פרוטוקול טרנספורמציה (וכל מה שכרוך בזה):

**יום 1- הכנת starter:**

* עבור כל דוגמא נכין 3 מ"ל מצע YPD במבחנה רב פעמית
* נגרד עם מקל לתוך המצע במבחנה (**לא** לקחת מעט)
* ניקח מבחנה לביקורת עם מצע בלבד, ונגרד מקל ריק כדי לבדוק שהמקל או המצע לא מזוהמים
* נשאיר ללילה באינקובטור 30 מע"צ. נבדוק שהאינקובטור פועל ומשתקשק.

**יום 2- Back Dilution:**

* עבור כל טרנספורמציה- נכין 5 מ"ל YPD במבחנת 15 מ"ל רגילה, פלוס עוד מבחנה של 5 מ"ל לקונטרול. לא משנה מה המצע שלנו, את ה-back dilution נעשה בכל מקרה ב-YPD.
* נמדוד OD: מוהלים פי 50 את הדוגמא (980 מיקרוליטר YPD ו-20 מיקרוליטר starter), לתוך קיווטה. אם השתמשנו ב-SD אז נמהל את הסטארטר במים ולא ב-YPD.
* נשתמש במים או ב-YPD בתור בלנק לכיול המכשיר (בהתאם למצע בו אנו מוהלים).
* המטרה שלנו לקבל 0.2 OD בנפח של 5 מ"ל, כדי שבסוף נגיע ל-0.6 OD, אז נחשב כמה אנחנו צריכים לקחת מהסטארטר:

מבצעים את החישוב הבא:

0.2 (OD)\*5,000(ul)=1,000 (OD\*ul)

1,000 (OD\*ul)/OD (that we measured\*dilution factor) =X ul (we need to take in 5 ml media)

לרוב פקטור המיהול שלנו יהיה 50 מכיוון שמהלנו פי 50 בקריאה.

אפשרות אחרת: להשתמש ב-back dilution calculator, להכניס OD ראשוני, OD סופי שאליו אנחנו רוצים להגיע (0.6 הוא האופטימלי, עד 0.8 זה בסדר), ואז לחשב כמה נפח צריך לקחת מהדוגמא לתוך X מ"ל. אפשר להכין יותר מ-3 מ"ל (למשל 5 מ"ל).

* נוסיף כמה שיצא בחישוב לכל מבחנה של 5 מ"ל, כולל לקונטרול
* שמים באינקובטור המסתובב (מאוזן) ומחכים 3.5 שעות
* קוראים את הריכוז: ניקח לקריאה 250 מיקרוליטר מהשמרים עם 750 מיקרוליטר של YPD. הריכוז הרצוי הוא 0.6-0.8 OD. לא לשכוח שצריך להכפיל את הריכוז פי 4 (אם מקבלים סביב ה-0.15 זה מעולה, כי אז פי 4 זה יוצא סביב ה-0.6).
* מדליקים את המחמם על 100 מע"צ ומביאים קרח. מחמם שני על 42 מע"צ.
* נשים סלמון sperm ל-5 דק' ב-100 מע"צ
* בתום 5 דק' נעביר לקרח
* נסרכז את כל ה-5 מ"ל בתנאים של 3,000 g, 3 min, בצנטרפוגה הגדולה
* שואבים את הנוזל
* מרחיפים את המשקע עם 1 מ"ל DDW ומעבירים לאפנדורף
* מסרכזים שוב בתנאים של 3 min, 3,000 g
* שואבים את המים
* מרחיפים כל משקע עם הפלסמיד/תוצר PCR שלו (20 מיקרוליטר פר דוגמא)
* מכינים מיקס לפי הטבלה בעמוד הבא:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **10 (11X)** | **5 (6X)** | **1** | **Reagents** |
| 2640 ul | 1440 ul | 240 ul | PEG 300 50% w/v |
| 396 ul | 216 ul | 36 ul | Lithium Acetate (0.1M) |
| 550 ul | 300 ul | 50 ul | Boiled Salmon Sperm-carrier of DNA |
|  |  | 14 | DDW |

* נוסיף את המיקס לשמרים שהכנו קודם 340) מיקרוליטר פר אפנדורף) ונערבב
* נשים ב-42 מע"צ ל-40 דק'
* נעביר לסרכוז (בתנאים של 3,000 g, 3 min)
* שואבים את הנוזל העליון
* Recovery לסלקציה של אנטיביוטיקה: נרחיף עם 1 מ"ל YPD רגיל. ל-G418/Hygro נחכה שעה, ול-NAT נחכה שלוש שעות. ה-recovery מתבצע בשקשוק ב-30 מעלות.
* לזריעה: נרחיף ב-100 מיקרוליטר מים. אם עשינו recovery, אז צנטרפוגה ואז החרפה במים.
* אפשרות נוספת: מרחיפים עם 1 מ"ל מים חדשים וזורעים על צלחת אחת 100 מיקרוליטר (נקרא לזה מהול). כדי להכין גם צלחת מרוכזת יותר- נסרכז שוב, ונרחיף רק ב-100 מ"ל אותו נזרע.

**יום 4- רפליקציה**

לאחר יומיים-3 נצפה לקבל צלחת מלאה. אם אין מושבות בודדות (דשא/שטיח), נצטרך לזרוע מחדש כדי לקבל מושבות בודדות. איך נעשה את זה?

1. שיטת ה-velveting: השיטה הכי ישנה אבל מומלצת ע"י מאיה. מרכיבים את המתקן כך שנוגעים רק בפינות הקטיפה. הקטיפה כלפי מעלה וסוגרים את הבורג. מניחים את הצלחת בעדינות ודופקים ממש בעדינות על הצלחת. אחר כך לוקחים צלחת נקיה ושמים על הקטיפה וטופחים עליה.

ניקיון: שוטפים במים וסבון כמו כביסה ומעמידים במתקן בכיור.

1. שיטת המים: נכין אפנדורף עם 1 מ"ל מים (DDW). נגרד את הצלחת all over the place כדי לתפוס את כל המושבות, נרחיף במים ונזרע 100 מיקרוליטר עם בידים.
2. שיטת הטיפ: נגרד את הצלחת כמו בשיטת המים אבל נזרע הפעם כזריעת בידוד, כאשר בכל נגלה של מריחות נחליף לטיפ חדש.

**יום 5-6- Streaking:**

מחלקים את הצלחת ל-6 (כמו פיצה). עם טיפ, לוקחים 6 מושבות שונות ועושים זריעת בידוד, מחליפים 4 טיפים במהלך זריעת הבידוד.

**יום 7-8- Picking:**

לוקחים מושבה בודדת ועושים קו.

**בדיקה לאמינות טרנספורמציה (check PCR):**

נוכל לבדוק אם המושבות שלנו חיוביות ע"י צילום במיקרוסקופ (אם מדובר על מקטע פלואורסנטי שהכנסנו). בכל מקרה, נרצה לבצע check PCR כדי לדעת אם המקטע נכנס במקום הנכון:

**Check PCR:**

הכנת הטמפלט:

* ניקח כמות גדולה של שמרים ונערבב עם 50ul של NaOH 20mM (לכל 1 מ"ל של NaOH נכניס 10 מיקרוליטר של RNAse).
* נוסיף מבחנת ביקורת (אחת עם NaOH לבד, אחת עם זן WT=BY).
* נכניס ל-PCR לתוכנית NaOH Boil למשך 20 דק'
* נעשה ספין דאון למשך 3 דק' (נשים לב שיש איזון)
* אפשר לשמור במינוס 20 עד להמשך הכנת ה-check PCR

הכנת הדוגמאות ל-PCR:

נכין מיקס ל-PCR, כך שעבור כל דוגמא:

* 5 מיקרוליטר Go Taq Green Mix
* 2.6 מיקרוליטר מים
* 0.2 מיקרוליטר פריימר F (בריכוז 10 מיקרומולר)
* 0.2 מיקרוליטר פריימר R (בריכוז 10 מיקרומולר)

נחלק למבחנות PCR (זה יוצא 8 מיקרוליטר פר מבחנת PCR).

ניקח עם מוליטפיפטור 2 מיקרוליטר טמפלט (כולל הביקורות), לקבלת נפח של 10 מיקרוליטר פר דוגמא.

אם אנחנו בודקים נוקאאוט, נשתמש באקטין כביקורת חיובית. לא נצפה לראות בנדים במה שקיבל את הנוקאאוט, ולכן צריך בנד כלשהו כדי לדעת שהראקציה עבדה. בבדיקה של תיוג חלבון בפלואורופור זה פחות קריטי כי נצפה לקבל בנד אם הטרנספורמציה עבדה.

נריץ על תוכנית Gotaq, שלוקחת שעה וחצי.