

Electroporación

Sesion 2

21 enero 2016

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

Fundamentos ¿Qué significa electroporar?

- ▶ 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

Programmed Functions

Program	Species	Cuvette Size (cm)	Preset Conditions*
Bacteria			
Ec1	<i>Escherichia coli</i>	0.1	1.80 kV, 1 pulse
Ec2	<i>Escherichia coli</i>	0.2	2.50 kV, 1 pulse
StA	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.2	1.80 kV, 1 pulse, 2.5 ms
Agr	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	0.1	2.20 kV, 1 pulse
Ec3	<i>Escherichia coli</i>	0.2	3.00 kV, 1 pulse
Fungi			
Sc2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.2	1.50 kV, 1 pulse
Sc4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.2	3.00 kV, 1 pulse
ShS	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0.2	2.00 kV, 1 pulse
Dic	<i>Dictyostelium discoideum</i>	0.4	1.00 kV, 2 pulses, 1.0 ms
Pic	<i>Pichia pastoris</i>	0.2	2.00 kV, 1 pulse

* Unless the pulse time is truncated below 5 ms, the unit will deliver the optimal time constant of ~5 ms to samples in high-resistance media.

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 plásmido: Plásmidos purificados tienen mas eficiencia
- ▶ Concentración celular óptima: 10^9 a 3×10^{10} UFC/mL
- ▶ Eficiencia transformación = UFC transformantes / μg DNA

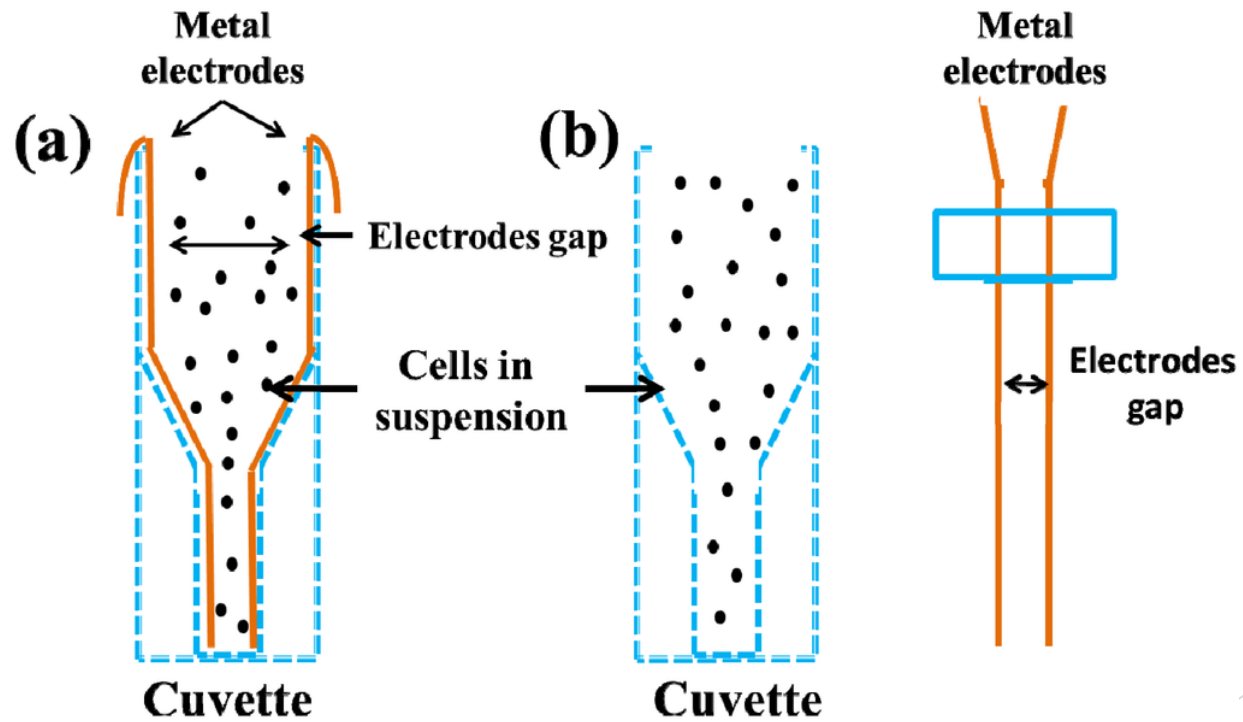
Medio para electroporación

- ▶ 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

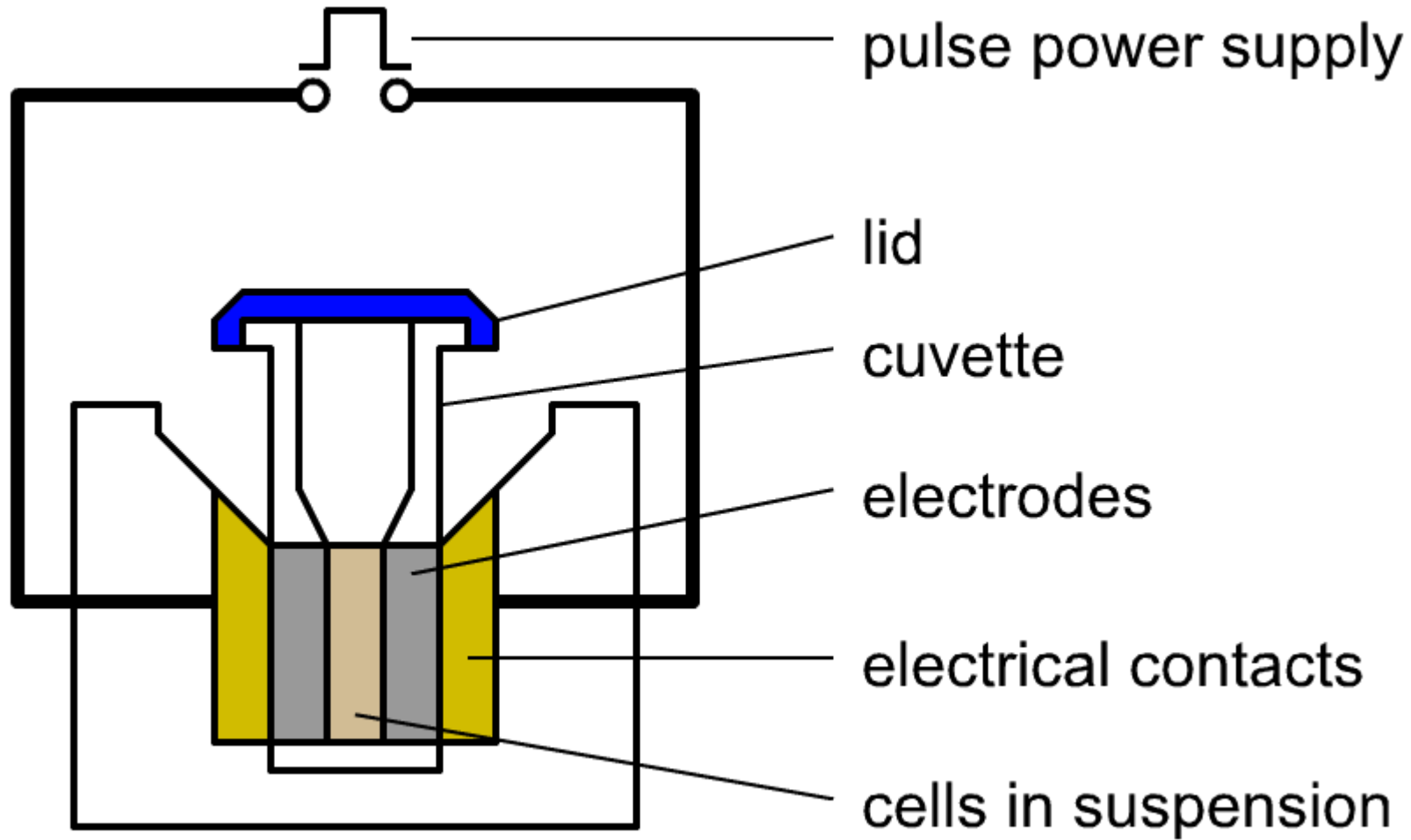
Medio para electroporación

- ▶ 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



MÉTODO

EMPLEAR GUANTES TODO EL TIEMPO

Transformación bacteriana

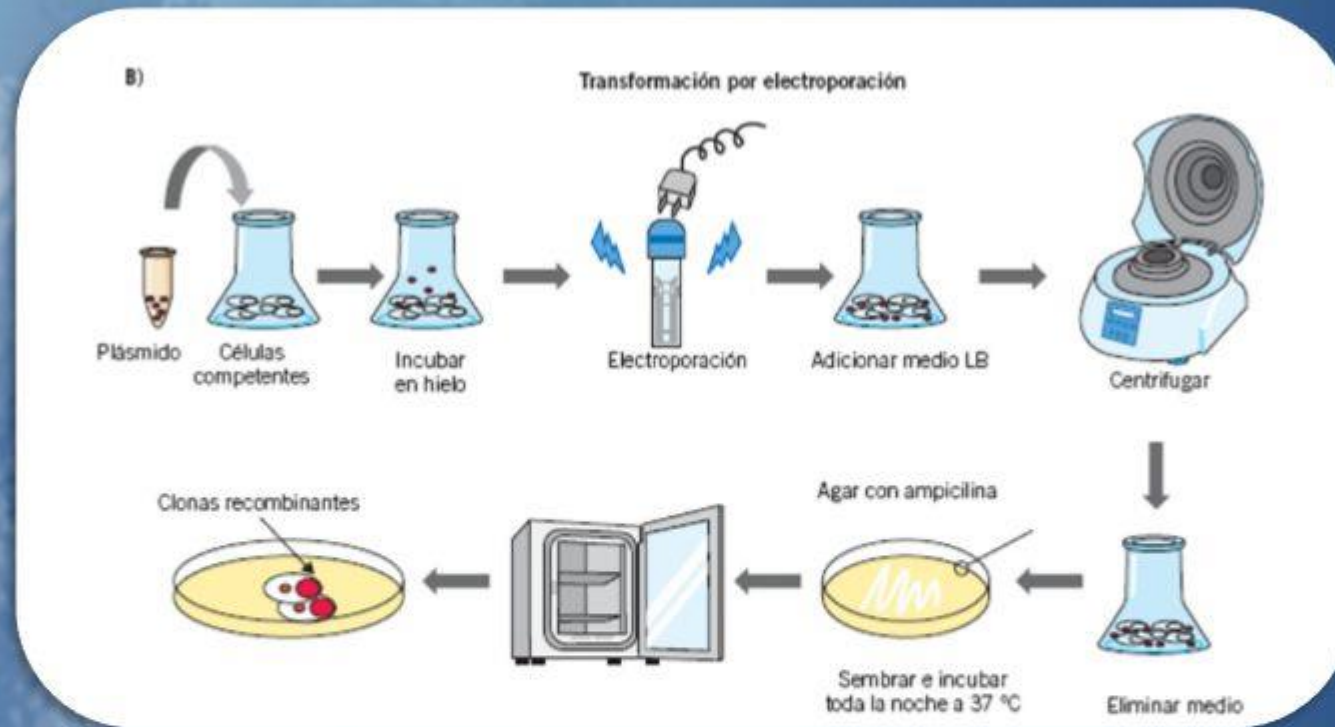


Figura 14-7. Transformación de bacterias. B) Transformación por electroporación. En la transformación por electroporación la diferencia estriba en que en lugar de un choque térmico se aplican pulsos eléctricos que desestabilizan la membrana celular y permiten la entrada del vector.

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

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

- ▶ 2. Tomar en zona aséptica 1 μ L de plasmido
- ▶ 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

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

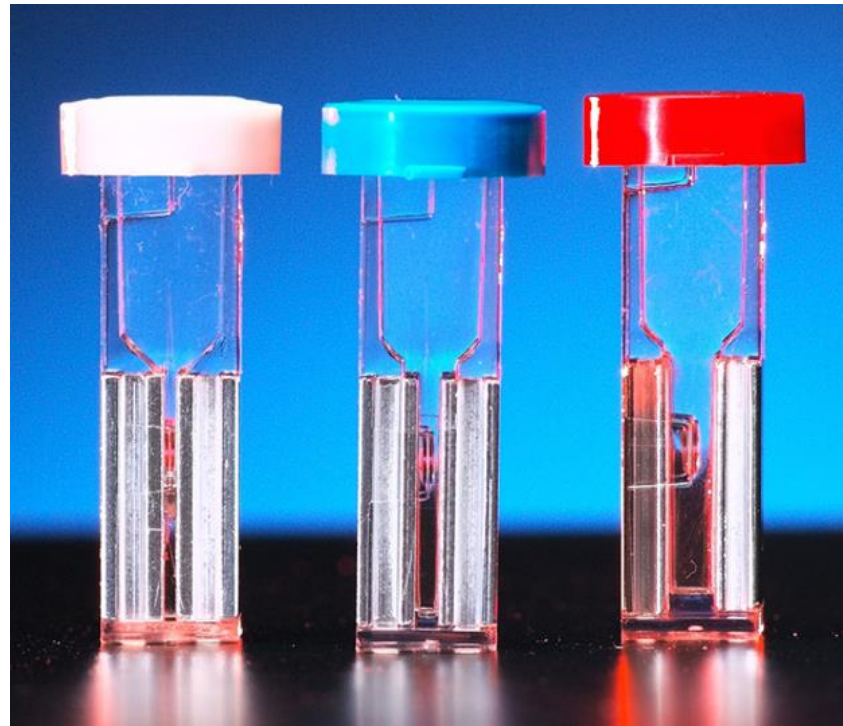
Thorough Cleanliness

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



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**



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

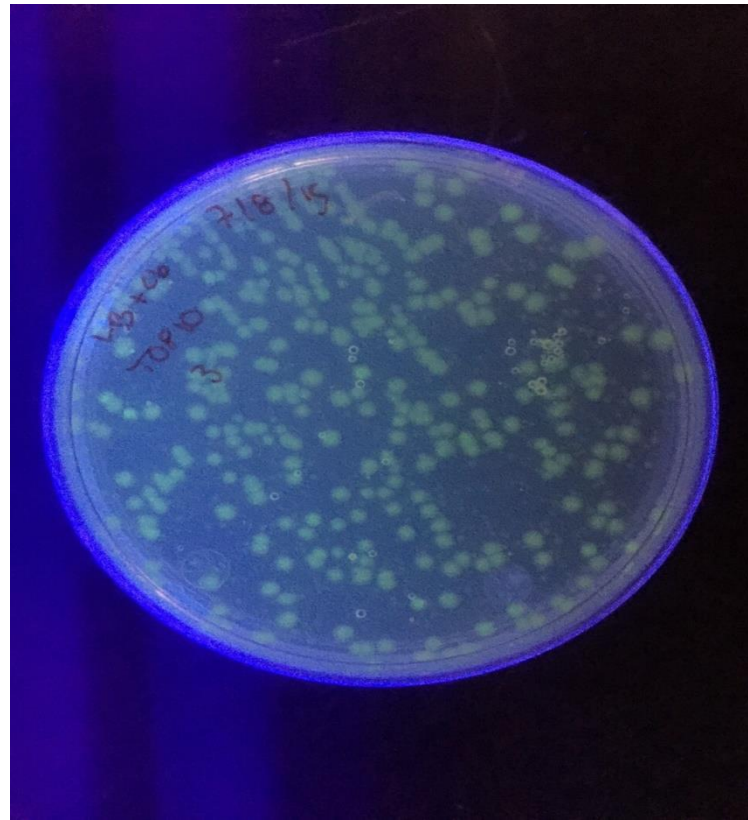
EVALUACIÓN DE *E. coli* w3110 *amp*^R *gfp*⁺ (CÉLULAS RECOMBINANTES ó TRANSFORMANTES)

- ▶ 16. Transferir 100 µL del cultivo recuperado a agar luria con ampicilina (100 µg/ml)
- ▶ 17. Realizar 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

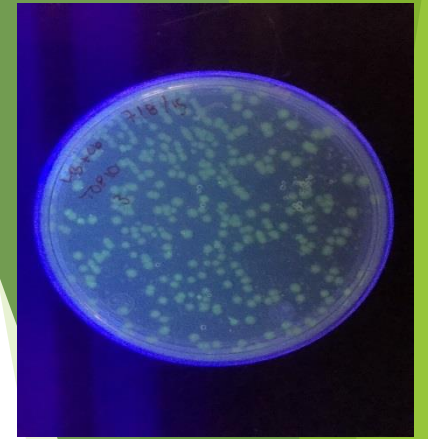
EVALUACIÓN DE *E. coli* w3110 *amp*^R *gfp*⁺ (CÉLULAS RECOMBINANTES ó TRANSFORMANTES)

- ▶ 19. Verificar características morfocoloniales de la cepa w3110 (desarrollo en el agar con ampicilina 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)



E. coli w3110 *amp*^R *gfp*⁺



▶ Inocular por agotamiento radial en cuadrantes en

▶ Agar triptona soya

▶ Agar Mac Conkey

▶ Agar EMB

INCUBAR 37°C / 24 h

Observar características morfocoloniales



E. coli w3110

(Cepa Silvestre; Sin transformar)

- ▶ Inocular por agotamiento radial en cuadrantes (utiliza microtubo de célula competente sin transformar) en :
 - ▶ Agar luria con ampicilina (100 µg/mL)
 - ▶ Agar triptona soya
 - ▶ Agar Mac Conkey
 - ▶ Agar EMB

INCUBAR 37°C / 24 h

Observar características morfológicas



Comprobación de fenotipos en *Salmonella* Typhimurium PF430 (*amp^R gfp⁺* ; luz UV)

▶ Inocular por agotamiento radial en cuadrantes en

▶ agar luria con ampicilina (100 µg/mL)

▶ Agar triptona soya

▶ Agar Mac Conkey

Comprobación de fenotipos en *Salmonella* *Typhimurium* PF430 (*amp^R gfp⁺* ; luz UV)

- ▶ A partir de esta cepa se extrajo el plásmido pBABE por lisis alcalina
- ▶ Por tanto es resistente a ampicilina y genera fluorescencia verde debido a la proteína GFP
- ▶ Pero es *Salmonella* : no metaboliza la lactosa (lac -)
- ▶ Inocular por agotamiento radial en cuadrantes en
 - ▶ agar luria con ampicilina (100 µg/mL)
 - ▶ Agar triptona soya
 - ▶ Agar Mac Conkey
 - ▶ INCUBAR 37°c/24 h
 - ▶ Visualizar características morfológicas en los medios selectivos

Sesión 3

22 enero 2016

Comprobación fenotípica final

A las 24 h incubadas 37° C : Características morfocoloniales
 Visualizar en medios sin indicador ó colorantes colonias verde
 fluorescentes

Medio cultivo	<i>S. Typhimurium gfp⁺ amp^R</i>	<i>E. coli</i> W3110	<i>E. coli</i> W3110 <i>gfp⁺ amp^R</i>
Agar luria + 100 µg/mL ampicilina	√	√	√
Agar luria + 100 µg/mL ampicilina + luz UV	√ ¿Presencia de satélites?	√	√ Cuantificar/ Presencia de satélites
Agar triptona soya	√	√	√
Agar EMB		√	√
Agar Mc Conkey	√	√	√

IMViC / Kligler: A partir de colonias aisladas en agar triptona soya

Prueba fenotípica	<i>S. Typhimurium</i> <i>gfp⁺ amp^R</i>	<i>E. coli</i> W3110	<i>E. coli</i> W3110 <i>gfp⁺</i> <i>amp^R</i>
Triptofanasa (Indol)		√	√
Ácidos mixtos (Rojo Metilo)		√	√
Butanediol/Acetoína (Vogues Proskauer)		√	√
Citrato liasa		√	√
Lactosa (Kligler)	√	√	√
Glucosa (Kligler)	√	√	√
Sulfhídrico (Kligler)	√	√	√

Microscopía:

A) A partir de agar luria+ampicilina (100µg/mL); Frotis fijo

B) A partir de McConKey o Agar triptona soya: Gram

Características microscópicas	<i>S. Typhimurium gfp⁺ amp^R</i>	<i>E. coli</i> W3110	<i>E. coli</i> W3110 <i>gfp⁺ amp^R</i>
Microscopio fluorescencia			
Microscopio campo claro			

Cálculos eficiencia transformación

El cultivo original presentó una DO = 0.6 por lo que en unidades Klett se tiene:

$$U. Klett = \frac{0.6}{0.002} = 300 U. Klett$$

Usando la curva de calibración de McFarland se calculó la cantidad de células original presentes en el cultivo.

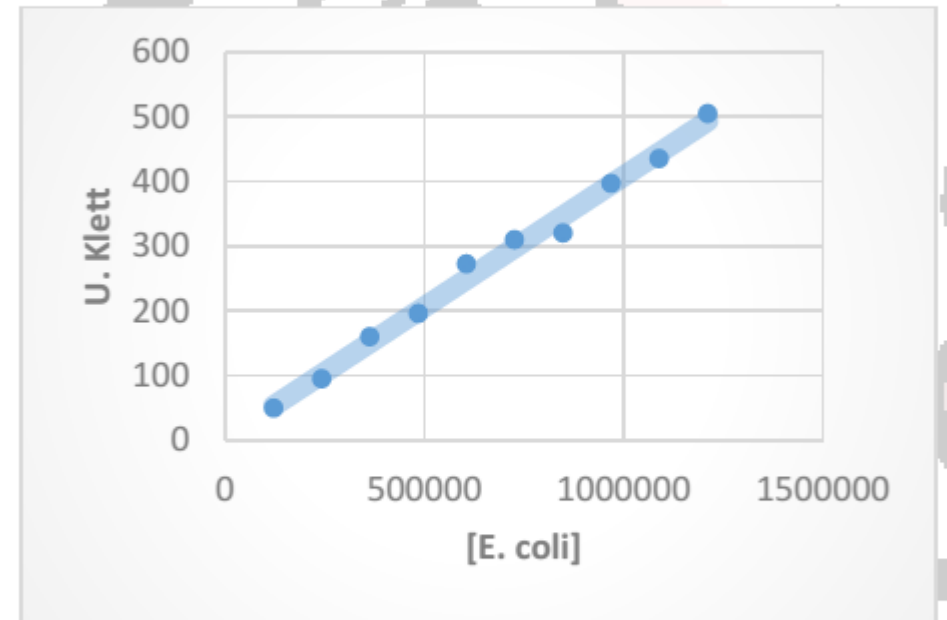


Gráfico 1. Curva de calibración de McFarland

$$y = 1.63 \times 10^{-7} x + 5.1333$$

Cálculos eficiencia transformación

Despejando se obtiene que:

$$x = \frac{U.Klett - 5.1333}{1.63 \times 10^{-7}}$$

Sustituyendo:

$$x = \frac{300 - 5.1333}{1.63 \times 10^{-7}}$$

Se obtiene que el número total de células presente en el cultivo original es de:

$$x \cong 2 \times 10^9$$

Ahora, a partir de la cantidad de cultivo utilizado para inocular la caja de agar luria obtenemos la cantidad de células RECOMBINANTES presentes:

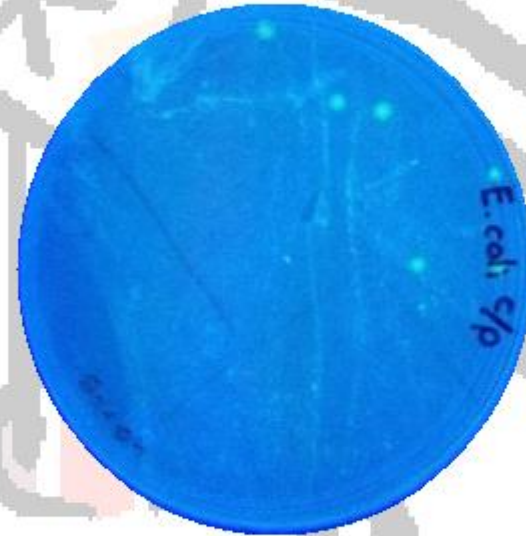


Figura 2. Colonias recombinantes obtenidas

$$1000 \mu l \times \frac{6 UFC}{30 \mu l} = 200 \text{ células/mL}$$

Cálculos eficiencia transformación

Ahora utilizando los datos del plásmido calculamos el número total de células transformantes obtenidas:

$$\frac{200 \text{ células}}{0.04 \mu\text{l}} = 5000 \text{ células transformantes}$$

A partir de los datos obtenidos obtenemos el porcentaje de eficiencia:

$$5000 \times \frac{100 \%}{2 \times 10^9} = 0.00025 \%$$

¿Cómo conocer la concentración de DNA del plásmido?

- ▶ La absorbancia de la muestra de DNA se determina en el espectrofotómetro a 260 nm, 280 nm y 230 nm
- ▶ 260 nm: ácidos nucleicos (DNA, RNA, NUCLEÓTIDOS)
- ▶ 280 nm: Proteína
- ▶ 230 nm: Guanidina y otros solubles en fenol

¿Cómo conocer la concentración de DNA del plásmido?

- ▶ Para DNA
- ▶ $1 \text{ U OD}_{260\text{nm}} = 50 \mu\text{g/ mL}$
- ▶ La concentración en la muestra se calcula con la fórmula:
- ▶ $A_{260\text{nm}} \times \text{dilución} \times 50 = [\text{DNA}] \mu\text{g/ mL}$

Composición de medios de cultivo

- ▶ **Medio YENB:**
- ▶ Extracto de levadura: 0.75%
- ▶ Caldo nutritivo: 0.8%

- ▶ **Medio SOC**
- ▶ Triptona: 2%
- ▶ Extracto de levadura: 0.5%
- ▶ NaCl: 0.058%
- ▶ MgSO_4 anhidro: 0.12%
- ▶ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.2%
- ▶ KCl: 1.25 mM
- ▶ Glucosa: 20 mM