

# Procedimientos para extracción de DNA plasmídico

Una de las finalidades de la introducción de DNA plasmídico en bacterias (por el empleo de distintas técnicas) es lograr la multiplicación de este material para poder obtener un gran número de copias idénticas del gen de interés (clonado molecular).

Usualmente es necesario llevar a cabo la purificación del DNA plasmídico a partir de un cultivo, tanto líquido como sólido, de bacterias transformadas para realizar estudios a nivel molecular. Los mismos pueden ser: determinación de tamaño, mapeo con enzimas de restricción, determinación de la secuencia nucleotídica, construcción de nuevos plásmidos híbridos, etc. Para cada uno de estos fines se requieren masas y grados de pureza diferentes. Por ejemplo, para la secuenciación automática se necesitan unos 350 nanogramos de un plásmido de alrededor de 4 kilopares de bases y un grado muy estricto de pureza, mientras que para observar retardo de migración en un gel se necesita sólo una colonia bacteriana (o parte de ella) y los requerimientos de pureza son mínimos.

## **1) Perfil plasmídico por electroforesis en gel de agarosa (Eckardt modificado)**

- a) Tomar con un escarbadiante una colonia bacteriana (de 1,5 a 2 mm de diámetro).
- b) Estriar a una placa con medio LB sólido con al antibiótico correspondiente y posteriormente resuspender (pipeteando suavemente dos o tres veces) el material restante en 16 µl de solución de lisis. Es importante evitar la formación de burbujas en esta etapa.
- c) Agregar 3 µl de solución III de *miniprep*. Homogeneizar por vorteadado suave (evitar burbujas).
- d) Centrifugar a 14000 rpm durante 4 minutos a temperatura ambiente.
- e) Sembrar el 15 µl del sobrenadante (sin tomar los restos celulares del *pellet*), en gel de agarosa 0,8-1%.

Solución de lisis

9 volúmenes de *buffer* de siembra 10x

11 volúmenes de agua bidestilada estéril

40 volúmenes de solución II de *miniprep*

*Buffer* de siembra 10X: 0,25% P/V bromophenol blue, 0,25% P/V xylene cyanol, 25% P/V ficoll tipo 400

Solución II de *miniprep*: 0,2 N Na OH y 1% SDS

Solución III de *miniprep*:

60 ml de 5M KAc (pH 4.8)

11,5 ml de AcH glacial

28,5 ml de agua

La solución resultante es 3M para el K y 5M para el Ac.

## **Referencias**

- 1) "Extraction and purification of plasmid DNA". Molecular cloning. Sambrook, Fritsch y Maniatis.
- 2) "A rapid procedure for the screening of recombinant plasmids". Le Gouill and Déry. *Nucl. Acids. Research*, 1991.
- 3) "A rapid Alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA". Birnboim. *Recombinant DNA methodology*, 1989.
- 4) "Preparation of plasmid DNA: a modified mini alkaline-lysis/ PEG precipitation procedure". *Applied Biosystems, Inc.*