

Procedimiento de empaquetamiento *in vitro* utilizando sólo la cepa SMR 10

JULIO DELGADO

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

El empaquetamiento *in vitro* de ADN del bacteriófago *lambda*, fue inicialmente desarrollado por Becker y Gold (1975), utilizando mezclas de extractos de bacterias infectadas con mutantes de este bacteriófago, alterados, en los genes responsables del ensamblaje de la partícula de fago. Desde entonces, y hasta el presente, ese procedimiento ha sido mejorado hasta lograr eficiencias de empaquetamiento de 10^8 ufp \cdot μg^{-1} de ADN de *lambda* intacto. Normalmente se utilizan dos cepas para este proceso.

A continuación se expone un procedimiento de empaquetamiento basado en la utilización solamente de una cepa de *Escherichia coli*.

El proceso se divide en dos partes: preparación de la mezcla de empaquetamiento y reacción de empaquetamiento en sí.

Preparación de la mezcla

- A partir de un cultivo fresco de la cepa de *E. coli* SMR 10 crecido una noche a 30°C, se inoculan 500 ml de medio LB hasta obtener una DO_{600} de 0,1.
- Se incuba a 30°C hasta una DO_{600} de 0,3. Se induce el fago colocando el cultivo en un baño de 45°C durante 15 minutos con agitación moderada.
- Se transfiere el cultivo a una zaranda recíprocante y se incuba a 38-39°C con agitación vigorosa durante una hora.
- El chequeo de la inducción exitosa se realiza añadiendo una gota de cloroformo a 1 ml del cultivo (las células deben "lisar" en pocos minutos).
- Las células enfriadas en un baño de hielo se colectan por centrifugación a 9 000 rpm durante seis minutos (puede realizarse a 4 200 rpm durante diez minutos).
- Se elimina el sobrenadante y se resuspende el *pellet* en 4 ml del buffer A (tris-HCl 20 mM, pH 8 con MgCl 3mM, EDTA 1mM y 2-mercaptoetanol a una concentración de 0,05% v/v).
- Se sonica el material hasta que la suspensión pierda su viscosidad, evitando formar espuma (15 golpes de tres segundos con descansos de 20 segundos será suficiente).
- Se colecta el debrís celular en un tubo previamente enfriado mediante centrifugación a 6 000 rpm durante seis minutos.

- Se adicionan 0,5 ml de buffer M1, el cual se prepara de la siguiente manera:
 - 113 μ l de agua destilada,
 - 3 μ l de 1M Tris-HCL, pH 7,5,
 - 300 μ l de 0,05M espermidina con 0,1M de putrescina,
 - 75 μ l de 0,1M γ -ATP,
 - 1 μ l de 2-mercaptoetanol,
 - 9 μ l de 1M $MgCl_2$.
- Se mezcla cuidadosamente y se distribuye el material en alícuotas de 100 μ l en viales previamente enfriados.
- Se congela el material en nitrógeno líquido y se almacena a 80°C.

Reacción de empaquetamiento

- La mezcla se prepara en el siguiente orden:
 - 7 μ l de buffer A,
 - 1 ó 2 μ l de ADN,
 - 1 μ l de buffer M1,
 - 15 μ l de extracto de SMR 10.
- Se mezcla suavemente y se incuba a temperatura ambiente durante una hora.
- Se diluye 0,5 ml de buffer de fago que contiene Mg y se añaden dos gotas de cloroformo.
- Se pasa a placa.

Comentarios

Durante la preparación de la mezcla después del proceso de inducción, la temperatura del cultivo no debe bajar de 37°C, de lo contrario la inducción será poco efectiva.

Es importante que después de completada la inducción, la temperatura del cultivo se mantenga por debajo de 4°C.

La efectividad de la sonicación se puede verificar mediante la centrifugación de alícuotas de 50 μ l en microfuga durante dos minutos, ya que el *pellet* de la muestra sonicada debe ser mayor que el de la muestra no sonicada.

En cada proceso de chequeo de la preparación de la mezcla durante la reacción de empaquetamiento, deben emplearse diferentes cantidades de extracto.

Este procedimiento es más simple (utiliza una sola cepa), rápido, económico y suficientemente eficiente como para ser utilizado de rutina en el laboratorio. El rendimiento de estas mezclas es de $10^7 - 10^8$ ufp $\cdot \mu g^{-1}$.

REFERENCIAS

- BECKER, A. y M. GOLD (1975). *Isolation of the bacteriophage lambda A-gene protein*. Proc. Natl. Acad. Sci., 72: 581.