KIT EDUCATIVO

Transformación de *E. coli* para la obtención de colonias fluorescentes

TBED27-20

| 20 ESTUDIANTES | INTERMEDIO

www.tiarisbiosciences.com

Experiencia docente de +1 módulo

Número de estudiantes

Complejidad de la práctica

© Tiaris Biosciences | v01.2026

Tiaris Biosciences
PT Rabanales 21, Edif Aldebarán
c/ Astrónoma Cecilia Payne s/n. Córdoba. España
info@tiarisbiosciences.com

CONTENIDOS

1 Introducción 4

1.1. La transformación bacteriana como herramienta de la ingeniería genética. 4

1.2. Los plásmidos como vectores de ADN 4

2 Objetivos de la Práctica 5

3 Material incluido 6

4 Material requerido (*no suministrado*) 6

5 Descripción de la Práctica de Laboratorio 7

5.1. Preparaciones previas al procedimiento experimental 8

5.2. Obtención de células químicamente competentes 8

5.3. Transformación de las células obtenidas 9

1 INTRODUCCIÓN

1.1. LA TRANSFORMACIÓN BACTERIANA COMO HERRAMIENTA DE INGENIERÍA GENÉTICA

La **transformación bacteriana** es un proceso de transferencia genética mediante el cual una bacteria incorpora ADN procedente del medio extracelular. La adquisición de este material genético puede conferir nuevas características a la célula receptora y constituye un mecanismo de gran interés para comprender la variabilidad genética y la capacidad de adaptación de los microorganismos.

En determinadas especies bacterianas, la transformación ocurre de forma natural y depende de mecanismos celulares específicos que permiten captar ADN del entorno. En el laboratorio, sin embargo, este proceso puede inducirse artificialmente para introducir moléculas de ADN diseñadas con fines experimentales. Esta estrategia constituye una de las herramientas fundamentales de la ingeniería genética y permite estudiar la función de los genes, amplificar secuencias de ADN y producir proteínas recombinantes.

Sin embargo, las bacterias no incorporan ADN de forma eficiente en condiciones normales. Para favorecer este proceso es necesario utilizar células que hayan adquirido un estado fisiológico denominado **competencia**. Existen diferentes métodos para conseguirlo, entre ellos los tratamientos químicos y la electroporación.

La eficiencia de transformación depende de numerosos factores. Entre ellos se encuentran la competencia de las células, la calidad y cantidad del ADN, las características del vector y el proceso de transformación. Por ello, no todo el ADN añadido a una preparación de células competentes acaba entrando en una célula, ni todas las células que incorporan ADN necesariamente mantienen una molécula funcional.

Una de las bacterias más utilizadas en estos procedimientos es la bacteria gramnegativa *Escherichia coli*, un microorganismo modelo caracterizado por su rápido crecimiento, su facilidad de cultivo y el amplio conocimiento de su genética y fisiología. La introducción de plásmidos en células de *E. coli* permite utilizar esta bacteria como hospedadora para mantener y multiplicar moléculas de ADN exógeno.

1.2. LOS PLÁSMIDOS COMO VECTORES DE ADN

Los plásmidos son moléculas de ADN, generalmente circulares y de doble cadena, que pueden replicarse de manera independiente del cromosoma bacteriano. En biología molecular se

emplean como vectores para introducir y mantener secuencias genéticas en una célula hospedadora.

Tras la entrada del plásmido, es necesario distinguir las células transformadas de aquellas que no han incorporado el vector. Para ello se utiliza un marcador seleccionable, habitualmente un gen que confiere resistencia a un determinado antibiótico o el empleo de proteínas fluorescentes o de colores. En el caso de los genes de resistencia, cuando las células se cultivan en un medio que contiene el agente de selección, únicamente aquellas que poseen el gen de resistencia pueden crecer. La aparición de colonias, por tanto, constituye una evidencia indirecta de que se ha producido la incorporación y mantenimiento del plásmido.

Además del marcador de selección, los plásmidos utilizados en ingeniería genética incorporan elementos que cumplen funciones específicas. Entre ellos se encuentra el origen de replicación, necesario para que el ADN plasmídico pueda multiplicarse dentro de la bacteria; el sitio múltiple de clonación, zona que concentra distintas secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción y que ofrece cierta flexibilidad para introducir los genes de interés. En función del objetivo experimental los plásmidos pueden incluir otras secuencias como son promotores específicos para la transcripción, orígenes de replicación para otros sistemas biológicos, secuencias para generar virus, entre otras.

La incorporación del plásmido no implica automáticamente que todos sus genes se expresen. Para que un gen codificante de una proteína de lugar a un producto funcional, su información debe transcribirse a ARN mensajero y traducirse posteriormente en una cadena polipeptídica que alcance una conformación adecuada. La actividad resultante dependerá, además, de la regulación de la expresión génica y de las condiciones fisiológicas de la célula.

2 OBJETIVOS DE LA PRÁCTICA

Está práctica docente está diseñada para comprender la transformación bacteriana como herramienta de la ingeniería genética. Para ello los estudiantes llevarán a cabo el proceso de obtención de células bacterianas competentes y su transformación con el vector fuGFP, codificante de la proteína verde fluorescente (GFP). El crecimiento de las células transformadas en medio selectivo permitirá observar el cambio de fenotipo mediante la resistencia a kanamicina y la obtención de colonias fluorescentes.

3 MATERIAL INCLUIDO

El kit incluye los siguientes reactivos

Componentes	TBED27-20	Almacenamiento
Vial *Escherichia coli (DH5α)*	300 µL	-20 °C
Placas de Petri	25 placas	25 °C
Espátula de Drigalsky	20 unidades	25 °C
Asa de siembra	20 unidades	25 °C
Medio sólido Luria Bertani (LB)	2 x 150 mL 1 x 100 mL	25 °C
Medio líquido Luria Bertani (LB)	2 x 20 mL	25 °C
Solución de $CaCl_2$ (0,1M)	30 mL	25 °C
Solución de Kanamicina (10 mg/mL)	400 µL	-20 °C
Vector de Transformación (fuGFP)(20 ng/ µL)	2 x 55 µL	-20 °C

ATENCIÓN:

- *Los materiales y reactivos incluidos en este kit se suministran estériles. Deben abrirse y utilizarse en condiciones que garanticen el mantenimiento de la esterilidad.*
- *La cepa de E. coli utilizada no es patógena; aun así, debe manipularse utilizando guantes de protección y en condiciones de asepsia.*

4 MATERIAL REQUERIDO (*no suministrado*)

Para la ejecución de la práctica se requiere:

- Guantes de laboratorio
- Micropipetas P10, P200 y P1000 y sus puntas correspondientes
- Viales 1,5 mL
- Incubador de 37° C
- Baño de agua termostado (42°C)
- Microcentrífuga
- Hielo picado
- Transiluminador

5 DESCRIPCIÓN DE LA PRÁCTICA DE LABORATORIO

En esta práctica se realizará la transformación de la cepa DH5α de *Escherichia coli* con el plásmido fuGFP, codificante de la proteína verde fluorescente (GFP). La adquisición del plásmido confiere a las células que lo portan, el gen de resistencia a kanamicina y el gen GFP que hacen que la colonia sea resistente a kanamicina y adquiera un color verde fluorescente a la luz ultravioleta.

DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA AL FENOTIPO

El objetivo de esta experiencia

La introducción de un gen exógeno y la visualización de su expresión mediante fluorescencia permiten comprender cómo la incorporación de nueva información genética puede dar lugar a una característica observable en la célula bacteriana.

La resistencia a antibióticos constituye uno de los marcadores de selección más utilizados en los procedimientos de transformación bacteriana. En el sistema empleado en esta práctica, el plásmido contiene el gen aminoglucósido 3' fosfotransferasa, el cual confiere resistencia a la kanamicina. Esta enzima añade un grupo fosfato a la molécula de kanamicina, causando la pérdida de la afinidad del antibiótico por el ribosoma bacteriano, concretamente por la subunidad 30S. Como ya no puede unirse a su diana, el antibiótico deja de interferir en la síntesis de proteínas de la bacteria, permitiendo que las bacterias portadoras del marcador puedan crecer en presencia del antibiótico.

Por tanto, el crecimiento en presencia de kanamicina permite seleccionar las bacterias que presentan el fenotipo de resistencia. En el contexto de esta práctica, este crecimiento constituye una evidencia indirecta de que las células mantienen y expresan el marcador de resistencia asociado al plásmido.

La observación de colonias fluorescentes depende de la expresión del gen de la proteína verde fluorescente (*GFP, Green Fluorescent Protein*) incluido también en el plásmido. GFP es una proteína que emite fluorescencia verde cuando es excitada con luz de una longitud de onda adecuada. Fue identificada originalmente en la medusa *Aequorea victoria* y se ha convertido en una de las herramientas más utilizadas en biología molecular y celular.

El gen que codifica GFP puede incorporarse a vectores plasmídicos para estudiar la expresión génica y visualizar procesos biológicos. Cuando una célula incorpora el vector y expresa correctamente este gen, produce la proteína GFP, cuyo cromóforo adquiere capacidad fluorescente tras un proceso de maduración que no requiere la adición de sustratos externos.

En esta práctica, la expresión de GFP permite visualizar directamente el resultado de la transformación bacteriana, convirtiendo la incorporación de información genética en una característica fenotípica fácilmente observable.

En condiciones experimentales adecuadas, las colonias fluorescentes que crecen en presencia de kanamicina indican la presencia y expresión funcional de los marcadores descritos. No obstante, la confirmación definitiva de la identidad del plásmido o de una secuencia específica requiere métodos adicionales, como el análisis del ADN plasmídico o técnicas moleculares de identificación.

5.1. PREPARACIONES PREVIAS AL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

- Antes de comenzar, asegúrese de disponer de un recipiente con hielo para los pasos de incubación en hielo.
- Prepare un baño de agua a 42 °C. Compruebe con un termómetro la temperatura del baño, ya que esta no debe superar los 42 °C.
- Atemperar a 37°C las placas preparadas con Medio Selectivo en un incubador.

5.2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS QUÍMICAMENTE COMPETENTES

Cada grupo de trabajo obtendrá una placa de cultivo con la bacteria Escherichia coli que hará químicamente competente haciendo uso de $CaCl_2$.

1. Dispensar **500 µL del medio líquido LB** en un vial de 1,5 mL estéril.
2. Añadir aproximadamente entre **20-25 colonias de la placa de *E. coli*** utilizando para ello un asa de siembra (en caso de no contar con colonias aisladas puede coger una asada del cultivo de aproximadamente 1 cm de largo). Asegurarse que todas las bacterias quedan en el medio, resuspender suavemente con pipeta.
3. Centrifugar a 12.000 rpm durante 2 minutos y eliminar el sobrenadante con la pipeta. No dejar residuos del medio y cuidar de no tocar el pellet.
4. Añadir **500 µL de la Solución de $CaCl_2$ (0,1 M) frío** al pellet celular.
5. Resuspender **suavemente** con micropipeta (P200) las colonias en la solución cuidando que estas queden completamente disueltas. Es importante pipetear con suavidad las células pues son muy sensibles en esta solución.
6. Incubar en hielo 5 minutos.
7. Centrifugar a 12.000 rpm 2 minutos y eliminar el sobrenadante con la pipeta, no tocar el pellet celular.
8. Resupender suavemente el pellet con 50 µL de la Solución de $CaCl_2$ (0,1 M), sin hacer espuma, asegurándose que la solución bacteriana es homogénea. Colocar en hielo hasta su utilización.

Las células preparadas son células químicamente competentes y deben ser usadas tan pronto termine este paso.

5.3. TRANSFORMACIÓN DE LAS CÉLULAS OBTENIDAS

Para la transformación se emplearán las células obtenidas en la Actividad 5.2.

1. Atemperar a 37ºC las placas con Medio Selectivo en un incubador.
2. A los **50 µL de células competentes** obtenidas, añadir **5 µL de Vector de Transformación fuGFP**.
3. Mezclar suavemente dando unos golpecitos con los dedos contra el tubo.
4. Incubar durante 30 minutos en hielo.
5. Incubar en baño de agua durante 2 minutos a 42ºC (no pasar el tiempo de incubación). Incubar 5 minutos en hielo.
6. Añadir a la mezcla de transformación 1 mL de LB e incubar a 37ºC durante 30 minutos con agitación, para darle expresión al gen de resistencia a kanamicina.

   Si no tuviera posibilidad de incubar con agitación, incubar en estático.
7. Centrifugar a 13.000 rpm durante 2 minutos. Eliminar el sobrenadante volcando el tubo. Resuspender el pellet con el volumen residual de medio LB.
8. Añadir la mezcla en el centro de una placa Petri preparada con el medio selectivo y atemperada previamente a 37ºC, esparcir por toda la superficie usando la espátula de Drigalsky. Las células transformadas deben quedar extendidas en toda la superficie de la placa de forma homogénea para lograr obtener colonias aisladas.
9. Colocar las placas en un incubador a 37ºC e incubar de 16 a 24 horas.
10. El color de las colonias se puede ver con luz natural mientras que las colonias fluorescentes se pueden ver colocando la placa en el transiluminador de luz azul o ultravioleta.

    Para visualizar una mayor intensidad en el color de las colonias, conservar las placas a 4ºC durante 3 días.