

Protocolo para preparación de bacterias competentes y su transformación

1. A 10 ml de medio LB (Luria-Bertani) previamente autoclavado se le añaden, "picando" de una colonia, las bacterias (E. coli).
Preparación de medio LB (para 1 litro):
10 g Triptona (Pronadisa, Cat. 1612.00), 5g extracto de levadura (Pronadisa, Cat. 1702.00) y 10 g NaCl (pH=7)
2. Se deja crecer en agitación y a 37°C hasta que llega a una D.O. de 0.6-0.7
3. Poner en hielo rápidamente en cuanto se retiren de la agitación.
4. Se centrifugan a 5 ° C durante 7 minutos a 4000 r.p.m. en una centrífuga de mesa (8000 g)
5. Se descarta el sobrenadante y al pellet (bacterias) se le añaden 5 ml de CaCl₂ 0.1 M
6. Se mantienen las bacterias en hielo durante 10 minutos.
7. Se vuelve a centrifugar 5 minutos a 2500 r.p.m. en la misma centrífuga (2500 g)
8. Descartamos el sobrenadante y al pellet se le añade 1ml de CaCl₂ 0.1 M frío
9. Aquí tendremos ya las células competentes, que pueden conservarse a -80°C.
10. Cuando queramos introducirles el ADN (transformación), a esas células les añadiremos 2-mercaptoetanol (para permeabilizar más las membranas), tomando 2 µl de una mezcla de 2 µl 2-merc.+ 8 µl agua.
11. Ahora introduciremos la disolución de plásmido para que quede a una concentración de 10-15 ng/µl.
12. Mantenemos durante media hora en hielo.
13. Posteriormente ponemos durante un minuto la muestra en un baño a 42 °C
14. Volvemos a dejar en hielo durante un minuto.
15. Añadimos 1 ml de LB
16. Pasaremos ahora las células a crecer (las metemos durante una hora a 37°C en un agitador o baño)
17. Retiramos todo el líquido (las células precipitan) excepto unos 200 µl
18. Usando una pipeta resuspendemos suavemente las células (porque aún tienen las paredes débiles).
19. Plaqueamos en una placa de cultivo de LB-agar (Pronadisa, Cat. 1083.00) usando un asa de vidrio para extender.
20. Llevamos el cultivo a una estufa a 37° C y lo dejamos crecer un día.