

45. Clonación del DNA amplificado mediante PCR

Gabriel Dorado Pérez

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

RESUMEN

Aunque ya han comenzado a desarrollarse técnicas basadas en el análisis de moléculas individuales, el estudio de los ácidos nucleicos requiere generalmente un paso previo de amplificación. En este capítulo se aborda la clonación del fragmento de DNA correspondiente al gen *araA* de *Salmonella typhimurium* previamente amplificado mediante PCR. Básicamente, se trata de insertar el DNA amplificado mediante PCR (DNA pasajero o inserto) en un plásmido apropiado (DNA vector o vehículo) mediante un proceso denominado ligación, previa linearización (digestión o restricción). Para que esta construcción (DNA recombinante o manipulado) persista en el tiempo y se amplifique in vivo es necesario introducirla en un hospedador (del inglés “host”) apropiado, como *E. coli* (que previamente se ha hecho “competente” para favorecer la entrada del DNA recombinante) y finalmente poder seleccionar aquellas células portadoras del DNA recombinante utilizado en el proceso.

Palabras clave: antibiótico, célula competente, colonia transformante, hospedador, huésped, transgénico.

Abreviaturas empleadas. DMSO: dimetil sulfóxido; DNA: ácido desoxirribonucleico; IPTG: isopropilto- β -D-galactósido; LB: medio rico Luria-Bertani; OD: densidad óptica; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; PEG: polietilén glicol; RNA: ácido ribonucleico; PM: peso molecular; TSS: medio para inducir estado de competencia; X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Aunque ya han comenzado a desarrollarse técnicas basadas en el análisis de moléculas individuales, el estudio de los ácidos nucleicos requiere generalmente un paso previo de amplificación. Tradicionalmente, dicho proceso se ha llevado a cabo in vivo, mediante la construcción de bibliotecas (del inglés “libraries”) génicas o de cDNA. Típicamente, el DNA de interés es cortado con una o varias enzimas de restricción y ligado a un vector como el fago lambda, con el que luego se infecta un cultivo de *Escherichia coli* que se hace crecer en medio sólido. Las bibliotecas génicas o de cDNA contienen representaciones de los miles de genes y fragmentos de DNA de la muestra de partida generados tras su restricción. Para clonar propiamente y poder analizar el DNA de interés, es necesario identificarlo en dicha biblioteca. Ello se consigue rastreándola mediante el uso de sondas o anticuerpos específicos que reconozcan secuencias presentes o proteínas expresadas por la biblioteca.

Finalmente, los clones de interés pueden ser subclonados en plásmidos (para facilitar su manejo) y secuenciados. Puede ser también interesante estudiar la expresión génica del DNA clonado en vectores de expresión apropiados. Esta estrategia, aunque eficiente, es muy laboriosa y requiere una gran inversión de tiempo, oscilando típicamente entre meses y años.

El desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha permitido simplificar la clonación clásica (léase, in vivo) del DNA e incluso prescindir completamente de ella en algunos casos. De hecho, podría considerarse la PCR como una especie de “clonación in vitro”, ya que el material genético se amplifica en el tubo de ensayo y no en una bacteria. El proceso es muy rápido, llevándose a cabo en tan sólo unas horas (o incluso minutos). Una vez que el DNA ha sido amplificado mediante PCR, se dispone de suficiente número de copias del fragmento como para proceder a su análisis de restricción, identificación por Southern o secuenciación. La PCR puede realizarse a partir de una biblioteca génica o de cDNA, pero también directamente de DNA genómico, RNA, cDNA, e incluso células completas.

Conviene sin embargo aclarar que la PCR no sustituye en todos los casos a la clonación clásica. En muchas ocasiones, ambas estrategias se complementan. Así, puede ser interesante clonar in vivo un fragmento de DNA amplificado mediante PCR para estudiar su expresión génica bajo condiciones controladas. La ventaja de llevar a cabo una amplificación mediante PCR y después una clonación in vivo del material amplificado es que el proceso de clonación se acelera respecto a la metodología clásica.

En esta sesión abordaremos la clonación del fragmento de DNA correspondiente al gen *araA* de *Salmonella typhimurium* previamente amplificado mediante PCR.

2. PRINCIPIO DE LA CLONACIÓN IN VIVO

Básicamente, se trata de insertar el DNA amplificado mediante PCR (DNA pasajero o inserto) en un plásmido apropiado (DNA vector o vehículo) mediante un proceso denominado ligación, previa linearización (digestión o restricción). Para que esta construcción (DNA recombinante o manipulado) persista en el tiempo y se amplifique in vivo es necesario introducirla en un hospedador (del inglés “*host*”) apropiado, como *E. coli* (que previamente se ha hecho “competente” para favorecer la entrada del DNA recombinante) y finalmente poder seleccionar aquellas células portadoras del DNA recombinante utilizado en el proceso. A continuación se comentan estos cuatro pasos de la clonación in vivo:

Restricción: Las enzimas de restricción o restrictasas catalizan el corte de ambas cadena azúcar–fosfato del dsDNA. Parece que estas enzimas no tendrían actividad sobre ssDNA (a menos que éste forme estructuras de doble cadena consigo mismo u otras cadenas sencillas de DNA o RNA). Las restrictasas se clasifican en tres grandes tipos. Las enzimas de tipo I cortan a distancias grandes y variables del sitio de reconocimiento. Las de tipo II cortan en el sitio de reconocimiento (4 a 8 pb) o muy cerca, de forma específica. Las de tipo III cortan 25 pb fuera del sitio de reconocimiento. Las restrictasas de

tipo II son las herramientas empleadas generalmente en los proyectos de ingeniería del material genético. Se cree que estas enzimas forman parte de un sistema de defensa de las células procarióticas para destruir el DNA extraño que penetre en la célula (p.ej., virus). Obviamente, todo sistema defensivo de restricción debe ir acompañado inexorablemente por otro previo complementario y protector de modificación (metilación) para proteger su propio DNA recién sintetizado. La nomenclatura de las restrictasas es curiosa. Consta de tres letras en cursiva, con la primera mayúscula (ej.: *Eco*; *Hin*), correspondientes al organismo del que se aislaron por primera vez, seguida a menudo de una cuarta letra (ej.: *EcoR*; *Hind*) correspondiente a la estirpe del organismo productor, y terminada con un número romano (ej.: *EcoRV*; *HindIII*) que denota el orden de descubrimiento. Éste puede ir precedido de un espacio (ej.: *EcoR V*; *Hind III*). La nomenclatura oficial añade una R y un punto o bien una M y un punto para diferenciar la enzima de restricción de la de modificación, respectivamente (ej.: *R•EcoRV*; *R•HindIII* vs *M•EcoRV*; *M•HindIII*). Por defecto, en ausencia de R• o M• se supone que se trata de una restrictasa.

Ligación: Las DNA ligasas requieren como sustrato dos extremos de DNA; un extremo 5' (portador de un grupo fosfato) y un extremo 3' (grupo hidroxilo de la desoxirribosa). La reacción se produce a partir de sustratos de doble cadena (dsDNA o DNA:RNA), siendo muy poco eficiente con cadenas sencillas aisladas (ssDNA). La ligasa puede unir tanto extremos romos como extremos cohesivos (esta última situación es mucho más favorable). También existe la RNA ligasa, capaz de unir extremos de ssRNA y, en menor medida, otras combinaciones de DNA y/o RNA de cadenas sencillas o dobles.

Transformación: Existen diversos métodos para introducir material genético en una célula; proceso conocido como transformación (ya que dicha célula se “transforma” o altera genéticamente). El método clásico consiste en hacer orificios en las envolturas celulares, lo cual suele conseguirse mediante diferentes compuestos químicos y tratamientos físicos (como cambios de temperatura, rotura mecánica con bolitas, etc). Otro sistema mucho más eficiente consiste en la electroporación, que consigue el mismo efecto aplicando una diferencia de potencial relativamente grande (para generar los orificios) en tiempos muy cortos (para no matar las células). Una alternativa para células difíciles de transformar por la presencia de una pared celular consistente (como las vegetales) utiliza sistemas biobalísticos o biolísticos: se trata de bombardear las células o tejidos con partículas microscópicas (generalmente metales pesados como el oro o tungsteno) impregnadas del DNA pasajero. Finalmente, el método más efectivo (usado sólo con células de mamífero) es la microinyección, mediante la cual se inyecta el DNA pasajero con una aguja muy fina y la ayuda de un microscopio a cada una de las células; una a una y manualmente.

Selección: Según el método de transformación utilizado y las células empleadas, pueden aplicarse diferentes métodos de selección de las células que han incorporado el DNA pasajero. Generalmente el vector en que se ha ligado el DNA pasajero suele codificar una o varias enzimas que confieren resistencia a antibióticos, de forma que sólo las células que han incorporado dicho vector (con o sin pasajero) serán capaces de crecer en un medio selectivo suplementado con dicho antibiótico. Para diferenciar entre los

transformantes con y sin inserto suele emplearse la capacidad de las células transformadas con vector+inserto para transformar/generar o no un sustrato/producto cromogénico (complementación α). En otros casos, se emplean vectores que codifican un veneno celular, matando a las células transformadas por el vector, excepto en el caso de que incorporen el DNA pasajero (el cual impide la correcta expresión génica de la toxina). Este último método tiene la ventaja de que elimina los transformantes sin inserto. En otras palabras, en las cajas selectivas sólo crecerán los transformantes que porten vectores ligados con el DNA pasajero. Veamos con algo más de detalle algunas estrategias de selección de los transformantes:

Complementación α : Es el método más popular. Los vectores empleados en el método clásico cromogénico (tipo pUC) tienen el DNA que codifica para los primeros 146 aminoácidos del gen de la β -galactosidasa (*lacZ*). Insertado en esta secuencia se encuentra otra denominada "sitio de clonación múltiple" (del inglés, "*polycloning site*"; "*polylinker*") que no altera la fase de lectura, aunque genera un extremo amino terminal de la β -galactosidasa con unos cuantos aminoácidos extra insertados. A pesar de ello, este extremo amino de la enzima no altera la funcionalidad de ésta. La utilidad del sitio de clonación múltiple es que tiene secuencias de corte únicos en el vector para decenas de enzimas de restricción, de modo que puede resultar fácil digerir el vector y el pasajero con enzimas para ligarlos dentro del sitio de clonación múltiple. Generalmente ello implica la rotura de la fase de lectura y/o la generación de un extremo amino de la β -galactosidasa no funcional (a menos que el inserto sea extremadamente pequeño). Estos vectores se emplean con células hospedadoras que codifican para la porción carboxiterminal de la β -galactosidasa. Aunque por separado ninguno de los productos de la expresión génica de los extremos amino o carboxilo de la β -galactosidasa son activos enzimáticamente, pueden asociarse para generar una β -galactosidasa completa y funcional (aunque, la enzima lleve, como se ha indicado, unos cuantos aminoácidos extra insertados en el extremo amino). Y precisamente a este tipo de complementación se le llama complementación α . Las bacterias con fenotipo Lac⁺ que resultan de la complementación α se pueden reconocer fácilmente porque forman colonias azules en presencia del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactósido (X-gal) y un inductor del gen de la lactosa como el isopropiltio- β -D-galactósido (IPTG). Sin embargo, la inserción de una DNA pasajero en el sitio de policlonación del vector, produce casi invariablemente un extremo amino terminal de β -galactosidasa que no es capaz de conseguir la complementación α . Estas bacterias recombinantes con DNA pasajero ligado en el vector generarán colonias blancas en dicho medio.

Inactivación por inserción: Es un procedimiento que se utiliza con vectores viejos (tipo pBR322) que codifican resistencia para dos o más antibióticos (por ejemplo, *tetr* y *amp^r*, que confieren resistencia a tetraciclina y ampicilina, respectivamente). Este método exige una distribución apropiada de los sitios de restricción en el vector y requiere más pasos que el anteriormente descrito, por lo que actualmente se usa poco. Consiste en digerir al vector con una enzima que corte dentro de uno de los genes de resistencia a antibiótico (por ejemplo, *tetr*). Este sitio de corte es usado para ligar el DNA pasajero. El DNA recombinante se usa para transformar bacterias sensibles a ambos antibióticos. Los transformantes se seleccionan en medio que contiene el

segundo antibiótico (en nuestro caso, *amp^r*, cuyo gen codificante está intacto en el vector cortado). Para distinguir las células transformadas con el DNA recombinante que incluye el pasajero de las células transformadas con el vector intacto (por ejemplo, por recircularización sin inserto durante la ligación), se resiembran réplicas de cada colonia transformante en dos tipos de cajas (en posiciones equivalentes): unas que contienen tetraciclina y otras que contienen ampicilina. Las colonias que crezcan en ambas cajas probablemente porten vectores recircularizados sin DNA pasajero. Las colonias que crezcan sólo en presencia de ampicilina portarán probablemente vectores recombinantes con DNA pasajero ligado.

Disrupción de un gen letal: Recientemente se ha comercializado un nuevo sistema que emplea elementos de los dos anteriores y simplifica el proceso de clonación. Los vectores portan un sitio de policlonación para ligar fácilmente el DNA pasajero y un gen de resistencia a antibiótico para la selección de los transformantes como en el caso de la complementación α . La novedad estriba en el hecho de que estos vectores codifican una proteína letal para la célula, cuya expresión sólo se evita si se inserta un DNA pasajero en el sitio de clonación múltiple. El resultado es que sólo las células transformantes que incorporen vectores con inserto ligado podrán crecer en el medio selectivo provisto de antibiótico. Las células no transformadas no crecerán debido a la presencia de antibiótico; las células transformadas con vectores sin inserto se autoenvenenarán con la proteína letal que codifica dicho vector intacto. De este modo se evita usar X-gal/IPTG y se simplifica la selección de los mutantes. Como ejemplo comercial está el “Zero Background Cloning Kit” de Invitrogen (San Diego, CA, USA).

3. PREPARACIÓN DEL DNA PASAJERO Y VECTOR

Nota: Como es habitual, la manipulación del material biológico se debe realizar bajo las oportunas condiciones de esterilidad, a fin de evitar contaminaciones y degradación de las muestras.

ATENCIÓN: El material biológico de desecho deberá ser destruido. Por ejemplo, mediante inmersión en un agente oxidante fuerte como lejía diluida (hipoclorito sódico) o esterilización en autoclave. El primero suele emplearse con ácidos nucleicos; el segundo con células.

3.1. Purificación del DNA pasajero (amplicón obtenido por PCR)

En primer lugar se procede a purificar el DNA pasajero previamente amplificado mediante PCR. Este paso puede llevarse a cabo empleando diversas técnicas, como la clásica basada en fenol/cloroformo, u otras más recientes que se sirven de columnas provistas de filtros especiales o de resinas de sílice que unen los ácidos nucleicos.

En esta sesión emplearemos el kit GeneClean II (Bio101, USA). Se basa en que el DNA se une a unas bolitas de sílice cuando la concentración salina es alta, pero se libera de las mismas en presencia de agua o solución amortiguadora de baja fuerza iónica.

a).-Añadir 3 volúmenes de la solución de NaI (NaI Stock Solution) a la muestra. Ejemplo: si la muestra tiene 50 µl, añadirle 150 µl de NaI.

Nota: Agitar vigorosamente la suspensión GlassMilk (GlassMilk Suspension) mediante un agitador tipo vórtex hasta conseguir dispersarla uniformemente.

b).-Añadir 5 µl de la suspensión GlassMilk a la muestra. Comprobar previamente que la suspensión GlassMilk está dispersada. En caso contrario se cogería poca (sobrenadante) o demasiada (precipitado) resina.

Nota: Como regla general, 5 µl de GlassMilk son suficientes para purificar hasta 5 µg de DNA. Puede añadirse más GlassMilk para purificar cantidades superiores de DNA.

c).-Mezclar bien e Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente o — mejor— en hielo picado. Se obtienen mejores resultados si se mezcla de vez en cuando y/o si se incuba toda la noche en hielo picado.

d).-Centrifugar a máxima velocidad (16.000 g = 14.000 rpm en microfuga 5415C Eppendorf; Hamburg, Alemania) durante 5 segundos. Retirar y guardar el sobrenadante por decantación o con micropipeta. Procurar recoger todo el sobrenadante.

Nota: En este momento, el DNA debe estar unido a las bolitas de sílice. El sobrenadante se guarda por si se desea realizar una segunda extracción y como medida de seguridad. En cualquier caso, puede tirarse una vez comprobado que el DNA ha sido recuperado de las bolitas, al final de este protocolo.

e).-Añadir 400 µl de la solución NewWash. Agitar para dispersar la resina y precipitar centrifugando a máxima velocidad durante 5 segundos.

f).-Repetir el lavado anterior dos veces más. Al final procurar eliminar todo el sobrenadante. Colocar el Eppendorf boca abajo sobre papel absorbente en estufa a 37°C para favorecer la evaporación de los restos de etanol presentes. Generalmente la muestra se seca en unos 5 a 10 minutos.

g).-Una vez comprobado que la resina está seca, añadir 10 µl de agua o solución amortiguadora TE. Mezclar bien con la pipeta e incubar a 55°C durante 5 minutos. Centrifugar a máxima velocidad durante 5 segundos y recoger el sobrenadante (que contiene el DNA). Repetir el proceso añadiendo otros 10 µl de agua al precipitado, mezclar, incubar y centrifugar. Recoger el sobrenadante y mezclarlo con el obtenido previamente.

Nota: La segunda elución, aunque no es imprescindible, permite recuperar entre un 10 y un 20% del DNA.

h).-Cuantificar el DNA purificado (ver más adelante).

i).-Guardar a -20°C.

3.2. Purificación del DNA vector (plásmido *pBluescript*)

El DNA vector (plásmido) puede adquirirse comercialmente o bien obtenerse a partir de un cultivo de células portadoras de dicho huésped. Los métodos de purificación de plásmidos son también variados.

Nota: Si se desea purificar el vector de células hospedadoras, es necesario obtener un cultivo en fase estacionaria de *E. coli* portadora de *pBluescript* (SK+). Para ello se siembra con un asa una caja de petri con medio rico con ampicilina a partir de un cultivo almacenado a -80°C . Tras incubar toda la noche a 37°C aparecerán colonias aisladas. Con una de estas colonias se inoculan 10 ml (miniprep) ó 500 ml (maxiprep) de medio rico con ampicilina. Las células se incuban toda la noche a 37°C sin agitación (miniprep) o con 120 rpm (maxiprep).

Emplearemos el kit Magic Miniprep de Promega (USA) para purificar *pBluescript* (SK+) de *E. coli* DH5 α . *pBluescript* es un plásmido de 2964 pb (~3 kpb) que confiere al hospedador resistencia a ampicilina.

El fundamento del kit Magic Miniprep es similar al descrito previamente para GeneClean. Las células se lisan en presencia de detergente (SDS), álcali (NaOH) y RNasa. El lisado se neutraliza con acetato potásico y se añade la resina de silicio que unirá al DNA presente. Finalmente, la resina con el DNA se lava en una columna y el ácido nucleico se eluye con agua.

a).-Añadir 1,5 ml de suspensión bacteriana (esto es, cultivo en fase estacionaria crecido durante la noche en presencia de ampicilina) a cada uno de dos tubos Eppendorf de 2 ml.

b).-Centrifugar a 12.000 *g* durante 30 segundos para precipitar las células. Eliminar el sobrenadante por decantación.

c).-Resuspender la pella del primer Eppendorf en 100 μl de la solución de resuspensión (Cell Resuspension Solution). Añadir la suspensión al segundo tubo. Añadir otros 100 μl de la solución de resuspensión al primer tubo, recogerlos y echarlos al segundo tubo. Resuspender bien pipeteando arriba y abajo una y otra vez.

d).-Añadir 200 μl de solución de lisis (Cell Lysis Solution) y mezclar invirtiendo el tubo varias veces. La suspensión celular debe hacerse clara casi inmediatamente. En caso contrario, continuar invirtiendo el tubo hasta que la solución se aclare.

e).-Incubar la muestra a 60°C durante 30 minutos para digerir completamente el RNA (opcional).

Nota: Las muestras son estables en la solución de lisis durante al menos 18 meses (a temperatura ambiente).

f).-Añadir 200 μl de la solución de neutralización. Mezclar invirtiendo el tubo varias veces.

g).-Centrifugar a 12.000 *g* durante 5 minutos.

h).-Decantar el sobrenadante claro (que contiene el plásmido) a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml.

i).-Resuspender bien la resina de purificación de DNA (Magic Miniprep DNA Purification Resin) y añadir 1 ml de la misma al sobrenadante. Mezclar invirtiendo el tubo varias veces. El DNA se unirá a la resina.

j).-Preparar una jeringa de plástico de 3 ml. Retirar el émbolo (colocarlo en posición vertical para no ensuciar la cabeza de goma). Acoplar a la jeringa sin émbolo una minicolumna (Magic Minicolumn).

k).-Pipetear la mezcla (resina + DNA) en la jeringa. Insertar el émbolo. Presionar lenta y suavemente el émbolo. El líquido drenado puede tirarse a un vaso de precipitados.

l).-Separar la minicolumna de la jeringa. Retirar el émbolo de la jeringa (colocarlo en posición vertical para no ensuciar la cabeza de goma). Volver a acoplar la columna con la jeringa. Pipetear 2 ml de la solución de lavado (Column Wash Solution) en la jeringa. Presionar lenta y suavemente el émbolo. El líquido drenado puede tirarse a un vaso de precipitados.

m).-Separar la minicolumna de la jeringa. Colocar la minicolumna en un tubo Eppendorf de 1,5 ml cuyo tapón haya sido cortado previamente. Centrifugar a 12.000 *g* durante 20 segundos para secar la resina.

n).-Transferir la minicolumna a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml. Añadir 50 μ l de agua a la minicolumna. Esperar un minuto (el DNA permanecerá intacto en la minicolumna durante 30 minutos). Para eluir el DNA, centrifugar la minicolumna a 12.000 *g* durante 20 segundos. Retirar la minicolumna.

ñ).-Cuantificar el DNA purificado (ver más adelante).

o).-Guardar la solución conteniendo el DNA plasmídico a -20°C .

3.3. Cuantificación del DNA

Existen diversos métodos de cuantificación de ácidos nucleicos. En general, y si se dispone de suficiente cantidad de material, suele emplearse la espectrofotometría (absorbancia a 260 nm) mediante un espectrofotómetro estándar o dedicado (GeneQuant II de Pharmacia; Uppsala, Suecia). En los primeros suelen utilizarse microcubetas de cuarzo que requieren un volumen mínimo de 70 μ l de muestra, aunque recientemente se han desarrollado cubetas de tan solo 5–10 μ l (1 mm paso de luz) o incluso 0'5–5 μ l (0'1 mm paso de luz) como las de Hellma (Müllheim/Baden, Alemania). El GeneQuant II permite cuantificaciones desde 3 μ l. También pueden emplearse métodos fluorimétricos que son muy sensibles, aunque más difíciles de poner a punto. Por último se encuentran los sistemas basados en la tinción de diluciones de ácidos nucleicos con bromuro de etidio que se comparan con patrones conocidos. Una variante de este último método, que presenta la ventaja de su rapidez, comodidad y pequeño volumen empleado está representada por el kit "DNA DipStick" de Invitrogen (San Diego, CA, USA) así como el kit

“NucleicDotMetric” de GenoTechnology (Saint Louis, MO, USA). El primero utiliza la intensidad de color como parámetro de cuantificación, mientras que el segundo determina la concentración de ácidos nucleicos teniendo en cuenta el diámetro de la mancha formada. Permiten cuantificar volúmenes tan pequeños como 1 μ l que contengan entre 0,1 – 10 ng (DipStick) o entre 1 ng – 10 μ g (NucleicDotMetric) de DNA. En esta práctica emplearemos el kit DNA DipStick.

Nota: Dado que el rango de detección (respuesta lineal) del kit DNA DipStick oscila entre 0,1 –10 ng DNA/ μ l (idealmente alrededor de 1 – 2 ng DNA/ μ l), conviene emplear soluciones que no se desvíen significativamente de dichas concentraciones, realizando en su caso las oportunas diluciones y pruebas previas.

El fundamento de esta técnica es la reacción de los ácidos nucleicos con determinados compuestos químicos para generar un color azulado que es proporcional a la cantidad de DNA o RNA presente.

ATENCIÓN: Las soluciones “Coupling” y “Developer” contienen sustancias peligrosas. Usar siempre guantes.

a).-Preparar la solución de DNA. Tratar de obtener una solución que contenga entre 1–2 ng DNA/ μ l. Si se desconoce la concentración original, realizar pruebas con diluciones 1:10 y 1:100 de la misma.

b).-Colocar 1 μ l del estándar (1 ng DNA/ μ l) de la muestra original y de cada una de las diluciones en la membrana del DipStick. Es recomendable usar pipeta con suficiente precisión (p.ej., tipo P2 de Gilson; Villiers-le-Bel, Francia). Dejar secar.

c).-Añadir 1 ml de “Wash Solution” a la cubeta 1. Sumergir la membrana del DipStick en dicha cubeta durante 10 segundos.

Nota: Pueden procesarse al mismo tiempo varias tiras DipStick en la misma cubeta.

d).-Añadir 1 ml de “Coupling Solution” a la cubeta 2. Sumergir la membrana del DipStick en dicha cubeta durante 3 minutos.

e).-Sumergir la membrana del DipStick en un vaso de precipitados con agua destilada durante 20 segundos y volverla a meter en la cubeta 1 durante 4 minutos.

f).-Añadir 1 ml de “Developing Stock” a la cubeta 3. Adicionar 1 gota de “Developer”. Tapar la cubeta con su tapón y mezclar bien invirtiendo varias veces.

g).-Sumergir la membrana del DipStick en la cubeta 3 durante 2 minutos.

h).-Meter la membrana del DipStick en la cubeta 1 durante 20 segundos. Sacar el DipStick y dejarlo secar al aire o en estufa a 37°C.

i).-Determinar la concentración del DNA mediante comparación con los estándares.

Nota: Si las concentraciones probadas estuvieran fuera de rango (colores demasiado tenues o demasiado intensos), repetir el proceso con nuevas diluciones hasta obtener una respuesta lineal.

3.4. Digestión del DNA vector: generación de extremos romos

El objetivo de este paso es producir un vector lineal con extremos romos. En el caso de *pBluescript*, elegimos la restrictasa *EcoR V* que corta en el “polilinker”.

a).-Digerir 10 µg (10 µl) de *pBluescript* (SK+) con 22 U (2,2 µl) de *EcoR V* en un volumen total de 20 µl a 37°C durante 5 h. Seguir las indicaciones del suministrador de la restrictasa. En el caso de Boehringer–Mannheim (Mannheim, Alemania):

| | |
|---|---------------|
| Agua destilada “milli-Q” | 5,8 µl |
| 10 x Amortiguador B | 2 µl |
| <i>pBluescript</i> (1 µg/µl) | 10 µl (10 µg) |
| <i>EcoR V</i> (10 U/µl) | 2,2 µl (22 U) |
| Volumen final = 20 µl (ajustado con agua) | |
| Incubar a 37° C durante 5 h (o toda la noche) | |
| Guardar a –20°C | |

b).-Comprobar la efectividad de la digestión, sometiendo a electroforesis en gel de agarosa una muestra de la misma (p.ej., 1 µl = 50 ng) junto con 50 ng de *pBluescript* sin digerir y un patrón de pesos moleculares.

ATENCIÓN: Es muy importante que el 100% del vector esté digerido. En caso contrario, las moléculas sin cortar transformarán preferentemente las células hospedadoras (ver más adelante), generando transformantes azules sin DNA pasajero. Si fuera necesario, correr el producto de digestión en un gel de agarosa de bajo punto de fusión, cortar la banda deseada (vector linearizado) y purificar dicho DNA.

c).-Purificar el DNA mediante GeneClean (ver protocolo descrito anteriormente).

d).-Cuantificar el DNA purificado mediante DNA DipStick (ver protocolo descrito anteriormente).

e).-Guardar el producto purificado de la digestión a –20°C.

Nota: Generalmente se realiza la digestión de suficiente cantidad de DNA vector (p.ej., 10 µg), lo cual permite emplearlo después en múltiples experimentos de clonación.

3.5. Extensión del DNA vector y pasajero: generación de colas T o A

La técnica de clonación denominada T/A o de vectores T se basa en el hecho de que los productos de PCR suelen presentar una A extra en sus dos extremos 3'. Esta peculiaridad puede explotarse para clonar dichos productos; basta añadir una T a los extremos 3' romos del vector elegido y previamente linearizado mediante una restrictasa.

ATENCIÓN: No todas las polimerasas añaden A. Como excepciones típicas se encuentran las polimerasas con capacidad correctora exonucleasa 3'→5' (*Pfu*, *Vent*, *UITma*, etc). Por otra parte, la base añadida es también dependiente de la secuencia (Hu, 1993).

a).-Para generar un vector T (esto es, con una T extra en cada extremo 3'), incubar 5 µg del vector previamente linearizado con *EcoRV* en presencia de 2 mM dTTP, 5 U de AmpliTaq y la cantidad correspondiente de solución amortiguadora y agua en un volumen total de 50 µl a 72°C durante 2 h. Cubrir la reacción con cera para evitar la evaporación.

| Tabla 2. Generación de colas T en vector | |
|---|--------------|
| Agua destilada "milli-Q" | 34 µl |
| 10 x Amortiguador de polimerasa | 5 µl |
| dTTP (100 mM) | 1 µl (2 mM) |
| <i>pBluescript</i> (0.5 µg/µl) | 10 µl (5 µg) |
| AmpliTaQ (5 U/µl) | 1 µl (5 U) |
| Volumen final = 50 µl (ajustado con agua) | |
| Añadir cera para evitar evaporación | |
| Incubar a 72° C durante 2 h | |
| Guardar a -20°C | |

b).-Para generar un pasajero A (esto es, con una A extra en cada extremo 3'), basta haber realizado previamente una PCR con una polimerasa apropiada (como, p.ej., Taq, AmpliTaq o Tth) dejando al final del proceso 5–10 minutos de reacción a 70–75 °C. En caso de duda, incubar 1,45 µg del DNA amplificado en presencia de 2 mM dATP, 5 U de AmpliTaq y la cantidad correspondiente de solución amortiguadora y agua en un volumen total de 25 µl a 72°C durante 2 h. Cubrir la reacción con cera para evitar la evaporación.

| Tabla 3. Generación de colas A en pasajero | |
|---|-----------------|
| Agua destilada "milli-Q" | 34 µl |
| 10 x Amortiguador de polimerasa | 5 µl |
| dATP (100 mM) | 1 µl (2 mM) |
| Amplicón 857pb (145 ng/µl) | 10 µl (1,45 µg) |
| AmpliTaQ (5 U/µl) | 1 µl (5 U) |
| Volumen final = 50 µl (ajustado con agua) | |
| Añadir cera para evitar evaporación | |
| Incubar a 72° C durante 2 h | |
| Guardar a -20°C | |

c).-Si no lo estuvieran, purificar el DNA vector y el DNA pasajero con GeneClean.

d).-Si fuera necesario, cuantificar el DNA vector y el DNA pasajero espectrofotométricamente o mediante el kit DNA DipStick (Invitrogen), según se ha indicado anteriormente.

e).-Guardar a -20°C .

4. LIGACIÓN DEL DNA PASAJERO Y VECTOR

Una vez obtenidos y purificados el DNA vector (con colas T) y el DNA pasajero (con colas A) puede procederse a la unión entre ambos (ligación) para formar una nueva molécula recombinante.

Nota: Los mejores resultados se obtienen cuando la proporción de ligación vector : pasajero es 1 o ligeramente superior para el pasajero. Obviamente, se trata de proporciones de *número de moléculas*; no de cantidad en peso. Por ejemplo, en 1 μg de un vector de 10 kpb hay diez veces menos moléculas que en 1 μg de un pasajero de 1 kpb. Por ello, deberán realizarse los cálculos necesarios para transformar la cantidad en peso de vector e inserto a número de moléculas o molaridad. Una forma especial de expresar este concepto es mediante el término “picomoles de extremos” (del inglés, “*picomole ends*”) por microgramo de DNA lineal de doble cadena, según la fórmula:

$$(2 \times 10^6)/(660 \times n^{\circ} \text{ pb}) = \text{pmoles de extremos}/\mu\text{g de dsDNA}$$

En nuestro caso, el vector pBluescript tiene 2964 pb, mientras que el inserto consta de 857 pb; esto es, el primero es ~ 3.5 veces más grande que el segundo. Este concepto se resume en la tabla siguiente:

| Tabla 4. Relación entre peso y molaridad | | |
|--|--|--|
| | 1 μg de pBluescript (2964 pb) es... | 1 μg de Pasajero (857 pb) es... |
| Peso (μg) | 1 | 1 |
| Molaridad (pmoles) | 0,5111847215 | 1,767971429 |
| Molaridad de extremos (pmoles de extremos) | 1,022369443 | 3,535942859 |
| Número de moléculas | $3,08244 \times 10^{11}$ | $1,06484 \times 10^{12}$ |
| Equivalencias en molaridad (n° moléculas) | | |
| 1 μg pBluescript = 0,2891362 μg de Pasajero | | |
| 1 μg Pasajero = 3,4585765 μg de pBluescript | | |

a).-Mezclar 0,4 μg (=0,41 pmoles de extremos) de *pBluescript* purificado (previamente digerido con *EcoRV* y con cola T) con 0,13 μg (=0,46 pmoles de extremos) de DNA pasajero purificado (directamente de PCR o tras reacción para añadirle cola A, según se describe arriba).

b).-Incubar la mezcla a 45°C durante 5 minutos para desnaturalizar posibles apareamientos. Colocar en hielo picado.

c).-Añadir 0.1 U de T4 DNA ligasa, la solución amortiguadora apropiada y agua hasta 20 µl de volumen total. Incubar a 16°C toda la noche. En el caso de Boehringer–Mannheim:

| Tabla 5. Reacción de ligación vector•pasajero | |
|--|-----------------|
| Agua destilada “milli-Q” | 7,9 µl |
| 10 x Amortiguador | 2 µl |
| DNA vector + pasajero | 10 µl (0,53 µg) |
| DNA Ligasa T4 (1 U/µl) | 0,1 µl (0,1 U) |
| Volumen final = 20 µl (ajustado con agua) | |
| Incubar a 16° C durante toda la noche | |
| Guardar a –20°C | |

Nota: Una forma económica y cómoda de preparar un baño a 16°C es colocar agua y algo de hielo picado en una caja de poliestireno expandido hasta que la temperatura llegue a 16°C. Una vez tapada la caja puede conservar dicha temperatura durante toda la noche, incluso en verano.

5. TRANSFORMACIÓN DE *E. COLI* Y SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES

En este paso se introduce el DNA recombinante previamente generado (vector ligado con pasajero) en la célula hospedadora. Para incrementar la eficacia del proceso, se somete al cultivo de células hospedadoras a determinados tratamientos químicos y/o físicos para hacerlas “competentes” (esto es, capaces de incorporar más fácilmente DNA externo). Finalmente, los transformantes se seleccionan en base a su resistencia a antibióticos.

5.1. Obtención de *E. coli* DH5α competentes

Existen diversos métodos para obtener bacterias competentes. El procedimiento clásico se basa en la exposición de las células a iones Ca^{2+} en forma de cloruro de calcio (CaCl_2) acompañada, a veces, de choques térmicos, habiéndose optimizado para producir >108 transformantes/µg de DNA. No obstante, su principal inconveniente es que se trata de un protocolo bastante laborioso. Recientemente se han desarrollado métodos mucho más simplificados que generan 107–108 transformantes/µg de DNA. En esta sesión utilizaremos un método simplificado que emplea polietilén glicol (PEG), además de iones Mg^{2+} (MgSO_4 o MgCl_2) y DMSO (dimetil sulfóxido).

a).-Inocular 10 ml de medio rico LB con una colonia de *Escherichia coli* DH5αF' en un matraz de 100 ml. Incubar a 37°C toda la noche sin agitación.

b).-Añadir 1 ml del cultivo anterior a un matraz de 500 ml conteniendo 110 ml de medio rico LB precalentado a 37°C. Incubar a 37°C con agitación (100 rpm) hasta que la $\text{OD}_{600} = 0.3 - 0.4$ (~ 2 horas y media).

Nota: Este protocolo procesa unos 100 ml de cultivo y genera unos 10 ml de bacterias competentes. Cada ml permite sembrar 20 cajas de transformantes. De modo que si se desea realizar un experimento a menor escala. Por ejemplo, para sembrar 20 cajas selectivas, basta con procesar unos 10 ml de cultivo

inicial (que generarán 1 ml de suspensión competente), acelerándose la manipulación y trabajo significativamente.

Nota: Aunque pueden emplearse células en otra fase de crecimiento, el estadio de fase exponencial temprana ($OD_{600} = 0.3 - 0.4$) produce los mejores resultados. Medir periódicamente la OD_{600} del cultivo extrayendo muestras de 1 ml. Lo ideal es usar un matraz con pitorro, de forma que pueda medirse la OD directamente sin extraer células del mismo.

c).-Centrifugar las bacterias a 1000 g y 4°C durante 10 minutos (sin freno). Eliminar el sobrenadante por decantación y resuspender las células precipitadas con cuidado en 10 ml (un décimo del volumen procesado) de TSS enfriado en hielo picado.

Nota: Este paso puede llevarse a cabo en una centrífuga preparativa Beckman (Fullerton, CA, USA) con el rotor JA20 (3.000 rpm = 1090 g). Si se están procesando sólo 20 ml de cultivo, puede emplearse la microfuga Eppendorf 5415C con el rotor de tubos de 1,5/2 ml (18 tubos), lo cual permite procesar hasta 36 ml cada vez. La única precaución en este último caso es colocar la microfuga en una cámara refrigerada un par de horas antes de su uso y envuelta en una bolsa hermética de plástico (para evitar condensaciones y riesgo de corto circuito). Asimismo, sacar la microfuga de la cámara envuelta en una bolsa hermética de plástico y esperar 2 horas antes de abrirla. En general, lo ideal es disponer de una microfuga permanentemente en la cámara fría o —mejor— de una microfuga refrigerada.

ATENCIÓN: Una vez expuestas a TSS, las células son especialmente delicadas. Por ello es esencial tratarlas con suavidad. En particular, evitar agitarlas violentamente. Para resuspenderlas pipetear suavemente arriba y abajo.

Nota: En este momento las células son “competentes”. Pueden además conservarse en tal estado si se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido (-196°C) o en una mezcla congelante como hielo seco con etanol, acetona o metanol (-77°C) o hielo picado y cloruro cálcico: 1,4 partes en peso de hielo : 2 partes en peso de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (-55°C).

5.2. Transformación

a).-Mezclar con sumo cuidado 92 μl de células *Escherichia coli* DH5 α F' competentes previamente generadas con 8 μl (~212 ng) de la reacción de ligación previamente obtenida en un tubo de propileno frío. Preparar un control positivo mezclando 100 μl de la suspensión de células competentes con 0.1 ng (=100 pg) de pBluescript intacto, así como un control negativo sin añadir DNA a las células competentes.

Nota: En el caso de emplear células competentes congeladas, éstas deben descongelarse lentamente en hielo y usarse inmediatamente. Aunque lo ideal es descongelarlas una sola vez, es posible descongelarlas y congelarlas varias veces sin que pierdan la competencia; sobre todo si se congelan las células sobrantes inmediatamente tras su descongelación. Un truco para evitar

congelaciones/descongelaciones consiste en desprender un trozo de células congeladas con una espátula y guardar inmediatamente el resto congelado.

b).-Incubar la mezcla de células competentes y DNA a 4°C durante 5 a 60 minutos (p.ej., 30 min).

c).-Diluir la mezcla hasta 1 ml con TSS enriquecido con 20 mM de glucosa (o sea, añadir 900 µl de TSS + 18,5 µl de solución 20% glucosa). Incubar a 37°C durante 1 h con agitación (140 rpm) para permitir la expresión del gen de resistencia a antibiótico presente en los plásmidos.

d).-Recuperar las células centrifugando a 1.000 g durante 10 min. Eliminar sobrenadante por decantación y resuspender las bacterias con mucho cuidado en 100 µl de TSS.

5.3. Selección de transformantes

a).-Sembrar por duplicado; es decir, 50 µl de la suspensión bacteriana por cada caja de petri de 9 cm ø conteniendo 25 ml de medio sólido rico Luria-Bertani, ampicilina, IPTG y X-Gal. Sembrar también los controles positivos y negativos. En el caso de controles positivos, sembrar una dilución apropiada para que los transformantes puedan contarse fácilmente (en caso contrario, habrá decenas de miles de colonias que podrán incluso formar un césped).

Nota: Lo más cómodo es preparar un cóctel de ampicilina, IPTG y X-Gal que se añade previamente a las cajas o junto con la mezcla de células transformadas.

Nota: Aunque para sembrar puede usarse agar de cobertera, cuando el número de cajas sembradas es pequeño, resulta más conveniente emplear un asa de siembra de vidrio que se esteriliza entre siembra y siembra con alcohol quemado por mechero.

ATENCIÓN: Cuando se selecciona resistencia a ampicilina, las células transformadas deben sembrarse a una densidad <104 por caja de 9 cm ø e incubarse menos de 20 h a 37°C. De otro modo, pueden generarse falsos positivos (colonias satélites), ya que se libera al medio β-lactamasa, que destruye la ampicilina y permite el crecimiento de las células cercanas (aunque sean sensibles a la ampicilina). Este efecto puede reducirse en parte o prácticamente eliminarse utilizando, respectivamente, otros antibióticos como la carbenicilina o la zeocina. No obstante, éstos son más caros y no todos los vectores incorporan genes de resistencia a los mismos. Entre los que incorporan resistencia a zeocina se encuentra el pZErO-1, del anteriormente mencionado “Zero Background Cloning Kit” de Invitrogen.

b).-Incubar a 37°C durante 20 h en estufa.

c).-Contar las colonias blancas y las azules de las cajas problema y controles positivos (no deben haber crecido colonias en las cajas de controles negativos). Calcular las frecuencias de transformación (transformantes o unidades formadoras de colonias/µg de DNA) para las cajas problemas y

control positivo, así como el porcentaje de colonias blancas (con inserto; esto es, β -gal-) vs colonias totales (incluyendo las azules; sin inserto).

d).-Recrecer diez colonias blancas en cajas nuevas con medio rico sólido y los agentes selectivos e indicadores (ampicilina, IPTG y X-Gal). Para ello, coger la colonia con un palillo de dientes estéril y hacer una raya sobre la superficie del medio de la caja nueva.

e).-Incubar a 37°C hasta el día siguiente.

f).-Guardar los clones transformantes a 4°C hasta su posterior uso.

ATENCIÓN: Se supone que las colonias azules no incorporan inserto, mientras las blancas sí. No obstante, es posible que alguna colonia blanca en realidad sea un falso positivo. Ello puede ser debido a que se produjera un cambio de fase al relinearizarse el vector sin pasajero, o a otra alteración que impida la producción de β -galactosidasa funcional. Por ello, es aconsejable confirmar las colonias blancas como auténticos transformantes que incluyan el DNA pasajero, como veremos en las sesiones 13 a 14.

6. BIBLIOGRAFÍA COMENTADA

- + Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds) (2005): "Current Protocols in Molecular Biology". Vols 1 a 4. New York: Greene & John Wiley (New York). Manual de protocolos. "La nueva «Biblia» del Biólogo Molecular" actualizada trimestralmente. Clasificación: PROTOSCOLOS.
- + Bio101 (2005): The GeneClean II Kit. Instructions for purification of DNA. Catalog number: GeneCleanII. Bio101, Inc. (USA). Manual de instrucciones del kit "3106". Clasificación: PROTOSCOLOS.
- Brown TA (ed) (1991): "Molecular Biology LabFax". Oxford: Bios Scientific Publishers/Blackwell Scientific Publications. Clasificación: DATOS.
- Burrell MA (ed) (1993): "Enzymes of Molecular Biology". Totowa: Humana Press. Clasificación: TEORÍA ESPECÍFICO.
- Chung CT, Niemela SL, Miller RH (1989): One step preparation of competent *Escherichia coli*. Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc Natl Acad Sci USA 86:2172-2175. Descripción del proceso de transformación simplificado basado en PEG. Clasificación: TEORÍA ESPECÍFICO.
- Firman K (1991): "DNA Cloning/Sequencing Workshop". New York: Ellis Horwood. Clasificación: PROTOSCOLOS.
- Hu GX (1993): DNA polymerase-catalyzed addition of nontemplate extra nucleotides to the 3' end of a DNA fragment. DNA and Cell Biology 12:763-770. Actividad "extendasa" inespecífica de las DNA polimerasas. Clasificación: TEORÍA ESPECÍFICO.
- + Promega (2005): Magic Minipreps DNA Purification System. Plasmid Miniprep. Instructions for isolating plasmid DNA from bacteria. Catalog number A7100. Promega (USA). Manual de instrucciones del kit "Magic Miniprep". Clasificación: PROTOSCOLOS.

- + Sambrook J, Russell D (2001): “Molecular Cloning. A Laboratory Manual”, 3rd edition, Vols 1–3. New York: CSH Laboratory Press. Manual de protocolos. “La «Biblia» clásica del Biólogo Molecular”. Clasificación: PROTOCOLOS.
- + Stratagene (2005): *pBluescript*. DNA cloning vector. Instructions for cloning DNA. Stratagene (USA). Manual de instrucciones del kit “*pBluescript*”. Clasificación: PROTOCOLOS.
- Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M (1992): “Recombinant DNA” New York: Freeman and Company. Divulgativo y a la vez con nivel y rigor científico. Clásico sobre Ingeniería Genética y sus aplicaciones. Claro, didáctico y con numerosos esquemas e ilustraciones explicativas. Muy recomendable. Clasificación: TEORÍA DIVULGATIVO.

Nota: las referencias fundamentales para la preparación de la sesión se indican con el símbolo “+”.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto PAFPU ‘FORMAPROFE’ (‘UCO-N-031’) de Formación del Profesorado Universitario, Junta de Andalucía.

ANEXO 1: MEDIOS, SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO

Pesar o añadir las cantidades que se indican en las tablas correspondientes, disolver en agua (en el caso de que se desee repartir entre botes) y esterilizar en autoclave (“autoclavar”) a 120°C y 1 bar (= 1 kg/cm²) de presión durante 20 minutos.

ATENCIÓN: Comprobar que el autoclave tiene agua en el fondo. En caso contrario, añadir agua destilada hasta la rejilla del fondo de la máquina. Asimismo, comprobar que las salidas de agua y de aire se encuentran cerradas. Si no se toman estas precauciones podría quemarse el autoclave.

ATENCIÓN: Como norma general, no se deben autoclavar soluciones concentradas de ácidos (clorhídrico, sulfúrico) o álcalis (NaOH). Como es obvio, estas soluciones son “estériles” per se. Además, pueden dañar la estructura de acero del autoclave. Tampoco se autoclavan soluciones concentradas ni diluidas de disolventes orgánicos (acetona, tolueno, éter, metanol, etanol, etc). En estos casos se autoclava la solución sin el disolvente orgánico volátil. Éste se añade posteriormente cuando la temperatura de la muestra es igual a la ambiente. En caso contrario, el disolvente volátil se evaporará completamente durante el proceso de esterilización en el autoclave!

Generalmente las soluciones se preparan en botes de vidrio tipo Pyrex.

Medio rico Luria–Bertani (LB) líquido o sólido

El medio rico Luria–Bertani (LB) puede prepararse líquido (crecimiento masivo de cultivos) o sólido (aislamiento de colonias), según se indica en la tabla siguiente.

| Tabla 6. Medio rico Luria–Bertani (LB) líquido | | |
|--|--------------------|---------------------|
| | Para 500 ml (g) | Para 1 litro (g) |
| Bacto triptona | 5 | 10 |
| Extracto de levadura | 2,5 | 5 |
| NaCl | 5 | 10 |
| Agua destilada “milli-Q” | Hasta 500 ml | Hasta 1 litro |
| En su caso, disolver bien y repartir en botes o matraces | | |
| Esterilizar en autoclave | | |
| Guardar a temperatura ambiente | | |

Nota: El medio rico LB líquido permanece estable a temperatura ambiente durante meses (e incluso años).

ATENCIÓN: Antes de usar un medio rico LB líquido, agitar el bote o matraz que lo contiene para descartar la posibilidad de contaminación microbiana. En tal caso, el medio se volvería blanquecino–opaco y debería desecharse (previa destrucción del contaminante en el autoclave).

| Tabla 7. Medio rico Luria–Bertani (LB) sólido | | |
|---|--------------------|---------------------|
| | Para 500 ml (g) | Para 1 litro (g) |
| Bacto triptona | 5 | 10 |
| Extracto de levadura | 2,5 | 5 |
| NaCl | 5 | 10 |
| “Bacto agar” | 7,5 | 15 |
| Agua destilada “milli-Q” | Hasta 500 ml | Hasta 1 litro |
| Esterilizar en autoclave | | |
| Dejar enfriar hasta 50–60°C | | |
| Repartir a razón de unos 25 ml/caja petri 9 cm ø | | |
| Dejar solidificar sobre superficie horizontal | | |
| Secar cajas en estufa a 37°C hasta el día siguiente (cerradas) o en cabina de flujo laminar durante media hora (abiertas) | | |
| Guardar a 4°C en bolsas cerradas | | |

Nota: Aunque generalmente no es necesario, puede añadirse un 95% del agua al medio rico LB (líquido o con agar), ajustar el pH a 7,5 con NaOH y añadir el resto de agua hasta el volumen final deseado.

Nota: Antes de repartir, el medio con agar, puede dejarse enfriar hasta 50–60°C al aire, en hielo picado (vigilando y agitando para que no se solidifique) o en una estufa a 60°C. Esta última alternativa es muy cómoda, permitiendo repartir en placas cuando se desee.

Nota: El medio rico LB sólido permanece estable a 4°C durante meses. No debe almacenarse a temperatura ambiente porque acabaría evaporándose, convirtiéndose en una lámina de agar.

ATENCIÓN: Antes de usar una caja de petri con medio rico LB sólido, comprobar al trasluz que no esté contaminada por alguna colonia. Si lo

estuviera, desechar dicha caja (previa destrucción del contaminante en el autoclave).

Solución glucosa (20%)

La solución TSS consta de medio rico Luria–Bertani (LB) al que se añade PEG, sulfato de magnesio y DMSO, según se indica en la tabla siguiente.

| Tabla 8. Solución glucosa (20%) | | |
|--|-------------------|--------------------|
| | Para 10 ml (g) | Para 100 ml (g) |
| Glucosa | 2 | 20 |
| Agua destilada “milli-Q” | Hasta 10 ml | Hasta 100 ml |
| Añadir 5 ó 50 ml, respectivamente, disolver y completar hasta 10 ó 100 ml. La disolución completa de la glucosa en polvo tarda en completarse una hora o más, por lo que se recomienda el uso de una “mosca magnética” | | |
| Esterilizar en autoclave | | |
| Guardar a temperatura ambiente | | |

Solución TSS

La solución TSS consta de medio rico Luria–Bertani (LB) al que se añade PEG, sulfato de magnesio y DMSO, según se indica en la tabla siguiente.

| Tabla 9. Solución TSS | | |
|--|--------------------|---------------------|
| | Para 500 ml (g) | Para 1 litro (g) |
| Bacto triptona | 5 | 10 |
| Extracto de levadura | 2,5 | 5 |
| NaCl | 5 | 10 |
| Polietilenglicol (PEG) PM = 3350 (u 8000) | 50 | 100 |
| MgSO ₄ | 4,31 | 8,63 |
| Agua destilada “milli-Q” | Hasta 475 ml | Hasta 950 ml |
| Ajustar el pH a 6,5 | | |
| Esterilizar en autoclave | | |
| Esperar a que se enfríe a temperatura ambiente | | |
| DMSO | 25 ml | 50 ml |
| Guardar a temperatura ambiente | | |

Nota: Ajustar el pH con HCl concentrado ANTES de ajustar el volumen final con agua. Es decir, disolver en algo menos de 500 ml o 1 litro, respectivamente (p. ej., en 400 y 800 ml, respectivamente), ajustar pH y finalmente completar hasta el volumen final.

Solución TSS+glucosa

La solución TSS consta de medio rico Luria–Bertani (LB) al que se añade PEG, sulfato de magnesio y DMSO, según se indica en la tabla siguiente.

| Tabla 10. Solución TSS+20mM glucosa | | |
|---|--------------------|---------------------|
| | Para 10 ml (ml) | Para 100 ml (ml) |
| Solución TSS | 10 | 100 |
| Solución Glucosa (20%) | 20,6 µl | 2,1 |
| Añadir a razón de 900 µl por transformación (volumen total 1 ml) | | |
| Guardar a temperatura ambiente | | |

Solución Ampicilina

La ampicilina permite seleccionar las bacterias que han incorporado el vector portador del gen de resistencia al antibiótico.

| Tabla 11. Solución ampicilina (60 µg/µl) | | |
|---|----------------|----------------|
| | Para 1 ml | Para 10 ml |
| Ampicilina | 0,06 g (60 mg) | 0,6 g (600 mg) |
| Agua destilada "milli-Q" | 994 µl | 9,4 ml |
| Ajustar los volúmenes con agua hasta 1 ó 10 ml | | |
| Esterilizar por filtración a través de 0,22 µm | | |
| Repartir en tubos Eppendorf | | |
| Guardar a -20°C | | |

Para obtener el medio selectivo, añadir 1 µl de la solución de ampicilina (60 µg/µl) por cada ml de medio para tener 60 µg/ml. Añadir al medio líquido justo antes de su utilización. Para obtener medio sólido selectivo, añadir justo antes de su uso a razón de 25 µl por caja de petri de 9 cm Ø conteniendo 25 ml de medio rico solidificado. Extender con asa de siembra.

Nota: Generalmente justo antes de sembrar las bacterias transformantes, se añade a las cajas de medio rico solidificado un cóctel formado por ampicilina (o el antibiótico selectivo), IPTG y X-gal, extendiéndose la mezcla con un asa de siembra hasta que su superficie quede seca. (ver "Solución Cóctel Selectivo" más abajo).

Solución IPTG

El IPTG (isopropiltio-β-D-galactósido) es un análogo de la galactosa que activa el operón de la lactosa, produciéndose β-galactosidasa.

| Tabla 12. Solución IPTG (200 µg/µl) | | |
|--|-----------|------------|
| | Para 1 ml | Para 10 ml |
| IPTG | 0,2 g | 2 g |
| Agua destilada "milli-Q" | 800 µl | 8 ml |
| Ajustar los volúmenes con agua hasta 1 ó 10 ml, respectivamente | | |
| Esterilizar por filtración a través de 0,22 µm | | |
| Repartir en tubos Eppendorf | | |
| Guardar a -20°C | | |

Añadir a razón de 4 µl por caja de petri de 9 cm Ø conteniendo 25 ml de medio rico solidificado. Extender con asa de siembra.

Nota: Generalmente justo antes de sembrar las bacterias transformantes, se añade a las cajas de medio rico solidificado un cóctel formado por ampicilina (o el antibiótico selectivo), IPTG y X-gal, extendiéndose la mezcla con un asa de siembra hasta que su superficie quede seca. (ver “Solución Cóctel Selectivo” más abajo).

Solución X-Gal

El X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido) es un sustrato cromogénico de la β -galactosidasa. En estado íntegro no tiene color (generándose colonias “blancas”), pero su producto de digestión, el bromocloroindol, es coloreado (generándose colonias “azules”).

| Tabla 13. Solución IPTG (20 μ g/ μ l) | | |
|--|-------------|------------|
| | Para 1 ml | Para 10 ml |
| X-Gal | 0,02 g | 0,2 g |
| Dimetilformamida | 998 μ l | 9,8 ml |
| Ajustar los volúmenes con agua hasta 1 ó 10 ml | | |
| Repartir en tubos Eppendorf | | |
| Proteger de la luz en tubos ámbar o con papel aluminio | | |
| Guardar a -20°C | | |

Añadir a razón de 40 μ l por caja de petri de 9 cm \varnothing conteniendo 25 ml de medio rico solidificado. Extender con asa de siembra.

Nota: Generalmente justo antes de sembrar las bacterias transformantes, se añade a las cajas de medio rico solidificado un cóctel formado por ampicilina (o el antibiótico selectivo), IPTG y X-gal, extendiéndose la mezcla con un asa de siembra hasta que su superficie quede seca (ver “Solución Cóctel Selectivo” más abajo).

Solución Cóctel Selectivo (Ampicilina+IPTG+X-Gal)

Para seleccionar transformantes resistentes a ampicilina es necesario preparar cajas de medio rico con dicho antibiótico, IPTG y X-Gal. Para optimizar el proceso y ahorrar dinero (el X-Gal y el IPTG son muy caros) lo mejor es preparar en primer lugar cajas que contengan sólo medio rico Luria-Bertani (ver sesión 1). Para emplearlas como cajas selectivas de transformantes, basta añadir a cada una un cóctel conteniendo ampicilina, X-Gal e IPTG, extender con un asa de siembra y dejar secar, según se indica en la tabla siguiente. A continuación pueden sembrarse los transformantes. De hecho, pueden sembrarse y extenderse conjuntamente, con el consiguiente ahorro de tiempo.

| Tabla 14. Solución Cóctel Selectivo (Ampicilina+IPTG+X-Gal) | | | | | |
|---|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Para 25 ml | Para 125 ml | Para 250 ml | Para 375 ml | Para 500 ml |
| | | | | | |

| | (1 caja) | (5 cajas) | (10 cajas) | (15 cajas) | (20 cajas) |
|--|----------|-----------|------------|------------|------------|
| Ampicilina (60 µg/µl) | 25 µl | 125 µl | 250 µl | 375 µl | 500 µl |
| IPTG (200 µg/µl) | 4 µl | 20 µl | 40 µl | 60 µl | 80 µl |
| X-Gal (20 µg/µl) | 40 µl | 200 µl | 400 µl | 600 µl | 800 µl |
| Mezclar bien y añadir a razón de 69 µl por caja de medio sólido LB | | | | | |
| Extender con asa de siembra hasta que la superficie quede seca | | | | | |
| Sembrar transformantes | | | | | |

Material biológico: estirpes y vectores

El fragmento amplificado por PCR (857 pb) se insertará en el vector pBluescript que será clonado en *E. coli* DH5αF'.

Tabla 15. Estirpes y vectores

| | Genotipo | Comentarios |
|--------------------------------|---|--|
| <i>Escherichia coli</i> DH5αF' | <i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ø80 <i>lacZ</i> ΔM15) <i>hsdR17</i> (<i>r</i> _k ⁻ , <i>m</i> _k ⁻) <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i> F' | <p>Estirpe supresora deficiente en recombinación usada para clonar DNA de plásmidos y cósmidos.</p> <p>La delección (ø80 <i>lacZ</i>ΔM15) permite la α-complementación con la región amino terminal de la β-galactosidasa codificada por los vectores tipo pUC (p.ej., pBluescript).</p> <p>El marcador <i>hsdR17</i> (<i>r</i>_k⁻, <i>m</i>_k⁻) confiere carencia de restricción (<i>r</i>_k⁻) y de metilación (<i>m</i>_k⁻).</p> <p>Contiene el episoma F'.</p> |
| <i>pBluescript</i> (SK+) | <i>AmpR</i> <i>Lac</i> promoter MCS <i>ColE1</i> <i>f1</i> (+) | <p>"Phagemid" ("Plasmifago") de 2964 pb derivado de pUC19.</p> <p>Presenta gen de resistencia a ampicilina, confiriendo dicha propiedad a las células hospedadoras de dicho huésped.</p> <p>La porción del gen <i>lacZ</i> (promotor) que incluye permite complementación-α, lo cual hace posible la selección blanco/azul de las colonias recombinantes.</p> <p>La secuencia de clonación múltiple (MCS; "Multiple Cloning Site") permite el corte único con diferentes restrictasas para la inserción del DNA pasajero.</p> <p>El origen de replicación <i>ColE1</i> permite su multiplicación en forma de dsDNA (esto es, plásmido). Por su parte, el origen de replicación <i>f1</i> (+) permite generar ssDNA cuando la célula hospedadora es coinfectada con un fago huésped denominado fago coadyuvante ("helper phage").</p> |