

Instrukcja

JO-FI™ komórki kompetentne

Wysokowydajny szczep do każdego rodzaju klonowania i standardowej transformacji plazmidowym DNA. Stabilna replikacja plazmidów wysokokopijnych.

numer katalogowy	wielkość
1033-20	20 szt.
1033-40	40 szt.

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

Zalety

- Wysoka efektywność transformacji: $5-6 \times 10^9$ cfu/ μ g pUC19 DNA

Opis

Komórki kompetentne JO-FI™ są pochodną szczepu *E. coli* DH5 α ™. Szczep nie jest patogeny i został opracowany do klonowania molekularnego (Biohazard level 1).

Specyfikacja

- Oporność na tetracyklinę (15 μ g/ml) i streptomycynę (25 μ g/ml).
- Represor lacI^q pozwala na ścisłą kontrolę ekspresji z promotorów trc, tac i lac zależną od obecności IPTG.
- Delecja lacZ Δ M15 pozwala na selekcję rekombinowanych klonów w kolorze niebieskim (LA + X-Gal).
- Mutacja w rejonie genu *recA1* zmniejsza częstotliwość występowania niepożądanych rekombinacji podczas klonowania DNA.
- Mutacja w genie *endA1* obniża aktywność endonukleazy I, powoduje niższy poziom degradacji DNA, tym samym zapewniając szybszy transfer plazmidu.
- Mutacja w genie *mcrA* powoduje wydajną transformację metylowanego DNA z preparatów genomowych.
- Mutacja w genie *hsdR* pozwala na wydajną transformację niemetylowanego DNA po amplifikacji PCR.

Skład

	1033-20	1033-40	przechowywanie
JO-FI™ komórki kompetentne	20 x 50 μ l	40 x 50 μ l	-80 °C
pUC19 kontrola DNA (10 pg/ μ l)	50 μ l	50 μ l	od -80 do -20 °C
Pożywka SOC	20 ml	40 ml	-20 °C

Dobre praktyki podczas transformacji

Rozmrażanie

Komórki najlepiej rozmrażać na lodzie, a DNA dodać, gdy tylko zniknie ostatni kawałek lodu w próbówce.

Inkubacja na lodzie

Aby uzyskać maksymalną wydajność transformacji, mieszanina komórek i DNA powinna być inkubowana na lodzie przez minimum 30 min. Krótsza inkubacja zmniejsza wydajność transformacji.

Szok temperaturowy

Zarówno temperatura, jak i czas szoku cieplnego wpływa na transfer plazmidowego DNA do komórek kompetentnych. Należy zwrócić uwagę aby nie przekraczać parametrów podanych w protokole.

Wzrost hodowli

Wzrost hodowli w temperaturze 37 °C przez 60 min skutkuje najlepszą regeneracją komórek oraz ekspresją genów oporności na antybiotyki. Zmniejszenie czasu inkubacji poniżej 45 min powoduje obniżenie wydajności transformacji. Dodatkowo zastosowanie pożywki SOC prowadzi do podwyższenia wydajności transformacji w stosunku do używanej standardowo pożywki LB.

Płytki do transformacji

Do transformacji można używać zarówno płytek ciepłych lub zimnych, mokrych bądź suchych bez znaczącego wpływu na wydajność transformacji. Jednak na płytkach ciepłych i podsuszonych łatwiej rozprowadzić mieszaninę ligacyjną oraz szybszej zauważyć formowanie kolonii bakteryjnych.

Protokół transformacji

1. Rozmrozić komórki kompetentne na lodzie (ok. **10 min**).
2. Dodać **1-5 µl** (1 pg-100 ng) plazmidowego **DNA**.
3. Delikatnie wymieszać przez pipetowanie.
Uwaga! Nie używać worteksu.
4. Inkubować na lodzie przez **30-60 min**.
5. Inkubować przez **30-60 s** w temp. **42 °C**.
6. Inkubować na lodzie przez **5 min**.
7. Dodać **900 µl** pożywki **SOC** (bez antybiotyku). Pożywka powinna być uprzednio ogrzana do temp. pokojowej.
8. Inkubować z wytrząsaniem przez **45-60 min** w temp. **37 °C**.
9. Wirować **2 min** przy **2000-3000 RPM**.
10. Usunąć **800 µl** supernatantu, a resztę wymieszać przez pipetowanie.
11. Przenieść **100 µl** zawiesiny na płytkę LA z odpowiednim antybiotykiem i rozprowadzić na jałową głaszczką po całej powierzchni podłoża.
12. Płytki inkubować:
16 godz. w temp. **37 °C** lub
24-35 godz. w temp. **30 °C** lub
48 godz. w temp. **25 °C**



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

wersja 2023-1

