

1. Komórki kompetentne.

Komórki, które mają zdolność do pobierania DNA (z różnych źródeł) są określane jako "kompetentne". Istnieje kilka technik przygotowywania kompetentnych komórek.

Materiały:

- LB
- 0.1M CaCl_2
- 0.1M CaCl_2 + 15% glicerol

Protokół:

- Zaszczepić 1 ml LB bakterią *E. coli*.
- Umieścić w inkubatorze z wytrząsaniem w temperaturze 37°C i 200 obr.
- **Upewnić się, że wszystkie odczynniki (roztwory CaCl_2) są lodowate lub w temperaturze 4°C.**
- Dodaj 1 ml całonocnej hodowli do 99 ml świeżej pożywki LB (rozcieńczenie 1:100, bez antybiotyków).
- Wstrząsaj inkubuj w temperaturze 37°C i 200 obr/min przez 3-4 godziny lub do momentu, gdy OD osiągnie 0,4.
- Rozdzielić hodowlę do wielu probówek.
- Umieścić w lodzie na 20 minut.
- Wirować w temperaturze 4°C przy 4000 obr/min przez 10 minut.
- Odrzucić supernatant, przechylając probówki nad pojemnikiem na odpady, a następnie odsysając wszelkie pozostałości pożywki.

- Zawiesić każdy osad w lodowatym 0,1M CaCl_2 , inkubować na lodzie przez 30 minut.
- Wirować w temperaturze 4°C przy 4000 obr/min przez 10 minut.
- Odrzucić supernatant i połączyć osady poprzez ponowne zawieszenie w 5 ml lodowatego 0,1M CaCl_2 z 15% glicerolem
- Użyć do dalszej transformacji lub przechowywać w zamrażarce w temperaturze -80°C

2. Transformacja.

Proces transformacji szokiem termicznym z chlorkiem wapnia zachęca komórki bakteryjne do pobierania DNA z otaczającego środowiska.

Materiały:

- LB
- LB agar
- LB agar,
 - kanamycyna (10mg/ml)
10-50ug/ml
 - amplicylina (50mg/ml)
50-100ug/ml
- plasmid
- bakterie E. coli BL21

Protokół:

- Dodać 1-5 μl (10pg-100ng) plazmidu (nie przekraczać 5 μl na 50 μl porcję komórek).
- Inkubować na lodzie przez 30 minut.
- Szok termiczny poprzez umieszczenie w łaźni wodnej o temperaturze 42°C na dokładnie 30 sekund.

- Umieścić komórki na lodzie na 2 minuty.
- Dodać 1 ml wstępnie ogrzanej pożywki LB lub SOC.
- Wstrząsać inkubować 37°C, 200 obr./min, 1 godzinę w celu uzyskania wzrostu.
- Rozprowadzić rozcieńczenia 1:10 i 1:100 wyrosłych kultur na ciepłych płytkach selektywnych i/lub przesiewowych (np. antybiotyk i/lub X-gal).
- Inkubować w temperaturze 37°C przez 12-16 godzin.

Media

- **LB (1000ml)**
10g Trypton
5g Ekstrakt drożdżowy
10g NaCl
Autoklawowanie
- **Agar LB**
dla 1,5% agaru
15g agaru
dla 0,7%
7g agaru
Autoklawowanie

3.Produkcja białka rekombinowanego

Materiały:

- LB
- 20x NPS
- 50x 5052
- 1M MgSO₄

Protokół:

- Dzień 1
Pojedynczą kolonię ze świeżej płytki przenieść sterylnie do 10ml pożywki z odpowiednim antybiotykiem. Wstrząsać w 37°C przez noc.
- Dzień 2
Przygotować sterylnie pożywkę LB-5052 z odpowiednim antybiotykiem. Przenieść 10ml na

100ml pożywki wcześniej
przygotowanej pre-kultury.
Wytrząsać w 37°C przez noc.

Media:

- 20x NPS (1000ml)
66g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
136g KH_2PO_4
142g Na_2PO_4
- 50x 5052 (1000ml)
250g Glicerol
25g Glukoza
100g Laktoza
- 1M MgSO_4
- LB-5052 (100ml)
0,1ml 1M MgSO_4
2ml 50x5052
5ml 20xNPS