

46. Purificación y análisis del DNA recombinante

Gabriel Dorado Pérez

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

RESUMEN

En las prácticas anteriores se ha procedido a la selección de las bacterias transformantes mediante su identificación por el color (blanco) y crecimiento en cajas selectivas con antibiótico (ampicilina). La mayor parte de dichos transformantes portarán el DNA recombinante (plásmido con inserto) apropiado. No obstante, algunos de ellos podrían ser recombinantes que no hayan incorporado el inserto correcto. El método más exacto para determinar la identidad molecular del DNA recombinante es mediante secuenciación del mismo. Sin embargo, éste es un procedimiento laborioso y caro. Por ello, existen diversas estrategias para seleccionar antes de la secuenciación aquellos plásmidos recombinantes que porten insertos cuya secuencia y tamaño sea el esperado. Tradicionalmente, esta preselección se ha llevado a cabo realizando análisis de restricción de dichas construcciones. Actualmente, esta metodología puede complementarse con la amplificación mediante PCR con cebadores específicos del inserto o que flanqueen al mismo, comprobando después en un gel de agarosa el tamaño de los amplicones producidos. Éstos pueden ser posteriormente sometidos a un análisis de restricción. El resultado de cada uno de estos análisis se somete a electroforesis en gel de agarosa y se tiñe con bromuro de etidio. Estos análisis son complementarios: puede realizarse uno, varios o todos; según las necesidades y tiempo disponible.

Palabras clave: falsos positivos, maxi preparación, mini preparación, PCR, purificación analítica, purificación preparativa.

Abreviaturas empleadas. DMSO: dimetil sulfóxido; DNA: ácido desoxirribonucleico; LB: medio rico Luria-Bertani; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; SDS: dodecil sulfato sódico.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En prácticas anteriores se ha procedido a la selección de las bacterias transformantes mediante su identificación por el color (blanco) y crecimiento en cajas selectivas con antibiótico (ampicilina). La mayor parte de dichos transformantes portarán el DNA recombinante (plásmido con inserto) apropiado. No obstante, algunos de ellos podrían ser recombinantes que no hayan incorporado el inserto correcto.

El método más exacto para determinar la identidad molecular del DNA recombinante es mediante secuenciación del mismo. Sin embargo, éste es un procedimiento laborioso y caro. Por ello, existen diversas estrategias para

seleccionar antes de la secuenciación aquellos plásmidos recombinantes que porten insertos cuya secuencia y tamaño sea el esperado. Tradicionalmente, esta preselección se ha llevado a cabo realizando análisis de restricción de dichas construcciones. Actualmente, esta metodología puede complementarse con la amplificación mediante PCR con cebadores específicos del inserto o que flanqueen al mismo, comprobando después en un gel de agarosa el tamaño de los amplicones producidos. Éstos pueden ser posteriormente sometidos a un análisis de restricción. En definitiva, las técnicas de análisis pre-secuenciación del DNA recombinante pueden resumirse en las siguientes estrategias:

- Mini preparaciones (del inglés “*minipreps*”) rápidas (analíticas)
- Mini preparaciones estándares (preparativas)
- Amplificación mediante PCR del inserto o parte del mismo
- Análisis de restricción del plásmido recombinante y amplicones.

El resultado de cada uno de estos análisis se somete a electroforesis en gel de agarosa y se tiñe con bromuro de etidio. Estos análisis son complementarios: puede realizarse uno, varios o todos; según las necesidades y tiempo disponible.

2. PRINCIPIO

Algunos principios de las técnicas empleadas en estas sesiones han sido ya comentados en sesiones previas: amplificación mediante PCR; purificación de plásmidos y restricción; y electroforesis en gel de agarosa.

3. SELECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

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 (hipoclorito sódico) al 10%, agua oxigenada (peróxido de hidrógeno) al 3%, esterilización “húmeda” en autoclave (120 °C a 1 bar (1 kg/cm²) durante 20 min) o esterilización “seca” en horno (180°C durante 4 h). Los dos primeros suele emplearse para destruir ácidos nucleicos; los dos últimos para matar células.

3.1. Purificación rápida “analítica”

El objetivo es obtener una preparación de plásmidos que pueda ser sometida a electroforesis para determinar su tamaño. Se trata de un método analítico; es decir, cuyo objetivo no es utilizar dichos plásmidos en futuras manipulaciones, sino, simplemente, comprobar su tamaño y posteriormente desecharlos. Ello sirve para escoger entre todos aquellos que presenten las máximas probabilidades de contener el inserto deseado. Existen varios protocolos de purificación rápida de plásmidos. Algunos utilizan detergente (como SDS, para romper las células), álcali (como NaOH, para desnaturalizar

el cromosoma bacteriano y las proteínas) y sal (como KCl, para favorecer la precipitación de las proteínas y cromosomas desnaturalizados, restos celulares y SDS), quedando los plásmidos en solución (véase la página 1.32 de Sambrook et al, 2001). Uno algo menos eficiente, pero mucho más rápido y cómodo se describe a continuación:

a).-Añadir a un tubo Eppendorf de 1,5 ml (conteniendo 20 µl de agua destilada estéril) una porción de una colonia o raya previamente crecida en el medio selectivo apropiado. Si se trata de medio con IPTG/X-Gal, la colonia o raya será blanca (si contiene el DNA pasajero o inserto).

Nota: puede incrementarse el rendimiento empleando agua con un 0,5% de SDS. Como se ha indicado, puede mejorarse todavía más siguiendo el protocolo “rápido” descrito en la página 1.32 de Sambrook et al (1989), si bien complica el aquí descrito, que es el más simple y rápido de todos.

Nota: las células pueden cogerse con un asa de siembra. Las asas de siembra desechables de plástico son muy cómodas, porque pueden romperse dejando dentro del tubo la porción terminal de la misma que contiene las bacterias.

ATENCIÓN: no es recomendable coger las células con un palillo de dientes (de madera) estéril, porque éste absorbe agua, dejando las células “secas”, con lo que habría que añadir otros 10 µl de agua al tubo (que podrían ser absorbidos de nuevo por la madera). Y en cualquier caso, habría pérdidas no deseadas.

b).-Agitar para mezclar bien, fijar la apertura del tubo Eppendorf con un “pico de pato” para que el tubo no se abra, e incubar en un baño de agua a 95–100°C durante 5 min.

Nota: en vez del “pico de pato”, puede emplearse un tubo Eppendorf con sistema de cierre de seguridad.

c).-Centrifugar a 12.000 *g* durante 5 min. Recoger el sobrenadante, que contendrá parte de los ácidos nucleicos.

d).-Someter a electroforesis 10 µl del sobrenadante en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, junto con una muestra control de vector sin inserto (en nuestro caso, *pGEM-5Zf(+)* o *pBluescript(SK+)*). También pueden usarse otros patrones de peso molecular, como 0,5 µg de λ *xHind* III (fragmento menor visible de ~2 Kpb) y λ *xPst* I (fragmento menor visible de ~300 pb).

Nota: a la hora de comparar tamaños, es importante no olvidar que sólo el dsDNA lineal tiene movibilidades equiparables a un estándar de pesos de dsDNA (que es lineal). Los plásmidos superenrollados sólo podrán comprarse con otros superenrollados. Por ello, suele incluirse un plásmido de tamaño conocido como referencia.

Nota: los plásmidos son generalmente dsDNA superenrollado (I). No obstante, parte de los mismos puede encontrarse en forma relajada (II; cuando una de las hebras está cortada) o incluso lineal (III; ambas hebras rotas en el

mismo sitio). Las proporciones relativas suelen ser: I >>> II > III. Por otra parte, el bromuro de etidio se intercala entre las bases del DNA, reduciendo la densidad de éste. La movilidad de las moléculas en una electroforesis en gel de agarosa depende no sólo de su carga, tamaño y densidad, sino también de su forma. Así, en ausencia de bromuro de etidio, los plásmidos generan tres bandas que se distribuyen en el sentido cátodo → ánodo de la siguiente forma: tipo II -> III -----> I. En presencia de bromuro de etidio, la movilidad pasa a ser: tipo III -----> I -> II.

e).-Visualizar el resultado de la electroforesis y determinar los transformantes con un tamaño apropiado de inserto para su posterior purificación preparativa.

Nota: la miniprep descrita previamente es bastante grosera, por lo que es normal observar también una mancha bastante llamativa de RNA de bajo (tRNA) y medio (rRNA) peso molecular. Ello es normal, ya que el RNA se encuentra fundamentalmente en forma de cadena sencilla (ssRNA), por lo que tiene expuestas sus bases nitrogenadas al exterior, provocando una mayor fluorescencia. A veces, también es posible observar una banda de DNA genómico de alto peso molecular, aunque la mayor parte del mismo habrá precipitado con los restos de membrana y pared celular previamente desechados (a los cuales se encuentra unido físicamente).

3.2. Purificación estándar “preparativa”

Una vez determinadas las construcciones recombinantes apropiadas, puede procederse al crecimiento de las correspondientes bacterias hospedadoras a partir de las colonias o rayas. El recrecimiento se realiza en medio rico LB suplementado con los agentes selectivos (ver más abajo, “Recrecimiento de transformantes”).

Un protocolo completo de purificación preparativa de plásmidos se describe con detalle en las sesiones 9 a 13, utilizando el kit “MagicMiniprep” de Promega. En esta sesión, emplearemos el kit “QIAprep Spin Miniprep” de QIAGEN (Hilden, Alemania; <<http://www.qiagen.com>>).

El kit “QIAprep Spin Miniprep” está basado en tecnología de membrana de gel de sílice, y no requiere extracción mediante fenol, cloroformo, bromuro de etidio o cloruro de cesio, ni precipitación mediante etanol. Está basado en tres pasos: 1) una lisis alcalina de las bacterias. El lisado se neutraliza en presencia de una elevada concentración salina que favorece en siguiente paso; 2) la adsorción del DNA a la membrana de gel de sílice en presencia de una elevada concentración salina. La membrana de gel de sílice reemplaza las suspensiones de vidrio o sílice previamente empleadas, siendo mucho más cómoda y rápida; y 3) el lavado y elución del DNA plasmídico en una solución amortiguadora de baja concentración salina o en agua destilada. Ello garantiza que sólo se purificará el DNA plasmídico, siendo eliminados el DNA cromosómico, RNA, proteínas y otros metabolitos.

Con este sistema pueden prepararse 1–24 muestras simultáneamente en menos de 30 minutos; bien empleando una microfuga o un sistema de vacío. En esta práctica emplearemos el primer método. Cada membrana es capaz de

adsorber 20 µg de dsDNA, con una recuperación del 85–95% (dependiendo del volumen de elución), pudiendo procesar de 1–5 ml (plásmidos de alto número de copias por bacteria: 300 a 700; *pUC*, *pBluescript*, *pGEM*) o de 1–10 ml (plásmidos de bajo número de copias por bacteria y cósmidos: 5 a 20; *pBR322*) de cultivo estacionario. El DNA que se eluye en solución amortiguadora Tris o en agua está listo para emplearse en reacciones de restricción o secuenciación fluorescente; que son los dos procesos a que someteremos el DNA obtenido.

ATENCIÓN: por norma, deben manipularse todos los reactivos de biología molecular con guantes. Por dos motivos: 1) para proteger a la muestra de contaminantes humanos (DNA, RNasa, etc); y 2) para protegernos a nosotros de posibles sustancias tóxicas o entidades infecciosas (sustancias tóxicas, irritantes, mutágenos, virus, etc). Así, en nuestro caso, los tampones P2, N3 y PB contienen sustancias irritantes.

Nota: todas las centrifugaciones se llevarán a cabo en una microfuga de mesa a máxima velocidad: $\geq 10.000\text{ g}$ ($\geq 11.000\text{ rpm}$). Como se indica en cada paso, nosotros las realizaremos a 12.000 g (que equivalen a 12.210 rpm en la microfuga Eppendorf modelo “Centrifuge 5415C”, cuyo radio es de 7,2 cm empleando tubos de 1,5 ml en el rotor F-45-18-11).

ATENCIÓN: el protocolo que sigue está diseñado para purificar hasta 20 µg de DNA plasmídico de alto número de copias a partir de 1,5 ml de un cultivo estacionario de *E. coli* en medio rico Luria-Bertani (LB). Existen modificaciones para plásmidos de bajo número de copias y cósmidos, para plásmidos grandes ($>10\text{--}50\text{ Kpb}$) y para purificación adicional de DNA preparado por otros métodos, que no sean tratados en esta práctica (pueden consultarse en el protocolo del fabricante).

a).-Crecer la bacteria *Escherichia coli* DH5 α F' hospedadora del plásmido recombinante en 1 a 5 ml de medio rico Luria-Bertani (LB) en presencia del antibiótico selectivo apropiado (ampicilina) hasta cultivo estacionario (p.ej., unas 12 a 16 h durante la noche) en condiciones de agitación vigorosa (p.ej., 200 rpm) para asegurar una buena aireación y crecimiento.

ATENCIÓN: las bacterias deben inocularse a partir de colonias frescas, para evitar pérdida de plásmidos o mutaciones.

ATENCIÓN: es importante mantener la presión del agente selectivo (antibiótico) a través de todas las fases de crecimiento de las bacterias; de otro modo se estarían seleccionando bacterias sin plásmidos, que crecen mucho más rápidamente ya que no dedican energía a replicarlos. Igualmente sucedería si el antibiótico se ha degradado; por ello, es aconsejable almacenarlos congelados y añadirlos justo antes de utilizar el medio selectivo, como se indica en “Apéndice: medios, soluciones y material biológico”.

ATENCIÓN: en general, no deben incubarse las bacterias más de 16 horas, ya que las células pueden comenzar a lisarse, reduciéndose el rendimiento de plásmidos obtenidos. Si fuera necesario, puede realizarse un crecimiento más prolongado ($\sim 20\text{ h}$) pero reduciendo la agitación (aireación) para ralentizar el crecimiento ($\sim 140\text{ rpm}$). Por otra parte, si fuera preciso, el cultivo ya crecido puede guardarse a 4°C durante unas horas para evitar su degeneración.

b).-Centrifugar de 1 a 5 ml del cultivo estacionario (p.ej., 1,5 + 1,5 ml = 3 ml en sendos tubos de microfuga de 1,5 ml) a 12.000 g durante 30 segundos para precipitar las células. Eliminar el sobrenadante por decantación.

Nota: comprobar que la RNasa A ha sido añadida previamente al bote que contiene la solución amortiguadora P1 (el fabricante los suministra por separado y es necesario mezclarlos antes de usar el kit por primera vez).

c).-Resuspender una de las pellas anteriores en 250 µl de solución amortiguadora P1 ("Buffer P1"), pipeteando con suavidad y cuidado hacia arriba y hacia abajo. Transferir al segundo tubo y resuspender como antes. Ahora, todas las células procedentes de ambos tubos (3 ml de cultivo) estarán resuspendidas en un sólo tubo.

Nota: Tras la resuspensión de las células, no deben observarse acúmulos de las mismas; la resuspensión debe ser total. En caso contrario pipetear de nuevo hacia arriba y hacia abajo hasta conseguir una resuspensión completa.

ATENCIÓN: no agitar mediante vórtex, pues ello podría desnaturalizar la RNasa empleada.

ATENCIÓN: comprobar que la solución amortiguadora P2 no presenta precipitados de sal; en tal caso, redisolverlos calentando a 37°C. No agitar la solución amortiguadora P2 vigorosamente.

d).-Añadir 250 µl de solución amortiguadora P2 ("Buffer P2") y mezclar suavemente, invirtiendo el tubo 4 a 6 veces. Si fuera necesario, seguir invirtiendo el tubo hasta obtener una solución viscosa y ligeramente clara.

ATENCIÓN: cerrar inmediatamente el bote que contiene la solución amortiguadora P2 para evitar que se acidifique con el CO₂ del aire.

ATENCIÓN: no agitar mediante vórtex, pues ello rompería el DNA genómico, que podría luego contaminar la preparación de plásmido. Además, ello podría desnaturalizar la RNasa empleada.

ATENCIÓN: no prolongar la reacción de lisis más de 5 min, ya que una exposición excesiva al medio alcalino puede provocar la desnaturalización irreversible del plásmido, que correrá más rápidamente durante su electroforesis en gel de agarosa y será resistente a la digestión por enzimas de restricción.

Nota: las células son lisadas en presencia de SDS/NaOH (solución amortiguadora P2). El detergente SDS solubiliza los componentes fosfolipídicos y proteicos de la envuelta celular, provocando la lisis celular y la liberación del contenido celular. El medio alcalino desnaturaliza los DNAs cromosómicos y plasmídicos, así como las proteínas.

ATENCIÓN: comprobar que la solución amortiguadora N3 no presenta precipitados de sal; en tal caso, redisolverlos calentando a 37°C.

e).-Añadir 350 µl de solución amortiguadora N3 (“Buffer N3”) e invertir el tubo inmediatamente y suavemente de 4 a 6 veces. La solución debe volverse turbia.

ATENCIÓN: para evitar precipitaciones localizadas, debe mezclarse inmediatamente, completamente y suavemente, tras la adición de la solución amortiguadora N3. Es importante que la solución se mezcla completamente y suavemente, para asegurar la total precipitación de los restos no deseados.

ATENCIÓN: para evitar la contaminación del DNA plasmídico con DNA cromosómico, es importante mezclar suavemente durante la lisis celular, evitando agitar vigorosamente o con vórtex. Si se agita vigorosamente durante la lisis celular, el cromosoma puede romperse, liberándose fragmentos del mismo al sobrenadante. Dichos fragmentos de DNA cromosómico se comportan del mismo modo que el DNA plasmídico, siendo copurificados a la vez.

Nota: la solución amortiguadora N3 neutraliza el medio alcalino previo, evitando así los posibles daños al DNA plasmídico comentados anteriormente. Esta solución amortiguadora también incrementa la concentración salina del medio, provocando la coprecipitación del DNA cromosómico desnaturalizado (unido a la membrana y pared celular) con complejos insolubles que contienen restos celulares, proteínas desnaturalizadas, sal y detergente (SDS). Mientras tanto, el DNA plasmídico, que es mucho menor que el cromosómico, es capaz de renaturalizar correctamente y permanece en solución (o sea, sin precipitar) en el sobrenadante.

f).-Centrifugar a 12.000 *g* durante 10 minutos. Debe formarse una pella blanca y compacta.

g).-Acoplar una columna de centrifugado QIAprep (“QIAprep spin column”) en un tubo de recolección de 2 ml (“2-ml collection tube”).

h).-Aplicar el sobrenadante del paso anterior (“e”) a la columna QIAprep, mediante una pipeta o —mejor— por decantación.

i).-Centrifugar a 12.000 *g* durante 30–60 segundos. Eliminar el flujo obtenido.

j).-Opcionalmente, puede lavarse la columna QIAprep añadiendo 0’5 ml de solución amortiguadora PB (“Buffer PB”), centrifugando a 12.000 *g* durante 30–60 segundos y desechando el flujo obtenido.

ATENCIÓN: las bacterias hospedadoras tipo “XL-1 Blue” y “DH5α” no requieren este paso opcional de lavado. Otras estirpes que generan DNA de calidad sin el paso opcional de lavado son DH1 y C600. Sin embargo, este lavado es necesario en aquellas bacterias hospedadoras que presentan actividad nucleasa, como las estirpes *endA+*. Entre ellas se encuentran las de la serie “HB101” y derivadas (como las series “TG1” y “JM”), o cualquier estirpe silvestre, que tienen altos niveles de actividad nucleasa o altos contenidos en carbohidratos. Por otra parte, deben considerarse también las características de metilación del DNA y de crecimiento de las estirpes. En resumen, las

estirpes “XL-1 Blue” y “DH5 α ” son muy recomendables por generar resultados reproducibles y fiables. Curiosamente, la estirpe XL1-Blue crece lentamente, pero genera DNA plasmídico de muy alta calidad que funciona excepcionalmente bien en secuenciación.

ATENCIÓN: la solución amortiguadora PE requiere etanol, que no es suministrado por el fabricante y debe añadirse siguiendo las instrucciones (220 ml de etanol absoluto + 55 ml de solución amortiguadora = 275 ml de solución amortiguadora completa) antes de su uso.

k).-Lavar la columna de centrifugado QIAprep, añadiendo 750 μ l de solución amortiguadora PE (“Buffer PE”) y centrifugando a 12.000 g durante 30–60 segundos. Desechar el flujo obtenido.

ATENCIÓN: los restos de solución amortiguadora de lavado no se eliminarán completamente a menos que el flujo anterior se elimine antes del paso siguiente (“k”) de centrifugado. Los restos de etanol de la solución amortiguadora PE pueden inhibir las siguientes reacciones enzimáticas.

l).-Centrifugar de nuevo a 12.000 g durante 1 min para eliminar los restos que quedaran de la solución amortiguadora de lavado.

m).-Colocar la columna QIAprep en un tubo limpio de microfuga de 1,5 ml. Para eluir el DNA plasmídico, añadir 50 μ l de solución amortiguadora EB (“Buffer EB”; 10 mM Tris•Cl, pH 8,5) o agua al centro de cada columna QIAprep. Incubar durante 1 min.

Nota: es importante añadir la solución amortiguadora de elución o el agua directamente en el centro de la membrana, para asegurar el máximo rendimiento.

ATENCIÓN: si se usara agua para eluir el DNA, asegurarse que su pH está comprendido entre 7,0 y 8,5. Un pH menor de 7,0 puede reducir el rendimiento.

Nota: también puede eluirse el DNA en TE (10 mM Tris•Cl, 1 mM Na₂EDTA, pH 8,0), pero el Na₂EDTA puede inhibir algunas reacciones enzimáticas subsiguientes.

n).-Centrifugar a 12.000 g durante 1 min. Se espera un volumen eluido de 45 μ l (para 50 μ l de solución amortiguadora de elución añadido) o de 60 μ l (para 100 μ l de solución amortiguadora de elución añadido).

ñ).-Comprobar la integridad del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa.

o).-Comprobar la concentración del DNA mediante espectrofotometría a 260 nm y su pureza mediante la relación 260 nm/280 nm. Un protocolo detallado puede encontrarse en la sesión 3 (“Purificación y análisis de DNA cromosómico bacteriano”). En esta práctica emplearemos el Espectrofotómetro DU 650 de Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA; <<http://www.beckman.com>>) y la cubeta de cuarzo Ultra-micro QS 1.000 de 50 μ l (referencia C1819) de Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA; <<http://www.sigma-aldrich.com>>).

Rendimiento: para la combinación empleada, consistente en bacteria hospedadora *Escherichia coli* DH5 α F' y plásmido huésped *pGEM* o *pBluescript*, se esperan obtener de 5 a 15 μ g de DNA plasmídico por cada 1,5 ml de cultivo estacionario en medio rico LB.

Si asumimos un rendimiento de 20 μ g/3 ml de cultivo, al eluirlos en 45 μ l se obtendrá una concentración de 444,4 ng/ μ l). Dado que 1 unidad de densidad óptica a 260 nm ($1OD_{260}$) = 50 μ g/ml en cubeta (= 50 ng/ μ l) para DNA de doble cadena (dsDNA), y que las medidas fiables de densidad óptica oscilan entre 0,5 y 1,5 OD_{260} , proceder como sigue para calcular la [DNA] espectrofotométricamente:

p).-Diluir 5 μ l de la solución de DNA a cuantificar en 65 μ l de agua (volumen total de 70 μ l). Si la solución de DNA fuera de 444,4 ng/ μ l, tras dicha dilución se tendrían en cubeta 31,75 ng/ μ l = 31,75 μ g/ml = 0,63 OD_{260} .

ATENCIÓN: aunque el fabricante (Sigma–Aldrich) indica que el volumen mínimo de la cubeta de cuarzo Ultra-micro QS 1.000 (referencia C1819) es de 50 μ l, deben medirse al menos 70 μ l para obtener resultados fiables.

q).-Comprobar la densidad óptica a 260 nm. Si fuera preciso, diluir la muestra (o incrementar su concentración añadiendo más muestra y menos agua a la cubeta) hasta que la medida de densidad óptica se encuentre dentro del rango apropiado.

r).-Comprobar la densidad óptica a 280 nm. Ello es un índice de la posible contaminación proteica.

s).- Si fuera posible, determinar el espectro entre 250 y 290 nm. Debe obtenerse un pico romo claro.

Nota: Las soluciones de DNA puro presentan una relación OD_{260} / OD_{280} = 1,6–2,0. Valores menores de 1,6 son típicamente causados por contaminación proteica. Valores mayores de 2,0 generalmente se deben a contaminación con RNA. Para mayor información sobre problemas con la calidad del DNA, rendimiento, etc, consultar el manual original del “QIAprep Spin Miniprep Kit”.

Almacenamiento: el DNA eluido puede guardarse a -20°C . Esto es particularmente importante si se eluyó en agua, ya que en ausencia de un agente tamponante, el DNA puede degradarse a temperaturas superiores. Si se desean almacenamientos muy prolongados, lo mejor es guardarlos precipitados en presencia de alcohol absoluto a -80°C , o —mejor— secos (liofilizados) a temperatura ambiente, refrigerados o congelados.

4. ANÁLISIS MEDIANTE PCR

Una alternativa a la miniprep analítica previamente descrita consiste en realizar una PCR de las construcciones recombinantes seleccionadas en cajas selectivas (colonias o rayas). Puede realizarse una amplificación empleando cebadores universales (que aparean con secuencias del vector) o —en el caso

de que la secuencia del inserto sea conocida—, utilizando cebadores que hibridan con secuencias de dicho DNA pasajero.

La PCR es un método identificativo muy cómodo y rápido, ya que es posible amplificar DNA directamente de colonias. Para ello basta añadir una parte de una colonia o raya al tubo de PCR conteniendo los reactivos de la reacción. Aunque este método funciona, generalmente se realiza a partir del sobrenadante generado tras hervir las bacterias, según se indica a continuación. El protocolo completo de amplificación mediante PCR se describe con detalle en la sesión 4 (“Amplificación de DNA mediante PCR”), utilizando los reactivos y termociclador de Perkin–Elmer:

a)..-Añadir a un tubo Eppendorf de 1'5 ml (conteniendo 20 μ l de agua destilada estéril) una porción de una colonia o raya previamente crecida en el medio selectivo apropiado. Si se trata de medio con IPTG/X–Gal, la colonia o raya será blanca.

Nota: las células pueden cogerse con un asa de siembra. Las asas de siembra desechables de plástico son muy cómodas, porque pueden romperse dejando dentro del tubo la porción terminal de la misma que contiene las bacterias.

ATENCIÓN: no es recomendable coger las células con un palillo de dientes (de madera) estéril, porque éste absorbe agua, dejando las células “secas”, con lo que habría que añadir otros 20 μ l de agua al tubo (que podrían ser absorbidos de nuevo por la madera). Y en cualquier caso, habría pérdidas no deseadas.

b)..-Agitar para mezclar bien e incubar en un baño de agua a 95–100°C durante 5 min.

c)..-Centrifugar a 12.000 *g* durante 5 min. Recoger el sobrenadante (que contendrá parte de los ácidos nucleicos).

d)..–Utilizar 5 μ l del sobrenadante previamente recuperado por reacción de PCR de 50 μ l (esto es, un 10% del volumen de reacción).

Nota: dado que esta PCR suele ser analítica, puede abaratare su costo realizando amplificaciones de tan solo 20 μ l. En tal caso, pueden usarse sólo 2 μ l del sobrenadante de bacterias hervidas. Si se dispone de una PCR capilar, los volúmenes pueden reducirse proporcionalmente hasta incluso 3 μ l totales por reacción (0'3 μ l = 300 nl del sobrenadante de bacterias hervidas).

e)..-Someter a electroforesis 5 μ l del producto de reacción en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, junto con un patrón de pesos moleculares (p.ej., 0'5 μ g de λ xPst I).

f)..-Visualizar el resultado de la electroforesis para determinar las amplificaciones obtenidas. Éstas corresponderán a los transformantes que porten plásmidos con el inserto esperado.

g).–Seleccionar los transformantes correctos para su posterior procesamiento.

Nota: el protocolo descrito anteriormente es bastante grosero (aunque funciona bien como método analítico), por lo que si se requiere un rendimiento mayor de producto deberá partirse de DNA purificado mediante la purificación estándar preparativa, previamente descrita para el kit “QIAGEN Spin Miniprep”.

5. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN

El objetivo de este paso es comprobar si el DNA recombinante responde de la forma esperada a su digestión mediante una o varias enzimas de restricción (por separado o de forma conjunta). En el caso de que la secuencia del inserto sea desconocida, este procedimiento puede servir para mapearlo o cartografiarlo; es decir, obtener un mapa de restricción en el que dicha secuencia desconocida (representada por una línea o barra) es cortada por líneas o flechas que indican el lugar de corte de las diferentes enzimas utilizadas. Este es un método de identificación de secuencias que ha sido muy utilizado en el pasado, aunque recientemente la facilidad para secuenciar DNA (la cual permite obtener la identidad molecular última del mismo) lo está haciendo caer en desuso.

Puede realizarse un análisis de restricción de los plásmidos purificados con el método de miniprep estándar, así como de los amplicones generados mediante PCR. Al igual que los anteriores, este análisis es opcional. La elección de la(s) restrictasa(s) utilizada(s) dependerá del conocimiento de la secuencia del vector y (en su caso) de la del inserto. El precio es también un factor a considerar. Generalmente, se eligen una o varias restrictasas que produzcan uno (una banda), dos (dos bandas) o más cortes en el plásmido recombinante. Las digestiones se realizan de forma estándar (véanse las sesiones 9 a 13: “Clonación del DNA amplificado”) y se someten a electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio (véase la sesión 3: “Purificación y análisis de DNA cromosómico bacteriano”).

El conocimiento de las secuencias y sus sitios de corte ayudará a la interpretación de los resultados. Por ejemplo, podemos digerir el DNA recombinante con dos enzimas que corten justo antes y después del inserto (generando dos bandas de DNA lineal en la electroforesis: la del vector y la del DNA pasajero), así como con enzimas que corten también dentro del inserto (si conocemos su secuencia) para confirmar su identidad. En esta práctica usaremos bien *Hind* III (A•AGCT.T) y *Bam*H I (G•GATC.C), que cortan a *pBluescript*(SK+) antes y después del inserto, respectivamente; o bien *Nco* I (C•CATG.G) y *Pst* I (C.TGCA•G), que cortan a *pGEM–5Zf*(+) (y a *pGEM–T*) antes y después del inserto, respectivamente. *pGEM–T* es *pGEM–5Zf*(+) digerido (linearizado) con *Eco*R V en la base 51 y con sendas bases “T” añadidas a los extremos 3’.

Nota: las enzimas de restricción suelen ser particularmente lábiles. Procurar mantenerlas el mínimo tiempo posible fuera del congelador. Una vez fuera del

mismo, insertarlas en hielo o —mejor— en una gradilla criogénica previamente enfriada (congelada) en el congelador.

a).-En el caso de *pGEM*, digerir con *Nco* I. Realizar también una digestión doble con *Nco* I y *Pst* I (véanse las sesiones anteriores). En el caso de *pBluescript*, digerir con *Hind* III. Realizar también una digestión doble con *Hind* III y *Bam*H I (véanse las sesiones 9 a 13):

Tabla 1. Digestión de la construcción del DNA recombinante en <i>pGEM-5Zf(+)</i> o <i>pBluescript(SK+)+(-araA)</i> bien con <i>Nco</i> I y <i>Pst</i> I (<i>pGEM</i>); o con <i>Hind</i> III y <i>Bam</i>H I (<i>pBluescript</i>).		
	Digestión con <i>Pst</i> I (para <i>pGEM</i>) o con <i>Hind</i> III (para <i>pBluescript</i>)	Digestión doble con <i>Pst</i> I y <i>Nco</i> I (para <i>pGEM</i>) o con <i>Hind</i> III y <i>Bam</i> H I (para <i>pBluescript</i>)
Agua destilada “milli-Q”	7,99 µl	7,98 µl
10 x Amortiguador H (para <i>pGEM</i>), o 10 x Amortiguador B (para <i>pBluescript</i>)	1 µl	1 µl
<i>pGEM</i> o <i>pBluescript(SK+)+(-araA)</i> (100 ng/µl)	1 µl (100 ng)	1 µl (100 ng)
<i>Pst</i> I (10 U/µl) (para <i>pGEM</i>), o <i>Hind</i> III (10 U/µl) (para <i>pBluescript</i>)	0,01 µl (0,1 U)	0,01 µl (0,1 U)
<i>Nco</i> I (10 U/µl) (para <i>pGEM</i>) o <i>Bam</i> H I (10 U/µl) (para <i>pBluescript</i>)	—	0,01 µl (0,1 U)
Volumen final = 10 µl (ajustado con agua)		
Incubar a 37° C durante 5 h (o toda la noche)		
Guardar a -20°C		

Nota: para la digestión sencilla de *pGEM*, es preferible usar *Pst* I, porque es más barata que *Nco* I. Por su parte, para la digestión sencilla de *pBluescript*, es preferible usar *Hind* III, porque es más barata que *Bam*H I.

Nota: si se desea generar mayor cantidad de producto, pueden incrementarse proporcionalmente todos los componentes de la reacción.

b).-Comprobar la efectividad de la digestión, sometiéndola a electroforesis en gel de agarosa junto con 100 ng de *pGEM* o *pBluescript* sin digerir y un patrón de pesos moleculares. P.ej., 0,5 µg de λ x*Hind* III (fragmento menor visible de ~2 kpb) o λ x*Pst* I (fragmento menor visible de ~300 pb). Como patrones de pesos moleculares, también pueden usarse 100 ng de los amplicones grande o pequeño generados en la PCR descrita en la sesión 4.

Nota: el vector *pGEM-5Zf(+)* consta de 3003 pb. El fragmento pasajero, ligado a las colas “T” de *pGEM-T* (véanse sesiones 9 a 13: “Clonación del DNA amplificado”), tiene bien 857+2 pb (amplicón Ara•1–Ara•2) o bien 608+2 pb (amplicón Ara•3–Ara•4). *Pst* I corta 28 pb después del sitio de inserción (colas T), mientras que *Nco* I corta 24 pb antes de dicho sitio. Por tanto, tras el corte del DNA recombinante con ambas enzimas, deberán obtenerse dos bandas de

dsDNA. A saber (aproximadamente): una banda de $3003 - (28 + 24) = 2951$ pb correspondiente a casi todo el vector, y otra de bien $857 + 2 + (28 + 24) = 911$ pb correspondiente al inserto grande, o bien $608 + 2 + (28 + 24) = 662$ pb correspondiente al inserto pequeño.

Nota: por su parte, el vector *pBluescript(SK+)* consta de 2964 pb. El fragmento pasajero, insertado en el sitio *EcoR V* del vector (véanse sesiones 9 a 13: “Clonación del DNA amplificado”), tiene bien $857+2$ pb (amplicón Ara•1–Ara•2) o bien $608+2$ pb (amplicón Ara•3–Ara•4). *BamH I* corta 22 pb después del sitio *EcoR V*, mientras que *Hind III* corta 8 pb antes de dicho sitio. Por tanto, tras el corte del DNA recombinante con ambas enzimas, deberán obtenerse dos bandas de dsDNA. A saber (aproximadamente): una banda de $2964 - (22 + 8) = 2934$ pb correspondiente a casi todo el vector, y otra de bien $857 + 2 + (22 + 8) = 889$ pb correspondiente al inserto grande, o bien $608 + 2 + (22 + 8) = 640$ pb correspondiente al inserto pequeño.

Nota: los tamaños anteriores son aproximados, ya las restrictasas usadas no producen cortes romos, sino cohesivos; esto es, dejan extremos o colas de cadena sencilla allí donde cortan el dsDNA diana.

Nota: es conveniente comprobar la funcionalidad de las restrictasas empleadas, incorporando controles positivos de digestión; esto es, secuencias (plásmidos o DNA lineales) que se sabe presentan sitios de restricción para las enzimas utilizadas.

6. RECRECIMIENTO DE TRANSFORMANTES

Los transformantes seleccionados se recrecen en medio rico LB para su posterior procesamiento y análisis (almacenamiento, restricción, secuenciación, etc).

Según el DNA plasmídico requerido (1–3 ml de cultivo estacionario de *Escherichia coli* generan de 5 a 20 μg de DNA plasmídico), pueden inocularse bacterias en tubos de 2 cm \varnothing con 5 ml de medio rico LB, o en matraces erlenmeyer de 100 ml con 10 ml de medio rico LB. En ambos casos, el medio se suplementará con el antibiótico correspondiente. Los tubos suelen utilizarse con tapón de aluminio. Los matraces se preparan con un tapón de algodón para permitir la entrada de oxígeno:

a).-Añadir 5 ml de medio rico LB a tubos de 2 cm de diámetro.

b).-Añadir 5 μl de una solución de ampicilina (60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) para tener una concentración final de 60 μg de ampicilina/ml de medio rico.

Nota: algunos protocolos recomiendan una concentración final de 100 μg de ampicilina/ml de medio rico. En tal caso, se añadirían 8,3 μl de la solución de ampicilina (60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a los 5 ml de medio rico.

c).-Inocular una colonia o parte de una raya mediante un asa de siembra. Agitar el asa vigorosamente para dispersar la pella de bacterias. Tapar el tubo con su tapón de aluminio.

d).-Agitar el tubo vigorosamente con un agitador tipo vórtex para dispersar las bacterias.

e).-Incubar a 37°C sin agitación o con agitación suave (140 rpm) hasta el día siguiente (~20 h).

7. CONSERVACIÓN DE CONSTRUCCIONES RECOMBINANTES

Una vez determinada la identidad molecular de los transformantes, pueden almacenarse en dos formas fundamentales: como plásmidos o como bacterias hospedadoras completas que los portan.

7.1. CONSERVACIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

La purificación preparativa de plásmidos se describe con detalle en las sesiones 9 a 13: “Clonación del DNA amplificado”.

Los plásmidos pueden conservarse en soluciones acuosas (agua, o TE a pH 7.5) congeladas a -20°C o menos, siendo estables durante años. Si se desea un almacenamiento prácticamente indefinido, proceder a su secado o — mejor— liofilización (sublimación al vacío previa congelación). Es conveniente indicar mediante rotulador negro indeleble el nombre del plásmido, su concentración y la fecha de envasado.

7.2. Conservación de bacterias transformantes

Las bacterias transformantes (conteniendo plásmidos) pueden conservarse a temperatura ambiente en picadura (1 año) o congeladas en presencia de un agente crioprotector (glicerol, DMSO, etc) en congeladores (-20 a -150°C) o — mejor— sumergidas en nitrógeno líquido (-196°C). Las bacterias congeladas de esta forma son estables durante años. Es conveniente indicar mediante rotulador negro indeleble el nombre de la estirpe hospedadora, el plásmido huésped y la fecha de congelación.

ATENCIÓN: la experiencia enseña que la cadena del frío es muy fácil de romper; es cuestión de tiempo. Para evitar sorpresas desagradables, es conveniente almacenar también los vectores purificados como tales (véase apartado anterior) y, en cualquier caso, guardar réplicas de las estirpes en congeladores diferentes; a ser posibles en edificios diferentes. La instalación de alarmas y —sobre todo— un equipo electrógeno que se active/desactive de forma retardada con la caída/restauración del flujo eléctrico general, puede salvar años de trabajo invertidos en la producción de estirpes. La integridad y buen funcionamiento de dicho sistema electrógeno debe comprobarse periódicamente.

A continuación se describe un método sencillo para almacenar estirpes congeladas:

a).-Añadir a cada tubo criogénico, previamente rotulado, 150 µl de glicerol estéril.

Nota: el glicerol suele suministrarse al 80 – 87% de riqueza. Usarlo tal cual, una vez esterilizado en el autoclave.

ATENCIÓN: el glicerol es muy viscoso. A menos que uses una pipeta de desplazamiento positivo, vas a echar aproximadamente un 25% menos del volumen deseado (150 μ l). Dicho con otras palabras: usa una pipeta de desplazamiento positivo (p.ej., tipo Microman de Gilson (Middleton, WI, USA; <<http://www.gilson.com>>), o bien regula la pipeta normal para 200 μ l (porque así estarás echando realmente unos 150 μ l).

b).-Añadir 850 μ l de un cultivo bacteriano en fase estacionaria a cada tubo.

c).-Tapar el tubo y agitar para resuspender bien las bacterias.

d).-Congelar rápidamente 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).

e).-Almacenar en los congeladores correspondientes o —mejor— en nitrógeno líquido.

Nota: para incrementar la supervivencia, se recomienda congelar las bacterias rápidamente (en nitrógeno líquido) y descongelarlas lentamente (en hielo picado). En el caso de las células de mamífero, se recomienda todo lo contrario: congelación lenta (vapores de nitrógeno líquido o bloque de poliestireno expandido en congelador a -80°C) y descongelación rápida (baño a 37°C). Ello se debe a dos factores fundamentalmente. Por una parte, las bacterias tienen unas envolturas celulares mucho más fuertes que las células de mamífero. Por otra, las bacterias son mucho menores que las células de mamífero, de modo que los cristales pequeños afectan más a las primeras que a las segundas.

8. 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: PROTOCOS.

Brown TA (ed) (1991): "Molecular Biology LabFax". Oxford: Bios Scientific Publishers/Blackwell Scientific Publications. Clasificación: DATOS.

Firman K (1991): "DNA Cloning/Sequencing Workshop". New York: Ellis Horwood. Clasificación: PROTOCOS.

Promega (2005): Magic Minipreps DNA Purification System. Plasmid Miniprep. Instructions for isolating plasmid DNA from bacteria. Catalog number A7100. Promega (Madison, WI, USA; <<http://www.promega.com>>). Manual de instrucciones del kit "Magic Miniprep". Clasificación: PROTOCOS.

+ Promega (2005): pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems. Instructions for cloning DNA. Part# TM042; Revised 7/97. Promega (Madison, WI, USA;

- <<http://www.promega.com>>). Manual de instrucciones del kit “*pGEM*”. Clasificación: PROTOSCOLOS.
- + Qiagen (2005): QIAprep Miniprep Handbook. Plasmid Miniprep. Instructions for isolating plasmid DNA from bacteria. Catalog number 27106. Qiagen (Hilden, Alemania; <<http://www.qiagen.com>>). Manual de instrucciones del kit “QIAprep Spin Miniprep”. Referencia/Versión: 1009346 04/98 (April, 1998). 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: PROTOSCOLOS.
 - + Stratagene (2005): *pBluescript*. DNA cloning vector. Instructions for cloning DNA. Stratagene (La Jolla, CA, USA; <<http://www.stratagene.com>>). Manual de instrucciones del kit “*pBluescript*”. Clasificación: PROTOSCOLOS.
- 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

Véanse las sesiones anteriores; particularmente la de “Purificación y análisis de DNA cromosómico bacteriano”, la de “Amplificación de DNA mediante PCR” y la de “Clonación del DNA amplificado”.