

**TRANSFORMACIÓN BACTERIANA DE GENES CODIFICADOS EN PLÁSMIDOS.
ELECTROTRANSFORMACIÓN DE PLÁSMIDOS CON GEN CODIFICANTE DE PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE RESISTENTE A
AMPICILINA (Y/O CARBENICILINA) EN *E. COLI***

Introducción.

La transformación bacteriana se lleva a cabo cuando una cepa naturalmente competente acepta material genético extracelular y no es degradado en el citoplasma de la misma (Snyder *et al.*, 2013). La primera evidencia de esta transferencia horizontal de genes ocurrió en 1928 cuando Griffith realizaba sus estudios sobre la virulencia en ratones de dos cepas de *Streptococcus pneumoniae*, una cepa con morfología colonial de aspecto liso (patógena) y una cepa de aspecto rugoso (no patógena). Años después Avery y sus colegas descubrieron que existía una transferencia de DNA lo que provocaba que la cepa rugosa fuera capaz de infectar a los ratones, este fenómeno fue conocido como transformación y marcó el principio de la era de la genética molecular (Vee Aune y Achmann, 2009).

La transformación bacteriana ocurre naturalmente cuando existe DNA desnudo en el ambiente extracelular y una célula receptora que sea capaz de introducirlo a su citoplasma sin que sea degradado por alguna nucleasa; para que esto ocurra es necesario que en su genoma contenga diferentes genes que codifiquen para diferentes proteínas que ayudaran a la bacteria a captar el DNA; en la mayoría de las bacterias dichos genes solo se expresan bajo condiciones específicas lo cual hace aún más improbable que las células bacterianas puedan transformarse de manera natural (Johnston *et al.*, 2014).

Hasta el 2014, se estimaba que existían al rededor 82 especies diferentes capaces de transformarse de manera natural dentro de las cuales destacan *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, entre otros (Johnston *et al.*, 2014; Snyder *et al.*, 2013). Las bacterias que son capaces de introducir DNA desnudo a su citoplasma son conocidas como bacterias naturalmente competentes

Debido a que la eficiencia de la transformación natural es relativamente baja se han desarrollado diferentes metodologías para que cepas naturalmente no competentes puedan ser transformadas con una mejor eficiencia (Vee Aune y Achmann, 2009) y así ser utilizadas con diferentes propósitos industriales y de investigación, como son la producción de diferentes metabolitos de interés a nivel industrial y la creación de bibliotecas de clonas. Dichos métodos son muy variados y tienen diferentes fundamentos, sin embargo, en la mayoría de los protocolos se siguen tres pasos fundamentales: preparación de células competentes, etapa de “choque” y recuperación de las células (Vee Aune y Achmann, 2009). Uno de los métodos más utilizados es la transformación química o quimiotransformación, la cual consiste en tratar a las células con cloruro de calcio para hacer más lábil a la membrana y así, al ser sometidas a un choque térmico, se generen poros no selectivos lo que facilita el paso del DNA (Snyder *et al.*, 2013).

Otro de los métodos más utilizados se conoce como electrotransformación y consiste en mezclar al DNA desnudo con células electrocompetentes, a esta mezcla se le aplican pulsos eléctricos los cuales generan poros no selectivos en la membrana de la célula para que de esta manera el DNA pueda atravesarla (Eynard y Teissié, 2000; Snyder *et al.*, 2013). El pulso eléctrico es generado por un equipo llamado electroporador el cual almacena la energía en un capacitor que se encuentra dentro del equipo para que después, este voltaje sea descargado mediante unos electrodos en la cubeta de la electroporación donde se encuentra la muestra (Puc *et al.*, 2004).

Para que pueda llevarse a cabo la electrotransformación, es necesario someter a las células que se desean transformar a un proceso de preparación de células electrocompetentes, que tiene como objetivo quitar los iones presentes en el medio así como, agregar sustancias no iónicas como el glicerol para prevenir un choque osmótico (Snyder *et al.*, 2013). Las células por lo general se acondicionan cuando el cultivo se encuentra en la mitad de la fase exponencial ya que en esta etapa, tanto la pared como la membrana de las células aún no están totalmente formadas lo cual facilita la formación de los poros no selectivos al aplicar el pulso eléctrico; debido a esto, se ha demostrado que la eficiencia de transformación en bacterias Gram-negativas es mayor en comparación a las bacterias Gram-positivas, microalgas y levaduras (10^7 - 10^{10} transformantes/ μg de DNA, 10^5 - 10^7 transformantes/ μg de DNA y 10^4 - 10^7 transformantes/ μg de DNA respectivamente) (Kotnik *et al.*, 2015). Otro motivo por el cual las células competentes se preparan en esta fase de crecimiento es debido a que si existe una alta cantidad de células (mayor a 5×10^8 células por mL en el caso de *E. coli*), éstas aumentarían la conductividad del medio debido a que en sus membranas existe cierta concentración de iones los cuales provocarían una disminución de hasta tres órdenes de magnitud en la eficiencia de transformación (Eynard y Teissié, 2000).

La transformación de cepas no competentes naturalmente en lo general se realiza utilizando DNA plasmídico debido a que al ser una doble cadena circular covalentemente cerrada presenta una menor susceptibilidad a ser degradada por las endonucleasas presentes en el citoplasma de las bacterias (Snyder *et al.*, 2013), además, actualmente existen plásmidos sintéticos y diferentes metodologías mediante las cuales se pueden introducir genes de selección así como genes que codifican para diferentes metabolitos de interés. Otra de las ventajas de los plásmidos es que su replicación es independiente del DNA cromosomal y a diferencia de este, puede existir más de una copia del plásmido en una célula (Snyder *et al.*, 2013). Debido a estas características, los plásmidos han sido utilizados desde hace varios como vectores de clonación para la transformación de diferentes cepas bacterianas.

El plásmido utilizado en este proyecto codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) la cual se encuentra de manera natural en las medusas (*Aequorea victoria*), sin embargo, debido a sus variadas aplicaciones el gen que la codifica fue clonado desde 1992 en *Escherichia coli* y *Caenorhabditis elegans* (Ferrer, 2008). El uso más común de la proteína GFP ha sido como marcador *in vivo* para el estudio de la localización y tráfico intracelular de las proteínas, ya sea en organismos procariontes o eucariontes ya que se ha demostrado que esta proteína no genera un efecto tóxico en las células (Micklos *et al.*, 2003). La proteína presente de manera natural en *A. victoria* está compuesta de 238 aminoácidos y presenta una estructura en forma de barril β , en el centro se encuentra el compuesto cromóforo (p-hidroxibencilidenimidazolinona), el cual es capaz de absorber luz azul o luz ultravioleta y emitirla como un haz de luz de mayor longitud de onda regresando así a su estado basal (Ferrer, 2008).

Debido a la importancia de la transformación utilizando los métodos de electrotransformación este protocolo tiene como objetivo bajo condiciones óptimas realizar la transformación en *E. coli* W3110 utilizando un plásmido que codifica para la resistencia a ampicilina y la producción de proteínas GFP.

OBTENCIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES

METODOLOGÍA

REACTIVOS Y CEPAS

- 1 tubo de ensayo 16X150 CON 4 mL de caldo YENB PRECULTIVO DE *E. coli* w3110 37°C/18h/300 r.p.m.
- 1 tubo de ensayo 22x175 con 1.5 mL de glicerol 10% estéril
- 1 tubo de ensayo 22x175 con 20 mL de agua milliQ o bidestilada pH 7.0 estéril
- 1 tubo de ensayo 16x150 con 10 mL de agua milliQ o bidestilada pH 7.0 estéril
- 1 matraz Erlenmayer de 250 mL con 50 mL de caldo YENB estéril (hidratar con agua MilliQ o bidestilada pH 7.0)
- 1 tubo de 16x150 con 3 mL de medio YENB (fungirá como blanco para calibración del espectrofotómetro)

MATERIAL

- 1 par de guantes clínicos
- 1 micropipeta 1000 μ L
- 1 micropipeta 100 μ L
- 1 caja con puntas de 1000 μ L estériles
- 1 caja con puntas de 100 μ L estériles
- 1 Portamicropipetas
- 1 tubo cónico 50 mL **estéril**
- 6 microtubos centrífuga **estériles**
- 1 gradilla para microtubos
- 1 gradilla para tubo cónico
- 1 recipiente plástico para residuos de puntas y microtubos o consumibles de plástico con desinfectante
- 1 recipiente plástico para residuos biológicos con desinfectante
- 1 hielera
- Centrífuga para tubos 50 mL

Microcentrífuga
Balanza
Hielo frapé
Ultracongelador
Espectrofotómetro con celdas correspondientes a 600 nm

PROCEDIMIENTO

NOTA: Es obligatorio utilizar guantes a lo largo de todo el protocolo

- En zona aséptica y con la micropipeta de 1000 μL , tomar 250 μL del precultivo de *E. coli* W3110 en medio YENB (ext. levadura+caldo nutritivo) desarrollado a 37°C/300 rpm/18 horas.
- Inocular el volumen en un matraz Erlenmayer de 250 mL conteniendo 50 ml de medio YENB.
- Incubar 37°C/300 rpm durante aproximadamente 2.5 horas.
- Monitorear la densidad óptica del cultivo a 600 nm ($\text{DO}_{600\text{nm}}$), y detener la incubación hasta que la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ del cultivo obtenida sea de 0.6 unidades de absorbancia.
- **IMPORTANTE: REGISTRAR EN BITÁCORA EL VALOR DE $\text{DO}_{600\text{nm}}$ OBTENIDO**
- **A PARTIR DE ESTE MOMENTO MANTENER EN LO POSIBLE EL CULTIVO, SOLUCIONES DE LAVADO Y MICROTUBOS EN HIELO.**
- En zona aséptica verter todo el contenido del matraz a un tubo cónico de centrífuga estéril de 50 mL FRIO.
- Centrifugar 4000 rpm/5min.
- Decantar sobrenadante en zona aséptica (colocar el sobrenadante para su esterilización dentro del matraz Erlenmayer donde se desarrolló *E. coli* W3110).
- **QUEDARÁ EL CONCENTRADO CELULAR (PASTILLA) EN EL TUBO (se deberá evitar la pérdida de la pastilla celular).**
- Adicionar 20 mL agua milliQ estéril pH=7.0 al tubo (FRIA).
- Agitar el tubo cónico en vórtex para lograr la resuspensión de la pastilla celular.
- Centrifugar 4000 rpm/5 min.
- En zona aséptica eliminar el sobrenadante por decantación (se deberá evitar la pérdida de la pastilla celular; colocar el sobrenadante de lavado para su esterilización dentro del matraz Erlenmayer donde se desarrolló *E. coli* W3110).
- **QUEDARÁ EL CONCENTRADO CELULAR LAVADO 1 VEZ (PASTILLA) EN EL TUBO.**
- Adicionar en zona aséptica 10 mL de agua milliQ pH=7 (FRIA).
- Agitar el tubo cónico en vórtex para lograr la resuspensión de la pastilla celular.
- Centrifugar 4000 rpm/5 min.
- Eliminar el sobrenadante de agua de lavado CON MICROPIPETA DE 1000 μL Y PUNTA ESTÉRIL NUEVA (EVITAR EN LO POSIBLE SUCCIONAR LA PASTILLA CELULAR; colocar el sobrenadante de lavado para su esterilización dentro del matraz Erlenmayer donde se desarrolló *E. coli* W3110).
- **QUEDARÁ EL CONCENTRADO CELULAR (PASTILLA) LAVADO POR SEGUNDA OCASIÓN EN EL TUBO.**
- En zona aséptica adicionar con micropipeta de 1000 μL , 1.0 mL glicerol 10% FRIO Y ESTÉRIL.
- Succionar y expulsar varias veces con la misma punta de la micropipeta las células para resuspender.
- Traspasar el volumen total de células resuspendidas en el glicerol al 10%, a 1 microtubo de centrífuga FRIO.
- Centrifugar a 10000 rpm/ 1 min.
- Eliminar con micropipeta de 1000 μL y punta nueva estéril, el líquido, EVITAR SUCCIONAR LA PASTILLA.
- Adicionar con micropipeta de 1000 μL y punta nueva estéril, 150 μL de glicerol 10% ESTERIL FRIO.
- Alicuotar con micropipeta de 100 μL y punta nueva estéril en varios tubos de microcentrífuga FRIOS, 40 μL de esta suspensión de CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES, TENER CUIDADO DE DEPOSITAR EN EL FONDO DEL MICROTUBO EL VOLUMEN ALICUOTADO.
- Ultracongelar a -70°C .

EVALUACIÓN DEL TAMAÑO DEL PLÁSMIDO pBABE-GFP MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1 %.

Prácticamente todos los protocolos en biología molecular requieren, en algún momento, ubicar las fracciones de los ácidos nucleicos. La electroforesis en gel es un método de fraccionamiento utilizado rutinariamente en el laboratorio de biología molecular. Las separaciones electroforéticas permiten la resolución de fragmentos en un rango de <1,000 Daltones a >10⁸.

En general, el uso de electroforesis para separar ácidos nucleicos es una técnica muy sencilla. Los ácidos nucleicos están cargados de manera uniforme negativamente, además de que el DNA de doble cadena se encuentra razonablemente libre de complicaciones estructurales que puedan afectar su movilidad. Sin embargo, existen ciertas variables que afectan la migración de los ácidos nucleicos en un gel. Éstas incluyen la conformación de los ácidos nucleicos, el tamaño de poro del gel, el gradiente de voltaje aplicado y la concentración de sal en el amortiguador que se utiliza. La más básica de las variables es el tamaño de poro del gel, el cual determina el tamaño de los fragmentos que se pueden resolver. En la práctica, esto significa que geles con un tamaño de poro mayor son utilizados para resolver fragmentos >500 a 1,000 pares de bases (pb ó bp por sus siglas en inglés).

Tabla 1. Concentración de agarosa recomendada para separar fragmentos de DNA de varios tamaños.

Agarosa (%)	Rango efectivo de resolución de fragmentos de DNA lineal (en kb)
0.5	30 a 1
0.7	12 a 0.8
1.0	10 a 0.5
1.2	7 a 0.4
1.5	3 a 0.2

Los plásmidos son moléculas circulares de DNA independientes del cromosoma y se caracterizan por ser una doble cadena, tener su propio sitio de origen de replicación (*ori*) y estar covalentemente cerrados; suelen tener tamaños de varios cientos hasta miles de pares de bases. Los plásmidos codifican para diferentes RNA y proteínas que no son indispensables para el crecimiento de las bacterias (genes no constitutivos); por lo general juegan un papel importante en la adaptación y evolución de las bacterias ya que pueden provocar la adquisición de alguna resistencia a diferentes antibióticos, que produzcan bacteriocinas e incluso que puedan degradar diferentes solventes orgánicos como el tolueno (Madigan *et al.*, 2012).

Actualmente los plásmidos se nombran con una “p” inicial la cual indica que se trata de DNA plasmídico y posteriormente se agregan letras mayúsculas que describen los genes codificados en el plásmido o las iniciales de la(s) persona(s) que lo aislaron o lo construyeron, por último, se agrega una serie de números la cual ayuda a identificar alguna construcción en particular (Snyder *et al.*, 2013).

A diferencia del DNA cromosomal, puede existir más de una copia del plásmido en una célula, este número de copias dependerá de los mecanismos de regulación del sitio *ori* de cada uno y de acuerdo a esto los plásmidos se puede clasificar como de bajo número de copias (plásmidos astringentes) o de alto número de copias (plásmidos relajados).

Los plásmidos han sido utilizados desde hace varios años como vectores de clonación debido a las características antes mencionadas, además, con ayuda de algunas construcciones sintéticas se han logrado obtener vectores de clonación que presentan 3 características importantes las cuales son la capacidad de replicarse de manera autónoma, presentar genes de selección como son la resistencia a diferentes antibióticos y presentar un sitio de clonación múltiple (Snyder *et al.*, 2013). Gracias a la universalidad del código genético los genes que se pueden insertar en los vectores de clonación puede proceder no solamente de bacterias, sino que también pueden utilizar genes de organismos eucariontes.

La mayoría de los vectores de clonación son derivados de plásmidos aislados de diferentes bacterias, especialmente de *E. coli*, sin embargo, han sido modificados con la finalidad de obtener plásmidos más pequeños, con un alto número de copias y con marcadores de selección fáciles de identificar. Dentro de los marcadores de selección más comunes se encuentran la resistencia al cloranfenicol (Cam^R), a la tetraciclina (Tet^R), a la ampicilina (Amp^R) y a la kanamicina (km^R) (Snyder *et al.*, 2013).

El plásmido que se utiliza en el presente protocolo es el plásmido pBabe-GFP (Figura 1), entre otras características posee un tamaño de 5,169 bp, el gen que codifica para la resistencia a ampicilina y el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (<https://www.addgene.org/10668/> último acceso 31/07/16) .

El objetivo de esta parte del protocolo experimental es conocer la metodología para la realización de una electroforesis, para verificar el tamaño del plásmido pBabe-GFP que será introducido en la cepa de *E. coli* W3110 por electrotransformación.

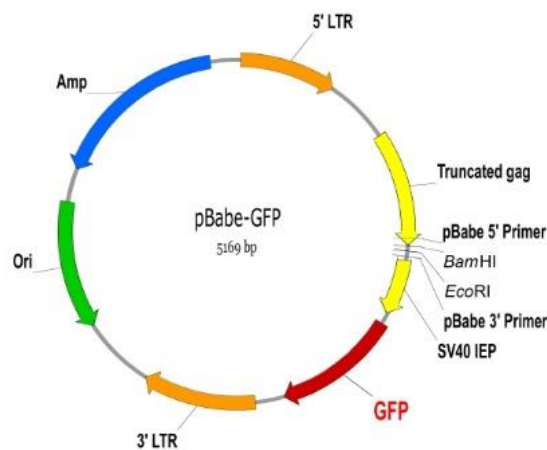


Figura 1. Plásmido pBabe-GFP (<https://www.addgene.org/10668/> último acceso 31/07/16).

NOTA: Es obligatorio utilizar guantes a lo largo de todo el protocolo

REACTIVOS QUÍMICOS Y REACTIVOS BIOLÓGICOS

25 mL de agarosa 1% (P/V).

200 mL de buffer TBE (tris-boratos-EDTA) de corrida para electroforesis.

Amortiguador-colorante de corrida.

Marcador de peso molecular de \pm 1Kbp (O'Gene Ruler Thermo®).

DNA del plásmido pBabe-GFP (PM: 5,169 bp).

Solución de bromuro de etidio 0.04 % (**CUIDADO: AGENTE MUTAGÉNICO**)

MATERIAL

1 par de guantes clínicos

Horno de microondas

Fuente de poder para electroforesis a 120 Volts

Cámara de electroforesis

Soporte para preparación de geles

1 peine para cámara de electroforesis

Transiluminador

Guantes nuevos
Lentes de seguridad o pantalla de acrílico
Micropipetas 0.5 a 10 μ L
Parafilm en cuadros de 1 x 3 cm

PROCEDIMIENTO

NOTA: Es obligatorio utilizar guantes a lo largo de todo el protocolo

1. La metodología general para el ensamble de la cámara de electroforesis se muestra en la figura 2.

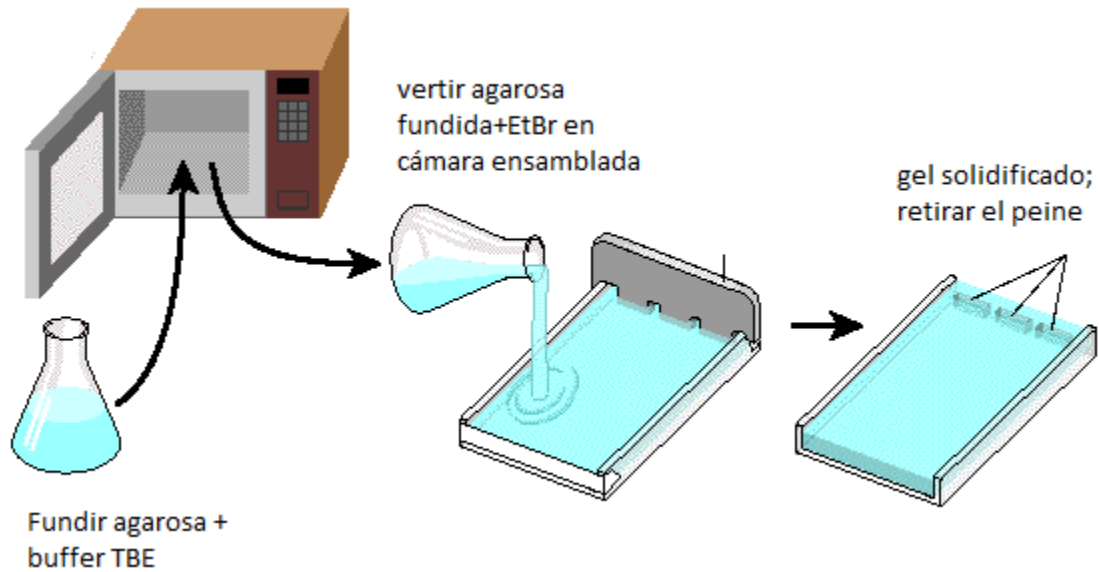


Figura 2. Elaboración de gel de agarosa

2. Ensamblar la cámara de electroforesis como se muestra en la figura 3. Se coloca la charola para geles en la parte central y limitando el área de vertido de agarosa con barras metálicas. Colocar el peine para conformar los pozos del gel en el extremo superior.

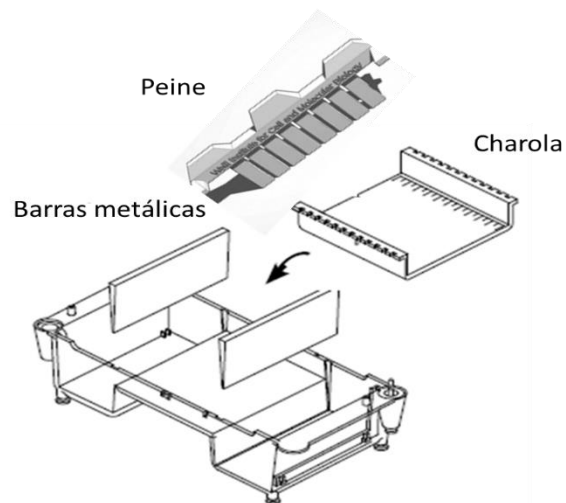


Figura 2. Ensamblado de la cámara de electroforesis

3. Preparar el gel de agarosa al 1% (p/v), fundiendo 0.25 g de la agarosa en 25.0 mL de buffer TBE 1X en microondas.
4. Enfriar aproximadamente a 50°C, colocar en un recipiente de 50 mL nuevo (exclusivo para geles con agente mutagénico, puede ser un tubo de centrifuga cónico desechable), agregar 4 µL de bromuro de etidio, mezclar por inversión.
5. Vaciar la agarosa en la base para preparación de geles y dejar enfriar para solidificar.
6. Una vez que ha solidificado el gel, retirar el peine y las barras metálicas.
7. Vertir buffer TBE 1X en volumen suficiente como para cubrir el gel ~ 1 mm-2 mm (el gel debe quedar sumergido completamente en el buffer).
8. Con una micropipeta de 10 µL preparar la muestra de DNA plasmídico a analizar colocar en un trozo de parafilm de 1 x 3 cm, L 5 µL de muestra a analizar (emplear punta nueva), con 3 µL del colorante de carga (emplear punta nueva).
9. Mezclar la muestra con el colorante de carga succionando y expulsando varias veces con la punta de la micropipeta, se deberá evitar la incorporación de burbujas de aire.
10. "Cargar" cada muestra+colorante a analizar en cada uno de los pozos del gel. Tener cuidado de no picar el gel con la punta de la pipeta ni depositar la muestra sobre el gel.
11. Emplear un pozo para cargar el marcador de peso molecular mezclando 2 µL de éste con 3 µL de colorante.
12. Colocar la tapa de la cámara de electroforesis.
13. Conectar los cables a la fuente de poder. El DNA migra del cátodo (polo negativo, cable negro) al ánodo (polo positivo, cable rojo).
14. Encender la fuente de poder y dejar migrar de 1 a 10 V/cm de gel (100 volts).
15. Cuando el frente del colorante haya migrado a la mitad del gel, apagar la fuente de poder y revisar el gel en un transiluminador de luz ultravioleta (tiempo de corrida aproximado 30 min).
16. Verificar el tamaño de las bandas obtenidas de las muestras, tomando como referencia al marcador de PM. El plásmido pBABA-GFP tiene un peso molecular de 5, 169 bp. Tomar como referencia la banda análoga en tamaño al marcador de peso molecular (Figura 4).

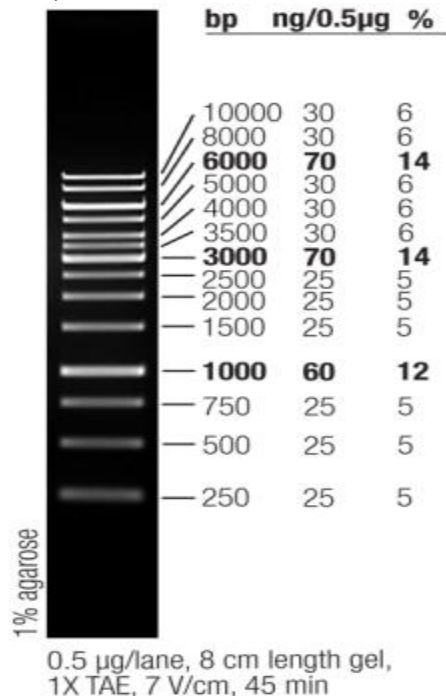


Figura 4. Marcador de peso molecular O' Gene Ruler 1 Kbp.

(<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SM1163>; última accesión 31/07/2016)

ELIMINACIÓN DE RESIDUOS:

Deseche los guantes en el recipiente rojo, de residuos biológico-infecciosos.

Coloque los geles en la charola específica de residuos para que sean tratados posteriormente.

ELECTROTRANSFORMACIÓN

REACTIVOS, MEDIOS, MATERIAL GENÉTICO, CEPAS

1.0 μL de DNA del plásmido pBABE-GFP.
2 microtubo de 2 mL con 40 μL de células de *E. coli* W3110 electrocompetentes
2 cajas de Petri con 20 mL de agar Luria + ampicilina [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$]
1 caja de Petri con 20 mL de agar Mac Conkey
1 caja de Petri con 20 mL de agar Eosina Azul de Metileno
1 tubo con *Salmonella* Typhimurium PFV 430 amp^r gfp⁺
1 tubo 16x150 con 2 mL de medio SOC
Hielo frappé

EQUIPO Y MATERIAL

1 par de guantes clínicos
Electroporador BIORAD, ajustado a 1.8 KV/5 mseg (Programa E1)
1 celda electroporación 1 mm en empaque estéril
1 tubo 16x150 estéril
Micropipeta de 1000 μL
Micropipeta de 100 μL
Micropipeta de 10 μL
Puntas para micropipeta de 1000, 100 y 10 μL estériles
1 aguja de jeringa delgada estéril
1 varilla de vidrio en "L" para plaquear estéril
1 lupa
1 asa bacteriológica
Mechero
1 gradilla para microtubos
1 gradilla para tubos
Incubadora a 37°C con agitación orbital 300 rpm con gradilla adaptada para incubar tubos
Incubadora a 37°C
1 hielera

PROCEDIMIENTO

NOTA: Es obligatorio utilizar guantes a lo largo de todo el protocolo

MANTENER LAS CEPAS Y EL MATERIAL DESCRITO EN ESTA PARTE DEL PROTOCOLO LO MAS POSIBLE TODO EL TIEMPO EN HIELO
ESTOS PASOS DEBEN HACERSE CON LA MAYOR RAPIDEZ POSIBLE

(A) ELECTROPORACIÓN.

- Colocar en hielera y enterrarlos en el hielo:
1 microtubo con plásmido pBABE (recuerda que éste contiene el gen *gfp*)
1 microtubo con 40 μL de *E. coli* W3110 electrocompetentes
1 Celda de electroporación DENTRO DEL SOBRE QUE LA MANTIENE ESTÉRIL (NO SACARLA DE SU EMPAQUE)
- Tomar en zona aséptica con una micropipeta de 10 μL y punta estéril 1 μL de plasmido
- Transferir el plásmido dentro de los 40 μL de células competentes de *E. coli* W3110
- Dar ligeros golpes y suaves al fondo del microtubo para mezclar

- Abrir la celda de electroporación en zona aséptica
- Con la micropipeta de 100 µL transferir todo el contenido del microtubo (ya con el plásmido pBABE-GFP) DENTRO DE LA CELDA, INTRODUCE LA PUNTA DE LA MICROPIPETA Y DESLIZA POR EL BORDE DE LA CANALETA;

NO INCORPORAR BURBUJAS, VERIFICAR QUE NO HAYA BURBUJAS DE AIRE DENTRO DE LA MISMA

En caso de existir burbujas de aire pinchar éstas con una aguja estéril, evitar en lo posible embarrar las células en las paredes

- Tapar la celda y secar en caso de estar húmeda por la parte externa
- Encender electroporador, verificar que en la pantalla se muestre el programa "Ec1" (1.8 KV/5 mseg)
- Introducir la celda en el carrusel del electroporador
- Oprime el botón "pulse". Se escuchará un sonido al momento que el equipo aplique la descarga
- Posteriormente el equipo mostrará el programa "Ec1" de nuevo en la pantalla
- **En caso de que en la pantalla se muestre la abreviatura "Arc", la muestra colocada en la celda sufrió un "puenteo de corriente eléctrica" lo que indicará que las células de *E. coli* W3110 son inservibles y deberán ser desechadas. Esto se presentará en el caso de que no exista al menos un volumen de 40 µL de células con plásmido en la celda, o bien que la muestra tenga burbujas de aire**
- Retirar la celda de carrusel

(B) RECUPERACIÓN DEL SHOCK ELÉCTRICO (REALIZAR LO MAS PRONTO POSIBLE ESTA ETAPA DEL PROTOCOLO)

- En zona aséptica utilizando la micropipeta de 1000 µL y punta estéril, adicionar 1000 µL (1.0ml) de medio SOC al cultivo dentro de la celda.
- Succionar y expulsar varias veces para mezclar el cultivo electroporado con el medio SOC
- Transferir todo el contenido de la celda a un tubo estéril de 16x150(procurar transferir todo el tubo)
- Incubar 37°C/300 rpm/ 1h

(C) EVALUACIÓN DE *E. coli* w3110 amp^R gfp+ (CÉLULAS RECOMBINANTES Ó TRANSFORMANTES)

- En zona aséptica utilizando la micropipeta de 100 µL y punta estéril alicuotar y transferir 100 µL del cultivo recuperado a agar luria con ampicilina [100 µg/ml]
- Realizar extensión superficial empleando varilla de vidrio en "L" estéril
- Incubar 37°C / 24 h y refrigerar
- Verificar características morfológicas de la cepa *E. coli* W3110 amp^R gfp+ (desarrollo en el agar con ampicilina y colonias verde fluorescentes) con luz visible y contabilizar.
- Calcular la eficiencia de transformación (ver Anexo)
- Verificar características morfológicas de la cepa *E. coli* W3110 amp^R gfp+ bajo luz UV
- Observar si existen colonias satelitales y las características morfológicas de las mismas
- Realizar un frotis fijo y observar en el microscopio de fluorescencia.
- Reinocular por agotamiento en cuadrante radial 1 colonia transformante en agar Mac Conkey, agar EMB y agar triptona soya
- Incubar 37°C/24 h
- Verificar características morfológicas en los medios sólidos selectivos diferenciales
- A partir de las colonias desarrolladas en el agar triptona soya realizar un frotis fijo y tinción de Gram, además de las pruebas bioquímicas IMViC y agar Kligler Hierro

(D) EVALUACIÓN DE *E. coli* w3110 (Cepa parental; Sin transformar)

- Inocular por agotamiento radial en cuadrantes (utiliza microtubo de célula competente sin transformar) en :
Agar luria con ampicilina (100 µg/mL)
Agar triptona soya
Agar Mac Conkey
Agar EMB
- Incubar 37°C / 24 h
- Verificar características morfológicas en los medios sólidos selectivos diferenciales y el agar luria con ampicilina

- A partir de las colonias desarrolladas en el agar triptona soya realizar un frotis fijo y tinción de Gram y las pruebas bioquímicas IMViC y agar Kligler Hierro

(E) Comprobación de fenotipos en *Salmonella* Typhimurium PF430 (*amp^R gfp⁺*; luz UV)

Inocular por agotamiento radial en cuadrantes en

agar luria con ampicilina (100 µg/mL)

Agar triptona soya

Agar Mac Conkey

- Incubar 37°C / 24 h
- Verificar características morfológicas en los medios sólidos selectivos diferenciales y el agar luria con ampicilina
- A partir de las colonias desarrolladas en el agar triptona soya realizar la pruebas bioquímicas agar Kligler Hierro.

ANEXO 1

EFICIENCIA DE TRANSFORMACIÓN

- Utilizando los datos de Densidad Óptica a 600 nm obtenidos de los tubos de Mac Farland (práctica de cuantificación de microorganismos por turbidimetría), calcular la ecuación de la línea recta
- Realizar el despeje necesario para calcular la concentración de *E. coli* W3110 contenidas en el matraz que se sometió al procedimiento de células electrocompetentes.
- Realizar los cálculos de células transformantes contabilizadas y considerando el volumen de inoculación depositado en la caja de agar luria con ampicilina
- Obtener la eficiencia de transformación considerando la concentración del plásmido empleado

APÉNDICE
CONCENTRACIÓN DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS

A) Especificaciones de la electroforesis en gel de agarosa

Buffer para electroforesis TBE:

Solución stock 10X:

Tris base	108 g
ácido bórico	55g
EDTA 0.5M, pH 8.0	40 ml
H ₂ O	aforar a 1000 mL

Solución de trabajo 1X

Tris base	89mM
ácido bórico	89 mM
EDTA	2mM

Solución de bromuro de etidio. **Precaución: compuesto carcinógeno potencial. Debe de ser manipulado con mucho cuidado.**

Solución stock 1000X,	0.5 mg/ml
Bromuro de etidio	50 mg
Agua	100 ml de H ₂ O
Solución de trabajo:	0.5 µg/ml: Diluir la solución stock 1:1000
Proteger de la luz.	

Gel-amortiguador de carga (Loading buffer gel) 10X:

Ficoll 400	20%
Na ₂ EDTA, pH 8.0	0.1M
SDS	10%
Azul de bromofenol	0.25%

B) Composición de los medios empleados

Medio YENB:

Extracto de levadura: 0.75%

Caldo nutritivo: 0.8%

Medio SOC

Triptona: 2%

Extracto de levadura: 0.5%

NaCl: 0.058%

MgSO₄ anhidro: 0.12%

MgCl₂.6H₂O: 0.2%

KCl: 1.25 mM

Glucosa: 20 mM