

# 39. Aislamiento y purificación del DNA de un plásmido recombinante

**Aurora Galván Cejudo, Manuel Tejada, Antonio Camargo, José Javier Higuera, Vicente Mariscal, Emilio Fernández Reyes**

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba*

## RESUMEN

**El DNA de un plásmido recombinante presente en una bacteria se aísla por un método rápido y sencillo ("miniprep") que consiste en lisis bacteriana, precipitación de proteínas y DNA genómico, y finalmente precipitación del DNA plasmídico. El objetivo es obtener suficiente cantidad del DNA para su análisis posterior mediante electroforesis.**

*Palabras clave:* DNA plasmídico, lisis alcalina, eficiencia de la purificación

*Abreviaturas empleadas.* DNA: ácido desoxirribonucleico; IPTG, isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido; LB: medio de Luria-Bertani; RNasa, Ribonucleasa.

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico, circular y generalmente de pequeño tamaño que se encuentran en muchas especies bacterianas y que se pueden replicar de manera independiente del DNA cromosómico. A diferencia de éste, los plásmidos no son necesarios para la viabilidad general de la célula, pero pueden contener genes que contribuyen a la supervivencia en condiciones especiales, como los que confieren resistencia a antibióticos, a metales etc. Algunas clases de plásmidos poseen además la propiedad conocida como "replicación relajada", esto es, están presentes en forma de muchas copias por célula, lo que facilita enormemente su aislamiento y purificación.

Los plásmidos poseen un interés singular en Ingeniería Genética por ser uno de los sistemas vectores más sencillos de usar. Un vector de clonación es un sistema que permite introducir en una célula hospedadora un fragmento de DNA que se pretende clonar; en esta célula hospedadora el vector se replica y expresa, en su caso. La molécula que resulta de la unión de un DNA vector con el DNA de interés (denominado entonces "inserto") se denomina molécula de vector recombinante.

Para ser utilizado como vector de clonación, un plásmido ideal debe poseer al menos tres características: 1) Debe tener su propio origen de replicación y por tanto la capacidad de replicación autónoma independiente del genoma del hospedador. 2) Debe tener sitios de clonación múltiple que permitan la apertura del DNA con enzimas de restricción y hace posible la clonación de insertos de

DNA en la forma y orientación determinada. 3) Debe poseer marcadores genéticos seleccionables que permitan aislar las células hospedadoras que contengan el vector. La mayoría de los plásmidos naturales no cumplen todas estas condiciones, por lo que una primera tarea de la Ingeniería Genética ha consistido en la construcción de plásmidos artificiales, combinando en una misma molécula diversos rasgos útiles procedentes de los plásmidos naturales.

La presencia en el plásmido del gen de resistencia a ampicilina permite seleccionar las bacterias que portan estos plásmidos, gracias a su capacidad para crecer en presencia de dicho antibiótico (el gen de resistencia codifica una beta lactamasa, enzima que degrada la ampicilina).

La mayoría de los plásmidos usados en Biología Molecular contienen el sitio de clonación múltiple dentro del gen de la  $\beta$ -galactosidasa lo que permite la interrupción e inactivación de este gen cuando un DNA inserto se clona en esta región. En medios de cultivo que contengan el análogo de la lactosa X-gal, esta estrategia permite distinguir las colonias bacterias que contienen el vector recombinante (con inserto) de aquellas que han recibido un vector no recombinante (sin inserto). Las bacterias que reciben el vector recombinante no pueden utilizar lactosa ni su análogo y formará colonias blancas. Las bacterias que reciben un vector no recombinante sí pueden utilizar la lactosa o su análogo y formarán colonias azules.

El objetivo de esta práctica consiste en la purificación del DNA del plásmido recombinante contenido en una cepa de la bacteria *E. coli*, y familiarizarse con las propiedades de DNA plasmídico.

## 2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO

- Tubos Eppendorf, micropipetas, puntas estériles, pipetas Pasteur, agua estéril, microcentrífuga.
- Células *E.coli* transformadas: suspensión en medio LB/Amp
- Solución de resuspensión
- Solución de lisis
- Solución 3M de acetato potásico

## 3. PROTOCOLO A REALIZAR

### 3.1. Cultivo de bacterias

**Paso 1.** Se preparan frascos de cultivo o tubos con medio LB estéril, a los que se añade en el momento de cultivar ampicilina a una concentración final de 0,1 mg/ml (ya que estamos trabajando con plásmidos que poseen el gen de resistencia a este antibiótico).

**Paso 2.** Se toman colonias individuales de la placa de agar, pasándolas al medio líquido, y se incuban una noche a 37°C, con agitación.

### 3.2. Extracción del DNA plasmídico

Si bien existen kits comerciales para preparar DNA plasmídico, la realización de este protocolo se considera formativo, sencillo y permite obtener de modo rutinario DNA plasmídico con un grado de pureza aceptable. El material que entre en contacto con el cultivo de bacterias deberá desecharse en un recipiente con lejía.

1. Se toma 1 ml del cultivo de bacterias y se centrifuga en un tubo eppendorf durante 2 min (14000 rpm). Se elimina el sobrenadante por inversión del tubo o con ayuda de una pipeta, dejando el sedimento lo más seco posible.
2. Se resuspende el sedimento de bacterias en 250 µl de tampón de resuspensión empleando una pipeta (aspirar y expulsar el líquido varias veces sobre el sedimento hasta que desaparezca éste). Se incuba 2 min a temperatura ambiente.
3. Se añaden al tubo 250 µl de la solución de desnaturalización NaOH/SDS. Se agita el tubo por inversión suave (observar el aspecto y viscosidad de la disolución). Posteriormente se incuba durante 5 min a temperatura ambiente.
4. Se añaden a continuación 300 µl de acetato potásico 3 M y se mezcla el contenido del tubo (observar el aspecto del tubo, aparecerá una turbidez blanca al precipitar las proteínas y el DNA cromosómico). Se incuba 10 min en hielo.
5. Se centrifuga 10 min (14000 rpm).
6. Con ayuda de una pipeta se transfiere cuidadosamente la fase acuosa sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo. Si la fase acuosa no está suficientemente limpia, y contiene restos del precipitado blanco, volver a centrifugar los tubos.
7. En este sobrenadante se encuentra RNA y el DNA plasmídico. Estos ácidos nucleicos se precipitan con 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Mezclar bien por inversión y guardar a -20°C durante al menos 20 min (congelador).
8. Pasado este tiempo, se centrifuga durante 30 min a 14000 rpm.
9. Se elimina todo el sobrenadante volcando el tubo con cuidado. El precipitado se lava de nuevo con 0,5 ml de etanol 70% frío (20 min, centrifugación).
10. Se elimina todo el sobrenadante volcando el tubo con cuidado. El precipitado casi invisible, que contiene DNA plasmídico y RNA, se debe secar completamente para eliminar los restos de etanol que pueden interferir con procesos posteriores. El precipitado se disuelve en 25 µl agua estéril.
11. Finalmente se añaden 0,5 µl de una solución de RNasa (1 µg/ml) y se incuba 20 min a temperatura ambiente. Este tratamiento con RNAasa

degrada el RNA quedando una preparación purificada de DNA plasmídico. Una alternativa a este paso es incluir la RNasa en el tampón inicial de resuspensión o tampón de lisis

#### **4. RESULTADOS ESPERADOS**

El método empleado para la obtención del plásmido se denomina de "lisis alcalina": se basa en la desnaturalización y precipitación selectiva del DNA cromosómico en medios con NaOH y SDS. En estas condiciones el DNA plasmídico permanece intacto debido principalmente a su pequeño tamaño y su naturaleza circular y superenrollada.

El tratamiento con alta concentración de sal (acetato potásico) y SDS produce la precipitación de gran parte de las proteínas.

El tratamiento con RNasa elimina la contaminación de RNA que puede ser importante.

La purificación del DNA plasmídico se completa entonces por precipitación con etanol. Es posible obtener DNA plasmídico con diferente grado de superenrollamiento que se puede visualiza tras la separación por electroforesis y tinción con BrEt .

#### **5. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS**

- a) Describe el porqué de los tratamientos con: NaOH y SDS, acetato potásico, etanol, y RNasa.
- b) Realiza un esquema de la purificación según se utilice la RNasa en: 1) el tampón de lisis ó 2) al final. ¿Se podría prescindir de ella?
- c) ¿Por qué tienen carga negativa las moléculas de DNA?
- d) ¿Cuál es el papel de cada componente del tampón de carga?
- e) Dibujar un esquema con el resultado obtenido en el gel y razona los resultados.
- f) En caso de tener las formas superenrollada y relajada del plásmido indicar si:
  - ¿Tienen el mismo peso molecular?
  - ¿Y la misma longitud en pares de bases?
  - ¿Cómo se podría convertir una forma en otra?. ¿Cuál en cual?

#### **6. BIBLIOGRAFÍA COMENTADA**

Old RW, Primrose SB (1989) "Principles of Gene Manipulation". Blackwell Sci. Pub. (Oxford, England), pp 11-13. Resumen comprensivo del procedimiento.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) "Molecular Cloning". Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1.74-1.84. Excelente recetario con variaciones útiles.

## **ANEXO 1: MEDIOS, SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO**

### **Soluciones**

- Solución de resuspensión
- Solución de lisis
- Solución 3M de acetato potásico

#### -Medio de cultivo LB:

Extracto de levadura	5g/l
Triptona	10g/l
NaCl	5g/l

Esterilizar en autoclave. Almacenar en frío.

#### -Placas LB/ampicilina/IPTG/X-Gal:

Medio de cultivo LB  
Agar 1,6%  
Ampicilina 100 µg/ml  
IPTG 500 µM  
X-Gal 40µg/ml

### **Material biológico**

- Células *E.coli* transformadas: suspensión en medio LB/Amp