

## PRÁCTICA 8

### Inoculación de bacterias de *E. coli* (cepa DH5 $\alpha$ )

Existen varias cepas de bacterias *E. coli* que pueden ser utilizadas para “conservar” y aumentar la población de un plásmido específico; incluso a veces se recomienda el uso de alguna de ellas para algún plásmido en especial. Se recomienda, de manera general, la cepa de *E. coli* **DH5- $\alpha$** , la cual presenta varias ventajas para el manejo de la mayoría de los plásmidos, ya que es muy eficiente para ser transformada (introducción del plásmido), se multiplica con facilidad, y es resistente a condiciones de conservación.

Para realizar el pre- cultivo:

- o Tomar el tubo de *E. coli* (cultivo conservado en DMSO) y en condiciones de esterilidad (a la llama y utilizando todo el material estéril) adicionar 50  $\mu$ L en 5 mL de medio LB líquido, sin antibióticos.
- o Crecer el cultivo durante toda la noche (12-16 h) a 37 °C en agitación (200-225 rpm).

### Protocolo de creación de células competentes con CaCl<sub>2</sub>

1.- Inocular 1 mL del pre-cultivo en 20 mL de medio LB (en un frasco eurotubo). Crecer el cultivo a 37 °C en agitación (220- 225 rpm) hasta que la DO<sub>600</sub> llegue a 0.4-0.6 (durante 1 h, 30 min a 3 horas dependiendo de la cepa, fase de crecimiento temprana o comienzo de la fase exponencial). Dejar 1 h, 30 min.

2.- Transferir 2 mL de cultivo, en condiciones de esterilidad, a 2 tubos fríos de 2 mL. Enfriar los cultivos a 0 °C durante 10 minutos (en hielo).

**NOTA:** Todos los pasos en el protocolo serán llevados a cabo en condiciones de esterilidad.

3.- Centrifugar las células a 4000 rpm durante 10 minutos.

4.- Desechar el sobrenadante, y colocar los tubos en posición invertida (sobre papel secante estéril) durante 1 minuto para eliminar los restos de medio.

5.- Dejar los tubos en hielo durante 2 minutos.

6.- Resuspender (dando toques con el dedo) cada pellet en 400  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M frío e incubar en hielo (5 minutos).

7.- Recuperar las células centrifugando a 4000 rpm durante 10 minutos.

8.- Tirar el sobrenadante, y dejar los tubos invertidos durante 1 minuto para eliminar los restos de solución.

9.- Dejar los tubos en hielo durante 2 minutos.

10.- Resuspender cada pellet en 80  $\mu$ L de solución de CaCl<sub>2</sub> 0.1M fría por cada 2 mL de cultivo inicial.

**NOTA:** En este paso, las células pueden ser repartidas en alícuotas que pueden ser almacenadas a -70 °C. Las células mantienen la competencia bajo estas condiciones, aunque los almacenamientos prolongados pueden disminuirla.

## Protocolo de Transformación

Tener en consideración los siguientes puntos:

- ¡¡Dispones de medio SOC a temperatura ambiente!!
- ¡¡Encender el baño a 42 °C!!
- Se utilizarán las células competentes producidas en el paso anterior.
- Hay que tener preparadas 2 placas LB/ampicilina/IPTG/X-GAL para cada reacción de ligación. Preparar en total 2-3 placas.

1.- Utilizando puntas estériles, transferir 100  $\mu$ L de suspensión de células competentes a un tubo de 1.5 mL estéril de microfuga (1 tubo por cada reacción de ligación). Adicionar 2  $\mu$ L de DNA de cada reacción de ligación (no más de 50 ng) a cada tubo. Mezclar el contenido de los tubos suavemente haciendo remolinos. Incubar los tubos en hielo durante 30 minutos.

2.- A continuación poner los tubos en un baño con agua en movimiento a 42 °C. Incubar exactamente 90 segundos. No agitar los tubos.

3.- Rápidamente, transferir los tubos a hielo y dejarlas durante 2 minutos.

4.- Adicionar 900  $\mu$ L de medio SOC a cada tubo. Incubar durante 1 hora y 50 minutos a 37 °C en agitación para permitir a las bacterias recuperar y expresar los marcadores de resistencia a los antibióticos codificados por el plásmido.

## Siembra en placas para la determinación de transformantes

5.- Sembrar 100  $\mu$ L de cada cultivo de transformación en cada placa de LB/ampicilina/IPTG/X-GAL (haciendo una siembra en extensión). Es recomendable hacer una dilución 1:10 en medio SOC.

- Para hacer la siembra hay que fabricar el asa de cultivo con una pipeta Pasteur de vidrio. De manera que mediante la aplicación de calor, utilizando el mechero de alcohol, hay que doblar dos zonas en el asa, en el centro y en el extremo, flameando posteriormente el asa para esterilizarlo. Luego descargar el calor en una zona de la placa antes de realizar la extensión del cultivo.
- Sembrar una placa sin diluir el cultivo y otra tras realizar la dilución (en total 2 placas por reacción).

(Si se quiere más concentrado, centrifugar 10 minutos a 4500 rpm, resuspender en 200  $\mu$ L de medio SOC y sembrar a modo de césped 100  $\mu$ L).

6.- Incubar las placas toda la noche (O/N) a 37 °C. Al día siguiente deberían verse alrededor de 100 colonias por palca.