



Elaborado por:
Dr. Fernando Guzmán Chávez
Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM
PROYECTO DGAPA-PAPIME (PE202023)

PRÁCTICA EXPERIMENTAL

Inducción de proteína recombinante por IPTG en *E. coli*

Desarrollo experimental

1. Tomar 2.5 mL de cultivo saturado de células de *E. coli* cepa BL21 transformadas con el vector *pFGC_T7_OLac_mCherry* o el vector *pFGC_T7_OLac_eGFP* y añadirlos a 20 mL de medio LB-Ampicilina (se agregaron 20 μ L de Ampicilina 100 μ g/mL) contenidos en un matraz estéril.
2. Tomar una alícuota de 1 mL de la mezcla del paso 1 y leerla en el espectrofotómetro a 600 nm contra un blanco de medio LB (la absorbancia debe ser menor a 0.3). Registrar la absorbancia.

Absorbancia inicial	
<i>pFGC_T7_OLac_mCherry</i>	<i>pFGC_T7_OLac_eGFP</i>
0.15	0.18

3. Incubar los tubos con agitación de 200 r.p.m. a 37°C. El cultivo celular debe llegar a una absorbancia entre 0.4-0.6.
4. Para verificar que se llegó a la absorbancia indicada, tomar una alícuota de 1 mL y leerla en el espectrofotómetro a 600 nm.

Tiempo transcurrido	Absorbancia	
	<i>pFGC_T7_OLac_mCherry</i>	<i>pFGC_T7_OLac_eGFP</i>
30 minutos	0.30	0.33
50 minutos	0.48	0.48

5. Al llegar a la absorbancia apropiada, tomar una alícuota de 200 μ L a la que llamaremos **tiempo 0** (contenida en un tubo de microfuga, la cual fue congelada a -70°C).

6. INICIO DE LA INDUCCIÓN. Agregar el IPTG para tener una concentración final en el tubo de 1 mM. El volumen del medio con células puede variar, dependiendo del número de alícuotas que se hayan tomado para determinar que la absorbancia corresponde a 0.4-0.6. Hacer el cálculo tomando en cuenta el volumen final del medio con células.

El volumen inicial fue de 22.5 mL (medio LB-Ampicilina + cultivo saturado de células). Se tomaron de cada cultivo 3 mL para medir la absorbancia (inicial, a los 30 y 50 minutos), por lo que el volumen de medio considerado para calcular la cantidad de IPTG a agregar es de 19.5 mL. El stock de IPTG tiene una concentración de 1 M o 1000 mM.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(1000 \text{ mM IPTG}) V_1 = (1 \text{ mM IPTG})(19.5 \text{ mL de medio})$$

$$V_1 = \frac{(1 \text{ mM IPTG})(19.5 \text{ mL de medio})}{1000 \text{ mM IPTG}}$$

$$V_1 = 0.0195 \text{ mL de IPTG 1 M o } 19.5 \text{ } \mu\text{L de IPTG 1 M}$$

Por lo que para iniciar la inducción se agregaron 19.5 μ L de IPTG 1 M.

7. Incubar nuevamente a 37°C y 200 r.p.m. y tomar alícuotas de 200 μ L cada 30 minutos por 2 horas. La alícuotas se almacenaron a -70°C.

Material Elaborado por: Dr. Fernando Guzmán Chávez y el Dr. José Antonio Pedroza García, los plásmidos fueron exclusivamente creados para esta práctica por el Dr. Fernando Guzmán Chávez. Se agradece el apoyo del **PROYECTO DGAPA-PAPIME (PE202023)** para el desarrollo de este material.