

COMPONENTES FORNECIDOS

Bactérias *Escherichia coli* eletrocompetentes pht
Meio SOC

100ul/tubo
1ml/tubo

PROTOCOLO DE TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES PHT

Esse produto deve ser manipulado apenas por pessoas capacitadas. Todos os reagentes e componentes devem ser considerados potencialmente perigosos para saúde, devendo-se usar equipamentos de proteção individual, para manipulação dos mesmos. Deve-se evitar o contato com a pele, mucosas e olhos. Todo o protocolo deve ser realizado assepticamente, e utilizando ponteiros e tubos estéreis.

Atenção: Uso restrito para pesquisa laboratorial. Não deve ser utilizado para diagnóstico de doenças humanas ou animais. Não deve ser aplicado em humanos ou animais.

Estocar à -80°C (não estocar em nitrogênio líquido)

DESCRIÇÃO

E. coli eletrocompetente pht apresenta eficiência de transformação superior a 10^6 ufc/ μ g de plasmídeo pUC18. É ideal para clonagem e propagação de plasmídeo, pois permite a replicação estável e em número elevado.

INSTRUÇÕES GERAIS

Manipule com cuidado, as células competentes são sensíveis a alterações de temperatura. Descongele as células no gelo e faça a transformação, tão logo as mesmas sejam descongeladas. **Amostras não utilizadas podem ser recongeladas, porém com significativa perda na eficiência.**

PROTOCOLO DE UTILIZAÇÃO:

Antes da transformação:

- Ligue o eletroporador
- Aqueça os meios de cultura SOC (fornecido com o kit) e LB caldo (se necessário) à temperatura ambiente.
- Aqueça as placas de SOB seletivas pht à temperatura ambiente (utilize 1 ou 2 placas para cada transformação).
- Espalhe X-gal nas placas de SOB pht contendo antibiótico, se necessário.

PROCEDIMENTOS:

Utilize esse protocolo para transformação de células eletrocompetentes pht. **Não utilize para transformação química.**

- 1) Descongele uma amostra de células eletrocompetentes pht para cada transformação, lentamente, no gelo.
- 2) Utilize 40 a 100 µl da suspensão de células (**observe a indicação da cubeta que será utilizada**) e 10ng a 1µg de DNA (o volume de DNA não deve exceder 5% do volume de células). (**É recomendável ressuspender o DNA em água em vez de tampão TE para manter a força iônica necessária à eletroporação eficiente. DNA proveniente de restrição ou ligação deve ser dessalinizado antes de sua utilização para eletroporação**).
- 3) Misture gentilmente (**não pipete**) e deixe no gelo por 1 min
- 4) Transfira a mistura para uma cubeta de eletroporação estéril, previamente gelada, evitando a formação de bolhas e aquecimento das células.
- 5) Enxugue a água de condensação da parte externa da cubeta
- 6) Aplique um pulso elétrico de 25µF, 2,5kV e 200ohm, por 2,5 a 4 ms (**Observe o manual do eletroporador e o volume de células que irá utilizar**)
- 7) Adicione, imediatamente, 1mL do meio de cultura SOC pht (acompanha o kit) pré-aquecido à cubeta.
- 8) Resuspenda as células gentilmente, com o auxílio de uma pipeta “pasteur” estéril.
- 9) Transfira a suspensão para um novo tubo
- 10) Incube à 37°C por 1 hora para permitir a expressão da resistência ao antibiótico. Pode ser submetido à agitação leve.
- 11) Plaqueie por espalhamento na superfície das placas pré-aquecidas de SOB seletivo pht (vendido separadamente) 10 a 200 µl de cada transformante em placas separadas. **Atenção para o antibiótico que irá utilizar: verifique o manual que acompanha o vetor.**
 - Recomenda-se a utilização de mais de um volume para obtenção de colônias isoladas.
 - Recomenda-se plaquear as células não transformadas: em meio não seletivo (para confirmar a viabilidade)
- 12) Mantenha o restante das células transformantes à 4°C, caso seja necessário plaquear volumes diferentes no dia seguinte.
- 13) Inverta as placas e incube overnight à 37°C
- 14) Selecione algumas colônias para análise por prep, PCR ou sequenciamento.

Recomenda-se a utilização de cubetas novas. Para realizar uma nova eletroporação utilize uma nova cubeta. Caso não seja possível, proceda à lavagem rigorosa da mesma com água destilada e etanol 70% imediatamente após sua utilização e esterilize em luz ultravioleta por 30 minutos. Alternativamente, pode-se deixar no álcool 70% overnight e lavar posteriormente como indicado acima.

CÁLCULO DE EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de colônias}}{\text{X pg DNA utilizados}} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{\mu\text{g}} \times \frac{1000\mu\text{l (vol. total)}}{\text{X } \mu\text{l (vol. plaqueado)}} \times \text{fator de diluição}$$

Por exemplo:

Se eu fiz uma transformação utilizando **5 ng de DNA**, eu utilizei **5.000 pg**. Após adicionar o S.O.C. (**volume total de 1000 µl**) Fiz uma diluição **1/10** e **inoculei 50 µl na placa**. Obtive **83 colônias** brancas. Sendo assim:

$$\frac{83 \text{ colônias}}{5.000 \text{ pg}} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{\mu\text{g}} \times \frac{1000\mu\text{l (vol. total)}}{50 \mu\text{l}} \times 10 = 3,3 \times 10^6 \text{ transformantes}/\mu\text{g de DNA}$$

CERTIFICADO DE QUALIDADE

Cada lote de células eletrocompetentes pht é testado quanto à eficiência de transformação utilizando o plasmídeo controle pUC18 e o protocolo acima. As bactérias transformantes são plaqueadas em meio SOB pht acrescido de 100µg/mL de ampicilina, e incubado overnight. A eficiência de transformação deve ser superior à 1×10^5 ufc/µg de DNA. Cada lote é submetido, ainda, ao teste de sensibilidade aos antibióticos canamicina, gentamicina, estreptomicina, ampicilina, tetraciclina e cloranfenicol.

Antibióticos pht disponíveis para comercialização:

Ampicilina	100mg/mL
Canamicina	10mg/mL
Cloranfenicol	15mg/mL
Estreptomicina	50mg/mL
Gentamicina	7mg/mL
Tetraciclina	12,5mg/mL

Meios de cultura pht disponíveis:

- 2XYT sólido (250mL e placas) e caldo (100 e 500mL)
- LB sólido (250mL e placas) e caldo (100 e 500mL)
- SOB (250mL e placas)
- SOC (1, 100 e 500mL)
- Podem ser suplementados com antibióticos, IPTG e X-Gal.

Ligue e faça sua cotação conosco!!

Phoneutria Biotecnologia
Rua Teles de Menezes, 148, Santa Branca
Belo Horizonte - MG
Fone/fax: (31) 3427-6413
www.phoneutria.com.br

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.