



Instruktion som kompletterar BioRads laboration med pGLO-transformationen

Instruktionen nedan visar hur laborationen kan göras utan att använda ampicillin. Det ger dessutom möjlighet att träna på att göra en spädningsserie och att renodla bakterier.

Instruktionen nedan utgår från den instruktion som medföljer kittet med pGLU.

I följande koncentreras beskrivningen till enbart plattorna med LB+arabinos. (Det är dessa plattor som är intressanta och visar fluorescensen!)

Gjut plattor med LB+arabinos. Försök få ut så många plattor som möjligt - ta inte mer agar än att lösningen precis täcker petriskålens botten. (Mängden arabinos begränsar ju hur stor volym medium som man kan göra. Ev. kan man köpa arabinos och blanda med LB-medium. Se till att använda L (+) arabinos, den andra stereoisomeren fungerar inte. LB-medium finns också att köpa färdigt som pulver, men kan också blandas från separata komponenter.)

Beskrivningen i kittet följs fram t o m punkt 9 i Transformation Kit - Quick Guide, där LB-broth sätts till bakteriesuspensionen. (Det är knappast möjligt att göra kontrollen med bakteriesuspension utan pGLU om man bara har tillgång till materialet i ett kit eftersom det kräver så många plattor.)

Efter 10 min inkubation med LB-broth görs en spädningsserie med pGLU-bakteriesuspensionen. Späd i 10-steg: 10x, 100x, 1000x och 10000x - fler utspädningssteg behövs knappast. Använd 0,9 % NaCl-lösning vid utspädning.

Tillsätt 100 mikroliter från varje utspädningssteg till var sin platta med LB+arabinos. (Gör gärna dubbelprov om antalet plattor tillåter.) Stryk ut suspensionen med ympnål som beskrivs i instruktionen eller sprid med rackla. Inkubera 1 dygn i värmeskåp 37 grader.

Belys plattorna med en liten UV-lampa. (Mörklägg rummet helt och låt ögonen mörkeradapteras en stund.)

Om du har lyckats med transformationen bör du se enstaka lysande punkter på plattorna. Där utspädningsgraden är liten blir punkterna (kolonierna) mycket små och syns bara om man tittar noga.

Välj ut någon/några av de lysande kolonierna, plocka upp dem med en steril tandpetare eller spetsig ympnål. Stryk ut på en platta med LB+arabinos. Inkubera ett dygn vid 37 grader.

Belys plattan med uv-ljus. Om du lyckats få ett bra renutsryk syns kraftigt lysande bakteriekolonier på plattan.

Kommentarer:

Det går också att räkna transformationsfrekvens om man gör en så stor utspädning av bakteriesuspensionen att man kan räkna enskilda kolonier. Troligen krävs i så fall större utspädningsgrad än 10 000x.

Det kan vara svårt att få en tillräckligt hög transformationsgrad. Om transformationen inte går bra syns inte några lysande kolonier.