

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

Día 1:

1. Descongelar células competentes en hielo (Estaban guardadas a -80°C). Se trata de células E. Coli M15 (Prep4). Están congeladas en viales de unos 330 μl . Se necesitarán 100 μl por DNA que se quiera incluir.
2. Transferir **100 μl** 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°C .
3. Añadir a cada tubo (con 100 μl de células), **1.7 μl de βMeSH** (stock diluido 1:10 con H_2O) 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 μl** .
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 1,5 h: **50 μl de Amp. (50 mg/ml) + 50 μl de Kan. (25 mg/ml)**.
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 μl** (quizá 20 μl 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 H_2O
desioni.	

INÓCULO	
Medio 2xYT, preparar 1l	
- Triptona	16 g
- Extracto levadura	10 g
- NaCl	5 g
	en 1000 ml H_2O 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°C , selladas con parafina y tomar otras colonias para hacer un preinóculo nuevo.

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

INÓCULO

Día 3:

- 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.
- 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.
- Añadir **500 μ l IPTG (1M)** para inducir la expresión de KcsA.
- Crecer durante **2h a 37 °C y 200 rpm**.
- Centrifugar con JA-10 durante 15 min, 6000 rpm, 4 °C.