

49. Transformación de *Chlamydomonas* con la técnica de perlas de vidrio

Emilio Fernández Reyes, Vicente Mariscal, Aurora Galván Cejudo

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

RESUMEN

La transformación es una técnica básica en Biología Molecular que permite introducir DNA en un organismo y su integración en el genoma de forma estable. Existen una gran cantidad de estrategias de transformación (electroporación, utilización de virus, plásmido Ti, pistola de partícula, whisher, perlas de vidrio etc). En la práctica se discuten algunas de estas técnicas, sus principios, ventajas e inconvenientes y se realiza una estrategia sencilla y asequible a cualquier laboratorio para la transformación del alga unicelular *Chlamydomonas*. Se propone un protocolo de transformación de una estirpe de *Chlamydomonas* mediante agitación con perlas de vidrio. La estirpe de *Chlamydomonas* que se usa es mutante de nitrato reductasa y por tanto es incapaz de crecer en nitrato. Esta estirpe se transformará con un plásmido que contiene una copia funcional del gen de la nitrato reductasa y por tanto le restaurará la capacidad de crecer en medios con nitrato como única fuente de nitrógeno.

Palabras clave: Transformación, *Chlamydomonas*

Abreviaturas empleadas. PEG: polietilenglicol

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La transformación es una técnica básica en Biología Molecular y que permite introducir DNA en un organismo con múltiples propósitos. El DNA puede proceder del propio organismo o de un organismo diferente (exógeno) y entre los objetivos que se pueden perseguir están:

- Complementar una mutación cuando se introduce una copia correcta del gen defectuoso
- Hacer una interrupción dirigida de un gen determinado por recombinación homóloga
- Interrumpir genes al azar cuando se transforma con un determinado gen (etiqueta) y esta etiqueta se integra en el genoma al azar y de forma heteróloga
- Expresar/ sobreexpresar una proteína de interés o simplemente replicar el DNA para su posterior purificación, etc.

Es tan importante disponer de técnicas sencillas y eficientes de transformación, que se puede decir que un organismo recalcitrante a la transformación tiene poco interés como organismo modelo en estudios básicos y presenta dificultades para proyectos biotecnológicos. Todo ello ha dado lugar a la puesta a punto de múltiples estrategias de transformación dependiendo del organismo. Las técnicas más utilizadas son:

- Técnica del cloruro de calcio para células competentes de *E. coli*
- Electroporación
- Plásmido Ti
- Pistola de partícula
- Whisher, perlas de vidrio, etc...

En esta práctica se propone una estrategia sencilla y asequible a cualquier laboratorio para la transformación del alga unicelular *Chlamydomonas*. Además, existe una variedad de plásmidos y de estirpes para transformar que están disponibles en <http://www.chlamy.org>, así como otro material para fines didácticos.

A continuación se propone un protocolo de transformación de una estirpe de *Chlamydomonas* 305Cw15 que es mutante de nitrato, y por tanto es incapaz de crecer en nitrato, y que presenta una mutación de pared Cw que facilita la transformación. Esta estirpe se complementa para el crecimiento en nitrato con el gen de la nitrato reductasa contenido en el plásmido pMN24.

2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO

- Medio de cultivo líquido con amonio.
- Medio de cultivo líquido sin nitrógeno.
- Placas de agar con medio de cultivo de nitrato.
- Tubos estériles de 10 ml.
- Perlas de vidrio esterilizadas.
- Células de *Chlamydomonas* 305Cw15.
- DNA del plásmido PMN24.

3. PROTOCOLO A REALIZAR

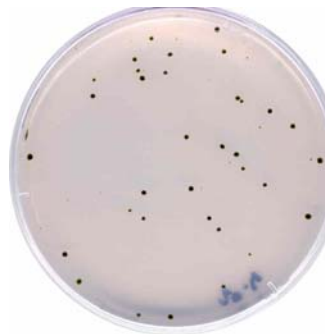
- 1. Crecer las células de *Chlamydomonas* en medio mínimo con amonio hasta una densidad de $1-2 \times 10^6$ células/ml.
- 2. Recoger las células por centrifugación a 5000 rpm, 5 min.
- 3. Resuspender las células en medio sin nitrógeno a una relación v/v 1/100.
- 4. Disponer de una serie de tubos de ensayo estériles a los que se añade: 300 μ l de células, 100 μ l de polietilenglicol al 20%, 1-2 μ g DNA

(el DNA linealizado transforma generalmente mejor que el DNA superenrollado), y 300 mg de perlas de vidrio estériles.

- 5. Agitar vigorosamente en vórtex 15-30 segundos.
- 6. Plaquear en medio selectivo con nitrato e incubar en la luz

4. RESULTADOS ESPERADOS

A los 6 días aparecerán colonias visibles cuando se transforma con el plásmido PMN24. En los controles, de células tratadas del mismo modo pero sin DNA PMN24, no deben aparecer colonias



5. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

La eficiencia de transformación, es decir, el número de colonias transformantes por número de células y μg de DNA, dependerá de factores como el tipo de DNA, la presencia o no de pared celular, el tiempo de agitación, etc. La estirpe que se usa carece de pared celular (mutación Cw) lo que aumenta la eficiencia de transformación.

Existe una variedad plásmidos y de estirpes de *Chlamydomonas* para transformar que están disponibles en <http://www.chlamy.org>, así como otro material para fines didácticos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Fernández E, Schnell R, Ranum LPW, Hussey SC, Silflow CD, Lefebvre PA (1989) Isolation and characterization of the nitrate reductase structural gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 86, 6449-6453.
- Harris E (1989) The *Chlamydomonas* sourcebook. Academic Press, New York.
- Harris EH (2001) *Chlamydomonas* as a model organism. Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 52, 363–406.

ANEXO 1: MEDIOS, SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO

Soluciones

Los medios utilizados para el cultivo de *C. reinhardtii* se preparan a partir de las siguientes soluciones concentradas (Harris, 1989):

- *Solución A*: 5 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 40 g/l NH_4Cl .
- *Solución A-N*: Igual que la solución A, pero sin NH_4Cl .
- *Solución B*: 115 g/l K_2HPO_4 , 6 g/l KH_2PO_4
- *Solución de oligoelementos*: 10g de EDTA (ácido libre) se disuelven en 250 ml de H_2O . A continuación, se calientan 550 ml de H_2O a 100°C y se añaden por el siguiente orden: 11,4 g/l H_3BO_3 ; 22 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5,1 g/l $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 5g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,6 g/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1,6 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,214 g/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Tras mezclar ambas soluciones, se deja enfriar a $80\text{-}90^\circ\text{C}$ y se ajusta el pH a 6,8 con KOH al 20% procurando que la temperatura no baje de 70°C . Se enrasa el volumen hasta 1 l, manteniéndose en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 2 días antes de su uso.

Preparación de los medios:

- Medio líquido con amonio: 10 ml/l de solución A, 10 ml/l de solución B, 1 ml/l de solución de oligoelementos.
- Medio líquido con nitrato: 10 ml/l de solución A-N, 10 ml/l de solución B, 1 ml/l de solución de oligoelementos y 4 mmol/l de nitrato.
- Medio sólido selectivo de nitrato: se añade bactoagar (15 g/l) a la mezcla anterior previamente disuelta. Una vez autoclavado el medio se distribuye en placas Petri.