

TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Protocolo para transformar bacterias competentes preparadas por CaCl_2 , para ser transformadas por shock térmico.

1. Descongelar células competentes en hielo. Están congeladas en viales de unos 330 μl . Se necesitarán 100 μl por DNA que se quiera incluir.
2. Transferir 100 μl de las células a tubos falcon (cierre no hermético, buena aireación) preenfriados en hielo (V_{total} del tubo = 15 ml). Poner otro tubo con medio LB en un baño a 42°C.
3. Añadir a cada tubo (con 100 μl de células), 1,7 μl de bMeOH (stock: 2 μl de bMeOH + 18 μl de H_2O autocl.) preparado recientemente. $[\text{betaMeOH}]_f = 25\text{mM}$.
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; éste será el control.
6. Incubar en hielo durante 30 min.
7. Dar un recuerdo del antibiótico (50 μl de Ampicilina a 50 mg/ml; ó 50 μl de Kanamicina a 25 mg/ml) 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 seg. 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 1 h a 37°C y 250 rpm.
11. Sembrar 50 μl en placas de agar + antibiotico (amp, kan, etc). 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 μl de sobrenadante. Resuspender el pellet.
13. Sembrar 50 μl del resuspendido en las placas adecuadas. Esto es alta concentración. Estufa a 37°C y O.N.