

Transformace kompetentních buněk *E. coli*

Příprava kompetentních buněk pro transformaci

Jako recipientních kmenů pro klonování cizorodé DNA se nejčastěji využívá kmenů *E. coli*, které byly mutacemi a metodami genového inženýrství upraveny tak, aby byly schopny s vysokou účinností přijímat externí DNA (většinou plazmidovou), umožňovaly její replikaci a udržovaly její původní strukturu (tj. nezpůsobovaly vyštěpování naklonované DNA) a dovolovaly selekci rekombinantních plazmidů. Podrobná charakteristika těchto kmenů (zejména jejich genotyp) bývá uváděna v katalogích firem a praktických příručkách. Vlastní navození kompetence spočívá v pomnožení buněk příslušného kmene *E. coli* v tekutém živném mediu (např. LB bujonu) do exponenciální fáze růstu, převedení buněk do roztoku CaCl_2 , v němž se buňky ponechají několik hodin, během nichž dojde k jejich vyhladování a určitým změnám v buněčné stěně, umožňujícím přijmout externí DNA. Takto připravené buňky lze použít buď bezprostředně, nebo se převedou do roztoku CaCl_2 s přídavkem glycerolu, v němž je možné buňky zamrazit na -70°C a použít později (takto připravené buňky lze uchovávat několik měsíců nebo i déle).

Organismy: Bakteriální kmen *E. coli* TOP10F'

Materiál: LB bujon, sterilní roztok 0,05 M CaCl_2 , sterilní centrifugační zkumavky, kolorimetr s příslušenstvím, chlazená centrifuga, rotor 6×50 ml

Postup:

1. 20 ml LB bujonu v Erlenmayerově baňce naočkujeme 2 ml bujonové kultury (18 hod/ 37°C) a inkubujeme při 37°C na vodní třepací lázni do hustoty suspenze $\text{OD}_{600} = 0,3$.
2. Buněčnou kulturu vytemperujeme na 0°C v ledové vodní lázni a centrifugujeme 10 min/3000 ot při 4°C . Od této chvíle nesmí teplota překročit 4°C !
3. Sediment buněk resuspendujeme v polovině objemu ledového roztoku CaCl_2 a ponecháme v lednici při 4°C přes noc.
4. Buňky zcentrifugujeme jako v bodě 2) a sediment resuspendujeme ve 2 ml (obecně v 1/10 výchozího objemu kultury) roztoku CaCl_2 .
5. Takto připravené kompetentní buňky lze používat přibližně jeden týden. Pro dlouhodobé uchování se k buněčné suspenzi přidá 1/10 objemu sterilního glycerolu (4°C !) a suspenze se zmrazí na -70°C .

Transformace kompetentních buněk *E. coli* rekombinantní DNA

Organismy: kompetentní buňky *E. coli* TOP10F'

DNA: vektor pBluescript SK-, vektor s inzertem pBluescript + hsp60 5.4

Materiál: ligační směs z úlohy 4, TE pufr, LB bujon, LB agar, ampicilin (roztok 100 mg/ml), IPTG (roztok 0,1 M), X-gal (roztok 20 mg/ml v dimethylformamidu), Petriho misky, sterilní hokejky

Postup:

1. Do mikrozkušavky se napipetuje 200 μ l kompetentních buněk. (V případě, že se používají buňky zmrazené na -70°C , nechají se pozvolna rozmraznout při pokojové teplotě.)
2. Zkušavka se umístí do ledové lázně.
3. Přidá se DNA (obvykle se 1-5 μ l ligační směsi smíchá s TE pufrém do celkového objemu 10 μ l, který se pak přidá ke kompetentním buňkám). Jako kontrolu provádíme vždy transformaci s (i) vektorem bez inzertu, (ii) vektorem s inzertem a (iii) bez DNA (výsev samotných kompetentních buněk na selekční médium).
4. Lehce se promíchá a ponechá v ledové lázni 30 minut.
5. Buňky se podrobí tepelnému šoku ponořením zkušavky na 1 min do vodné lázně 42°C , nebo 3 min 37°C .
6. Zkušavka se přenesse do ledové lázně a přidá se 1 ml LB bujonu.
7. Následuje inkubace 1 hod při 37°C na vodní třepací lázni (exprese genů umožňujících růst na selekčním médiu).
8. Buňky se zcentrifugují 3 min při 6000 ot/min.
9. Supernatant se sleje - většinou však zůstane ve zkušavce asi 100 μ l supernatantu, ve kterém lze buňky resuspendovat.
10. Suspenze se vyseje pomocí bakteriologické hokejky na agarové plotny (LB agar, obsahující 100 μg ampicilinu /ml). Pokud se použijí plotny obsahující navíc X-gal (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a IPTG (20 mM), lze přímo odlišit podle zbarvení kolonie obsahující rekombinantní nebo nerekombinantní plazmid.
11. Plotny se inkubují 24-48 hod při 37°C .

Poznámky:

1. Účinnost transformace kolísá v závislosti na použitém kmeni *E. coli*, na pracovním postupu při přípravě kompetentních buněk a na koncentraci DNA použité k transformaci. Platí, že nejvyšší účinnosti transformace se dosáhne při použití velmi nízkých koncentrací DNA, nepřesahujících 10 ng/jednu transformační směs (optimální konc. je pod 1 ng DNA).
2. Je vhodné sledovat nárůst kolonií na plotnách: někdy se stává, že v okolí transformantů se postupně objevují, dorůstají) drobné kolonie, které nejsou transformanty a nejsou tudíž rezistentní k ampicilinu: rostou v okolí rezistentních kolonií, které ampicilin rozkládají.
3. Vyroslé kolonie je vhodné přepasážovat na čisté plotny a založit klony z jednotlivých nově vyrostlých kolonií.