

Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en *Escherichia coli*

Yunier Serrano-Rivero, Armando Hernández-García y Rafael Fando-Calzada.

Dpto. Biología Molecular, Dirección de Enfermedades Infecciosas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado postal 6412, La Habana, Cuba. yunier.serrano@cnic.edu.cu.

Recibido: 20 de julio de 2012.

Aceptado: 12 de noviembre de 2012.

Palabras clave: células competentes, transformación, cloruro de calcio, shock térmico.

Key words: competent cells, transformation, calcium chloride, thermal shock.

La transformación genética es un proceso mediante el cual la célula capta moléculas de ADN libre y las mantiene en su interior en forma de un replicón extracromosómico o las incorpora a su genoma por recombinación homóloga.¹ Muchas bacterias pueden activamente incorporar ADN exógeno mediante una capacidad genéticamente programada denominada competencia natural.^{1,2} El estado de competencia natural nunca ha sido demostrado directamente en *Escherichia coli* y en la mayoría de los casos, se emplea el término de transformación genética en lugar de permeabilización artificial del ADN.¹

Un proceso de transformación genética consta de cuatro etapas que son comunes para todas las bacterias y necesarias para la detección exitosa de los transformantes. Estas etapas son: (i) el desarrollo de un estado de competencia en la célula, (ii) la unión de la molécula de ADN a la superficie celular, (iii) su entrada y procesamiento y, (iv) la expresión fenotípica del nuevo genotipo resultante.³ Por otra parte, la introducción de un vector plasmídico es esencial y constituye la primera etapa en los trabajos de Biología Molecular. Usualmente se emplea el tratamiento con sustancias químicas y la electroporación para la transformación artificial de *E. coli*.⁴⁻⁶ También se han reportado otros métodos menos comunes como la biobalística, el tratamiento con polietilenglicol, el ultrasonido y las microondas.⁷

El mecanismo exacto por el cual el cloruro de calcio media el proceso de transformación artificial sigue siendo una incógnita. Resultados previos sugieren que el calcio facilita la adsorción del ADN sobre la superficie celular y el shock térmico permite la entrada del ADN adsorbido al citoplasma de la célula.⁸ Se postulan dos modelos que explican el mecanismo de transformación inducida de las células bacterianas.⁹ Según el primer modelo, el ADN libre se une a un receptor en la membrana celular y es transportado a través de canales, ya sea en forma circular o linear. Este modelo se basa en el papel importante que representan los canales formados

por el complejo poli- β -hidroxibutirato (PHB)/calcio/polifosfato en la captación y entrada de moléculas de ADN.^{9,10} El segundo modelo asume que el shock térmico desestabiliza la membrana celular, de manera que favorece la entrada del ADN a la célula a través de poros temporales formados en aquella.⁹

El método clásico de preparación de células competentes de *E.coli* con cloruro de calcio y transformación por shock térmico fue reportado por Mendel y Higa en 1970.^{4,7,9} En estos tiempos, sigue siendo ampliamente usado.⁴ Posteriormente, el método ha sido mejorado con resultados en la eficiencia de transformación de 10^5 a 10^7 transformantes por microgramo de ADN plasmídico.^{4,11,12} El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio comparativo de dos métodos de preparación de células competentes tratadas con disoluciones de cloruro de calcio y cloruro de magnesio.

El método A es el método de Sambrook y col¹³ con modificaciones, el cual se utilizó para la preparación de células competentes. Se inoculó 1 mL de un precultivo en 100 mL de LB que se suplementó con 20 mmol/L de disolución de $MgCl_2$ y la densidad óptica a 600 nm fue seleccionada en el intervalo de 0,4 a 0,6. Las células fueron colectadas mediante centrifugación a 8000 r/min a 4 °C durante 10 min, el sobrenadante se desechó y la biomasa bacteriana se resuspendió en 20 mL de una disolución de 50 mmol/L $CaCl_2$ previamente colocada sobre hielo. La suspensión se dispuso en baño de hielo durante 30 min y las células fueron nuevamente colectadas por centrifugación a 8000 r/min durante 10 min. Luego de eliminar el sobrenadante, el precipitado celular se resuspendió en una mezcla de una disolución de 50 mmol/L $CaCl_2$ con glicerol al 20 %. La mezcla había sido previamente colocada sobre hielo y la concentración celular obtenida fue de $5 \cdot 10^9$ Unidades formadoras de colonias (UFC)/mL. Finalmente, alícuotas de 200 μ L fueron conservadas a -70 °C.

El método optimizado por el grupo de Tang y col,¹⁴ con modificaciones, fue utilizado en la preparación de células competentes (método B). Las células fueron colectadas mediante centrifugación a 5000 r/min durante 5 min a 4 °C, cuando la densidad óptica del cultivo medida a 600 nm se encontró en el intervalo 0,3 a 0,4. En cada lavado se emplearon 5 mL de la mezcla de disoluciones de 80 mmol/L $CaCl_2$ y 50 mmol/L $MgCl_2$. Todas las incubaciones sobre hielo con la mezcla de lavado fueron de 30 min. Finalmente, alícuotas de 200 μ L fueron conservadas a -70 °C.

La frecuencia de transformación (FT) de las células transformadas con ADN plasmídico (pUC19) se expresó como el logaritmo en base 10, la cual fue de $6,83 \cdot 10^4$ UFC/ μ g de pUC19 y $2,03 \cdot 10^7$ UFC/ μ g de pUC19, para el método A y el B respectivamente. La prueba t-Student arrojó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambas frecuencias de transformación (Tabla 1).

Los resultados obtenidos con el método A en el presente trabajo fueron inferiores a los obtenidos por Sambrook y col¹³ y Tang y col.¹⁴ Sin embargo, en el caso del método B, la frecuencia de transformación observada fue dos veces superior a la reportada por Sambrook y col¹³ y se encontró en el orden informado por Tang y col,¹⁴ sin llegar a alcanzar sus mejores resultados, lo que pudiera deberse a los cambios introducidos en el protocolo de la preparación de las células competentes en los experimentos desarrollados en este trabajo (Tabla 1).

La frecuencia de transformación de las células competentes preparadas por ambos métodos se evaluó mediante transformación. En este ensayo, se mezclaron 90 μ L de células competentes con 10 μ L de pUC19, a una concentración 1 ng/ μ L. En el caso del control negativo se mezclaron 90 μ L de células competentes con 10 μ L de agua milli-Q. Tanto las células en estudio como el control negativo se mantuvieron sobre baño de

hielo durante 30 min. Posteriormente, cada mezcla se sometió a un shock térmico a 42 °C, durante 40 s e inmediatamente se colocó sobre baño de hielo durante 1 min. A continuación, se añadieron 400 µL de LB y se incubó durante 1 h a 37 °C en zaranda a 200 r/min. Finalmente, se sembraron 100 µL de las diluciones apropiadas en placas de agar LB suplementado con ampicilina, 100 µg/µL. Todas las placas fueron incubadas durante toda la noche a 37 °C. No se observó crecimiento de colonias en la superficie de las placas en las que se sembró el control negativo.

Tabla 1. Frecuencia de transformación con pUC19 de las células competentes.

Método	FT (UFC/µg de pUC19)	Log(FT) ± DS	Relación (FTB/FTA)
A	$6,83 \cdot 10^4$	$4,831 \pm 0,020$	303,30
B	$2,03 \cdot 10^7$	$7,307 \pm 0,011$	-
C	$10^5 - 10^7$	-	-
D	$10^7 - 10^9$	-	-

DS Desviación estándar. C Sambrook y cols. 1989. D Tang y cols. 1994.

Los plasmidios purificados procedentes de las colonias obtenidas de las células competentes preparadas por ambos métodos (A y B), mostraron una migración en gel de agarosa semejante al plasmidio control (Fig. 1).



Fig 1. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. Carril 1: plasmidio control pUC19. Carril 2: pUC19 purificado a partir de las células transformadas preparadas por el método A. Carril 3: pUC19 purificado a partir de las células transformadas preparadas por el método B.

El protocolo de preparación de células competentes por el método B, presenta una frecuencia de transformación 303,3 veces mayor que la del método A, debido posiblemente al empleo combinado de mayores concentraciones de $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$.¹⁵ Colectar las células al inicio de la fase exponencial de crecimiento (densidad óptica a 600 nm en el intervalo de 0,3 a 0,4) y tratarlas con disoluciones de CaCl_2 a concentraciones crecientes, inferiores a 100 mmol/L, aumentan la frecuencia de transformación de las células competentes.¹⁶

CONCLUSIONES

El protocolo de preparación de células competentes por el método B demostró ser superior al método A en el sistema experimental utilizado en este trabajo. Este nuevo método resulta fácil, económico y asequible. Por otra parte, la frecuencia de transformación que se obtiene es suficiente para llevar a cabo los trabajos en biología molecular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sinha S, Redfield R J. Natural DNA Uptake by *Escherichia coli*. P LoS ONE. 2012; 7:1- 6.
2. Dubnau D. DNA Uptake in bacteria. Annu Rev Microbiol. 1999;53: 217-244.
3. Baur B, Hanselmann K, Schlimme W, Jenni B. Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. Appl Environ Microbiol. 1996; 62: 3673-3678.
4. Majeed M, Hussain K, Noreen M, Izhar M. Optimum range of plasmid supercoiled DNA for preparation of competent Top 10 *E. coli*. Archives of Pharmacy Practice. 2011; 2:76-79.
5. Chen I, Dubnau D. DNA uptake during bacterial transformation. Nat Rev Microbiol. 2004; 2: 241-249.
6. Swords WE. Chemical transformation of *E. Coli*. Methods Mol Biol 2003; 235. 49 - 53.
7. Singh M, Yadav A, Ma X, Amoah E. Plasmid DNA Transformation in *Escherichia Coli*: Effect of Heat Shock Temperature, Duration, and Cold Incubation of CaCl₂ Treated Cells. International Journal of Biotechnology and Biochemistry 2010; 6:561-568.
8. Panja S, Aich P, Jana B, Basu T. How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of *Escherichia coli*? Molecular Membrane Biology. 2008; 25: 411-422.
9. Chan J, Davis C, Jokic I. Influences of growth temperature and preparation of competent cells on efficiency of chemically-induced transformation in *Escherichia coli* DH5 α . Journal of Experimental Microbiology and Immunology. 2006; 9:92-96.
10. Huang R, Reusch RN. Genetic competence in *Escherichia coli* requires poly- β -hydroxybutyrate/calcium phosphate membrane complexes and certain divalent cations. J Bacteriol. 1995;177: 486-490.
11. Pope B, Kent HM. High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. 1996; 24:536-537.
12. Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc Natl Acad Sci USA. 1989; 86:2172-2175.
13. Sambrook J, Maniatis T, Fritsch ET. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. 2ed. Book1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE.UU.; 1989;p. 1,82-1,84.
14. Tang X, Nakata Y, Li Hai-Ou, Zhang M, Gao H, Fujita A, Sakatsume O, Ohta T, Yokoyama K. The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E. coli*. Nucleic Acids Research. 1994; 22:2857-2858.

15. Bergmans HE, Kooijman DH, Hoekstra PM. Cotransformation of linear chromosomal DNA and plasmid DNA in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 1980; 9:211-214.
16. Xiaowei Li X, Sui X, Zhang Y, Sun Y, Yan Zhao Y, Ying Zhai Y, Wang Q. An improved calcium chloride method preparation and transformation of competent cells African Journal of Biotechnology. 2010; 9:8549-8554.