

# Transformación células M15(Prep4) con la construcción KcsA-pQE30 n°2.

## Día 1:

1. Descongelar células competentes en hielo (Estaban guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ ). Se trata de células E. Coli M15 (Prep4). Están congeladas en viales de unos 330 $\mu\text{l}$ . Se necesitarán 100  $\mu\text{l}$  por DNA que se quiera incluir.
2. Transferir **100  $\mu\text{l}$**  a tubos falcon (cierre no hermético, buena aireación) preenfriados en hielo ( $V_{\text{total del tubo}} = 15 \text{ ml}$ ). Poner otro tubo con 1,5 ml de **medio LB** en un baño a  $42^{\circ}\text{C}$ .
3. Añadir a cada tubo (con 100  $\mu\text{l}$  de células), **1.7 $\mu\text{l}$  de  $\beta\text{MeSH}$**  (stock diluido 1:10 con  $\text{H}_2\text{O}$ ) preparado recientemente  $[\beta\text{MeSH}]_{\text{final}} = 25\text{mM}$ .
4. Dejar 10 min en hielo. Agitar suavemente cada 2 min.
5. Añadir 200 ng del DNA correspondiente (superexceso). **Aprox. 2  $\mu\text{l}$** .
6. Incubar en hielo durante 30 minutos.
7. Dar un recuerdo de ampicilina a las placas. Meterlas en la estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  (sin ventilador) al menos 1,5 h: **50  $\mu\text{l}$  de Amp. (50 mg/ml) + 50  $\mu\text{l}$  de Kan. (25 mg/ml)**.
8. Poner en un baño de agua a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 45 s. El tiempo es crítico para grandes rendimientos.
9. Incubar en hielo durante 2 min.
10. Añadir **1 ml del LB** precalentado en el baño a  $42^{\circ}\text{C}$  e incubar en agitador orbital 1h a  $37^{\circ}\text{C}$  y 250 r.p.m.
11. Sembrar **50  $\mu\text{l}$**  (quizá 20  $\mu\text{l}$  sea suficiente) en placas de agar + ampicilina.

Este día también se preparan **100 ml de medio LB** para el **PREINÓCULO** y **1 l de medio 2xYT** para el **INÓCULO** y se autoclavan.

PREINÓCULO	
Medio LB, 2 g (comercial) para 100 ml	
Para 1 l:	
- Triptona	10 g
- Extracto levadura	5 g
- NaCl	10 g
	en 100 ml $\text{H}_2\text{O}$
desioni.	

INÓCULO	
Medio 2xYT, preparar 1l	
- Triptona	16 g
- Extracto levadura	10 g
- NaCl	5 g
	en 1000 ml $\text{H}_2\text{O}$ desioni.

## PREINÓCULO

## Día 2:

1. Disponemos de células competentes y transformadas (**KcsA-pQE30 n°2**) en una placa petri del día anterior. De ellas tomaremos una colonia. Si hay colonias aisladas podemos guardar estas placas 15 días a  $4^{\circ}\text{C}$ , selladas con parafina y tomar otras colonias para hacer un preinóculo nuevo.

2. Disponemos, preparado el día anterior y autoclavado, de un matraz de 250 ml unos 100 ml de LB. Supplementamos con:
    - Kanamicina (stock 25 mg/ml) → 100  $\mu$ l                       $[Kan]_f = 0.025$  mg/ml
    - Ampicilina (stock 50 mg/ml) → 100  $\mu$ l                       $[Amp]_f = 0.05$  mg/ml
    - Glucosa 40% (stock al 40%) → 100  $\mu$ l                       $[Glu]_f = 0.04\%$
  3. Preinocular cada matraz con una única colonia de las bacterias transformadas correspondientes. Hacerlo a última hora de la tarde.
  4. Dejar a 37°C, 200 rpm de agitación durante la NOCHE.
- 

## INÓCULO

### Día 3:

1. Inocular 1L de 2xYT con los 100 ml del preinóculo y añadir 1ml de:  
Amp (50mg/ml), Kan (25mg/ml), Glu (40%). Agitación a 37°C, 200 rpm.
2. Dejar crecer hasta O.D.=0.6-0.8. Medir a 600 nm (visible). Hacer primera medida a las **2h**.

Nota: Si un matraz llega antes a O.D. deseada, llevar a 4°C. Si se pasa, descartar la mitad del volumen y añadir 2xYT fresco. Incubar 25 min y volver a medir.
3. Añadir **500  $\mu$ l IPTG (1M)** para inducir la expresión de KcsA.
4. Crecer durante **2h a 37 °C y 200 rpm**.
5. Centrifugar con JA-10 durante 15 min, 6000 rpm, 4 °C.