

Přílohová část

Popis pracovního postupu:

30.5.2013

Transformační protokol pro DH5α

1. kompetentní buňky velmi pomalu rozmrazovat v ledové vodní lázni
2. ihned po rozmražení jemně poklepat na epinku s kompetentními buňkami a přenést po 50 µl kompetentních buněk do epinek (nejlépe vychlazených)
3. přidat DNA, ^{obvykle 2 µl} poklepat
4. inkubovat 30 minut na ledu
5. dát ohřívat čisté sterilní LB na 37 °C (stačí asi 1 ml na 1 transformaci)
6. heat shock: na 1:45 až 1:50 (necelé 2 minuty) do , 42°C; netřepat!!!
7. ihned po šoku přemístit epinky na 3-5 minut na led
8. do každé epinky přidat 300 µl předeřátého LB, inkubovat 60 minut při 37°C, 600 rpm ^{s amp. (NE karam.)}
9. buňky nasadit na misky: napipetovat, rozlít po misce
10. misky inkubovat 12 až 14 hodin (nejlépe přes noc) při 37°C.

Mutageneze plazmidu pomocí PCR (s polymerázou pfx)

1. Připravíme čerstvý plazmid v koncentraci 20 ng/ul. Kvalita plazmidu je pro úspěch reakce zásadní.
2. Připravíme mutagenézni primery v koncentraci 62,5 ng/ul (ze zásobního roztoku 2500 ng/ul ředíme 40x). *Návrh mutagenézních primerů dle protokolu QuickChange. Kvalita primerů je pro úspěch reakce stěžejní. Primery od IDT jsou ok v běžné kvalitě, ostatní raději nechat přechistit dHPLC nebo jinak.*

3. Nasadíme reakci v objemu 25 ul:

voda	...	do 25 ul (obvykle 10,05 ul)
pufr pfx (2x)	...	5 ul
MgSO ₄ (25 mM)	...	1 ul (1 mM)
dNTP	...	0,75 ul
primery	...	à 1 ul (à 62,5 ng do reakce)
plazmid	...	1 ul (20 ng do reakce)
pfx polymeráza	...	0,2 ul
enhancer (2x)	...	5 ul (nemusí být)

4. Kromě vlastní reakce nasadíme i kontroly – NK – bez plazmidu nebo bez primerů nebo bez pfx polymerázy; případně, máme-li, pozitivní kontrolu (jiný plazmid, jiné primery, co chodí)
5. Průběh reakce: úvodní denaturace – 94 °C: 5 minut; dále 16-18 cyklů (dle typu a rozsahu mutace): 94 °C: 30 s; 55 °C: 1 min; 68 °C: 8 min (obvykle 1 minuta / kb plazmidu; + 1 min navíc jako rezerva); finální extenze: 68 °C, 10 min; případně schlazení reakce na RT
6. Z reakce(i) můžeme odebrat 1 ul směsi jako kontrolu transformace a funkce DpnI

7. K reakcím přidáme 1 ul enzymu DpnI; inkubujeme při 37 °C nejméně jednu hodinu, lze i přes noc (*rozštěpí mateřské řetězce, které jsou methylované; nové řetězce vzniklé při PCR methylované nejsou a DpnI je tedy neštěpí*)
8. 1 ul reakční směsi (nebo i kontrolních směsí použijeme pro transformaci kompetentních bakterií
9. Bakterie vyrostlé z ostrého pokusu po působení DpnI skrínujeme pro přítomnost mutace; většinou sekvenačně – úspěšnost této metody bývá přes 90 %

