

TRANSFORMACE KOMPETENTNÍCH BUNĚK DH5 α TEPLOTNÍM ŠOKEM

1. Kompetentní buňky vyndáme z -80°C . Rozehřejeme buď umístěním na led nebo opatrně v ruce. Buňky se ale nesmí zahřát příliš! Rovněž s buňkami, protože mají poškozenou buněčnou stěnu, zacházíme velmi opatrně – netřeseme s nimi, nevortexujeme, necentrifugujeme. Pokud promícháváme, tak špičkou jejím opatrným kroužením.
2. K 50 μl buněk přidáme 2 μl ligační směsi (až 25 ng DNA na 50 μl buněk, objem DNA nesmí přesáhnout 5% objemu kompetentních buněk), jemně promícháme
4. Inkubujeme 30 minut na ledu
5. Provedeme teplotní šok („heat shock“) umístěním zkumavky s buňkami na 90 sekund do 42°C
6. Zkumavku rychle přemístíme na led a inkubujeme 1-2 minuty.
7. K buňkám přidáme 800-900 μl SOC media nebo LB medium
8. Inkubujeme na třepačce 45-60 minut v 37°C
9. Připravíme kultivační misky s LB médiem a příslušným antibiotikem a případně IPTG a X-Gal:
10. 100 μl buněk rozetřeme sterilní skleněnou hokejkou na povrch media.
11. Zbytek buněk centrifugujeme, většinu supernatantu tj. horní fáze odstraníme a ve zbytku supernatantu (cca 100 μl) resuspendujeme buňky. V této fázi buňky již mají obnovenou buněčnou stěnu, takže nejsou náchylné k mechanickému poškození. Buňky nanese na médium.
12. Inkubujeme misky s buňkami přes noc v 37°C . Obvykle je inkubační doba 12-16 hodin, ne výrazně více, jinak bakterie přerostou.

Příprava kultivačních misek s ampicilinem a IPTG/X-Gal:

K rozeřátému pevnému LB médiu, jehož teplota není vyšší než 65°C (jinak by degradovalo antibiotikum), přidáme ze zásobního roztoku ampicilin do finální koncentrace 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kultivačního média. Pokud máme 0,1g/ml zásobní roztok ampicilinu, na jeden mililitr média přidáváme 1 μl ampicilinu. Médium rozlijeme do misek (cca 25 ml do Petriho misky o průměru 8cm).

V 1,5 ml sterilní zkumavce smísíme 64 μl X-Gal (12,5 mg/ml) a 3,5 μl IPTG (240 mg/ml) ze zásobního roztoku, promícháme a nanese na povrch pevného média a pomocí sterilní skleněné kultivační hokejky rovnoměrně rozetřeme po povrchu média. Sterilitu získáme namočením hokejky do etanolu a jejím krátkým vypálením nad plamenem.