

Instrukcja

E.coli Transformer Express Kit

Zestaw do przygotowania i transformacji komórek kompetentnych *E.coli*. Ulepszona metoda chemiczna pozwalająca na transformację nawet w 1 minutę, bez szoku cieplnego.

numer katalogowy	wielkość
4020-240E	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 wchodzi 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)	4
LB Miller (LB)	4
Protokół przygotowania komórek kompetentnych	5
Protokół transformacji komórek kompetentnych bez szoku cieplnego (1 - 5 minut)	6
Informacje dodatkowe	7

Skład

	4020-240E	przechowywanie
Roztwór S1 Express	15 ml	+4 °C
Roztwór S2 Express	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, sterylne probówki 50 ml typu Falcon
- wytrząsarka 37 °C
- wirówka z rotorem do probówek 50 ml z opcją chłodzenia

Niezbędne do transformacji komórek kompetentnych

- jałowa pożywka SOC: 1 ml na 1 transformację, [nr kat. K-SOC-40, K-SOC-240](#)
- płytki z podłożem selekcyjnym: 1 płytka na 1 transformację
- termoblok 37 °C
- wirówka z rotorem do probówek 1.5 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. Uzpełnić 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)

[nr.kat. 2020-250, 2020-1000](#)

1. Do odpowiedniego naczynia odważyć **25 g** podłoża.
2. Uzpełnić 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 Express** i **S2 Express** należy schłodzić w lodzi.

1. W **10 ml pożywki LB** (w razie konieczności z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku) zaszczerpić pojedynczą kolonię *E.coli* uzyskaną z posiewu redukcijnego. Inkubować hodowlę w wyrzäsarsce przez **noc** w temp. **37 °C**.

2. Do **100 ml** świeżej pożywki **LB** (w razie konieczności z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku) dodać **1 ml hodowli nocnej**.

3. Inkubować w wyrzäsarsce przez **2-3 godz.** przy **220-250 RPM** w temp. **37 °C**, do uzyskania $OD_{600}=0,3-0,5$, kiedy to bakterie osiągną fazę logarytmicznego wzrostu.

Uwaga. Dla niektórych szczepów *E. coli* hodowla w temp. **18 °C - 25°C** pozwala uzyskać lepszą kompetencję.

4. Po osiągnięciu odpowiedniego OD_{600} schłodzić hodowlę w **lodzie** przez **15 min.**

5. Odwirować hodowlę przez **5 min** przy **3500 RPM** (~1500 x g) w wirówce z rotorem schłodzonym do temp. **+4 °C**. Usunąć supernatant.

Uwaga. Jeżeli supernatant nie jest klarowny, należy zwiększyć prędkość wirowania do 3000 x g i wydłużyć czas wirowania do 10 min.

6. Osad delikatnie zawiesić w **2 ml** roztworu **S1 Express**.

7. Ostrożnie dodać po **2 ml** roztworu **S2 Express** i delikatnie wymieszać.

8. Mieszaninę schłodzić w **lodzie** przez **15 min.**

9. Rozprzrcjować **zawiesinę komórek kompetentnych** po **100 µl** do jałowych probówek 1,5 ml typu Eppendorf.

Uwaga. 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 lub zamrozić w temp. **-80 °C** w celu późniejszego użycia.

Uwaga. 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 bez szoku cieplnego (1 - 5 minut)

- Należy przygotować odpowiednią liczbę płytek z podłożem selekcyjnym.
- Przed przystąpieniem do transformacji podłoża powinny mieć temp. pokojową.
- Należy ogrzać pożywkę **SOC** do **37 °C**.
- 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.

Uwaga. Objętość DNA / mieszaniny ligacyjnej nie powinna być większa niż 20 µl.

3. Mieszaninę DNA i komórek kompetentnych schłodzić **w lodzie** przez **1-5 min**.

Uwaga. 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. Jeśli transformowany jest plazmid z opornością na ampicylinę, wysiać mieszaninę transformacyjną na płytkę z ampicyliną.

5. Jeśli transformowany jest plazmid bez oporności na ampicylinę (lub z opornością na inny antybiotyk):

Do mieszaniny należy dodać **1 ml** podgrzanej do temp. **37 °C** pożywki **SOC bez antybiotyku**.

Inkubować hodowlę przez **45 min** z wytrząsaniem przy **220 RPM** w temp. **37 °C** w celu ekspresji genów odpowiedzialnych za oporność na antybiotyki.

6. Zwirować przez **3 min** przy **3500 RPM**, usunąć większość supernatantu. Delikatnie zawiesić osad bakteryjny w pozostałym supernatancie i wysiać na płytkę z podłożem selekcyjnym.

7. Płytki inkubować przez **noc** w temp. **37 °C**.

Informacje dodatkowe

Średnia wydajność transformacji komórek *E.coli* TOP10F' plazmidem pUC19 wynosi 10^7 - 10^8 CFU/ μ g. Aby podnieść wydajność transformacji np. w przypadku skomplikowanego klonowania, zalecamy następujące zmiany w protokole:

- zwiększenie czasu inkubacji w lodzie do **45 min.** (patrz punkt 3. protokołu transformacji komórek kompetentnych)
- następnie szok cieplny **60 s** w temp. **42 °C**
- schłodzenie przez **2 min** w lodzie
- przejście do pkt. 4 [protokołu transformacji komórek kompetentnych](#).



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

