

DEMOLAB

Bioquímica. Biologia molecular: electroforesi d'ADN plasmídic

Competències específiques

3. Dissenyar, planejar i desenvolupar projectes de recerca seguint els passos de les metodologies científiques, tenint en compte els recursos disponibles de manera realista i cercant vies de col·laboració, per indagar en aspectes relacionats amb les ciències biològiques, geològiques i mediambientals.

Aquesta competència específica es connecta amb els següents descriptors: CCL5, STEM1, STEM2, STEM3, CD1, CD2, CPSAA3.2, CE3.

Pràctica 1. Extracció d'ADN plasmídic (Lisi alcalina)

Els plasmidis són molècules d'ADN extracromosòmic, normalment amb forma circular, i que es poden replicar independentment del cromosoma. Els plasmidis són freqüents en bacteris i, encara que en general no contenen informació essencial, sí que estan implicats en la incorporació d'avantatges selectius, com ara resistències a antibiòtics. Els plasmidis són usats freqüentment en biotecnologia i biologia molecular, perquè són bons d'extreure i manipular. A més a més, les seves propietats de replicació i conjugació són de gran utilitat per l'anàlisi genètica i la clonació de gens.

Hi ha diferents tècniques per aïllar ADN plasmídic. Una de les més usades és el mètode d'extracció per lisi alcalina. La majoria de cromosomes bacterians són circulars, relativament grossos i no superenrotllats, per contra, els plasmidis són de mida petita i presenten una estructura d'hèlix superenrotllada. Durant el procés d'extracció per lisi alcalina es provoca la desnaturalització de l'ADN, tant plasmídic com cromosòmic, i, posteriorment, la seva renaturalització. Durant la renaturalització, l'ADN cromosòmic és atrapat per complexos proteics i precipitarà, mentre que l'ADN mantenint-se en solució.

L'extracció per lisi alcalina permet obtenir entre 100 i 500 µg d'ADN a partir de 1,5-3 mL de cultiu bacterià en fase exponencial, comptant que presentin entre 10-20 còpies de plàsmid per bacteri. La quantitat d'ADN extret serà directament proporcional al nombre de còpies per cèl·lula, i inversament proporcional a la mida del plàsmid.

Material

- Micropipetes de 200 µL i de 2-20 / 5-50 µL
- Tub d'assaig amb creixement exponencial de bacteri
- Tubs ppendorf de 1,5 mL
- Centrífuga per a tubs de 1,5 mL
- Vòrtex

Reactius

- Medi de cultiu
- Tampó 1: 50mM Glucosa + 25 mMTris-HCl (pH 8) + 10 mM EDTA (pH 8).
Mantenir en fred.
- Tampó 2: NaOH 0,2 N + SDS 1%
- Tampó 3: Acetat potàssic 5 mM 60 mL + Àcid acètic glacial 11,5 mL + Aigua
milliQ 28,5 mL -- Vol final 100 mL
- Isopropanol

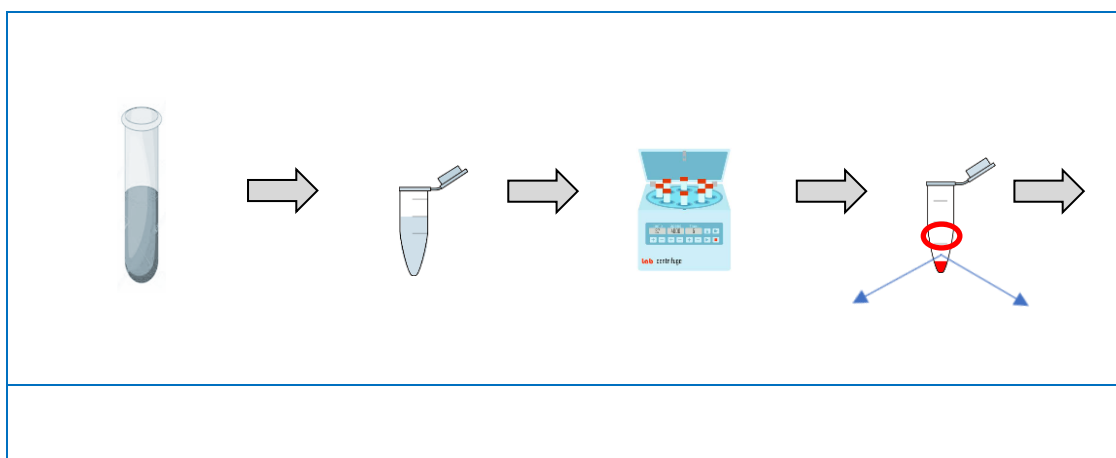
Procediment

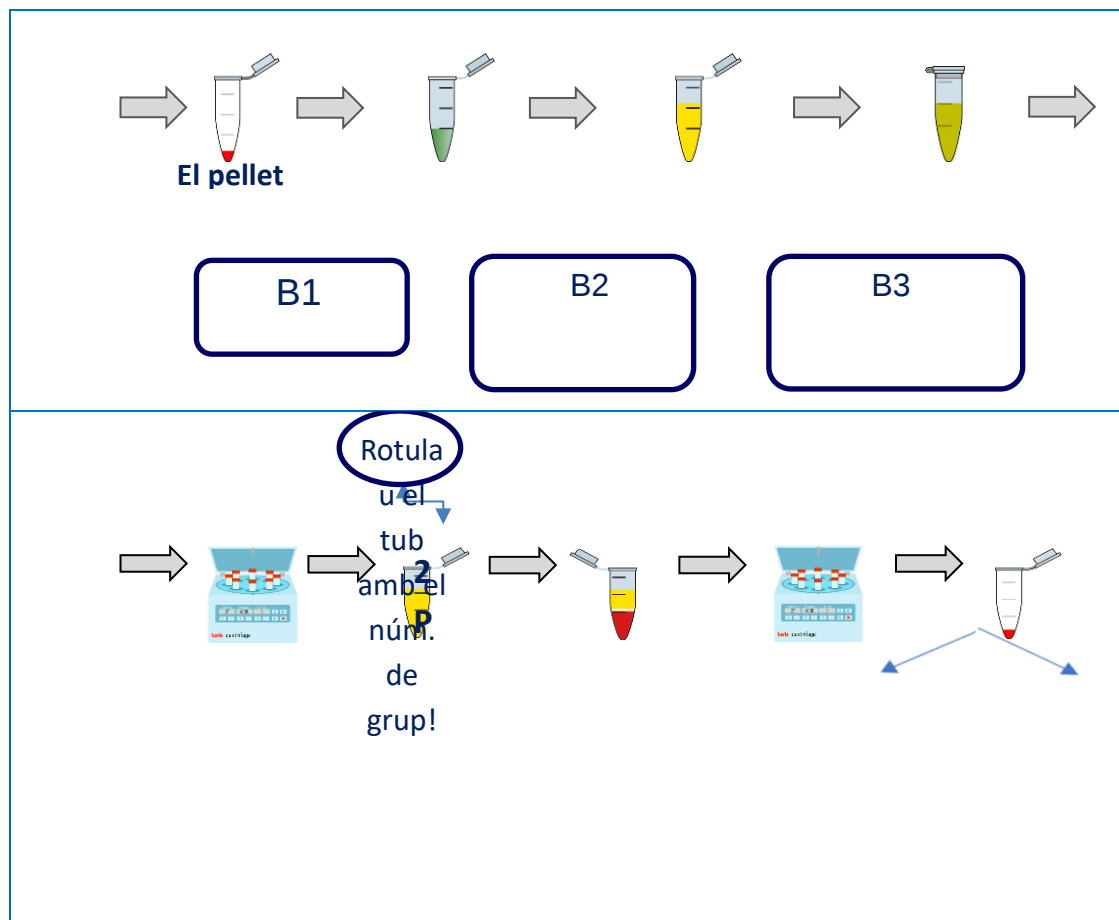
1. Inocular 3-4 mL de medi de cultiu i incubar 12-15 hores a 30°C en agitació (prèviament preparat).
2. Transferir 1,5 mL del cultiu exponencial a un tub eppendorf. Centrifugar a 13000 rpm, 3 minuts. Llevar-ne el sobrenedant i abocar-ho al tassó de precipitats. Lleva la resta de sobrenedant amb una micropipeta.
3. amb ajuda del vòrtex. Aquesta dissolució isotònica segresta els ions presents al medi.

4. Afegir 200 μ L de tampó 2 i mesclar per inversió 5-6 vegades (no amb vòrtex). Ficar en gel. Aquesta dissolució conté SDS que és un detergent i romp les membranes cel·lulars i desnatura les proteïnes. També conté NaOH que desnatura l'ADN. Quan s'obri l'Eppendorf s'ha de veure una mucositat.
5. Afegir 200 μ L de tampó 3 i tornar a mesclar per inversió (sense vòrtex). Ficar en gel. Aquest reactiu renaturalitza l'ADN. El K forma complexes amb l'SDS que fa precipitar les proteïnes amb l'ADN cromosòmic, però no el plasmídic.
6. Centrifugar a 13000 rpm durant 5 min. Els complexes ADN cromosòmic-proteïnes precipitaran, mentre que l'ADN plasmídic quedarà en solució.
7. Transferir 500 μ L del sobrenedant al tub I que conté 335 μ L d'isopropanol. Agitar amb ajuda del vòrtex. L'ADN és insoluble en l'isopropanol, i precipitarà.
8. Incubar 5 minuts en gel.
9. Centrifugar a 13000 rpm durant 10 min. Ara precipitarà l'ADN plasmídic i formarà un botó translúcid.
10. Retirar el sobrenedant i eixugar la mostra deixant l'Eppendorf obert 5 minuts.
11. Resuspendre en 10 μ L de tampó 1.
12. La mostra està llesta per analitzar en un gel d'agarosa.

Activitats

1. L'esquema representa el procés d'extracció de l'ADN plasmídic. Completa l'esquema detallant les passes.





2. Respon al següent qüestionari:

- Què és l'ADN Plasmídic?
- Quines propietats diferencials entre l'ADN cromosòmic i plasmídic, usa la tècnica de lisi alcalina per obtenir només ADN plasmídic?
- Quins avantatges evolutius pot aportar l'ADN plasmídic?
- Quines aplicacions biotecnològiques té la manipulació d'ADN plasmídic?
- Què fa el tampó 2 que conté SDS i EDTA?
- Què fa l'isopropanol?

Pràctica 2. Electroforesi en gel d'Agarosa

L'electroforesi és un mètode de separació de biomolècules per aplicació d'un corrent elèctric. Les molècules d'ADN i d'ARN estan carregades negativament, i aplicant una

diferència de potencial, migraran cap al pol positiu, separant-se d'acord amb la seva mida.

En el cas de les molècules d'ADN i ARN se fa servir com a suport de l'electroforesi un gel d'agarosa. L'agarosa és un polímer lineal de galactosa i 3,6-anhidrogallactosa. El gel es prepara dissolvent l'agarosa en un tampó i en calent per obtenir-ne una mescla homogènia i transparent. Després es deixa refredar perquè polimeritzi i adquireixi la consistència d'un gel semisòlid.

La migració dels fragments d'ADN variarà en funció de la seva mida, la configuració molecular (lineal, circular, superenrotllat), la concentració d'agarosa en el gel i el voltatge.

Per carregar les mostres d'ADN en el gel, en primer lloc es formen uns pouets amb l'ajuda d'una pinta que es col·loca abans de deixar refredar l'agarosa. Per disposar l'ADN en els pouets, la mostra es mescla amb un tampó de càrrega que, per una banda, augmenta la densitat de la mostra (si no, suraria), i, per una altra banda, tenyeix la mostra i fa possible visualitzar la càrrega i l'avanç de la mostra en el gel.

Una vegada l'ADN/ARN ha migrat pel gel d'agarosa, s'ha d'observar, per la qual cosa s'usa una substància que s'enllaça amb la molècula i que és fluorescent amb llum UV.

Materials

- Matràs de 50 mL
- Proveta 100 mL
- Agarosa
- Micropipeta 2-20 µL
- Cubeta d'electroforesi horitzontal
- Llum UV i càmera fotogràfica

Reactius

- Agarosa

- Tampó TBE d'electroforesi
- Tampó de càrrega
- Solució amb SYBER SAFE (fora del Demolab)

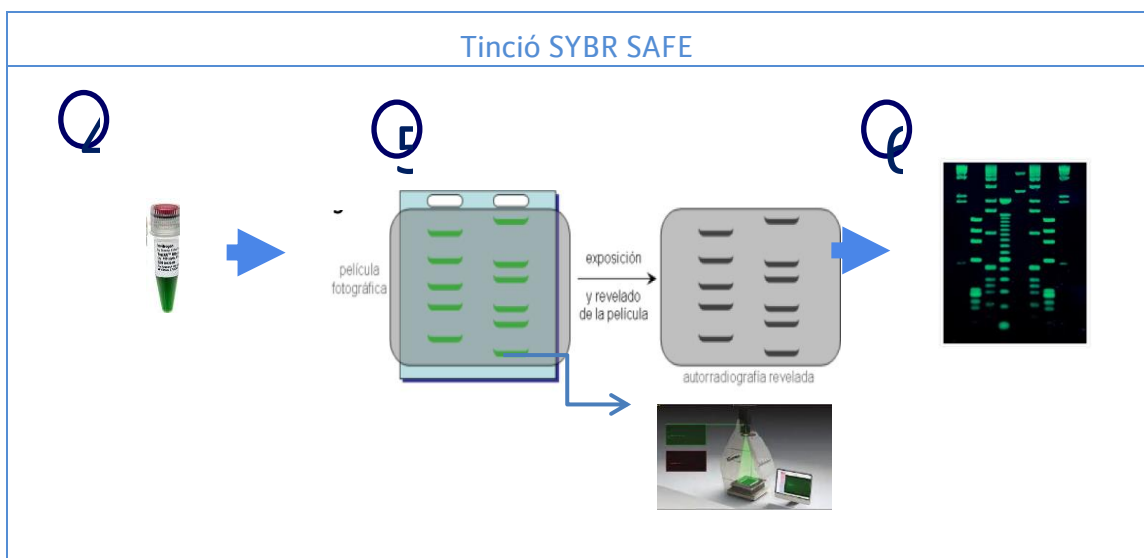
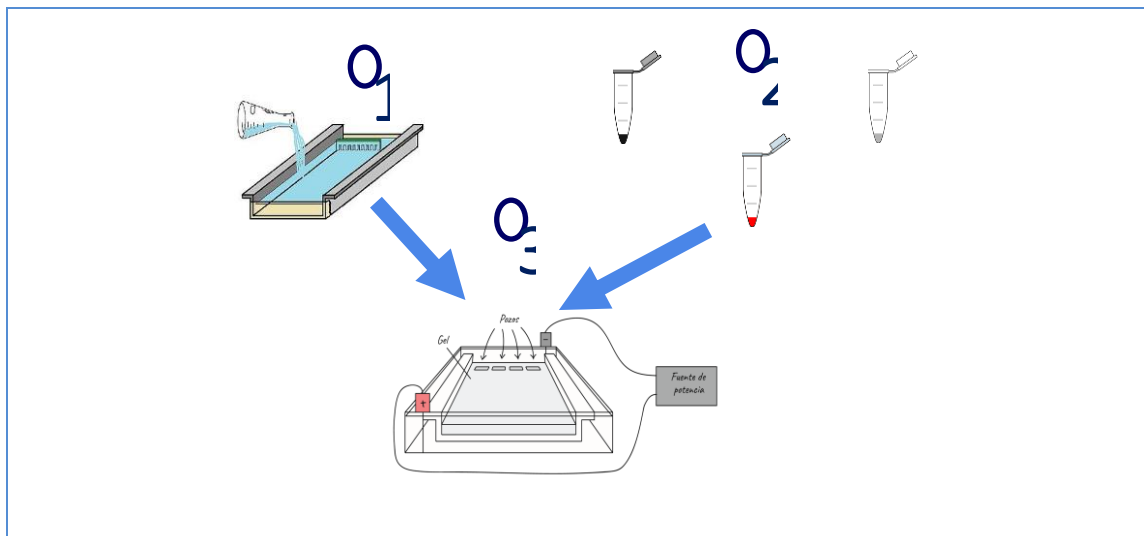
Procediment

1. Pesar 0,2 g d'agarosa i dissoldre en 20 mL de tampó TBE 1x
2. Encalentir la mescla a l'agitador (amb temperatura) fins que queda totalment transparent. Una vegada totalment fus, deixar en agitació sense calor per refredar una mica.
3. Preparar el llit del gel amb la pinta de pouets. Abocar la mescla fusa d'agarosa evitant la formació de bombolles.
4. Deixar refredar l'agarosa totalment. Una vegada polimeritzada, col·locar el gel en la seva posició dins la cubeta d'electroforesi. Amb els pouets a la banda negativa.
5. Emplenar la cubeta amb el tampó TBE 1x fins a cobrir completament el gel d'agarosa.
6. Afegir 2 µL de tampó de càrrega a cada una de les mostres d'ADN plasmídic.
7. Disposar la mostra amb el tampó de càrrega en cada pouet. 12 µL aprox.
8. Aplicar 50 volts durant 60 minuts. Deixar córrer el gel durant aprox. 60 minuts i sempre, aturar-ho abans que el front arribi a la banda de la vorera.
9. Retirar el gel i tenyir amb SYBER SAFE per visualitzar l'ADN amb UV i fer una foto. Donat el potencial mutagènic del SYBER SAFE i la radiació UV, els col·laboradors faran aquesta darrera passa i mostraran la foto resultant.

Activitats

1. L'esquema representa el procés d'electroforesi en gel d'agarosa. Completa l'esquema detallant les passes.

Electroforesi gel agarosa



2. Respon al següent qüestionari:

- Perquè es posa una pinta amb pouets quan es prepara el gel d'agarosa?
- Perquè posam tampó de càrrega a les mostres d'ADN?
- Quin resultat s'observa? Explica què són les bandes que s'observen al gel.

3. Feu un mapa de pensament de les etapes de la tècnica emprada a la pràctica.