

Práctica N°3

Preparación de células competentes y transformación genética

La transformación es un proceso por el cual las células captan ADN libre presente en el medio (generalmente ADN plasmídico) y expresan una porción de este material genético (sintetizan proteínas tomando como molde el ADN que captan; por lo tanto, son proteínas “no propias” de la célula que captó ese ADN). Esta nueva información genética suele proporcionar al organismo una nueva característica que es identificable después de la transformación (resistencia a antibióticos). Transformación genética significa literalmente 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. Es un fenómeno que ocurre de forma natural en muchas bacterias, pero la eficacia del proceso varía enormemente de unas especies a otras. Para que la transformación tenga lugar, la bacteria tiene que encontrarse en el llamado “estado de competencia”, que ocurre en determinadas condiciones fisiológicas. En este estado, la bacteria presenta alteraciones en su pared y membrana celulares, que permiten la entrada de ácidos nucleicos en la célula.

En el laboratorio se han diseñado metodologías diversas que inducen el estado de competencia en bacterias que no lo presentan de forma natural. Éstas se basan en diversos tratamientos químicos o físicos que producen microporos en la célula, lo que permite la introducción del ADN exógeno (transformación) de un modo bastante eficiente. Uno de los métodos físicos es la electroporación, la cual consiste en inducir la competencia mediante la aplicación de un pulso eléctrico muy breve e intenso. Dicha competencia se puede inducir además con tratamientos químicos utilizando compuestos como el cloruro de calcio. Hay que tener en cuenta sin embargo que tras estos tratamientos no todas las células del cultivo se hacen competentes.

Tres factores son cruciales para consistentemente obtener altas frecuencias de transformación de células competentes:

- 1. La pureza de los reactivos usados en los buffers de transformación.** Es muy importante preparar las células competentes usando reactivos de la más alta calidad y pureza. Algunos reactivos, incluyendo componentes de los medios de cultivo bacterianos, pierden su actividad con el almacenamiento. Siempre que sea posible usar reactivos y medios de cultivo frescos.
- 2. El estadio de crecimiento de las células.** Las más altas frecuencias de transformación son obtenidas con cultivos que han sido crecidos directamente de un stock almacenado en medio de congelación a -70°C . cultivos a los cuales se les han hecho repiques continuamente en el laboratorio, o almacenados a 4°C o a temperatura ambiente, no deben ser usados.
- 3. La limpieza de la cristalería y material de plástico.** La presencia de trazas de detergentes u otros químicos disminuyen grandemente la eficiencia de la transformación bacteriana.

La transformación en el laboratorio es una técnica de rutina de enorme utilidad, que nos permite introducir prácticamente cualquier plásmido en casi cualquier tipo de bacteria. Se usa en muchas áreas de la biotecnología. En agricultura, se pueden introducir en las plantas los genes que codifican características como la resistencia al frío, a los pesticidas o a la sequía. En biodegradación, las bacterias se pueden transformar con genes que las hagan capaces de digerir los vertidos accidentales

de petróleo. En medicina, las enfermedades originadas por genes defectuosos se están empezando a tratar con terapia génica.

Materiales

- Células de *E.coli* de la cepa de interés (DH-5 α)
- Tubos eppendorf
- Tubos Falcon 50ml
- Erlenmeyer de 250 ml estéril
- Cajas de Petri
- Medio LB-líquido
- Micropipetas de 10-20-200-1000 μ l
- Puntas de micropipeta
- Hielo
- Nitrógeno líquido
- ADN plasmídico

Reactivos

- **Solución MgCl₂-CaCl₂:** CaCl₂ 20 mM, MgCl₂ 80 mM
 - **Solución de congelación:** CaCl₂ 0.1M con glicerol al 15%
- Ambas soluciones se esterilizan por filtración y se almacenan a 4°C

Equipos: Congelador de -70°C o -20°C, Cabina de flujo laminar, Centrífuga, Incubadora con agitación, Espectrofotómetro.

Procedimiento para preparación de células competentes de *E. Coli* con el protocolo de cloruro de calcio (CaCl₂):

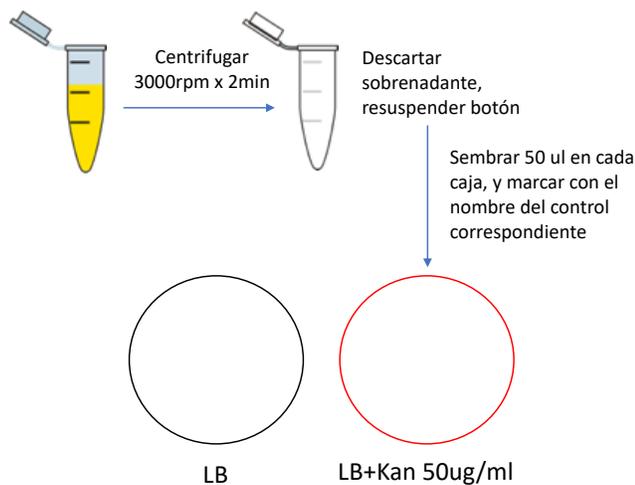
1. Tomar una colonia de una caja de petri que ha sido incubada por 16-20 h a 37°C (estas células no pueden haber sido transformadas, tienen que ser células que no alberguen plásmidos). Transferir la colonia a 100 ml de medio de cultivo LB en un Erlenmeyer de 1 Lt. Incubar el cultivo por tres horas a 37°C, con agitación constante (250 rpm), monitoreando el crecimiento del cultivo.
2. Poner las células en hielo por 10 min (revolver ocasionalmente, conservar la cadena de frío a partir de este momento)
3. Centrifugar a 2700 g durante 10 min a 4°C.
4. Descartar el sobrenadante y resuspender el botón suavemente en 30 ml de la **solución MgCl₂-CaCl₂** (CaCl₂ 20 mM, MgCl₂ 80 mM) fría. Las células son susceptibles a disrupción mecánica, tratarlas con cuidado.
5. Centrifugar a 2700 g durante 10 min a 4°C.
6. Descartar el sobrenadante, resuspender suavemente en 5 ml de solución de congelación fría (CaCl₂ 0.1M/glicerol 15%).
7. Alicuotar en tubos eppendorf de 1.5 ml 200ul de células. Agregarlas a nitrógeno líquido e inmediatamente congelar a -80°C.

Procedimiento de transformación de células competentes Ca⁺⁺

1. Descongelar las células en hielo.
 - a. **Células transformadas:** tomar un tubo eppendorf, agregar 1ul del plásmido circular o de toda la reacción de ligación y posteriormente 100ul de las células competentes (no se requiere más de 50 ng de ADN para la transformación). Mezclar el contenido del tubo.
 - b. **Control de transformación:** tomar otro tubo, agregar 100ul de células competentes

- c. **Control de viabilidad:** en otro tubo agregar 20ul de células competentes (**Nota:** Estas células deben permanecer en el hielo durante todo el procedimiento, sólo se volverán a usar hasta el final, en el momento en el que se vayan a sembrar en los medios de cultivo)
2. Incubar durante 30min en hielo.
 3. Someter las células a un choque térmico de 90 segundos a 42°C en un baño maría (el choque térmico es un paso crucial).
 4. Enfriar en hielo durante 2 minutos.
 5. Añadir 800µl de medio de cultivo LB sin antibiótico a los tubos (control de transformación y células transformadas). Incubar 30min a 37°C en agitación (para permitirle a la célula recuperarse y expresar el marcador de resistencia codificado por el plásmido).
 6. Tomar dos cajas de LB+kanamicina 50 ug/ml, en una agregar 100ul de las células (**marcar como 100ul**) y para la siguiente caja, centrifugar los 900 ul restantes a 3000 rpm por 2 min (**marcar como 900ul**), descartar aproximadamente 850ul del sobrenadante y usar los 50ul que quedan para sembrar en la caja.
 7. Dejar las cajas a T° ambiente hasta que el líquido se absorba.
 8. Invertir las cajas e incubar toda la noche a 37°C. Las colonias transformadas deben aparecer después de 12-16 h.

Procedimiento para los controles de viabilidad y electroporación (hacer el procedimiento completo para cada control)



Nota: La caja negra siempre será el LB sin el antibiótico, la caja roja, será el LB con el antibiótico de selección, en este caso kanamicina a 50 ug/ml

Procedimiento para las células transformadas con pCR35, que les confiere resistencia a kanamicina

