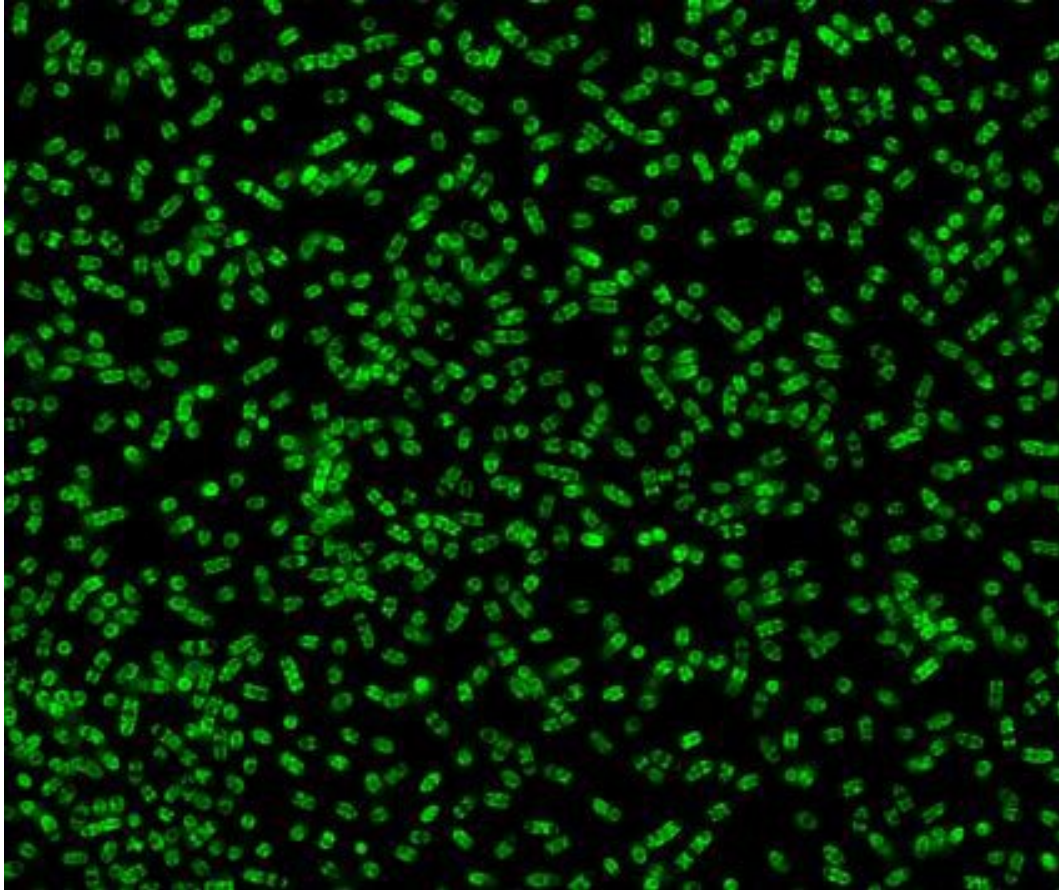


# Transformació bacteriana amb pGLO



Imatges  
CIB-CSIC

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

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

Programa **Amgen TransferCiència 2022/23**

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 fer que aquesta produeixi 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

1. Bioremediació
2. Biosensors
3. Disseny de biocatalitzadors



Font: presentació de Natalia Hernández Herreros

## Introducció

### 1. Quin és l'objectiu de l'experiment?

L'objectiu de l'experiment és transformar un microorganisme amb un plasmidi recombinant per induir l'expressió d'una proteïna d'interès.

### 2. En quin camp t'agradaria que tingués aplicació la teva proteïna recombinant? A quin problema t'agradaria donar-li solució?

(Dedicar màxim 5 minuts a aquesta qüestió. Una vegada escoltades les diferents propostes projectar la presentació amb l'exemple dels Bioplàstics).

### 3. Quin avantatge tindria un microorganisme capaç d'"encendre" o "apagar" l'expressió d'un gen determinat en unes condicions o altres?

La regulació gènica permet l'adaptació a canvis en les condicions del medi i preveu la sobreproducció de proteïnes innecessàries, la qual cosa suposaria un alt cost energètic a la cèl·lula.

### 1. Abans de començar a produir la proteïna d'interès, quins passos hauríem d'haver realitzat prèviament? Pista: recordes el dogma central de la biologia molecular?

#### Recordatorio



El dogma central de la biologia molecular és una teoria que postula que la informació genètica flueix de l'ADN a l'ARN i d'aquest a la proteïna, o de l'ARN directament a la proteïna.

- Identificar el gen que codifica la proteïna que volem produir.  
Amplificar el gen d'interès a partir de l'ADN de l'organisme al qual pertany i inserir-lo en un plasmidi que ens servirà de vehicle per introduir-lo en el microorganisme que actuarà com a "fàbrica" de la proteïna d'interès.
- El microorganisme portador del plasmidi transcriurà i traduirà aquest gen donant lloc a la nostra proteïna d'interès.

### 4. Quins són els principals materials que necessitarem?

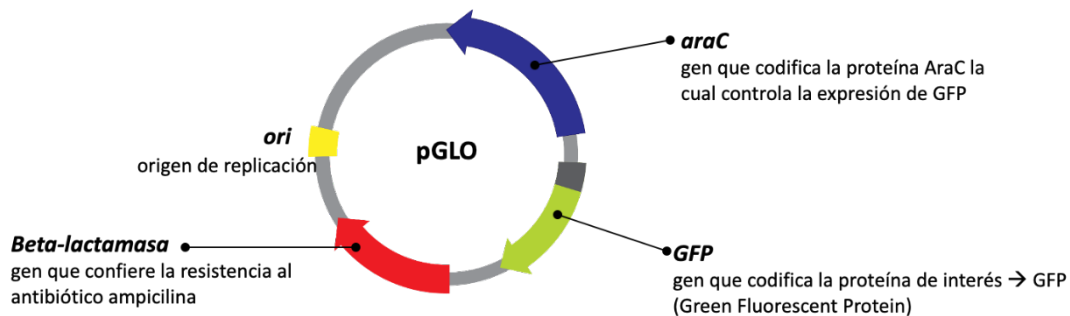
- Microorganisme – El microorganisme més àmpliament utilitzat en els laboratoris de biologia molecular és *Escherichia coli*.
- Plasmidi recombinant contenint el gen d'interès.
- Medi de cultiu.

## Plasmidis

Els plasmidis són molècules d'ADN circulars, capaços de replicar-se autònomament i transmissibles de forma independent a l'ADN cromosòmic. Els plasmidis es troben comunament en els procariotes i, infreqüentment, 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*.



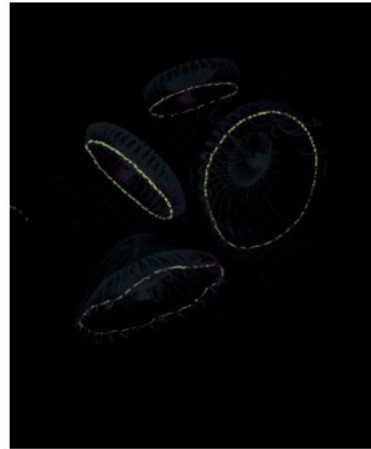
explorer.bio-rad.com

- **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 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:

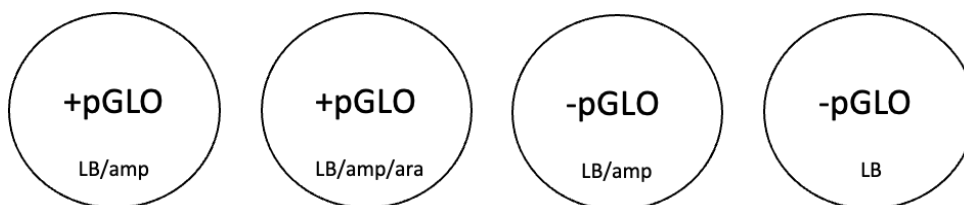
- No es pot menjar ni beure al laboratori.
  - Rentar-se les mans amb aigua i sabó abans de la pràctica i en sortir del laboratori.
  - Es recomana l'ús d'ulleres i guants.
  - Totes les superfícies de treball s'han de netejar abans i després de la feina o en cas d'un vessament del cultiu amb desinfectant 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.
1. 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.
  - b. 2 plaques de medi LB suplementat amb ampicil·lina.
  - c. 1 placa de medi LB suplementat amb ampicil·lina i arabinosa.
3. Solució per a transformació.
4. 1 mL de medio LB.
5. Plasmidi pGLO rehidratat (material comú).
6. Ases de sembra.
7. Micropipeta 2-20 µL i puntes (material comú).
8. Pipetas Pasteur d'un sol ús.
9. 2 microtubs.
10. Suport per a microtubs.
11. Recipient amb glaç.
12. Cronòmetre.
13. Bany d'aigua i termòmetre (material comú).
14. Llum UV (material comú).
15. Retolador indeleble.

## Protocol experimental

1. Anomeneu els microtubs:  
+ pGLO  
pGLO
2. Afegiu el nom del grup i col·loqueu-los en el suport per a microtubs.
3. 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.
4. Amb una nansa de sembra estèril agafeu una única colònia de la placa de mig LB amb *E. coli*. Introduir la nansa 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·locar el tub al glaç de nou. Amb una nova assaja de sembra repetir el procés al tub -pGLO.
5. Examineu el plasmidi pGLO amb la llum UV i anoteu les teves observacions. Prengueu 10 µL de plasmidi pGLO amb una micropipeta i transferiu-lo al microtub + pGLO. Col·loqueu de nou el microtub al glaç. **No afegiu plasmidi al microtub -pGLO. Per què no?**
6. Incubeu els microtubs en glaç durant 10 minutos.
7. Mentre els tubs hi ha el glaç, anomeneu les plaques a la part de baix (no a la tapa) de la següent manera:



8. Afegiu-hi el nom del grup.
9. 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, retorneu els tubs al glaç ràpidament. Incubeu els tubs en glaç durant 2 minuts.

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

10. 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.
11. Colpegeu gentilment els tubs amb el dit per ressuspensar les cèl·lules dipositades 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.**
12. 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.**
13. Agrupeu les plaques, col·loqueu-les en posició invertida i incubeu-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?**

1. Preparació de les cèl·lules: Pas 3.
2. Transformació: Passos 4, 5 i 7.
3. Recuperació: 8, 9 i 10.



## Discussió dels resultats

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

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

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

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

No s'hauria d'observar fluorescència. El plasmidi conté el gen que codifica la GFP però es tracta exclusivament d'una seqüència d'ADN. L'element que aporta la fluorescència és la proteïna un cop el bacteri la produeix.

3. Per què hi ha tantes cèl·lules que creixen a la placa de LB? Quin objectiu té usar aquest control?

Com que no hi ha antibiòtic a la placa les cèl·lules no tenen cap pressió selectiva que eviti el seu creixement. Aquest control serveix per veure que les cèl·lules emprades es troben en bon estat.

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

**4. En quines plaques espereu trobar bacteris més similars als del cultiu original (*E. coli* sense transformar)? Per què?**

A la placa control LB/-pGLO. A aquests bacteris no se'ls va afegir el plasmidi i es van sembrar de nou a LB. Per tant, són idèntiques al cultiu inicial sense transformar.

**5. Quines plaques cal comparar per determinar si ha ocorregut la transformació genètica? Per què?**

Cal comparar la placa de LB/amp -pGLO i la placa de LB/amp +pGLO. Les cèl·lules a les quals no se'ls va afegir el plasmidi (-pGLO) no haurien de contenir el gen de resistència a ampicil·lina per la qual cosa no haurien de ser capaços de créixer en presència d'aquest antibiòtic. Per contra, les cèl·lules a les quals sí que se'ls va afegir el plasmidi haurien d'expressar el gen de resistència i ser capaços de créixer en el medi suplementat amb ampicil·lina. Si no detectem creixement a la placa de LB/amp +pGLO significa que no s'ha produït la transformació.

**6. Quina és la importància de fer servir controls? Què passaria si no els féssim?**

El control ens serveix com a guia per interpretar el resultat de l'experiment.

Si no haguéssim fet servir el control de -pGLO en LB i no hagués crescut res en cap placa no podríem saber si el problema és que cap colònia s'ha transformat o si el cultiu original d '*E. coli* estava en mal estat.

Si no haguéssim fet servir el control de -pGLO en LB/amp no podríem discernir si el creixement de les cèl·lules +pGLO en LB/amp és degut al fet que han estat transformades pel plasmidi o si l'ampicil·lina estava en mal estat o, en un cas més improbable, es tracta de cèl·lules que, tot i no tenir el plasmidi, són resistents a l'ampicil·lina.