

## Preparazione di terreno LB solido (50 ml)

### **Luria-Bertani (LB) medium**

- 1% tryptone
- 0.5% yeast extract
- 0.5% NaCl
- 1.5% bacteriological agar

- 1) Pesare le quantità necessarie a preparare 50 mL di terreno. Aggiungere 50 mL di acqua distillata.
- 2) Attaccare alla bottiglia un pezzetto di nastro da autoclave.
- 3) Sterilizzare in autoclave.

*ti + 20 min + tg  
120 gradi*

## Preparazione delle cellule competenti

- Prelevare in sterilità 5 mL di una coltura di cellule di E. coli DH5a ad OD 600 di 0.3-0.4 e trasferirli in una provetta Falcon da 50 mL sterile.
- Centrifugare 5 minuti a 3000 g a 4°C ed eliminare il surnatante.
- Risospendere dolcemente le cellule in 0.8 ml di buffer 1 e trasferire sotto cappa la sospensione in un eppendorf da 2 mL.
- Incubare in ghiaccio 15 minuti.
- Centrifugare 5 minuti a 3000 g a 4°C.
- Eliminare sotto cappa il surnatante e risospendere le cellule in 400 uL di buffer 2.
- Congelare in N<sub>2</sub> liquido e conservare a -80°C.

## Composizione buffer 1 e buffer 2:

- Buffer 1 (50 ml):
  - RbCl 12 g/l (0.6 g)
  - MnCl<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O 9.9 g/l (0.49 g)
  - 1.5 ml di una soluzione di KAc 1 M a pH 7.5
  - CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O 1.5 g/l (0.075 g)
  - Glicerolo 150 g/l (7.5 g)
  - Si porta a pH 5.8 con HAc, si porta a volume (50 ml) con acqua milliQ e si filtra con una membrana con pori di 0.22 µm sotto cappa.
- Buffer 2 (20 ml):
  - 0.4 ml di una soluzione di MOPS 0.5 M a pH 6.8
  - RbCl 1.2 g/l (0.025 g)
  - CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O 11 g/l (0.22 g)
  - Glicerolo 150 g/l (3 g)
  - Si porta a volume (20 ml) con acqua milliQ e si filtra con una membrana con pori di 0.22 µm sotto cappa.



## Preparazione delle piastre di LB-agar

Sciogliere il terreno LB-agar nel microonde (se già solidificato). Aspettare che si raffreddi (ma non che solidifichi) e sotto cappa aggiungere 100 µg/ml di ampicillina (50 uL dello stock 1000X). Versare il terreno nelle due piastre. Lasciarle aperte sotto cappa fino a che l'agar solidifica, chiuderle e conservarle a 4 °C.