Generación de bacterias

competentes por CaCl2

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Elaboró: | Revisó: | Autorizó: |
| Nombre: | Dr. Oscar Medina Contreras | Dr. Oscar Medina Contreras | Dra. Jenny Vilchis Gil |
| Firma: |  |  |  |
| Fecha: | 2020-04-08 | 2020-04-08 | 2020-05-01 |

1. **Propósito**

Generar bacterias *E. coli* químicamente competentes de las cepas TOP10 y DH5 por medio de sales.

1. **Alcance**

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que deseen generar bacterias químicamente competentes en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Instituto Nacional de Salud Hospital Infantil de México Federico Gómez.

1. **Políticas de operación, normas y lineamientos**

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Instituto Nacional de Salud Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento.

Los residuos de tipo CRETI (Corrosivas, Reactivas, Explosivas, Toxicas e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052-SEMARNAT- 2005.

1. **Descripción del Protocolo**

* Picar una colonia de bacterias, cepas TOP10 o DH5, y colocar en 15ml de caldo LB (Luria-Bertani) sin antibiótico. Incubar a 37°C/200rpm/12-16hrs.
* Transferir 10ml del crecimiento bacteriano a 200ml de caldo LB estéril sin antibiótico. Incubar a 37°C/ 200rpm y medir la densidad óptica a 600nm cada hora.
* Una vez llegado a la densidad óptica de 0.6 colocar el cultivo bacteriano en tubos falcón de 50ml fríos.
* Centrifugar a 5000rpm/30 minutos/4°C.
* Desechar el sobrenadante y resuspender las bacterias en 10ml de CaCl₂ 0.1M frio.
* Centrifugar 10 minutos/5000rpm/4°C
* Desechar el sobrenadante y resuspender las bacterias en 10ml de CaCl₂ 0.1M frio. Incubar una hora en hielo.
* Centrifugar 5000rpm/10 minutos /4°C y eliminar el sobrenadante.
* Añadir 2ml de CaCl₂ y 20% glicerol frío. Incubar 5 minutos en hielo.
* Preparar alícuotas de 100µl.
* Congelar **inmediatamente** en nitrógeno líquido.
* Almacenar a -70°C.

Nota:

Todo debe realizarse bajo el mechero en condiciones de esterilidad. Todos los reactivos e insumos utilizados deben de ser estériles.

1. **Diagrama de Flujo**
2. **Documentos de Referencia**

Manual de “pENTR™ Directional TOPO Cloning Kits” life technologies

Current Protocols in Molecular Biology, Section 1.2.1, Supplement 59. Frederick M. Ausubel et al. 2003.

1. **Anexos**

|  |  |
| --- | --- |
| **CaCl2** | **11.098g** |
| **H2Od** | **100ml** |

**Preparación de CaCl₂**

**Ajustar pH a 7.5 y esterilizar.**