

36. Preparación de medios de laboratorio, cultivo de bacterias y gel de agarosa

Gabriel Dorado Pérez

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

RESUMEN

En este capítulo se describirá la preparación de medios de laboratorio, el cultivo bacteriano y la preparación de geles de agarosa. Como es habitual, el cultivo de bacterias se debe realizar bajo las oportunas condiciones de esterilidad, a fin de evitar contaminaciones. Se procede a inocular medio rico Luria–Bertani previamente preparado con una colonia de la bacteria *Salmonella typhimurium* previamente crecida en cajas de medio rico sólido. Por su parte, el gel de agarosa se prepara en solución amortiguadora TBE o TAE.

Palabras clave: agitación, bacteria, colonia, crecimiento, electroforesis, solución amortiguadora.

Abreviaturas empleadas. EtBr: bromuro de etidio; LB: medio rico Luria-Bertani; LMP: agarosa de bajo punto de fusión; Na₂-EDTA: sal disódica del ácido etilén diamino tetra-acético; PM: peso molecular; TAE: solución amortiguadora Tris-Acético-EDTA; TBE: solución amortiguadora Tris-Bórico-EDTA; Tris base o Trizma base: Tris (hidroximetil) aminometano.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En este capítulo se describirá la preparación de dos medios de laboratorio, como son el empleado para el cultivo bacteriano y los geles de agarosa.

2. PREPARACIÓN DE MEDIO RICO LÍQUIDO Y SÓLIDO

La Tabla 1 del anexo muestra la preparación de medios ricos Luria-Bertani.

3. OBTENCIÓN DE UN CULTIVO BACTERIANO: INOCULACIÓN DE MEDIO LÍQUIDO RICO Y SIEMBRA EN PLACA EN MEDIO RICO SÓLIDO

Nota: como es habitual, el cultivo de bacterias se debe realizar bajo las oportunas condiciones de esterilidad, a fin de evitar contaminaciones.

a) Inocular 10 ml de medio rico Luria–Bertani (en matraz erlenmeyer de 100 ml tapado con algodón) con una colonia de la bacteria *Salmonella typhimurium* previamente crecida en cajas de medio rico sólido.

b) Coger otra colonia de bacterias y extenderla suavemente por una placa de Petri con medio rico sólido. La extensión se hará en varias direcciones, de manera que del borde del primer extendido se arrastra hasta el lado contiguo de la placa, y así sucesivamente.

c) Incubar en una estufa a 37°C sin agitación hasta el día siguiente.

Nota: en el caso de que se requiera un crecimiento más rápido, incubar con agitación (200 rpm). Para un mayor eficiencia, inocular los 10 ml de medio rico con 100 µl de un cultivo líquido previamente obtenido.

Nota: El cultivo crecido (es decir, en fase estacionaria) puede almacenarse en hielo hasta su uso. Las bacterias también pueden congelarse a -20°C hasta su uso. Para ello es recomendable (sobre todo para reducir el volumen de la muestra) centrifugar el cultivo y eliminar el sobrenadante. Agitar la pella de células antes de congelarlas (para facilitar su posterior resuspensión una vez descongeladas).

Nota: El cultivo crecido (en fase estacionaria) en medio líquido se utilizará para aislamiento de su ADN en la próxima sesión (sesión 3).

4. PREPARACIÓN DE UN GEL DE AGAROSA

a) Preparar la bandeja de metacrilato (donde se formará el gel) con el(los) peine(s) apropiado(s) (en nuestro caso, con 1,5 mm de anchura) para añadirle la agarosa fundida. Colocarla en una superficie horizontal y poner cinta aislante por la parte anterior y posterior para formar una cubetita. Comprobar que los dientes del(los) peine(s) no llegan a tocar la bandeja (en caso de hacerlo, las muestras se perderían al ser aplicadas en los pocillos “sin fondo”).

b) Preparar la solución del gel de agarosa en un matraz erlenmeyer de vidrio de 100 ml. Para ello, añadir las cantidades de agarosa y solución amortiguadora TBE o TAE indicadas en el anexo, tapar con plástico autoadherente (p. ej., del usado para alimentos tipo SaranWrap) para evitar evaporación excesiva y taladrar con una aguja varias veces (para que no explote al calentarse en microondas).

c) Fundir en el microondas.

ATENCIÓN: vigilar constantemente para que no se salga la solución (al hervir demasiado). Se recomienda emplear una potencia intermedia. Puede agitarse suavemente de vez en cuando para realizar una fusión más uniforme.

ATENCIÓN: El matraz erlenmeyer llega a alcanzar elevadas temperaturas dentro del microondas. Usar guantes o protectores de goma (tipo “hot hand”) para manipularlo sin riesgo.

d) Retirar el matraz con el gel fundido del microondas y dejar enfriar un poco. Añadir las cantidades indicadas en el anexo de bromuro de etidio (EtBr) al gel. La concentración final es de 0,5 µg de EtBr/ml.

ATENCIÓN: Es importante dejar enfriar el gel lo suficiente para que no dañe la bandeja de metacrilato que, en caso contrario, puede llegar a deformarse.

e) Agitar el gel suavemente (para conseguir una mezcla uniforme con el EtBr) y verter la solución del gel con el bromuro de etidio en la bandeja previamente preparada.

f) Una vez solidificado el gel, retirar el(los) peine(s) y las cintas adhesivas (en su caso) y colocar la bandeja sobre la cubeta de electroforesis.

ATENCIÓN: Asegurarse de que el gel no sólo está solidificado, sino también a temperatura ambiente. En caso contrario los pocillos pueden llegar a romperse al retirar el peine.

Nota: Para una solidificación más rápida se recomienda verter el gel en una cámara fría. Ello resulta particularmente útil cuando se emplea agarosa de bajo punto de fusión (“Low Melting Point” o LMP) y/o cuando la temperatura ambiente es elevada (p. ej., en verano). Además, cuando se emplea agarosa LMP debe tenerse especial cuidado en retirar el peine sólo cuando el gel esté frío.

g) Rellenar la cubeta de electroforesis con el electrolito de cubeta (TBE 1X) hasta que el gel quede sumergido completamente (p.ej., bajo medio cm de electrolito).

h) El gel ya está listo para aplicar las muestras y realizar su electroforesis.

5. BIBLIOGRAFÍA COMENTADA

+ Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds) (2005) “Current Protocols in Molecular Biology”. Vols 1 a 4. Greene & John Wiley (New York, USA). Manual de protocolos. “La nueva «Biblia» del Biólogo Molecular” actualizada trimestralmente. Clasificación: PROTOCOLOS.

Old RW, Primrose SB, Twyman RM, Old RW (2002) “Principles of Gene Manipulation”. 6th edition. Blackwell (Oxford, UK). Uno de los mejores libros sobre Ingeniería Genética. Nivel elevado. Didáctico y con excelente material gráfico. Recomendado para estudiantes y profesionales que quieran refrescar conceptos y ponerse al día en este campo. Clasificación: TEORÍA AVANZADO.

+ Sambrook J, Russell D (2001) “Molecular Cloning. A Laboratory Manual”, 3rd edition, Vols 1–3. CSH Laboratory Press (New York, USA). Manual de protocolos. “La «Biblia» clásica del Biólogo Molecular”. Clasificación: PROTOCOLOS.

Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M (1992) “Recombinant DNA”. Freeman and Company (New York, USA). Divulgativo y a la vez con nivel y rigor científico. Clásico sobre Ingeniería Genética y sus aplicaciones. Claro, didáctico y con numerosos esquemas e ilustraciones explicativas. Muy recomendable. Clasificación: TEORÍA DIVULGATIVO.

Nota: las referencias fundamentales para la preparación de la sesión se indican con el símbolo “+”.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto PAFPU 'FORMAPROFE' ('UCO-N-031') de Formación del Profesorado Universitario, Junta de Andalucía.

ANEXO 1: MEDIOS, SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO

Pesar o añadir las cantidades o volúmenes que se indican en las tablas correspondientes del anexo, disolver en agua (en el caso de que se desee repartir en botes) y esterilizar en autoclave ("autoclavar") a 120°C y 1 bar (= 1 kg/cm²) de presión durante 20 minutos. Una vez esterilizados, los medios con agar pueden conservarse líquidos en una estufa a 63°C hasta su uso.

Normas para el manejo del autoclave: Comprobar que el autoclave tiene suficiente agua. En caso contrario, añadir agua destilada hasta la rejilla del fondo de la máquina. Asimismo, comprobar que las salidas de agua y de aire se encuentran cerradas. Si no se toman estas precauciones podría quemarse el autoclave. Una vez haya terminado el autoclave hay que esperar que baje la presión y la temperatura para abrirlo sin peligro.

ATENCIÓN: Como norma general, no se deben "autoclavar" soluciones concentradas de ácidos (clorhídrico, sulfúrico) o álcalis (NaOH). Como es obvio, estas soluciones son "estériles" per se. Además, pueden dañar la estructura de acero del autoclave. Tampoco se autoclavan soluciones concentradas de disolventes orgánicos (acetona, tolueno, éter, metanol, etanol, etc).

Generalmente las soluciones se preparan en botes de vidrio tipo Pyrex.

ATENCIÓN: Los álcalis como la sosa (NaOH) o la potasa (KOH) atacan al vidrio. En estos casos deberán usarse botes de plástico para su almacenamiento.

Medio rico Luria–Bertani

A continuación se indica la composición del medio rico de cultivo de *Escherichia coli*.

	Medio líquido (g)	Medio sólido (g)
Bacto triptona	10	10
Extracto de levadura	5	5
CINa	10	10
Agar	—	15
Agua destilada	Hasta 1 litro	Hasta 1 litro

El medio rico líquido puede prepararse en botes Pyrex o en matraces erlenmeyer para cultivos (10 ml de medio rico en matraz de 100 ml). El medio sólido también se prepara en matraz de 100 ml, se deja enfriar un poco

después de la esterilización (~63 °C) y se reparte a razón de 25 ml por caja de petri de 9 cm Ø. Por lo tanto, cada alumno preparará 10 ml de medio líquido y 25 ml de medio sólido.

Las cajas de medio rico, una vez haya solidificado el medio, se dejan boca abajo en la estufa a 37°C hasta el día siguiente (para secar el vapor condensado). El secado puede realizarse rápidamente colocando las cajas abiertas en una cabina estéril de flujo laminar durante una hora.

El medio rico líquido se almacena a temperatura ambiente. Las cajas de medio rico se guardan en bolsas cerradas a 4°C hasta su uso. El medio rico permanece estable durante meses.

Nota: No conviene añadir los agentes selectivos (en su caso) a las cajas con medio sólido que vayan a ser conservadas en frigorífico. Es mejor prepararlas sin dichos agentes (p.ej., antibióticos), y añadirlos en la superficie con un asa de siembra triangular justo antes de usarse. Así se asegura que el antibiótico no ha sido degradado.

Solución amortiguadora TBE

A continuación se indica la composición de la solución amortiguadora TBE para electroforesis.

	3,8 litros (g)	1 litro (g)
Tris base	212	55,8
Ácido bórico	160	42,1
Na ₂ -EDTA	18,6	4,9
Agua destilada	Hasta 3,8 litros	Hasta 1 litro

ATENCIÓN: La solución amortiguadora 10X TBE puede prepararse también, pero con el tiempo y las bajas temperaturas acaba por precipitar, siendo luego imposible volver a disolverlo. Por ello se recomienda preparar la máxima concentración como 5X TBE.

Solución amortiguadora TAE

A continuación se indica la composición de la solución amortiguadora TAE para electroforesis.

	50X	1X
Tris base	242 g	4,84 g
Ácido acético glacial	57,1 ml	1,14 ml
Na ₂ -EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100 ml	2 ml
Agua destilada	Hasta 1 litro	Hasta 1 litro

Solución 20X Bromuro de etidio

A continuación se indica la composición de la solución de bromuro de etidio.

	10 ml	1 ml
Bromuro de etidio	100 mg	10 mg
Agua destilada	Hasta 10 ml	Hasta 1 ml

ATENCIÓN: El EtBr es un mutágeno potente. NO es necesario esterilizarlo. NO se debe “autoclavar” por precaución. Deben seguirse escrupulosamente medidas estrictas de seguridad (guantes, mascarilla, campana extractora) en su preparación a fin de evitar la inhalación del polvo o su contacto con la piel. Una vez en solución es más fácil de manipular.

ATENCIÓN: El EtBr es sensible a la luz. Proteger la solución en bote envuelto por papel aluminio o —mejor— en bote con cristal ámbar.

Gel de agarosa (0,7%)

A continuación se indica la preparación de un gel de agarosa.

	Agarosa (g) [Final] = 0,7%	1xTBE (o TAE) (ml)	EtBr (10 mg/ml) (μ l) [Final] = 0,5 μ g/ml
Gel grande (15 x 25 cm)	1,75	250	12,50
Gel mediano (15 x 10 cm)	0,70	100	5,00
Gel pequeño (7 x 10 cm)	0,28	40	2,00