

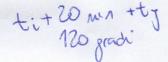
Luria-Bertani (LB) medium

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.



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 a 3000 g a 4°C ed eliminare il surnatante.
- Risospendere dolcemente le cellule in 0.8 ml di <u>buffer 1</u> 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 <u>buffer</u> <u>2</u>.
- Congelare in N_2 liquido e conservare a -80° C.

Composizione buffer 1 e buffer 2:

- <u>Buffer 1</u> (50 ml):
 - o RbCl 12 g/l (0.6 g)
 - o MnCl*4H₂O 9.9 g/l (0.49 g)
 - $_{\odot}$ 1.5 ml di una soluzione di KAc 1 M a pH 7.5
 - \circ CaCl₂*2H₂O 1.5 g/l (0.075 g)
 - o Glicerolo 150 g/l (7.5 g)
 - $_{\odot}$ 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.
- <u>Buffer 2</u> (20 ml):
 - o 0.4 ml di una soluzione di MOPS 0.5 M a pH 6.8
 - o RbCl 1.2 g/l (0.025 g)
 - o CaCl₂*2H₂O 11 g/l (0.22 g)
 - o Glicerolo 150 g/l (3 g)
 - \circ 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 $100~\mu g/ml$ 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.