

## Transformación xenética de bacterias

|                     |           |   |
|---------------------|-----------|---|
| Familia profesional | SAN       | SANIDADE  |
| Ciclo formativo     | CSSAN06   | Anatomía patolóxica e citodiagnóstico   |
| Grao                | CS        | Superior  |
| Módulo profesional  | MP1369    | Bioloxía molecular e citoxenética   |
| Unidades didácticas | UD07-UD10 | UD07. Clonación de ácidos nucleicos<br>UD10. Cultivos celulares   |
| <b>Actividade</b>   | <b>A1</b> | Transformación Xenética de Bacterias  |
| Autores             |           | JUAN MANUEL ARGIBAY SANMARTÍN<br>JUAN MANUEL CARRO CONS<br>MARÍA JOSÉ MARTÍNEZ FERNÁNDEZ<br>PILAR PEREIRA POZA<br>JOSEFA PEREIRAS VÁZQUEZ<br>ROSARIO MARÍA TEMES SUÁREZ<br>FRANCISCO JAVIER TOBÍO OTERO<br>MARIÍA BELÉN VÁZQUEZ LÓPEZ |
| Nome do arquivo     |           | CSSAN06_MP1369_UD05_A01_TXB   |

© 2017 Xunta de Galicia.

Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria.

Este traballo foi realizado durante un Proxecto de Formación en centros para Profesorado de FP retribuído pola Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria e ten licenza Creative Commons BY-NC-SA (recoñecemento - non comercial - compartir igual). Para ver unha copia desta licenza, visitar a ligazón <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/es/>.

# CONTIDOS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1.Ficha técnica.....</b>  | <b>3</b>  |
| Contexto da actividade.....  | 3         |
| Título da actividade.....  | 3         |
| Resultados de aprendizaxe do currículo.....  | 3         |
| Obxectivos didácticos e título e descrición da actividade.....   | 3         |
| Criterios de avaliación.....   | 4         |
| Contidos.....  | 4         |
| Actividades de ensino e aprendizaxe e de avaliación, métodos, recursos e instrumentos de avaliación..... | 5         |
| <b>2.Transformación xenética de E.coli con plásmido pGLO (A1).....</b>                                   | <b>6</b>  |
| 2.1Introdución.....  | 6         |
| 2.2Desenvolvemento da actividade.....  | 6         |
| 2.2.1Tarefas do profesorado.....   | 6         |
| 2.2.2Tarefas do alumnado.....  | 7         |
| <b>3.Materiais.....</b>  | <b>25</b> |
| 3.1Textos de apoio ou de referencia.....   | 25        |
| 3.2Recursos didácticos.....  | 25        |
| <b>4.Avaliación.....</b>   | <b>25</b> |
| Proba final (exercicio).....   | 27        |
| <b>5.Anexos.....</b>   | <b>28</b> |
| Anexo I.....   | 28        |
| Anexo II.....  | 28        |
| Anexo III.....   | 28        |
| Anexo IV.....  | 28        |

# 1. Ficha técnica

## Contexto da actividade

| Módulo                                      | Duración | Unidade didáctica.                  | Sesións 60´ | Actividades  | Sesións 50´ |
|---|----------|-------------------------------------|-------------|--|-------------|
| MP1369<br>Biología Molecular e Citoxenética | 50       | UD07. Clonación de ácidos nucleicos | 25          | Exposición de contidos                             | 5           |
|   |          |                                     |             | Transformación xenética bacteriana                 | 10          |
|   |          |                                     |             | Selección e identificación de clones recombinantes | 10          |
|   |          | UD10. Cultivos celulares            | 25          | Exposición de contidos                             | 5           |
|   |          |                                     |             | Cultivo de células bacterianas                     | 20          |

## Título da actividade

| Nº | Título                             | Descrición  | Duración |
|----|------------------------------------|---|----------|
| A1 | Transformación xenética bacteriana | Transferencia do plásmido pGLO en E. coli. para a obtención da proteína transxénica GFP mediante cromatografía, a partir de técnicas de síntese, extracción e purificación. | 50       |

## Resultados de aprendizaxe do currículo

| Resultados de aprendizaxe do currículo   | Completo |
|--|----------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>RA2.. Realiza cultivos celulares e describe os pasos do procedemento</li> <li>RA4. Aplica as técnicas de extracción de ácidos nucleicos a mostrás biolóxicas, e seleccionouse o tipo de técnica en función da mostra que cumpra analizar</li> <li>RA7. Aplica as técnicas de extracción de ácidos nucleicos a mostrás biolóxicas, e seleccionouse o tipo de técnica en función da mostra que cumpra analizar</li> </ul> | Non      |

## Obxectivos didácticos e título e descrición da actividade

| Obxectivos específicos   | Actividade                             | Descrición básica   | Duración |
|--|--|---|----------|
| 1 Rehidratar ampicilina, arabinosa, bacterias e plásmido pGLO.             | A01 Transformación xenética bacteriana | Obtección da proteína transxénica mediante cromatografía. | 50       |
| 2 Preparar medio de cultivo (LB agar) e plásmido.                          |  |   |          |
| 3 Preparar as placas co medio de cultivo e sementar colonias de E. coli.   |  |   |          |
| 4 Preparar alícuotas de caldo LB.  |  |   |          |
| 5 Transformación xenética  |  |   |          |
| 6 Extracción e purificación da proteína transxénica mediante cromatografía |  |   |          |

## Criterios de avaliación

| Criterios de avaliación   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>CA2.1 Caracterizáronse os métodos de cultivo celular que se aplican nos estudos citoxénéticos</li><li>CA2.2 Seleccionáronse os tipos de medios e suplementos en función do cultivo que cumpra realizar</li><li>CA2.3 Realizáronse os procedementos de posta en marcha, mantemento e seguimento do cultivo</li><li>CA2.4 Determinouse o número e a viabilidade celular nos cultivos na propagación do cultivo</li><li>CA2.5 Tomáronse as medidas para a eliminación da contaminación detectada</li><li>CA2.6 Definíronse os procedementos de conservación das células</li><li>CA2.7 Traballouse en condicións de esterilidade</li><li>CA3.3 Métodos de tinguadura e bandeado cromosómico. Patróns de identificación</li><li>CA4.1 Definíronse as características estruturais e funcionais dos ácidos nucleicos e as súas propiedades físicas</li><li>CA4.2. Describiuse o proceso de replicación do ADN</li><li>CA7.1 Describiuse o proceso de clonación de ácidos nucleicos</li><li>CA7.2 Caracterizáronse os encimas de restrición, os vectores e as células hóspede utilizadas nas técnicas de clonación</li><li>CA7.3 Utilizáronse programas bioinformáticos para obter información sobre o inserto que se queira clonar</li><li>CA7.4 Detallouse a selección das células recombinantes</li><li>CA7.9 Descríbense as aplicacións dos procedementos de clonación e secuenciación no diagnóstico clínico e na terapia xenética</li></ul> |

## Contidos

| Contidos   |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>Determinación de métodos de clonación e secuenciación do ADN</li><li>Realización de cultivos celulares</li><li>Aplicación de técnicas de análise cromosómica</li></ul> |

## Actividades de ensino e aprendizaxe e de avaliación, métodos, recursos e instrumentos de avaliación

| Qué e para qué   | Cómo  |  |  | Con qué  | Cómo e con qué se valora  | Duración (sesións) |
|--|---|--|--|--|---|--------------------|
| Actividade (título e descrición)   | Profesorado (en termos de tarefas)  | Alumnado (tarefas)   | Resultados ou produtos   | Recursos   | Instrumentos e procedementos de avaliación  |                    |
| <b>A1. Transformación xenética bacteriana</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Transferencia do plásmido pGLO en E. coli para a obtención da proteína transxénica GFP mediante cromatografía, a partir de técnicas de síntese, extracción e purificación.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Tp1.1</b> Exposición por parte do profesor dos contidos e procedementos de interese para a práctica.</li> <li><b>Tp1.2</b> Guía e supervisión do seguimento dos protocolos a desenvolver para a consecución das prácticas.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Ta1.1</b> Preparación da área, equipos e materiais de traballo.</li> <li><b>Ta1.2</b> Preparación de medios de cultivo e reactivos.</li> <li><b>Ta1.3</b> Rehidratación, semente e incubado das bacterias.</li> <li><b>Ta1.4</b> Transformación xenética</li> <li><b>Ta1.5</b> Extracción e purificación da proteína transxénica mediante cromatografía</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Conseguíuse a extracción e purificación da proteína transxénica GFP mediante cromatografía despois de levar a cabo os protocolos precisos para a transformación xenética.</li> <li>Rexistro dixital de imaxes.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Presentación multimedia.</li> <li>Apuntes proporcionados polo profesor.</li> <li>Equipos e materiais propios do laboratorio de bioloxía molecular.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Ficha de seguimento das prácticas.</li> <li>Memoria das prácticas realizadas.</li> <li>Proba escrita dos contidos conceptuais tratados na actividade.</li> </ul> | 50                 |

## 2. Transformación xenética de E.coli con plásmido pGLO (A1)

---

### 2.1 Introducción

A transformación xenética ocorre cando unha célula capta e expresa unha porción nova de material xenético (ADN). Esta nova información adoita proporcionar ao organismo unha nova característica que é identificable despois da transformación. Transformación xenética significa cambio causado por xenes e implica a inserción dun ou máis xenes nun organismo co obxectivo de modificar as características do devandito organismo.

A transformación xenética úsase en moitas áreas da biotecnoloxía. En medicamento, as enfermidades orixinarias por xenes defectuosos están a empezarse a tratar con terapia xénica, mediante a transformación das células do paciente con copias do xene que carecen da anomalía que produce a enfermidade.

Os xenes pódense obter de ADN de humanos, animais, plantas ou microorganismos, e introducirse en bacterias.

En condicións adecuadas, esas bacterias poden producir incluso insulina humana auténtica, a cal se pode usar para tratar aos pacientes con diabetes.

### 2.2 Desenvolvemento da actividade

Nesta actividade seguiranse os pasos protocolizados para levar a cabo a transferencia do plásmido pGLO en *Escherichia coli*. O resultado que se busca é a obtención da proteína transxénica GFP mediante cromatografía.

Para chegar a este resultado final realizaranse técnicas de síntese, de extracción e de purificación, finalizando coa realización da cromatografía.

As tarefas a realizar por parte, tanto do profesorado como do alumnado, desenvólvense nos puntos seguintes.

A actividade distribúese en dúas partes, a primeira referida á transformación xenética e a seguinte á extracción e purificación da proteína transxénica GFP mediante cromatografía:

Parte 1: inclúe as tarefas Ta1.1, Ta1.2, Ta1.3 e Ta1.4

Parte 2: inclúe a tarefa Ta1.5

#### 2.2.1 Tarefas do profesorado

- **Tp1.1 Exposición por parte do profesor dos contidos e procedementos de interese para a práctica.**

O profesorado responsable encárgase da presentación dos contidos teóricos que van ser precisos para a comprensión e o desenvolvemento da actividade práctica.

- **Tp1.2 Guía e supervisión do seguimento dos protocolos a desenvolver para a consecución das prácticas.**

O profesorado responsable encargárase de supervisar:

- Os protocolos a seguir.
- Emprego axeitado do material e dos equipos necesarios.
- Rexistro mediante distintos instrumentos (táboas de rexistro, caderno do alumnado) dos procesos, así como da recollida das imaxes dos procedementos realizados utilizando metodoloxía TIC.

## 2.2.2 Tarefas do alumnado

- **Ta1.1 Preparación da área, equipos e materiais de traballo.**

O material e equipos precisos para a realización desta parte da actividade son os que se detallan a continuación:

### **Equipamiento de laboratorio requerido**

- Cámara de fluxo laminar ou chisqueiros de gas
- Estufa 32°C (para óptima expresión da GFP) e 37°C
- Baño a 42°C (1-6 L)
- Microondas
- Centrífuga a 1500 rpm
- Incubador shaker (opcional)
- Vortex (opcional)
- Autoclave (opcional)
- Micropipetas e puntas (opcional)

### **Material de laboratorio necesario**

- Frasco Erlenmeyer (1 L)
- Probeta graduada (500 mL)
- Bandexas para xeo picado (poliespan)
- Cronómetro de laboratorio
- Termómetro de laboratorio
- Gradilla metálica para baño
- Rotuladores indelebles
- Parafilm para sellar

### **Reactivos necesarios**

- Auga destilada
- Xeo para picar
- Lixivia ao 10%
- Alcohol 70% (opcional)

### **Kit de transformación pGLO de BioRad. Inclúe:**

#### **Reactivos do kit**

- Células bacterianas (E. coli cepa HB101 K12), liofilizadas.
- Plásmido pGLO, liofilizado.
- Ampicilina, liofilizada.
- L(+) arabinosa, liofilizada.
- Solución de transformación (50 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6,1), estéril.
- Medio nutritivo LB líquido, estéril.
- Medio nutritivo LB agar en polvo, estéril.

### Material do kit

- Pipetas Pasteur, estériles.
- Asas de sementar, estériles.
- Placas Petri (60 mm), estériles.
- Tubos de microcentrífuga (2 mL).
- Gradilla de espuma para microtubos
- Lanterna de luz ultravioleta

Imaxes recollidas nos anexos.

#### ■ Ta1.2 Preparación de medios de cultivo e reactivos.

Neste apartado da actividade lévanse a cabo as seguintes tarefas: hidratación, semente e incubado das bacterias, seguindo o paso 1 detallado na táboa 1.

| Paso | Objetivo (evitar contaminación)                | Tiempo | Antelación   |
|------|--|--------|--------------|
| 1    | Rehidratar ampicilina                          | 2 min  | 3-7 días     |
|      | Rehidratar arabinosa                           | 10 min | 3-7 días     |
|      | Preparar placas LB agar:                       | 1 hora | 3-7 días     |
|      | 16 [LB] 16 [LB/amp] 8 [LB/amp/ara]             |        |              |
| 2    | Rehidratar bacteria <i>E. coli</i>             | 5 min  | 24-36 horas  |
|      | Rehidratar plásmido pGLO                       | 2 min  | 24-36 horas  |
|      | Sembrar para aislar colonias de <i>E. coli</i> | 15 min | 24-36 horas  |
| 3    | Preparar puesto de trabajo                     | 10 min | día transgen |
|      | Preparar baño a 42°C                           | 10 min | día transgen |
|      | Preparar alicuotas de caldo LB                 | 10 min | día transgen |
|      | Picar hielo                                    | 5 min  | día transgen |

Táboa 1

Procedemento:

#### 1. Preparar ampicilina e arabinosa

A ampicilina está envasada nun pequeno viario e deshidratada. Cunha pipeta estéril, engade 3 mL da solución de transformación ao viario para rehidratar o antibiótico (Utilízase a solución de transformación porque está estéril. No seu lugar pódese utilizar auga destilada estéril).

A arabinosa tamén se atopa deshidratada nun pequeno viario. Cunha pipeta estéril, engade 3 mL da solución de transformación no viario para rehidratar o azucre. Axita o viario, mellor coa axuda dun axitador vórtex. (Utilízase a solución de transformación porque está estéril. No seu lugar pódese utilizar auga destilada estéril).



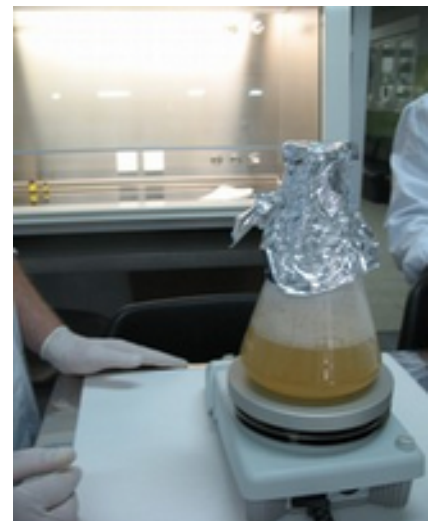
2.

### Preparar o agar

As placas débense preparar polo menos 3 días antes de realizar a práctica. Débense almacenar 2 días a temperatura ambiental e logo baixo refrixeración ata o momento do seu uso. Aos dous días a temperatura ambiente permite secar o agar para favorecer a captación da solución de transformación.

Para preparar o agar, engadir 500 mL de auga destilada a un matraz Erlenmeyer de 1 litro. Engadir o contido do paquete de agar LB. Axitar o matraz para disolver o agar, e quentar ata ebulición no microondas. Volver axitar e quentar unhas 3 veces máis ata que o agar se disolva, tendo coidado de deixar arrefriar o matraz antes de axitalo, para evitar que o medio quente queime a man.

Cando o agar se disolva, deixalo arrefriar ata que o matraz se poida tocar sen queimarse (aprox. 50°C). Mentres se arrefría o agar, etiquetar as placas. Hai que ter coidado de que o agar non se arrefría tanto que chegue a solidificar.



### 3. Rotular as placas e engadir o agar LB

As placas de agar débense rotular na base, preto do bordo da placa, cun rotulador de tinta indeleble. Se se utilizan as 40 placas do kit, rotular 16 placas como LB, 16 como LB/amp e 8 como LB/amp/ara.

Primeiro, engadir o agar LB nas placas marcadas como LB.

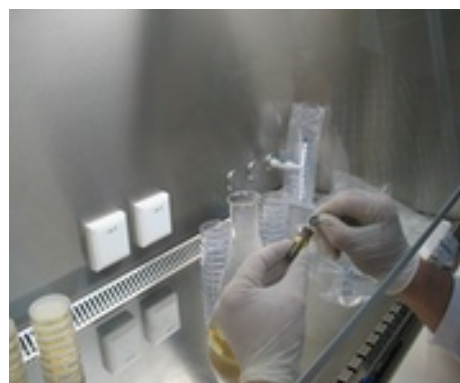
Facer unha torre de entre 4 e 8 placas e cunha man abrir a tapa da placa inferior suxeitando o resto da torre, mentres que coa outra man engádesse o agar LB. Encher a placa entre un terzo e a metade da súa capacidade (aprox. 12 mL). Tapar esa placa, e continuar coa placa superior na torre. Cando se enchan todas as placas, deixalas arrefriar nesa posición.



**A continuación, engadir a ampicilina xa hidratada ao agar LB sobranste no matraz.** Axitar o matraz brevemente para mesturala. Encher as 16 placas rotuladas como LB/amp segundo a técnica descrita antes.



**Por último, engadir a arabinosa hidratada ao agar LB con ampicilina sobranste no matraz.** Axitar o matraz brevemente para mesturala e encher as 8 placas marcadas como LB/amp/ara utilizando a técnica.



#### 4. Almacenar as placas

Despois de deixar as placas dous días a TA pódense utilizar ou se poden almacenar en columnas de ata 20 placas de altura introducindoas en bolsas.

Gardar as placas na neveira de forma investida e dentro das bolsas ata o seu uso.



#### ■ Ta1.3 Rehidratación, semente e incubado das bacterias.

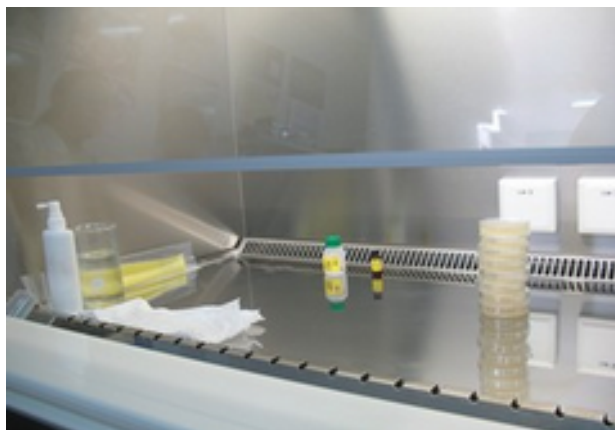
Neste apartado da actividade lévanse a cabo as seguintes tarefas: rehidratar as bacterias, sementar as placas para obter as colonias das placas illadas e preparar o plásmido pGLO, seguindo o paso 2 detallado na táboa 1.

Procedemento:

##### 1. Rehidratar as bacterias

Cunha pipeta estéril, rehidratar o liofilizado de *E. coli* HB101 engadindo 250 mL da solución de transformación no viario. Tapar o viario e deixar a suspensión 5 min a temperatura ambiente. Axitar o viario antes de engadilo ás placas de LB (Utilízase a solución de transformación porque está estéril. No seu lugar pódese utilizar auga destilada estéril).

Gardar a bacteria rehidratada na neveira ata o momento do seu uso (en 24 horas se é posible, e non máis de 3 días).



##### 2. Sementar as placas para obter colonias bacterianas illadas

Cada grupo necesitará o seu propio cultivo de células a transformar. O kit contén material suficiente para preparar 8 postos de traballo. As placas de LB débense sementar para obter colonias illadas da bacteria e débense incubar a 37°C durante 24-36 horas antes da transformación.

a) Partindo da suspensión de *E. coli* preparada no punto 1 e de 8 placas LB, sementar unha placa para cada un dos grupos. O propósito do illamento é formar colonias illadas a partir dunha suspensión cunha alta concentración bacteriana.

En condicións favorables, unha célula se multiplica para dar millóns de células xenéticamente idénticas en 24 horas. Hai millóns de bacterias nunha única colonia de 1 mm.

Introducir un asa de sementa estéril na suspensión bacteriana. Introducir o asa sen inclinar o viario. Sacar o asa e estender na placa como aparece na figura inferior. A extensión realízase en catro cuadrantes.

A primeira extensión é para dispersar un pouco as células.

Deslizar o asa de esquerda a dereita unha ducia de veces en cada un dos cuadrantes. En cada cuadrante consecutivo as células están cada vez máis diluídas, aumentando a posibilidade de obter colonias illadas. É importante utilizar a maior superficie posible de placa para realizar a extensión.

Virar a placa 45 graos aprox. (de maneira que se facilite o movemento da man) e comezar co segundo cuadrante. Tocar o cuadrante anterior un par de veces e logo continuar deslizando o asa de esquerda a dereita 10 veces. É importante utilizar a maior superficie posible de placa para realizar a extensión. Virar a placa 45 graos aprox. (de maneira que se facilite o movemento da man) e comezar co segundo cuadrante. Tocar o cuadrante anterior un par de veces e logo continuar deslizando o asa de esquerda a dereita 10 veces.

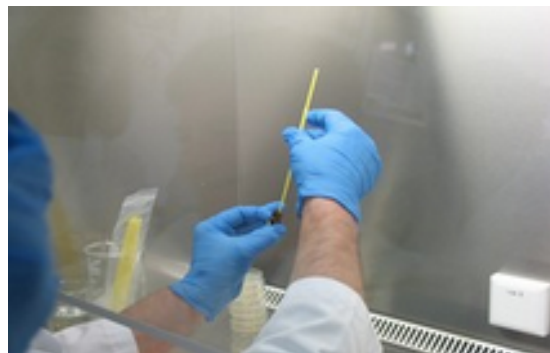
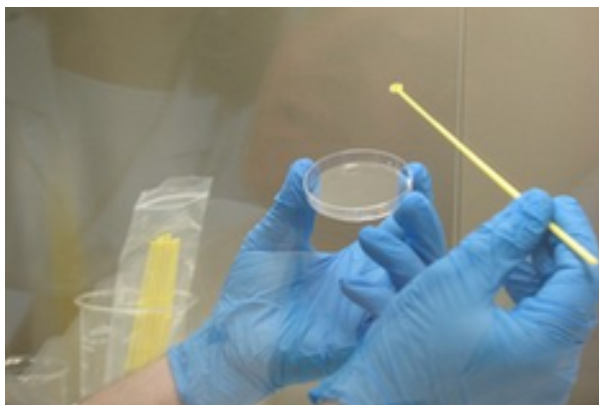
Virar a placa de novo e repetir a acción.

Virar a placa por última vez e sementar o último cuadrante. Repetir os pasos (a-d) no resto das placas de LB. Usar o mesmo asa de sementa para todas as placas. Ao terminar con cada placa, tapala inmediatamente para evitar a súa contaminación.

b) Deixar as placas toda a noite en posición investida na estufa a 37°C ou a temperatura ambiente durante 2-3 días se non se dispón de estufa. Usar para a transformación nas 24-36 horas seguintes. Non refrixeralas antes do seu uso.

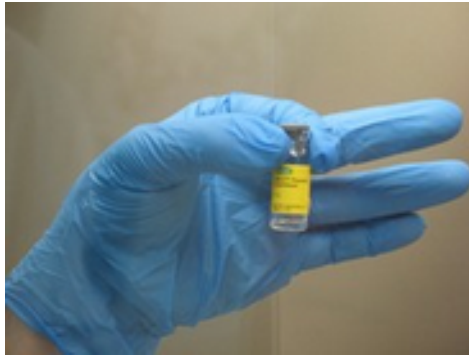
c) *E. coli* produce colonias de cor crema, redondas e de bordos lisos.

Non utilizar as placas contaminadas con outras colonias.



### 3. Preparar o plásmido pGLO

Cunha nova pipeta estéril engadir 250  $\mu$ L da solución de transformación no viario que contén o plásmido pGLO liofilizado. A cantidade de ADN é tan pequena que pode parecer que o viario está baleiro. Se é posible, gardar o ADN rehidratado na neveira (Utilízase a solución de transformación porque está estéril e non conteñen nucleasas. No seu lugar pódese utilizar auga destilada estéril).



#### ■ Ta1.4 Transformación xenética

Neste apartado da actividade lévanse a cabo as seguintes tarefas: preparación de alicuotas, preparación dos postos de traballo e transformación xenética.

Procedemento:

#### 1. Preparar alicuotas

Para cada grupo, engadir 1 mL da solución de transformación ( $\text{CaCl}_2$ ) e 1 mL do caldo LB nos tubos eppendorf de 2 mL do kit. Se o caldo LB se alicueta 1 día antes da práctica, gardar baixo refrixeración. Etiquetar os tubos.

#### 2. Preparar os postos de traballo

Consultar no protocolo o material necesario en cada posto de traballo.

#### 3. Transformación xenética

a) Etiquetar os tubos Eppendorf pechados, un como +pGLO e outro como -pGLO. Indicar nome do manipulador. Poñer os tubos nunha gradilla con cortiza.



b) Abrir os tubos e cunha pipeta estéril engadir 250  $\mu$ L da solución de transformación ( $\text{CaCl}_2$ ).



c) Poñer os tubos en xeo.



d) Con asa de sementa estéril coller unha colonia da placa. Abrir o tubo +pGLO e introducir o asa na solución de transformación. Virar o asa entre os dedos índice e pulgar ata que a colonia se disperse totalmente na solución de transformación (evitar que queden fragmentos flotantes).

Deixar o tubo na gradilla de xeo. Con outro asa estéril repetir a operación co tubo -pGLO.



e) Situar a solución co plásmido pGLO á luz UV e anotar as observacións.

Introducir unha nova asa estéril no viario que contén o plásmido e coller solución plasmídica. Levalo ao tubo +pGLO, pechalo e deixar o tubo na gradilla no xeo.

Pechar tamén o tubo -pGLO, pero sen engadir o plásmido.



f) Incubar os tubos en xeo 10 min.

Olo: Asegurarse de que o fondo dos tubos está en contacto co xeo.



g) Mentres os tubos permanecen no xeo, etiquetar as placas de agar na súa base: unha placa LB/amp e outra LB/amp/ara con +pGLO e unha placa LB/amp e outra como LB con -pGLO.



h) Choque térmico.

Levar os tubos na gradilla ao baño preparado a 42°C, e introducilos durante 50 seg exactos. Asegurarse de colocar ben a gradilla para que o fondo dos tubos estea en contacto coa auga.

Pasados os 50 seg, levar de novo os tubos ao xeo. O cambio do xeo ao baño e viceversa debe facerse con rapidez. Deixar os tubos en xeo 2 min.



i) Sacar a gradilla do xeo e deixala na mesa. Abrir un dos tubos e cunha nova pipeta estéril, engadir 250  $\mu$ l do caldo LB ao tubo e pechalo.

Repetir a operación con outra pipeta estéril no outro tubo. Incubar os tubos 10 min a temperatura ambiente.



j) Axitar os tubos golpeándoos co dedo. Cunha pipeta estéril, pasar 100  $\mu$ l de cada tubo ás placas de cultivo correspondentes.

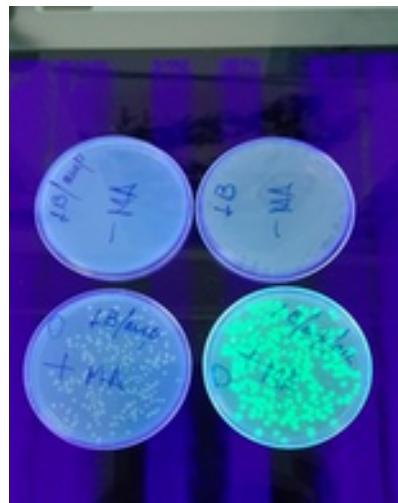


k) Con axuda dunha asa de sementa estéril, estender o líquido por toda a superficie da placa, facendo estrías no agar en todas as direccións.



l) Apilar as placas e empaquetarlas con cinta adhesiva todas xuntas. Poñer o nome do manipulador e

introducilas en posición invertida na estufa a 37 ou 32°C ata o día seguinte.



#### ▪ Ta1.5 Extracción e purificación da proteína transxénica mediante cromatografía

As proteínas transxénicas obtidas por enxeñería xenética teñen moitas aplicacións desde o tratamento de enfermidades humanas en medicamento (exemplo insulina) ata a obtención de encimas que produzan deterxentes non contaminantes. En todos os casos, estas proteínas teñen que ser extraídas e purificadas para ser útiles.

Nunha primeira etapa, mediante o proceso de transformación xenética (kit pGLO), prodúcese unha bacteria (*E. coli*) que sintetiza unha proteína transxénica (GFP). Nunha segunda etapa, utilízase a técnica de cromatografía para o proceso de extracción e purificación da proteína transxénica.

A cromatografía é unha técnica que se basea no coñecemento das propiedades físicas e químicas das moléculas como son o peso molecular, a carga eléctrica ou a solubilidade. A proteína GFP é moi hidrofóbica en comparación co resto de proteínas bacterianas que son moi hidrofílicas. Esta característica diferencial permite o illamento e a purificación da proteína GFP transxénica de entre as proteínas bacterianas baseándonos nunha matriz cromatográfica (columna) de natureza hidrofóbica que interacciona de forma específica coa GFP.

A cromatografía de interacción hidrofóbica baséase nun principio similar á agregación salina ou “salting-out” usado para a precipitación de proteínas. A adición dun tampón con alta concentración de sal á columna de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) reduce a solvatación das proteínas da mostra, incrementando a súa hidrofobicidade e, por tanto, favorecendo a súa unión á matriz

hidrofóbica da columna. Usando tampones de forza iónica decrecente, as moléculas unidas á columna se elúen (sepáranse da matriz) de forma secuencial. A GFP, que é extremadamente hidrofóbica comparada coas proteínas do lisado bacteriano, permanece unida á matriz da columna ata que se emprega o tampón de menor forza iónica. Este método, por tanto, separa e purifica de maneira efectiva a GFP transxénica das proteínas bacterianas.

Esta práctica parte das bacterias transxénicas produtoras da GFP que foron obtidas na práctica anterior co kit de transformación pGLO. As bacterias deben ser crecidas nun medio líquido e posteriormente lisadas (rotas) para liberar o seu contido celular que inclúe as proteínas nativas bacterianas e a proteína foránea de interese, neste caso a GFP.

Esta proteína transxénica separarase dos contaminantes bacterianos mediante a cromatografía en columna utilizando o GFP purificación kit de BioRad. As características únicas de fluorescencia da GFP permiten un seguimento do proceso de extracción e purificación cunha simple lámpada UV.

O material e equipos precisos para a realización da actividade son os que se detallan a continuación:

#### **Equipamiento requerido**

- Cámara de fluxo laminar ou chisqueiros de gas
- Estufa a 32°C (para óptima expresión de GFP)
- Conxelador
- Microondas
- Centrífuga a 3.000 rpm
- Incubador shaker (opcional, aumenta a velocidade de crecemento bacteiano)
- Vortex (opcional)
- Autoclave (opcional)
- Micropipetas e puntas (opcional)

#### **Material necesario**

- Frasco Erlenmeyer (250 mL), estéril.
- Probeta graduada (100 mL)
- Cronómetro de laboratorio
- Termómetro de laboratorio
- Rotuladores indelebles
- Parafilm para selar
- Lámpada de luz ultravioleta
- Gradilla para microtubos
- Gradilla para columnas.

#### **Reactivos necesarios**

- Bacteria transformada con pGLO (LB/amp/ara)
- Auga destilada
- Lixivia ao 10%
- Alcol 70% (opcional)

#### **Kit de purificación de GFP por cromatografía de BioRad. Inclúe:**

##### **Reactivos**

- Ampicilina, liofilizada.
- L(+) arabinosa, liofilizada.
- Lisozima, liofilizada.

- Medio nutritivo LB en 1 tableta, estéril.
- Tampón CHE (10mm Tris, 1mm EDTA, pH 8,0)
- Tampón de equilibrado da columna (2M NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>/CHE, pH 8,0)
- Tampón de unión (4M NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>/CHE, pH 8,0)
- Tampón de lavado (1,3M NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>/CHE, pH 8,0)

### Material

- Columnas de cromatografía (HIC)
- Tapóns das columnas
- Pipetas Pasteur, estériles.
- Asas de sementa, estériles.
- Tubos de microcentrífuga (2 mL), estériles.
- Tubos de cultivo de 15 mL, estériles.
- Tubos colectores de 5 mL.

Neste apartado da actividade lévase a cabo a seguinte tarefa: Purificación de GFP por cromatografía.

Pódense observar os seguintes pasos:

- Concentración bacteriana
- Lisis bacteriana e eliminación de residuos bacterianos
- Purificación de proteína por cromatografía

Procedemento:

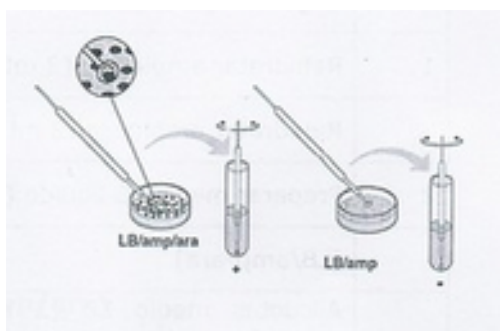
Inoculación e crecemento de cultivo bacteriano (30 min)

1. Retirar do incubador a 32°C as placas de cultivo en LB agar (LB/amp e LB/amp/ara). Os cultivos veñen da práctica de transformación con pGLO.
2. Identificar colonias ben illadas de cor branca da placa LB/amp e, con axuda dunha lámpada UV, identificar as colonias de cor verde da placa LB/amp/ara.



3. Preparar dous tubos de cultivo de 15 mL con 2 mL de medio LB/amp/ara e marcar un tubo con (+) para unha colonia verde e outro con (-) para unha colonia branca.

Pescar unha colonia verde cun asa de sementa estéril e inocular o medio (+). Virar o asa entre os dedos índice e pulgar para dispersar ben a colonia no medio. Repetir a mesma operación para a colonia branca a inocular no tubo (-). Importante, pescar unha soa colonia illada.

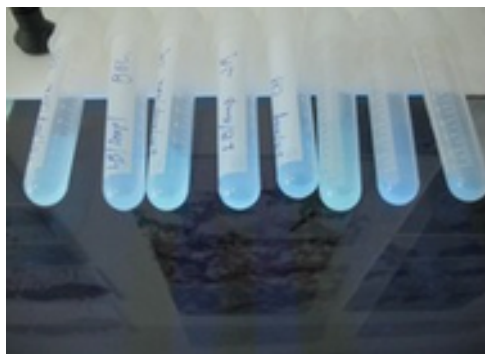


Tapar os tubos e colocalos nun shaker (incubador-axitador) a 32°C de forma horizontal durante 24 horas. Se non se dispón dun shaker débese colocar nun incubador a 32°C pero o crecemento vai ser máis lento. Alternativamente, despois de tapar o tubo, pódese axitar vigorosamente coa man e incubar a temperatura ambiente durante 2 días axitando periodicamente cando sexa posible (4-8 horas).



#### Concentración Bacteriana (60 min)

1. Retirar os cultivos líquidos do incubador e observalos coa luz UV. Anotar calquera diferenza de cor observable entre os dous cultivos.



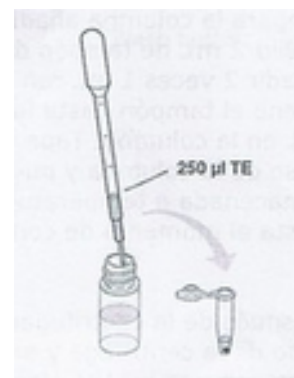
2. Etiquetar un tubo Eppendorf con (+).
3. Con axuda dunha pipeta, transferir 2 mL de cultivo líquido (+) ao tubo (+). A pipeta pódese lavar e utilizar nos seguintes pasos.
4. Centrifugar os tubos Eppendorf a máxima velocidade (1.500-3000 rpm) durante 5 min.



5. Eliminar o sobrenadante, sobre un recipiente cunha solución de lixivia, sen perder o pellet de células. Observar o pellet coa luz UV.



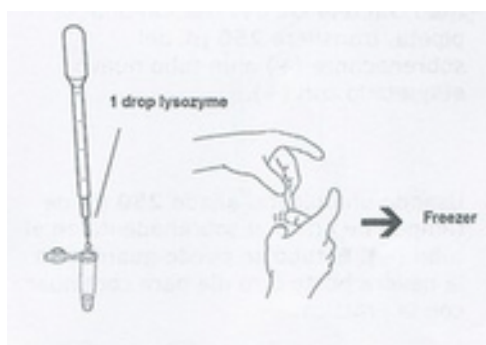
6. Engadir 250  $\mu$ L de tampón CHE no tubo con axuda dunha pipeta.



Resuspender o pellet vigorosamente pipeteando arriba e abaixo varias veces. Se está difícil de resuspender, pódese axudar agarrando a cabeza do tubo cos dedos índice e pulgar dunha man e golpeando a base do tubo co índice da outra man.

7. Engadir unha pinga de lisozima ás bacterias resuspendidas con axuda dunha pipeta para iniciar a dixestión encimática da parede celular da bacteria.

Mesturar o contido do tubo con delicadeza invertindo o tubo varias veces. Observar o tubo con luz UV.



8. Colocar o tubo Eppendorf no conxelador durante 30 min ou ata o próximo día para continuar a práctica.

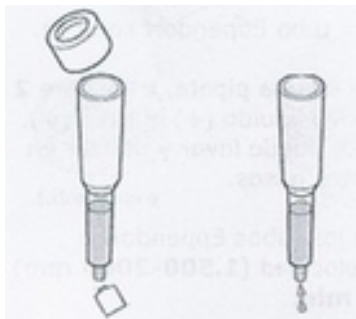
A conxelación causa a ruptura completa da bacteria (parede e membrana).

Lisis bacteriana (30 min)

1. Retirar os tubos Eppendorf do conxelador e descongelar a mostra por frotación e quecemento coa man.
2. Colocar os tubos nunha centrífuga e precipitar os residuos da bacteria por centrifugación a máxima velocidade durante 10 min.

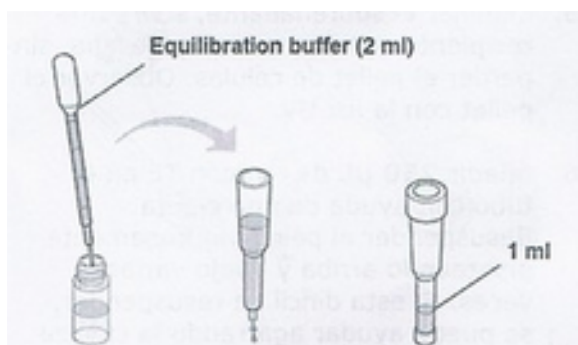


3. Durante a centrifugación anterior, preparar as columnas de cromatografía. Retirar a tapa da cabeza e o tapón da base da columna HIC fornecida co recheo. Permitir a drenaxe do tampón da columna (aprox. 5 min).

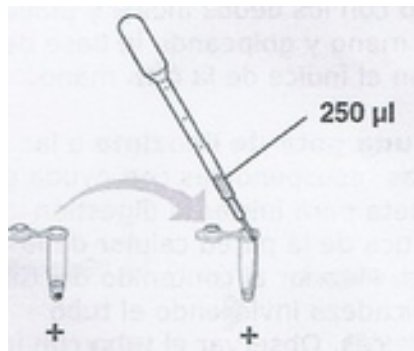


4. Preparar a columna engadindo polo pescozo 2 mL de tampón de equilibrado. Engadir 2 veces 1 mL cunha pipeta.

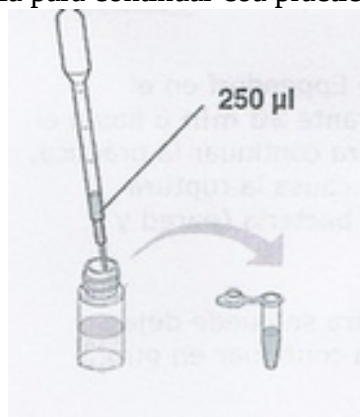
Drenar o tampón ata a marca de 1 mL na columna. Tapar a cabeza e base da columna, agora xa pode ser almacenada a temperatura ambiente ata o momento de continuar.



Despois da centrifugación retirar o tubo da centrifuga e examina o tubo cunha luz UV. Usando unha pipeta, transfire 250  $\mu$ L do sobrenadante (+) a un tubo novo etiquetado con (+).

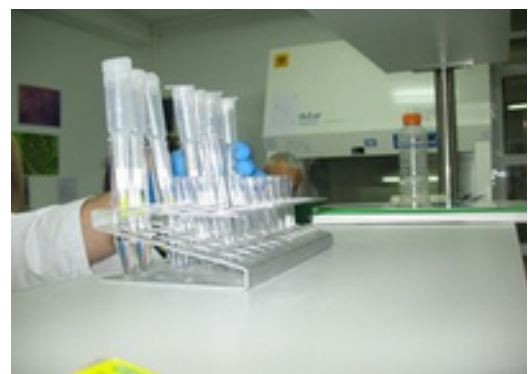
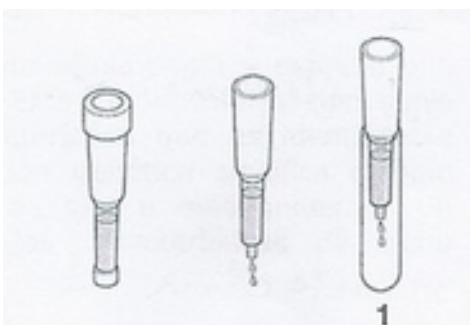


Usando unha pipeta, engadir 250  $\mu$ L de tampón de unión ao sobrenadante no tubo (+). O tubo pódese gardar na neveira ata outro día para continuar coa práctica.



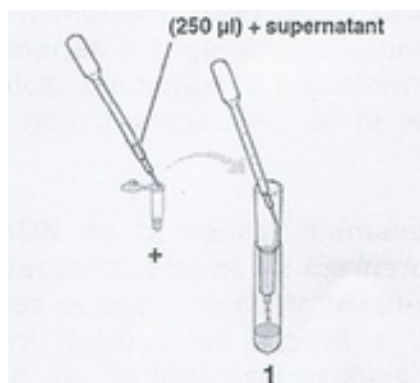
### Cromatografía de proteínas (30 min)

1. Etiquetar 3 tubos colectores (1-3) e colocalos nunha gradilla.
2. Recuperar as columnas HIC, retirar as tapas da cabeza e a base e colocar sobre o tubo colector nº1. Permitir a drenaxe da columna ata que o tampón alcance a matriz HIC.

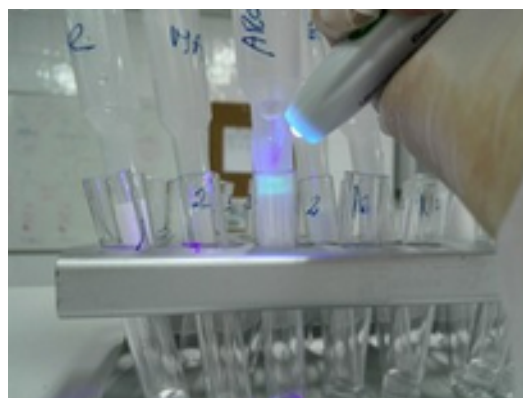
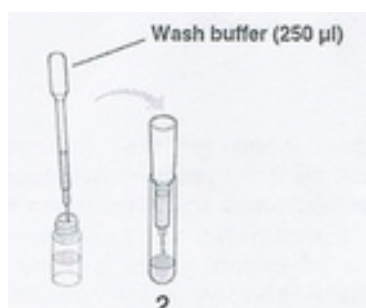


3. Usando unha pipeta, cargar 250  $\mu$ L do sobrenadante na columna. Para iso, apoiar a punta de pipeta contra a parede interior por encima de superficie da matriz e descargar o sobrenadante sobre a parede interior.

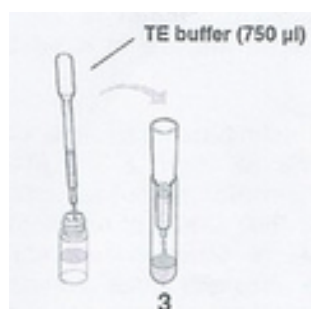
Mirar a columna usando unha luz UV e anotar as observación. Despois de terminada a drenaxe, pasar a columna ao tubo nº2.



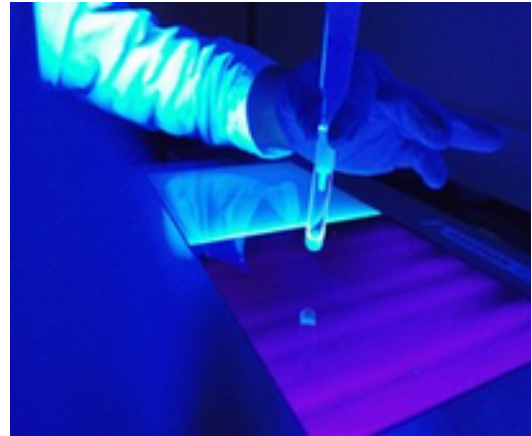
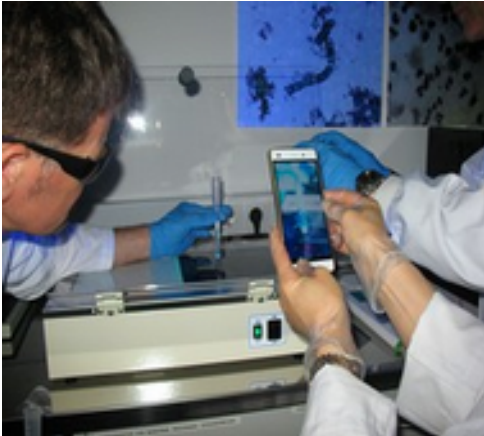
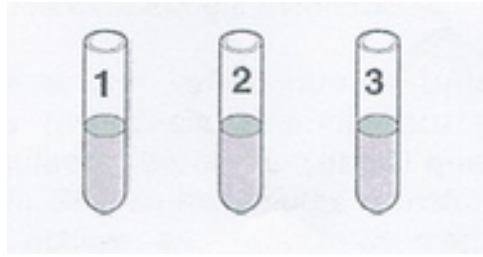
4. Usando unha nova pipeta, engadir 250 µL de tampón de lavado e permitir que todo o volume pase a través da columna. Observar a columna usando unha luz UV e anotar a observación. Despois de que termine a drenaxe, pasar a columna ao tubo nº3.



5. Usando unha nova pipeta, engadir 750 µL de tampón CHE e permite que todo o volume pase a través da columna. Mira a columna cunha luz UV e anota a observación.



6. Examina os 3 tubos colectores con luz UV e anota as diferenzas de cor entre os tubos.



7. Os tubos pódense tapar con Parafilm e gardar en neveira para proceder a unha separación e visualización da proteína GFP mediante electroforesis en xel de poliacrilamida (outro kit diferente).

8. Discusión.

## 3. Materiais

---

### 3.1 Textos de apoio ou de referencia

- *Biología molecular y citogenética*. F. Gómez-Aguado, M.I. Lorenzo, F. Simón, B. Hernández. Ed. Altamar.
- Protocolo de Bio-Rad: Kit de transformación bacteriana con pGLO.

### 3.2 Recursos didácticos

- Os recursos didácticos relativos a material e instrumentos necesarios para a actividade xa se enumeran en cada tarefa.
- Apuntes elaborados polo profesor ou profesora cos contidos teóricos necesarios para desenvolver a actividade.
- Protocolos normalizados de traballo correspondente ás distintas tarefas da actividade.
- Terminais analóxicos e dixitais (cámara fotográfica, ordenadores).

## 4. Avaliación

---

| Criterios de avaliación seleccionados para esta actividade  | Instrumento de avaliación  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>CA2.1 Caracterizáronse os métodos de cultivo celular que se aplican nos estudos citoxénéticos.</li> </ul>                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Proba escrita.</li> <li>Lista de cotexo.</li> </ul> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>CA2.2 Seleccionáronse os tipos de medios e suplementos en función do cultivo que cumpra realizar.</li> </ul>                               | <ul style="list-style-type: none"> <li>Proba escrita.</li> <li>Lista de cotexo.</li> </ul> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>CA2.3 Realizáronse os procedementos de posta en marcha, mantemento e seguimento do cultivo.</li> </ul>                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>Proba escrita.</li> <li>Lista de cotexo.</li> </ul> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>CA2.4 Determinouse o número e a viabilidade celular nos cultivos na propagación do cultivo.</li> </ul>                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>Proba escrita.</li> <li>Lista de cotexo.</li> </ul> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>CA2.5 Tomáronse as medidas para a eliminación da contaminación detectada.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Proba escrita.</li> <li>Lista de cotexo.</li> </ul> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>CA2.6 Definíronse os procedementos de conservación das células.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Proba escrita.</li> <li>Lista de cotexo.</li> </ul> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>CA2.7 Traballouse en condicións de esterilidade.</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Proba escrita.</li> <li>Lista de cotexo.</li> </ul> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>CA3.3 Métodos de tinguadura e bandeado cromosómico. Padróns de identificación.</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Proba escrita.</li> <li>Lista de cotexo.</li> </ul> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>CA4.1 Definíronse as características estruturais e funcionais dos ácidos nucleicos e as súas propiedades físicas.</li> </ul>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>Proba escrita.</li> <li>Lista de cotexo.</li> </ul> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>CA4.2. Describiuse o proceso de replicación do ADN.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Proba escrita.</li> <li>Lista de cotexo.</li> </ul> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>CA7.1 Describiuse o proceso de clonación de ácidos nucleicos.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Proba escrita.</li> <li>Lista de cotexo.</li> </ul> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>CA7.2 Caracterizáronse os encimas de restrición, os vectores e as células hóspede utilizadas nas técnicas de clonación.</li> </ul>         | <ul style="list-style-type: none"> <li>Proba escrita.</li> <li>Lista de cotexo.</li> </ul> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>CA7.3 Utilizáronse programas bioinformáticos para obter información sobre o inserto que se queira clonar.</li> </ul>                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>Proba escrita.</li> <li>Lista de cotexo.</li> </ul> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>CA7.4 Detallouse a selección das células recombinantes.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Proba escrita.</li> <li>Lista de cotexo.</li> </ul> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>CA7.9 Describíronse as aplicacións dos procedementos de clonación e secuenciación no diagnóstico clínico e na terapia xenética.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Proba escrita.</li> <li>Lista de cotexo.</li> </ul> |

## Proba final (exercicio)

1. Que é unha transformación xenética?
2. Que organismo será mais apropiado para ser modificado xeneticamente, un unicelular un pluricelular?
3. Que características debe ter ou non ter o organismo para asegurarnos de que non nos danará nin a nós nin ao medio ambiente?
4. Realiza un esquema do plásmido pGLO e interprétao.
5. Que medios de cultivo son necesarios para poder realizar unha transformación xenética co plásmido pGLO?
6. Que se entende por placa control? Para que serve utilizar un control?
7. En que consiste o choque térmico ao que se somete ás bacterias e que finalidade ten?
8. Que placas débense comparar para determinar se se produciu a transformación xenética? Por que?
9. Que técnica de separación utilízase para a obtención da proteína GFP?
10. Que evidencias indicánnos que a transformación xenética realizouse con éxito?

## 5. Anexos

---

Os anexos referidos inclúense como arquivos adxuntos a este documento.

### Anexo I

Fotos do laboratorio.

### Anexo II

Fotos dos equipos.

### Anexo III

Fotos material.

### Anexo IV

Secuencia fotográfica das tarefas.