

Kompetens sejt készítés

1. Antibiotikum mentes lemezre kikenünk a törzsből. 100 μ l steril víz+egy pipettahegynyi TOP-10 sejt. Alaposan elkeverjük majd hozzáadunk még 900 μ l steril vizet. Ebből 100 μ l-t szélesztünk antibiotikum mentes LB lemezre.
2. Másnap 1 telepet 5ml LB-oldatba teszünk és 37 fokon rázatjuk ON (starter kultúra)
3. A következő nap 50ml LB-oldatba 1,5-2ml-t teszünk a starter kultúrából, attól függően, hogy milyen sűrűnek látjuk. Megmérjük az OD600-at. Akkor jó ha az értéke 0,1-0,15.
4. Inkubálás 37 °C rázatva, közben folyamatosan monitorozzuk az OD600-at.
5. OD600=0,35-0,4 növesztjük a bacikat.
6. Előhűtött 50ml-es Falcon csőbe kettéosztjuk a felszaporított bacikat.10 perc inkubálás jégen.
7. Centrifugálás 3000xg 4°C 10 perc
8. Falcononként 10 ml jéghideg 100mM kalcium-klorid-ot teszünk a pelletre és alaposan felszuszpendáljuk.
9. Centrifugálás 3000xg 4 °C 10 perc
10. Falcononként 850 μ l jéghideg 100mM kalcium-klorid-ot teszünk a pelletre és alaposan felszuszpendáljuk
11. Inkubálás 30 perc 4 °C.
12. Falcononként 150 μ l jéghideg glicerint adunk a bacikhoz és alaposan felszuszpendáljuk.
13. 100 μ l-ként előhűtött előre feliratozott eppendorfokba szétosztjuk és -80°C tároljuk.