

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	GLA-01 V. 00
		Página	1 de 1

AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA

1. Título

Aislamiento y purificación de DNA plasmídico

2. Objetivo

Conocer los principios básicos y aplicarlos para hacer purificación de plásmidos como un modelo de utilización de vectores en DNA recombinante.

3. Marco teórico

En la tecnología de DNA recombinante uno de los procedimientos frecuentemente realizados es la clonación de genes. Es decir, la separación y amplificación de un gen de los demás genes existentes en el material genético de un determinado organismo. En la clonación de genes se utilizan alguno de diversos tipos de vectores como fagos (virus que infectan bacterias), fagémidos, cósmidos, plásmidos, etc. Se denominan vectores por la misma connotación trigonométrica del vector o transportador, en este caso transportadores de genes y las funciones codificadas por esos genes. En la presente práctica como un modelo de vectores se va a realizar aislamiento y purificación de DNA de plásmido. Los plásmidos corresponden a un material extracromosomal natural de las bacterias.

Los plásmidos contienen genes necesarios para algunas funciones de las bacterias, las bacterias tienen sistemas naturales para pasar un plásmido de una bacteria a otra y por lo tanto es un mecanismo para transferir genes. No son los únicos, pero tienen especial importancia dentro de los genes contenidos en los plásmidos aquellos que hacen que la bacteria sea resistente a antibióticos. En ausencia del plásmido la bacteria puede ser destruida por el antibiótico, en presencia del plásmido la bacteria no es afectada por el antibiótico y puede crecer sin problema. En la práctica la presencia de genes que producen resistencia a los antibióticos son de gran ayuda en la tecnología de DNA recombinante, por una parte crecer una bacteria que contiene un plásmido en un medio que contenga el antibiótico evita se pierdan los plásmidos, por otro lado permiten un proceso que se denomina **selección**, es decir, al crecer la bacteria en un medio que contenga el antibiótico solo crecerán las que contengan el plásmido.

Una vez descubiertos los plásmidos los investigadores desarrollaron técnicas para extraerlos e introducirlos en las bacterias, agregarles o quitarles genes, combinar plásmidos, combinar plásmidos con fagos, modificarlos para introducirlos en células eucarióticas, introducirlos en células humanas, etc. El proceso en el laboratorio utilizado para introducir un plásmido a una bacteria se denomina **transformación** y el mismo proceso para introducirlo en una célula eucariótica se denomina **transfección**.

Hoy contamos con cientos de diferentes plásmidos que a partir de los plásmidos naturales han sido desarrollados por los investigadores y siguen siendo utilizados en centros de investigación y producción.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	GLA-01 V. 00
		Página	2 de 1

AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA

Uno de los objetivos del aislamiento del DNA del plásmido es su separación del DNA cromosomal de la bacteria, la principal característica que se aprovecha en este proceso de purificación es la diferencia de tamaño, mientras el plásmido tiene menos de 10.000 pares de bases, el cromosoma bacteriano generalmente tiene más de 1 millón de pares de bases. Al desnaturalizar los dos DNA y renaturalizarlos rápidamente, el plásmido se renaturaliza adecuadamente y queda soluble mientras el cromosoma bacteriano no se renaturaliza adecuadamente, forma redes, no queda soluble y se precipita.

4. Materiales equipos e insumos


Incubadora con agitación
Tubos para cultivos de bacterias
Microcentrífuga
Vórtex
Micropipetas P1000, P200 y P20
Puntas azules y amarillas para micropipeta
Tubos eppendorf de 1,5 o 2 mL

5. Reactivos

Bacteria transformada con el plásmido pUC18 o cualquier otro

Medio LB: Triptona 10 g
 Extracto de levadura 5 g
 NaCl 5 g
 Ajustar a pH 7.0 con NaOH
 Llevar a un litro con agua y esterilizar en autoclave

Acetato de potasio 5 M
Acido acético glacial
Ampicilina o el antibiótico correspondiente para selección
NaOH 5 N
NaCl 2 M
Tris HCl 1 M pH 8.0
EDTA 500 mM pH 8.0
Glucosa 1 M
SDS 5 %
Etanol absoluto
Agua destilada
Marcador DNA Lambda Hind

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	GLA-01 V. 00
		Página	3 de 1

AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA

Los estudiantes deben traer hielo.

6. Procedimiento

La práctica se realiza en dos sesiones; en la primera, se aísla el plásmido; en la segunda, se hace electroforesis en gel de agarosa para visualizarlo.

1. Tomar una colonia de una bacteria que haya sido transformada con un plásmido e inocularla en 2 mL de medio LB que contenga ampicilina a una concentración de 20 mg/mL.
2. Incubar con agitación toda la noche a 37 °C.
3. Transferir 1.5 mL del cultivo a un tubo eppendorf y centrifugar a 10.000 rpm por 5 minutos. Si se dispone de tubos de 2 mL, se trabaja con 2 mL de cultivo.
4. Remover y descartar el sobrenadante. El precipitado contiene las bacterias transformadas.
5. Resuspender el precipitado en 100 µL de una solución mixta que contenga: 25 mM de tris-HCl pH 8.0, 10 mM de EDTA pH 8.0 y 50 mM de glucosa. El precipitado debe desagregarse completamente, si es necesario ayúdese de un vórtex.
6. Agregar 200 µL de una solución mixta que contiene: 0.2 N de NaOH y 1 % de SDS. Mezclar suavemente por inversión de tubo varias veces.
7. Incubar en hielo por 10 minutos.
8. Agregar 150 µL de una solución mixta preenfriada en hielo que contiene: 3 M de potasio y 5 M de acetato.
9. Incubar en hielo por 5 minutos.
10. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos.
11. Transferir 400 µL del sobrenadante a otro tubo eppendorf. Determinar cuanto volumen de sobrenadante fue transferido. Descartar el precipitado. En el sobrenadante queda el plásmido y en el precipitado queda el cromosoma bacteriano.
12. Agregar el doble de volumen de etanol absoluto (800 µL de etanol).
13. Incubar a temperatura ambiente por 2 minutos.
14. Centrifugar a 13.000 rpm por 10 minutos.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	GLA-01 V. 00
		Página	4 de 1

AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA

15. Muy cuidadosamente descartar el sobrenadante.
16. Agregar 50 µL de etanol al 70 %, centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos.
17. Muy cuidadosamente descartar el sobrenadante.
18. Secar el precipitado que contiene el plásmido, introduciendo el tubo en una incubadora a 45 °C por 10 minutos.
19. Agregar 50 µL de agua para resuspender el DNA plasmídico.
20. Hacer electroforesis en gel de agarosa para ver el DNA del plásmido.

7. Bibliografía

- J. Sambrook; E.F. Fritsch, T. Maniatis, **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** CSHL press 2001
- Fred M. Ausubel; Roger Brent; Robert E. Kingston; David D. Moore; J.G. Seidman; John A. Smith; Kevin Struhl **Current Protocols in Molecular Biology**, John Wiley and Sons, Inc, 1998
- Contreras J, Pinilla G, Beltrán R, Wasserman M, Rojas M O **Manual de Técnicas Básicas. Primer Curso Institucional sobre Biología Molecular** ISBN 958-13-0083-X .1 ed. Bogotá : Instituto Nacional de Salud, 1991, v.1. p.30.
- Concepción Puerta y Claudia Urueña. **Prácticas de Biología Molecular**. Editorial Pontificia Universidad Javeriana, 2005