

41. Comprobación de colonias transformantes mediante PCR y electroforesis

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

En esta práctica se realiza una PCR, analizando los componentes de la reacción, el programa de ciclos a utilizar, y empleando como DNA molde directamente el de colonias obtenidas de una placa de transformación. Se pone de manifiesto la sensibilidad del método y se discute su utilidad en numerosas aplicaciones.

Palabras clave: DNA plasmídico, DNA de colonias, molde, cebador, Taq DNA polimerasa.

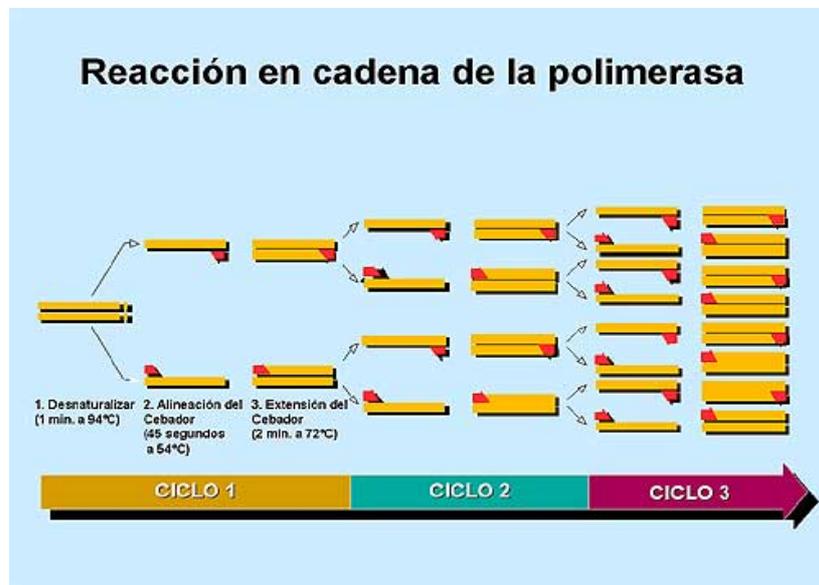
Abreviaturas empleadas. BrEt: Bromuro de etidio; DNA: ácido desoxirribonucleico.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de DNA específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de DNA. Se basa en la actividad de la enzima DNA polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de DNA complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio (adenina, timina, citosina y guanina), que son los componentes de la cadena de DNA, y una pequeña cadena de DNA (oligonucleótido) que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebador.

La PCR se desarrolla en tres pasos. El primero es la separación de las dos cadenas que forman la molécula de DNA que se quiere amplificar, para lo cual se debe calentar el DNA a una temperatura de 95-96 °C. Cada una de estas cadenas actuará como molde para fabricar su complementaria. A continuación se baja la temperatura para conseguir que cada cebador se una a su región complementaria dentro de la cadena de DNA. El último paso consiste en la generación de la cadena de DNA complementaria por acción de la DNA polimerasa. El problema con el que se encontraron los científicos que idearon esta técnica es que resulta preciso aumentar la temperatura de la mezcla de reacción hasta valores por encima de los 70°C para que las dos cadenas de DNA se mantengan separadas. A estas temperaturas tan elevadas la DNA polimerasa se inactivaba y era preciso añadirla de nuevo en cada ciclo. Esto

fue así hasta que se descubrió la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en aguas termales y cuya DNA polimerasa (Taq polimerasa) es capaz de trabajar a temperaturas superiores a los 70°C. De esta manera sólo hay que añadir la enzima al inicio del proceso de reacción y llevar a cabo tantos ciclos como sea necesario. Cada una de las moléculas de DNA hijas pueden volver a entrar en el proceso y servir como molde para fabricar más copias. Se consigue una amplificación de 2^n , siendo n el número de ciclos de reacción.



Las aplicaciones de la PCR y de sus numerosas variantes son muy numerosas, entre ellas:

- Simplifica sobremanera muchos experimentos de ingeniería genética
- Permite muchos estudios de expresión genética
- Secuenciación directa de secuencias amplificadas
- Detección de mutaciones
- Diagnósticos de enfermedades genéticas e infecciosas
- En ciencia forense: identificación de restos biológicos, determinación de paternidad, pruebas periciales en criminología
- En arqueología y paleontología

Al aplicar un campo eléctrico a una solución de moléculas con carga neta, éstas se desplazarán hacia el polo contrario a su carga. En este principio se basa la técnica denominada electroforesis y el desplazamiento de la molécula en cuestión depende de dos factores: la carga y el tamaño. La electroforesis en gel es una técnica muy utilizada para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos. Los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos nucleicos son polímeros como la poliacrilamida y la agarosa. Estos geles van en una cuba, sumergidos en un tampón, con pH superior a 8. De esta forma, las moléculas de DNA o RNA sometidas a electroforesis se desplazarán al polo positivo, porque poseen carga neta negativa a valores de pH superiores a 5.

Cuando la electroforesis se realiza en un gel, éste se comporta como un tamiz molecular y permite separar moléculas cargadas basándose en su tamaño y forma. Así una mezcla de moléculas de DNA de diferente tamaño,

que pueden resultar de una reacción con enzimas de restricción, se separarán en función de aquel. Es importante el empleo de un marcador de tamaño conocido porque permite calcular la masa molecular de las bandas de DNA.

Para comprobar que las colonias transformantes elegidas tienen el plásmido recombinante que queremos, analizaremos los insertos de los plásmidos aislados mediante PCR.

Los vectores de clonación poseen sitios de anclaje de cebadores conocidos, que están situados flanqueando el sitio de clonación múltiple del vector. Usaremos estos cebadores para amplificar el inserto de los plásmidos aislados el día anterior.

Los productos de PCR se analizarán mediante separación electroforética en gel de agarosa.

2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO

- Tubos eppendorf, micropipetas, puntas estériles, agua estéril, microcentrífuga.
- Termociclador.
- Cubeta de electroforesis.
- Fuente de alimentación.
- Equipo de visualización de geles.

3. PROTOCOLO A REALIZAR

A cada tubo eppendorf de 300 μ l se añaden 6,1 μ l de la mezcla de reacción de PCR, 1 μ l de solución de la bacteria que se prepara resuspendiendo una colonia en 100 μ l de agua destilada (aprox. 1 ng de plásmido, DNA molde), y se completa con agua destilada hasta 25 μ l.

Los cebadores utilizados, RB1 y RB3, corresponden a los del gen de la paramomicina presente en el plásmido recombinante.

3.1. Programa de PCR

1. 96 °C durante 5' (desnaturalización)
 2. 96 °C durante 1' (desnaturalización)
 3. 60 °C durante 1' (hibridación de los cebadores)
 4. 72 °C durante 30'' (elongación de la polimerasa)
 5. 72 °C durante 5' (finalización de fragmentos elongados)
 6. 4 °C (mantener hasta retirar los tubos)
- 

3.2. Separación mediante electroforesis de los productos amplificados por la PCR anterior

Preparación del gel de agarosa:

1. Preparar en un erlenmeyer 100 ml de suspensión 0,8 % de agarosa en buffer de electroforesis.

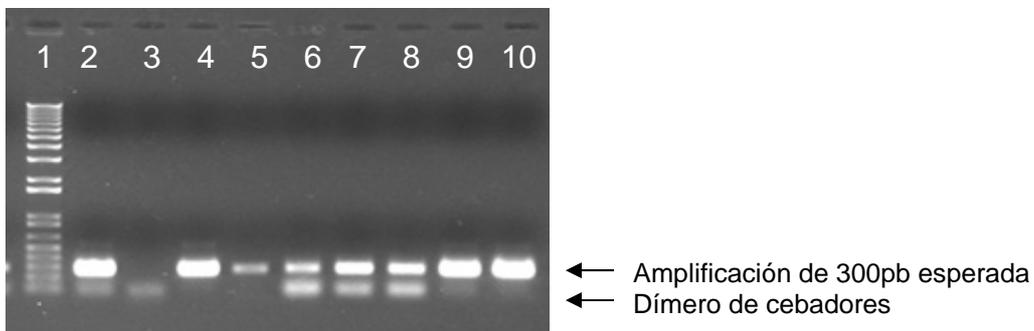
2. Fundir en una placa calefactora.
3. Dejar enfriar la suspensión hasta que alcance 50 °C aprox.
4. Sellar la cama en la que se va a verter el gel de agarosa y colocar el peine que formará los pocillos del gel.
5. Una vez la solución de agarosa ha alcanzado los 50 °C añadir 8 µl de bromuro de etidio (5 mg/ml) y homogeneizar la solución.
6. Verter la solución de agarosa con BrEt en la cama previamente sellada y con el peine para la construcción de los pocillos de carga. Dejar que polimerice durante 20-30 min.

Electroforesis:

1. Añadir 3 µl de buffer de carga al vial donde tenemos el producto de la PCR; homogeneizar y cargar el contenido del vial en un pocillo del gel de agarosa ya polimerizado.
2. Establecer una diferencia de potencial de 60 V entre los polos de la cubeta de electroforesis. Mantener estas condiciones hasta que la separación de los colorantes del buffer de carga, nos de idea de que los fragmentos originados por los digestión estén bien separados (45-60 min).
3. Visualizar por medio de luz UV.

4. RESULTADOS ESPERADOS

Una muestra de los resultados que se consiguen aparece en la gráfica siguiente:



Calle 1: marcador de 1 kpb ("ladder")
 Calle 2: control positivo
 Calle 3: control negativo
 Calles 4 a 10: resultado de la PCR de distintas colonias

5. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

La PCR es una técnica rutinaria que permite obtener en corto plazo los resultados esperados. Mediante esta metodología, de un conjunto de colonias puede determinarse, usando los cebadores del fragmento de DNA deseado, las que contienen o no el inserto de interés. De esta forma solamente las colonias positivas que se obtengan se cultivarán y se aislará suficiente DNA para su análisis posterior.

Como se ha realizado en esta práctica, el DNA de las colonias no ha tenido que ser aislado previamente, sino que se usan las bacterias directamente ya que muchas de ellas se lisan durante el primer paso de desnaturalización, haciendo su DNA accesible al cebado de la PCR.

6. BIBLIOGRAFÍA COMENTADA

Gonzalez-Ballester D, de Montaigu A, Galván A, Fernández E (2005) Restriction enzyme site-directed amplification PCR: a tool to identify regions flanking a marker DNA. *Anal Biochem.* 340: 330-335. Una aplicación de la técnica de PCR donde se describen los cebadores utilizados en esta práctica.

Dieffenbach CW, Dveksler GS (1995) "PCR Primer. A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press. Un excelente y completo manual sobre la PCR.

ANEXO 1: MEDIOS, SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO

Cebadores utilizados para el gen de resistencia a paramomicina

RB1: 5'AGCTGGCCCACGAGGAGGAC3'

RB3: 5'CTTCCATCCACCGCCGTTTCGTCA3'

Mezcla de reacción de PCR

- 5,5 µl de mezcla de reacción (10 pmoles de cada cebador, 10 nmoles de cada nucleótido, 2,5 µl buffer comercial de la polimerasa 10X)
- 0,6 U de polimerasa (1 U/µl)

Material biológico

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