

# 38. Purificación de ADN plasmídico y electroforesis del mismo en gel de agarosa

José Luis Caballero Repullo, Enriqueta Moyano, Juan Muñoz Blanco

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba*

## RESUMEN

Los plásmidos son moléculas pequeñas de ADN circular muy comunes en bacterias que se replican de modo autónomo e independiente del cromosoma de la célula. Constituyen una herramienta fundamental en Biología Molecular e Ingeniería Genética ya que se pueden usar como “vectores” para introducir en ellos cualquier fragmento de ADN de interés y de esta forma amplificarlo (es lo que se llama “clonar” un fragmento de DNA). La obtención de grandes cantidades de ADN puro de estos “vectores” es fundamental en aplicaciones posteriores. En esta práctica se realizará el aislamiento y purificación de un ADN plasmídico mediante la utilización de un “kit” de uso rutinario en laboratorios de Biología Molecular. Posteriormente se visualizará mediante electroforesis en gel de agarosa.

*Palabras clave:* agarosa, aislamiento, lisis, plásmido, UV, vector

*Abreviaturas empleadas.* ADN: ácido desoxirribonucleico; EtBr, bromuro de etidio; UV: luz ultravioleta.

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los plásmidos son moléculas pequeñas de ADN circular capaces de replicarse de forma autónoma, independientemente del cromosoma. Son muy comunes en bacterias y algunos de ellos, los más pequeños, existen en las células bacterianas en un número elevado (hasta 100 copias por célula). Los plásmidos son una herramienta fundamental en Biología Molecular e Ingeniería Genética ya que se pueden usar como “vectores” para introducir en ellos cualquier fragmento de ADN de interés y de esta forma amplificarlo de forma natural dentro de la bacteria en la que el plásmido se replica (es lo que se llama “clonar” un fragmento de DNA). Existen muchos plásmidos disponibles para usar con este fin y la mayoría contienen al menos los siguientes elementos:

-Un origen de replicación autónomo para *E. coli* (ej. ColE1) que permite la replicación autónoma en esta bacteria.

-Un gen que confiere a la bacteria portadora del plásmido resistencia a algún antibiótico, generalmente ampicilina.

-Un sitio de clonación múltiple en el que se encuentra dianas únicas para varias enzimas de restricción y que permite la introducción del ADN a clonar.

Un método que permite visualizar ADN plasmídico o fragmentos del mismo es la electroforesis en gel de agarosa, en la cual se separan en función de su tamaño. Esta técnica consiste en someter la mezcla de moléculas de ADN embebidas en un gel de agarosa a un campo eléctrico. Las moléculas de ADN son atraídas al polo positivo debido a la carga neta negativa de ambas cadenas consecuencia de sus grupos fosfato. Las moléculas más pequeñas migran más rápido que las grandes al verse menos “frenadas” por el gel de agarosa en su desplazamiento. Cuando los fragmentos se han separado, el gel se sumerge en una solución que contiene bromuro de etidio y luego se ilumina con luz UV. El bromuro de etidio (EtBr) es una molécula plana con afinidad por el ADN que se intercala entre las pares de bases y que tiene la particularidad de que fluoresce cuando está unido a él. Al iluminar el gel con luz UV se ven bandas de fluorescencia que corresponden a moléculas de ADN.

La obtención de altas cantidades de ADN plasmídico puro es fundamental a la hora de analizarlo o utilizar a éste como vector en aplicaciones posteriores. El avance de la ingeniería genética y de las técnicas de ADN recombinante ha supuesto un aumento del número y variedad de técnicas de purificación de ADN. En comparación con métodos tradicionales (que utilizan fenol u otros reactivos tóxicos), los nuevos métodos utilizan reactivos no peligrosos, mientras que mantienen un alto rendimiento y pureza del producto final. El objetivo de esta práctica es el aislamiento y purificación de un ADN plasmídico que contiene un fragmento de cDNA correspondiente a un gen que se expresa en el proceso de maduración del fruto de fresa. Este paso es previo y necesario para la caracterización posterior del gen. Se utilizará un “kit” de aislamiento y purificación de plásmidos que se usa de modo rutinario en laboratorios de Biología Molecular. Posteriormente, se visualizará, mediante electroforesis en gel de agarosa.

## **2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO**

- Ampicilina.
- Medio de cultivo LB.
- Puntas estériles.
- Pipetas automáticas.
- Hielo picado en escamas.
- Agua destilada.
- Tanques, camas y peines de electroforesis.
- Fuente de alimentación.
- Agarosa.
- EtBr.
- Microcentrífugas.
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml.
- Vaso de precipitado (para desecho).
- Erlenmeyer de 100 ml.
- Microondas.
- Balanza.
- Cinta adhesiva.
- TBE.
- Solución de resuspensión celular (solución 1).
- Solución de lisis celular (solución 2).

Solución de neutralización (solución 3).

### 3. PROTOCOLO A REALIZAR

#### 3.1. Obtención de un lisado celular y purificación del ADN plasmídico

**Nota:** Se suministrará el cultivo bacteriano para la realización de esta práctica.

1. Transferir un cultivo de noche (1-2 ml) de células portadoras del plásmido a un tubo eppendorf (1,5 ml) de microcentrífuga. Centrifugar las células durante 30 s. Eliminar el sobrenadante por aspiración o con una pipeta.

2. Añadir 200µl de Solución 1 (solución de resuspensión celular) y mezclar mediante agitador (“vortex”) o pipeteando arriba y abajo hasta que la resuspensión sea homogénea.

3. Añadir 250 µl de Solución 2 (solución de lisis celular) y mezclar suavemente invirtiendo el tubo cerrado una 10 veces (no mezclar con agitador). La solución debe hacerse viscosa ligeramente transparente, señal de que las células se han lisado.

4. Añadir 250µl de Solución 3 (solución de neutralización) y mezclar suavemente invirtiendo el tubo unas 10 veces (NO AGITAR!). Un precipitado blanco debe de aparecer.

5. Centrifugar en una microfuga durante 10 min.

**Nota:** a) (Mientras que la centrifugación se realiza insertar un Filtro de Centrifugación (“Spin Filter”) en uno de los tubos de 2 ml (Tubos de lavado) que se suministran.

b) Mezclar la solución 4 (“Quantum Prep Matrix”) que contiene la matriz purificadora mediante agitación del bote en la que se suministra hasta asegurar que la matriz está totalmente resuspendida)

6. Transferir el sobrenadante (lisado) al Filtro de centrifugación, añadir 200µl de la Solución 4 resuspendida y mezclar todo mediante pipeteo arriba y abajo. (Suponiendo que haya varias muestras, primero se transfiere el lisado de todas, luego se añade la matriz a todas y se mezcla)

7. Centrifugar durante 30 s.

8. Retirar con cuidado el Filtro de Centrifugación, descartar el filtrado del tubo y colocar de nuevo el Filtro en el mismo tubo (ya vacío). Añadir 500 µl de Solución 5 (“Wash Buffer”) y lavar la matriz mediante centrifugación durante 30 s.

9. Repetir el paso anterior, pero esta vez centrifugar durante 2 min para eliminar cualquier residuo de etanol.

10. Retirar el Filtro de Centrifugación y colocarlo en un tubo eppendorf limpio de 1,5 ml. Añadir 100µl de H<sub>2</sub>O calentada a 70 °C y dejar humedecer 1 min.

11. Recuperar la solución que contiene el ADN, mediante centrifugación durante 1 min.

12. Descartar el Filtro de Centrifugación y guardar el ADN a -20 °C.

**Nota:** Todas las centrifugaciones se realizan en centrífuga de tubos eppendorf y a velocidad máxima (12-14.000 rpm).

### 3.2. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa

1. Fabricación del gel de agarosa al 1 %:

En un matraz mezclar una cantidad adecuada de agarosa (1 g) con tampón TBE (100 ml). Calentar la mezcla (agarosa + TBE) con la ayuda de un microondas u hornillo eléctrico hasta fundir y disolver completamente la agarosa (¡cuidado al agitar el matraz, que la agarosa al calentarse puede salpicar abruptamente fuera del matraz y producir serias quemaduras!). Añadir 5 µl de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml).

**(NOTA MUY IMPORTANTE: el bromuro de etidio es una solución muy tóxica. Debe evitarse en todo momento el contacto con la misma. ¡Usar guantes para protección!)**

Dejar enfriar ligeramente la mezcla (gel) hasta que alcance una temperatura de entre 50 °C a 60 °C y verterla, seguidamente, sobre una “cama electroforética”, previamente preparada, colocando el “peine” adecuado para formar los pocillos.

Dejar enfriar SIN MOVER a temperatura ambiente hasta que gelifique completamente.

2. En un tubo eppendorf limpio añadir 20 µl (10 µl del ADN aislado anteriormente + 10 µl de agua) de la disolución de ADN y 3 µl de “tampón de carga”.

3. Centrifugar ligeramente la mezcla SÓLO si hay demasiadas gotas repartidas dentro del tubo, con objeto de recoger todo el volumen de muestra.

4. Depositar la muestra en uno de los pocillos del gel de agarosa al 1% previamente fabricado (éste se ha colocado con anterioridad sumergido en tampón TBE en una cubeta de electroforesis)

5. Cerrar o tapar la cubeta de electroforesis, colocar los electrodos de tal forma que el polo negativo quede al lado de los pocillos y el polo positivo en el extremo opuesto del gel, hacia donde va a migrar el ADN, y aplicar una corriente eléctrica continua de 100-120 voltios

6. Detener la electroforesis tras unos 60 minutos o cuando el colorante haya recorrido las tres cuartas partes del gel. Visualizar el ADN con ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta.

**Nota:** La luz UV de onda corta es sumamente peligrosa (produce daños en el ADN), por lo que ha de evitarse a toda costa la exposición de ojos y piel sin protección alguna (gafas, etc.)

#### **4. RESULTADOS ESPERADOS**

Mediante la utilización de este método de extracción y purificación se obtendrá ADN plasmídico de gran pureza. El rendimiento será alrededor de 25 µg de ADN en 1,5 ml de cultivo. Mediante la visualización en el gel de agarosa se podrá obtener una cuantificación de la cantidad de plásmido obtenido en relación al patrón que se utilice en la electroforesis.

#### **5. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS**

Existen varios parámetros críticos para obtener un resultado óptimo. Los cultivos en medio LB deberían ser crecidos hasta 1-1'5 A<sub>600</sub> unidades/ml o 1 x 10<sup>9</sup> células/ml. Las columnas no deben ser sobrecargadas con DNA plasmídico, para ello deben de usarse los volúmenes de cultivo que se indican en el protocolo. Almacenar las columnas y las soluciones a las temperaturas recomendadas.

La composición exacta de las soluciones utilizadas en los "kit" no se conocen normalmente. En general, la solución 1 se basa en un tampón Tris pH 8 para la resuspensión de las células. La solución de lisis (solución 2) está compuesta por sosa y SDS. La solución 3 por acetato potásico pH 5,5 que permite la neutralización del lisado antes de cargarlo en la columna.

#### **6. BIBLIOGRAFÍA**

- Sambrook J, Russell DW (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Birren B, Ed (1999) Genome Analysis. A Laboratory Manual Series, 4 Volúmenes. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Davis LG, Dibner MK, Battey JF (1986) Basic Methods in Molecular Biology. Elsevier.

#### **ANEXO 1: MEDIOS, SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO**

**Medio LB:** Para 1 l  
Bacto-triptona 10 g  
NaCl 10 g  
Extracto de levadura 5 g

**Solución 1:**  
Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, 10 mM EDTA

**Solución 2:**  
NaOH 200 mM, SDS 1 % (w/v)

**Solución 3:**

Acetato potásico 3,1 mM pH 5,5

**Solución tampón 10X TBE:**

<b>Tabla 1. Solución tampón 10X TBE.</b>		
	<b>2 litros (g)</b>	<b>1 litro (g)</b>
"Tris base"	216	108
Ácido bórico	110	21,05
Na <sub>2</sub> -EDTA	14,8	2,45
Agua destilada	Hasta 2 litros	Hasta 1 litro