

Tópicos de Biofísica Molecular

1^{er} Cuatrimestre de 2018

Docentes: Lía Pietrasanta y Alan Bush

Práctica de laboratorio nº 5: Transformación de bacterias

OBJETIVOS

Familiarizarse con la manipulación genética de organismos unicelulares. Transformar bacterias *Escherichia coli* con un plásmido y seleccionar células transformantes.

INTRODUCCIÓN

La **transformación** se define como la introducción dentro de una célula eucariota “inferior” o bacteriana de una molécula de ADN que no pertenece a dicha célula. Este mismo proceso se denomina **transfección** en células eucariota “superior”¹. Los organismos que han sido permanentemente modificados por la inserción, supresión o reemplazo de un gen se denominan organismos *transgénicos*.

Las técnicas de transformación celular han permitido en gran medida ampliar los conocimientos acerca de la regulación génica y de la función de las proteínas en los sistemas celulares. La introducción de una construcción de ADN recombinante en la que se ha situado una secuencia codificante de un gen reportero (luciferasa, proteínas fluorescentes, beta-galactosidasa, etc.) bajo una secuencia de regulación que se desea estudiar permite medir con facilidad tasas de expresión génica en diferentes situaciones experimentales.

Muchas veces puede ser de interés seleccionar las células que han adquirido el plásmido. Para facilitararlo se incluyen en estos plásmidos genes de resistencia a drogas que permiten a las células que los han adquirido sobrevivir en medios selectivos. Así, se pueden diferenciar las **transformaciones temporales o transientes**, en las que el ADN introducido no se incorpora en el genoma, y las **transformaciones estables** en las que el ADN se **integra** en el genoma del organismo.

Las técnicas de transformación que se utilizan en la actualidad se pueden clasificar en dos tipos: **métodos químicos** y **métodos físicos** [2]. Los **métodos químicos** están basados en la formación de complejos que las células son capaces de adquirir e incorporar, bien sea directamente mediante la ruta endocítica o a través de las membranas. Sin embargo estas técnicas son esencialmente empíricas y no se conocen los detalles sobre cómo funcionan. Esas técnicas no tienen nada que ver con los mecanismos de competencia natural que ocurren en otras bacterias. Entre estos métodos podemos mencionar:

¹ En células animales el término **transformación** se reserva para indicar la transición a un estado canceroso.

1. **Método del cloruro cálcico.** Basado en la obtención de un precipitado entre el cloruro de calcio y el ADN en una solución salina de fosfatos. En esta situación coprecipitan formando unos agregados que son endocitados por las células. Aparentemente el agregado con calcio protege al ADN de la degradación por las nucleasas celulares.
2. **Método del DEAE dextrano.** Basado en la obtención de complejos entre la resina DEAE y el ADN. Los polímeros de DEAE dextrano o polybreno tienen una carga que les permite unirse a las muy negativamente cargadas moléculas de ADN. El ADN acomplejado se introduce en las células mediante choque osmótico mediante DMSO o glicerol. El uso de DEAE dextrano se limita a las transfecciones transientes.
3. **Método de lipofección.** Se basa en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y ADN. El complejo tiene afinidad por la membrana y permite la entrada del ADN en el citosol. Existen un gran número de lípidos que se emplean en lipofección, aunque existe un consenso de un lípido catiónico sintético, a partir de la cual se han diseñado muchas variantes. Es esencial optimizar las condiciones específicas de transfección para obtener buenas eficiencias, que suelen ser en buenas condiciones de entre el 70 y el 90% de las células de la placa. Las desventajas del método es, aparte del elevado precio de los lípidos, el hecho de que no todos los lípidos funcionan en todos los tipos celulares, y que hay que optimizar el ensayo para cada tipo celular. Los parámetros a optimizar son la relación entre lípido y ADN (relación de cargas), la cantidad de ADN empleado, el tiempo que se exponen las células al complejo y la presencia o ausencia de suero.
4. **Método del esferoplasto.** Utilizado para células con pared celular, como los hongos y las células vegetales. Se basa en remover la pared celular (mediante enzimas que la degradan), teniendo recaudos para que la célula no se muera. Dichas células sin pared celular se llaman esferoplastos, y cuando se las incuban en un medio con poli-etileno-glicol (PEG), son capaces de incorporar ADN foráneo.
5. **Método del litio.** Usado principalmente para transformar hongos con pared celular. Se basa en incubar las células con acetato de litio, PEG y someterlas a un shock térmico. Estas condiciones desestabilizan la pared celular y permiten la entrada de ADN, sin la necesidad de preparar esferoplastos.

Los **métodos físicos** están basados en la introducción mecánica de las moléculas en el interior de la célula. Entre ellos están:

1. **Microinyección directa.** El ADN se microinyecta directamente al citosol, célula por célula.
2. **Electroporación.** Introducción del ADN adherido a micropartículas que se disparan sobre las células.
3. **Biobalística.** Se basa en cubrir micropartículas de oro u otros metales con ADN, y luego disparar dichas partículas como micro-proyectiles contra las células. De esta manera se puede atravesar la pared celular de hongos y vegetales, permitiendo a las mismas incorporar el ADN.

En esta práctica vamos a transformar células de bacterias del género *Escherichia coli* con un plásmido llamado *pBluescript*. Vamos a usar el método del cloruro de calcio, que es técnicamente sencillo y permite transformar este tipo de células. Esta técnica

consiste en crecer las células en un medio de cultivo (generalmente LB líquido), colectarlas durante la de crecimiento exponencial y resuspenderlas en una solución fría conteniendo CaCl₂. El tratamiento con CaCl₂ es muy importante para lograr la competencia y se ha hipotetizado que las cargas positivas del Ca²⁺ neutralizan las cargas negativas de los fosfatos del DNA y de los fosfolípidos de la membrana bacteriana, disminuyendo de esta manera la repulsión natural de estas biomoléculas.

Las fases del protocolo de transformación en el TP son las siguientes:

1. **Incubación en hielo** del DNA plasmídico con las células competentes en solución de CaCl₂. En ese momento, con la ayuda del Ca²⁺, el DNA se adsorbe sobre la membrana de las bacterias, la cual además, tiene disminuida su fluidez debido a la baja temperatura. El CaCl₂ también altera la pared celular y hace más fácil la entrada del DNA.
2. **Shock térmico** a 42°C por 1 minuto y medio. En ese momento, la combinación de Ca²⁺ y temperatura hace que se formen poros en la membrana plasmática de las bacterias que permiten que el DNA plasmídico entre a las células. Es importante destacar que para obtener la mayor eficiencia en el proceso de transformación es fundamental el cambio brusco en la fluidez de la membrana, por lo que el shock térmico debe ser generado por el pasaje inmediato del tubo que contiene las bacterias junto al DNA, desde el hielo directamente al baño de 42°C.
3. **Recuperación** con LB sin antibiótico a 37°C por 20 minutos. Este paso permite que las células se estabilicen y comiencen a expresar el gen de resistencia al antibiótico antes del **plaqueo** en un medio de cultivo adicionado con el antibiótico correspondiente.

En el TP se hacen tres controles:

1. **Control de viabilidad:** plaqueando las células en LB sin antibiótico.
2. **Control negativo:** transformando las células con agua estéril y plaqueando en LB Ampicilina.
3. **Control positivo:** transformando las células con una masa conocida de un plásmido conocido.

Cálculo de la eficiencia: La eficiencia de una preparación de células competentes es expresada como el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por microgramo de plásmido transformado (#UFC/μg). Se asume que cada colonia observada luego de cultivar las bacterias en placa proviene de una única bacteria pero, al no poder asegurarlo, hablamos de UFCs y no de número de bacterias. La eficiencia nos da idea de cuántas colonias es posible obtener con nuestras bacterias competentes y nos permite saber si serán útiles para nuestro propósito.

DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

ANÁLISIS DEL PLÁSMIDO

El programa ApE es un editor de secuencias de ADN, sencillo, versátil, gratuito y de código abierto. Se puede bajar desde <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>. El formato más utilizado para guardar secuencias de ADN, en particular secuencias de

plásmidos, es genbank (con extensión ".gb" o ".gbk"). Además de la secuencia, estos archivos pueden almacenar "características" presentes en el plásmido.

Descarguen la secuencia del plásmido "pBluescript-SK.gbk" de la página de la materia. Este archivo contiene únicamente la secuencia del plásmido. A continuación vamos a identificar las características presentes en el plásmido. Para ello haremos uso de una pequeña biblioteca de secuencias reconocidas que vienen con el programa. Es posible agregar nuevas secuencias a esta biblioteca o crear bibliotecas nuevas.

- 1) Ir a **Features>Annotate features using library** o presionar Control+K. Se anotan elementos comunes como orígenes de replicación y sitios de unión a primers universales con su Nombre, Dirección (>>>>, en la hebra cuya secuencia figura, <<<<<, en la que no figura), Tipo de "característica" y su posición en pares de bases.
- 2) Generen un mapa del plásmido a medida que lo van anotando en **Enzyme>Graphic Map** o Control+Y. En esta instancia deberían ver un mapa similar al mostrado en la Figura 1.

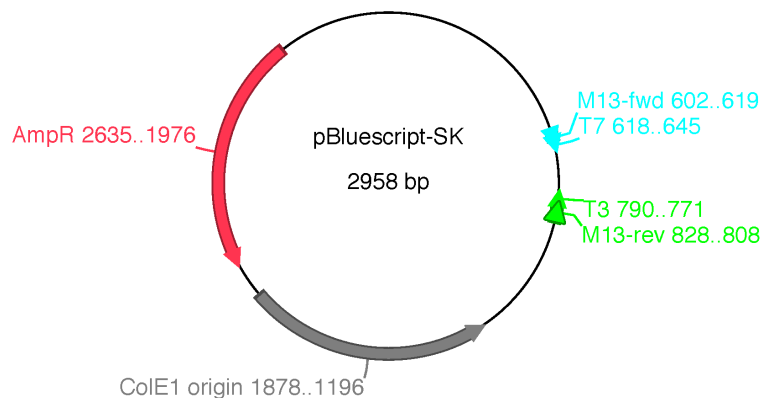
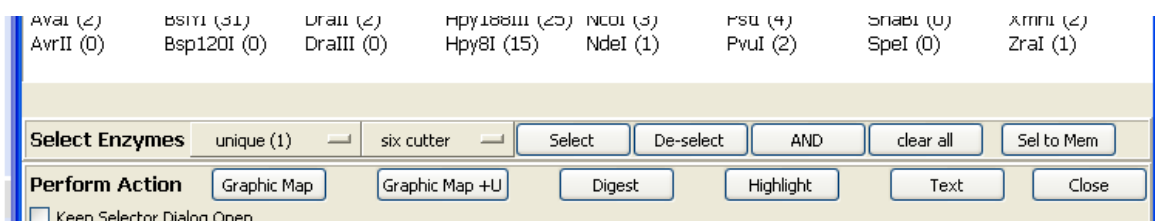


Figura1. Mapa del plásmido pBluescript-SK.

- 3) Por último, vamos a generar un mapa de los sitios de corte de las enzimas de restricción. Dicho mapa es útil para diseñar estrategias de clonado, es decir, cómo introducir fragmentos de ADN en el plásmido. Ir a **Enzymes>Enzyme Selector** o Control+E. Seleccionen Unique (1) y six cutter (enzimas más comunes) y luego "Select". Finalmente, **Graphic Map**.



CUESTIONARIO

Identifique los elementos mostrados en el mapa de la Figura 1. ¿Cuál es la utilidad de cada uno de ellos?

¿Cómo están distribuidos los sitios de restricción? ¿Nota algún lugar donde haya una densidad particularmente alta de sitios de restricción? ¿Cuál será la utilidad de dicha secuencia?

TRANSFORMACIÓN

Se usarán bacterias de una cepa de *Escherichia coli* hechas competentes por el tratamiento con CaCl₂.

Las etapas subsiguientes deben ser realizadas en esterilidad.

1. Cada alumno recibirá 1 tubo eppendorf con 50 µl de bacterias competentes en hielo.
2. Agregar al tubo plásmido Bluescript o agua según le indique el docente.
3. Incubar en hielo durante 20 minutos.
4. Poner los tres tubos a 42°C durante estrictamente 90" (un minuto y medio, ser exacto).
5. Poner los tubos en hielo con agua para que se enfríen rápidamente (5 minutos).
6. Agregar 100 µl de LB líquido, homogeneizar por inversión e incubar 20 minutos a temperatura ambiente.
7. Plaquear la suspensión de bacterias (aproximadamente 100 µl) en placas de LB sólido conteniendo ampicilina (100 µg/ml).
Además, cada turno plaqueará una placa de LB sin ampicilina con 100 µl de un tubo. A esta placa la llamaremos control de viabilidad.
9. Incubar todas las placas a 37°C en estufa, durante unas 24 hs y observar los resultados en la clase siguiente.
10. Calcular la eficiencia de transformación como número de UFC por µg de DNA Introducido.

Medios de Cultivo

LB

Bacto-triptona 10 g
Extracto de levadura 5 g
NaCl 5 g
H₂O llevar hasta 1 litro

LB sólido

A 1 litro de LB
15 g de bacto-agar

Se esterilizan autoclavando 20 min.

BIBLIOGRAFÍA

- *Guía de Trabajos Prácticos* de la materia IBMC - cátedra Dr. A. Kornblitt, DFBMC, FCEN, UBA.
- *Guía de Trabajos Prácticos* de la materia Ingeniería Genética 2015, DFBMC, FCEN, UBA - equipo docente: Fiszbein, Sapochnik, Vasen, Nieto Moreno y Patop.
- Kawai, Shigeyuki, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata. "Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: methods and possible underlying mechanism." *Bioengineered bugs* 1.6 (2010): 395-403.
- *Guía de Laboratorio* de la materia Tópicos de Biofísica 2011- DF, FCEN, UBA. Lía Pietrasanta y Catalina von Bilderling.