

Módulo 2

Clonación y Selección de moléculas recombinantes

El fragmento de ADN amplificado por PCR en el módulo anterior se introdujo en un vector pGEM T Easy (Ver Anexo 2) utilizando una ligasa. En la primera clase de este módulo se transformarán células competentes de *E. coli* con el producto de esta ligación. El segundo día seleccionarán clones transformantes, en el tercer día extraerán el plásmido de estos clones. El cuarto día verificarán la presencia del inserto por digestión con enzimas de restricción apropiadas. El quinto día se analizarán los productos de las digestiones.

Día 1: Transformación

1. Fundamentos teóricos de la ligación, transformación, vectores y células huésped.
2. Descongelar las células competentes e incubarlas en hielo aproximadamente 10 minutos.
3. Agregar el ADN en un volumen igual o menor a 1/5 del volumen de las células competentes. Realizaremos transformaciones con: a) 1 a 5 ng de un plásmido puro (vector usado), de concentración conocida; b) mezcla de ligación, según instrucciones del docente y c) control negativo (sin ADN).
4. Dejar en hielo 15 minutos.
5. Incubar a 42°C por 90 segundos o a 37°C por 2 minutos.
6. Poner en hielo nuevamente por unos minutos.
7. Agregar 4 volúmenes de LB e incubar a 37°C con agitación suave por 50 minutos.
8. Plaquear 100 µl de estas incubaciones en placas de selección (LB agar ampicilina, X- gal, IPTG) con rastrillo. Plaquear así mismo las células huésped de partida en LB agar (medio no selectivo).
9. Incubar a 37°C durante la noche

Día 2: Selección de Transformantes.

10. Determinar el número de colonias blancas y azules. Calcular la eficiencia de transformación, en base a los resultados obtenidos de la transformación con el plásmido puro de concentración conocida.
11. Seleccionar una colonia blanca y sembrar un tubo de 2 ml conteniendo LB y 50 µg/ml de ampicilina; la ampicilina se agregará en el momento.
12. Incubar a 37°C durante la noche con agitación.

Día 3: Minipreparación de ADN plasmídico

13. Centrifugar 1.5 ml del cultivo crecido a 37° C durante toda la noche durante 30 seg a 12000 rpm. Descartar el sobrenadante, agregar el resto del cultivo en el mismo tubo y centrifugar nuevamente. Descartar el sobrenadante.
14. Resuspender el pellet bacteriano en 200 µl de la solución I.
15. Agregar 5 µl ARNasa 1 mg/ ml.
16. Agregar 200µl de la solución II y mezclar suavemente. Dejar 3 minutos a temperatura ambiente.
17. Agregar 200µl de la solución III. Mezclar y centrifugar 5 minutos a 12000 rpm.
18. Recuperar el sobrenadante.
19. Agregar 0.6 volúmenes de isopropanol. Agitar bien.
20. Dejar 5 minutos a temperatura ambiente.
21. Centrifugar 10 minutos a 12000 rpm.
22. Lavar el precipitado con etanol 70°
23. Centrifugar 5 minutos a 12000 rpm
24. Descartar el sobrenadante y dejar secar
25. Resuspender en 30 µl de agua destilada estéril.

Día 4: Visualización del ADN plasmídico
Digestión con enzimas de restricción

26. Preparar un minigel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X.
27. Sembrar un 5 µl de plásmido obtenido en el punto 25, junto con un marcador de peso molecular.
28. Realizar la migración.
29. Detener la corrida y visualizar bajo transiluminador de luz UV.
30. Teniendo en cuenta el mapa de restricción del vector pGEM-T Easy y el sitio de inserción del fragmento amplificado elija las enzimas de restricción que permitan escindir el inserto. También se digerirá con un enzima de restricción que da un corte dentro del inserto.

31. En todos los casos, pipetear en un tubo de microcentrífuga:

ADN obtenido en las miniprep.	5 μ l
Buffer de restricción 10x	2,5 μ l
Enzima	0,5 μ l
Agua c.s.p.	25 μ l

32. Incubar a 37°C durante dos horas.

33. Guardar a -20°C.

Día 5: Gel de electroforesis para verificar la presencia del inserto

34. Se utilizarán minigeles de poliacrilamida no desnaturalizante al 12 % preparados por el grupo anterior.

35. Se siembran las reacciones de digestión, los controles (plásmidos sin digerir) y un marcador de peso molecular adecuado. Se agrega buffer de carga.

36. Se deja migrar en buffer TBE 1X, a aproximadamente 100 V, hasta que el azul de bromofenol esté saliendo del gel. La migración demora en el entorno de 1 hora – 1 hora y media en la que se prepararán los minigeles para el grupo siguiente.

37. Se detiene la corrida y se tiñe con nitrato de plata (ver anexo 1).

38. Se determina el tamaño de los fragmentos obtenidos en las digestiones. Se mide la distancia migrada por las bandas del marcador de peso molecular y los productos de restricción.

Anexo 1: REACTIVOS Y SOLUCIONES

Ligación

Ver Anexo 2

Transformación

Preparación de células competentes XL1 Blue

1. Crecer un precultivo toda la noche a a partir de una colonia aislada en LB
2. Inocular con el precultivo 250 ml de medio y dejar crecer hasta una DO_{550nm} de 0,6.
3. Dejar en hielo durante 10 minutos.
4. Centrifugar a 2500 g durante 10 min a 4° C.
5. Resuspender las células suavemente en 80 ml de solución TB fría.
6. Dejar en hielo 10 min.
7. Centrifugar a 2500 g durante 10 minutos a 4° C
8. Resuspender las células suavemente en 20 ml de solución TB fría.
9. Agregar DMSO para obtener una concentración final de 7%
10. Dejar en hielo 10 min.
11. Alicuotar en 0.05 –2 ml y congelar preferentemente en nitrógeno líquido (de lo contrario congelar en un freezer a -80°C).

LB (Luria-Bertani)

Triptona	10g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10g
Agua c.s.p.	1L

Ajustar pH a 7,0 con NaOH 5N

Agar

Para preparar las placas de LB agregar agar a una concentración final de 15g/L

Solución TB

PIPES	10 mM
Piperazin-N,N'-bis 2-etansulfónico	
MnCl₂	55mM
CaCl₂	15 mM
KCl	250mM

Ajustar pH a 6,7 con KOH 5N antes de adicionar el MnCl₂

X-gal (2% en dimetilformamida)

5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

Se usan 40 μl por placa

IPTG (100mM)

Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido

Se usan 40 μl por placa

Ampicilina (50mg/ml; 100X)

Preparación de ADN plasmídico

-Solución I

Tris.HCl pH 8,0	50mM
EDTA	10 mM

-Solución II

NaOH	0,2 M
SDS	1%

-Solución III

Acetato de potasio pH 4,8	3M
----------------------------------	-----------

-Isopropanol

-Etanol 70°

-Agua destilada estéril

Digestiones con enzimas de restricción

-Enzimas de restricción

XbaI, PstI, EcoRI, HindIII, XhoI, KpnI; Sall

-Tampones correspondientes

-Agua destilada estéril

Electroforesis- gel de poliacrilamida

Preparación de los minigeles de acrilamida

1. Preparar 15 ml de acrilamida al 12 % en TBE 1X. Atención: La acrilamida sin polimerizar es neurotóxica por lo que se debe trabajar con guantes!
2. Agregar 150 µl de APS al 10 % y 15 µl de TEMED. Mezclar bien.
3. Verter la preparación en el molde correspondiente.
4. Esperar 30 minutos a que polimerice; montar en la cuba para realizar la corrida.

Soluciones

Acrilamida al 30%:

Acrilamida	29 g
N',N'- metilen-bisacrilamida	1 g
Agua csp.	100 ml.

TBE 5X:

54 g de Tris base
27,5 g de ácido bórico
20 ml de EDTA 0,5 M, pH 8,0

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina aprox. 99%.

APS 10%: Persulfato de amonio al 10% .

Tinción con nitrato de plata

1. Sumergir el gel en un recipiente con 150 ml de solución fijadora durante 5 minutos.
2. Pasar el gel a un recipiente con 150 ml de solución de nitrato de plata 2g/L durante 5 minutos.
3. Enjuagar el gel con 150 ml de agua destilada.
4. Sumergir el gel en recipiente con 150 ml de solución reveladora hasta que las bandas de ADN sean fácilmente visualizables.

Soluciones

Solución fijadora: 15 ml de EtOH, 750 µl de ácido acético glacial en 150 ml de agua.

Solución de plata: 2 g de nitrato de plata en 1L de agua destilada.

Solución reveladora: 30 g de hidróxido de sodio en 1L de agua destilada. En el momento se prepara la solución uso agregando 750 µl de formaldehído 37 % v/v a 150 ml de solución reveladora.

Anexo 2 - Mapa de restricción y protocolo deligación con pGEM-T Easy

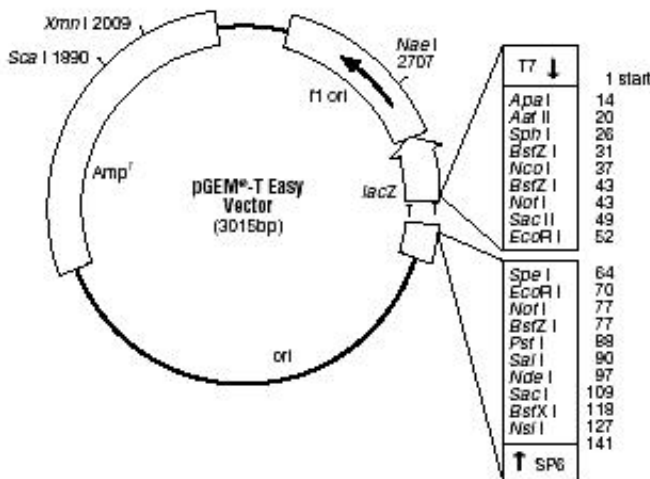


Figure 3. pGEM[®]-T Easy Vector circle map and sequence reference points.

pGEM[®]-T Easy Vector Sequence reference points:

T7 RNA Polymerase transcription initiation site	1
SP6 RNA Polymerase transcription initiation site	141
T7 RNA Polymerase promoter (-17 to +3)	2999-3
SP6 RNA Polymerase promoter (-17 to +3)	139-158
multiple cloning region	10-128
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operon sequences	2836-2996, 166-395
<i>lac</i> operator	200-216
β -lactamase coding region	1337-2197
phage f1 region	2380-2835
binding site of pUC/M13 Forward Sequencing Primer	2956-2972
binding site of pUC/M13 Reverse Sequencing Primer	176-192

D. pGEM[®]-T Easy Vector Restriction Sites

The pGEM[®]-T Easy Vector has been linearized at base 60 with *EcoRV* and a T added to both 3'-ends. This site will not be recovered upon ligation of the vector and insert. The tables were constructed using DNASTAR[®] sequence analysis software. Please note that we have not verified this information by restriction digestion with each enzyme listed. The location given specifies the 3'-end of the cut DNA (the base to the left of the cut site). Please contact your local Promega Branch Office or Distributor if you identify a discrepancy. In the U.S., contact Technical Services at 1-800-356-9526.

Table 7. Restriction Enzymes That Cut the pGEM[®]-T Easy Vector Between 1 and 5 Times

Enzyme	# of Sites	Location	Enzyme	# of Sites	Location
<i>Aat</i> II	1	20	<i>Fsp</i> I	2	1632, 2855
<i>Acc</i> I	1	91	<i>Hae</i> II	4	395, 765, 2755, 2763
<i>Acy</i> I	2	17, 1947	<i>Hga</i> I	4	628, 1206, 1936, 2821
<i>Afl</i> III	2	114, 517	<i>Hinc</i> II	1	92
<i>Alw</i> 26 I	2	1471, 2247	<i>Hind</i> II	1	92
<i>Alw</i> 44 I	2	831, 2077	<i>Hsp</i> 92 I	2	17, 1947
<i>Alw</i> NI	1	933	<i>Mae</i> I	5	65, 1012, 1265, 1600, 2755
<i>Apa</i> I	1	14	<i>Mlu</i> I	1	114
<i>Asp</i> H I	4	109, 835, 1996, 2081	<i>Nae</i> I	1	2707
<i>Ava</i> II	2	1548, 1770	<i>Nci</i> I	4	30, 897, 1593, 1944
<i>Ban</i> I	3	261, 1358, 2641	<i>Nco</i> I	1	37
<i>Ban</i> II	3	14, 109, 2679	<i>Nde</i> I	1	97
<i>Bbu</i> I	1	26	<i>Not</i> I	1	2705
<i>Bgl</i> I	4	39, 42, 1530, 2848	<i>Not</i> I	2	43, 77
<i>Bsa</i> I	1	1471	<i>Nsi</i> I	1	127
<i>Bsa</i> A I	1	2604	<i>Nsp</i> I	2	26, 521
<i>Bsa</i> H I	2	17, 1947	<i>Pae</i> R7 I	1	2636
<i>Bsa</i> J I	5	37, 46, 256, 677, 2951	<i>Ppu</i> 10 I	1	123
<i>Bsp</i> 120 I	1	10	<i>Pst</i> I	1	88
<i>Bsp</i> H I	2	1237, 2245	<i>Pvu</i> I	2	1780, 2876
<i>Bsp</i> M I	1	77	<i>Pvu</i> II	2	341, 2905
<i>Bss</i> S I	2	690, 2074	<i>Rsa</i> I	1	1890
<i>Bst</i> O I	5	257, 545, 666, 679, 2952	<i>Sac</i> I	1	109
<i>Bst</i> X I	1	118	<i>Sac</i> II	1	49
<i>Bst</i> Z I	3	31, 43, 77	<i>Sal</i> I	1	90
<i>Cfr</i> 10 I	2	1490, 2705	<i>Sca</i> I	1	1890
<i>Dde</i> I	4	792, 1201, 1367, 1907	<i>Sin</i> I	2	1548, 1770
<i>Dra</i> I	3	1276, 1295, 1987	<i>Spe</i> I	1	64
<i>Dra</i> III	1	2604	<i>Sph</i> I	1	26
<i>Drd</i> I	2	625, 2559	<i>Sse</i> 8387 I	1	88
<i>Dsa</i> I	2	37, 46	<i>Ssp</i> I	2	2214, 2396
<i>Eag</i> I	3	31, 43, 77	<i>Sty</i> I	1	37
<i>Ear</i> I	3	401, 2205, 2893	<i>Taq</i> I	5	56, 91, 617, 2061, 2637
<i>Ecl</i> HK I	1	1410	<i>Tfi</i> I	2	352, 492
<i>Eco</i> 52 I	3	31, 43, 77	<i>Vsp</i> I	3	288, 347, 1582
<i>Eco</i> CR I	1	107	<i>Xmn</i> I	1	2009
<i>Eco</i> R I	2	52, 70			
<i>Eco</i> RV	1	60 (see above)			
<i>Fok</i> I	5	134, 1376, 1557, 1844, 2931			

Note: The enzymes listed in boldface type are available from Promega.

Table 8. Restriction Enzymes That Do Not Cut the pGEM®-T Easy Vector.

<i>Acc</i> B7 I	<i>Bbs</i> I	<i>Bst</i> 98 I	<i>Fse</i> I	<i>Pme</i> I	<i>Spl</i> I
<i>Acc</i> III	<i>Bcl</i> I	<i>Bst</i> E II	<i>Hind</i> III	<i>Pml</i> I	<i>Srf</i> I
<i>Acc</i> 65 I	<i>Bgl</i> II	<i>Bsu</i> 36 I	<i>Hpa</i> I	<i>Ppu</i> M I	<i>Stu</i> I
<i>Afl</i> II	<i>Blp</i> I	<i>Cla</i> I	<i>I-Ppo</i> I	<i>Psh</i> A I	<i>Swa</i> I
<i>Age</i> I	<i>Bpu</i> 1102 I	<i>Csp</i> I	<i>Kas</i> I	<i>Psp</i> 5 II	<i>Tth</i> 111 I
<i>Asc</i> I	<i>Bsa</i> B I	<i>Csp</i> 45 I	<i>Kpn</i> I	<i>Psp</i> A I	<i>Xba</i> I
<i>Ava</i> I	<i>Bsa</i> M I	<i>Dra</i> II	<i>Nar</i> I	<i>Rsr</i> II	<i>Xcm</i> I
<i>Avr</i> II	<i>Bsm</i> I	<i>Eco</i> 47 III	<i>Nhe</i> I	<i>Sfi</i> I	<i>Xho</i> I
<i>Bal</i> I	<i>Bsr</i> BR I	<i>Eco</i> T2 I	<i>Nru</i> I	<i>Sgf</i> I ^(K)	<i>Xma</i> I
<i>Bam</i> HI	<i>Bsr</i> G I	<i>Eco</i> 81 I	<i>Pac</i> I	<i>Sgr</i> A I	
<i>Bbe</i> I	<i>Bss</i> H II	<i>Eco</i> N I	<i>Pfi</i> M I	<i>Sma</i> I	
<i>Bbr</i> P I	<i>Bst</i> 1107 I	<i>Ehe</i> I	<i>Pin</i> A I	<i>Sna</i> B I	

Note: The enzymes listed in boldface type are available from Promega.

Table 9. Restriction Enzymes That Cut the pGEM®-T Easy Vector 6 or More Times.

<i>Acl</i> I	<i>Bst</i> 71 I	<i>Hae</i> III	<i>Mbo</i> I	<i>Nla</i> III	<i>Tru</i> 9 I
<i>Afu</i> I	<i>Bst</i> U I	<i>Hinf</i> I	<i>Mbo</i> II	<i>Nla</i> IV	<i>Xho</i> II
<i>Bbv</i> I	<i>Cfo</i> I	<i>Hpa</i> II	<i>Mnl</i> I	<i>Ple</i> I	
<i>Bsa</i> O I	<i>Dpn</i> I	<i>Hph</i> I	<i>Mse</i> I	<i>Sau</i> 3A I	
<i>Bsp</i> 1286 I	<i>Dpn</i> II	<i>Hsp</i> 92 II	<i>Msp</i> I	<i>Sau</i> 96 I	
<i>Bsr</i> I	<i>Eae</i> I	<i>Mae</i> II	<i>Msp</i> A1 I	<i>Scr</i> F I	
<i>Bsr</i> S I	<i>Fxu</i> 4H I	<i>Mae</i> III	<i>Nde</i> II	<i>Sfa</i> N I	

Note: The enzymes listed in boldface type are available from Promega.

Protocolo de ligación utilizado

A. Protocol

1. Briefly centrifuge the pGEM®-T or pGEM®-T Easy Vector and Control Insert DNA tubes to collect contents at the bottom of the tube.
2. Set up ligation reactions as described below. Note: Use 0.5ml tubes known to have low DNA-binding capacity (e.g., VWR Cat.# 20170-310).
3. Vortex the 2X Rapid Ligation Buffer vigorously before each use.

	Standard Reaction	Positive Control	Background Control
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5µl	5µl	5µl
pGEM®-T or pGEM®-T Easy Vector (50ng)	1µl	1µl	1µl
PCR product	Xµl*	–	–
Control Insert DNA	–	2µl	–
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl)	1µl	1µl	1µl
deionized water to a final volume of	10µl	10µl	10µl

*Molar ratio of PCR product:vector may require optimization (see Section III.C).

4. Mix the reactions by pipetting. Incubate the reactions 1 hour at room temperature.

Alternatively, if the maximum number of transformants is required, incubate the reactions overnight at 4°C.