

TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS

Día 1:

1. Descongelar células competentes en hielo:

VAMP-2B	BL21 (sob)
SNAP-25	BL21 (sob)
Syntaxin-1A	C43 (pel)
BoNT/A/E	M15 (pel)

Están congeladas en viales de unos 330 μ l. Se necesitarán 100 μ l por DNA que se quiera incluir.

2. Transferir 100 μ l a tubos falcon (cierre no hermético, buena aireación) preenfriados en hielo ($V_{\text{total del tubo}}=15$ ml). Poner otro tubo con medio LB en un baño a 42°C.
3. Añadir a cada tubo (con 100 μ l de células), 1.7 μ l de β MeSH (stock diluido 1:10 con H₂O) preparado recientemente [β MeSH]_{final} = 25mM.
4. Dejar 10 min en hielo. Agitar suavemente cada 2 min.
5. Añadir 200 ng del DNA correspondiente (superexceso). Poner otro tubo falcon con todo menos el DNA; este será el control.
6. Incubar en hielo durante 30 minutos.
7. Dar un recuerdo de ampicilina a las placas. Meterlas en la estufa a 37°C (sin ventilador) al menos una hora y media.
8. Poner en un baño de agua a 42°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 °C e incubar en agitador orbital 1h a 37°C y 250 r.p.m.
11. Sembrar 50 μ l en placas de agar + ampicilina. Estas serán las placas de baja concentración.
12. Transferir a eppendorf y centrifugar 1 min a 3000 rpm. Retirar el sobrenadante y dejar 50-100 μ l de sobrenadante. Resuspender el pellet.
13. Sembrar 50 μ l del resuspendido en las placas adecuadas. Esto es alta concentración. Estufa a 37°C y o/n.

PREINÓCULO

Día 2:

1. Disponemos de células competentes y transformadas en una placa petri del día anterior. Si hay colonias aisladas colocarlas a 4°C.
2. Poner en un matraz de 250 ml unos 100 ml de LB suplementados con ampicilina y glucosa 40% (inhibidor de la expresión de las proteínas), ambos a 1/1000 de su concentración original del stock (poner 1 μ l de cada uno por cada ml de LB).

Kanamicina (stock 25 mg/ml) \rightarrow 100 μ l [Kan]_f= 0.025 mg/ml (si es BoNT/E o BoNT/A.

Ampicilina (stock 50 mg/ml) \rightarrow 100 μ l [Amp]_f=0.05 mg/ml

Glucosa 40% (stock al 40%) \rightarrow 100 μ l [Glu]_f=0.04%

3. Preinocular cada matraz con una única colonia de las bacterias transformadas correspondientes. Hacerlo a última hora.
4. Dejar a 37°C en agitación

INÓCULO

Día 3:

1. Inocular 100 ml, dependiendo de O.D., provenientes del preinóculo en un matraz de 2 l con 1250 ml de medio 2xYT suplementado con 100µl ampicilina ,100µl glucosa 40% y 100µl de kanamicina (sólo si es BoNTE/A). Agitación a 37°C.
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. Al llegar al O.D. deseado, tomar 1 ml para ver expresión. Centrifugar ese ml, quitar sobrenadante y congelar.(sólo si son células nuevas,para ver cómo funcionan)
4. Agregar IPTG a 1 mM final (stock 1M). Añadir 1µl de IPTG / ml de 2xYT y dejar 3 a 5 h más. Se induce la expresión.
5. Centrifugar con el rotor JA-14, previamente enfriado, a 6000xg durante 15 min. Resuspender en el menor volumen posible, usando el propio sobrenadante y transferir a un tubo corning.
6. Centrifugar en G5-6 a 3.000 r.p.m. durante 15 min. Se descarta el sobrenadante y se congela el pellet a -20°C.