

Transformación de bacterias E. coli

Para poder introducir DNA foráneo con alta eficiencia dentro de bacterias es necesario inducir el “estado de competencia” de las mismas. El tratamiento de cultivos bacterianos frescos, en fase logarítmica de crecimiento, con agentes químicos permite debilitar la estructura de su pared celular haciendo que se puedan introducir en las células DNAs derivados de distintas fuentes. Un requisito fundamental es que la manipulación de las bacterias durante el tratamiento químico, y después del mismo, sea muy cuidadosa, ya que al tener alterada la pared aumenta el grado de fragilidad de las bacterias.

Una alternativa al tratamiento químico es la electroporación, en este caso se somete a las bacterias a un campo eléctrico que desestabiliza a las estructuras de pared y membrana. Durante este proceso se inducen poros temporarios por los que ingresa el DNA en las bacterias. En este caso no es necesario inducir el “estado de competencia” previamente, simplemente las bacterias de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento se lavan varias veces para eliminar todas las sales que puedan estar presentes.

Preparación de bacterias E.coli DH5α competentes

- a) Crecer un cultivo de *E. coli* a 37°C con agitación vigorosa (190-200 rpm) en medio LB hasta alcanzar saturación (*overnight*).
- b) Diluir el inóculo al 1% medio, crecer a 37°C con agitación vigorosa (190-200 rpm) hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,8 a 1 (fase logarítmica tardía).
- c) Incubar las bacterias durante 5 minutos en agua- hielo.
- d) Centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
- e) Resuspender el pellet en 40 ml de TFB I a 0°C.
- f) Incubar la suspensión durante 5 minutos en agua- hielo.
- g) Centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
- h) Resuspender el total del *pellet* en 4 ml de TFB II.
- i) Incubar las bacterias durante 15 minutos en baño de agua- hielo.
- j) Fraccionar en tubos *Eppendorf* en alícuotas de 500 µl.
- k) Conservar a -80°C hasta su utilización.

Medio LB: disolver 10 gr de triptona, 10 gr de NaCl y 5 gr de extracto de levadura en un litro de agua bidestilada. Para preparar medio sólido incorporar 15 gr de agar por litro de medio.

TFBI		TFBII	
Acetato de K	30mM	Pipes o Mops	10mM
KCl	100mM	CaCl ₂	75mM
CaCl ₂	10mM	KCl	10mM
MnCl ₂	50mM	glicerol	15%
Glicerol	15%		

Preparación de bacterias E.coli DH5α competentes

- a) Crecer un cultivo de *E. coli* a 37°C con agitación vigorosa (190-200 rpm) en medio LB hasta alcanzar saturación (*overnight*).
- b) Diluir el inóculo al 1% medio, crecer a 37°C con agitación vigorosa (190-200 rpm) hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,5 a 0,6 (fase logarítmica tardía).
- c) Incubar las bacterias durante 10 a 15 minutos en agua- hielo.
- d) Centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- e) Resuspender cuidadosamente el *pellet* en 100 ml de CaCl₂ 100mM.
- f) Incubar la suspensión durante 30 minutos en agua- hielo.
- g) Centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- h) Resuspender cuidadosamente el *pellet* en 100 ml de MgCl₂ 100mM.
- i) Incubar 30 minutos en baño de agua- hielo.
- j) Centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- k) Resuspender cuidadosamente el *pellet* en 1 ml de solución de CaCl₂ 100mM, MgCl₂ 100mM y 30% de glicerol.
- l) Fraccionar en alícuotas de 50 a 100 µl en tubos *Eppendorf*.
- m) Conservar a -80°C hasta su utilización.

Preparación de bacterias E.coli DH5α electrocompetentes

- a) Inocular 1 litro de medio LB (sin NaCl) con 10 ml de un cultivo fresco saturado (cultivo *overnight*) para lograr una dilución 1/100 del cultivo original.
- b) Crecer a 37°C con agitación vigorosa (190-200 rpm) hasta alcanzar una OD₆₀₀:0.5
- c) Colocar el cultivo en hielo durante 15' a 30' .
- d) Distribuir 200 ml de cultivo en 5 "mamaderas" de 250 ml de capacidad.
- e) Centrifugar en rotor GSA (previamente enfriado) a 4000 rpm durante 10'.
- f) Remover todo el sobrenadante (lo mejor posible). Resuspender el total del *pellet* en 1000 ml de glicerol* al 10% (200 ml en cada "mamadera").
- g) Centrifugar a 4000 rpm durante 10'. Eliminar el sobrenadante.
- h) Resuspender el total del *pellet* en 500 ml de glicerol al 10% (100 ml en cada "mamadera").
- i) Centrifugar a 4000 rpm durante 10'. Eliminar el sobrenadante.
- j) Resuspender el total del *pellet* en 20 ml de glicerol al 10% (4 ml en cada "mamadera"). Juntar todas las fracciones en una sola "mamadera".
- k) Centrifugar a 4000 rpm durante 10'.
- l) Resuspender en un volumen final de 2 ml de glicerol al 10%.
- m) Congelar[#] en alícuotas de 100 µl.

***EL GLICEROL DEBE ESTAR FRÍO (4°C).**

#Las alícuotas deben congelarse rápidamente con etanol a -70°C.

Preparación de bacterias TOP10 electrocompetentes

- a) Inocular 5 ml de medio SOB con bacterias TOP10, cultivar a 37°C con agitación vigorosa (190-200 rpm) hasta alcanzar saturación (*overnight*).

- b) Diluir 1/100 el cultivo saturado en 250 ml de SOB fresco, crecer a 37°C con agitación vigorosa (200 rpm) hasta alcanzar una OD₅₅₀ de 0,55 a 0,65 (fase logarítmica tardía).
- c) Dividir el cultivo en dos “mamaderas” de 250 ml de capacidad e incubar en hielo durante 30 minutos.
- d) Centrifugar a 4000 rpm durante 10 a 15 minutos a 4°C.
- e) Eliminar el sobrenadante y resuspender cada *pellet* en 10 ml de solución FSB fría (0 a 4°C).
- f) Transferir a tubos estériles de 50 ml. Incubar en agua- hielo durante 15 minutos.
- g) Centrifugar a 4000 rpm durante 10 a 15 minutos a 4°C. Eliminar el sobrenadante.
- h) Eliminar el sobrenadante y resuspender cada *pellet* en 1,8 ml de solución FSB fría (0 a 4°C) usando una pipeta estéril de 5 ml.
- i) Agitar suavemente los tubos y agregar gota a gota, mezclando bien, 65 µl de DMSO a cada tubo.
- j) Incubar los tubos en hielo durante 15 minutos.
- k) Fraccionar en alícuotas de 50 µl en tubos *Eppendorf*.
- l) Congelar[#] en alícuotas de 100 µl.

[#]Las alícuotas deben congelarse rápidamente con etanol a -70°C.

SOB (para 1000 ml): disolver en 950 ml de agua bidestilada 20 g de bactotripton, 5 g de extracto de levadura y 0,5 g de NaCl. Agregar 10 ml de KCl 250 mM (1,86 g de KCl en 100 ml de H₂O), ajustar el pH a 7 con HCl y llevar a 1 litro. **Esterilizar.** Antes de usar agregar MgCl₂ hasta alcanzar una concentración final de 10 mM (19 g de MgCl₂ en 90 ml de H₂O, llevar el volumen a 100 ml y esterilizar).

Solución de transformación (FSB) (para 100 ml): 1 ml de acetato de K 1 M pH 7,5[#]; 890 mg de MnCl₂·4H₂O; 150 mg de CaCl₂·2H₂O; 750 mg de KCl; 80 mg de cloruro de cobalto hexamino; 10 ml de glicerol 100% y 80 ml de agua desionizada. Ajustar a pH 6,4 con HCl 0,1N. SI SE SUPERA EL pH ELIMINAR LA SOLUCIÓN, NO REAJUSTAR CON UNA BASE. Ajustar el volumen final a 100 ml con agua desionizada y esterilizar por filtración; almacenar a 4°C.

[#]9,82 gr de acetato de K, en 90 ml de agua desionizada, llevar a pH 7,5 con ácido acético 2 M, completar el volumen a 100 ml con agua destilada.

DMSO: usar una alícuota fresca del reactivo para cada preparación, descartar el volumen excedente.

Transformación química de bacterias E. coli

- a) Tomar 50 µl de bacterias competentes e incubarlas en baño de agua- hielo durante 10 minutos.
- b) Agregar 5 µl de la mezcla de ligación (entre 5 y 20 ng).
- c) Incubar 30 minutos en agua- hielo.
- d) Incubar a 42°C de 40 segundos a 2 minutos (no es conveniente exceder los 2 minutos de *shock térmico*).
- d) Colocar durante 10 minutos en agua- hielo.
- e) Agregar 200 µl de medio LB sin antibiótico e incubar a 37°C (preferentemente con agitación) durante 60 minutos.
- f) Plaquear 50 µl de la suspensión bacteriana en una placa con medio LB con antibiótico e incubar a 37°C de 12 a 16 horas. Agregar, para plásmidos que presentan α complementación, 2 µl de IPTG de

concentración inicial 1 M y 25 a 30 μ l de X-Gal (solución stock: 20 mg de la droga sólida disuelta en 1 ml de N, N-dimetilformamida) por placa chica.

Electroporación:

- a) Dejar descongelar las bacterias. Mezclar bien, en un tubo *Eppendorf* previamente enfriado, 100 μ l de bacterias competentes y de 1 a 5 μ l de la mezcla de ligación. Dejar en hielo durante 30" a 1'.
- b) "Setear" el *gene pulser* a 25 μ F y 2.2 kv; *el pulse controller* a 200 ohm (para una cubeta de electroporación de 2 mm)
- c) Poner la mezcla en una cubeta de electroporación fría y colocarla en el electroporador.
- d) Presionar los botones del electroporador hasta escuchar el sonido.
- e) Sacar la cubeta y agregar SOC (sin antibiótico) inmediatamente, resuspender rápidamente las bacterias (ello maximiza la recuperación de transformantes).
- f) Incubar 1h a 37°C y plaquear en cajas de medio LB con ampicilina (solución stock 100 mg/ ml, se considera como 1000x). Para plásmidos que presentan α complementación agregar (15' antes de sembrar), 2 μ l de IPTG (concentración inicial 1 M) y 25 a 30 μ l de X-Gal (solución stock: 20 mg de la droga sólida disuelta en 1 ml de N, N-dimetilformamida) para cada placa chica.

SOB (para 1000 ml): disolver en 950 ml de agua bidestilada 20 g de bactotripton, 5 g de extracto de levadura y 0,5 g de NaCl. Agregar 10 ml de KCl 250 mM (1,86 g de KCl en 100 ml de H₂O), ajustar el pH a 7 con HCl y llevar a 1 litro. **Esterilizar.** Antes de usar agregar MgCl₂ hasta alcanzar una concentración final de 10 mM (19 g de MgCl₂ en 90 ml de H₂O, llevar el volumen a 100 ml y esterilizar).

SOC: agregar al **SOB:** glucosa hasta alcanzar una concentración de 20mM final (debe estar esterilizada por filtración).

Eficiencia de transformación: en todos los casos, más allá del método de transformación empleado, es necesario establecer la eficiencia de transformación de las bacterias. Para ello se transforman las mismas con distintas concentraciones de un plásmido superenrollado correctamente cuantificado y se cuentan las colonias obtenidas. La eficiencia de transformación se expresa como número de colonias obtenidas/ μ g de DNA plasmídico superenrollado.

Para bacterias competentes por el método químico se espera obtener eficiencias de 10⁵- 10⁷ transformantes/ μ g de DNA plasmídico superenrollado; para bacterias electrocompetentes, 10⁹- 10¹⁰ transformantes.

Referencias:

- 1) "Preparation of competent E. coli.". Molecular cloning. Sambrook, Fritsch y Maniatis.
- 2) "Zero backgroundTM/ Kan cloning kit". Instruction manual. Invitrogen.
- 3) "Overview of electroporation and electrofusion". Chang *et al.*
- 4) "Electrotransformation of bacteria by plasmid DNA". Trevors *et al.*