

# 48. Transformación de *Escherichia coli* con un plásmido recombinante

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

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

## RESUMEN

Se trabaja el principio de adquisición de información genética en bacterias mediante la introducción de DNA plasmídico por transformación. Se trabaja la selección de clones celulares con las características esperadas de la expresión o ausencia de expresión de los genes marcadores presentes en un plásmido recombinante y se estima la eficiencia de la transformación. Asimismo, se preparan soluciones y medios de cultivos de bacterias y se utilizan en condiciones asépticas.

*Palabras clave:* células competentes, choque térmico, eficiencia de transformación,  $\beta$ -galactosidasa.

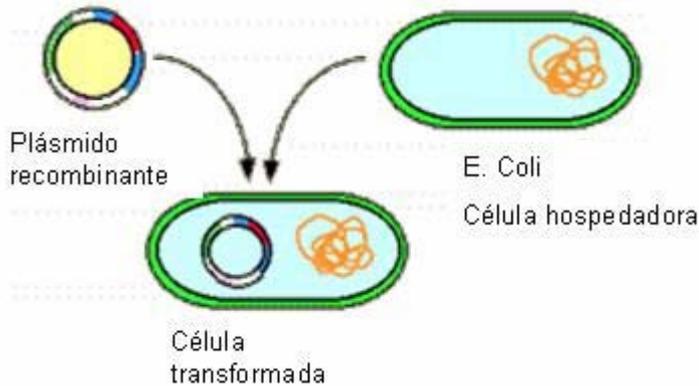
*Abreviaturas empleadas.* ATP: trifosfato de adenosina; DNA: ácido desoxirribonucleico; mRNA: ácido ribonucleico mensajero; IPTG, isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido; X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido.

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La transformación es un proceso por el cual las células captan DNA libre presente en el medio. Es un fenómeno que ocurre de forma natural en muchas bacterias, pero la eficacia del proceso varía enormemente de unas especies a otras. Para que la transformación tenga lugar, la bacteria tiene que encontrarse en el llamado *estado de competencia*, que ocurre en determinadas condiciones fisiológicas; en este estado, la bacteria presenta alteraciones en su pared y membrana celulares, que permiten la entrada de ácidos nucleicos en la célula.

En el laboratorio se ha conseguido poner a punto técnicas que inducen el estado de competencia en bacterias que no lo presentan de forma natural, como es el caso de *E. coli*. Estas técnicas se basan en diversos tratamientos químicos o físicos que producen microporos en la célula, lo que permite la introducción del DNA exógeno (transformación) de modo bastante eficiente. Uno de los métodos físicos es la electroporación, consistente en inducir la competencia mediante la aplicación de un pulso eléctrico muy breve e intenso. Dicha competencia se puede inducir con tratamientos químicos utilizando compuestos como el cloruro cálcico. Hay que tener en cuenta sin embargo que tras estos tratamientos no todas las células del cultivo se hacen competentes.

La transformación en el laboratorio es una técnica rutinaria de enorme utilidad, que nos permite introducir prácticamente cualquier plásmido en su forma circular o superenrollada en casi cualquier tipo de bacteria. El método que se describe a continuación es, por su simplicidad, uno de los más utilizados para transformar *E. coli*. Para detectar la transformación, el DNA introducido llevará un marcador seleccionable en el medio adecuado.



El objetivo de esta práctica es introducir el plásmido recombinante obtenido en una reacción de ligación en la estirpe de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Esta estirpe está modificada genéticamente de manera que es posible inducir en laboratorio la competencia de las células así como mantener el plásmido de forma estable en su interior.

Se usarán células competentes obtenidas por tratamiento químico con cloruro de calcio.

## 2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO

Tubos Eppendorf, micropipetas, puntas estériles, agua estéril, microcentrífuga, baño termostatzado.

## 3. PROTOCOLO A REALIZAR

### 3.1. Obtención de células competentes

1. Estriar las células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  en una caja Petri con medio PSI-a e incubar toda la noche a 37°C.
2. Inocular 5 ml de medio PSI-b con una colonia aislada (utilizar un matraz de 125 ml) e incubar a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,3 a 550 nm.
3. Inocular, con el cultivo anterior, 100 ml de medio PSI-b en un matraz de 1 litro precalentado a 37°C. Incubar a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,48 a 550 nm.
4. Enfriar el matraz del paso anterior durante 5 minutos en hielo y posteriormente recoger las células por centrifugación a 6000 rpm, 5 minutos a 4°C.
5. Resuspender el pella ("pellet") en 40 ml de TFB-1 frío. Mantener 5

- minutos en hielo.
6. Recoger las células por centrifugación a 6000 rpm 5 minutos a 4°C.
  7. Resuspender las células en 4 ml de TFB-2. Mantener en hielo durante 15 minutos.
  8. Alicuotar las células y congelar a -80°C o en nitrógeno líquido.

### 3.2. Transformación de células competentes

1. Descongelar las células en hielo. Inmediatamente después, añadir 1/10 de  $\beta$ -mercaptoetanol 1,8% v/v. Para ello añadir 15  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol 1,8% a 150  $\mu$ l de células.
2. Mantener 10 minutos en hielo. Enfriar las muestras que contienen las ligaciones del inserto de DNA y el vector en hielo durante este tiempo.
3. Añadir 50  $\mu$ l de células a cada ligación. Mantener en hielo durante 30 minutos.
4. Someter las células a un choque térmico de 3 minutos a 37°C en un baño termostatzado.
5. Enfriar en hielo durante 2 minutos.
6. Añadir 500  $\mu$ l de medio de cultivo LB. Incubar 1 hora a 37°C en agitación.
7. Transferir todo el volumen a placas LB/ampicilina/IPTG/X-Gal.
8. Incubar toda la noche a 37°C.

## 4. RESULTADOS ESPERADOS

En una placa **A** se siembra la bacteria utilizada sin transformar y en otra **B** la bacteria que se transformó con la mezcla de ligación y en otra **C** con una cantidad de DNA de vector conocida (unos 1-5 ng).

Al día siguiente se debe observar en las placas dos parámetros. Uno es el número de colonias obtenidas en cada placa, y otro es el tipo (color) de dichas colonias. El número de colonias dividido por la cantidad de DNA utilizado nos indicará la eficiencia de la transformación, que dependerá del grado de competencia de las células utilizadas, del método de transformación elegido y del tamaño del plásmido utilizado, siendo dicha eficiencia inversamente proporcional al tamaño del mismo. Esta eficiencia es en algunos casos superior a  $10^9$  colonias / $\mu$ g DNA, pero puede ser tan pequeña como cero o unas pocas colonias en el caso más desfavorable.

En la placa **A** no se observarán colonias ya que la estirpe hospedadora utilizada es sensible a ampicilina.

En la placa **B** aparecerán dos tipos de colonias blancas y azules, seleccionadas por resistencia a ampicilina, ya que ambos tipos de bacterias portan el plásmido. Las colonias azules corresponden a las células transformadas con el vector que lleva el gen de la  $\beta$ -galactosidasa funcional y produce por inducción con IPTG dicha enzima capaz de hidrolizar al X-Gal y generar color azul. Las colonias blancas corresponden a las células transformadas con el vector que lleva un gen de la  $\beta$ -galactosidasa no funcional por inserción de un fragmento de DNA dentro del mismo.

Finalmente, la placa **C** sólo contendrá colonias azules pues portan el vector intacto con una  $\beta$ -galactosidasa funcional.

Se contará el número de colonias en **B** y **C**, y se determinará la eficiencia de la transformación y de la ligación.

## 5. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

El método de transformación mediante choque térmico de células competentes con cationes divalentes es muy rutinario dada la facilidad de realización del mismo y la no necesidad de utilizar aparatos sofisticados, a diferencia de la electroporación o la biobalística. No obstante la eficiencia del mismo puede resultar baja, según el caso.

## 6. BIBLIOGRAFÍA COMENTADA

- Inohue H, Nojima H, Okayama H (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28. Artículo clásico optimizando el método.
- Old RW, Primrose SB (1989) Principles of gene manipulation. Blackwell Sci. Pub. Oxford. pp 11-13. Resumen completo del procedimiento.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 1.74-1.84. Excelente recetario con variaciones útiles.

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

### Soluciones

#### -Medio PSI-a:

Extracto de levadura 5g/l

Triptona 20 g/l

MgSO<sub>4</sub> 5g/l

Ajustar el pH a 7,6 con KOH. Añadir 14 g/l de agar.

Esterilizar en autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

#### -Medio PSI-b:

Medio PSI-a sin agar.

#### -TFB-1:

Acetato potásico 30 mM

KCl 100 mM

CaCl<sub>2</sub> 10 mM

MnCl<sub>2</sub> 50 mM

Glicerol 15% v/v

Ajustar el pH a 5,8 con ácido acético 0,2 M. Esterilizar por filtración. Almacenar en frío.

#### -TFB-2:

MOPS 10 mM

CaCl<sub>2</sub> 75 mM

KCl 10 mM

Glicerol 15% v/v

Ajustar el pH a 6,5 con KOH. Esterilizar por filtración. Almacenar en frío.

-Medio de cultivo LB:

Extracto de levadura 5g/l

Triptona 10 g/l

NaCl 5g/l

Esterilizar en autoclave. Almacenar en frío.

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

Medio de cultivo LB

Agar 1,6%

Ampicilina 100 µg/ml

IPTG 500 µM

X-Gal 40 µg/ml

**Material biológico**

En esta práctica se utiliza la estirpe de *Escherichia coli* DH5α y el plásmido pBKSII, pero también podrían utilizarse otras estirpes hospedadoras (K12, B, W, XL1-Blue, HB101, JM109 y C600) y otros plásmidos que incluyan el sitio de clonación múltiple dentro de la secuencia del gen de β-galactosidasa.