

EXTRACCIÓN ADN PLASMÍDICO

Ref.ADNPLASMIDO (25 extracciones)

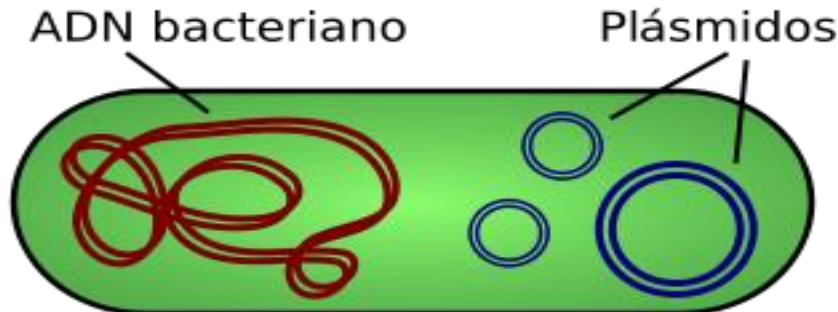
1.OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es introducir los principios de la extracción de ADN plasmídico a partir de células bacterianas.

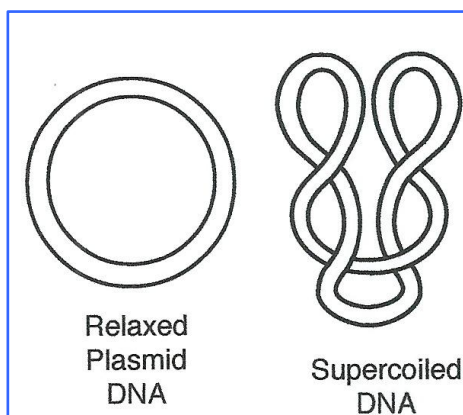
Los estudiantes aprenderán la estructura y función de los plásmidos de ADN.

2. INTRODUCCION

Los plásmidos son fragmentos extracromosómicos de ácidos nucleicos (ADN o ARN) que aparecen en el citoplasma de algunos procariontas. Son de tamaño variable aunque menor que el cromosoma principal. Cada bacteria puede tener uno o varios a la vez.



Los plásmidos tienen una conformación variable que puede ser lineal, circular o con estructura superenrollada (supercoiled DNA).



De forma natural los ADN plasmídicos existe como molécula superenrollada (Forma I), este ADN superenrollado está doblado en sí y tiene una estructura más condensada y enredada que el mismo ADN cuando está relajado.

El ADN purificado debe ser un círculo cerrado covalentemente y estar en forma de estructura superenrollada, esta estructura en la célula es causada por la acción de unos enzimas llamados girasas y esto tiene importantes consecuencias biológicas. Si uno o más fosfatos unidos al esqueleto del ADN superenrollado son eliminados o rotos (nicks), la molécula pasa a una forma relajada llamada ADN circular (Forma II). Las 2 cadenas del ADN circular no están cerradas covalentemente y se mantienen unidas por puentes de hidrógeno entre las bases.

El ADN plasmídico superenrollado purificado con el tiempo y lentamente desarrolla nicks y se convierte en Forma II, esto se debe a que el ADN en forma I no es estable como las formas circulares o relajadas.

El control de la replicación del plásmido depende del tipo de plásmido, existiendo plásmidos cuya replicación está acoplada con la replicación del cromosoma bacteriano y plásmidos cuya replicación no está relacionada con la del cromosoma. El tipo de genes que portan los plásmidos es variado, tratándose generalmente de genes que aportan ventajas adaptativas a la bacteria que los porta: genes de resistencia a antibióticos, genes de producción de sustancias tóxicas para otras bacterias o genes que codifican enzimas útiles para degradar sustancias químicas.

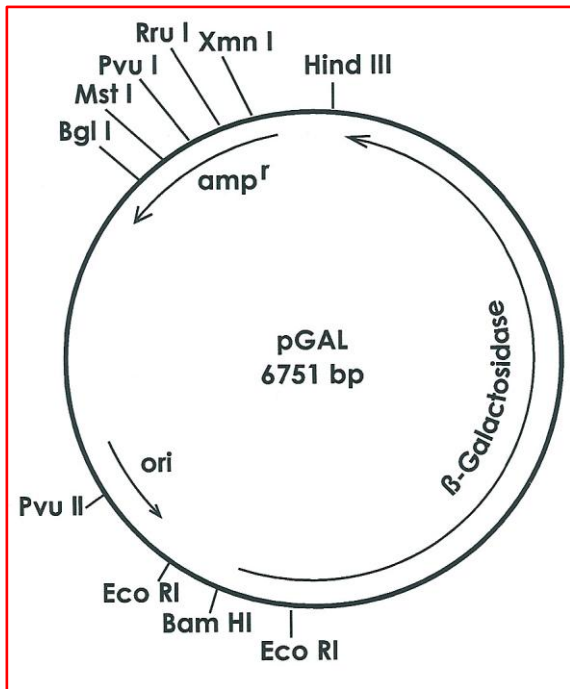
Los plásmidos se pueden clasificar siguiendo distintos criterios. Uno de estos criterios es el tipo de genes que portan. Así se define el grupo de plásmidos con genes de degradación de sustancias, el grupo de plásmidos con genes de fertilidad, el que porta genes de virulencia o el grupo que porta genes de resistencia.

Los plásmidos son herramientas muy útiles en ingeniería genética para la transformación génica y la manipulación genética de procariontes y eucariontes. Los plásmidos empleados en ingeniería genética se llaman vectores. Son muy útiles para sintetizar en grandes cantidades proteínas de interés, como la insulina o los antibióticos, mediante un procedimiento conocido como transformación. El proceso de transformación comienza con la selección de un plásmido adecuado, en el que se introducen los genes que se quieren expresar con protocolos específicos que usan enzimas de restricción y DNA ligasa. Posteriormente se transforma un tipo de bacteria con el plásmido modificado y se seleccionan las bacterias transformadas que produzcan las sustancias deseadas. Estas bacterias se cultivan en sistemas de tipo biorreactores para su crecimiento en grandes cantidades. En este proceso se eligen plásmidos con características que permitan seleccionar las bacterias transformadas en un medio de cultivo como por ejemplo plásmidos con genes de resistencia a antibióticos o con genes de enzimas que sintetizan compuestos coloreados.

Aunque los plásmidos no pueden sintetizar una envoltura proteica y se transfieren con dificultad de una célula a otra se ha hipotetizado que podrían ser los precursores de los primeros virus.

En este experimento el plásmido pGAL de 6751 pares de bases que ha sido modificado por ingeniería genética será aislado a partir de células bacterianas que se suministran con el kit. El

plásmido pGAL contiene el gen de E.coli que codifica para la β -galactosidasa que en presencia del galactósido artificial X-GAL producirá colonias de color azul , esto se debe a que cuando la β -galactosidasa rompe el X-GAL se produce un producto azul, esta propiedad permitirá distinguir en una placa de cultivo que células bacterianas tienen el plásmido pGAL. Además este plásmido confiere resistencia al antibiótico ampicilina ya que contiene el gen que codifica para la β -lactamasa que inactiva la ampicilina.



3. COMPONENTES

Pellets bacterianos que contiene el plásmido pGAL	25 unidades
DANAGENE Plasmid Mini Kit	25 extracciones

Componentes necesarios y NO suministrados

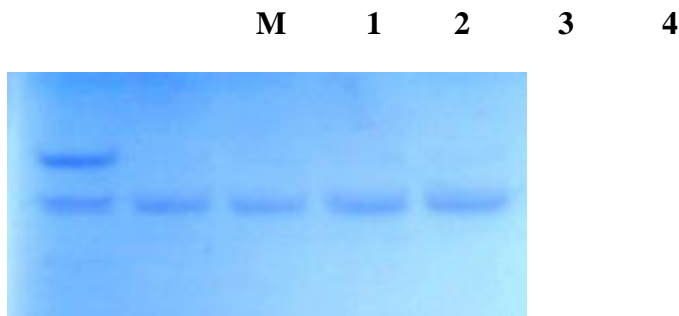
- Microcentrifuga.
- Microtubos y micropipetas.
- Etanol 100%.
- Sistema de electroforesis básico (aparatos y reactivos).
- Sistema de detección de ácidos nucleicos.

4. PRACTICA

Esta práctica que permite aislar el plásmido pGAL de células bacterianas se lleva a cabo con el kit comercial DANAGENE Plasmid Mini Kit (VER ANEXO), este kit permite la extracción del ADN plasmídico utilizando un método denominado de lisis alcalina y tratamiento con RNAsa que permiten la obtención de un lisado celular claro con mínima cantidad de ADN y ARN contaminante. En presencia de sales caotrópicas, el ADN plasmídico se une a las membranas de sílica de unas columnas presentes en el kit. Los contaminantes son eliminados con un tampón de lavado y el ADN plasmídico es eluido con un tampón de elución.

1. Si no se disponen de un sistema básico de electroforesis, contactar con el departamento técnico de DanaGen-BioTedi info@bioted.es que le podrá suministrar todos los materiales necesarios para llevar a cabo la electroforesis de los resultados de la extracción de ADN plasmídico.
2. Si no se dispone de un sistema de visualización del ADN propio (Bromuro de etidio, SBRY Green, etc) se le puede suministrar nuestro **DANABLUE** o GELSAFE (necesita un transiluminador UV).

5. RESULTADOS



M: Marcador peso molecular.

1. Plásmido pGAL.
2. Plásmido pGAL.
3. Plásmido pGAL.
4. Plásmido pGAL.

Tinción realizada con nuestro sistema NO TÓXICO DANABLUE

ANEXO

Protocolo de extracción de ADN plasmídico a partir de cultivos de 1-3 ml

1. **Resuspender el pellet bacteriano en 250 µl de Solución de Resuspensión+ 2.50 µl de TRUEBLUE Lysis control reagent** mediante agitación con vortex o pipeta, asegurándose de la completa resuspensión de las células.

NOTA: Preparar suficiente Solución de Resuspensión EP01/ TRUEBLUE Lysis control reagent para el número de minipreps que se han de realizar. Se formará un precipitado después de la adición del TRUEBLUE lysis control reagent que no afectará. Agite para su disolución.

2. **Lisar las células con 250 µl de Solución de Lisis** . Suavemente invertir el tubo 8-10 veces hasta que la mezcla aparezca clara y viscosa. **No utilizar vortex**. Se puede incubar 3 minutos, pero nunca más de 5 minutos.

3. **Neutralizar añadiendo 350µl de Solución de Neutralización / Unión** .Suavemente invertir el tubo 8-10 veces. Se recomienda la incubación durante 5 minutos en hielo.

4. **Centrifugar a máxima velocidad en una microcentrifuga durante 5 minutos**. Si hubiera partículas flotando en el sobrenadante, volver a centrifugar.

5. **Cuidadosamente pasar el sobrenadante a una Spin microcolumna con su tubo de recogida**.

6. **Centrifugar a máxima velocidad durante 30- 60 segundos**. Sacar la Spin microcolumna del tubo de recogida y colocar en un nuevotubo de recogida.

7. **Añadir 600 µl de Solución de Lavado en el reservorio de la spin microcolumna. Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.

8. **Realizar un 2º lavado. Añadir 600 µl de Solución de Lavado en el reservorio de la spin microcolumna. Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos**. Eliminar el líquido.

9. **Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar el etanol residual**.

10. Insertar la spin microcolumna en un microtubo de 1.5 ml nuevo. **Añadir 50- 100 µl de Tampón de elución en el reservorio de la spin microcolumna**.

11. **Incubar 1 minuto**. Se recomienda que el tampón esté a 55°C.

12. **Centrifugar a máxima velocidad durante 60 segundos**. El microtubo contiene ahora el ADN plasmídico.