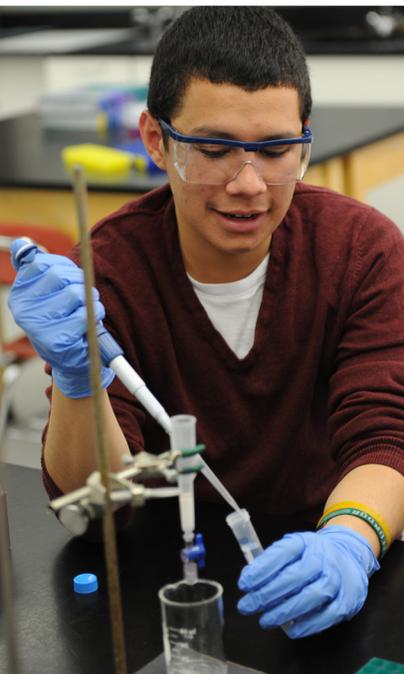
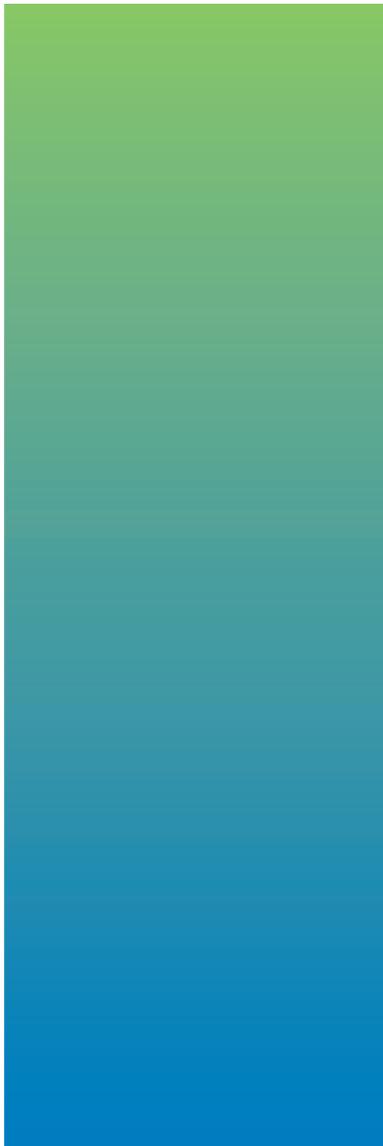


# AMGEN® Biotech Experience

Descubrimiento científico para el aula

## Guía del profesor





## AGRADECIMIENTOS

La Fundación Amgen y el Centro de Desarrollo Educativo (EDC) están especialmente agradecidos con el siguiente personal del programa Amgen Biotech Experience (ABE), revisores docentes y maestros piloto que proporcionaron sugerencias y comentarios valiosísimos: Tracy Bailey-Gates, Tara Bennett Bristow, Ann Cortina, Anu Deshpande, Carol Fujita, Anne Gundry, Martin J. Ikkanda, Wendie Johnston, Mary Liu, Grace Montgomery, Alia Qatarneh, Todd Ryan, Christina Schramm, Lisa Sequeira, Karin Steinhauer, Karen Stephens, Sherry Tsai, David Upegui, Amy Welch, Wendy Wooten y Jo Wu.

También queremos agradecer a Takara Bio USA, Inc. y la Universidad de California en San Diego, que nos permitieron emplear el gen rojo fluorescente *tdTomato* en este programa.

Finalmente, agradecemos al personal de Amgen pasado y presente, cuyo compromiso y valioso aporte han mantenido el programa relevante y alineado con las prácticas actuales de la industria.



# HISTORIA DEL PROGRAMA

## LOS PIONEROS DE AMGEN BIOTECH EXPERIENCE

*“Los pioneros abren caminos para que los que siguen continúen recorriéndolos”.*

- Autor desconocido

A pesar de que la experiencia de Amgen Biotech ahora llega a casi 100,000 alumnos y 1,500 profesores cada año, el programa tuvo comienzos humildes. Todo comenzó con un grupo de científicos y profesores que tenían pasión por compartir sus conocimientos con los alumnos.

En 1989, el biólogo molecular Bruce Wallace, Director Ejecutivo Científico Steve Elliot (ahora retirado) y otros en Amgen, consideraron que la compañía podría ser fundamental para facilitar el desarrollo profesional de los profesores de secundaria del área, con el objetivo de mejorar la educación científica impartida a los alumnos. Realizaron una convocatoria entre los profesores de biología interesados en un programa de prácticas profesionales durante el verano.

Intrigado, Hugh Nelson, un profesor de secundaria de Thousand Oaks, California, respondió a la invitación. Nelson se dedicó a aprender los procedimientos que emplea Amgen para desarrollar productos biológicos, y trabajó con un científico de Amgen para adecuar una serie de laboratorios para alumnos de secundaria. Amgen acordó facilitar equipos y productos químicos para enseñar los procedimientos de laboratorio en las escuelas secundarias del área.

Dos años después, Amgen lanzó el programa escolar oficial en las escuelas del condado de Ventura en California. Dos años después del lanzamiento, 1,300 alumnos de 12 escuelas locales participaron en el programa.

“Los laboratorios ponen a los alumnos en contacto con la realidad de la ciencia moderna”, indica Nelson. “Se necesita dinero para hacer experimentos, y Amgen aportó los fondos necesarios para este importante programa transformador. No estoy menos impresionado con el programa [ahora] de lo que estaba en 1989”.

En 1999, Amgen reclutó a Marty Ikkanda, profesor de ciencias biológicas de Pierce College en Woodland Hills, California, para que revisase el plan de estudios del programa y lograra que se pareciera a sus clases universitarias. El programa revisado se implementó en 20 escuelas el siguiente año escolar, y el número llegó a 30 al final del año escolar.

“Los profesores nos dicen que no tienen problemas de asistencia cuando realizan los laboratorios de biotecnología de Amgen”, afirma Ikkanda, quien se retiró del programa en 2013. “Es una forma fantástica de lograr que los alumnos se interesen en la ciencia”.

En 2005, con el creciente interés de los profesores de biología de otras comunidades, la Fundación Amgen, el principal brazo filantrópico de Amgen, se asoció con el profesor Ikkanda para ampliar el programa. Durante varios años, el programa se amplió a nuevas comunidades de Amgen en Estados Unidos y Europa.

En 2013, la Fundación Amgen unió fuerzas con el Centro de Desarrollo Educativo, una organización global sin fines de lucro con profunda experiencia y conocimientos en educación científica, para establecer una Oficina del programa con el fin de apoyar y fortalecer el programa. El programa ha seguido ampliándose a nuevas comunidades de Amgen a nivel internacional.

Una colaboración que comenzó hace casi 30 años inspiró el compromiso continuo de científicos y profesores para compartir su conocimiento y pasión por la ciencia. La Fundación Amgen se enorgullece de continuar apoyando un programa que hoy es más fuerte que nunca, y está preparado para llevar la biotecnología del mundo real a una nueva generación de profesores y alumnos. “Ese espíritu pionero distingue a Amgen”, afirma Eduardo Cetlin, presidente de la Fundación Amgen. “Siempre estaremos agradecidos con esos primeros colaboradores por formar las raíces de este poderoso programa”.

[Visite el sitio web de ABE en \*\*www.amgenbiotechexperience.com\*\*](http://www.amgenbiotechexperience.com)

# ÍNDICE

## DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PLAN DE ESTUDIOS

	OV-1
Introducción	OV-1
Contenido del plan de estudios de ABE	OV-2
Descripción general del contenido	OV-4
Conexiones con el plan de estudios de biología	OV-6
Conexiones con los estándares académicos	OV-7
Supuestos de conocimientos y habilidades previas	OV-14
Evaluación del aprendizaje estudiantil	OV-14
Seguridad del laboratorio	OV-15
Preparación de materiales	OV-17
Información pedagógica adicional	OV-32

## PESTAÑA A

### INTRODUCCION AL PROGRAMA

	A-1
Descripción general	A-3
Preparación	A-5
Enseñanza	A-5
<i>Sesión 1</i>	A-5
<i>Sesión 2</i>	A-6

### CAPÍTULO 1: ALGUNAS HERRAMIENTAS DEL TRABAJO

	A-9
Descripción general	A-11
Preparación	A-13
Enseñanza	A-17
<i>Sesión 1</i>	A-17

<i>Sesión 2</i>	A-21
Antecedentes científicos: movimiento de colorantes en la electroforesis en gel	A-25
<i>Sesión 3 (Opcional)</i>	A-26

## PESTAÑA B

<b>CAPÍTULO 2: ¿CÓMO SE COMIENZA A CLONAR UN GEN?</b>	<b>B-1</b>
Descripción general	B-3
Preparación	B-5
Enseñanza	B-8
<i>Sesión 1</i>	B-8
Antecedentes científicos: clonación	B-10
Antecedentes científicos: ¿por qué hay promotores bacterianos en los plásmidos?	B-12
<i>Sesión 2 (Opcional)</i>	B-12
<i>Sesión 3</i>	B-14
Antecedente científico: enzimas de restricción	B-15
<i>Sesión 4</i>	B-16
Antecedente científico: los componentes del plásmido pARA-R	B-21

<b>CAPÍTULO 3: CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE</b>	<b>B-23</b>
Descripción general	B-25
Preparación	B-26
Enseñanza	B-28
<i>Sesión 1</i>	B-28
Antecedente científico: replicación del ADN	B-29
Antecedente científico: las enzimas de la replicación del ADN	B-31
<i>Sesión 2</i>	B-32

<b>CAPÍTULO 4: ASEGURARSE DE QUE SE CREÓ UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE</b>	<b>B-39</b>
Descripción general	B-41
Preparación	B-42
Enseñanza	B-47
<i>Sesión 1</i>	B-47
<i>Sesión 2</i>	B-49
<i>Sesión 3</i>	B-55

**CAPÍTULO 5: CONSEGUIR PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN BACTERIAS** **B-59**

Descripción general	B-61
Preparación	B-63
Enseñanza	B-65
<i>Sesión 1</i>	B-65
Antecedente científico: el dogma central y la transcriptasa inversa	B-67
<i>Sesión 2</i>	B-69
<i>Sesión 3</i>	B-75

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

Descripción general	C-3
Preparación	C-5
Enseñanza	C-7
<i>Sesión 1</i>	C-7
Antecedentes científicos: ¿por qué hay promotores bacterianos en los plásmidos?	C-11
<i>Sesión 2 (Opcional)</i>	C-11
<i>Sesión 3</i>	C-13
Antecedentes científicos: enzimas de restricción	C-14
<i>Sesión 4</i>	C-15
Antecedente científico: los componentes del plásmido pARA-R	C-20

**CAPÍTULO 4A: ASEGURARSE DE QUE SE CREÓ UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE** **C-23**

Descripción general	C-25
Preparación	C-27
Enseñanza	C-31
<i>Sesión 1</i>	C-31
<i>Sesión 2</i>	C-33
<i>Sesión 3</i>	C-38

**CAPÍTULO 5A: INSERTAR PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN BACTERIAS** **C-41**

Descripción general	C-43
Preparación	C-45
Enseñanza	C-47
<i>Sesión 1</i>	C-47

Antecedente científico: el dogma central y la transcriptasa inversa	C-49
<i>Sesión 2</i>	C-51
<i>Sesión 3</i>	C-57

## PESTAÑA D

<b>CAPÍTULO 5B: INSERTAR PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN BACTERIAS</b>	<b>D-1</b>
Descripción general	D-3
Preparación	D-6
Enseñanza	D-8
<i>Sesión 1</i>	D-8
Antecedente científico: ¿por qué los promotores bacterianos están en los plásmidos?	D-11
<i>Sesión 2 (Opcional)</i>	D-12
<i>Sesión 3</i>	D-13
Antecedente científico: enzimas de restricción	D-15
Antecedente científico: los componentes del plásmido pARA-R	D-16
<i>Sesión 4</i>	D-17
<i>Sesión 5</i>	D-18
<i>Sesión 6</i>	D-24

## PESTAÑA E

<b>CAPÍTULO 6: CONSEGUIR LO QUE NECESITAMOS</b>	<b>E-1</b>
Descripción general	E-3
Preparación	E-5
Enseñanza	E-8
<i>Sesión 1</i>	E-8
<i>Sesión 2</i>	E-10
Antecedente científico: insulina recombinante	E-15
<i>Sesión 3</i>	E-15

## COPIAS MAESTRAS REPRODUCIBLES (RM)

Laboratorio 1.3: Examen de la precisión de micropipetas	RM 1
Clone ese gen: diagrama de plásmido	RM 2
Clone ese gen: secuencia de ADN humano	RM 3
Laboratorio 4: Diagrama de escalera de ADN	RM 4
Laboratorio 4A: Diagrama de escalera de ADN	RM 4A
Predicciones de crecimiento bacteriano	RM 5

**OV**

**AMGEN<sup>®</sup> Biotech Experience**

Scientific Discovery for the Classroom

**AMGEN<sup>®</sup> Foundation**





# DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PLAN DE ESTUDIOS

## INTRODUCCIÓN

---

La integración de ABE en su aula es una oportunidad única e importante para usted y sus alumnos. Para ayudarlo a desarrollar el conocimiento y las prácticas del contenido científico de los alumnos, así como para ofrecer una aplicación del mundo real, el material de esta sección cubre el *qué, por qué y cómo* del plan de estudios: el contenido de la ciencia que se trata, los principios y prácticas de enseñanza y aprendizaje empleados, y las consideraciones prácticas para implementar el curso. Leer esta sección *antes de* comenzar mejorará su forma de enseñar y los beneficios que los alumnos obtienen de ella.

Los laboratorios de ABE son similares a algunos de los importantes pasos que la industria de biotecnología farmacéutica utiliza para fabricar fármacos (proteínas terapéuticas) para tratar una serie de enfermedades. La biotecnología proporciona las herramientas y técnicas a la investigación farmacéutica moderna y al desarrollo de fármacos, y es fundamental que los futuros ciudadanos conozcan este campo. Las técnicas de biotecnología comunes se utilizan para desarrollar una amplia gama de productos, desde la insulina, que salva vidas, hasta una enzima que aumenta el contenido de vitaminas del arroz y una vacuna humana expresada en una planta. Los laboratorios se centran en estas técnicas para que sus alumnos comprendan mejor las herramientas de la biotecnología y puedan comenzar a considerar el impacto potencial de esta industria en nuestro futuro. Además, al participar en este programa, los alumnos pueden estar más motivados para comprender los conceptos científicos subyacentes y tal vez incluso seguir carreras relacionadas con las ciencias.

Las experiencias de laboratorio como las que proporciona este programa son extremadamente importantes en la educación científica, ya que ofrecen oportunidades para hacer que la ciencia sea “real” y relevante para los alumnos y, además, les permite utilizar las herramientas y técnicas profesionales de biotecnología para investigar cuestiones científicas. Las experiencias eficientes de laboratorio pueden hacer lo siguiente:

- Mejorar la comprensión de los alumnos sobre el contenido y los conceptos fundamentales de las ciencias.
- Ayudar a los alumnos a desarrollar habilidades científicas y prácticas de razonamiento.
- Aumentar la comprensión de los alumnos sobre la complejidad y la ambigüedad de la investigación científica.

- Permitir que los alumnos desarrollen habilidades académicas, interpersonales e intrapersonales importantes que son necesarias para su éxito futuro, incluida la resolución de problemas, el pensamiento crítico y el trabajo en equipo.

## CONTENIDO DEL PLAN DE ESTUDIOS DE ABE

---

La secuencia completa de los laboratorios de ABE hace que los alumnos sigan los mismos procedimientos que emplean los científicos para introducir un gen que codifica una proteína terapéutica humana en las bacterias. Inducen a las bacterias a reproducir y expresar la proteína y luego cosechan la proteína humana de las bacterias. En estos laboratorios, los alumnos producirán una molécula de ADN recombinante que consiste en un plásmido bacteriano diseñado y sus elementos de control (origen de replicación, gen de resistencia a la ampicilina y el operón arabinosa) y un gen de la anémona de mar, *Discosoma* sp. Al gen de la anémona de mar se le conoce como el gen de la proteína fluorescente roja (*rfp*). Los genes *rfp* codifican la proteína fluorescente roja (RFP), una proteína que permite que la anémona de mar sea fluorescente. Los científicos emplean el RFP como un gen reportero en estudios biológicos. Al unir el gen *rfp* a un gen que les interesa estudiar, pueden asegurarse de que el gen de interés se expresa o identificar la ubicación de una proteína en una célula.

Una vez que los alumnos han producido el plásmido de ADN recombinante, lo usan para transformar *Escherichia coli* (*E. coli*). Las células transformadas se esparcen sobre la superficie de una placa de agar que contiene ampicilina y arabinosa, un monosacárido de cinco carbonos necesario para la expresión génica de *rfp*. Las colonias bacterianas que expresan el gen *rfp* aparecerán de color rojo (o rosa brillante). Las células de una de estas colonias rojas se transfieren a un medio de cultivo líquido para replicarse, y las células se cosechan y se lisan (se rompen) para liberar la RFP dentro de la solución. Luego, esta solución se fracciona en una columna de cromatografía, y la RFP se purifica de otras proteínas que existen en el lisado celular en función de su hidrofobicidad.

El proceso para hacer una proteína terapéutica humana es muy similar, aunque las colonias de bacterias recombinantes no pueden identificarse por su expresión de RFP. Al hacer una proteína terapéutica humana, debe darse otro paso: las colonias que crecieron en la placa que contiene ampicilina deben cultivarse después en una placa que contiene otro antibiótico, la tetraciclina. El gen para la tetraciclina se interrumpe cuando se introduce el gen humano, y las bacterias de las colonias recombinantes no sobrevivirán en la placa que contiene tetraciclina. Las células de las colonias que no pudieron sobrevivir en placas de tetraciclina se cultivan y se lisan para liberar la proteína terapéutica humana, que luego se purifica.

Los alumnos que lleven a cabo la secuencia completa del laboratorio de ABE producirán una molécula de ADN recombinante que luego usarán para transformar *E. coli*. Esto los ayudará a comprender mejor cómo utilizar las herramientas y técnicas de biotecnología y los procedimientos utilizados para fabricar proteínas terapéuticas humanas. Cuando comienza el programa por primera vez o si su tiempo es limitado, puede ser un desafío terminar la secuencia completa de ingeniería

genética. El plan de estudios de ABE incluye múltiples secuencias para adaptarse a una variedad de situaciones en el aula. En las cuatro secuencias, los alumnos realizan la lectura introductoria y completan el primer conjunto de laboratorios (Tab A). Vea previamente las secuencias de laboratorio de ABE descritas en la **Tabla OV.1** a continuación y decida cuál seguirá cada una de sus clases.

**Tabla OV.1: Posibles secuencias de laboratorio de ABE y contenido cubierto en cada uno**

Secuencia	Pestaña	Contenido	Número de sesiones
Secuencia completa de ingeniería genética (sesiones 18–20)	Pestaña A	<b>Introducción:</b> Los alumnos leen sobre las industrias de la biotecnológica y la biofarmacéutica.	2
		<b>Laboratorio 1:</b> Los alumnos aprenden a usar dos herramientas básicas de laboratorio de biotecnología: las micropipetas y la electroforesis en gel.	2–3
	Pestaña B	<b>Laboratorio 2:</b> Los alumnos aprenden cómo se hacen los plásmidos. En el laboratorio, hacen un plásmido que contiene el gen <i>rfp</i> .	3–4
		<b>Laboratorio 3:</b> Los alumnos ligan su plásmido.	2
		<b>Laboratorio 4:</b> Los alumnos comprueban que tienen el plásmido recombinante correcto.	3
	Pestaña E	<b>Laboratorio 5:</b> Los alumnos transforman las bacterias usando el plásmido recombinante, luego cultivan las bacterias transformadas.	3
<b>Laboratorio 6 (opcional):</b> Los alumnos extraen y purifican la proteína producida dentro de las bacterias por el gen <i>rfp</i> .		3	
Secuencia abreviada de ingeniería genética (sesiones 16–18)	Pestaña A	<b>Introducción:</b> Los alumnos leen sobre las industrias de la biotecnológica y la biofarmacéutica.	2
		<b>Laboratorio 1:</b> Los alumnos aprenden a usar dos herramientas básicas de laboratorio de biotecnología: las micropipetas y la electroforesis en gel.	2–3
	Pestaña C	<b>Laboratorio 2A:</b> Los alumnos aprenden cómo se hacen los plásmidos. En el laboratorio, los alumnos usan enzimas de restricción para crear fragmentos de ADN que contienen el gen <i>rfp</i> .	3–4
		<b>Laboratorio 4A:</b> Los alumnos comprueban que tienen el plásmido recombinante correcto.	3
		<b>Laboratorio 5A:</b> Los alumnos transforman las bacterias usando el plásmido recombinante, luego cultivan las bacterias transformadas.	3
	Pestaña E	<b>Laboratorio 6 (opcional):</b> Los alumnos extraen y purifican la proteína producida dentro de las bacterias por el gen <i>rfp</i> .	3
Enfoque en la secuencia de bacterias (sesiones 12–14)	Pestaña A	<b>Introducción:</b> Los alumnos leen sobre las industrias de la biotecnológica y la biofarmacéutica.	2
		<b>Laboratorio 1:</b> Los alumnos aprenden a usar dos herramientas básicas de laboratorio de biotecnología: las micropipetas y la electroforesis en gel.	2–3
	Pestaña D	<b>Laboratorio 5B:</b> Los alumnos aprenden cómo se hacen los plásmidos. En el laboratorio, agregan un plásmido que contiene el gen <i>rfp</i> a las bacterias, creando así un organismo genéticamente modificado. Cultivan las bacterias.	5–6
	Pestaña E	<b>Laboratorio 6 (opcional):</b> Los alumnos extraen y purifican la proteína producida dentro de las bacterias por el gen <i>rfp</i> .	3
Introducción a la secuencia de biotecnología (sesiones 4–5)	Pestaña A	<b>Introducción:</b> Los alumnos leen sobre las industrias de la biotecnológica y la biofarmacéutica.	2
		<b>Laboratorio 1:</b> Los alumnos aprenden a usar dos herramientas básicas del laboratorio de biotecnología: las micropipetas y la electroforesis en gel.	2–3

## SUGERENCIAS DE TIEMPO PARA ENSEÑAR ABE

Dado el poco tiempo que tiene permitido conservar el kit, puede ser difícil terminar la secuencia completa de los laboratorios ABE durante el período del préstamo.

Si está realizando la secuencia de ingeniería genética completa (pestañas A, B y E) o la secuencia de ingeniería genética abreviada (pestañas A, C y E), debe completar la introducción del programa en la pestaña A antes de recibir el kit.

## DESCRIPCIÓN GENERAL DEL CONTENIDO

---

La descripción general del plan de estudios describe el contenido de ciencias del plan de estudios en el que idealmente deberían participar sus alumnos al completar el programa ABE. Es especialmente importante proporcionar contexto y conexiones al plan de estudios de ciencias mientras los alumnos participan en las experiencias de laboratorio, dado que puede tener el kit en un momento en que está enseñando otro contenido, desde ecología hasta evolución, o que incluso puede usar estos laboratorios con cursos que no sean biología.

### LA GRAN IDEA

Las proteínas codificadas por el ADN son responsables de los rasgos:



### LA GRAN PREGUNTA

¿Cuál es la relación entre genes, proteínas y los rasgos de un organismo?

### PREGUNTAS SECUNDARIAS

1. ¿Cómo resulta la expresión de un gen en los rasgos de un organismo?
2. ¿Cuál es la relación entre proteínas y rasgos?
3. ¿Cómo se codifica la información en el ADN?
4. ¿Cómo se decodifica esta información?
5. ¿Cuál es el producto del mensaje decodificado?
6. ¿Cómo resulta este producto en los rasgos?
7. ¿Cuáles son las consecuencias para un organismo si el producto se altera o no se fabrica?
8. ¿Cómo se pueden diseñar los organismos para que produzcan diferentes productos proteicos y tener nuevos rasgos?

## METAS DE COMPRESIÓN

- Los alumnos entienden que toda la información requerida por los organismos para mantener la vida está codificada en la disposición de los nucleótidos en su ADN.
- Los alumnos entienden que la codificación y decodificación del ADN es la misma entre todos los organismos, lo que hace posible la expresión de un gen humano por las bacterias.
- Los alumnos entienden cómo los procesos de transcripción y traducción facilitan la transferencia de información del ADN a las proteínas.
- Los alumnos reconocen que los rasgos de los organismos están determinados por la expresión de genes específicos en su ADN.
- Los alumnos entienden cómo se regula la expresión génica.
- Los alumnos entienden cómo las funciones de las proteínas son responsables de los rasgos de un organismo.
- Los alumnos reconocen que un cambio en la secuencia de ADN puede alterar la función de una proteína y puede cambiar los rasgos de un organismo.
- Los alumnos saben cómo las bacterias pueden modificarse genéticamente para hacer nuevos productos.
- Los alumnos comprenden la relación recíproca entre la investigación científica básica y el desarrollo tecnológico: entienden que los descubrimientos de los plásmidos, las enzimas de restricción y las ligasas que se obtuvieron durante la investigación básica han generado las herramientas y técnicas de la biotecnología; a su vez, las herramientas y técnicas de la biotecnología permiten a los científicos alcanzar una comprensión más profunda sobre los genes y la función de sus productos en una célula.
- Los alumnos comprenden cuál es el propósito de usar muestras de control en las investigaciones científicas.

## LOS RESULTADOS DEL APRENDIZAJE

Después de completar el programa, los alumnos deberán estar en capacidad de hacer lo siguiente:

- Describir la relación entre el ADN, los genes, las proteínas y los rasgos.
- Explicar cómo se transfiere la información del ADN a las proteínas mediante la transcripción y la traducción.
- Explicar cómo la expresión génica en una célula determina los rasgos de un organismo.
- Describir cómo las características de los organismos (rasgos) son el resultado de la actividad proteica.
- Describir cómo una pérdida o ganancia de la función proteica puede alterar los rasgos de un organismo.
- Debatir cómo los organismos pueden ser diseñados para tener nuevas características.
- Describir la función de las herramientas biológicas, como los plásmidos, las enzimas de restricción y la ADN ligasa, en el proceso de la ingeniería genética.
- Proporcionar ejemplos de cómo la ingeniería genética puede usarse para resolver problemas médicos.
- Modelar el proceso de producción de un plásmido recombinante.

## CONEXIONES CON EL PLAN DE ESTUDIOS DE BIOLOGÍA

Aquí se muestran sugerencias sobre dónde los laboratorios ABE pueden integrarse adecuadamente en el flujo conceptual de la enseñanza de las ciencias en el aula.

Capítulo	Conexiones con el plan de estudios	Notas
1	Competencias de laboratorio	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uso de micropipetas</li> <li>• Uso de electroforesis en gel</li> </ul>
2/2A/5B	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estructura del ADN</li> <li>• Genes y ADN</li> <li>• Función de las enzimas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estructura básica del ADN</li> <li>• Principios y usos de la ingeniería genética (GE)</li> <li>• Relación entre genes y ADN</li> <li>• Cómo funcionan las enzimas</li> <li>• Enzimas de restricción</li> </ul>
3	Reacciones enzimáticas	Función de la ligasa en la GE
4/4A	Universalidad del ADN	Visualizar el ADN
5/5A/5B	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Universalidad de la expresión génica</li> <li>• Transcripción</li> <li>• Traducción</li> <li>• Actividad proteica</li> <li>• Estructura celular de las bacterias</li> <li>• Variables y controles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gran idea de la biología: ADN → Proteína → Rasgo</li> <li>• Proceso de expresión génica</li> <li>• Todos los organismos expresan los genes de la misma manera</li> <li>• Colonias frente a células individuales</li> </ul>
6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crecimiento bacteriano</li> <li>• Estructura y función de la proteína</li> <li>• Biomoléculas</li> <li>• Mutación</li> <li>• Evolución</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crecimiento exponencial, latencia, fase de muerte</li> <li>• Plegamiento de la proteína</li> <li>• Bioquímica</li> <li>• Mutación del gen <i>rfp</i></li> <li>• Motivo evolutivo de la fluorescencia</li> </ul>

# CONEXIONES CON LOS ESTÁNDARES ACADÉMICOS

---

## ENLACES AL CONTENIDO PRINCIPAL DE LA BIOLOGÍA

ABE cumple con muchos de los Estándares de Ciencias de la Próxima Generación (NGSS) y los Estándares Estatales Básicos Comunes (CCSS). La biología que los alumnos exploran en el programa es fundamental para el aprendizaje de la ciencia y la tecnología. Los alumnos obtienen conocimiento del contenido, dominio de las prácticas científicas y comprensión de varias ideas básicas disciplinarias. Los alumnos también exploran la lectura y escritura científica que cumple con los estándares de la Lengua inglesa del CCSS.

Los siguientes símbolos indican cuando se introduce un concepto, se desarrolla en profundidad o se elabora en:

\* = Introducido

\*\* = Desarrollado

\*\*\* = Elaborado en

## ESTÁNDARES DE LA CIENCIA DE PRÓXIMA GENERACIÓN

Expectativas de rendimiento	Capítulo						
	Introducción	1	2/2A	3	4/4A	5/5A/5B	6
<b>HS-LS1. De las moléculas a los organismos: Estructuras y procesos</b>							
HS-LS1-1. Elabore una explicación basada en la evidencia de cómo la estructura del ADN determina la estructura de las proteínas, que llevan a cabo las funciones esenciales de la vida a través de sistemas de células especializadas.	*	*	**	***		***	
HS-LS1-6. Elabore y revise una explicación basada en la evidencia de cómo el carbono, el hidrógeno y el oxígeno de las moléculas de azúcar pueden combinarse con otros elementos para formar aminoácidos u otras moléculas grandes cuya base es el carbono.			*	**			***
<b>HS-LS3. Herencia: Hereditario y variación de rasgos</b>							
HS-LS3-1. Haga preguntas para aclarar las relaciones sobre la función del ADN y los cromosomas en la codificación de las instrucciones para los rasgos característicos transmitidos de padres a hijos.			*			***	
HS-LS3-2. Haga y defienda una afirmación basada en la evidencia de que las variaciones genéticas hereditarias pueden resultar de (1) nuevas combinaciones genéticas a través de la meiosis, (2) errores viables que ocurren durante la replicación o (3) mutaciones causadas por factores ambientales.				*			
<b>HS-LS4 Evolución biológica: Unidad y diversidad</b>							
HS-LS4-4. Elabore una explicación basada en la evidencia de cómo la selección natural conduce a la adaptación de las poblaciones.			**			**	
HS-LS4-5. Evalúe la evidencia que respalda las afirmaciones de que los cambios en las condiciones ambientales pueden resultar en (1) aumentos en el número de individuos de algunas especies, (2) la aparición de nuevas especies con el tiempo y (3) la extinción de otras especies.			**		*	*	

Prácticas científicas	Capítulo						
	Introducción	1	2/2A	3	4/4A	5/5A/5B	6
<b>Elaboración de preguntas y definición de problemas</b>							
Haga preguntas que surjan de examinar los modelos o una teoría para aclarar las relaciones.		*	**	**	**	**	***
<b>Desarrollar y usar modelos</b>							
Utilice modelos (incluidos los matemáticos y computacionales) para generar datos que respalden explicaciones y predigan los fenómenos, analizar sistemas y resolver problemas.			*			*	
<b>Planificación y realización de investigaciones</b>							
Planifique y realice una investigación individual y en colaboración para producir datos que sirvan de base para la evidencia y el diseño; decida los tipos, la cantidad y la precisión de los datos necesarios para producir mediciones confiables, considere las limitaciones en la precisión de los datos (por ejemplo, número de ensayos, costo, riesgo, tiempo) y refine el diseño en consecuencia.			*			**	
<b>Explicaciones de la elaboración y el diseño de soluciones</b>							
Construya una explicación basada en evidencia válida y confiable obtenida de una variedad de fuentes (incluidas las propias investigaciones, modelos, teorías, simulaciones, revisión por pares de los alumnos) y la suposición de que las teorías y leyes que describen el mundo natural operan hoy como lo hicieron en el pasado y continuará haciéndolo en el futuro.			*	**	**	**	***
<b>Participar en un argumento a partir de la evidencia</b>							
Realice y defienda una afirmación basada en evidencia sobre el mundo natural que refleje tanto el conocimiento científico como la evidencia generada por los alumnos.			*		**	**	***

Conceptos transversales	Capítulo						
	Introducción	1	2/2A	3	4/4A	5/5A/5B	6
<b>Patrones</b>							
Los patrones observados de las formas y eventos guían la organización y clasificación, y generan preguntas sobre las relaciones y los factores que influyen en estos.	*			**			
<b>Causa y efecto: Mecanismo y explicación</b>							
Los eventos tienen causas, a veces simples, a veces multifacéticas. Una actividad principal de la ciencia es investigar y explicar las relaciones causales y los mecanismos por los cuales están mediadas. Dichos mecanismos pueden probarse después en contextos determinados y usarse para predecir y explicar eventos en nuevos contextos.			*			**	
<b>Escala, proporción y cantidad</b>							
Al considerar los fenómenos, es fundamental reconocer lo que es relevante en diferentes medidas de tamaño, tiempo y energía, y reconocer cómo los cambios en la escala, proporción o cantidad afectan la estructura o el rendimiento de un sistema.			*		**		
<b>Sistemas y modelos de sistemas</b>							
La definición del sistema en estudio, especificando sus límites y haciendo explícito un modelo de ese sistema, proporciona herramientas para comprender y probar ideas que son aplicables en toda la ciencia y la ingeniería.			*		*		
<b>Estructura y función</b>							
La forma en que se forma un objeto o un ser vivo y su estructura secundaria determinan muchas de sus propiedades y funciones.	*	*	***	***	***	**	***
<b>Estabilidad y cambio</b>							
Las condiciones de estabilidad y los determinantes de las tasas de cambio o evolución de un sistema son elementos críticos de estudio, tanto para sistemas naturales como creados.							*

Ideas básicas disciplinarias	Capítulo						
	Introducción	1	2/2A	3	4/4A	5/5A/5B	6
<b>LS1.A: Estructura y función</b>							
Los sistemas de células especializadas dentro de los organismos les ayudan a realizar las funciones esenciales de la vida.	*	*					
Todas las células contienen información genética en forma de moléculas de ADN. Los genes son regiones en el ADN que contienen las instrucciones que codifican la formación de proteínas, que llevan a cabo la mayor parte del trabajo de las células.	*	*	**	***	**	***	***
<b>LS1.C: Organización de la materia y el flujo de energía en los organismos</b>							
Las moléculas de azúcar así formadas contienen carbono, hidrógeno y oxígeno. Sus estructuras principales de hidrocarburos se usan para producir aminoácidos y otras moléculas basadas en carbono que se pueden ensamblar en moléculas más grandes (como proteínas o ADN), que luego se pueden usar, por ejemplo, para formar nuevas células.		*	**	**			***
<b>LS3.A: Herencia de los rasgos</b>							
Cada cromosoma consta de una sola molécula de ADN muy larga, y cada gen en el cromosoma es un segmento específico de ese ADN. Las instrucciones para formar las características de las especies se llevan en el ADN. Todas las células en un organismo tienen el mismo contenido genético, pero los genes utilizados (expresados) por la célula pueden estar regulados de diferentes maneras. No todo el ADN codifica una proteína; algunos segmentos de ADN están involucrados en funciones reguladoras o estructurales, y no se conoce la función de algunos (hasta ahora).	*	*	**	**	**	***	
<b>LS3.B: Variación de rasgos</b>							
En la reproducción sexual, los cromosomas a veces pueden intercambiar partes durante el proceso de meiosis (división celular), creando así nuevas combinaciones genéticas y, por lo tanto, más variación genética. Aunque la replicación del ADN está estrictamente regulada y es extremadamente precisa, se producen errores y se producen mutaciones, que también son una fuente de variación genética. Los factores ambientales también pueden causar mutaciones en los genes, y las mutaciones que son viables se heredan.				*		*	

Ideas básicas disciplinarias	Capítulo						
	Introducción	1	2/2A	3	4/4A	5/5A/5B	6
Los factores ambientales también afectan la expresión de rasgos y, por lo tanto, afectan la probabilidad de aparición de rasgos en una población. Por lo tanto, la variación y distribución de los rasgos observados depende de factores genéticos y ambientales.			*				
<b>LS4.B: Selección natural</b>							
Los rasgos que afectan positivamente la supervivencia tienen más probabilidades de reproducirse y, por lo tanto, son más comunes en la población.			*			*	
<b>LS4.C: Adaptación</b>							
La selección natural conduce a la adaptación, es decir, a una población dominada por organismos que son anatómica, conductual y fisiológicamente adecuados para sobrevivir y reproducirse en un entorno específico. Es decir, la supervivencia y reproducción diferencial de organismos en una población que tiene un rasgo hereditario ventajoso conduce a un aumento en la proporción de individuos en las generaciones futuras que tienen el rasgo y a una disminución en la proporción de individuos que no lo tienen.			**			**	

## ESTÁNDARES ESTATALES BÁSICOS COMUNES

Lengua inglesa/Alfabetización	Capítulo						
	Introducción	1	2/2A	3	4/4A	5/5A/5B	6
<b>RST.11-12.9:</b> Sintetice la información de una variedad de fuentes (p. ej., textos, experimentos, simulaciones) en una comprensión coherente de un proceso, fenómeno o concepto, aclarando información conflictiva cuando sea posible.		*	*	**	**	**	***
<b>WHST.9-12.1:</b> Escriba argumentos centrados en contenido específico de la disciplina.			*	*	**	**	***
<b>WHST.9-12.9:</b> Obtenga evidencia de textos informativos para respaldar el análisis, la reflexión y la investigación.		*	**	**	**	**	***

## ENLACES A LAS COMPETENCIAS BÁSICAS DEL SIGLO XXI<sup>1</sup>

El programa ABE ofrece muchas oportunidades para que los alumnos desarrollen competencias básicas del siglo XXI en los dominios cognitivo e interpersonal.

Dominio cognitivo	Capítulo						
	Introducción	1	2/2A	3	4/4A	5/5A/5B	6
<b>Procesos cognitivos y estrategias</b>							
Pensamiento crítico				*	**	**	***
Resolución de problemas			*	**	**	**	***
Análisis			*	**	**	**	***
Razonamiento / argumentación		*	**	**	**	**	***
Interpretación		*	**	**	**	**	***
<b>Conocimiento</b>							
Comunicación oral y escrita		*	**	**	**	**	***
Escucha activa		*	**	**	**	**	***

Dominio Interpersonal	Capítulo						
	Introducción	1	2/2A	3	4/4A	5/5A/5B	6
<b>Trabajo en equipo y colaboración</b>							
Comunicación		*	**	**	**	**	***
Colaboración		*	**	**	**	**	***
Trabajo en equipo		*	**	**	**	**	***
Habilidades interpersonales		*	**	**	**	**	***

<sup>1</sup> Del Consejo Nacional de Investigación. (2012). *Educación para la vida y el trabajo: desarrollo de conocimientos y habilidades transferibles en el siglo XXI*. Washington, DC: The National Academies Press.

## SUPUESTOS DE CONOCIMIENTOS Y HABILIDADES PREVIAS

---

Los laboratorios de ABE pueden usarse para cualquier clase de biología con una mínima adaptación. Sin embargo, al comienzo de un curso introductorio de biología, los alumnos pueden tener una comprensión conceptual menor sobre algunos de los conceptos científicos relacionados con estos laboratorios y, por lo tanto, requerirán más apoyo para establecer esas conexiones. Le recomendamos enseñar estos conceptos a medida que los alumnos los necesiten, en lugar de enseñar todos antes de comenzar el programa. Los conocimientos previos asumidos para cada capítulo se enumeran al comenzar cada capítulo en esta guía.

Los alumnos con poca experiencia en la realización de laboratorios de ciencias pueden necesitar tiempo e instrucciones adicionales para tener una experiencia de laboratorio segura y efectiva.

## EVALUACIÓN DEL APRENDIZAJE ESTUDIANTIL

---

Puede evaluar la comprensión de los alumnos a lo largo del programa mientras participan en debates en clase y responden las preguntas del laboratorio. Las preguntas *DETÉNGASE Y PIENSE* de la sección *Métodos* del laboratorio están diseñadas para que los alumnos reflexionen sobre cómo piensan en momento y lugar; estas preguntas también le ofrecen una instantánea de su comprensión a medida que avanzan en la investigación.

Al final del programa de ABE, puede plantear preguntas de evaluación final como las siguientes (las posibles respuestas están a continuación de las preguntas en cursiva):

1. Explique el propósito, los productos, las herramientas y el proceso de la ingeniería genética. *El propósito de la ingeniería genética es abordar la necesidad de tratar enfermedades que son resultado de la falta de una proteína funcional. Los productos asociados con la ingeniería genética son proteínas funcionales. Las herramientas asociadas con la ingeniería genética son los plásmidos, las enzimas de restricción y las bacterias. El proceso de ingeniería genética consiste en transferir un gen humano a un plásmido, insertar el plásmido en bacterias, clonar el plásmido y purificar la proteína fabricada por la bacteria.*
2. Revise la **Figura 2.4/2A.4/5B.4** en la página B-10/C-11/D-9. ¿En qué parte de este proceso utilizaría el pipeteo y la electroforesis en gel? *El pipeteo se usa en cada paso, y la electroforesis en gel se usa para confirmar que la digestión de la enzima de restricción funcionó y que se obtuvo el plásmido recombinante correcto.*
3. ¿Cómo usa la célula las instrucciones en el ADN para producir proteínas? *La transferencia de información del ADN a la proteína ocurre en dos pasos: transcripción y traducción. Transcripción es la copia del gen del ADN en el ARN mensajero (ARNm). Traducción es la síntesis de la proteína usando el ARNm.*

4. ¿Por qué es importante que los científicos tengan un conocimiento profundo de biología así como de las competencias de laboratorio? *Para producir un producto a partir de un gen, los científicos necesitan conocimiento científico de las enfermedades genéticas, ADN y procesos celulares para diseñar los procedimientos de laboratorio, y necesitan competencias de laboratorio para llevar a cabo esos procedimientos.*
5. En este programa leerá acerca de cómo los científicos modifican un plásmido bacteriano agregando un gen humano para producir proteínas terapéuticas humanas. ¿De qué manera este proceso ayuda a tratar las enfermedades genéticas? *Las personas que carecen de las proteínas humanas pueden usar las proteínas producidas por las bacterias para tratar los síntomas de su enfermedad.*
6. Antes de que la ingeniería genética produjera la insulina humana, las personas usaban insulina extraída del ganado que era similar (pero no exactamente igual) a la insulina humana. ¿Cuáles podrían ser los beneficios de la insulina genéticamente modificada sobre la insulina extraída del ganado? *La insulina genéticamente modificada tiene las siguientes ventajas en comparación con la insulina extraída del ganado: (1) es más fácil obtener grandes cantidades, (2) es exactamente igual a la insulina humana, por lo que es menos probable que cause una reacción adversa, y (3) resuelve las preocupaciones éticas sobre el uso de animales.*
7. ¿Cuáles son algunos posibles riesgos que podrían estar asociados con el uso de células bacterianas para producir proteínas humanas? *Las bacterias podría liberarse al medioambiente. Un posible resultado de esta liberación es que las bacterias que tienen resistencia a los antibióticos pueden transmitir la resistencia a otras bacterias, incluidas las bacterias dañinas. Otro riesgo es que el producto del gen humano fabricado por las bacterias podría ser ligeramente diferente de la proteína producida en las células humanas, produciendo así efectos secundarios riesgosos, o el producto podría sufrir un cambio no detectado y dejar de ser efectivo o seguro para el uso humano.*

## SEGURIDAD DEL LABORATORIO

---

Es fundamental enseñar a los alumnos la seguridad del laboratorio adecuada durante las experiencias del laboratorio. Los protocolos de laboratorio utilizados en el programa ABE se designan como Nivel 1 de seguridad de laboratorio, lo que requiere precauciones mínimas. Sin embargo, dado que los alumnos trabajan con materiales de laboratorio reales, estos protocolos ofrecen una excelente oportunidad para enseñar a los alumnos buenas prácticas en términos de seguridad de laboratorio. Cabe señalar que en los capítulos 5 y 6 los alumnos trabajan con células de *E. coli*. Si bien la cepa de células utilizada en ABE es bastante benigna, es importante que los alumnos sigan las buenas prácticas y tomen precauciones al realizar los laboratorios.

Todos los alumnos deben conocer las siguientes precauciones básicas de seguridad de laboratorio:

- El cabello largo debe permanecer atado.
- No debe comer ni beber en el laboratorio, ni guardar alimentos o bebidas aquí.

- Debe mantener los bancos y mesas del laboratorio despejados y solo deben mantener allí materiales de laboratorio, cuadernos e implementos.
- Debe manipular los materiales y equipos con cuidado, y nunca deben usar químicos y colorantes sin la supervisión adecuada.
- Debe asegurarse de que todos los cultivos, químicos, desinfectantes y medios estén etiquetados de manera clara con nombres y fechas. Si son peligrosos, incluya la información de peligro adecuada.
- Use gafas de laboratorio en todo momento.
- Conozca la ubicación de la estación de lavado de ojos y el lavabo más cercanos.
- Cubra cualquier corte que tenga en las manos con una venda. Se pueden usar guantes como protección adicional.

Lleve a cabo los siguientes procedimientos de seguridad cuando trabaje con microorganismos:

- Trate todos los microorganismos como si fueran patógenos.
- Use guantes desechables cuando manipule bacterias en el laboratorio de transformación (Laboratorio 5/5A/5B).
- Al manipular tubos de microcentrífuga, puntas de pipeta, esparcidores de células y placas de Petri, evite derrames y cualquier contacto innecesario. Informe al profesor si se produce un derrame.
- Lávese las manos con un jabón desinfectante antes y después de trabajar con microorganismos. El jabón no desinfectante eliminará las bacterias de la superficie y se puede usar si no hay jabón desinfectante disponible. Se pueden usar guantes como protección adicional.
- **Manejo de los residuos del laboratorio:**
  - ♦ Coloque todo el equipo que entre en contacto con las bacterias en una bolsa de residuos con riesgo biológico bien etiquetada.
  - ♦ No deposite desechos líquidos en la bolsa de residuos con riesgo biológico. Vierta los desechos líquidos en un recipiente especialmente designado.
  - ♦ Devuelva la bolsa de residuos con riesgo biológico con el kit para esterilizar en autoclave y volver a utilizar.
  - ♦ Esterilice el desecho líquido agregando una solución de lejía al 10 % y luego vertiéndolo por el desagüe.
- **Limpieza:**
  - ♦ Limpie los derrames de inmediato, con precaución. Remoje el derrame con una solución de lejía al 10 % y cúbralo con toallas de papel. Después de dejar que el derrame se remoje en el blanqueador durante dos minutos, limpie cuidadosamente y coloque los materiales en la bolsa de residuos con riesgo biológico. Lave el área nuevamente con desinfectante.
  - ♦ Use una solución de lejía al 10 % para desinfectar todos los bancos y áreas de trabajo antes y después de trabajar con microorganismos.
  - ♦ Si hay fragmentos de vidrio, use un cepillo especialmente designado y un recogedor para barrerlos. Coloque los fragmentos en una solución de lejía al 10 %, luego drene y deséchelos, de acuerdo con las normas locales.
  - ♦ Use gafas resistentes a productos químicos y tenga cuidado al manipular la solución de lejía.
  - ♦ Conozca la ubicación de la estación de lavado de ojos y el lavabo más cercanos.

**NOTA:** No permita que los alumnos manejen la solución de lejía.

## PREPARACIÓN DE MATERIALES

---

Antes de comenzar, debe familiarizarse con los procedimientos de laboratorio en cada capítulo, la preparación requerida y los materiales que necesitará. La preparación de materiales en cada capítulo supone 12 grupos de 2 o 3 alumnos. Si tiene más o menos grupos de laboratorio, ajuste la cantidad de materiales de manera correspondiente. La siguiente información lo ayudará con estos ajustes.

**NOTA:** Algunos laboratorios requieren una preparación varios días antes del laboratorio, así que lea la sección *Preparación* para cada capítulo que planea usar antes de comenzar el programa.

**NOTA:** El tiempo de preparación que se requiere para los laboratorios ABE es importante. Puede pedirles a los alumnos que están interesados en adquirir competencias de laboratorio que lo ayuden con la preparación.

## MATERIALES NECESARIOS POR GRUPO

Las siguientes tablas incluyen solo aquellos materiales para los cuales necesitará ajustar cantidades dependiendo de cuántos grupos de alumnos tenga en cada clase.

## PESTAÑA A

Sesión/ Laboratorio	Paso de preparación	Acción	Material	Cantidad necesaria por grupo
Capítulo 1, Sesión 1, Laboratorio 1.1	Preparación adicional y materiales para el Laboratorio 1.1	Prepare juegos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:	a. Una gradilla de plástico para tubos de microcentrífuga con un tubo de microcentrífuga con solución de colorante rojo (RD)	1
			b. Micropipeta P-20	1
			c. Caja de puntas de pipetas desechables	1
			d. Hoja de práctica de micropipeta laminada (del kit)	1
			e. Contenedor de residuos	Uno por cada dos grupos
Capítulo 1, Sesión 2, Laboratorio 1.2	Prepare geles de agarosa para el Laboratorio 1.2 <sup>2</sup> (se pueden preparar con varios días de anticipación)	Prepare la solución de agarosa:	a. SB 20x	1.5 ml
			b. Agua destilada (dH <sub>2</sub> O)	28.5 ml
			c. Agarosa	0.24 g
			d. Bolsas con cierre de tamaño sándwich o de un cuarto de galón	1
	Preparación adicional y materiales para el Laboratorio 1.2	Prepare SB 1x (se puede preparar con varios días de anticipación):	a. SB 20x	2.5 ml
			b. dH <sub>2</sub> O	47.5 ml
			c. Frasco de 50 ml etiquetado "SB 1x"	Uno por cada dos grupos
		Prepare juegos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:	a. Gradilla de plástico para tubos de microcentrífuga con: <ul style="list-style-type: none"> <li>i. Tubo de microcentrífuga de colorante rojo (RD)</li> <li>ii. Tubo de microcentrífuga de solución de colorante 1 (S1)</li> <li>iii. Tubo de microcentrífuga de solución de colorante 2 (S2)</li> <li>iv. Tubo de microcentrífuga de solución de colorante 3 (S3)</li> </ul>	1
			b. Micropipeta P-20	1
			c. Caja de puntas de pipetas desechables	1
			d. Placas de práctica de pipeteo cargadas con gel de agarosa al 0,8 %	2
			e. Contenedor de residuos	Uno por cada dos grupos

<sup>2</sup> Se requieren las cantidades de los materiales enumerados para hacer un gel, que puede ser usado por dos grupos.

## PESTAÑA A (CONTINUACIÓN)

Sesión/ Laboratorio	Paso de preparación	Acción	Material	Cantidad necesaria por grupo
Capítulo 1, Sesión 3, Laboratorio 1.3 (Opcional)	Preparación y materiales adicionales para el Laboratorio opcional 1.3	Copie el Master reproducibile 1 y reúna los siguientes materiales:	a. Laboratorio 1.3: Examen de precisión de micropipetas (RM 1)	Una copia por alumno
			b. Rejilla de plástico para tubos de microcentrífuga con un tubo de microcentrífuga de dH <sub>2</sub> O	1
			c. Micropipeta P-20	1
			d. Caja de puntas de pipetas desechables	1
			e. Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml	8
			f. Marcador permanente	1
			g. Gotero	1
			h. Contenedor de residuos	Uno por cada dos grupos

## PESTAÑA B

Sesión/ Laboratorio	Paso de preparación	Acción	Material	Cantidad necesaria por grupo
Capítulo 2, Sesión 2	Fotocopie los folletos y reúna los materiales de <i>Clone ese gen</i>	Copie los Masters reproducibles y reúna los siguientes materiales:	a. Diagrama de plásmidos (RM 2)	1 copia (por pareja)
			b. Secuencia de ADN humano (RM 3)	1 copia (por pareja)
			c. Tijeras	1 (por pareja)
			d. Cinta	1 rollo (por pareja)
Capítulo 2, Sesión 3, Laboratorio 2	Alícuotas de reactivos para el Laboratorio 2 (se pueden hacer con varios días de anticipación)	Etiquete cinco tubos de microcentrifuga de 1.5 ml de la siguiente manera:	a. Tubo de microcentrifuga marcado con "2.5B"	1
			b. Tubo de microcentrifuga marcado con "K"	1
			c. Tubo de microcentrifuga marcado con "A"	1
			d. Tubo de microcentrifuga marcado con "RE"	1
			e. Tubo de microcentrifuga marcado con "dH <sub>2</sub> O"	1
		Pipetee los reactivos en los tubos de microcentrifuga de la siguiente manera:	a. Tampón de restricción 2.5x en el tubo marcado con "2.5xB"	20.0 µl
			b. Solución de plásmido pKAN-R en un tubo marcado con "K"	10.0 µL
			c. Solución de plásmido pARA en el tubo marcado con "A"	10.0 µL
			d. Enzimas de restricción en el tubo marcado con "RE"	5.0 µl
			e. Agua destilada en el tubo marcado con "dH <sub>2</sub> O"	1,000 µL
	Reúna los materiales para el laboratorio 2	Prepare juegos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:	a. Gradilla de plástico para tubos de microcentrifuga con: <ul style="list-style-type: none"> <li>i. Tubo de microcentrifuga marcado con "2.5xB"</li> <li>ii. Tubo de microcentrifuga de K</li> <li>iii. Tubo de microcentrifuga A</li> <li>iv. Tubo de microcentrifuga RE</li> <li>v. Tubo de microcentrifuga de dH<sub>2</sub>O</li> </ul>	1
			b. Micropipeta P-20	1
			c. Caja de puntas de pipetas desechables	1
			d. Tubos de microcentrifuga de 1.5 ml	4
e. Marcador permanente			1	
f. Contenedor de residuos			Uno por cada dos grupos	

## PESTAÑA B (CONTINUACIÓN)

Sesión/ Laboratorio	Paso de preparación	Acción	Material	Cantidad necesaria por grupo
Capítulo 3, Sesión 2, Laboratorio 3	Alícuotas de reactivos para el Laboratorio 3 (se pueden hacer con varios días de anticipación)	Etiquete tres tubos de microcentrifuga de 1.5 ml de la siguiente manera:	a. Tubo de microcentrifuga marcado con "LIG"	1
			b. Tubo de microcentrifuga marcado con "5xB"	1
			c. Tubo de microcentrifuga marcado con "dH <sub>2</sub> O" <b>NOTA: Este tubo puede estar disponible de laboratorios anteriores</b>	1
		Pipeteo los reactivos en los tubos de microcentrifuga de la siguiente manera:	a. ADN ligasa en el tubo marcado "LIG"	2.0 µl
			b. Tampón de ligación 5x en el tubo marcado "5xB"	4.0 µl
			c. Agua destilada en el tubo marcado con "dH <sub>2</sub> O"	1,000 µL
	Reúna los materiales para el laboratorio 3	Prepare los conjuntos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:	a. Gradilla de plástico para tubos de microcentrifuga con: <ul style="list-style-type: none"> <li>i. Tubo de microcentrifuga de pKAN-R digerido del laboratorio 2 (K+)</li> <li>ii. Tubo de microcentrifuga de pARA digerido del laboratorio 2 (A+)</li> <li>iii. Tubo de microcentrifuga de LIG</li> <li>iv. Tubo de microcentrifuga de 5xB</li> <li>v. Tubo de microcentrifuga de dH<sub>2</sub>O</li> </ul>	1
			b. Micropipeta P-20	1
			c. Caja de puntas de pipetas desechables	1
			d. Marcador permanente	1
			e. Contenedor de residuos	Uno por cada dos grupos

## PESTAÑA B (CONTINUACIÓN)

Sesión/ Laboratorio	Paso de preparación	Acción	Material	Cantidad necesaria por grupo
Capítulo 4, Sesiones 1 y 2, Laboratorio 4	Preparar geles de agarosa para el Laboratorio 4 <sup>3</sup> (Puede prepararse con varios días de anticipación)	Prepare la solución de agarosa:	a. SB 20x	1.5 ml
			b. dH <sub>2</sub> O	28.5 ml
			c. Agarosa	0.24 g
			d. Bolsas con cierre de tamaño sándwich o de un cuarto de galón	1
	Alícuotas de reactivos para el Laboratorio 4 (se pueden preparar con varios días de anticipación)	Etiquete dos tubos de microcentrifuga de 1.5 ml de la siguiente manera:	a. Tubo de microcentrifuga marcado con "LD"	1
			b. Tubo de microcentrifuga marcado con "M"	1
		Pipete los reactivos en los tubos de microcentrifuga de la siguiente manera:	a. Colorante de carga en el tubo marcado con "LD"	20.0 µl
			b. Escalera de ADN en el tubo marcado con "M"	10.0 µL
	Preparación y materiales adicionales para el Laboratorio 4	Prepare SB 1x (se puede preparar con varios días de anticipación):	a. SB 20x	2.5 ml
			b. dH <sub>2</sub> O	47.5 ml
			c. Frasco de 50 ml etiquetado con "SB 1x"	1
		Copie el Master reproducible y prepare juegos de materiales que incluyan lo siguiente:	a. Gradilla de plástico para tubos de microcentrifuga con: <ul style="list-style-type: none"> <li>i. Tubo de microcentrifuga de K-</li> <li>ii. Tubo de microcentrifuga de K+</li> <li>iii. Tubo de microcentrifuga de A-</li> <li>iv. Tubo de microcentrifuga de A+</li> <li>v. Tubo de microcentrifuga de LIG</li> <li>vi. Tubo de microcentrifuga de LD</li> <li>vii. Tubo de microcentrifuga de dH<sub>2</sub>O</li> <li>viii. Tubo de microcentrifuga de M</li> </ul>	1
			b. Marcador permanente	1
			c. Micropipeta P-20	1
			d. Caja de puntas de pipetas desechables	1
			e. Contenedor de residuos	Uno por cada dos grupos
			f. Diagrama de escalera de ADN (RM 4)	Una copia por alumno

<sup>3</sup> Las cantidades de los materiales enumerados harán un gel, que puede ser usado por dos grupos.

## PESTAÑA B (CONTINUACIÓN)

Sesión/ Laboratorio	Paso de preparación	Acción	Material	Cantidad necesaria por grupo
Capítulo 5, Sesión 1-3, Laboratorio 5	Alícuotas de reactivos y materiales para el Laboratorio 5 (se pueden preparar con varios días de anticipación)	Etiquete dos tubos de microcentrifuga de la siguiente manera:	a. Tubo de microcentrifuga de 1.5 ml marcado con "LB"	1
			b. Tubo de microcentrifuga de 1.5 ml marcado "CC"	1
		Pipetee el reactivo en el tubo marcado con "LB"	a. Caldo Luria (LB)	350 µl
			a. Gradilla de plástico para tubos de microcentrifuga con: i. Tubo de microcentrifuga de LB ii. Tubo de microcentrifuga de plásmido ligado del laboratorio 3 (LIG)	1
		Prepare juegos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:	b. Tubos de microcentrifuga de 1.5 ml	2
			c. Marcador permanente	1
			d. Guantes desechables	1 par (por alumno)
			e. Micropipeta P-20	1
			f. Micropipeta P-200	1
			g. Caja de puntas de pipetas desechables	1
	h. 3 placas Petri con agar: i. Placa LB (una franja) ii. Placa LB / amp (dos franjas) iii. Placa LB / amp / ara (tres franjas)		1 1 1	
	a. Taza de poliestireno		1	
	Alícuota de reactivos y materiales para el Laboratorio 5 (para preparar justo antes del laboratorio)	Copie el Master reproducible y reúna los otros materiales necesarios para el laboratorio:	b. Esparcidores de células	2
			c. Cinta de color	1 rollo (por cada dos grupos)
			d. Recipiente de recolección de residuos líquidos, como un vaso de precipitado pequeño	1 (por cada 1-2 grupos)
			e. Bolsa de residuos con riesgo biológico (para materiales que entran en contacto con células de <i>E. coli</i> ).	Uno por cada dos grupos
			f. <b>Predicciones de crecimiento bacteriano (RM 5)</b>	Una copia por alumno
			a. Tubo de microcentrifuga de 1.5 ml helado con la etiqueta "CC"	1
		b. Células de <i>E. coli</i> competentes	100 µl	

## PESTAÑA C

Sesión/ Laboratorio	Paso de preparación	Acción	Material	Cantidad necesaria por grupo
Capítulo 2A, Sesión 2	Fotocopie los folletos y reúna los materiales de <i>Clone ese gen</i>	Copie los Masters reproducibles y reúna los siguientes materiales:	a. Diagrama de plásmidos (RM 2)	1 copia (por pareja)
			b. Secuencia de ADN humano (RM 3)	1 copia (por pareja)
			c. Tijeras	1 (por pareja)
			d. Cinta	1 rollo (por pareja)
Capítulo 2A, Sesión 2, Laboratorio 2A	Alícuotas de reactivos para el Laboratorio 2A (se pueden preparar con varios días de anticipación)	Etiquete cuatro tubos de microcentrífuga de 1.5 ml de la siguiente manera:	a. Tubo de microcentrífuga marcado con "2.5xB"	1
			b. Tubo de microcentrífuga marcado con "PR"	1
			c. Tubo de microcentrífuga marcado con "RE"	1
			d. Tubo de microcentrífuga marcado con "dH <sub>2</sub> O"	1
		Pipetee los reactivos en los tubos de microcentrífuga de la siguiente manera:	a. Tampón de restricción 2.5x en el tubo marcado con "2.5xB"	12.0 µl
			b. Solución de plásmido pARA-R en el tubo marcado con "RP"	10.0 µL
			c. Enzimas de restricción en el tubo marcado con "RE"	3.0 µL
			d. Agua destilada en el tubo marcado con "dH <sub>2</sub> O"	1,000 µL
	Reúna los materiales para el laboratorio 2A	Prepare juegos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:	a. Gradilla de plástico para tubos de microcentrífuga con: <ul style="list-style-type: none"> <li>i. Tubo de microcentrífuga de 2.5xB</li> <li>ii. Tubo de microcentrífuga de RP</li> <li>iii. Tubo de microcentrífuga de RE</li> <li>iv. Tubo de microcentrífuga de dH<sub>2</sub>O</li> </ul>	1
			b. Micropipeta P-20	1
			c. Caja de puntas de pipetas desechables	1
			d. Guantes desechables	1 par (por alumno)
e. Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml			2	
f. Marcador permanente			1	
g. Contenedor de residuos			Uno por cada dos grupos	

## PESTAÑA C (CONTINUACIÓN)

Sesión/ Laboratorio	Paso de preparación	Acción	Material	Cantidad necesaria por grupo
Capítulo 4A, Sesiones 1 y 2, Laboratorio 4A	Prepare geles de agarosa para el Laboratorio 4A <sup>4</sup> (se pueden preparar con varios días de anticipación)	Prepare la solución de agarosa:	a. SB 20x	1.5 ml
			b. dH <sub>2</sub> O	28.5 ml
			c. Agarosa	0.24 g
			d. Bolsas con cierre de tamaño sándwich o de un cuarto de galón	1
	Alícuotas de reactivos para el Laboratorio 4A (se pueden preparar con varios días de anticipación)	Etiquete dos tubos de microcentrífuga de 1.5 ml de la siguiente manera:	a. Tubo de microcentrífuga marcado con "LD"	1
			b. Tubo de microcentrífuga marcado con "M"	1
		Pipete los reactivos en los tubos de microcentrífuga de la siguiente manera:	a. Colorante de carga en el tubo marcado con "LD"	20.0 µl
			b. Escalera de ADN en el tubo marcado con "M"	10.0 µL
	Preparación y materiales adicionales para el Laboratorio 4A	Prepare SB 1x (se puede preparar con varios días de anticipación):	a. SB 20x	2.5 ml
			b. dH <sub>2</sub> O	47.5 ml
			c. Frasco de 50 ml etiquetado con "SB 1x"	Uno por cada dos grupos
		Copie el Master reproducible y prepare juegos de materiales que incluyan lo siguiente:	a. Gradilla de plástico para tubos de microcentrífuga con: <ul style="list-style-type: none"> <li>i. Tubo de microcentrífuga de pARA digerido del laboratorio 2A (R+)</li> <li>ii. Tubo de microcentrífuga de pARA-R no digerido del laboratorio 2A (R-)</li> <li>iii. Tubo de microcentrífuga de LD</li> <li>iv. Tubo de microcentrífuga de M</li> </ul>	1
			b. Micropipeta P-20	1
			c. Caja de puntas de pipetas desechables	1
			d. Contenedor de residuos	Uno por cada dos grupos
e. <b>Diagrama de escalera de ADN (RM 4A)</b>			1 copia (por estudiante)	

<sup>4</sup> Las cantidades de los materiales enumerados harán un gel, que puede ser usado por dos grupos.

## PESTAÑA C (CONTINUACIÓN)

Sesión/ Laboratorio	Paso de preparación	Acción	Material	Cantidad necesaria por grupo	
Capítulo 5A, Sesión 1-3, Laboratorio 5A	Alícuotas de reactivos y materiales para el Laboratorio 5A (se pueden preparar con varios días de anticipación)	Etiquete tres tubos de microcentrífuga de 1.5 ml de la siguiente manera:	a. Tubo de microcentrífuga marcado con "LB"	1	
			b. Tubo de microcentrífuga marcado con "RP"	1	
			c. Tubo de microcentrífuga marcado con "CC"	1	
		Pipetee los reactivos en los tubos de microcentrífuga de la siguiente manera:	a. Caldo Luria en el tubo marcado con "LB"	350 µl	
			b. Plásmido recombinante pARA-R en el tubo marcado con "RP"	12.0 µl	
		Prepare juegos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:	a. Gradilla de plástico para tubos de microcentrífuga con:	i. Tubo de microcentrífuga de LB	1
				ii. Tubo de microcentrífuga de RP	
			b. Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml	2	
			c. Marcador permanente	1	
			d. Guantes desechables	1 par (por alumno)	
	e. Micropipeta P-20		1		
	f. Micropipeta P-200		1		
	g. Caja de puntas de pipetas desechables		1		
	h. 3 placas Petri con agar:	i. Placa LB (una franja)	1		
		ii. Placa LB / amp (dos franjas)	1		
		iii. Placa LB / amp / ara (tres franjas)	1		
	Alícuota de reactivos y materiales para el Laboratorio 5A (para preparar justo antes del laboratorio)	Copie el Master reproducible y reúna los otros materiales necesarios para el laboratorio:	a. Taza de poliestireno	1	
			b. Esparcidores de células	2	
			c. Cinta de color	1 rollo por cada dos grupos	
			e. Bolsa de residuos con riesgo biológico (para materiales que entran en contacto con células de <i>E. coli</i> ).	Uno por cada dos grupos	
e. Contenedor de recolección de residuos líquidos, como un vaso de precipitado pequeño			Uno por cada dos grupos		
f. <b>Predicciones de crecimiento bacteriano (RM 5)</b>			Una copia por alumno		
Prepare células competentes 15 minutos antes de que los alumnos comiencen el laboratorio:		a. Tubo helado con la etiqueta "CC"	1		
b. Células de <i>E. coli</i> competentes	100 µl				

## PESTAÑA D

Sesión/ Laboratorio	Paso de preparación	Acción	Material	Cantidad necesaria por grupo
Capítulo 5B, Sesión 2	Fotocopie los folletos y reúna los materiales de <i>Clone ese gen</i>	Copie los Masters reproducibles y reúna los siguientes materiales:	a. Diagrama de plásmidos (RM 2)	1 copia (por pareja)
			b. Secuencia de ADN humano (RM 3)	1 copia (por pareja)
			c. Tijeras	1 (por pareja)
			d. Cinta	1 rollo (por pareja)
Capítulo 5B, Sesión 3-5, Laboratorio 5B	Alicuotas de reactivos y materiales para el Laboratorio 5B (se pueden preparar con varios días de anticipación)	Etiquete tres tubos de microcentrifuga de 1.5 ml de la siguiente manera:	a. Tubo de microcentrifuga marcado con "LB"	1
			b. Tubo de microcentrifuga marcado con "RP"	1
			c. Tubo de microcentrifuga marcado con "CC"	1
		Pipetee los reactivos en los tubos de microcentrifuga de la siguiente manera:	a. Caldo Luria en el tubo marcado con "LB"	350 µl
			b. Plásmido recombinante pARA-R en el tubo marcado con "RP"	12.0 µl
		Prepare juegos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:	a. Gradilla de plástico para tubos de microcentrifuga con:	1
			i. Tubo de microcentrifuga de LB	
			ii. Tubo de microcentrifuga de RP	
			b. Tubos de microcentrifuga de 1.5 ml	2
			c. Marcador permanente	1
			d. Guantes desechables	1 par (por alumno)
			e. Micropipeta P-20	1
			f. Micropipeta P-200	1
		g. Caja de puntas de pipetas desechables	1	
h. 3 placas Petri con agar:	i. Placa LB (una franja)	1		
	ii. Placa LB / amp (dos franjas)	1		
	iii. Placa LB / amp / ara (tres franjas)	1		

## PESTAÑA D (CONTINUACIÓN)

Sesión/ Laboratorio	Paso de preparación	Acción	Material	Cantidad necesaria por grupo
Capítulo 5B, Sesión 3-5, Laboratorio 5B (Continuación)	Alícuotas de reactivos y materiales para el Laboratorio 5B <i>(para preparar justo antes del laboratorio)</i>	Copie el Master reproducibile y reúna los otros materiales necesarios para el laboratorio:	a. Taza de poliestireno	1
			b. Esparcidores de células	2
			c. Cinta de color	1 rollo por cada dos grupos
			e. Bolsa de residuos con riesgo biológico (para materiales que entran en contacto con células de <i>E. coli</i> ).	Uno por cada dos grupos
			e. Contenedor de recolección de residuos líquidos, como un vaso de precipitado pequeño	Uno por cada dos grupos
			f. <b>Predicciones de crecimiento bacteriano (RM 5)</b>	Una copia por alumno
		Prepare células competentes 15 minutos antes de que los alum- nos comiencen el laboratorio:	a. Tubo helado con la etiqueta "CC"	1
			b. Células de <i>E. coli</i> .	100 µl

## PESTAÑA E

Sesión/ Laboratorio	Paso de preparación	Acción	Material	Cantidad necesaria por grupo
Capítulo 6, Sesión 2, Laboratorio 6, Parte A	Alícuotas de reactivos para el Laboratorio 6, Parte A (se puede preparar uno o dos días antes del laboratorio)	Etiquete tres tubos de microcentrifuga de 1.5 ml de la siguiente manera:	a. Tubo de microcentrifuga marcado con "EB"	1
			b. Tubo de microcentrifuga marcado con "LyB"	1
			c. Tubo de microcentrifuga marcado con "EC"	1
		Pipetee los reactivos en los tubos de microcentrifuga de la siguiente manera:	a. Tampón de elución en el tubo marcado "EB"	200 µl
			b. Tampón de lisis en cada tubo marcado con "LyB"	160 µl
		Pipetee cultivo en suspensión de LB/amp/ara de <i>E. coli</i> en el tubo de microcentrifuga de la siguiente manera:	a. Cultivo en suspensión de LB/amp/ara de <i>E. coli</i>	1,000 µl (1 ml)
	Reúna los materiales para laboratorio 6, Parte A	Prepare juegos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:	a. Gradilla de plástico para tubos de microcentrifuga con: <ul style="list-style-type: none"> <li>i. Tubo de microcentrifuga de <i>E. coli</i> (EC)</li> <li>ii. Tubo de microcentrifuga de EB</li> <li>iii. Tubo de microcentrifuga de LyB</li> </ul>	1
			b. Contenedor de recolección de residuos líquidos, como un vaso de precipitado pequeño	1
			c. Micropipeta P-200	1
			d. Caja de puntas de pipetas desechables	1
			e. Marcador permanente	1
			f. Bolsa de riesgo biológico (para materiales que entran en contacto con células de <i>E. coli</i> ).	Uno por cada dos grupos

## PESTAÑA E (CONTINUACIÓN)

Sesión/ Laboratorio	Paso de preparación	Acción	Material	Cantidad necesaria por grupo
Capítulo 6, Sesión 2, Laboratorio 6, Parte B	Reúna los materiales para el laboratorio 6, Parte B	Prepare juegos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:	a. Gradilla de plástico para tubos de microcentrífuga con un tubo de microcentrífuga con EC de la Parte A	1
			b. Los siguientes reactivos: <sup>5</sup>	
			i. Tampón de unión (BB)	1
			ii. Tampón de lavado (WB)	1
			iii. Tampón de elución (EB)	1
			iv. Tampón de equilibrio de columna (CEB)	1
			c. Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml	2
			d. Columna de cromatografía	1
e. Contenedor de recolección de residuos líquidos, como un vaso de precipitado pequeño	1			
f. Micropipeta P-1,000	1			
g. Caja de puntas de pipetas desechables	1			

## ALÍCUOTAS DE REACTIVOS, ADN Y ENZIMAS

Los protocolos del laboratorio ABE se han escrito para minimizar la cantidad de alícuotas que debe hacer; pero, no se ha eliminado por completo. Las pautas para la separación en alícuotas se incluyen para cada laboratorio en la sección **Preparación**. Cuando sea adecuado, se hacen sugerencias que pueden ahorrar tiempo de preparación de las alícuotas. Por ejemplo, en lugar de hacer una sola alícuota para cada grupo, hay momentos en que se puede hacer una doble alícuota y dos grupos pueden compartir el reactivo.

## PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

La mayoría de las soluciones en su kit están en concentraciones de trabajo para que no tenga que diluirlas antes de dividir las en alícuotas para los alumnos. Sin embargo, es posible que se le envíen algunos a concentraciones más altas (es decir, concentración de "stock") que las concentraciones que los

<sup>5</sup> Se le entregará tubos de 15 ml de cada tampón o un recipiente grande de cada tampón. Si tiene los tubos de 15 ml, puede entregar uno a cada grupo. Si tiene el recipiente más grande, vierta 10 ml de cada tampón en una serie de matraces que pueden ser compartidos por dos grupos.

alumnos realmente usan. Por ejemplo, el tampón de borato de sodio (SB, para electroforesis) se proporciona a una concentración stock de 20x; los alumnos solo trabajarán con el SB en la concentración 1x. Diluir un gran volumen de SB en la concentración de trabajo le ahorrará tiempo de preparación.

**NOTA:** Una vez utilizado, SB 1x puede permanecer en la caja de electroforesis o descartarse. Si tiene clases consecutivas, mantenga el tampón en las cajas de electroforesis para las clases que realizan el mismo laboratorio.

Para calcular la dilución de una concentración de stock a una concentración de trabajo:

1. Determine cuánta solución de trabajo necesita por grupo.
2. Multiplique el volumen necesario por grupo por el número de grupos.
3. Use la fórmula  $C_1V_1 = C_2V_2$  para determinar el volumen de la solución stock ( $V_1$ ) a la concentración del stock ( $C_1$ ) deberá diluir para preparar el volumen final de la solución de trabajo ( $V_2$ ) en la concentración de trabajo ( $C_2$ ).
4. Multiplique este volumen por el número de clases que tenga.

**Ejemplo:** Necesita preparar SB 1x para hacer geles de agarosa. Si cada una de sus clases tiene 12 grupos de laboratorio, necesitará seis geles para cada clase. Cada gel necesita aproximadamente 30 ml de SB 1x. El SB suministrado tiene una concentración de 20x. Tiene cinco clases en las que dirige los laboratorios de ABE.

- *Determine cuánta solución de concentración de trabajo necesitará por grupo:*

30 ml de SB 1x por gel

- *Multiplique el volumen necesario por grupo por el número de grupos.*

30 ml × 6 geles = 180 ml

- *Use la fórmula  $C_1V_1 = C_2V_2$ :*

20x × V1 = 1x × 180 ml

V1 = (1x × 180 ml) / 20x

V1 = 9 ml de 20x SB

Necesita mezclar 9 ml de 20x SB y 171 ml de dH<sub>2</sub>O (desionizada o destilada) para hacer 180 ml de 1x SB para una clase.

- *Multiplique este volumen por el número de clases que tiene:*

5 × 9 ml = 45 ml

Como tiene cinco clases, necesita mezclar 45 ml de 20x SB y 855 ml de dH<sub>2</sub>O. Esto producirá 900 ml de 1x SB, suficiente para las cinco clases.

## INFORMACIÓN PEDAGÓGICA ADICIONAL

---

Así como los alumnos necesitan ayuda para realizar experimentos e interpretar resultados, necesitan apoyo para utilizar las herramientas didácticas que son una parte esencial de la investigación científica. Independientemente de su dominio de la lectura, los alumnos que se encuentran con textos científicos a menudo necesitan ayuda para entender lo que están leyendo y aprender conceptos científicos. Cada capítulo tiene una o más lecturas que cumplen diferentes funciones: involucrar a los alumnos al relatar lo que están a punto de aprender en situaciones de la vida real, proporcionar la información de contexto necesaria para completar una actividad o resumir las interpretaciones conceptuales que los alumnos deben haber adquirido.

Puede usar una serie de estrategias para apoyar a los alumnos en la lectura de material científico. Algunas de las lecturas se pueden leer en voz alta durante la clase, y algunas se pueden completar como tarea. En cualquier caso, la lectura de los alumnos debe continuar con una serie de preguntas (quién, qué, por qué, cuándo y dónde) que se debatirán con toda la clase. Escribir las respuestas en papel milimetrado con un dibujo relacionado con la idea principal y luego publicarlas como referencia también puede ser efectivo. Los alumnos pueden elaborar su propio glosario, usando sus propias palabras para definir vocabulario desconocido. Pueden identificar palabras que no conocen, llevar las palabras a un debate con toda la clase y agregarlas a su glosario.

### CÓMO DIRIGIR DEBATES EN EL AULA

Los debates en clase son una estrategia integral para la enseñanza y el aprendizaje en el programa ABE:

- Preguntas que hacen que los alumnos analicen o repasen una lectura, ya sea solos o como parte de un grupo, pueden usarse para iniciar un debate. Conforme se desarrolla el debate, los alumnos pueden plantear sus propias preguntas.
- El debate a nivel de toda la clase brinda a los alumnos la oportunidad de relatar experiencias de la vida real que podrían haber tenido sobre el tema en cuestión, lo que hace que el curso sea auténtico, práctico y pertinente.
- El debate se puede utilizar para generar ideas. Luego, los alumnos tienen la oportunidad de explicar sus ideas y aportar pruebas para sus conclusiones.
- Los debates que requieren conocimiento previo pueden revelar ideas preconcebidas sobre un tema.
- El proceso de criticar explicaciones en un foro público permite a los alumnos alcanzar una mayor profundidad de comprensión y confrontar ciertas ideas preconcebidas.
- Los debates se pueden utilizar para informar la instrucción al permitirle evaluar la comprensión previa, determinar el nivel de comprensión de los alumnos de los conceptos que se comentan y determinar la lógica y el razonamiento de los alumnos.

Los alumnos pueden no estar acostumbrados a los debates en las aulas de ciencias. Si alienta a todos los alumnos a participar y practicar el “tiempo de espera” aumentará la participación en la clase y la calidad de las respuestas. Si permite que los alumnos tengan debates en grupos pequeños antes de participar en debates a nivel de toda la clase brindará a los alumnos más reticentes la oportunidad de ganar confianza para hablar ante un grupo y conocer el valor de sus contribuciones.

Como facilitador, tiene varias tareas:

- Plantee preguntas que inviten a la reflexión.
- Divida las preguntas más grandes en preguntas más pequeñas y manejables.
- Ayude a los alumnos a aclarar sus ideas reformulando o haciendo preguntas diferentes.
- Mantenga el debate enfocado en los conceptos que se están explorando.
- Ayude a los alumnos a practicar la “etiqueta” del debate al escuchar y responder a los demás.

## **CUADERNOS E INFORMES DE LABORATORIO**

Cada estudiante debe usar un cuaderno de laboratorio que utilizará para guardar todo su trabajo, incluidas las respuestas a las preguntas respondidas individualmente o como parte de un grupo, notas tomadas durante los debates, datos y comentarios registrados en investigaciones de laboratorio y tareas de redacción. Este cuaderno permitirá a los alumnos referirse a sus ideas y pensamientos, y les permitirá a usted y a sus alumnos evaluar su progreso en la comprensión conceptual y monitorear las mejoras en habilidades tales como redacción, recopilación de datos, análisis crítico y pensamiento.

A medida que los alumnos participen en el programa ABE, bríndeles la oportunidad de escribir informes de laboratorio que sigan una secuencia de crear una hipótesis, recopilar y analizar datos, y sacar conclusiones y afirmaciones respaldadas por evidencia.

## **USO DE DIAGRAMAS DE FLUJO EN EL LABORATORIO**

Dada la complejidad de algunos de los protocolos de laboratorio de ABE, será muy difícil para los alumnos completar los laboratorios a tiempo y correctamente si no revisan los protocolos de antemano. Además, dado que hay muchos pasos para cada protocolo, los alumnos deben desarrollar un diagrama de flujo para trabajar durante cada laboratorio. Los alumnos deben desarrollar diagramas de flujo que sean lo suficientemente detallados como para que no necesiten consultar la Guía del estudiante durante el laboratorio y que les permita registrar notas durante el experimento.

Se proporcionan diagramas de flujo de muestra para cada laboratorio y como Masters reproducibles en el sitio web del programa. Para los primeros laboratorios, es posible que desee proporcionar a los alumnos una muestra, ya sea completa o parcial.

Revise el diagrama de flujo de cada estudiante antes de que comience el laboratorio.

## RECURSOS

Los enlaces a los recursos que puede utilizar para mejorar el aprendizaje de los alumnos están disponibles en el sitio web del programa. Estos recursos incluyen videos, artículos relacionados con el contenido del plan de estudios y laboratorios que pueden usarse para ampliar el aprendizaje de los alumnos.

## ICONOS

Se utilizan íconos en las Guías del maestro y 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	Guía del estudiante	Guía del maestro
	<b>¿SABÍA?:</b> Información general sobre los conceptos que se tratan en el capítulo.	✓	
	<b>DETÉNGASE Y PIENSE:</b> Preguntas clave para mejorar la comprensión de los alumnos de los protocolos de laboratorio.	✓	✓
	<b>CONSIDERAR:</b> Preguntas clave para mejorar la comprensión de los alumnos sobre conceptos biológicos importantes.	✓	✓
	<b>SEGURIDAD:</b> Recordatorios de técnicas clave de seguridad en el laboratorio.	✓	✓
	<b>TÉCNICA DE LABORATORIO:</b> Técnicas de laboratorio útiles para mejorar la eficiencia y los resultados.	✓	✓
	<b>IDEAS CLAVE:</b> Conceptos importantes que son centrales para cada sesión.		✓
	<b>RECURSOS:</b> Información sobre los recursos encontrados en el sitio web del programa.		✓
	<b>IR MÁS ALLÁ:</b> Áreas sugeridas para ir más allá del plan de estudios.		✓
	<b>ESTRATEGIA:</b> Sugerencias de mejores prácticas al enseñar este contenido.		✓

**A**

**AMGEN<sup>®</sup> Biotech Experience**  

---

**Scientific Discovery for the Classroom**

**AMGEN<sup>®</sup> Foundation**





# INTRODUCCIÓN AL PROGRAMA

## AMGEN BIOTECH EXPERIENCE



# DESCRIPCIÓN GENERAL

---

La Introducción al Programa proporciona un contexto para las experiencias de laboratorio que sus alumnos tendrán en Amgen Biotech Experience (ABE). Los alumnos leen sobre ingeniería genética e investigación biofarmacéutica (biofarmacia).

## SUPUESTOS DEL CONOCIMIENTO PREVIO

Los estudiantes ya deben saber lo siguiente:

- La relación entre el ADN, los genes, las proteínas y los rasgos, específicamente, que los genes contienen el código para fabricar una proteína y que las proteínas son moléculas que se utilizan para fabricar y desarrollar la célula, por lo que son responsables de los rasgos.

## OBJETIVOS DE APRENDIZAJE

Al final de la Introducción al programa, los alumnos podrán hacer lo siguiente:

- Explicar que la ingeniería genética crea organismos genéticamente modificados que producen proteínas humanas a partir del ADN humano.
- Explicar cómo se puede usar la ingeniería genética para tratar algunas enfermedades.

## RESULTADOS EVALUADOS

- Evalúe la capacidad de cada estudiante para explicar que la ingeniería genética crea organismos genéticamente modificados que producen proteínas humanas a partir del ADN humano y cómo la ingeniería genética puede usarse para tratar algunas enfermedades al revisar el trabajo de los alumnos sobre el K-W-L y el Muro de palabras en la segunda sesión.

## SECUENCIA DE ACTIVIDADES SUGERIDA

### SESIÓN 1

---

- Haga que los alumnos comiencen un K-W-L sobre los conceptos de biotecnología y la industria biofarmacéutica. (10 minutos)
- Haga que los alumnos lean [¿Qué es la biotecnología?](#) Dirija un debate sobre la lectura. (35 minutos)

### SESIÓN 2

---

- Haga que los alumnos comiencen un K-W-L sobre los conceptos de biotecnología y la industria biofarmacéutica. (20 minutos)
- Haga que los alumnos creen un Muro de palabras que defina las palabras en [¿Qué es la biotecnología?](#) (20 minutos)
- Haga que los alumnos registren una pregunta relacionada con el contenido de [¿Qué es la biotecnología?](#) (5 minutos)

# PREPARACIÓN

---

Familiarícese con el contenido de la descripción general del plan de estudios y de esta introducción. Elija y marque un video que muestre debates sobre biotecnología y sus contribuciones.

## MATERIALES PARA ACTIVIDADES DE LECTURA

Reúna los siguientes materiales y distribúyalos a los alumnos según sea necesario:

- Tres hojas de papel de periódico, con la etiqueta “Saber (K)”, “Quiero saber (W)” y “Aprendido (L)”, respectivamente
- Marcadores
- Resaltadores o notas adhesivas para tomar notas
- Una ficha o nota adhesiva por estudiante
- Cinta adhesiva o cinta de enmascarar

# ENSEÑANZA

---

## SESIÓN 1

---

**IDEAS CLAVE:** La ingeniería genética permite a los humanos insertar ADN humano en otros organismos y luego hacer que estos organismos genéticamente modificados produzcan proteínas humanas. Estas proteínas se pueden usar para tratar una amplia variedad de enfermedades y ayudar a millones de personas.



**Haga que los alumnos comiencen un K-W-L sobre los conceptos de biotecnología y la industria biofarmacéutica. (10 minutos)**

Publique las hojas preparadas de papel de periódico: “Saber (K)”, “Quiero saber (W)” y “Aprendido (L)”. Pida a los alumnos que indiquen lo que ya saben sobre biotecnología (“K”) y lo que quieren saber (“W”), y que anoten esto en el papel periódico. Mantenga las hojas publicadas en el aula durante el programa.

**ESTRATEGIA:** Después de cada laboratorio o lectura, vuelva a visitar la hoja “W” y comience a agregar a la hoja “L”. Revise las hojas “W” y “L” al final del programa para evaluar cómo ha evolucionado el conocimiento de los alumnos sobre este campo.



**Haga que los alumnos lean ¿Qué es la biotecnología? Dirija un debate sobre la lectura. (35 minutos)**

En esta lectura, los alumnos aprenden que la biotecnología comenzó después del descubrimiento de los plásmidos y las enzimas de restricción y que se utiliza

para desarrollar productos y tecnologías que mejoran la salud humana, crean combustibles para impulsar el mundo y desarrollan mejores sistemas para la producción de alimentos. Recuerde a los alumnos que usen el **Glosario** para buscar términos científicos si necesitan ayuda para entender la lectura.

Muestre uno o más videos que presenten debates sobre biotecnología y sus contribuciones. Después de ver los videos, pida a los alumnos que intercambien ideas sobre el futuro y la promesa de la biotecnología.



**RECURSOS:** Los enlaces a los videos que puede mostrar a los alumnos están disponibles en el sitio web del programa.

Para ayudar a los alumnos a comprender la lectura y los videos, pídeles que trabajen en grupos de dos a cuatro y lleven a cabo las siguientes estrategias de lectura:

- Destaque o registre en notas adhesivas cualquier palabra y concepto que considere importante mientras leen.
- Registre las preguntas que tengan sobre la lectura o el contenido relacionado.

Diga a los alumnos que compartirán algunas de sus notas y preguntas en la siguiente clase.



**ESTRATEGIA:** Mientras dirige el debate, emplee las siguientes prácticas y técnicas:

- Dé a los alumnos tiempo para evaluar las respuestas de los demás.
- Pida aclaraciones.
- Pida una explicación.
- Replantee o reformule.
- Pida un ejemplo.
- Pida evidencia.
- Proporcione ejemplos y contraejemplos.
- Pida a los alumnos que aporten una explicación.
- Pida a los alumnos que evalúen una respuesta.

## SESIÓN 2

---



**IDEAS CLAVE:** Los investigadores biofarmacéuticos estudian la biología humana para comprender mejor cómo desarrollar soluciones para mejorar la vida de las personas que padecen enfermedades graves.

**Haga que los alumnos comiencen un K-W-L sobre los conceptos de biotecnología y la industria biofarmacéutica. (20 minutos)**

Pida a los alumnos que vuelvan a examinar la hoja “W” y comiencen a agregar a la hoja “L”, utilizando lo que aprendieron en **¿Qué es la biotecnología?** Explique a los alumnos que realizarán actividades y laboratorios en los próximos días que les darán una mejor idea de la biotecnología y la biofarmacia.

**ESTRATEGIA:** Si los alumnos necesitan apoyo adicional para comprender la lectura, dirija un debate en clase formulando las siguientes preguntas:

- ¿Qué idea importante sacó de esta lectura?
- ¿Cómo cree que la información de esta introducción se relaciona con los laboratorios que está a punto de realizar?



**Haga que los alumnos creen un Muro de palabras que defina las palabras del contenido de ¿Qué es la ingeniería genética? (20 minutos)**

Entregue una ficha o una nota adhesiva y un marcador a cada estudiante y pídale que escriban una palabra o término clave de la lectura. Haga que los alumnos publiquen las tarjetas de una en una, agrupando las mismas palabras o palabras similares.

**ESTRATEGIA:** Es posible que desee mantener este “Muro de palabras” publicado y volver a examinarlo cada cierto tiempo; puede agregarlo a lo largo del programa, pero limite el número de palabras a 10-20. Anime a los alumnos a consultar el Muro de palabras durante los debates en clase o mientras leen protocolos de laboratorio. También puede usar el Muro de palabras como una herramienta para evaluar el aprendizaje de los alumnos al pedirles que desarrollen mapas conceptuales que muestren las relaciones entre las palabras.

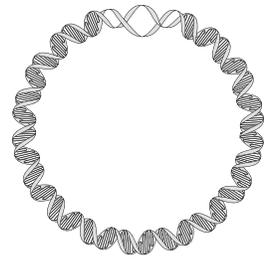


**Haga que los alumnos registren una pregunta relacionada con el contenido de ¿Qué es la biotecnología? (5 minutos)**

**ESTRATEGIA:** Es posible que desee volver a examinar estas preguntas al final del programa (como clase o individualmente) para evaluar la comprensión del contenido por parte de los alumnos.







# CAPÍTULO 1

## ALGUNAS HERRAMIENTAS DEL TRABAJO



# DESCRIPCIÓN GENERAL

---

El Capítulo 1 presenta a los alumnos algunas herramientas de ingeniería genética, y los laboratorios relacionados les brindan a los alumnos una experiencia práctica con algunas herramientas y técnicas importantes comúnmente utilizadas en biología molecular. A los alumnos también se les presentan algunas mediciones volumétricas que se usan con mayor frecuencia en este campo de la ciencia.

## SUPUESTOS DEL CONOCIMIENTO PREVIO

Los estudiantes ya deben saber lo siguiente:

- La relación entre el ADN, los genes, las proteínas y los rasgos, específicamente, que los genes contienen el código para fabricar una proteína y que las proteínas son moléculas que se utilizan para fabricar y desarrollar la célula, por lo que son responsables de los rasgos.
- Los objetos cargados, incluidas las moléculas, se mueven a través de un campo eléctrico.

## OBJETIVOS DE APRENDIZAJE

Al final de este capítulo, los estudiantes podrán 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.

## RESULTADOS EVALUADOS

- Evalúe la capacidad de cada estudiante para usar micropipetas y la técnica de electroforesis en gel revisando su trabajo en los Laboratorios 1.1 y 1.2, y revisando sus respuestas a las preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE* en el Laboratorio 1.1 (página A-17 de la Guía del estudiante) y a la primera pregunta de *DETÉNGASE Y PIENSE* en el Laboratorio 1.2, Parte B (página A-22 de la Guía del estudiante).
- Evalúe la capacidad de cada alumno para explicar la importancia de las micropipetas y la electroforesis en gel en la ingeniería genética revisando sus respuestas a la pregunta 1 en *Antes del laboratorio* en el Laboratorio 1.1 (página A-15 de la Guía del estudiante) a la pregunta 1 en *Antes del laboratorio* en el Laboratorio 1.2 (página A-19 de la Guía del estudiante), y a la pregunta 1 en *Preguntas del Capítulo 1* (página A-24 de la Guía del estudiante).

- Evalúe la capacidad de cada estudiante para describir cómo la electroforesis en gel separa el ADN al revisar sus respuestas a la segunda y tercera preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE* en el Laboratorio 1.2, Parte B (página A-22 de la Guía del estudiante).
- Evalúe la capacidad de cada estudiante para explicar cómo se puede utilizar la ingeniería genética para tratar algunas enfermedades genéticas revisando sus respuestas a la pregunta 2 en *Preguntas del Capítulo 1* (página A-24 de la Guía del estudiante).

## SECUENCIA DE ACTIVIDADES SUGERIDA

### SESIÓN 1

- Revise la *Introducción* y *los Objetivos del Capítulo 1*. (5 minutos)
- Pida a los estudiantes que contesten las preguntas *¿Qué sabes ya?* y que compartan sus respuestas. (10 minutos)
- Haga que los alumnos completen el Laboratorio 1.1. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y el *DETÉNGASE Y PIENSE* con la clase y que expliquen su razonamiento. (20 minutos)
- Pida a los alumnos que lean la introducción al Laboratorio 1.2 y que respondan las preguntas de *Antes del laboratorio*. (10 minutos)

### SESIÓN 2

- Haga que los alumnos completen el Laboratorio 1.2. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y de *DETÉNGASE Y PIENSE* con la clase y que expliquen su razonamiento. (35 minutos)
- Pida a los alumnos que discutan las *Preguntas del Capítulo 1* en grupos pequeños y que registren sus respuestas de forma individual. Dirija un debate a partir de las respuestas de los alumnos. (10 minutos)

### SESIÓN 3 (OPCIONAL)

- Haga que los alumnos completen el **Laboratorio 1.3 (RM 1)**. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y de *DETÉNGASE Y PIENSE* con la clase y que expliquen su razonamiento. (45 minutos)

# PREPARACIÓN

Antes de comenzar, debe familiarizarse con los procedimientos de laboratorio en cada capítulo, la preparación requerida y los materiales que necesitará. Las instrucciones suponen que proporcionará materiales para 12 grupos de 2 o 3 alumnos. Multiplique las cantidades según sea necesario en función de la cantidad de alumnos y el número de clases que imparte.

## PREPARE GELES DE AGAROSA PARA EL LABORATORIO 1.2

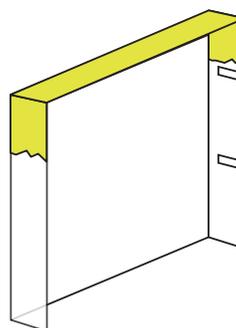
**RECURSOS:** El video *Preparación de un gel de agarosa* (disponible en el sitio web del programa) repasa el proceso de preparar y moldear un gel de agarosa como se describe a continuación.



1. Reúna los siguientes materiales:

- 6 bandejas para electroforesis en gel
- 6 peines de 10 pocillos
- Opcional: cinta adhesiva

2. Coloque las 6 bandejas de gel de electroforesis y los 6 peines. Prepare las bandejas para el moldeado asegurando las compuertas en los extremos de cada bandeja en la posición "arriba" o colocando cinta adhesiva en los extremos de cada bandeja. Coloque un peine en cada bandeja antes de agregar la solución de agarosa.



3. Prepare la solución de agarosa:

a. Reúna los siguientes materiales:

- 2 matraces graduados de 250 ml, uno etiquetado como "1x SB"
- Matraz de 500 ml etiquetado con "Gel"
- 12.5 ml de tampón de borato de sodio 20x (20x SB)
- 237.5 ml de agua destilada o desionizada.
- 1.44 g de agarosa
- Balanza de masa
- Plástico para envolver
- Punta de pipeta desechable
- Horno de microondas
- Guantes resistentes al calor o pinzas
- 6 bolsas con cierre de tamaño sándwich o de un cuarto de galón
- Contenedor de residuos para puntas y tubos de microcentrífuga usados

b. Prepare 250 ml de una solución 1x de tampón de borato de sodio (1x SB). Agregue 12.5 ml de 20x SB al matraz graduado de 250 ml etiquetado con "SB", agregue agua destilada o desionizada hasta la marca de 250 ml y mezcle.

- c. Vierta 180 ml de SB 1x en el segundo matraz graduado de 250 ml.
- d. Mida 1.44 g de agarosa con la balanza de masa y colóquelos en el matraz de 500 ml etiquetado con "Gel". Agregue los 180 ml de 1x SB del paso 3c para preparar una solución de agarosa al 0.8 %.
- e. Cubra la abertura del matraz de 500 ml con plástico para envolver. Use la punta de la pipeta para perforar un pequeño agujero en el plástico para envolver.
- f. Coloque el matraz cubierto en un horno de microondas y caliente durante un minuto a máxima potencia. Con una mano con guante, agite suavemente el matraz. (De otro modo puede usarse una placa caliente para derretir la agarosa, pero necesitará usar un hervidor doble).



**SEGURIDAD:** Use guantes resistentes al calor o emplee pinzas para sostener el matraz.

- g. Continúe calentando en el horno de microondas el matraz durante intervalos de 5 a 15 segundos hasta que toda la agarosa se haya disuelto. Para verificar esto, sostenga el matraz hacia la luz y agite la solución. Busque con cuidado las "lentes" de cristales de agarosa suspendidos en el líquido. Si no hay lentes visibles, la agarosa está disuelta. Espere cinco minutos para que la agarosa se enfríe a aproximadamente 60 °C antes de continuar con el paso 4.



**TÉCNICA DE LABORATORIO:** Intente no dejar que la solución se enfríe hasta el punto de que la agarosa comience a solidificarse nuevamente, pero si lo hace, simplemente vuelva a calentar la solución como se describió anteriormente.

4. Moldee los geles en las bandejas preparadas.

Cuando la solución de agarosa se haya enfriado hasta el punto de que pueda tocar de manera segura el fondo del matraz (aproximadamente 60 °C; esto tomará unos cinco minutos), vierta 25 a 30 ml de la solución de agarosa en cada bandeja de electroforesis.

- a. Asegúrese de incluir los peines al moldear los geles. La solución debe cubrir unos 2 mm del peine.
- b. Una vez que los geles se solidifiquen (lo que llevará alrededor de 30 minutos), extraiga los peines de cada gel. Tire de cada peine hacia afuera sin moverlo de un lado a otro; esto minimizará el daño a la pared frontal del pocillo.
- c. Retire los geles de las bandejas de electroforesis en gel y almacénelos en bolsas con cierres individuales con una pequeña cantidad restante de SB 1x del paso 3b. Almacene en el refrigerador hasta que esté listo para usar. Asegúrese de mantenerlos planos y no sobre una superficie con textura, ya que las superficies con textura se grabarán en los geles y afectarán la forma en que las moléculas se mueven a través de ellos.

## PREPARACIÓN Y MATERIALES ADICIONALES PARA EL LABORATORIO 1.1

Prepare 12 juegos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:

1. Gradilla de plástico para tubos de microcentrífuga que contenga un tubo de microcentrífuga de una solución de colorante rojo (RD, del kit)
2. Micropipeta P-20
3. Caja de puntas de pipetas desechables
4. Hoja de práctica de micropipeta laminada (del kit)
5. Contenedor de residuos para puntas y tubos de microcentrífuga usados (1 recipiente para cada 2 grupos)

## PREPARACIÓN Y MATERIALES ADICIONALES PARA EL LABORATORIO 1.2

1. Prepare 300 ml de SB 1x.

**TÉCNICA DE LABORATORIO:** Debe preparar SB 1x para todas las clases que completarán este laboratorio; simplemente multiplique las cantidades dadas por el número de clases.



- a. Reúna los siguientes materiales:
    - 15 ml de SB 20x
    - Matraz graduado de 500 ml etiquetado con "SB"
    - 285 ml de agua destilada o desionizada
    - 6 matraces de 50 ml etiquetado con "SB"
  - b. Agregue 15 ml de tampón SB 20x al matraz de 500 ml etiquetado con "SB", agregue agua destilada o desionizada hasta la marca de 300 ml y mezcle.
  - c. Vierta 50 ml de SB en cada uno de los matraces de 50 ml etiquetados con "SB".
2. De su kit, reúna 12 juegos de cuatro tubos (uno de cada uno RD, S1, S2 y S3). Asegúrese de devolver estos tubos al kit después del laboratorio.
  3. Prepare 12 juegos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:
    - Gradilla de plástico para tubos de microcentrífuga que contenga los siguientes reactivos:
      - ◆ Tubo de microcentrífuga de colorante rojo (RD)
      - ◆ Tubo de microcentrífuga de solución de colorante 1 (S1)
      - ◆ Tubo de microcentrífuga de solución de colorante 2 (S2)
      - ◆ Tubo de microcentrífuga de solución de colorante 3 (S3)
    - Micropipeta P-20
    - Caja de puntas de pipetas desechables

- 2 placas de práctica de pipeteo cargadas con gel de agarosa al 0,8 %.
  - Contenedor de residuos para puntas y tubos de microcentrífuga usados (1 recipiente para cada 2 grupos)
4. Prepare seis cajas de electroforesis, cada una cerca de una fuente de alimentación; cada dos grupos compartirán una caja. Una vez que las cajas están preparadas, cargue cada una con un gel de agarosa (preparado anteriormente) y coloque un matraz de 50 ml que contenga SB 1x (preparado anteriormente) cerca de cada caja.
  5. Coloque la microcentrífuga en una ubicación central para que todos los grupos puedan compartirla.

## PREPARACIÓN Y MATERIALES ADICIONALES PARA EL LABORATORIO 1.3 OPCIONAL

Los materiales para alumnos se enumeran en **Laboratorio 1.3: Examen de precisión de micropipetas (RM 1)**, que se encuentra al final de esta guía.

1. Haga una copia de **Laboratorio 1.3: Examen de precisión de micropipetas (RM 1)** para cada estudiante.
2. Reúna 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y etiquételos como "dH<sub>2</sub>O."
3. Con una micropipeta P-200, vierta 200 µl de agua destilada en los tubos marcados con "dH<sub>2</sub>O".
4. Prepare 12 juegos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:
  - Gradilla de plástico para tubos de microcentrífuga que contenga un tubo de microcentrífuga de dH<sub>2</sub>O (preparado en el paso 3)
  - Micropipeta P-20
  - Caja de puntas de pipetas desechables
  - 8 tubos de microcentrífuga vacíos de 1.5 ml
  - Marcador permanente
  - Gotero
  - Contenedor de residuos para puntas y tubos de microcentrífuga usados (1 recipiente para cada 2 grupos)
5. Coloque la microcentrífuga en una ubicación central para que todos los grupos puedan compartirla.

# ENSEÑANZA

## SESIÓN 1

**IDEAS CLAVE:** La biotecnología requiere el uso de herramientas muy específicas y tener competencias de laboratorio perfeccionadas. Las micropipetas se utilizan para medir y transferir volúmenes muy pequeños de líquidos.



**Revise la Introducción y los Objetivos del Capítulo 1 con los alumnos. (5 minutos)**

La **Introducción** explica el propósito principal de este capítulo, vinculándolo a la Introducción al programa. Los **Objetivos del Capítulo 1** indican a los alumnos en qué deben enfocarse mientras trabajan en el capítulo. Explique a los alumnos qué evaluará en este capítulo y cuáles son sus expectativas en relación con el desempeño de los alumnos.

**Pida a los alumnos que contesten lo siguiente ¿Qué sabes ya? y que compartan sus respuestas. (10 minutos)**

La sección *¿Qué sabes ya?* La sección activa el conocimiento sobre biotecnología de los alumnos y cómo la precisión es necesaria para llevar a cabo experimentos de biotecnología. Haga que los alumnos trabajen en parejas para responder las preguntas y registrar sus ideas; esto les ayudará a evaluar lo que saben y lo que no saben sobre la biotecnología y los procedimientos experimentales que se utilizan en ella.

**NOTA:** El nivel de respuestas de los alumnos a estas preguntas puede variar mucho según sus conocimientos previos. Por ejemplo, los alumnos en las clases de biología de nivel superior probablemente tendrán un conocimiento mucho más extenso de diferentes herramientas y técnicas biotecnológicas y una comprensión más profunda de por qué es necesaria la precisión.

Posibles respuestas a las preguntas *¿Qué sabes ya?*:

1. ¿Qué herramientas y técnicas de biotecnología ha usado anteriormente?  
¿Para qué las usó? *Las respuestas variarán mucho según las experiencias de los alumnos.*
2. ¿Por qué es importante la precisión cuando se llevan a cabo procedimientos de biotecnología? *La exactitud y la precisión de las mediciones ayudan a garantizar que los experimentos sean exitosos y reproducibles.*

Haga que los alumnos completen el Laboratorio 1.1. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y el *DETÉNGASE Y PIENSE* con la clase y que expliquen su razonamiento. (20 minutos)

En este laboratorio, los alumnos se familiarizan con la forma de usar la micropipeta para cargar y verter líquidos y comparan el tamaño relativo de las diferentes cantidades medidas por una micropipeta. Establezca un sistema de gestión de materiales para que los alumnos lo sigan. Los alumnos deben ser responsables de recoger y devolver sus kits.

Los alumnos comentan las preguntas de *Antes del laboratorio* en sus grupos y registran sus respuestas de forma individual. Haga que los alumnos compartan sus respuestas con la clase.

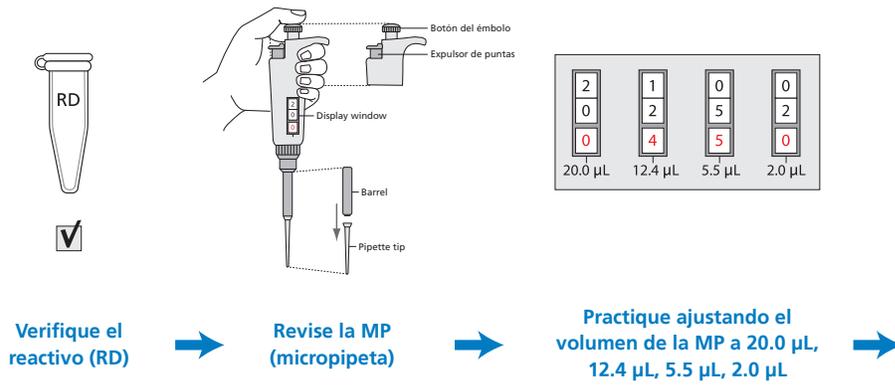


**ESTRATEGIA:** Para los laboratorios del Capítulo 1, es posible que desee mostrar a los alumnos el diagrama de flujo de muestra y explicar cómo se puede usar para ayudarlos a recordar los pasos que deben seguir para completar el laboratorio, en lugar de hacer que sigan los *Métodos* del laboratorio paso a paso.

Posibles respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio*:

1. ¿Por qué cree que es necesario utilizar volúmenes de reactivos muy pequeños y exactos en biotecnología? *En este campo, usará cantidades muy pequeñas de reactivos y las medidas correctas de las cantidades de reactivo son necesarias para que los procedimientos sean exitosos.*
2. Lea la sección de *Métodos* en las páginas de A-15 a A-17 de la Guía del estudiante y describa brevemente los pasos, utilizando palabras y un diagrama de flujo. *Las respuestas de los alumnos serán variadas. El diagrama de flujo de un estudiante podría parecerse al de la página siguiente.*

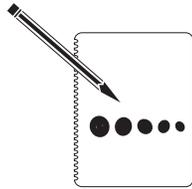
## Diagrama de flujo del laboratorio 1.1



**Práctica con la micropipeta:**

Nombre	20.0 µL	15.0 µL	10.0 µL	5.0 µL	2.0 µL
1. _____	<input type="checkbox"/>				
2. _____	<input type="checkbox"/>				
3. _____	<input type="checkbox"/>				
4. _____	<input type="checkbox"/>				

**Pipetee 20.0 µL RD en la hoja laminada** → **Pipetee otras cantidades de RD en la hoja laminada**



**Dibuje los tamaños de las cantidades de RD en el cuaderno**

Antes de que los alumnos comiencen el laboratorio, repase brevemente la sección *Métodos*, luego revise las partes de la micropipeta (**Figura 1.1** en la página A-14 de la Guía del estudiante) y demuestre cómo usarlo.



**RECURSOS:** El video *Cargar una pipeta* (disponible en el sitio web del programa) muestra cómo usar la micropipeta.



**TÉCNICA DE LABORATORIO:** Repase lo siguiente con los alumnos:

- Sostenga el tubo a la altura de los ojos para que pueda ver si la solución está cargada y distribuida adecuadamente.
- Al cargar la pipeta, presione siempre el émbolo hasta la primera posición de parada *antes de* sumergir la punta en el líquido. Esto evitará que una burbuja de aire sea expulsada al líquido.

Durante el laboratorio, los alumnos deben debatir las preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE* en sus grupos y luego registrar sus respuestas de forma individual. (Las preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE* ayudan a los alumnos a mantenerse enfocados en el objetivo del laboratorio). Haga que los alumnos compartan sus respuestas y sus opiniones para cada pregunta.



Posibles respuestas para las preguntas de *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? *Las cantidades son tan pequeñas y es fácil confundirse y seguir los pasos en el orden incorrecto, por lo que es importante verificar que la solución ingrese y salga de la punta. Si falta un reactivo, todo el experimento será inválido.*
- 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, para evitar colocar la micropipeta, usar el botón de expulsión para extraer la punta y mantener la caja de puntas cerrada. Si estuviera trabajando con plásmidos y células bacterianas, ¿por qué serían importantes estas precauciones? *Las puntas y todas las superficies deben permanecer limpias para que los plásmidos y las células bacterianas no se contaminen con otras sustancias. Tampoco desea contaminarse a sí mismo ni a las superficies con bacterias.*



**ESTRATEGIA:** Mientras dirige el debate, implemente las siguientes prácticas:

- Dé a los alumnos tiempo para evaluar las respuestas de los demás.
- Pida aclaraciones.
- Pida una explicación.
- Replantee o reformule.
- Pida un ejemplo.
- Pida evidencia.
- Proporcione ejemplos y contraejemplos.
- Pida a los alumnos que aporten una explicación.
- Pida a los alumnos que evalúen una respuesta.

Pida a los alumnos que lean la **introducción al Laboratorio 1.2** y que respondan las preguntas de *Antes del laboratorio*. (10 minutos)

Los alumnos se familiarizan con la técnica de electroforesis en gel. Explique a los alumnos que en este laboratorio practicarán el uso de colorantes para convertirse en expertos en la técnica. Si procede, diga a sus alumnos que en el Capítulo 4 o 4A utilizarán esta técnica para asegurarse de que están trabajando con el plásmido correcto.

## SESIÓN 2

**IDEAS CLAVE:** Aquellos que llevan a cabo la ingeniería genética utilizan herramientas muy específicas y tienen competencias de laboratorio perfeccionadas. La electroforesis en gel permite visualizar cantidades pequeñas de ADN. Con esta técnica, los científicos pueden separar e identificar fragmentos de ADN con los que están trabajando.



Haga que los alumnos completen el Laboratorio 1.2. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y de **DETÉNGASE Y PIENSE** y que expliquen su razonamiento. (35 minutos)

Haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* con la clase.

**ESTRATEGIA:** Para el laboratorio, es posible que desee mostrar a los alumnos los ejemplos de diagramas de flujo de las páginas A-22 y A-23 en lugar de hacerlos crear los suyos propios.



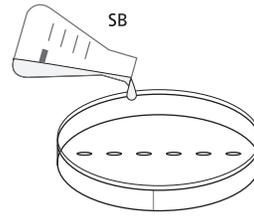
Posibles respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio*:

1. ¿En qué circunstancias podría ser importante usar la electroforesis en gel para separar e identificar los plásmidos y los segmentos lineales cortos de ADN? *Esto sería importante si está haciendo un plásmido recombinante y tiene que verificar que ha tenido éxito.*
2. Lea la sección *Métodos* en las páginas de A-20 a A-23 de la Guía del estudiante y describa brevemente los pasos para la Parte A y la Parte B, utilizando palabras y un diagrama de flujo. *Las respuestas de los alumnos serán variadas. Sus diagramas de flujo pueden parecerse a los de las páginas A-22 y A-23.*

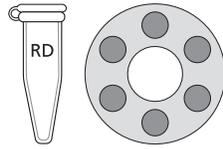
## Laboratorio 1.2, Diagrama de flujo de la Parte A



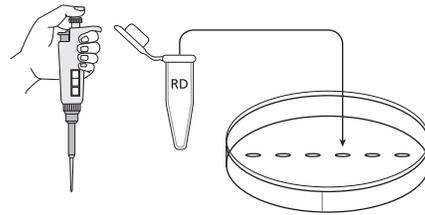
Verifique el reactivo (RD)



Cubra el gel mientras pipetea las placas de práctica con SB

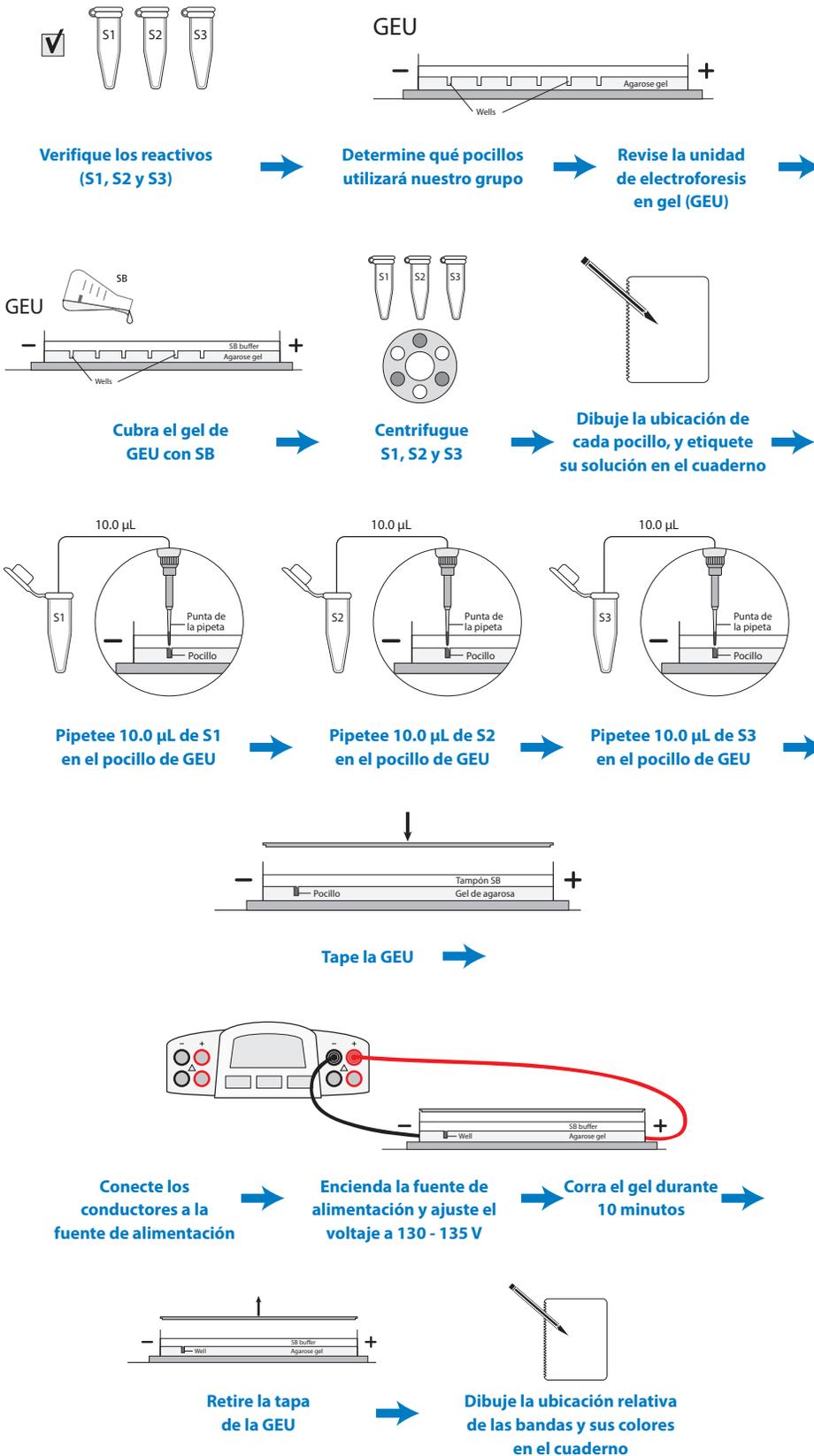


Centrifugue el tubo de RD



Pipetee 10.0  $\mu$ l RD en cada pocillo de la placa

## Laboratorio 1.2, Diagrama de flujo de la Parte B



Antes de que los alumnos comiencen el laboratorio, repase brevemente la sección *Métodos*, luego revise la unidad de electroforesis en gel (**Figura 1.3** de la página A-18 de la Guía del estudiante) y demuestre cómo usarla.



**RECURSOS:** El video *Trabajando con pequeños volúmenes de líquido* muestra cómo mezclar los líquidos con la micropipeta, *Mediante una caja de electroforesis* muestra cómo configurar el equipo de electroforesis, y *Cargar un gel* muestra cómo pipetear soluciones en pocillos. Los tres videos están disponibles en el sitio web del programa.

Durante el laboratorio, los alumnos deben debatir las preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE* en sus grupos y luego registrar sus respuestas de forma individual. Haga que los alumnos compartan sus respuestas y su razonamiento durante el laboratorio con la clase.



Posibles respuestas para las preguntas *DETÉNGASE Y PIENSE*:

- Estudie sus resultados de la electroforesis en gel. ¿Qué solución de muestra contenía un solo colorante: S1, S2 o S3? ¿Cómo lo sabes? *S3 contenía un solo colorante porque solo tenía una banda.*
- ¿Qué carga eléctrica tienen los colorantes? Explique su razonamiento. *Los colorantes tienen una carga negativa porque son repelidos por el electrodo negativo y atraídos por el electrodo positivo.*
- Los colorantes que se separan son naranja G (amarillo), azul de bromofenol (púrpura) y cianol de xileno (azul). Si la forma molecular y la carga eléctrica de los tres colorantes son similares, ¿cuál es el orden de los colorantes de las moléculas más pesadas a las más livianas, según sus resultados iniciales? ¿Por qué cree que este es el orden correcto? De la más pesada a la más liviana: *Xileno cianol, azul de bromofenol, naranja G. Este orden se basa en la apariencia de las bandas de color en el gel de agarosa después de correr la caja de electroforesis: el azul está más cerca de los pocillos, el púrpura es el siguiente más cercano y el colorante amarillo se alejó más de los pocillos.*

## ANTECEDENTES CIENTÍFICOS: MOVIMIENTO DE COLORANTES EN LA ELECTROFORESIS EN GEL

El orden que los alumnos pueden dar probablemente no sea correcto, porque los colorantes utilizados en este laboratorio tienen diferentes relaciones de carga a masa. Aunque las moléculas más pesadas se moverán más lentamente que las moléculas más pequeñas si ambas tienen la misma carga eléctrica, las moléculas con más carga eléctrica negativa se moverán más rápido que las moléculas con menos carga eléctrica negativa si ambas tienen el mismo peso. Los pesos moleculares para los colorantes son 408.40 unidades atómicas (au) para naranja G, 669.98 au para azul de bromofenol y 538.62 au para xileno cianol. Sin embargo, el xileno cianol migra más lentamente que el azul de bromofenol, aunque es más pequeño, porque el azul de bromofenol tiene una mayor relación carga a masa.

El otro factor que afecta la distancia recorrida a través del gel es la forma. Las moléculas más largas o ramificadas se enredarán en el gel y se moverán más lentamente que las moléculas más cortas o más compactas, incluso si tienen el mismo peso y carga eléctrica. En el Capítulo 4, los alumnos separarán segmentos lineales de ADN y plásmidos de ADN. Todas las moléculas de ADN tienen la misma relación de carga a masa, por lo que el movimiento del ADN está determinado únicamente por la masa y la forma.

**IR MÁS ALLÁ:** Es posible que desee entrar en más detalles sobre los factores que afectan la distancia recorrida a través del gel que se proporciona en la Guía del estudiante. Puede usar el ejemplo de los colorantes para presentar la idea de la relación carga a masa.



**Pida a los alumnos que comenten las Preguntas del Capítulo 1 en grupos pequeños y que registren sus respuestas de forma individual. Debata las respuestas de los alumnos como clase. (10 minutos)**

Los alumnos reflexionan sobre las herramientas que usaron y su comprensión del proceso de ingeniería genética respondiendo las *Preguntas del Capítulo 1*.

Posibles respuestas a las *Preguntas del Capítulo 1*:

1. ¿Por qué sería beneficioso utilizar una micropipeta para medir reactivos en biotecnología en lugar de otro instrumento de medición? *Las micropipetas se utilizan para transferir volúmenes muy pequeños y exactos de reactivos.*
2. ¿Qué le dicen los resultados de la electroforesis en gel sobre el material genético? *La electroforesis en gel se usa para separar e identificar plásmidos y segmentos lineales cortos de ADN.*



**Estrategia:** Mientras dirige el debate, implemente las siguientes prácticas:

- Dé a los alumnos tiempo para evaluar las respuestas de los demás.
- Pida aclaraciones.
- Pida una explicación.
- Replantee o reformule.
- Pida un ejemplo.
- Pida evidencia.
- Proporcione ejemplos y contraejemplos.
- Pida a los alumnos que aporten una explicación.
- Pida a los alumnos que evalúen una respuesta.

### SESIÓN 3 (OPCIONAL)

**IDEAS CLAVE:** La micropipeta es mucho más precisa que el gotero.

Haga que los alumnos completen el Laboratorio 1.3 (RM 1). Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y de **DETÉNGASE Y PIENSE** con la clase y que expliquen su razonamiento. (45 minutos)

Los alumnos comentan las preguntas de *Antes del laboratorio* en sus grupos y registran sus respuestas de forma individual. Haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* con la clase.

Posibles respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio*:

1. ¿Por qué la precisión podría ser importante en el proceso de ingeniería genética? *Necesita precisión para mezclar las cantidades correctas de reactivos; de lo contrario, el procedimiento podría no funcionar.*
2. Lea la sección *Métodos* a continuación y describa brevemente los pasos, utilizando palabras y un diagrama de flujo. *Las respuestas de los alumnos serán variadas. El diagrama de flujo de un estudiante podría verse como el diagrama de flujo en la página A-27.*

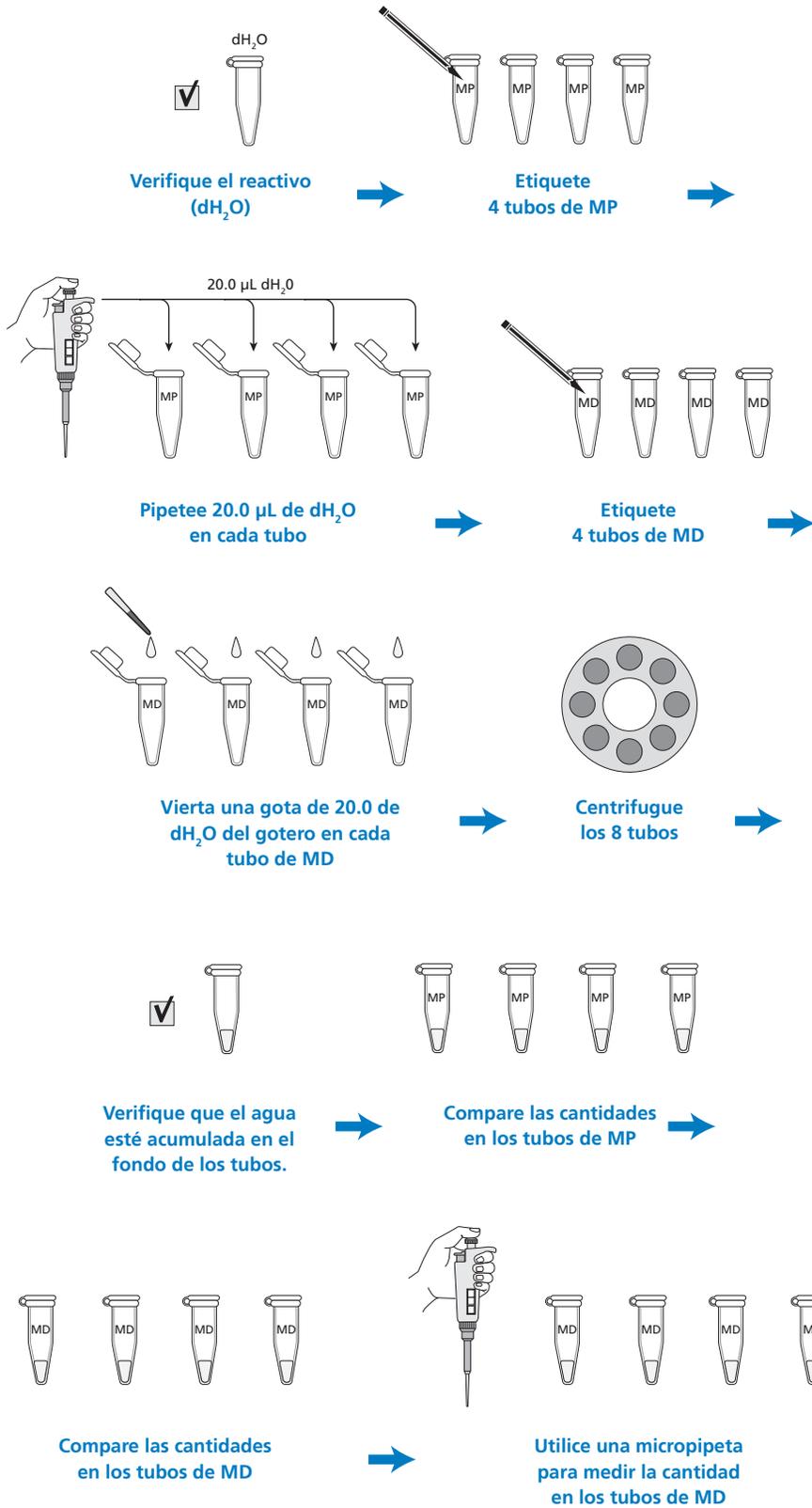
Durante el laboratorio, los alumnos deben debatir las preguntas de **DETÉNGASE Y PIENSE** en sus grupos y luego registrar sus respuestas de forma individual. Haga que los alumnos compartan sus respuestas y su razonamiento en cada pregunta.

Posible respuesta para la pregunta **DETÉNGASE Y PIENSE**:

¿Qué sucede cuando se centrifuga el agua? ¿Por qué podría ser importante la centrifugación cuando se manejan pequeños volúmenes de líquido? *El líquido se consolida en el fondo del tubo, por lo que puede verterse más fácilmente desde el tubo o mezclarse más fácilmente si se agrega otro reactivo al tubo.*



### Diagrama de flujo del laboratorio 1.3





**B**

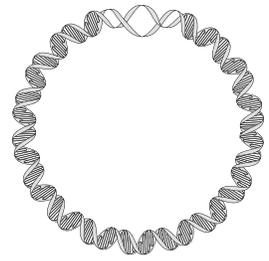
**AMGEN<sup>®</sup> Biotech Experience**  

---

**Scientific Discovery for the Classroom**

**AMGEN<sup>®</sup> Foundation**





## CAPÍTULO 2

### ¿CÓMO SE COMIENZA A CLONAR UN GEN?



# DESCRIPCIÓN GENERAL

---

En este capítulo, los alumnos aprenden sobre dos herramientas biológicas esenciales utilizadas en ingeniería genética: plásmidos y enzimas de restricción. Los alumnos llevan a cabo una actividad en papel en la que determinan qué enzima de restricción se debe usar para crear un nuevo plásmido recombinante. Luego participan en una actividad de laboratorio, Laboratorio 2, en la que usan las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III para digerir dos plásmidos, pARA y pKAN-R. En la preparación del laboratorio, los alumnos describen los fragmentos de ADN que resultarán del protocolo del laboratorio. También aprenden cómo se hacen las proteínas terapéuticas humanas y qué partes del proceso explorarán durante el desarrollo del plan de estudios.

## SUPUESTOS DEL CONOCIMIENTO PREVIO

Los estudiantes ya deben saber lo siguiente:

- El ADN es una molécula bicatenaria, y cada cadena de ADN está formada por subunidades unidas covalentemente llamadas nucleótidos.
- Un nucleótido está formado por un azúcar, un grupo fosfato y una base nitrogenada. Hay cuatro bases nitrogenadas diferentes: citosina, guanina, adenina y timina.
- Los nucleótidos están unidos entre sí por un esqueleto de azúcar-fosfato; las bases nitrogenadas sobresalen de este esqueleto.
- Las dos cadenas de ADN están conectadas por enlaces de hidrógeno entre bases nitrogenadas adyacentes, que se denominan pares de bases; la citosina siempre se combina con guanina, y la adenina siempre se combina con timina.
- El proceso de decodificación del ADN tiene dos pasos: un paso de transcripción que transfiere la información codificada en el ADN al ARN mensajero, y un paso de traducción en el que la información transportada por el ARN mensajero se usa para producir proteínas.

## OBJETIVOS DE APRENDIZAJE

Al final de este capítulo, los estudiantes podrán 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.

## RESULTADOS EVALUADOS

- Evalúe la capacidad de cada estudiante para describir las características del plásmido revisando sus respuestas a las preguntas 1, 3 y 5 en *Preguntas del Capítulo 2* (página B-19 de la Guía del estudiante).

- Evalúe la capacidad de cada estudiante para explicar cómo se usan los plásmidos para clonar un gen revisando sus respuestas a la pregunta 4 en *Preguntas del Capítulo 2* (página B-19 de la Guía del estudiante).
- Evalúe la capacidad de cada alumno para describir la función de las enzimas de restricción revisando sus respuestas a la pregunta 2 en *Preguntas del Capítulo 2* (página B-19 de la Guía del estudiante).
- Evalúe la capacidad de cada estudiante para explicar cómo usar las enzimas de restricción para crear un plásmido recombinante revisando sus respuestas a las preguntas 1 y 3 en *Preguntas de la actividad* (página B-14 de la Guía del estudiante).

## SECUENCIA DE ACTIVIDADES SUGERIDA

### SESIÓN 1

- Revise la **Introducción** y *los Objetivos del Capítulo 2* con los alumnos. (2 minutos)
- Pida a los estudiantes que contesten las preguntas *¿Qué sabes ya?* y que compartan sus respuestas. (10 minutos)
- Presentar y debatir **Su desafío** (3 minutos)
- Haga que los alumnos lean **Comenzar a clonar un gen** y **Producir Proteínas Terapéuticas Humanas en Bacterias** y que contesten las preguntas de *CONSIDERAR* (15 minutos)
- Dirija un debate sobre las respuestas de los alumnos a las preguntas de *CONSIDERAR* de **Comenzar a clonar un gen**. (10 minutos)
- Presente la secuencia del laboratorio ABE que seguirá la clase. (5 minutos)

### SESIÓN 2 (OPCIONAL)

- Haga que los alumnos completen una de las tres actividades opcionales: (1) Llevar a cabo una investigación en Internet sobre un producto farmacéutico realizado mediante un proceso recombinante, (2) llevar a cabo una investigación en Internet sobre un tema bioético relacionado con la ingeniería genética y luego debatir sobre el tema o escribir un artículo de opinión o publicación de blog, o (3) extraer ADN. (45 minutos)

### SESIÓN 3

- Haga que los alumnos lleven a cabo el procedimiento **Clone ese gen**. (15 minutos)
- Haga que los alumnos comenten la pregunta de *DETÉNGASE Y PIENSE* y de *Preguntas de la actividad* en pequeños grupos y que registren sus respuestas de forma individual. (15 minutos)
- Dirija un debate a partir de las respuestas de los alumnos. (15 minutos)

## SESIÓN 4

- Antes de comenzar el Laboratorio 2, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y que expliquen su razonamiento. Haga que los alumnos completen el Laboratorio 2. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE* y que expliquen su razonamiento. (25 minutos)
- Pida a los alumnos que comenten las *Preguntas del Capítulo 2* en grupos pequeños y que registren sus respuestas de forma individual. (10 minutos)
- Discuta las respuestas de los estudiantes como una clase. (10 minutos)

## PREPARACIÓN

Antes de comenzar, debe familiarizarse con los procedimientos de laboratorio en cada capítulo, la preparación requerida y los materiales que necesitará. Las instrucciones suponen que proporcionará materiales para 12 grupos de 2 o 3 alumnos. Multiplique las cantidades según sea necesario en función de la cantidad de alumnos y el número de clases que imparte.

**TÉCNICA DE LABORATORIO:** Con excepción del agua destilada, todos los reactivos utilizados en el Capítulo 2 deben almacenarse en un congelador hasta que esté listo para prepararlos para los alumnos.



## OBTENER ACCESO A INTERNET

Si planea que los alumnos completen una investigación en Internet sobre una enfermedad que es abordada por la industria biofarmacéutica o sobre un problema bioético relacionado con la ingeniería genética, asegúrese de que los alumnos tengan acceso a computadoras con una conexión confiable a Internet para la Sesión 2.

## EXTRACCIÓN DE ADN

Si planea que los alumnos extraigan ADN en la Sesión 2, elija un laboratorio y reúna los materiales necesarios. Aquí hay dos posibilidades:

- Los alumnos extraen ADN de las fresas.
- Los alumnos extraen y comparan ADN de varios organismos diferentes (por ejemplo, fresas, timo de ternera y *E. coli*).

**RECURSOS:** Los enlaces a los posibles laboratorios que puede usar en su clase están disponibles en el sitio web del programa.



## FOTOCOPIE LOS FOLLETOS Y REÚNA LOS MATERIALES PARA EL PROCEDIMIENTO CLONE ESE GEN

Se necesitan dos folletos para cada pareja de alumnos: **Diagrama de plásmido (RM 2)** y **Secuencia de ADN humano (RM 3)**. El Master reproducible (RM) para el folleto se encuentra al final de esta guía. Consiga tijeras y un rollo de cinta adhesiva para cada pareja. Los alumnos usarán estos materiales para construir un modelo en papel de un plásmido recombinante que contenga un gen de insulina.

## ALÍCUOTAS DE REACTIVOS PARA EL LABORATORIO 2

Los reactivos se pueden dividir en alícuotas hasta varios días antes del Laboratorio 2.

1. Saque los siguientes reactivos del congelador y permita que se descongelen durante 15 minutos:
  - Tampón de restricción 2.5x (2.5xB)
  - Plásmido pKAN-R (K)
  - Plásmido pARA (A)
  - Enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III (RE)
2. Etiquete dos tubos de microcentrífuga de la siguiente manera:
  - 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados con "2.5xB"
  - 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados con "K"
  - 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados con "A"
  - 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados con "RE"
  - 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados con "dH<sub>2</sub>O"
3. Agite en vórtex y gire los tubos 2.5xB y RE antes de dividir en alícuotas. Si no tiene un vórtice, mueva el tubo varias veces para mezclar y luego gire hacia abajo en la microcentrífuga.
4. Pipetee los reactivos en los tubos de microcentrífuga de la siguiente manera:
  - 20.0 µl de 2.5xB en los tubos marcados como "2.5xB"
  - 10.0 µl de la solución de plásmido pKAN-R en los tubos marcados con "K"
  - 10.0 µl de la solución de plásmido pARA en los tubos marcados con "A"
  - 5.0 µl de RE en los tubos marcados con "RE"
  - 1,000 µl de agua destilada en los tubos marcados con "dH<sub>2</sub>O"
5. Después de la división en alícuotas, almacene los reactivos en el refrigerador hasta el comienzo del período de clase en el que se utilizarán.

## PREPARAR Y CALIBRAR BAÑO MARÍA PARA EL LABORATORIO 2

El día anterior al Laboratorio 2, prepare y calibre el baño maría a 37 °C para garantizar que la temperatura sea correcta para la incubación de las digestiones de

restricción de los alumnos. Es importante que la temperatura no supere los 37 °C, ya que esto conducirá a la desnaturalización de la enzima; equívóquese hacia abajo si es necesario. Asegúrese de usar agua destilada en el baño maría.

1. Reúna los siguientes materiales:
  - Baño maría
  - Termómetro
  - Gradilla flotante para tubos de microcentrífuga
  - Temporizador
2. Coloque el baño maría en una ubicación central para que todos los grupos puedan compartirlo.
3. Llene el baño maría con agua destilada y coloque el termómetro dentro de este. Caliente el agua a 37 °C, manteniendo el baño cubierto para reducir la evaporación.
4. Coloque la gradilla flotante para tubos de microcentrífuga (para sostener los tubos en el baño maría) y el temporizador en la mesa al lado del baño maría.
5. Si las clases realizarán el Laboratorio 3, deje el baño maría preparado y calibre a 80 °C el día anterior al laboratorio. (Asegúrese de que haya suficiente agua en el baño y que el baño esté cubierto para reducir la evaporación).

## REÚNA LOS MATERIALES PARA EL LABORATORIO 2

Reúna materiales en el día del laboratorio. Después de preparar las gradillas con los reactivos, asegúrese de guardarlos en el refrigerador hasta que los alumnos estén listos para usarlos.

1. Prepare 12 juegos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:
  - Gradilla de plástico para tubos de microcentrífuga que contengan los siguientes reactivos:
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de 2.5xB
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de plásmido pKAN-R (K)
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de plásmido pARA (A)
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de RE
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de dH<sub>2</sub>O
  - Micropipeta P-20
  - Caja de puntas de pipetas desechables
  - 4 tubos de microcentrífuga vacíos de 1.5 ml
  - Marcador permanente
  - Contenedor de residuos para puntas y tubos de microcentrífuga usados (necesitará 1 contenedor por cada 2 grupos)
2. Coloque la microcentrífuga en una ubicación central para que todos los grupos puedan compartirla.

# ENSEÑANZA

## SESIÓN 1



**IDEAS CLAVE:** Los plásmidos son vectores ideales para usar en ingeniería genética porque pueden replicarse en la célula bacteriana, tienen una secuencia llamada promotor del gen que permite la transcripción y traducción de un gen cercano, llevan un gen de resistencia a los antibióticos que se puede usar como marcador seleccionable y se puede transferir a las bacterias mediante un proceso llamado conjugación. La creación de un plásmido recombinante que contiene ADN de otra especie se logra mediante la acción de enzimas de restricción. Las enzimas de restricción pueden cortar un gen de interés del ADN humano y pueden cortar el plásmido; las dos piezas de ADN se pueden unir. Algunas enzimas de restricción cortan de manera asimétrica el ADN en secuencias específicas, de modo que el extremo de una cadena sobresale del otro. Estos extremos se denominan “extremos adhesivos”. Otras enzimas pueden cortar directamente el ADN y crear “extremos romos”.

**Revise la Introducción y los Objetivos del Capítulo 2 con los alumnos. (2 minutos)**

La **Introducción** explica el propósito principal de este capítulo, vinculándolo a la Introducción al programa. Los **Objetivos del Capítulo 2** indican a los alumnos en qué deben enfocarse mientras trabajan en el capítulo. Explique a los alumnos qué evaluará en este capítulo y cuáles son sus expectativas en relación con el desempeño de los alumnos.

**Pida a los estudiantes que contesten las preguntas ¿Qué sabes ya? y que compartan sus respuestas. (10 minutos)**

Responder las preguntas en esta sección activa el conocimiento de los alumnos sobre el ADN y cómo se usan los plásmidos y las enzimas de restricción en la ingeniería genética, y revela las brechas que existen en su conocimiento. Haga que los alumnos respondan las preguntas en parejas y que anoten sus ideas para que pueda evaluar lo que saben y lo que no saben.

Posibles respuestas a las preguntas ¿Qué sabes ya?:

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. *El ADN es una molécula bicatenaria, y cada cadena está compuesta de nucleótidos. Existen cuatro nucleótidos diferentes, que se distinguen por una subparte llamada base. Las bases son citosina, guanina, adenina y timina. Las dos cadenas de ADN están conectadas por enlaces de hidrógeno entre bases adyacentes, que se denominan pares de bases. En los pares de bases, la citosina siempre se combina con guanina, y la adenina siempre se combina con timina. Las cadenas dobles y los enlaces de hidrógeno débiles entre pares de bases aseguran que el ADN se pueda desenrollar y copiar. Los cuatro nucleótidos diferentes permiten crear secuencias que codifican las estructuras de las proteínas.*

2. Todos los organismos vivos contienen ADN. ¿De qué manera es igual el ADN de los diferentes organismos y de qué manera varía? *Todo el ADN tiene la misma estructura y utiliza el mismo código y los mismos procesos de transcripción y traducción. Entre los diferentes organismos, las secuencias de ADN variarán porque los organismos producen diferentes proteínas.*
3. Aplicando lo que sabe sobre los genes y cómo se expresan, explique por qué es posible que una célula bacteriana produzca una proteína humana a partir de las instrucciones codificadas en un gen humano. *La célula bacteriana puede crear una proteína humana a partir de un gen humano debido a que el ADN en todos los organismos usa el mismo código y los mismos procesos de transcripción y traducción.*
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? *Las enzimas de restricción pueden cortar un gen humano y pueden cortar un plásmido, y estas dos piezas se pueden unir para formar un plásmido recombinante que se inserta en las bacterias.*

### Presentar y debatir Su desafío. (3 minutos)

Haga que los alumnos lean **Su desafío** y discuta qué harán en estos laboratorios.

### Haga que los alumnos lean **Comenzar a clonar un gen y Producir Proteínas Terapéuticas Humanas en Bacterias** y que contesten las preguntas de **CONSIDERAR** que siguen a esta primera lectura. (15 minutos)

En estas lecturas, los alumnos aprenden por qué los plásmidos son una herramienta ideal para insertar un gen humano en las bacterias y cómo se usan las enzimas de restricción para crear un plásmido recombinante. Haga que los alumnos anoten las respuestas de las preguntas de **CONSIDERAR** en sus cuadernos. Recuerde a los alumnos que usen el **Glosario** para buscar términos científicos si necesitan ayuda para entender la lectura.

### Dirija un debate sobre las respuestas de los alumnos a las preguntas de **CONSIDERAR** de **Comenzando a clonar un gen y Produciendo Proteínas Terapéuticas Humanas en Bacterias**. (10 minutos)

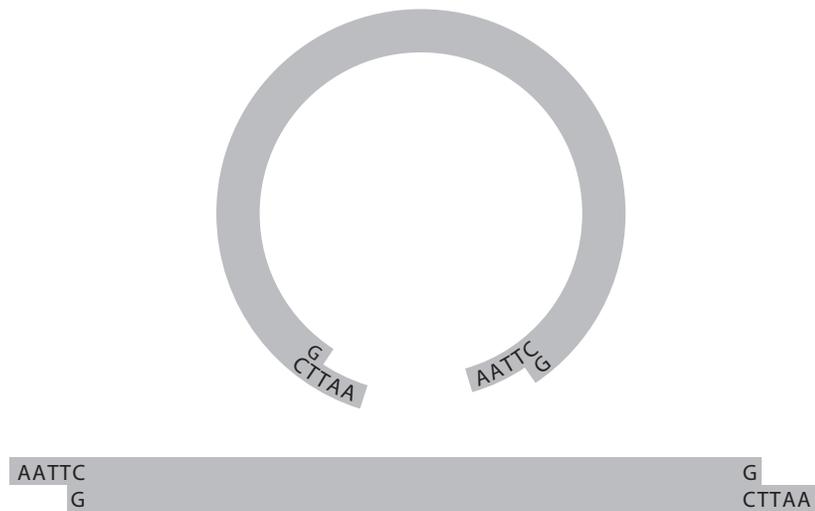
Evalúe el conocimiento de los alumnos sobre el ADN y cómo se utilizan los plásmidos y las enzimas de restricción en la ingeniería genética al revisar las respuestas de los alumnos a las preguntas de **CONSIDERAR**.

Posibles respuestas a las preguntas de **CONSIDERAR**:

- 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. *Si algunas bacterias transportan un plásmido con un gen de resistencia a los antibióticos, sobrevivirán cuando se expongan al antibiótico. Esto les da una ventaja selectiva sobre las bacterias que no llevan ese plásmido; aquellas bacterias sin el plásmido morirán cuando se expongan al antibiótico.*



- ¿Cómo las bacterias que llevan una enzima de restricción evitan cortar su propio ADN? *Las bacterias podrían tener una forma de proteger su propio ADN en secuencias donde podría ser cortada por la enzima de restricción, o su ADN podría no tener la secuencia cortada por la enzima de restricción.*
- ¿Cuál es la secuencia del extremo adhesivo que se produce cuando se corta el ADN con *BamHI*? ¿Con *HindIII*? *El extremo sobresaliente para BamHI es GATC. El extremo sobresaliente para HindIII es AGCT.*
- Los científicos pueden modificar a los plásmidos para tener un solo sitio de enzimas de restricción. Imagina que tienes 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. *Hay dos formas posibles de representar un plásmido que se ha cortado con EcoRI:*



*Usaría la enzima de restricción EcoRI para cortar el gen de la planta. Los extremos del gen pueden alinearse con los extremos del plásmido.*

## ANTECEDENTES CIENTÍFICOS: CLONACIÓN

En su sentido más verdadero, un clon es una copia genética exacta de un organismo. En la naturaleza, la clonación ocurre cada vez que una célula se divide durante la mitosis para producir células hijas, o cuando un embrión se divide para producir gemelos. La reproducción asexual en plantas implica la generación de una planta completamente nueva a partir de una célula madura, completamente diferenciada (somática). La clonación en plantas es posible porque cada célula madura tiene el complemento completo de ADN necesario para producir una planta completa. Casi todas las células animales también contienen un complemento de ADN completo, lo que les permite regenerar células

dañadas, e incluso partes de todo el cuerpo, en el caso de anfibios y reptiles.

El desarrollo de clones de animales completos a partir de células completamente diferenciadas no ha sido tan sencillo como lo ha sido con las plantas. Sin embargo, en 1996 (¡después de 276 intentos!), investigadores escoceses lograron clonar al primer mamífero, Dolly, de la célula de la ubre de una oveja de seis años. Desde entonces, muchos otros animales han sido clonados de células somáticas, incluidos gatos, vacas, ciervos, perros, bueyes, ratas, cabras, lobos, cerdos, búfalos de agua e incluso un mono rhesus, pero no humanos. A pesar de varias afirmaciones, la clonación humana no se ha logrado (y si se debería lograr, es una pregunta que quizás desee debatir con sus alumnos). Si los alumnos están interesados en aprender cómo se clonan los animales, la información está disponible en Internet. Informe a los alumnos que realizarán la clonación genética, es decir, harán una copia exacta de un solo gen de un organismo (anémona de mar) en otro organismo (bacteria).

**ESTRATEGIA:** Los dibujos de los alumnos pueden variar y es posible que desee comparar diferentes representaciones. Debido a que un plásmido es un objeto tridimensional, los alumnos pueden tener problemas para visualizar un cambio en la estructura, como un corte. Por ejemplo, en la segunda representación del plásmido cortado, el extremo se voltea y, por lo tanto, también lo hace la secuencia. Si es necesario, haga modelos de papel para el plásmido y haga que los alumnos realicen el corte en el modelo.



**ESTRATEGIA:** Mientras dirige el debate, implemente las siguientes prácticas:

- Dé a los alumnos tiempo para evaluar las respuestas de los demás.
- Pida aclaraciones.
- Pida una explicación.
- Replantee o reformule.
- Pida un ejemplo.
- Pida evidencia.
- Proporcione ejemplos y contraejemplos.
- Pida a los alumnos que aporten una explicación.
- Pida a los alumnos que evalúen una respuesta.



**Presente la secuencia del laboratorio ABE que seguirá la clase. (5 minutos)**

Repase la secuencia de laboratorio ABE elegida. Si bien los alumnos pueden no tener la oportunidad de completar todos los laboratorios, es importante que sepan cómo su trabajo encaja en el “panorama general” del desarrollo de organismos genéticamente modificados para fabricar productos que los seres humanos puedan usar. Revise la **Figura 2.4** (página B-10 de la Guía del estudiante), que muestra la producción de una proteína terapéutica humana. Señale qué partes del proceso completarán en su secuencia de laboratorio y describa los desafíos específicos de los alumnos (ver **Tabla OV.1** en la página OV-3).

## ANTECEDENTES CIENTÍFICOS: ¿POR QUÉ HAY PROMOTORES BACTERIANOS EN LOS PLÁSMIDOS?

Todos los genes tienen sus propios promotores, entonces, ¿por qué incluir un promotor al construir un vector plasmídico? El mecanismo de transcripción génica es el mismo en todos los organismos: la ARN polimerasa se une a un promotor específico y copia la secuencia de ADN del gen en el ARN mensajero. Sin embargo, la secuencia de ADN de los promotores y la estructura de las ARN polimerasas pueden variar; así, la ARN polimerasa bacteriana no reconocerá ni se unirá a un promotor humano. Quizás lo más importante, dado que muchos genes eucariotas contienen intrones y exones, muchos genes humanos, como el de la insulina, que han sido clonados no se eliminan directamente del ADN genómico; en cambio, el ADN se sintetiza a partir del ARNm del gen de interés por la transcriptasa inversa. Esta es la copia de ADN (ADNc) que luego se clona. Estos ADNc carecen de un promotor y, por lo tanto, deben insertarse en el vector plasmídico cerca de un promotor. Para facilitar la comprensión de la clonación del gen de la insulina, el uso de ADNc se ha omitido en la lectura. Es posible que desee elaborar este proceso con sus alumnos.

### SESIÓN 2 (OPCIONAL)



**IDEAS CLAVE:** Las decisiones sociales sobre la implementación de los esfuerzos relacionados con la ciencia y la tecnología deben basarse tanto en el conocimiento científico como en la economía, las políticas, la política y la ética. El ADN tiene la misma estructura y función sin importar de qué organismo provenga.

Haga que los alumnos completen una de las tres actividades opcionales: (1) llevar a cabo una investigación en Internet sobre un producto farmacéutico elaborado mediante un proceso recombinante, (2) llevar a cabo una investigación en Internet sobre un tema bioético relacionado con la ingeniería genética y luego debatir sobre el tema o escribir un artículo de opinión o publicación de blog, o (3) extraer ADN. (45 minutos)

Puede extender la introducción de los alumnos a la biotecnología haciéndolos participar en una o más de las actividades siguientes.

### TERAPÉUTICA HUMANA AHORA Y EN EL FUTURO

Asigne a los alumnos para trabajar individualmente o en equipos para aprender más sobre algunos de los productos recombinantes que se encuentran actualmente en investigación y desarrollo o en el mercado, ya sea en este país o en el extranjero, y que luego presenten lo más destacado de sus hallazgos al resto de la clase. Puede sugerir que investiguen qué productos recombinantes se usan, o podrían usarse en el futuro, para afecciones médicas comunes, por ejemplo:

- Anemia
- Asma
- Enfermedades autoinmunes, como el lupus o la enfermedad de Crohn

- Cáncer o los efectos secundarios de los tratamientos contra el cáncer, como los trasplantes de médula ósea y la quimioterapia
- Diabetes
- Insuficiencia renal

## CONSIDERACIONES BIOÉTICAS

Existen muchos problemas bioéticos potenciales relacionados con la ingeniería genética y la biofarmacéutica. Los alumnos pueden investigar uno de los siguientes temas y luego participar en un debate en clase o escribir un artículo de opinión o una entrada de blog:

- **Insulina natural frente a la genéticamente modificada:** Además de la insulina genéticamente modificada producida por bacterias, las personas con diabetes pueden ser tratadas con insulina tomada de vacas o cerdos. Si bien algunas personas pueden tener reacciones adversas a la insulina sintética modificada genéticamente y, por lo tanto, necesitan tomar un producto natural, otras simplemente prefieren usar productos naturales (en lugar de productos genéticamente modificados). ¿Deberían respetarse sus puntos de vista? ¿Se debe permitir que las personas con diabetes elijan?
- **Seguridad del tratamiento frente al acceso al tratamiento:** La invención de nuevas terapias, incluida la insulina genéticamente modificada, ha salvado innumerables vidas. Sin embargo, antes de que un medicamento o tratamiento pueda ponerse a disposición del público, debe someterse a una gran cantidad de pruebas para determinar su efectividad y garantizar que el producto sea seguro para su uso en seres humanos. Estos ensayos clínicos pueden tardar muchos años en completarse, tiempo que los pacientes con enfermedades terminales a menudo no tienen. Los pacientes que padecen enfermedades potencialmente mortales han defendido durante mucho tiempo el acceso a medicamentos que aún no han completado todo el proceso de aprobación. Argumentan que deberían poder recibir medicamentos no aprobados si han agotado todas las demás opciones de tratamiento. ¿Deberían concederse sus deseos? ¿Es más importante permitir que los pacientes tengan acceso a medicamentos o asegurarse de que los productos sean completamente seguros para uso humano primero?

**RECURSOS:** En el sitio web del programa se incluyen enlaces a noticias sobre estos temas.



## EXTRACCIÓN DE ADN

En esencia, este programa trata sobre el ADN. El ADN codifica las proteínas, que a su vez dan como resultado los rasgos de los organismos, ya sea que esos rasgos sean fluorescencia, producción reducida de insulina o cabello castaño. Para ayudar a los alumnos a comprender que todo el ADN tiene la misma estructura, haga que realicen un laboratorio de extracción de ADN. Aislar el ADN de diferentes organismos y comparar sus propiedades (como la viscosidad) reforzará la idea de que no importa cuál sea la fuente, todo el ADN se ve similar y tiene propiedades similares.

**RECURSOS:** Se proporcionan enlaces a posibles laboratorios en el sitio web del programa.



## SESIÓN 3



**IDEAS CLAVE:** Al crear un plásmido recombinante, es importante examinar las secuencias del ADN plasmídico y del ADN humano que contiene el gen de interés. Es necesario encontrar una enzima de restricción única que corte el ADN plasmídico en un solo sitio y que corte cerca de los dos extremos del gen humano. Los “extremos adhesivos” idénticos creados por los cortes de una única enzima de restricción hacen posible unir las diferentes secuencias de ADN en un plásmido recombinante.

Haga que los alumnos lleven a cabo el procedimiento *Clone ese gen*. (15 minutos)

Los alumnos ven secuencias genéticas de ADN plasmídico y un gen humano diana cromosómico (insulina) y eligen la enzima de restricción apropiada para usar para crear un modelo en papel de un plásmido recombinante. Haga que los alumnos completen esta actividad en parejas. Tenga en cuenta que el gen de insulina que se muestra en **RM 3** es un modelo y no es la secuencia completa de pares de bases en el gen de la insulina humana.



**ESTRATEGIA:** Si varias parejas están luchando con la misma parte de la actividad, pare la clase y revise las instrucciones para esa parte. Es posible que desee que los alumnos que hayan completado con éxito esa parte compartan lo que han hecho.

Haga que los alumnos comenten la pregunta de **DETÉNGASE Y PIENSE** y de *Preguntas de la actividad* en pequeños grupos y que registren sus respuestas de forma individual. (15 minutos)

Durante la actividad, los alumnos deben debatir las preguntas en sus grupos y registrar sus respuestas de forma individual. Luego, pida a los alumnos que compartan sus respuestas y razonamiento para cada pregunta con la clase. Circule para realizar un seguimiento de los debates y brindar apoyo.



Posible respuesta para la pregunta **DETÉNGASE Y PIENSE**:

¿Por qué es importante usar la misma enzima o enzimas para cortar tanto el plásmido como el gen de la insulina del ADN humano? *Para que tengan secuencias complementarias de bases que puedan coincidir y permitir que los dos segmentos de ADN se unan.*

Posibles respuestas a las *Preguntas de las actividades*:

1. ¿Qué enzima de restricción eligió? ¿Por qué eligió esa? *La enzima de restricción EcoRI es la única enzima que corta el plásmido una vez sin alterar un gen.*
2. ¿Dónde insertaría el gen de la insulina y por qué? *El gen debe insertarse cerca de la secuencia promotora, ya que esta secuencia permitirá que el gen se transcriba en la célula bacteriana.*
3. ¿Qué antibiótico usaría para determinar si se tomó el ADN recombinante? *Se puede usar ampicilina o kanamicina, ya que ambos genes son parte del plásmido recombinante final.*

### Dirija un debate a partir de las respuestas de los alumnos. (15 minutos)

Haga que los alumnos compartan sus respuestas y su razonamiento para *DETÉNGASE Y PIENSE* y *Preguntas de la actividad* con la clase A medida que los alumnos compartan sus respuestas, evalúe el conocimiento de los alumnos sobre cómo se utilizan las enzimas de restricción en la ingeniería genética.

## ANTECEDENTE CIENTÍFICO: ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

A principios de la década de 1970, Hamilton Smith y Daniel Nathans pudieron purificar un “agente” inmune desconocido que se encontró en las bacterias. Este agente molecular protegió a las bacterias al restringir el crecimiento de los virus bacteriófagos. Se descubrió que el agente era una enzima que podía cortar el ADN viral en fragmentos a medida que se inyectaba en su célula. Smith, Nathans y Werner Arber recibieron el Premio Nobel por su descubrimiento y caracterización de estas importantes moléculas.

Existen varias clases de enzimas de restricción, pero las que han sido más útiles son las que reconocen y cortan consistentemente una secuencia de bases específica. Algunas enzimas de restricción reconocen una secuencia de cuatro bases; otras reconocen una secuencia de cinco o seis bases. Los sitios de restricción son palíndromos. Este es un concepto importante que puede enfatizar a sus alumnos, tal vez utilizando ejemplos como “radar” y “Madam, I'm Adam”.

Algunas enzimas de restricción harán un “corte contundente”, sin dejar bases sobresalientes. Otras enzimas, incluidas *BamHI* y *HindIII*, dejarán bases sobresalientes, creando así extremos adhesivos. Estas enzimas son particularmente útiles ya que los extremos adhesivos hacen que la recombinación de fragmentos de ADN sea un procedimiento bastante simple. Lo “adhesivo” es el resultado de la extraordinaria afinidad de los nucleótidos complementarios para formar enlaces de hidrógeno entre ellos.

La nomenclatura para las enzimas de restricción es bastante sencilla. La primera letra del nombre de la enzima se deriva del género de bacteria de la cual se aisló la enzima. Las siguientes dos letras provienen de las dos primeras letras del epíteto específico de la bacteria. A menudo hay una cuarta letra después de las tres primeras, que representa la cepa o el tipo de bacteria. Debido a que algunas cepas de bacterias producen varias enzimas de restricción, un número romano identifica el orden en que se aislaron las enzimas. **Tabla 2.1** en la página B-8 de la Guía del estudiante, se muestran algunos ejemplos de enzimas de restricción aisladas de diferentes cepas de bacterias y las secuencias de ADN que cortan.

## SESIÓN 4



**IDEAS CLAVE:** Los científicos que trabajan en ingeniería genética utilizan herramientas muy específicas, incluidas herramientas fabricadas por personas y herramientas biológicas.

Antes de comenzar el Laboratorio 2, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y que expliquen su razonamiento. Haga que los alumnos completen el Laboratorio 2. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE* y que expliquen su razonamiento. (25 minutos)

En este laboratorio, los alumnos usan enzimas de restricción para digerir (cortar) dos plásmidos. Explique a los alumnos que la digestión de la enzima de restricción creará los fragmentos que necesitan para que el plásmido recombinante se inserte en las bacterias.

**NOTAS:** Aquí hay algunas notas importantes para la incubación en baño maría en este laboratorio:

- Al final del laboratorio, cargue la gradilla flotante con todos los tubos de los grupos sobre la mesa y luego coloque la gradilla en el baño maría para una incubación de 15 minutos.
- Dejar el digerido en el baño maría durante un par de horas no interferirá con la restricción, pero las muestras no deben dejarse en el baño maría durante más de dos horas, ya que *BamHI* puede comenzar a cortar el ADN de manera aleatoria.
- Después de la incubación de 15 minutos, asegúrese de colocar lo digerido en el congelador hasta que sea necesario para el próximo laboratorio.

Los alumnos comentan la primera pregunta de *DETÉNGASE Y PIENSE* y las preguntas de *Antes del laboratorio* en sus grupos y registran sus respuestas de forma individual. Haga que los alumnos compartan sus respuestas con la clase.



Posible respuesta para la primera pregunta de *DETÉNGASE Y PIENSE*:

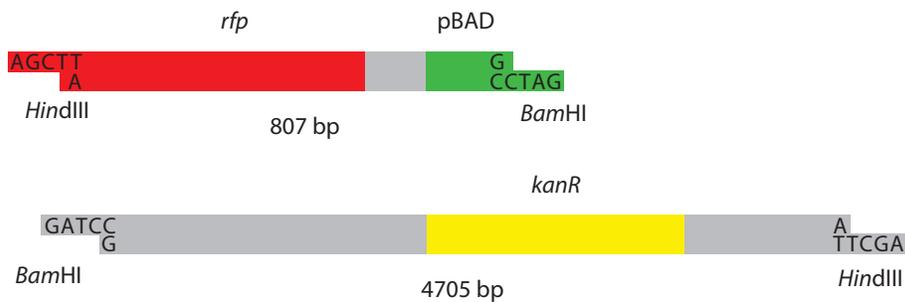
¿Por qué el uso de dos enzimas diferentes para cortar el plásmido evita que el plásmido vuelva a formar un círculo sin el gen insertado? *Debido a que las secuencias de los extremos adhesivos son diferentes (uno tiene la secuencia BamHI y el otro tiene la secuencia HindIII), los dos extremos no pueden aparearse. La única forma de reformar el círculo es con la inserción del gen rfp que tiene los extremos BamHI y HindIII*

Posibles respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio*:

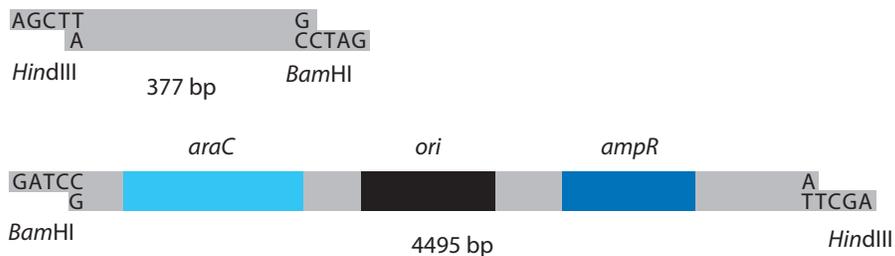
1. Revise la **Figura 2.3**. Si pKAN-R se digiere con *Bam*HI y *Hind*III, ¿qué fragmentos se producen? Si pARA se digiere con *Bam*HI y *Hind*III, ¿qué fragmentos se producen? Registre la secuencia de nucleótidos de los extremos adhesivos y la longitud de cada fragmento (pb), e indique los genes y otras secuencias importantes presentes en cada fragmento.

Las secuencias son las siguientes:

**Fragmentos de digestión de pKAN-R:**



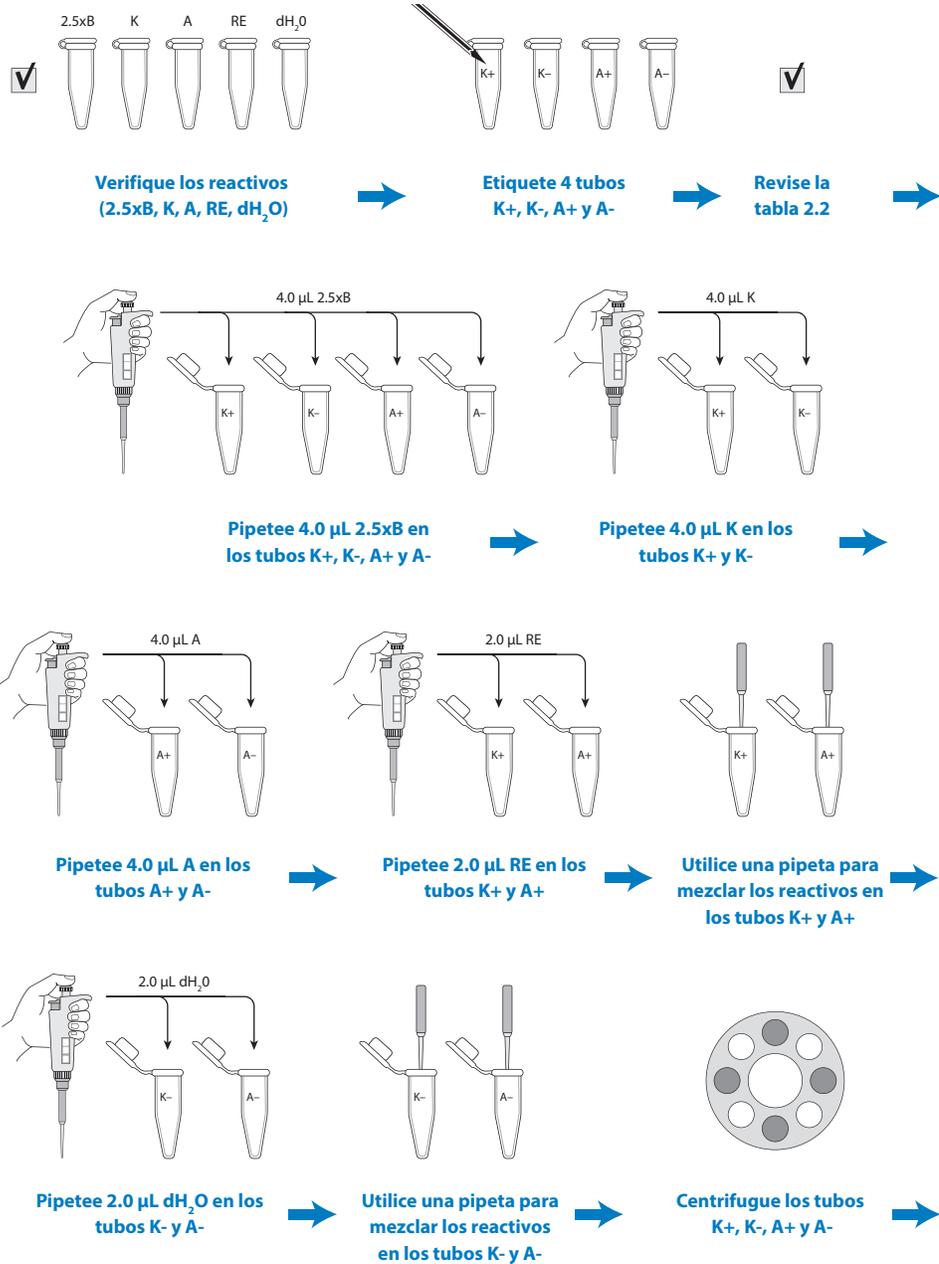
**Fragmentos de digestión de pARA:**



2. Para crear un plásmido que pueda producir RFP en bacterias, ¿qué componentes se necesitan en el plásmido? *El plásmido necesita un origen de replicación, un promotor, el gen de interés (rfp), y un gen de resistencia a los antibióticos que permite la identificación de las bacterias que han tomado el plásmido.*
3. Las bacterias pueden ser eliminadas 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 ineficiente (como se analiza en la lectura), ¿por qué un marcador seleccionable es crucial en la clonación de un gen en las bacterias? *Desea saber qué células bacterianas tienen el plásmido y pueden producir la proteína que está purificando. El marcador seleccionable le permitirá matar las bacterias que no tienen el plásmido con el gen de interés.*

4. Lea la sección de *Métodos* en las páginas de B-17 y B-18 de la Guía del estudiante y describa brevemente los pasos, utilizando palabras y un diagrama de flujo. *Las respuestas de los alumnos serán variadas. Un diagrama de flujo de los alumnos podría verse así:*

### Diagrama de flujo del laboratorio 2



## Diagrama de flujo del laboratorio 2 (continuación)



Revise la sección *Métodos* brevemente con los alumnos antes de comenzar el laboratorio.

**TÉCNICA DE LABORATORIO:** Revise el uso de las micropipetas con los alumnos.

Durante el laboratorio, los alumnos deben debatir las preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE* en sus grupos y luego registrar sus respuestas de forma individual. Pida a los alumnos que compartan sus respuestas y razonamiento para cada pregunta con la clase.

Posibles respuestas a la segunda y tercera preguntas de *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? *Los tubos sin las enzimas son controles. Podemos comparar un control con el tubo que tiene las enzimas para comparar el plásmido sin cortar con el plásmido cortado. Si por alguna razón las enzimas no funcionaron como se esperaba, el control lo indicará, ya que tanto el tubo de control como el tubo con las enzimas darán el mismo resultado cuando se examinen con electroforesis en gel.*
- ¿Por qué las enzimas funcionan mejor a 37 °C? ¿Por qué se deben colocar las enzimas en el congelador? *Las enzimas originalmente provenían de bacterias que están a la temperatura del cuerpo humano y están diseñadas para funcionar a esta temperatura. Colocar las enzimas en el congelador detendrá la reacción.*

En el paso 6, se indica a los grupos que coloquen sus cuatro tubos de microcentrifuga (K +, A +, K– y A–) en la gradilla flotante para tubos de microcentrifuga cerca del baño maría. Cuando la gradilla esté llena, colóquela en el baño maría e incube durante 5 a 15 minutos. Una vez completada la incubación, coloque todos los tubos en el congelador a –20 °C para el Laboratorio 3.

**Pida a los alumnos que comenten las Preguntas del Capítulo 2 en grupos pequeños y que registren sus respuestas de forma individual. (10 minutos)**

Los alumnos reflexionan sobre los conceptos que aprendieron en este capítulo respondiendo a las *Preguntas del Capítulo 2*. Circule para realizar un seguimiento de los debates y brindar apoyo.



Posibles respuestas a las *Preguntas del Capítulo 2*:

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. *Las características importantes de un vector plasmídico son (1) una secuencia para el inicio de la replicación del ADN, ori, que permite que el plásmido se replique en la bacteria; (2) una secuencia promotora para iniciar la transcripción del gen insertado; y (3) un gen que codifica una proteína para la resistencia a los antibióticos, lo que permite la identificación de bacterias que han captado el plásmido.*
2. ¿Qué papel tienen las enzimas de restricción en la naturaleza? *Protegen a las bacterias de la infección por virus bacteriófagos.*
3. Según su comprensión de la evolución, ¿por qué las bacterias retienen un gen que les da resistencia a los antibióticos? ¿Cómo es que la existencia de las bacterias con resistencia a los antibióticos afecta a la medicina hoy en día? *Las bacterias con el gen de resistencia a los antibióticos se reproducirán más porque tienen una ventaja selectiva sobre otras bacterias que no portan ese gen. Esta es una gran preocupación en medicina porque ahora hay cepas de bacterias que causan enfermedades pero que los antibióticos no pueden destruir.*
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 hacer un producto nunca antes hecho en bacterias? *El código de ADN y los procesos de transcripción y traducción son los mismos en todos los organismos vivos. Las enzimas como la ARN polimerasa son específicas para los promotores; la ARN polimerasa bacteriana solo reconocerá promotores bacterianos. Una vez que un gen humano o de anémona de mar se coloca bajo el control de un promotor bacteriano en un plásmido y el plásmido recombinante es absorbido por la bacteria, la ARN polimerasa bacteriana transcribirá el gen insertado. Si está enseñando una clase avanzada, los alumnos también pueden notar que la maquinaria de síntesis de proteínas traducirá los codones triples universales en proteínas.*
5. Debido a un accidente en el laboratorio, las bacterias que llevan un plásmido con un gen de resistencia a la kanamicina y las bacterias que llevan un plásmido con un gen de resistencia a la ampicilina se mezclaron de forma accidental. ¿Cómo diseñaría un experimento que te permita clasificar los dos tipos de bacterias? (Pista: ¡Asegúrese de no eliminar uno de los tipos de bacterias que intenta clasificar!) *Las bacterias deben dividirse en dos lotes; un lote debe tratarse con kanamicina y el otro lote debe tratarse con ampicilina.*

**Discuta las respuestas de los estudiantes como una clase. (10 minutos)**

Evalúe la comprensión de los alumnos sobre el uso de plásmidos y enzimas de restricción para la clonación de genes mientras discuten sus respuestas a las *Preguntas del Capítulo 2*.

**ESTRATEGIA:** Mientras dirige el debate, aplique las siguientes prácticas:

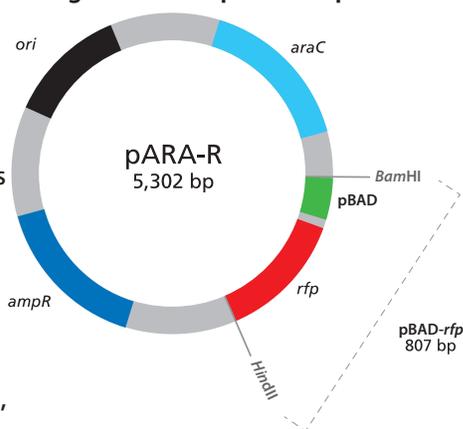
- Dé a los alumnos tiempo para evaluar las respuestas de los demás.
- Pida aclaraciones.
- Pida una explicación.
- Replantee o reformule.
- Pida un ejemplo.
- Pida evidencia.
- Proporcione ejemplos y contraejemplos.
- Pida a los alumnos que aporten una explicación.
- Pida a los alumnos que evalúen una respuesta.



## ANTECEDENTE CIENTÍFICO: LOS COMPONENTES DEL PLÁSMIDO pARA-R

El plásmido recombinante que se utiliza en este programa para clonar el gen *rfp* es el plásmido pARA-R (ver Figura T2.1). Se han desarrollado muchos tipos diferentes de vectores plasmídicos para clonar genes. Todos tienen los componentes básicos necesarios para clonar y expresar genes en bacterias, incluida una secuencia para iniciar la replicación del ADN (el punto *ori*), un promotor para iniciar la transcripción, un marcador seleccionable y un sitio o sitios de restricción cerca del promotor para insertar el gen de interés. El plásmido pARA-R se ha construido de manera que el gen se inserte utilizando *Bam*HI y *Hind*III. El uso de dos enzimas de restricción diferentes asegura que el gen *rfp* se insertará en una sola orientación, la apropiada para transcribir la cadena con sentido del ADN. Es posible que desee revisar la idea de las cadenas “de sentido” y “antisentido” con los alumnos.

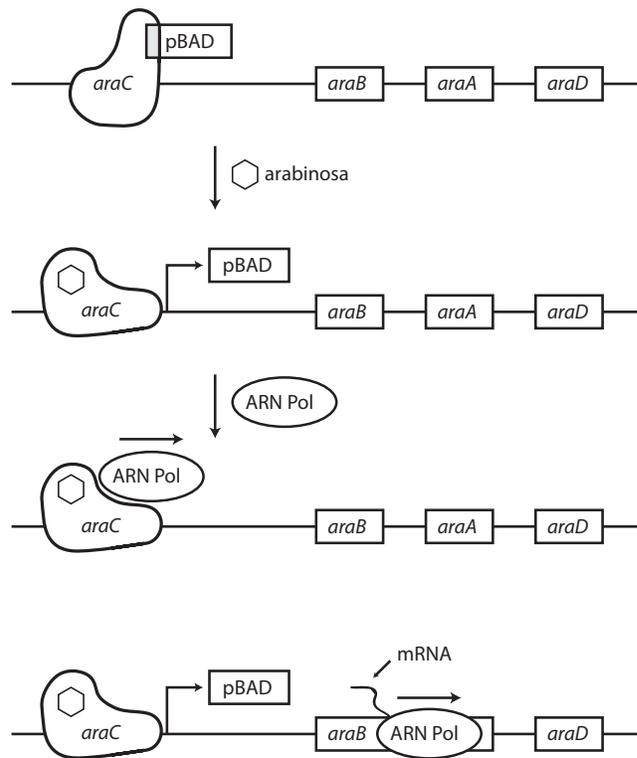
Figura T2.1: El plásmido pARA-R



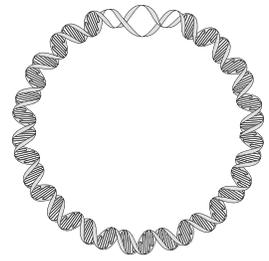
El plásmido pARA-R se ha construido para incluir componentes del operón arabinosa, que permiten la expresión del gen *rfp* gen a ser regulado. Todos los organismos vivos, incluidas las bacterias, tienen la capacidad de regular la expresión de sus genes. El ejemplo más obvio de esta regulación se da en la diferenciación celular en organismos multicelulares. La mayoría de las células contienen el complemento completo de ADN, pero durante la diferenciación solo ciertos genes se expresan a medida que las células se convierten en células de la piel, los músculos o las raíces. Gran parte de esta regulación ocurre al nivel de iniciación de la transcripción. El inicio de la transcripción puede

ser activado por proteínas llamadas activadores, o desactivado por proteínas llamadas represores. Si bien las bacterias no se diferencian, sí responden a las condiciones ambientales, como la presencia o ausencia de un azúcar, incluida la arabinosa. El operón arabinosa es un ejemplo clásico de regulación génica en bacterias (ver **Figura T2.2**). El operón comprende tres genes, *araB*, *araA* y *araD*, que codifican las proteínas responsables del transporte y la descomposición de la arabinosa. También incluye un promotor y una secuencia 5' de ADN próximo a la secuencia del promotor, que se une a la proteína AraC. La proteína AraC regula la expresión de los genes de arabinosa permitiendo su transcripción en presencia de arabinosa o desactivando la expresión génica en su ausencia.

**Figura T2.2: El operón arabinosa**



En ausencia de arabinosa, la proteína AraC bloquea la unión de la ARN polimerasa al promotor; por lo tanto, no puede iniciarse la transcripción, y los tres genes: *araB*, *araA* y *araD*, no se expresan. Cuando la arabinosa está presente en el medioambiente, el azúcar se une a la proteína AraC, lo que altera la forma del ADN de tal manera que la ARN polimerasa puede unirse al promotor y los genes *araB*, *araA* y *araD* se expresan. El plásmido pARA-R utilizado en este programa tiene el promotor pBAD y el gen *araC*, así como los genes resistentes a la ampicilina y la kanamicina. Los genes *araB*, *araA* y *araD* han sido eliminados y reemplazados por el gen *rfp*, poniendo el gen *rfp* bajo el control del promotor de arabinosa. Las colonias de bacterias que albergan este plásmido serán rojas en presencia de arabinosa y blancas en su ausencia.



## **CAPÍTULO 3**

# **CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE**



## DESCRIPCIÓN GENERAL

---

En este capítulo, los alumnos aprenden sobre otra herramienta biológica esencial utilizada en la ingeniería genética: las ADN ligasas, enzimas que catalizan la unión de fragmentos de ADN. Los alumnos leen sobre el rol de la ADN ligasa en la replicación del ADN y la ingeniería genética. Los alumnos llevan a cabo una actividad de laboratorio, Laboratorio 3, en la que ligan la digestión de restricción que llevaron a cabo en el Laboratorio 2, con el objetivo de hacer el plásmido pARA-R que contiene el gen *rfp* y el gen *ampR*.

## SUPUESTOS DEL CONOCIMIENTO PREVIO

Los estudiantes ya deben saber lo siguiente:

- El ADN es una molécula bicatenaria, y cada cadena de ADN está formada por subunidades unidas covalentemente llamadas *nucleótidos*.
- Un nucleótido está formado por un azúcar, un grupo fosfato y una base nitrogenada. Hay cuatro bases nitrogenadas diferentes: citosina, guanina, adenina y timina.
- Los nucleótidos están unidos entre sí por una estructura de azúcar-fosfato; las bases nitrogenadas sobresalen de esta estructura.
- Las dos cadenas de ADN están conectadas por enlaces de hidrógeno entre bases nitrogenadas adyacentes, que se denominan *pares de bases*; la citosina siempre se combina con guanina, y la adenina siempre se combina con timina.

## OBJETIVOS DE APRENDIZAJE

Al final de este capítulo, los estudiantes podrán 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.

## RESULTADOS EVALUADOS

- Evalúe la capacidad de cada alumno para describir el papel de las ADN ligasas en la replicación del ADN al revisar sus respuestas a las preguntas 1 y 5 en *Preguntas del Capítulo 3* (página B-33 de la Guía del estudiante).
- Evalúe la capacidad de cada alumno para describir el papel de las ADN ligasas en la replicación del ADN al revisar sus respuestas a las preguntas 2, 3 y 5 en *Preguntas del Capítulo 3* (página B-33 de la Guía del estudiante).
- Evalúe la capacidad de cada alumno para describir los posibles plásmidos recombinantes que se forman durante la ligación al revisar sus respuestas a la pregunta 1 en *Antes del laboratorio* (página B-31 de la Guía del estudiante) y a la pregunta 4 en *Preguntas del Capítulo 3* (página B-33 de la Guía del estudiante).

## SECUENCIA DE ACTIVIDADES SUGERIDA

### SESIÓN 1

- Revise la **Introducción** y los **Objetivos del Capítulo 3** con los alumnos. (5 minutos)
- Pida a los estudiantes que contesten las preguntas *¿Qué sabes ya?* y que compartan sus respuestas. (15 minutos)
- Haga que los alumnos lean **Pegar fragmentos de ADN juntos** y que contesten las preguntas de **CONSIDERAR**. (10 minutos)
- Dirija un debate sobre las respuestas de los alumnos a las preguntas de **CONSIDERAR** de **Pegar fragmentos de ADN juntos**. (5 minutos)
- Haga que los alumnos comiencen el Laboratorio 3 leyendo el párrafo introductorio y que luego respondan las preguntas de *Antes del laboratorio* (10 minutos)

### SESIÓN 2

- Haga que los alumnos realicen el Laboratorio 3. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las pregunta 1 de *Antes del laboratorio* y la pregunta de **DETÉNGASE Y PIENSE** con la clase y que expliquen su razonamiento. (30 minutos)
- Pida a los alumnos que discutan las *Preguntas del Capítulo 3* en grupos pequeños y que registren sus respuestas de forma individual. (5 minutos)
- Dirija un debate de toda la clase sobre las respuestas de los alumnos. (10 minutos)

**NOTA:** Hay un período de incubación de 20 minutos en esta sesión, durante el cual los alumnos pueden comenzar a trabajar en las *Preguntas del Capítulo 3*.

## PREPARACIÓN

Antes de comenzar, debe familiarizarse con los procedimientos de laboratorio de este capítulo, la preparación requerida y los materiales que necesitará. Las instrucciones suponen que proporcionará materiales para 12 grupos de 2 o 3 alumnos. Si tiene más o menos alumnos, ajuste las cantidades según corresponda.



**TÉCNICA DE LABORATORIO:** Con excepción del agua destilada, todos los reactivos utilizados en el Capítulo 3 deben almacenarse en un congelador hasta que esté listo para prepararlos para los alumnos.

## CALIBRAR EL BAÑO MARÍA PARA EL LABORATORIO 3

Si su baño maría aún no está preparado, vea *Preparar y calibrar el baño maría para el laboratorio 2* (página B-6 de esta guía). Para este laboratorio, calibre el baño maría a 80 °C, asegurándose de que haya suficiente agua en el baño y que el baño esté cubierto para reducir la evaporación. Asegúrese de usar agua

destilada en el baño maría y de mantener el termómetro, el temporizador y la gradilla flotante para tubos de microcentrífuga con el baño maría. Si las clases realizarán el Laboratorio 5, deje el baño maría preparado y calíbrelo a 42 °C el día anterior al laboratorio.

## ALÍCUOTAS DE REACTIVOS PARA EL LABORATORIO 3

Los reactivos se pueden dividir en alícuotas varios días antes del Laboratorio 3. Almacene los reactivos separados en alícuotas en el refrigerador.

1. Saque los siguientes reactivos del congelador y permita que se descongelen durante 15 minutos:
  - ADN ligasa (LIG)
  - Tampón de ligación 5x (5xB)
2. Gire el 5xB en la microcentrífuga.
3. Etiquete dos tubos de microcentrífuga de la siguiente manera:
  - 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados con "LIG"
  - 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados con "5xB"
  - 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados con "dH<sub>2</sub>O"

**NOTA:** Los tubos dH<sub>2</sub>O pueden estar disponibles de laboratorios anteriores.

4. Pipetee los reactivos en los tubos de microcentrífuga de la siguiente manera:
  - 2.0 µl de LIG en los tubos marcados como "LIG"
  - 4.0 µl de 5xB en los tubos marcados como "5xB"
  - 1,000 µl de agua destilada (dH<sub>2</sub>O) en los tubos marcados con "dH<sub>2</sub>O"

## REÚNA LOS MATERIALES PARA EL LABORATORIO 3

Reúna materiales en el día del laboratorio. Después de preparar las gradillas con los reactivos, asegúrese de guardarlos en el refrigerador hasta que los alumnos estén listos para usarlos.

1. Saque los siguientes reactivos del congelador y permita que se descongelen durante 15 minutos:
  - Tubo de microcentrífuga de pKAN-R digerido del laboratorio 2 (K+)
  - Tubo de microcentrífuga de pARA digerido del laboratorio 2 (A+)

**NOTA:** Las muestras digeridas pueden permanecer a temperatura ambiente durante algunas horas sin la amenaza de degradación.

2. Gire los reactivos en la microcentrífuga para integrar la condensación.

3. Prepare 12 juegos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:
  - Gradilla de plástico para tubos de microcentrífuga que contenga los siguientes reactivos:
    - ◆ 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 LIG (preparado anteriormente)
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de 5xB (preparado anteriormente)
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de dH<sub>2</sub>O (preparado anteriormente o sobrante de un laboratorio anterior)
  - Micropipeta P-20
  - Caja de puntas para puntas de pipetas desechables
  - Marcador permanente
  - Contenedor de residuos para puntas y tubos de microcentrífuga usados (necesitará 1 contenedor por cada 2 grupos)
4. Coloque la microcentrífuga en una ubicación central para que todos los grupos puedan compartirla.
5. Coloque el termómetro, el temporizador y la gradilla flotante para tubos de microcentrífuga (para sostener los tubos en el baño maría) en la mesa al lado del baño maría.

#### NOTAS:

- Cuando sus alumnos hayan completado sus ligaciones, asegúrese de recoger todos sus tubos de microcentrífuga A+, K+ y LIG. Estos tubos deben tener el número de grupo y el período de clase de los alumnos para que los alumnos puedan ubicarlos fácilmente para el próximo laboratorio. Los tubos LIG pueden mantenerse a temperatura ambiente durante la noche. Los tubos K+ y A+ deben devolverse a la caja de almacenamiento que contiene los tubos K- y A- (en el congelador).
- Los tubos de 5xB se pueden desechar.
- Las muestras de los tubos K+, A+, K-, A- y LIG se analizarán en un gel de electroforesis en el próximo laboratorio.

## ENSEÑANZA

---

### SESIÓN 1

---



**IDEAS CLAVE:** La herramienta final necesaria para hacer ADN recombinante es una forma de “pegar” el plásmido y los fragmentos de genes creados con enzimas de restricción. A principios de la década de 1960, los científicos aislaron enzimas llamadas ADN ligasas que podían unir fragmentos de ADN. El papel biológico principal de las ligasas era asegurar la replicación del ADN al catalizar la formación de enlaces covalentes entre bases adyacentes en una

cadena de ADN recién hecha. Las ligasas también pueden usarse en el proceso de ingeniería genética al catalizar la formación de enlaces covalentes entre bases adyacentes en dos extremos adhesivos complementarios. El paso de la ligación en el proceso de ingeniería genética conduce a múltiples productos de ADN recombinante.

**Revise la Introducción y los Objetivos del Capítulo 3 con los alumnos. (5 minutos)**

La **Introducción** explica el propósito principal de este capítulo, vinculándolo a la Introducción al programa. Los *Objetivos del Capítulo 3* les dicen a los alumnos en qué deben enfocarse mientras trabajan en este capítulo. Explique a los alumnos qué evaluará en este capítulo y cuáles son sus expectativas en relación con el desempeño de los alumnos.

**Pida a los estudiantes que contesten las preguntas *¿Qué sabes ya?* y que compartan sus respuestas. (15 minutos)**

La sección *¿Qué sabes ya?* La sección activa el conocimiento de los alumnos sobre enzimas, replicación de ADN y ligación de ADN, y revela brechas en ese conocimiento. Haga que los alumnos respondan las preguntas en parejas y luego registren y compartan sus ideas, para que puedan evaluar lo que saben y lo que no saben sobre las enzimas, la replicación del ADN y la ligación del ADN. Es posible que desee recordar a los alumnos la definición de replicación del ADN antes de comenzar.

### **ANTECEDENTE CIENTÍFICO: REPLICACIÓN DEL ADN**

Replicación del ADN: es el proceso biológico de hacer una copia idéntica de una sección de ADN, que ocurre en todos 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.

Posibles respuestas a las preguntas *¿Qué sabes ya?*:

1. *¿Cuál es la función de las enzimas en las reacciones? Las enzimas catalizan reacciones, lo que significa que causan reacciones a una velocidad mayor que la que ocurriría si la enzima no estuviera presente.*
2. *¿Cómo se produce la replicación del ADN? Las dos cadenas en la doble hélice se desenrollan y se separan una de la otra. Los nucleótidos en cada cadena están unidos por hidrógeno a nucleótidos simples complementarios. La enzima ADN polimerasa crea una nueva cadena de ADN asegurando que los nucleótidos individuales estén unidos entre sí por una estructura de azúcar y fosfato. El resultado son dos hélices dobles que son idénticas a la doble hélice original, excepto por los raros errores de copia.*

3. ¿Por qué es esencial la replicación del ADN en todas las células? *El ADN codifica las instrucciones para las proteínas que se necesitan para la estructura y función celular. Cuando las células se dividen, necesitan replicar el ADN para que ambas células tengan las instrucciones.*
4. ¿Qué sucede cuando se unen dos fragmentos de ADN con extremos adhesivos complementarios? ¿Cómo asegura la actividad de la ADN ligasa que la unión sea permanente? *Cuando se unen dos extremos adhesivos complementarios, las bases en cada hebra sobresaliente forman enlaces de hidrógeno entre sí, creando pares de bases. Los alumnos podrían especular que la ligasa une las estructuras principales del ADN.*

**Haga que los alumnos lean Pegar fragmentos de ADN juntos y que contesten las preguntas de CONSIDERAR. (10 minutos)**

En esta lectura, los alumnos aprenden sobre las ligasas y su papel tanto en la replicación del ADN como en el proceso de ingeniería genética. Los alumnos revisan los enlaces de hidrógeno y los enlaces covalentes en el contexto de la replicación del ADN y la unión de fragmentos de ADN. Haga que los alumnos anoten las respuestas de las preguntas de *CONSIDERAR* en sus cuadernos. Recuerde a los alumnos que usen el *Glosario* para buscar términos científicos si necesitan ayuda para entender la lectura.

**Dirija un debate sobre las respuestas de los alumnos a las preguntas de CONSIDERAR de Pegar fragmentos de ADN juntos. (5 minutos)**

Evalúe el conocimiento de los alumnos sobre el ADN y cómo se utilizan las ligasas en la ingeniería genética al revisar las respuestas de los alumnos a las preguntas de *CONSIDERAR*.



Posibles respuestas a las preguntas de *CONSIDERAR*:

- ¿Cuáles son los roles de los enlaces de hidrógeno y los enlaces covalentes en la estructura del ADN? *Los enlaces de hidrógeno son enlaces débiles formados entre las bases de nucleótidos en las dos cadenas en la doble hélice; mantienen las dos cadenas juntas. Se forman enlaces covalentes entre los nucleótidos; crean una estructura principal para cada cadena de ADN.*
- Según lo que acaba de aprender sobre la replicación del ADN, ¿cuál es la posible función de las ligasas al unir los extremos adhesivos de los fragmentos de ADN? *El ADN recombinante se forma al insertar un gen en un vector plasmídico. Para que la clonación sea completa y funcional, el plásmido y el gen deben unirse mediante enlaces covalentes. La ADN ligasa cataliza esta reacción.*

## ANTECEDENTE CIENTÍFICO: LAS ENZIMAS DE LA REPLICACIÓN DEL ADN

La ADN ligasa es una de varias enzimas involucradas en la replicación del ADN, lo que ocurre en múltiples puntos de origen a lo largo de la molécula. Para replicarse, la molécula de ADN primero debe desenrollarse para revelar las bases. La topoisomerasa inicia el desenrollado cortando el ADN en los puntos *ori*. El desenrollado continúa mediante la helicasa, que rompe los enlaces de hidrógeno entre los pares de bases. La enzima ADN polimerasa copia las secuencias en nuevas cadenas uniéndose a la cadena de ADN que se copiará y guiando los nucleótidos al enlace de hidrógeno con las bases complementarias.

La replicación por la ADN polimerasa puede ocurrir solo en la dirección de 5' a 3'. La replicación puede llevarse a cabo de manera continua en la cadena principal o la cadena de 5' a 3' de la doble hélice, pero debe ocurrir de manera no continua en la cadena rezagada o de 3' a 5'. La replicación en la cadena rezagada requiere iniciadores de ARN que activan la replicación en la dirección de 5' a 3'. Estos iniciadores están unidos al ADN por primasa. La replicación en la cadena rezagada produce pequeños fragmentos, que se unen mediante ADN ligasa. Los cebadores de ARN se eliminan antes de la ligación de los fragmentos por ADN ligasa.

La ADN polimerasa también tiene una función de corrección, que reconoce pares de bases no coincidentes y elimina la base incorrecta. La ADN ligasa cataliza el paso final de la replicación, la formación del enlace fosfodiéster covalente para completar la estructura de azúcar-fosfato de la nueva cadena de ADN.

Haga que los alumnos comiencen el Laboratorio 3 leyendo el párrafo introductorio y que luego respondan las preguntas de *Antes del laboratorio* (10 minutos)

Los alumnos usan una ADN ligasa para unir los fragmentos creados por la digestión de restricción de los plásmidos pKAN-R y pARA. Explique a los alumnos que una ADN ligasa se unirá a cualquier fragmento que tenga extremos adhesivos complementarios.

Los alumnos comentan las preguntas de *Antes del laboratorio* (página B-31 de la Guía del estudiante) en sus grupos y registran individualmente sus respuestas. Este trabajo se puede completar como tarea si es necesario. Los alumnos necesitarán sus cuadernos para responder la pregunta 1, ya que deben referirse al trabajo que hicieron en el Capítulo 2.

**ESTRATEGIA:** Es posible que los alumnos estén menos comprometidos con este laboratorio, ya que requiere pocos pasos y no sucede nada visible. Recuérdeles que la ligación es un paso crítico en el proceso de creación de un plásmido recombinante. También explique que es importante visualizar lo que sucede en los tubos de microcentrifuga determinando qué posibles productos pueden formarse durante el procedimiento de ligación.



Para responder la pregunta 1 en *Antes del laboratorio*, los alumnos dibujan modelos del proceso de ligación para determinar tres productos que pueden resultar. Revise esta pregunta con los alumnos y pídale que expliquen qué información necesitan para responderla.

## SESIÓN 2



**IDEAS CLAVE:** El paso de ligación en el proceso de ingeniería genética conduce a múltiples plásmidos de ADN recombinante; solo uno de los productos es el plásmido recombinante que necesita.

Haga que los alumnos continúen el Laboratorio 3. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las pregunta 1 de *Antes del laboratorio* y la pregunta de *DETÉNGASE Y PIENSE* con la clase y que expliquen su razonamiento. (30 minutos)

Haga que los alumnos completen los pasos 1–3 en la sección *Métodos*. Luego, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las dos preguntas, mientras comienza la incubación de las digestiones de restricción.



**ESTRATEGIA:** Para ahorrar tiempo, no revise la pregunta 2 durante esta práctica de laboratorio. Puede revisar los resúmenes de los alumnos en otro momento. A continuación se proporciona una posible respuesta a esta pregunta.

**NOTA:** Durante este período de incubación, los alumnos también pueden comenzar a trabajar en las *Preguntas del Capítulo 3*.

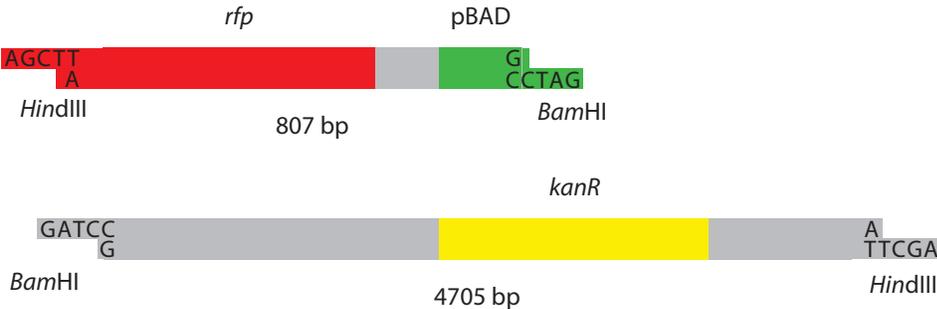
Posibles respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio*:

1. Revise su respuesta a la pregunta 1 en *Antes del laboratorio* en el Laboratorio 2 (página B-16 de la Guía del estudiante), 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. Muestre los genes de cada plásmido, otras secuencias importantes y la cantidad de pares de bases que tiene cada uno. *Se pueden hacer diez posibles plásmidos de dos fragmentos a partir de los cuatro fragmentos presentes en la digestión de restricción. Los 4 fragmentos y los 10 plásmidos aparecen en las siguientes páginas. Revise el trabajo de los alumnos y presente todos los plásmidos posibles si los alumnos no los han descrito a todos.*

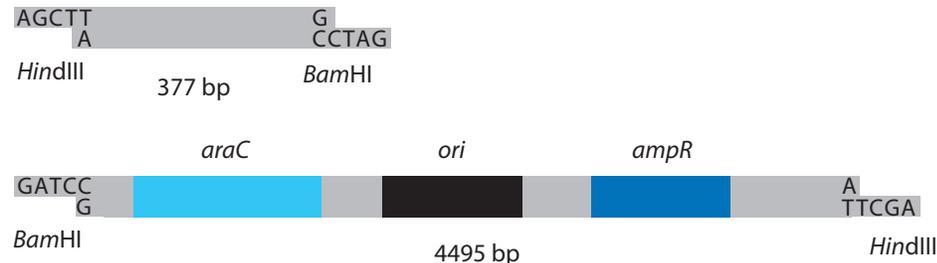


**ESTRATEGIA:** Pida a los alumnos que expliquen por qué los plásmidos pKAN-R y pARA originales se encuentran entre los productos. Los alumnos deben darse cuenta de que los dos plásmidos pueden volver a formarse a partir de los fragmentos en presencia de ligasa.

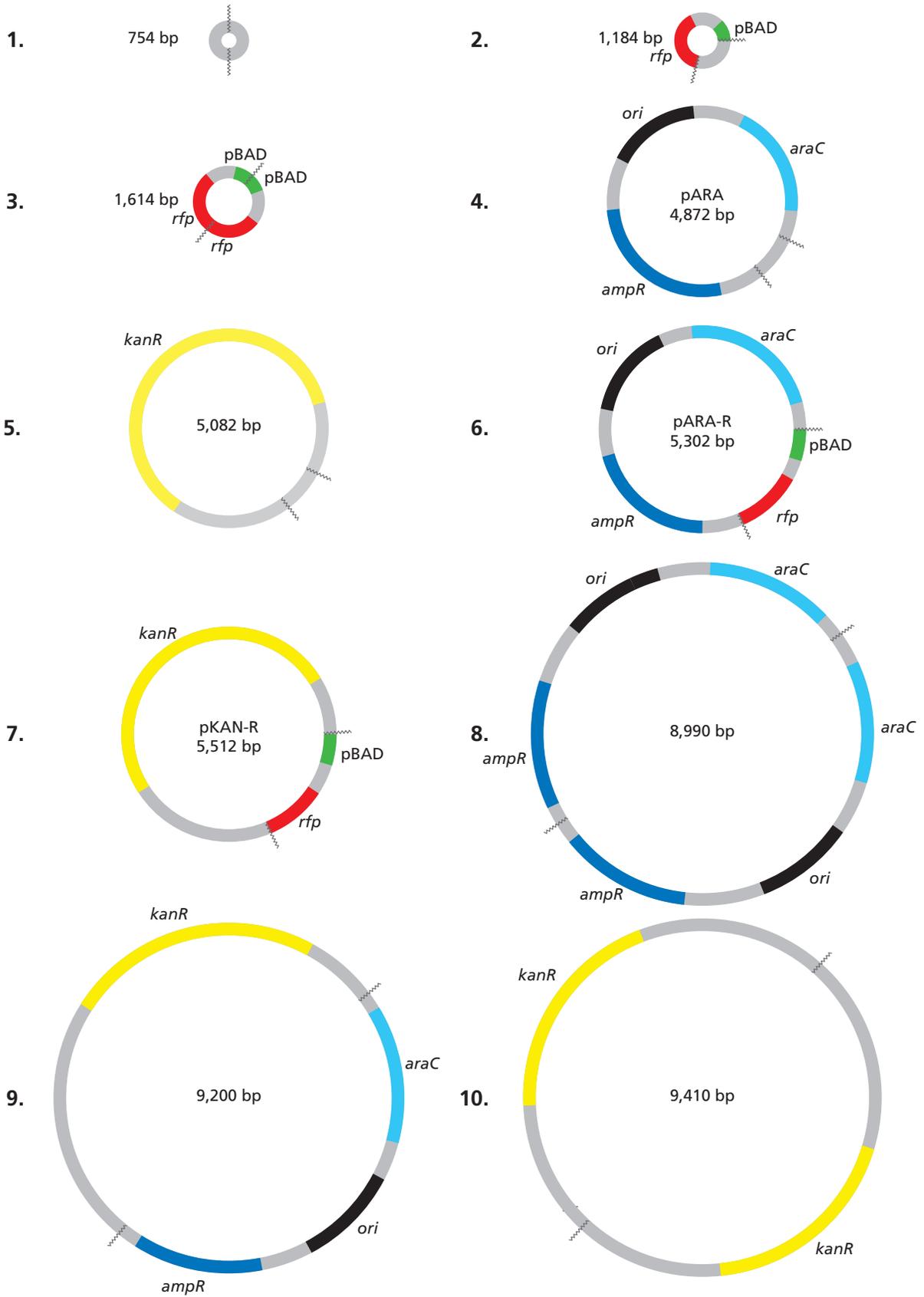
**Fragmentos de digestión de pKAN-R:**



**Fragmentos de digestión de pARA:**

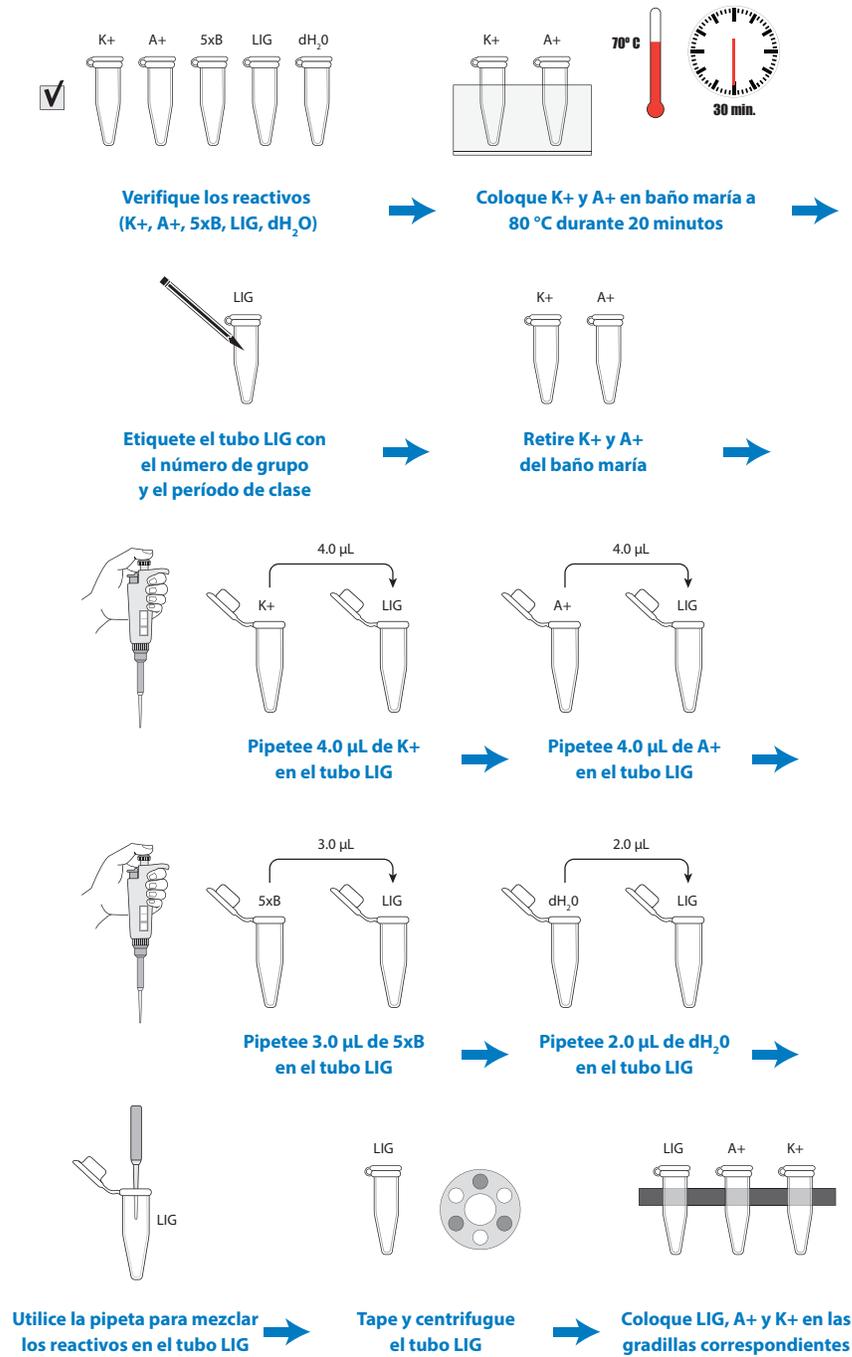


Todos los plásmidos de dos fragmentos que pueden formarse durante la ligación



2. Lea la sección de *Métodos* en la página B-32 de la Guía del estudiante y describa brevemente los pasos, utilizando palabras y un diagrama de flujo. Las respuestas de los alumnos serán variadas. Un diagrama de flujo de los alumnos podría verse así:

**Diagrama de flujo del laboratorio 3**





Posible respuesta para la pregunta *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 realizó este paso? *Si las enzimas de restricción aún están activas, descompondrán los plásmidos formados por la acción de la ADN ligasa.*

Al final del laboratorio, haga que los grupos coloquen sus tubos *LIG* en una gradilla para tubos de microcentrifuga para incubarlos durante la noche a temperatura ambiente. Haga que los grupos coloquen sus tubos *A+* y *K+* en una segunda gradilla para tubos de microcentrifuga, que debe devolverse al congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para el Laboratorio 4.

**Pida a los alumnos que discutan las Preguntas del Capítulo 3 en grupos pequeños y que registren sus respuestas de forma individual. (5 minutos)**

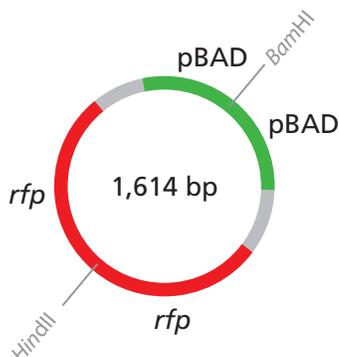
Haga que los alumnos reflexionen sobre su comprensión de la ligación respondiendo las *Preguntas del Capítulo 3*. Interrumpa esta actividad para volver a la sección *Métodos* del Laboratorio 3 cuando sea hora de retirar los tubos de *K+* y *A+* del baño maría a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Dirija un debate de toda la clase sobre las respuestas de los alumnos. (10 minutos)**

Posibles respuestas a las *Preguntas del Capítulo 3*:

1. ¿Qué papel tienen las ADN ligasas en la naturaleza? *La ligasa es necesaria en un paso de la replicación del ADN. Durante el proceso de replicación, una de las cadenas hijas está formada por fragmentos de ADN. La ligasa une los fragmentos al catalizar la formación de un enlace covalente entre nucleótidos adyacentes.*
2. ¿Qué papel tienen las ADN ligasas en la clonación de genes? *La ligasa cataliza la unión a lo largo del esqueleto de azúcar-fosfato del ADN después de que las bases en los extremos adhesivos complementarios han formado enlaces de hidrógeno entre sí.*
3. ¿Qué propiedades de los fragmentos de restricción de ADN producidos en el Laboratorio 2 permiten la ligación de estos fragmentos? *Los fragmentos tienen extremos adhesivos complementarios. La ligasa cataliza la unión de la estructura principal solo después de la creación de los pares de bases.*

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? *Sí, los dos fragmentos pueden unirse porque tienen extremos adhesivos complementarios. El plásmido resultante (plásmido 3 de la figura en la página B-34) se muestra aquí:*



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? *Los enlaces de hidrógeno se forman primero. Ambos tipos de enlaces deben formarse porque los enlaces de hidrógeno aseguran que las bases se coloquen en el orden correcto, mientras que los enlaces covalentes aseguran que los nucleótidos se unan permanentemente a lo largo de la estructura de azúcar y fosfato.*

**Estrategia:** Mientras dirige el debate, implemente las siguientes prácticas:

- Dé a los alumnos tiempo para evaluar las respuestas de los demás.
- Pida aclaraciones.
- Pida una explicación.
- Replantee o reformule.
- Pida un ejemplo.
- Pida evidencia.
- Proporcione ejemplos y contraejemplos.
- Pida a los alumnos que aporten una explicación.
- Pida a los alumnos que evalúen una respuesta.







## CAPÍTULO 4

# ASEGURARSE DE QUE SE CREÓ UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE



# DESCRIPCIÓN GENERAL

---

Dado que se fabrican diferentes productos durante el proceso de ligación, los biólogos deben verificar que han creado el plásmido recombinante que necesitan, es decir, el que tiene el gen de interés y todos los componentes necesarios para que se produzca la proteína de interés. En este capítulo, los alumnos aprenden sobre la importancia de verificar su trabajo a medida que determinan si tienen el plásmido pARA-R que contiene tanto el gen *rfp* y el gen *ampR*.

## SUPUESTOS DEL CONOCIMIENTO PREVIO

Los estudiantes ya deben saber lo siguiente:

- El ADN es una molécula bicatenaria, y cada cadena de ADN está formada por subunidades unidas covalentemente llamadas nucleótidos.
- Un nucleótido está formado por un azúcar, un grupo fosfato y una base nitrogenada. Hay cuatro bases nitrogenadas diferentes: citosina, guanina, adenina y timina.
- Los nucleótidos están unidos entre sí por una estructura de azúcar-fosfato; las bases nitrogenadas sobresalen de esta estructura.
- Las dos cadenas de ADN están conectadas por enlaces de hidrógeno entre bases nitrogenadas adyacentes, que se denominan pares de bases; la citosina siempre se combina con guanina, y la adenina siempre se combina con timina.

## OBJETIVOS DE APRENDIZAJE

Al final de este capítulo, los estudiantes podrán hacer lo siguiente:

- Describa por qué es importante verificar los productos creados en el proceso de ingeniería genética.
- Predice la velocidad relativa de los fragmentos de restricción de ADN y los plásmidos a través de un gel durante la electroforesis en gel
- Separe e identifique los fragmentos de restricción de ADN y los plásmidos mediante electroforesis en gel

## RESULTADOS EVALUADOS

- Evalúe la capacidad de cada alumno para describir por qué es importante verificar los productos creados en el proceso de ingeniería genética al revisar sus respuestas a la pregunta 1 en las *Preguntas del Capítulo 4* (página B-48 de la Guía del estudiante).
- Evalúe la capacidad de cada alumno para predecir la distancia relativa recorrida de los fragmentos de restricción de ADN y los plásmidos a través de un gel revisando sus respuestas a la primera pregunta de *DETÉNGASE Y PIENSE* en el Laboratorio 4 (página B-47 de la Guía del estudiante).
- Evalúe la capacidad de cada alumno para separar e identificar los fragmentos de restricción de ADN y los plásmidos mediante la electroforesis en gel al revisar sus respuestas a las preguntas 2–9 en las *Preguntas del Capítulo 4* (página B-48 de la Guía del estudiante).

## SECUENCIA DE ACTIVIDADES SUGERIDA

### SESIÓN 1

- Revise la **Introducción** y *los Objetivos del Capítulo 4* con los alumnos. (5 minutos)
- Pida a los estudiantes que contesten las preguntas *¿Qué sabes ya?* y que compartan sus respuestas. (10 minutos)
- Haga que los alumnos lean **¿Por qué necesita verificar?** y que contesten las preguntas de **CONSIDERAR**. (15 minutos)
- Dirija un debate sobre las respuestas de los alumnos a las preguntas de **CONSIDERAR** de **¿Por qué necesita verificar?** (5 minutos)
- Haga que los alumnos comiencen el Laboratorio 4. Haga que los alumnos lean el párrafo introductorio y revisen las preguntas de *Antes del laboratorio* en sus grupos. (10 minutos)

**NOTA:** Haga que los alumnos respondan las preguntas de *Antes del laboratorio* como tarea.

### SESIÓN 2

- Haga que los alumnos completen el Laboratorio 4. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y las preguntas de **DETÉNGASE Y PIENSE** con la clase y que expliquen su razonamiento. (45 minutos)

### SESIÓN 3

- Pida a los alumnos que comenten las *Preguntas del Capítulo 4* en grupos pequeños y que registren sus respuestas de forma individual. (20 minutos)
- Dirija un debate a partir de las respuestas de los alumnos. (25 minutos)

## PREPARACIÓN

Antes de comenzar, debe familiarizarse con los procedimientos de laboratorio en cada capítulo, la preparación requerida y los materiales que necesitará. Las instrucciones suponen que proporcionará materiales para 12 grupos de 2 o 3 alumnos. Multiplique las cantidades según sea necesario en función de la cantidad de alumnos y el número de clases que imparte.

## FOTOCOPIE LOS FOLLETOS PARA EL LABORATORIO 4

Se necesita una copia del **diagrama de escalera de ADN (RM 4)** para cada estudiante. El Master reproducible (RM) para el folleto se encuentra al final de esta guía.

## PREPARE GELES DE AGAROSA PARA EL LABORATORIO 4

**RECURSOS:** El video *Preparación de un gel de agarosa* (disponible en el sitio web del programa) repasa el proceso de preparar y moldear un gel de agarosa como se describe a continuación.



**NOTA:** Los geles se pueden preparar con varios días de anticipación.

1. Prepare las bandejas para la electroforesis en gel:
  - a. Reúna los siguientes materiales:
    - 6 bandejas para electroforesis en gel
    - 12 peines de 10 pocillos
    - Opcional: cinta adhesiva
  - b. Prepare las bandejas para electroforesis en gel para el moldeado asegurando las compuertas en los extremos de cada bandeja en la posición "arriba" o colocando cinta adhesiva en los extremos de cada bandeja. Coloque dos peines en cada bandeja, uno al final y otro en el medio, antes de agregar la solución de agarosa.
2. Prepare la solución de agarosa:
  - a. Reúna los siguientes materiales:
    - 2 matraces graduados de 250 ml, uno etiquetado con "1x SB"
    - 12.5 ml de tampón de borato de sodio 20x (20x SB)
    - 237.5 ml de agua destilada o desionizada.
    - 1.44 g de agarosa
    - Balanza de masa
    - Matraz de 500 ml etiquetado con "Gel"
    - Envoltura de plástico
    - Punta de pipeta desechable
    - Horno de microondas
    - Guantes resistentes al calor o pinzas
    - 6 bolsas con cierre de tamaño sándwich o de un cuarto de galón
    - Contenedor de residuos para puntas y tubos de microcentrífuga usados
  - b. Prepare 250 ml de SB 1x agregando 12.5 ml de SB 20x al matraz graduado de 250 ml etiquetado como "SB 1x", agregando agua destilada o desionizada hasta la marca de 250 ml, y mezcle.
  - c. Vierta 180 ml de SB 1x en el segundo matraz graduado de 250 ml.
  - d. Agregue 1.44 g de agarosa (ya medida en tubos cónicos, a menos que se indique lo contrario) al matraz de 500 ml etiquetado como "Gel". Agregue los 180 ml de SB 1x que se midieron previamente para obtener una solución de agarosa al 0.8 %.
  - e. Cubra la abertura del matraz de 500 ml con plástico para envolver. Use la punta de la pipeta para perforar un pequeño agujero en el plástico para envolver.



- f. Coloque el matraz cubierto en un horno de microondas y caliente durante un minuto a máxima potencia. Con una mano con guante, agite suavemente el matraz. (De otro modo puede usarse una placa caliente para derretir la agarosa, pero necesitará usar un hervidor doble).

**SEGURIDAD:** Use guantes resistentes al calor o use pinzas para sostener el matraz.

- g. Continúe calentando en el horno de microondas el matraz durante intervalos de 5 a 15 segundos hasta que toda la agarosa se haya disuelto. Para verificar esto, sostenga el matraz hacia la luz y agite la solución. Busque con cuidado las “lentes” de cristales de agarosa suspendidos en el líquido. Si no hay lentes visibles, la agarosa está disuelta. Espere cinco minutos para que la agarosa se enfríe a aproximadamente 60 °C antes de continuar con el paso 3.



**TÉCNICA DE LABORATORIO:** Si la solución se enfría demasiado, la agarosa comienza a solidificarse nuevamente. Si esto sucede, simplemente recaliente la solución como se describe anteriormente.

3. Moldee los geles en las bandejas:
  - a. Cuando la solución de agarosa se haya enfriado hasta el punto de que pueda tocar de manera segura el fondo del matraz (aproximadamente 60 °C; esto tomará unos cinco minutos), vierta 25 a 30 ml de la solución de agarosa en cada bandeja de electroforesis. La solución debe cubrir unos 2 mm del peine.
  - b. Una vez que los geles se solidifiquen (lo que llevará alrededor de 30 minutos), saque los peines de cada gel. Tire de cada peine hacia afuera sin moverlo de un lado a otro; esto minimizará el daño a la pared frontal del pocillo.
  - c. Retire los geles de las bandejas de electroforesis en gel y almacénelos en bolsas con cierres individuales con una pequeña cantidad de SB 1x. Almacene en el refrigerador hasta que esté listo para usar. Asegúrese de mantenerlos planos y no sobre una superficie con textura, ya que las superficies con textura se grabarán en los geles y afectarán la forma en que las moléculas se mueven a través de ellos.

## ALÍCUOTAS DE REACTIVOS PARA EL LABORATORIO 4

**NOTA:** Los reactivos se pueden dividir en alícuotas varios días antes del Laboratorio 4.

1. Obtenga el colorante de carga que se ha almacenado a temperatura ambiente. Retire la escalera de ADN del congelador y deje que se descongele durante 15 minutos.

**NOTA:** El colorante de carga es el mismo que la Solución 2 que se usó en el Laboratorio 1.2; contiene naranja G, azul de bromofenol y xileno cianol.

2. Etiquete dos tubos de microcentrífuga de la siguiente manera:
  - 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados con “LD”
  - 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados con “M”

- Pipetee los reactivos en los tubos de microcentrífuga de la siguiente manera:
  - 20.0  $\mu\text{l}$  de colorante de carga en los tubos marcados como "LD"
  - 10.0  $\mu\text{l}$  de escalera de ADN en los tubos marcados con "M"

**NOTA:** Después de la división en alícuotas, almacene el colorante de carga a temperatura ambiente y la escalera de ADN en el refrigerador.

## REÚNA LOS MATERIALES PARA EL LABORATORIO 4

**NOTA:** Reúna los materiales el día del laboratorio.

- Prepare 300 ml de SB 1x.

**TÉCNICA DE LABORATORIO:** Debe preparar SB 1x para todas las clases que completarán este laboratorio; simplemente multiplique las cantidades dadas por el número de clases.



- Reúna los siguientes materiales:
    - 15 ml de SB 20x
    - Matraz graduado de 500 ml etiquetado con "1x SB"
    - 285 ml de agua destilada o desionizada
    - 6 matraces de 50 ml etiquetados con "1x SB"
  - Agregue 15 ml de 20x SB al matraz de 500 ml con la etiqueta "1x SB", agregue agua destilada o desionizada hasta la marca de 300 ml y mezcle.
  - Vierta 50 ml de 1x SB en cada uno de los matraces de 50 ml etiquetados con "1x SB".
- Saque los siguientes reactivos del congelador y permita que se descongelen durante 15 minutos:
    - 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 plásmidos ligados del laboratorio 3 (LIG)
  - Gire las digestiones de restricción y los controles en la microcentrífuga para integrar la condensación.
  - Prepare 12 juegos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:
    - Gradilla de plástico para tubos de microcentrífuga que contenga los siguientes reactivos:
      - 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 LD (preparado anteriormente)

- ◆ Tubo de microcentrífuga de agua destilada (dH<sub>2</sub>O)
  - ◆ Tubo de microcentrífuga de M (preparado anteriormente)
  - Micropipeta P-20
  - Caja de puntas de pipetas desechables
  - Contenedor de residuos para puntas y tubos de microcentrífuga usados (necesitará 1 contenedor por cada 2 grupos)
  - Copias de **Diagrama de escalera de ADN (RM 4)**, uno para cada estudiante
5. Prepare seis cajas de electroforesis, cada una cerca de una fuente de alimentación; cada dos grupos compartirán una caja. Cargue cada caja con gel de agarosa al 0.8 % (preparado anteriormente) y coloque un matraz de 50 ml que contenga tampón 1x SB (también preparado anteriormente) cerca de cada caja. Guarde las bolsas con cierre que contenían los geles y etiquételos con el número de cada grupo y el período de clase en caso de que necesite almacenar los geles antes de realizar la coloración final y la fotodocumentación, vea *Completar los geles para el Laboratorio 4* a continuación.
  6. Coloque la microcentrífuga en una ubicación central para que todos los grupos puedan compartirla.

**NOTA:** Al final del laboratorio, asegúrese de regresar al congelador el tubo de microcentrífuga de plásmidos ligados (LIG) de los alumnos del Laboratorio 3.

## COMPLETAR LOS GELES PARA LABORATORIO 4.

1. A menos que tenga un período doble para las sesiones de clase 2 y 3, deberá continuar corriendo los geles después de que finalice la sesión 2, o interrumpir el procedimiento si está realizando otra clase utilizando las unidades de electroforesis en gel:
  - Si puede completar los geles después de que la clase haya terminado, corra los geles hasta que la coloración amarilla de Naranja G esté **cerca** del final del gel. El fragmento más pequeño que le interesa, que contiene el gen *rfp*, corre justo detrás de la banda amarilla. Una vez que se completa la electroforesis, los geles se pueden transferir a las bolsas con cierre etiquetadas o en una bandeja de coloración.
  - Si necesita interrumpir los geles, asegúrese de que los estudiantes los hayan estado corriendo durante al menos 10 minutos. Pida a los alumnos que desconecten la alimentación de la unidad de electroforesis, extraigan la bandeja de moldeado y deslicen el gel dentro de la bolsa con cierre etiquetada. Coloque un nuevo gel en la bandeja para la siguiente clase. Cuando tenga tiempo, puede devolver los geles que se corrieron parcialmente a la bandeja y continuar con la electroforesis, siguiendo las instrucciones anteriores.
2. Después de que los geles se hayan corrido, debe colorearlos y fotodocumentarlos para visualizar las bandas de ADN. Las instrucciones para la colorear y la fotodocumentar geles se incluyen con sus materiales. Los geles se pueden descartar en la basura normal después de la documentación.

## SESIÓN 1

**IDEAS CLAVE:** En general, es importante verificar que un procedimiento funcionó como esperaba. En biotecnología en particular, el proceso de múltiples pasos que se utiliza para clonar un gen da como resultado múltiples productos, y es necesario verificar que tenga el plásmido recombinante que necesita.



### Revise la Introducción y los Objetivos del Capítulo 4 con los alumnos. (5 minutos)

La **Introducción** explica el propósito principal de este capítulo, vinculándolo a la Introducción al programa. Los **Objetivos del Capítulo 4** les dicen a los alumnos en qué deben enfocarse mientras trabajan en este capítulo. Explique a los alumnos qué evaluará en este capítulo y cuáles son sus expectativas en relación con el desempeño de los alumnos.

### Pida a los estudiantes que contesten las preguntas *¿Qué sabes ya?* y que compartan sus respuestas. (10 minutos)

Responder las preguntas en esta sección activa el conocimiento de los alumnos sobre la electroforesis en gel, la verificación en el laboratorio y la ligación, y revela las brechas en su conocimiento. Haga que los alumnos respondan las preguntas en parejas, registren sus respuestas y compartan sus ideas con la clase para que pueda evaluar lo que saben y lo que no saben.

Posibles respuestas a las preguntas *¿Qué sabes ya?* :

1. *¿Por qué los fragmentos de restricción de ADN y los plásmidos se separan cuando se analizan por electroforesis en gel? Las moléculas de ADN, incluidos los fragmentos y plásmidos, se mueven a través del gel durante el procedimiento de electroforesis en gel. La separación ocurre durante el procedimiento porque las moléculas más ligeras y compactas se mueven más rápido que las moléculas más pesadas y menos compactas.*
2. *¿Por qué es importante identificar y verificar un plásmido recombinante? Puede cometer errores durante un procedimiento o puede haber otros problemas, como reactivos que no son correctos. Los productos de los procedimientos de ingeniería genética no son visibles, por lo que los errores pueden pasar desapercibidos. Debe asegurarse de tener un plásmido recombinante que tenga el gen que necesita, así como cualquier otro gen o secuencia importante.*
3. *Cuando los fragmentos de ADN se unen con una ADN ligasa, se crea una serie de productos. ¿Como sucede esto? Se pueden ligar dos fragmentos que tienen extremos adhesivos complementarios, incluidos dos fragmentos que son iguales.*

Haga que los alumnos lean **¿Por qué necesita verificar?** y que contesten las preguntas de **CONSIDERAR**. (15 minutos)

En esta lectura, los alumnos aprenden un método para llevar a cabo el proceso de ingeniería genética para crear plásmidos recombinantes y luego verificar el plásmido recombinante. Los alumnos también aprenden que los plásmidos pueden existir en tres configuraciones: superenrollado, círculo mellado y multímero. Recuerde a los alumnos que usen el **Glosario** para buscar términos científicos si necesitan ayuda para entender la lectura.

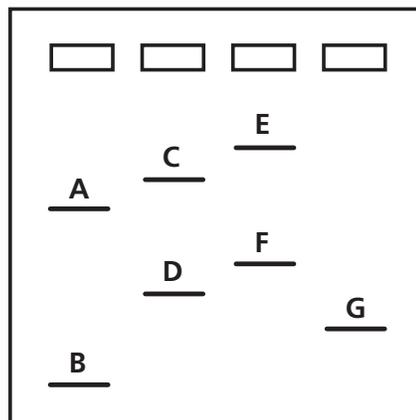
Dirija un debate sobre las respuestas de los alumnos a las preguntas de **CONSIDERAR** de **¿Por qué necesita verificar?** (5 minutos)

Evalúe el conocimiento de los alumnos sobre la electroforesis en gel y la verificación en el proceso de ingeniería genética revisando sus respuestas a las preguntas **CONSIDERAR**.



Posibles respuestas a las preguntas de **CONSIDERAR**:

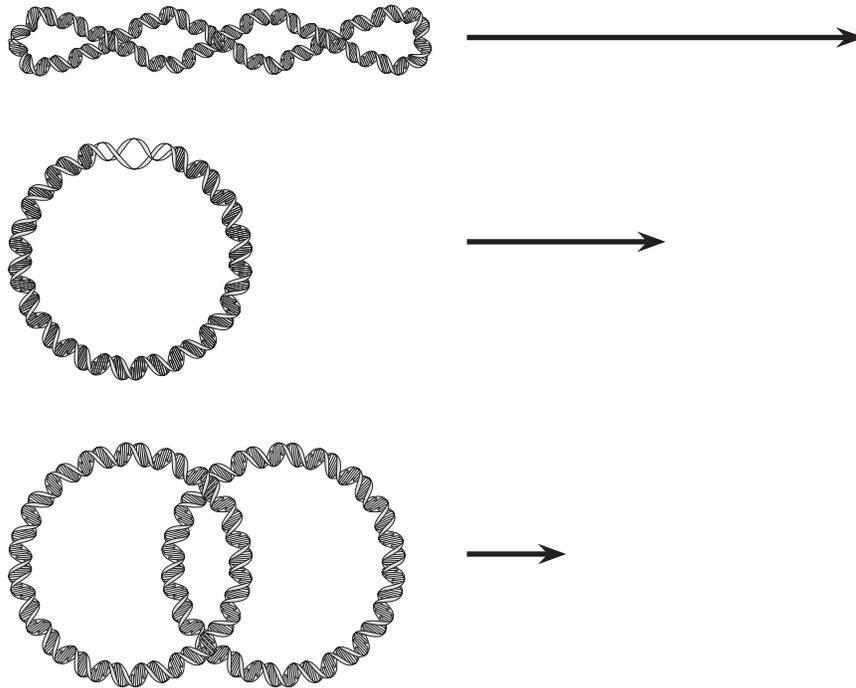
- Después de la separación por electroforesis en gel, de diferentes fragmentos de ADN y plásmidos, el gel se colorea para mostrar bandas que indican la ubicación de cada tipo de fragmento y plásmido. El dibujo de un gel coloreado a continuación muestra una serie de bandas que se etiquetaron con letras.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



*El orden de los fragmentos de menor a mayor es B, G, D, F, A, C y E.*

- Si usara electroforesis en gel para separar el mismo plásmido que tiene las tres configuraciones, ¿qué 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. *El plásmido superenrollado se movería más rápido y el multímero se movería más lento. Los plásmidos superenrollado y los de círculo mellado tienen el mismo peso molecular, pero el plásmido superenrollado se mueve más*

rápidamente a través del gel porque ocupa menos espacio por su tamaño. El multímero es muy lento porque tiene múltiples copias del plásmido y, por lo tanto, tiene un peso molecular mucho mayor. Ver el siguiente diagrama:



Haga que los alumnos comiencen el Laboratorio 4 leyendo el párrafo introductorio y que luego revisen las preguntas de *Antes del laboratorio* en sus grupos. (10 minutos)

**NOTA:** Haga que los alumnos respondan las preguntas de *Antes del laboratorio* como tarea.

Diga a los alumnos que el propósito de este laboratorio es verificar los productos de su trabajo de laboratorio anterior. Haga que los alumnos discutan las preguntas de *Antes del laboratorio* en sus grupos y que registren sus respuestas de forma individual como tarea. Los alumnos necesitarán sus cuadernos para referirse a su trabajo anterior.

## SESIÓN 2

**IDEAS CLAVE:** Los fragmentos de ADN y los plásmidos se pueden separar por electroforesis en gel. El ADN no se puede ver en el gel, por lo que una mezcla de colorantes llamada colorante de carga se mezcla con las muestras de ADN para controlar el progreso del procedimiento de electroforesis en gel. Para ayudar a determinar los tamaños de piezas desconocidas de ADN, se corre en el gel una mezcla de fragmentos de ADN de tamaños conocidos, llamada escalera de ADN. Después de completar la electroforesis en gel, el gel se colorea para mostrar la ubicación de los fragmentos de ADN y los plásmidos.



Haga que los alumnos completen el Laboratorio 4. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y las preguntas de **DETÉNGASE Y PIENSE** con la clase y que expliquen su razonamiento. (45 minutos)

Antes de comenzar el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* con sus grupos y que resuelvan cualquier diferencia. Luego, pida a los alumnos que compartan sus respuestas y sus ideas para cada pregunta con la clase.

Posibles respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio*:

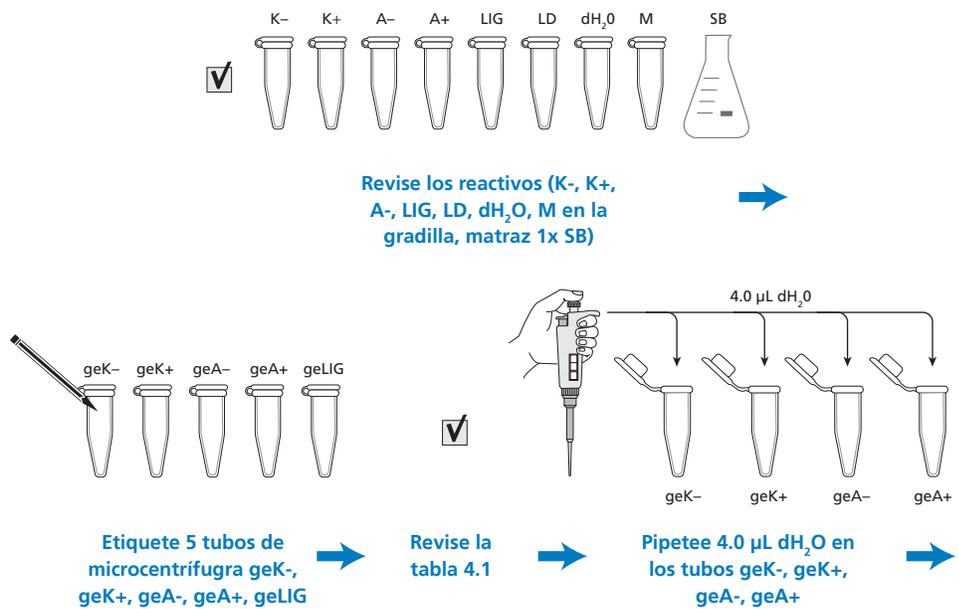
1. Los plásmidos pKAN-R y pARA que usted digirió en el Laboratorio 2 se replicaron en una célula bacteriana. ¿Qué configuraciones (superenrollado, círculo mellado y multímero) podrían tener estos dos plásmidos antes de la digestión? *Los dos plásmidos pueden tener las tres configuraciones.*
2. La ligación 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 (superenrollado, de círculo mellado y multímero) pueden tener los plásmidos ligados? *Los plásmidos ligados solo pueden tener la configuración de círculo mellado, ya que las otras dos configuraciones solo pueden ocurrir si un plásmido se ha replicado en una célula bacteriana.*
3. Debe predecir todos los productos que pueda ver, incluidas las diferentes configuraciones de plásmidos. Revise su 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 de 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. *A continuación se muestra una tabla de muestra:*

Tubo	Fragmentos y plásmidos enumerados en orden de aumento del tamaño de pb en cada tubo
K-	(1) pKAN-R, 5,512 bp <i>El plásmido puede tener las tres configuraciones, y la configuración superenrollado debería moverse más rápido.</i>
K+	(1) fragmento pBAD-rfp, 807 pb (2) fragmento kanR, 4,705 pb
A-	(1) pARA, 4,872 pb <i>El plásmido puede tener las tres configuraciones, y la configuración superenrollado debería moverse más rápido.</i>
A+	(1) fragmento en blanco, 377 pb (2) fragmento ampR-ori-araC, 4,495 pb

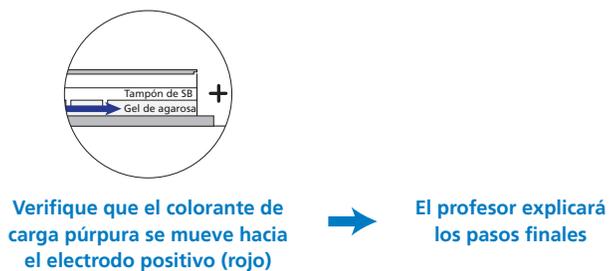
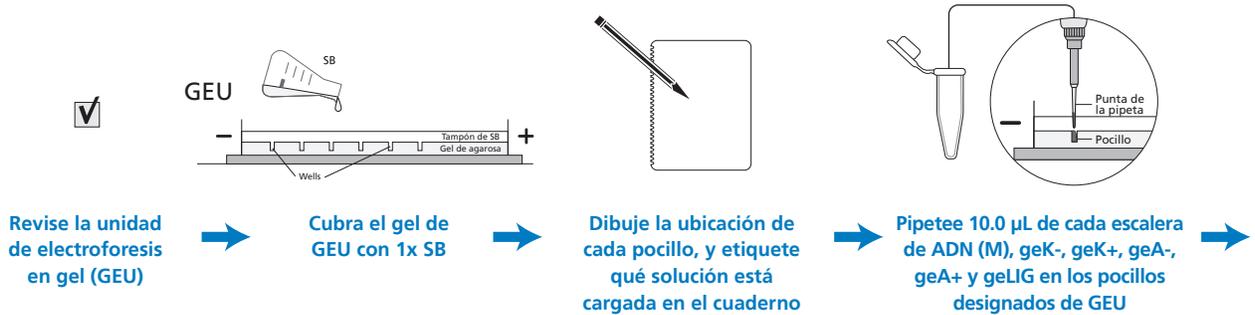
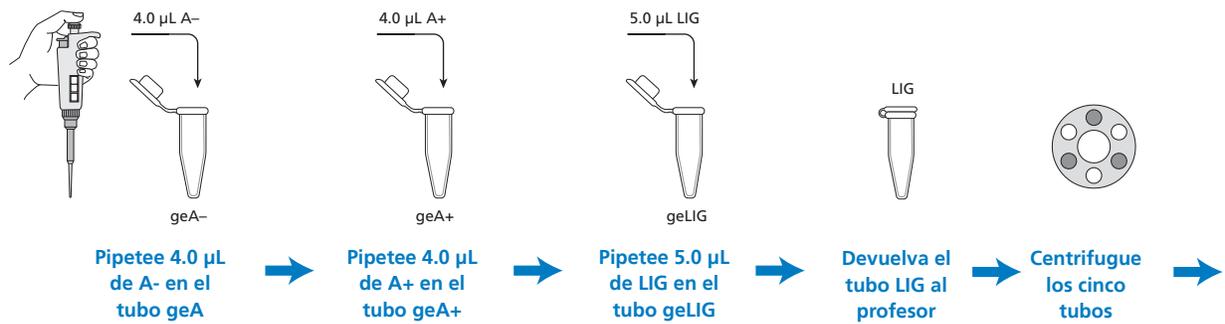
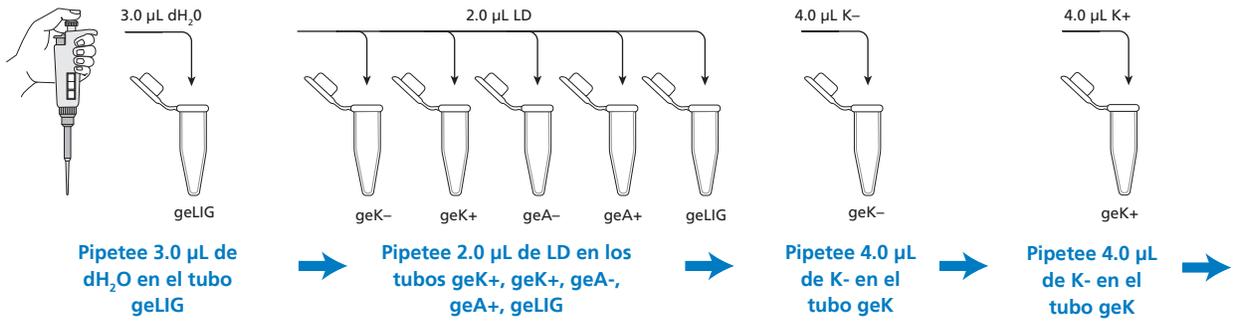
Tubo	Fragmentos y plásmidos enumerados en orden de aumento del tamaño de pb en cada tubo
LIG	(1) plásmido doble blanco, 754 pb (2) pBAD-rfpplásmido en blanco, 1,184 pb (3) plásmido doble pBAD-rfp, 1,614 pb (4) pARA, 4.872 pb (5) plásmido en blancokanR, 5,082 pb (6) pARA-R, 5,302 pb (7) pKAN-R, 5,512 pb (8) plásmido doble ampR-ori-araC, 8,990 pb (9) plásmido ampR-ori-araC-kanR, 9,200 pb (10) plásmido doble kanR, 9,410 pb

4. Lea la sección de *Métodos* en las páginas de B-45 a B-47 de la Guía del estudiante y describa brevemente los pasos, utilizando palabras y un diagrama de flujo. Las respuestas de los alumnos serán variadas. Un diagrama de flujo de los alumnos podría verse así:

**Diagrama de flujo del laboratorio 4**



### Diagrama de flujo del laboratorio 4 (continuación)

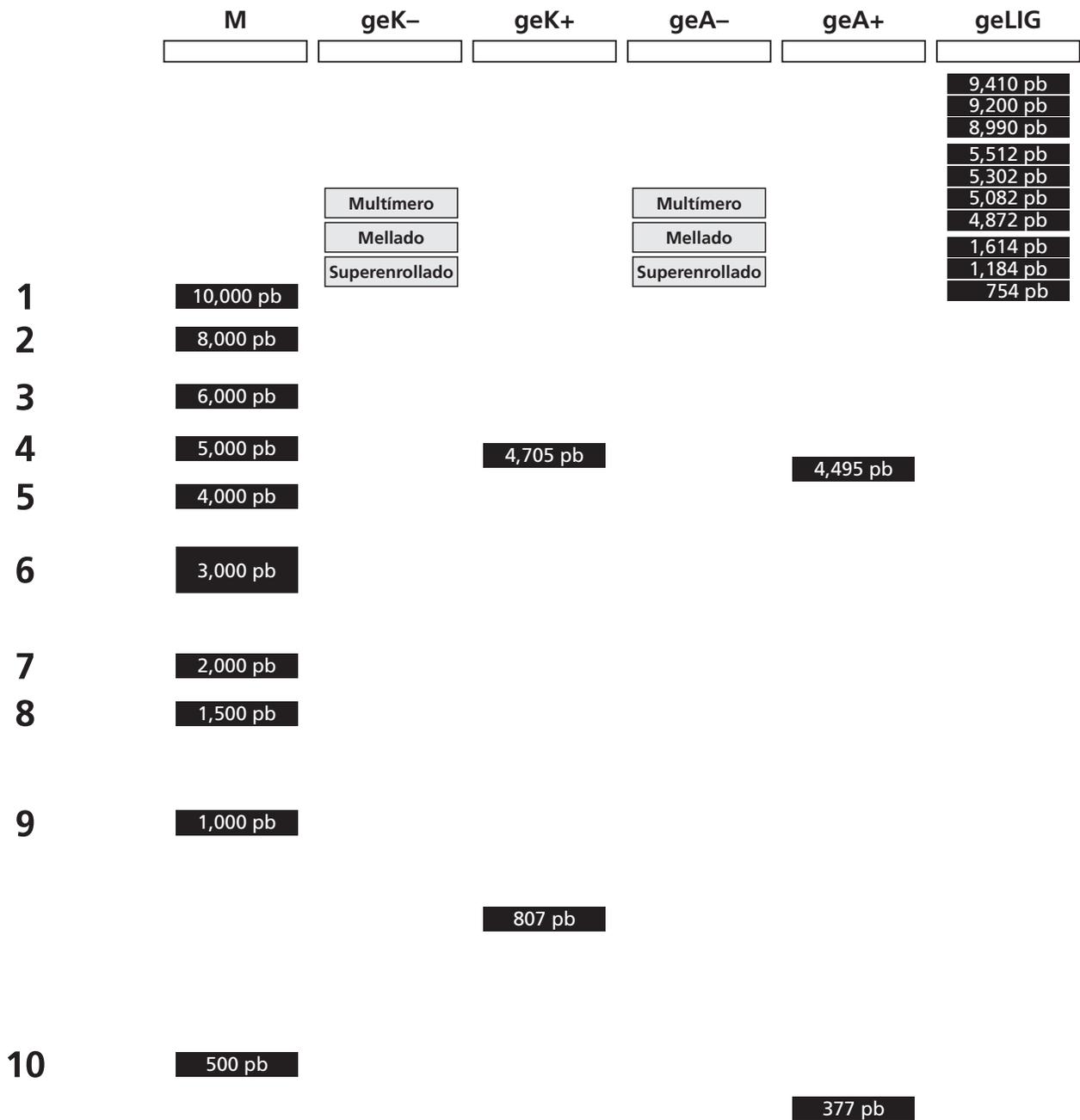


Entregue a cada alumno una copia de **Diagrama de escalera de ADN (RM 4)**. Durante el laboratorio, los alumnos deben debatir las preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE* en sus grupos y luego registrar individualmente sus respuestas. Pida a los alumnos que compartan sus respuestas y razonamiento para cada pregunta con la clase.

Posibles respuestas para las preguntas *DETÉNGASE Y PIENSE*:

- El ADN no es visible a medida que se mueve a través del gel. El colorante de carga contiene los tres colorantes que separó en el Laboratorio 1.2. ¿Por qué es útil usar el colorante de carga en este laboratorio? *Puede asegurarse de que las muestras en el gel estén corriendo y que lo estén haciendo en la dirección correcta.*
- La escalera de ADN sirve como estándar porque contiene una mezcla de moléculas de ADN de tamaños conocidos. Al 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 (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 los **Diagrama de escalera de ADN**? *Vea el siguiente diagrama. Tenga en cuenta que los alumnos no sabrán exactamente dónde colocar los plásmidos. Deben conocer las tendencias generales, que son (1) los plásmidos son mucho más lentos que los fragmentos lineales de ADN; (2) si los plásmidos son del mismo tamaño, entonces la diferencia de velocidad se determina mediante la configuración de rápido a lento en el orden (a) superenrollado, (b) círculo mellado y (c) multímero; y (3) si los plásmidos tienen la misma configuración, entonces la diferencia de velocidad está determinada por el tamaño.*





- 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? *A menos que los alumnos conozcan los métodos de tinción, sus respuestas variarán. Después de haber escuchado las ideas de los alumnos, puede presentar el proceso de tinción y explicar que la mancha está compuesta por un colorante que se adhiere a las moléculas de ADN, al igual que los colorantes para la ropa se adhieren a las moléculas de la tela.*

Después del laboratorio, deberá colorear y fotodocumentar los geles para que los alumnos los usen para responder las *Preguntas del Capítulo 4*. Consulte las instrucciones incluidas en el kit.

## SESIÓN 3

**IDEAS CLAVE:** Los fragmentos de ADN y los plásmidos que se han separado por electroforesis en gel se pueden identificar mediante la comparación con una escalera de ADN. Esta identificación se puede usar para verificar si el plásmido recombinante que necesita está presente y también puede brindar información a los alumnos sobre qué tan bien funcionaron sus procedimientos.



**Pida a los alumnos que comenten las Preguntas del Capítulo 4 en grupos pequeños y que registren sus respuestas de forma individual. (20 minutos)**

Para responder muchas de las preguntas, los alumnos deberán analizar sus geles. Está preparado para ayudar a los alumnos a entender lo que ven a medida que responden las preguntas.

**ESTRATEGIA:** Está preparado para revisar los geles de los alumnos con ellos y para hablar sobre los posibles motivos de los resultados no concluyentes, como un lote malo de plásmidos, errores de pipeteo o etiquetado en el procedimiento de digestión, errores de pipeteo o etiquetado en el procedimiento de ligación, enzimas inactivas o la adición de muestras incorrectas a los pocillos en el gel. Explique que los científicos verifican sus resultados después de cada paso, pero que los alumnos no tuvieron tiempo suficiente para llevar a cabo múltiples verificaciones.



**Dirija un debate a partir de las respuestas de los alumnos. (25 minutos)**

Posibles respuestas a las Preguntas del Capítulo 4:

1. ¿Por qué es importante verificar que tiene el plásmido recombinante correcto? *Puede cometer errores durante un procedimiento o puede haber otros problemas, como reactivos que no son correctos. Los productos de los procedimientos de ingeniería genética no son visibles, por lo que los errores pueden pasar desapercibidos. Debe asegurarse de tener un plásmido recombinante que tenga el gen que necesita, así como cualquier otro gen o secuencia importante antes de continuar el proceso de colocar el plásmido en bacterias.*

**ESTRATEGIA:** También se hizo una pregunta similar en la sección ¿Qué sabes ya? al comienzo del capítulo. Pida a los alumnos que comparen sus dos respuestas.



**NOTA:** Las respuestas de los alumnos a las preguntas 2–8 variarán, dependiendo de su éxito en la realización de los procedimientos, incluido el procedimiento de electroforesis en gel. Estas posibles respuestas pueden no ser aplicables si sus procedimientos no tuvieron éxito.



**IR MÁS ALLÁ:** Pídales a los alumnos que creen una curva estándar de los fragmentos de la escalera de ADN trazando el logaritmo bp (o kbp) versus la distancia en el gel en papel semilogarítmico. Luego, los alumnos pueden usar la curva estándar para determinar con mayor precisión la longitud (número de pb) de bandas desconocidas.

2. ¿Cómo se compararon los resultados reales del gel con las predicciones del gel? *Las respuestas variarán, pero si el procedimiento se realizó correctamente, los alumnos deberían ver el mismo número de bandas que se predice en cada carril, excepto el carril geLIG, que será una mancha (consulte la respuesta a la pregunta 9 en la página B-57 para obtener más información). No es raro que los alumnos no agreguen una de las enzimas necesarias o carguen los geles en un orden diferente al sugerido en el protocolo. Esto está bien, siempre y cuando puedan averiguar qué hay en cada línea al revisar los plásmidos no digeridos y la longitud de los fragmentos.*
3. ¿Ha visto alguna banda que no se esperaba? ¿Qué factor podría explicar el origen de estas bandas inesperadas? *Las respuestas pueden variar, pero pueden aparecer bandas inesperadas si se utilizaron reactivos incorrectos o vencidos en los procedimientos, si los alumnos cargaron los geles en un orden diferente al sugerido en el protocolo, o si los alumnos cargaron una línea dos veces.*
4. ¿El gel muestra que sus procedimientos de ligadura y digestión de restricción fueron exitosos? Describa la evidencia que usó para llegar a esta afirmación. *Los procedimientos de digestión de la restricción y ligación fueron exitosos porque existen diferencias en el contenido de los tubos K-, K+, A-, A+ y LIG.*
5. En las líneas geK- y geA-, ¿ve evidencia de configuraciones múltiples de plásmidos? Explique su respuesta. *Los alumnos deben ver dos o tres bandas diferentes en las líneas geK y geA, lo cual es evidencia de múltiples configuraciones de plásmidos.*
6. En las líneas geK+ y geA+, ¿ve evidencia de digestión completa? Explique su respuesta. *Sí, solo hay dos bandas en cada línea, lo que demuestra que el plásmido se digirió completamente en sus dos fragmentos.*
7. ¿En qué línea esperarías encontrar el gen *rfp* y el gen *ampR* en la fotografía de gel? ¿Puede localizar estos dos genes? Explique su respuesta. *En la línea geK+, esperaríamos ver una banda entre los fragmentos de escalera de ADN de 1,000 pb y 500 pb, que es el fragmento de 807 pb que lleva el gen *rfp*. En la línea geA+, esperaríamos ver una banda de fragmentos de escalera de ADN entre los 4.000 pb y 5.000 pb, que es el fragmento de 4.495 pb que lleva el gen *ampR*. Vemos ambas bandas en estas ubicaciones.*
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? *Sí, las bandas para los fragmentos lineales tienen bordes finales.*

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 los extremos adhesivos *Bam*HI y *Hind*III. ¿Hay evidencia de un fragmento circular de 1,614 pb en la línea del tubo geLIG? Explique su respuesta. *Es probable que los alumnos no puedan confirmar la existencia de este plásmido. En este carril, el gel probablemente contendrá una “mancha” en el extremo más cercano al pocillo que es una combinación de diferentes plásmidos. No se puede producir una separación clara de los plásmidos completos debido al contenido de la muestra y al procedimiento de electroforesis en gel. La muestra del procedimiento de ligación consiste en unas pocas copias de cada uno de los plásmidos múltiples. En comparación con los fragmentos, los plásmidos completos tienen un peso molecular relativamente alto y se mueven muy lentamente a través del gel en el procedimiento de electroforesis. En el tiempo que tardan los fragmentos más pequeños en moverse hasta el final del gel, los plásmidos completos se han movido a poca distancia del pocillo y no se han separado completamente el uno del otro.*

**ESTRATEGIA:** Mientras dirige el debate, aplique las siguientes prácticas:

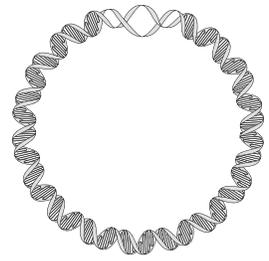
- Dé a los alumnos tiempo para evaluar las respuestas de los demás.
- Pida aclaraciones.
- Pida una explicación.
- Replantee o reformule.
- Pida un ejemplo.
- Pida evidencia.
- Proporcione ejemplos y contraejemplos.
- Pida a los alumnos que aporten una explicación.
- Pida a los alumnos que evalúen una respuesta.



**IR MÁS ALLÁ:** Como se describió anteriormente, muchos animales han sido clonados a partir de células somáticas, pero esta lista no incluye a los humanos. Puede hacer que los alumnos investiguen las técnicas y los resultados de la clonación y el debate actual sobre si los humanos deben ser clonados, y que luego mantengan su propio debate sobre esta cuestión.







## CAPÍTULO 5

# CONSEGUIR PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN BACTERIAS



# DESCRIPCIÓN GENERAL

---

En este capítulo, los alumnos aprenden que los plásmidos recombinantes deben ser absorbidos por las bacterias para replicarse y expresar sus genes. En el laboratorio, los alumnos transforman bacterias con los productos de ligación, incluido el plásmido pARA-R que contiene el gen *rfp* y el gen *ampR*.

## SUPUESTOS DEL CONOCIMIENTO PREVIO

Los estudiantes ya deben saber lo siguiente:

- La relación entre el ADN, los genes, las proteínas y los rasgos, específicamente, que los genes contienen el código para fabricar una proteína y que las proteínas son moléculas que se utilizan para fabricar y desarrollar la célula, por lo que son responsables de los rasgos.
- El ADN es una molécula bicatenaria, y cada cadena de ADN está compuesta de subunidades unidas covalentemente llamadas nucleótidos, que se abrevian de acuerdo con la base nitrogenada que contienen (C, G, A, T)
- La transcripción es el proceso mediante el cual la información codificada en el ADN se transfiere al ARN mensajero, un ácido ribonucleico monocatenario.
- La traducción es el proceso por el cual la información codificada en el ARN mensajero se decodifica y transforma en una proteína.

## OBJETIVOS DE APRENDIZAJE

Al final de este capítulo, los estudiantes podrán 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 como un rasgo.

## RESULTADOS EVALUADOS

- Evalúe la capacidad de cada estudiante describir la función de la transformación en el proceso de clonación revisando sus respuestas a la pregunta 4 en *Preguntas del Capítulo 5* (página B-66 de la Guía del estudiante).
- Evalúe la capacidad de cada alumno para explicar el propósito de cada control en el experimento de transformación revisando sus respuestas a las preguntas 1 y 2 en *Antes del laboratorio* (páginas B-60 de la Guía del estudiante), a la primera pregunta de *DETÉNGASE Y PIENSE* en el Laboratorio 5 (página B-63 de la Guía del estudiante), y a la pregunta 3 en *Preguntas del Capítulo 5* (página B-66 de la Guía del estudiante), y su trabajo en **Predicciones de crecimiento bacteriano (RM 5)**.
- Evalúe la capacidad de cada alumno para explicar cómo la información codificada en un gen se expresa como un rasgo al revisar sus respuestas a las preguntas 5 y 6 en *Preguntas del Capítulo 5* (página B-66 de la Guía del estudiante).

## SECUENCIA DE ACTIVIDADES SUGERIDA

### SESIÓN 1

- Revise la **Introducción** y *los Objetivos del Capítulo 5*. (5 minutos)
- Pida a los estudiantes que contesten las preguntas *¿Qué sabes ya?* y que compartan sus respuestas. (10 minutos)
- Haga que los alumnos lean **Transformar bacterias con plásmidos recombinantes** y que contesten las preguntas de *CONSIDERAR*. (10 minutos)
- Dirija un debate sobre las respuestas de los alumnos a las preguntas de *CONSIDERAR* preguntas de **Transformas bacterias con plásmidos recombinantes**. (5 minutos)
- Haga que los alumnos comiencen el Laboratorio 5 leyendo los párrafos introductorios y respondiendo las preguntas de *Antes del laboratorio* en sus grupos. (15 minutos)

### SESIÓN 2

- Haga que los alumnos continúen el Laboratorio 5. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y de *DETÉNGASE Y PIENSE* con la clase y que expliquen su razonamiento. (45 minutos)

**NOTA:** Hay dos períodos de espera de 15 minutos durante este laboratorio, durante el cual los alumnos pueden compartir sus respuestas a estas preguntas.

### SESIÓN 3

- Haga que los alumnos revisen los resultados del Laboratorio 5. (10 minutos)
- Demuestre cómo establecer un cultivo en suspensión para las bacterias transformadas, como preparación del Capítulo 6. (5 minutos)
- Revise la transcripción, la traducción y la relación entre genes, proteínas y rasgos. (10 minutos)
- Pida a los alumnos que analicen las *Preguntas del Capítulo 5* en grupos pequeños y que registren sus respuestas de forma individual. (10 minutos)
- Dirija un debate a partir de las respuestas de los alumnos. (10 minutos)

## PREPARACIÓN

---

Antes de comenzar, debe familiarizarse con los procedimientos de laboratorio en cada capítulo, la preparación requerida y los materiales que necesitará. Las instrucciones suponen que proporcionará materiales para 12 grupos de 2 o 3 alumnos. Multiplique las cantidades según sea necesario en función de la cantidad de alumnos y el número de clases que imparte.

**TÉCNICA DE LABORATORIO:** Las células competentes que se requieren en el Laboratorio 5 deben almacenarse en el congelador hasta el día en que se usan. Por lo tanto, separe las alícuotas de los reactivos y reúna los materiales para el laboratorio el mismo día que lo lleve a cabo. Trate de minimizar la cantidad de veces que las células se descongelan.



### FOTOCOPIE LOS FOLLETOS PARA EL LABORATORIO 5

Se necesita una copia de **Predicciones de crecimiento bacteriano (RM 5)** para cada estudiante. El Master reproducible (RM) para el folleto se encuentra al final de la guía.

### REVISE LAS PRECAUCIONES DE SEGURIDAD Y LOS PROCEDIMIENTOS DE ELIMINACIÓN DE DESECHOS PARA EL LABORATORIO 5

Revise las precauciones de seguridad y los procedimientos enumerados en las páginas OV-15 y OV-16 en la Descripción general del plan de estudios con los alumnos.

### CALIBRAR EL BAÑO MARÍA PARA EL LABORATORIO 5

Si su baño maría aún no está preparado, vea *Preparar y calibrar el baño maría para el laboratorio 2* (página B-6 de esta guía). Para este laboratorio, calibre el baño maría a 42 °C, asegurándose de que haya suficiente agua en el baño y que el baño esté cubierto para reducir la evaporación. Asegúrese de usar agua destilada en el baño maría y de mantener el termómetro, el temporizador y la gradilla flotante para tubos de microcentrifuga con el baño maría.

### ALÍCUOTAS DE REACTIVOS Y MATERIALES DE RECOLECCIÓN PARA LABORATORIO 5

Reúna materiales en el día del laboratorio. Después de preparar las gradillas con los reactivos, asegúrese de guardarlos en el refrigerador hasta que los alumnos estén listos para usarlos. Separe en alícuotas las células competentes 15 minutos antes de que los alumnos comiencen el laboratorio (vea el paso 5).

1. Etiquete dos tubos de microcentrifuga de la siguiente manera:
  - 12 tubos de microcentrifuga de 1.5 ml marcados con "LB"
  - 12 tubos de microcentrifuga de 1.5 ml marcados con "CC"

2. Pipetee 350  $\mu$ l de caldo Luria en los tubos marcados con "LB"
3. Prepare 12 juegos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:
  - Gradilla de plástico para tubos de microcentrífuga que contenga los siguientes reactivos:
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de LB, que se preparó antes
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de plásmido ligado del laboratorio 3 (LIG)
  - NOTA: Si el gel de confirmación de un grupo en el Laboratorio 4 indicó que no obtuvo ligación, ese grupo debería tomar prestados 2.0  $\mu$ l de plásmido ligado con éxito de otros grupos. (El grupo necesitará un total de 8.0  $\mu$  para la transformación).**
  - 2 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
  - Marcador permanente
  - Micropipeta P-20
  - Micropipeta P-200
  - Caja de puntas de pipetas desechables
  - 3 placas Petri con agar:
    - ◆ 1 placa de LB (una franja)
    - ◆ 1 placa de LB / amp (dos franjas)
    - ◆ 1 placa de LB / amp / ara (tres franjas)
4. Reúna los otros materiales necesarios para el laboratorio:
  - Guantes desechables
  - Tazas de espuma de poliestireno (una por grupo)
  - Esparcidores de células
  - Cinta adhesiva
  - Bolsa de residuos con riesgo biológico
  - Recipiente de recolección de residuos líquidos, como un vaso de precipitado pequeño
  - Copias de **Predicciones de crecimiento bacteriano (RM5)**, una para cada estudiante
5. Prepare células competentes 15 minutos antes de que los alumnos comiencen el laboratorio, de la siguiente manera:
  - Prepare un recipiente pequeño lleno de hielo picado.
  - Coloque los tubos etiquetados con CC en el hielo.
  - Pipetee 100  $\mu$ l de células de *E. coli* competentes en cada tubo con CC, sujetando los tubos solo por los bordes y devolviéndolos inmediatamente al hielo.
  - Coloque el recipiente lleno de hielo de células competentes en una ubicación central.
  - Coloque tazas de espuma de poliestireno al lado del contenedor de hielo.
6. Coloque la incubadora en una ubicación central y calíbrala a 37 °C.
7. Coloque los esparcidores de células y la cinta en una ubicación central para que los grupos puedan compartirlos.

**NOTA:** Las placas de los grupos se incubarán durante 24–36 horas a 37 °C. Si los alumnos no se reúnen en aproximadamente 24 horas, retire las placas de la incubadora y colóquelas en el refrigerador. Si no hay una incubadora disponible, las placas pueden almacenarse a temperatura ambiente por hasta 48 horas.

## SESIÓN 1

**IDEAS CLAVE:** Una vez que se ha creado un plásmido recombinante, este debe ser absorbido por las bacterias para que puedan usar la maquinaria de las células bacterianas para replicarse y expresar el gen de interés. El proceso en el que la bacteria capta el ADN de su entorno se llama transformación. Debido a que las bacterias son organismos unicelulares que existen en un ambiente hostil, no se transforman fácilmente. Sin embargo, con una preparación específica, 1 de cada 1,000 células absorberán plásmidos.



### Revise la Introducción y los Objetivos del Capítulo 5. (5 minutos)

La **Introducción** explica el propósito principal de este capítulo, vinculándolo a la Introducción al programa. Los *Objetivos del Capítulo 5* les dicen a los alumnos en qué deben enfocarse mientras trabajan en este capítulo. Explique a los alumnos qué evaluará en este capítulo y cuáles son sus expectativas en relación con el desempeño de los alumnos.

### Pida a los estudiantes que contesten las preguntas *¿Qué sabes ya?* y que compartan sus respuestas. (10 minutos)

La sección *¿Qué sabes ya?* La sección activa el conocimiento de los alumnos sobre la absorción de plásmidos y la expresión génica, y revela brechas en ese conocimiento. Haga que los alumnos respondan las preguntas en parejas, registren sus ideas y luego las compartan con la clase para que pueda evaluar lo que saben y lo que no saben sobre la absorción de plásmidos y la expresión génica.

Posibles respuestas a las preguntas *¿Qué sabes ya?*:

1. *¿Crees que la captación bacteriana de un plásmido del ambiente es un evento común? ¿Por qué o por qué no? Probablemente no sea un evento común. Las células tratarán de protegerse a sí mismas de las sustancias del medioambiente, ya que muchas de ellas pueden ser perjudiciales.*
2. *¿Cuáles son los pasos involucrados en la transcripción y traducción de un gen? Durante la transcripción, el ADN se copia en el ARN mensajero. Durante la traducción, el ARN mensajero se decodifica en una parte celular llamada ribosoma. El ribosoma lee los codones del ARNm y los traduce en aminoácidos. Cada codón (un grupo de tres bases) en la secuencia corresponde a un aminoácido, y los aminoácidos son los componentes básicos de las proteínas.*
3. *¿Cuál es la relación entre genes, proteínas y rasgos (o características observables)? Un gen contiene el código para hacer una proteína, y las proteínas son moléculas que se usan para hacer y desarrollar la célula, por lo que son responsables de los rasgos. A menudo, un rasgo es el resultado de múltiples proteínas.*

4. ¿Qué tienen en común las bacterias y los seres humanos que hacen posible que un gen humano se exprese en bacterias? *La estructura y el código del ADN son los mismos en bacterias y humanos. La maquinaria celular que realiza la transcripción y traducción es la misma en bacterias y humanos.*

**Haga que los alumnos lean Transformar bacterias con plásmidos recombinantes y que contesten las preguntas de CONSIDERAR. (10 minutos)**

En esta lectura, los alumnos aprenden sobre la transformación, que es la absorción de ADN por las bacterias. La célula bacteriana proporciona la maquinaria celular que permite que un plásmido recombinante se replique y exprese un gen. Los alumnos aprenden que el código de ADN y los procesos de transcripción y traducción son universales, lo que hace posible que las bacterias expresen un gen humano. Haga que los alumnos anoten las respuestas de las preguntas de CONSIDERAR en sus cuadernos. Recuerde a los alumnos que usen el **Glosario** para buscar términos científicos si necesitan ayuda para entender la lectura.

**Dirija un debate sobre las respuestas de los alumnos a las preguntas de CONSIDERAR preguntas de Transformas bacterias con plásmidos recombinantes. (5 minutos)**

Evalúe el conocimiento de los alumnos sobre la expresión génica, la absorción de plásmidos, el ADN y cómo se usan las ligasas en ingeniería genética al revisar sus respuestas a las preguntas de CONSIDERAR.



Posibles respuestas a las preguntas de CONSIDERAR:

- 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? *El vector debe introducirse dentro de una célula para que su ADN pueda transcribirse y traducirse en una proteína. Si el vector contiene un activador para el promotor, como araC, podría ser necesaria una sustancia como la arabinosa.*
- ¿Por qué es importante que las membranas de las bacterias de *E. coli* regulen cuidadosamente qué sustancias pueden entrar y salir de la célula? *La célula regula las sustancias que pueden entrar y salir porque algunas sustancias pueden afectarla negativamente.*

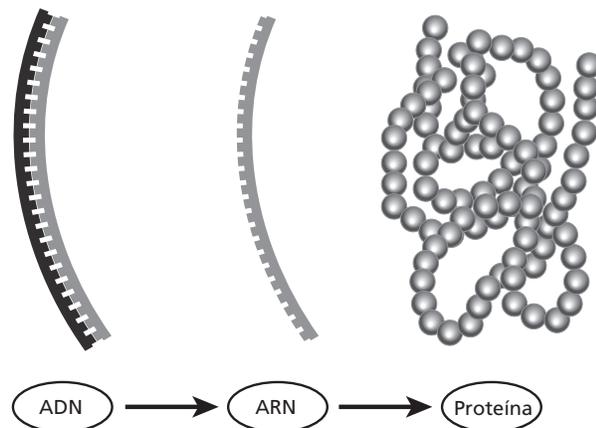
**Haga que los alumnos comiencen el Laboratorio 5 leyendo los párrafos introductorios y respondiendo las preguntas de Antes del laboratorio en sus grupos. (15 minutos)**

Los alumnos comentan las preguntas de *Antes del laboratorio* en sus grupos y registran sus respuestas de forma individual. Este trabajo se puede completar como tarea si es necesario.

## ANTECEDENTE CIENTÍFICO: EL DOGMA CENTRAL Y LA TRANSCRIPTASA INVERSA

En 1957, Francis Crick sentó las bases intelectuales para comprender cómo la información en el ADN da como resultado rasgos de organismos. Propuso lo que se conoció como el "dogma central", que establece que la información genética almacenada en el ADN se transfiere al ARN en el proceso de transcripción. El ARN "mensajero" (ARNm) luego lleva esta información a los ribosomas, donde se traduce en proteínas (ver **Figura T5.1**).

**Figura T5.1: Dogma central**

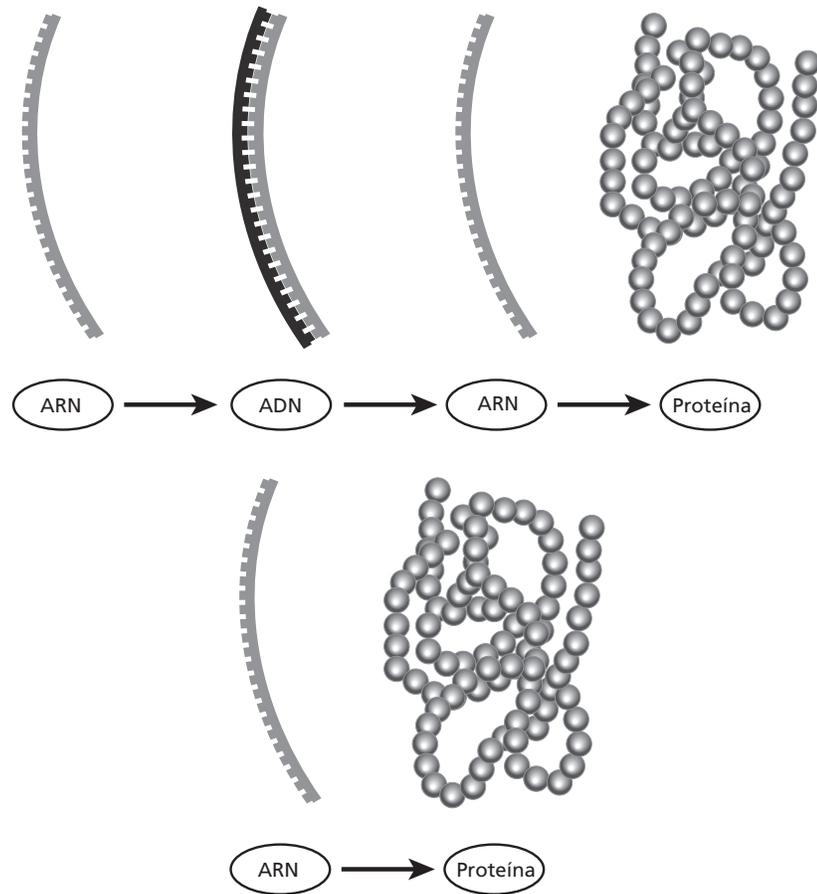


El descubrimiento de que ciertos virus no usan ADN sino ARN como material genético condujo a una modificación significativa del dogma central. Un grupo de virus de ARN, llamados retrovirus, almacena su información genética como ARN bicatenario, y la información en el ARN se convierte en ADN mediante la enzima transcriptasa inversa. Este ADN se integra en el genoma de la célula huésped y luego se transcribe mediante la ARN polimerasa de la célula huésped en ARNm, que es traducido por la maquinaria de síntesis de proteínas de la célula huésped para generar proteínas virales.

Otro grupo de virus, llamados virus de cadena positiva, omiten el ADN por completo. Una molécula de ARN monocatenario sirve como material genético y como ARNm. El virus de la polio es un ejemplo de un virus cuyo ARN genómico tiene tres funciones: (1) almacenar información genética, (2) servir como plantilla para la replicación por una ARN polimerasa dependiente de ARN y (3) actuar como un ARNm que dirige la traducción de la información codificada en proteínas virales.

Estos descubrimientos demostraron que el flujo de información según lo establecido en el dogma central tiene múltiples vías. Además de la ruta que se muestra arriba, hay dos rutas adicionales, que se muestran en la **Figura T5.2**.

Figura T5.2: Vías alternativas para el dogma central



El descubrimiento de la transcriptasa inversa, que ganó un Premio Nobel en 1970 por sus descubridores, Howard Temin y David Baltimore, proporcionó una herramienta invaluable para la biotecnología. Con la transcriptasa inversa, se podrían generar copias de ADN directamente del ARNm. Esta copia de ADN (ADNc) alivió los problemas que se presentaron por el hecho de que el ADN genómico no podía usarse en bacterias, las cuales no tienen la capacidad de empalmar (eliminar) intrones del ARNm. El ADNc contiene solo exones y, por lo tanto, puede usarse en bacterias para producir la proteína codificada.

Además de llevar información genética, algunas moléculas de ARN pueden actuar como enzimas y participan en la regulación de la expresión génica. La capacidad del ARN para desempeñar una serie de roles diferentes en la célula ha llevado a algunos científicos a proponer que la forma de vida ancestral estaba basada en el ARN y posteriormente evolucionó a las formas que conocemos ahora, con el ADN como la principal biomolécula de la herencia.

## SESIÓN 2

**IDEAS CLAVE:** Las células bacterianas que se han transformado con el plásmido pARA-R se identifican al cultivarlas en presencia de ampicilina y arabinosa. La ampicilina evitará el crecimiento de células que no portan un gen de resistencia a la ampicilina, y la arabinosa activará el promotor bacteriano que controla la expresión del gen *rfp*.



Haga que los alumnos continúen el Laboratorio 5. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y de **DETÉNGASE Y PIENSE** con la clase y que expliquen su razonamiento. (45 minutos)

Los alumnos realizan una actividad de laboratorio, Laboratorio 5, en la que transforman bacterias con el plásmido pARA-R que contiene el gen *rfp* y el gen *ampR*. Los alumnos aprenden sobre la importancia de los controles cuando seleccionan las bacterias que han tomado el plásmido pARA-R.

Haga que los alumnos primero completen los pasos 1–7 en la sección *Métodos*. Luego, mientras los tubos P– y P+ están en hielo durante 15 minutos, haga que los alumnos compartan sus respuestas a la pregunta 3 en *Antes del laboratorio*. (Todas las preguntas de *Antes del laboratorio* y las posibles respuestas siguen).

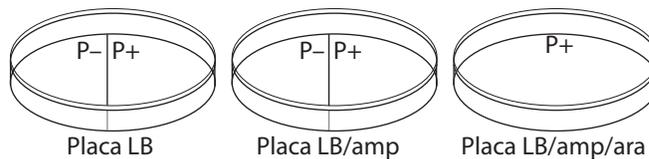
Posibles respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio*:

1. La ampicilina es un antibiótico que mata 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? *Solo las células que tienen un plásmido que contiene el gen de resistencia a la ampicilina podrán crecer en presencia de ampicilina. Puede seleccionar las células que se han transformado, que son muy pocas.*
2. ¿Qué sucederá cuando las células bacterianas que contienen el plásmido pARA-R no reciban arabinosa? *El gen *rfp* no puede expresarse a menos que la célula reciba arabinosa; solo en presencia de arabinosa la proteína activadora AraC activará el gen promotor *rfp*.*



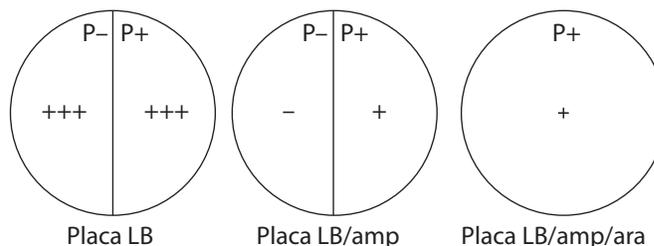
**IR MÁS ALLÁ:** Es posible que desee proporcionar información más detallada a los alumnos sobre cómo funciona la proteína activadora AraC. El gen *araC* es parte del operón arabinosa, que es un ejemplo clásico de regulación génica en bacterias (ver la **Figura T2.1** en la página B-21 de esta guía). Además de *araC* el operón comprende tres genes, *araB*, *araA* y *araD*, que codifican las proteínas responsables del transporte y la descomposición de la arabinosa. También incluye un promotor y una secuencia 5' de ADN próximo al promotor, que se une a la proteína AraC. La proteína AraC regula la expresión de los genes de arabinosa permitiendo su transcripción en presencia de arabinosa o desactivando la expresión génica en su ausencia. En el plásmido pARA-R, el operón arabinosa controla la expresión del gen *rfp*, y la RFP solo se puede producir cuando hay arabinosa presente.

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 de 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. Entonces 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.

*Predicciones para cada placa:*



Respuestas para *Tabla 1* y la *Tabla 2* en *RM 5*:

**Tabla 1: Grupo de control P- (bacterias no transformadas)**

Placa Contiene	Crecimiento previsto	Conclusión si se produce un crecimiento previsto	Conclusión si no se produce el crecimiento previsto
Caldo Luria (LB)	+++	<i>Las bacterias no transformadas están vivas, y el caldo Luria puede apoyar su crecimiento</i>	<i>Problema con bacterias, caldo Luria o métodos</i>
Caldo Luria ampicilina (LB / amp)	-	<i>La ampicilina mata las bacterias no transformadas</i>	<i>Problema con ampicilina</i>

**Tabla 2: Grupo Experimental P+ (bacterias transformadas)**

Placa Contiene	Crecimiento previsto	Conclusión si se produce un crecimiento previsto	Conclusión si no se produce el crecimiento previsto
Caldo Luria (LB)	+++	<i>Las bacterias transformadas están vivas, y el caldo Luria puede apoyar su crecimiento; las bacterias no fueron afectadas por el proceso de transformación</i>	<i>Problema con bacterias, caldo Luria o proceso de transformación</i>
Caldo Luria ampicilina (LB / amp)	+	<i>Algunas bacterias transformadas tienen plásmidos con resistencia a la ampicilina</i>	<i>La transformación no funcionó</i>
Caldo Luria ampicilina arabinosa (LB / amp / ara)	+	<i>Algunas bacterias transformadas tienen plásmidos con resistencia a la ampicilina</i>	<i>Problema con arabinosa; la transformación no funcionó</i>

**ESTRATEGIA:** Muchos alumnos se esfuerzan por comprender los controles y se beneficiarán de un debate sobre el crecimiento de las bacterias no transformadas y transformadas en cada condición. Ayude a los alumnos a comprender que cada control está diseñado para proporcionar una respuesta a una pregunta útil, es decir:

- ¿Son viables las células?
- ¿La ampicilina mata las células no transformadas?
- ¿Son viables las células después del procedimiento de transformación?



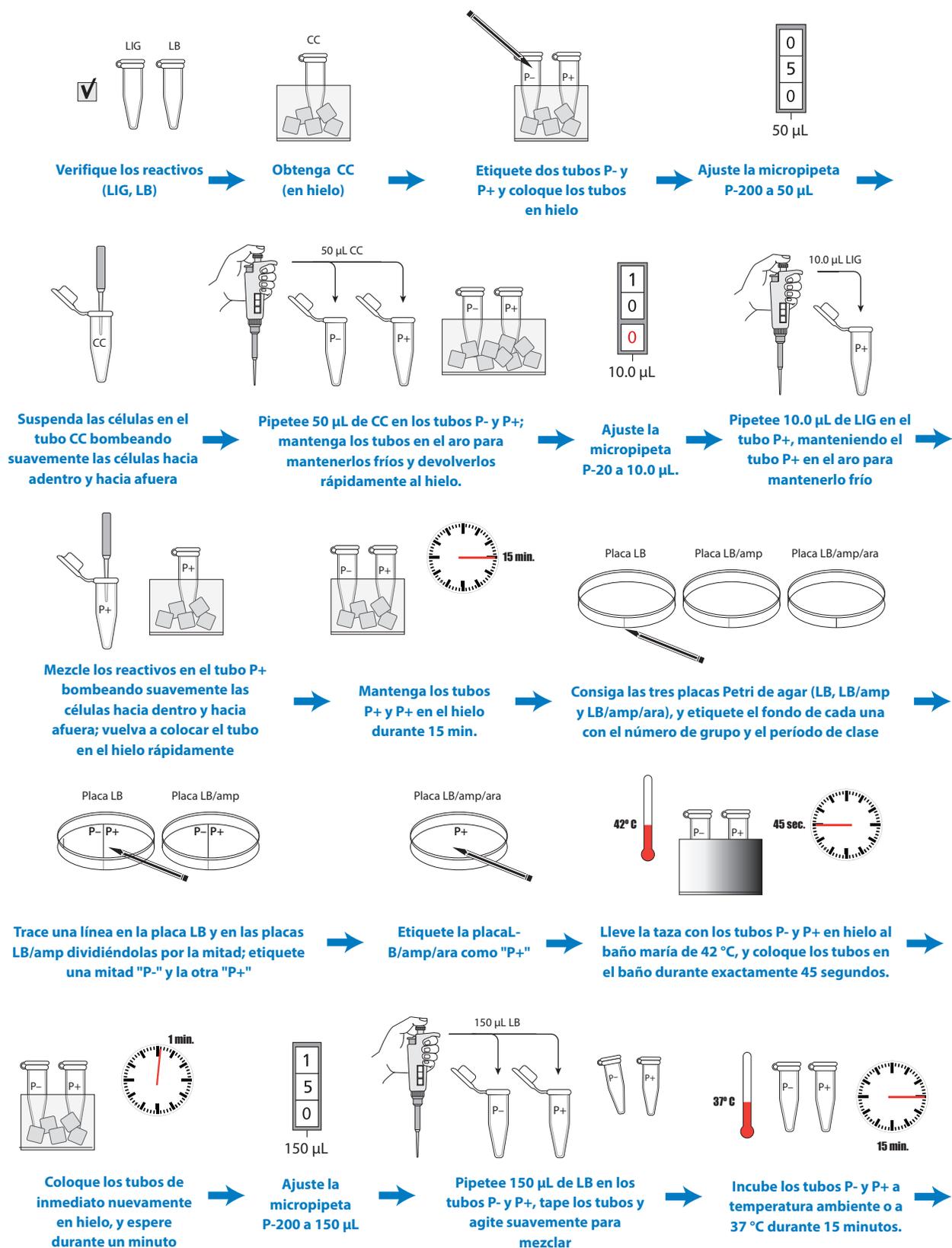
- ¿Fue exitosa la transformación en la medida en que algunas células han adquirido resistencia a la ampicilina?
- ¿Alguna célula transformada produce RFP?

Puede pedirles a los alumnos que consideren un escenario en el que las células se transformaron y se colocaron en la placa LB / amp / ara, pero luego no crecieron, y usted no había llevado a cabo ningún control. Ayude a los alumnos a comprender que solo si el experimentador ha cultivado la bacteria en cada condición puede determinar por qué el procedimiento de transformación no funcionó.

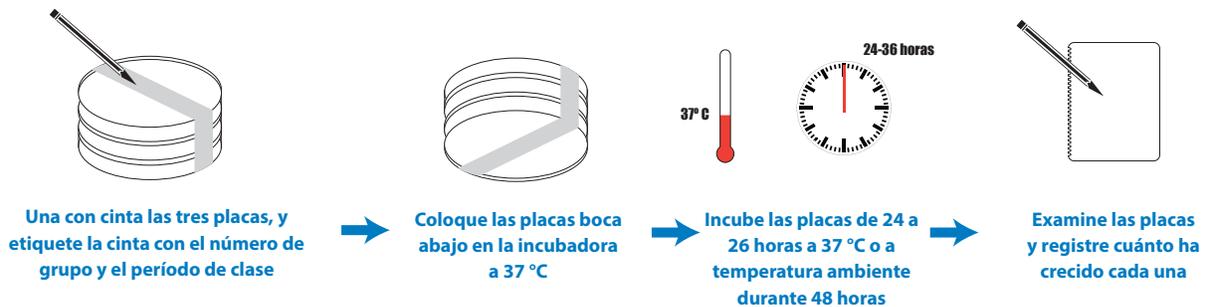
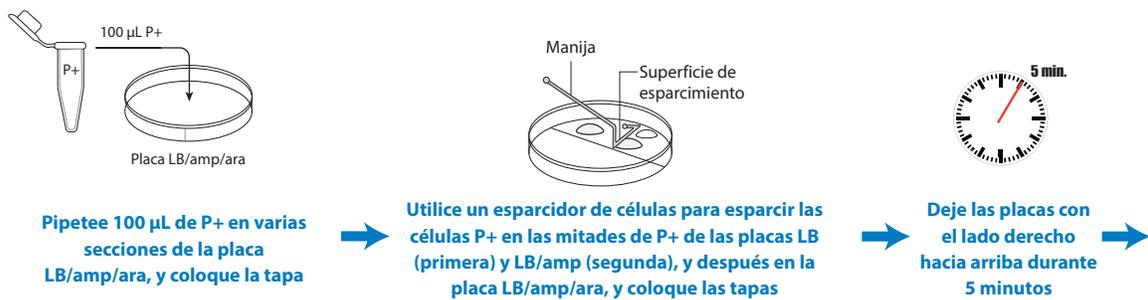
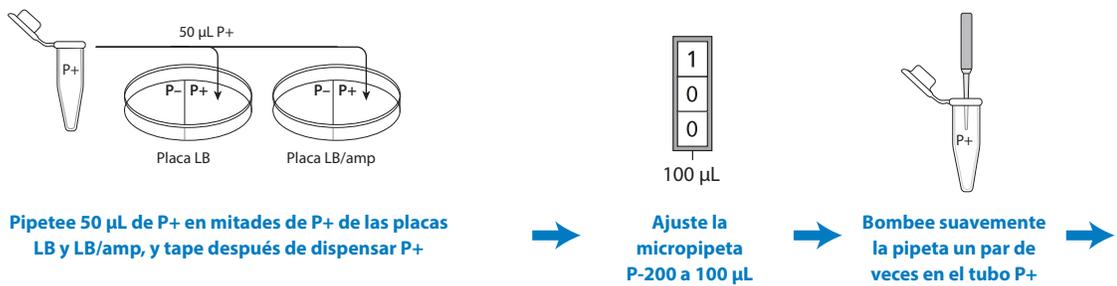
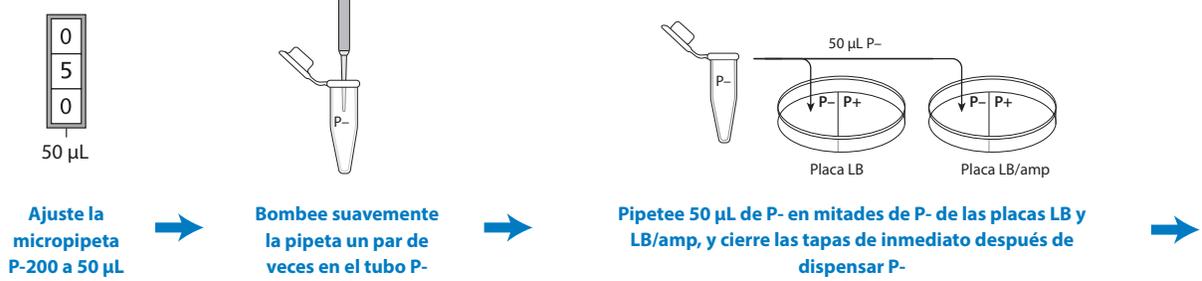
Si los alumnos se preguntan por qué las células no transformadas no se colocan en la placa LB / amp / ara, puede explicarles si esto responde a una pregunta útil que arroja luz sobre el éxito del experimento.

4. Lea la sección de *Métodos* en las páginas de B-61 a B65 de la Guía del estudiante y describa brevemente los pasos, utilizando palabras y un diagrama de flujo. *Las respuestas de los alumnos serán variadas. El diagrama de flujo de un estudiante puede ver los diagramas de flujo en las páginas B-73 y B-74.*

## Diagrama de flujo del laboratorio 5



## Diagrama de flujo del laboratorio 5 (continuación)



Mientras los tubos P- y P+ se incuban en el paso 12, haga que los alumnos comenten las preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE* y que registren sus respuestas de forma individual. Pida a los alumnos que compartan sus respuestas y razonamiento para cada pregunta con la clase.

Posibles respuestas para las preguntas de *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-? *El cultivo de bacterias P+ se mezcla con los plásmidos recombinantes, mientras que el cultivo de bacterias P- no se mezcla con los plásmidos recombinantes. El propósito del cultivo de bacterias P- es asegurarse de que las células y las condiciones de crecimiento funcionen como se esperaba. El cultivo de bacterias P- debe crecer bien en el caldo Luria y debe morir cuando se expone al antibiótico ampicilina.*
- ¿Por qué las células necesitan tiempo para recuperarse después del choque térmico? *El choque implica que el calor pone a las bacterias bajo estrés. Dejar que las bacterias se asienten sin someterlas a nada más les da tiempo a las células para volver a su estado habitual. Las bacterias necesitan tiempo para comenzar a producir proteínas como AmpR.*
- ¿Por qué se incuban las células a 37 °C? *Las bacterias están adaptadas para crecer dentro del cuerpo humano, el cual mantiene esa temperatura.*
- Usó una técnica aséptica en este laboratorio. ¿Por qué esto es importante? *La técnica aséptica puede evitar la transferencia de bacterias del experimento al medioambiente y del medioambiente al experimento.*



Al final del laboratorio, recuerde a los alumnos que coloquen todos los materiales que entren en contacto con células de *E. coli* en la bolsa de residuos con riesgo biológico etiquetada.

### SESIÓN 3

**IDEAS CLAVE:** Las células bacterianas transformadas con el plásmido pARA-R se identifican mediante un proceso de selección que utiliza las secuencias que se han manipulado en el plásmido.



#### Haga que los alumnos revisen los resultados del Laboratorio 5. (10 minutos)

Haga que los alumnos retiren sus placas de las incubadoras y registren sus resultados en sus cuadernos. Si planea llevar a cabo el Laboratorio 6, guarde algunas placas que tengan colonias rojas o rosadas brillantes, y haga que los alumnos coloquen las placas restantes en una bolsa de residuos con riesgo biológico.

### Demuestre cómo establecer un cultivo en suspensión para las bacterias transformadas, como preparación para el Capítulo 6. (5 minutos)

Siga las instrucciones detalladas en la sección **Preparación** (*Cultivar bacterias para la purificación de proteínas*, página E-6 de esta guía). Eliminará algunas colonias celulares transformadas de las placas y las colocará en un cultivo en suspensión en un agitador. Estas células y los plásmidos pARA-R que contienen se multiplicarán en los próximos días.

### Revise la transcripción, la traducción y la relación entre genes, proteínas y rasgos. (10 minutos)



**ESTRATEGIA:** Revisar el conocimiento previo importante ayuda a los alumnos a aplicar lo que han aprendido previamente.

Use esta revisión para abordar las brechas en el conocimiento de los alumnos, según lo determinado por sus respuestas a las preguntas 2 y 3 *¿Qué sabes ya?* Consulte la **Figura 5.2** en la página B-56 de la Guía del estudiante durante su revisión.

### Pida a los alumnos que analicen las Preguntas del Capítulo 5 en grupos pequeños y que registren sus respuestas de forma individual. (10 minutos)

Haga que los alumnos reflexionen sobre su comprensión del proceso de selección para identificar las células bacterianas transformadas con el plásmido pARA-R y la expresión génica respondiendo las *Preguntas del Capítulo 5*.

### Dirija un debate a partir de las respuestas de los alumnos. (10 minutos)

Evalúe la comprensión de los alumnos del proceso de selección para identificar células bacterianas transformadas con el plásmido pARA-R y la expresión génica mediante la revisión de sus respuestas a las *Preguntas del Capítulo 5*.

Posibles respuestas a las *Preguntas del Capítulo 5*:

1. Mire los resultados de su transformación. *¿Sus resultados reales coinciden con los resultados pronosticados? Si no, ¿qué diferencias ve y cuáles son algunas explicaciones para estas diferencias? Las respuestas variarán. Si se producen resultados inesperados, ayude a los alumnos a pensar en lo que podría haber sucedido. Hay muchos procedimientos en los que podría haber ocurrido un error que podría afectar los resultados.*
2. *¿Cuántas colonias rojas se presentaron en su placa LB/amp/ara? Las respuestas variarán. Todos los grupos deben obtener algunas colonias que expresen RFP, a menos que se haya cometido un error al realizar los procedimientos. Si un grupo no consigue colonias rojas, pero sí tienen colonias en la placa LB / amp / ara, discuta con toda la clase lo que podría haber sucedido. Los alumnos deben darse cuenta de que es posible que la bacteria que tenía el gen ampR absorbiera un plásmido pero que no fuera el plásmido pARA-R con el gen rfp.*

3. ¿Por qué aparecieron las colonias rojas solo en la placa LB/amp/ara y no en la placa LB/amp? *El gen rfp no puede expresarse a menos que la célula reciba arabinosa, ya que el operón de arabinosa solo activará el promotor genético rfp en presencia de arabinosa.*
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? *En ingeniería genética, el objetivo es producir muchos productos, como la insulina. Más copias del plásmido y su gen darán como resultado la producción de más producto dentro de la 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. *El gen rfp en el plásmido está compuesto de ADN, y el gen se copia en el ARN mensajero. Este proceso se llama transcripción. El ARN mensajero se utiliza para construir la proteína en el ribosoma al unirse para transferir moléculas de ARN que combinan codones y aminoácidos; los aminoácidos luego se unen para formar la proteína. Este proceso se llama traducción. La proteína puede contribuir a un rasgo, y en este caso la RFP hace que las células se vuelvan rojas.*
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? *La estructura y el código del ADN, y la maquinaria celular que lleva a cabo la transcripción y la traducción, son los mismos en todos los organismos vivos.*
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? *Solo bacterias que se transformaron con un plásmido que tenía el gen rfp, el gen ampR y el activador AraC (que activa el promotor para el gen rfp en presencia de arabinosa), puede crecer en la placa LB / amp / ara y producir la proteína fluorescente roja. De los posibles plásmidos que podrían formarse en el procedimiento de ligación, el plásmido pARA-R es el único plásmido que tiene todas estas secuencias. Es posible que desee revisar los posibles plásmidos con los alumnos (que se muestran en la página B-34 de esta guía y están disponibles en el sitio web del programa como una presentación de diapositivas).*

**ESTRATEGIA:** Mientras dirige el debate, aplique las siguientes prácticas:

- Dé a los alumnos tiempo para evaluar las respuestas de los demás.
- Pida aclaraciones.
- Pida una explicación.
- Replantee o reformule.
- Pida un ejemplo.
- Pida evidencia.
- Proporcione ejemplos y contraejemplos.
- Pida a los alumnos que aporten una explicación.
- Pida a los alumnos que evalúen una respuesta.





C

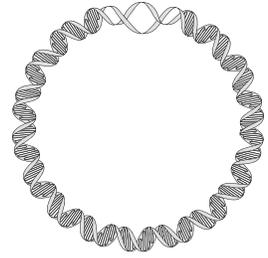
**AMGEN<sup>®</sup> Biotech Experience**  

---

**Scientific Discovery for the Classroom**

**AMGEN<sup>®</sup> Foundation**





## CAPÍTULO 2A

### ¿CÓMO SE COMIENZA A CLONAR UN GEN?



# DESCRIPCIÓN GENERAL

---

En este capítulo, los alumnos aprenden sobre dos herramientas biológicas esenciales utilizadas en ingeniería genética: plásmidos y enzimas de restricción. Los alumnos llevan a cabo una actividad en papel en la que determinan qué enzima de restricción se debe usar para crear un nuevo plásmido recombinante. Los alumnos realizan una actividad de laboratorio, Laboratorio 2A, en la que usan enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III para digerir el plásmido pARA-R. En la preparación del laboratorio, los alumnos describen los fragmentos de ADN que resultarán del protocolo del laboratorio.

## SUPUESTOS DEL CONOCIMIENTO PREVIO

Los estudiantes ya deben saber lo siguiente:

- El ADN es una molécula bicatenaria, y cada cadena de ADN está formada por subunidades unidas covalentemente llamadas nucleótidos.
- Un nucleótido está formado por un azúcar, un grupo fosfato y una base nitrogenada. Hay cuatro bases nitrogenadas diferentes: citosina, guanina, adenina y timina.
- Los nucleótidos están unidos entre sí por un esqueleto de azúcar-fosfato; las bases nitrogenadas sobresalen de este esqueleto.
- Las dos cadenas de ADN están conectadas por enlaces de hidrógeno entre bases nitrogenadas adyacentes, que se denominan pares de bases; la citosina siempre se combina con guanina, y la adenina siempre se combina con timina.
- El proceso de decodificación del ADN tiene dos pasos: un paso de transcripción que transfiere la información codificada en el ADN al ARN mensajero, y un paso de traducción en el que la información transportada por el ARN mensajero se usa para producir proteínas.

## OBJETIVOS DE APRENDIZAJE

Al final de este capítulo, los estudiantes podrán 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

## RESULTADOS EVALUADOS

- Evalúe la capacidad de cada alumno para describir las características del plásmido revisando sus respuestas a la pregunta 2 en *Preguntas de actividad* (página C-14 de la Guía del estudiante) y a las preguntas 1, 3 y 5 en *Preguntas del Capítulo 2A* (página C-19 de la Guía del estudiante).

- Evalúe la capacidad de cada estudiante para explicar cómo se usan los plásmidos para clonar un gen revisando sus respuestas a la pregunta 4 en *Preguntas del Capítulo 2A* (página C-19 de la Guía del estudiante).
- Evalúe la capacidad de cada estudiante para describir la función de las enzimas de restricción revisando sus respuestas a la pregunta 2 en *Preguntas del Capítulo 2A* (página C-19 de la Guía del estudiante).
- Evalúe la capacidad de cada estudiante para explicar cómo usar las enzimas de restricción para crear un plásmido recombinante revisando sus respuestas a las preguntas 1 y 3 en *Preguntas de la actividad* (página C-14 de la Guía del estudiante).

## SECUENCIA DE ACTIVIDADES SUGERIDA

### SESIÓN 1

- Revise la **Introducción** y *los Objetivos del Capítulo 2A* con los alumnos. (2 minutos)
- Pida a los estudiantes que contesten las preguntas *¿Qué sabes ya?* y que compartan sus respuestas. (5 minutos)
- Presentar y debatir **Su desafío**. (3 minutos)
- Haga que los alumnos lean **Comenzar a clonar un gen** y **Producir Proteínas Terapéuticas Humanas en Bacterias** y que respondan las preguntas de **CONSIDERAR** (20 minutos)
- Dirija un debate sobre las respuestas de los alumnos a las preguntas de **CONSIDERAR** de **Comenzar a clonar un gen**. (10 minutos)
- Presente la secuencia del laboratorio ABE que seguirá la clase. (5 minutos)

### SESIÓN 2 (OPCIONAL)

- Haga que los alumnos completen una de las tres actividades opcionales: (1) Llevar a cabo una investigación en Internet sobre un producto farmacéutico realizado mediante un proceso recombinante, (2) llevar a cabo una investigación en Internet sobre un tema bioético relacionado con la ingeniería genética y luego debatir sobre el tema o escribir un artículo de opinión o publicación de blog, o (3) extraer ADN. (45 minutos)

### SESIÓN 3

- Haga que los alumnos realicen **Clonar ese gen** y discutan la pregunta de **DETÉNGASE Y PIENSE** a medida que trabajan. (25 minutos)
- Pida a los alumnos que respondan las *Preguntas de la actividad* en grupos pequeños y que registren sus respuestas de forma individual. (10 minutos)
- Dirija un debate sobre las respuestas de los alumnos a todas las preguntas. (10 minutos)

## SESIÓN 4

- Haga que los alumnos completen el Laboratorio 2A. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y de *DETÉNGASE Y PIENSE* y que expliquen su razonamiento. (25 minutos)
- Pida a los alumnos que comenten las *Preguntas del Capítulo 2A* en grupos pequeños y que registren sus respuestas de forma individual. (10 minutos)
- Discuta las respuestas de los estudiantes como una clase. (10 minutos)

## PREPARACIÓN

Antes de comenzar, debe familiarizarse con los procedimientos de laboratorio en cada capítulo, la preparación requerida y los materiales que necesitará. Las instrucciones suponen que proporcionará materiales para 12 grupos de 2 o 3 alumnos. Multiplique las cantidades según sea necesario en función de la cantidad de alumnos y el número de clases que imparte.

**TÉCNICA DE LABORATORIO:** Con excepción del agua destilada, todos los reactivos utilizados en el Capítulo 2A deben almacenarse en un congelador hasta que esté listo para prepararlos para los alumnos.



## FOTOCOPIE LOS FOLLETOS Y REÚNA LOS MATERIALES PARA EL PROCEDIMIENTO CLONE ESE GEN

Se necesitan dos folletos para cada par de alumnos: **Diagrama de plásmido (RM 2)** y **Secuencia de ADN humano (RM 3)**. El Master reproducible (RM) para el folleto se encuentra al final de esta guía. Consiga un par de tijeras y un rollo de cinta adhesiva para cada par. Los alumnos usarán estos materiales para construir un modelo en papel de un plásmido recombinante que contenga un gen de insulina.

## ALÍCUOTAS DE REACTIVOS PARA EL LABORATORIO 2A

Los reactivos se pueden dividir en alícuotas hasta varios días antes del Laboratorio 2A.

1. Saque los siguientes reactivos del congelador y permita que se descongelen durante 15 minutos:
  - Tampón de restricción 2.5x (2.5xB)
  - plásmido pARA-R (RP)
  - Enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III (RE)
2. Etiquete dos tubos de microcentrífuga de la siguiente manera:
  - 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados con "2.5xB"
  - 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados con "RP"
  - 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados con "RE"
  - 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados con "dH<sub>2</sub>O"

3. Agite en vórtice y gire 2.5xB y RE antes de dividir en alícuotas los tubos para los grupos de alumnos. Si no tiene un vórtice, mueva el tubo varias veces para mezclar y luego gire hacia abajo en la microcentrífuga.
4. Pipetee los reactivos en los tubos de microcentrífuga de la siguiente manera:
  - 12.0 µl de tampón de restricción en los tubos marcados con "2.5xB"
  - 10.0 µl de la solución de plásmido pARA en los tubos marcados con "RP"
  - 3.0 µl de RE en los tubos marcados con "RE"
  - 1,000.0 µl de dH<sub>2</sub>O en los tubos marcados con "dH<sub>2</sub>O"
5. Después de la división en alícuotas, almacene los reactivos en el refrigerador hasta el comienzo del período de clase en el que se utilizarán.

## PREPARAR Y CALIBRAR EL BAÑO MARÍA PARA EL LABORATORIO 2A

El día anterior al Laboratorio 2A, prepare y calibre el baño maría a 37 °C para garantizar que la temperatura sea correcta para la incubación de las digestiones de restricción de los alumnos. Es importante que la temperatura no supere los 37 °C, ya que esto conducirá a la desnaturalización de la enzima; equívóquese hacia abajo si es necesario. Asegúrese de usar agua destilada en el baño maría.

1. Reúna los siguientes materiales:
  - Baño maría
  - Termómetro
  - Gradilla flotante para tubos de microcentrífuga
  - Temporizador
2. Coloque el baño maría en una ubicación central para que todos los grupos puedan compartirlo.
3. Llene el baño maría con agua destilada y coloque el termómetro dentro de este. Caliente el agua a 37 °C, manteniendo el baño cubierto para reducir la evaporación.
4. Coloque la gradilla flotante para tubos de microcentrífuga (para sostener los tubos en el baño maría) y el temporizador en la mesa al lado del baño maría.
5. Si las clases realizarán el Laboratorio 5A, deje el baño maría preparado y calibre a 42 °C el día anterior al laboratorio. (Asegúrese de que haya suficiente agua en el baño y que el baño esté cubierto para reducir la evaporación).

## REÚNA LOS MATERIALES PARA EL LABORATORIO 2A

Reúna materiales en el día del laboratorio. Después de preparar las gradillas con los reactivos, asegúrese de guardarlos en el refrigerador hasta que los alumnos estén listos para usarlos.

1. Prepare 12 juegos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:
  - Gradilla de plástico para tubos de microcentrífuga que contengan los siguientes reactivos:
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de 2.5xB
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de plásmido pARA-R (RP)
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de RE
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de dH<sub>2</sub>O
  - Micropipeta P-20
  - Caja de puntas de pipetas desechables
  - 2 tubos de microcentrífuga vacíos de 1.5 ml
  - Marcador permanente
  - Contenedor de residuos para puntas y tubos de microcentrífuga usados (necesitará 1 contenedor por cada 2 grupos)
2. Coloque la microcentrífuga en una ubicación central para que todos los grupos puedan compartirla.

## ENSEÑANZA

### SESIÓN 1

**IDEAS CLAVE:** Los plásmidos son vectores ideales para usar en ingeniería genética porque pueden replicarse en la célula bacteriana, tienen una secuencia llamada promotor del gen que permite la transcripción y traducción de un gen cercano, llevan un gen de resistencia a los antibióticos que se puede usar como marcador seleccionable y se puede transferir a las bacterias mediante un proceso llamado conjugación. La creación de un plásmido recombinante que contiene ADN de otra especie se logra mediante la acción de enzimas de restricción. Las enzimas de restricción pueden cortar un gen de interés del ADN humano y pueden cortar el plásmido; las dos piezas de ADN se pueden unir. Algunas enzimas de restricción cortan de manera asimétrica el ADN en secuencias específicas, de modo que el extremo de una cadena sobresale del otro. Estos extremos se denominan “extremos adhesivos”.



Revise la **Introducción** y los **Objetivos del Capítulo 2A** con los alumnos. (2 minutos)

La **Introducción** explica el propósito principal de este capítulo, vinculándolo a la Introducción al programa. Los **Objetivos del Capítulo 2A** les dicen a los alumnos en qué deben enfocarse a aprender mientras trabajan en este capítulo. Explique a los alumnos qué evaluará en este capítulo y cuáles son sus expectativas en relación con el desempeño de los alumnos.

### Pida a los estudiantes que contesten las preguntas *¿Qué sabes ya?* y que compartan sus respuestas. (5 minutos)

Responder las preguntas en esta sección activa el conocimiento de los alumnos sobre el ADN y cómo se usan los plásmidos y las enzimas de restricción en la ingeniería genética, y revela las brechas que existen en su conocimiento. Haga que los alumnos respondan las preguntas en parejas y que anoten sus ideas para que pueda evaluar lo que saben y lo que no saben.

Posibles respuestas a las preguntas *¿Qué sabes ya?*:

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. El ADN es una molécula bicatenaria, y cada cadena está compuesta de nucleótidos. Existen cuatro nucleótidos diferentes, que se distinguen por una subparte llamada base. Las bases son citosina, guanina, adenina y timina. Las dos cadenas de ADN están conectadas por enlaces de hidrógeno entre bases adyacentes, que se denominan pares de bases. En los pares de bases, la citosina siempre se combina con guanina, y la adenina siempre se combina con timina. Las cadenas dobles y los enlaces de hidrógeno débiles entre pares de bases aseguran que el ADN se pueda desenrollar y copiar. Los cuatro nucleótidos diferentes permiten crear secuencias que codifican las estructuras de las proteínas.*
2. *Todos los organismos vivos contienen ADN. ¿De qué manera es igual el ADN de los diferentes organismos y de qué manera varía? Todo el ADN tiene la misma estructura y utiliza el mismo código y los mismos procesos de transcripción y traducción. Entre los diferentes organismos, las secuencias de ADN variarán porque los organismos producen diferentes proteínas.*
3. *Aplicando lo que sabe sobre los genes y cómo se expresan, explique por qué es posible que una célula bacteriana produzca una proteína humana a partir de las instrucciones codificadas en un gen humano. La célula bacteriana puede crear una proteína humana a partir de un gen humano debido a que el ADN en todos los organismos usa el mismo código y los mismos procesos de transcripción y traducción.*
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? Las enzimas de restricción pueden cortar un gen humano y pueden cortar un plásmido, y estas dos piezas se pueden unir para formar un plásmido recombinante que se inserta en las bacterias.*

### Presentar y debatir **Su desafío**. (3 minutos)

Haga que los alumnos lean **Su desafío** y comenten qué harán en estos laboratorios.

**Haga que los alumnos lean *Comenzar a clonar un gen y Producir Proteínas Terapéuticas Humanas en Bacterias* y que respondan las preguntas de *CONSIDERAR* (20 minutos)**

En estas lecturas, los alumnos aprenden por qué los plásmidos son una herramienta ideal para insertar un gen humano en las bacterias y cómo se usan las enzimas de restricción para crear un plásmido recombinante. Haga que los alumnos anoten las respuestas de las preguntas de *CONSIDERAR* en sus cuadernos. Recuerde a los alumnos que usen el *Glosario* para buscar términos científicos si necesitan ayuda para entender la lectura.

**Dirija un debate sobre las respuestas a las preguntas de *CONSIDERAR* de *Comenzar a clonar un gen*. (10 minutos)**

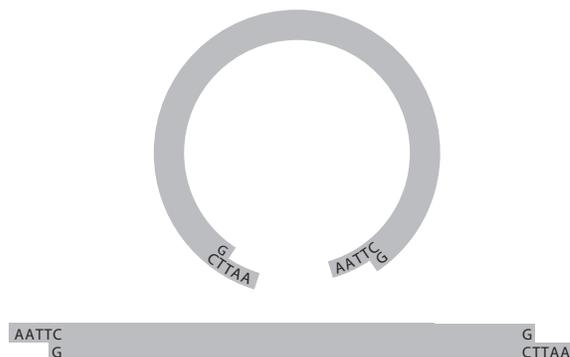
Evalúe el conocimiento de los alumnos sobre el ADN y cómo se utilizan los plásmidos y las enzimas de restricción en la ingeniería genética al revisar las respuestas de los alumnos a las preguntas de *CONSIDERAR*.

Posibles respuestas a las preguntas de *CONSIDERAR*:

- 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. *Si algunas bacterias transportan un plásmido con un gen de resistencia a los antibióticos, sobrevivirán cuando se expongan al antibiótico. Esto les da una ventaja selectiva sobre las bacterias que no llevan ese plásmido; aquellas bacterias sin el plásmido morirán cuando se expongan al antibiótico.*
- ¿Cómo las bacterias que llevan una enzima de restricción evitan cortar su propio ADN? *Las bacterias podrían tener una forma de proteger su propio ADN en secuencias donde podría ser cortada por la enzima de restricción, o su ADN podría no tener la secuencia cortada por la enzima de restricción.*
- ¿Cuál es la secuencia del extremo adhesivo que se produce cuando se corta el ADN con *BamHI*? ¿Con *HindIII*? *El extremo sobresaliente para BamHI es GATC. El extremo sobresaliente para HindIII es AGCT.*



- Los científicos pueden modificar a los plásmidos para tener un solo sitio de enzimas de restricción. Imagina que tienes 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. *Hay dos formas posibles de representar un plásmido que se ha cortado con EcoRI:*



Usaría la enzima de restricción *EcoRI* para cortar el gen de la planta. Los extremos del gen pueden alinearse con los extremos del plásmido.



**ESTRATEGIA:** Los dibujos de los alumnos pueden variar y es posible que desee comparar diferentes representaciones. Debido a que un plásmido es un objeto tridimensional, los alumnos pueden tener problemas para visualizar un cambio en la estructura, como un corte. Por ejemplo, en la segunda representación del plásmido cortado, el extremo se voltea y, por lo tanto, también lo hace la secuencia. Si es necesario, haga modelos de papel para el plásmido y haga que los alumnos realicen el corte en el modelo.



**ESTRATEGIA:** Mientras dirige el debate, implemente las siguientes prácticas:

- Dé a los alumnos tiempo para evaluar las respuestas de los demás.
- Pida aclaraciones.
- Pida una explicación.
- Replantee o reformule.
- Pida un ejemplo.
- Pida evidencia.
- Proporcione ejemplos y contraejemplos.
- Pida a los alumnos que aporten una explicación.
- Pida a los alumnos que evalúen una respuesta.

**Presente la secuencia del laboratorio ABE que seguirá la clase. (5 minutos)**

Repase la secuencia de laboratorio ABE elegida. Si bien los alumnos pueden no tener la oportunidad de completar todos los laboratorios, es importante que sepan cómo su trabajo encaja en el “panorama general” del desarrollo de organismos genéticamente modificados para fabricar productos que los seres humanos puedan usar. Revise la **Figura 2A.4** (página C-11 de la Guía del estudiante), que muestra la producción de una proteína terapéutica humana.

Señale qué partes del proceso completarán en su secuencia de laboratorio y describa los desafíos específicos de los alumnos (ver **Tabla OV.1** en la página OV-3).

### **ANTECEDENTES CIENTÍFICOS: ¿POR QUÉ HAY PROMOTORES BACTERIANOS EN LOS PLÁSMIDOS?**

Todos los genes tienen sus propios promotores, entonces, ¿por qué incluir un promotor al construir un vector plasmídico? El mecanismo de transcripción génica es el mismo en todos los organismos: la ARN polimerasa se une a un promotor específico y copia la secuencia de ADN del gen en el ARN mensajero. Sin embargo, la secuencia de ADN de los promotores y la estructura de las ARN polimerasas pueden variar; así, la ARN polimerasa bacteriana no reconocerá ni se unirá a un promotor humano. Quizás lo más importante, dado que muchos genes eucariotas contienen intrones y exones, muchos genes humanos, como el de la insulina, que han sido clonados no se eliminan directamente del ADN genómico; en cambio, el ADN se sintetiza a partir del ARNm del gen de interés por la transcriptasa inversa. Esta es la copia de ADN (ADNc) que luego se clona. Estos ADNc carecen de un promotor y, por lo tanto, deben insertarse en el vector plasmídico cerca de un promotor. Para facilitar la comprensión de la clonación del gen de la insulina, el uso de ADNc se ha omitido en la lectura. Es posible que desee elaborar este proceso con sus alumnos.

## **SESIÓN 2 (OPCIONAL)**

**IDEAS CLAVE:** Las decisiones sociales sobre la implementación de los esfuerzos relacionados con la ciencia y la tecnología deben basarse tanto en el conocimiento científico como en la economía, las políticas, la política y la ética. El ADN tiene la misma estructura y función sin importar de qué organismo provenga.



Haga que los alumnos completen una de las tres actividades opcionales:

(1) llevar a cabo una investigación en Internet sobre un producto farmacéutico elaborado mediante un proceso recombinante, (2) llevar a cabo una investigación en Internet sobre un tema bioético relacionado con la ingeniería genética y luego debatir sobre el tema o escribir un artículo de opinión o publicación de blog, o (3) extraer ADN. (45 minutos)

Puede extender la introducción de los alumnos a la biotecnología haciéndolos participar en una o más de las actividades siguientes.

## **TERAPÉUTICA HUMANA AHORA Y EN EL FUTURO**

Asigne a los alumnos para trabajar individualmente o en equipos para aprender más sobre algunos de los productos recombinantes que se encuentran actualmente en investigación y desarrollo o en el mercado, ya sea en este país o en el extranjero, y que luego presenten lo más destacado de sus hallazgos al resto de la clase. Puede sugerir que investiguen qué productos recombinantes se usan, o podrían usarse en el futuro, para afecciones médicas comunes, por ejemplo:

- Anemia
- Asma
- Enfermedades autoinmunes, como el lupus o la enfermedad de Crohn
- Cáncer o los efectos secundarios de los tratamientos contra el cáncer, como los trasplantes de médula ósea y la quimioterapia
- Diabetes
- Insuficiencia renal

## CONSIDERACIONES BIOÉTICAS

Existen muchos problemas bioéticos potenciales relacionados con la ingeniería genética y la biofarmacéutica. Los alumnos pueden investigar uno de los siguientes temas y luego participar en un debate en clase o escribir un artículo de opinión o una entrada de blog:

- Insulina natural frente a la genéticamente modificada: Además de la insulina genéticamente modificada producida por bacterias, las personas con diabetes pueden ser tratadas con insulina extraída de vacas o cerdos. Si bien algunas personas pueden tener reacciones adversas a la insulina sintética modificada genéticamente y, por lo tanto, necesitan tomar un producto natural, otras simplemente prefieren usar productos naturales (en lugar de productos genéticamente modificados). ¿Deberían respetarse sus puntos de vista? ¿Se debe permitir que las personas con diabetes elijan?
- Seguridad del tratamiento frente al acceso al tratamiento: La invención de nuevas terapias, incluida la insulina genéticamente modificada, ha salvado innumerables vidas. Sin embargo, antes de que un medicamento o tratamiento pueda ponerse a disposición del público, debe someterse a una gran cantidad de pruebas para determinar su efectividad y garantizar que el producto sea seguro para el uso en humanos. Estos ensayos clínicos pueden tardar muchos años en completarse, tiempo que los pacientes con enfermedades terminales a menudo no tienen. Los pacientes que padecen enfermedades potencialmente mortales han defendido durante mucho tiempo el acceso a medicamentos que aún no han completado todo el proceso de aprobación. Argumentan que deberían poder recibir medicamentos no aprobados si han agotado todas las demás opciones de tratamiento. ¿Deberían concederse sus deseos? ¿Es más importante permitir que los pacientes tengan acceso a medicamentos o asegurarse de que los productos sean completamente seguros para uso humano primero?



**RECURSOS:** En el sitio web del programa se incluyen enlaces a noticias sobre estos temas.

## EXTRACCIÓN DE ADN

En esencia, este programa trata sobre el ADN. El ADN codifica las proteínas, que a su vez dan como resultado los rasgos de los organismos, ya sea que esos rasgos sean fluorescencia, producción reducida de insulina o cabello castaño. Para ayudar a los alumnos a comprender que todo el ADN tiene la misma estructura,

haga que realicen un laboratorio de extracción de ADN. Aislar el ADN de diferentes organismos y comparar sus propiedades (como la viscosidad) reforzará la idea de que no importa cuál sea la fuente, todo el ADN se ve similar y tiene propiedades similares.

**RECURSOS:** Se proporcionan enlaces a posibles laboratorios en el sitio web del programa.



### SESIÓN 3

**IDEAS CLAVE:** Al crear un plásmido recombinante, es importante examinar las secuencias del ADN plasmídico y del ADN humano que contiene el gen de interés. Es necesario encontrar una enzima de restricción única que corte el ADN plasmídico en un solo sitio y que corte cerca de los dos extremos del gen humano. Los “extremos adhesivos” idénticos creados por los cortes de una única enzima de restricción hacen posible unir las diferentes secuencias de ADN en un plásmido recombinante.



Haga que los alumnos lleven a cabo el procedimiento *Clone ese gen*. (15 minutos)

Los alumnos ven secuencias genéticas de ADN plasmídico y un gen humano diana cromosómico (insulina) y eligen la enzima de restricción apropiada para usar para crear un modelo en papel de un plásmido recombinante. Haga que los alumnos completen esta actividad en parejas. Tenga en cuenta que el gen de insulina que se muestra en **RM 3** es un modelo y no es la secuencia completa de pares de bases en el gen de la insulina humana.

**ESTRATEGIA:** Si varias parejas están teniendo problemas con la misma parte de la actividad, pare la clase y revise las instrucciones para esa parte. Es posible que desee que los alumnos que hayan completado con éxito esa parte compartan lo que han hecho.



Haga que los alumnos comenten la pregunta de **DETÉNGASE Y PIENSE** y de *Preguntas de la actividad* en pequeños grupos y que registren sus respuestas de forma individual. (15 minutos)

Durante la actividad, los alumnos deben debatir las preguntas en sus grupos y registrar sus respuestas de forma individual. Luego, pida a los alumnos que compartan sus respuestas y razonamiento para cada pregunta con la clase. Circule para realizar un seguimiento de los comentarios y brindar apoyo.

Posible respuesta para la pregunta **DETÉNGASE Y PIENSE**:

¿Por qué es importante usar la misma enzima o enzimas para cortar tanto el plásmido como el gen de la insulina del ADN humano? *Para que tengan secuencias complementarias de bases que puedan coincidir y permitir que los dos segmentos de ADN se unan.*



Posibles respuestas a las *Preguntas de las actividades*:

1. ¿Qué enzima de restricción eligió? ¿Por qué eligió esa? *La enzima de restricción EcoRI es la única enzima que corta el plásmido una vez sin alterar un gen.*
2. ¿Dónde insertaría el gen de la insulina y por qué? *El gen debe insertarse cerca de la secuencia promotora, ya que esta secuencia permitirá que el gen se transcriba en la célula bacteriana.*
3. ¿Qué antibiótico usaría para determinar si se tomó el ADN recombinante? *Se puede usar ampicilina o kanamicina, ya que ambos genes son parte del plásmido recombinante final.*

### Dirija un debate a partir de las respuestas de los alumnos. (15 minutos)

Haga que los alumnos compartan sus respuestas y su razonamiento para *DETÉNGASE Y PIENSE* y *Preguntas de la actividad* con la clase A medida que los alumnos compartan sus respuestas, evalúe el conocimiento de los alumnos sobre cómo se utilizan las enzimas de restricción en la ingeniería genética.

## ANTECEDENTES CIENTÍFICOS: ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

A principios de la década de 1970, Hamilton Smith y Daniel Nathans pudieron purificar un “agente” inmune desconocido que se encontró en las bacterias. Este agente molecular protegió a las bacterias al restringir el crecimiento de los virus bacteriófagos. Se descubrió que el agente era una enzima que podía cortar el ADN viral en fragmentos a medida que se inyectaba en su célula. Smith, Nathans y Werner Arber recibieron el Premio Nobel por su descubrimiento y caracterización de estas importantes moléculas.

Existen varias clases de enzimas de restricción, pero las que han sido más útiles son las que reconocen y cortan consistentemente una secuencia de nucleótidos específica. Algunas enzimas de restricción reconocen una secuencia de cuatro bases; otras reconocen una secuencia de cinco o seis bases. Los sitios de restricción son palíndromos. Este es un concepto importante que puede enfatizar a sus alumnos, tal vez utilizando ejemplos como “radar” y “Madam, I'm Adam”.

Algunas enzimas de restricción harán un “corte contundente”, sin dejar bases sobresalientes. Otras enzimas, incluidas *BamHI* y *HindIII*, dejarán bases sobresalientes, creando así extremos adhesivos. Estas enzimas son particularmente útiles ya que los extremos adhesivos hacen que la recombinación de fragmentos de ADN sea un procedimiento bastante simple. Lo “adhesivo” es el resultado de la extraordinaria afinidad de los nucleótidos complementarios para formar enlaces de hidrógeno entre ellos.

La nomenclatura para las enzimas de restricción es bastante sencilla. La primera letra del nombre de la enzima se deriva del género de bacteria

de la cual se aisló la enzima. Las siguientes dos letras provienen de las dos primeras letras del epíteto específico de la bacteria. A menudo hay una cuarta letra después de las tres primeras, que representa la cepa o el tipo de bacteria. Debido a que algunas cepas de bacterias producen varias enzimas de restricción, un número romano identifica el orden en que se aislaron las enzimas. **Tabla 2A.1** en la página C-8 de la Guía del estudiante se muestran algunos ejemplos.

## SESIÓN 4

**IDEAS CLAVE:** Los científicos que trabajan en ingeniería genética utilizan herramientas muy específicas, incluidas herramientas hechas por personas y herramientas biológicas.



Haga que los alumnos completen el Laboratorio 2A. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y de **DETÉNGASE Y PIENSE** y que expliquen su razonamiento. (25 minutos)

Los alumnos usan enzimas de restricción para digerir (cortar) un plásmido. Explique a los alumnos que la digestión de la enzima de restricción creará los fragmentos que necesitan para verificar que tienen el plásmido recombinante correcto que se insertará en las bacterias.

**NOTAS** Aquí hay algunas notas importantes para la incubación en baño maría en este laboratorio:

- Al final del laboratorio, cargue la gradilla flotante con los tubos de todos los grupos sobre la mesa y luego colóquela en el baño maría para una incubación de 15 minutos.
- Dejar el digerido en el baño maría durante un par de horas no interferirá con la restricción, pero las muestras no deben dejarse en el baño maría durante más de dos horas, ya que *BamHI* puede comenzar a cortar el ADN de manera aleatoria.
- Después de la incubación de 15 minutos, asegúrese de colocar lo digerido en el congelador hasta que sea necesario para el próximo laboratorio.

Los alumnos comentan la primera pregunta de **DETÉNGASE Y PIENSE** y las preguntas de *Antes del laboratorio* en sus grupos y registran sus respuestas de forma individual. Haga que los alumnos compartan sus respuestas con la clase.

Posible respuesta para la primera pregunta de **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? *Debido a que las secuencias de los extremos adhesivos son diferentes (uno tiene la secuencia BamHI y el otro tiene la secuencia HindIII), los dos extremos no pueden aparearse. La única forma de reformar el círculo es con la inserción del gen rfp que tiene los extremos BamHI y HindIII.*

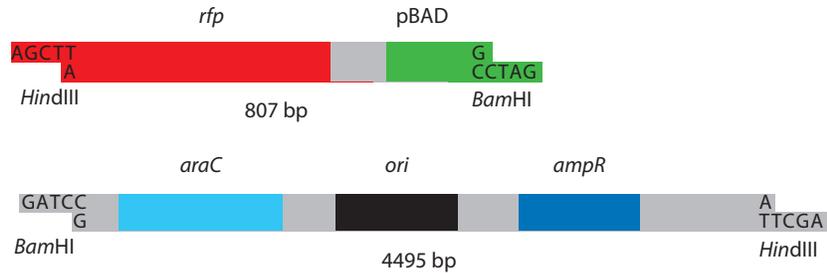


Posibles respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio*:

1. Revise la **Figura 2A.3**. Si pARA se digiere con *Bam*HI y *Hind*III, ¿qué fragmentos se producen? Registre la secuencia de nucleótidos de los extremos adhesivos y la longitud de cada fragmento (pb), e indique los genes y otras secuencias importantes presentes en cada fragmento.

Las secuencias son las siguientes:

**Fragmentos de digestión de pARA:**



2. Para crear un plásmido que pueda producir RFP en bacterias, ¿qué componentes se necesitan en el plásmido? *El plásmido necesita un origen de replicación, un promotor, el gen de interés (rfp), y un gen de resistencia a los antibióticos que permite la identificación de las bacterias que han tomado el plásmido.*
3. Las bacterias pueden ser eliminadas 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 ineficiente (como se analiza en la lectura), ¿por qué un marcador seleccionable es crucial en la clonación de un gen en las bacterias? *Desea saber qué células bacterianas tienen el plásmido y pueden producir la proteína que está purificando. El marcador seleccionable le permitirá matar las bacterias que no tienen el plásmido con el gen de interés.*
4. Lea la sección de *Métodos* en las páginas de C-17 y C-18 de la Guía del estudiante y describa brevemente los pasos, utilizando palabras y un diagrama de flujo. *Las respuestas de los alumnos serán variadas. El diagrama de flujo de un estudiante podría parecerse al de la página siguiente.*

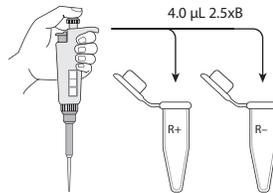
## Diagrama de flujo del laboratorio 2A



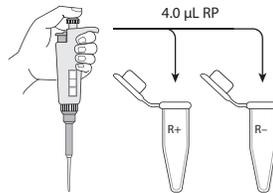
Verifique los reactivos  
(2.5xB, RP, RE, dH<sub>2</sub>O)

Etiquete los 2  
tubos R+ y R-

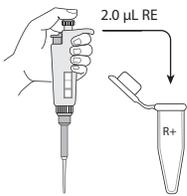
Revise la  
Tabla 2A.2



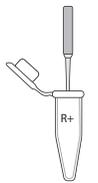
Pipetee 4.0 µL de 2.5xB en  
los tubos R+ y R-



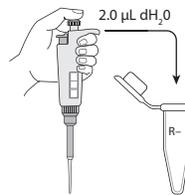
Pipetee 4.0 µL de RP  
en los tubos R+ y R-



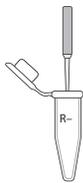
Pipetee 2.0 µL de RE  
en el tubo R+



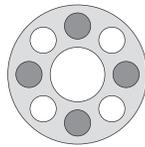
Utilice la pipeta para  
mezclar los reactivos  
en el tubo R+



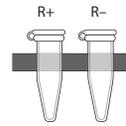
Pipetee 2.0 µL de H<sub>2</sub>O  
en el tubo R-



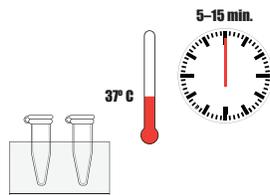
Utilice la pipeta para  
mezclar los reactivos  
en el tubo R-



Centrifugue los  
tubos R+ y R-



Coloque los tubos en la  
gradilla flotante para tubos  
de microcentrifuga



El profesor:  
Colocará los tubos R+ y R- en baño  
maría a 37 °C y los incubará de 5 a 15  
minutos



El profesor:  
Colocará los tubos R+ y R-  
en el congelador a -20 °C

Revise la sección *Métodos* brevemente con los alumnos antes de comenzar el laboratorio.



**TÉCNICA DE LABORATORIO: Revise el uso de las micropipetas con los alumnos.**

Durante el laboratorio, los alumnos deben debatir las preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE* en sus grupos y luego registrar sus respuestas de forma individual. Pida a los alumnos que compartan sus respuestas y razonamiento para cada pregunta con la clase.



Posibles respuestas a la segunda y tercera preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE*:

- En este paso, se le pide que prepare un tubo sin las enzimas de restricción, *BamHI* y *HindIII*. ¿Cuál es el propósito de este paso y por qué es importante? *El tubo sin las enzimas es un control. Podemos comparar un control con el tubo que tiene las enzimas para comparar el plásmido sin cortar con el plásmido cortado. Si por alguna razón las enzimas no funcionaron como se esperaba, el control lo indicará, ya que tanto el tubo de control como el tubo con las enzimas darán el mismo resultado cuando se examinen con electroforesis en gel.*
- ¿Por qué las enzimas funcionan mejor a 37 °C? ¿Por qué se deben colocar las enzimas en el congelador? *Las enzimas originalmente provenían de bacterias que están a la temperatura del cuerpo humano y están diseñadas para funcionar a esta temperatura. Colocar las enzimas en el congelador detendrá la reacción.*

En el paso 6, se indica a los grupos que coloquen sus dos tubos de microcentrífuga (R+ y R-) en la gradilla flotante para tubos de microcentrífuga cerca del baño maría. Cuando la gradilla esté llena, colóquela en el baño maría e incube durante 5 a 15 minutos. Una vez que se completó la incubación, coloque los cuatro tubos en el congelador a -20 °C para el Laboratorio 4A.

**Pida a los alumnos que comenten las Preguntas del Capítulo 2A en grupos pequeños y que registren sus respuestas de forma individual. Discuta las respuestas de los estudiantes como una clase. (20 minutos)**

Los alumnos reflexionan sobre los conceptos que aprendieron en este capítulo y demuestran que han comprendido el uso de plásmidos y enzimas de restricción para la clonación de genes al contestar las *Preguntas del Capítulo 2A*.

Posibles respuestas a las *Preguntas del Capítulo 2A*:

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. *Las características importantes de un vector plasmídico son (1) una secuencia para el inicio de la replicación del ADN, ori, que permite que el plásmido se replique en la bacteria; (2) una secuencia promotora para iniciar la transcripción del gen insertado; y (3) un gen que codifica una proteína para la resistencia a los antibióticos, lo que permite la identificación de bacterias que han captado el plásmido.*

2. ¿Qué papel tienen las enzimas de restricción en la naturaleza? *Protegen a las bacterias de la infección por virus bacteriófagos.*
3. Según su comprensión de la evolución, ¿por qué las bacterias retienen un gen que les da resistencia a los antibióticos? ¿Cómo es que la existencia de las bacterias con resistencia a los antibióticos afecta a la medicina hoy en día? *Las bacterias con el gen de resistencia a los antibióticos se reproducirán más porque tienen una ventaja selectiva sobre otras bacterias que no portan ese gen. Esta ventaja selectiva es una gran preocupación en medicina porque ahora existen cepas de bacterias que causan enfermedades que los antibióticos no pueden matar.*
4. Las bacterias, las anémonas de mar y los humanos parecen ser, en la superficie, organismos muy diferentes. Explique cómo se puede expresar un gen de los seres humanos o una anémona de mar en las bacterias para hacer un producto nunca antes hecho en bacterias. *El código de ADN y los procesos de transcripción y traducción son los mismos en todos los organismos vivos. Una vez que un gen humano o de anémona de mar se combina con un promotor bacteriano en un plásmido y las bacterias absorben el plásmido recombinante, la bacteria puede leer el código de ADN y producir la proteína.*
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 accidentalmente. (Pista: ¡Asegúrese de no eliminar uno de los tipos de bacterias que intenta clasificar!) *Las bacterias deben dividirse en dos lotes; un lote debe tratarse con kanamicina y el otro lote debe tratarse con ampicilina.*

**ESTRATEGIA:** Mientras dirige el debate, aplique las siguientes prácticas:

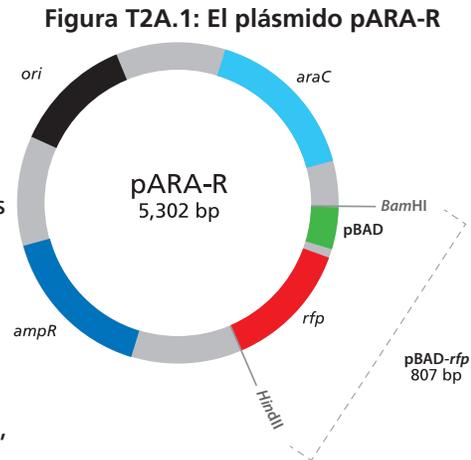
- Dé a los alumnos tiempo para evaluar las respuestas de los demás.
- Pida aclaraciones.
- Pida una explicación.
- Replantee o reformule.
- Pida un ejemplo.
- Pida evidencia.
- Proporcione ejemplos y contraejemplos.
- Pida a los alumnos que aporten una explicación.
- Pida a los alumnos que evalúen una respuesta.



## ANTECEDENTE CIENTÍFICO: LOS COMPONENTES DEL PLÁSMIDO pARA-R

El plásmido recombinante que se utiliza en este programa para clonar el gen *rfp* es el plásmido pARA-R (ver Figura T2A.1). Se han desarrollado muchos tipos diferentes de vectores plasmídicos para clonar genes. Todos tienen los componentes básicos necesarios para clonar y expresar genes en bacterias, incluida una secuencia para iniciar la replicación del ADN (el punto *ori*), un promotor para iniciar la

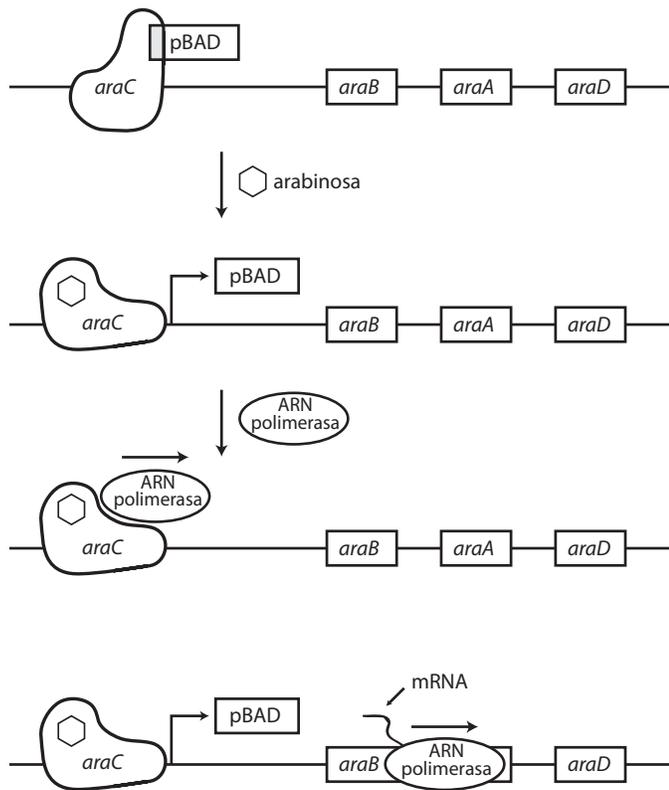
transcripción, un marcador seleccionable y un sitio o sitios de restricción cerca del promotor para insertar el gen de interés. El plásmido pARA-R se ha construido de manera que el gen se inserte utilizando *Bam*HI y *Hind*III. El uso de dos enzimas de restricción diferentes asegura que el gen *rfp* se insertará en una sola orientación, la apropiada para transcribir la cadena de sentido del ADN. Es posible que desee revisar la idea de las cadenas “de sentido” y “antisentido” con los alumnos.



El plásmido pARA-R se ha construido para incluir componentes del operón arabinosa, que permiten la expresión del gen *rfp* gen a ser regulado. Todos los organismos vivos, incluidas las bacterias, tienen la capacidad de regular la expresión de sus genes. El ejemplo más obvio de esta regulación se da en la diferenciación celular en organismos multicelulares. La mayoría de las células contienen el complemento completo de ADN, pero durante la diferenciación solo ciertos genes se expresan a medida que las células se convierten en células de la piel, los músculos o las raíces. Gran parte de esta regulación ocurre al nivel de iniciación de la transcripción. El inicio de la transcripción puede ser activado por proteínas llamadas activadores, o desactivado por proteínas llamadas represores. Si bien las bacterias no se diferencian, sí responden a las condiciones ambientales, como la presencia o ausencia de un azúcar, incluida la arabinosa.

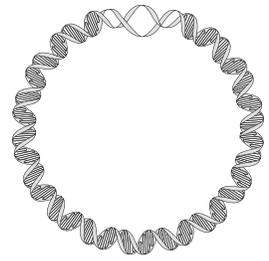
El operón arabinosa es un ejemplo clásico de regulación génica en bacterias (ver Figura T2A.2). El operón comprende tres genes, *araB*, *araA* y *araD*, que codifican las proteínas responsables del transporte y la descomposición de la arabinosa. También incluye un promotor y una secuencia 5' de ADN próximo al promotor, que se une a la proteína AraC. La proteína AraC regula la expresión de los genes de arabinosa permitiendo su transcripción en presencia de arabinosa o desactivando la expresión génica en su ausencia.

Figura T2A.2: El operón arabinosa



En ausencia de arabinosa, la proteína AraC bloquea la unión de la ARN polimerasa al promotor; por lo tanto, no puede iniciarse la transcripción, y los tres genes: *araB*, *araA* y *araD*, no se expresan. Cuando la arabinosa está presente en el medioambiente, el azúcar se une a la proteína AraC, lo que altera la forma del ADN de tal manera que la ARN polimerasa puede unirse al promotor y los genes *araB*, *araA* y *araD* se expresan. El plásmido pARA-R utilizado en este programa tiene el promotor pBAD y el gen *araC*, así como los genes resistentes a la ampicilina y la kanamicina. Los genes *araB*, *araA* y *araD* han sido eliminados y reemplazados por el gen *rfp*, poniendo el gen *rfp* bajo el control del promotor de arabinosa. Las colonias de bacterias que albergan este plásmido serán rojas en presencia de arabinosa y blancas en su ausencia.





## **CAPÍTULO 4A**

# **ASEGURARSE DE QUE SE CREÓ UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE**



# DESCRIPCIÓN GENERAL

---

Dado que se fabrican diferentes productos durante el proceso de ligación, los biólogos deben verificar que han creado el plásmido recombinante que necesitan, es decir, el que tiene el gen de interés y todos los componentes necesarios para que se produzca la proteína de interés. En este capítulo, los alumnos aprenden sobre la importancia de verificar su trabajo a medida que determinan si tienen el plásmido pARA-R que contiene tanto el gen *rfp* y el gen *ampR*.

## SUPUESTOS DEL CONOCIMIENTO PREVIO

Los estudiantes ya deben saber lo siguiente:

- El ADN es una molécula bicatenaria, y cada cadena de ADN está formada por subunidades unidas covalentemente llamadas nucleótidos.
- Un nucleótido está formado por un azúcar, un grupo fosfato y una base nitrogenada. Hay cuatro bases nitrogenadas diferentes: citosina, guanina, adenina y timina.
- Los nucleótidos están unidos entre sí por una estructura de azúcar-fosfato; las bases nitrogenadas sobresalen de esta estructura.
- Las dos cadenas de ADN están conectadas por enlaces de hidrógeno entre bases nitrogenadas adyacentes, que se denominan pares de bases; la citosina siempre se combina con guanina, y la adenina siempre se combina con timina.

## OBJETIVOS DE APRENDIZAJE

Al final de este capítulo, los estudiantes podrán hacer lo siguiente:

- Describa por qué es importante verificar los productos creados en el proceso de ingeniería genética.
- Predice la velocidad relativa de los fragmentos de restricción de ADN y los plásmidos a través de un gel durante la electroforesis en gel
- Separe e identifique los fragmentos de restricción de ADN y los plásmidos mediante electroforesis en gel

## RESULTADOS EVALUADOS

- Evalúe la capacidad de cada alumno para describir por qué es importante verificar los productos creados en el proceso de ingeniería genética al revisar sus respuestas a la pregunta 1 en las *Preguntas del Capítulo 4A* (página C-35 de la Guía del estudiante).
- Evalúe la capacidad de cada estudiante para predecir la distancia relativa recorrida por los fragmentos de restricción de ADN y los plásmidos a través de un gel revisando sus respuestas a la primera pregunta de *DETÉNGASE Y PIENSE* en el Laboratorio 4A (página C-32 de la Guía del estudiante).

- Evalúe la capacidad de cada estudiante para separar e identificar los fragmentos de restricción de ADN y los plásmidos mediante la electroforesis en gel al revisar sus respuestas a las preguntas 2–8 en las *Preguntas del Capítulo 4A* (página C-35 de la Guía del estudiante).

## SECUENCIA DE ACTIVIDADES SUGERIDA

### SESIÓN 1

- Revise la **Introducción** y los *Objetivos del Capítulo 4A* con los alumnos. (5 minutos)
- Pida a los estudiantes que contesten las preguntas *¿Qué sabes ya?* y que compartan sus respuestas. (10 minutos)
- Haga que los alumnos lean **¿Por qué necesita verificar?** y que contesten las preguntas de *CONSIDERAR*. (15 minutos)
- Dirija un debate sobre las respuestas de los alumnos a las preguntas de *CONSIDERAR* de **¿Por qué necesita verificar?** (5 minutos)
- Haga que los alumnos comiencen el Laboratorio 4A leyendo el párrafo introductorio y que luego revisen las preguntas de *Antes del laboratorio* en sus grupos. (10 minutos)

**NOTA:** Haga que los alumnos respondan las preguntas de *Antes del laboratorio* como tarea.

### SESIÓN 2

- Haga que los alumnos completen el Laboratorio 4A. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y las preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE* con la clase y que expliquen su razonamiento. (45 minutos)

### SESIÓN 3

- Pida a los alumnos que discutan las *Preguntas del Capítulo 4A* en grupos pequeños y que registren sus respuestas de forma individual. (20 minutos)
- Dirija un debate a partir de las respuestas de los alumnos. (25 minutos)

# PREPARACIÓN

---

Antes de comenzar, debe familiarizarse con los procedimientos de laboratorio en cada capítulo, la preparación requerida y los materiales que necesitará. Las instrucciones suponen que proporcionará materiales para 12 grupos de 2 o 3 alumnos. Multiplique las cantidades según sea necesario en función de la cantidad de alumnos y el número de clases que imparte.

## FOTOCOPIE LOS FOLLETOS PARA EL LABORATORIO 4A

Se necesita una copia del **Diagrama de escalera de ADN (RM 4A)** para cada estudiante. El Master reproducible (RM) para el folleto se encuentra al final de esta guía.

## PREPARE GELES DE AGAROSA PARA EL LABORATORIO 4A

**RECURSOS:** El video, *Preparación de un gel de agarosa* (disponible en el sitio web del programa) repasa el proceso de preparar y moldear un gel de agarosa como se describe a continuación.



**NOTA:** Los geles se pueden preparar con varios días de anticipación.

1. Prepare las bandejas para la electroforesis en gel:
  - a. Reúna los siguientes materiales:
    - 6 bandejas para electroforesis en gel
    - 12 peines de 10 pocillos
    - Opcional: cinta adhesiva
  - b. Prepare las bandejas para electroforesis en gel para el moldeado asegurando las compuertas en los extremos de cada bandeja en la posición “arriba” o colocando cinta adhesiva en los extremos de cada bandeja. Coloque un peine en cada bandeja antes de agregar la solución de agarosa.
2. Prepare la solución de agarosa:
  - a. Reúna los siguientes materiales:
    - 2 matraces graduados de 250 ml, uno etiquetado con “1x SB”
    - 12.5 ml de tampón de borato de sodio 20x (20x SB)
    - 237.5 ml de agua destilada o desionizada
    - 1.44 g de agarosa
    - Balanza de masa
    - Matraz de 500 ml etiquetado con “Gel”
    - Envoltura de plástico
    - Punta de pipeta desechable
    - Horno de microondas
    - Guantes resistentes al calor o pinzas

- 6 bolsas con cierre de tamaño sándwich o de un cuarto de galón
  - Contenedor de residuos para puntas y tubos de microcentrífuga usados
- b. Prepare 250 ml de SB 1x agregando 12.5 ml de SB 20x al matraz graduado de 250 ml etiquetado como "SB 1x", agregando agua destilada o desionizada hasta la marca de 250 ml, y mezcle.
  - c. Vierta 180 ml de SB 1x en el segundo matraz graduado de 250 ml.
  - d. Agregue 1.44 g de agarosa (ya medida en tubos cónicos, a menos que se indique lo contrario) al matraz de 500 ml etiquetado con "Gel". Agregue los 180 ml de SB 1x que se midieron previamente para obtener una solución de agarosa al 0.8 %.
  - e. Cubra la abertura del matraz de 500 ml con plástico para envolver. Use la punta de la pipeta para perforar un pequeño agujero en el plástico para envolver.
  - f. Coloque el matraz cubierto en un horno de microondas y caliente durante un minuto a máxima potencia. Con una mano con guante, agite suavemente el matraz. (De otro modo puede usarse una placa caliente para derretir la agarosa, pero necesitará usar un hervidor doble).



**SEGURIDAD:** Use guantes resistentes al calor o use pinzas para sostener el matraz.

- g. Continúe calentando en el horno de microondas el matraz durante intervalos de 5 a 15 segundos hasta que toda la agarosa se haya disuelto. Para verificar esto, sostenga el matraz hacia la luz y agite la solución. Busque con cuidado las "lentes" de cristales de agarosa suspendidos en el líquido. Si no hay a la vista, la agarosa está disuelta. Espere cinco minutos para que la agarosa se enfríe a aproximadamente 60 °C antes de continuar con el paso 3.



**TÉCNICA DE LABORATORIO:** Si la solución se enfría demasiado, la agarosa comienza a solidificarse nuevamente. Si esto sucede, simplemente recaliente la solución como se describe anteriormente.

3. Moldee los geles en las bandejas:
  - a. Cuando la solución de agarosa se haya enfriado hasta el punto de que pueda tocar de manera segura el fondo del matraz (aproximadamente 60 °C; esto tomará unos cinco minutos), vierta 25 a 30 ml de la solución de agarosa en cada bandeja de electroforesis. La solución debe cubrir unos 2 mm del peine.
  - b. Una vez que los geles se solidifiquen (lo que llevará alrededor de 30 minutos), extraiga los peines de cada gel. Tire de cada peine hacia afuera sin moverlo de un lado a otro; esto minimizará el daño a la pared frontal del pocillo.
  - c. Retire los geles de las bandejas de electroforesis en gel y almacénelos en bolsas con cierres individuales con una pequeña cantidad de SB 1x. Almacene en el refrigerador hasta que esté listo para usar. Asegúrese de mantenerlos planos y no sobre una superficie con textura, ya que las superficies con textura se grabarán en los geles y afectarán la forma en que las moléculas se mueven a través de ellos.

## ALÍCUOTAS DE REACTIVOS PARA EL LABORATORIO 4A

**NOTA:** Los reactivos se pueden dividir en alícuotas varios días antes del Laboratorio 4A.

1. Obtenga el colorante de carga que se ha almacenado a temperatura ambiente. Retire la escalera de ADN del congelador y deje que se descongele durante 15 minutos.

**NOTA:** El colorante de carga es el mismo que la Solución 2 que se usó en el Laboratorio 1.2; contiene naranja G, azul de bromofenol y xileno cianol.

2. Etiquete dos tubos de microcentrífuga de la siguiente manera:
  - 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados con "LD"
  - 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados con "M"
3. Pipetee los reactivos en los tubos de microcentrífuga de la siguiente manera:
  - 20.0  $\mu$ l de colorante de carga en los tubos marcados como "LD"
  - 10.0  $\mu$ l de escalera de ADN en los tubos marcados con "M"

**NOTA:** Después de la división en alícuotas, almacene el colorante de carga a temperatura ambiente y la escalera de ADN en el refrigerador.

## REÚNA LOS MATERIALES PARA EL LABORATORIO 4A

**NOTA:** Reúna los materiales el día del laboratorio.

1. Prepare 300 ml de 1x SB:
  - a. Reúna los siguientes materiales:

**TÉCNICA DE LABORATORIO:** Debe preparar SB 1x para todas las clases que completarán este laboratorio; simplemente multiplique las cantidades dadas por el número de clases.



- 15 ml de SB 20x
  - Matraz graduado de 500 ml etiquetado con "1x SB"
  - 285 ml de agua destilada o desionizada
  - 6 matraces de 50 ml etiquetados con "1x SB"
- b. Agregue 15 ml de 20x SB al matraz de 500 ml etiquetado con "1x SB", agregue agua destilada o desionizada hasta la marca de 300 ml y mezcle.
  - c. Vierta 50 ml de 1x SB en cada uno de los matraces de 50 ml etiquetados con "1x SB".
2. Saque los siguientes reactivos del congelador y permita que se descongelen durante 15 minutos:
    - Tubo de microcentrífuga de pARA digerido del laboratorio 2A (R+)
    - Tubo de microcentrífuga de pARA no digerido del laboratorio 2A (R-)
  3. Gire las digestiones de restricción y los controles en la microcentrífuga para integrar la condensación.

4. Prepare 12 juegos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:
  - Gradilla de plástico para tubos de microcentrífuga que contenga los siguientes reactivos:
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de pARA digerido del laboratorio 2A (R+)
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de pARA no digerido del laboratorio 2A (R-)
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de LD (preparado anteriormente)
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de agua destilada (dH<sub>2</sub>O)
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de M (preparado anteriormente)
  - Micropipeta P-20
  - Caja de puntas de pipetas desechables
  - Contenedor de residuos para puntas y tubos de microcentrífuga usados (necesitará 1 contenedor por cada 2 grupos)
  - Copias de **Diagrama de escalera de ADN (RM 4A)**, uno para cada alumno
5. Prepare seis cajas de electroforesis, cada una cerca de una fuente de alimentación; cada dos grupos compartirán una caja. Cargue cada caja con gel de agarosa al 0.8 % (preparado anteriormente) y coloque un matraz de 50 ml que contenga tampón 1x SB (también preparado anteriormente) cerca de cada caja. Guarde las bolsas con cierre que contenían los geles y etiquételos con el número de cada grupo y el período de clase en caso de que necesite almacenar los geles antes de realizar la coloración final y la fotodocumentación, vea *Completar los geles para el Laboratorio 4A* a continuación.
6. Coloque la microcentrífuga en una ubicación central para que todos los grupos puedan compartirla.

## COMPLETAR LOS GELES PARA EL LABORATORIO 4A.

1. A menos que tenga un período doble para las sesiones de clase 2 y 3, deberá continuar corriendo los geles después de que finalice la sesión 2, o interrumpir el procedimiento si está realizando otra clase utilizando las unidades de electroforesis en gel:
  - Si puede completar los geles después de que la clase haya terminado, corra los geles hasta que la coloración amarilla de Naranja G esté **cerca** del final del gel. El fragmento más pequeño que le interesa, que contiene el gen *rfp*, corre justo detrás de la banda amarilla. Una vez que se completa la electroforesis, los geles se pueden transferir a las bolsas con cierre etiquetadas o en una bandeja de coloración.
  - Si necesita interrumpir los geles, asegúrese de que los estudiantes los hayan estado corriendo durante al menos 10 minutos. Pida a los alumnos que desconecten la alimentación de la unidad de electroforesis, extraigan la bandeja de moldeado y deslicen el gel dentro de la bolsa con cierre etiquetada. Coloque un nuevo gel en la bandeja para la siguiente clase. Cuando tenga tiempo, puede devolver los geles que se corrieron parcialmente a la bandeja y continuar con la electroforesis, siguiendo las instrucciones anteriores.

2. Después de que los geles se hayan corrido, debe colorearlos y fotodocumentarlos para visualizar las bandas de ADN. Las instrucciones para la colorear y la fotodocumentar geles se incluyen con sus materiales. Los geles se pueden descartar en la basura normal después de la documentación.

## ENSEÑANZA

### SESIÓN 1

**IDEAS CLAVE:** En general, es importante verificar que un procedimiento funcionó como esperaba. En biotecnología en particular, el proceso de varios pasos que se utiliza para clonar un gen da como resultado múltiples productos, y es necesario verificar que tenga el plásmido recombinante que necesita.



Revise la **Introducción** y los **Objetivos del Capítulo 4A** con los alumnos. (5 minutos)

La **Introducción** explica el propósito principal de este capítulo, vinculándolo a la Introducción al programa. Los **Objetivos del Capítulo 4A** les dicen a los alumnos en qué deben enfocarse para aprender mientras trabajan en este capítulo. Explique a los alumnos qué evaluará en este capítulo y cuáles son sus expectativas en relación con el desempeño de los alumnos.

Pida a los estudiantes que contesten las preguntas *¿Qué sabes ya?* y que compartan sus respuestas. (10 minutos)

Responder las preguntas en esta sección activa el conocimiento de los alumnos sobre la electroforesis en gel, y la verificación en el laboratorio y revela las brechas en su conocimiento. Haga que los alumnos respondan las preguntas en parejas, registren sus respuestas y compartan sus ideas con la clase para que pueda evaluar lo que saben y lo que no saben.

Posibles respuestas a las preguntas *¿Qué sabes ya?*:

1. *¿Por qué los fragmentos de restricción de ADN y los plásmidos se separan cuando se analizan por electroforesis en gel? Las moléculas de ADN, incluidos los fragmentos y plásmidos, se mueven a través del gel durante el procedimiento de electroforesis en gel. La separación ocurre durante el procedimiento porque las moléculas más ligeras y compactas se mueven más rápido que las moléculas más pesadas y menos compactas.*
2. *¿Por qué es importante identificar y verificar un plásmido recombinante? Puede cometer errores durante un procedimiento o puede haber otros problemas, como reactivos que no son correctos. Los productos de los procedimientos de ingeniería genética no son visibles, por lo que los errores pueden pasar desapercibidos. Debe asegurarse de tener un plásmido recombinante que tenga el gen que necesita, así como cualquier otro gen o secuencia importante.*

Haga que los alumnos lean **¿Por qué necesita verificar?** y que contesten las preguntas de **CONSIDERAR**. (15 minutos)

En esta lectura, los alumnos aprenden un método para llevar a cabo el proceso de ingeniería genética para crear plásmidos recombinantes y luego verificar el plásmido recombinante. Los alumnos también aprenden que los plásmidos pueden existir en tres configuraciones: superenrollado, círculo mellado y multímero. Recuerde a los alumnos que usen el **Glosario** para buscar términos científicos si necesitan ayuda para entender la lectura.

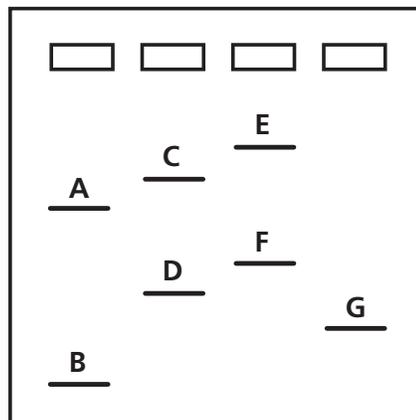
Dirija un debate sobre las respuestas de los alumnos a las preguntas de **CONSIDERAR** de **¿Por qué necesita verificar?** (5 minutos)

Evalúe el conocimiento de los alumnos sobre la electroforesis en gel y la verificación en el proceso de ingeniería genética revisando sus respuestas a las preguntas **CONSIDERAR**.



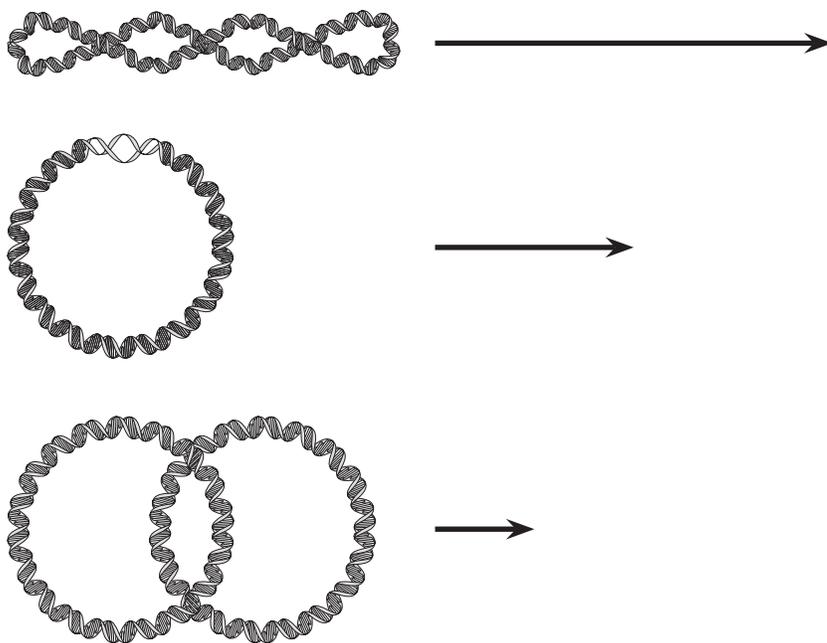
Posibles respuestas a las preguntas de **CONSIDERAR**:

- 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?



*El orden de los fragmentos de menor a mayor es B, G, D, F, A, C y E.*

- Si usó electroforesis en gel para separar el mismo plásmido que tiene las tres configuraciones, ¿qué plásmido se moverá más rápido y cuál se moverá 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. *El plásmido superenrollado se movería más rápido y el multímero se movería más lento. Los plásmidos superenrollado y los de círculo mellado tienen el mismo peso molecular, pero el plásmido superenrollado se mueve más rápidamente a través del gel porque ocupa menos espacio por su tamaño. El multímero es muy lento porque tiene múltiples copias del plásmido y, por lo tanto, tiene un peso molecular mucho mayor. Vea el diagrama en la siguiente página.*



Haga que los alumnos comiencen el Laboratorio 4A leyendo el párrafo introductorio y que luego revisen las preguntas de *Antes del laboratorio* en sus grupos. (10 minutos)

**NOTA:** Haga que los alumnos respondan las preguntas de *Antes del laboratorio* como tarea.

Diga a los alumnos que el propósito de este laboratorio es verificar los productos de su trabajo de laboratorio anterior. Haga que los alumnos discutan las preguntas de *Antes del laboratorio* en sus grupos y que registren sus respuestas de forma individual como tarea. Los alumnos necesitarán sus cuadernos para referirse a su trabajo anterior.

## SESIÓN 2

**IDEAS CLAVE:** Los fragmentos de ADN y los plásmidos pueden separarse mediante electroforesis en gel. El ADN no puede verse en el gel, por lo que una mezcla de colorantes llamada colorante de carga, se mezcla con las muestras de ADN para controlar el progreso del procedimiento de electroforesis en gel. Para ayudar a determinar los tamaños de los fragmentos desconocidos de ADN, se corre en el gel una mezcla de fragmentos de ADN de tamaños conocidos, llamada escalera de ADN. Después de completar la electroforesis en gel, el gel se colorea para mostrar la ubicación de los fragmentos de ADN y los plásmidos.



Haga que los alumnos completen el Laboratorio 4A. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y las preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE* con la clase y que expliquen su razonamiento. (45 minutos)

Antes de comenzar el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* con sus grupos y que resuelvan cualquier diferencia. Luego, pida a los alumnos que compartan sus respuestas y sus ideas para cada pregunta con la clase.

Posibles respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio*:

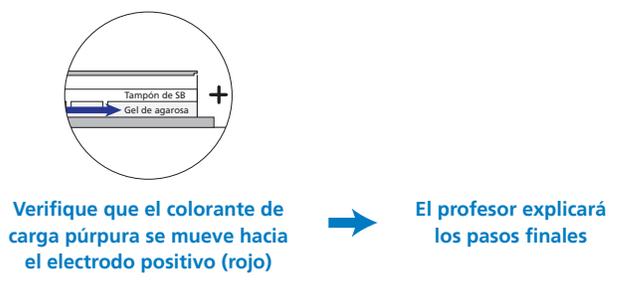
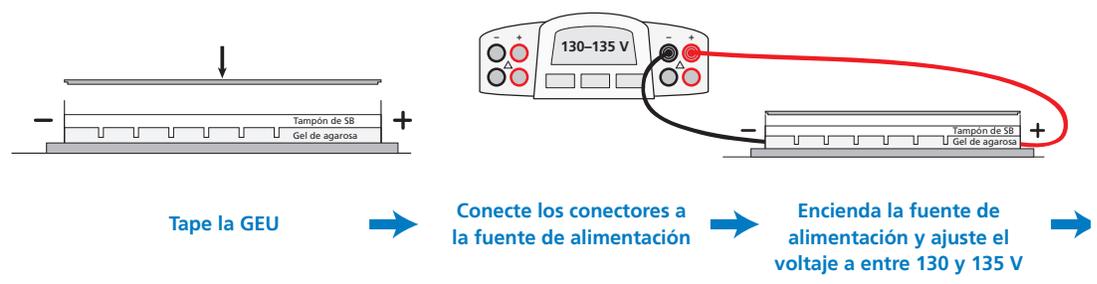
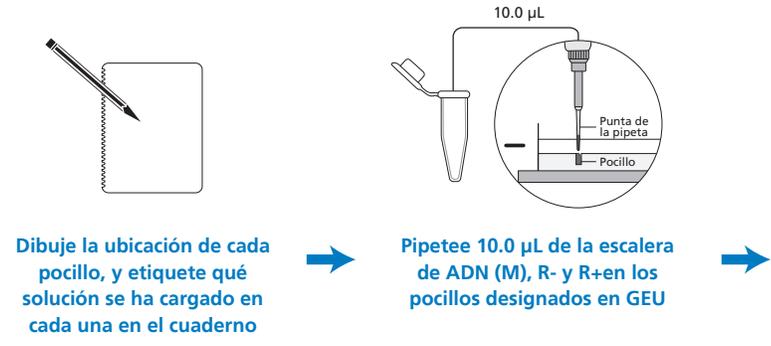
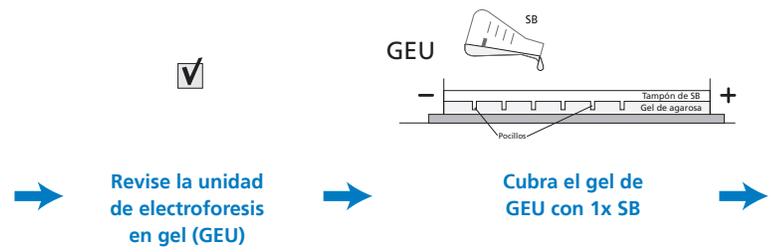
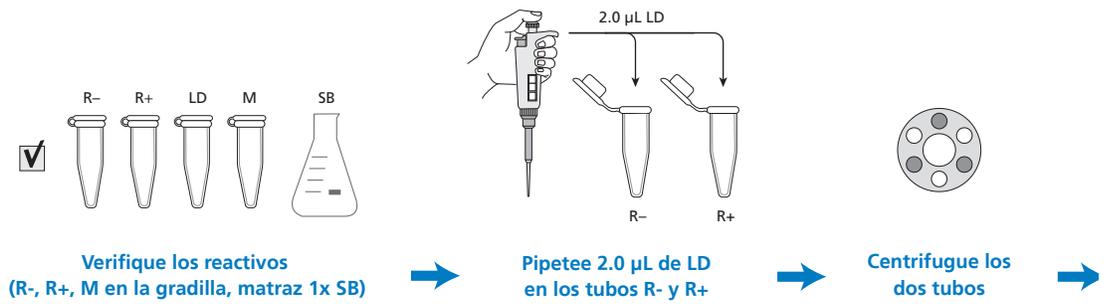
1. El plásmido pARA-R que digirió en el Laboratorio 2A se replicó en una célula bacteriana. ¿Qué configuraciones (superenrollada, círculo mellado y multímero) podrían tener el plásmido antes de la digestión? *Los dos plásmidos pueden tener las tres configuraciones.*
2. Debe predecir todos los productos 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 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.

*A continuación un ejemplo de tabla:*

Tubo	Fragmentos y plásmidos enumerados en orden de aumento del tamaño de pb en cada tubo
R-	<i>(1) pARA-R, 5,302 pb El plásmido puede tener las tres configuraciones, y la configuración superenrollado debería moverse más rápido.</i>
R+	<i>(1) fragmento pBAD-rfp, 807 pb (2) fragmento ampR-ori-araC, 4,495 pb</i>

3. Lea la sección de *Métodos* en las páginas de C-32 a C-34 de la Guía del estudiante y describa brevemente los pasos, utilizando palabras y un diagrama de flujo. *Las respuestas de los alumnos serán variadas. El diagrama de flujo de un estudiante podría parecerse al de la página siguiente.*

## Diagrama de flujo del laboratorio 4A

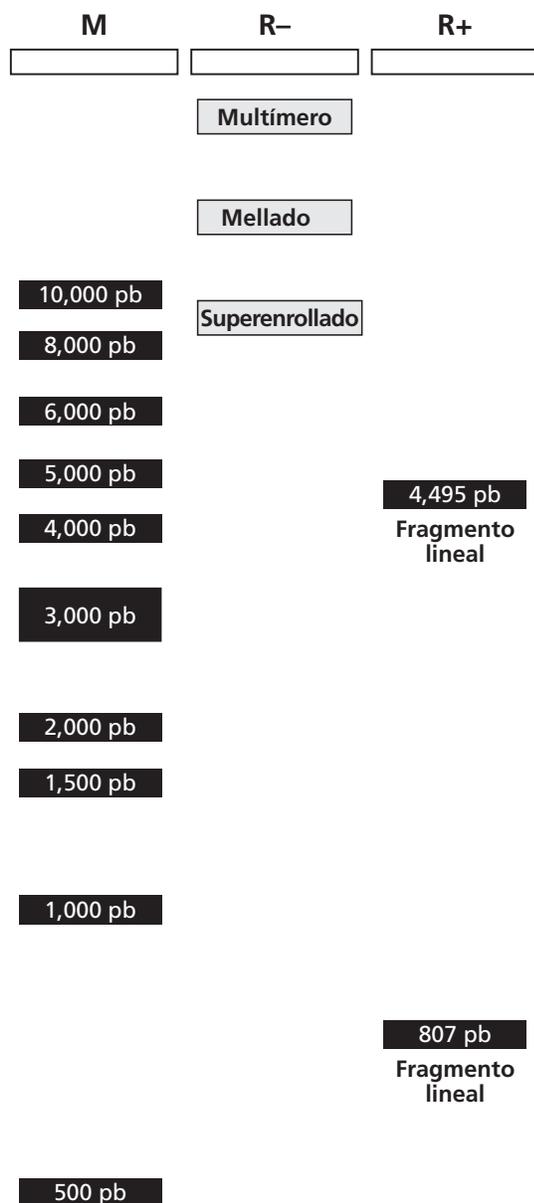


Entregue a cada alumno una copia de **Diagrama de escalera de ADN (RM 4A)**. Durante el laboratorio, los alumnos deben comentar las preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE* en sus grupos y luego registrar sus respuestas de forma individual. Pida a los alumnos que compartan sus respuestas y razonamiento para cada pregunta con la clase.



Posibles respuestas para las preguntas *DETÉNGASE Y PIENSE*:

- El ADN no es visible a medida que se mueve a través del gel. El colorante de carga contiene los tres colorantes que separó en el Laboratorio 1.2. ¿Por qué es útil usar el colorante de carga en este laboratorio? *Puede asegurarse de que las muestras en el gel estén corriendo y que lo estén haciendo en la dirección correcta.*
- La escalera de ADN sirve como estándar porque contiene una mezcla de moléculas de ADN de tamaños conocidos. Al 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 K-, K+, A-, A+ y LIG indicando su posición en los **Diagrama de escalera de ADN**? *Vea el siguiente diagrama. Tenga en cuenta que los alumnos no sabrán exactamente dónde colocar los plásmidos. Deben conocer las tendencias generales, que son: (1) los plásmidos son mucho más lentos que los fragmentos lineales de ADN; (2) si los plásmidos son del mismo tamaño, entonces la diferencia de velocidad se determina mediante la configuración de rápido a lento en el orden (a) superenrollado, (b) círculo mellado y (c) multímero; y (3) si los plásmidos tienen la misma configuración, entonces la diferencia de velocidad está determinada por el tamaño.*



- 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? *A menos que los alumnos conozcan los métodos de tinción, sus respuestas variarán. Después de haber escuchado las ideas de los alumnos, puede presentar el proceso de tinción y explicar que la mancha está compuesta por un colorante que se adhiere a las moléculas de ADN, al igual que los colorantes para la ropa se adhieren a las moléculas de la tela.*

Después del laboratorio, deberá colorear y fotodocumentar los geles para que los alumnos los usen para responder las *Preguntas del Capítulo 4A*. Consulte las instrucciones incluidas en el kit.

## SESIÓN 3



**IDEAS CLAVE:** Los fragmentos de ADN y los plásmidos que se han separado por electroforesis en gel se pueden identificar mediante la comparación con una escalera de ADN. Esta identificación se puede usar para verificar si el plásmido recombinante que necesita está presente y también puede brindarle información sobre qué tan bien funcionaron sus procedimientos.

**Pida a los alumnos que discutan las Preguntas del Capítulo 4A en grupos pequeños y que registren sus respuestas de forma individual. (20 minutos)**

Para responder muchas de estas preguntas, los alumnos deberán analizar las fotografías de sus geles. Esté preparado para ayudar a los alumnos a entender lo que ven a medida que responden las preguntas.

**Dirija un debate a partir de las respuestas de los alumnos. (25 minutos)**



**ESTRATEGIA:** Esté preparado para revisar los geles de los alumnos con ellos y para hablar sobre los posibles motivos de los resultados no concluyentes, como un lote malo de plásmidos, errores de pipeteo o etiquetado en el procedimiento de digestión, enzimas inactivas o por la adición de muestras incorrectas a los pocillos en el gel. Explique que los científicos verifican sus resultados después de cada paso, pero que los alumnos no tuvieron tiempo suficiente para llevar a cabo múltiples verificaciones.

Posibles respuestas a las Preguntas del Capítulo 4A:

1. ¿Por qué es importante verificar que tiene el plásmido recombinante correcto? *Puede cometer errores durante un procedimiento o puede haber otros problemas, como reactivos que no son correctos. Los productos de los procedimientos de ingeniería genética no son visibles, por lo que los errores pueden pasar desapercibidos. Debe asegurarse de tener un plásmido recombinante que tenga el gen que necesita, así como cualquier otro gen o secuencia importante antes de continuar el proceso de colocar el plásmido en bacterias.*



**ESTRATEGIA:** También se hizo una pregunta similar en la sección *¿Qué sabes ya?* al comienzo del capítulo. Pida a los alumnos que comparen sus dos respuestas.

**NOTA:** Las respuestas de los alumnos a las preguntas 2–7 variarán, dependiendo de su éxito en la realización de los procedimientos, incluido el procedimiento de electroforesis en gel. Estas posibles respuestas pueden no ser aplicables si sus procedimientos no tuvieron éxito.



**IR MÁS ALLÁ:** Pídales a los alumnos que creen una curva estándar de los fragmentos de la escalera de ADN trazando el logaritmo bp (o kbp) versus la distancia en el gel en papel semilogarítmico. Los alumnos pueden usar la curva estándar para determinar con mayor precisión la longitud (número de pb) de bandas desconocidas.

2. ¿Cómo se compararon los resultados reales del gel con las predicciones del gel? *Las respuestas variarán, pero si el procedimiento se realizó correctamente, los alumnos deberían ver la misma cantidad de bandas como se predice en cada línea. No es raro que los alumnos no agreguen una de las enzimas necesarias o carguen los geles en un orden diferente al sugerido en el protocolo. Esto está bien, siempre y cuando puedan averiguar qué hay en cada línea al revisar los plásmidos no digeridos y la longitud de los fragmentos.*
3. ¿Ha visto alguna banda que no se esperaba? ¿Qué factor podría explicar el origen de estas bandas inesperadas? *Las respuestas pueden variar, pero pueden aparecer bandas inesperadas si se utilizaron reactivos incorrectos o vencidos en los procedimientos, si los alumnos cargaron los geles en un orden diferente al sugerido en el protocolo, o si los alumnos cargaron una línea dos veces.*
4. ¿El gel muestra que está utilizando el plásmido recombinante correcto? *Describa la evidencia que usó para llegar a esta afirmación. Este es el plásmido recombinante correcto porque la línea R+ tiene dos fragmentos del tamaño correcto.*
5. En la línea R-, ¿ve evidencia de configuraciones múltiples de plásmidos? *Explique su respuesta. Los alumnos deben ver dos o tres bandas diferentes en la línea R-, lo cual es evidencia de varias configuraciones de plásmidos.*
6. En la línea R+, ¿ve evidencia de digestión completa? *Explique su respuesta. Sí, solo hay dos bandas en cada línea, lo que demuestra que el plásmido se digirió completamente en sus dos fragmentos.*
7. ¿En qué línea esperarías encontrar el gen *rfp* y el gen *ampR* en la fotografía de gel? ¿Puede localizar estos dos genes? *Explique su respuesta. En la línea R+, esperaríamos ver una banda entre los fragmentos de escalera de ADN de 1,000 pb y 500 pb, que corresponde al fragmento de 807 pb que lleva el gen *rfp*. En la línea R+, esperaríamos ver una banda entre los fragmentos de escalera de ADN entre los 4,000 pb y 5,000 pb, que corresponde al fragmento de 4.495 pb que lleva el gen *ampR*. Vemos ambas bandas en estas ubicaciones.*
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? *Sí, las bandas para los fragmentos lineales tienen bordes finales.*

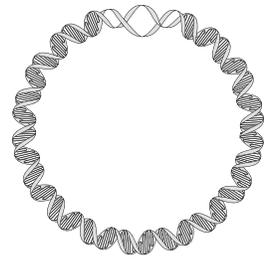
**ESTRATEGIA:** Mientras dirige el debate, aplique las siguientes prácticas:

- Dé a los alumnos tiempo para evaluar las respuestas de los demás.
- Pida aclaraciones.
- Pida una explicación.
- Replantee o reformule.
- Pida un ejemplo.
- Pida evidencia.
- Proporcione ejemplos y contraejemplos.
- Pida a los alumnos que aporten una explicación.
- Pida a los alumnos que evalúen una respuesta.





**IR MÁS ALLÁ:** Como se describió anteriormente, muchos animales han sido clonados a partir de células somáticas, pero esta lista no incluye a los seres humanos. Puede hacer que los alumnos investiguen las técnicas y los resultados de la clonación y el debate actual sobre si los humanos deben ser clonados, y que luego mantengan su propio debate sobre esta cuestión.



## **CAPÍTULO 5A**

# **INSERTAR PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN BACTERIAS**



# DESCRIPCIÓN GENERAL

---

En este capítulo, los alumnos aprenden que los plásmidos recombinantes deben ser absorbidos por las bacterias para replicarse y expresar sus genes. En el laboratorio, los alumnos transforman bacterias con el plásmido pARA-R que contiene el gen *rfp* y el gen *ampR*.

## SUPUESTOS DEL CONOCIMIENTO PREVIO

Los estudiantes ya deben saber lo siguiente:

- La relación entre el ADN, los genes, las proteínas y los rasgos, específicamente, que los genes contienen el código para fabricar una proteína y que las proteínas son moléculas que se utilizan para fabricar y desarrollar la célula, por lo que son responsables de los rasgos.
- El ADN es una molécula bicatenaria, y cada cadena de ADN está compuesta de subunidades unidas covalentemente llamadas nucleótidos, que se abrevian de acuerdo con la base nitrogenada que contienen (C, G, A, T)
- La transcripción es el proceso mediante el cual la información codificada en el ADN se transfiere al ARN mensajero, un ácido ribonucleico monocatenario.
- La traducción es el proceso por el cual la información codificada en el ARN mensajero se decodifica y transforma en una proteína.

## OBJETIVOS DE APRENDIZAJE

Al final de este capítulo, los estudiantes podrán 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 como un rasgo.

## RESULTADOS EVALUADOS

- Evalúe la capacidad de cada estudiante para describir la función de la transformación en el proceso de clonación de genes revisando sus respuestas a la pregunta 4 en *Preguntas del Capítulo 5A* (página C-54 de la Guía del estudiante).
- Evalúe la capacidad de cada estudiante para explicar el propósito de cada control en el experimento de transformación revisando sus respuestas a las preguntas 1 y 2 en *Antes del laboratorio* (páginas C-47 de la Guía del estudiante), a la primera pregunta de *DETÉNGASE Y PIENSE* en el Laboratorio 5A (página C-50 de la Guía del estudiante), y a la pregunta 3 en *Preguntas del Capítulo 5A* (página C-54 de la Guía del estudiante), y su trabajo en **Predicciones de crecimiento bacteriano (RM 5)**.
- Evalúe la capacidad de cada alumno para explicar cómo la información codificada en un gen se expresa como un rasgo al revisar sus respuestas a las preguntas 5 y 6 en *Preguntas del Capítulo 5A* (página C-54 de la Guía del estudiante).

## SECUENCIA DE ACTIVIDADES SUGERIDA

### SESIÓN 1

- Revise la **Introducción** y *los Objetivos del Capítulo 5A*. (5 minutos)
- Pida a los estudiantes que contesten las preguntas *¿Qué sabes ya?* y que compartan sus respuestas. (10 minutos)
- Haga que los alumnos lean **Transformar bacterias con plásmidos recombinantes** y que contesten las preguntas de **CONSIDERAR**. (10 minutos)
- Dirija un debate sobre las respuestas de los alumnos a las preguntas de **CONSIDERAR** preguntas de **Transformas bacterias con plásmidos recombinantes**. (5 minutos)
- Haga que los alumnos comiencen el Laboratorio 5A leyendo los párrafos introductorios y respondiendo las preguntas de *Antes del laboratorio* en sus grupos. (15 minutos)

### SESIÓN 2

- Haga que los alumnos continúen el Laboratorio 5A. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y de **DETÉNGASE Y PIENSE** con la clase y que expliquen su razonamiento. (45 minutos)

**NOTA:** Hay dos períodos de espera de 15 minutos durante este laboratorio, durante el cual los alumnos pueden compartir sus respuestas a estas preguntas.

### SESIÓN 3

- Haga que los alumnos revisen los resultados del Laboratorio 5A. (10 minutos)
- Demuestre cómo establecer un cultivo en suspensión para las bacterias transformadas, como preparación para el Capítulo 6. (5 minutos)
- Revise la transcripción, la traducción y la relación entre genes, proteínas y rasgos. (10 minutos)
- Pida a los alumnos que discutan las *Preguntas del Capítulo 5A* en grupos pequeños y que registren sus respuestas de forma individual. (10 minutos)
- Dirija un debate a partir de las respuestas de los alumnos. (10 minutos)

## PREPARACIÓN

---

Antes de comenzar, debe familiarizarse con los procedimientos de laboratorio en cada capítulo, la preparación requerida y los materiales que necesitará. Las instrucciones suponen que proporcionará materiales para 12 grupos de 2 o 3 alumnos. Multiplique las cantidades según sea necesario en función de la cantidad de alumnos y el número de clases que imparte.

**TÉCNICA DE LABORATORIO:** Las células competentes que se requieren en el Laboratorio 5 deben almacenarse en el congelador hasta el día en que se usan. Por lo tanto, separe las alícuotas de los reactivos y reúna los materiales para el laboratorio el mismo día que lo lleve a cabo. Trate de reducir al mínimo la cantidad de veces que las células se descongelan.



### FOTOCOPIE LOS FOLLETOS PARA EL LABORATORIO 5A

Una copia de **Predicciones de crecimiento bacteriano (RM 5)** es necesaria para cada alumno. El Master reproducible (RM) para el folleto se encuentra al final de la guía.

### REVISE LAS PRECAUCIONES DE SEGURIDAD Y LOS PROCEDIMIENTOS DE ELIMINACIÓN DE RESIDUOS PARA EL LABORATORIO 5A

Revise las precauciones de seguridad y los procedimientos enumerados en las páginas OV-15 y OV-16 con los alumnos.

### CALIBRAR EL BAÑO MARÍA PARA EL LABORATORIO 5A

Si su baño maría aún no está preparado, vea *Preparar y calibrar el baño maría para el laboratorio 2A* (página C-6 de esta guía). Para este laboratorio, calibre el baño maría a 42 °C, asegurándose de que haya suficiente agua en el baño y que el baño esté cubierto para reducir la evaporación. Asegúrese de usar agua destilada en el baño maría y de mantener el termómetro, el temporizador y la gradilla flotante para tubos de microcentrífuga con el baño maría.

### PREPARE ALÍCUOTAS DE REACTIVOS Y REÚNA LOS MATERIALES PARA EL LABORATORIO 5A

Reúna materiales en el día del laboratorio. Después de preparar las gradillas con los reactivos, asegúrese de guardarlos en el refrigerador hasta que los alumnos estén listos para usarlos. Separe en alícuotas las células competentes 15 minutos antes de que los alumnos comiencen el laboratorio (vea el paso 5).

1. Etiquete dos tubos de microcentrífuga de la siguiente manera:
  - 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados con "LB"
  - 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados con "RP"
  - 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados con "CC"

2. Pipetee los reactivos en los tubos de microcentrífuga de la siguiente manera:
  - 350  $\mu$ l de caldo Luria en tubos marcados con "LB"
  - 12.0  $\mu$ l del plásmido recombinante pARA-R en tubos marcados con "RP"
3. Prepare 12 juegos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:
  - Gradilla de plástico para tubos de microcentrífuga que contengan los siguientes reactivos:
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de LB
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de RP
  - 2 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
  - Marcador permanente
  - Micropipeta P-20
  - Micropipeta P-200
  - Caja de puntas de pipetas desechables
  - 3 placas Petri con agar:
    - ◆ 1 placa de LB (una franja)
    - ◆ 1 placa de LB / amp (dos franjas)
    - ◆ 1 placa de LB / amp / ara (tres franjas)
4. Reúna los otros materiales necesarios para el laboratorio:
  - Guantes desechables
  - Tazas de espuma de poliestireno (una por grupo)
  - Esparcidores de células
  - Cinta adhesiva
  - Bolsa de residuos con riesgo biológico
  - Recipiente de recolección de residuos líquidos, como un vaso de precipitado pequeño
  - Copias de **Predicciones de crecimiento bacteriano (RM 5)**, uno para cada alumno
5. Prepare células competentes 15 minutos antes de que los alumnos comiencen el laboratorio, de la siguiente manera:
  - Prepare un recipiente pequeño lleno de hielo picado.
  - Coloque los tubos etiquetados con CC en el hielo.
  - Pipetee 100  $\mu$ l de células de *E. coli* competentes en cada tubo con CC, sujetando los tubos solo por los bordes y devolviéndolos inmediatamente al hielo.
  - Coloque el recipiente lleno de hielo de células competentes en una ubicación central.
  - Coloque tazas de espuma de poliestireno al lado del contenedor de hielo.
6. Coloque la incubadora en una ubicación central y calíbreala a 37 °C.
7. Coloque los esparcidores de células y la cinta en una ubicación central para que los grupos puedan compartirlos.

**NOTA:** Las placas de los grupos se incubarán durante 24 a 36 horas a 37 °C. Si los alumnos no se reúnen en aproximadamente 24 horas, retire las placas de la incubadora y colóquelas en el refrigerador. Si no hay una incubadora disponible, las placas pueden almacenarse a temperatura ambiente por hasta 48 horas.

## SESIÓN 1

**IDEAS CLAVE:** Una vez que se ha creado un plásmido recombinante, este debe ser absorbido por las bacterias para que puedan usar la maquinaria de las células bacterianas para replicarse y expresar el gen de interés. El proceso en el que la bacteria capta el ADN de su entorno se llama transformación. Debido a que las bacterias son organismos unicelulares que existen en un ambiente hostil, no se transforman fácilmente. Sin embargo, con una preparación específica, 1 de cada 1,000 células absorberán plásmidos.



### Revise la **Introducción** y los **Objetivos del Capítulo 5A**. (5 minutos)

La **Introducción** explica el propósito principal de este capítulo, vinculándolo a la Introducción al programa. Los **Objetivos del Capítulo 5A** les dicen a los alumnos en qué deben enfocarse para aprender mientras trabajan en este capítulo. Explique a los alumnos qué evaluará en este capítulo y cuáles son sus expectativas en relación con el desempeño de los alumnos.

### Pida a los estudiantes que contesten las preguntas *¿Qué sabes ya?* y que compartan sus respuestas. (10 minutos)

La sección *¿Qué sabes ya?* La sección activa el conocimiento de los alumnos sobre la absorción de plásmidos y la expresión génica, y revela brechas en ese conocimiento. Haga que los alumnos respondan las preguntas en parejas, registren sus ideas y luego las compartan con la clase para que pueda evaluar lo que saben y lo que no saben sobre la absorción de plásmidos y la expresión génica.

Posibles respuestas a las preguntas *¿Qué sabes ya?*:

1. *¿Crees que la captación bacteriana de un plásmido del ambiente es un evento común? ¿Por qué o por qué no? Probablemente no sea un evento común. Las células tratarán de protegerse a sí mismas de las sustancias del medioambiente, ya que muchas de ellas pueden ser perjudiciales.*
2. *¿Cuáles son los pasos involucrados en la transcripción y traducción de un gen? Durante la transcripción, el ADN se copia en el ARN mensajero. Durante la traducción, el ARN mensajero se decodifica en una parte celular llamada ribosoma. El ribosoma lee los codones del ARNm y los traduce en aminoácidos. Cada codón (un grupo de tres bases) en la secuencia corresponde a un aminoácido, y los aminoácidos son los componentes básicos de las proteínas.*
3. *¿Cuál es la relación entre genes, proteínas y rasgos (o características observables)? Un gen contiene el código para hacer una proteína, y las proteínas son moléculas que se usan para hacer y desarrollar la célula, por lo que son responsables de los rasgos. A menudo, un rasgo es el resultado de múltiples proteínas.*

4. ¿Qué tienen en común las bacterias y los seres humanos que hacen posible que un gen humano se exprese en bacterias? *La estructura y el código del ADN son los mismos en bacterias y humanos. La maquinaria celular que realiza la transcripción y traducción es la misma en bacterias y humanos.*

**Haga que los alumnos lean Transformar bacterias con plásmidos recombinantes y que contesten las preguntas de CONSIDERAR. (10 minutos)**

En esta lectura, los alumnos aprenden sobre la transformación, que es la absorción de ADN por las bacterias. La célula bacteriana proporciona la maquinaria celular que permite que un plásmido recombinante se replique y exprese un gen. Los alumnos aprenden que el código de ADN y los procesos de transcripción y traducción son universales, lo que hace posible que las bacterias expresen un gen humano. Haga que los alumnos anoten las respuestas de las preguntas de *CONSIDERAR* en sus cuadernos. Recuerde a los alumnos que usen el *Glosario* para buscar términos científicos si necesitan ayuda para entender la lectura.

**Dirija un debate sobre las respuestas de los alumnos a las preguntas de CONSIDERAR preguntas de Transformas bacterias con plásmidos recombinantes. (5 minutos)**

Evalúe el conocimiento de los alumnos sobre la expresión génica, la absorción de plásmidos, el ADN y cómo se usan las ligasas en ingeniería genética al revisar sus respuestas a las preguntas de *CONSIDERAR*.



Posibles respuestas a las preguntas de *CONSIDERAR*:

- 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? *El vector debe introducirse dentro de una célula para que su ADN pueda transcribirse y traducirse en una proteína. Si el vector contiene un activador para el promotor, como araC, podría ser necesaria una sustancia como la arabinosa.*
- ¿Por qué es importante que las paredes celulares de las bacterias de *E. coli* regulen cuidadosamente qué sustancias pueden entrar y salir de la célula? *La célula regula las sustancias que pueden entrar y salir porque algunas sustancias pueden afectarla negativamente.*

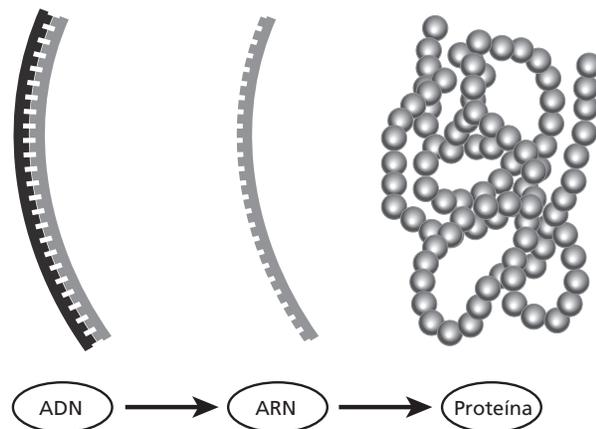
**Haga que los alumnos comiencen el Laboratorio 5A leyendo los párrafos introductorios y respondiendo las preguntas de Antes del laboratorio en sus grupos. (15 minutos)**

Los alumnos comentan las preguntas de *Antes del laboratorio* en sus grupos y registran sus respuestas de forma individual. Este trabajo se puede completar como tarea si es necesario.

## ANTECEDENTE CIENTÍFICO: EL DOGMA CENTRAL Y LA TRANSCRIPTASA INVERSA

En 1957, Francis Crick sentó las bases intelectuales para comprender cómo la información en el ADN da como resultado rasgos de organismos. Propuso lo que se conoció como el “dogma central”, que establece que la información genética almacenada en el ADN se transfiere al ARN en el proceso de transcripción. El ARN “mensajero” (ARNm) luego lleva esta información a los ribosomas, donde se traduce en proteínas (ver **Figura T5A.1**).

**Figura T5A.1: Dogma central**

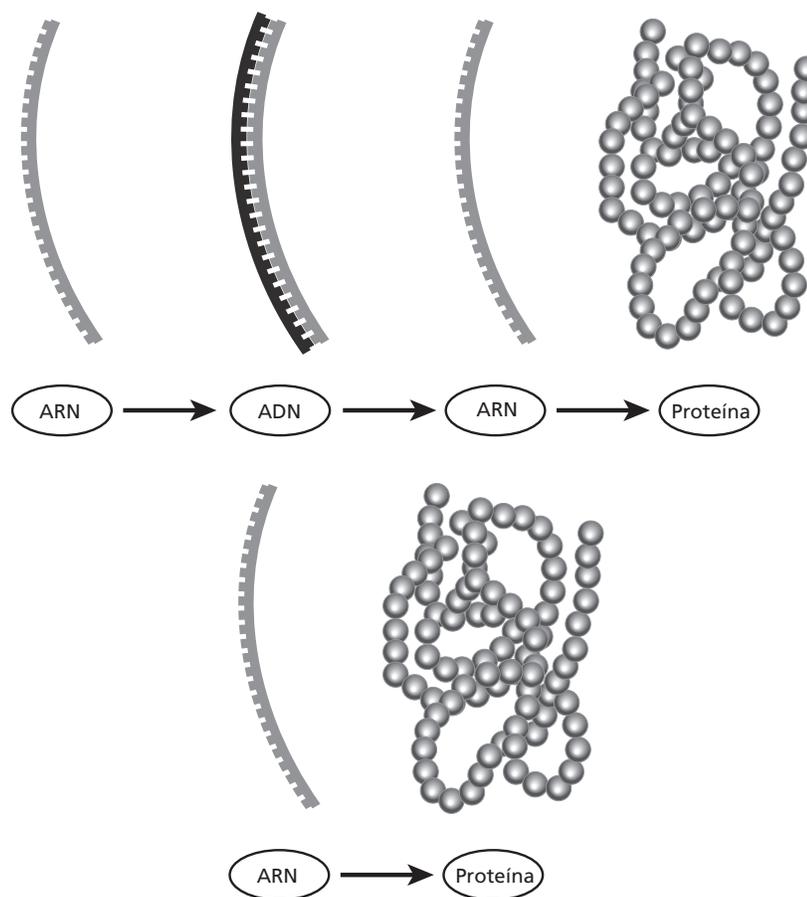


El descubrimiento de que ciertos virus no usan ADN sino ARN como material genético condujo a una modificación significativa del dogma central. Un grupo de virus de ARN, llamados retrovirus, almacena su información genética como ARN bicatenario, y la información en el ARN se convierte en ADN mediante la enzima transcriptasa inversa. Este ADN se integra en el genoma de la célula huésped y luego se transcribe mediante la ARN polimerasa de la célula huésped en ARNm, que es traducido por la maquinaria de síntesis de proteínas de la célula huésped para generar proteínas virales.

Otro grupo de virus, llamados virus de cadena positiva, omiten el ADN por completo. Una molécula de ARN monocatenario sirve como material genético y como ARNm. El virus de la polio es un ejemplo de un virus cuyo ARN genómico tiene tres funciones: (1) almacenar información genética, (2) servir como plantilla para la replicación por una ARN polimerasa dependiente de ARN y (3) actuar como un ARNm que dirige la traducción de la información codificada en proteínas virales.

Estos descubrimientos demostraron que el flujo de información según lo establecido en el dogma central tiene varias vías. Además de la ruta que se muestra arriba, hay dos rutas adicionales, que se muestran en la **Figura T5A.2**.

Figura T5A.2: Caminos alternativos para el dogma central



El descubrimiento de la transcriptasa inversa, que ganó un Premio Nobel en 1970 por sus descubridores, Howard Temin y David Baltimore, proporcionó una herramienta invaluable para la biotecnología. Con la transcriptasa inversa, se podrían generar copias de ADN directamente del ARNm. Esta copia de ADN (ADNc) alivió los problemas que se presentaron por el hecho de que el ADN genómico no podía usarse en bacterias, las cuales no tienen la capacidad de empalmar (eliminar) intrones del ARNm. El ADNc contiene solo exones y, por lo tanto, puede usarse en bacterias para producir la proteína codificada.

Además de llevar información genética, algunas moléculas de ARN pueden actuar como enzimas y participan en la regulación de la expresión génica. La capacidad del ARN para desempeñar una serie de roles diferentes en la célula ha llevado a algunos científicos a proponer que la forma de vida ancestral estaba basada en el ARN y posteriormente evolucionó a las formas que conocemos ahora, con el ADN como la principal biomolécula de la herencia.

## SESIÓN 2

**IDEAS CLAVE:** Las células bacterianas que se han transformado con el plásmido pARA-R se identifican al cultivarlas en presencia de ampicilina y arabinosa. La ampicilina evitará el crecimiento de células que no portan un gen de resistencia a la ampicilina, y la arabinosa activará el promotor bacteriano que controla la expresión del gen *rfp*.



Haga que los alumnos continúen el Laboratorio 5A. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y de *DETÉNGASE Y PIENSE* con la clase y que expliquen su razonamiento. (45 minutos)

Los alumnos realizan una actividad de laboratorio, Laboratorio 5A, en la que transforman bacterias con el plásmido pARA-R que contiene el gen *rfp* y el gen *ampR*. Los alumnos aprenden sobre la importancia de los controles cuando seleccionan las bacterias que han tomado el plásmido pARA-R.

Haga que los alumnos primero completen los pasos 1–6 en la sección *Métodos*. Luego, mientras los tubos P– y P+ están en hielo durante 15 minutos, haga que los alumnos compartan sus respuestas a la pregunta 3 en *Antes del laboratorio*. (Todas las preguntas de *Antes del laboratorio* y las posibles respuestas siguen).

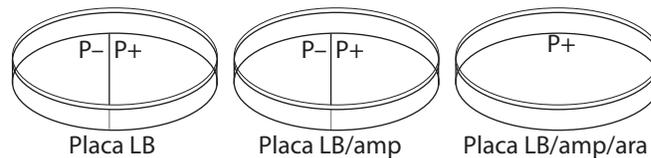
Posibles respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio*:

1. La ampicilina es un antibiótico que mata 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? *Solo las células que tienen un plásmido que contiene el gen de resistencia a la ampicilina podrán crecer en presencia de ampicilina. Puede seleccionar las células que se han transformado, que son muy pocas.*
2. ¿Qué sucederá cuando las células bacterianas que contienen el plásmido pARA-R no reciban arabinosa? *El gen *rfp* no puede expresarse a menos que la célula reciba arabinosa; solo en presencia de arabinosa la proteína activadora AraC activará el gen promotor *rfp*.*



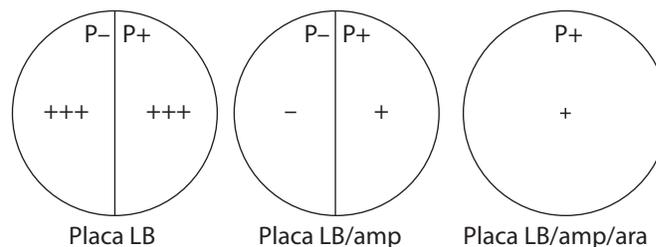
**IR MÁS ALLÁ:** Es posible que desee proporcionar información más detallada a los alumnos sobre cómo funciona la proteína activadora AraC. El gen *araC* es parte del operón arabinosa, que es un ejemplo clásico de regulación génica en bacterias (ver la **Figura T2A.1** en la página C-21 de esta guía). Además de *araC* el operón comprende tres genes, *araB*, *araA* y *araD*, que codifican las proteínas responsables del transporte y la descomposición de la arabinosa. También incluye un promotor y una secuencia 5' de ADN próximo al promotor, que se une a la proteína AraC. La proteína AraC regula la expresión de los genes de arabinosa permitiendo su transcripción en presencia de arabinosa o desactivando la expresión génica en su ausencia. En el plásmido pARA-R, el operón arabinosa controla la expresión del gen *rfp*, y la RFP solo se puede producir cuando hay arabinosa presente.

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 de 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. Entonces 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.

*Predicciones para cada placa:*



Respuestas para *Tabla 1* y la *Tabla 2* en *RM 5*:

**Tabla 1: Grupo de control P- (bacterias no transformadas)**

Placa Contiene:	Crecimiento previsto	Conclusión si se produce un crecimiento previsto	Conclusión si no se produce el crecimiento previsto
Caldo Luria (LB)	+++	<i>Las bacterias no transformadas están vivas, y el caldo Luria puede apoyar su crecimiento</i>	<i>Problema con bacterias, caldo Luria o métodos</i>
Caldo Luria ampicilina (LB / amp)	-	<i>La ampicilina mata las bacterias no transformadas</i>	<i>Problema con ampicilina</i>

**Tabla 2: Grupo Experimental P+ (bacterias transformadas)**

Placa Contiene:	Crecimiento previsto	Conclusión si se produce un crecimiento previsto	Conclusión si no se produce el crecimiento previsto
Caldo Luria (LB)	+++	<i>Las bacterias transformadas están vivas, y el caldo Luria puede apoyar su crecimiento; las bacterias no fueron afectadas por el proceso de transformación</i>	<i>Problema con bacterias, caldo Luria o proceso de transformación</i>
Caldo Luria ampicilina (LB / amp)	+	<i>Algunas bacterias transformadas tienen plásmidos con resistencia a la ampicilina</i>	<i>La transformación no funcionó</i>
Caldo Luria ampicilina arabinosa (LB / amp / ara)	+	<i>Algunas bacterias transformadas tienen plásmidos con resistencia a la ampicilina</i>	<i>Problema con arabinosa; la transformación no funcionó</i>

**ESTRATEGIA:** Muchos alumnos se esfuerzan por comprender los controles y se beneficiarán de un debate sobre el crecimiento de las bacterias no transformadas y transformadas en cada condición. Ayude a los alumnos a comprender que cada control está diseñado para proporcionar una respuesta a una pregunta útil, es decir:

- ¿Son viables las células?
- ¿La ampicilina mata las células no transformadas?



- ¿Son viables las células después del procedimiento de transformación?
- ¿Fue exitosa la transformación en la medida en que algunas células han adquirido resistencia a la ampicilina?
- ¿Alguna célula transformada produce RFP?

Puede pedirles a los alumnos que consideren un escenario en el que las células se transformaron y se colocaron en la placa LB / amp / ara, pero luego no crecieron, y usted no había llevado a cabo ningún control. Ayude a los alumnos a comprender que solo si el experimentador ha cultivado la bacteria en cada condición puede determinar por qué el procedimiento de transformación no funcionó.

Si los alumnos se preguntan por qué las células no transformadas no se colocan en la placa LB / amp / ara, puede explicarles si esto responde a una pregunta útil que arroja luz sobre el éxito del experimento.

4. Lea la sección *Métodos* en las páginas de C-49 a C-53 de la Guía del estudiante y describa brevemente los pasos, utilizando palabras y un diagrama de flujo. *Las respuestas de los alumnos serán variadas. El diagrama de flujo de un estudiante puede parecerse a los diagramas de flujo de las páginas C-55 y C-56.*

Mientras los tubos P- y P+ se incuban en el paso 11, haga que los alumnos discutan las preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE* y que registren sus respuestas de forma individual. Pida a los alumnos que compartan sus respuestas y razonamiento para cada pregunta con la clase.

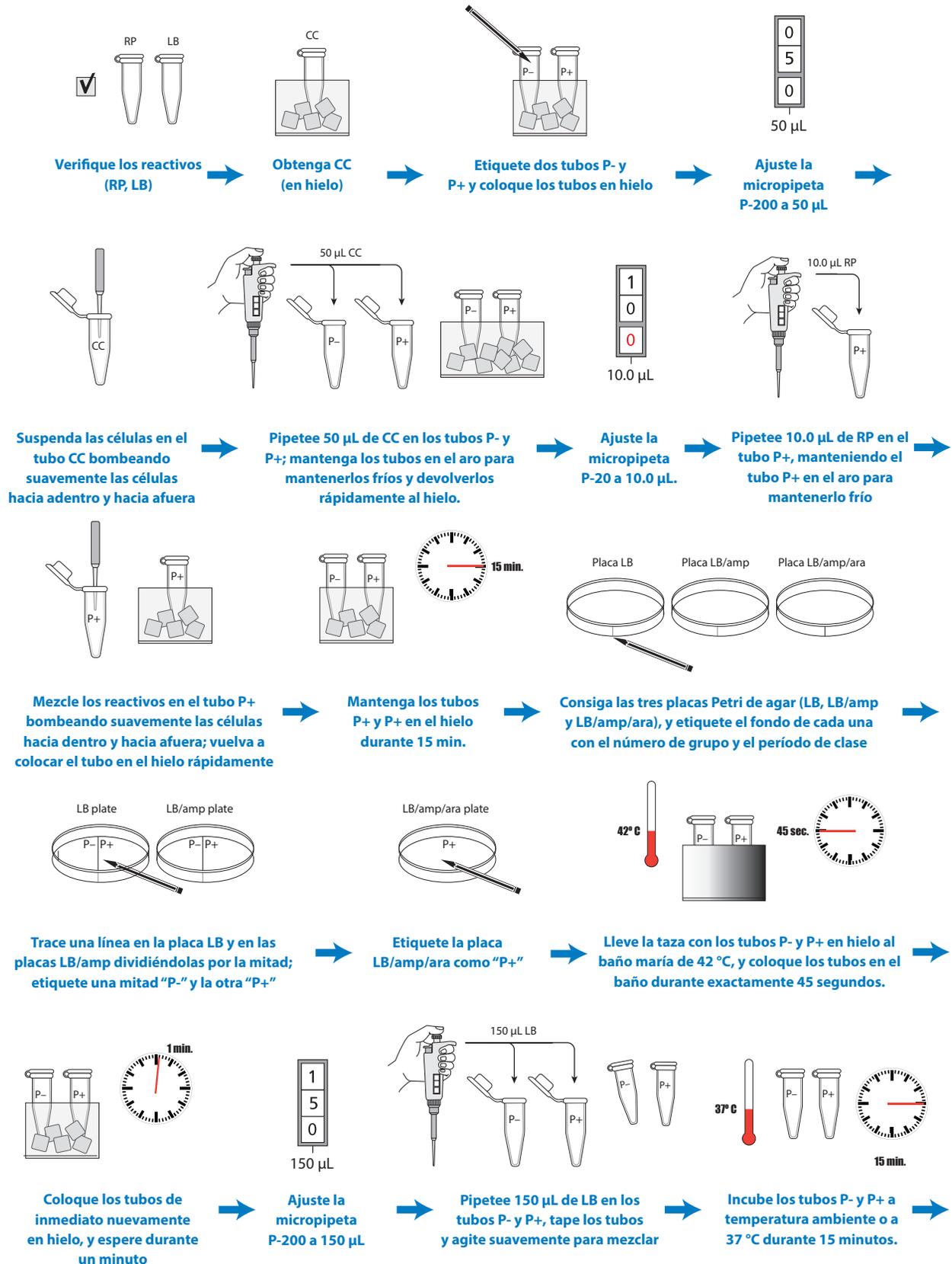


Posibles respuestas para las preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE*:

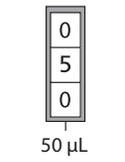
- ¿De qué diferente manera se trató el cultivo de bacterias P+ del cultivo de bacterias P-? (Un *cultivo* es una población aislada de células). ¿Cuál es el propósito del cultivo de bacterias P-? *El cultivo de bacterias P+ se mezcla con los plásmidos recombinantes, mientras que el cultivo de bacterias P- no se mezcla con los plásmidos recombinantes. El propósito del cultivo de bacterias P- es asegurarse de que las células y las condiciones de crecimiento funcionen como se esperaba. El cultivo de bacterias P- debe crecer bien en el caldo Luria y debe morir cuando se expone al antibiótico ampicilina.*
- ¿Por qué las células necesitan tiempo para recuperarse después del choque térmico? *El choque implica que el calor pone a las bacterias bajo estrés. Dejar que las bacterias se asienten sin someterlas a nada más les da tiempo a las células para volver a su estado habitual.*
- ¿Por qué se incuban las células a 37 °C? *Las bacterias están adaptadas para crecer dentro del cuerpo humano, el cual mantiene esa temperatura.*
- Usó una técnica aséptica en este laboratorio. ¿Por qué esto es importante? *La técnica aséptica puede evitar la transferencia de bacterias del experimento al medioambiente y del medioambiente al experimento.*

Al final del laboratorio, recuerde a los alumnos que coloquen todos los materiales que entren en contacto con células de *E. coli* en la bolsa de residuos con riesgo biológico etiquetada.

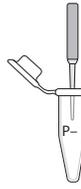
## Diagrama de flujo del laboratorio 5A



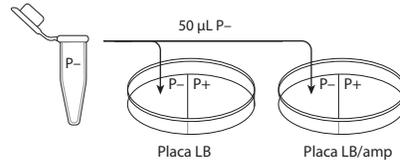
## Diagrama de flujo del laboratorio 5A (continuación)



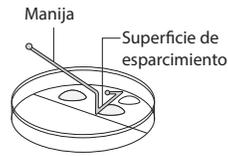
Ajuste la micropipeta P-200 a 50 µL



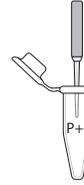
Bombée suavemente la pipeta un par de veces en el tubo P-



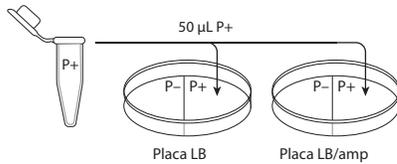
Pipetee 50 µL de P- en mitades de P- de las placas LB y LB/amp, y cierre las tapas de inmediato después de dispensar P-



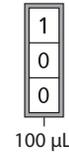
Utilice un esparcidor de células nuevo para esparcir las células P- en mitades de P- de las placas LB (primera) y LB/amp (segunda), y tape



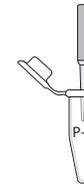
Con la punta de pipeta nueva, bombée suavemente la pipeta un par de veces en el tubo P+



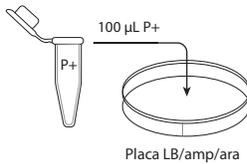
Pipetee 50 µL de P+ en mitades de P+ de las placas LB y LB/amp, y tape después de dispensar P+



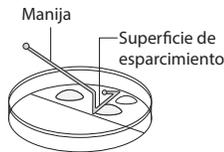
Ajuste la micropipeta P-200 a 100 µL



Bombée suavemente la pipeta un par de veces en el tubo P+



Pipetee 100 µL de P+ en varias secciones de la placa LB/amp/ara, y coloque la tapa



Utilice un esparcidor de células para esparcir las células P+ en las mitades de P+ de las placas LB (primera) y LB/amp (segunda), y después en la placa LB/amp/ara, y coloque las tapas



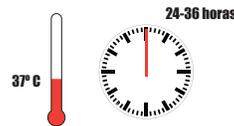
Deje las placas con el lado derecho hacia arriba durante 5 minutos



Una con cinta las tres placas, y etiquete la cinta con el número de grupo y el período de clase



Coloque las placas boca abajo en la incubadora a 37 °C



Incube las placas de 24 a 26 horas a 37 °C o a temperatura ambiente durante 48 horas



Examine las placas y registre cuánto ha crecido cada una

## SESIÓN 3

**IDEAS CLAVE:** Las células bacterianas transformadas con el plásmido pARA-R se identifican mediante un proceso de selección que utiliza las secuencias que se han manipulado en el plásmido.



### Haga que los alumnos completen el Laboratorio 5A. (10 minutos)

Haga que los alumnos retiren sus placas de las incubadoras y registren sus resultados en sus cuadernos. Si planea llevar a cabo el Laboratorio 6, guarde algunas placas que tengan colonias rojas o rosadas brillantes, y haga que los alumnos coloquen las placas restantes en una bolsa de residuos con riesgo biológico.

### Demuestre cómo establecer un cultivo en suspensión para las bacterias transformadas, como preparación para el Capítulo 6. (5 minutos)

Siga las instrucciones detalladas en la sección **Preparación** (*Cultivar bacterias para la purificación de proteínas*, página E-6 de esta guía). Eliminará algunas colonias celulares transformadas de las placas y las colocará en un cultivo en suspensión en un agitador. Estas células y los plásmidos pARA-R que contienen se multiplicarán en los próximos días.

### Revise la transcripción, la traducción y la relación entre genes, proteínas y rasgos. (10 minutos)

**ESTRATEGIA:** Revisar el conocimiento previo importante ayuda a los alumnos a aplicar lo que han aprendido previamente.



Use esta revisión para abordar las brechas en el conocimiento de los alumnos, según lo determinado por sus respuestas a las preguntas 2 y 3 *¿Qué sabes ya?* Consulte la **Figura 5A.2** en la página C-43 de la Guía del estudiante durante su revisión.

### Pida a los alumnos que discutan las Preguntas del Capítulo 5A en grupos pequeños y que registren sus respuestas de forma individual. Dirija un debate a partir de las respuestas de los alumnos. (20 minutos)

Haga que los alumnos reflexionen sobre su comprensión del proceso de selección para identificar las células bacterianas transformadas con el plásmido pARA-R y la expresión génica respondiendo las *Preguntas del Capítulo 5A*.

Posibles respuestas a las *Preguntas del Capítulo 5A*:

1. Mire los resultados de su transformación. ¿Sus resultados reales coinciden con los resultados pronosticados? Si no, ¿qué diferencias ve y cuáles son algunas explicaciones para estas diferencias? *Las respuestas variarán. Si se*

*producen resultados inesperados, ayude a los alumnos a pensar en lo que podría haber sucedido. Hay muchos procedimientos en los que podría haber ocurrido un error que podría afectar los resultados.*

2. *¿Cuántas colonias rojas se presentaron en su placa LB/amp/ara? Las respuestas variarán. Todos los grupos deben obtener algunas colonias que expresen RFP, a menos que se haya cometido un error al realizar los procedimientos.*
3. *¿Por qué aparecieron las colonias rojas solo en la placa LB/amp/ara y no en la placa LB/amp? El gen rfp no puede expresarse a menos que la célula reciba arabinosa, ya que el operón de arabinosa solo activará el promotor genético rfp en presencia de arabinosa.*
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? En ingeniería genética, el objetivo es producir muchos productos, como la insulina. Más copias del plásmido y su gen darán como resultado la producción de más producto dentro de la 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. El gen rfp en el plásmido está compuesto de ADN, y el gen se copia en el ARN mensajero. Este proceso se llama transcripción. El ARN mensajero se utiliza para construir la proteína en el ribosoma al unirse para transferir moléculas de ARN que combinan codones y aminoácidos; los aminoácidos luego se unen para formar la proteína. Este proceso se llama traducción. La proteína puede contribuir a un rasgo, y en este caso la RFP hace las células rojas.*
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? La estructura y el código del ADN, y la maquinaria celular que lleva a cabo la transcripción y la traducción, son los mismos en todos los organismos vivos.*



**ESTRATEGIA:** Mientras dirige el debate, implemente las siguientes prácticas:

- Dé a los alumnos tiempo para evaluar las respuestas de los demás.
- Pida aclaraciones.
- Pida una explicación.
- Replantee o reformule.
- Pida un ejemplo.
- Pida evidencia.
- Proporcione ejemplos y contraejemplos.
- Pida a los alumnos que aporten una explicación.
- Pida a los alumnos que evalúen una respuesta.



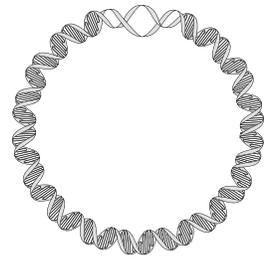
**AMGEN<sup>®</sup> Biotech Experience**  

---

**Scientific Discovery for the Classroom**

**AMGEN<sup>®</sup> Foundation**





## **CAPÍTULO 5B**

# **INSERTAR PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN BACTERIAS**



# DESCRIPCIÓN GENERAL

---

En este capítulo, los alumnos aprenden sobre dos herramientas biológicas esenciales utilizadas en ingeniería genética: plásmidos y enzimas de restricción. Los alumnos llevan a cabo una actividad en papel en la que determinan qué enzima de restricción se debe usar para crear un nuevo plásmido recombinante. Los alumnos aprenden que los plásmidos recombinantes deben ser captados por las bacterias para replicarse y expresar sus genes. En el laboratorio, los alumnos transforman bacterias con el plásmido pARA-R que contiene el gen de la proteína fluorescente roja (*rfp*) y el gen de resistencia a la ampicilina (*ampR*).

## SUPUESTOS DEL CONOCIMIENTO PREVIO

Los estudiantes ya deben saber lo siguiente:

- El ADN es una molécula bicatenaria, y cada cadena de ADN está compuesta de subunidades unidas covalentemente llamadas nucleótidos, que se abrevian de acuerdo con la base nitrogenada que contienen (C, G, A, T).
- Los nucleótidos están unidos entre sí por una estructura de azúcar-fosfato; las bases nitrogenadas sobresalen de esta estructura.
- Las dos cadenas de ADN están conectadas por enlaces de hidrógeno entre bases nitrogenadas adyacentes, que se denominan pares de bases; la citosina siempre se aparea con la guanina, y la adenina siempre se aparea con la timina.
- La relación entre el ADN, los genes, las proteínas y los rasgos, específicamente, que los genes contienen el código para fabricar una proteína y que las proteínas son moléculas que se utilizan para fabricar y desarrollar la célula, por lo que son responsables de los rasgos.
- La transcripción es el proceso mediante el cual la información codificada en el ADN se transfiere al ARN mensajero, un ácido ribonucleico monocatenario.
- La traducción es el proceso por el cual la información codificada en el ARN mensajero se decodifica y transforma en una proteína.

## OBJETIVOS DE APRENDIZAJE

Al final de este capítulo, los estudiantes podrán 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.

## RESULTADOS EVALUADOS

- Evalúe la capacidad de cada alumno para describir las características del plásmido revisando sus respuestas a la pregunta 2 en *Preguntas de la actividad* (página D-13 de la Guía del alumno), a la pregunta 4 en *Antes del laboratorio* (página D-20 de la Guía del alumno), y a las preguntas 1 y 3 en las *Preguntas del Capítulo 5B* (página D-26 de la Guía del alumno).
- Evalúe la capacidad de cada alumno para explicar cómo usar las enzimas de restricción para crear un plásmido recombinante revisando sus respuestas a las preguntas 1 y 3 en *Preguntas de la actividad* (página D-13 de la Guía del alumno) y la pregunta 2 en *Preguntas del Capítulo 5B* (página D-26 de la Guía del alumno).
- Evalúe la capacidad de cada estudiante para describir la función de la transformación en el proceso de clonación de genes revisando sus respuestas a la pregunta 4 y 6 en *Preguntas del Capítulo 5B* (página D-26 de la Guía del estudiante).
- Evalúe la capacidad de cada estudiante para explicar el propósito de cada control en el experimento de transformación revisando sus respuestas a las preguntas 1 y 2 en *Antes del laboratorio* (páginas D-19 de la Guía del estudiante), a la primera pregunta de *DETÉNGASE Y PIENSE* en el Laboratorio 5B (página D-23 de la Guía del estudiante), y a la pregunta 5 en *Preguntas del Capítulo 5B* (página D-26 de la Guía del estudiante), y su trabajo en **Predicciones de crecimiento bacteriano (RM 5)**.
- Evalúe la capacidad de cada alumno para explicar cómo la información codificada en un gen se expresa como un rasgo al revisar sus respuestas a las preguntas 7 y 8 en *Preguntas del Capítulo 5B* (página D-26 de la Guía del estudiante).

## SECUENCIA DE ACTIVIDADES SUGERIDA

### SESIÓN 1

- Revise la *Introducción y los Objetivos del Capítulo 5B*. (2 minutos)
- Pida a los estudiantes que contesten las preguntas *¿Qué sabes ya?* y que compartan sus respuestas. (10 minutos)
- Presentar y debatir **Su desafío**. (3 minutos)
- Haga que los alumnos lean **Plásmidos y enzimas de restricción** y **Producir Proteínas Terapéuticas Humanas en Bacterias** y que respondan las preguntas de *CONSIDERAR* (20 minutos)
- Dirija un debate sobre las respuestas de los alumnos a las preguntas de *CONSIDERAR* de **Plásmidos y enzimas de restricción**. (5 minutos)
- Presente la secuencia del laboratorio ABE que seguirá la clase. (5 minutos)

## SESIÓN 2 (OPCIONAL)

- Haga que los alumnos completen una de las tres actividades opcionales: (1) Llevar a cabo una investigación en Internet sobre un producto farmacéutico realizado mediante un proceso recombinante, (2) llevar a cabo una investigación en Internet sobre un tema bioético relacionado con la ingeniería genética y luego debatir sobre el tema o escribir un artículo de opinión o publicación de blog, o (3) extraer ADN. (45 minutos) Haga que los alumnos realicen **Clonar ese gen** y discutan la pregunta de **DETÉNGASE Y PIENSE** a medida que trabajan. (25 minutos)

## SESIÓN 3

- Haga que los alumnos lleven a cabo el procedimiento **Clone ese gen**. (15 minutos)
- Haga que los alumnos comenten la pregunta de **DETÉNGASE Y PIENSE** y de *Preguntas de la actividad* en pequeños grupos y que registren sus respuestas de forma individual. (15 minutos)
- Dirija un debate a partir de las respuestas de los alumnos. (15 minutos)

## SESIÓN 4

- Haga que los alumnos lean **Transformar bacterias con plásmidos recombinantes** y que contesten las preguntas de **CONSIDERAR**. (10 minutos)
- Dirija un debate sobre las respuestas de los alumnos a las preguntas de **CONSIDERAR** preguntas de **Transformas bacterias con plásmidos recombinantes**. (5 minutos)
- Haga que los alumnos comiencen el Laboratorio 5B. Haga que los alumnos lean los párrafos introductorios y respondan las preguntas de *Antes del laboratorio* en sus grupos. (30 minutos)

## SESIÓN 5

- Haga que los alumnos continúen el Laboratorio 5B. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y de **DETÉNGASE Y PIENSE** con la clase y que expliquen su razonamiento. (45 minutos)

**NOTA:** Hay dos períodos de espera de 15 minutos durante este laboratorio, durante el cual los alumnos pueden compartir respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y de **DETÉNGASE Y PIENSE**.

## SESIÓN 6

- Haga que los alumnos completen el Laboratorio 5B. (10 minutos)
- Demuestre cómo establecer un cultivo en suspensión para las bacterias transformadas, como preparación para el Capítulo 6. (5 minutos)
- Revise la transcripción, la traducción y la relación entre genes, proteínas y rasgos. (10 minutos)
- Pida a los alumnos que discutan las *Preguntas del Capítulo 5B* en grupos pequeños y que registren sus respuestas de forma individual. Dirija un debate a partir de las respuestas de los alumnos. (20 minutos)

## PREPARACIÓN

---

Antes de comenzar, debe familiarizarse con los procedimientos de laboratorio en cada capítulo, la preparación requerida y los materiales que necesitará. Las instrucciones suponen que proporcionará materiales para 12 grupos de 2 o 3 alumnos. Multiplique las cantidades según sea necesario en función de la cantidad de alumnos y el número de clases que imparte.



**TÉCNICA DE LABORATORIO:** Las células competentes que se requieren en el Laboratorio 5B deben almacenarse en el congelador hasta el día en que se usan. Por lo tanto, separe las alícuotas de los reactivos y reúna los materiales para el laboratorio el mismo día que lo lleve a cabo.

### FOTOCOPIE LOS FOLLETOS Y REÚNA LOS MATERIALES PARA EL PROCEDIMIENTO CLONE ESE GEN

Se necesitan dos folletos para cada par de alumnos: **Diagrama de plásmido (RM 2)** y **Secuencia de ADN humano (RM 3)**. El Master reproducible (RM) para el folleto se encuentra al final de esta guía. Consiga un par de tijeras y un rollo de cinta adhesiva para cada pareja. Los alumnos usarán estos materiales para construir un modelo en papel de un plásmido recombinante que contenga un gen de insulina.

### FOTOCOPIE LOS FOLLETOS PARA EL LABORATORIO 5B

Una copia de **Predicciones de crecimiento bacteriano (RM 5)** es necesaria para cada alumno. El Master reproducible (RM) para el folleto se encuentra al final de la guía.

### REVISE LAS PRECAUCIONES DE SEGURIDAD Y LOS PROCEDIMIENTOS DE ELIMINACIÓN DE DESECHOS PARA EL LABORATORIO 5B

Revise las precauciones de seguridad y los procedimientos enumerados en las páginas OV-13 y OV-14 con los alumnos.

### CALIBRAR EL BAÑO MARÍA PARA EL LABORATORIO 5B

El día antes del Laboratorio 5B, configure y calibre el baño maría a 42 °C. Asegúrese de usar agua destilada en el baño maría.

1. Reúna los siguientes materiales:

- Baño maría
- Termómetro
- Gradilla flotante para tubos de microcentrífuga
- Temporizador

2. Coloque el baño maría en una ubicación central para que todos los grupos puedan compartirlo.
3. Llene el baño maría con agua destilada y coloque el termómetro dentro de este. Caliente el agua a 42 °C, manteniendo el baño cubierto para reducir la evaporación.
4. Coloque la gradilla flotante para tubos de microcentrífuga (para sostener los tubos en el baño maría) y el temporizador en la mesa al lado del baño maría.

## **PREPARE ALÍCUOTAS DE REACTIVOS Y REÚNA LOS MATERIALES PARA EL LABORATORIO 5B**

Reúna materiales en el día del laboratorio. Después de preparar las gradillas con los reactivos, asegúrese de guardarlos en el refrigerador hasta que los alumnos estén listos para usarlos. Separe en alícuotas las células competentes 15 minutos antes de que los alumnos comiencen el laboratorio (vea el paso 5 a continuación).

1. Etiquete dos tubos de microcentrífuga de la siguiente manera:
  - 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados con "LB"
  - 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados con "RP"
  - 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml marcados con "CC"
2. Pipetee los reactivos en los tubos de microcentrífuga de la siguiente manera:
  - 350 µl de caldo Luria en tubos marcados con "LB"
  - 12.0 µl del plásmido recombinante pARA-R en tubos marcados con "RP"
3. Prepare 12 juegos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:
  - Gradilla de plástico para tubos de microcentrífuga que contengan los siguientes reactivos:
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de LB
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de RP
  - 2 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
  - Marcador permanente
  - Micropipeta P-20
  - Micropipeta P-200
  - Caja de puntas de pipetas desechables
  - 3 placas Petri con agar:
    - ◆ 1 placa de LB (una franja)
    - ◆ 1 placa de LB / amp (dos franjas)
    - ◆ 1 placa de LB / amp / ara (tres franjas)
4. Reúna los otros materiales necesarios para el laboratorio:
  - Tazas de espuma de poliestireno (una por grupo)
  - Guantes desechables
  - Esparcidores de células
  - Temporizador o reloj
  - Cinta adhesiva
  - Bolsa de residuos con riesgo biológico

- Recipiente de recolección de residuos líquidos, como un vaso de precipitado pequeño
  - Copias de **Predicciones de crecimiento bacteriano (RM 5)**, uno para cada alumno
5. Prepare células competentes 15 minutos antes de que los alumnos comiencen el laboratorio, de la siguiente manera:
    - Prepare un recipiente pequeño lleno de hielo picado.
    - Coloque los tubos etiquetados con CC en el hielo.
    - Pipetee 100  $\mu$ l de células de *E. coli* competentes en cada tubo con CC, sujetando los tubos solo por los bordes y devolviéndolos inmediatamente al hielo.
    - Coloque el recipiente lleno de hielo de células competentes en una ubicación central.
    - Coloque tazas de espuma de poliestireno al lado del contenedor de hielo.
  6. Coloque la incubadora en una ubicación central y calíbrala a 37 °C.
  7. Coloque los esparcidores de células y la cinta en una ubicación central para que los grupos puedan compartirlos.

**NOTA:** Las placas de los grupos se incubarán durante 24 horas a 37 °C. Si los alumnos no se reúnen en aproximadamente 24 horas, retire las placas de la incubadora y colóquelas en el refrigerador.

## ENSEÑANZA

### SESIÓN 1



**IDEAS CLAVE:** Los plásmidos son vectores ideales para usar en ingeniería genética porque pueden replicarse en la célula bacteriana, tienen una secuencia llamada promotor del gen que permite la transcripción y traducción de un gen cercano, llevan un gen de resistencia a los antibióticos que se puede usar como marcador seleccionable y se puede transferir a las bacterias mediante un proceso llamado conjugación. La creación de un plásmido recombinante que contiene ADN de otra especie se logra mediante la acción de enzimas de restricción. Las enzimas de restricción pueden cortar un gen de interés del ADN humano y pueden cortar el plásmido; las dos piezas de ADN se pueden unir. Algunas enzimas de restricción cortan de manera asimétrica el ADN en secuencias específicas, de modo que el extremo de una cadena sobresale del otro. Estos extremos se denominan extremos adhesivos.

#### Revise la Introducción y los Objetivos del Capítulo 5B. (2 minutos)

La **Introducción** explica el propósito principal de este capítulo, vinculándolo a la Introducción al programa. Los *Objetivos del Capítulo 5B* les dicen a los alumnos en qué deben enfocarse para aprender mientras trabajan en este capítulo. Explique a los alumnos qué evaluará en este capítulo y cuáles son sus expectativas en relación con el desempeño de los alumnos.

### Pida a los estudiantes que contesten las preguntas *¿Qué sabes ya?* y que compartan sus respuestas. (10 minutos)

Responder las preguntas en esta sección activa el conocimiento de los alumnos sobre el ADN, cómo se usan los plásmidos y las enzimas de restricción en la ingeniería genética, y revela las brechas en su conocimiento. Haga que los alumnos respondan las preguntas en parejas y que anoten sus ideas para que pueda evaluar lo que saben y lo que no saben.

Posibles respuestas a las preguntas *¿Qué sabes ya?*:

1. Todos los organismos vivos contienen ADN. *¿De qué manera es igual el ADN de los diferentes organismos y de qué manera varía? Todo el ADN tiene la misma estructura y utiliza el mismo código y los mismos procesos de transcripción y traducción. Entre los diferentes organismos, las secuencias de ADN variarán porque los organismos producen diferentes proteínas.*
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? Las enzimas de restricción pueden cortar un gen humano y pueden cortar un plásmido, y estas dos piezas se pueden unir para formar un plásmido recombinante que se inserta en las bacterias.*
3. *¿Crees que la captación bacteriana de un plásmido del ambiente es un evento común? ¿Por qué o por qué no? Probablemente no sea un evento común. Las células tratarán de protegerse a sí mismas de las sustancias del medioambiente, ya que muchas de ellas pueden ser perjudiciales.*
4. *¿Cuál es la relación entre genes, proteínas y rasgos (o características observables)? Un gen contiene el código para hacer una proteína, y las proteínas son moléculas que se usan para hacer y desarrollar la célula, por lo que son responsables de los rasgos. A menudo, un rasgo es el resultado de múltiples proteínas.*
5. *¿Qué tienen en común las bacterias y los seres humanos que hacen posible que un gen humano se exprese en bacterias? La estructura y el código del ADN son los mismos en bacterias y humanos. La maquinaria celular que realiza la transcripción y traducción es la misma en bacterias y humanos.*

### Presentar y debatir **Su desafío** (3 minutos)

Haga que los alumnos lean **Su desafío** y comenten qué harán en estos laboratorios.

### Haga que los alumnos lean **Plásmidos y enzimas de restricción y Producir Proteínas Terapéuticas Humanas en Bacterias** y que respondan las preguntas de **CONSIDERAR** (20 minutos)

En estas lecturas, los alumnos aprenden por qué los plásmidos son una herramienta ideal para insertar un gen humano en las bacterias y cómo se usan las enzimas de restricción para crear un plásmido recombinante. Haga

que los alumnos anoten las respuestas de las preguntas de *CONSIDERAR* en sus cuadernos. Recuerde a los alumnos que usen el **Glosario** para buscar términos científicos si necesitan ayuda para entender la lectura.

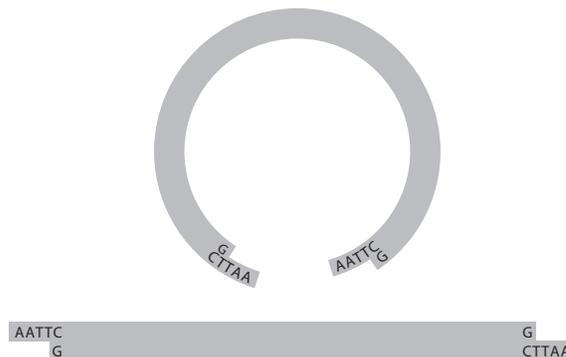
### Dirija un debate sobre las respuestas de los alumnos a las preguntas de *CONSIDERAR* de **Plásmidos y enzimas de restricción**. (5 minutos)

Evalúe el conocimiento de los alumnos sobre el ADN y cómo se utilizan los plásmidos y las enzimas de restricción en la ingeniería genética al revisar las respuestas de los alumnos a las preguntas de *CONSIDERAR*.



Posibles respuestas a las preguntas de *CONSIDERAR*:

- 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. *Si algunas bacterias transportan un plásmido con un gen de resistencia a los antibióticos, sobrevivirán cuando se expongan al antibiótico. Esto les da una ventaja selectiva sobre las bacterias que no llevan ese plásmido; aquellas bacterias sin el plásmido morirán cuando se expongan al antibiótico.*
- ¿Cómo las bacterias que llevan una enzima de restricción evitan cortar su propio ADN? *Las bacterias podrían tener una forma de proteger su propio ADN en secuencias donde podría ser cortada por la enzima de restricción, o su ADN podría no tener la secuencia cortada por la enzima de restricción.*
- ¿Cuál es la secuencia del extremo adhesivo que se produce cuando se corta el ADN con *BamHI*? ¿Con *HindIII*? *El extremo sobresaliente para BamHI es GATC. El extremo sobresaliente para HindIII es AGCT.*
- Los científicos pueden modificar a los plásmidos para tener un solo sitio de enzimas de restricción. Imagina que tienes 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. *Hay dos formas posibles de representar un plásmido que se ha cortado con EcoRI:*



*Usaría la enzima de restricción EcoRI para cortar el gen de la planta. Los extremos del gen pueden alinearse con los extremos del plásmido.*



**ESTRATEGIA:** Los dibujos de los alumnos pueden variar y es posible que desee comparar diferentes representaciones. Debido a que un plásmido es un objeto tridimensional, los alumnos pueden tener problemas para visualizar un cambio en la estructura, como un corte. Por ejemplo, en la segunda representación

del plásmido cortado, el extremo se voltea y, por lo tanto, también lo hace la secuencia. Si es necesario, haga modelos de papel para el plásmido y haga que los alumnos realicen el corte en el modelo.

**Estrategia:** Mientras dirige el debate, implemente las siguientes prácticas:



- Dé a los alumnos tiempo para evaluar las respuestas de los demás.
- Pida aclaraciones.
- Pida una explicación.
- Replantee o reformule.
- Pida un ejemplo.
- Pida evidencia.
- Proporcione ejemplos y contraejemplos.
- Pida a los alumnos que aporten una explicación.
- Pida a los alumnos que evalúen una respuesta.

**Presente la secuencia del laboratorio ABE que seguirá la clase. (5 minutos)**

Repase la secuencia de laboratorio ABE elegida. Si bien los alumnos pueden no tener la oportunidad de completar todos los laboratorios, es importante que sepan cómo su trabajo encaja en el “panorama general” del desarrollo de organismos genéticamente modificados para fabricar productos que los seres humanos puedan usar. Revise la **Figura 5B.4** (página D-9 de la Guía del estudiante), que muestra la producción de una proteína terapéutica humana. Señale qué partes del proceso completarán en su secuencia de laboratorio y describa los desafíos específicos de los alumnos (ver **Tabla OV.1** en la página OV-3).

### **ANTECEDENTE CIENTÍFICO: ¿POR QUÉ LOS PROMOTORES BACTERIANOS ESTÁN EN LOS PLÁSMIDOS?**

Todos los genes tienen sus propios promotores, entonces, ¿por qué incluir un promotor al construir un vector plasmídico? El mecanismo de transcripción génica es el mismo en todos los organismos: la ARN polimerasa se une a un promotor específico y copia la secuencia de ADN del gen en el ARN mensajero. Sin embargo, la secuencia de ADN de los promotores y la estructura de las ARN polimerasas pueden variar; así, la ARN polimerasa bacteriana no reconocerá ni se unirá a un promotor humano. Quizás lo más importante, dado que muchos genes eucariotas contienen intrones y exones, muchos genes humanos, como el de la insulina, que han sido clonados no se eliminan directamente del ADN genómico; en cambio, el ADN se sintetiza a partir del ARNm del gen de interés por la transcriptasa inversa. Esta es la copia de ADN (ADNc) que luego se clona. Estos ADNc carecen de un promotor y, por lo tanto, deben insertarse en el vector plasmídico cerca de un promotor. Para facilitar la comprensión de la clonación del gen de la insulina, el uso de ADNc se ha omitido en la lectura. Es posible que desee elaborar este proceso con sus alumnos. Es posible que desee elaborar este proceso con sus alumnos.

## SESIÓN 2 (OPCIONAL)



**IDEAS CLAVE:** Las decisiones sociales sobre la implementación de los esfuerzos relacionados con la ciencia y la tecnología deben basarse tanto en el conocimiento científico como en la economía, las políticas, la política y la ética. El ADN tiene la misma estructura y función sin importar de qué organismo provenga.

Haga que los alumnos completen una o más de las tres actividades opcionales: (1) llevar a cabo una investigación en Internet sobre un producto farmacéutico elaborado mediante un proceso recombinante, (2) llevar a cabo una investigación en Internet sobre un tema bioético relacionado con la ingeniería genética y luego debatir sobre el tema o escribir un artículo de opinión o publicación de blog, o (3) extraer ADN. (45 minutos)

Puede extender la introducción de los alumnos a la biotecnología haciéndolos participar en una o más de las actividades siguientes.

### TERAPÉUTICA HUMANA AHORA Y EN EL FUTURO

Asigne a los alumnos para trabajar individualmente o en equipos para aprender más sobre algunos de los productos recombinantes que se encuentran actualmente en investigación y desarrollo o en el mercado, ya sea en este país o en el extranjero, y que luego presenten lo más destacado de sus hallazgos al resto de la clase. Puede sugerir que investiguen qué productos recombinantes se usan, o podrían usarse en el futuro, para afecciones médicas comunes, por ejemplo:

- Anemia
- Asma
- Enfermedades autoinmunes, como el lupus o la enfermedad de Crohn
- Cáncer o los efectos secundarios de los tratamientos contra el cáncer, como los trasplantes de médula ósea y la quimioterapia
- Diabetes
- Insuficiencia renal

### CONSIDERACIONES BIOÉTICAS

Existen muchos problemas bioéticos potenciales relacionados con la ingeniería genética y la biofarmacéutica. Los alumnos pueden investigar uno de los siguientes temas y luego participar en un debate en clase o escribir un artículo de opinión o una entrada de blog:

- Insulina natural frente a la genéticamente modificada: Además de la insulina genéticamente modificada producida por bacterias, las personas con diabetes pueden ser tratadas con insulina extraída de vacas o cerdos. Si bien algunas personas pueden tener reacciones adversas a la insulina sintética modificada genéticamente y, por lo tanto, necesitan tomar un producto natural, otras simplemente prefieren usar productos naturales (en lugar de productos genéticamente modificados). ¿Deberían respetarse sus puntos de vista? ¿Se debe permitir que las personas con diabetes elijan?

- Seguridad del tratamiento frente al acceso al tratamiento: La invención de nuevas terapias, incluida la insulina genéticamente modificada, ha salvado innumerables vidas. Sin embargo, antes de que un medicamento o tratamiento pueda ponerse a disposición del público, debe someterse a una gran cantidad de pruebas para determinar su efectividad y garantizar que el producto sea seguro para el uso en humanos. Estos ensayos clínicos pueden tardar muchos años en completarse, tiempo que los pacientes con enfermedades terminales a menudo no tienen. Los pacientes que padecen enfermedades potencialmente mortales han defendido durante mucho tiempo el acceso a medicamentos que aún no han completado todo el proceso de aprobación. Argumentan que deberían poder recibir medicamentos no aprobados si han agotado todas las demás opciones de tratamiento. ¿Deberían concederse sus deseos? ¿Es más importante permitir que los pacientes tengan acceso a medicamentos o asegurarse de que los productos sean completamente seguros para uso humano primero?

**RECURSOS:** En el sitio web del programa se proporcionan enlaces a noticias sobre estos temas.



## EXTRACCIÓN DE ADN

En esencia, este programa trata sobre el ADN. El ADN codifica las proteínas, que a su vez dan como resultado los rasgos de los organismos, ya sea que esos rasgos sean fluorescencia, producción reducida de insulina o cabello castaño. Para ayudar a los alumnos a comprender que todo el ADN tiene la misma estructura, haga que realicen un laboratorio de extracción de ADN. Aislar el ADN de diferentes organismos y comparar sus propiedades (como la viscosidad) reforzará la idea de que no importa cuál sea la fuente, todo el ADN se ve similar y tiene propiedades similares.

**RECURSOS:** Se proporcionan enlaces a posibles laboratorios en el sitio web del programa.



## SESIÓN 3

**IDEAS CLAVE:** Al crear un plásmido recombinante, es importante examinar las secuencias del ADN plasmídico y del ADN humano que contiene el gen de interés. Es necesario encontrar una enzima de restricción única que cortará el ADN plasmídico en un solo sitio y que corte cerca de los dos extremos del gen humano. Los “extremos adhesivos” idénticos creados por los cortes de una única enzima de restricción hacen posible unir las diferentes secuencias de ADN en un plásmido recombinante.

Haga que los alumnos lleven a cabo el procedimiento *Clone ese gen*. (15 minutos)

Los alumnos ven secuencias genéticas de ADN plasmídico y un gen humano diana cromosómico (insulina) y eligen la enzima de restricción apropiada para usar para crear un modelo en papel de un plásmido recombinante. Haga que

los alumnos completen esta actividad en parejas. Tenga en cuenta que el gen de insulina que se muestra en **RM 3** es un modelo y no es la secuencia completa de pares de bases en el gen de la insulina humana.



**ESTRATEGIA:** Si varias parejas están teniendo problemas con la misma parte de la actividad, pare la clase y revise las instrucciones para esa parte. Es posible que desee que los alumnos que hayan completado con éxito esa parte compartan lo que han hecho.

**Haga que los alumnos comenten la pregunta de *DETÉNGASE Y PIENSE* y de Preguntas de la actividad en pequeños grupos y que registren sus respuestas de forma individual. (15 minutos)**

Durante la actividad, los alumnos deben debatir las preguntas en sus grupos y registrar sus respuestas de forma individual. Luego, pida a los alumnos que compartan sus respuestas y razonamiento para cada pregunta con la clase. Circule para realizar un seguimiento de los comentarios y brindar apoyo.



Posible respuesta para la pregunta *DETÉNGASE Y PIENSE*:

¿Por qué es importante usar la misma enzima o enzimas para cortar tanto el plásmido como el gen de la insulina del ADN humano? *Para que tengan secuencias complementarias de bases que puedan coincidir y permitir que los dos segmentos de ADN se unan.*

Posibles respuestas a las Preguntas de las actividades:

1. ¿Qué enzima de restricción eligió? ¿Por qué eligió esa? *La enzima de restricción EcoRI es la única enzima que corta el plásmido una vez sin alterar un gen.*
2. ¿Dónde insertaría el gen de la insulina y por qué? *El gen debe insertarse cerca de la secuencia promotora, ya que esta secuencia permitirá que el gen se transcriba en la célula bacteriana.*
3. ¿Qué antibiótico usaría para determinar si se tomó el ADN recombinante? *Se puede usar ampicilina o kanamicina, ya que ambos genes son parte del plásmido recombinante final.*

**Dirija un debate a partir de las respuestas de los alumnos. (15 minutos)**

Haga que los alumnos compartan sus respuestas y su razonamiento para *DETÉNGASE Y PIENSE* y Preguntas de la actividad con la clase A medida que los alumnos compartan sus respuestas, evalúe el conocimiento de los alumnos sobre cómo se utilizan las enzimas de restricción en la ingeniería genética.

## ANTECEDENTE CIENTÍFICO: ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

A principios de la década de 1970, Hamilton Smith y Daniel Nathans pudieron purificar un “agente” inmune desconocido que se encontró en las bacterias. Este agente molecular protegió a las bacterias al restringir el crecimiento de los virus bacteriófagos. Se descubrió que el agente era una enzima que podía cortar el ADN viral en fragmentos a medida que se inyectaba en su célula. Smith, Nathans y Werner Arber recibieron el Premio Nobel por su descubrimiento y caracterización de estas importantes moléculas.

Existen varias clases de enzimas de restricción, pero las que han sido más útiles son las que reconocen y cortan consistentemente una secuencia de nucleótidos específica. Algunas enzimas de restricción reconocen una secuencia de cuatro bases; otras reconocen una secuencia de cinco o seis bases. Los sitios de restricción son palíndromos. Este es un concepto importante que puede enfatizar a sus alumnos, tal vez utilizando ejemplos como “radar” y “Madam, I'm Adam”.

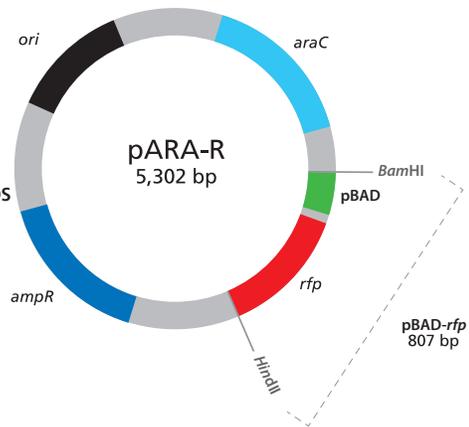
Algunas enzimas de restricción harán un “corte contundente”, sin dejar bases sobresalientes. Otras enzimas, incluidas *Bam*HI y *Hind*III, dejarán bases sobresalientes, creando así extremos adhesivos. Estas enzimas son particularmente útiles ya que los extremos adhesivos hacen que la recombinación de fragmentos de ADN sea un procedimiento bastante simple. Lo “adhesivo” es el resultado de la extraordinaria afinidad de los nucleótidos complementarios para formar enlaces de hidrógeno entre ellos.

La nomenclatura para las enzimas de restricción es bastante sencilla. La primera letra del nombre de la enzima se deriva del género de bacteria de la cual se aisló la enzima. Las siguientes dos letras provienen de las dos primeras letras del epíteto específico de la bacteria. A menudo hay una cuarta letra después de las tres primeras, que representa la cepa o el tipo de bacteria. Debido a que algunas cepas de bacterias producen varias enzimas de restricción, un número romano identifica el orden en que se aislaron las enzimas. **Tabla 5B.1** en la página D-7 de la Guía del estudiante, se muestran algunos ejemplos de enzimas de restricción aisladas de diferentes cepas de bacterias y las secuencias de ADN que cortan.

## ANTECEDENTE CIENTÍFICO: LOS COMPONENTES DEL PLÁSMIDO pARA-R

El plásmido recombinante que se utiliza en este programa para clonar el gen *rfp* es el plásmido pARA-R (ver Figura T5B.1). Se han desarrollado muchos tipos diferentes de vectores plasmídicos para clonar genes. Todos tienen los componentes básicos necesarios para clonar y expresar genes en bacterias, incluida una secuencia para iniciar la replicación del ADN (el punto *ori*), un promotor para iniciar la transcripción, un marcador seleccionable y un sitio

Figura T5B.1: El plásmido pARA-R



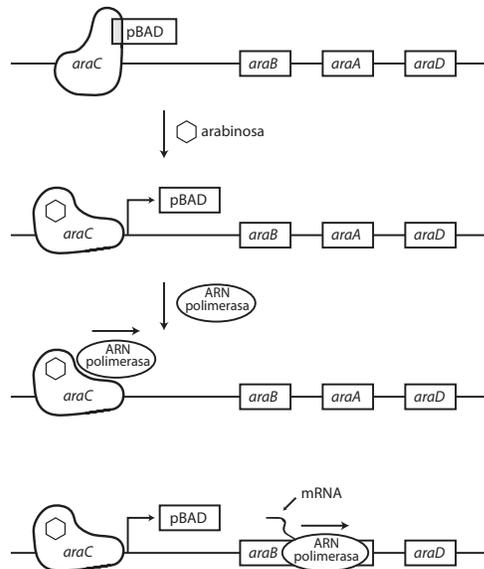
o sitios de restricción cerca del promotor para insertar el gen de interés. El plásmido pARA-R se ha construido de manera que el gen se inserte utilizando *Bam*HI y *Hind*III. El uso de dos enzimas de restricción diferentes asegura que el gen *rfp* se insertará en una sola orientación, la apropiada para transcribir la cadena de sentido del ADN. Es posible que desee revisar la idea de las cadenas “de sentido” y “antisentido” con los alumnos.

El plásmido pARA-R se ha construido para incluir componentes del operón arabinosa, que permiten la expresión del gen *rfp* gen a ser regulado. Todos los organismos vivos, incluidas las bacterias, tienen la capacidad de regular la expresión de sus genes. El ejemplo más obvio de esta regulación se da en la diferenciación celular en organismos multicelulares. La mayoría de las células contienen el complemento completo de ADN, pero durante la diferenciación solo ciertos genes se expresan a medida que las células se convierten en células de la piel, los músculos o las raíces. Gran parte de esta regulación ocurre al nivel de iniciación de la transcripción. El inicio de la transcripción puede ser activado por proteínas llamadas activadores, o desactivado por proteínas llamadas represores. Si bien las bacterias no se diferencian, sí responden a las condiciones ambientales, como la presencia o ausencia de un azúcar, incluida la arabinosa. El operón arabinosa es un ejemplo clásico de regulación génica en bacterias (vea la Figura T5B.2). El operón comprende tres genes, *araB*, *araA* y *araD*, que codifican las proteínas responsables del transporte y la descomposición de la arabinosa. También incluye un promotor y una secuencia 5' de ADN próximo al promotor, que se une a la proteína AraC. La proteína AraC regula la expresión de los genes de arabinosa permitiendo su transcripción en presencia de arabinosa o desactivando la expresión génica en su ausencia.

En ausencia de arabinosa, la proteína AraC bloquea la unión de la ARN polimerasa al promotor; por lo tanto, no puede iniciarse la transcripción, y los tres genes: *araB*, *araA* y *araD*, no se expresan. Cuando la arabinosa está presente en el medioambiente, el azúcar se une a la proteína AraC,

lo que altera la forma del ADN de tal manera que la ARN polimerasa puede unirse al promotor y los genes *araB*, *araA* y *araD* se expresan. El plásmido pARA-R utilizado en este programa tiene el promotor pBAD y el gen *araC*, así como los genes resistentes a la ampicilina y la kanamicina. Los genes *araB*, *araA* y *araD* han sido eliminados y reemplazados por el gen *rfp*, poniendo el gen *rfp* bajo el control del promotor de arabinosa. Las colonias de bacterias que albergan este plásmido serán rojas en presencia de arabinosa y blancas en su ausencia.

**Figura T5B.2: El operón arabinosa**



## SESIÓN 4

**IDEAS CLAVE:** Una vez que se ha creado un plásmido recombinante, este debe ser captado por las bacterias para que pueda usar la maquinaria de las células bacterianas para replicarse y expresar el gen de interés. El proceso en el que la bacteria capta el ADN de su entorno se llama transformación. Debido a que las bacterias son organismos unicelulares que existen en un ambiente hostil, no se transforman fácilmente. Sin embargo, con una preparación específica, 1 de cada 1,000 células captarán plásmidos.



Haga que los alumnos lean **Transformar bacterias con plásmidos recombinantes** y que contesten las preguntas de **CONSIDERAR**. (10 minutos)

En esta lectura, los alumnos aprenden sobre la transformación, que es la captación de ADN por las bacterias. La célula bacteriana proporciona la maquinaria celular que permite que un plásmido recombinante se replique y exprese un gen. Los alumnos aprenden que el código de ADN y los procesos de transcripción y traducción son universales, lo que hace posible que las bacterias expresen un gen humano. Haga

que los alumnos anoten las respuestas de las preguntas de *CONSIDERAR* en sus cuadernos. Recuerde a los alumnos que usen el **Glosario** para buscar términos científicos si necesitan ayuda para entender la lectura.

**Dirija un debate sobre las respuestas de los alumnos a las preguntas de *CONSIDERAR* preguntas de Transformas bacterias con plásmidos recombinantes. (5 minutos)**

Evalúe el conocimiento de los alumnos sobre la expresión génica, la absorción de plásmidos, el ADN y cómo se usan las ligasas en ingeniería genética al revisar sus respuestas a las preguntas de *CONSIDERAR*.



Posibles respuestas a las preguntas de *CONSIDERAR*:

- 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? *El vector debe introducirse dentro de una célula para que su ADN pueda transcribirse y traducirse en una proteína. Si el vector contiene un activador para el promotor, como araC, podría ser necesaria una sustancia como la arabinosa.*
- ¿Por qué es importante que las paredes celulares de las bacterias de *E. coli* regulen cuidadosamente qué sustancias pueden entrar y salir de la célula? *La célula regula las sustancias que pueden entrar y salir porque algunas sustancias pueden afectarla negativamente.*

**Haga que los alumnos comiencen el Laboratorio 5B. Haga que los alumnos lean los párrafos introductorios y respondan las preguntas de *Antes del laboratorio* en sus grupos. (30 minutos)**

Los alumnos comentan las preguntas de *Antes del laboratorio* en sus grupos y registran sus respuestas de forma individual.

## SESIÓN 5



**IDEAS CLAVE:** Las células bacterianas que se han transformado con el plásmido **pARA-R** se identifican al cultivarlas en presencia de ampicilina y arabinosa. La ampicilina evitará el crecimiento de células que no portan un gen de resistencia a la ampicilina, y la arabinosa activará el promotor bacteriano que controla la expresión del gen *rfp*.

**Haga que los alumnos continúen el Laboratorio 5B. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y de *DETÉNGASE Y PIENSE* con la clase y que expliquen su razonamiento. (45 minutos)**

**NOTA:** Hay dos períodos de espera de 15 minutos durante este laboratorio, durante los cuales los alumnos pueden compartir sus respuestas a estas preguntas.

Los alumnos realizan una actividad de laboratorio, Laboratorio 5B, en la que transforman bacterias con el plásmido pARA-R que contiene el gen *rfp* y el gen *ampR*. Los alumnos aprenden sobre la importancia de los controles cuando seleccionan las bacterias que han tomado el plásmido pARA-R.

Haga que los alumnos completen los pasos 1–6 en la sección *Métodos*. Luego, mientras los tubos P– y P+ están en hielo durante 15 minutos, haga que los alumnos compartan sus respuestas a la pregunta 3 en *Antes del laboratorio*. (Todas las preguntas de *Antes del laboratorio* y las posibles respuestas siguen).

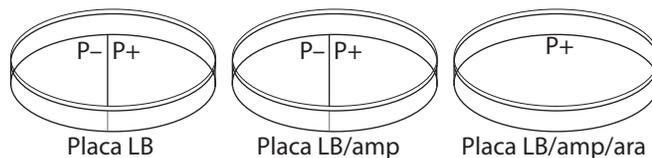
Posibles respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio*:

1. La ampicilina es un antibiótico que mata 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? *Solo las células que tienen un plásmido que contiene el gen de resistencia a la ampicilina podrán crecer en presencia de ampicilina. Puede seleccionar las células que se han transformado, que son muy pocas.*
2. ¿Qué sucederá cuando las células bacterianas que contienen el plásmido pARA-R no reciban arabinosa? *Los genes *rfp* no puede expresarse a menos que la célula reciba arabinosa. Solo en presencia de arabinosa la proteína activadora AraC activará al promotor del gen *rfp*.*

**IR MÁS ALLÁ:** Es posible que desee proporcionar información más detallada a los alumnos sobre cómo funciona la proteína activadora AraC, utilizando la información en *Antecedentes científicos: los componentes del plásmido pARA-R* en las páginas D-16 y D-17.

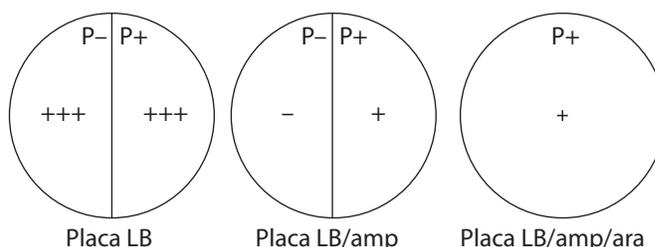


3. En el laboratorio, agregará muestras del grupo control P– y del grupo experimental P+ a las placas que contienen varias combinaciones de caldo de Luria (LB), ampicilina y el azúcar arabinosa. Las placas se organizarán de la siguiente manera:



Usando la clave sobre **Predicciones de crecimiento bacteriano (RM 5)**, muestre sus predicciones para el crecimiento que esperaría para cada combinación. Entonces 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.

Predicciones para cada placa:



Respuestas para las **Tablas 1 y 2** en **RM 5**:

**Tabla 1: Grupo de control P- (bacterias no transformadas)**

Placa Contiene:	Crecimiento previsto	Conclusión si se produce un crecimiento previsto	Conclusión si no se produce el crecimiento previsto
Caldo Luria (LB)	+++	<i>Las bacterias no transformadas están vivas, y el caldo Luria puede apoyar su crecimiento</i>	<i>Problema con bacterias, caldo Luria o métodos</i>
Caldo Luria ampicilina (LB / amp)	-	<i>La ampicilina mata las bacterias no transformadas</i>	<i>Problema con ampicilina</i>

**Tabla 2: Grupo Experimental P+ (bacterias transformadas)**

Placa Contiene:	Crecimiento previsto	Conclusión si se produce un crecimiento previsto	Conclusión si no se produce el crecimiento previsto
Caldo Luria (LB)	+++	<i>Las bacterias transformadas están vivas, y el caldo Luria puede apoyar su crecimiento; las bacterias no fueron afectadas por el proceso de transformación</i>	<i>Problema con bacterias, caldo Luria o proceso de transformación</i>
Caldo Luria ampicilina (LB / amp)	+	<i>Algunas bacterias transformadas tienen plásmidos con resistencia a la ampicilina</i>	<i>La transformación no funcionó</i>
Caldo Luria ampicilina arabinosa (LB / amp / ara)	+	<i>Algunas bacterias transformadas tienen plásmidos con resistencia a la ampicilina</i>	<i>Problema con arabinosa; la transformación no funcionó</i>

**ESTRATEGIA:** Muchos alumnos luchan por entender los controles y se beneficiarán de un debate sobre el crecimiento de las bacterias no transformadas y transformadas en cada condición. Ayude a los alumnos a comprender que cada control está diseñado para proporcionar una respuesta a una pregunta útil, es decir:



- ¿Son viables las células antes de la transformación?
- ¿La ampicilina mata las células no transformadas?
- ¿Son viables las células después del procedimiento de transformación?
- ¿Fue exitosa la transformación en la medida en que algunas células han adquirido resistencia a la ampicilina?
- ¿Alguna célula transformada produce RFP?

Puede pedirles a los alumnos que consideren un escenario en el que las células se transformaron y se colocaron en la placa LB / amp / ara, pero luego no crecieron, y usted no llevó a cabo ningún control. Ayude a los alumnos a comprender que solo si el experimentador ha cultivado la bacteria en cada condición puede determinar por qué el procedimiento de transformación no funcionó.

Si los alumnos se preguntan por qué las células no transformadas no se colocan en la placa LB / amp / ara, puede explicarles si esto responde a una pregunta útil que arroja luz sobre el éxito del experimento.

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 accidentalmente. Diseñe un experimento que le permita ordenar los dos tipos de bacterias. (Pista: ¡Asegúrese de no eliminar uno de los tipos de bacterias que intenta clasificar!) *Las bacterias deben dividirse en dos lotes; un lote debe tratarse con kanamicina y el otro lote debe tratarse con ampicilina.*
5. Lea la sección de *Métodos* en las páginas de D-21 a D-25 de la Guía del estudiante y describa brevemente los pasos, utilizando palabras y un diagrama de flujo. *Las respuestas de los alumnos serán variadas. El diagrama de flujo de un estudiante puede parecerse a los de las páginas D-22 y D-23.*

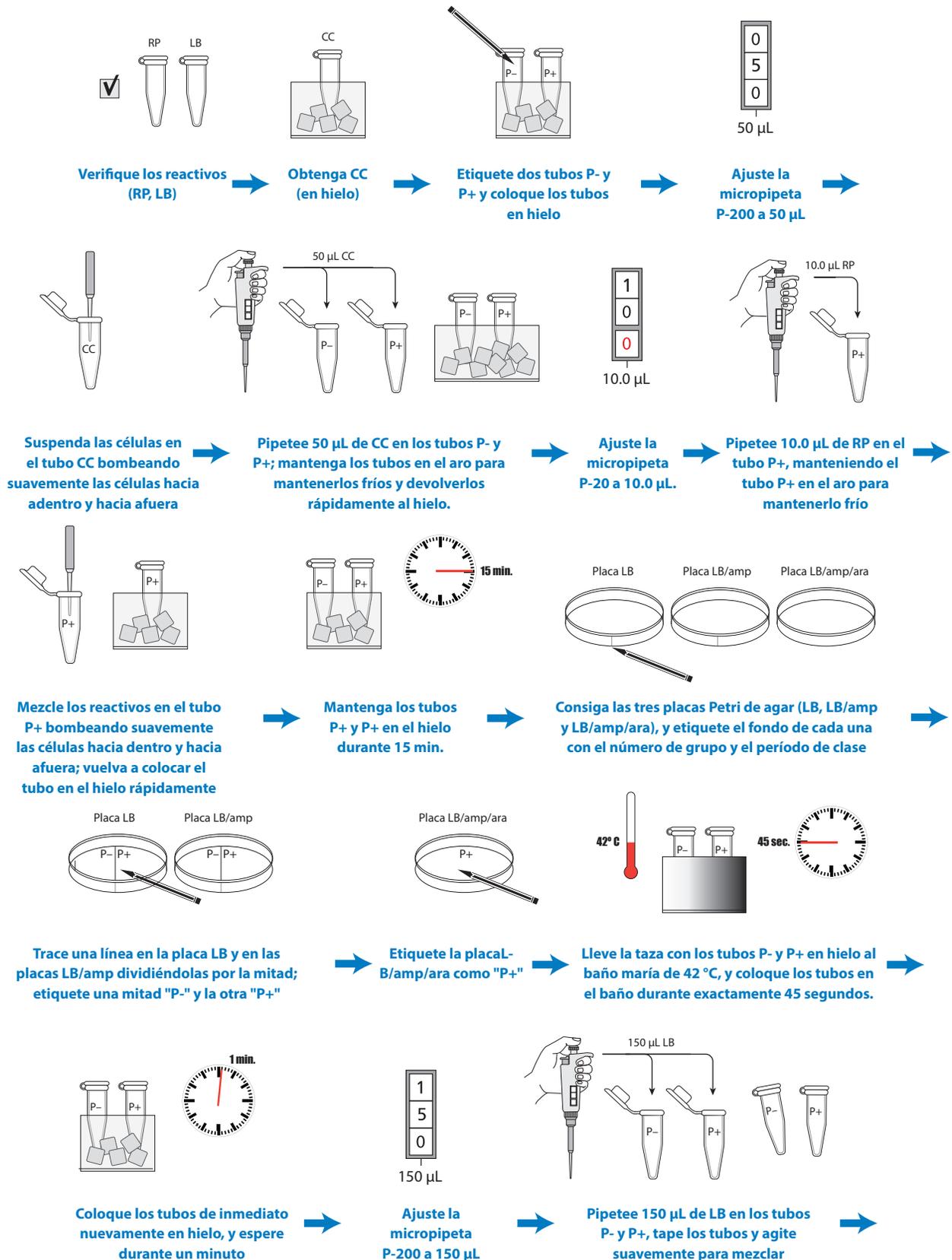
Mientras los tubos P– y P+ se incuban por 15 minutos en el paso 11, haga que los alumnos discutan las preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE* y que registren sus respuestas de forma individual. Pida a los alumnos que compartan sus respuestas y razonamiento para cada pregunta con la clase.

Posibles respuestas para las preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE*:

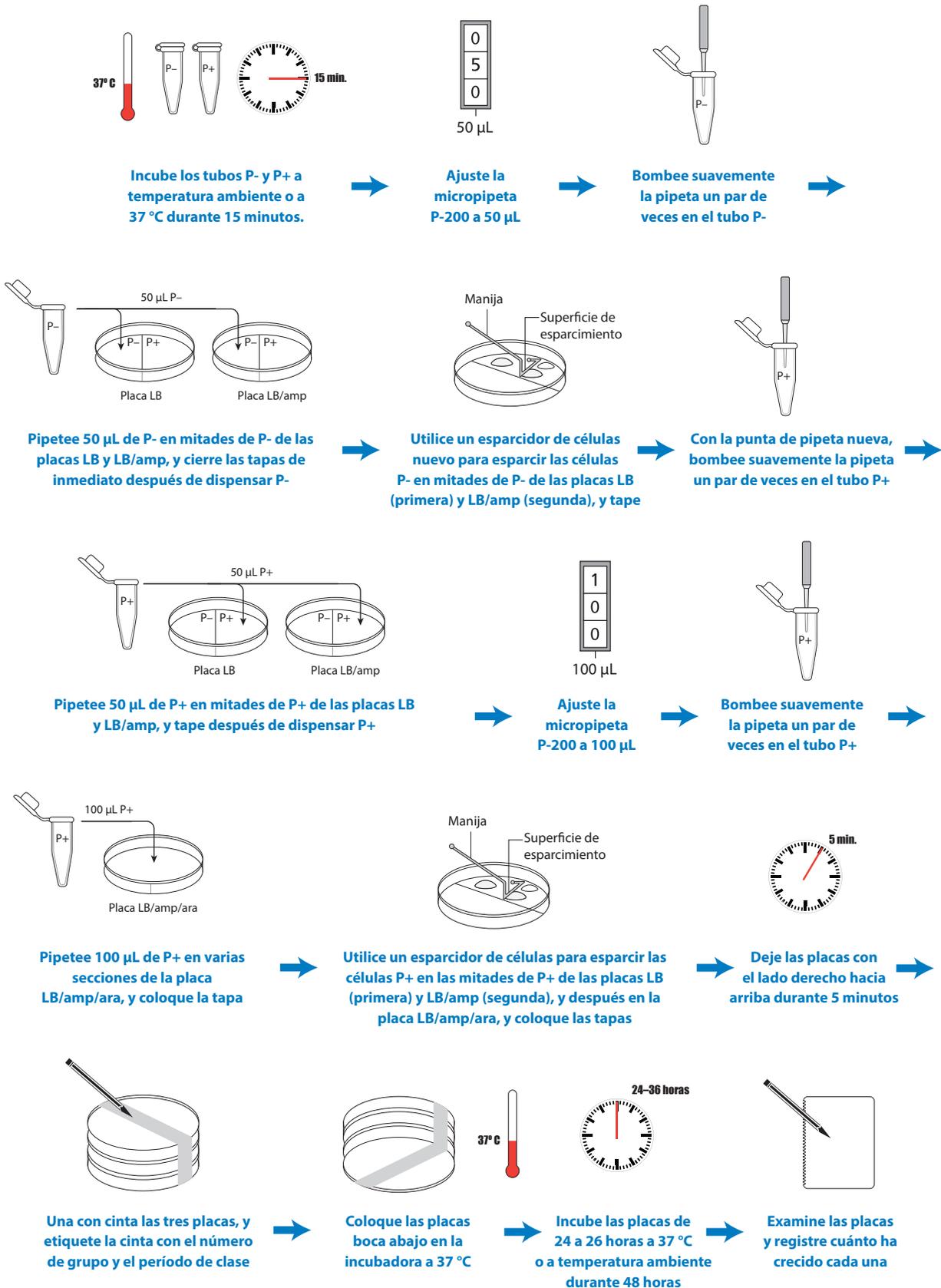
- ¿De qué diferente manera se trató el cultivo de bacterias P+ del cultivo de bacterias P–? (Un *cultivo* es una población aislada de células). ¿Cuál es el propósito del cultivo de bacterias P–? *El cultivo de bacterias P+ se mezcla con los plásmidos recombinantes, mientras que el cultivo de bacterias P– no se mezcla con los plásmidos recombinantes. El propósito del cultivo de bacterias P– es asegurarse de que las células y las condiciones de crecimiento*



## Diagrama de flujo del laboratorio 5B



## Diagrama de flujo del laboratorio 5B (continuación)



funcionen como se esperaba. El cultivo de bacterias P- debe crecer bien en el caldo Luria y debe morir cuando se expone al antibiótico ampicilina.

- ¿Por qué las células necesitan tiempo para recuperarse después del choque térmico? *El choque implica que el calor pone a las bacterias bajo estrés. Dejar que las bacterias se asienten sin someterlas a nada más les da tiempo a las células para volver a su estado habitual.*
- ¿Por qué se incuban las células a 37 °C? *Las bacterias están adaptadas para crecer dentro del cuerpo humano, el cual mantiene esa temperatura.*
- Usó una técnica aséptica en este laboratorio. ¿Por qué esto es importante? *La técnica aséptica puede evitar la transferencia de bacterias del experimento al medioambiente y del medioambiente al experimento.*

Al final del laboratorio, recuerde a los alumnos que coloquen todos los materiales que entren en contacto con células de *E. coli* en la bolsa de residuos con riesgo biológico etiquetada.

## SESIÓN 6



**IDEAS CLAVE:** Las células bacterianas transformadas con el plásmido pARA-R se identifican mediante un proceso de selección que utiliza las secuencias que se han manipulado en el plásmido.

### Haga que los alumnos completen el Laboratorio 5B. (10 minutos)

Haga que los alumnos retiren sus placas de las incubadoras y registren sus resultados en sus cuadernos. Si planea llevar a cabo el Laboratorio 6, guarde algunas placas que tengan colonias rojas o rosadas brillantes, y haga que los alumnos coloquen las placas restantes en una bolsa de residuos con riesgo biológico.

### Demuestre cómo establecer un cultivo en suspensión para las bacterias transformadas, como preparación para el Capítulo 6. (5 minutos)

Siga las instrucciones detalladas en la sección **Preparación** (*Cultivar bacterias para la purificación de proteínas*, página E-6 de esta guía). Eliminará algunas colonias celulares transformadas de las placas y las colocará en un cultivo en suspensión en un agitador. Estas células y los plásmidos pARA-R que contienen se multiplicarán en los próximos días.

## Revise la transcripción, la traducción y la relación entre genes, proteínas y rasgos. (10 minutos)

**ESTRATEGIA:** Revisar el conocimiento previo importante ayuda a los alumnos a aplicar lo que han aprendido previamente.



Use esta revisión para abordar las brechas en el conocimiento de los alumnos, según lo determinado por sus respuestas a las preguntas 2 y 3 *¿Qué sabes ya?* Consulte la **Figura 5B.6** en la página D-16 de la Guía del estudiante durante su revisión.

## Pida a los alumnos que discutan las Preguntas del Capítulo 5B en grupos pequeños y que registren sus respuestas de forma individual. Dirija un debate a partir de las respuestas de los alumnos. (20 minutos)

Haga que los alumnos reflexionen sobre su comprensión de cómo se usan los plásmidos y las enzimas de restricción en la clonación de genes, del proceso de selección para identificar células bacterianas transformadas con el plásmido pARA-R y la expresión de genes respondiendo las *Preguntas del Capítulo 5B*.

Posibles respuestas a las *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. *Las características importantes de un vector plasmídico son (1) una secuencia para el inicio de la replicación del ADN, ori, que permite que el plásmido se replique en la bacteria; (2) un promotor para iniciar la transcripción del gen insertado; y (3) un gen que codifica una proteína para la resistencia a los antibióticos, lo que permite la identificación de bacterias que han captado el plásmido.*
2. Al seleccionar una enzima de restricción para la clonación, ¿qué consideraciones importantes deben tenerse en cuenta? *Diferentes enzimas de restricción cortan en diferentes secuencias de ADN. Debe examinar las secuencias en el ADN plasmídico y en el ADN humano y encontrar una única enzima de restricción que (1) corte el plásmido en un solo sitio que no esté dentro de ningún gen o secuencia importante y que esté cerca del promotor para que el gen insertado puede expresarse y (2) cortar el ADN humano lo más cerca posible de ambos extremos del gen de interés sin cortar dentro del gen.*
3. Según su comprensión de la evolución, ¿por qué las bacterias retienen un gen que les da resistencia a los antibióticos? ¿Cómo es que la existencia de las bacterias con resistencia a los antibióticos afecta a la medicina hoy en día? *Las bacterias con el gen de resistencia a los antibióticos se reproducirán más porque tienen una ventaja selectiva sobre otras bacterias que no portan ese gen. Esta ventaja selectiva es una gran preocupación en medicina porque ahora existen cepas de bacterias que causan enfermedades que los antibióticos no pueden matar.*
4. Mire los resultados de su transformación. ¿Sus resultados reales coinciden con los resultados pronosticados? Si no, ¿qué diferencias ve y cuáles son algunas explicaciones para estas diferencias? *Las respuestas variarán. Si se producen resultados inesperados, ayude a los alumnos a pensar en lo que*

*podría haber sucedido. Hay muchos procedimientos en los que podría haber ocurrido un error que podría afectar los resultados.*

5. *¿Por qué aparecieron las colonias rojas solo en la placa LB/amp/ara y no en la placa LB/amp? El gen rfp no puede expresarse a menos que la célula reciba arabinosa, ya que el operón de arabinosa solo activará el promotor genético rfp en presencia de arabinosa.*
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? En ingeniería genética, el objetivo es producir muchos productos, como la insulina. Más copias del plásmido y su gen darán como resultado la producción de más producto dentro de la célula.*
7. *¿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. El gen rfp en el plásmido está compuesto de ADN, y el gen se copia en el ARN mensajero. Este proceso se llama transcripción. El ARN mensajero se utiliza para construir la proteína en el ribosoma al unirse para transferir moléculas de ARN que combinan codones y aminoácidos; los aminoácidos luego se unen para formar la proteína. Este proceso se llama traducción. La proteína puede contribuir a un rasgo, y en este caso la RFP hace las células rojas.*
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? La estructura y el código del ADN, y la maquinaria celular que lleva a cabo la transcripción y la traducción, son los mismos en todos los organismos vivos.*



**ESTRATEGIA:** Mientras dirige el debate, aplique las siguientes prácticas:

- Dé a los alumnos tiempo para evaluar las respuestas de los demás.
- Pida aclaraciones.
- Pida una explicación.
- Replantee o reformule.
- Pida un ejemplo.
- Pida evidencia.
- Proporcione ejemplos y contraejemplos.
- Pida a los alumnos que aporten una explicación.
- Pida a los alumnos que evalúen una respuesta.

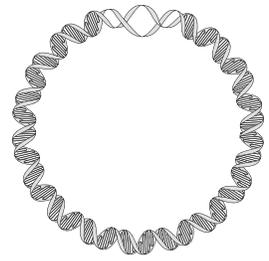
E

# **AMGEN<sup>®</sup> Biotech Experience**

Scientific Discovery for the Classroom

**AMGEN<sup>®</sup> Foundation**





## **CAPÍTULO 6**

# **CONSEGUIR LO QUE NECESITAMOS**



# DESCRIPCIÓN GENERAL

---

En este capítulo, los alumnos completan los pasos finales en el proceso de ingeniería genética, obteniendo y separando una proteína de interés creada por un gen clonado. Los alumnos leen sobre el crecimiento de células bacterianas, cómo la conformación de proteínas se relaciona con la función de las proteínas, el plegamiento de proteínas y el papel de los aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos tanto en el plegamiento de proteínas como en la separación de proteínas. En el laboratorio, los alumnos lisan las bacterias transformadas y luego usan la cromatografía en columna para separar la RFP del resto de las proteínas celulares.

## SUPUESTOS DEL CONOCIMIENTO PREVIO

Los estudiantes ya deben saber lo siguiente:

- La relación entre el ADN, los genes, las proteínas y los rasgos, específicamente, que son los genes los que contienen el código para fabricar una proteína y que las proteínas son moléculas que se utilizan para fabricar y desarrollar la célula, por lo que son responsables de los rasgos.
- Las bacterias experimentan reproducción asexual por división celular
- Las proteínas son biomoléculas grandes que consisten en una o más cadenas largas formadas por bloques de construcción llamados aminoácidos.
- Las proteínas tienen muchas funciones, incluida la de actuar como una enzima (aceleran las velocidades de reacción), transportar moléculas, señalizar y formar estructuras
- Se pueden formar enlaces no covalentes basados en atracciones eléctricas débiles entre diferentes moléculas o dentro de una molécula
- Las moléculas o iones que son solubles en agua forman enlaces no covalentes débiles basados en atracciones eléctricas débiles

## OBJETIVOS DE APRENDIZAJE

Al final de este capítulo, los estudiantes podrán hacer lo siguiente:

- Describa las condiciones que son favorables para el crecimiento bacteriano.
- Explique cómo la conformación de una proteína (forma tridimensional) se relaciona con su función.
- Explique cómo se produce el plegamiento de las proteínas.
- Explique cómo la cromatografía en columna separa las proteínas.

## RESULTADOS EVALUADOS

- Evalúe la capacidad de cada estudiante para explicar cómo se relaciona la conformación de una proteína con su función revisando sus respuestas a la pregunta 1 en *Preguntas del Capítulo 6* (página E-16 de la Guía del estudiante).
- Evalúe la capacidad de cada estudiante para describir cómo se produce el plegamiento de la proteína revisando sus respuestas a la pregunta 2 en *Preguntas del Capítulo 6* (página E-16 de la Guía del estudiante).

- Evalúe la capacidad de cada alumno para explicar cómo la cromatografía en columna separa las proteínas revisando sus respuestas a la primera pregunta de *DETÉNGASE Y PIENSE* en el Laboratorio 6, Parte B (página E-14 de la Guía del estudiante) y a las preguntas 3–5 en las *Preguntas del Capítulo 6* (página E-16 de la Guía del estudiante).

## SECUENCIA DE ACTIVIDADES SUGERIDA

### SESIÓN 1

- Revise la **Introducción** y los *Objetivos del Capítulo 6* con los alumnos. (5 minutos)
- Pida a los estudiantes que contesten las preguntas *¿Qué sabes ya?* y que compartan sus respuestas. (10 minutos)
- Haga que los alumnos lean **Producir la proteína de interés** y que contesten las preguntas de *CONSIDERAR*. (20 minutos)
- Dirija un debate sobre las respuestas de los alumnos a las preguntas de *CONSIDERARE* de **Producir la proteína de interés**. (10 minutos)

### SESIÓN 2

- Haga que los alumnos lean el párrafo introductorio del Laboratorio 6, compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y complete la Parte A. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE* con la clase. (45 minutos)

### SESIÓN 3

- Haga que los alumnos completen el Laboratorio 6, Parte B. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE* con la clase y que expliquen su razonamiento. (30 minutos)
- Pida a los alumnos que discutan las *Preguntas del Capítulo 6* en grupos pequeños y que registren sus respuestas de forma individual. Dirija un debate a partir de las respuestas de los alumnos. (15 minutos)

## PREPARACIÓN

---

Antes de comenzar, debe familiarizarse con los procedimientos de laboratorio en cada capítulo, la preparación requerida y los materiales que necesitará. Las instrucciones suponen que proporcionará materiales para 12 grupos de 2 o 3 alumnos. Multiplique las cantidades según sea necesario en función de la cantidad de alumnos y el número de clases que imparte.

### REVISE LAS PRECAUCIONES DE SEGURIDAD Y LOS PROCEDIMIENTOS DE ELIMINACIÓN DE RESIDUOS PARA EL LABORATORIO 6

Revise las precauciones de seguridad y los procedimientos de eliminación de residuos de las páginas OV-15 y OV-16 con los alumnos.

### COLUMNAS DE CROMATOGRAFÍA

Un día o dos antes del laboratorio, asegúrese de que las columnas estén colocadas en posición vertical y que la llave de paso esté en la posición correcta (horizontal = bloqueada). Si la resina parece estar en los lados de cualquiera de las columnas o está seca, agregue varios mililitros de etanol al 20 % a la columna. Deje que el etanol drene hasta que haya una capa de aproximadamente 2 mm por encima del lecho de resina.

**NOTA:** Después del laboratorio de cromatografía, agregue 20 % de etanol al lecho de resina con la llave de paso cerrada. Asegúrese de que las columnas estén en posición vertical con la llave de paso en la posición bloqueada.

### PREPARE ALÍCUOTAS DE REACTIVOS PARA LABORATORIO 6, PARTE A

Un día o dos antes del laboratorio, prepare gradillas con los reactivos necesarios:

1. Etiquete tubos de microcentrífuga de 1.5 ml de la siguiente manera:
  - 12 tubos de microcentrífuga marcados con "EB"
  - 12 tubos de microcentrífuga marcados con "LyB"
2. Pipetee los reactivos en los tubos de microcentrífuga etiquetados de la siguiente manera:
  - 200 µl de tampón de elución en los tubos marcados con "EB"
  - 160 µl de tampón de lisis en los tubos marcados como "LyB"
3. Tape los tubos. Guarde el tampón de lisis en el congelador.

**NOTA:** Otros reactivos pueden almacenarse a temperatura ambiente.

## CULTIVAR BACTERIAS PARA LA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Exactamente un día antes de comenzar el Laboratorio 6, prepare un cultivo en suspensión de bacterias que se han transformado con el plásmido pARA-R (provisto en su kit).

1. Reúna los siguientes materiales:
  - Asa de inoculación
  - Células transformadas (EC, proporcionadas en el kit)
  - Matraz estéril que contiene caldo LB / amp
  - Tapa ventilada para matraz
  - Agitador
  - Tubo de arabinosa estéril (500 mg / ml)
2. Prepare el cultivo en suspensión:
  - Usando el asa de inoculación, transfiera de manera aséptica 500  $\mu$ l de células transformadas al matraz estéril que contiene caldo LB / amp.
  - Asegure la tapa ventilada al matraz.
  - Agite e incube el matraz (a 37 °C) durante cuatro a cinco horas. El caldo LB / amp debe volverse turbio, lo que indica que las células están creciendo.
  - Agregue suficiente arabinosa estéril al matraz para que la concentración final de arabinosa sea 5 mg / ml de caldo LB / amp.
  - Continuar agitando durante la noche.
  - Asegúrese de que el cultivo esté de color rojo brillante a la mañana siguiente. Si no es así, el procedimiento no fue exitoso.

## REÚNA LOS MATERIALES PARA LABORATORIO 6, PARTE A

**NOTA:** Reúna estos materiales el día del laboratorio.

1. Etiquete 12 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml con "EC".
2. Pipetee 1,000  $\mu$ l (1 ml) del cultivo en suspensión de LB / amp / ara de *E. coli* en los tubos marcados con "EC".

**NOTA:** Cada grupo necesitará un 1,000  $\mu$ l (1 ml) de cultivo en suspensión adicional de LB / amp / ara de *E. coli* durante el laboratorio; un estudiante de cada grupo le traerá el tubo EC para que pueda agregar esta solución adicional.

3. Prepare 12 juegos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:
  - Gradilla de plástico para tubos de microcentrífuga que contengan los siguientes reactivos:
    - ◆ Tubo de microcentrífuga del cultivo LB/amp/ara de *E. coli* (EC)
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de tampón de elución (EB)
    - ◆ Tubo de microcentrífuga de tampón de lisis (LyB)
  - Recipiente de recolección de residuos líquidos, como un vaso de precipitado pequeño
  - Micropipeta P-200
  - Caja de puntas para puntas de pipetas desechables
  - Marcador permanente

- Contenedor de residuos para puntas y tubos de microcentrífuga usados (necesitará 1 contenedor por cada 2 grupos)
  - Bolsa de riesgo biológico para materiales que entran en contacto con células de *E. coli* competentes
4. Coloque la microcentrífuga en una ubicación central para que todos los grupos puedan compartirla.

## INCUBE LAS CÉLULAS CON TAMPÓN DE LISIS DURANTE LA NOCHE

Al final del Laboratorio 6, Parte A, haga que los grupos le den sus tubos de EC etiquetados con su número de grupo y período de clase. Incube las células a temperatura ambiente durante la noche. Si los alumnos completan la Parte B el día después de la Parte A, mantenga los tubos a temperatura ambiente. De lo contrario, coloque los tubos en el congelador hasta el día del laboratorio. El día que los alumnos completen la Parte B, mueva los lisados celulares congelados al refrigerador para descongelarlos, excepto los lisados para la primera clase del día; déjelos a temperatura ambiente para que se descongelen.

## REÚNA LOS MATERIALES PARA LABORATORIO 6, PARTE B

**NOTA:** Reúna estos materiales el día del laboratorio.

1. Prepare 12 juegos de materiales; cada uno de ellos debe incluir lo siguiente:
- Gradilla de plástico para tubos de microcentrífuga que contiene el tubo de microcentrífuga de células lisadas de la Parte A (EC)
  - Los siguientes reactivos:
    - ◆ Tampón de unión (BB), 4.0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
    - ◆ Tampón de lavado (WB), 1.3 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
    - ◆ Tampón de elución (EB), Tris 10 mM y EDTA 1 mM<sup>7</sup>
    - ◆ Tampón de equilibrio de columna (CEB), 4,0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

**NOTA:** Se le proporcionarán 12 tubos de 15 ml de cada tampón o un recipiente grande de cada tampón. Si tiene los tubos de 15 ml, se puede entregar uno a cada grupo. Si tiene el recipiente más grande, vierta 10 ml de cada tampón en un conjunto de matraces que pueden ser compartidos por dos grupos.

- 2 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
  - Columna de cromatografía
  - Recipiente de recolección de residuos líquidos, como un vaso de precipitado pequeño
  - Micropipeta P-1,000
  - Caja de puntas de pipetas desechables
  - Contenedor de residuos para puntas y tubos de microcentrífuga usados (necesitará 1 contenedor por cada 2 grupos)
2. Coloque la microcentrífuga en una ubicación central para que todos los grupos puedan compartirla.

<sup>7</sup> EDTA es un agente quelante molecular que secuestra iones metálicos.

# ENSEÑANZA

## SESIÓN 1



**IDEAS CLAVE:** Las bacterias transformadas se pueden cultivar y cosechar para proporcionar la proteína producida por el gen clonado. La separación de proteínas requiere una comprensión de la estructura de la proteína. Las proteínas llevan a cabo la mayoría de las funciones celulares, como la catálisis, el transporte, la señalización y la construcción de estructuras. Para llevar a cabo estas funciones, las proteínas se pliegan en conformaciones específicas que exponen sitios de unión que se unen a moléculas específicas. La separación de proteínas en su estado plegado es difícil, por lo que la separación se logra desplegando proteínas en soluciones salinas llamadas tampones. Una vez desplegada, el método de separación de la cromatografía en columna aprovecha el hecho de que diferentes proteínas tienen diferentes cantidades de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos. Una solución tampón que contiene las proteínas desplegadas se pasa a través de una columna de cromatografía que tiene perlas recubiertas de resina, que se unen a las proteínas más hidrofóbicas mientras las proteínas más hidrofílicas pasan a través de la columna. Otras soluciones tampón liberarán las proteínas unidas de la columna haciendo que se plieguen nuevamente.

**Revise la Introducción y los Objetivos del Capítulo 6 con los alumnos. (5 minutos)**

La **Introducción** explica el propósito principal de este capítulo, vinculándolo a la Introducción al programa. Los **Objetivos del Capítulo 6** les dicen a los alumnos en qué deben enfocarse mientras trabajan en este capítulo. Explique a los alumnos qué evaluará en este capítulo y cuáles son sus expectativas por su desempeño.

**Pida a los estudiantes que contesten las preguntas ¿Qué sabes ya? y que compartan sus respuestas. (10 minutos)**

La sección *¿Qué sabes ya?* La sección activa el conocimiento de los alumnos sobre el crecimiento bacteriano y las proteínas, y revela brechas en ese conocimiento. Pida a los alumnos que contesten las preguntas en parejas y que registren y compartan sus ideas para que usted pueda evaluar lo que saben y no saben sobre el crecimiento bacteriano y las proteínas.

Posibles respuestas a las preguntas *¿Qué sabes ya?*:

1. *¿Cómo se reproducen las bacterias? Las bacterias generalmente se reproducen por fisión binaria, que es un tipo de reproducción asexual. La célula crece y luego se divide para formar dos células idénticas (a veces llamadas células hijas) que son genéticamente iguales a la célula madre.*
2. *¿Por qué las proteínas a veces se llaman moléculas de caballo de batalla? Las proteínas llevan a cabo casi todos los procesos celulares y forman estructuras celulares.*

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, señalar o formar estructuras. *Si una proteína es una enzima (catalizadora), su forma puede contener reactivos en una orientación que acelera la reacción. Si una proteína transporta otras moléculas o actúa como una señal, su forma puede coincidir con la forma de otra molécula de manera que se aferre a ella. Si una proteína forma una estructura, su forma puede encajar con otras proteínas que también forman esa estructura.*
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? *A menos que los alumnos hayan estudiado previamente el plegamiento de proteínas, es posible que no puedan responder esta pregunta. El plegamiento de proteínas es el resultado de la formación de enlaces no covalentes débiles entre los aminoácidos, la tendencia de los aminoácidos hidrofóbicos a quedar enterrados dentro de la proteína y la formación de puentes de disulfuro covalentes entre los aminoácidos que contienen azufre.*

### Haga que los alumnos lean **Producir la proteína de interés** y que contesten las preguntas de **CONSIDERAR**. (20 minutos)

En esta lectura, los alumnos aprenden sobre cómo crecen las células bacterianas en condiciones favorables y cómo la conformación de proteínas se relaciona con su función. Los alumnos leen sobre el plegamiento de proteínas y aprenden que un factor en este proceso es la tendencia de los aminoácidos hidrofóbicos insolubles en agua a ser enterrados en el interior de las proteínas. Los alumnos leen que las cantidades relativas de hidrofobicidad e hidrofilia de las proteínas se usan para separar las proteínas en la cromatografía en columna. Haga que los alumnos anoten las respuestas de las preguntas de **CONSIDERAR** en sus cuadernos. Recuerde a los alumnos que usen el **Glosario** para buscar términos científicos si necesitan ayuda para entender la lectura.

### Dirija un debate sobre las respuestas de los alumnos a las preguntas de **CONSIDERARE** de **Producir la proteína de interés**. (10 minutos)

Evalúe el conocimiento de los alumnos sobre cómo crecen las bacterias, el plegamiento y la función de las proteínas, y cómo la cromatografía en columna separa las proteínas revisando sus respuestas a las preguntas de **CONSIDERAR**.

Posibles respuestas a las preguntas de **CONSIDERAR**:

- ¿Por qué podría ser mejor el matraz agitador para soportar el crecimiento celular bacteriano que una placa? *Las células tienen mejor acceso a la comida y al oxígeno en el agitador porque se mueven libremente, en lugar de asentarse una encima de la otra como lo hacen en una placa.*



- 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 gasta 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.

*Entre la mitad y el final de la fase de registro sería un buen momento para activar un gen de interés. En este punto hay una gran cantidad de células sanas. Anteriormente en la curva de crecimiento, hay menos células y menos proteínas. Más adelante en la curva de crecimiento hay células que envejecen con proteínas que se degradan, lo que puede afectar la capacidad de la célula para producir proteínas en grandes cantidades.*

- Si una mutación cambia un aminoácido, ¿cómo podría afectar este cambio al plegamiento de proteínas y a la función de las proteínas? *El cambio puede dar como resultado una proteína plegada de manera incorrecta que no tiene la conformación correcta para llevar a cabo su función. Esta mutación puede causar una enfermedad genética.*
- 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. *Haría nuevos tampones con diferentes concentraciones de sal para tener en cuenta las cantidades relativas de los aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos de las proteínas. La concentración de sal del tampón de elución debe hacer que la proteína de interés se vuelva a plegar y se libere de la columna.*

## SESIÓN 2



**IDEAS CLAVE:** Para obtener una gran cantidad de RFP, las células bacterianas que han sido transformadas por el plásmido pARA-R según se identifica por el proceso de selección se cultivan en condiciones de crecimiento favorables y se alimentan de arabinosa para activar el gen *rfp*. Las células bacterianas se lisan para liberar el contenido celular.

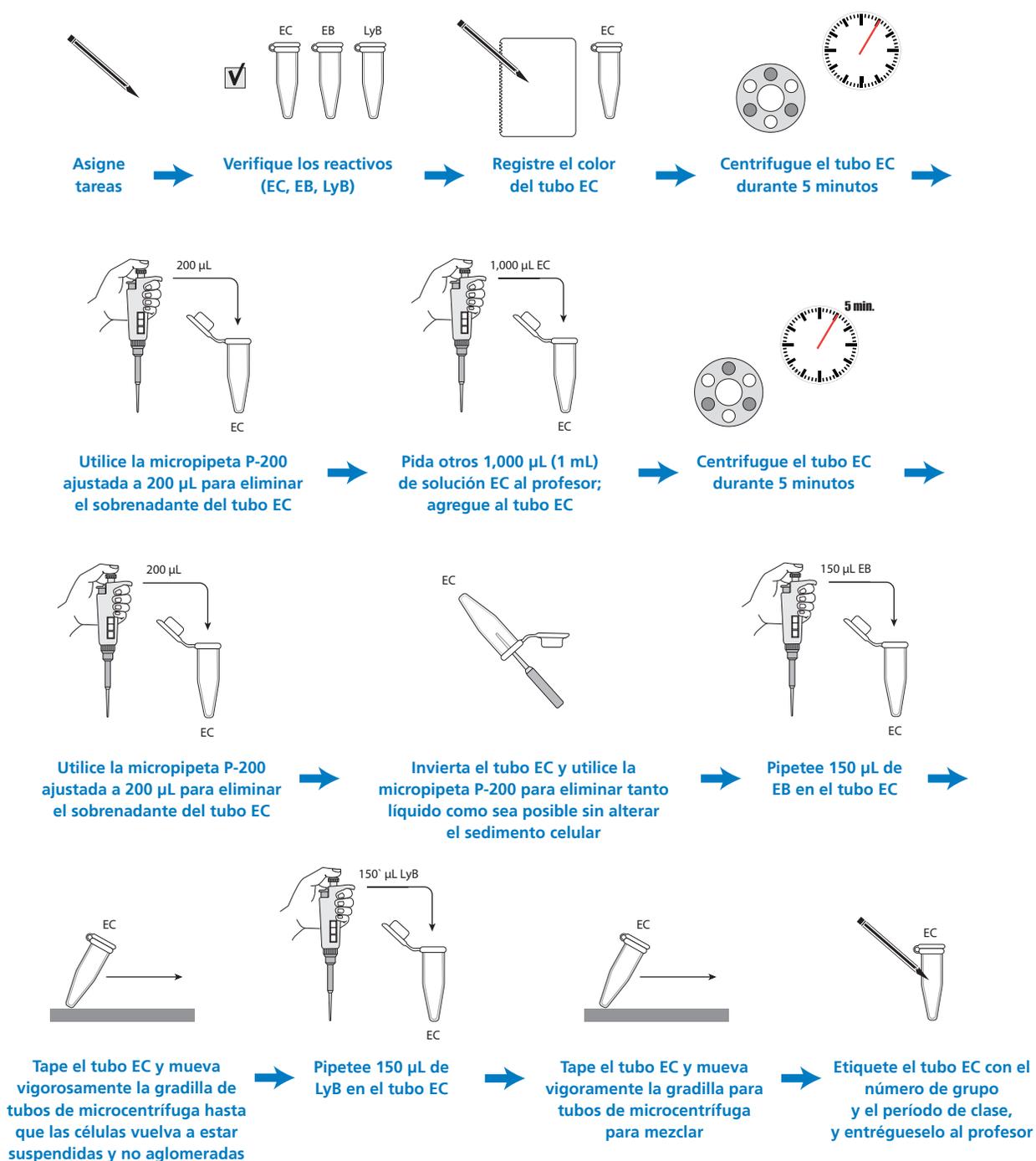
**Haga que los alumnos lean el párrafo introductorio del Laboratorio 6, compartan sus respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio* y que completen la *Parte A*. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan su respuesta a las preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE* con la clase. (45 minutos)**

Este laboratorio se desarrolla en dos días. En la Parte A, los alumnos lisan las bacterias que han sido cultivadas y alimentadas con arabinosa para activar el gen *rfp*. Los alumnos discuten las preguntas de *Antes del laboratorio* en sus grupos y registran sus respuestas de forma individual. Haga que los alumnos compartan sus respuestas con la clase.

Posibles respuestas a las preguntas de *Antes del laboratorio*:

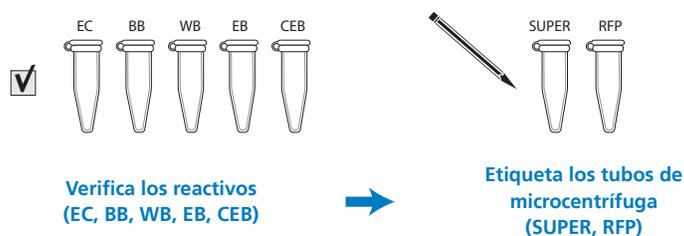
1. En la cromatografía en columna, ¿cómo pueden usarse soluciones de diferentes concentraciones de sal, que desplegarán proteínas en diversos grados, para ayudar a purificar la RFP? *Las proteínas se despliegan en el tampón de unión, que tiene una alta concentración de sal. Cuando se agregan a la columna, las proteínas hidrofóbicas en el tampón de unión se adhieren a las perlas de la columna, mientras que las proteínas hidrofílicas pasan a través de la columna. Las proteínas hidrofóbicas que se adhieren a la columna pueden liberarse agregando tampones con concentraciones de sal más bajas. Estos tampones permiten que las proteínas se vuelvan a plegar, lo que las libera de la columna. Se pueden agregar varios tampones diferentes para liberar proteínas con diferentes cantidades relativas de aminoácidos hidrófobos.*
2. Lea las secciones de *Métodos* para la Parte A (páginas E-12 y E-13 de la Guía del estudiante) y para la Parte B (en las páginas E-14 y E-15 de la Guía del estudiante) y describa brevemente los pasos, usando palabras y un diagrama de flujo. *Las respuestas de los alumnos serán variadas. El diagrama de flujo de un estudiante puede parecerse a los diagramas de flujo de las páginas E-12, E-13 y E-14.*

## Laboratorio 6, Diagrama de flujo de la Parte A

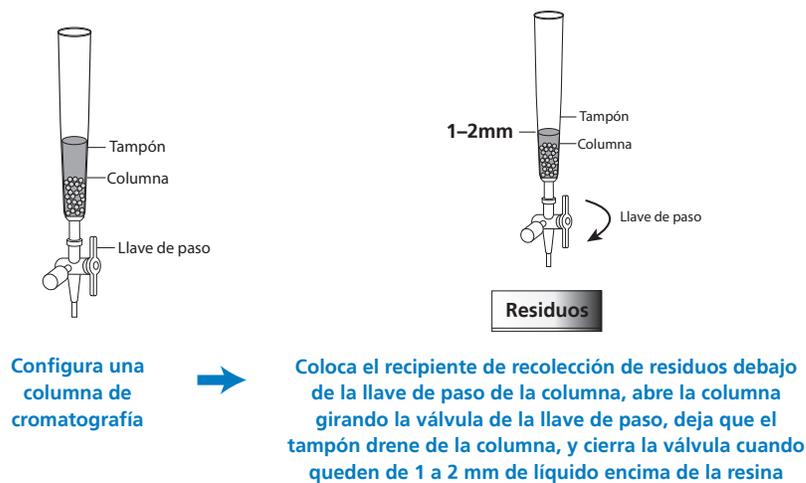


## Laboratorio 6, Diagrama de flujo de la Parte B

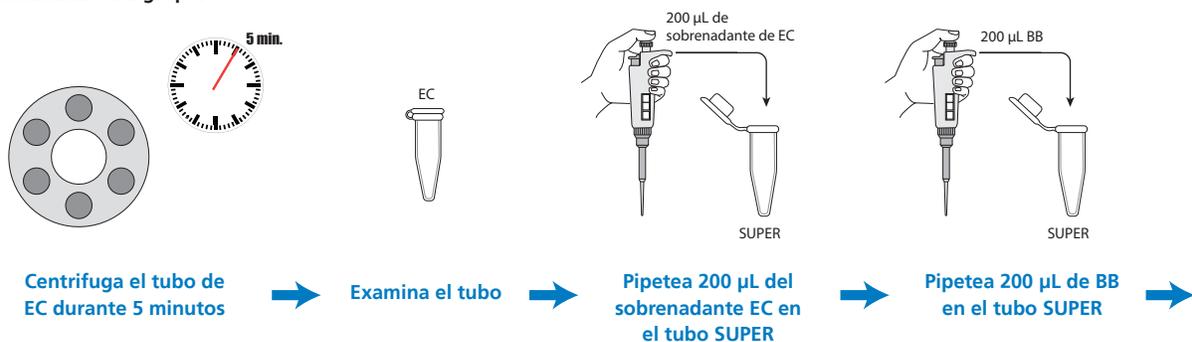
Un miembro del grupo:



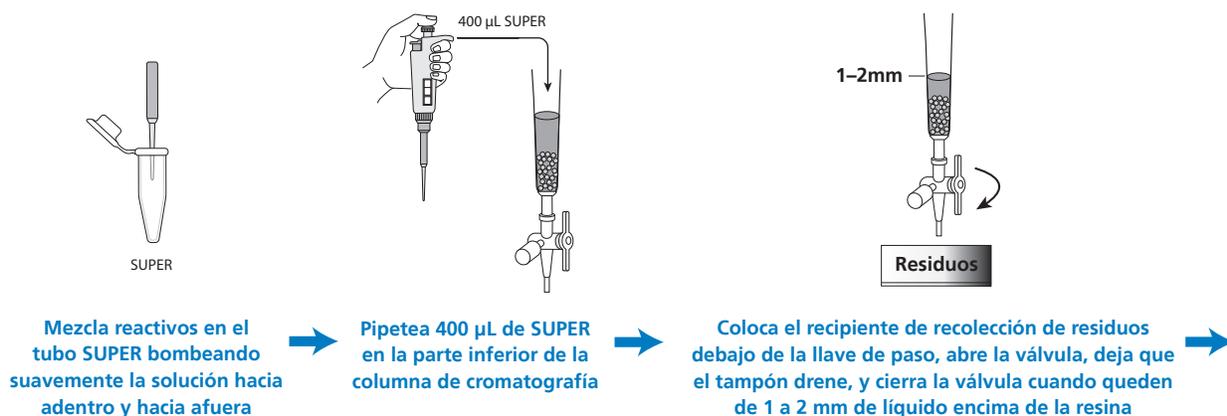
Un miembro del grupo:



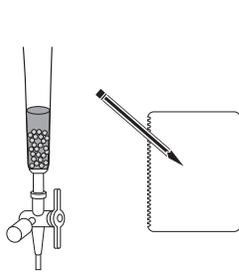
Un miembro del grupo:



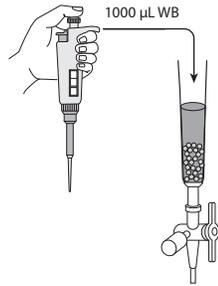
Todo el grupo:



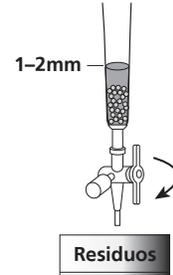
Laboratorio 6, Diagrama de flujo de la Parte B (continuación)



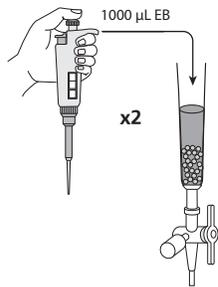
Ubica RFP y registra sus observaciones en el cuaderno



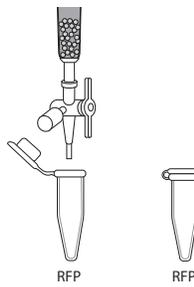
Pipetea 1,000 µL de WB en la parte inferior de la columna de cromatografía



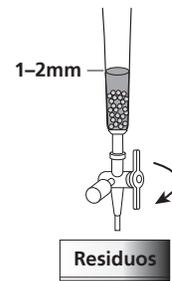
Coloca el recipiente de recolección de residuos debajo de la llave de paso, abre la válvula, deja que el tampón drene, y cierra la válvula cuando queden de 1 a 2 mm de líquido encima de la resina



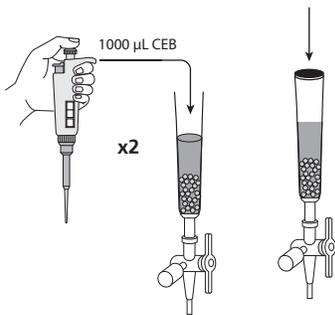
Dos veces más, pipetea 1,000 µL de EB en la parte inferior de la columna de cromatografía



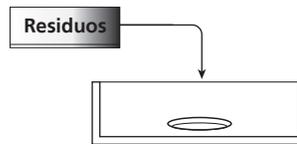
Coloca el tubo de RFP debajo de la llave de paso, abre la válvula, deja que drene únicamente la parte roja del eluato, cierra la válvula y tapa muy bien el tubo



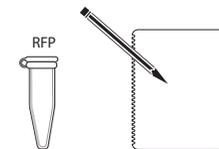
Coloca el recipiente de recolección de residuos debajo de la llave de paso, abre la válvula, deja que el tampón drene, y cierra la válvula cuando queden de 1 a 2 mm de líquido encima de la resina



Dos veces, pipetea 1,000 µL de CEB en la parte inferior de la columna de cromatografía, y tapa muy bien la columna para la clase siguiente



Vierte el contenido del recipiente de recolección de residuos por el fregadero



Compara la intensidad de color del tubo de RFP con los tubos de los otros grupos, y registra sus observaciones en el cuaderno

Mientras las células cultivadas giran en la microcentrifuga durante cinco minutos en la Parte A, paso 3, haga que los alumnos discutan sobre las preguntas de **DETÉNGASE Y PIENSE** y que registren sus respuestas de forma individual. Haga que los alumnos compartan sus respuestas con la clase.

Posibles respuestas para las preguntas de **DETÉNGASE Y PIENSE**:

- ¿Cómo puede determinar dónde está la RFP en cada paso de la separación? *La RFP fluoresce en rojo para que pueda identificarse fácilmente.*
- ¿De qué color es el sobrenadante? ¿El gránulo? ¿Cuáles son los contenidos de cada uno? *El gránulo es de color rosado brillante o rojo mientras que el sobrenadante es transparente. El gránulo contiene todas las células de E. coli con RFP mientras que el sobrenadante contiene el medio de crecimiento (LB).*



**RECURSOS:** Ayude a los alumnos a visualizar el plegamiento de proteínas mostrándoles un video del proceso (disponible en el sitio web del programa).



### **ANTECEDENTE CIENTÍFICO: INSULINA RECOMBINANTE**

Muchas proteínas están formadas por cadenas peptídicas separadas que están conectadas por puentes disulfuro. La insulina es una de esas proteínas: está compuesta por dos cadenas peptídicas, denominadas cadena A (que tiene 21 aminoácidos) y cadena B (que tiene 30 aminoácidos). Cuando se produce insulina humana recombinante, las dos cadenas se elaboran por separado y se purifican, luego se mezclan y se conectan en una reacción que forma los puentes disulfuro, produciendo insulina humana recombinante.

### **SESIÓN 3**

**IDEAS CLAVE:** Una vez que las células bacterianas que produjeron RFP se lisan, la proteína se separa de otras proteínas en la célula mediante el uso de una columna de cromatografía que aprovecha las diferencias en la hidrofobicidad. Para separar la RFP, que es una proteína muy hidrófoba, la columna de cromatografía está llena de perlas recubiertas de resina que se unen a proteínas hidrófobas que se han desplegado en una solución tampón de unión. Un tampón de lavado libera moderadamente proteínas hidrófobas de la resina y un tampón de elución libera 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 hacen que las proteínas unidas se vuelvan a plegar.



Haga que los alumnos completen el Laboratorio 6, Parte B. Durante el laboratorio, haga que los alumnos compartan sus respuestas a las preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE* con la clase y que expliquen su razonamiento. (30 minutos)

En la Parte B de este laboratorio de dos días, los alumnos usan la cromatografía en columna para separar la RFP del resto de las proteínas de la célula lisada.

Mientras las células lisadas giran en la microcentrífuga durante cinco minutos en el paso 6, haga que los alumnos discutan sobre las preguntas de *DETÉNGASE Y PIENSE* y que registren sus respuestas de forma individual. Haga que los alumnos compartan sus respuestas con la clase.



Posibles respuestas para las preguntas de *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? *BB hace que las proteínas se desplieguen para que las proteínas hidrofóbicas se unan a las perlas recubiertas de resina en la columna. WB hace que las proteínas moderadamente hidrofóbicas se vuelvan a plegar y las libera de la resina. EB hace que la RFP se pliegue nuevamente y la libera de la resina.*
- ¿De qué color es el sobrenadante? ¿El gránulo? ¿Cuáles son los contenidos de cada uno? *El gránulo es blanco mientras que el sobrenadante es rosado. El gránulo contiene los restos celulares, mientras que el sobrenadante contiene los tampones de elución y lisis (EB y LB), así como la proteína fluorescente roja y otras proteínas citoplasmáticas.*

Pida a los alumnos que discutan las Preguntas del Capítulo 6 en grupos pequeños y que registren sus respuestas de forma individual. Dirija un debate a partir de las respuestas de los alumnos. (15 minutos)

Haga que los alumnos reflexionen sobre su comprensión de la conformación de proteínas, el plegamiento de proteínas y la separación de proteínas con cromatografía en columna respondiendo las Preguntas del Capítulo 6.

Posibles respuestas a las Preguntas del Capítulo 6:

1. ¿Por qué es importante la conformación de una proteína para llevar a cabo su función? *Una conformación específica da como resultado sitios de unión en el exterior de la proteína. Los sitios de unión permiten que la proteína se una a otras moléculas, es de esta manera cómo una proteína puede llevar a cabo su función. Las proteínas tienen una de cuatro funciones: catalizar reacciones, transportar moléculas, proporcionar una señal o formar estructuras.*
2. ¿Qué propiedades de los aminoácidos en una proteína se relacionan con el plegamiento de proteínas? *La secuencia de aminoácidos determina el*

*plegamiento. El plegamiento de proteínas es el resultado de la formación de enlaces de hidrógeno débiles entre los aminoácidos, la tendencia de los aminoácidos hidrofóbicos a quedar enterrados dentro de la proteína y la formación de puentes de disulfuro covalentes entre los aminoácidos que contienen azufre.*

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? El eluato es más brillante que el lisado celular. El eluato contiene principalmente RFP separada, mientras que el lisado celular contenía todas las proteínas celulares.*
4. *¿Qué característica de RFP se utiliza como base para la separación por cromatografía en columna? La RFP tiene más aminoácidos hidrofóbicos que aminoácidos hidrofílicos y, cuando se despliega, se adhiere a la resina en las perlas de la columna.*
5. *¿Cómo se puede ajustar o modificar el procedimiento de cromatografía en columna para aumentar la pureza de la muestra de RFP? Use más tampones de lavado que tengan más grado de concentración de sal durante el proceso de elución. Recoja el eluato rojo en lotes pequeños y mantenga solo los lotes del medio.*

**ESTRATEGIA:** Mientras dirige el debate, aplique las siguientes prácticas:

- Dé a los alumnos tiempo para evaluar las respuestas de los demás.
- Pida aclaraciones.
- Pida una explicación.
- Replantee o reformule.
- Pida un ejemplo.
- Pida evidencia.
- Proporcione ejemplos y contraejemplos.
- Pida a los alumnos que aporten una explicación.
- Pida a los alumnos que evalúen una respuesta.





**RM**

**AMGEN<sup>®</sup> Biotech Experience**

---

Scientific Discovery for the Classroom

**AMGEN<sup>®</sup> Foundation**



## LABORATORIO 1.3: EXAMEN DE LA PRECISIÓN DE MICROPIPETAS

Acaba de enterarse de que se utiliza una micropipeta para transferir volúmenes muy pequeños y exactos de líquidos en mililitros (ml, milésimas de litro) o microlitros ( $\mu\text{l}$ , millonésimas de litro). Cada micropipeta está calibrada para que el volumen más pequeño que entrega sea preciso, lo que significa que el volumen medido puede reproducirse de manera consistente. En este laboratorio, comparará la precisión de una micropipeta y un gotero.

### ANTES DEL LABORATORIO

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

1. ¿Por qué la precisión podría ser importante en el proceso de ingeniería genética?
2. Lea la sección *Métodos* a continuación y describa brevemente los pasos, utilizando palabras y un diagrama de flujo.

### MATERIALES

#### Reactivos

- Una gradilla de plástico para tubos de microcentrífuga con un tubo de microcentrífuga de agua destilada ( $\text{dH}_2\text{O}$ )

#### Equipo y suministros

- Micropipeta P-20 (para medir 2.0–20.0  $\mu\text{l}$ )
- Caja de puntas de pipetas desechables
- 8 tubos de microcentrífuga vacíos de 1.5 ml
- Marcador permanente
- Gotero
- Microcentrífuga (será compartida entre todos los grupos)
- Contenedor de residuos para las puntas y tubos de microcentrífuga usados (se compartirán entre los grupos)

#### SEGURIDAD:

- Deberá usar 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 maestro.
- Lávese bien las manos con jabón después de terminar el laboratorio.



## MÉTODOS

En este laboratorio, examinará la *precisión* (exactitud) de una micropipeta y la comparará con la precisión de otro instrumento que probablemente haya usado mucho en sus clases de ciencias: un gotero.

1. Revise su gradilla para asegurarse de que tiene el tubo de dH<sub>2</sub>O.
2. Etiquete cuatro tubos de microcentrifuga vacíos como "MP" y coloque los tubos en la gradilla.
3. Pipetee 20.0 µl de dH<sub>2</sub>O en cada uno de los cuatro tubos MP. Tape los tubos.
4. Etiquete cuatro tubos de microcentrifuga vacíos con "MD" y coloque los tubos en la gradilla.
5. Use el gotero para dispensar una sola gota de dH<sub>2</sub>O en cada uno de los cuatro tubos de MD. Tape los tubos.
6. Examine el agua en los tubos y luego centrifugue los tubos.



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

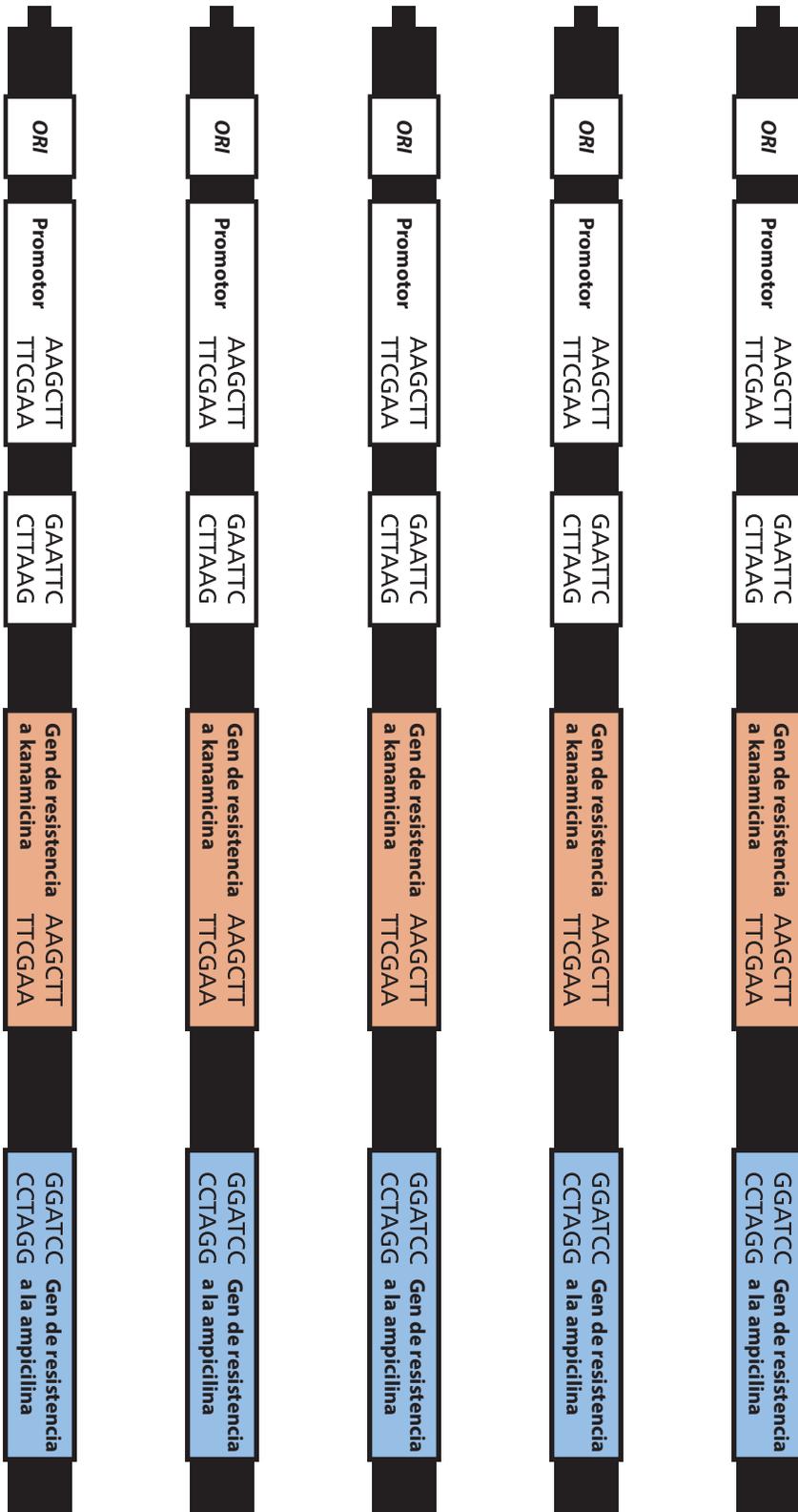
7. Vuelva a examinar el agua en los tubos para verificar que ahora el agua esté en el fondo de los tubos.



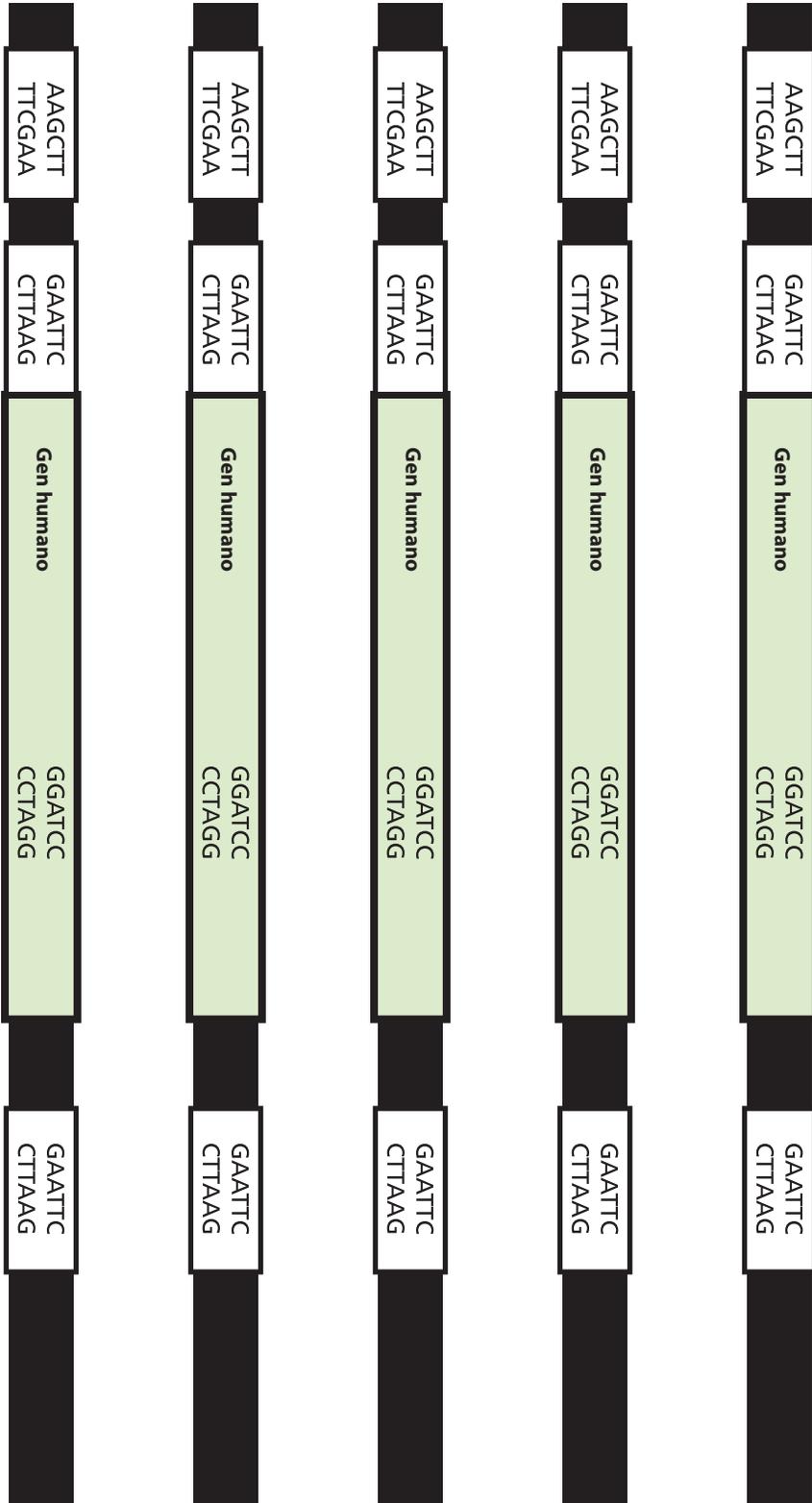
**DETÉNGASE Y PIENSE:** ¿Qué sucede cuando el agua se centrifuga?  
¿Por qué podría ser importante la centrifugación cuando se manejan pequeños volúmenes de líquido?

8. Compare la cantidad de agua en los cuatro tubos de MP. ¿Parece que en los cuatro tubos hay la misma cantidad?
9. Compare la cantidad de agua en los cuatro tubos de MD. ¿Parece que en los cuatro tubos hay la misma cantidad?
10. Use la micropipeta para verificar el volumen en cada tubo de MD y compare los valores que obtenga.
11. Informe a la clase sobre lo que aprendió sobre la cantidad de dH<sub>2</sub>O dispensado por el gotero de medicamentos. Compare los valores obtenidos por los diferentes grupos.

# CLONE ESE GEN: DIAGRAMA DE PLÁSMIDO



# CLONE ESE GEN: SECUENCIA DE ADN HUMANO

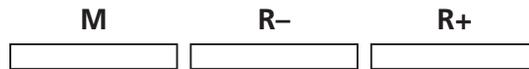


# LABORATORIO 4: DIAGRAMA DE ESCALERA DE ADN



1	10,000 pb
2	8,000 pb
3	6,000 pb
4	5,000 pb
5	4,000 pb
6	3,000 pb
7	2,000 pb
8	1,500 pb
9	1,000 pb
10	500 pb

# LABORATORIO 4A: DIAGRAMA DE ESCALERA DE ADN



1	10,000 pb
2	8,000 pb
3	6,000 pb
4	5,000 pb
5	4,000 pb
6	3,000 pb
7	2,000 pb
8	1,500 pb
9	1,000 pb
10	500 bp

# PREDICCIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Predecir cuánto crecimiento bacteriano verá en cada placa. Marque la placa / sección de la placa con +++ (crecimiento alto), ++ (crecimiento medio), + (crecimiento bajo), o - (sin crecimiento):

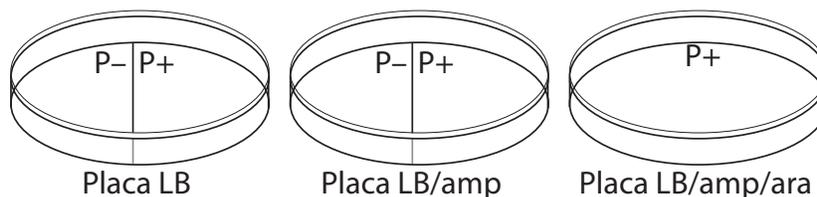


Tabla 1: Grupo de control P- (bacterias no transformadas)

Placa Contiene	Previsto Crecimiento	Conclusión si se produce un crecimiento previsto	Conclusión si no se produce el crecimiento previsto
Caldo Luria (LB)			
Caldo Luria ampicilina (LB / amp)			

Tabla 2: Grupo Experimental P+ (bacterias transformadas)

Placa Contiene	Previsto Crecimiento	Conclusión si se produce un crecimiento previsto	Conclusión si no se produce el crecimiento previsto
Caldo Luria (LB)			
Caldo Luria ampicilina (LB / amp)			
Caldo Luria ampicilina arabinosa (LB / amp / ara)			

