

Instrukcja

E.coli Transformer Kit

Zestaw do przygotowania i transformacji komórek kompetentnych *E.coli*. Metoda chemiczna.

numer katalogowy	wielkość
4020-240	6 x 40 transformacji

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

Gwarancja

Firma A&A Biotechnology udziela gwarancji na niniejszy produkt.

Firma nie gwarantuje poprawnego działania produktu w przypadku:

- odstępstwa od dostarczonego wraz z produktem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzą w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

Spis treści

Skład	3
Dodatkowy sprzęt i odczynniki	3
Niezbędne do przygotowania komórek kompetentnych	3
Niezbędne do transformacji komórek kompetentnych	3
Przygotowanie pożywek	4
LB Agar (LA) (nr kat. 2021-250, 2021-1000)	4
LB Miller (LB) (LB) (nr kat. 2020-250, 2020-1000)	4
Protokół przygotowania komórek kompetentnych	5
Protokół transformacji komórek kompetentnych	6

Skład

	4020-240	przechowywanie
Roztwór S1E	15 ml	+4 °C
Roztwór S2E	15 ml	+4 °C

Zestaw był testowany na pochodnych szczepów *Escherichia coli*: B, K-12.

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne do przygotowania komórek kompetentnych

- szczep *E.coli*
- jałowa pożywka LB Miller (LB) (nr kat. 2020-250, 2020-1000)
- jałowa pożywka LB Agar (LA) (nr kat. 2021-250, 2021-1000)
- sterylne probówki 1,5 ml typu Eppendorf, jałowe probówki 50 ml typu Falcon
- wytrząsarka 37 °C
- wirówka z rotorem do probówek 50 ml

Niezbędne do transformacji komórek kompetentnych

- jałowa pożywka LB Miller (LB) (nr kat. 2020-250, 2020-1000)
- płytki z podłożem selekcyjnym: 1 płytka na 1 transformację
- jałowe probówki 50 ml typu Falcon
- termoblok 37 °C
- wirówka z rotorem do probówek 50 ml

Przygotowanie pożywek

Przygotowanie 1000 ml pożywki.

LB Agar (LA) (nr kat. 2021-250, 2021-1000)

1. Do odpowiedniego naczynia odważyć **40 g** podłoża.
2. Uzupełnić do **1000 ml** jałową wodą i wymieszać.
3. Zawiesinę autoklawować przez **10-20 min** w temp. **121 °C**.
4. Po schłodzeniu do temp. **50-60 °C** ponownie wymieszać przed użyciem.
Informacja. Po rozpuszczeniu i autoklawowaniu końcowe pH=7,0 w temp. 25 °C.

LB Miller (LB) (LB) (nr kat. 2020-250, 2020-1000)

1. Do odpowiedniego naczynia odważyć **25 g** podłoża.
2. Uzupełnić do **1000 ml** jałową wodą i wymieszać.
3. Zawiesinę autoklawować przez **10-20 min** w temp. **121 °C**.
4. Po schłodzeniu do temp. **50-60 °C** ponownie wymieszać przed użyciem.
Informacja. Po rozpuszczeniu i autoklawowaniu końcowe pH=7,0 w temp. 25 °C.

Protokół przygotowania komórek kompetentnych

- Bakterie *Escherichia coli* należy przesiać redukcynicznie na płytkę z podłożem LA
- Płytkę inkubować przez noc w temp. 37 °C
- Roztwory S1 i S2 należy schłodzić w lodzie

1. W **10 ml pożywki LB** (w razie konieczności z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku) zaszczyć pojedynczą kolonię *E.coli* uzyskaną z posiewu redukcynicznego.

Inkubować hodowlę w wytrząsarce przez **noc** w temp. **37 °C**.
2. Do **100 ml** świeżej pożywki **LB** (w razie konieczności z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku) dodać po **1 ml hodowli nocnej**.
3. Inkubować w wytrząsarce przez **2-3 godz.** przy **220-250 RPM** w temp. **37 °C**, do uzyskania $OD_{600}=0,3-0,5$, kiedy bakterie osiągną fazę logarytmicznego wzrostu.
4. Po osiągnięciu odpowiedniego OD_{600} schłodzić hodowlę w **lodzie** przez **15 min**.
5. Wirować hodowlę przez **5 min** przy **3500 RPM** (~1500 x g) w wirówce z rotorem schłodzonym do temp. **+4 °C**. Usunąć supernatant.

Jeżeli supernatant nie jest klarowny, należy zwiększyć prędkość wirowania do 3000 x g i wydłużyć czas wirowania do 10 min.
6. Roztwór **S1E** schłodzić w lodzie. Osad delikatnie zawiesić w **2 ml** roztworu **S1E**.
7. Ostrożnie dodać po **2 ml** roztworu **S2E** i delikatnie wymieszać.
8. Mieszaninę schłodzić w **lodzie** przez **15 min**.
9. Rozporcjować **zawiesinę komórek kompetentnych** po **100 µl** do jałowych probówek o poj. 1,5 ml typu Eppendorf.

Na jedną transformację należy używać 100 µl komórek kompetentnych. Nie zaleca się wielokrotnego zamrażania / rozmrażania komórek kompetentnych.
10. Tak przygotowane komórki kompetentne można użyć bezpośrednio do transformacji (patrz strona 5.) lub zamrozić w temp. **-80 °C** w celu późniejszego użycia.

Bardzo ważne jest, aby komórki kompetentne zamrażać powoli. Nie wolno zamrażać komórek w ciekłym azocie. Zaleca się przechowywanie komórek kompetentnych w pudełku styropianowym w temp. **-80 °C**.

Protokół transformacji komórek kompetentnych

- Przygotować odpowiednią liczbę płytek z podłożem selekcyjnym.
- Przed przystąpieniem do transformacji podłoża powinny mieć temp. pokojową.
- Zaleca się przygotowanie dodatkowej płytki z podłożem selekcyjnym dla kontroli negatywnej transformacji.

1. Do każdej transformacji użyć **100 µl komórek kompetentnych *E.coli*** rozmrożonych w lodzie lub świeżo przygotowanych i schłodzonych w lodzie.
2. Do komórek kompetentnych dodać **plazmidowego DNA** lub **mieszaniny ligacyjnej** i delikatnie wymieszać.
Objętość DNA / mieszaniny ligacyjnej nie powinna być większa niż 20 µl.
3. Mieszaninę DNA i komórek kompetentnych schłodzić **w lodzie przez 15-45 min.**
Podczas inkubacji w lodzie nie należy potrząsać probówką z mieszaniną ani jej mieszać, ponieważ wpływa to na obniżenie efektywności transformacji. Dłuższy czas inkubacji polepsza efektywność transformacji.
4. Przeprowadzić szok cieplny przez **60 s** w temp. **42 °C**.
Można to zrobić również w łaźni ultradźwiękowej. Wówczas mieszaninę wstawiamy na 5-10 s do włączonej łaźni o temp. pokojowej).
5. Mieszaninę transformacyjną schłodzić **w lodzie przez 2 min.**
Jeśli transformowany jest plazmid z opornością na ampicylinę przejść do pkt. 7. protokołu transformacji.
6. Jeśli transformowany jest plazmid bez oporności na ampicylinę (lub z opornością na inny antybiotyk):
 - do mieszaniny należy dodać po **1 ml** podgrzanej do temp. **37 °C** pożywki **LB bez antybiotyku**.
 - inkubować hodowlę przez **45 min** z wytrząsaniem przy **220 RPM** w temp. **37 °C** w celu ekspresji genów odpowiedzialnych za oporność na antybiotyk.
7. Wysiać po **20-200 µl mieszaniny transformacyjnej** na płytkę z podłożem selekcyjnym.
8. Płytki inkubować przez **noc** w temp. **37 °C**.

Średnia wydajność transformacji komórek *E.coli* TOP10F plazmidem pUC19 wynosi 10^7 - 10^8 CFU.



A&A BIOTECHNOLOGY

innovating life science

A&A Biotechnology, ul. Strzelca 40, 80-299 Gdańsk
tel. 883 323 761, 600 776 268
info@aabiotech.com, www.aabiotech.com

