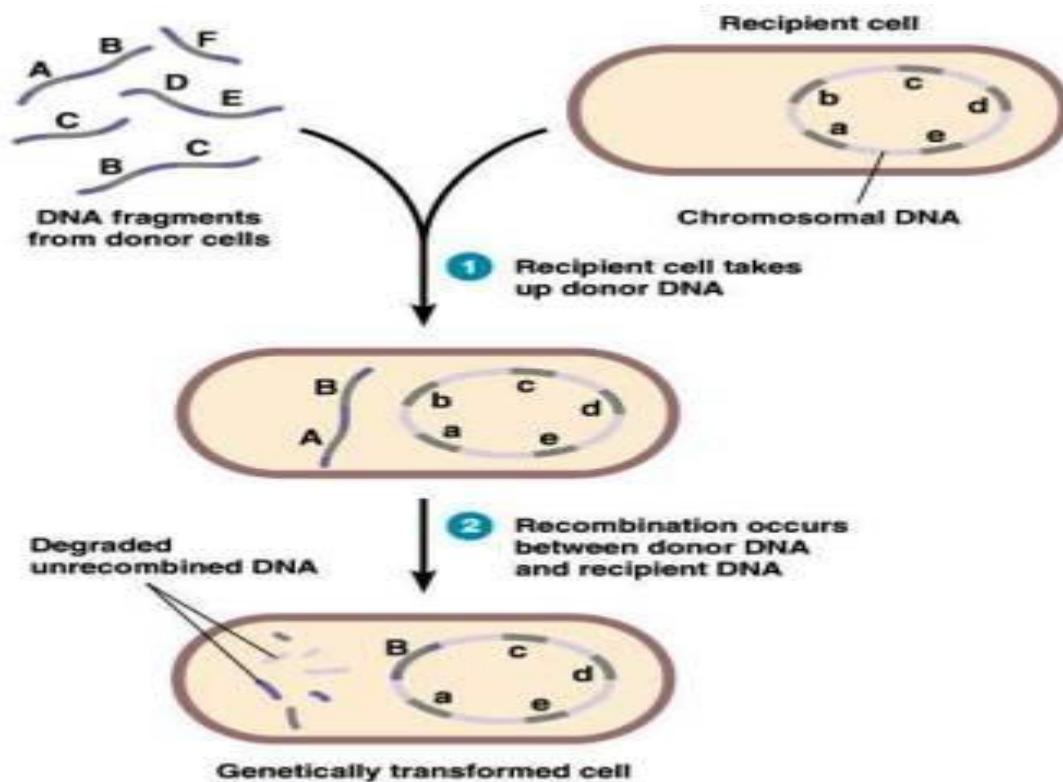


Genética de bacterias

Transferencia horizontal de genes

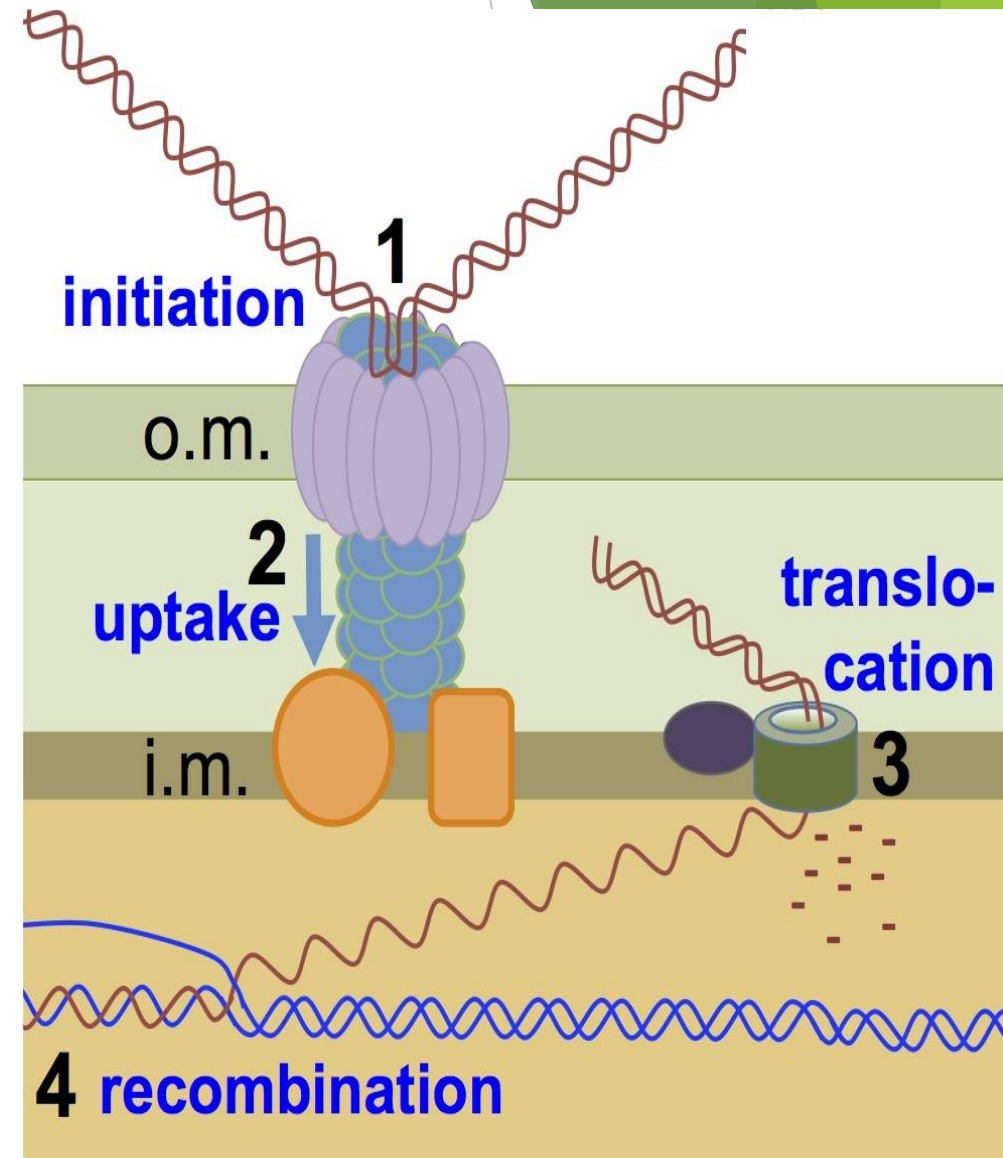
Electrotransformación de plásmidos con gen codificante de proteína verde fluorescente en *E. coli*

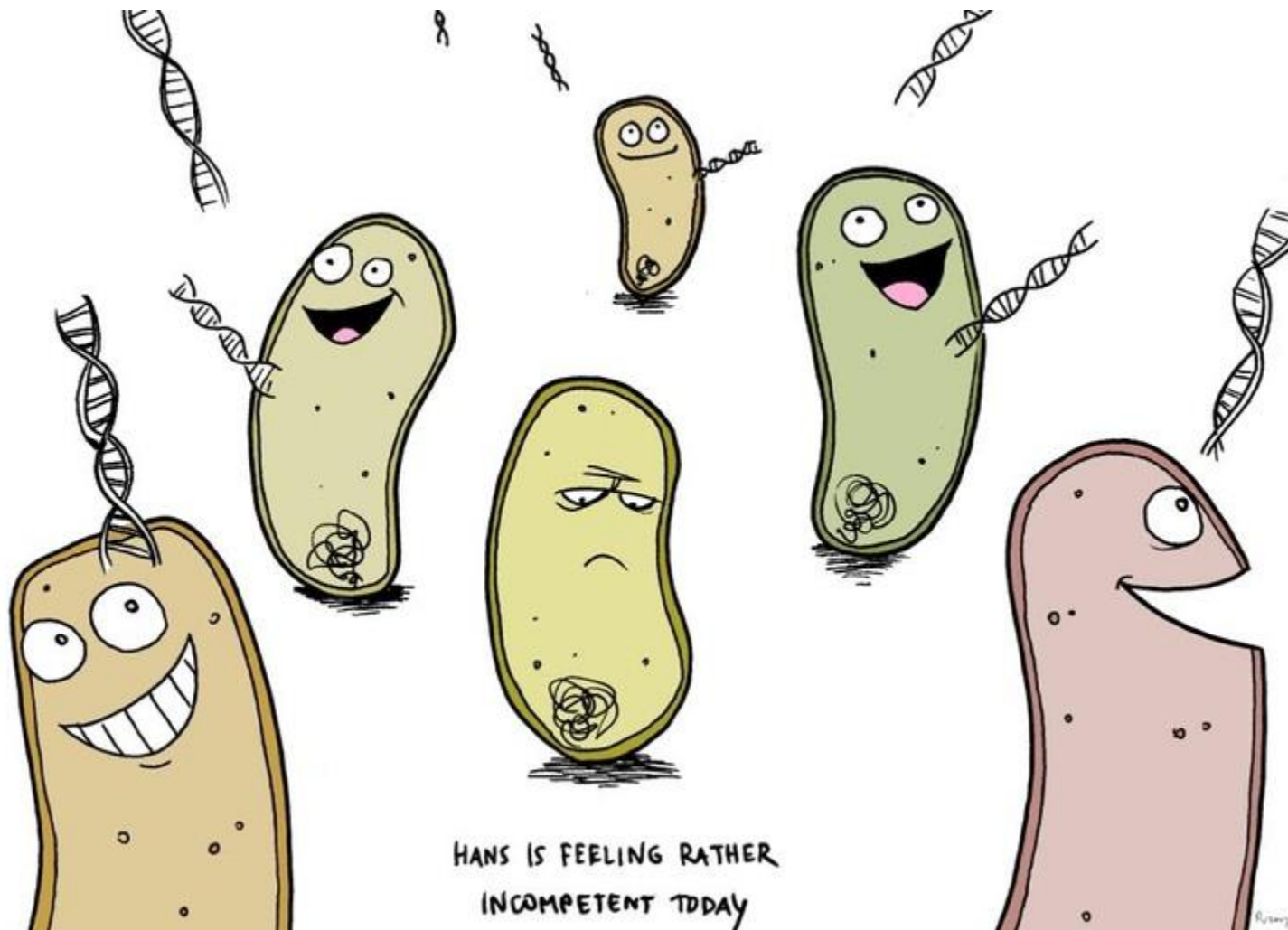
Transformación



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Células naturalmente competentes

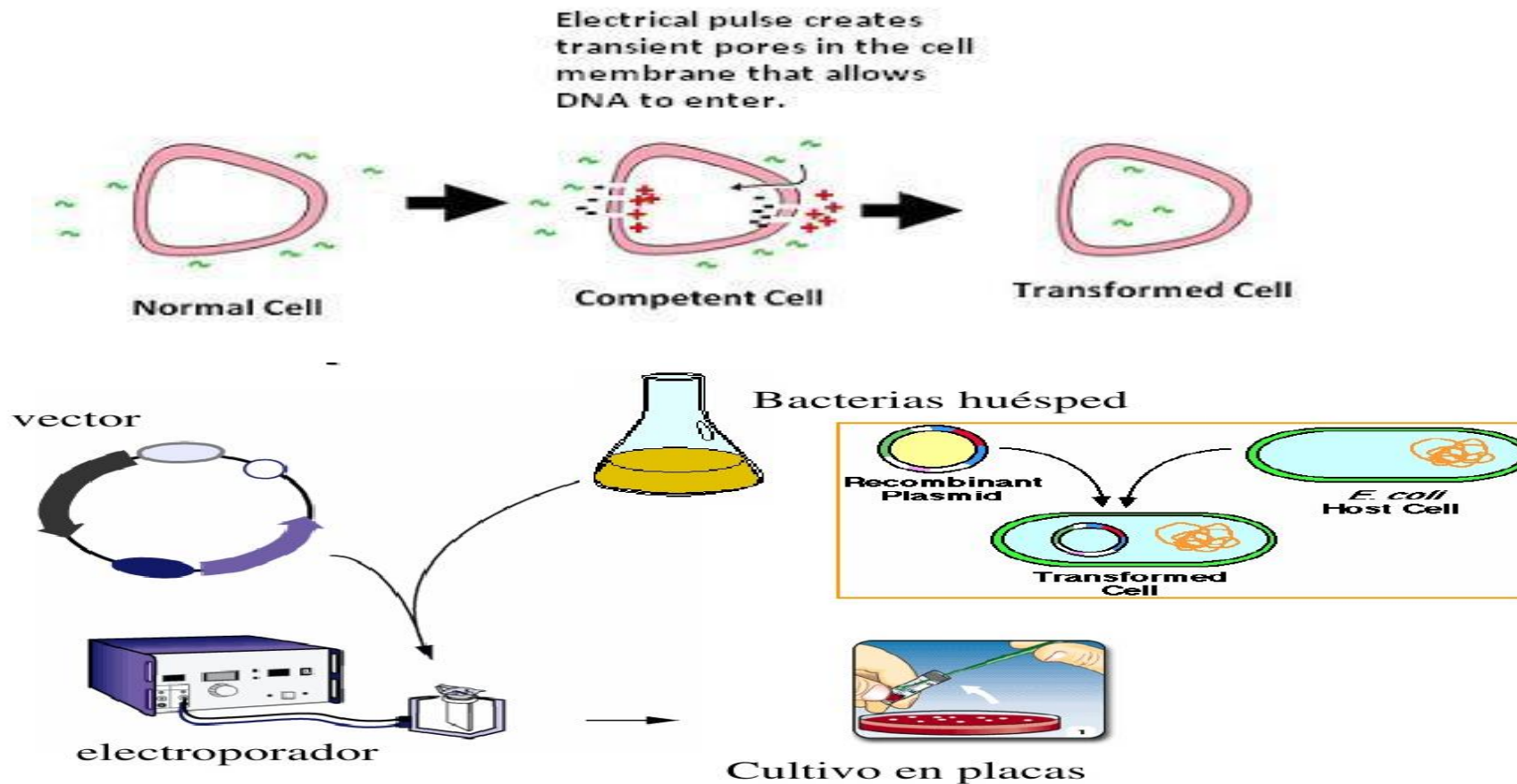




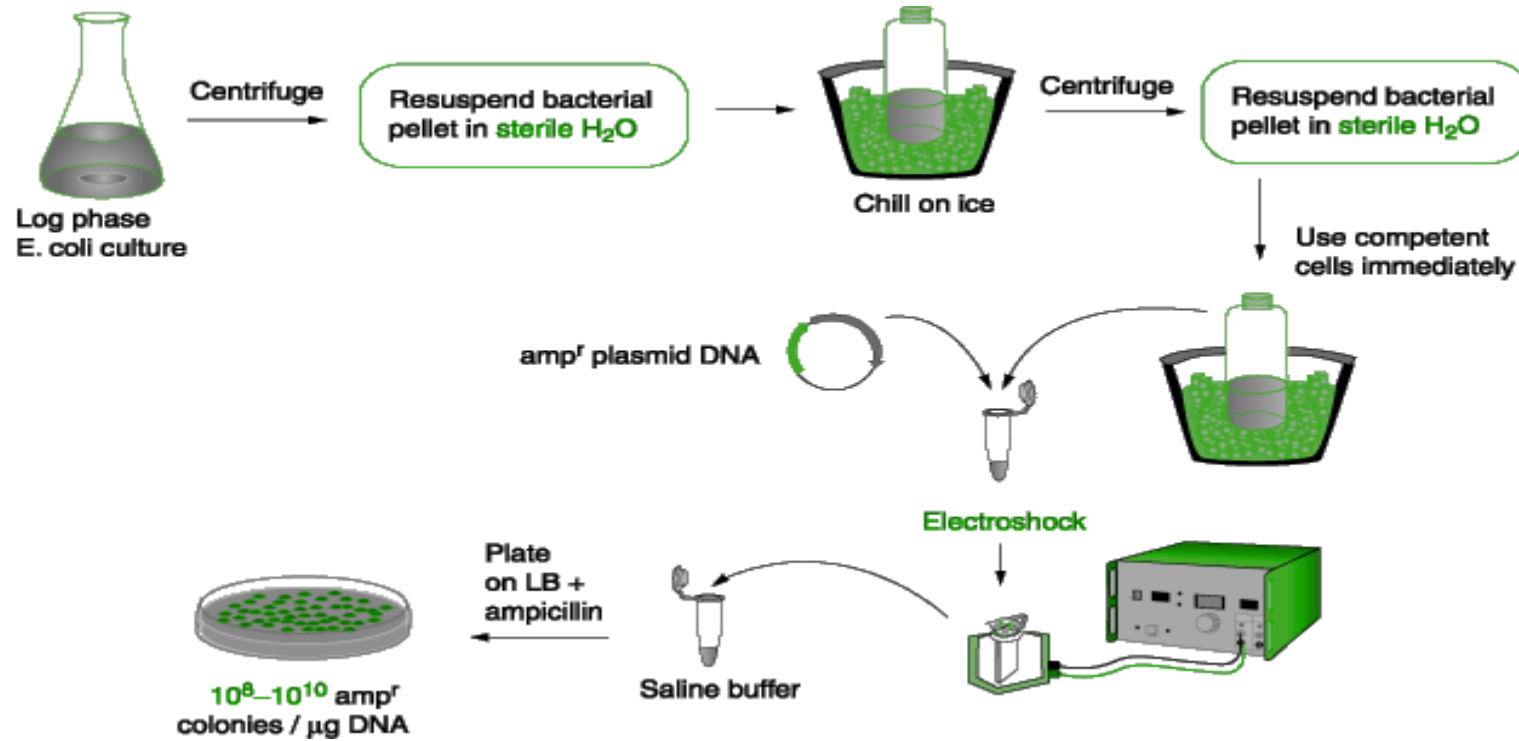
HANS IS FEELING RATHER
INCOMPETENT TODAY

Obtención de células electrocompetentes

Células electrocompetentes (Competencia artificial)



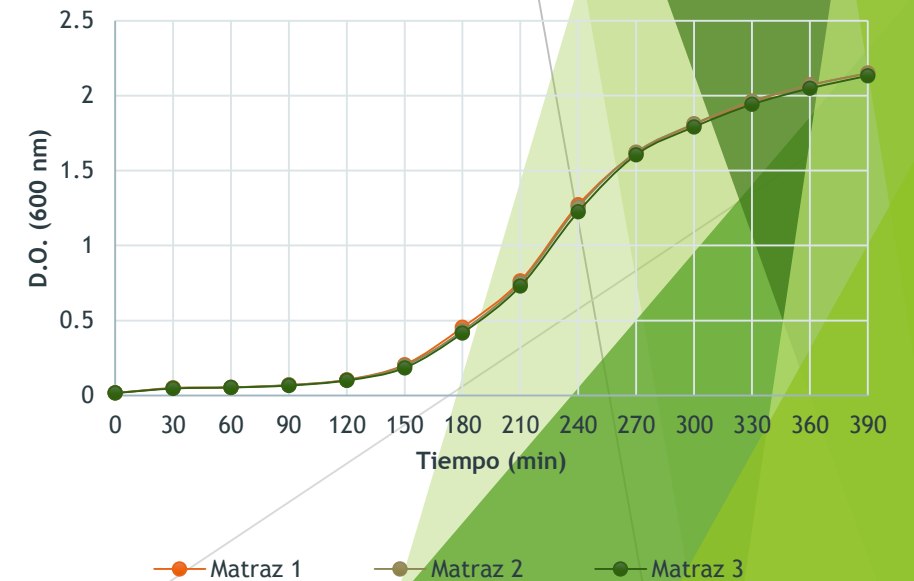
¿Cómo se hacen células electrocompetentes?



Método

1. Precultivo de *E. coli* w3110 en medio YENB (ext. levadura+caldo nutritivo)
2. Incubar 37°C/300 rpm/18 horas
3. Inocular 0.25 mL en 50 ml de medio YENB
4. Incubar 37°C/300 rpm
5. Medir turbidez en espectrofotómetro 600 nm hasta DO =0.6

Curva de crecimiento de
E. coli W3110



Método

mantener en lo posible todo en hielo

6. En zona aséptica verter todo el contenido del cultivo en tubo cónico centrífuga FRIO

7. Centrifuga 4000 rpm/5min

8. Decantar sobrenadante en zona aséptica

QUEDARÁ EL CONCENTRADO CELULAR (PASTILLA) EN EL TUBO

9. Adiciona 20 mL agua destilada estéril pH=7.0 al tubo (FRIO)

10. Vórtex para suspender

11. Centrifuga 4000 rpm/5 min

12. Elimina sobrenadante por decantación

QUEDARÁ CONCENTRADO CELULAR LAVADA 1 VEZ (PASTILLA) EN EL TUBO



Método

mantener en lo posible todo en hielo

13. Adiciona en zona aséptica 10 mL agua destilada FRIA pH=7
14. Vórtex
15. Centrifuga 4000 rpm / 5 min
16. Elimina agua de lavado CON MICROPIPETA (EVITAR LLEVARSE LA PASTILLA CELULAR)

18. En zona aséptica adiciona 1.0 mL glicerol 10% FRIO Y ESTÉRIL
19. Con la micropipeta succiona y expulsa varias veces las células para resuspenderlas
20. Traspasa a 1 microtubo de centrifuga FRIO
21. Centrifuga a 10000 rpm/ 1 min



Método

mantener en lo posible todo en hielo

22. Elimina con micropipeta el líquido EVITA SUCCIONAR EL PELLET
23. Adiciona 150µL de glicerol 10% ESTERIL FRIO
24. Resuspender succionando varias veces con la micropipeta
25. Traspasa 40 µL de esta suspensión de CÉLULAS COMPETENTES a 2 tubos de microcentrífuga FRIOS
26. Ultracongelar a -70° C

Electroporación

Fundamentos ¿Qué significa electroporar?

- ▶ Se puede aplicar a bacterias, levaduras, etc
- ▶ Un pulso de alto voltaje se aplica al microorganismo suspendido en un pequeño volumen de medio de alta resistencia
- ▶ Consiste en :
 - ▶ Sistema generador del pulso eléctrico
 - ▶ Cámara de electroporación
 - ▶ Celda con electrodos incluidos
- ▶ La muestra se coloca en la celda en medio de los electrodos
- ▶ El equipo contiene un capacitor, cargado con alto voltaje
- ▶ Se descarga la corriente contenida en el capacitor hacia la muestra
- ▶ Se alcanza un pico alto de voltaje a través de los electrodos
- ▶ Se logra una electroporación óptima en *E. coli* en aprox 5mseg

Factores que influyen. Generalidades

- ▶ Lo más común para *E. coli* es emplear celdas de 0.2 mm con volumen de 40 μ L en voltaje de 2.5 kV por aprox. 5 mseg.
- ▶ Se pueden emplear las mismas condiciones en bacterias como *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Helicobacter*, *Borrelia*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus*
- ▶ 5 mseg óptimo para muestras con alta resistencia

Crecimiento microbiano

- ▶ Las mas altas eficiencias de transformación se logran con células que se encuentran entre la fase exponencial temprana a fase exponencial media
- ▶ Para células de E. coli en fase estacionaria la eficiencia de transformación decae considerablemente

DNA

- ▶ Plásmidos es el material genético mas utilizado, y es mejor si están superenrollados
- ▶ Disminuye de 10^3 a 10^4 en plásmidos lineales
- ▶ Tamaño del plásmido disminuye eficiencia
- ▶ También se puede emplear para introducir:
 - ▶ RNA, proteínas, carbohidratos, moléculas pequeñas
- ▶ Pureza del plasmido: Plásmidos purificados tienen mas eficiencia
- ▶ Concentración celular óptima: 10^9 a 3×10^{10} UFC/mL
- ▶ Eficiencia transformación = UFC transformantes / μg DNA

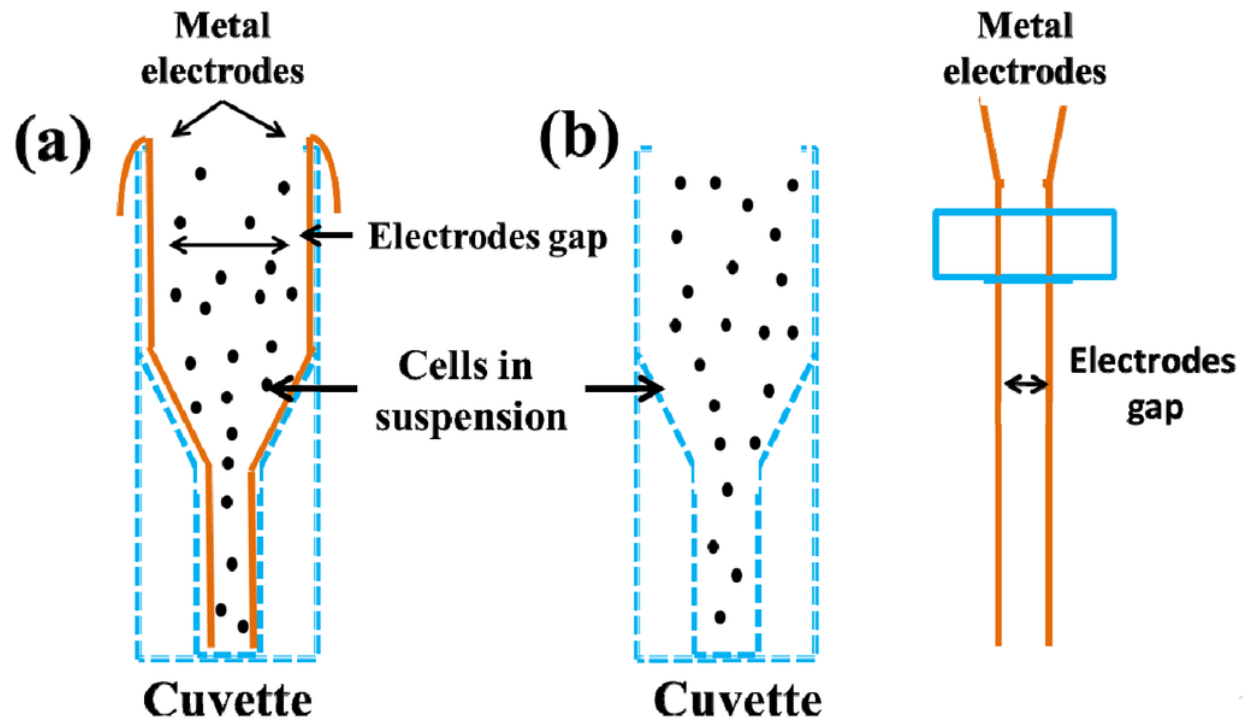
Medio para electroporación

- ▶ Medios de alta resistencia (>600 ohms)
- ▶ Por tanto lavar las células para eliminar restos de medio
- ▶ Células con restos genera arcos (puente) de corriente eléctrica al electroporar
- ▶ Deben lavarse por dos o tres veces con soluciones no iónicas como glicerol, sacarosa, sorbitol o polietilenglicol
- ▶ Glicerol: además crioprotector

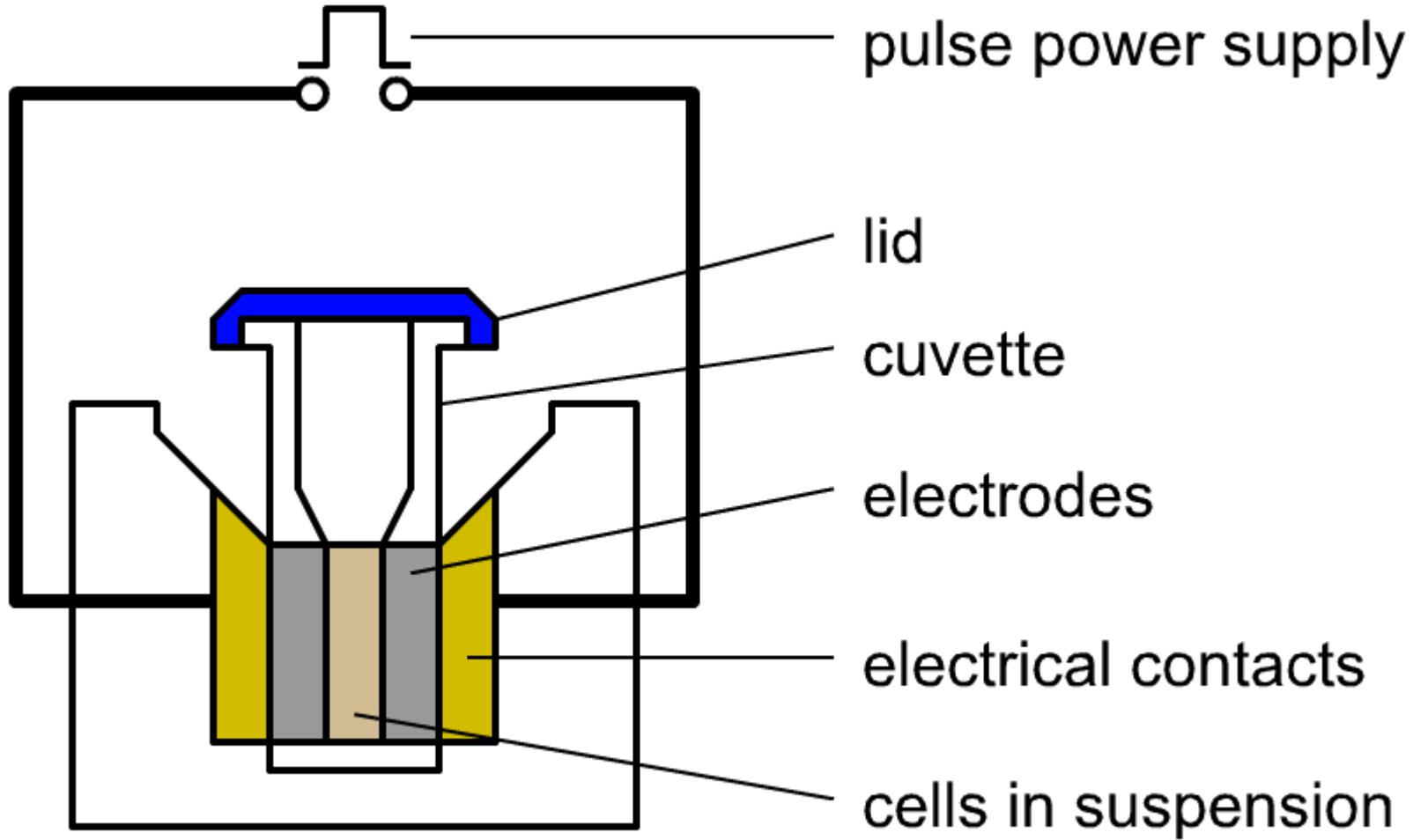
Medio para electroporación

- ▶ Volumen: Soluciones iónicas, resistencia de muestra inversamente proporcional al volumen de solución en celda
- ▶ Presencia de iones divalentes: resistencia menor a iones monovalentes
- ▶ pH: la resistencia de solución buffer es afectada por el pH
- ▶ Temperatura: Formación temporal de poros: Mantener las células a baja temperatura después del pulso, permite mantener poro abierto mayor tiempo para la introducción de DNA ($<4^{\circ}\text{C}$)

Celdas (0.2 mm, aprox. 50 μ l capacidad máxima) ESTÉRILES



Celdas



MÉTODOS

Transformación bacteriana

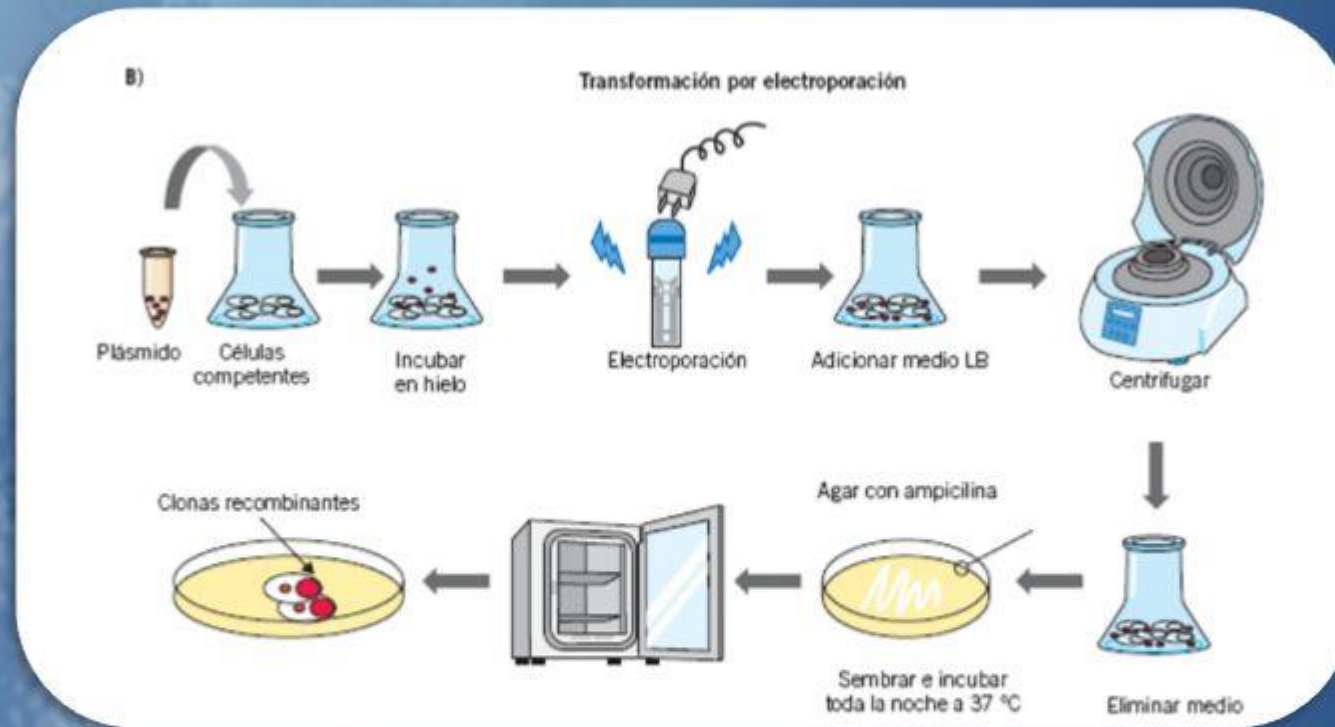


Figura 14-7. Transformación de bacterias. B) Transformación por electroporación. En la transformación por electroporación la diferencia estriba en que en lugar de un choque térmico se aplican pulsos eléctricos que desestabilizan la membrana celular y permiten la entrada del vector.

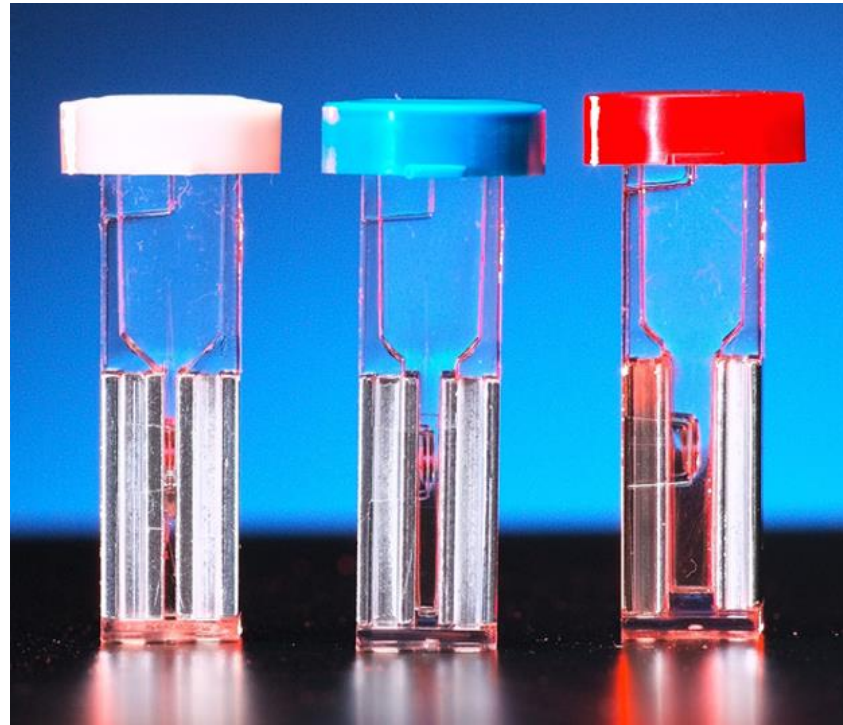
Mantener en lo posible todo el tiempo en hielo. ESTOS PASOS DEBEN HACERSE CON LA MAYOR RAPIDEZ POSIBLE

SE TE PROPORCIONARÁN DOS MICROTUBOS CADA UNO CON 40 μ l DE CÉLULAS COMPETENTES. RESERVAR UN TUBO

- ▶ PARA UN TUBO DE CÉLULAS COMPETENTES:
- ▶ 1. Colocar en hielera:
 - ▶ Microtubo con plásmido pBABE (recuerda que éste contiene el gen *gfp*)
 - ▶ Microtubo con 40 μ L de células competentes
 - ▶ Celda de electroporación DENTRO DEL SOBRE QUE LA MANTIENE ESTÉRIL
- ▶ 2. Tomar en zona aséptica 1 μ L de plásmido
- ▶ 3. Depositar el plásmido dentro del microtubo con los 40 μ L de células competentes de *E. coli* w3110
- ▶ 4. Dar ligeros golpes al fondo del microtubo para mezclar
- ▶ 5. Abrir la celda en zona aséptica

Mantener en lo posible todo el tiempo en hielo. ESTOS PASOS DEBEN HACERSE CON LA MAYOR RAPIDEZ POSIBLE

- ▶ 6. Colocar todo el contenido del microtubo DENTRO DE LA CELDA, INTRODUCE LA PUNTA DE LA MICROPIPETA Y DESLIZA POR EL BORDE; NO INCORPORAR BURBUJAS, VERIFICA QUE NO HAYA BURBUJAS DE AIRE DENTRO



Guaranteed Efficiency

Electroporation efficiency is maximized with precision cuvettes for your Gene Pulser and MicroPulser™ electroporators

Ensured Sterility

Each cuvette is fitted with a snug cap, wrapped, and sterilized by gamma irradiation

Inspected and Tested

Cuvettes are inspected at several points in the manufacturing process and tested in actual electroporation experiments to guarantee performance

Color-Coded Caps

Colored caps enable easy identification of different cuvette sizes

Smooth Electrode Surface

The aluminum electrode plates are subjected to an 11-step etching and cleaning process for uniform pulse delivery to the entire sample

Sturdy Construction

Durable polycarbonate is used to withstand pulses of very high voltage

Easy Identification

Individual color-coded pouches distinguish 3 different cuvette gap widths to ensure proper use

Precise Gap Widths

Cuvettes are manufactured to very narrow gap tolerances to ensure reproducibility among experiments

Consistent Chamber Shape

Seamless plastic molding eliminates leaking and keeps the aluminum plates parallel for uniform sample treatment and safety

Thorough Cleanliness

Cuvette cleanliness is maximized by assembly in a clean-room environment and repeated washing in 2 different solvents for contaminant-free electroporation



ESTOS PASOS DEBEN HACERSE CON LA MAYOR RAPIDEZ POSIBLE

- ▶ 7. Encender electroporador, aparecerá en la pantalla el programa “Ec1”
- ▶ 8. Tapa la celda e introdúcela en el carrusel del electroporador



Condiciones programa Ec1

Volts	1800
Tiempo	5 mseg



ESTOS PASOS DEBEN HACERSE CON LA MAYOR RAPIDEZ POSIBLE

- ▶ 9. Oprime el botón “pulse”. Se escuchará un sonido al momento que el equipo aplique la descarga
- ▶ 10. El equipo mostrará el programa de nuevo “Ec1” en la pantalla
- ▶ 11. Retirar la celda



ESTOS PASOS DEBEN HACERSE CON LA
MAYOR RAPIDEZ POSIBLE
RECUPERACIÓN DEL SHOCK ELÉCTRICO

- ▶ 12. En zona aséptica colocar 1000 μ L (1.0ml) de medio SOC al cultivo dentro de la celda
- ▶ 13. Pistonear 1 vez para mezclar el cultivo electroporado con el medio SOC
- ▶ 14. Transferir todo el contenido de la celda a un tubo estéril
- ▶ 15. Incubar 37° C/300 rpm/ 1h

EVALUACIÓN DE *E. coli* w3110 *amp*^R *gfp*⁺ (CÉLULAS RECOMBINANTES ó TRANSFORMANTES)

- ▶ 16. Transferir 30 µL del cultivo recuperado a agar luria con carbenicilina (100 µg/ml; análogo de ampicilina ideal para ensayo de recombinación)
- ▶ 17. Realizar una del inóculo extensión superficial empleando varilla de vidrio en “L”
- ▶ 18. Incubar 37° C / 24 h e incubar a 28° C (T° ambiente) por 24 h mas
- ▶ 19. Verificar características morfocoloniales de la cepa w3110 (desarrollo en el agar con carbenicilina y colonias verde fluorescentes) con luz visible y contabilizar
- ▶ 20. Verificar características morfocoloniales de la cepa w3110 bajo luz UV

E. coli w3110 *amp*^R *gfp*⁺ (luz UV)

