

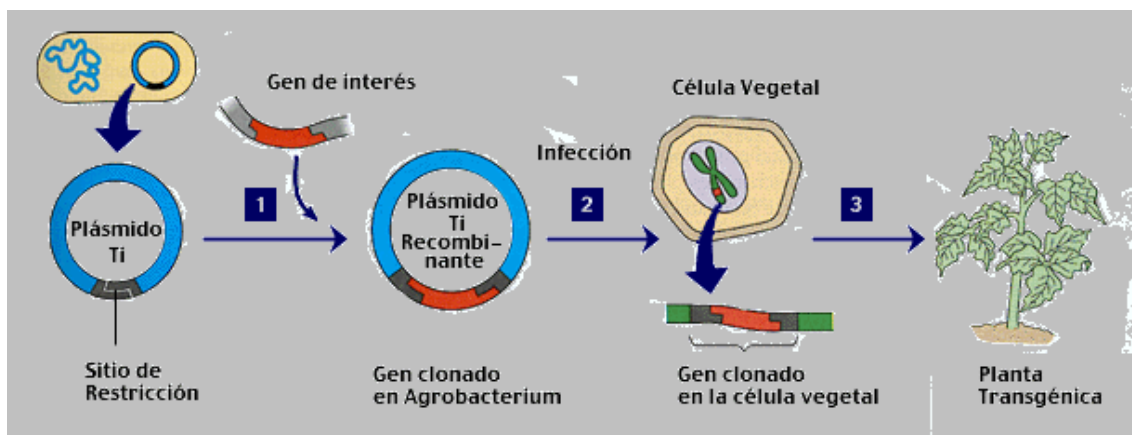
## Práctica 1: Transformación genética de bacterias

### Transformación genética

La transformación genética ocurre cuando una célula capta y expresa una porción nueva de material genético (ADN). Esta nueva información suele proporcionar al organismo una nueva característica que es identificable después de la transformación. Transformación genética significa cambio causado por genes e implica la inserción de uno o más genes en un organismo con el objetivo de modificar las características de dicho organismo.

La transformación genética se usa en muchas áreas de la **biotecnología**. En medicina, las enfermedades originarias por genes defectuosos se están empezando a tratar con terapia génica, mediante la transformación de las células del paciente con copias del gen que carecen de la anomalía que produce la enfermedad.

Los genes se pueden obtener de ADN de humanos (ej. gen de insulina), animales, plantas o microorganismos y se pueden introducir en bacterias (cepas de *Escherichia coli*) para producir proteínas de interés (ej. insulina). En condiciones adecuadas "in vitro", esas bacterias pueden producir **insulina humana** auténtica, la cual se puede usar para tratar a los pacientes con diabetes, una enfermedad genética en la que los genes responsables de producir insulina no funcionan correctamente.



### El sistema pGLO

Las bacterias, además de un cromosoma, pueden contener uno o más pequeños fragmentos circulares de ADN llamados **plásmidos**. Un plásmido suele contener genes que proporcionan alguna **característica beneficiosa** a la bacteria portadora para facilitar su supervivencia. En la naturaleza, las bacterias pueden transferirse plásmidos de unas a otras, pudiendo así compartir esos genes beneficiosos. Este mecanismo les permite a las bacterias adaptarse a nuevos medios. Por ejemplo, el fenómeno de la **resistencia bacteriana a los antibióticos** se debe a la transformación plasmídica.

El kit de transformación pGLO permite realizar un sencillo procedimiento para transformar bacterias con un gen que codifica la síntesis de una proteína denominada **GFP** (Green Fluorescent Protein). La fuente natural de este gen es la medusa fosforescente *Aequorea victoria*, en la que la GFP es la responsable de que la medusa brille o emita fluorescencia en la oscuridad. Después de la transformación de las bacterias, estas expresan el gen de la medusa y sintetiza la proteína GFP, lo que les permite emitir un color verde brillante cuando son expuestas a luz ultravioleta.

El plásmido pGLO (figura) contiene el gen (**gfp**) para la síntesis de la proteína GFP y un gen (**bla**) para resistencia al antibiótico ampicilina. También contiene un sistema de regulación de genes (**araC**) que se puede usar para controlar la expresión de la GFP en las células transformadas. El gen para sintetizar GFP se puede activar en las células transformadas simplemente añadiendo **arabinosa** al medio de cultivo. La selección de las células que se han transformado con el plásmido pGLO se realiza observando el crecimiento en placas con antibiótico. Las células transformadas aparecerán blancas (fenotipo salvaje) en placas que no contengan arabinosa, y de color verde fluorescente cuando se añada arabinosa al agar. La singular estructura de pGLO permite estudiar fácilmente los mecanismos de regulación génica y la selección de genes.

### **Esquema plásmido pGLO**

Plásmido artificial diseñado y construido por ingeniería genética.



- Ori Origen de replicación
- Bla Gen de expresión de proteína de resistencia al antibiótico ampicilina
- GFP Gen de expresión de la proteína fosforescente verde
- araC Gen de regulación de la expresión de la proteína GFP

## **Técnicas básicas de laboratorio** (ver manual BioRad)

### **Precaución de esterilización**

Como en cualquier técnica de microbiología es imprescindible no introducir bacterias y hongos contaminantes en el experimento. Estos microorganismos se encuentran en todas partes (dedos de manos, mesa y material de laboratorio, etc.) y es importante que el material estéril de trabajo no entre en contacto con las superficies contaminadas. Se debe trabajar en un ambiente estéril como una cabina de flujo o bajo la influencia de la llama de un mechero de laboratorio.

### **Uso de pipeta o micropipetas**

Importante hacer hincapié en la graduación de pipetas, especialmente para las micropipetas.

### **Trabajar con la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*)**

La bacteria *E. coli* utilizada (cepa K12) no es un organismo patógeno, tanto la versión nativa como la transformada con el plásmido pGLO. Sin embargo, el manejo de *E. coli* K12 del kit debe de hacerse según las normas estándar de seguridad microbiológica: desinfección diaria de superficies de trabajo y material, desinfección de residuos antes de tirarlos, evitar la formación de aerosoles al abrir tubos y lavarse las manos antes de salir del laboratorio. Se recomienda el uso de guantes y gafas protectoras.

### **Desinfección y eliminación del material**

Todas las soluciones y materiales (asas de siembra y pipetas) contaminados con bacterias se dejan en una solución de lejía al 10% durante 20 min. Se debe habilitar un recipiente con esta solución desinfectante en cada puesto de trabajo. Las placas Petri con bacterias se esterilizan cubriendo el agar con la solución de lejía al 10% durante una hora. El líquido descontaminado se puede eliminar por el fregadero y el material descontaminado se deposita dentro de bolsas en la basura.

Opcional: descontaminar todo el material mediante autoclave (1 atmósfera durante 20 min).

### **Lámpara ultravioleta (UV)**

La radiación UV puede dañar los ojos y la piel. La luz UV de onda corta es más dañina que la de onda larga. La lámpara de UV facilitada por BioRad es de onda larga.

Si es posible usar gafas protectoras de seguridad.

### **Incubación de bacterias**

La temperatura óptima de crecimiento de *E. coli* es de 37°C, que se consigue usando una estufa, obteniendo colonias con diámetro de 1-1,5 mm con cultivos de 24-48 horas. Temperaturas inferiores producirán una tasa de crecimiento menor. El crecimiento se puede realizar sin estufa, pero entonces el número de días necesarios para que crezcan las colonias dependerá de la temperatura ambiental.

## **Indicaciones metodológicas**

### **Siembra de bacterias en placas de agar**

Primero se debe preparar las placas de agar, a continuación rehidratar la bacteria y finalmente realizar la siembra. Ver paso 1 y 2 de la práctica.

### **Transferencia de colonias de placas de agar a tubos**

Coger una sola colonia (1-1,5 mm de diámetro) de la placa de cultivo pues contiene millones de células. No coger más de una colonia.

### **Transferencia de DNA (pGLO)**

Durante la transferencia del plásmido desde el tubo de almacenaje a la solución de transformación se debe verificar que el asa de siembra tiene una fina película de la solución plasmídica en el anillo del asa. Similar a una película de jabón en un aro de hacer pompas.

### **Choque térmico para transformación**

Es importante el cambio brusco de temperatura y la duración del choque térmico como procedimiento para favorecer la captación de ADN foráneo o extraño por la bacteria. Para obtener óptimos resultados, los tubos de la suspensión celular se deben sacar directamente del hielo, situarlos en un baño a **42°C durante 50 segundos** y ponerlos inmediatamente en hielo otra vez. Se debe respetar los tiempos y temperaturas recomendadas, sino, se reducirá drásticamente la transformación.

El choque térmico aumenta la permeabilidad de la membrana bacteriana al ADN foráneo o extraño. Aunque se desconoce el motivo, se sabe que la duración del choque térmico es crítico para el proceso y se ha optimizado para esta bacteria y condiciones.

### **Siembra de células transformadas y células control**

Las bacterias se depositan en el fondo de los tubos y la siembra debe realizarse de una suspensión homogénea. Para ello se debe agitar el tubo ligeramente. Coger la parte superior del tubo con los dedos pulgar e índice y agitar el fondo del tubo con el dedo índice de la otra mano. Como alternativa se puede agitar ligeramente con la pipeta antes de la siembra.

Ojo: La adicción de demasiado medio de transformación (suspensión bacteriana) a las placas Petri es contraproducente ya que el agar de las placas no puede absorber el exceso de líquido y la siembra será desigual.

Asegurarse de tapar las placas Petri inmediatamente después de realizar la extensión de la suspensión bacteriana.

### **Kit de cromatografía GFP (práctica 2)**

Conservar las bacterias transformadas con pGLO en placas LB/amp/ara para la purificación de la proteína GFP. Iniciar un cultivo líquido a partir de una colonia para la purificación al día siguiente o almacenar las placas con el medio hacia arriba en un sitio frío (nevera) si la purificación se realiza en otro momento. Almacenar las placas boca abajo evita que la humedad se condense y caiga sobre las colonias. El frío mantendrá vivas a las células pero impedirá que crezcan hasta que se necesiten. El tiempo óptimo de conservación es de 2-4 semanas y si se almacenan más tiempo se debe precintar las placas con Parafilm para evitar su deshidratación.

## Indicaciones teóricas

### Medios de cultivo

Los medios de cultivo líquidos y sólidos utilizados en este experimento son el **caldo LB** (Luria y Bertani) y **LB agar**, respectivamente. El LB se elabora a partir de un extracto de levaduras y productos de degradación enzimática de la carne, por lo que contiene una mezcla de nutrientes (carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos, sales minerales y vitaminas) adecuados para el crecimiento bacteriano. El agar, que es un polisacárido de algas, es líquido cuando se calienta y solidifica cuando se enfría, proporcionando un soporte sólido para el crecimiento de las bacterias.

### Selección de antibiótico

El plásmido pGLO contiene el gen (*bla*) para la producción de  $\beta$ -lactamasas, lo que permite a la bacteria portadora ser resistente al antibiótico **ampicilina**. Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas producidas y excretadas por las bacterias que contienen los plásmidos e inactivan la ampicilina presente en el medio LB agar permitiendo el crecimiento bacteriano. Sólo las bacterias transformadas con el plásmido y que expresen el gen de las  $\beta$ -lactamasas sobrevivirán en las placas que contienen la ampicilina. Realmente, sólo un reducido porcentaje de células captan el plásmido. Las bacterias que no se transforman no pueden crecer en las placas con ampicilina.

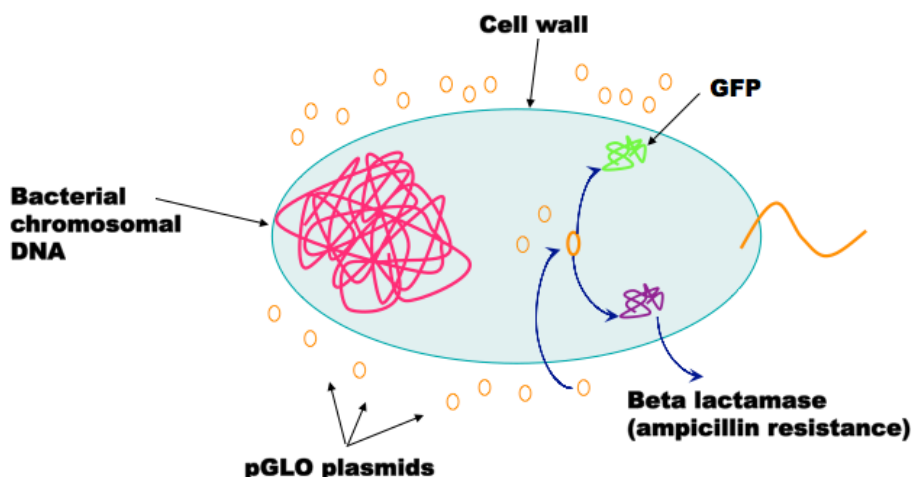
### Solución de transformación

Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en la solución (50 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 6,1) neutralizan la repulsión entre las cargas negativas de los grupos fosfato del ADN y los fosfolípidos de la membrana celular, permitiendo así la entrada del ADN foráneo en las células.

### Recuperación bacteriana

La incubación de 10 min a temperatura ambiente después de la adición del caldo LB permite a las células crecer y expresar la  $\beta$ -lactamasas que proporcionan resistencia a la ampicilina. Así, las células transformadas sobreviven en placas con ampicilina.

La incubación óptima es a 37°C en estufa durante la noche pero puede realizarse a temperatura ambiente más tiempo reduciendo unas 10 veces la eficacia de transformación.

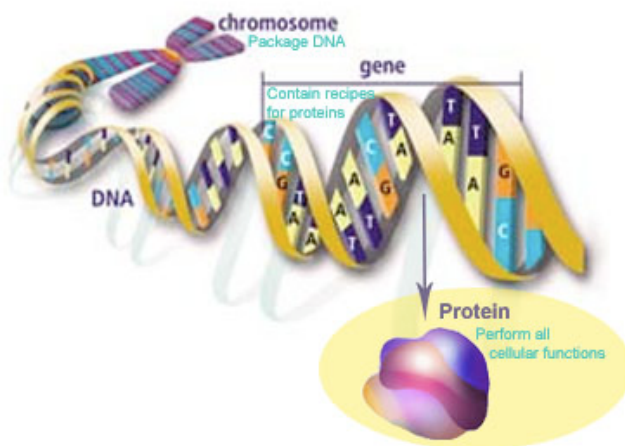


### Regulación del gen *gfp* en el plásmido pGLO

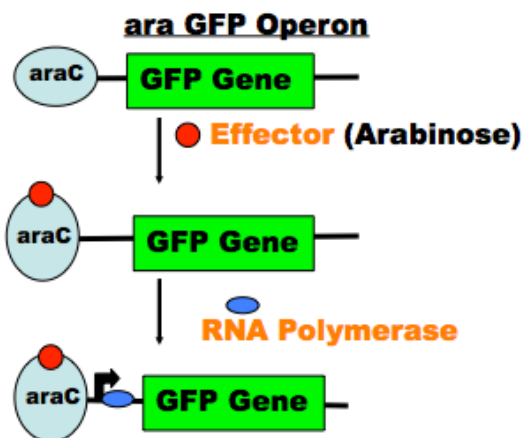
La expresión génica está regulada en todos los organismos para permitir la adaptación a diferentes condiciones y evitar una superproducción de proteínas innecesarias. Los genes implicados en la degradación de nutrientes son un buen ejemplo de genes con una alta regulación. El carbohidrato arabinosa es una fuente de energía y de carbono para la bacteria. Los genes bacterianos que codifican las enzimas para degradar la arabinosa no se expresan cuando no hay arabinosa en el medio. Pero cuando hay arabinosa, los genes se activan, volviéndose a inactivar cuando la arabinosa se agota.

La arabinosa inicia la transcripción de estos genes *araC* induciendo la unión de la RNA polimerasa. En el plásmido modificado genéticamente pGLO, algún gene implicado en la degradación de la arabinosa ha sido sustituido por el gen *gfp* que en la medusa codifica la proteína GFP. Cuando las bacterias transformadas con el plásmido pGLO están creciendo en presencia de arabinosa, el gen *gfp* se activa y las bacterias emiten un color verde brillante cuando se exponen a luz ultravioleta.

El **dogma central** de la biología:  
ADN - ARN - PROTEÍNA - CARACTERÍSTICA



El **control de expresión** de la proteína GFP



### **Equipamiento requerido**

- Cámara de flujo laminar o mecheros de gas.
- Estufa a 37°C y 32°C (para óptima expresión de GFP).
- Baño a 42°C (1-6 L).
- Microondas.
- Centrífuga a 1500 rpm.
- Incubador shaker (opcional).
- Vortex (opcional).
- Autoclave (opcional).
- Micropipetas y puntas (opcional).

### **Material necesario**

- Frasco Erlenmeyer (1 L).
- Probeta graduada (500 mL).
- Bandejas para hielo picado (poliespan).
- Cronómetro de laboratorio.
- Termómetro de laboratorio.
- Gradilla metálica para baño.
- Rotuladores indelebles.
- Parafilm para sellar y tijeras.
- Guantes y bata de laboratorio.

### **Reactivos necesarios**

- Agua destilada.
- Hielo para picar.
- Lejía al 10%.
- Alcohol 70% (opcional).

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

#### **Reactivos**

- 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**

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

## **Fases práctica 1: Transformación genética de bacterias**

Se pueden observar las siguientes fases:

- A) Preparación práctica y siembra de cultivo bacteriano en placas LB agar
- B) Transformación de *E. coli* con plásmido pGLO y siembra
- C) Análisis de la transformación

**Temporalización de la práctica** (ver manual del profesor de BioRad)

Se necesita deshidratar componentes liofilizados del kit de transformación pGLO y preparar placas de cultivo y diverso material previo a la realización de la práctica de transformación genética de *E. coli*.

**1A) Preparación de la práctica:** Viernes (-3 días) y Lunes

	<b>Objetivo</b> (evitar contaminación)	<b>Tiempo</b>	<b>Antelación</b>
<b>Paso 1</b> Viernes	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]		
<b>Paso 2</b> Lunes	Preparar estufa a 37°C	1 min	24-36 horas
	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>	30 min	24-36 horas
<b>Paso 3</b> Martes	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

**1B) Transformación genética.** Martes 2-3 horas (preparación y práctica)

**1C) Análisis de resultados.** Miércoles (+1 días)

**Ojo** Se puede continuar con la práctica de purificación de proteína transgénica con el kit de BioRad.

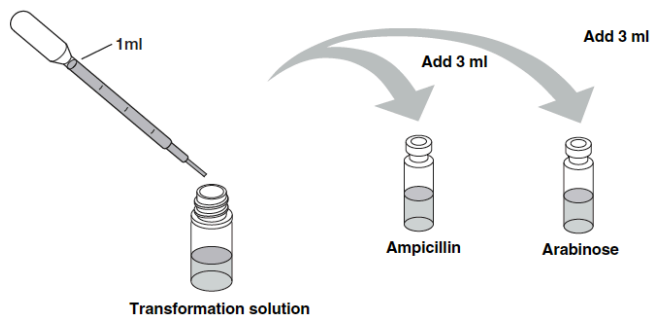
## **1A) Preparación de la práctica y siembra del cultivo bacteriano**

### **PASO 1 [viernes (-3 días): aprox. 90 min]**

#### **1. Preparar ampicilina y arabinosa**

La ampicilina está envasada en un pequeño vial y deshidratada. Con una pipeta estéril, añade **3 mL** de la solución de transformación al vial para rehidratar el antibiótico (Se utiliza la solución de transformación porque está estéril. En su lugar se puede utilizar agua destilada estéril).

La arabinosa también se encuentra deshidratada en un pequeño vial. Con una pipeta estéril, añade **3 mL** de la solución de transformación en el vial para la rehidratación del azúcar (dura unos 10 min). Agita el vial, mejor con la ayuda de un agitador *vórtex*. (Se utiliza la solución de transformación porque está estéril. En su lugar se puede utilizar agua destilada estéril).

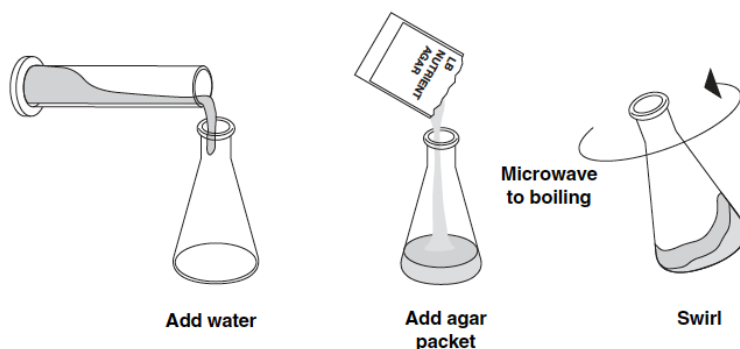


#### **2. Preparar el agar**

Las placas se deben preparar al menos 3 días antes de realizar la práctica. Se deben almacenar 2 días a temperatura ambiental y luego bajo refrigeración hasta el momento de su uso. Los dos días a temperatura ambiente permiten secar el agar para favorecer la captación de la solución de transformación.

Para preparar el agar, añadir **500 mL** de agua destilada a un matraz Erlenmeyer de **1 litro**. Añadir el contenido del paquete de LB agar. Agitar el matraz para disolver el agar, y calentar hasta ebullición en microondas o placa. Volver a agitar y calentar unas 3 veces más hasta que el agar se disuelva, teniendo cuidado de dejar enfriar el matraz antes de agitarlo, para evitar que el medio caliente salte a la mano.

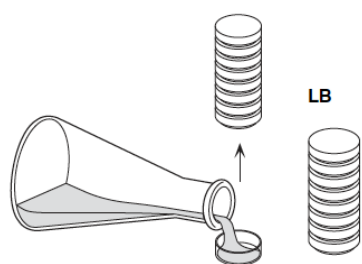
Cuando el agar se haya disuelto, dejarlo enfriar hasta que el matraz se pueda tocar sin quemarse (aprox. 50°C). Mientras se enfría el agar, etiqueta las placas. Ten cuidado de que el agar no se enfríe tanto que llegue a solidificar.



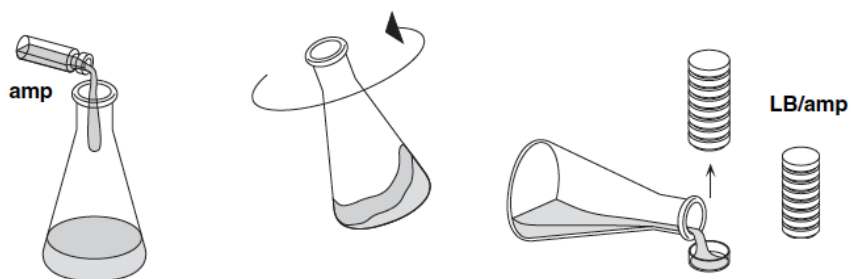
### 3. Rotular las placas y añadir el agar LB

Las placas de agar se deben rotular en la base, cerca del borde de la placa, con un rotulador de tinta indeleble. Si se utilizan las 40 placas del kit, rotular: 16 placas como **LB**, 16 como **LB/amp** y 8 como **LB/amp/ara**.

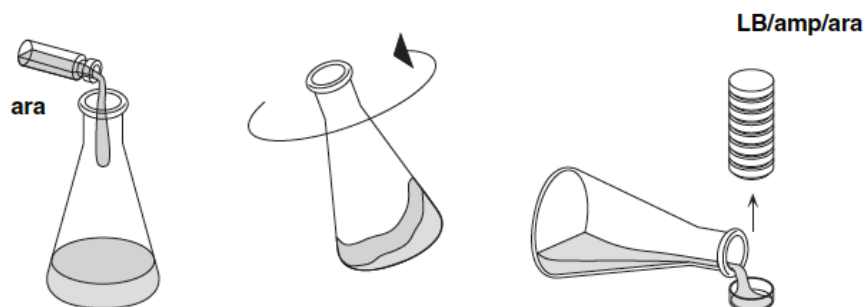
**Primero, añadir el agar LB en las placas marcadas como LB.** Hacer una torre de entre 4 y 8 placas y con una mano abrir la tapa de la placa inferior sujetando el resto de la torre, mientras que con la otra mano se añade el agar LB. Rellenar la placa entre un tercio y la mitad de su capacidad (aprox. 12 mL). Tapar esa placa, y continuar con la placa superior en la torre. Cuando se hayan rellenado todas las placas dejarlas enfriar en esa posición.



**A continuación, añadir la ampicilina ya hidratada al agar LB sobrante en el matraz.** Agitar el matraz brevemente para mezclarla. Rellenar las 16 placas rotuladas como **LB/amp** según la técnica descrita antes.



**Por último, añadir la arabinosa hidratada al agar LB con ampicilina sobrante en el matraz.** Agitar el matraz brevemente para mezclarla y rellenar las 8 placas marcadas como **LB/amp/ara** utilizando la técnica ya descrita.



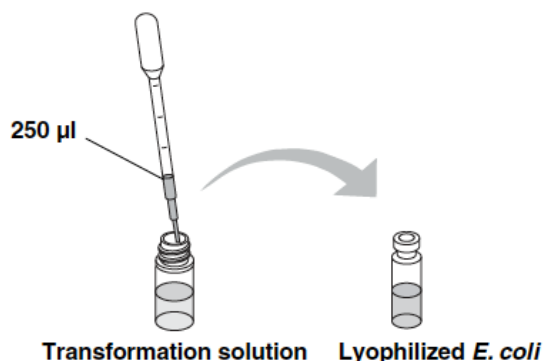
### 4. Almacenar las placas

Después de dejar las placas dos días a TA se pueden utilizar o se pueden almacenar en columnas de hasta 20 placas de altura introduciéndolas en bolsas. Guardar las placas en la nevera de forma invertida y dentro de las bolsas hasta su uso.

## **PASO 2 [lunes (-1 día): aprox. 30-60 min]**

### **1. Rehidratar las bacterias**

Con una pipeta estéril, rehidratar el liofilizado de *E. coli* HB101 añadiendo **250 µL** de la solución de transformación en el vial. Tapar el vial y dejar la suspensión 5 min a temperatura ambiente. Agitar el vial antes de añadirlo a las placas de LB. (Se utiliza la solución de transformación porque está estéril. En su lugar se puede utilizar agua destilada estéril). Guardar la bacteria rehidratada en la nevera hasta el momento de su uso (en 24 horas a ser posible, y no más de 3 días).



### **2. Sembrar las placas para obtener colonias bacterianas aisladas**

Cada grupo necesitará su propio cultivo de células a transformar. El *kit* contiene material suficiente para preparar 8 puestos de trabajo. Las placas de LB se deben sembrar para obtener colonias aisladas de la bacteria y se deben incubar a **37°C** durante **24-36 horas** antes de la transformación.

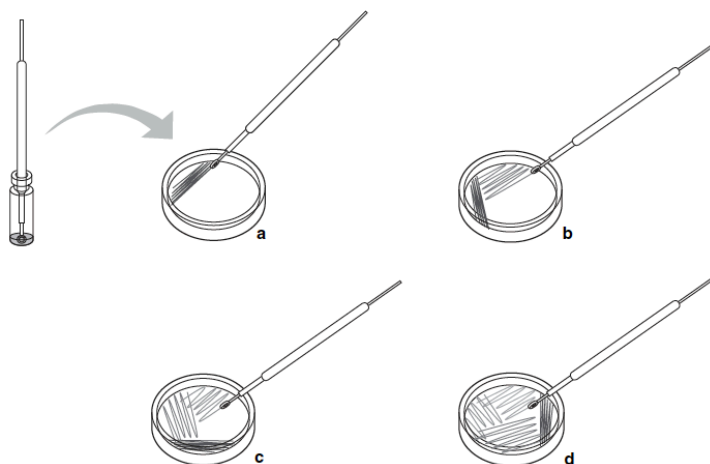
Partiendo de la suspensión de *E. coli* preparada en el punto 1 y de 8 placas **LB**, siembra una placa para cada uno de los grupos. El propósito del aislamiento es formar colonias aisladas a partir de una suspensión con una alta concentración bacteriana. En condiciones favorables, una célula se multiplica para dar millones de células genéticamente idénticas en 24 horas. Hay millones de bacterias en una única colonia de 1 mm.

**a)** Introducir un asa de siembra estéril en la suspensión bacteriana. Introducir el asa sin inclinar el vial. Sacar el asa y extender en la placa como aparece en la figura inferior. La extensión se realiza en cuatro cuadrantes. La primera extensión es para dispersar un poco las células. Deslizar el asa de izquierda a derecha una docena de veces en cada uno de los cuadrantes. En cada cuadrante consecutivo las células están cada vez más diluidas, aumentando la posibilidad de obtener colonias aisladas.

**b)** Es importante utilizar la mayor superficie posible de placa para realizar la extensión. Girar la placa 45 grados aprox. (de manera que se facilite el movimiento de la mano) y comenzar con el segundo cuadrante. Tocar el cuadrante anterior un par de veces y luego continuar deslizando el asa de izquierda a derecha 10 veces.

**c)** Girar la placa de nuevo y repetir la acción.

**d)** Girar la placa por última vez y sembrar el último cuadrante. Repetir los pasos (a-d) en el resto de las placas de LB. Usar el mismo asa de siembra para todas las placas. Al terminar con cada placa, taparla y sellarla con cinta o parafilm inmediatamente para evitar su contaminación.

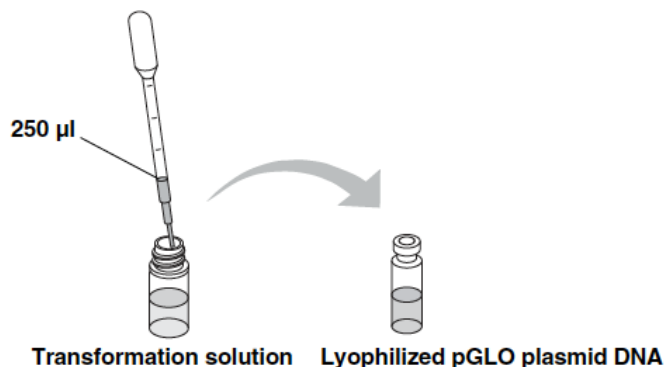


**e)** Dejar las placas toda la noche en posición invertida en la estufa a **37°C** o a temperatura ambiente durante 2-3 días si no se dispone de estufa. Usar para la transformación en las 24-36 horas siguientes. **No refrigerarlas antes de su uso.**

**f)** *E. coli* produce colonias de color crema, redondas y de bordes lisos. No utilizar las placas contaminadas con otras colonias.

### 3. Preparar el plásmido pGLO

Con una nueva pipeta estéril añadir **250 µL** de la solución de transformación en el vial que contiene el plásmido pGLO liofilizado y agitar con vortex. La cantidad de ADN es tan pequeña que puede parecer que el vial está vacío. Si es posible, guardar el ADN rehidratado en la nevera (Se utiliza la solución de transformación porque está estéril y no contienen nucleasas. En su lugar se puede utilizar agua destilada estéril).



## PASO 3 (martes, día de transformación genética: )

### 1. Preparar alícuotas (8 grupos de 2-4 alumnos)

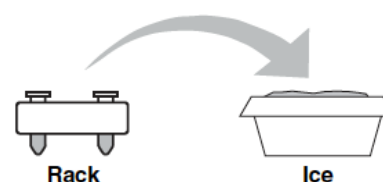
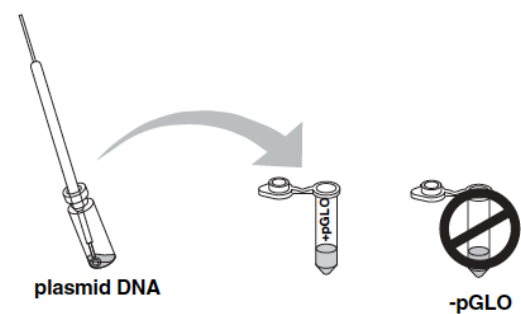
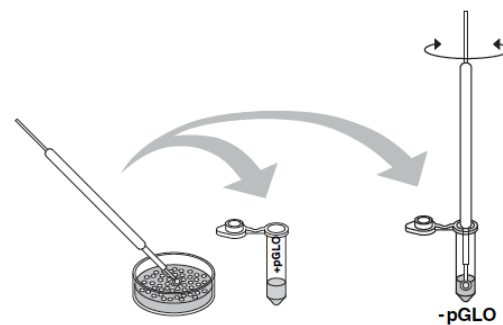
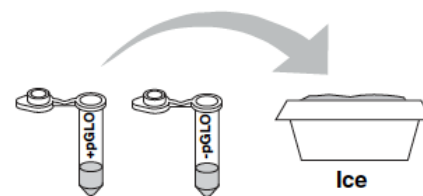
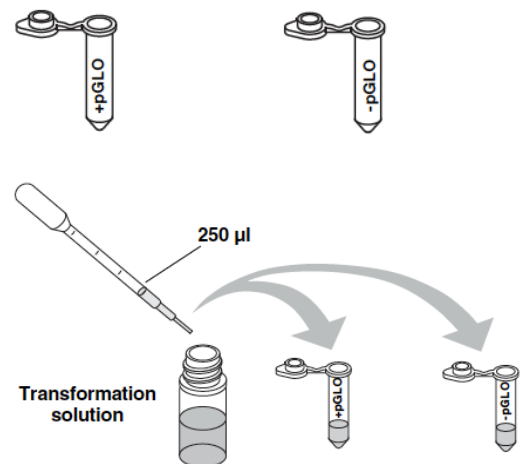
Para cada grupo, añadir **1 mL** de la solución de transformación ( $\text{CaCl}_2$ ) en un tubo eppendorf de 2 mL y **1 mL** del caldo LB en otro tubos *eppendorf* de 2 mL del *kit*. Si el caldo LB se alícuota 1 día antes de la práctica, guardar bajo refrigeración. Etiquetar los tubos.

### 2. Preparar los puestos de trabajo

Consultar en el protocolo el material necesario en cada puesto de trabajo.

## B) Transformación genética

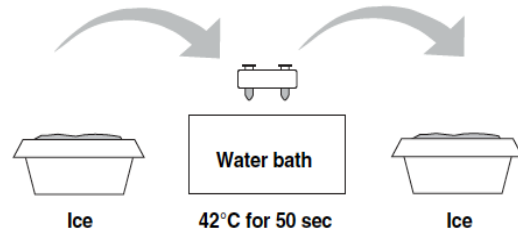
1. Etiquetar los tubos Eppendorf cerrados, uno como +pGLO y otro como -pGLO. Indicar nombre del manipulador. Poner los tubos en una gradilla con corcho
2. Abrir los tubos y con una pipeta estéril añadir **250 µL** de la solución de transformación (CaCl<sub>2</sub>).
3. Poner los tubos en hielo.
4. Con un asa de siembra estéril coger una colonia de la placa. Abrir el tubo +pGLO e introducir el asa en la solución de transformación. Girar el asa entre los dedos índice y pulgar hasta que la colonia se disperse totalmente en la solución de transformación (evitar que queden fragmentos flotantes). Dejar el tubo en la gradilla de hielo. Con otro asa estéril repetir la operación con el tubo -pGLO.
5. Situar la solución con el plásmido pGLO a la luz UV y anotar las observaciones. Introducir una nueva asa estéril en el vial que contiene el plásmido y coger solución plasmídica. Llevarlo al tubo +pGLO, cerrarlo y dejar el tubo en la gradilla en el hielo. Cerrar también el tubo -pGLO, pero sin añadir el plásmido.
6. Incubar los tubos en hielo **10 min.** **Ojo:** Asegurarse de que el fondo de los tubos está en contacto con el hielo.



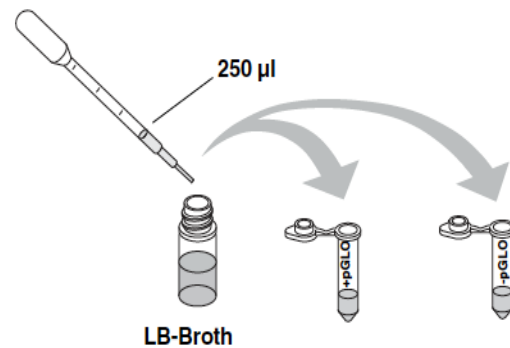
7. Mientras los tubos permanecen en el hielo, etiquetar las placas de agar en su base: una placa LB/amp y otra LB/amp/ara con +pGLO y una placa LB/amp y otra como LB con -pGLO.



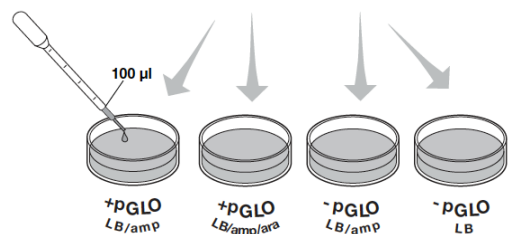
8. **Choque térmico.** Llevar los tubos en la gradilla al baño preparado a **42°C**, e introducirlos durante **50 seg** exactos. Asegurarse de colocar bien la gradilla para que el fondo de los tubos esté en contacto con el agua. Pasados los **50 seg**, llevar de nuevo los tubos al hielo. El cambio del hielo al baño y viceversa debe hacerse con rapidez. Dejar los tubos en hielo **2 min**.



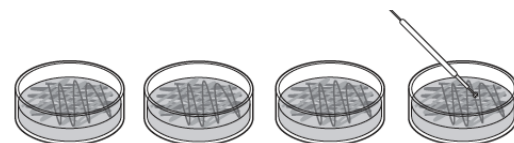
9. Sacar la gradilla del hielo y dejarla en la mesa. Abre uno de los tubos y con una nueva pipeta estéril, añade **250 µL** del caldo LB al tubo y cerrarlo. Repetir la operación con otra pipeta estéril en el otro tubo. Incubar los tubos 10 min a temperatura ambiente.



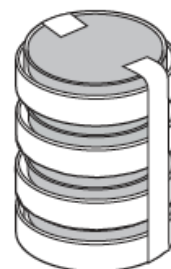
10. Agitar los tubos golpeándolos con el dedo. Con una pipeta estéril, pasar **100 uL** de cada tubo a las placas de cultivo correspondientes.



11. Con ayuda de una asa de siembra estéril, extender el líquido por toda la superficie de la placa, haciendo estrías en el agar en todas las direcciones.



12. Apilar las placas y empaquetarlas con cinta adhesiva todas juntas. Poner el nombre del manipulador e introducir las en posición invertida en la estufa a **37°C** hasta el día siguiente.



## **Práctica 2: Extracción y Purificación de una proteína transgénica (GFP) mediante cromatografía**

Las proteínas transgénicas obtenidas por ingeniería genética tienen muchas aplicaciones desde el tratamiento de enfermedades humanas en medicina (ejemplo insulina) hasta la obtención de enzimas que produzcan detergentes no contaminantes. En todos los casos, estas proteínas tienen que ser extraídas y purificadas para ser útiles.

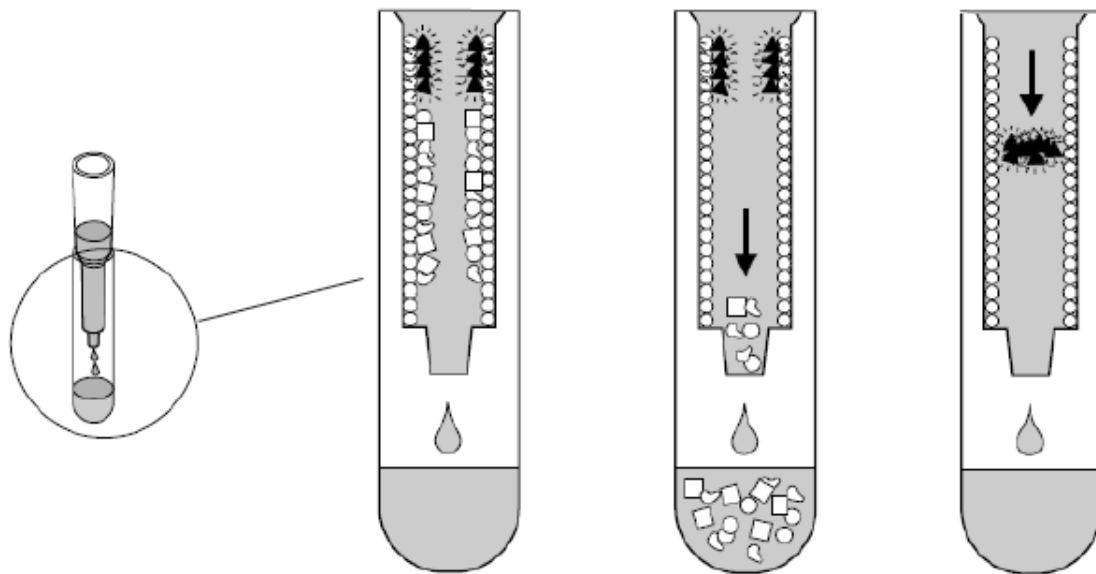
En una primera etapa (práctica anterior), mediante el proceso de transformación genética (kit pGLO), se produce una bacteria (*E. coli*) que sintetiza una proteína transgénica (GFP). En una segunda etapa, se utiliza la técnica de cromatografía para el proceso de extracción y purificación de la proteína transgénica.

La cromatografía es una técnica que se basa en el conocimiento de las propiedades físicas y químicas de las moléculas como son el peso molecular, la carga eléctrica o la solubilidad. La proteína GFP es muy hidrofóbica en comparación con el resto de proteínas bacterianas que son muy hidrofílicas. Esta característica diferencial permite el aislamiento y la purificación de la proteína GFP transgénica de entre las proteínas bacterianas basándonos en una matriz cromatográfica (columna) de naturaleza hidrofóbica que interacciona de forma específica con la GFP (figura 1).

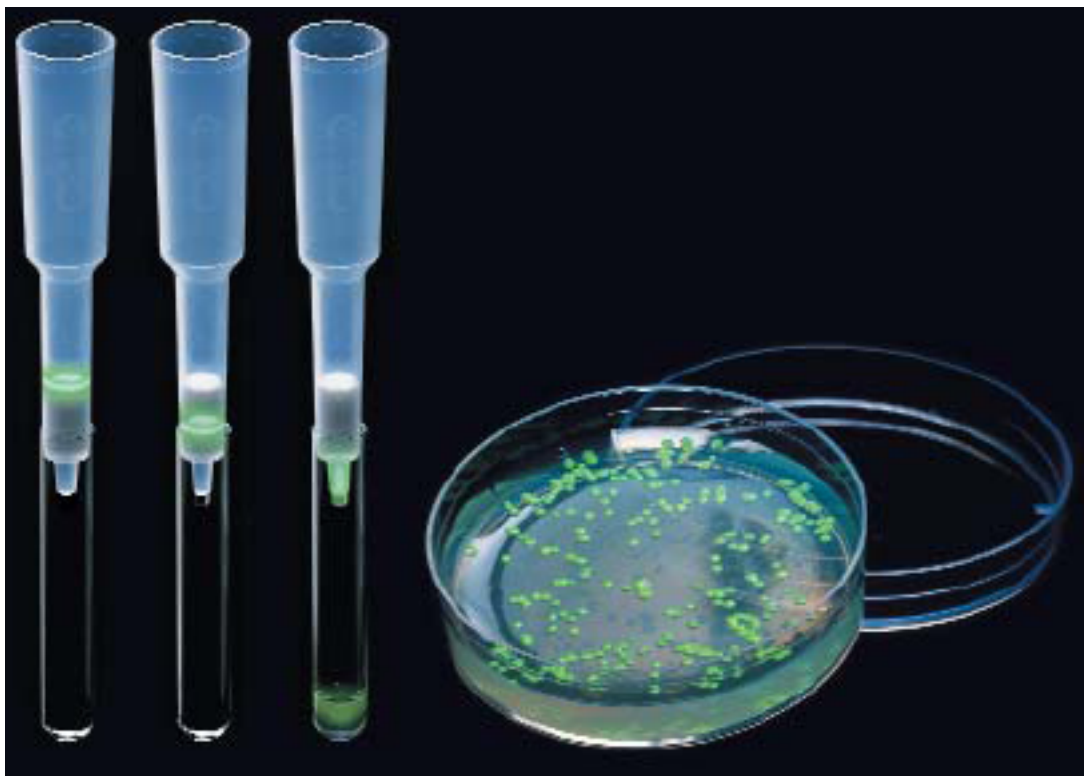
La cromatografía de interacción hidrofóbica se basa en un principio similar a la agregación salina o "salting-out" usado para la precipitación de proteínas. La adición de un tampón con alta concentración de sal a la columna de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) reduce la solvatación de las proteínas de la muestra, incrementando su hidrofobicidad y, por tanto, favoreciendo su unión a la matriz hidrofóbica de la columna. Usando tampones de fuerza iónica decreciente, las moléculas unidas a la columna se eluyen (se separan de la matriz) de forma secuencial (figura1). La GFP, que es extremadamente hidrofóbica comparada con las proteínas del lisado bacteriano, permanece unida a la matriz de la columna hasta que se emplea el tampón de menor fuerza iónica. Este método, por tanto, separa y purifica de manera efectiva la GFP transgénica de las proteínas bacterianas.

Esta práctica parte de las bacterias transgénicas productoras de la GFP que fueron obtenidas en la práctica anterior con el kit de transformación pGLO (figura 2). Las bacterias deben ser crecidas en un medio líquido y posteriormente lisadas (rotas) para liberar su contenido celular que incluye las proteínas nativas bacterianas y la proteína foránea de interés, en este caso la GFP. Esta proteína transgénica se separará de los contaminantes bacterianos mediante la cromatografía en columna (figura 1) utilizando el GFP purificación kit de BioRad. Las características únicas de fluorescencia de la GFP permiten un seguimiento del proceso de extracción y purificación con una simple lámpara UV.

**Figura 1:** Columna de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) para separación de moléculas de forma secuencial (BioRad).



**Figura 2:** Bacterias transgénicas productoras de la GFP utilizadas para la separación y purificación de la proteína GFP por cromatografía de columna (BioRad).



### **Equipamiento requerido**

- Cámara de flujo laminar o mecheros de gas.
- Estufa a 32°C (para óptima expresión de GFP).
- Congelador.
- Microondas.
- Centrífuga a 3.000 rpm.
- Incubador shaker (opcional, aumenta la velocidad de crecimiento bacteriano).
- Vortex (opcional).
- Autoclave (opcional).
- Micropipetas y puntas (opcional).

### **Material necesario**

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

### **Reactivos necesarios**

- Bacteria transformada con **pGLO (LB/amp/ara)**
- Agua destilada
- Lejía al 10%
- Alcohol 70% (opcional)

**Kit de purificación de GFP por cromatografía de BioRad.** Incluye:

### **Reactivos**

- Ampicilina, liofilizada.
- L(+) arabinosa, liofilizada.
- Lisozima, liofilizada.
- Medio nutritivo LB en 1 tableta, estéril.
- Tampón TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0)
- Tampón de equilibrado de la columna (2M NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>/TE, pH 8,0)
- Tampón de unión (4M NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>/TE, pH 8,0)
- Tampón de lavado (1,3M NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>/TE, pH 8,0)

### **Material**

- Columnas de cromatografía (HIC).
- Tapones de las columnas.
- Pipetas Pasteur, estériles.
- Asas de siembra, estériles.
- Tubos de microcentrífuga (2 mL), estériles.
- Tubos de cultivo de 15 mL, estériles.
- Tubos colectores de 5 mL.

## Temporalización

La práctica se divide en dos etapas realizada en dos días consecutivos. Como paso previo se debe revisar el protocolo y las técnicas metodologías empleadas (50 min) y el equipamiento y el material necesario (10 min). Durante la realización de la práctica hay pasos donde se puede parar el proceso y continuar otro día o momento adecuado. Aparece reflejado como **STOP**. El procedimiento se debe realizar en condiciones estériles en una campana de flujo o bajo la influencia de una llama de mechero de gas.

### A. Cultivo y crecimiento bacteriano (Día 1 = 90 min)

Preparación de la práctica antes de cromatografía (Ver manual de BioRad)

	<b>Objetivo</b> (evitar contaminación)	<b>Tiempo</b>	<b>Antelación</b>
<b>Paso 1</b>	Rehidratar ampicilina (3 mL TE)	5 min	1 día
	Rehidratar arabinosa (3 mL TE)	10 min	1 día
<b>Paso 2</b>	Preparar medio LB/amp/ara líquido (50 mL)	30 min	1 día
	Alicuotar medio LB/amp/ara en tubos de 15 mL (2 mL x 2 x puesto)	10 min	1 día
<b>Paso 3</b>	Inocular medio LB/amp/ara	15 min	1 día
	Preparar shaker o método alternativo	10 min	1 día
	Iniciar cultivo bacteriano	O/N	1 día
<b>Paso 4</b>	Preparar puesto de trabajo	10 min	Purificación
	Preparar un recipiente con lejía al 10%	5 min	Purificación
	Recipiente para lavar pipetas	5 min	Purificación
	Rehidratar lisozima (1 mL TE), nevera	5 min	Purificación

### B. Purificación de GFP por cromatografía (Día 2 = 120 min)

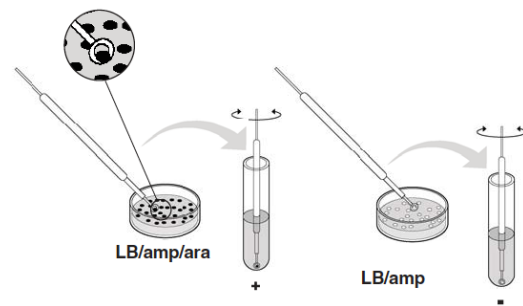
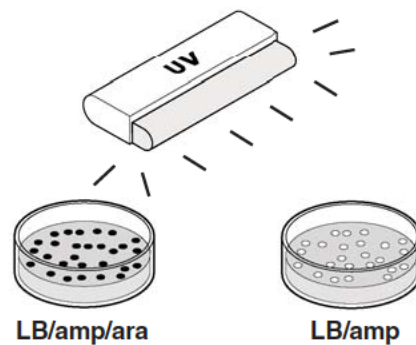
Se puede diferenciar los siguientes pasos:

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

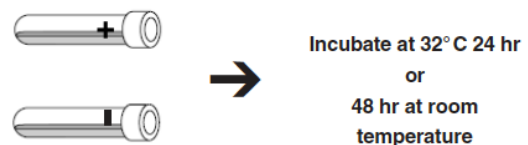
## Procedimiento

### A. Inoculación y crecimiento de cultivo bacteriano (30 min)

1. Retirar del incubador a **37°C** las placas de cultivo en LB agar (LB/amp y LB/amp/ara). Los cultivos vienen de la práctica de transformación con pGLO.
2. Identificar colonias bien aisladas de color blanco de la placa LB/amp y, con ayuda de una lámpara UV, de color verde de la placa LB/amp/ara.
3. Prepara 2 tubos de cultivo de **15 mL** con **2 mL** medio LB/amp/ara y marca un tubo con (+) para una colonia verde y otro con (-) para una colonia blanca.
4. Pesca 1 colonia verde con una asa de siembra estéril y inocula el medio (+). Gira el asa entre los dedos índice y pulgar para dispersar bien la colonia en el medio. Repetir la misma operación para la colonia blanca a inocular en el tubo (-). Importante, pescar una sola colonia aislada.



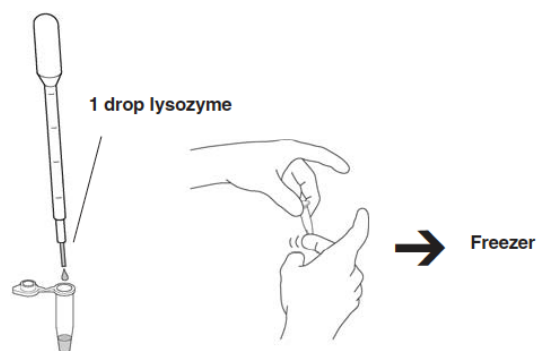
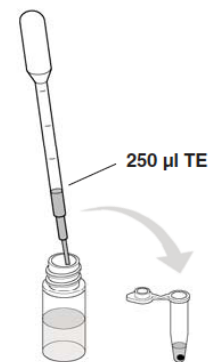
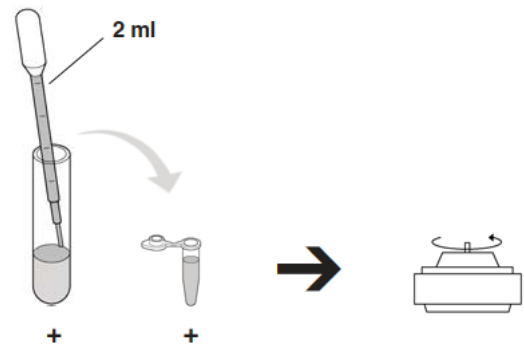
5. Tapa los tubos y colocalos en un shaker (incubador-agitador) a **32°C** de forma **horizontal** y en agitación a 200 rpm durante **24 horas**. Si no se dispone de un shaker se debe colocar en un incubador a **32°C** pero el crecimiento va ser más lento. Alternativamente, después de taponar el tubo, se puede agitar vigorosamente con la mano e incubar a temperatura ambiente durante 2 días agitando periódicamente cuando sea posible (4-8 horas).



## B. Purificación de la proteína GFP

### Concentración Bacteriana (60 min)

1. Retira los cultivos líquidos del incubador y obsérvalos con la luz UV. Anota cualquier diferencia de color observable entre los dos cultivos.
2. Etiqueta un tubo Eppendorf con (+).
3. Con una pipeta, transfiera **2 mL** de cultivo líquido (+) al tubo (+).  
**OJO:** La pipeta se puede lavar y utilizar en los siguientes pasos.
4. Centrifuga los tubos Eppendorf a máxima velocidad (**1.500-3000 rpm**) durante **5 min**.
5. Eliminar el sobrenadante, sobre una recipiente con una solución de lejía, sin perder el pellet de células. Observar el pellet con la luz UV.
6. Añadir **250 µL** de tampón TE en el tubo con ayuda de una pipeta. Resuspender el pellet vigorosamente pipeteando arriba y abajo varias veces. Si esta difícil de resuspender, se puede ayudar agarrando la cabeza del tubo con los dedos índice y pulgar de una mano y golpeando la base del tubo con el índice de la otra mano.
7. Añadir **1 gota de lisozima (100 µL)** a las bacterias resuspendidas con ayuda de una pipeta para iniciar la digestión enzimática de la pared celular de la bacteria. Mezclar el contenido del tubo con delicadeza invirtiendo el tubo varias veces. Observar el tubo con luz UV.
8. Colocar el tubo Eppendorf en el congelador durante **30 min** o hasta el próximo día para continuar la práctica. La congelación causa la ruptura completa de la bacteria (pared y membrana)



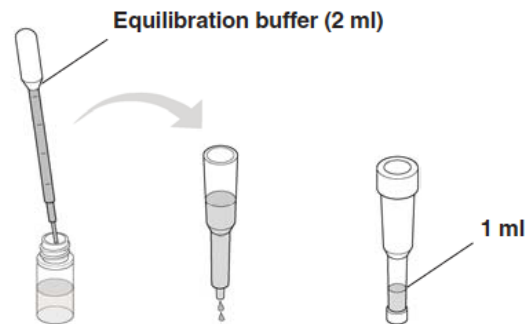
**OJO:** La muestra se puede dejar congelada para continuar en otro momento.

**Lisis bacteriana (30 min)**

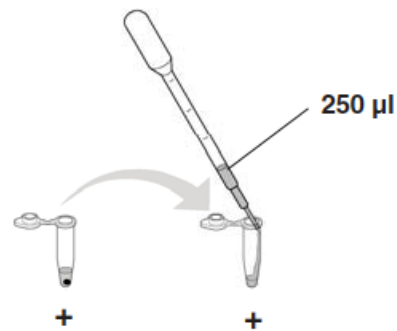
1. Retirar los tubos Eppendorf del congelador y descongelar la muestra por frotación y calentamiento con la mano.
2. Coloca los tubos en una centrífuga y precipita los residuos de la bacteria por centrifugación a máxima velocidad (3000 rpm) durante **10 min**.
3. Durante la centrifugación anterior, prepara las columnas de cromatografía. Retira la tapa de la cabeza y el tapón de la base de la columna HIC suministrada con el relleno. Permite el drenaje del tampón de la columna (aprox. 5 min).



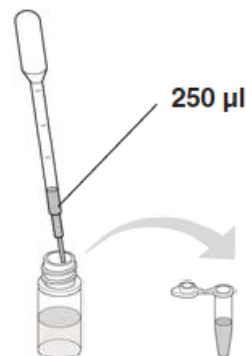
4. Prepara la columna añadiendo por el cuello **2 mL** de tampón de equilibrado. Añadir 2 veces **1 mL** con una pipeta. Drena el tampón hasta la marca de **1 mL** en la columna. Tapa la cabeza y base de la columna y puede ser almacenada a temperatura ambiente hasta el momento de continuar.



5. Después de la centrifugación retira el tubo de la centrifuga y examina el tubo con una luz UV. Usando una pipeta, transfiere **250 µL** del sobrenadante (+) a un tubo nuevo etiquetado con (+).

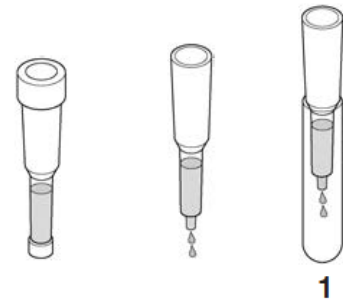


6. Usando una pipeta, añade **250 µL** de tampón de unión al sobrenadante en el tubo (+). **OJO:** El tubo se puede guardar en la nevera hasta otro día para continuar con la práctica.

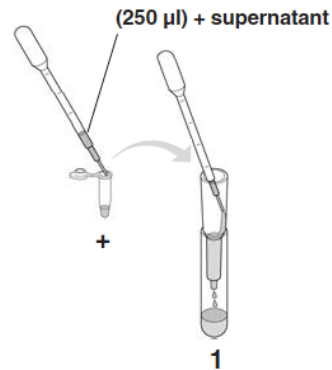


**Cromatografía de proteínas (30 min)**

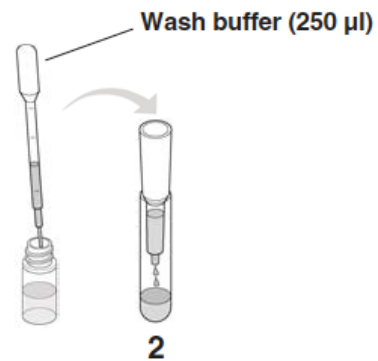
1. Etiqueta 3 tubos colectores (1-3) y colócalos en una gradilla.
2. Recupera las columnas HIC, retira las tapas de la cabeza y la base y colócala sobre el tubo colector nº1. Permite el drenaje de la columna hasta que el tampón alcanza la matriz HIC.



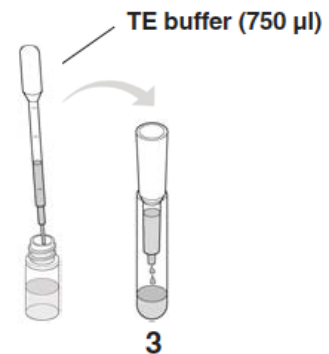
3. Usando una pipeta, cargar **250 µL** del sobrenadante en la columna. Para ello, apoya la punta de pipeta contra la pared interior por encima de superficie de la matriz y descarga el sobrenadante sobre la pared interior. Mira la columna usando una luz UV y anota las observación. Después de terminado el drenaje, pasa la columna al tubo nº2.



4. Con una nueva pipeta, añadir **250 µL** de tampón de lavado y permite que todo el volumen pase a través de la columna. Observa la columna usando una luz UV y anota la observación. Después de que haya terminado el drenaje, pasa la columna al tubo nº3.



5. Con una nueva pipeta, añadir **750 µL** de tampón TE y permite que todo el volumen pase a través de la columna. Mira la columna con una luz UV y anota la observación.



6. Examina los 3 tubos colectores con luz UV y anota las diferencias de color entre los tubos.
7. Los tubos se pueden tapar con Parafilm y guardar en nevera para proceder a una separación y visualización de la proteína GFP mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (otro kit diferente).
8. **Discusión** (tiempo indeterminado)

