

Guía Básica de Clonaje Molecular Para Principiantes



Lin Li Bao

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

2. CONCEPTOS BÁSICOS

- A. Diseño experimental
 - A.1. Elección del vector
 - A.2. Elección del sitio de inserción y enzimas de restricción
- B. Ensamblaje *In vitro*
 - B.1. preparación del vector & inserto
 - B.2. Introducción del inserto en el vector
- C. Replicación *In vivo*
 - C.1. Elección de bacterias competentes
 - C.2. Screening de clones con el plásmido nuevo
 - C.3. Comprobación del plásmido nuevo

3. CLONAJE TRADICIONAL DE “CORTA-y-PEGA”

4. CLONAJE CON BAC

5. CLONAJE POR GIBSON

This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).



1. INTRODUCCIÓN

En esta guía recojo todos los conocimientos y protocolos de clonaje que he usado personalmente durante mi tesis doctoral. Incluye una serie de conocimientos esenciales para el manejo de clonaje tradicional y también protocolos de BACs aplicable a cualquier plásmido de tamaño estándar. También incluye un método más moderno y muy eficiente, el famoso Gibson Assembly.

Muchas veces, el hecho de clonar un gen de interés en el vector que quieres constituye el primer paso y el más crucial para continuar un estudio de ciencia básica o traslacional. Y a veces, este primer paso te puede llevar muchísimo tiempo. Aunque en este manual no se recoge todas las metodologías existentes de clonaje molecular, aprenderás conceptos y técnicas básicas y esenciales. Con estos conocimientos podrás aprender rápidamente cualquier método de clonaje y aplicarlo. En cada paso de cada método os doy mi consejo personal basado en mi propia experiencia, CON EJEMPLOS REALES.

2. CONCEPTOS BÁSICOS

Para empezar, necesitarás dominar los siguientes conceptos:

Vector: plásmido circular que suele llevar una resistencia a antibióticos que se replica independientemente del ADN genómico dentro de la bacteria. Existen muchos tipos de vectores y se pueden clasificar de muchas maneras según sus características. Suelo decir que cada vector es un mundo. La clasificación que más te puede afectar en un clonaje es si es de bajo ó alto número de copias.



Existen vectores/plásmidos diseñados especialmente para facilitar los clonajes. Por ejemplo, los plásmidos que poseen un gen marcador, el gen de la beta-galactosidasa, lac Z. La actividad de la β -galactosidasa sólo se detecta en cepa de bacterias *E. coli* que posea un episoma F'. Las bacterias transfectadas con estos plásmidos necesitan ser inducidas con isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG; inductor del promotor de LacZ) y 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal; un colorante de color azul cuando es hidrolizado por la β -galactosidasa). El polilinker está localizado dentro del gen Lac Z. De esta manera, si consigues exitosamente ligar el inserto, se interrumpe la β -galactosidasa. Y cuando el ADN exógeno interrumpe el gen, no es capaz de hidrolizar el sustrato y la colonia permanece blanca (a veces azul claro).

Este tipo de vectores te permite hacer un screening más rápido identificando las colonias de color azul/blanco, gracias a la actividad β -galactosidasa.

Inserto: fragmento de ADN que quieres clonar en el plásmido vector.

Polilinker/MCS (Sitio de clonaje múltiple): una región que posee la mayoría de los vectores comerciales. Se trata de una región con múltiples sitios de restricción “comunes” de corte único diseñados especialmente para que se pueda elegir entre varias enzimas y ligar el inserto fácilmente.

A. Diseño experimental en el escritorio

A.1. Elección del vector

Siempre que sea posible, elige muy bien el vector. Aunque a veces esto no es posible, ya que puedes querer usar un vector basado en un artículo o simplemente el que haya disponible en tu laboratorio. Sea la opción que sea, una vez que tengas el vector, analízalo muy detenidamente explorando todas las opciones posibles. Yo uso la versión gratuita de *SnapGene Viewer*, es muy sencillo para hacer una simulación de tu clonaje. El *SnapGene* detecta automáticamente genes y sitios comunes tales como el sitio ORI (origen de replicación, esencial para la propagación del plásmido); el marcador de selección, como puede ser la resistencia a Kanamicina; el *polilinker*; el promotor; Proteínas como una proteína fluorescente; un marcador de selección secundario (figura 1). La lista es larga ya que existen una gran variedad con distintos genes de interés experimental.

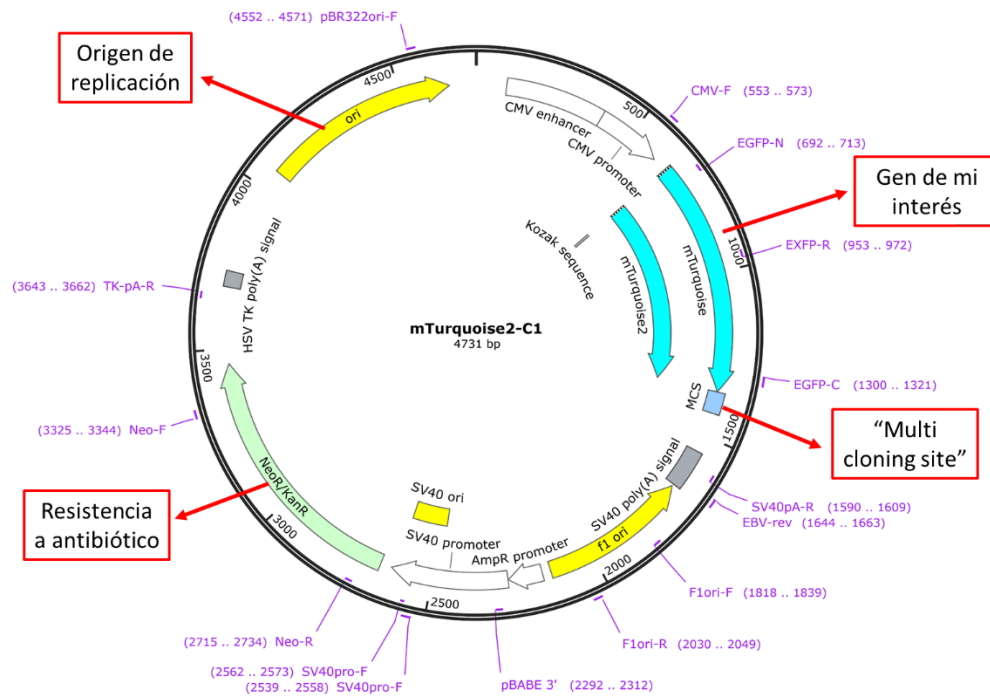


Figura 1. Mapa del plásmido de mTurquoise2-C1 visto con SnapGene. Los genes o sitios que se ve en este mapa es detectado automáticamente por el programa. Como se puede ver hay un origen de replicación, un *polilinker*, varios promotores, un gen de resistencia a antibiótico, y en este caso, una proteína fluorescente "mTurquoise2".

Puede ocurrir que no detecte estos sitios comunes al abrir un archivo, siempre puedes añadirlos marcando la opción "Detect common features" (figura 2). O añadir nuevos sitios manualmente totalmente personalizado. En este último caso, tienes que tener un segmento de secuencia seleccionada, ir a características, y añadirlo de la manera que quieras.

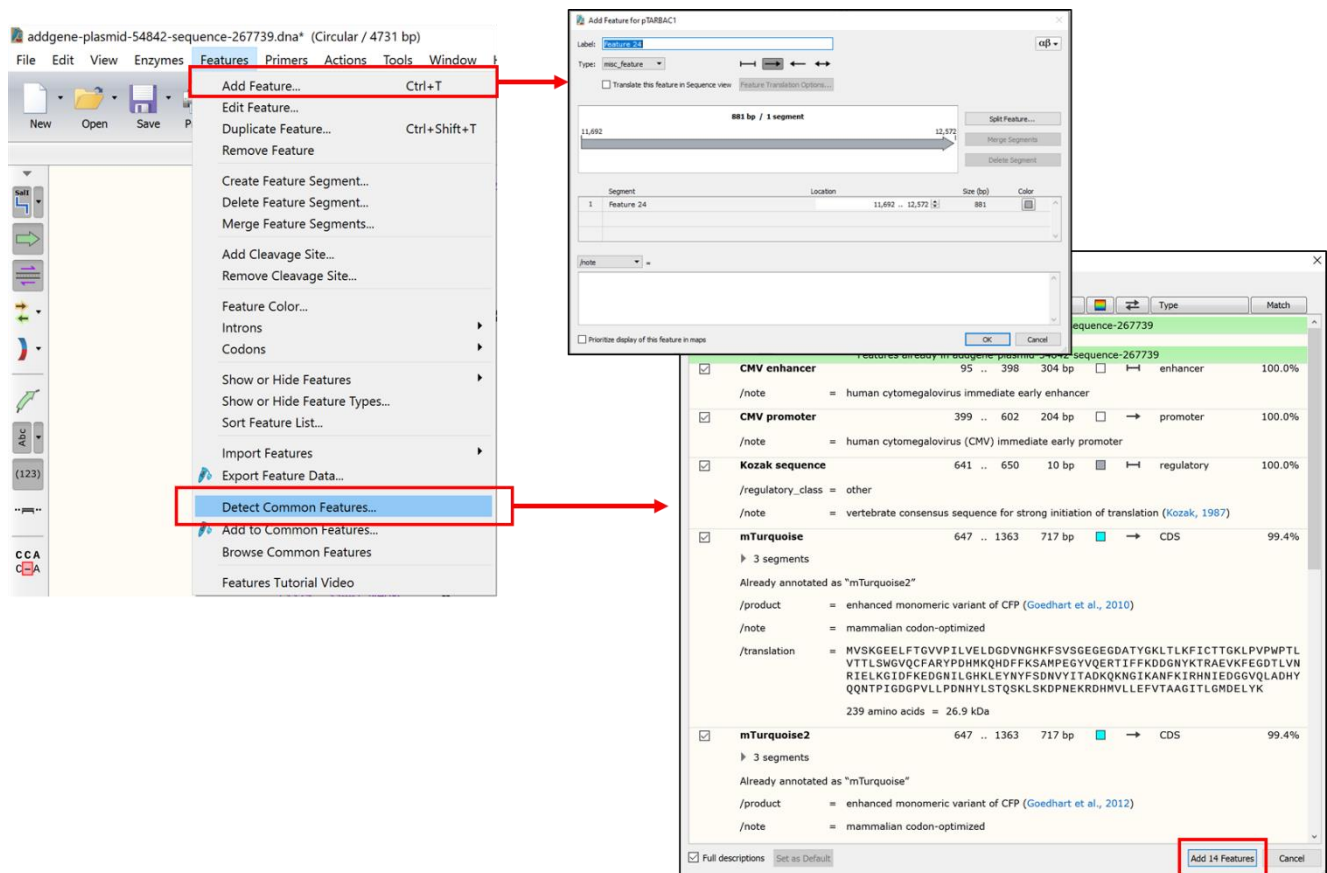


Figura 2. Cómo añadir manualmente o detectar automáticamente genes en SnapGene. En las opciones de la parte superior podrás manipular tu secuencia de la manera que quieras. Yo siempre hago una detección automática y si el fragmento que me interesa no es detectado, lo añado manualmente.

A.2. Elección del sitio de inserción y enzimas de restricción

El sitio de inserción/ligación de tu inserto vendrá determinada según el **objetivo** de cada experimento. La manera estándar y si no tienes un sitio concreto en el que ligar tu inserto, el sitio lo podrás elegir en función de los sitios de restricción que haya compatibles entre tu inserto y el vector. O si nos ponemos en el caso más fácil, quieres clonar tu inserto en el *polilinker* en el que tienes muchas enzimas de donde elegir. Entonces, elegir las enzimas correctas será crucial para tu éxito.

Las enzimas se pueden clasificar en dos grandes grupos, los que te dejan con extremo romo o con extremo cohesivo. Los extremos cohesivos son más eficientes que los

extremos romos. Las cadenas complementarias que deja los extremos cohesivos hacen que la unión sea mucho más estable (Figura 3).

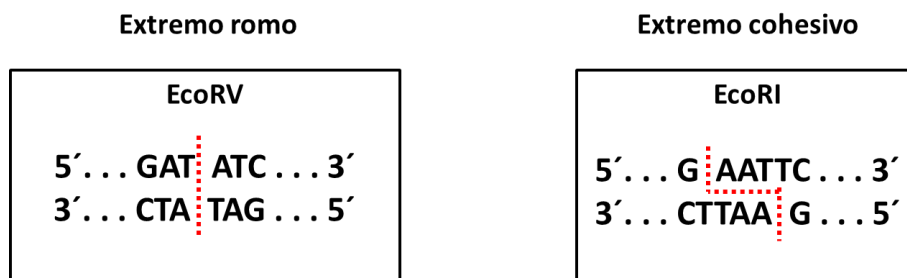


Figura 3. Ejemplo de enzimas que genera extremos romos y extremos cohesivos después de la digestión.

Además de la eficiencia de la ligación por los extremos libres, también hay que tener en cuenta el **sentido** de tu inserto. Si usas una sola enzima, pero quieres que tu inserto esté en una orientación concreta, tras la transformación, sólo la mitad de las bacterias con vector es la correcta. Si este es tu caso, lo mejor que puedes hacer es buscar dos enzimas con extremos cohesivos diferentes para que la inserción sea dirigida. La desventaja de las enzimas con extremo cohesivo es que no siempre puedes encontrar las dos enzimas que te aisle el vector y esté en el *polilinker* o el sitio deseado.

Entonces, hay que renunciar a las enzimas con extremo cohesivo y hacerlo con enzimas con extremo romo, o un extremo romo y otro cohesivo. ¡Sé flexible, usa tu propia combinación! Y si después de todo, no existe ningún sitio de restricción que te interese, siempre puedes recurrir a hacer “*blunting*” (añadir extremos romos) a cualquier sitio de corte (a mí personalmente no me gusta este método). Se puede hacer extremos romos añadiendo nucleótidos en los extremos 5' libres o eliminando nucleótidos de los extremos 3' libres, haciendo compatibles extremos no compatibles.



Sabías que... El nombre de una enzima de restricción proviene de la especie y la cepa de la bacteria de donde fue derivado. Veamos con un ejemplo: **EcoRI** fue aislado de *E. coli*, la cepa **R** y el primero en aislarse en esta cepa, **I**.

Para elegir enzimas en SnapGene, en la barra superior hay una opción de enzimas. Podrás poner una serie de enzimas que tengas disponible en el laboratorio o ver de todas las disponibles. Yo recomiendo la opción de situar todas las enzimas de corte único y/o doble corte y elegir las que más te convengan (figura 4).

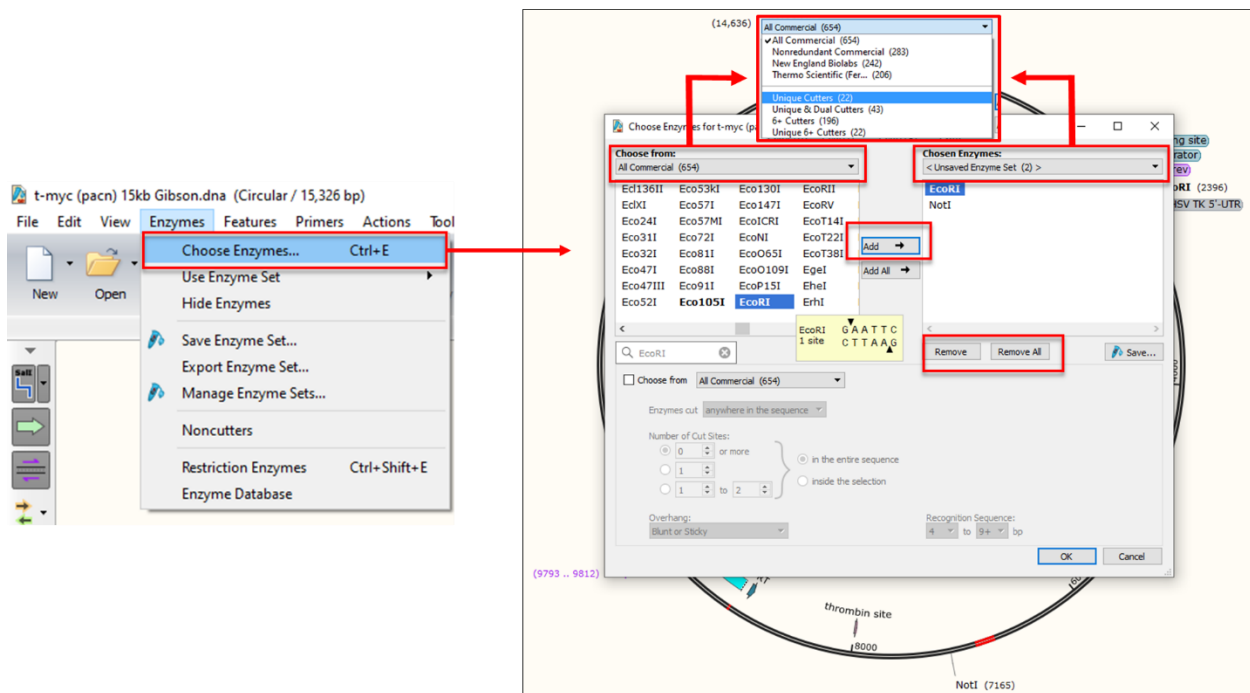


Figura 4. Cómo elegir enzimas en SnapGene. En la opción de enzimas de la barra superior elegir enzimas concretas que dispones, enzimas de casas comerciales comunes o incluso te ofrece grupos de enzimas. Las más útiles son las enzimas de corte único o de doble corte, que suelen ser los sitios que más te interesen para un clonaje.

Una vez decididas los sitios de corte y cómo clonar el vector y el inserto, conviene crear *in silico* la ligación/el plásmido nuevo. SnapGene te permite hacerlo fácilmente creando un nuevo archivo. Poniendo siempre primero el vector, en el sentido correcto, añadir el inserto, después la parte del vector que queda y crear vector (ver en el punto 3). Una vez creada, añades la detección de genes comunes y verificas que has creado tu vector de manera correcta respetando el sentido de los genes. En muchos casos es importante ya que puedes querer usar el promotor o una proteína fluorescente que tiene que estar en el mismo sentido de transcripción que tu gen de interés.

Sin embargo, el sitio de inserción no siempre es flexible. Por ejemplo, si tu objetivo es crear una proteína de fusión entre dos proteínas, no tienes elección. Sólo se puede crear de manera que la segunda proteína esté justo detrás de la primera sin su codón de STOP. En este caso, hay que recurrir otras maneras de clonarlo como la obtención del inserto por PCR. Este método tiene dos desventajas. La primera desventaja es que las polimerasas siempre cometen algún **error de replicación** y no hay maquinaria de reparación que repare esos errores. Para esto se puede recurrir a polimerasas especiales llamados “*high Fidelity*” que cometen error de replicación en una tasa muy baja. Para estas condiciones he usado la polimerasa Q5 (#M0491S/L) y he amplificado

fragmentos de hasta 5 kb (ver en el apartado de clonaje con Gibson Assembly). Y la otra desventaja es que existe **límite en tamaño** del fragmento que amplificas. Cuanto más grande sea el producto más difícil es la amplificación aunque existen muchas opciones de polimerasas especiales para fragmentos grandes.

La ventaja de este método es que no dependes de los sitios de corte que hay disponibles para extraer justo el fragmento que te interesa. En la amplificación el inserto (que suele ser más pequeño que el vector, aunque no siempre) puedes añadir en los *primers* los sitios de corte que necesitas. Por ejemplo, los sitios de corte que sí hay adecuados en el vector, pero no en el inserto. No entraré en detalle las condiciones para esta opción de PCR ya que siempre he intentado hacerlo por digestión



Sabías que... los extremos generados por digestión con enzimas conservan el grupo fosfato en el extremo 5', mientras que los productos de PCR no lo tienen. Durante la ligación, la ligasa necesita este grupo fosfato para formar un enlace fosfodiéster, una unión covalente entre los extremos 5' con 3' del vector-inserto.

Así mismo, además de simular el clonaje *in silico*, tienes la posibilidad de verificar que tus secuencias están bien, añadiendo la detección de **ORFs (Open Reading Frame)**. El programa te detecta todas las ORFs posibles. No te asustes, es simplemente una detección automática. Asegúrate de que tu proteína está entera en una de las ORFs. Para facilitar la visualización, te quedas con la ORF que te interesa (figura 5).

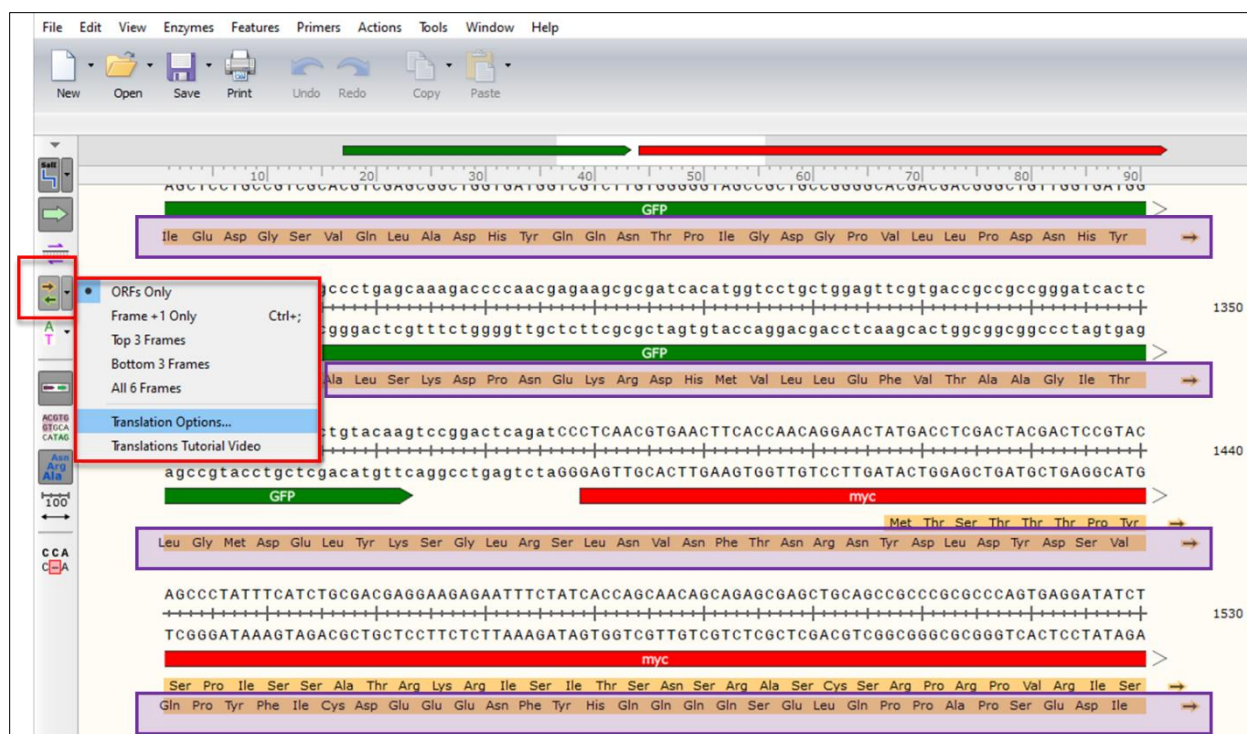


Figura 5. Cómo detectar ORFs en SnapGene. En esta secuencia está una proteína de fusión entre una GFP (verde) y el gen Myc (rojo). Con la detección de ORFs verifico que en una de las lecturas (enmarcado en morado) está la GFP que continúa incluyendo a Myc sin interrupción.

B. Ensamblaje *In vitro*

B.1. preparación del vector & inserto

Tras el diseño del clonaje en el ordenador, es hora de prepararlos para la posterior ligación. Como hemos visto en el apartado anterior, siempre que se pueda, se va a intentar encontrar las enzimas adecuadas para extraer tanto el vector como el inserto por digestión. Yo siempre he usado las enzimas de *New England Biolabs* (NEB). La mayoría son sin *star activity*. Para la digestión sigue el protocolo que viene para cada enzima según la casa comercial, aunque os enseñé en este apartado el protocolo que uso yo de manera estándar. Las enzimas de NEB suelen venir en formatos de actividad de 10U/μl, 20U/μl ó 100U/μl y varias cantidades que puede elegir. U es la unidad de actividad de la enzima, 1 U se define como la actividad necesaria para digerir 1 μg del plásmido λ durante 1 hora a 37°C en 50μl. Esto significa básicamente que, en una situación ideal, para digerir (un corte) un 1 μg de plásmido, sólo necesitas 1 U, 1 hora, a 37°C. Demasiado idílico, nunca ocurre al menos en mis manos. De esta manera, yo suelo usar 20U para cada μg de plásmido, a 37°C durante toda la noche (o/n). Aún así dependiendo

del estado de tu plásmido, puedes encontrarte con parte del plásmido sin digerir. Por lo tanto, siempre es recomendable poner un poco (50-100 ng) del plásmido sin digerir para servir de control negativo de la digestión en el gel de electroforesis.

Y siempre recomiendo poner las digestiones o/n.

Protocolo de digestión (NEB)

- DNA	1µg / X µl	4 µg
- Buffer 10x	1 µl	4 µl
- Enzima 20U	1 µl	4 µl
- H2O	---	----
<u>Vf= 10 µl</u>		<u>40µl (Vf =10x del volumen de la enzima)</u>

1. Mezclar todo e incubar a **37°C**, o/n. La enzima se echa al final siempre.
2. Cargar en el gel de agarosa, purificar o inactivar a **70°C**, 10 minutos para guardar.



La cantidad (µg) total del plásmido a digerir no es aleatoria. Hay que tener en cuenta dos cosas: **1)** La proporción del fragmento deseado. Por ejemplo, si es el plásmido linealizado, la mitad o incluso menos. La cantidad del fragmento que extraes también será sólo esa parte proporcionada de la cantidad total. **2)** Se pierde una gran cantidad de ADN durante la purificación. Aunque la proporción depende del método de purificación que uses. Por suerte, para las ligaciones no necesitamos gran cantidad de ADN, pero sí lo más puro posible. Yo siempre prefiero partir de la mayor cantidad posible y que el producto de purificación sea la más limpia posible.

Tanto si se han preparado el vector/inserto por digestión o PCR, se purifica el fragmento de ADN por tamaño en un gel de agarosa o en el caso de PCR se puede purificar directamente del producto de la PCR. Yo recomiendo siempre la primera opción, ya que en el gel de agarosa vemos si el fragmento corresponde bien al tamaño que queremos, y eliminamos restos que no nos interesa que nos puede diluir la purificación del fragmento deseado. Recomendando el Zymoclean Gel DNA recovery kit (#D4002).

Si tu vector tiene extremos compatibles como por ejemplo que haya sido linealizado con una única enzima, sería necesario eliminar el fosfato que está presente en su extremo 5'. Este paso de desfosforilación es necesario para evitar que el vector se religue y vuelva a formar el vector original dando lugar a falsos positivos.

Protocolo de desfosforilación (Sigma Aldrich #4898133001)

- Vector	X ng / X μ l
- Buffer 1 10x	1 μ l
- rAPid alkaline phosphatase	1 μ l
- H ₂ O	---
	<u>Vf= 10 μl</u>

- 1- Mezclar todo e incubar a **37°C**, 1 hora.
- 2- Inactivar a **75°C**, 2 minutos.

Esta mezcla se puede usar directamente en la ligación.

En el apartado anterior, hemos visto que a veces no es posible encontrar enzimas compatibles y hay que recurrir a otros métodos como hacer *blunting*. Un caso real podría ser digerir el vector con una enzima que deja extremos romos, y digerir el inserto con enzimas cohesivas y después hace *blunting* sólo al inserto. De esta manera ya se podría ligar el inserto en el vector cortados por enzimas no compatibles.

Protocolo de Blunt (Quick Blunting Kit - NEB #E1201)

- Inserto	X ng / X μ l
- Buffer 10x	1 μ l
- dNTP mix 1mM	1,5 μ l
- Enzima	1 μ l
- H ₂ O	---
	<u>Vf= 10 μl</u>

1. Mezclar todo e incubar a **25°C** (temperatura ambiente, RT), 1 hora.
2. Inactivar a **70°C**, 10 minutos.



Sabías que... Las enzimas que dejan extremos cohesivos pueden ser extremos 5'libres o 3'libres. Y el *blunting* se hace de distinta manera en función si es 5' o 3'libres. En los extremos 5'libres, se añadirán nucleótidos ya que las polimerasas sólo pueden añadir nucleótidos si tienen 5'-fosfato en el extremo. Y en los extremos 3'libres, se eliminarán los nucleótidos libres por las exonucleasas. El Blunting kit de NEB se encargará de ambos extremos.

B.2. Introducción del inserto en el vector

Después que preparar el vector y el inserto llega el momento de la ligación. Antes de poner cualquier ligación, especialmente si es la primera vez que se hace el clonaje, os recomiendo poner todos los **controles** posibles en cada paso de la ligación. Así, en cualquier diseño de la ligación deberías de incluir un control de la transformación, un control de la desfosforilación (figura 6), control negativo sin ligasa o cualquiera que te permita saber dónde ha podido fallar durante todo el proceso. Pon los controles adecuados a tu caso, no existe un protocolo único para todos los clonajes.

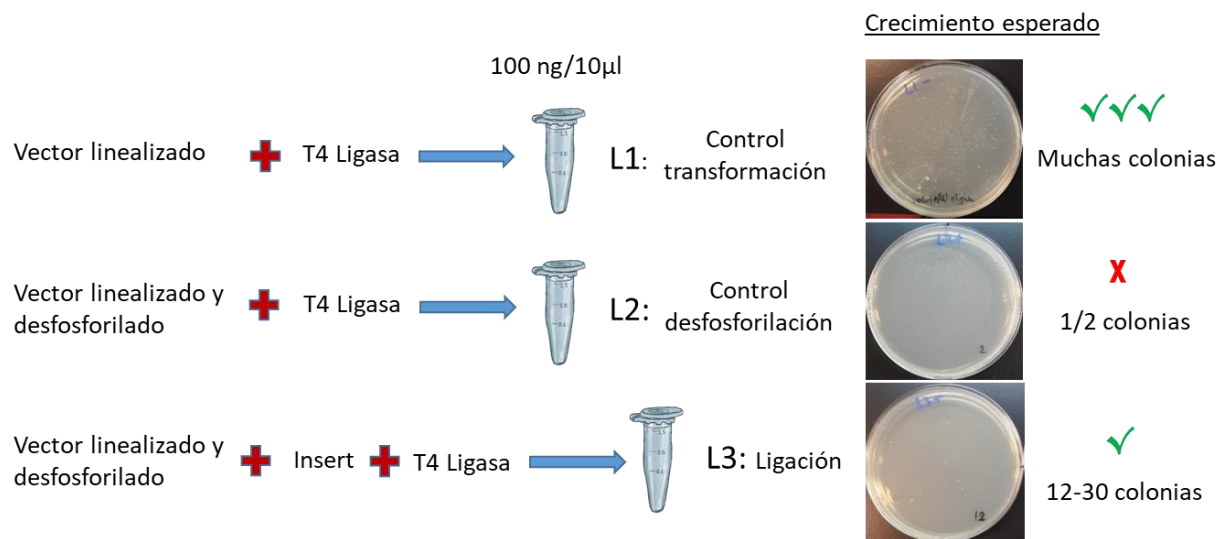


Figura 6. Diseño experimental de una ligación estándar. Se recomienda estos controles para una ligación estándar pero siempre hay que adaptar el diseño experimental a tu propio clonaje, ya que cada vector y cada ligación pueden ser totalmente diferentes. Así, la mezcla 1 (L1) es un control de la transformación y de la desfosforilación. Con este control se asegura que la transformación de las bacterias se ha realizado bien y además se comprueba que la ligasa está funcionando correctamente. La mezcla 2 (L2), se trata de un control positivo de la desfosforilación. En comparación con las colonias crecidas en la L1, se puede comprobar de si la desfosfatasa ha funcionado correctamente. Pero nunca es 100 % eficiente, se podrá ver siempre cierto crecimiento, 1 ó 2 colonias. La última mezcla (L3), sería la ligación en sí. En esta placa debes de observar menos crecimiento que la L1 y mucho más que la L2. Pero esto dependerá de tu vector e inserto.

Existen muchas enzimas, kits o protocolos de ligación. Yo he usado el “T4 DNA Ligase” de NEB, siguiendo el protocolo que recomienda la casa comercial, aunque con ligeras diferencias y recomiendo siempre la incubación a 16°C o/n.

Protocolo de Ligación con T4 (T4 DNA Ligase - NEB #M0202)

- 1- Calcula la cantidad de la reacción requerida (usar NEBioCalculator).

T4 DNA Ligase buffer (10x)	1µl
Vector (4kb)	50 ng (- µl)
Inserto (1kb)	37,5 ng (- µl) (ratio de 1:3)
H2O	-----
T4 Ligasa	1 µl (último paso)
	<u>Vf: 10 µl-20µl</u>

- 2- Pipetear suavemente la mezcla o mezclar con pequeños golpes con el dedo.
- 3- Incubar a 16°C o/n.
- 4- Inactivar a 65°C, 10 minutos.
- 5- Transformar todo el volumen en las bacterias competentes.



El volumen final de la ligación debe ser cuanto menos mejor. Esto limita la cantidad de ADN que puedes usar en la reacción. Yo suelo poner 50-100 ng de vector y la cantidad (ng) del inserto en función de la ratio que quiero poner. De esta manera, la cantidad total de ADN de la reacción suele ser alrededor de los 200ng. La ratio de vector vs inserto (siempre calcular en moles) es opcional, 1:1, 1:3, 1:5, 1:8...La ratio más común para usar es la de 1:3, 1 de vector : 3 de inserto, dependerá de cada caso y se puede probar varias a la vez.

C. Replicación *In vivo*

C.1. Elección de bacterias competentes

Las bacterias que generalmente se usan para la replicación de plásmidos son cepas no-patógenas de *E.coli*. Se les llama bacterias competentes y existen muchos tipos dependiendo de la clasificación. La clasificación más general sería dependiendo del tipo de tratamiento que necesita para la transformación, pueden ser químicamente y eléctricamente competentes. Dentro de cada grupo encontraremos a su vez múltiples tipos adaptado a la necesidad de cada experimento.

Os enseño aquí los 3 tipos de bacterias que he usado dependiendo del tipo de plásmido/ligación que necesitaba replicar. 2 cepas de bacterias químicamente

competentes y una cepa de bacteria eléctricamente competente. La cepa más común es la cepa *DH5α*, se usa para clonación de rutina. Además de la *DH5α*, es muy útil la cepa llamada *stb13*. Esta cepa *stb13*, no tiene la enzima *recA*, una recombinasa naturalmente presente en la maquinaria genética de la bacteria. Por lo tanto, es recomendable usarlo para plásmidos de ADN inestable que tienden a recombinarse fácilmente. Por último, la cepa eléctricamente competente EL250, especial para recombinación de BACs. Además de estos tipos que he usado yo, hay muchos más tipos de bacterias competentes como por ejemplo para expresión de proteínas, para producción de bibliotecas, etc (figura 7).

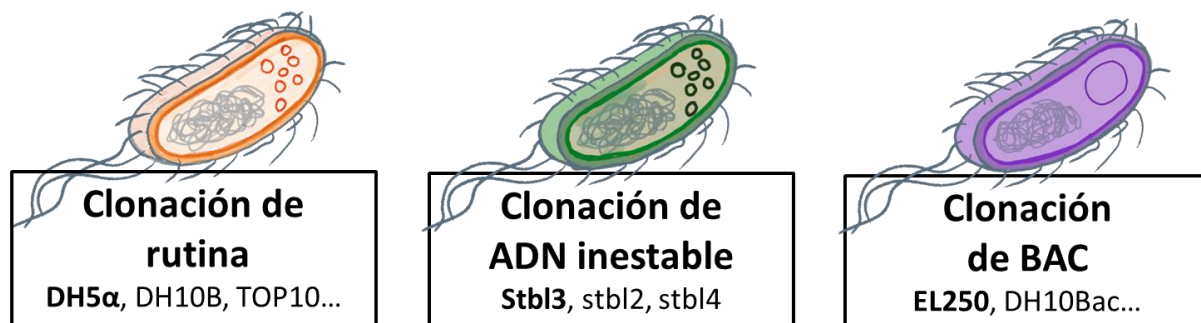


Figura 7. Tipos de bacterias competentes. En función de las características de tu clonaje, existen distintos tipos de bacterias competentes que se ajustan a tus necesidades.

Además, quiero añadir que estas bacterias las podemos generar masivamente en el laboratorio. Sólo necesitas una alícuota de partida. Existen distintos protocolos, os presento dos dependiendo de la necesidad de eficiencia que requieras para la transformación. Ambos protocolos para producir *DH5α*. Recomendando el protocolo 1, método estándar, más rápido, pero menos eficiente, recomendado para producir bacterias competentes para replicar plásmidos establecidos. El protocolo 2, “método Inoue”, requiere más tiempo, pero produce bacterias competentes más eficientes, recomendado para ligaciones (figura 8)

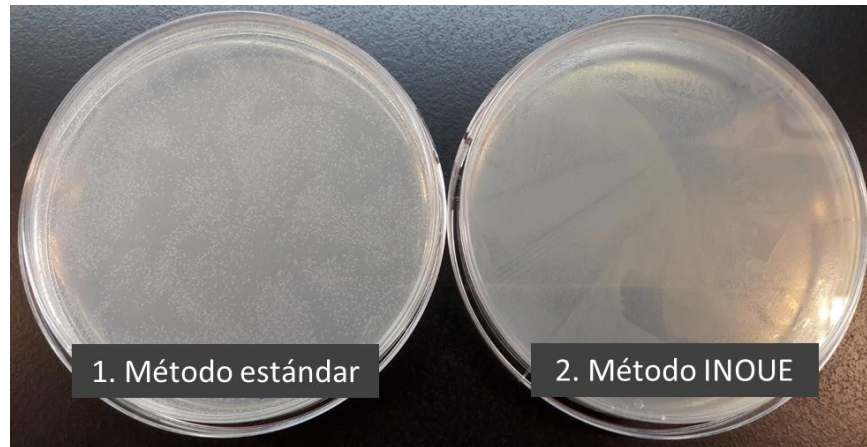


Figura 8. Comparación de bacterias competentes *DH5α* obtenidos por dos métodos. En la figura se compara el crecimiento de una transformación con 20ng de un plásmido establecido en el laboratorio. Como se puede apreciar en la figura, con el método estándar (1) han crecido muchas colonias, pero están aisladas. Este método es útil para replicar plásmidos ya establecidos. Mientras que con el método Inoue (2) han crecido tantas colonias que no se pueden aislar, éste segundo método produce bacterias más eficientes en la transformación y por tanto útil para replicar plásmidos de nueva ligación.

Protocolo 1. Bacterias competentes método estándar.

Preparar previamente:

- Unas bacterias competentes de partida.
- CaCl₂ 0,1M autoclavado.
- Glicerol 40% autoclavado.
- Tubos falcon de 50 ml enfriados.

Día 1

1. Plaquear bacterias competentes e incubar a **37°C**, 16-20 horas. Sin antibiótico.

Día 2

2. Picar una colonia y cultivar en un falcon de 50 ml con 5 ml de LB, a **37°C**, o/n. Sin antibiótico.

Día 3

3. Pasar el mini-cultivo a un matraz de 1L con 200ml (da para 50 alícuotas de 200µl aprox) de LB sin antibiótico.
4. Seguir la densidad óptica a 650 nm hasta llegar a 0,4-0,6 (2 horas o más).
5. Una vez alcanzado la densidad óptima, repartir en tubos con 25 ml del cultivo anterior y reposar en hielo 10 minutos.
6. Centrifugar a 4000 g, **4°C**, 5 minutos.
7. Añadir 10 ml de CaCl₂ 0,1M en hielo y resuspender suavemente.
8. Reposar en hielo 20 minutos.
9. Centrifugar a 4000 g, **4°C**, 5 minutos.
10. Retirar el sobrenadante decantando.
11. Resuspender con 0,25 ml de CaCl₂ 0,1M + 0,25 ml de glicerol 40% (Cf = 20 %).
12. Alicuotar en eppendorfs con 200 µl (para cada transformación se usa 100µl). Guardar a -80°C.

Protocolo 2. Bacterias ultra competentes por el "Método Inoue"

Preparar previamente:

- Unas bacterias competentes de partida.
- DMSO estéril.
- KOH 5M 100ml: Disolver 28,05g de pellets de KOH en 100 ml de H₂O miliQ.
- PIPES 0,5M pH6,7 100ml: Disolver 15,1 g de PIPES en 70 de H₂O miliQ. Ajustar el pH con KOH 5 M. Enrasar con H₂O miliQ hasta 100 ml. Esterilizar mediante filtro Nalgene 0,45 mm. Guardar alícuotas a -20°C.
- Buffer de transformación Inoue:
 - o MnCl₂4H₂O -----10,88 g (55mM)
 - o CaCl₂2H₂O -----2,20 g (15mM)
 - o KCl -----18,65 g (250 mM)
 - o PIPES 0,5M pH6,7-----20ml (10mM)
 - o H₂O----- Enrasar hasta 1L

Hacer alícuotas de 100 ml y guardar a -20°C. En el momento de usar, esterilizar la alícuota con filtro Nalgene 0,45 mm.

Día 1

1. Plaquear las bacterias e incubar a 37°C, 16-20 horas. Sin antibiótico.

Día 2

2. Picar una colonia en 25ml de LB en un matraz de 250ml. Sin antibiótico.
3. Incubar a 37°C en agitación (250-300 rpm) durante 6-8 horas.
4. Inocular 3 matraces de 1 L con 250ml de LB con un volumen del cultivo starter de 3, 5, 9 ml respectivamente.
5. Incubar a 22 °C con agitación moderada (180 rpm), o/n.

Día 3

Preparar previamente 100 ml del buffer de transformación Inoue filtrado. Tubos de 50 ml y eppendorf previamente enfriados a 4°C. Nitrógeno líquido. Y DMSO filtrado. A partir de este paso, se hace todo en frío, trabajar en cámara fría si es posible.

6. Leer la OD600 de los 3 cultivos. Monitorizar cada 45 minutos o más hasta que uno llegue a 0,55.
7. Poner el cultivo con la densidad óptima en hielo durante 10 minutos. Descartar los otros.
8. Verter en un tubo para centrifugar a 2.500 G, 4°C, 10 minutos.
9. Descartar el medio y dejar la botella boca abajo sobre papeles 2 minutos. Eliminar con una pipeta gotas que puedan quedar.
10. Resuspender suavemente con 75 ml de Buffer de transformación.
11. Centrifugar a 2.500 G, 4°C, 10 minutos.
12. Descartar el medio y dejar la botella boca abajo sobre papeles 2 minutos. Eliminar gotas que puedan quedar.
13. Resuspender las bacterias suavemente con 20 ml de buffer de transformación.
14. Añadir 1,5 ml de DMSO, mezclar suavemente y dejar en hielo 10 minutos.
15. Alicuotar en tubos con 200µl (se usa 100µl para cada transformación). Congelar inmediatamente en N₂ líquido y guardar a -80°C.

Tras seleccionar las bacterias que se va a usar, toca introducir la ligación en la bacteria para que se encargue de la replicación del mismo. En este apartado os dejo el protocolo de transformación estándar que sirve para las bacterias químicamente competentes.

Protocolo de transformación de bacterias químicamente competentes por choque térmico

- 1- Preparar un baño o termobloque a **42°C**.
- 2- Descongelar las bacterias competentes (*DH5alfa*) en hielo.
- 3- Añadir X µg de plásmido a las bacterias y mover suavemente con la punta de a pipeta. (para replicar un plásmido que ya dispones, con menos de 1 µg. Para replicar plásmido de ligación o complicados, usar toda la cantidad que se dispone).
- 4- Reposar en hielo durante 15 minutos.
- 5- Poner 40-60 segundos a **42°C** en el sistema preparado.
- 6- Colocar inmediatamente en hielo y reposar 2 minutos.
- 7- Añadir 600µl de medio LB y agitar a **37°C**, 1 hora.
- 8- Atemperar mientras placas de agar con el antibiótico deseado.
- 9- Plaquear las bacterias. (Para replicar un plásmido establecido, se puede plaquear 200ul del total en una placa. Para plásmidos ligados o de poca cantidad, se centrifuga el volumen total y se plaquea todo).
- 10- Crecer en un incubador a **37°C** o/n.

C.2. Screening de clones con el plásmido nuevo

Tras crecer las bacterias transformadas en placa durante una noche, procederemos a averiguar qué colonia ha replicado la ligación. Para esto hay que hacer una extracción del plásmido, lo que comúnmente llamamos una mini-prep. En este paso también se puede optar por distintas formas de comprobación en función de cada clonaje.

Si tienes pocas colonias, o el inserto es de un tamaño pequeño, se hacen las mini-preps con el kit de extracción que se dispone en el laboratorio (yo he usado por ejemplo NucleoSpin Plasmid EasyPure #740727.50). Y hay que elegir una o dos enzimas que te corte en el inserto y en el vector para chequear las colonias positivas por el patrón de digestión. Si tu inserto es pequeño, la mejor opción es poner varias digestiones que corte en tu inserto y en el vector vacío. Pon siempre el vector original, digerido y no digerido como control.

En cambio, si tu inserto es mayor de 1kb, recomiendo hacer la extracción y correr en un gel todos los plásmidos, incluyendo el vector original por supuesto, sin digerirlo

previamente. Ya que por tamaño te permite hacer una aproximación de las colonias positivas reales sin necesidad de esperar la digestión y gastar enzimas.

También puedes hacer PCR de tu inserto (no entraré en detalle ya que no lo he usado personalmente). Esto sólo confirma la presencia de tu inserto en el vector, pero no sabes la integridad de tu plásmido, después hay que hacer una digestión para comprobarlo.

Y si después de la transformación tienes muchas colonias que chequear, independientemente del tamaño de tu inserto, aunque cuanto más grande sea el inserto, más fácil es de diferenciarlo con el vector original. Os dejo en este apartado un protocolo de extracción mediante lisis enzimática, es un protocolo muy rápido que te permite extraer plásmidos de muchas colonias a la vez, pero no es una purificación. El plásmido que obtienes está sucio, por lo que en el gel de electroforesis verás mucha suciedad, pero no importa para la digestión o selección por tamaño (Figura 9).

Protocolo de extracción de plásmidos mediante lisis enzimática

Se recomienda usar este protocolo si tienes muchas colonias para chequear. Hay que tener en cuenta que este método es sucio, vas a encontrar con ADN genómico de la bacteria en el fondo de tu gel. Preparar previamente lizozima a 10mg/ml y STET:

STET para un volumen total de 100 ml (guardar a 4°C):

- 10% sacarosa----- 10 g
- 50 mM EDTA ----- 10 ml
- 50 mM Tris-HCl ----- 5 ml
- Tritón ----- 1 ml
- H2O miliQ ----- 84 ml
- pH = 8

- 1- Se recoge en un eppendorf 0,5-1 ml del minicultivo.
- 2- Centrifugar a 6000 rpm, 5 minutos.
- 3- Retirar el sobrenadante.
- 4- Añadir al pellet bacteriano 250 µl de STET (4°C) + 12,5 µl de lizozima (Ci: 10 mg/ml). Se mezcla invirtiendo el tubo
- 5- Calentar agua a 100 °C en una olla, meter los tubos en una gradilla resistente 1 minuto.
- 6- Centrifugar a 13.000 rpm, 15 minutos.
- 7- Retirar el precipitado (ADN genómico y restos bacterianos) con un palillo o punta.
- 8- Echar 250 µl de isopropanol, vortex y centrifugar a 13.000 rpm, 15 minutos.
- 9- Retirar el sobrenadante.
- 10- El plásmido forma un precipitado blanco/transparente en el fondo del tubo.
- 11- Dejar secar el precipitado.
- 12- Resuspender con 25 µl de agua.
- 13- Usar 1 µl para chequear con el método deseado.

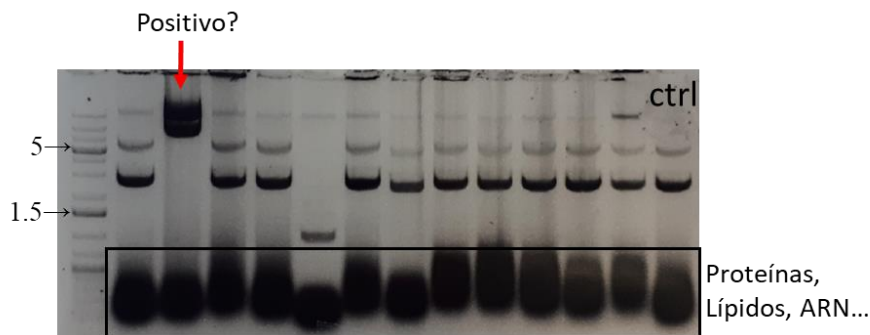


Figura 9. Screening de colonia positiva sin digestión en gel de agarosa. En este caso en concreto, el inserto era de 5kb. De esta manera se ha podido hacer un screening previo a la comprobación sólo por tamaño y usando el protocolo de extracción mediante lisis enzimática. En este gel de electroforesis podemos ver, que el ADN plasmidítico es bastante sucio aunque nos permite distinguir los tamaños del plásmido extraído. Para hacer este tipo de screening es muy importante poner el plásmido control, es decir, el vector sin digerir, para poder saber cuáles son iguales que el vector sin inserto.

C.3. Comprobación del plásmido nuevo

La secuenciación sería el paso definitivo de cualquier clonaje independientemente del método usado anteriormente. Este último paso es imprescindible especialmente si se ha usado PCR para amplificar el inserto. Aunque se haya chequeado el producto del clonaje usando varias enzimas, las digestiones sólo nos dice que se ha insertado un fragmento que sería nuestro inserto, pero no nos asegura si lo que hemos insertado está correcto. Durante la reparación, se ha podido producir pequeños cambios en los sitios de unión o SNPs (polimorfismo en nucleótido único) que unas digestiones son incapaces de detectar.

Secugen es el sitio donde secuenciamos este tipo de cosas (<https://www.secugen.es/en/index.php>), en la propia página del servicio vienen detallado el formato, concentración, cantidad del ADN que hay que mandarles dependiendo de la necesidad de cada muestra. Pero os voy a dar unos datos que hay que tener en cuenta antes de mandar muestras a este sitio.

- 1- Para secuenciar, necesitas *primers*/cebadores, si tu inserto está en un sitio “típico” de clonaje, es probable que tengas *primers* estándares que están en un gran número de vectores, tales como T3, T7, SP6...y están disponibles en Secugen. Si este es tu caso, no tienes necesidad de mandarles *primers* propios.
- 2- Si los *primers* que ellos disponen no te secuencian tu inserto, tendrás que usar unos propios. Para eso, si tienes unos *primers* que has usado anteriormente y sabes que funcionan, éstos serán tu primera preferencia.
- 3- Si vas a diseñar *primers* nuevos, hay que tener en cuenta que como máximo, el producto de la secuenciación es de 1kb aproximadamente. Y muchas veces no

llega a este valor ya que depende de la calidad de la muestra y la eficiencia de los *primers*. Así que conviene diseñar los *primers* asumiendo una amplificación de 500-800pb, para asegurar de que todo tu inserto esté secuenciado.

- 4- Por último, conviene que el primer esté a una distancia de 20-80pb de distancia del primer nucleótido que quieras que se secuencie. Ya que los primeros 50pb aproximadamente y los últimos 50pb del producto de la secuenciación no son eficientes y no es posible una buena lectura de dichas zonas.

Abajo se ejemplifica un producto de secuenciación en Secugen. Se puede ver que tengo un producto de 878 pb en total, el extremo 5' del producto tiene una región de unas 30pb que no se ha secuenciado y en el extremo 3' hay una zona de por lo menos 100pb que no se ha identificado bien. Esto hay que tenerlo en cuenta siempre que se secuencie. Así que no viene de más diseñar unos *primers* redundantes en la zona que más te interesen. Además, En el medio del producto también puede existir algún nucleótido que no se haya identificado bien, pero en estos casos, recomiendo una corrección manual aumentando los picos (Figura 10).



Figura 10. Producto de secuenciación de Secugen. Se trata de un producto de 878pb en total. N indica que no se ha podido leer la base que corresponde. Como podemos ver, en el extremo 5' existe una región de 30pb que no se ha secuenciado bien. Y en el extremo 3', los últimos 100 pb no se ha secuenciado bien. Mi recomendación es hacer una corrección manual en bases aisladas (cuadro rojo vertical superior) que no estén bien identificadas, ampliando la lectura (cuadro rojo vertical inferior).

3. CLONAJE TRADICIONAL “CORTA-y-PEGA”

A continuación se ejemplifica un clonaje hecho con métodos tradicionales aplicando los pasos detallados en el apartado anterior. El objetivo de este clonaje es conseguir introducir una proteína fluorescente amarilla (YFP) seguida de un gen resistente a kanamicina flanqueado por sitios FRT que servirá de molde para un posterior clonaje de BAC que se usará en el próximo apartado. En este caso, me interesa que la YFP esté *downstream* del gen de resistencia y no muy separado ya que posteriormente necesito introducirlo en un BAC. Los requerimientos son muy específicos.

La secuencia de la YFP la obtengo de un plásmido disponible en *Addgene* (Plasmid #54648) y el casete de resistencia flanqueado por FRT lo tengo en un plásmido “GC14” disponible en el laboratorio. Después de mirar todas las enzimas posibles y disponibles, los que mejor me vendrían sería linealizar el vector GC14 con las enzimas *SpeI* y *NotI* porque están muy cerca de donde acaba el Segundo FRT. El problema es que estas dos enzimas no me permiten sacar la YFP de su plásmido. Pero *SpeI* y *NheI* sí que generan extremos compatibles. Esto se puede mirar en páginas como *New England Biolabs* (<https://international.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/compatible-cohesive-ends-and-generation-of-new-restriction-sites>), donde podemos buscar sitios de corte de distintas enzimas pero generan extremos compatibles para la ligación. Así, el diseño experimental que hago sería digerir, el inserto YFP con *NheI* y *BamHI* y el vector GC14 con las enzimas *SpeI* y *NotI* (figura 11).

El primer paso es la digestión de ambos fragmentos con las enzimas correspondientes y la purificación de bandas de gel de agarosa. Tras obtener los dos fragmentos purificados, hice una primera ligación (protocolo ligación) en el que se ligaría el extremo del vector cortado por *SpeI* y el extremo del inserto digerido por *NheI* ya que son compatibles. Después de esta ligación, hice blunt (protocolo blunt) para generar extremos romos en los extremos libres no compatibles de los fragmentos. Por último, hice una segunda ligación de 5 horas sólo para que se pudiera ligar los extremos libres generando así el nuevo plásmido GC14-YFP (Figura 12). Este producto se transformaría en las bacterias competentes.

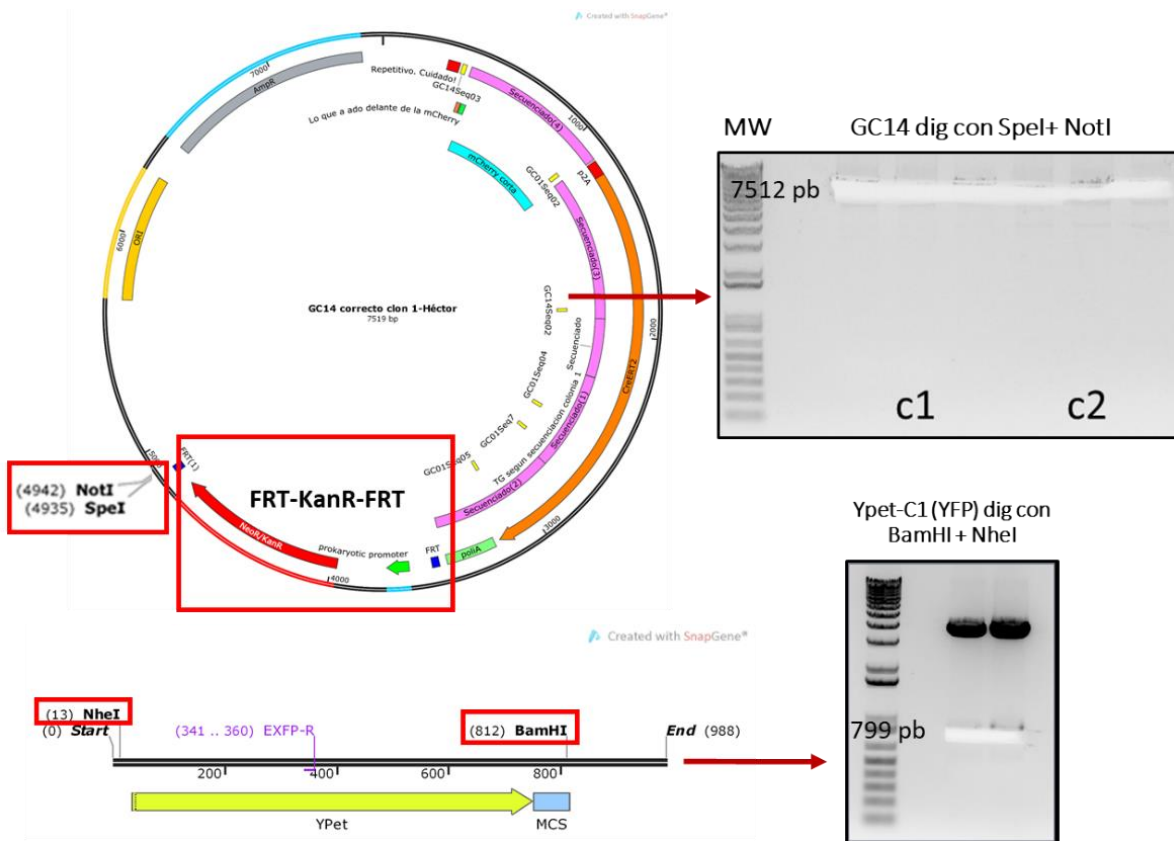


Figura 11. Elección de enzimas y extracción del vector e inserto. En el esquema se ilustra las enzimas seleccionadas y las digestiones del vector y del inserto, ambos purificados del gel de agarosa.

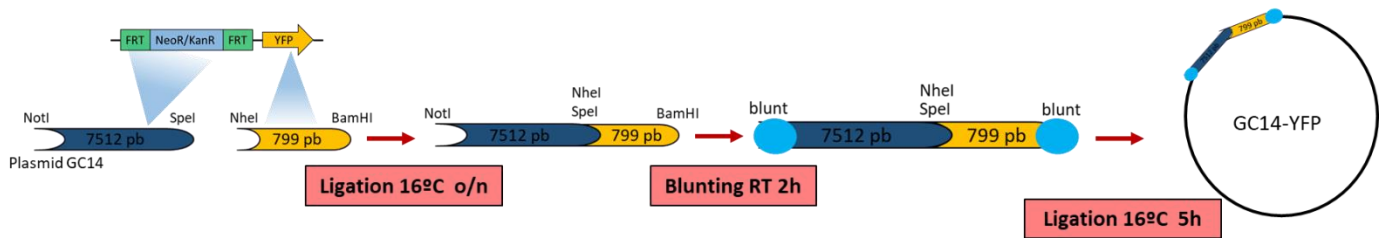


Figura 12. Diseño de la ligación GC-YFP. En el esquema se ilustra el diseño experimental en el escritorio y los pasos seguidos para la obtención del plásmido final. Una primera ligación o/n, seguido un blunting de 2 horas y finalmente un segundo paso de ligación de 5 horas.

La mejor manera para comprobar bien un nuevo plásmido, producto de ligación es creando el plásmido esperado en SnapGene y después buscar varias digestiones que te permita verificar la ligación (Figura 13).

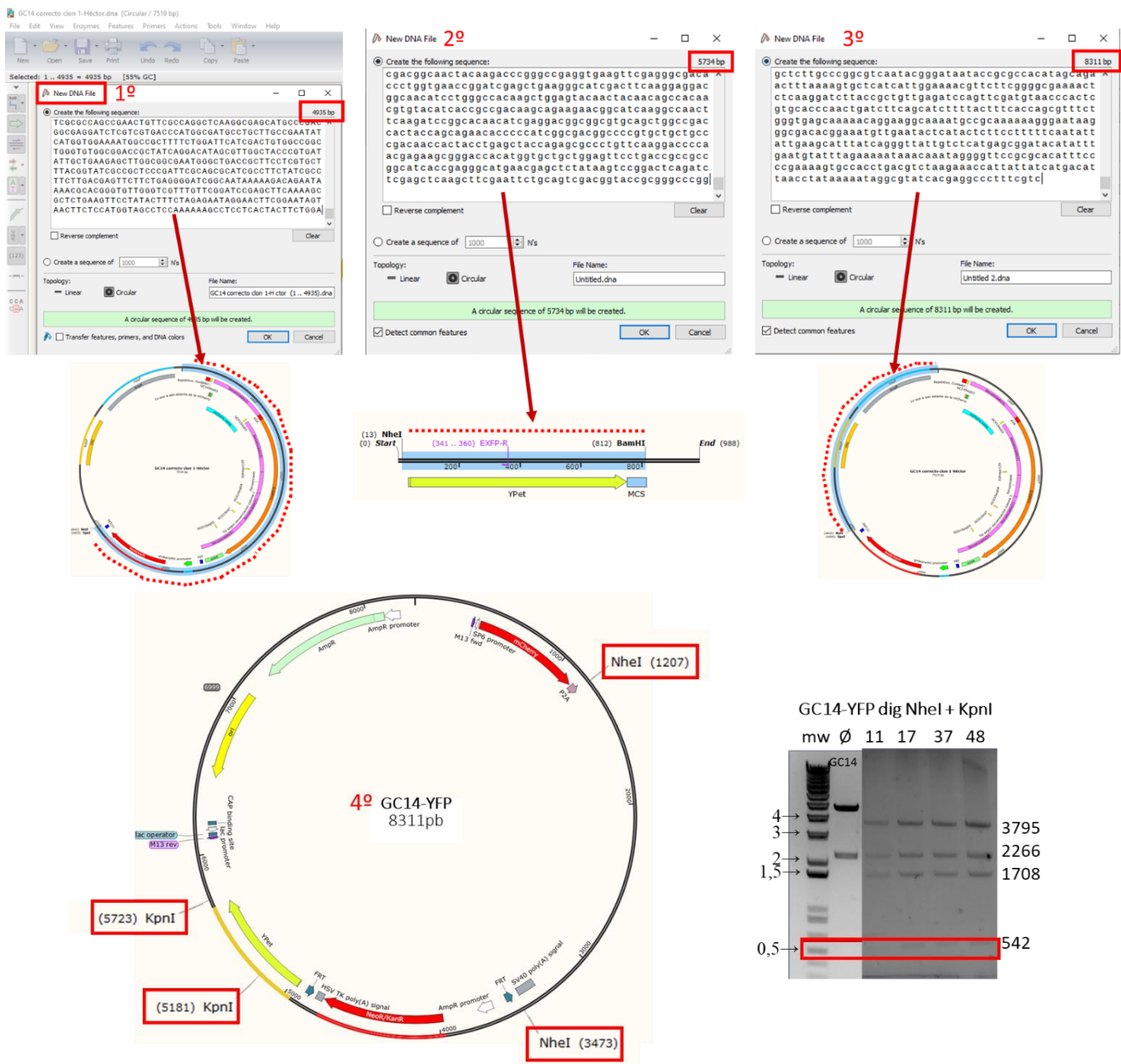


Figura 13. Cómo crear tu propio plásmido en SnapGene. Paso 1, abrir un nuevo archivo para crear un plásmido nuevo. Ponemos primero siempre el vector, desde el nucleótido 1 hasta donde se insertaría el inserto. **Paso 2,** añadir el inserto en el sentido correcto. **Paso 3,** añadir el resto del vector para terminar de cerrar el plásmido. Ya tenemos el nuevo plásmido creado. Ahora podremos probar todas las enzimas que nos convengan. En este clonaje por ejemplo, elegí dos enzimas, una que me corta en el inserto y otra que me fragmenta el vector. Tras la digestión tenemos 4 fragmentos de 3.795pb, 2.266pb, 1.708pb y 542 pb que podemos ver en el gel agarosa. Además, recomiendo siempre poner el vector original.

4. CLONAJE CON BAC

Los Bacterial artificial chromosomes (BACs) son plásmidos muy grandes que suelen tener desde 100 kb a 250 kb. Suelen contener genes endógenos de interés y múltiples regiones no codificantes que engloba dicho gen. Debido a su gran tamaño, son especialmente difíciles de manejar. Requieren kits de extracción especiales y hay que manejarlos cuidando los daños mecánicos de la manipulación para evitar roturas.

Para chequear un BAC se hace una PCR del gen de tu interés para comprobar que tu gen está presente (figura 14). Y además para ver la integridad del BAC necesitamos digerirlo con enzimas. Para eso, se hacen mini-preparación como con los plásmidos normales (ver protocolo de extracción de BACs de minicultivos).

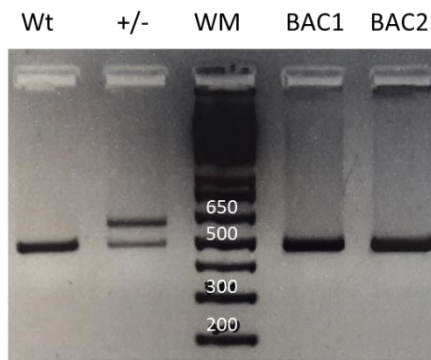


Figura 14. PCR del gen Myc. Se alinean en el intrón 1 del gen Myc, amplificando un fragmento de 457 pb. Se han puesto controles de la PCR con animales wt y heterocigota (+/-) disponibles en el laboratorio con alelos Myc wt y Myc flox. Se comprueba efectivamente, el gen Myc está presente en el BAC que deseo usar. BAC1 (RP24-78D24) y BAC2 (RP23-331E20).

Como los BACs son muy grandes, no es posible ver por digestión todos los fragmentos resultantes. La mejor manera es elegir una/dos enzimas que digiriera el BAC de manera que haya 4-6 fragmentos con tamaños distinguibles. Yo he usado la versión gratuita de *Serial Cloner* (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner-Download.html) para hacer las digestiones *in silico*. Además, para resolver estas digestiones con gel de electroforesis no es fácil. Primero hay que obtener ADN del BAC en buena calidad, suena fácil, pero no es así. Al ser tan grande, los kits de mini-preps normales no sirven, porque no pasan por el filtro de la columna de los kits normales. En este apartado os dejo un protocolo para la extracción de mini cultivos de BACs y se necesita un kit para los maxi-cultivos. En segundo lugar, el gel de agarosa tiene que ser de 0,9% y hay que correr el gel de una manera especial. Unos 10-20 minutos a 140V para que toda la digestión entre en el gel de agarosa, después bajar a 40-50V y dejar correr 8-14 horas. De esta manera, en la siguiente figura podéis ver cómo la misma digestión de dos BACs (nombrado como BAC1 y 2) va mejorando su resolución desde el gel A hasta el gel E. Llegando al punto de poder extraer una banda específica de todos los fragmentos que se obtiene (figura 15).

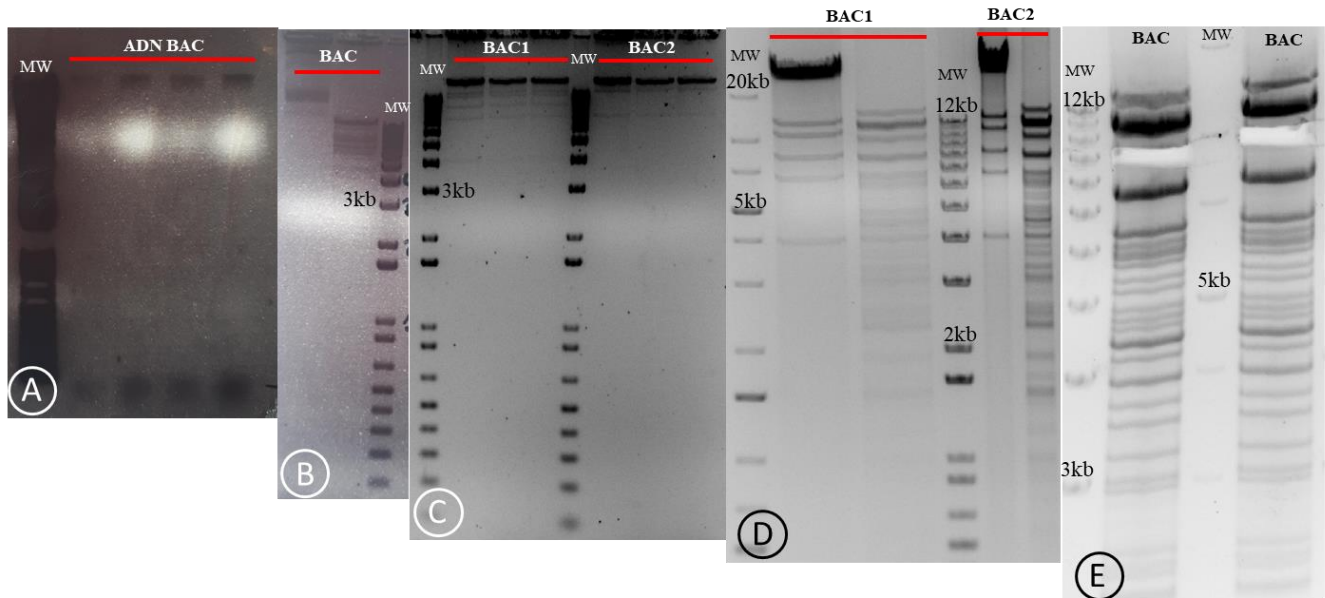


Figura 15. Gel de electroforesis para resolver digestiones de BACs. En esta figura se puede ver una progresión favorable de la resolución de digestiones de BACs. En el gel **A**, apenas se veía la presencia de los BACs. Este problema se resolvió cambiando el protocolo de extracción de los minicultivos de BACs. En el gel **B**, ya se conseguía ver la presencia de distintas bandas de la digestión, pero no son muy distinguibles las distintas bandas. En el gel **C**, ya se podía distinguir 3-4 bandas muy tenues con sus correspondientes tamaños. En el gel **D**, podemos distinguir bien más de 10 bandas. Y finalmente en el gel **E**, podemos distinguir las bandas de tal manera que podemos extraer del gel cualquier banda que queramos.

Protocolo de extracción de BACs de minicultivos

Preparar previamente:

- QIAGEN Plasmid Maxi kit (#12163)
- puntas autoclavadas con la punta cortada.
- Isopropanol a -20°C.

Día 1:

- 1- Plaquear Bacterias con BAC en una placa con cloranfenicol a 12,5 µg/mL a 30°C o/n.

Día 2:

- 2- Preparar tubos Falcon de 50 ml con 5 ml de LB + cloranfenicol a 12,5 µg/mL.
- 3- Picar una única colonia con una punta y colocarlo en un tubo preparado. No enrosacar la tapa del todo, dejar semicerrada con cinta para no perder la tapa durante la agitación.
- 4- Incubar a 30°C en agitación o/n.

Día 3:

- 5- Centrifugar los tubos a 4.000 rpm, 10 minutos.
- 6- Descartar el sobrenadante y resuspender en 500 µl de Buffer Qiagen P1 con vortex.
- 7- Añadir 500 µl de buffer Qiagen P2 y mezclar invirtiendo el tubo 3-4 veces. Incubar 5 minutos a RT.
- 8- Añadir 500 µl de buffer Qiagen P3 y mezclar invirtiendo el tubo 3-4 veces. Reposar en hielo 20 minutos.
- 9- Centrifugar a 4.000 rpm, 15 minutos.

Todos los pasos siguientes se usa puntas con la punta cortada.

- 10- Recoger el sobrenadante y filtrar con papel de filtro en tubos Falcon de 15 ml.
- 11- Añadir el mismo volumen (1,5 ml aprox) de isopropanol frío. Mezclar invirtiendo el tubo 3-4 veces e incubar 5 minutos a RT.
- 12- Centrifugar a 4.000 rpm, 15 minutos.
- 13- Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con 500 µl de EtOH 70%. Mezclar invirtiendo el tubo 3-4 veces.
- 14- Centrifugar a 4.000 rpm, 5 minutos.
- 15- Descartar el sobrenadante y secar el pellet con el tubo invertido. (eliminar muy bien los restos de etanol.
- 16- Añadir 50 µl de H₂O e incubar a RT ó 55°C unos 10-20 minutos.
- 17- Transferir el ADN con punta cortada en un eppendorf. Conservar a 4°C.

Para digestiones de chequeo, digerir 10 µl de esta preparación en un volumen final de 40 µl . Usar siempre puntas cortadas para manejar los BACs. Para la electroforesis, se corre unos 10 minutos a 120V y después a 40/50 V, o/n.

Así, después de mejorar el protocolo de extracción desde mini-preps hasta maxi-preps (ver protocolo de extracción de BACs de maxi cultivos), el protocolo de digestión también tiene algunos detalles específicos para BACs, tales como mayor cantidad de ADN (µg), mayor volumen final, y siempre incubación o/n. Normalmente hay que juntar pocillos del peine para poder cargar todo el volumen. Este protocolo funciona siempre que se haya obtenido ADN del BAC con la calidad suficiente. Dos medidas son fundamentales, la concentración debe de estar de 200-400 ng/µl y la ratio de 260/280 $\approx$ 1,9 (figura 16).

Protocolo de digestión de BAC

- BAC 40µg / X µl
 - Buffer 10x 10 µl
 - Enzima 20U 4-8 µl
 - H2O ---
- Vf= 100 µl
- Mezclar todo e incubar a **37 °C**, o/n.
 - Cargar en gel de agarosa.

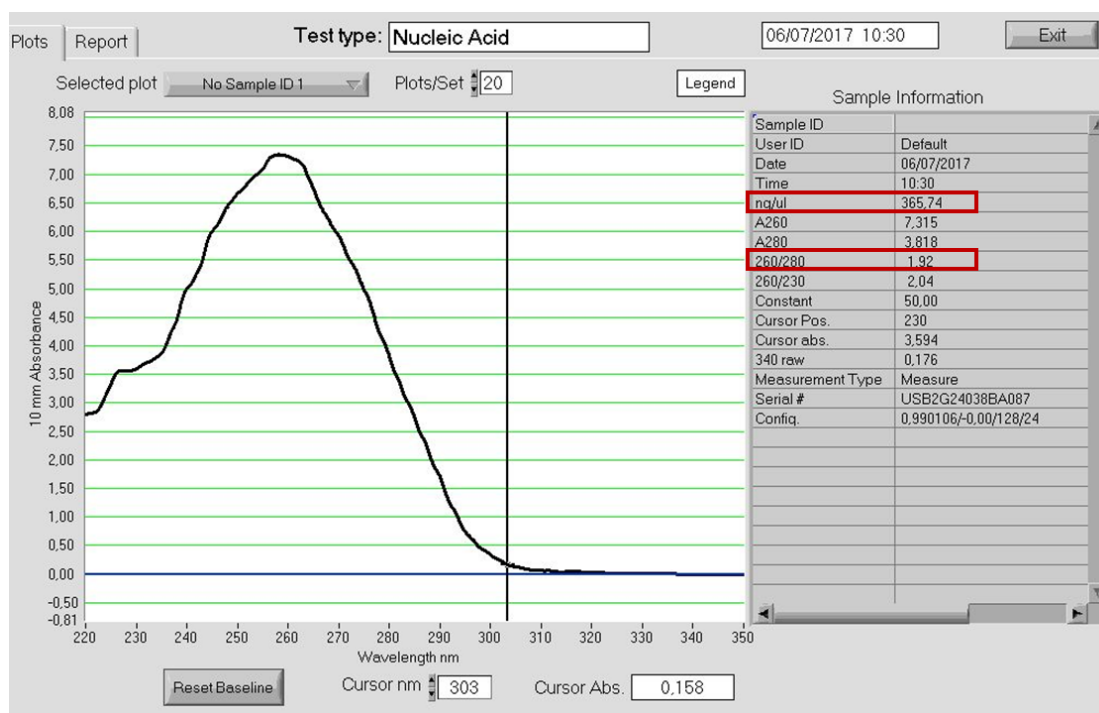


Figura 16. Medición de una extracción de BAC de un maxi-cultivo en el nanodrop. Como podemos ver, la concentración de esta extracción de BAC es de 365,74 ng/ul y el ratio 260/280 es de 1.92. esto es esencial para asegurarse de que la extracción es de una calidad suficiente ya que comparado con una maxi-prep de un plásmido normal resulta bastante poco.

Para chequear el BAC utilizado en mi clonaje, elegí entre otras Sall y XhoI (figura 17).

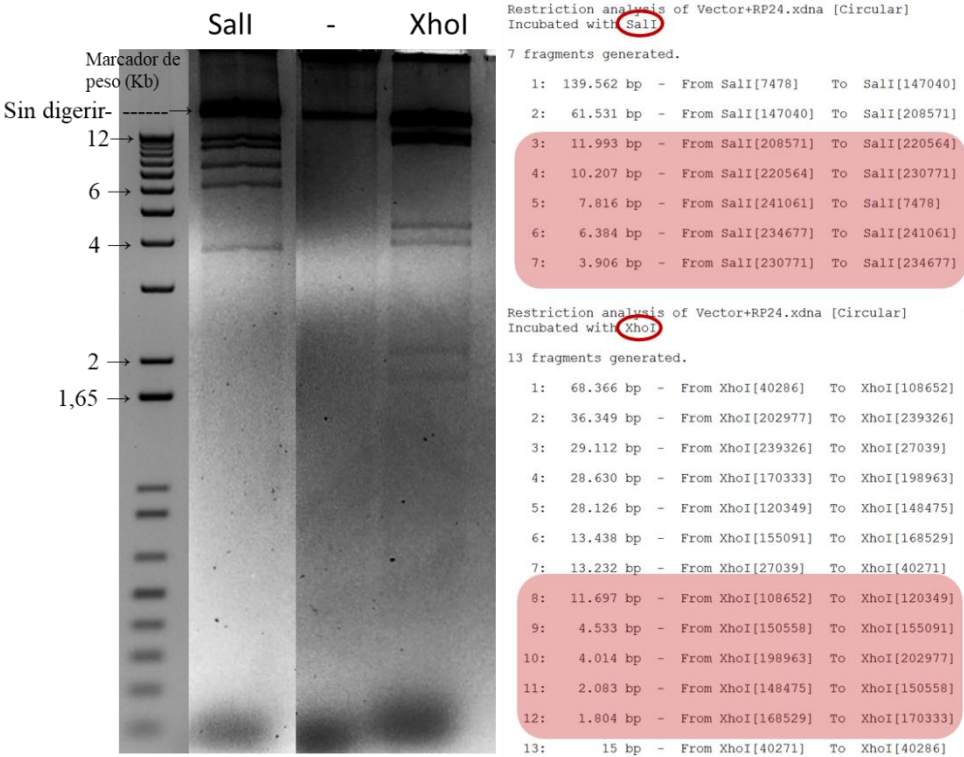


Figura 17. Digestión de BACs con Sall y XhoI. BAC 1 (RP24-78D24) digerido con Sall (pocillo 1), sin digerir (pocillo 2), y con XhoI (pocillo 3). Los productos de la digestión por comprendidos entre 2 y 12 kb se resuelven bien correspondiendo a los tamaños esperados por la digestión in silico. Bandas esperadas *in silico* con Sall (cuadro rojo): 11.9, 10.2, 7.8, 6.3 y 3.9 kb. Bandas esperadas *in silico* con XhoI (cuadro rojo): 11.7, 4.5, 4, 2 y 1.8 kb.

Protocolo de extracción de BACs de maxi cultivos

Este protocolo está basado en las instrucciones del kit de Qiagen Large-construct.

Preparar previamente:

- Kit de Qiagen "Large-construct" (Cat No./ID: 12462).
- Añadir vial de RNasa A al buffer P1.
- Buffer P2 sin precipitados.
- Buffer 3 enfriado a 4°C.
- Calentar el buffer de elución QF a 65°C.

Día 1:

- 1- Plaquear bacterias con BAC en una placa con cloranfenicol a 12,5 µg/mL a 30°C o/n.

Día 2:

- 2- Picar una única colonia y crecer en un tubo falcon de 50 ml con 5 ml de LB + cloranfenicol a 12,5 µg/mL.
- 3- Incubar a 30°C, 8 horas en agitación.
- 4- Verter el pre-cultivo (paso 2) en 200 ml de medio LB con cloranfenicol en un matraz de 1L e incubar a 30°C, 14-16 horas en agitación.

Día 3:

- 5- Verter el maxi-cultivo en botellas de >500 ml, tapar fuerte.
- 6- Centrifugar a 6.000 g, a 4°C, 15 minutos en centrífuga tipo Sorval.
- 7- Descartar el sobrenadante. (se puede congelar el pellet a -20°C)
- 8- Resuspender el pellet bacteriano con 20 ml de buffer P1 con una pipeta hasta que se elimine todo tipo de grumos.
- 9- Añadir 200 ml de buffer P2, mezclar invirtiendo el tubo 10 veces.
- 10- Incubar a RT, 5 minutos.
- 11- Añadir 20 ml de buffer P3 (4°C), mezclar invirtiendo el tubo 10 veces.
- 12- Incubar en hielo 10 minutos.
- 13- Centrifugar a 22.000 g, 4°C, 30 minutos.
- 14- Equilibrar la columna (Qiagen-tip 500) con 10 ml de buffer QBT mientras que se centrifuga.
- 15- Filtrar con un papel de filtro el sobrenadante.
- 16- Verter todo el volumen (en 2 veces) en la columna ya equilibrada y dejar caer por gravedad.
- 17- Lavar la columna con 30 ml de buffer QC, 2 veces. El BAC se queda unida a la columna.
- 18- Eluir el ADN con 15 ml de buffer QF (65°C) en un tubo falcon de 50 ml.
- 19- Añadir 10.5ml de isopropanol a RT, mezclar invirtiendo el tubo 10 veces.
- 20- Centrifugar a 22.000 g, a 4°C, 30 minutos. Colocar el tubo en posición reconocible para ver el pellet de forma localizada.
- 21- Descartar con cuidado el sobrenadante, el ADN debe de formar un pellet blanco/semi-transparente.
- 22- Lavar el pellet con 20 ml de EtOH 70% a RT invirtiendo el tubo 10 veces.
- 23- Centrifugar a 22.000 g, a 4°C, 15 minutos. Colocar el tubo en posición reconocible.
- 24- Descartar con cuidado el sobrenadante, secar el pellet muy bien de EtOH a RT ó a hasta 65°C.
- 25- Añadir 100 µl de H2O, disolver el ADN sin pipetear. Dejar a RT o/n ó calentar a 55°C con agitación suave. Debes de obtener una concentración de 250-400 ng/µl en el nanodrop.

Tras comprobar el BAC, ¡es hora de clonarlo! Los BACs al ser de gran tamaño comparado con los plásmidos estándares, no pueden ser clonados de la manera estándar. Sí se puede extraer regiones concretas del BAC siempre que haya enzimas de digestión adecuadas y clonarlo en otro plásmido pequeño de interés. ¿Pero y si queremos mantener la integridad del BAC? ¿Cómo podemos insertar un gen extra al BAC como un “corta y pega” explicado anteriormente? Para esto necesitamos usar “recombineering”, un método basado en la recombinación homóloga. El aprendizaje de este método ayuda a entender mejor el *Gibson assembly* y cualquier método de clonaje basado en recombinación homóloga.

El protocolo de recombineering consiste en 3 pasos principales (figura 18): **1)** Electroporación de BACs en bacterias EL250 (ó SW105 más nuevo, ambas de Neal Copeland), seguir protocolo de electroporación de BACs en bacterias EL250. **2)** Recombinación del inserto en BAC, seguir protocolo de recombinación de BACs. Y **3)** Eliminación del cassette FRT-Kan-FRT, seguir protocolo de eliminación del casete FRT-Kan-FRT del BAC. Para comprobar las colonias positivas en este experimento, es necesario usar PCRs. Ya que resulta poco eficiente hacer extracción y digestión de BAC en cada paso. Si tu inserto es pequeño, puedes diseñar los *primers* que te amplifiquen el inserto entero o la ausencia del inserto. Y si tu inserto es grande, también puedes amplificar un fragmento en el medio o en la unión con el BAC. De esta manera, puedes comprobar que efectivamente el inserto está en tu BAC en el paso 2, y después ausente en el paso 3. Finalmente, sí que merece la pena comprobarlo por digestión si hay enzimas que lo permitan. Además, cabe destacar que el protocolo de recombineering sirve sólo para BACs, se ha intentado clonar por recombinación en los mismos sitios, pero usando como vector un plásmido de pequeño tamaño y no funciona.

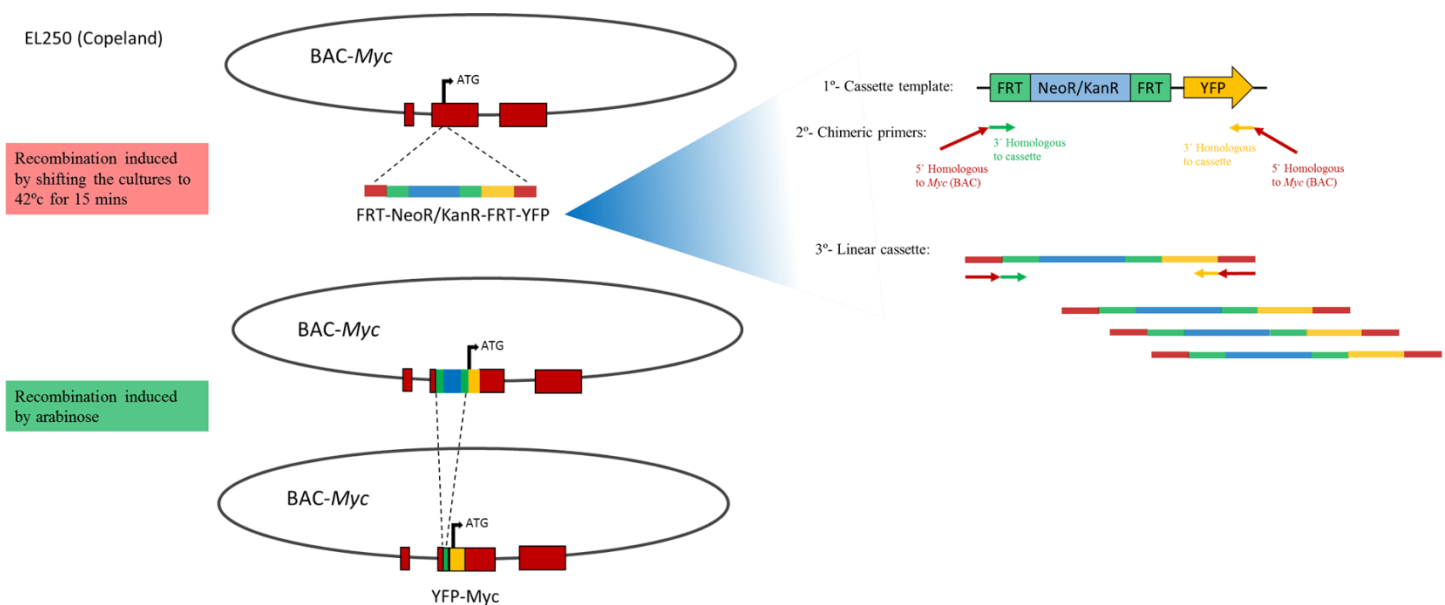


Figura 18. Ilustración esquemática del procedimiento de “recombineering” de BACs. Queremos insertar una proteína fluorescente amarilla (YFP) en el codón ATG del gen Myc, creando así una proteína de fusión de la YFP y MYC. Ver el apartado anterior los detalles para obtener el inserto FRT-KanR-FRT-YFP. Primero se hace una recombinación para insertar un casete de FRT-KanR/NeoR-FRT-YFP (cuadro rojo). Esto lo necesitamos para seleccionar las colonias positivas que son resistentes a la Kanamicina. Y después una segunda recombinación para quitar la resistencia a Kanamicina (cuadro verde). Así seleccionamos las colonias positivas por la pérdida de resistencia a la Kanamicina.

Se ha explicado previamente en el apartado anterior la creación de un vector “GC-YFP”. Donde se había clonado la YFP en el extremo 5’ del cassette FRT-KanR-FRT, obteniendo un cassette FRT-KanR-FRT-YFP que será el molde de donde amplifico el inserto. Éste vector es necesario para el paso 2 del recombineering de BAC. Como se ha mencionado anteriormente, el objetivo del clonaje era crear una proteína de fusión con una proteína fluorescente amarilla (YFP) y la proteína Myc presente en mi BAC. Necesito que la YFP esté sustituyendo el **codón start** de Myc. De esta manera, necesito que la YFP esté en el extremo 3’ de mi inserto porque tiene que transcribirse y traducirse junto y seguida de Myc. Además, en el extremo 5’ tiene que haber un gen de resistencia que no sea a cloranfenicol, necesario para seleccionar las colonias positivas en el primer paso de la recombinación. Por último, es necesario que éste gen de resistencia esté flanqueado por sitios FRT, por los que podremos eliminar el gen de resistencia al final del clonaje (figura 18 y figura 19).

Para la recombinación del inserto en el BAC, es necesario tener el inserto con brazos de homología con el sitio donde se va a insertar en el BAC. La única manera de conseguirlo es amplificando el inserto añadiendo los extremos homólogos al sitio de inserción. Es decir, necesitas diseñar *primers* quiméricos. Este paso es crucial para conseguir el clonaje. Los *primers* quiméricos se obtiene añadiendo en el extremo 5’ del primer 40 pb del sitio de inserción. Por otra parte, estos *primers* quiméricos necesitan condiciones especiales de obtención: purificación por PAGE y a una escala de 0,05 (pedidos en Sigma). Finalmente, después de la amplificación el inserto tendrá “5’-homología al sitio de inserción-FRT-KanR-FRT-YFP-homología al sitio de inserción-3’”. La polimerasa que he usado yo para amplificar mi inserto es la Q5 high fidelity. Aunque puedas seguir las instrucciones de la polimerasa, os dejo un protocolo estándar que uso yo para la amplificación del inserto. Esta PCR me ha servido para amplificar distintos insertos usando *primers* distintos (ver PCR para amplificar el casete para recombineering).

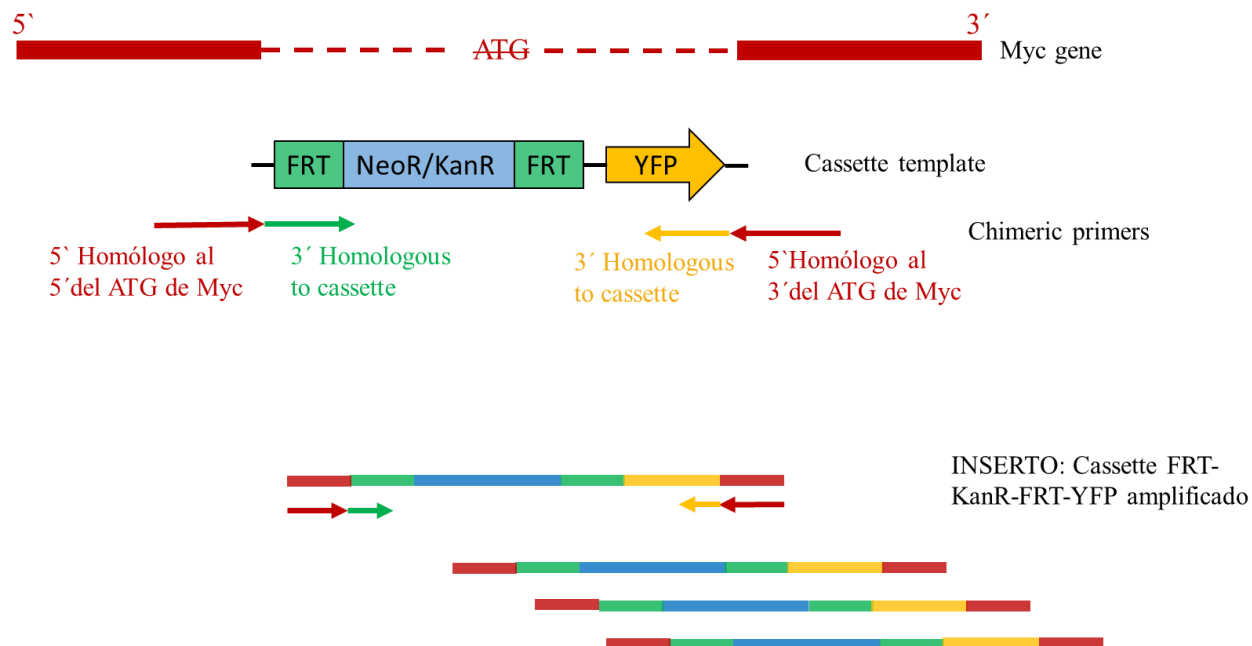


Figura 19. Ilustración esquemática de la obtención del inserto necesario para recombineering.

El objetivo es insertar un casete con YFP para crear la proteína de fusión deseada. Necesitas primero un molde con un casete FRT-kanR-FRT-YFP de donde amplificar el inserto añadiendo los extremos de homología. Este molde se ha creado con clonaje tradicional explicado en el apartado anterior. Se añaden manualmente una cola quimérica a los *primers*. Y se hace una PCR para amplificar el inserto para su posterior uso (ver protocolo de amplificación del casete para recombineering). Obteniendo finalmente “5'-homología al sitio de inserción-FRT-KanR-FRT-YFP-homología al sitio de inserción-3'”

PCR para amplificar el casete para recombineering

- DNA (distintas cantidades dependiendo de si es a partir de plásmido, ADN genómico...)
 - Q5 0,5 µl
 - 10 uM FW 0,5 µl
 - 10 uM RV 0,5 µl
 - 10mM dNTP 1 µl
 - Q5 buffer 5x 10 µl
 - H2O -----
- Vf = 50 µl

Condiciones PCR recombineering

- Fase 1-----98°C-----30 s
- Fase 2 (x35)-----98°C-----10 s
- 64°C-----20 s
- 72°C-----2 m (en función del tamaño)
- Fase 3 -----72°C-----7 m

Se recomienda 64°C como temperatura estándar y 500 ng de DNA en caso de usar plásmido como molde. Para optimizar las condiciones ajustado a cada experimento, se recomienda hacer una escalera de temperaturas con distintas cantidades de molde de partida.

1) Protocolo de electroporación de BACs en bacterias EL250

Disponer en las bacterias EL250, se recomienda hacer stock de glicerol para tener disponible en el laboratorio. Preparar previamente:

- H₂O miliQ estéril.
- Placas de agar con Cloranfenicol.
- Placas de agar sin antibióticos.
- LB bajo sal (2,5 gr) x2.
- LB sin sal x2.
- Cubeta de electroporación de 0,1 cm.

Día 1

- 1- Cultivar bacteria EL250 en una placa de agar sin antibióticos, crecer a 30°C, >16 h.

Día 2

- 2- Picar una única colonia con puntas nuevas, meter la punta en 5ml de LB low-salt en tubo de 50 ml. Crecer a 30°C o/n.

Día 3

- 3- Añadir 1, 2 ml en un matraz con 50 ml de LB low-salt respectivamente (cada cultivo de 50 ml da lugar a 5 alícuotas de electroporación). Incubar a 30°C hasta que uno de ellos alcance una OD600 de 0,4-0,7. Mirar cada hora. (Aproximadamente >= 3 debería alcanzar 0,4).

Preparar mientras:

- Enfriar una caja de puntas azules, eppendorfs, 5 x tubos falcon de 50ml a -20°C.
 - Preparar el mismo día glicerol al 10% en H₂O miliQ y enfriar a 4 °C.
 - Trabajar siempre en una cámara fría si es posible.
 - Desde el paso 4 hasta la electroporación es importante no pasar de los 45 minutos máximo.
 - Caja con hielo abundante preparado con puntas, eppendorfs, falcons, glicerol y cubeta de electroporación. a partir de este paso, se hace todo en frío.
- 4- Una vez que el cultivo de bacterias haya alcanzado densidad correcta. Pasar 10 ml de cultivo a cada falcon de 50ml previamente enfriado a -20 °C y mantener en hielo durante 5 minutos.
 - 5- Centrifugar los cultivos a 4°C, 4.000 rpm, 5-8 minutos.
 - 6- Descartar el sobrenadante.
 - 7- Añadir 1 ml de glicerol 10% frío al pellet bacteriano y resuspender con cuidado evitando formar burbujas de aire. (el pellet debe disolverse fácilmente, si forma grumos y no se resuspender bien, bajo mi experiencia no va a funcionar la electroporación).
 - 8- Transferir cada suspensión a un tubo eppendorf frío. Centrifugar a máxima velocidad, 4°C, 20 segundos.
 - 9- Descartar el sobrenadante con una punta azul con cuidado. Lavar 2 veces más con 1 ml de glicerol 10% frío.
 - 10- Resuspender el pellet con 40 µl de glicerol 10% frío.
 - 11- Coger con punta cortada 1-5 µl de BAC purificado y con mezclar con los 40 µl de bacterias competentes.
 - 12- Añadir la mezcla a la cubeta de electroporación fría evitando burbujas.
 - 13- Secar muy bien las placas metálicas de la cubeta y electroporar con el programa EC1.
 - 14- El valor del tiempo en milisegundos (ms) debe de ser cercano a 6.
 - 15- Inmediatamente después de electroporar, añadir 500 µl de LB sin antibiótico y transferir la suspensión a un eppendorf de 2 ml.
 - 16- Incubar a 30 °C, 2 horas en agitación. Plaquear en una placa de agar + cloranfenicol 50 µl y en otra el resto del volumen.
 - 17- Incubar a 30°C 24 horas.

2) Protocolo de recombinación de BACs

Disponer en las bacterias EL250, se recomienda hacer stock de glicerol para tener disponible en el laboratorio. Este protocolo está diseñado para una sola muestra. Si se trabaja con más, multiplicar rubos y placas por el número total de tus muestras. Preparar previamente:

- H₂O miliQ estéril.
- Placas de agar con Cloranfenicol x2.
- Placas de agar con cloranfenicol y kanamicina x2.
- LB sin sal.
- 2 x tubos de 10ml rotulados inducido y no inducido.

Día 1

- 1- Crecer Bacterias EL250 con BAC en una placa por zonas para aislar colonias a 30°C, o/n.

Día 2

- 2- Picar una única colonia con una punta y meter en 5 ml de LB sin sal + 12,5 ug/ml de cloranfenicol en un tubo falcon de 50 ml. Crecer a 30°C, >16 horas.

Día 3

- 3- Añadir 500 µl del cultivo anterior en un matraz con 25 ml de LB sin sal + cloranfenicol.
- 4- Incubar a 30°C, 250 rpm, hasta una densidad DO600= 0,2. (Aproximadamente tarda >2 horas en alcanzar esa densidad, minotorizar cada hora).

Preparar mientras:

- 2 x matraz de 25 ml, atemperar uno a 30°C, “no inducido” y otro en un baño a 42°C (si se usa incubador, a 48°C), “inducido”.
 - Preparar glicerol 10% con H₂O miliQ, enfriar a 4°C.
 - Enfriar a -20°C puntas amarillas, azul es, 2 falcons de 50 ml, 2 eppendorfs de 1,5 ml y 2 cubetas de electroporación de 0,1 cm.
 - Asegurar 4°C en las centrífugas que se vaya a usar.
 - Una caja con hielo abundante para hacer todos los pasos próximos en frío. Trabajar en cámara fría si es posible. Trabajar lo más rápido posible hasta el paso de la electroporación.
- 5- Cuando el cultivo alcance la DO adecuada, pasar 10 ml del cultivo al matraz atemperado a 30°C y otros 10 ml al matraz del baño a 42°C.
 - 6- Incubar ambos en agitación durante 15 minutos. El cultivo del baño, hacerlo manualmente.
 - 7- Pasar los 2 matraces a hielo y dejar 10 minutos, agitar con suavidad en vez en cuando.
 - 8- Pasar los cultivos a los falcon de 50 pre-enfriados. Centrifugar a 4.000 rpm a 4°C, 8 minutos.
 - 9- Descartar sobrenadante y resuspender el pellet con 1 ml de agua. (el pellet se tiene que disolver fácilmente sin formar grumos).
 - 10- Transferir la suspensión a los eppendorfs preparados.
 - 11- Centrifugar a 4°C, velocidad máxima, 20 segundos.
 - 12- Descartar el sobrenadante, resuspender el pellet con 1 ml de H₂O y centrifugar a 4°C, velocidad máxima, 20 segundos. Repetir este paso 3 veces.
 - 13- Finalmente, resuspender el pellet con 40 µl de glicerol 10%.
 - 14- Añadir 500 ng (sin superar los 10 µl) del fragmento a recombinar en el BAC. Mezclar con el dedo con suavidad sin pipetear.
 - 15- Transferir los 50 µl (máximo 60 µl) de la mezcla a la cubeta preparada anteriormente evitando burbujas. Limpiar muy bien las paredes de la cubeta de agua.
 - 16- Elegir el programa EC1. El resultado en milisegundos debe de estar alrededor del valor 5.
 - 17- Inmediatamente después, añadir 500 µl de LB sin sal y pasar a los tubos de 10 ml.
 - 18- Incubar a 30°C, 250 rpm, 2 horas.
 - 19- Plaquear 10 µl en placas de agar con cloranfenicol y el resto en las placas con cloranfenicol y kanamicina.

3) Protocolo de eliminación del cassette FRT-Kan-FRT del BAC

El casete de resistencia a kanamicina se escinde con inducción con arabinosa gracias al gen FLP existente en las bacterias EL250.

Preparar previamente:

- 2 x placas de agar con cloranfenicol.
- 1 x placa de agar con kanamicina.
- L-arabinosa al 4% (disolver 4 gramos de Arabinosa en 50 ml de H₂O miliQ). Autoclavar.

Día 1:

- 1- Coger de un clon chequeado en el paso anterior y crecer en un tubo Falcon de 50 ml con 5 ml de LB + cloranfenicol a 12,5 µg/mL.

Día 3:

- 2- Coger 300 µl del cultivo anterior para inocular 15 ml de LB con cloranfenicol en un matraz de 250ml.
- 3- Incubar a 30°C hasta una DO 600 de 0.5-0.8. (aproximadamente 2-3 horas, monitorizar cada hora).
- 4- Añadir L-arabinosa estéril a una concentración final de 0.2% (0.75 ml en 15 ml). Incubar a 30°C, 1 hora.
- 5- Coger 1 ml del cultivo anterior e inocular 10 ml de LB.
- 6- Incubar a 30 °C, 2 horas en agitación.
- 7- Diluir 1 µl en 100 µl de LB y plaquear en en una placa con cloranfenicol y otra placa con kanamicina. (no debería de crecer nada en la placa con kanamicina).
- 8- Picar colonias de la placa con cloranfenicol con una punta y crecer en 5 ml de LB en falcon de 50 ml con cloranfenicol, a 30°C, > 16 horas.

5. CLONAJE CON GIBSON

En este apartado se ejemplifica un clonaje usando el Gibson Assembly® Cloning Kit (#E5510S) de NEB. En mi caso, el inserto es de 9,6 kb, mientras que el vector es de 5 kb, así que decidí amplificar por PCR el vector en vez del inserto. Se diseñaron *primers* quiméricos para la amplificación del vector a partir del plásmido de interés. Y el inserto fue purificado a partir de digestión o/n (figura 20).

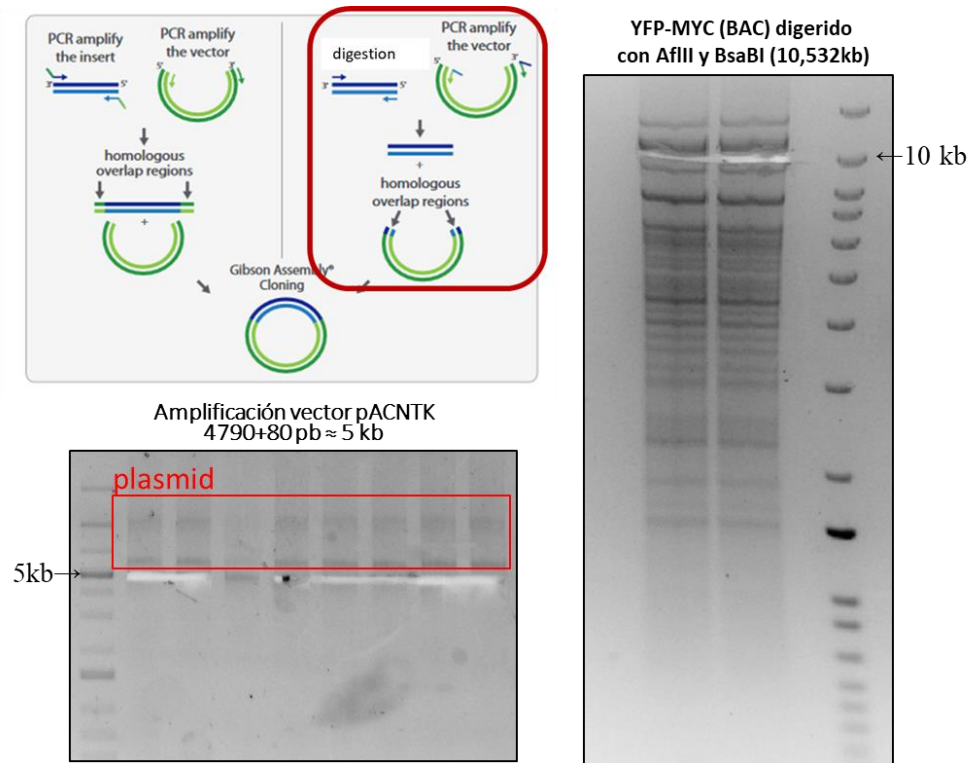


Figura 20. Extracción del vector e inserto para protocolo de Gibson assembly. Obtención del vector por PCR y posterior extracción de banda. Y el inserto fue obtenido por digestión del BAC YFP-MYC y posterior extracción de banda.

Tras la obtención del vector y el inserto, se siguió estrictamente el protocolo del kit de Gibson Assembly. Tras la ligación, se hizo una transformación con 2µl de las bacterias del kit, y los 18µl restantes de bacterias DH5α (figura 21). Posteriormente, se comprobaron las colonias primero sin digerir, y se vio que el 100% de las colonias picadas podían ser positivas (gel inferior de la figura 21). Ya que el inserto era de 9,6kb y el vector de 5kb, el nuevo plásmido sería de un tamaño de 14,6kb. Y finalmente se

eligieron enzimas como NotI y Sall para comprobar la integridad del plásmido (gel superior, figura 21).

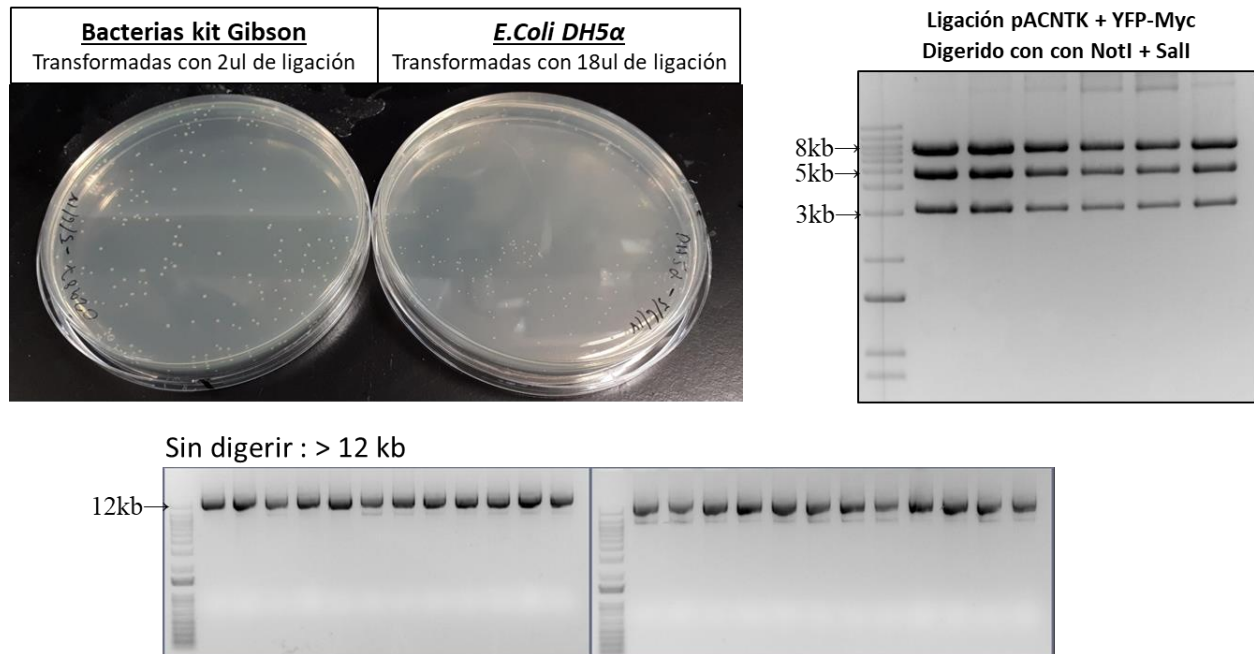


Figura 21. Screening tras la ligación por Gibson. En la figura de las placas podemos ver las colonias obtenidas tras transformar bacterias competentes del kit con 2 μ l de la ligación y tras transformar bacterias competentes disponibles en el laboratorio con 18 μ l de la ligación. En el gel superior, se puede ver las bandas obtenidas tras la digestión de NotI y Sall del nuevo plásmido. Y en el gel inferior podemos ver el plásmido tras la ligación sin digerir.

Por último, me gustaría dejaros un protocolo para precipitar o limpiar el ADN (fragmento). Muchas veces, tenemos que trabajar con lo que tenemos, ADN un poco sucio, muy diluido...para esto la solución es el protocolo de fenol cloroformo que podéis ver abajo.

Protocolo de precipitación de ADN

Este protocolo sirve para precipitar, limpiar o concentrar cualquier tipo de ADN para el uso deseado.

Paso opcional con fenol-cloroformo:

- 1- Echar el mismo volumen de fenol-cloroformo (coger metiendo bien la punta ya que contiene una capa protectora de aceite que no se debe de coger). Mezclar invirtiendo el tubo.
- 2- Centrifugar a 14.000 rpm, 15 minutos.
- 3- Recoger el sobrenadante.

Preparar previamente:

- Acetato de sodio
 - Isopropanol pre-enfriado a -20°C .
 - Glucógeno.
 - EtOH 70% enfriada a 4°C .
- 1- Añadir 2,5 ul de isopropanol por cada ul de ADN + 1/10 de acetato de sodio + 1ul de glucógeno.
 - 2- Mezclar invirtiendo el tubo y dejar a -80°C > 2h ó o/n.
 - 3- Centrifugar a 4°C a 14.000 rpm, 15 minutos.
 - 4- Descartar el sobrenadante.
 - 5- Lavar el pellet con EtOH 70% frío invirtiendo el tubo.
 - 6- Centrifugar a 4°C a 14.000 rpm, 15 minutos.
 - 7- Descartar el sobrenadante, dejar secar el pellet y resuspender en el volumen de TE ó agua deseada.

6. CONCLUSIÓN

La mejor conclusión es que da igual si hemos podido clonar o cuánto hemos tardado en algo que en principio iba a ser un corta-y-pega de dos semanas. Durante el arduo proceso de clonaje, hemos podido aprender conceptos fundamentales sobre el ADN y otras moléculas que nos servirá de base en toda la carrera científica en el *bench*.

Todo lo descrito en esta guía está basada en experiencias personales, recuerda, la única regla general de todos los protocolos es que tienes que adaptarlo para ti y tus plásmidos. En momentos de desesperación, piensa que estás haciendo lo más parecido a magia de verdad, estás manipulando ADN a tu antojo creando plásmidos únicos en el mundo. Espero que este manual ayude un poquito a tu iniciación en el mundo del clonaje y ¡suerte!

AGRADECIMIENTOS

Este manual ha sido posible gracias a todas aquellas personas de mi entorno, especialmente a los miembros del grupo MT. Gracias por escuchar todos mis lamentos y celebrar cada colonia positiva conmigo. Agradecer especialmente a la persistencia y la motivación inquebrantable de mi mentor de tesis, Miguel Torres. Gracias a su interés en el clonaje molecular tradicional he podido descubrir un poco de este mundillo de “corta-y-pegas” tan fácil y tan difícil, tan frustrante y tan satisfactorio de la genética. Moraleja obtenida: *“el clonaje es igual como la magia, tienes que creerlo para verlo”*. Por otro lado, muchas gracias a Giovanna, a su paciencia por enseñarme paso por paso cosas esenciales como buscar una enzima. Sí, yo también he pasado por eso. Después muchas gracias a Rocío por esos meses de lucha conjunta contra ese clonaje que no salía y no parecía que iba a salir. Sin ti, esos meses hubieran sido mucho peores aunque cuesta creerse eso. ¡Roci, que Johnny nos entiende! Después gracias a Lorena, mi “pollito” con sus palabras. Gracias a ella, me he lanzado a terminar este manual y que sea útil para ella y para otras más personas en un momento difícil.

Productos Utilizados:

- BamHI-HF R3136S/L/T/M
- EcoRI-HF R3101S/L/T/M
- EcoRV-HF R3195S/L/T/M
- KpnI-HF R3142S/L/M
- NheI-HF R3131S/L/M
- NotI-HF R3189S/L/M
- NruI-HF R3192S/L
- SacI-HF R3156S/L/M
- SalI-HF R3138S/L/T/M
- SpeI-HF R3133S/L/M
- PmeI R0560S/L
- XhoI R0146S/L/M
- XmaI R0180S/L/M
- Quick Blunting Kit E1201S/L
- T4 DNA Ligase M0202S/L/T/M
- Q5 High-Fidelity DNA Polymerase M0491S/L
- NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit E5520S
- Zymoclean Gel DNA recovery kit (#D4002)
- rAPid alkaline phosphatase Sigma Aldrich #4898133001
- NucleoSpin Plasmid EasyPure #740727.50
- QIAGEN Plasmid Maxi kit (#12163)
- Qiagen “Large-construct” kit (Cat No./ID: 12462)