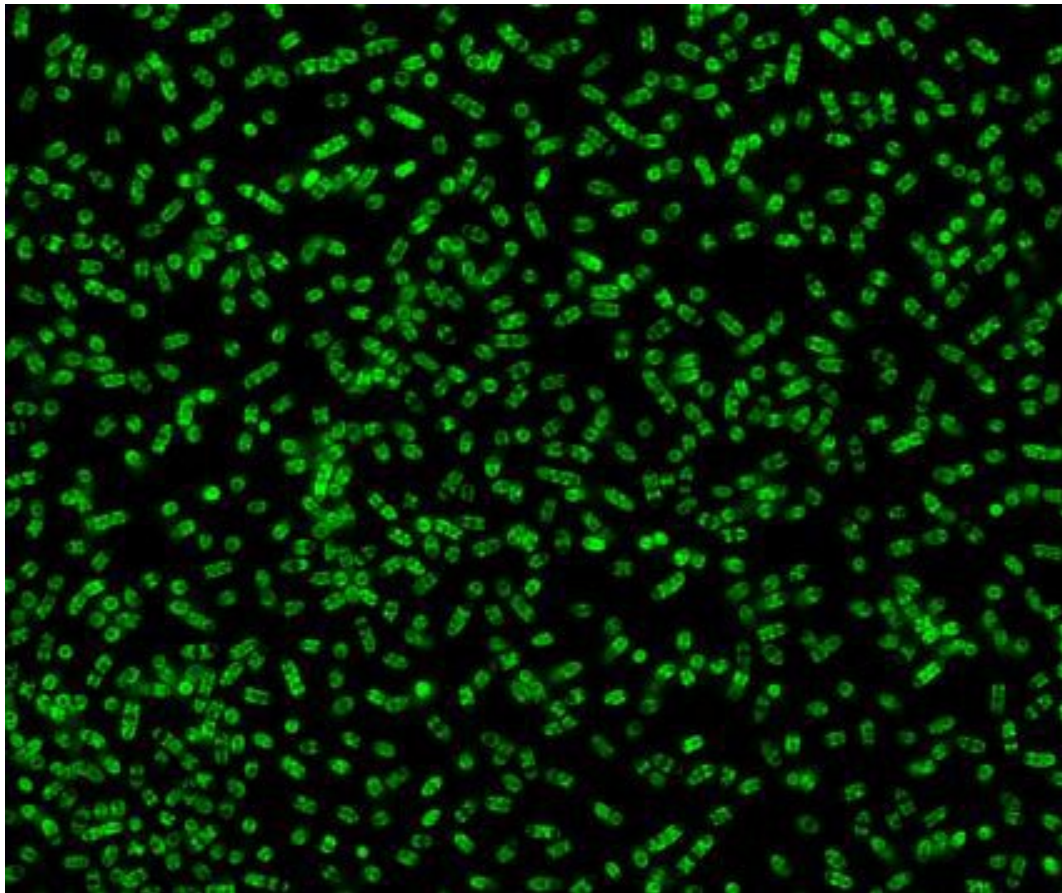


Transformación bacteriana con pGLO



Imágenes CIB-CSIC

Estos materiales didácticos son para uso docente y de investigación. Queda prohibida su comercialización o

Tras descubrir la multitud de aplicaciones de la biotecnología, un grupo de compañeros y tú habéis decidido montar una empresa de producción de enzimas recombinantes con distintos fines. Para ello, tenéis que poner a punto las principales técnicas a utilizar en el laboratorio. Hoy vais a testear si sois capaces de introducir ADN en una bacteria y hacer que esta produzca vuestra proteína de interés.

Ejemplos de aplicaciones de la ingeniería genética

Medicamentos y terapia génica



- Insulina
- Hormonas del crecimiento
- “Sustitución de genes defectuosos”

Medicina forense

Huella genética

- Identificar víctimas/agresores
- Estudios antropológicos



Agricultura y ganadería

- Tiempo de maduración de los frutos
- Aumentar la resistencia a plagas
- Mejorar la tolerancia al frío y calor



Medio ambiente

- Biorremediación
- Biosensores
- Diseño de biocatalizadores



Fuente: presentación de Natalia Hernández Herreros

Introducción

1. ¿Cuál es el objetivo del experimento?

El objetivo del experimento es transformar un microorganismo con un plásmido recombinante para inducir la expresión de una proteína de interés.

2. ¿En qué campo te gustaría que tuviese aplicación tu proteína recombinante? ¿A qué problema te gustaría darle solución?

(Dedicar máximo 5 minutos a esta cuestión. Una vez escuchadas las distintas propuestas proyectar la presentación con el ejemplo de los Bioplásticos).

3. ¿Qué ventaja tendría un microorganismo capaz de “encender” o “apagar” la expresión de un gen determinado en unas condiciones u otras?

La regulación génica permite la adaptación a cambios en las condiciones del medio y previene la sobreproducción de proteínas innecesarias, lo cual supondría un alto coste energético a la célula.

4. Antes de empezar a producir la proteína de interés, ¿qué pasos tendríamos que haber realizado previamente? Pista: ¿recuerdas el dogma central de la biología molecular?



El dogma central de la biología molecular es una teoría que postula que la información genética fluye del ADN al ARN y de este a la proteína, o del ARN directamente a la proteína.

1. Identificar el gen que codifica la proteína que queremos producir.
2. Amplificar el gen de interés a partir del ADN del organismo al que pertenece e insertarlo en un plásmido que nos servirá de vehículo para introducirlo en el microorganismo que actuará como “fábrica” de la proteína de interés.
3. El microorganismo portador del plásmido transcribirá y traducirá dicho gen dando lugar a nuestra proteína de interés.

5. ¿Cuáles son los principales materiales que necesitaremos?

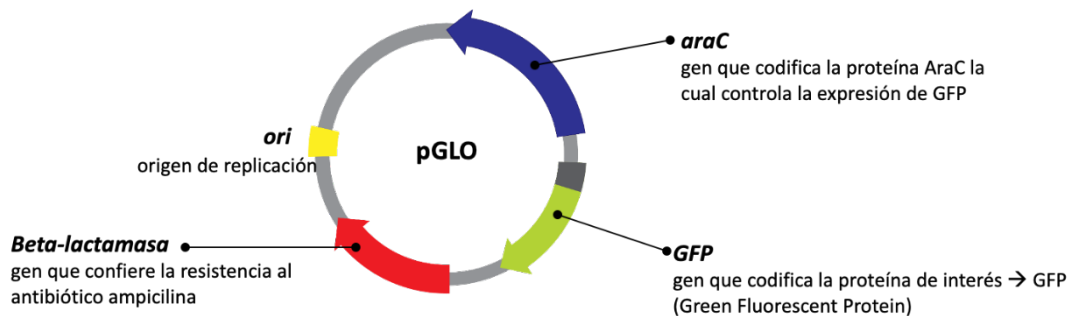
- Microorganismo – El microorganismo más ampliamente utilizado en los laboratorios de biología molecular es *Escherichia coli*.
- Plásmido recombinante conteniendo el gen de interés.
- Medio de cultivo.

Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN circulares, capaces de replicarse autónomamente y transmisibles de forma independiente al ADN cromosómico. Los plásmidos se encuentran comúnmente en los procariontes y, infrecuentemente, en algunos eucariontes. Suelen portar genes que dotan de alguna ventaja para la supervivencia de la bacteria que lo posee. Sus componentes principales son:

- Origen de replicación: secuencia de ADN a partir de la cual la bacteria inicia la copia del plásmido.
- Marcador de selección: gen que otorga a la bacteria que porte el plásmido la capacidad de desarrollarse en unas condiciones de crecimiento determinadas (por ejemplo: gen de resistencia a un antibiótico).
- Elementos reguladores: secuencias de ADN que controlan la transcripción del gen y su consecuente traducción a la proteína de interés. De esta forma podemos inducir la expresión del gen al agregar una señal química.
- Gen de interés: gen que codifica la proteína de interés.

pGLO es el plásmido que utilizaremos como vehículo para introducir el gen de interés en *E. coli*.



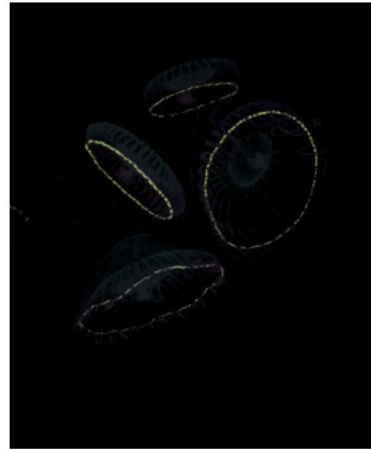
explorer.bio-rad.com

- **GFP**: El gen de interés codifica la proteína GFP (Green Fluorescent Protein). Este gen fue aislado de la medusa *Aequora Victoria*. Se trata de una proteína capaz de emitir fluorescencia bajo luz UV.

Protocolo adaptado por Ana Sánchez Arroyo: *Bio-Rad Explorer™ pGLO™ Bacterial Transformation Kit*



Luz visible



Luz UV

explorer.bio-rad.com

- **AraC:** Proteína reguladora que permite la expresión del gen de interés en presencia del carbohidrato arabinosa.

Transformación bacteriana

Se conoce como transformación al proceso de incorporación de ADN exógeno presente en el ambiente al interior de una célula a través de su membrana. Se trata de un proceso que ocurre de forma natural en algunas especies bacterianas y que además se puede inducir artificialmente. De hecho, es una técnica habitual en el campo de la ingeniería genética. Consta de tres pasos principales:

1. Preparación de las células: tratamiento para modificar la permeabilidad de la membrana celular con el objetivo de hacerla más proclive a la introducción del ADN exógeno.
2. Transformación: introducción del plásmido en la célula. En este experimento se realizará mediante choque térmico. El choque térmico provoca la formación de poros transitorios en la membrana celular que permiten la entrada del plásmido.
3. Recuperación: las células así tratadas se recuperan para que se produzca la expresión del gen de resistencia a antibiótico que les permitirá crecer en el medio de selección.

Protocolo adaptado por Ana Sánchez Arroyo: *Bio-Rad Explorer™ pGLO™ Bacterial Transformation Kit*

Realización de la práctica

Consideraciones previas

En el presente experimento utilizaremos una cepa de *Escherichia coli* no patogénica. Esta cepa está modificada genéticamente para no ser capaz de sobrevivir fuera de las condiciones de laboratorio. No obstante, su manejo necesita el seguimiento de una serie de pautas:

- No se puede comer ni beber en el laboratorio.
- Lavarse las manos con agua y jabón antes de la práctica y al salir del laboratorio.
- Se recomienda el uso de gafas y guantes.
- Todas las superficies de trabajo han de limpiarse antes y después del trabajo o en caso de un derrame del cultivo con desinfectante de laboratorio o una solución de lejía al 10%.
- Todo el material que haya estado en contacto con el cultivo ha de ser tratado en una solución de lejía al 10% durante al menos 20 minutos para su esterilización.
- Trabajo en condiciones de esterilidad (no tocar el medio de cultivo, no tocar las partes del material que vayan a estar en contacto con el cultivo, etc.)

Material necesario

1. 1 placa de medio LB con cultivo de *E. coli*.
2. Placas de Petri:
 - a. 1 placa de medio LB.
 - b. 2 placas de medio LB suplementado con ampicilina.
 - c. 1 placa de medio LB suplementado con ampicilina y arabinosa.
3. Solución para transformación.
4. 1 mL de medio LB.
5. Plásmido pGLO rehidratado (material común).
6. Asas de siembra.
7. Micropipeta 2-20 µL y puntas (material común).
8. Pipetas Pasteur desechables.
9. 2 microtubos.
10. Soporte para microtubos.
11. Recipiente con hielo.
12. Cronómetro.
13. Baño de agua y termómetro (material común).
14. Luz UV (material común).
15. Rotulador indeleble.

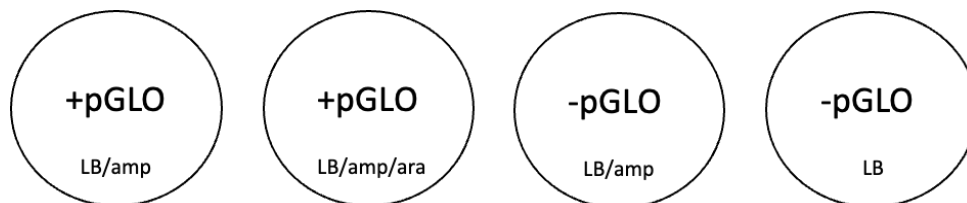
Protocolo adaptado por Ana Sánchez Arroyo: *Bio-Rad Explorer™ pGLO™ Bacterial Transformation Kit*

Protocolo experimental

1. Nombrar los microtubos:
 - a. + pGLO
 - b. - pGLO

Añadir el nombre del grupo y colocarlos en el soporte para microtubos.

2. Transferir con una pipeta Pasteur desechable 250 μ L de solución de transformación a cada uno de los microtubos. Colocar los tubos en el hielo.
3. Con un asa de siembra estéril coger una única colonia de la placa de medio LB con *E. coli*. Introducir el asa de siembra en la solución de transformación contenida en el microtubo +pGLO. Girar suavemente el asa de siembra de forma que la colonia quede dispersa en la solución (no se deben apreciar grumos). Colocar el tubo en el hielo de nuevo. Con una nueva asa de siembra repetir el proceso en el tubo -pGLO.
4. Examina el plásmido pGLO con la luz UV y anota tus observaciones. Tomar 10 μ L de plásmido pGLO con una micropipeta y transferirlo al microtubo +pGLO. Colocar de nuevo el microtubo en el hielo. **No añadir plásmido al microtubo -pGLO. ¿Por qué no?**
5. Incubar los microtubos en hielo durante 10 minutos.
6. Mientras los tubos están el hielo, nombrar las placas en la parte de abajo (no en la tapa) de la siguiente manera:



Añadir el nombre del grupo.

7. Realizar el choque térmico. Transferir el soporte con los microtubos +pGLO y -pGLO del hielo a un baño de agua a 42°C durante exactamente 50 segundos. Pasado ese tiempo, devolver los tubos al hielo rápidamente. Incubar los tubos en hielo durante 2 minutos.

8. Retirar del hielo el soporte con los microtubos. Añadir 250 µL de LB con una pipeta Pasteur estéril. **Usar una pipeta Pasteur estéril diferente para cada microtubo.** Incubar los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Golpear gentilmente los tubos con el dedo para resuspender las células depositadas en el fondo del microtubo. Con una nueva pipeta Pasteur estéril transferir 100 µL de cada tubo a la placa de Petri correspondiente. **Usar una pipeta Pasteur estéril diferente para cada microtubo.**
10. Con un asa de siembra estéril extender las suspensiones uniformemente sobre la superficie del medio de cultivo. Extender hasta que se observe que la suspensión celular ha sido absorbida. **Usar un asa de siembra estéril diferente para cada placa.**
11. Agrupar las placas, colocarlas en posición invertida e incubarlas a 37°C hasta el día siguiente (en su defecto incubarlas a temperatura ambiente durante 48 h).

¿Qué pasos del protocolo se corresponden con qué pasos de la transformación?

- Preparación de las células: Paso 3.
- Transformación: Pasos 4, 5 y 7.
- Recuperación: 8, 9 y 10.

Discusión de los resultados

Observa las placas y rellena la siguiente tabla con los resultados obtenidos.

		<i>Placas</i>			
		<i>-pGLO LB</i>	<i>-pGLO LB/amp</i>	<i>+pGLO LB/amp</i>	<i>+pGLO LB/amp/ara</i>
Componentes	Bacteria	X	X	X	X
	ADN			X	X
	Ampicilina		X	X	X
	Arabinosa				X
	¿Hay crecimiento?	X		X	X
	¿Observas fluorescencia?				X

1. ¿Coinciden con los resultados que esperabas? ¿Por qué?

2. ¿Observaste fluorescencia al iluminar el plásmido con luz UV? ¿A qué crees que se debe este resultado?

No debería observarse fluorescencia. El plásmido contiene el gen que codifica la GFP pero se trata exclusivamente de una secuencia de ADN. El elemento que aporta la fluorescencia es la proteína una vez que la bacteria la produce.

3. ¿Por qué hay tantas células que crecen en la placa de LB? ¿Qué objetivo tiene usar este control?

Al no haber antibiótico en la placa las células no tienen ninguna presión selectiva que evite su crecimiento. Este control sirve para ver que las células empleadas se encuentran en buen estado.

Protocolo adaptado por Ana Sánchez Arroyo: *Bio-Rad Explorer™ pGLO™ Bacterial Transformation Kit*

4. ¿En qué placas esperas encontrar bacterias más similares a las del cultivo original (*E. coli* sin transformar)? ¿Por qué?

En la placa control LB/-pGLO. A estas bacterias no se les añadió el plásmido y se sembraron de nuevo en LB. Por lo tanto, son idénticas al cultivo inicial sin transformar.

5. ¿Qué placas hay que comparar para determinar si ha ocurrido la transformación genética? ¿Por qué?

Hay que comparar la placa de LB/amp -pGLO y la placa de LB/amp +pGLO. Las células a las que no se les añadió el plásmido (-pGLO) no deberían contener el gen de resistencia a ampicilina por lo que no deberían de ser capaces de crecer en presencia de este antibiótico. Por el contrario, las células a las que sí se les añadió el plásmido deberían expresar el gen de resistencia y ser capaces de crecer en el medio suplementado con ampicilina. Si no detectamos crecimiento en la placa de LB/amp +pGLO significa que no se ha producido la transformación.

6. ¿Cuál es la importancia de usar controles? ¿Qué pasaría si no los hiciéramos?

El control nos sirve como guía para interpretar el resultado del experimento.

Si no hubiéramos usado el control de -pGLO en LB y no hubiera crecido nada en ninguna placa no podríamos saber si el problema es que ninguna colonia se ha transformado o si el cultivo original de *E. coli* estaba en mal estado.

Si no hubiéramos usado el control de -pGLO en LB/amp no podríamos discernir si el crecimiento de las células +pGLO en LB/amp se debe a que han sido transformadas por el plásmido o si la ampicilina estaba en mal estado o, en un caso más improbable, se trata de células que, a pesar de no tener el plásmido, son resistentes a la ampicilina.