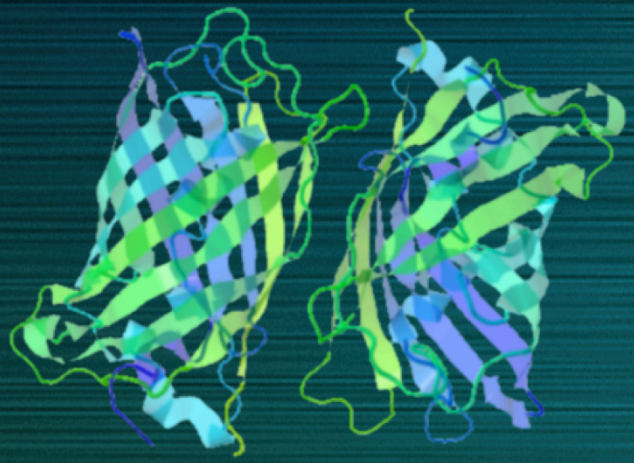
Obtención de bacterias transgénicas mediante Ingeniería genética.

Autora: Martina Escorial García

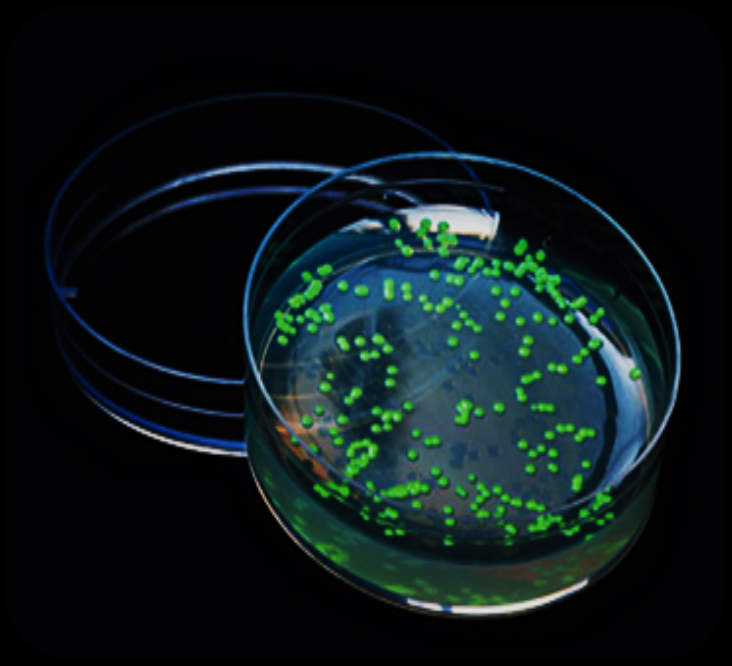
Tutoras: Mª Rosario Iglesias Álvaro y Teresa Martín Bayón.

IES Andrés Laguna.

Facultad de Ciencias. Dpto. Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología Universidad de Valladolid.



Índice



1. INTRODUCCIÓN
2. MARCO TEÓRICO
3. OBJETIVOS
4. MÉTODOS
5. RESULTADOS
6. CONCLUSIONES

Introducción

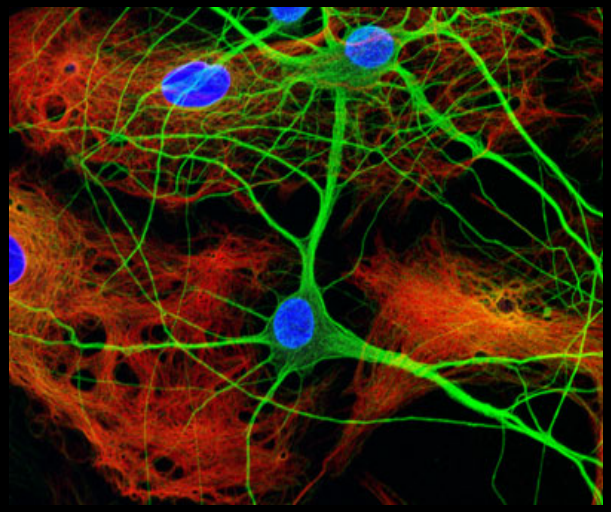
❖ LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE "GFP"

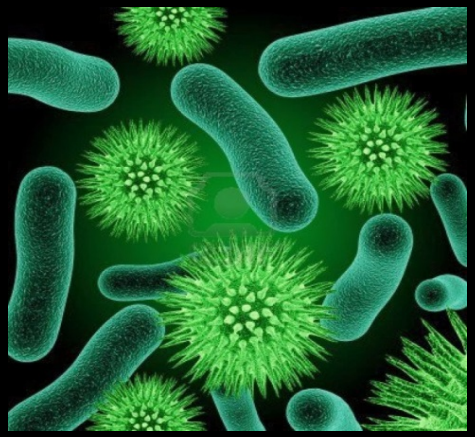
- *Nobel en Química 2008 (O. Shimomura, M. Chalfie, R.Y. Tsien)*

Aequorea victoria

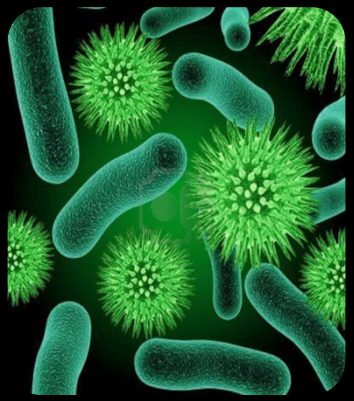
APLICACIONES

- **Biotecnología**
- **Medicina**
- **Biología celular**





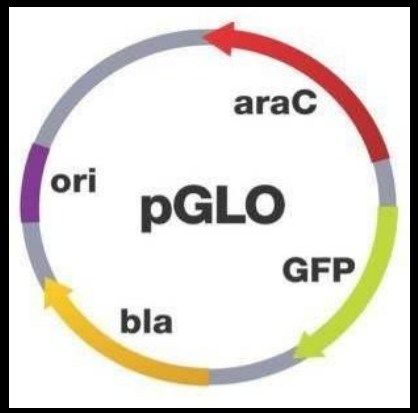
Marco teórico

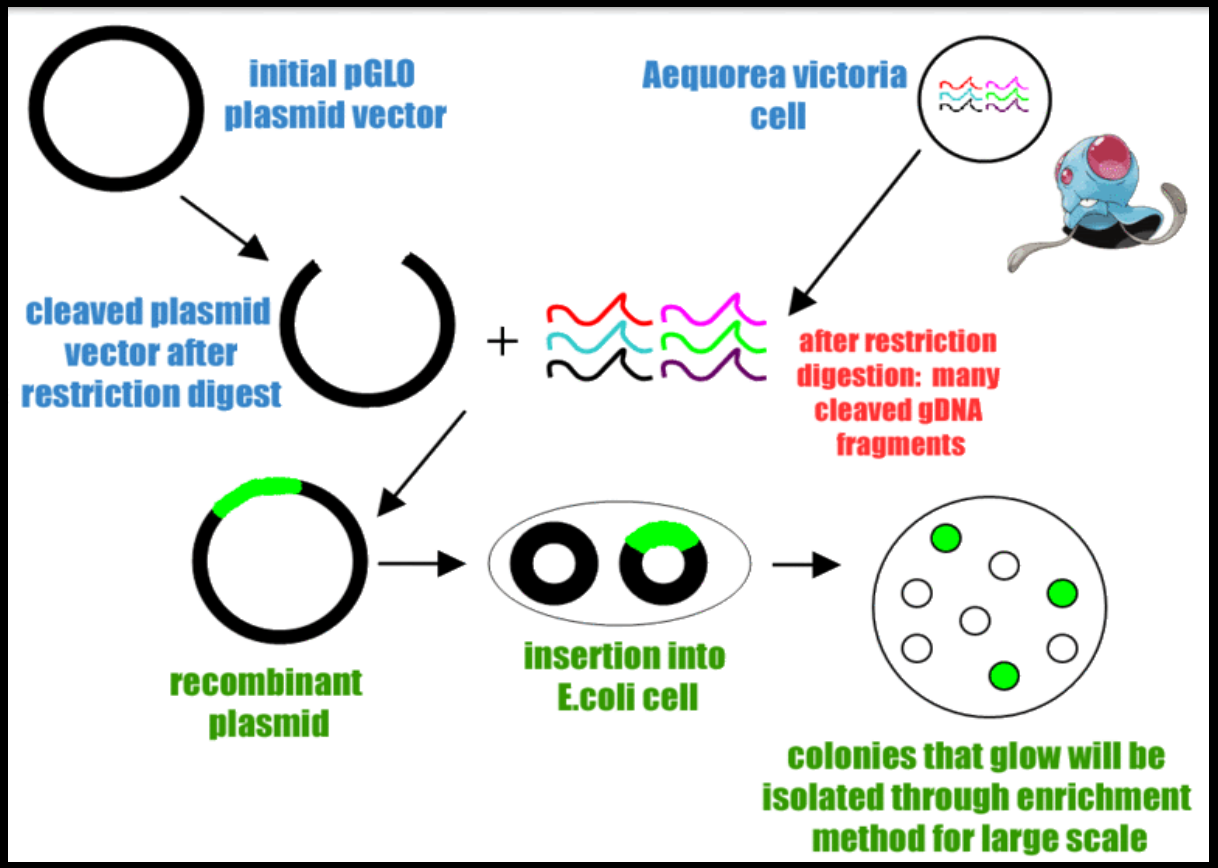


- **LA INGENIERÍA GENÉTICA: CLONACIÓN DEL GEN DE LA GFP EN E. COLI**

  TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS

  - *Las endonucleasas de restricción y los vectores de clonación: plásmidos*
  - *La tecnología del ADN recombinante.*
  - *La transformación bacteriana.*



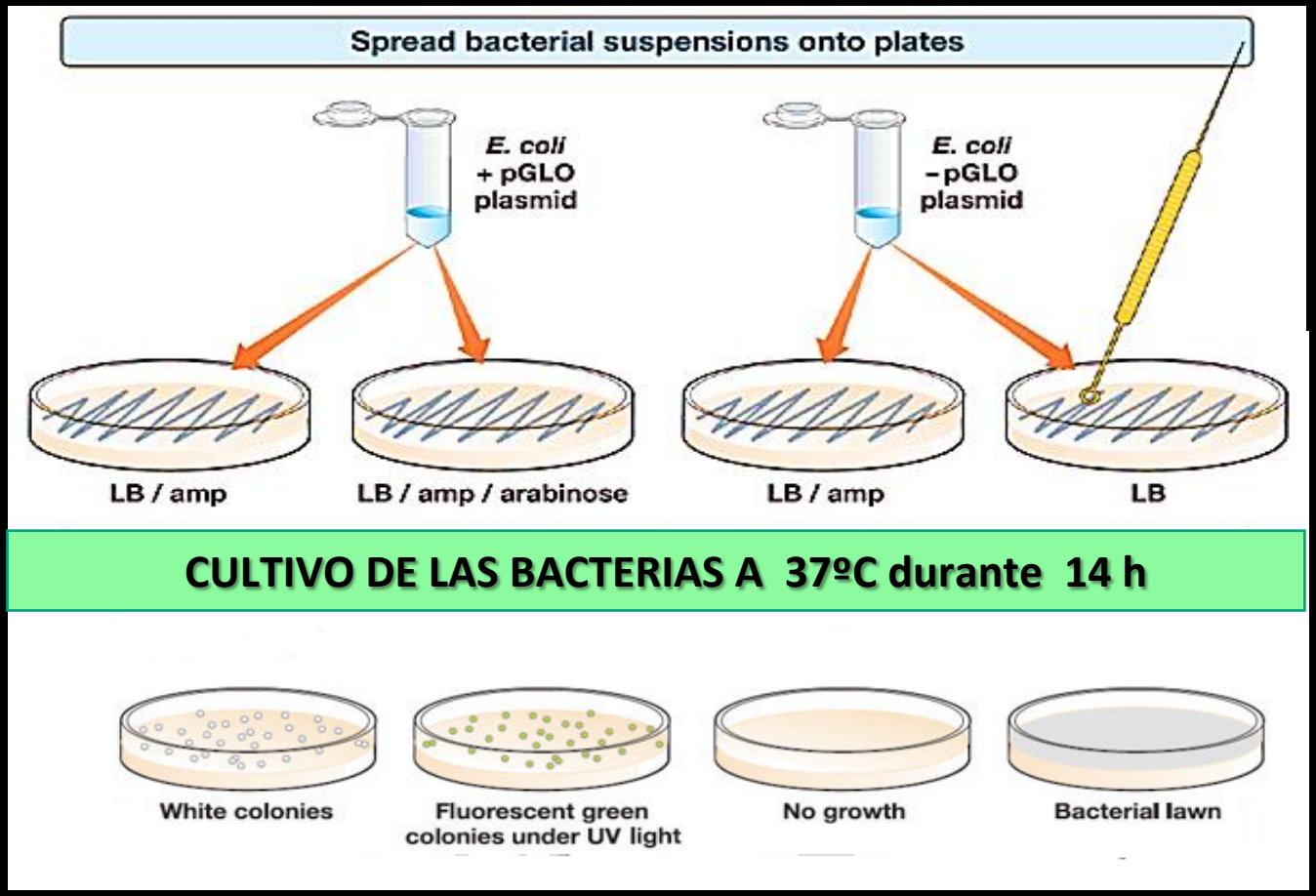


Objetivos

- Transformar las bacterias E. coli HB 101con el plásmido recombinante pGLO que contiene el gen de la GFP y determinar la eficiencia de transformación.
- Seleccionar una colonia bacteriana transformada y purificar el plásmido pGLO utilizando minicolumnas de gel de sílice.
- Analizar el plásmido purificado mediante electroforesis en gel de agarosa e identificar las conformaciones superenrolladas y relajadas de los plásmidos.
- Determinar el tamaño del gen de la GFP mediante digestión del plásmido pGLO con la endonucleasa de restricción HindIII.
- Inducir la expresión la proteína GFP mediante la activación el promotor pBAD con arabinosa y determinar la masa molecular de la GFP mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS.
- Analizar el efecto de la desnaturalización sobre la estabilidad del cromóforo y sobre la movilidad electroforética.

Métodos

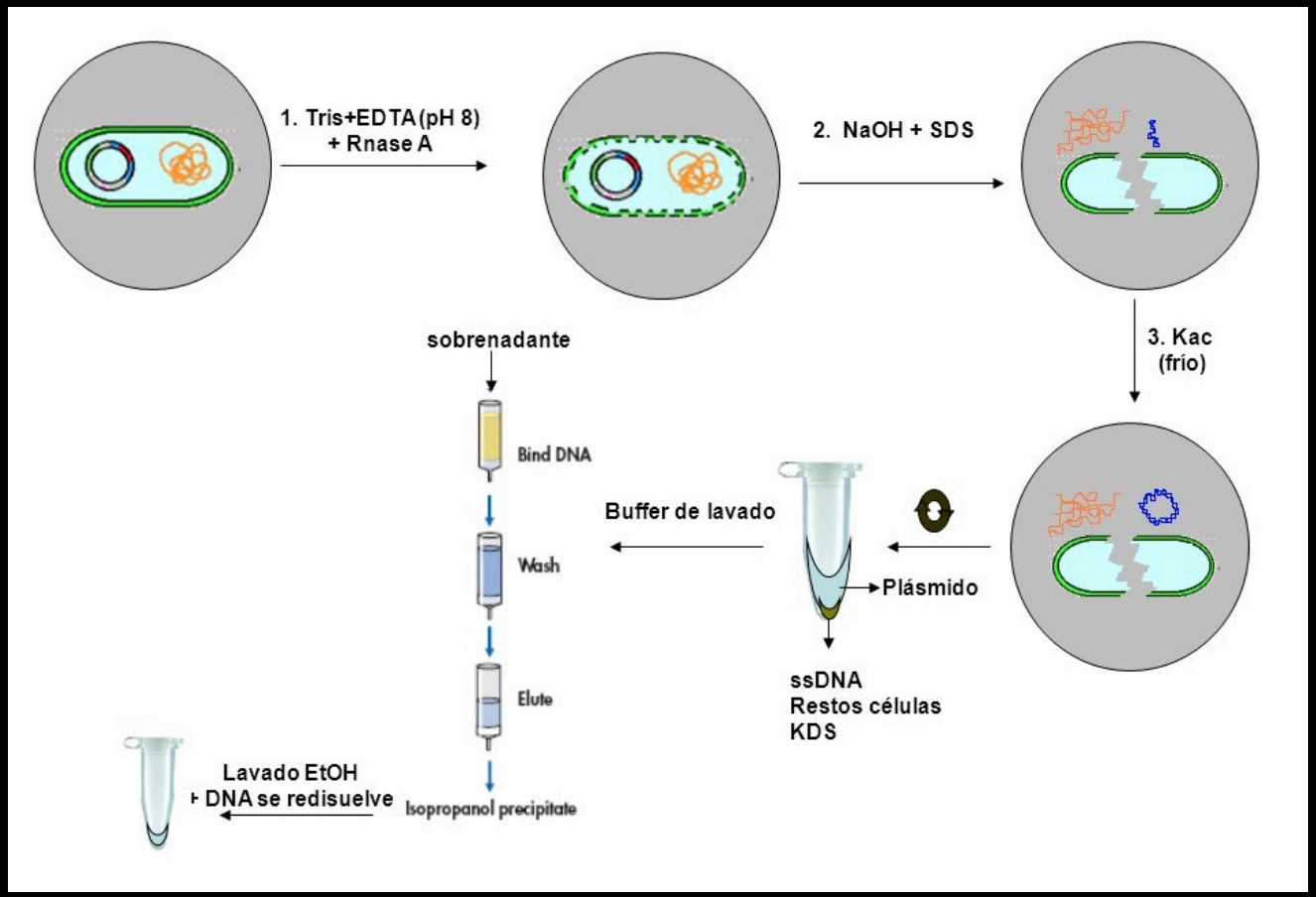
❖ **TRANSFORMACIÓN DE E. COLI CON PGLO**



- **Resistencia a Ampicilina**
- **Expresión de GFP: fluorescencia verde**

Métodos

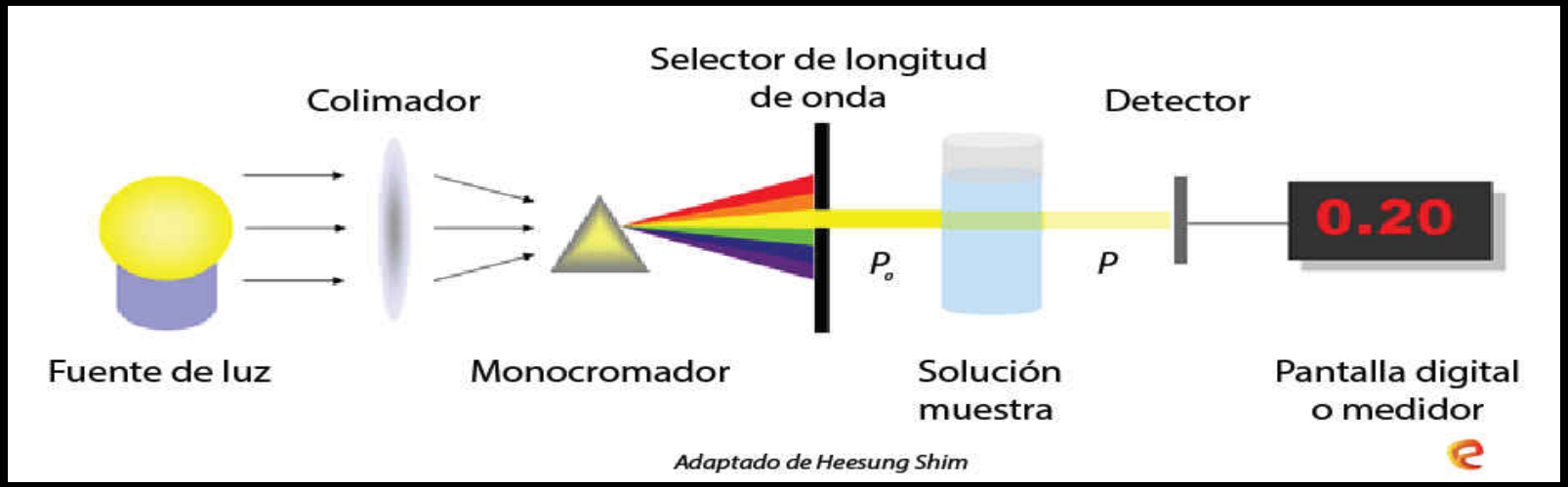
❖PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO PGLO



- ? *Lisis alcalina.*
- ? *Neutralización.*
- ? *Recuperación del sobrenadante fijado a la membrana de gel de sílice.*
- ? *Elución.*

Métodos

❖**DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA CONCENTRACIÓN DEL PLÁSMIDO**

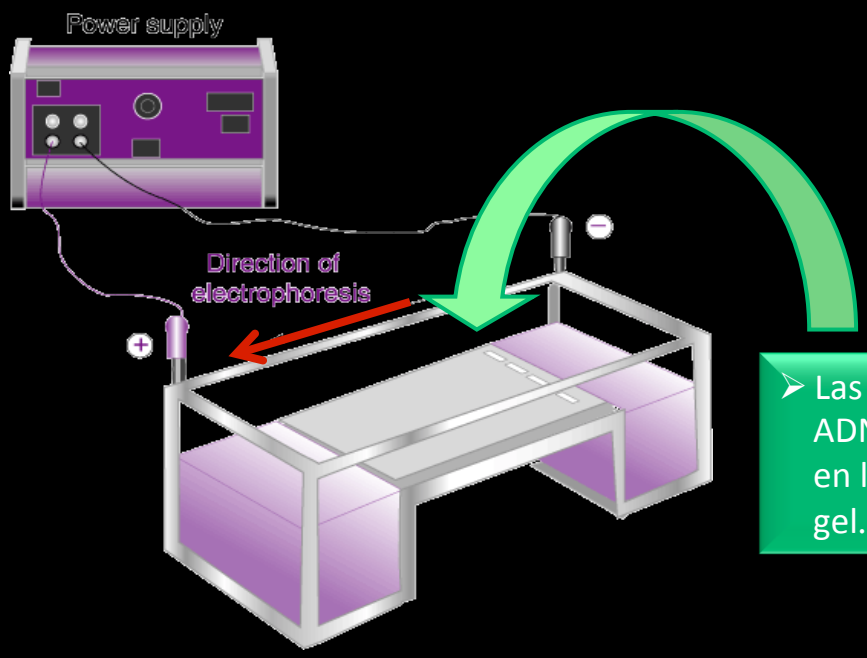


$$A = C \times \varepsilon \times l$$

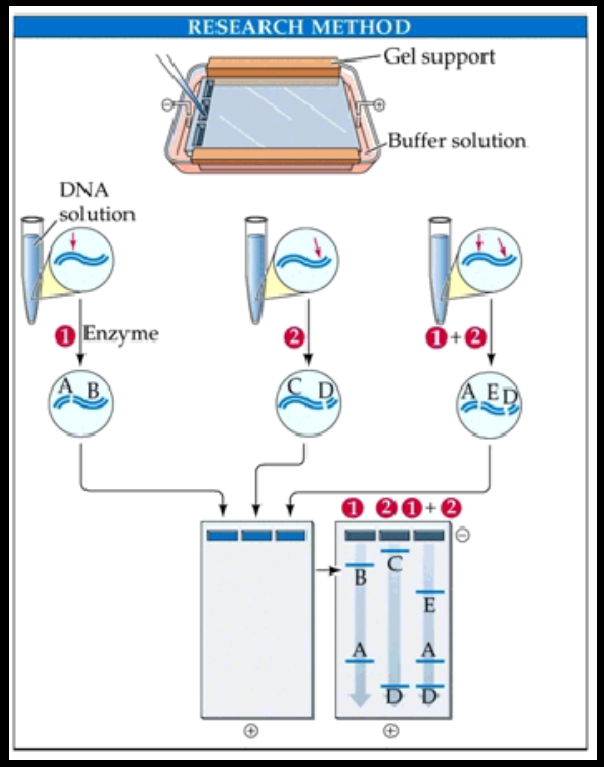
- ✓ Cuantificar
- ✓ Analizar Gen GFP

Métodos

❖ **DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA**



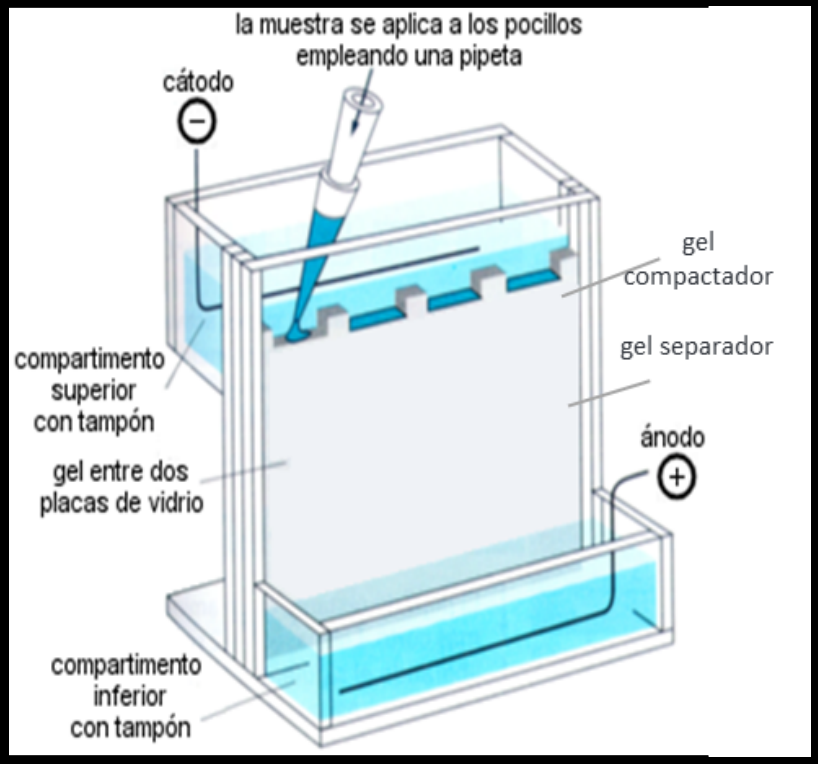
➢ Las muestras de ADN se depositan en los pocillos del gel.



❖ **Tinción del ADN con un compuesto fluorescente (GelRed). Las bandas se observan con luz uv**

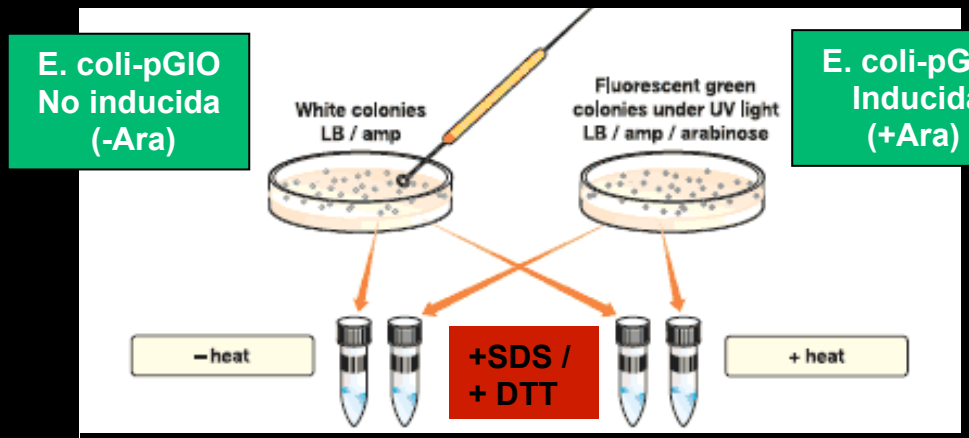
Métodos

❖ **EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA GFP: ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE POLIACRILMIDA-SDS (SDS-PAGE)**

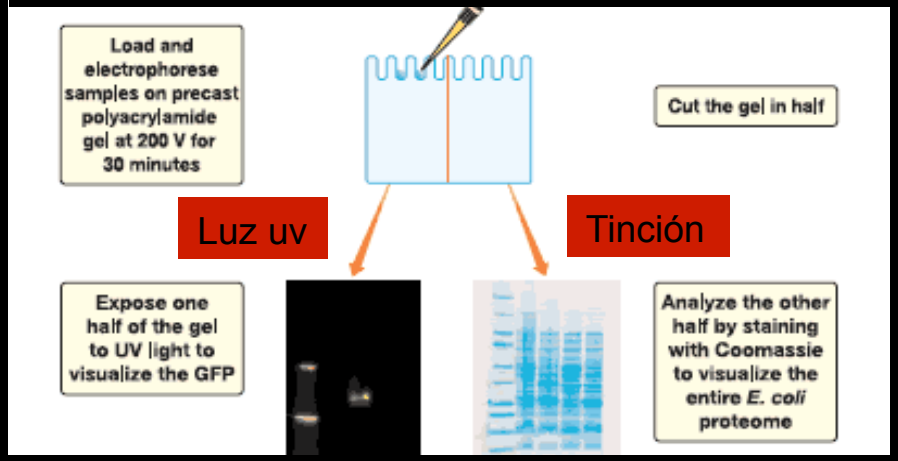


➢ TINCIÓN DEL GEL CON AZUL COOMASSIE

TRANSFORMACIÓN CON PGLO



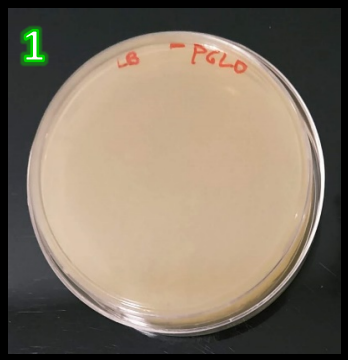
PREPARACIÓN DE MUESTRAS: SDS-PAGE

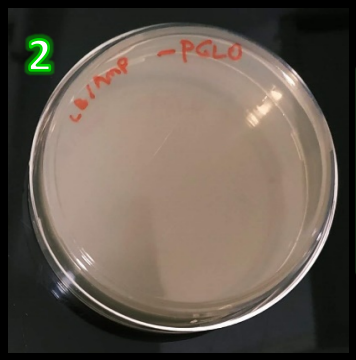


ANÁLISIS DEL RESULTADO

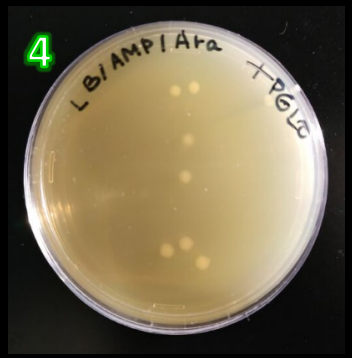
Resultados

❖ANÁLISIS DE LA TRANSFORMACIÓN DE E. COLI CON PGLO

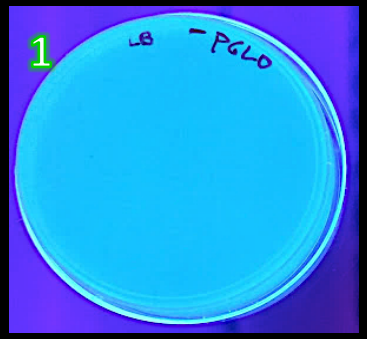


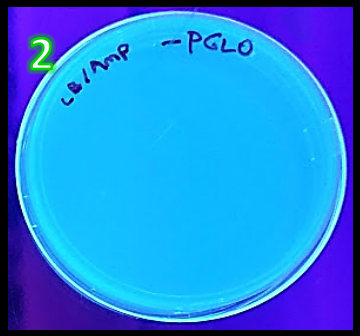


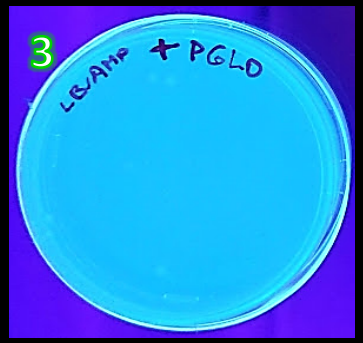
Bacterias sin transformar (-pGLO)



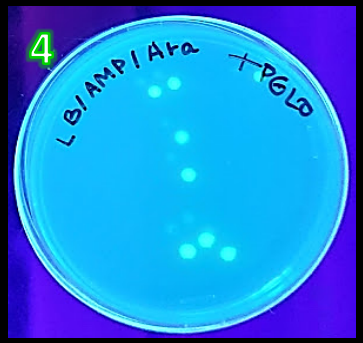
Bacterias transformadas (+pGLO)







+amp -ara

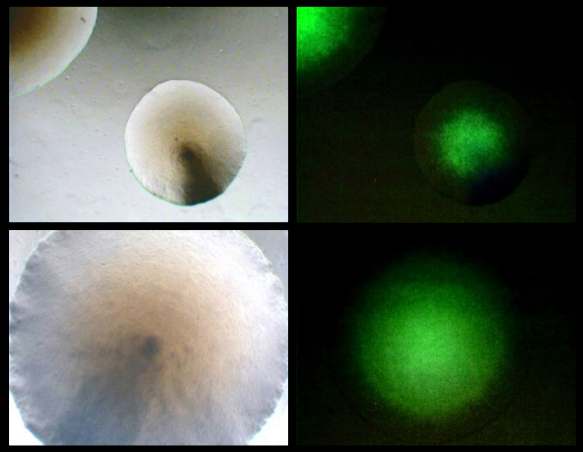


+amp +ara

Resultados

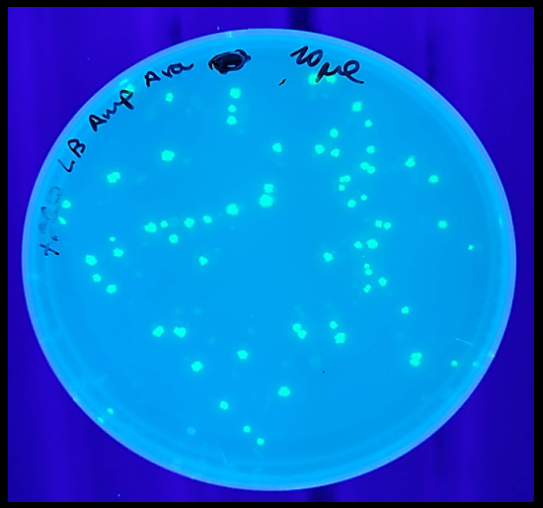
❖ COLONIAS OBSERVADAS AL MICROSCOPIO ÓPTICO INVERTIDO

40X



Luz ultravioleta 400nm

❖ CÁLCULO DE LA EFICIENCIA DE TRANSFORMACIÓN

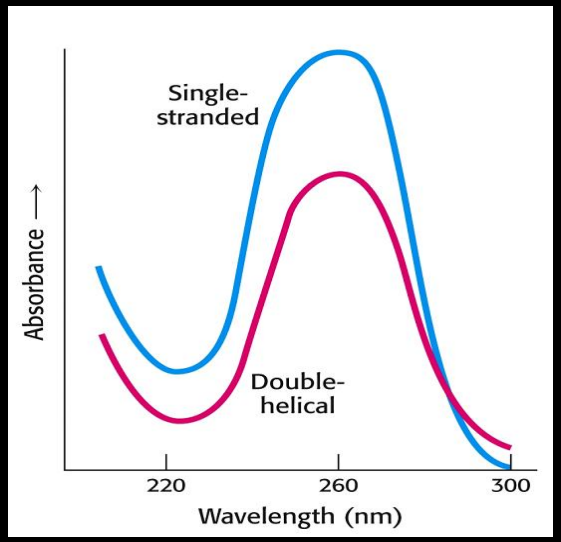


Eficiencia de transformación =CFU (nº total colonias)/ cantidad de pGLO (?g)

µl sembrados en placa	µg de plásmido	Nº de colonias	Eficiencia (cfu/µg)
10 µl	0,15686 µg	73	$4,65 \times 10^3$

Resultados

❖ANÁLISIS DE LA PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO

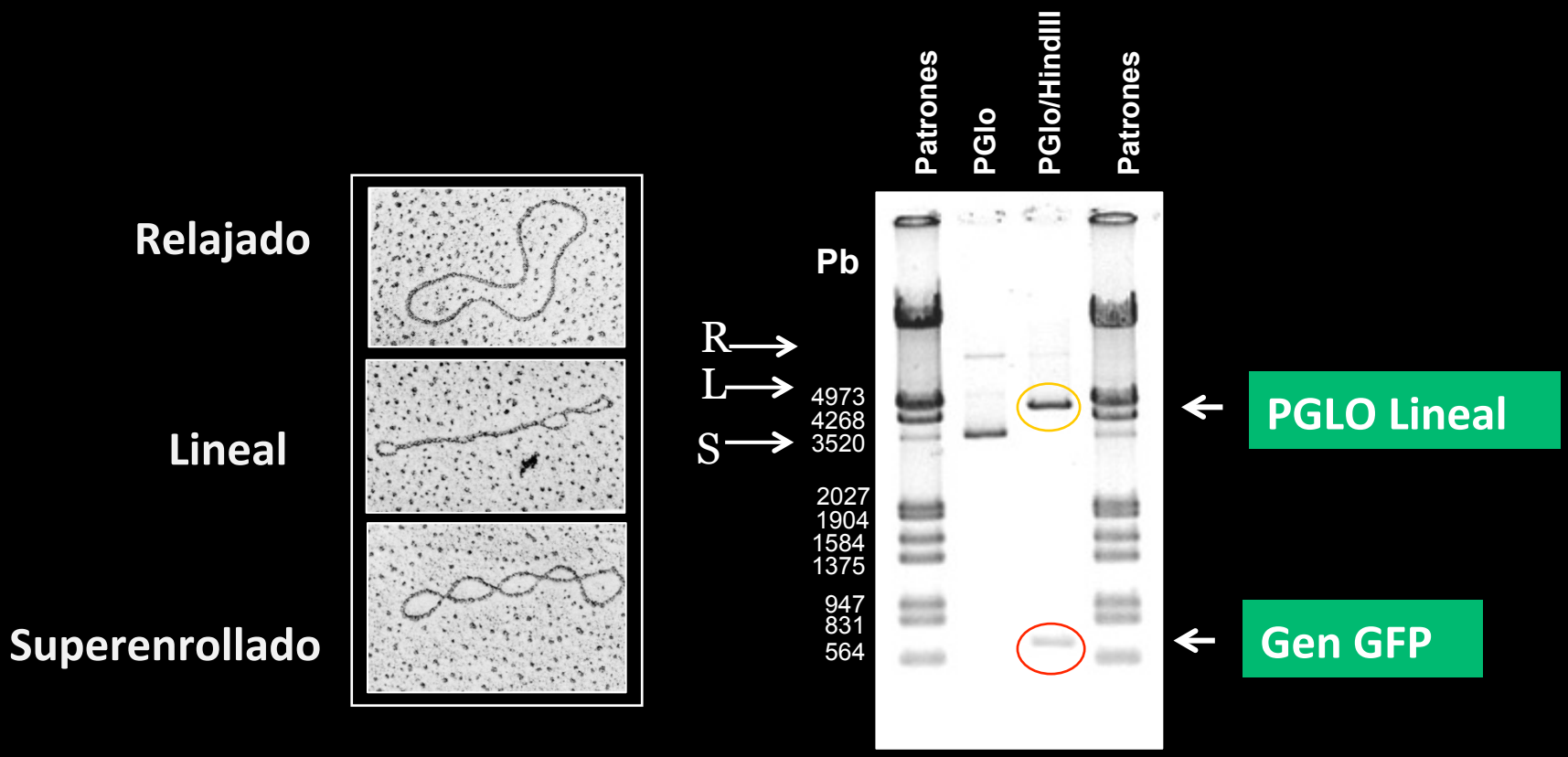


- **Concentración:**
  (?g/ml) = (A_{260}) 50?g/ml x factor de dilución
- **Rendimiento:**
  - (?g) = ?pGLO? x Volumen total

	Muestras	A_{260}-A_{320}	A_{280}-A_{320}	Concentración (mg/ml)	Rendimiento	Rendimiento total
Tubo 1	Elución 1	0,0162	0,0155	0,155	16,2	21,3 µg
	Elución 2	0,0051	0,0047	0,047	5,1	
Tubo 2	Elución 1	0,0225	0,0211	0,211	22,5	31,5 µg
	Elución 2	0,009	0,0071	0,071	9	

Resultados

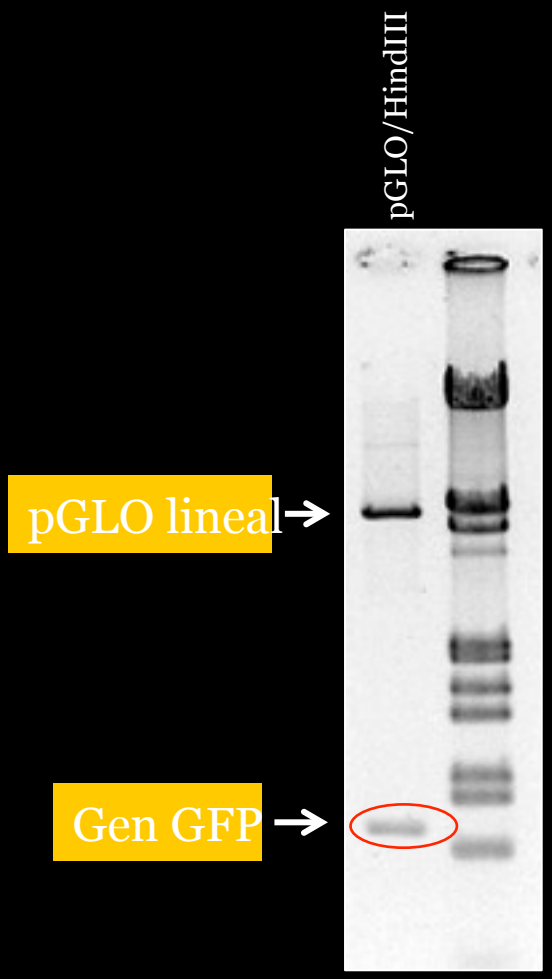
- **ANÁLISIS DEL PLASMIDO PGLO MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA**

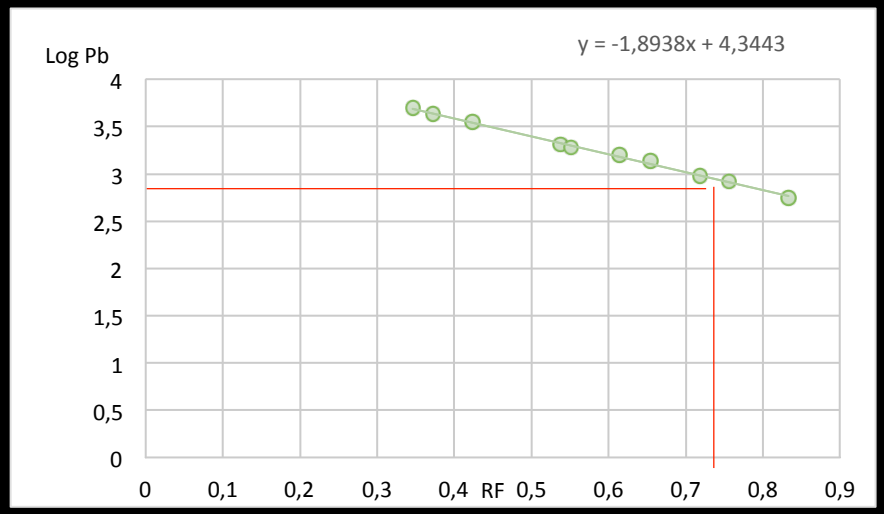


Resultados

❖ CÁLCULO DEL TAMAÑO DEL GEN DE LA GFP

Electroforesis en gel de agarosa 0,8 %





	cm banda	RF	log Pb	Tamaño (Pb)
GFP	6,3	0,808	2,849	706

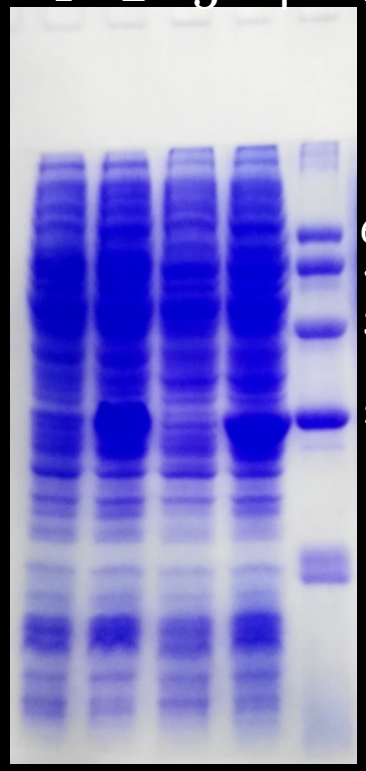
Resultados

E. Coli + pGLO

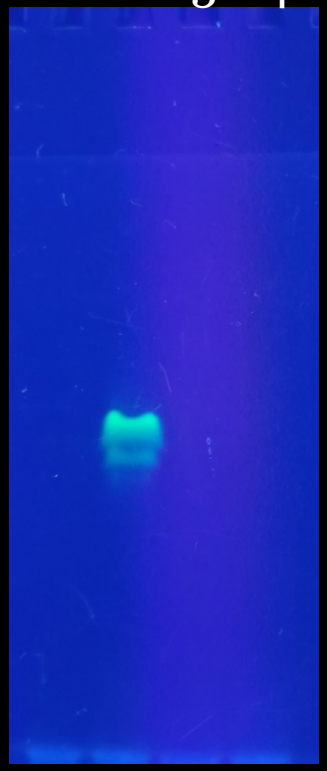
+ARA -ARA

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA -SDS

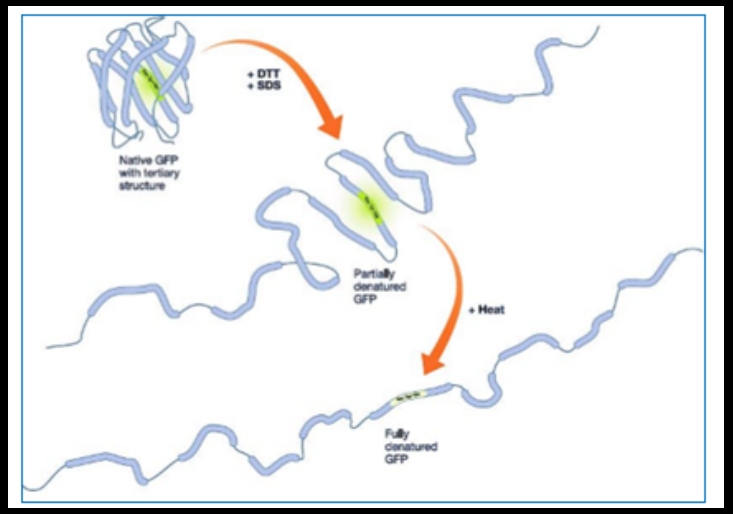
A. Azul Coomassie



B. Luz uv (400nm)



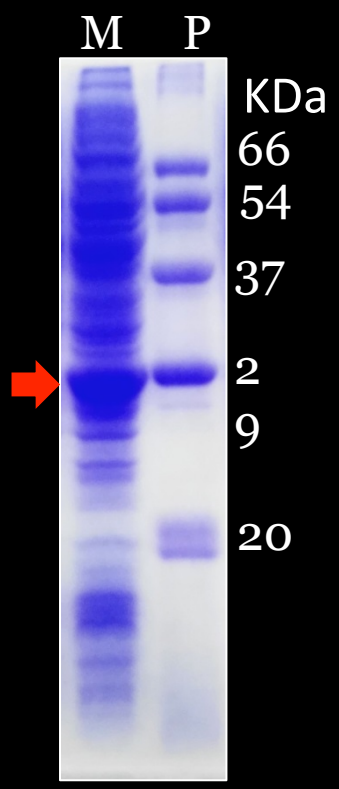
DESNATURALIZACIÓN

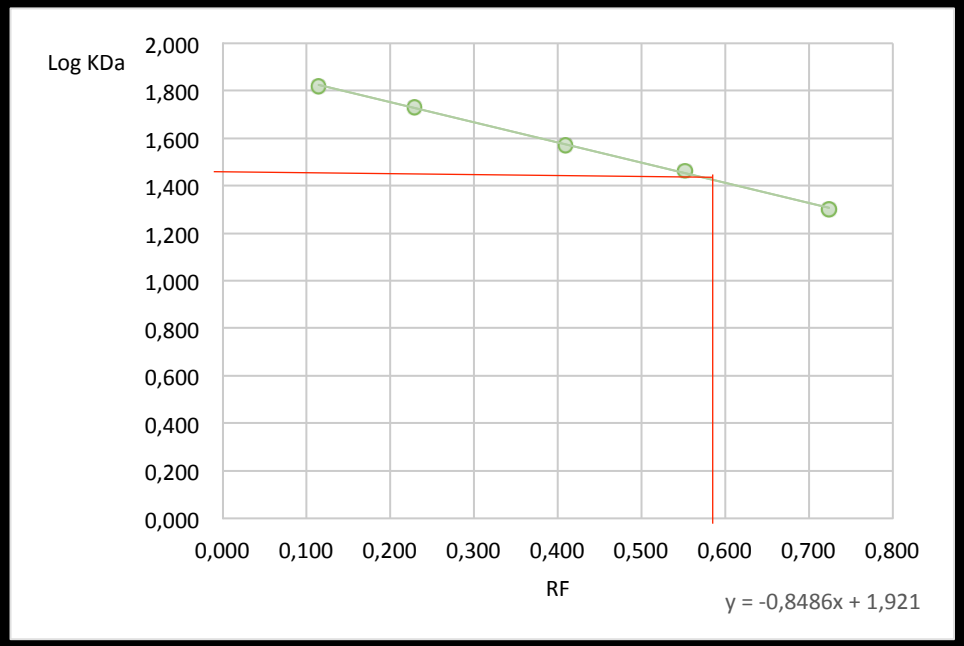


Resultados

❖DETERMINACIÓN DEL PM DE LA GFP

Electroforesis en SDS-PAGE





	cm banda	RF	log Kda	Peso molecular (KDa)
GFP	5,9	0,571	1,436	≈27

Conclusiones

- La bacteria E. Coli HB101 se ha transformado con el plásmido pGLO con una eficiencia muy alta y se han obtenido colonias fluorescentes.

- El plásmido PGLO se ha purificado y analizado mediante electroforesis en gel de agarosa y se han obtenido las bandas características de las conformaciones relajada, lineal y supenrollada.

- El gen de la GFP se ha caracterizado mediante la digestión del plásmido pGLO con Hind III y se obtenido una banda cuyo tamaño corresponde a 706 pb

- La proteína GFP expresada en presencia de arabinosa se ha analizado mediante electroforesis, obteniéndose una banda que corresponde a una Masa molecular de 27 kda.

- Se ha investigado el efecto de la desnaturalización con DTT y SDS sobre la estabilidad del cromóforo y se ha observado que la fluorescencia desaparece cuando la proteína se somete a desnaturalización térmica a 100ºC.

¡GRACIAS!