

Células Químicamente Competentes

MBL211, 50 reacciones, 5 tubos de 10 reacciones

MBL238, 100 reacciones, 2x (5 tubos de 10 reacciones)

MBL239, 200 reacciones, 4x (5 tubos de 10 reacciones)

MBL210, 500 reacciones, 10x (5 tubos de 10 reacciones)

Versión: 07/2006

Envío y almacenamiento: Las células son enviadas en nieve carbónica. Una vez recibidas, conservarlas a -80°C. Tenga en cuenta que las células competentes son extremadamente sensibles a los cambios de temperatura.

Genotipo: F^- , *gyrA96*, *recA1*, *endA1*, *thi1*, *hsdR17*($r_K^- m_K^+$), *deoR*, *supE44*, Δ (*lacZYA-argF*)*U169* ϕ 80*lacZ* Δ M15

Genotipo descrito: *no contiene episoma F, resistente a ácido nalidixico (Nal^R), mutante de recombinación, mutación en gen endonucleasa lo que favorece mejor calidad de los plásmidos purificados, auxotrofia para tiamina, mecanismo de restricción mutado pero no el de metilación, admite plásmidos de gran tamaño, supresor del codón de parada ocre TAA (se lo salta un % de las veces colocando Gln), delección del gen β -gal lo que permite la selección de colonias blancas/azules en X-Gal.*

Competencia: $>0,5 \times 10^7$ cfu/ μ g DNA plásmido

Aplicaciones: La competencia de las células permite:

- Subclonación de rutina en plásmidos
- Selección de colonias blancas /azules en placas de X-Gal.
- Transformación y purificación de plásmidos

Controles de calidad: Las células competentes son transformadas con 100 y 10 pg de DNA del plásmido pUC18. Las células transformadas se siembran en placas de LB agar con ampicilina 100 μ g/mL y se calcula la eficiencia de transformación.

Las células no transformadas se siembran en dos placas distintas: LB agar con ampicilina y LB agar con kanamicina para confirmar la ausencia de contaminación.

Protocolo estándar modificado

Este protocolo ha sido obtenido de la modificación del protocolo estándar de transformación de células competentes (descongelar las células, añadir DNA, incubar 30 minutos en hielo, choque térmico 2 minutos, hielo 5 minutos y sembrar en medio de selección). El resultado de ambos protocolos es el mismo.

Antes de empezar tener preparado:

- Placas de LB agar + Antibiótico pre-incubadas a 37°C
- Baño a 65°C
- Medio LB (0,5% Extracto levadura, 0,5% NaCl, 1% Triptona)

1. **Descongelar las células en hielo**, aproximadamente 15 minutos antes de comenzar la transformación. ¡No descongelar las células calentando el tubo con las manos!
2. (Opcional) **Inactivar la ligación a 65°C 10 min.** La inactivación de la ligación aumenta dos veces la eficiencia de transformación.
3. **Colocar en hielo** tantos **tubos de 1,5 mL** como transformaciones necesite realizar.
4. **Coger suavemente** con la pipeta **50µL de células competentes** y añadirlas a los tubos anteriores.
5. **Añadir 2-5 µL de la mezcla de ligación** y mezclar dando golpecitos suaves en el fondo del tubo. ¡No mezclar mediante vortex o pipeteo!
6. Incubar en **hielo** durante **5 minutos**.
7. **Sembrar*** en las placas precalentadas a 37°C, en el medio de selección adecuado.
** Cuando la resistencia a seleccionar no es ampicilina, añadir 1 mL de LB, incubar en agitador orbital a 37°C 1 hora. Centrifugar, dejar 50µL de sobrenadante, resuspender las células y sembrar en las placas apropiadas.*
8. **Incubar a 37°C** toda la noche.

Cálculo de la competencia

La eficiencia de transformación se calcula como transformantes por 1 µg de DNA de plásmido (pUC18, 2,7 kb).

Por ejemplo, se hacen varias diluciones de DNA en agua, se transforman las células competentes y se siembra en las placas los 50 µL de la mezcla de transformación. Al día siguiente obtenemos en la dilución de 100pg de DNA alrededor de unas 500 colonias

Como:	$\text{Competencia} = \frac{\text{N}^\circ \text{ colonias} \times 10^6 \text{ pg}/\mu\text{g}}{100 \text{ pg DNA}}$
Entonces	$\text{Competencia} = \frac{500 \times 10^6 \mu\text{g}}{100} = 5 \times 10^6 \text{ colonias}/\mu\text{g DNA}$

Tenga en cuenta que la eficiencia de transformación de mezclas de ligación es de hasta 50 veces menor que la que se obtiene con plásmidos superenrollados como el pUC18.