

TRASFORMAZIONE BATTERICA (T1)

Per effettuare la trasformazione batterica, ogni studente riceverà: 200 µl di una sospensione di cellule di *E. coli* XL1Blue, rese competenti con un trattamento con CaCl₂ e conservate a -80°C (provetta da 1,5 ml).

- risospendere delicatamente le cellule con piccoli colpi delle dita sulla provetta
- aggiungere alle cellule una delle seguenti componenti:

Provetta	Componente	
1....4	10 µl di miscela di ligazione	Campioni 1.....4
+	10 µl di vettore pGEM (1 ng totale)	controllo positivo
-	10 µl di acqua	controllo negativo (-DNA)

(miscela di ligazione: è il prodotto della reazione di ligazione tra il plasmide pGEM linearizzato con l'enzima di restrizione *EcoRI* e un frammento di DNA genomico, anch'esso tagliato con *EcoRI*).

- incubare in ghiaccio per 10 minuti
- trasferire in bagno termostato a 37°C per 5 minuti (fase di *heat shock*)
- porre per 1' in ghiaccio
- aggiungere sterilmente 800 µl di LB medium senza antibiotico
- incubare in termostato a 37°C per 15 minuti (tempo di espressione del gene *amp^R*)
- nel frattempo, ogni studente aggiungerà ad una piastra di Petri contenente LB agarizzato e ampicillina, 60 µl di una miscela ottenuta aggiungendo a 40 µl di IPGT (20 mg/ml) 20 µl di Xgal (40 mg/ml)
- distribuire il liquido in modo uniforme sulla superficie della piastra, utilizzando l'apposita spatola sterile
- trascorsi i 15 minuti di incubazione delle cellule, ciascun gruppo procede a piastrare rispettivamente:
 - 100 µl di cellule trasformate con la miscela di ligazione
 - 200 µl di cellule trasformate con la miscela di ligazione
 - 100 µl di cellule trasformate con acqua (controllo negativo, senza DNA)
 - 100 µl di cellule trasformate con pGEM (controllo positivo)
- distribuire le cellule in modo uniforme sulla piastra utilizzando l'apposita spatola sterile
- capovolgere le piastre (per evitare che in termostato la condensa cada sulle cellule) e incubarle in termostato a 37°C *over night*

Allestimento di una mini-coltura batterica

Sulle piastre che contengono ampicillina, dopo trasformazione, sono cresciute colonie bianche (plasmide ricombinante) e colonie blu (plasmide non ricombinante).

Per estrarre il DNA plasmidico dalle colonie bianche trasformate ed analizzare la presenza dell'inserito, è necessario prima allestire una mini-coltura batterica in terreno liquido, in modo da ottenere un numero di cellule più elevato.

Allestimento della coltura batterica in una provetta *ependorf*:

- mettere 0,5 ml di terreno di coltura con ampicillina in una provetta *ependorf* da 1,5 ml
- identificare una colonia batterica, sia essa bianca o blu, purché sia singola e ben separata dalle altre colonie
- con uno stuzzicadenti sterile prelevare la colonia batterica, inserendo lo stuzzicadenti verticalmente nella colonia
- stemperare la colonia batterica nel terreno di coltura
- chiudere la *ependorf* e incubare *over night* a 37°C.

Conteggio del numero di colonie batteriche trasformanti

Il conteggio del numero di colonie presenti viene effettuato per la piastra di controllo positivo, in cui era stata piastrata una quantità nota di DNA, cioè 1 ng di pGEM in 1000 µl (200µl di sospensione di cellule + 800µl di LB), di cui avevamo utilizzato solo 100 µl.

- rovesciare la piastra in modo che il coperchio appoggi sul banco di lavoro
- con un pennarello dividere la piastra in 4 settori uguali
- contare il numero di colonie presenti in due settori e fare la media dei due valori
- moltiplicare il valore medio ottenuto per 4 (si ottiene il numero di colonie totali/piastra)
- calcolare l'efficienza di trasformazione:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ colonie} \times \text{fattore di diluizione} \times 1000}{\text{ng DNA}}$$

Il fattore di diluizione nel nostro caso è 10: infatti dalla provetta con pGEM contenente circa 1000 µl di sospensione, ne sono stati piastrati 100 µl, ossia un decimo; dobbiamo quindi moltiplicare per 10 per sapere quante cellule si sarebbero formate con 1 ng di DNA. Poiché l'efficienza di trasformazione è calcolata in base ai microgrammi di DNA utilizzato, è necessario moltiplicare per 1000 (1 µg = 1000 ng).