

DP1-07: Obtención de bacterias *E. coli* bioluminiscentes

Tiempo: 1,5 h

Objetivo: Transformar una cepa competente de *E. coli* con un plásmido conteniendo el gen que codifica para una proteína fluorescente.

Fundamento: La transformación es un proceso por el cual las células captan ADN libre presente en el medio. Para que la transformación tenga lugar, la bacteria tiene que encontrarse en el llamado estado de competencia, que ocurre en determinadas condiciones fisiológicas; en este estado, la bacteria presenta alteraciones en su pared y membrana celulares, que permiten la entrada de ácidos nucleicos en la célula. Para detectar la transformación, el DNA introducido llevará un marcador seleccionable en el medio adecuado.

Las proteínas fluorescentes emiten radiación de una determinada longitud de onda en forma de color cuando son irradiadas con luz UV. Las proteínas fluorescentes se utilizan en diversos campos como la bioquímica, microbiología, ingeniería genética y fisiología, al permitir ver procesos previamente invisibles, como el desarrollo de neuronas, cómo se diseminan las células cancerosas, el desarrollo de enfermedades, el crecimiento de bacterias patogénicas, entre otros.

Materiales:

Placas de Petri	Baño termostático	Hielo
Matraces	Micropipetas	Incubador
Agar	Medio LB	Gradillas

Método:

A. Preparación de placas de Petri con medio LB.

1. Añadir a dos matraces Erlenmeyer 5g Triptona + 2.5g Extracto de levadura + 5g NaCl + 7.55g agar en 500 mL de agua.
2. Autoclavar 20 min.
3. Dejar enfriar y añadir a cada matraz 500 µl antibiótico 0.1mg/mL.
4. Agitar suavemente y añadir 20 mL a cada placa.

B. Transformación de *E. coli* con el plásmido.

1. Añadir 1-500ng del plásmido a 200µl de células competentes.
2. Mantener la mezcla en hielo durante 30 min.
3. Aplicar un choque térmico por incubación a 35°C a la mezcla durante 5 min, seguido de 2 min. de incubación en hielo.
4. Añadir 800µl de medio LB a los 200µl de células y agitar suavemente mediante inversión e incubar durante 1h a 35°C sin agitación.
5. Añade la mezcla a una placa de Petri con antibiótico 0.1 mg/mL e incubar 12-16h a 37°C.

C. Selección de transformantes.

1. Selecciona una colonia que haya crecido en la placa con antibiótico y realiza una siembra en una nueva placa de Petri con antibiótico e incuba 12-16h a 37°C.