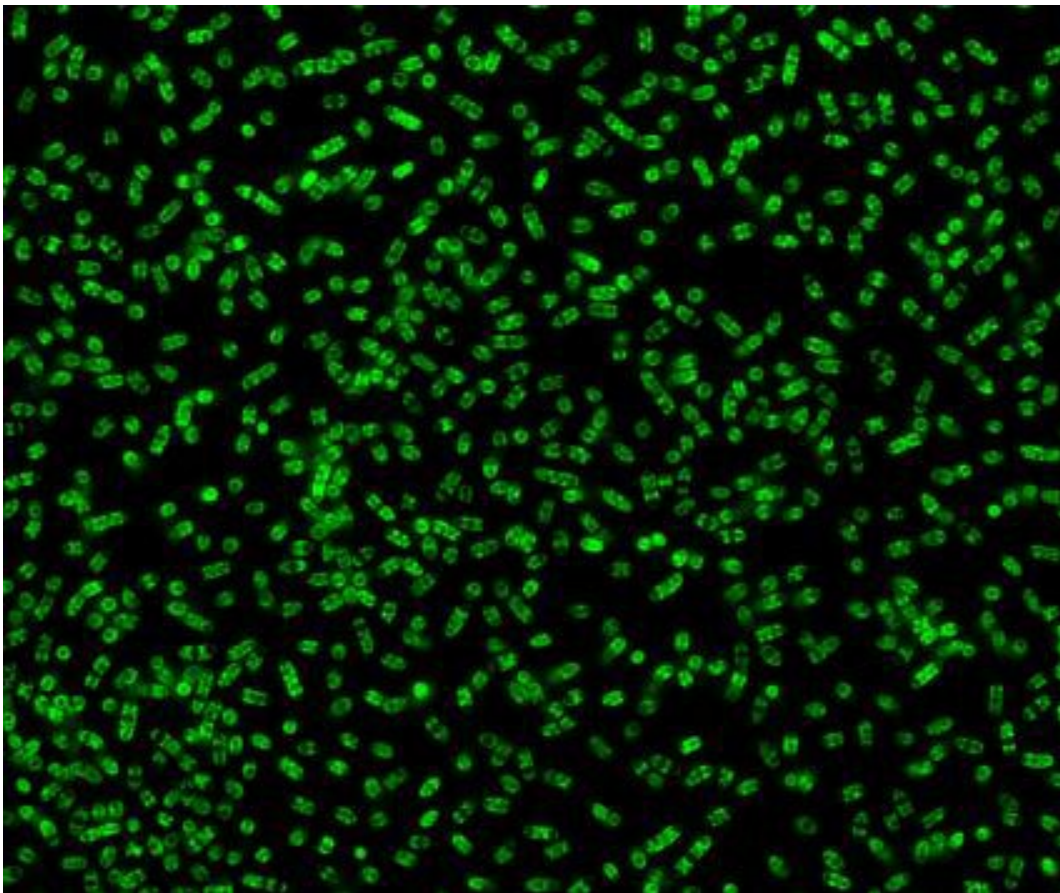


# Transformació bacteriana amb pGLO



Imágenes CIB-CSIC

**Aquests materials didàctics són per a ús docent i de recerca.  
Queda prohibida la seva comercialització o modificació.**

Després de descobrir la multitud d'aplicacions de la biotecnologia, un grup de companys i tu haureu decidit muntar una empresa de producció d'enzims recombinants amb diferents finalitats. Per això, haureu de posar a punt les principals tècniques a utilitzar al laboratori. Avui aneu a testejar si sou capaços d'introduir ADN en un bacteri i, així, convertir-lo en la fàbrica de la vostra proteïna d'interès.

### Exemples d'aplicacions de l'enginyeria genètica

#### Medicaments i teràpia gènica



- Insulina
- Hormones del creixement
- "Substitució de gens defectuosos"

#### Medicina forense

##### Empremta genètica

- Identificar víctimes/agressors
- Estudis antropològics



#### Agricultura i ramaderia

- Temps de maduració dels fruits
- Augmentar la resistència a plagues
- Millorar la tolerància al fred i calor



#### Medi ambient

- Bioremediació
- Biosensors
- Disseny de biocatalitzadors



Font: presentació de Natalia Hernández Herreros

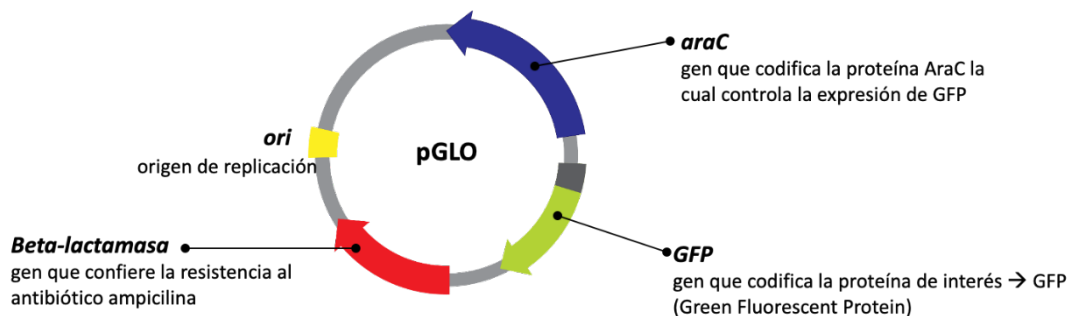


## Plasmidis

Els plasmidis són molècules d'ADN circulars, capaços de replicar-se autònomament i transmissibles de forma independent a l'ADN cromosòmic. Els plàsmids es troben comunament en els procariontes i, de manera infreqüent, en alguns eucariotes. Solen portar gens que doten d'algun avantatge per a la supervivència del bacteri que el posseeix. Els seus components principals són:

- **Origen de replicació:** seqüència d'ADN a partir del qual el bacteri inicia la còpia del plasmidi.
- **Marcador de selecció:** gen que atorga al bacteri que porti el plasmidi la capacitat de desenvolupar-se en unes condicions de creixement determinades (per exemple: gen de resistència a un antibiòtic).
- **Elements reguladors:** seqüències d'ADN que controlen la transcripció del gen i la seva conseqüent traducció a la proteïna d'interès. D'aquesta manera podem induir l'expressió del gen en agregar un senyal químic.
- **Gen d'interès:** gen que codifica la proteïna d'interès.

**pGLO** és el plasmidi que utilitzarem com a vehicle per introduir el gen d'interès en *E. coli*.



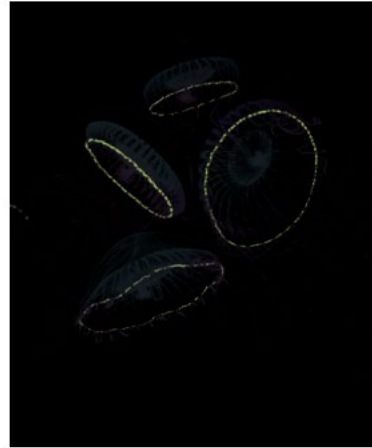
explorer.bio-rad.com

- **GFP:** El gen d'interès codifica la proteïna GFP (Green Fluorescent Protein). Aquest gen va ser aïllat de la medusa *Aequora Victoria*. Es tracta d'una proteïna capaç d'emetre fluorescència sota llum UV.

Protocol adaptat per Ana Sánchez Arroyo: *Bio-Rad Explorer™ pGLO™ Bacterial Transformation Kit*



Luz visible



Luz UV

[explorer.bio-rad.com](http://explorer.bio-rad.com)

- **AraC:** Proteïna reguladora que permet l'expressió del gen d'interès en presència del carbohidrat arabinosa.

### Transformació bacteriana

Es coneix com a transformació al procés d'incorporació d'ADN exogen present en l'ambient a l'interior d'una cèl·lula a través de la seva membrana. Es tracta d'un procés que passa de forma natural en algunes espècies bacterianes i que a més es pot induir artificialment. De fet, és una tècnica habitual en el camp de l'enginyeria genètica. Consta de tres passos principals:

1. Preparació de les cèl·lules: tractament per modificar la permeabilitat de la membrana cel·lular amb l'objectiu de fer-la més procliu a la introducció de l'ADN exogen.
2. Transformació: introducció del plasmidi a la cèl·lula. En aquest experiment es realitzarà mitjançant xoc tèrmic. El xoc tèrmic provoca la formació de porus transitoris a la membrana cel·lular que permeten l'entrada del plasmidi.
3. Recuperació: les cèl·lules així tractades es recuperen perquè es produeixi l'expressió del gen de resistència a l'antibiòtic que els permetrà créixer en el mitjà de selecció.

Protocol adaptat per Ana Sánchez Arroyo: *Bio-Rad Explorer™ pGLO™ Bacterial Transformation Kit*

## Realització de la pràctica

---

### Consideracions prèvies

En el present experiment utilitzarem un cep d'*Escherichia coli* no patogènica. Aquest cep està modificat genèticament per no ser capaç de sobreviure fora de les condicions de laboratori. No obstant això, el seu maneig necessita el seguiment d'una sèrie de pautes:

- No es pot menjar ni beure al laboratori.
  - Rentar-se les mans amb aigua i sabó abans de la pràctica i en sortir del laboratori.
  - Es recomana l'ús d'ulleres i guants.
1. Totes les superfícies de treball s'han de netejar abans i després de la feina o en cas d'un vessament del cultiu amb desinfectant de laboratori o una solució de lleixiu al 10%.
    - Tot el material que hagi estat en contacte amb el cultiu ha de ser tractat en una solució de lleixiu al 10% durant almenys 20 minuts per a la seva esterilització.
    - Treball en condicions d'esterilitat (no tocar el medi de cultiu, no tocar les parts del material que hagin d'estar en contacte amb el cultiu, etc.)

### Material necessari

1. 1 placa de medi LB amb cultiu de *E. coli*.
2. Plaques de Petri:
  - a. 1 placa de medi LB.
    1. 2 Plaques de medi LB suplementat amb ampicil·lina.
    1. 1 placa de medi LB suplementat amb ampicil·lina i arabinosa.
3. Solució per a transformació.
4. 1 mL de medi LB.
5. Plasmidi pGLO rehidratat.
6. Ases de sembra.
7. Micropipeta 2-20 µL i puntes.
8. Pipetes Pasteur d'un sol ús.
9. Retolador indeleble.
10. 2 microtubs.
11. Suport per a microtubs.
12. Recipient amb glaç.
13. Cronòmetre.
14. Bany d'aigua i termòmetre.
15. Llum UV.

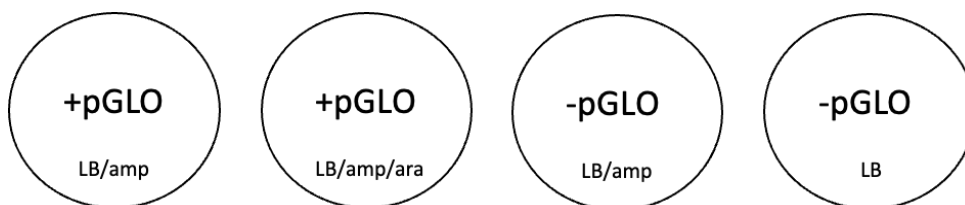
## Protocol experimental

1. Anomeneu els microtubs:
  - a. + pGLO
  - b. - pGLO

Afegiu el nom del grup i col·locar-los en el suport per a microtubs.

1. Transferiu amb una pipeta Pasteur d'un sol ús 250 µL de solució de transformació a cadascun dels microtubs. Col·locar els tubs al glaç.
2. Amb una nansa de sembra estèril agafeu una única colònia de la placa de mig LB amb *E. coli*. Introduïu la rossa de sembra en la solució de transformació continguda en el microtub + pGLO. Gireu suaument la nansa de sembra de manera que la colònia quedi dispersa en la solució (no s'han d'apreciar grums). Col·loqueu el tub al glaç de nou. Amb una nova nansa de sembra repetiu el procés al tub -pGLO.
3. Examineu el plasmidi pGLO amb la llum UV i anota les teves observacions. Prendre 10 µL de plasmidi pGLO amb una micropipeta i transferir-lo al microtub + pGLO. Col·loqueu de nou el microtub al glaç. **No afegiu plasmidi al microtub -pGLO. Per què no?**
4. Incubeu els microtubs en glaç durant 10 minuts.

1. Mentre els tubs hi ha el glaç, anomeneu les plaques a la part de baix (no a la tapa) de la següent manera:



Afegiu-hi el nom del grup i la data de l'experiment.

5. Realitzeu el xoc tèrmic. Transferiu el suport amb els microtubs +pGLO i -pGLO del glaç a un bany d'aigua a 42 °C durant exactament 50 segons. Passat aquest temps, torneu els tubs al glaç ràpidament. Incubeu els tubs en glaç durant 2 minuts.

6. Retireu del glaç el suport amb els microtubs. Afegiu-hi 250 µL de LB amb una pipeta Pasteur estèril. **Useu una pipeta Pasteur estèril diferent per a cada microtub.** Incubeu els tubs durant 10 minuts a temperatura ambient.
7. Colpegeu gentilmente els tubs amb el dit per ressuspensar les cèl·lules que s'hagin dipositat al fons del microtub. Amb una nova pipeta Pasteur estèril transferiu 100 µL de cada tub a la placa de Petri corresponent. **Useu una pipeta Pasteur estèril diferent per a cada microtub.**
8. Amb una nansa de sembra estèril estengueu les suspensions uniformement sobre la superfície del medi de cultiu. Estengueu-les fins que s'observi que la suspensió cel·lular ha estat absorbida. **Useu una nansa de sembra estèril diferent per a cada placa.**
9. Agrupeu les plaques, col·loqueu-les en posició invertida i incubar-les a 37 °C fins a l'endemà (en el seu defecte incubeu-les a temperatura ambient durant 48 h).

**Quins passos del protocol es corresponen amb quins passos de la transformació?**



## Discussió dels resultats

Observeu les plaques i ompliu la taula següent amb els resultats obtinguts.

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

1. Coincideixen amb els resultats que esperàveu? Per què?

2. Vau observar fluorescència en il·luminar el plàsmid amb llum UV? A què creieu que és degut aquest resultat?

- 3. Per què hi ha tantes cèl·lules que creixen a la placa de LB? Quin objectiu té usar aquest control?**
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
- 4. En quines plaques espereu trobar bacteris més similars als del cultiu original (*E. coli* sense transformar)? Per què?**
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
- 5. Quines plaques cal comparar per determinar si ha ocorregut la transformació genètica? Per què?**
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
- 6. Quina és la importància de fer servir controls? Què passaria si no els féssim?**

**fc**ri

Fundació  
Catalana per a  
la Recerca i la  
Innovació

**AMGEN**<sup>®</sup>  
TRANSFER  
CIÈNCIA

Protocol adaptat per Ana Sánchez Arroyo: *Bio-Rad Explorer™ pGLO™ Bacterial Transformation Kit*

Programa **Amgen TransferCiència 2022/23**