

Végig sterilen kell dolgozni, lehetőleg fülke alatt, láng mellett

TRANSZFORMÁLÁS:

1.nap

- a kompetens sejteket jégen kell kiolvasztani
- hűtött polypropylene csövekbe 50-50 µl-t tenni, és 5-10 µl ligálási közeget hozzátenni, óvatosan szuszpendálni
- 25' jégen áll (*közben: SOB-oldatot szobahőre vagy 37°C-ra melegíteni, glükózt hozzáadni*)
- 2' 42°C hőszokk, (vízfürdőben!)
- 2' jégre visszatenni
- 950 µl előmelegített SOC-ot hozzáadni
- 37°C, 1h 180-200 rpm-n rázatni (*LB-táptalajokat szobahőre tenni*) regenerálás, *egy óránál nem tovább!!*
- 50-100 µl-t széleszteni szobahőmérsékletű LB táptalajra
50 µl-t kimérek a táptalajra, alkoholba mártom a szélesztőkacsot, majd láng mellett leszárítom róla. Várok egy kicsit, amíg lehül és határozott mozdulatokkal szétszélesztem a bacikat.
A kompetens sejteket ellenőrizni kell. 50 µl kompetens sejtet antibiotikum mentes LB agarra széleszttek (ha életképesek másnapra szőnyeggé nőnek) másik 50 µl-t antibiotikus táptalajra mérek. Ha nem volt benne plazmid, és jó az antibiotikum akkor oda nem nő egy telep sem.
- O/N (14-16h) 37°C, termosztát. Fejjel lefelé.
Tovább nem érdemes bent tartani, mert túl nagy telepek lesznek, amiket később nehéz levenni. Másrészt egy idő után lebomlik az antibiotikum és egyéb baktériumok is felnőhetnek. Ha a sejtekre csak később lesz szükség, körbe kell parafilmezni, fóliázni, és hűtőbe tenni. Így akár egy hétig is kibírják.

2.nap

- reggel a plateket a termosztátból kivenni, és körbe-parafilmezni
- estig 4°C
- LB medimot 37°C-ra melegíteni
- bemérem az antibiotikumot
- 10-10 ml LB-t hosszú, hőlépezett kémcsőbe mérni

- 10 µl-es pipettával a felnőtt telepekből 1-1-et leoltani. Ha szélesztőbotot használok akkor azt előtte lángba kell tartani, majd megvárni míg kihül.
- O/N 37°C, 190-220 rpm