué enzima usaría usted para cortar el ADN de la planta? Explique su respuesta.

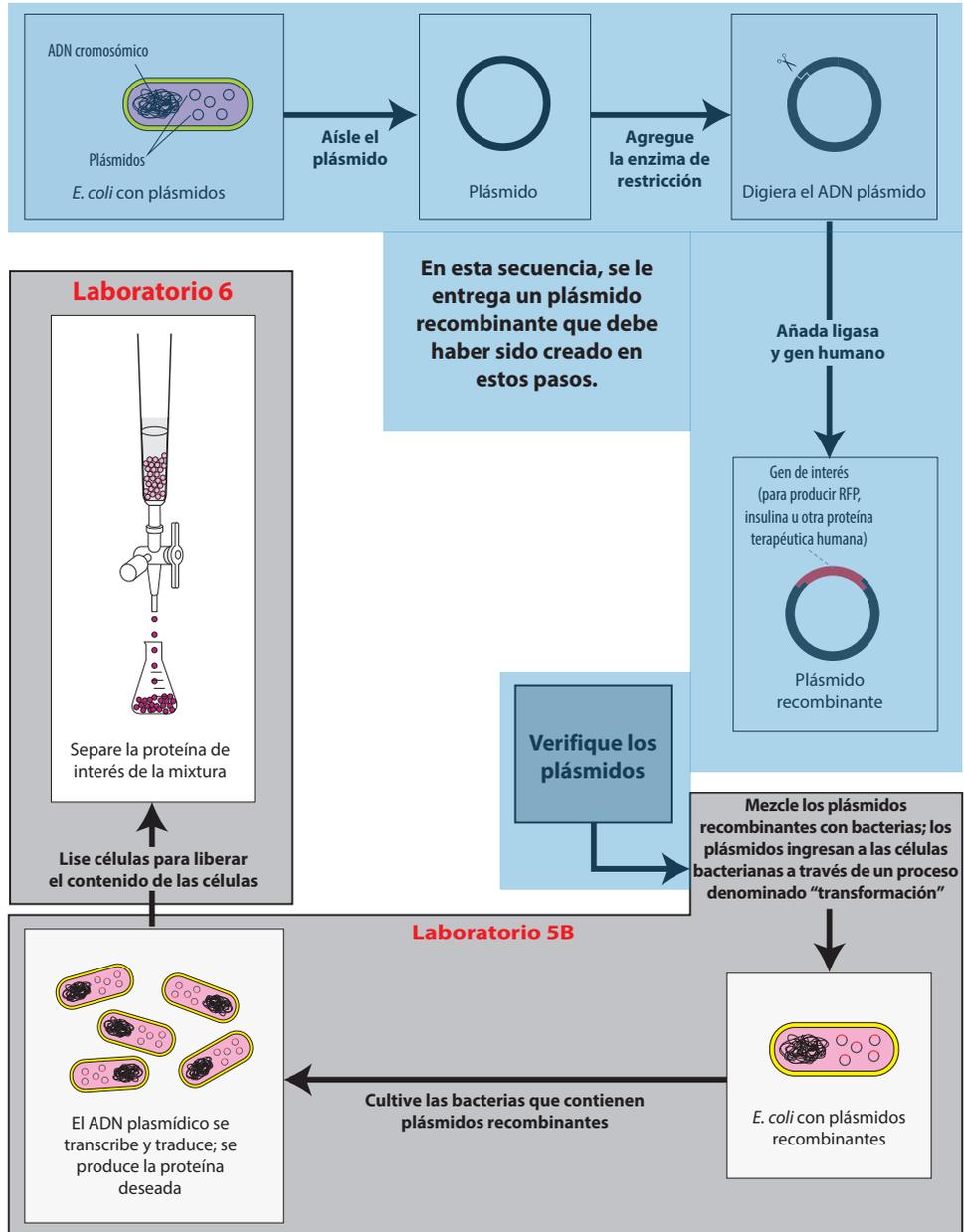
PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS HUMANAS EN LAS BACTERIAS

¿Conoces a alguien que tenga *diabetes* (una enfermedad que ocurre cuando la glucosa [azúcar] en la sangre de una persona es demasiado alta), *hemofilia* (que ocurre cuando se reduce la capacidad de coagulación de la sangre) y *deficiencia de crecimiento* (una enfermedad en la que una persona no crece adecuadamente)? Estas tres enfermedades se producen como resultado de la incapacidad del cuerpo de una persona para producir ciertas proteínas. En la diabetes, el cuerpo es incapaz de fabricar o producir *insulina* (una hormona producida en el páncreas que controla la cantidad de glucosa en la sangre). Las personas con hemofilia no pueden producir un *factor de coagulación de la sangre* (una variedad de proteínas en el plasma sanguíneo que participan en el proceso de coagulación). La deficiencia de crecimiento es el resultado de la incapacidad para producir la *hormona del crecimiento humano* (una hormona secretada por la glándula pituitaria que estimula el crecimiento). Un paciente con cualquiera de estas enfermedades debe ser tratado con la proteína faltante.

Antes del desarrollo de las tecnologías del ADN recombinante, las proteínas terapéuticas humanas se extrajeron de animales u otros seres humanos. La insulina fue aislada originalmente de los páncreas de cerdos y vacas. La hormona del crecimiento humano se extrajo de las glándulas pituitarias de cadáveres humanos. Estos métodos fueron efectivos, pero el uso de proteínas producidas por animales a veces dio lugar a reacciones adversas y fue difícil elaborar cantidades lo suficientemente grandes. Ahora, los científicos han descubierto cómo agregar ADN humano al ADN bacteriano, permitiendo que las bacterias produzcan una proteína humana.

En el proceso de la ingeniería genética, se agrega un gen humano a un plásmido que se ha cortado utilizando enzimas de restricción. El plásmido es captado por células bacterianas en un proceso llamado *transformación bacteriana*, y las células producen la proteína humana que está codificada por el gen humano junto con sus propias proteínas (vea la **Figura 5B.4**). Durante este proceso, los científicos usan una combinación de herramientas, algunas fabricadas por el hombre y otras biológicas. En este laboratorio, explorará y usará algunas de estas herramientas para que pueda comprender de primera mano cómo funcionan.

Figura 5B.4: Elaboración de una proteína terapéutica humana en bacterias





¿SABÍA?

El aumento de las bacterias resistentes a los antibióticos

Los antibióticos y fármacos similares se han utilizado durante los últimos 70 años para tratar a pacientes que padecen enfermedades infecciosas. Cuando se recetan y se toman correctamente, los antibióticos son sumamente valiosos para el cuidado del paciente. Sin embargo, estos fármacos se han usado tan ampliamente y durante tanto tiempo que los organismos infecciosos para los que los antibióticos están diseñados para destruir se han adaptado a ellos, haciendo que los fármacos sean menos eficaces. La resistencia a los antibióticos se produce cuando algunas bacterias en una población pueden sobrevivir cuando se exponen a uno o más antibióticos. Estas especies que se han vuelto resistentes causan infecciones que no pueden tratarse con los antibióticos habituales en las dosis y concentraciones habituales. Algunos han desarrollado resistencia a múltiples antibióticos y se denominan bacterias resistentes a múltiples fármacos o “superbacterias”.

La resistencia a los antibióticos es un fenómeno grave en crecimiento y se ha convertido en una de las principales preocupaciones de la salud pública del siglo XXI. Cuando los organismos resistentes a los fármacos adquieren resistencia a los



antibióticos de primera línea (los seleccionados en función de varias ventajas, como la seguridad, la disponibilidad y el costo), se requiere el uso de agentes de segunda línea. Estos son generalmente de espectro más amplio, pueden ser menos beneficiosos en relación con los riesgos asociados y pueden ser más costosos o menos accesibles.

CLONE ESE GEN

Ahora ya conoce dos herramientas biológicas para la clonación de un gen: los plásmidos y las enzimas de restricción.

1. Los plásmidos tienen varias características importantes:
 - Una secuencia para el inicio de la replicación del ADN, llamada punto *ori*, que permite que el plásmido se replique en las bacterias utilizando las enzimas de síntesis de ADN del huésped
 - Un promotor para iniciar la transcripción del gen insertado
 - Un gen que codifica una proteína para la resistencia a los antibióticos, que permite la identificación de bacterias que han tomado el plásmido
2. Las enzimas de restricción digieren tanto el plásmido como el ADN humano que contiene el gen de interés (como la insulina) que se va a clonar.

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

- Cortar el plásmido en un sitio (o sitios) que permita la inserción del nuevo gen.
- Cortar el plásmido en un sitio apropiado para garantizar que no se interrumpen genes o secuencias importantes, incluido el punto *ori*, el promotor, y al menos uno de los genes que codifican la resistencia a los antibióticos.
- Cortar el plásmido cerca del promotor para que pueda expresarse el gen insertado.
- Cortar el ADN humano lo más cerca posible de ambos extremos del gen de interés para que pueda insertarse en el sitio apropiado en el ADN plasmídico, sin cortar dentro del gen.

DETÉNGASE Y PIENSE: ¿Por qué es importante usar la misma enzima o enzimas para cortar tanto el plásmido como el gen de interés del ADN humano?



En esta actividad, hará un modelo en papel de un plásmido recombinante que contiene un gen de insulina. Tiene tres tareas:

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

HOJAS INFORMATIVAS

- Diagrama de plásmidos (RM 2)
- Secuencia de ADN humano (RM 3)

PROCEDIMIENTO

1. Sobre el **Diagrama de plásmidos (RM 2)**:
 - Use tijeras para cortar el plásmido y pegue los extremos para hacer un modelo en papel del plásmido.
 - Localice las posiciones del punto *ori*, el promotor, y los genes para la resistencia a los antibióticos.
 - Localice las posiciones de cada sitio de restricción de las enzimas de restricción.
2. Elija la enzima de restricción que se debe utilizar para cortar el plásmido. Verifique que la enzima de restricción cumpla con todos los siguientes criterios:
 - Deje el punto *ori*, el promotor, y al menos un gen de resistencia a antibióticos intacto.
 - Corte el plásmido solo una vez.
 - El corte está cerca del promotor.
3. Revise la **Tabla 5B.1** en la página D-7 y use tijeras para cortar el plásmido en el sitio de restricción exactamente como lo haría la enzima de restricción. Escriba las secuencias de los nucleótidos que quedan en cada extremo del plásmido.
4. Sobre la secuencia de **ADN humano (RM 3)**, inspeccione la secuencia del ADN humano y determine dónde cortarían el ADN las tres enzimas de restricción: *Bam*HI, *Eco*RI, y *Hind*III.
5. Determine si la enzima de restricción que eligió en el paso 2 es una buena opción para cortar el gen de la insulina del ADN humano al verificar que cumple con todos los siguientes criterios:
 - No corta dentro del gen de la insulina.
 - Corta muy cerca del principio y final del gen.
 - Permitirá que el gen de la insulina se inserte en el plásmido cortado.
6. Revise la **Tabla 5B.1**, y use tijeras para cortar el ADN humano en el sitio de restricción exactamente como lo haría la enzima de restricción. Escriba las secuencias de los nucleótidos que quedan en cada extremo del gen de la insulina después de que se haya cortado del ADN humano.
7. Use cinta adhesiva para insertar el gen de la insulina en el plásmido cortado. Verifique que los extremos cohesivos se conecten siguiendo la orientación correcta. (En el laboratorio, una tercera herramienta biológica, **ADN ligasa**, se utiliza para conectar permanentemente los extremos cohesivos). Ahora tiene un modelo en papel de un plásmido recombinante que contiene un gen de insulina. Una vez que el plásmido se replica (se copia) a sí mismo, el gen de la insulina también se copia o clona.

PREGUNTAS DE LA ACTIVIDAD

1. ¿Qué enzima de restricción eligió? ¿Por qué la eligió?
2. ¿Dónde insertaría el gen de la insulina y por qué?
3. ¿Qué antibiótico usaría para determinar si se tomó el ADN recombinante?

TRANSFORMACIÓN BACTERIANA CON PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

Como acaba de aprender, un plásmido es un vector ideal para transportar secuencias de ADN de un organismo a otro. Un plásmido puede ser captado por bacterias en las que se replica, y sus genes se expresan utilizando la maquinaria celular bacteriana. Si se insertó un gen de interés en el vector, la bacteria produce el producto codificado por ese gen.

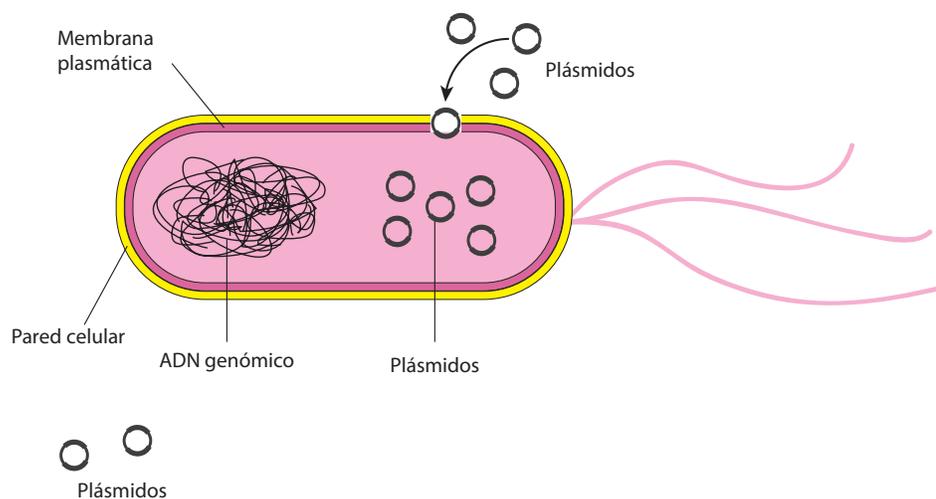


CONSIDERE: Una vez que se ha insertado un gen en un vector, ¿qué cree usted que se requiere para que el producto sea codificado por el gen insertado?

TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

Una vez que se fabrica un plásmido recombinante que contiene un gen de interés, como el gen de la insulina, el plásmido puede ingresar a las células bacterianas a través del proceso de transformación. La **Figura 5B.5** ilustra la transformación.

Figura 5B.5: Transformación bacteriana



La absorción de ADN del ambiente de una célula bacteriana ocurre con una eficacia muy baja en la naturaleza. Las bacterias de *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. Además, la pared celular tiene carga negativa y repele las moléculas de ADN que tienen carga negativa.



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

Para aumentar la eficiencia de la captación de ADN, las bacterias se tratan de dos maneras. Primero, las bacterias de *E. coli* se colocan en una solución que contiene iones de calcio positivos, que neutralizan la carga negativa en las membranas externas de las células, lo que permite que las moléculas de ADN crucen la pared celular e ingresen a la célula. A continuación, las bacterias se someten a un choque térmico, un aumento repentino de la temperatura, lo que hace que la presión afuera de la célula aumente. Esta diferencia de presión permite que el ADN plasmídico ingrese a la célula bacteriana desde el exterior.

A las células tratadas con calcio y calor se les considera **competentes** (capaces) de absorber el ADN de manera más eficiente, pero incluso con este tratamiento, solo 1 de cada 10,000 células bacterianas capta un plásmido en su ambiente. Entonces, ¿cómo pueden identificarse las bacterias que han captado el plásmido recombinante? Recuerde que un componente importante de un plásmido recombinante es un gen para la resistencia a los antibióticos. Si coloca células bacterianas en presencia de antibiótico, solo crecerán aquellas células que tengan el plásmido recombinante.

¿SABÍA?

Una carrera armamentista bacteriana

La captación de plásmidos puede tener graves consecuencias en la medicina. *Staphylococcus aureus* es una bacteria común que con frecuencia causa infecciones en la piel y el tracto respiratorio. Si la infección no se trata o se propaga al torrente sanguíneo, hasta el 30% de estas infecciones son mortales.

Algunas cepas de bacterias intercambian de forma natural los plásmidos, lo que permite una mayor variación genética en una especie que se reproduce asexualmente. Un mecanismo de intercambio es la conjugación bacteriana, en la cual un plásmido se comparte entre dos células bacterianas que entran en contacto entre sí. El otro método es la transformación, donde las bacterias absorben el ADN directamente de su ambiente. En la naturaleza, esto es a menudo causado por células muertas que liberan su contenido al medioambiente.

Tradicionalmente, los médicos han tratado las infecciones por estafilococos con antibióticos como la vancomicina, que interrumpe la formación de paredes celulares bacterianas. Sin embargo, en los últimos años, los médicos han encontrado que estos antibióticos ya no son eficaces para tratar las infecciones por estafilococos. Las cepas nuevas y más agresivas de las bacterias son cada vez más comunes, y los médicos no pueden tratar las infecciones.

Los investigadores creen que algunas bacterias de *Staphylococcus* han adquirido el gen *VanA* al conjugarse con otro tipo de bacterias. Los genes *VanA* infunden resistencia a la vancomicina, y ciertas especies lo llevan dentro de su genoma de forma natural. Las bacterias resultantes resistentes a la vancomicina de *Staphylococcus aureus* se están volviendo más comunes cada día y la tasa de mortalidad está aumentando.

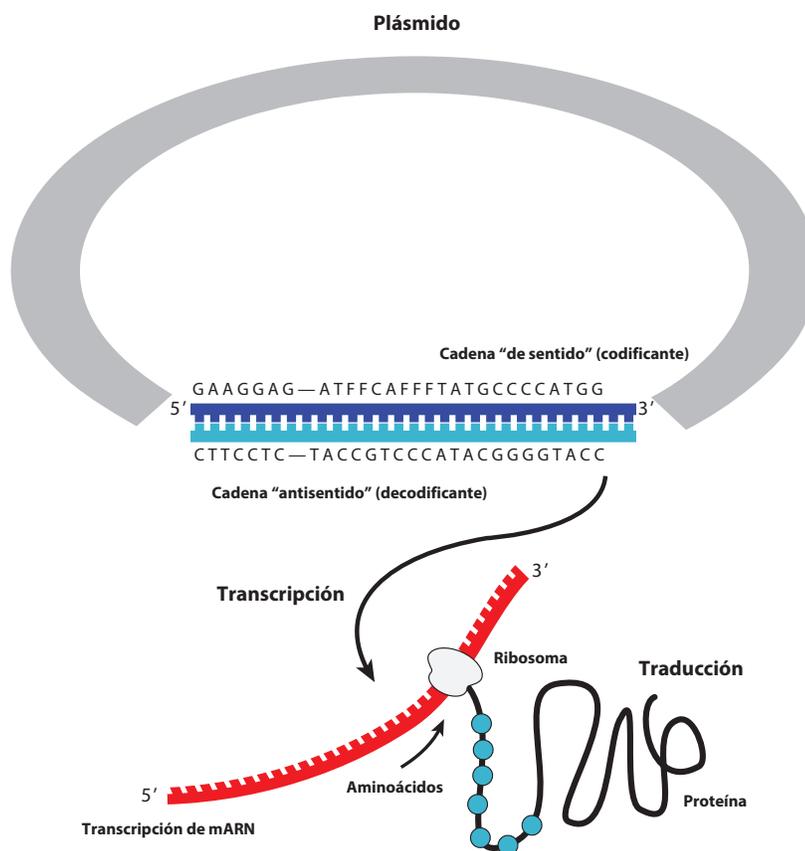


La neumonía farmacorresistente y la tuberculosis multirresistente también se han convertido en amenazas cada vez más peligrosas. Para evitar el aumento de estos “superbacterias”, la industria de la biotecnología tendrá que desarrollar tratamientos nuevos e innovadores.

DEL ADN PLASMÍDICO A LA PROTEÍNA

Una vez que un plásmido recombinante ha entrado a la célula bacteriana, la **ADN polimerasa** (una enzima que se usa para replicar moléculas de ADN) inicia la replicación en el punto *ori*, y el plásmido se replica utilizando las enzimas de replicación del ADN bacteriano. Estas copias múltiples 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 de ADN a la proteína, utilizando la maquinaria de transcripción y **traducción** de la célula (vea la **Figura 5B.6**). La proteína entonces altera los rasgos observables del organismo.

Figura 5B.6: Expresión génica de un plásmido en la célula bacteriana



La ingeniería genética solo es posible porque los genes de diferentes organismos pueden expresarse en 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 sabrá, las proteínas están formadas por subunidades más pequeñas llamadas **aminoácidos**, y por una secuencia de tres nucleótidos en el código de ADN para un solo aminoácido. Estas secuencias de tres nucleótidos se llaman **codones**. Por ejemplo, el codón TTG codifica para el aminoácido triptófano, y el codón AAG codifica para el aminoácido lisina. En muchos casos, más de un codón puede codificar el mismo aminoácido. Por ejemplo, AAA es también un codón para lisina. Además, existen codones informativos, como el **codón de inicio** (ATG) y el **codón de terminación** (TTA), que muestran en qué punto de la secuencia de ADN comienza y termina el código de la proteína.

¿SABÍA?

Producción de ADN a partir de ARN

A pesar de que el código de ADN es el mismo en todas las formas de vida, la transcripción y traducción de genes en **eucariotas** y **procariorias** utiliza diferentes enzimas y estructuras. (Las células humanas son eucariotas y las células bacterianas son procariorias). Una diferencia importante entre estos dos tipos de células es que los genes en los eucariotas contienen secuencias no codificadas llamadas **intrones**. La ARN polimerasa transcribe el gen, produciendo un gran ARN mensajero precursor que contiene ambos intrones y **exones**, que son las secuencias codificadoras. El ARN precursor es entonces **empalmado**, lo que elimina los intrones y une a los exones en el ARN mensajero maduro.

Los procariorias no pueden realizar el corte de los intrones. Para resolver este problema, los científicos usan una enzima, **la transcriptasa inversa** (que puede copiar el ARN en el ADN) para hacer ADN complementario (ADNc) a partir 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 de insulina humana clonado que se utiliza para producir insulina se prepara de esta manera.





LABORATORIO 5B: TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS CON UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE (pARA-R)

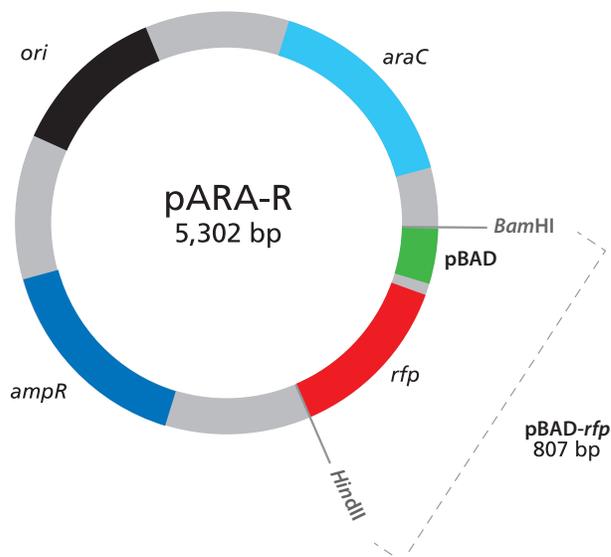
En este laboratorio llevará a cabo un paso importante del proceso de clonación génica, que es transformar las bacterias de *E. coli* con el plásmido pARA-R. El plásmido pARA-R contiene el gen *rfp* que puede producir la proteína fluorescente roja (RFP). Dividirá bacterias de *E. coli* que se trataron previamente con cloruro de calcio en dos grupos: un grupo de control al que no se agregará ningún plásmido y un grupo de tratamiento al que agregará el plásmido pARA-R.

Después de aplicar un choque térmico a ambos grupos de células, las cultivará bajo diferentes condiciones. Todas las bacterias se cultivarán en tres **placas de agar** (Placas Petri que contienen agar mezclado con un **medio** o fuente de alimento llamado **Caldo Luria** [LB] que favorece el crecimiento bacteriano). Una placa solo contendrá agar LB, una segunda tendrá el antibiótico ampicilina (amp) agregado al LB, y una tercera incluirá LB, ampicilina y azúcar **arabinosa** (ara) para activar la transcripción de la proteína de interés (RFP).

Al examinar el crecimiento de bacterias en estas condiciones, puede verificar que su procedimiento funcionó, y puede identificar las bacterias transformadas con el plásmido pARA-R. ¿Cómo sabrá si tiene éxito? Las bacterias tendrán un rasgo nuevo altamente visible: ¡ahora producirán RFP, lo que hará que las células se vean de color rojo o rosa brillante!

El plásmido pARA-R se muestra en la **Figura 5B.7**.

Figura 5B.7: El plásmido pARA-R



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

Sus funciones son las siguientes:

- *araC*: El gen *araC* codifica para una proteína **activadora**, que activa el promotor en presencia de arabinosa, un azúcar simple. (Un activador es una proteína que regula la transcripción de un gen al unirse a una secuencia cerca del promotor, lo que permite que la ARN polimerasa se una al promotor e inicie la transcripción del gen).
- pBAD: pBAD es un promotor.
- *rfp*: los genes *rfp* codifican para la expresión de la proteína fluorescente roja.
- *ampR*: los *ampR* El gen confiere resistencia al antibiótico ampicilina.

Si hay presencia de arabinosa (un azúcar), la proteína activadora de *araC* activa al promotor. La ARN polimerasa se une al promotor y comienza la transcripción del gen *rfp*. Cuando el gen *rfp* se expresa, las bacterias se vuelven de color rosa brillante. El gen *ampR* confiere resistencia al antibiótico ampicilina; solo las bacterias que portan este gen sobrevivirán a un antibiótico. Los científicos llaman a estos genes **marcadores seleccionables**. Solo las bacterias que contienen el gen de resistencia a los antibióticos, además de los genes *araC*, pBAD, y el *rfp*, sobrevivirán y mostrarán la coloración rosa brillante.

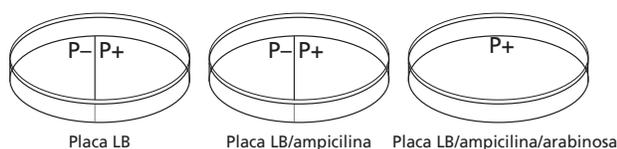
HOJAS INFORMATIVAS

- **Predicciones sobre el crecimiento bacteriano (RM 5)**

ANTES DEL LABORATORIO

Discuta lo siguiente con su grupo y prepárese para compartir sus ideas con la clase.

1. La ampicilina es un antibiótico que destruye las células bacterianas al interrumpir la formación de las paredes celulares. Sin embargo, el plásmido pARA-R tiene el gen de resistencia a la ampicilina, que produce una proteína que descompone a la ampicilina. ¿Cuál es el propósito de cultivar bacterias que se han transformado en presencia de la ampicilina?
2. ¿Qué sucederá cuando las células bacterianas que contienen el plásmido pARA-R no reciban arabinosa?
3. En el laboratorio, agregará muestras del grupo de control P- y del grupo de tratamiento P+ a las placas que contienen varias combinaciones de caldo Luria (LB), ampicilina y el azúcar arabinosa. Las placas se organizarán de la siguiente manera:



Usando la clave sobre **Predicciones de crecimiento bacteriano (RM 5)**, muestre sus predicciones para el crecimiento que esperaría para cada combinación. A continuación, complete la **Tabla 1** y **Tabla 2** en la hoja informativa describiendo las conclusiones que pueden extraerse si el crecimiento previsto se produce o no.

4. Debido a un accidente en el laboratorio, las bacterias que portaban un plásmido con un gen de resistencia a la ampicilina y las bacterias que portaban un plásmido con un gen que proporciona resistencia a otro antibiótico (kanamicina) se mezclaron de manera accidental. Diseñe un experimento que le permita ordenar los dos tipos de bacterias. (Pista: ¡Asegúrese de no destruir uno de los tipos de bacterias que intenta clasificar!)
5. Lea la sección *Métodos* en las páginas D-212 a D-25 y describa brevemente los pasos, utilizando palabras y un diagrama de flujo.



SEGURIDAD: Se deben seguir todas las precauciones de seguridad adecuadas y usar la vestimenta requerida para un laboratorio de ciencias. Consulte las instrucciones de su profesor.

SEGURIDAD: Tenga cuidado al manipular bacterias de *E. coli* y utilice una **técnica aséptica**.

La técnica aséptica es un conjunto de procedimientos que garantizan la protección tanto del laboratorista como de la muestra bacteriana, que es necesaria para que el experimento sea exitoso. De manera específica:

- No toque nada que haya estado o esté en contacto con bacterias de *E. coli*. Los estudiantes que manejan equipos que tienen contacto con bacterias deben usar guantes.
- Trate de evitar derrames o la contaminación de las superficies con cualquier cosa que haya estado en contacto con bacterias de *E. coli*. Informe de inmediato a su profesor si ocurre un derrame o contaminación.
- Cuando haya terminado de usar los tubos de microcentrífuga, las puntas de pipeta y los esparcidores de células, colóquelos inmediatamente en la bolsa de residuos con riesgo biológico o en el recipiente de residuos, según las indicaciones de su profesor.
- Cuando se le indique, coloque sus placas Petri en la bolsa de residuos con riesgo biológico.
- Lávese bien las manos con jabón después de terminar el laboratorio.

MATERIALES

Reactivos

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

NOTA: El tubo CC debe mantenerse en hielo en todo momento.

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

Equipo y suministros

- Una taza de espuma de poliestireno con hielo picado

NOTA: Llene una taza con un poco de hielo picado del recipiente que sostiene los tubos CC antes de tomar un tubo CC. Deberá mantener el tubo CC en hielo en todo momento.

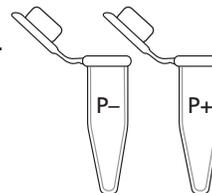
- 2 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Marcador permanente
- Guantes descartables
- Micropipeta P-20
- Micropipeta P-200
- Caja de puntas para puntas de pipetas desechables
- Paquete de esparcidores de células (se compartirán entre los grupos)
- Baño maría a 42 °C con gradilla flotante para tubos de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

MÉTODOS

1. Revise su gradilla para asegurarse de que tiene todos los reactivos que están en la lista.
2. Obtenga un tubo CC del recipiente lleno de hielo y colóquelo en una taza de poliestireno con hielo.

TÉCNICA DE LABORATORIO: Las células competentes en este laboratorio deben mantenerse frías; asegúrese de tomar los tubos de microcentrífuga por el borde superior para evitar calentar las células con las manos.

3. Etiquete dos tubos de microcentrífuga limpios con "P-" y "P+".
4. Coloque los tubos P- y P+ en la taza de poliestireno con hielo con el tubo CC.



TÉCNICA DE LABORATORIO: la transformación bacteriana requiere técnicas estériles. Es esencial que estas instrucciones se sigan al pie de la letra.





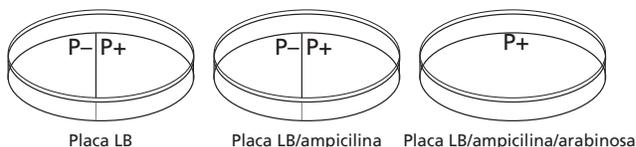
5. Con la micropipeta grande P-200, agregue las células competentes del tubo CC a los tubos P- y P+:
 - a. Fije la micropipeta P-200 a 50 μ l.
 - b. Con mucho cuidado, vuelva a suspender las células bacterianas en el tubo CC bombeando suavemente la pipeta dos veces en la solución.
 - c. Agregue 50 μ l de CC a cada uno de los tubos refrigerados vacíos (P- y P+), sosteniendo cada tubo por el borde para mantenerlo frío, y vuelva a colocar cada tubo rápidamente en el hielo.

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

6. Con una punta de pipeta nueva y la pipeta P-20, agregue RP al tubo con la etiqueta "P+":
 - a. Fije la micropipeta P-20 a 10.0 μ l.
 - b. Sostenga el tubo P+ enfriado por el borde superior y agregue 10.0 μ l de RP. Mezcle las soluciones bombeando la pipeta dos veces en los líquidos, y vuelva a colocar el tubo P+ en el hielo.
7. Mantenga los tubos P- y P+ en hielo durante 15 minutos.

NOTA: Durante el intervalo de 15 minutos, comparta y discuta sus respuestas a la pregunta 3 en *Antes del laboratorio*.

8. Mientras las células están en hielo, prepare sus tres placas Petri con agar, una placa de LB, una de LB/amp y una de LB/amp/ara:
 - a. Etiquete la parte inferior de cada placa (la parte que contiene el agar) con su número de grupo y período de clase. Escriba con letras pequeñas y en el borde de la placa.
 - b. Con las placas cerradas, dibuje una línea en la parte inferior de la placa LB y la placa LB/amp que divida cada placa por el medio. Etiquete la mitad de cada placa con "P-" y la otra mitad con "P+". Etiquete la placa LB/amp/ara con "P+". Las placas se organizarán de la siguiente manera:



9. Después de la incubación de 15 minutos en hielo, lleve los tubos P- y P+ (en la taza con hielo) a baño maría a 42 °C. Coloque los dos tubos en la gradilla flotante de tubos de microcentrífuga en baño maría durante exactamente 45 segundos.
10. Después del choque térmico de 45 segundos, vuelva a colocar los tubos en hielo y déjelos allí durante al menos un minuto.

11. Con una nueva punta de pipeta para cada reactivo y la micropipeta P-200 grande, agregue LB a los tubos P- y P +:
 - a. Fije la micropipeta P-200 a 150 μ l.
 - b. Agregue 150 μ l de LB al tubo P-. Tape el tubo y gírelo suavemente dos o tres veces para mezclar.

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

- c. Agregue 150 μ l de LB al tubo P+. Tape el tubo y gírelo suavemente dos o tres veces para mezclar.
12. Si el tiempo lo permite, deje que las células en los tubos P- y P+ se incuben a temperatura ambiente durante 15 minutos.



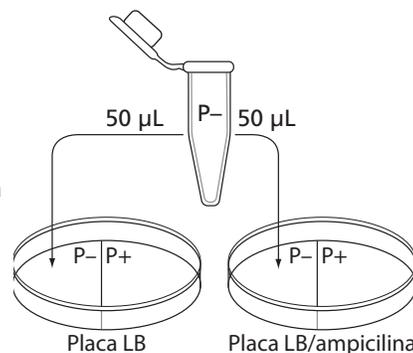
DETÉNGASE Y PIENSE:

- ¿De qué diferente manera se trató el cultivo de bacterias P+ del cultivo de bacterias P-? (Un **cultivo** es una población aislada de células). ¿Cuál es el propósito del cultivo de bacterias P-?
- ¿Por qué las células necesitan tiempo para recuperarse después del choque térmico?
- ¿Por qué se incuban las células a 37 °C?
- Usó una técnica aséptica en este laboratorio. ¿Por qué esto es importante?

13. Con una punta de pipeta nueva, agregue células del tubo P- a sus placas LB y LB/amp:
 - a. Fije la micropipeta P-200 a 50 μ l.

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

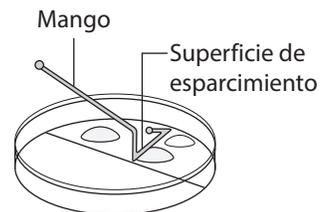
- b. Bombee suavemente la pipeta dos o tres veces en el tubo P- para suspender las células y cargue 50 μ l de las células P-.
 - c. Abra la tapa de la placa LB, como una "valva de almeja", y agregue 50 μ l de células del tubo P- a la sección marcada con "P-". Cierre la tapa.
 - d. Nuevamente, bombee suavemente la pipeta dos o tres veces en el tubo P- para suspender las células y cargue 50 μ l de las células P-.



- e. Abra la tapa de la placa LB/amp, como una valva de almeja, y agregue 50 μ l de células del tubo P- a la sección marcada "P-". Cierre la tapa.

14. Esparza las células del tubo P- en sus placas LB y LB/amp:

- a. Abra el paquete de esparcidores estériles de células en el extremo más cercano al mango del esparcidor. Retire solo un esparcidor y cierre el paquete para mantener la esterilidad de los demás.
- b. Abra la tapa de la placa LB, como una valva de almeja, y esparza las células de manera uniforme por todo el lado P- de la placa moviendo suavemente el esparcidor por la superficie del agar. (Mantenga las células en el lado P- de la placa). Cierre la tapa.
- c. Extienda cuidadosamente las células P- en la placa LB/amp, utilizando el mismo esparcidor y la misma técnica.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Sujete el esparcidor por el mango y no permita que el extremo doblado toque ninguna superficie, ya que esto contaminará el esparcidor. Coloque el esparcidor usado en la bolsa de residuos con riesgo biológico.

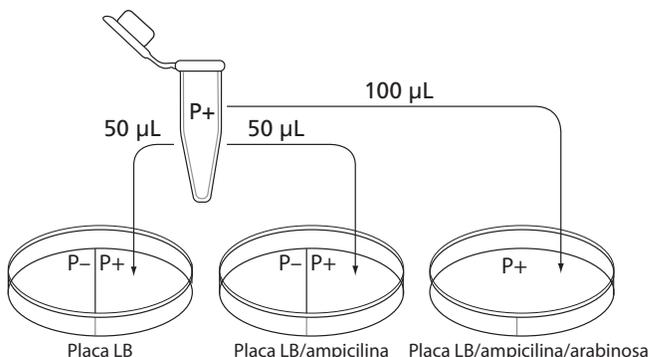
15. Con una punta de pipeta nueva, agregue células del tubo P+ a sus placas LB, LB/amp y LB/amp/ara:

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



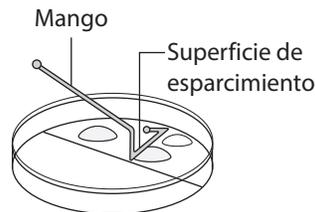
TÉCNICA DE LABORATORIO: Para evitar la contaminación, asegúrese de usar una punta de micropipeta nueva para cada solución.

- b. Bombée suavemente la pipeta dos o tres veces en el tubo P+ para suspender las células y cargue 50 μ l de las células P+.
- c. Abra la tapa de la placa LB, como una valva de almeja, y agregue 50.0 μ l de células del tubo P+ a la sección marcada "P+". Cierre la tapa.
- d. Nuevamente, bombee suavemente la pipeta dos o tres veces en el tubo P+ para suspender las células y cargue 50 μ l de las células P+.
- e. Abra la tapa de la placa LB/amp, como una valva de almeja, y agregue 50 μ l de células del tubo P+ a la sección marcada "P+". Cierre la tapa.
- f. Fije la micropipeta P-200 en 100 μ l, bombee suavemente la pipeta dos o tres veces en el tubo P+ y cargue 100 μ l de las células P+.
- g. Abra la tapa de la placa LB/amp/ara, como una valva de almeja, y agregue 100 μ l de células P+ en varias áreas de la superficie, no solo en un punto. Cierre la tapa.



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

- Abra el paquete de esparcidores estériles de células en el extremo más cercano al mango del esparcidor. Retire solo un esparcidor y cierre el paquete para mantener la esterilidad de los demás.
- Abra la tapa de la placa LB, como una valva de almeja, y esparza uniformemente las células en el lado P+ de la placa (y solo en este lado) moviendo suavemente el esparcidor a través de la superficie del agar. Cierre la tapa.
- Extienda cuidadosamente las células P+ en la placa LB/amp usando el mismo esparcidor y la misma técnica.
- Extienda cuidadosamente las células P+ en la placa LB/amp/ara usando el mismo esparcidor. Luego, gire suavemente la placa debajo del esparcidor P+ para que las células se puedan extender por toda la superficie de esta placa. Cierre la tapa.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Sujete el esparcidor por el mango y no permita que el extremo doblado toque ninguna superficie, ya que esto contaminará el esparcidor. Coloque el esparcidor usado en la bolsa de residuos con riesgo biológico.



- Deje que las tres placas se asienten hacia arriba durante cinco minutos.
- Use la cinta adhesiva provista para pegar las tres placas y rotule la cinta con su número de grupo y período de clase.
- Coloque las placas en la incubadora a 37 °C boca abajo para evitar que la condensación gotee sobre los geles.
- Coloque todos los tubos de microcentrífuga, puntas de pipeta y separadores de células en la bolsa de residuos con riesgo biológico.
- Incube las placas durante 24 a 36 horas a 37 °C.
- Examine las placas. En su cuaderno, registre la cantidad de crecimiento en cada mitad.
- Deseche las placas Petri en la bolsa de residuos con riesgo biológico cuando se le indique.

PREGUNTAS DEL CAPÍTULO 5B

1. Enumere en palabras o indique en un dibujo las características importantes de un vector plasmídico que se requieren para clonar un gen. Explique el propósito de cada característica.
2. Al seleccionar una enzima de restricción para la clonación, ¿qué consideraciones importantes deben tenerse en cuenta?
3. Según su comprensión de la evolución, ¿por qué las bacterias retienen un gen que les da resistencia a los antibióticos? ¿De qué manera la existencia de bacterias con resistencia a los antibióticos afecta a la medicina hoy en día?
4. Mire los resultados de su transformación. ¿Sus resultados reales coinciden con los resultados previstos? Si no es así, ¿qué diferencias observa y cuáles son algunas explicaciones para estas diferencias?
5. ¿Por qué aparecieron las colonias rojas solo en la placa LB/amp/ara y no en la placa LB/amp?
6. Los plásmidos recombinantes están diseñados para que puedan replicarse 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 convierte la información codificada en el gen *rfp* en un rasgo? Asegúrese de utilizar lo que ha aprendido previamente sobre la expresión génica y la relación entre ADN, ARN, proteínas y rasgos.
8. ¿Por qué es posible que las bacterias produzcan una proteína humana, como la insulina, o una proteína de anémona de mar, como la RFP?

¿SABÍA?

Sobre la conexión entre los genes y las proteínas

¿Cómo pudieron los científicos demostrar que un gen codifica una proteína? En 1941, George Beadle y Edward Tatum llevaron a cabo un experimento en el que expusieron el moho del pan a la radiación UV, un procedimiento que se sabe que causa **mutaciones** (cambios) en 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, una vitamina es la molécula final en una vía en la cual una serie de reacciones crea un conjunto correspondiente de moléculas precursoras, con cada reacción catalizada por una enzima (una proteína). Al alimentar a los precursores de la vitamina B6, uno a la vez, a la cepa mutante que no pudo producir esa vitamina, Beadle y Tatum pudieron determinar que el mutante solo carecía de una sola enzima que catalizara una reacción.

Beadle y Tatum luego investigaron si un solo gen causó la pérdida de la enzima única por cruces genéticos entre la cepa mutante incapaz de sintetizar la vitamina B6 y una cepa de tipo silvestre. Después de cultivar la progenie, descubrieron que la mitad tenía el mismo defecto que la cepa mutante original y la otra mitad no, lo que confirmó que se había mutado un solo gen. A partir de estos resultados, Beadle y Tatum propusieron que los genes fueron responsables de codificar las proteínas de un organismo y que un cambio en un gen podría dar como resultado la producción de 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.

Comprender la conexión entre genes y proteínas es fundamental para el avance de la biotecnología. Si los investigadores pueden comprender mejor qué genes afectan las proteínas involucradas en una enfermedad en particular, pueden trabajar de manera más efectiva para combatir esa enfermedad.



GLOSARIO DEL CAPÍTULO 5B

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

Placa de agar: es una placa de Petri que contiene agar mezclado con una fuente de alimento o medio llamado Caldo Luria (LB) que favorece el crecimiento bacteriano.

Aminoácidos: es el componente básico de las proteínas. Cada uno de los 20 aminoácidos es una sustancia orgánica con dos grupos unidos a él: un grupo amino (NH_2) y un grupo de ácido carboxílico (COOH).

Antibiótico: es una clase de compuestos que suprime o inhibe el crecimiento de microorganismos.

Resistencia antibiótica: es el estado en el que las bacterias ya no son sensibles a un antibiótico y continuarán creciendo y dividiéndose en presencia del antibiótico.

Arabinosa: es un azúcar de cinco carbonos que se encuentra naturalmente en varios carbohidratos de plantas y bacterias.

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

Conjugación bacteriana: es un proceso por el cual dos células bacterianas se unen y transfieren material genético entre sí.

Transformación bacteriana: es el intercambio de material genético entre cepas de bacterias; un proceso en el cual un plásmido es captado por células bacterianas.

Bacteriófago: es un virus que infecta una célula bacteriana y utiliza la maquinaria celular para replicarse. La célula bacteriana es finalmente destruida por el bacteriófago.

Base par: son dos bases nitrogenadas emparejadas en ADN bicatenario por enlaces débiles.

Factor de coagulación de la sangre: consiste en una variedad de proteínas en el plasma sanguíneo que participan en el proceso de coagulación.

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

Competente: es una célula que tiene la capacidad de transformarse genéticamente al captar el ADN del medioambiente.

Cultivo: es una población aislada de células que han crecido en un medio nutriente especialmente preparado.

Diabetes: es una enfermedad que se produce cuando el nivel de glucosa en la sangre de una persona es demasiado elevado.

Digestión: es el corte del ADN mediante una enzima de restricción.

ADN ligasa: es una enzima que cataliza la formación de enlaces químicos covalentes en el esqueleto azúcar-fosfato, uniendo de manera permanente los fragmentos de ADN.

ADN polimerasa: es una enzima utilizada para replicar las moléculas del ADN.

Replicación del ADN: es el proceso biológico de hacer una copia idéntica de ADN, que ocurre cada vez que se forma una célula nueva en los organismos vivos. La doble hélice se desenrolla, y cada cadena de la molécula original sirve como plantilla para la producción de la cadena complementaria.

***Escherichia coli* (E. coli):** es una bacteria común que se encuentra en el intestino de animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas son inofensivas, incluida la cepa que se utiliza en estos protocolos de laboratorio.

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

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

Expresado: es cuando la información codificada en un gen se ha convertido primero en ARN mensajero y luego en una proteína. Este proceso se llama expresión.

Fluorescencia: es la producción de luz por una molécula (p. ej., la proteína fluorescente roja liberará luz roja cuando se exponga a la luz ultravioleta).

Deficiencia del crecimiento: es una enfermedad que hace que una persona no crezca adecuadamente.

Hemofilia: es una enfermedad que se produce cuando se reduce la capacidad de coagulación de la sangre.

Hormona del crecimiento humano: es una hormona secretada por la glándula pituitaria que estimula el crecimiento.

Insulina: es una hormona que se produce en el páncreas que controla la cantidad de glucosa en la sangre. La insulina es una proteína.

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

Caldo Luria: es un medio nutricionalmente rico que favorece el crecimiento bacteriano.

Medio: es una solución, como el caldo Luria, que contiene sustancias que favorecen el crecimiento de microorganismos. El medio puede solidificarse mediante la adición de agar.

ARN mensajero: es una molécula de ARN transcrita del ADN de un gen y utilizada como plantilla para la síntesis de proteínas.

Mutación: es el cambio o daño que ocurre en una sección del ADN que altera los productos o procesos asociados con esa sección.

Origen de la replicación (ori): es una secuencia de ADN en la que se inicia la replicación del ADN.

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

Promotor: es una secuencia de ADN específica que se une a la ARN polimerasa e inicia la transcripción del gen.

Plásmido recombinante: es una pequeña pieza de ADN circular que contiene un gen.

Proteína fluorescente roja (RFP): es la proteína codificada por el gen *rfp*.

La proteína fluorescente roja es una molécula que tiene un tamaño de aproximadamente 238 aminoácidos. Cuando se expresa en células bacterianas, las células aparecen de color rojo o rosa brillante.

Replicar: significa copiar.

Sitio de restricción (también conocido como sitio de reconocimiento de restricción): es una secuencia de ADN específica que es cortada por una enzima de restricción. Muchos sitios de restricción son palíndromos, secuencias que son iguales cuando se leen hacia adelante o hacia atrás.

Transcriptasa inversa: es una enzima que cataliza la formación de ADN a partir de una plantilla de ARN en la transcripción inversa.

ARN (ácido ribonucleico): es una biomolécula monocatenaria formada por una base nitrogenada, un azúcar ribosa y un fosfato. El ARN desempeña un papel fundamental en la síntesis de las proteínas, al transmitir información genética desde el ADN al ribosoma donde se producen las proteínas.

ARN polimerasa: es una proteína que produce ARN mensajero a partir de ADN.

Marcador seleccionable: es un gen en un plásmido que se introduce en una célula junto con un gen de interés que se está clonando. Los marcadores seleccionables permiten a los científicos saber si la célula ha captado el plásmido porque se puede ver o detectar el marcador. Un marcador seleccionable común es un gen de resistencia a los antibióticos: solo las bacterias que tienen el gen sobrevivirán al antibiótico.

Empalme: es la modificación del ARN mensajero para la traducción eliminando intrones y uniendo exones.

Codón de inicio: es el primer codón de ARNm traducido por un ribosoma; típicamente AUG o GUG.

Extremo cohesivo: es el extremo de una molécula de ADN cortada con ciertas enzimas de restricción. Estos extremos son asimétricos, ya que una cadena es más larga que la otra y, por lo tanto, tiene bases no emparejadas. Los extremos cohesivos de dos piezas diferentes de ADN que se han cortado con la misma enzima (s) de restricción se pueden unir, ya que las bases no emparejadas en sus extremos son complementarias.

Codón de terminación: es un triplete de nucleótidos dentro del ARNm que señala la terminación de la traducción.

Transcripción: es el proceso mediante el cual la información codificada en el ADN se transfiere al ARN mensajero, un ácido ribonucleico monocatenario.

Transformación: es un proceso que coloca ADN extraño, como un plásmido, en una célula.

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

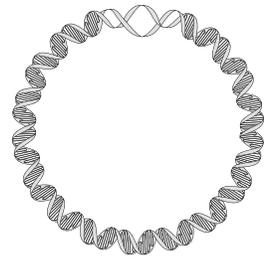
Vector: es un vehículo que mueve secuencias de ADN de un organismo a otro.

E

AMGEN[®] Biotech Experience

Descubrimiento científico para el aula

AMGEN[®] Foundation



CAPÍTULO 6

CÓMO CONSEGUIR LO QUE NECESITAMOS

INTRODUCCIÓN

La ingeniería genética se utiliza para producir proteínas terapéuticas. Para proporcionar un tratamiento para la diabetes, por ejemplo, se diseña un plásmido recombinante para contener un gen de insulina humana clonado. Las bacterias captan el plásmido recombinante y expresan el gen, produciendo insulina. Hasta la fecha, ha llevado a cabo todos o algunos de estos pasos utilizando el gen clonado *rfp* en lugar de un gen humano que produciría una proteína terapéutica.

El paso final en el proceso es obtener la proteína. Para hacer esto, las bacterias se tratan con un reactivo que las *lisa* (rompen sus paredes celulares), y la proteína se separa del contenido celular mediante un método llamado **cromatografía en columna**. (La cromatografía es un método para separar sustancias similares disolviéndolas y luego haciendo fluir la solución sobre un material que une las sustancias en diferentes grados. La cromatografía en columna utiliza una columna llena de cuentas recubiertas con el material de unión).

En este capítulo, completará este paso final. Lisará las bacterias que transformó en el Capítulo 5 y luego usará una columna que separa las proteínas en función de su solubilidad en agua para obtener la RFP producida por los genes clonados *rfp*. Este mismo proceso se usaría para aislar una proteína terapéutica humana.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 6

Al final de este capítulo, podrá hacer lo siguiente:

- Describa las condiciones que son favorables para el crecimiento bacteriano
- Explique cómo la **conformación** de una proteína (forma tridimensional) se relacionada con su función
- Explique cómo ocurre el **plegamiento de proteínas** (el proceso físico por el cual una proteína se pliega en su característica estructura tridimensional, que es esencial para su función).
- Explique cómo la cromatografía en columna separa las proteínas.

¿QUÉ ES LO QUE YA SABE?

Discuta las siguientes preguntas con su compañero y escriba sus ideas en su cuaderno. Esté preparado para discutir sus respuestas con la clase. No se preocupe si no sabe todas las respuestas. Discutir estas preguntas le ayudará a pensar en lo que ya sabe sobre el desarrollo bacteriano y las proteínas.

1. ¿Cómo se reproducen las bacterias?
2. ¿Por qué las proteínas a veces se llaman moléculas “caballo de batalla”?

3. ¿Cómo podría la conformación (forma o plegamiento) de una proteína ser importante para su función? Concéntrese en una de las siguientes funciones proteicas: actuar como una enzima (acelerar las velocidades de reacción), transportar moléculas, señalizar o formar estructuras.
4. Un *polipéptido* es una molécula lineal larga cuando se produce, pero inmediatamente se pliega en una conformación tridimensional específica, que llamamos proteína. ¿Qué propiedades de los aminoácidos en una proteína controlan el proceso de plegado?

PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA DE INTERÉS

Después de transformar las bacterias para que contengan el plásmido con el gen de interés, necesita la bacteria para que la bacteria se reproduzca y luego exprese este gen (produzca la proteína que codifica el gen).

REPRODUCCIÓN BACTERIANA

¿Qué factores afectan la reproducción bacteriana, que también se llama crecimiento bacteriano? El último paso en el Capítulo 5 fue colocar las bacterias que se transformaron con el plásmido pARA-R en un *cultivo en suspensión* en un matraz de agitación. Las células se suspendieron en un caldo de nutrientes, y la agitación mezcló aire en la suspensión y evitó que las bacterias se sedimentaran en la solución, proporcionando condiciones favorables para el crecimiento.

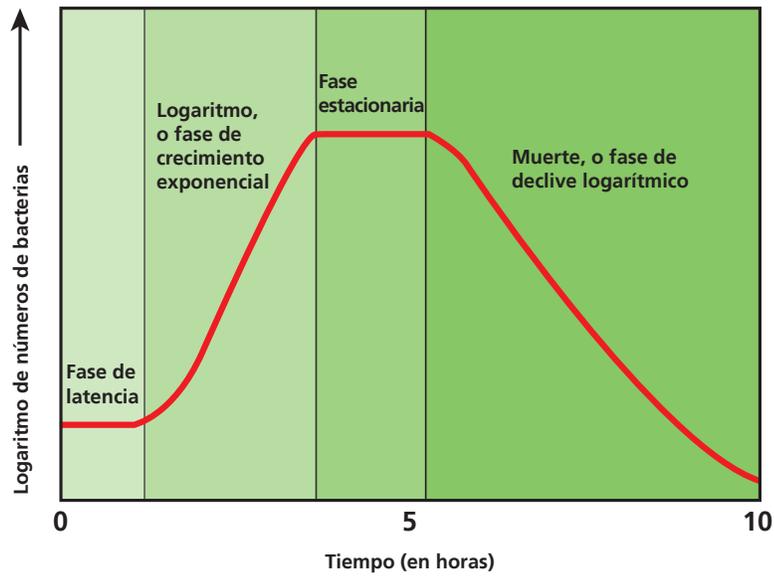
CONSIDERAR: ¿Por qué podría ser mejor el matraz agitador para favorecer el crecimiento celular bacteriano que una placa?



En condiciones óptimas, como las proporcionadas por el matraz agitador, el crecimiento de una población bacteriana es predecible (vea la **Figura 6.1**). El crecimiento ocurre en cuatro fases distintas:

- En la *fase de latencia*, hay una tasa de crecimiento cero. No hay células nuevas ni células muriendo. Las células se ajustan a las nuevas condiciones, se hacen más grandes y se preparan para la división celular.
- En la *fase de registro*, hay una tasa de logarítmica de crecimiento. El número de células nuevas es mayor que el número de células que mueren. Las células se someten a una división celular asexual y se duplican en número cada 20 minutos (que es el tiempo de duplicación promedio para *E. coli*; otras bacterias tienen diferentes tiempos de duplicación). Esta fase ocurre siempre que los recursos necesarios, como los alimentos y el oxígeno, sean ilimitados y no haya factores inusuales que causen la muerte celular.
- En la *fase estacionaria*, hay una tasa de crecimiento cero. El número de células nuevas es igual al número de células que mueren. Esta fase ocurre una vez que los recursos, como los alimentos y el oxígeno, se vuelven limitados.
- En la *fase de muerte*, hay una tasa de crecimiento negativa. El número de células nuevas es mayor que el número de células que mueren. Esta fase ocurre cuando los recursos se agotaron y cuando se acumulan residuos tóxicos.

Figura 6.1: Cambio en el crecimiento bacteriano con el tiempo en el matraz agitador



CONSIDERE: Si el gen de interés está controlado por un operón, como el operón de arabinosa, ¿cuándo es el mejor momento para activar el gen? Tenga en cuenta:

- La producción de la proteína quita energía de los procesos de crecimiento celular y división celular.
- Un mayor número de células producirá más proteínas.
- Las proteínas pueden degradarse con el tiempo.

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

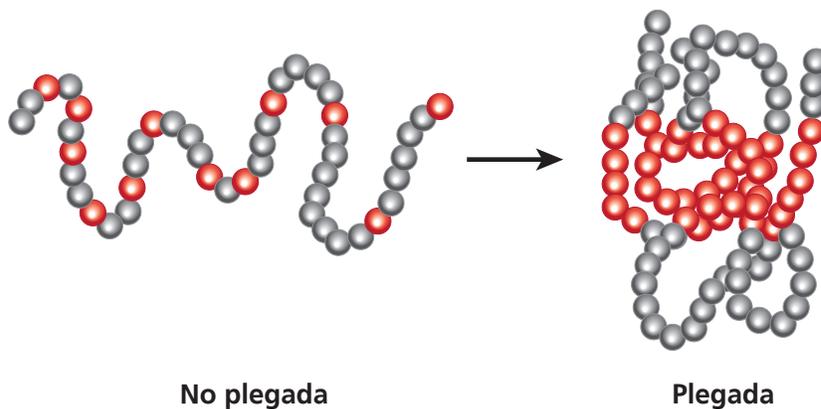
Cuando se permite que las bacterias transformadas crezcan y se multipliquen numerosas veces, pueden producir suficiente proteína terapéutica para satisfacer las necesidades de tratamiento de los pacientes. Sin embargo, la proteína terapéutica debe purificarse, lo que requiere separarla de los otros contenidos de la célula, incluidas otras proteínas. (Una bacteria típica puede contener más de 1,000 tipos diferentes de proteínas). La cromatografía en columna es un método utilizado para separar las proteínas.

¿Qué características físicas de las proteínas les permiten separarse por cromatografía en columna? Aunque todas las proteínas están formadas por aminoácidos, cada tipo de proteína tiene una función específica y una conformación (forma) específica. La conformación se relaciona con la función porque la superficie exterior de una proteína tiene sitios específicos que se unen a otras moléculas. Estos **sitios de unión** permiten que las proteínas se unan a otras moléculas, así es como las proteínas pueden catalizar reacciones, transportar moléculas, proporcionar una señal y formar estructuras.

Cuando un polipéptido se sintetiza por primera vez, es una cadena larga y flexible de aminoácidos, pero inmediatamente alcanza su conformación tridimensional mediante un proceso llamado plegamiento de proteínas (vea la **Figura 6.2**). Una vez que se ha plegado, el polipéptido se denomina proteína. El plegamiento de la proteína depende de las siguientes propiedades de los aminoácidos en la proteína:

- Formación de enlaces débiles no covalentes entre cadenas laterales de aminoácidos con carga positiva y carga negativa
- La tendencia de los aminoácidos **hidrofóbicos** (insolubles en agua) a ser enterrados en el interior de la proteína lejos del agua y de los aminoácidos **hidrofilicos** (solubles en agua) a encontrarse en el exterior de la proteína expuesta al agua
- Formación de enlaces covalentes, llamados **puentes disulfuro**, que ocurre entre aminoácidos que contienen azufre

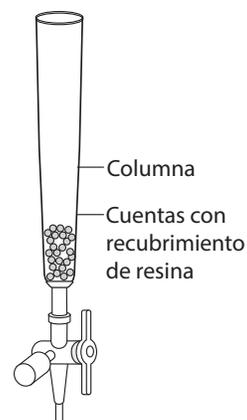
Figura 6.2: Plegamiento de la proteína



CONSIDERE: Si una mutación cambia un aminoácido, ¿cómo podría afectar este cambio al plegamiento de proteínas y a la función de las proteínas?

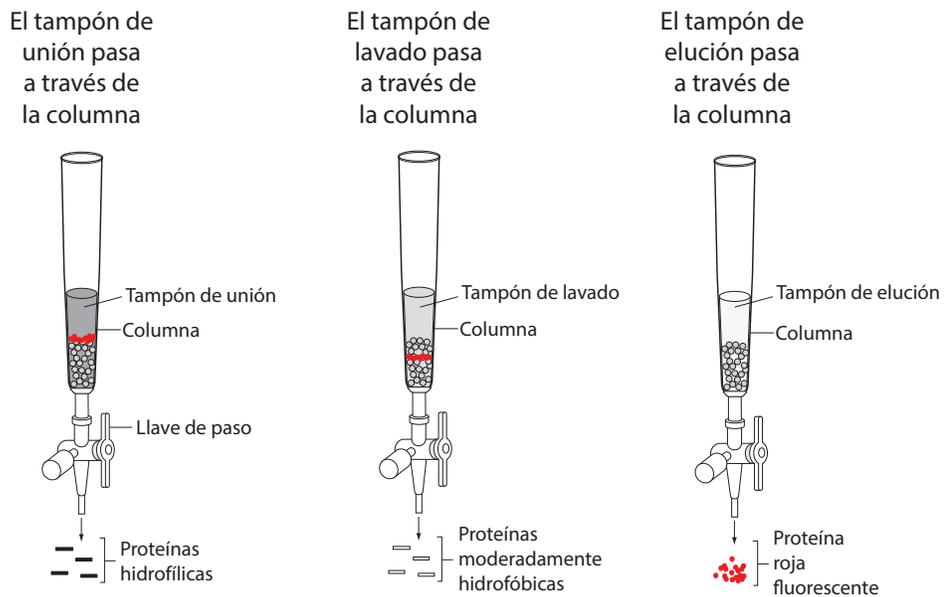


Las proteínas específicas son hidrofóbicas o hidrofílicas, dependiendo de la cantidad relativa de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos que contienen. Las proteínas hidrofóbicas y las proteínas hidrofílicas se pueden separar por cromatografía en columna. En este método, una columna está llena de pequeñas cuentas que están recubiertas con un material (llamado **resina**) que atrae aminoácidos hidrofóbicos, y la mezcla de proteínas se disuelve y pasa sobre las cuentas. Para que los aminoácidos hidrofóbicos se adhieran a la resina, las proteínas deben desplegarse para exponer los aminoácidos hidrofóbicos, que tienden a encontrarse en el interior de la proteína. Ciertas soluciones salinas llamadas **tampones** (soluciones que resisten los cambios en el pH) desplegarán proteínas en diversos grados.



Se puede usar una serie de tampones de diferentes concentraciones de sal para separar muchas proteínas entre sí. Por ejemplo, para separar la proteína RFP altamente hidrofóbica en una columna, se utiliza un tampón de unión para desplegar 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 un tampón de lavado en la columna para liberar proteínas moderadamente hidrofóbicas de la resina, y luego se vierte un tampón de **elución** (utilizado para extraer una sustancia que se une a otra lavándolo con una solución) en la columna para liberar RFP de la resina. Tanto los tampones de lavado como los de elución tienen una concentración de sal más baja que el tampón de unión y, por lo tanto, hacen que las proteínas unidas se plieguen y comiencen a cubrir sus aminoácidos hidrofóbicos. Dependiendo de la extensión del plegamiento, las proteínas se liberan de las cuentas. La **Figura 6.3** ilustra este proceso.

Figura 6.3: Uso de los tres tampones para separar la proteína roja fluorescente



CONSIDERE: Si estuviera tratando de usar la cromatografía en columna para separar la insulina de una mezcla de proteínas, ¿usaría los mismos tampones de unión, lavado y elución utilizados para la RFP, o usaría tampones con diferentes concentraciones de sal? Explique el razonamiento de su respuesta.

¿SABÍA?

Proteínas recombinantes

Como ha aprendido, cuando las proteínas recombinantes se producen para su uso como la terapéutica humana, las células huésped deben desarrollarse en grandes cantidades para que se produzca suficiente proteína recombinante para satisfacer la **demanda de tratamiento** (las necesidades de los pacientes). La proteína recombinante se aísla, purifica y analiza para determinar su actividad y calidad antes de que salga al mercado.

Sin embargo, producir una proteína con el orden adecuado de aminoácidos no es siempre una tarea sencilla. A veces se requiere un procesamiento o modificación adicional para producir una proteína activa o que funcione completamente. Muchas proteínas humanas son **glucosiladas**, lo que significa que tienen un patrón particular de moléculas de azúcar vinculadas a ellas. Si una proteína se traduce pero no se glucosila correctamente, es posible que no funcione correctamente. Otra modificación implica la adición de un grupo fosfato, un proceso conocido como **fosforilación**. La fosforilación de una proteína puede actuar como un tipo de interruptor, permitiendo que la proteína se vuelva más o menos activa al descubrir o cubrir sus sitios de unión. Además de los grupos sacárido (azúcar) y fosfato, se pueden agregar otros grupos químicos a una proteína para cambiar su función.

Las proteínas recombinantes para uso terapéutico incluyen **vacunas** (que hacen que el sistema inmunitario del cuerpo produzca anticuerpos que se unirán a una bacteria o que creen un virus para combatir una enfermedad), **hormonas** (sustancias que actúan como mensajeros químicos en el cuerpo), **anticuerpos monoclonales** (proteínas que se unen a sustancias en el cuerpo y están hechas por clones de una célula formada en el laboratorio), y **factores de crecimiento hematopoyético** (un grupo de proteínas que promueven el crecimiento, la diferenciación y la actividad de las células sanguíneas) para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, el SIDA, las alergias y el asma. El número de proteínas recombinantes ha aumentado considerablemente en los últimos años a medida que avanza la tecnología utilizada para su producción y purificación.





LABORATORIO 6: CÓMO PURIFICAR LA PROTEÍNA FLUORESCENTE

En el capítulo anterior, transformó las bacterias y luego seleccionó las bacterias que habían captado el plásmido de interés (que incluía el gen para *rfp*) colocando las células en placas que contenían LB, ampicilina y arabinosa. Todas las colonias bacterianas que crecieron en estas placas contenían el gen *rfp* porque el gen *rfp* fue emparejado con el gen de resistencia a la ampicilina. Su clase o su profesor seleccionaron una *colonia* (un grupo del mismo tipo de organismos que viven juntos, generalmente para beneficio mutuo), y lo cultivaron en un matraz agitador para crear una gran población de células idénticas que contenían el plásmido recombinante. Cerca del final de la fase logarítmica del crecimiento bacteriano, a las células se les administró arabinosa para activar los genes *rfp* para que puedan producir RFP. En la primera parte de este laboratorio, usará un reactivo llamado tampón de lisis para lisar o romper las células. En la segunda parte de este laboratorio, utilizará la cromatografía en columna para aislar o purificar la RFP. Este es el mismo proceso se usaría para aislar una proteína terapéutica humana.

ANTES DEL LABORATORIO

Discuta lo siguiente con su grupo y prepárese para compartir sus ideas con la clase.

1. En la cromatografía en columna, ¿cómo pueden usarse soluciones de diferentes concentraciones de sal, que desplegarán proteínas en diversos grados, para ayudar a purificar la RFP?
2. Lea la sección *Métodos* en la Parte A (en las páginas E-12 y E-13) y la Parte B (en páginas E-14 a E-15) y describa brevemente los pasos, usando palabras y un diagrama de flujo.



SEGURIDAD: Se deben seguir todas las precauciones de seguridad adecuadas y usar la vestimenta requerida para un laboratorio de ciencias. Consulte las instrucciones de su profesor.



SEGURIDAD: Tenga cuidado al manipular bacterias de *E. coli* y utilice una *técnica aséptica*.

La técnica aséptica es un conjunto de procedimientos que garantizan la protección tanto del laboratorista como de la muestra bacteriana, lo cual es necesario para que el experimento sea exitoso. De manera específica:

- No toque nada que haya estado o esté en contacto con bacterias de *E. coli* Sostenga los tubos de microcentrifuga y las placas de Petri por el exterior, sostenga solo los mangos de los separadores de células y no manipule las puntas de las pipetas.
- Trate de evitar derrames o la contaminación de las superficies con cualquier cosa que haya estado en contacto con bacterias de *E. coli* Informe de inmediato a su profesor si ocurre un derrame o contaminación.
- Cuando haya terminado de usar tubos de microcentrifuga, puntas de pipeta y esparcidores de células, colóquelos inmediatamente en la bolsa de riesgo biológico.
- Cuando se le indique, coloque sus placas Petri en la bolsa de residuos con riesgo biológico.
- Lávese bien las manos con jabón después de terminar el laboratorio.

PARTE A: LISIS DE CÉLULAS CULTIVADAS EN EL AGITADOR

MATERIALES

Reactivos

- Gradilla de tubos de microcentrifuga con lo siguiente:
 - ◆ Tubo de microcentrifuga del cultivo LB/amp/ara de *E. coli* (EC)
 - ◆ Tubo de microcentrifuga de tampón de elución (EB)
 - ◆ Tubo de microcentrifuga de tampón de lisis (LyB)
- 1,000 µl adicionales (1 ml) del cultivo LB/amp/ara de *E. coli* (obtenido de su profesor en el paso 6)

Equipo y suministros

- Microcentrifuga (se compartirá entre todos los grupos)
- Recipiente de residuos líquidos
- Micropipeta P-200
- Caja de puntas para puntas de pipetas desechables
- Marcador permanente
- Recipiente de residuos (se compartirá entre los grupos)
- Bolsa de residuos con riesgo biológico para materiales que entran en contacto con células de *E. coli* (se compartirá entre los grupos)

MÉTODOS

1. Revise su gradilla para asegurarse de que tiene todos los reactivos que están en la lista para la Parte A.
2. Examine el tubo de *E. coli* (EC) y registre su color en su cuaderno.
3. Antes de que pueda lisar las células, deberá separarlas del medio de crecimiento. Para hacer esto, gire el tubo de EC en la microcentrífuga durante cinco minutos.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Distribuya los tubos uniformemente en la microcentrífuga para que su peso esté equilibrado, asegurándose de que los tubos del mismo volumen estén directamente opuestos entre sí.



DETÉNGASE Y PIENSE: ¿Cómo puede determinar dónde está la RFP en cada paso de separación?

4. Retire con cuidado el tubo de EC de la microcentrífuga para evitar alterar el sedimento sólido que contiene las células bacterianas.
5. Fije la micropipeta P-200 a 200 μ l, coloque una punta nueva en la micropipeta y retire con cuidado el **sobrenadante** (el líquido transparente que se encuentra en la parte superior del precipitado sólido después de centrifugar la mezcla) del tubo de EC sin alterar el sedimento celular. (Puede suministrar el sobrenadante en el recipiente de residuos líquidos).
6. Lleve el tubo de EC a su profesor, quien agregará 1,000 μ l (1 ml) de la cultivo de LB/amp/ara de *E. coli* a su tubo de EC.
7. Repita los pasos 3–5 (haga girar el tubo durante cinco minutos y retire el líquido).



DETÉNGASE Y PIENSE: ¿De qué color es el sobrenadante? ¿El sedimento? ¿Qué contiene cada uno?

8. Invierta el tubo de EC que contiene el sedimento celular y use la micropipeta para extraer la mayor cantidad de líquido posible sin tocar el sedimento celular.



TÉCNICA DE LABORATORIO: asegúrese de usar una punta de micropipeta nueva para cada reactivo para evitar la contaminación.

9. Con una punta de pipeta nueva y la pipeta P-200, agregue 150 μ l de EB al sedimento celular en el tubo de EC.

10. Cierre bien la tapa del tubo de EC y pase el tubo con fuerza a través de la superficie de la gradilla de tubos de microcentrífuga para resuspender las células. Examine el tubo de EC cuidadosamente. Si hay grupos visibles de células, nuevamente pase el tubo por toda la superficie de la gradilla de tubos de microcentrífuga.
11. Con la pipeta P-200, agregue 150 μ l de tampón de lisis (LyB) al tubo de EC. Cierre bien la tapa del tubo de EC y pase con fuerza el tubo por toda la superficie de la gradilla de tubos de microcentrífuga dos veces para mezclar.
12. Etiquete el tubo de EC con su número de grupo y período de clase, y déselo a su profesor. Su profesor incubará las células a temperatura ambiente durante la noche.
13. Coloque todos los tubos de microcentrífuga y las puntas de pipeta en la bolsa de residuos con riesgo biológico.

PARTE B: SEPARAR LA PROTEÍNA FLUORESCENTE ROJA CON CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA.

MATERIALES

Reactivos

- Gradilla para tubos de microcentrífuga con el tubo de microcentrífuga de células lisadas (EC, de la Parte A de este laboratorio)
- Recipientes con lo siguiente:
 - ◆ Búfer de unión (BB)
 - ◆ Tampón de lavado (WB)
 - ◆ Tampón de elución (EB)
 - ◆ Tampón de equilibrio de columna (CEB)

Equipo y suministros

- 2 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Recipiente de residuos líquidos
- Micropipeta P-1,000
- Caja de puntas para puntas de pipetas desechables
- Columna de cromatografía
- Microcentrífuga (se compartirá entre todos los grupos)
- Recipiente de residuos (se compartirá entre los grupos)

MÉTODOS

1. Asigne tareas a su grupo. Haga que una persona se asegure de que sus materiales estén listos (pasos 2–3), que otra persona configure la columna de cromatografía (pasos 4–5), y otra persona haga girar las células lisadas y retire el sobrenadante (paso 6–7).
2. Asegúrese de que tiene todos los reactivos que están en la lista.
3. Etiquete dos tubos de microcentrífuga limpios con “SUPER” y “RFP”.
4. Configure su columna de cromatografía como lo indique su profesor, teniendo cuidado de no abrir la llave de paso unida a la parte inferior del tubo.



TÉCNICA DE LABORATORIO: No permita que la columna se seque.

5. Prepare la columna:
 - a. Coloque el recipiente de recolección de residuos líquidos debajo de la llave de paso.
 - b. Abra cuidadosamente la columna girando la válvula de la llave de paso y permita que el líquido drene en el recipiente de recolección de residuos.
 - c. Una vez que quede aproximadamente de 1 a 2 mm de líquido por encima del lecho de resina, cierre la válvula.
 - d. Asegúrese de que el líquido no drene de la columna al recipiente de residuos.
6. Haga girar el tubo de EC en la microcentrífuga durante cinco minutos para crear un sedimento de restos celulares.



TÉCNICA DE LABORATORIO: Distribuya los tubos uniformemente en la microcentrífuga para que su peso esté equilibrado.



DETÉNGASE Y PIENSE: los tres tampones que utilizará en este laboratorio son el tampón de unión (BB), el tampón de lavado (WB) y el tampón de elución (EB). ¿Cuál es la función de cada uno?

7. Examine el tubo. Debería ver un sobrenadante y un sedimento sólido.



DETÉNGASE Y PIENSE: ¿De qué color es el sobrenadante? ¿El sedimento? ¿Qué contiene cada uno?



TÉCNICA DE LABORATORIO: asegúrese de usar una punta nueva de micropipeta para cada reactivo para evitar la contaminación.

8. Con la pipeta P-1,000, retire con cuidado 200 μ l de sobrenadante de EC sin alterar el sedimento de restos celulares y vierta el sobrenadante al tubo SUPER. Si retira el sedimento de restos celulares, deberá centrifugar el tubo nuevamente.
9. Con una punta nueva, agregue 200 μ l de BB al tubo SUPER. Mezcle bombeando suavemente la solución hacia adentro y hacia afuera.
10. Con la misma punta pero cambiando el volumen, agregue 400 μ l de la mezcla del tubo SUPER a la columna de cromatografía. Suministre cuidadosamente la solución por el costado de la columna para evitar alterar la superficie del lecho de resina.
11. Abra la válvula y permita que la solución en la columna drene en el recipiente de recolección de residuos. Una vez que queden aproximadamente 1 a 2 mm de líquido por encima del lecho de resina, cierre la válvula.
12. Examine la columna y localice la RFP. ¿Se extiende por todo el lecho de resina o parece estar restringido a una sola banda? Registre sus observaciones en su cuaderno.
13. Con una punta nueva, agregue 1,000 μ l (1 ml) de WB suavemente por el costado de la columna de cromatografía. Trate de no alterar la resina.
14. Abra la válvula y permita que la solución en la columna drene en el recipiente de recolección de residuos. Cierre la válvula una vez que quede aproximadamente 1 a 2 mm de líquido por encima del lecho de resina.
15. Examine la columna y localice la RFP. ¿Ha cambiado la ubicación de la RFP en el lecho de resina?
16. Con una punta nueva, agregue 1,000 μ l (1 ml) de EB dos veces (2 ml en total), suavemente por el costado de la columna de cromatografía.
17. Coloque el tubo RFP debajo de la llave de paso. Abra la válvula y permita que la parte del **eluato** (la solución que desaparece) que es roja drene en el tubo de RFP. Cierre la válvula y tape el tubo cuando haya terminado.
18. Coloque el recipiente de recolección de residuos nuevamente debajo de la llave de paso. Abra la válvula y permita que el resto del eluato drene en el recipiente de residuos. Una vez que queden aproximadamente 1 a 2 mm de líquido por encima del lecho de resina, cierre la válvula.
19. Con una punta nueva, agregue 1,000 μ l de CEB dos veces (2 ml en total) a la columna de cromatografía para prepararla para la siguiente clase. Tape la columna con fuerza.
20. Vierta el contenido del recipiente de recolección de residuos por el desagüe del fregadero.
21. Compare su tubo RFP con tubos RFP de otros grupos. ¿Hay alguna diferencia en la intensidad del color de una muestra a otra? Registre sus observaciones en su cuaderno.

PREGUNTAS DEL CAPÍTULO 6

1. ¿Por qué es importante la conformación de una proteína para llevar a cabo su función?
2. ¿Qué propiedades de los aminoácidos en una proteína se relacionan con el plegamiento de proteínas?
3. ¿El eluato que contiene su RFP parece menos brillante o más brillante que en el lisado celular después de la centrifugación? Si hay una diferencia notable en la intensidad del color rojo, ¿qué podría explicar eso?
4. ¿Qué característica de RFP se utiliza como base para la separación por cromatografía en columna?
5. ¿Cómo se puede ajustar o modificar el procedimiento de cromatografía en columna para aumentar la pureza de la muestra de RFP?



¿SABÍA?

Proteínas quiméricas

Cuando determinó qué bacteria captó el plásmido recombinante que tenía el gen *rfp*, pudo ver la colonia transformada porque las bacterias se ven rojas fluorescentes cuando se exponen a la luz. La capacidad de una proteína fluorescente (FP) para “iluminarse” es una herramienta poderosa que está revolucionando la biología celular y la investigación biomédica. Numerosas FP de diferentes organismos se han aislados e incluso mutado para proporcionar un conjunto de herramientas de “etiquetas” de FP. Los FP se pueden unir a otras moléculas para controlar los procesos que ocurren dentro de las células y en el cuerpo en su conjunto.

La función de una proteína está directamente relacionada con su conformación, que es el resultado del plegamiento de proteínas. Otra información importante que arroja luz sobre el papel de una proteína es su distribución, movimiento, interacciones y asociación con otras proteínas. Para visualizar estos aspectos de una proteína, los científicos crean una molécula, conocida como **proteína de fusión** o una **proteína quimérica** (una quimera es un animal mítico que tiene partes de diferentes animales) que contiene tanto la proteína de interés como una FP fusionada. Los científicos pueden medir la fluorescencia desde un solo FP, haciendo que las proteínas de fusión sean potentes herramientas de visualización. Sin embargo, este procedimiento solo funciona si el FP no interfiere con la función de la proteína, por lo que se realizan pruebas para garantizar que una proteína en particular actúe igual con y sin la etiqueta FP.

GLOSARIO DEL CAPÍTULO 6

Sitio de unión: es el área de una biomolécula que se une a una sustancia específica o parte de una sustancia.

Tampón: es una solución que resiste los cambios en el pH, que contiene un ácido débil y su sal o una base débil y su sal.

Proteína quimérica: es una proteína creada al unir dos o más genes que originalmente codificaron proteínas separadas.

Colonia: es un grupo del mismo tipo de organismos que viven juntos, generalmente 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).

Cromatografía en columna: es un método para separar sustancias, en el que las sustancias se disuelven en un líquido que se deja fluir a través de una columna de vidrio llena de pequeñas cuentas. Las cuentas están recubiertas con un material que une las sustancias en diferentes grados.

Conformación: La forma o estructura tridimensional de algo.

Fase de la muerte: es el período de crecimiento bacteriano en un cultivo cuando las bacterias se quedan sin nutrientes y mueren.

Puente disulfuro: es un enlace único covalente entre los átomos de azufre y dos aminoácidos.

Eluato: es la solución que lava (por ejemplo, la solución que gotea de una columna de cromatografía).

Elución: es el proceso que consiste en extraer una sustancia que está unida a otra lavándola con una solución.

Proteína de fusión: *ver proteína quimérica.*

Glucosilación: es un proceso en el que un carbohidrato se une de manera covalente a otra molécula.

Factor de crecimiento hematopoyético: es un grupo de proteínas que promueve el crecimiento, la diferenciación y la actividad de las células sanguíneas.

Hormonas: son sustancias que actúan como mensajeros químicos en el cuerpo.

Hidrofílico: atraído por el agua; se disuelve en agua; es polar. Algunos ejemplos son el azúcar y la sal.

Hidrofóbico: rechazo al agua; no se disuelve en agua; no es polar. Algunos ejemplos son el aceite, la cera y RFP.

Fase de latencia: es el período de crecimiento bacteriano en un cultivo cuando las bacterias se adaptan a las condiciones de crecimiento; las bacterias individuales están madurando y aún no pueden dividirse.

Fase de registro: es el período de crecimiento bacteriano en un cultivo cuando el número de células bacterianas se duplica en un período fijo de tiempo (también conocido como fase logarítmica o exponencial).

Lisis: Ruptura.

Anticuerpo monoclonal: es un tipo de proteína que se une a sustancias en el cuerpo y está formada por clones de una célula creada en el laboratorio.

Fosforilación: es un proceso en el que un compuesto orgánico absorbe o se combina con ácido fosfórico o un grupo que contiene fósforo.

Polipéptido: es una molécula lineal larga que inmediatamente se pliega en una conformación tridimensional específica, que llamamos *proteína*.

Plegamiento de proteínas: es el proceso físico por el cual un polipéptido se pliega en su característica estructura tridimensional, que es esencial para la función de la proteína.

Resina: es el material utilizado en una columna de cromatografía para recubrir las cuentas.

Fase estacionaria: es el período de crecimiento bacteriano en un cultivo cuando la población permanece igual porque las tasas de división celular y muerte celular son iguales. Esto se debe a menudo a un factor limitante del crecimiento, como el agotamiento de un nutriente esencial.

Sobrenadante: es el líquido transparente que se encuentra en la parte superior de un precipitado sólido después de haber centrifugado una mezcla.

Cultivo en suspensión: es un método para cultivar células en un medio de crecimiento líquido que se mueve agitando o revolviendo. El movimiento mezcla aire en la suspensión y evita que las bacterias se asienten fuera de la solución.

Demanda de tratamiento: se refiere a las necesidades de los pacientes.

Vacuna: es una mezcla que contiene bacterias o virus muertos o debilitados que hace que el sistema inmunitario del cuerpo produzca anticuerpos que se unirán a una bacteria o para hacer que un virus combata una enfermedad.

