

Módulo 2

Clonación y Selección de moléculas recombinantes

El fragmento de ADN amplificado por PCR en el módulo anterior se introdujo en un vector pBluescript KS II+T utilizando una ligasa. En la primera clase de este módulo uds. transformarán células competentes de *E. coli* con el producto de esta ligación. El segundo día seleccionarán clones transformantes, en el tercer día extraerán el plásmido de estos clones. El cuarto día verificarán la presencia del inserto por digestión con enzimas de restricción apropiadas. El quinto día se analizarán los productos de las digestiones.

Día 1: Transformación

1. Fundamentos teóricos de la ligación, transformación, vectores y células huésped.
2. Descongelar las células competentes e incubarlas en hielo aproximadamente 10 minutos.
3. Agregar el ADN en un volumen igual o menor a 1/5 del volumen de las células competentes. Realizaremos transformaciones con: a) 1 a 5 ng de un plásmido puro (vector usado); b) 10 a 50 ng de la mezcla de ligación y c) control negativo (sin ADN).
4. Dejar en hielo 15 minutos.
5. Incubar a 42°C por 90 segundos o a 37°C por 120 segundos.
6. Agregar 4 volúmenes de LB e incubar a 37°C con agitación suave por 30 minutos.
7. Plaquear 100 µl de estas incubaciones en placas de selección (LB agar ampicilina, X- gal, IPTG) con rastrillo. Plaquear así mismo las células huésped de partida en LB agar (medio no selectivo).
8. Incubar a 37°C durante la noche

Bibliografía de apoyo: Lakin, N.D. (1993) Determination of DNA sequences that bind transcriptional factors by DNA footprinting. En *Transcriptional Factors: A Practical Approach* D.J.Latchman. ed. Oxford University Press

Día 2: Selección de Transformantes.

9. Determinar el número de colonias blancas y azules. Calcular la eficiencia de transformación.
10. Seleccionar tres colonias blancas y sembrar tubos de 3 ml conteniendo LB y 50 µg/ml de ampicilina.
11. Incubar a 37°C durante la noche con agitación.

Día 3: Minipreparación de ADN plasmídico

12. Centrifugar 1.5 ml del cultivo crecido a 37°C durante toda la noche durante 30 seg a 12000 rpm. Descartar el sobrenadante, agregar el resto del cultivo en el mismo tubo y centrifugar nuevamente. Descartar el sobrenadante.
13. Resuspender el pellet bacteriano en 200 µl de la solución I.
14. Agregar 1 µl ARNasa 10 mg/ ml.
15. Agregar 200µl de la solución II y mezclar suavemente. Dejar 5 minutos a temperatura ambiente.
16. Agregar 200µl de la solución III. Mezclar y centrifugar 10 minutos a 12000 rpm.
17. Recuperar el sobrenadante.
18. Agregar 0.6 volúmenes de isopropanol. Agitar bien.
19. Dejar 15 minutos a temperatura ambiente.
20. Centrifugar 15 minutos a 12000 rpm.
21. Lavar el precipitado con etanol 70°
22. Centrifugar 5 minutos a 12000 rpm
23. Descartar el sobrenadante y dejar secar
24. Resuspender en 30 µl de agua destilada estéril.

**Día 4: Visualización del ADN plasmídico
Digestión con enzimas de restricción**

25. Medir la absorbancia a 260 y 280 nm y calcular la concentración de ADN plasmídico obtenido.
26. Preparar un minigel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X.
27. Sembrar una cantidad adecuada de los plásmidos, junto con un marcador de peso molecular.
28. Realizar la migración.
29. Detener la corrida y visualizar bajo transiluminador de luz UV.
30. Teniendo en cuenta el mapa de restricción del vector KSII Bluescript y el sitio de inserción del fragmento amplificado elija las enzimas de restricción que permitan escindir el inserto. También se digerirá con un enzima de restricción que da un corte dentro del inserto.
31. En todos los casos, pipetear en un tubo de microcentrífuga:

ADN obtenido en las miniprep.	5 µl
Buffer de restricción 10x	2,5 µl
Agua	12,5 µl

Enzima	0,5 µl
c.s.p.	25 µl

32. Incubar a 37°C durante dos horas.

33. Guardar a –20°C.

Día 4: Gel de electroforesis para verificar la presencia del inserto

34. Se utilizarán minigeles de poliacrilamida no desnaturalizante al 12 % preparados por el grupo anterior.

35. Se siembran las reacciones de digestión, los controles (plásmidos sin digerir) y un marcador de peso molecular adecuado. Se agrega buffer de carga.

36. Se deja migrar en buffer TBE 1X, a aproximadamente 100 V, hasta que el azul de bromofenol esté saliendo del gel. La migración demora en el entorno de 1 hora – 1 hora y media en la que se prepararán los minigeles para el grupo siguiente.

37. Se detiene la corrida y se tiñe con nitrato de plata (ver anexo 1).

38. Se determina el tamaño de los fragmentos obtenidos en las digestiones. Se mide la distancia migrada por las bandas del marcador de peso molecular y los productos de restricción.

Anexo 1: REACTIVOS Y SOLUCIONES

Ligación

T4 ADN ligasa

Vector T

Plásmido pKSII+ Bluescript digerido con *EcoRV* e incubado con *Taq* polimerasa en presencia de dTTP.

La reacción de ligación descrita en los manuales aconseja incubar a 16°C de 1 a 4 horas, en presencia de enzima, cantidades equimolares de plásmido linealizado y del ADN a clonar cuando los extremos de ambas moléculas son cohesivos y poner de 5 a diez veces más de ADN cuando los extremos son romos.

Transformación

Preparación de células competentes XL1 Blue

1. Crecer un precultivo toda la noche a a partir de una colonia aislada en LB
2. Inocular con el precultivo 250 ml de medio y dejar crecer hasta una DO_{550nm} de 0,6.
3. Dejar en hielo durante 10 minutos.
4. Centrifugar a 2500 g durante 10 min a 4°C.
5. Resuspender las células suavemente en 80 ml de solución TB fría.
6. Dejar en hielo 10 min.
7. Centrifugar a 2500 g durante 10 minutos a 4 °C
8. Resuspender las células suavemente en 20 ml de solución TB fría.
9. Agregar DMSO para obtener una concentración final de 7%
10. Dejar en hielo 10 min.
11. Alicuotar en 0.05 –2 ml y congelar preferentemente en nitrógeno líquido (de lo contrario congelar en un freezer a –80°C).

LB (Luria-Bertani)

Triptona	10g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10g
Agua c.s.p.	1L

Ajustar pH a 7,0 con NaOH 5N

Agar

Para preparar las placas de LB agregar agar a una concentración final de 15g/L

Solución TB

PIPES	10 mM
Piperazin-N,N'-bis 2-etansulfónico	
MnCl ₂	55mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250mM

Ajustar pH a 6,7 con KOH 5N antes de adicionar el MnCl₂

X-gal (2% en dimetilformamida)

5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

IPTG (100mM)

Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido

Ampicilina (50mg/ml)

Preparación de ADN plasmídico**-Solución I**

Tris.HCl pH 8,0	50mM
EDTA	10 mM

-Solución II

NaOH	0,2 M
SDS	1%

-Solución III

Acetato de potasio pH 4,8	3M
---------------------------	----

-Isopropanol

-Etanol 70°

-Agua destilada estéril

Digestiones de restricción**-Enzimas de restricción**

XbaI, PstI, EcoRI, HindIII, XhoI, KpnI

-Tampones correspondientes

-Agua destilada estéril

Electroforesis- gel de poliacrilamida

Preparación de los minigeles de acrilamida

1. Preparar 15 ml de acrilamida al 12 % en TBE 1X. **Atención: La acrilamida sin polimerizar es neurotóxica por lo que se debe trabajar con guantes!**
2. Agregar 150 µl de APS al 10 % y 15 µl de TEMED. Mezclar bien.
3. Verter la preparación en el molde correspondiente.
4. Esperar 30 minutos a que polimerice y desmoldar.

Soluciones

Acrilamida al 30%:

Acrilamida	29 g
N',N'- metilen-bisacrilamida	1 g
Agua csp.	100 ml.

TBE 5X:

54 g de Tris base
27,5 g de ácido bórico
20 ml de EDTA 0,5 M, pH 8,0

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina aprox. 99%.

APS 10%: Persulfato de amonio al 10%

Tinción con nitrato de plata

1. Sumergir el gel en un recipiente con 150 ml de solución fijadora durante 5 minutos.
2. Pasar el gel a un recipiente con 150 ml de solución de nitrato de plata 2g/L durante 5 minutos.
3. Enjuagar el gel con 150 ml de agua destilada.
4. Sumergir el gel en recipiente con 150 ml de solución reveladora hasta que las bandas de ADN sean fácilmente visualizables.

Soluciones

Solución fijadora: 15 ml de EtOH, 750 µl de ácido acético glacial en 150 ml de agua.

Solución de plata: 2 g de nitrato de plata en 1L de agua destilada.

Solución reveladora: 30 g de hidróxido de sodio en 1L de agua destilada. En el momento se prepara la solución uso agregando 750 µl de formaldehído 37 % v/v a 150 ml de solución reveladora.