**Transformace bakterií, modrobílá selekce pomocí vektoru s rezistencí pro antibiotika**



http://en.wikipedia.org/wiki/Blue\_white\_screen

Úvod

Transformace je proces, při kterém se vpravuje různými způsoby cizí DNA do buňky. U bakterií se nejčastěji používají jako vektory plazmidy, do kterých se předem naligován potřebný produkt. Většinou se tento postup využívá k množení určitých produktů v bakteriální buňce.

V tomto praktickém cvičení budeme transformovat bakterii *Escherichia coli* umělým plazmidem StrataClone PCR Cloning Vector pSC-A-amp/kan, do kterého byl naligován naamplifikovaý gen pro malou podjednotku ribozómu sinice.

Základem postupu jsou chemický kompetentní buňky bakterie *E. coli*, do kterých se teplotním šokem vpraví už natransformovaný vektor. Poté probíhá tzv. modrobílá selekce. V místě plazmidu, kde se liguje PCR produkt se nachází LacZ‘ operon, který, pokud je přerušen PCR produktem, není aktivní. Tudíž není aktivní beta-galaktooxidáza, jejímž substrátem je X-gal a kolonie zůstane bílá. V opačném případě, kdy není naligování PCR produktu úspěšné, dochází k reakci s substrátem (X-gal) a kolonie je zbarvená modře (viz obrázek).

Postup je upraven podle návodu ke StrataClone PCR Cloning Kit a podle bakalářské práce Jahodářová (2012).

Materiál:

* K transformaci PCR produktů do bakterií byl využit StrataClone PCR Cloning Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA), který obsahuje chemicky kompetentní *E. coli* StrataClone SoloPack
* Termoblok
* Sterilní hokejky
* Petriho misky s LB médiem a 100 µg/ml Ampicilinu
* Tekuté LB médium
* 1,5 ml zkumavky
* Pipety
* Špičky
* Termostat

Postup:

Nejprve si přípravíme ligační reakci s použitím následujících reagencií o uvedených objemech, ty se smíchají v 1,5 ml zkumavce a 5 minut se inkubují při pokojové teplotě.

3 μl StrataClone Cloning Buffer

2 μl PCR produktu s koncentrací (50ng/μl)

1 μl StrataClone Vector Mix amp/kan

Další postup

1. Příprava ampicilinovéX-Gal 1,5 % agarózové plotny s Luria Bertani (LB) mediem.

* + - 15g agaru se přidá do 1 l LB media a sterilizuje v autoklávu 30 minut, před přidáním ampicilinu o koncentraci 100 μg/ml se musí médium nechat zchladnout přibližně na 50 °C.
		- Do 85 mm Petriho misek se nalije zhruba 30-35 ml média
		- Agar se nechá ztuhnout
		- Na takto připravené plotny se nalije 20 μl 50 mg/ml X-Galu a rozetře hokejkou, vše se nechá vsáknout při 37 °C po dobu 30 min.

2. Lehká centrifugace centrifugou Hettich Mikro 200 (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Německo) legační reakce. 1 μl legační reakce se napipetuje do 1 zkumavky (StrataGene SoloPack), s kompetentními buňkami, která byla umístěna na ledu. Následuje inkubace na ledu na 20 minut.

3. Teplotní šok po dobu 40-45 s provádíme v termobloku při teplotě 42 °C. Následně se nechají zkumavky na ledu na 2 min.

4. Do transformované ligační reakce se přidá 250 μl LB media. Zkumavky se inkubují minimálně 1,5 h při 37 °C na horizontální třepačce (150 rpm/min) v termostatu.

5. 100 μl transformované kultury se rozetře na agarové plotny.

6. Plotny se inkubují při 37 °C v Biological Termostatu BT 120 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika).

7. Modrobílé selekce kolonií bakterií, u kterých se vyskytuje, nebo nevyskytuje plasmid s vloženou DNA sinice.