



Transformación

Laboratorio de Genética Molecular
de Eucariotas

2010-2

**!Vamos a meter el plásmido en la
bacteria!**

Transformación

Se refiere al proceso de alterar una célula de forma que adquiera y exprese material genético del ambiente que la rodea

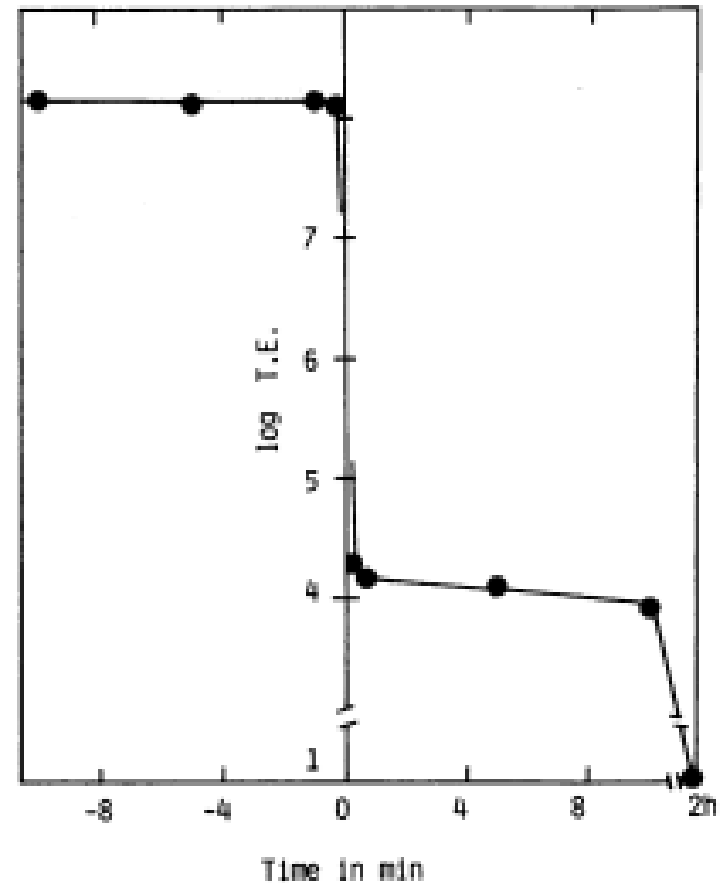
Transformación

- Esferoplastos
 - Células desprovistas de pared por digestión enzimática
 - Permeabilización exceso Ca^{++}
 - Organismos que no pueden inducir competencia
- Electroporación
- Acetato de Litio (LiAc) – Cloruro de Calcio (CaCl_2)
 - Simple
 - Altamente Reproducible
 - Plásmidos autoreplicativos
 - Plásmidos integrativos

Electroporación

- Pulso eléctrico crea poros acuosos por donde entra el ADN

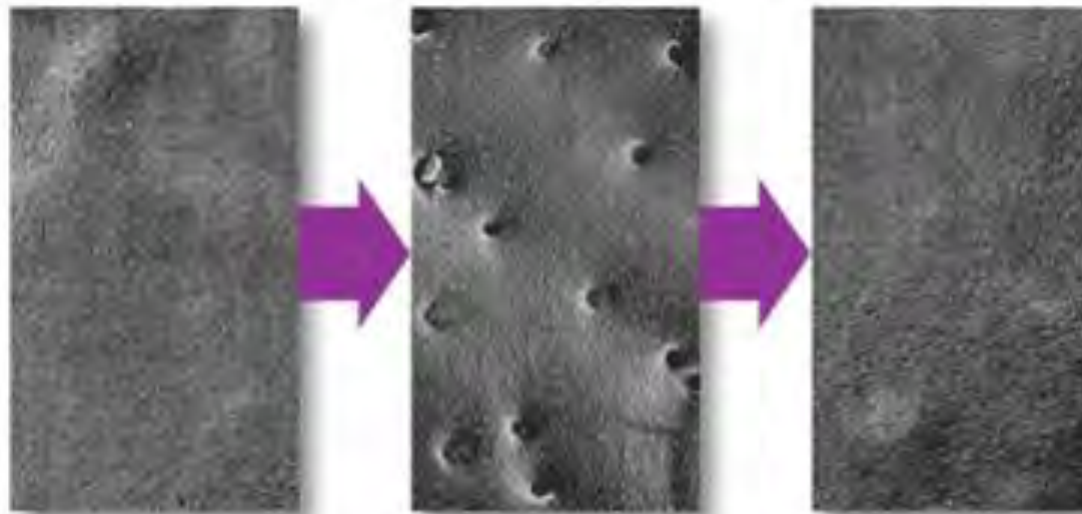
- Porceso reversible
- Estabilidad a $<10^{\circ}\text{C}$
- <http://gmcrops.yolasite.com/roporation.gif>
- Difusión



Electroporación

- Pulso electrico crea poros acuosos por donde entra el ADN

The phenomenon of electroporation



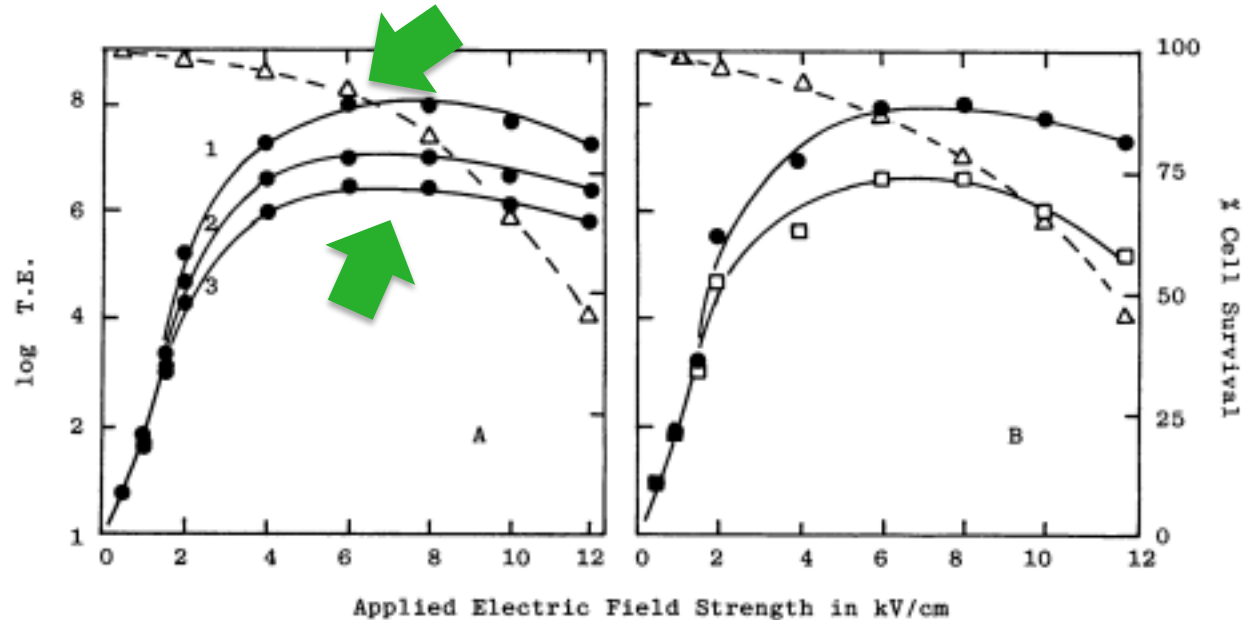
Cell membrane
before pulsing

Cell membrane
during pulsing

Cell membrane
after pulsing
/cell returns to

- *Controlled, millisecond electrical pulses induce temporary pores in the cell membrane*
- *Cell membrane reseals and is left unharmed*

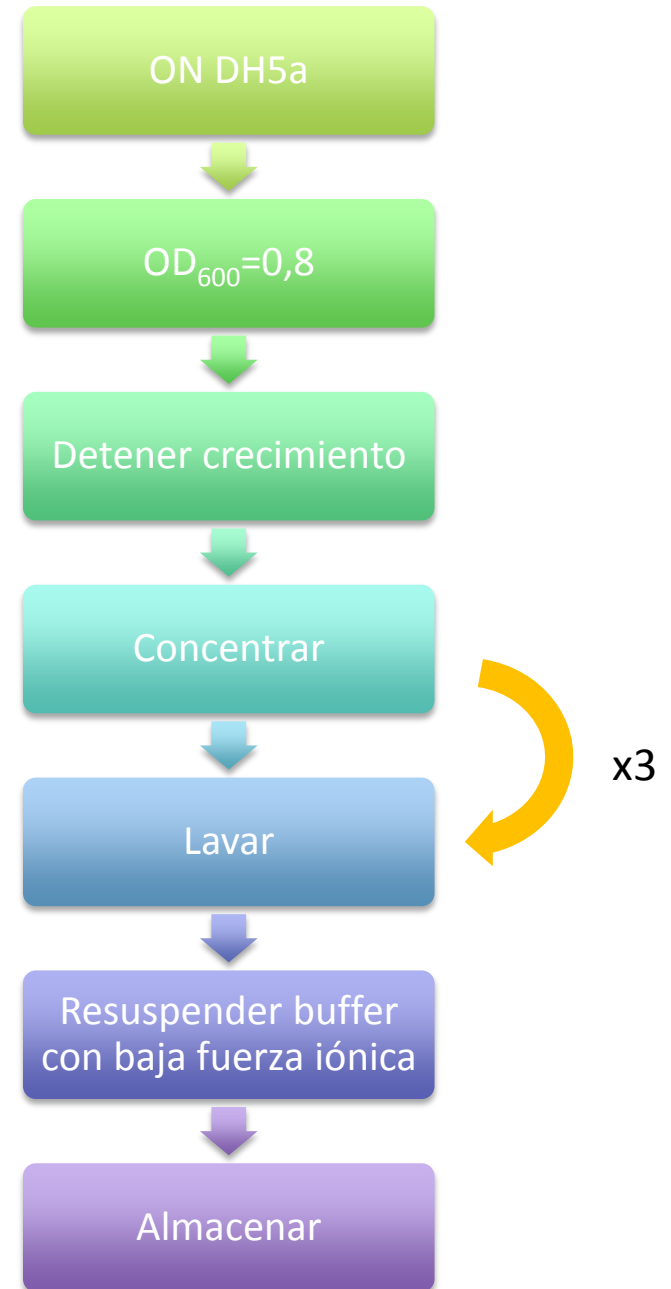
Electroporación



- La eficiencia de transformación aumenta con valores grandes de $E \tau^{1/2}$
 - 2,2-4,6 ms
- Pulso depende del organismo y de la longitud de la cuveta
 - 1,25V

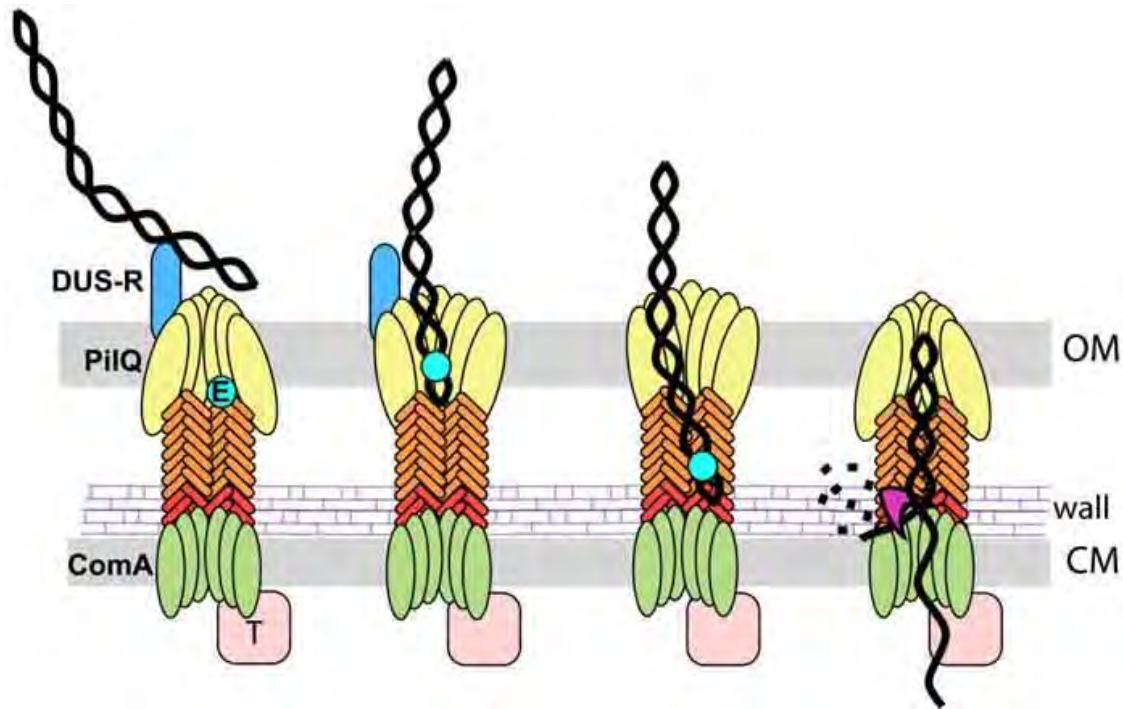
Electrocompetencia

- Fase óptima de crecimiento
 - $OD_{600}=0,3$
 - Log temprana
 - $OD_{600}=0,7-0,8$
 - Log media
- Lavados
 - Retirar exceso de sales
 - Prevenir “arcing”
 - Disminuir conductividad
 - Aumentar resistencia
- Glicerol
 - Conservar a -80

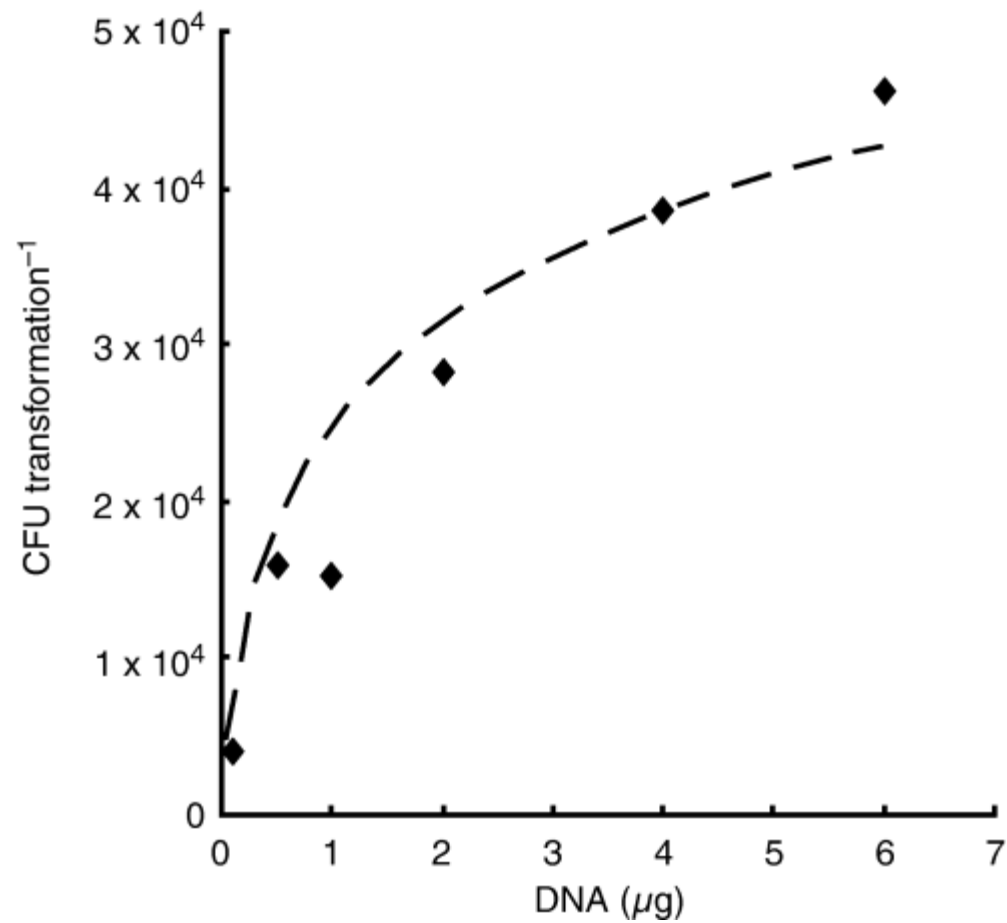


Transformación Química

- Utiliza CaCl_2 para facilitar la unión del ADN a las paredes de las células
- Heat-shock (42°C)



- Löfblom et al, 2007



Quimiocompetencia

Electroporación

- Electroporador
- Fácil y rápido
- Cantidad de ADN directamente proporcional a eficiencia de transformación
- $1 \times 10^{9-10}$ UFC/ μ g ADN

Transformación Química

- Conocimiento previo
- Más largo
- Saturación a altas concentraciones de ADN
- $1 \times 10^{4-6}$ UFC/ μ g ADN

¿Cómo selecciono las bacterias que adquirieron el plásmido (transformantes)?

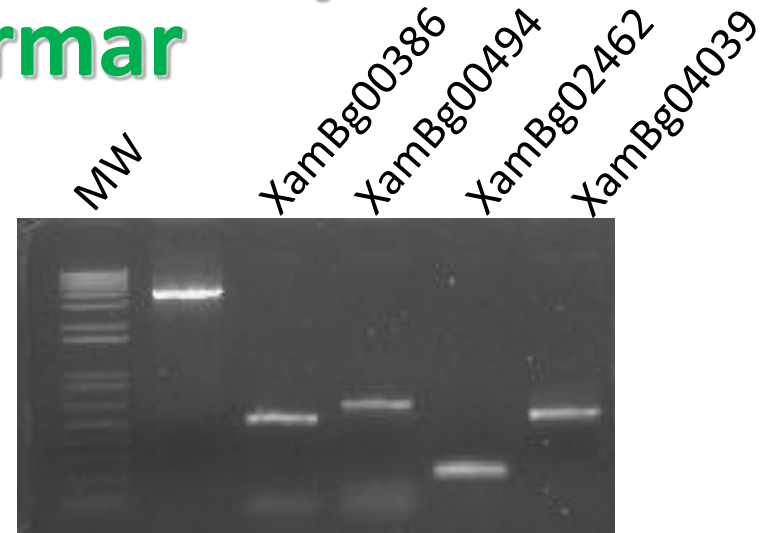


¿How to make your own plasmid? Seleccionar

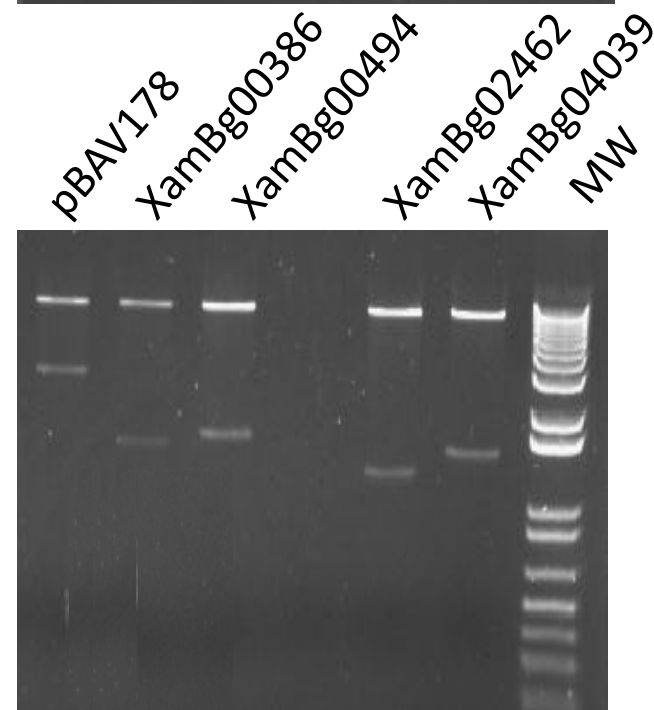


¿How to make your own plasmid? Confirmar

- PCR



- Mapa de restricción

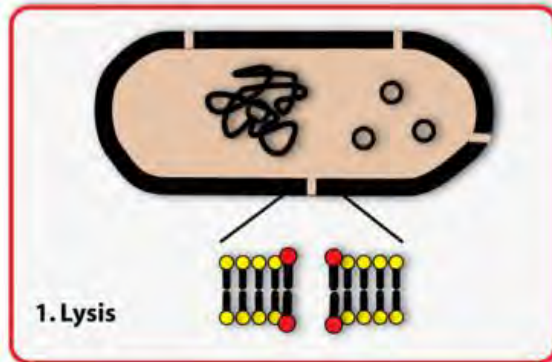


- Secuenciación!

**¡Vamos a sacar el plásmido de la
bacteria!**

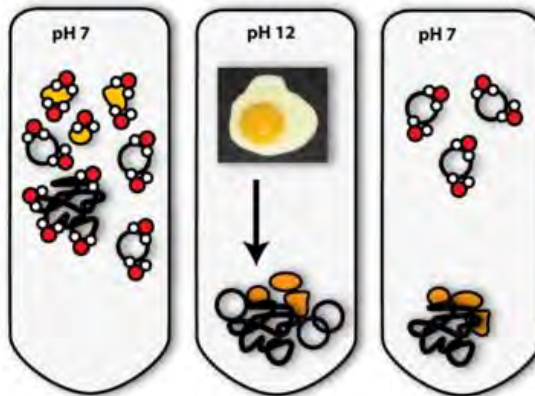


Miniprep

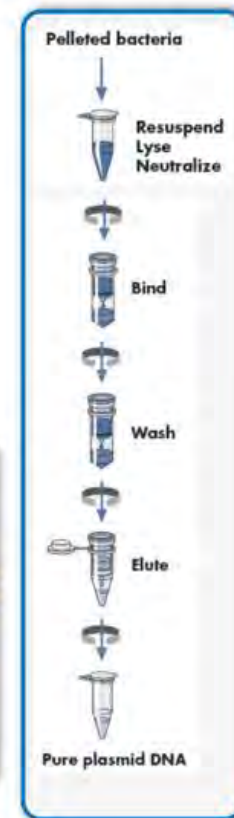
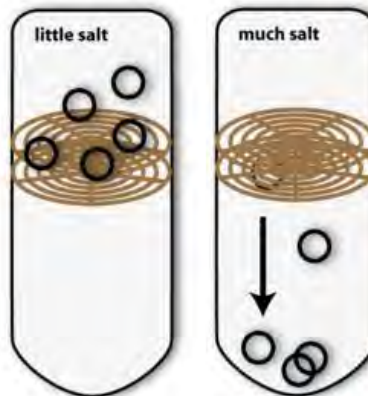


Minipreparation via alkaline lysis

2. Separation of Plasmids

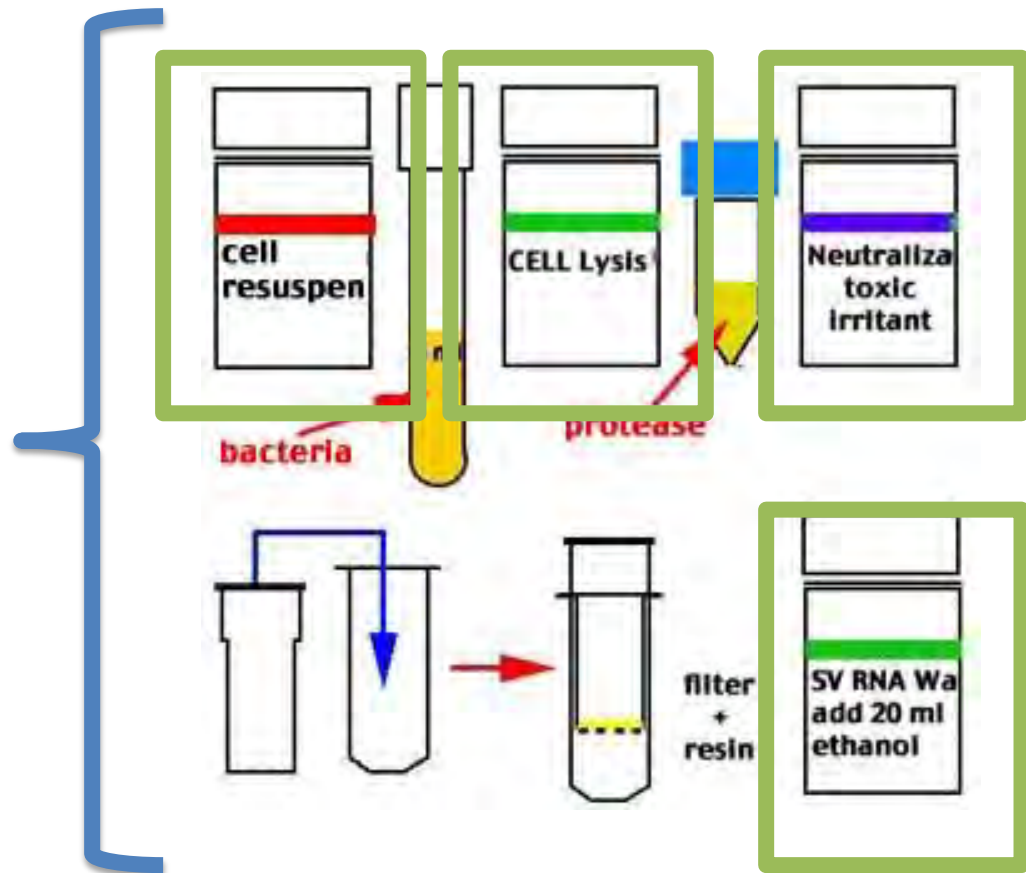
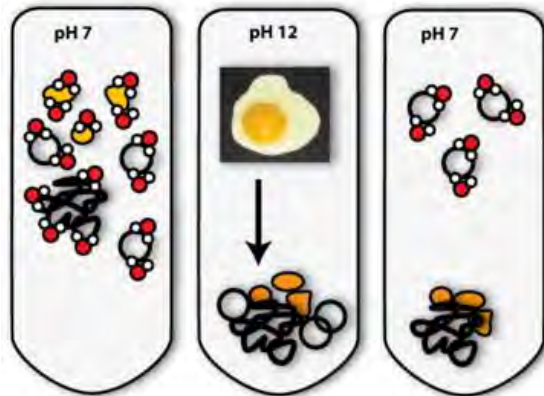


3. Column Purification



Miniprep

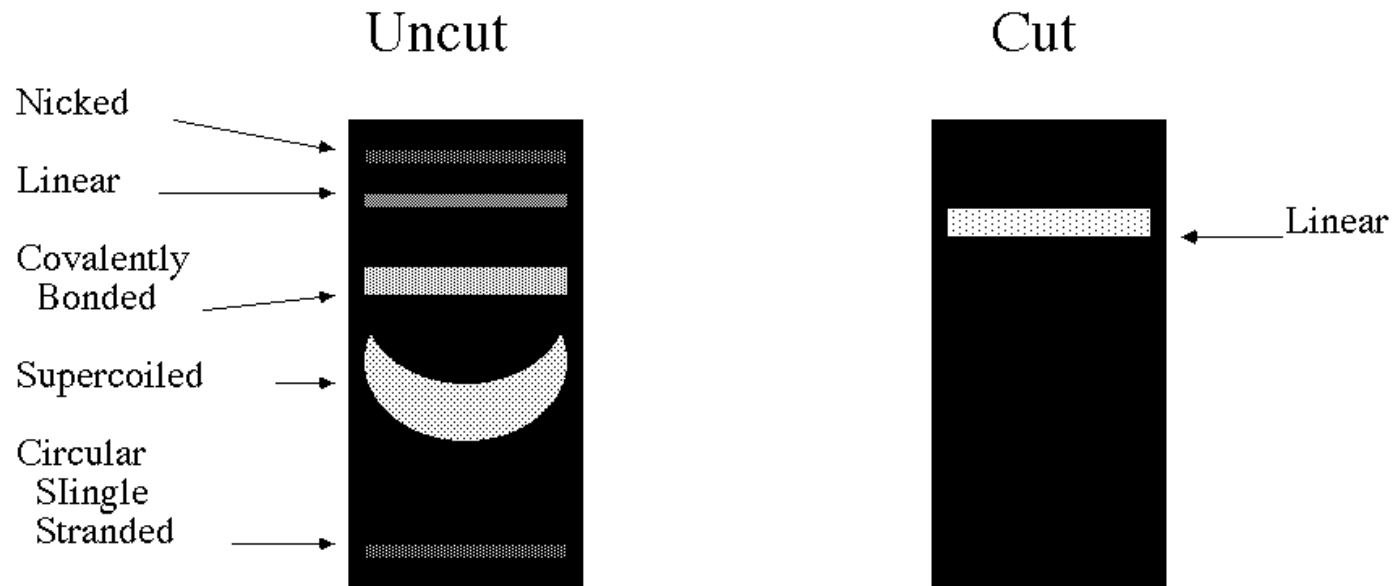
2. Separation of Plasmids



Entonces...

- ¿Qué es miniprep?
- ¿Soluciones?
- ¿SDS?
- ¿NaOH?

Plásmido en gel ☺



Plásmido en gel 😊

