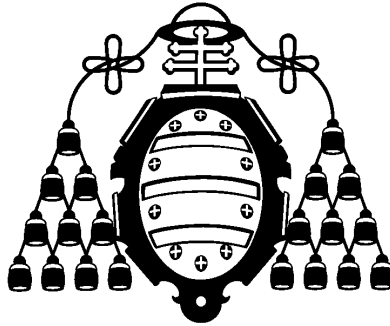


**DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA
Prácticas de BIOLOGIA MOLECULAR

Curso ____ / ____

Nombre y Apellidos :

Aislamiento y Purificación del DNA plasmídico

1. Introducción.

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico, de doble cadena, circulares y de pequeño tamaño, que se encuentran en muchas especies bacterianas. A diferencia del DNA cromosómico, estas moléculas no son necesarias para la viabilidad general de la célula, aunque pueden contener genes, como los que confieren resistencia a antibióticos, que contribuyen a la supervivencia en condiciones especiales. Algunos plásmidos poseen además la propiedad conocida como replicación relajada, estando presentes en un gran número de copias por célula, lo que facilita enormemente su aislamiento y purificación, algo esencial en un vector de clonación.

Para ser utilizado como vector de clonación, un plásmido ideal debe poseer la capacidad de replicación autónoma, ser pequeño para permitir un fácil aislamiento y manejo, y contener secuencias únicas de reconocimiento para endonucleasas de restricción (enzimas de restricción), así como marcadores genéticos selectivos. La mayoría de los plásmidos naturales no cumplen todas estas condiciones, por lo que una de las primeras tareas de la Tecnología del DNA Recombinante consistió en la construcción de plásmidos artificiales, combinando en una molécula pequeña las características útiles procedentes de los plásmidos naturales.

El plásmido pcDNA3 (Figura 1) es uno de los plásmidos artificiales que más popularidad ha alcanzado como vector de clonación. Las características más importantes de este plásmido comercial son las siguientes:

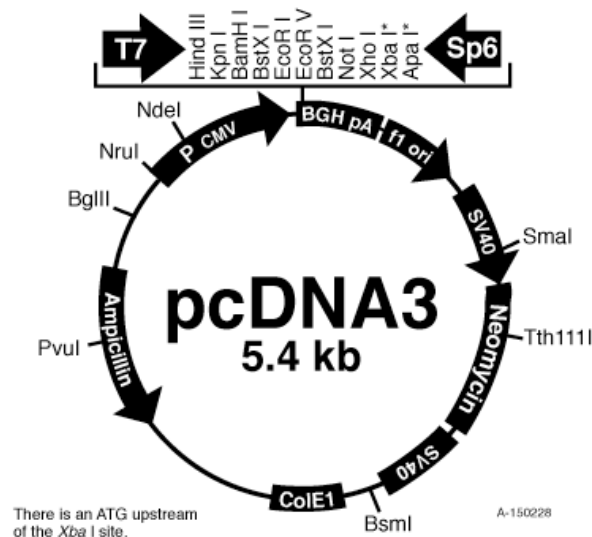


Figura 1. Plásmido pcDNA3

- Tiene un tamaño relativamente pequeño (5446 pb).
- Posee un origen de replicación de tipo relajado.
- Contiene dos genes de resistencia a los antibióticos ampicilina y neomicina, como marcadores genéticos de selección en bacterias y en células animales, respectivamente. Así, la presencia de ampicilina en el medio permite seleccionar las bacterias que portan este plásmido gracias a su capacidad de crecer en presencia de dicho antibiótico. Por el contrario, si el plásmido se expresa en células animales, la presencia de neomicina permite seleccionar aquellas células que portan el plásmido.
- Tiene sitios únicos de reconocimiento para los enzimas de restricción, agrupados en un sitio múltiple de clonación, en donde se pueden insertar fragmentos de DNA exógenos.

Adicionalmente, el plásmido pcDNA3 es un plásmido de expresión en células animales ya que contiene el promotor eucariota CMV, y además permite llevar a cabo la síntesis *in vitro* de RNA a partir del DNA insertado al contener los promotores virales de la Polimerasas SP6 y T7.

El objetivo de esta práctica consiste en la amplificación y purificación del plásmido recombinante pcDNA3-TRHR (Figura 2), un derivado del vector pcDNA3 que contiene clonado entre los sitios HindIII y EcoRI un inserto de DNA exógeno de 2129 pb correspondiente al receptor de TRH (TRHR).

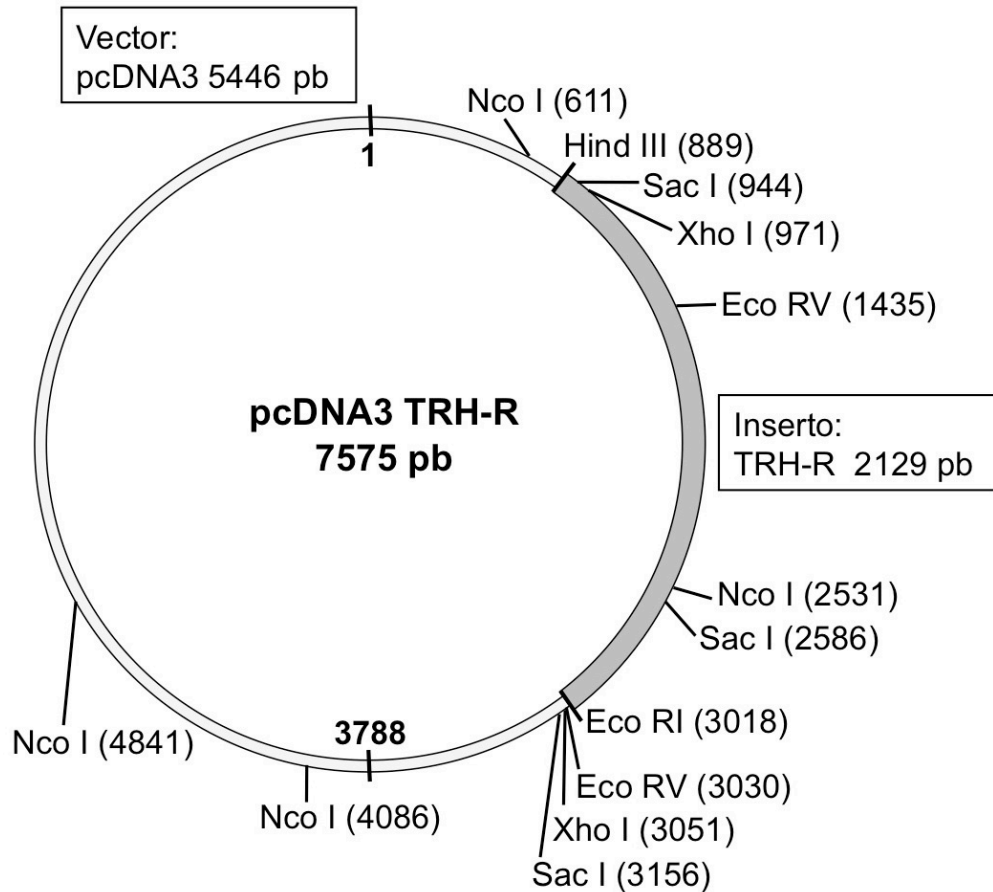


Figura 2. Plásmido pcDNA3-TRHR

Los pasos a seguir de forma resumida son los siguientes:

- 1) A partir de una pequeña alícuota de este plásmido recombinante se procederá inicialmente a su introducción en células de una cepa de la bacteria *E. coli*, mediante el mecanismo de *transformación celular*.
- 2) A continuación se seleccionará una colonia portadora del plásmido que se propagará en medio de cultivo con el antibiótico de selección adecuado (Ampicilina en este caso).
- 3) Finalmente, a partir de este cultivo de células de *E. coli* transformadas con el plásmido pcDNA3-TRHR se procederá a la extracción y purificación del mismo mediante el método denominado *lisis alcalina*, que se basa en la desnaturalización selectiva del DNA cromosómico mediante alcalinización con NaOH, en condiciones en las que el DNA plasmídico mantiene su estructura nativa. Después de neutralizar, el DNA cromosómico forma un precipitado insoluble y gran parte de las proteínas y el RNA también precipitan por tratamiento con SDS y alta concentración de sales.

1.1. Transformación celular: Procedimiento.

Para la transformación con plásmidos, las células de *E. coli* han de ser sometidas a un tratamiento específico que las confiere capacidad para ser transformadas por DNA presente en el medio externo. Estas células así tratadas se denominan células competentes.

El protocolo a seguir para la transformación del plásmido pcDNA3-TRHR en las células bacterianas competentes es el siguiente:

1. Descongelar lentamente en hielo las células competentes de la cepa de *E. coli* XL1Blue mantenidas hasta entonces a -70°C .
2. Manteniendo en todo momento en hielo el tubo eppendorf conteniendo las células competentes, tomar $50\ \mu\text{l}$ de la suspensión celular y añadirlo al tubo conteniendo $1\ \mu\text{l}$ de la disolución de plásmido pcDNA3-TRHR.
3. Mezclar suavemente las células competentes con el plásmido dando pequeños golpecitos al tubo y a continuación incubarlo 20 min en hielo. Durante este periodo preparar bloques termostatzados a 42°C y a 37°C .
4. Someter la mezcla de células competentes y DNA plasmídico a un choque térmico a 42°C durante exactamente 45 segundos. Pasar el tubo eppendorf inmediatamente de nuevo al hielo.
5. Añadir $400\ \mu\text{l}$ de medio de cultivo LB (Luria-Bertani), mezclar suavemente e incubar el tubo eppendorf en un bloque termostatzado a 37°C durante 30 minutos.
6. Extender $200\ \mu\text{l}$ de la mezcla de transformación sobre placas Petri conteniendo medio de cultivo sólido LB-agar conteniendo el antibiótico de selección Ampicilina (a una concentración de $100\ \mu\text{g/ml}$), ayudándose de perlas de vidrio esterilizadas.
6b. Además, añadir $200\ \mu\text{l}$ de la mezcla de transformación a tubos conteniendo $1,8\ \text{ml}$ de medio de cultivo líquido LB con $100\ \mu\text{g/ml}$ de Ampicilina. (*Este paso de siembra directamente en medio líquido se lleva a cabo con objeto de ahorrar tiempo, ver NOTA a pie de página*).
7. Incubar a 37°C las placas Petri hasta la aparición de colonias (al menos 24 horas). Incubar los tubos en las mismas condiciones, en este caso en agitación en un agitador orbital.
8. Con la ayuda de un palillo o una punta de pipeta esterilizada, picar de la placa Petri una colonia aislada y sembrarla en un tubo con $2\ \text{ml}$ de medio de cultivo LB líquido conteniendo $100\ \mu\text{g/ml}$ de ampicilina. Incubar a 37°C durante 24 horas en agitación. Este cultivo debería ser el utilizado para la extracción y purificación del DNA plasmídico, aunque en este caso se utilizará el obtenido de los pasos 6b y 7.

NOTA. El paso nº 8 es esencial para asegurar la pureza del plásmido que se va a amplificar. Sin embargo, y dado que el plásmido pcDNA3-TRHR suministrado es puro, en estas prácticas para ahorrar este tiempo de cultivo de 24 horas, se utilizará el cultivo obtenido de sembrar directamente la mezcla de transformación.

1.2. Purificación del DNA plasmídico: Procedimiento.

El protocolo a seguir para la purificación del plásmido es el siguiente:

1. Poner en un tubo eppendorf 1,5 ml del cultivo de *E. coli* transformado con el plásmido pcDNA3-TRHR que ha sido sembrado el día anterior. Centrifugar dicho tubo en una microcentrífuga durante 2 min. A continuación, eliminar el sobrenadante, dejando el sedimento (paquete celular) lo más seco posible.
2. Resuspender el sedimento de células añadiendo 100 µl de agua destilada y agitando enérgicamente utilizando un agitador de tubos (vortex).
3. Una vez bien resuspendidas las células, añadir al tubo 200 µl de la disolución alcalina de lisis (SDS 1%, NaOH 0,2 M)¹. Importante: no utilizar el agitador, mezclar invirtiendo el tubo varias veces. La muestra debe quedar clara y viscosa. Dejarlo incubar 1–2 min a temperatura ambiente. Si se incuba más tiempo, parte del DNA plasmídico se podría desnaturalizar.
4. Neutralizar añadiendo 150 µl de acetato potásico o sódico 3 M, pH 5. Mezclar de nuevo por inversión. Aparecerán agregados blancos al precipitar el DNA cromosómico. Incubar 1–2 min a temperatura ambiente.
5. Centrifugar 5 min en la microcentrífuga.
6. Pasar cuidadosamente utilizando una micropipeta² 400 µl del sobrenadante a otro tubo eppendorf limpio evitando tocar el sedimento pegado por las paredes. En este sobrenadante se encuentra el DNA plasmídico.
7. Precipitar el DNA plasmídico añadiendo al sobrenadante 1 ml de etanol absoluto frío (mantenido a –20°C). Cerrar muy bien el tubo y mezclar por inversión. Para una eficiente precipitación del DNA es importante mantener el tubo cierto tiempo a -20°C.
8. Centrifugar durante 10 min.
9. Descartar el sobrenadante. Utilizar para ello una micropipeta evitando tocar el fondo. Si es necesario, repetir la centrifugación 1 min para retirar todo el sobrenadante posible. El plásmido se encuentra en el sedimento junto con RNA contaminante fragmentado.
10. Evaporar todo el sobrenadante remanente secando los tubos conteniendo el precipitado de plásmido al vacío o en una estufa a 60°C durante 5 min.
11. Después de secar la preparación de plásmido, éste se resuspende en 20 µl de tampón TE (Tris-EDTA) conteniendo 0,1 mg/ml de RNAsa (Ribonucleasa).

Una alícuota de este plásmido pcDNA3-TRHR disuelto será sometida a digestión con diferentes enzimas de restricción para su análisis.

(1) El SDS o dodecilsulfato sódico es un detergente que rompe la membrana bacteriana; el NaOH sirve para desnaturalizar el DNA cromosómico.

(2) Preferentemente de tipo P200.

Análisis del DNA plásmídico mediante digestión con endonucleasas de restricción y electroforesis

2. Introducción.

Las endonucleasas de restricción son enzimas que reconocen secuencias específicas de DNA de doble cadena y cortan ambas hebras de la molécula. Habitualmente el corte se produce dentro de la secuencia de reconocimiento, originando fragmentos con extremos romos o fragmentos con extremos cohesivos (Figura 3).

Esta propiedad es muy importante porque permite unir fácilmente dos fragmentos de DNA de orígenes distintos, siempre que hayan sido cortados con un mismo enzima de restricción. Esto se traduce en la práctica, en la formación de moléculas de DNA híbridas, lo que constituye la base de la Tecnología del DNA Recombinante.

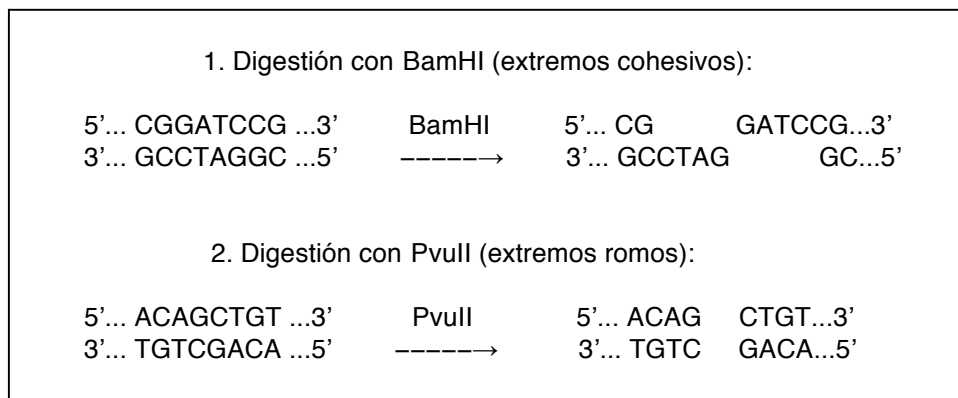


Figura 3. Digestiones con enzimas de restricción

El análisis de los fragmentos de DNA generados por la digestión con enzimas de restricción se realiza generalmente mediante electroforesis en geles de agarosa. Este análisis se basa en que, a pH neutro o alcalino, los grupos fosfato del DNA confieren a la molécula carga neta negativa que está uniformemente distribuida. Para moléculas de DNA de la misma conformación, sometidas a unas mismas condiciones electroforéticas, la velocidad de migración de los fragmentos de DNA en el gel depende sólo de su tamaño, puesto que las moléculas mayores tendrán más dificultad para atravesar los poros del gel que las más pequeñas.

Se puede asumir, dentro de ciertos límites, que la movilidad electroforética de un fragmento de DNA es inversamente proporcional al logaritmo de su longitud. Gracias a esto, utilizando unos patrones de tamaños conocidos, se podrán calcular las longitudes de los fragmentos de DNA obtenidos después de digerir un plásmido con enzimas de restricción.

El objetivo de esta práctica consiste en la digestión con diferentes endonucleasas de restricción del plásmido pcDNA3-TRHR obtenido anteriormente y el análisis electroforético de los fragmentos generados.

2.1. Digestión con las endonucleasas de restricción: Procedimiento.

La reacción de digestión se lleva a cabo en tubos eppendorf. Añadir a un tubo:

- 10 μ l de la disolución de DNA plasmídico.
- 10 μ l de una mezcla que contiene agua destilada, el tampón adecuado y los siguientes enzimas de restricción (HindIII, XhoI, EcoRV o SacI) en proporción 7:2:1, respectivamente. Agitar el tubo suavemente golpeándolo con el dedo e incubar a 37° C durante al menos dos horas (puede hacerse el día anterior y dejarse incubando durante la noche).

2.2. Preparación del gel para la electroforesis.

En esta análisis electroforético se utilizará agarosa al 0,7% en tampón TBE. Pesar 1,4 g de agarosa en un matraz erlenmeyer, añadir 200 ml de tampón TBE, tapar con un erlenmeyer pequeño invertido y fundir en un horno microondas. *¡ATENCIÓN porque una vez fundida la agarosa se va a añadir bromuro de etidio ($\approx 0,25 \mu\text{g/ml}$ final) que es un poderoso MUTAGENO!. USAR GUANTES.*

Preparar el recipiente para el gel limpiando con etanol una navecilla y sellándola por los lados con cinta adhesiva. Verter la mezcla en la navecilla y colocar el peine cerca de uno de los bordes de la misma. Dejar que la agarosa solidifique sin mover la navecilla. El bromuro de etidio se intercalará entre las bases del DNA y emitirá fluorescencia en el rango visible del espectro electromagnético, tras ser irradiado con luz ultravioleta, permitiendo visualizar los fragmentos de DNA.

Una vez solidificado el gel, retirar el peine y observar los pocillos formados. Retirar las cintas adhesivas. Colocarlo en el tanque de electroforesis sumergiéndolo en tampón TBE (Tris-Borato-EDTA). Si no se va a utilizar el gel hasta el día siguiente, envolverlo en un plástico y dejarlo en la nevera hasta entonces.

2.3. Preparación de la muestra.

Una vez transcurrido el tiempo de digestión de la muestra de DNA plasmídico, añadir, antes de cargarla en el gel, 5 μ l de tampón de la muestra de electroforesis. Este tampón contiene glicerol (un agente densificante que sirve para que las muestras sedimenten en el fondo de los pocillos) y azul de bromofenol (un colorante de pequeño tamaño molecular que sirve para controlar la migración del frente de la electroforesis).

2.4. Electroforesis.

Colocar cuidadosamente cada muestra en un pocillo distinto del gel mediante una micropipeta automática. Reservar un pocillo, para colocar la muestra (0,3 μ g) que contiene los fragmentos de DNA de tamaño conocido (patrones). Finalmente, conectar los electrodos del tanque de electroforesis a la fuente de alimentación, aplicando un voltaje de 80-100 V durante 2-3 horas.

2.5. Visualización y fotografía de los fragmentos de DNA.

Una vez terminada la electroforesis, se coloca el gel sobre un transiluminador que emite radiación ultravioleta (*) de una longitud de onda de 300 nm. Protegidos con una pantalla se puede observar durante unos segundos tras lo cual se puede fotografiar con una cámara Polaroid Land MP4.

(*) *¡ATENCIÓN!: Bromuro de etidio en gel. Usar guantes para su manipulación. No exponerse a la luz ultravioleta sin la pantalla o máscara de protección. Se pueden sufrir quemaduras graves.*

2.6. Determinación del tamaño de los fragmentos de DNA.

Sobre la fotografía del gel de electroforesis, medir la distancia recorrida por las bandas, desde el centro del pocillo hasta la banda, tanto de la muestra como de los patrones.

Representar gráficamente las distancias migradas por los fragmentos patrón frente al logaritmo de su tamaño (en pares de bases). Trazada la recta patrón, interpolar las distancias migradas por los fragmentos de DNA problema para estimar su tamaño.

Los tamaños de los fragmentos de DNA patrón (*GeneRuler 1 Kb DNA ladder*) son: 10.000, 8.000, 6.000 (este último aparece mas intenso), 5.000, 4.000, 3.500, 3.000 (este último aparece mas intenso), 2.500, 2.000, 1.500, 1.000 (este último aparece mas intenso), 750, 500 y 250 pb.

Resultados

10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
9
8
7
6
5
4
3
2
1

