

#### COMPONENTES FORNECIDOS

Bactérias <i>Escherichia coli</i> quimiocompetentes pht	200ul/tubo
Meio SOC	1ml/tubo

#### PROTÓCOLO DE TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES PHT

Esse produto deve ser manipulado apenas por pessoas capacitadas. Todos os reagentes e componentes devem ser considerados potencialmente perigosos para saúde, devendo-se usar equipamentos de proteção individual, para manipulação dos mesmos. Deve-se evitar o contato com a pele, mucosas e olhos. Todo o protocolo deve ser realizado assepticamente, e utilizando ponteiros e tubos estéreis.

**Atenção: Uso restrito para pesquisa laboratorial. Não deve ser utilizado para diagnóstico de doenças humanas ou animais. Não deve ser aplicado em humanos ou animais.**

**Estocar à -80°C (não estocar em nitrogênio líquido)**

#### DESCRIÇÃO

*E. coli* quimiocompetente pht apresenta eficiência de transformação maior que  $10^5$  ufc/ $\mu$ g de plasmídeo pUC18. É ideal para clonagem e propagação de plasmídeo, pois permite a replicação estável e em número elevado.

#### INSTRUÇÕES GERAIS

Manipule com cuidado, as células competentes são sensíveis a alterações de temperatura. Descongele as células no gelo e faça a transformação, tão logo as mesmas sejam descongeladas. **Amostras não utilizadas podem ser recongeladas, porém com significativa perda na eficiência.**

#### PROTÓCOLO DE UTILIZAÇÃO:

##### Antes da transformação:

- Aqueça o banho-maria a 42°C
- Aqueça os meios de cultura SOC (fornecido com o kit) e LB caldo (se necessário) à temperatura ambiente.
- Aqueça as placas de SOB seletivas pht à temperatura ambiente (utilize 1 ou 2 placas para cada transformação).
- Espalhe X-gal nas placas de SOB pht contendo antibiótico, se necessário.

##### PROCEDIMENTOS:

Utilize esse protocolo para transformação de células quimiocompetentes pht. **Não utilize para transformação elétrica.**

- 1) Descongele uma amostra de células quimiocompetentes pht para cada transformação, lentamente, no gelo.
- 2) Utilize os 200 $\mu$ l da suspensão de células e 10 a 100ng de DNA (o volume de DNA não deve exceder 5% do volume de células).
- 3) Misture gentilmente (**não pipete**) e deixe no gelo por 10 min
- 4) Dê um choque térmico à 42°C por um minuto e meio
- 5) Volte para o gelo por dois minutos

- 6) Adicione, imediatamente, 1 ml do meio de cultura SOC pht (acompanha o produto) pré-aquecido ao tubo contendo as células.
- 7) Inverta o tubo gentilmente, para homogeneizar a solução.
- 8) Incube à 37°C por 1 hora para permitir a expressão da resistência ao antibiótico. E reconstituição da parede celular.
- 9) Plaqueie por espalhamento na superfície das placas pré-aquecidas de SOB seletivo pht (vendido separadamente) 10 a 200 µl de cada transformante em placas separadas. **Atenção para o antibiótico que irá utilizar: verifique o manual que acompanha o vetor.**
  - Recomenda-se a utilização de mais de um volume para obtenção de colônias isoladas.
- 10) Mantenha o restante das células transformantes à 4°C, caso seja necessário plaquear volumes diferentes no dia seguinte.
- 11) Inverta as placas e incube overnight à 37°C
- 12) Selecione algumas colônias para análise por prep, PCR ou sequenciamento.

#### CÁLCULO DE EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO:

$$\frac{\text{Nº de colônias}}{\text{X pg DNA utilizados}} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{\mu\text{g}} \times \frac{1000 \mu\text{l (vol. total)}}{\text{X } \mu\text{l (vol. plaqueado)}} \times \text{fator de diluição}$$

Por exemplo:

Se eu fiz uma transformação utilizando **5 ng de DNA**, eu utilizei **5.000 pg**. Após adicionar o S.O.C. (**volume total de 1000 µl**) Fiz uma diluição **1/10** e **inoculei 50 µl na placa**. Obtive **83 colônias** brancas. Sendo assim:

$$\frac{83 \text{ colônias}}{5.000 \text{ pg}} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{\mu\text{g}} \times \frac{1000 \mu\text{l (vol. total)}}{50 \mu\text{l}} \times 10 = \mathbf{3,3 \times 10^6 \text{ transformantes}/\mu\text{g de DNA}}$$

#### CERTIFICADO DE QUALIDADE

Cada lote de células quimiocompetentes pht é testado quanto à eficiência de transformação utilizando o plasmídio controle pUC18 e o protocolo acima. As bactérias transformantes são plaqueadas em meio LB ágar acrescido de 100µg/mL de ampicilina, e incubado overnight. A eficiência de transformação deve ser superior à 1x10<sup>6</sup>ufc/µg de DNA. Cada lote é submetido, ainda, ao teste de sensibilidade aos antibióticos canamicina, gentamicina, estreptomicina, ampicilina, tetraciclina e cloranfenicol.

**Antibióticos pht disponíveis para comercialização:**

Ampicilina	100mg/mL
Canamicina	10mg/mL
Cloranfenicol	15mg/mL
Estreptomicina	50mg/mL
Gentamicina	7mg/mL
Tetraciclina	12,5mg/mL

**Meios de cultura pht disponíveis:**

- 2XYT sólido (250mL e placas) e caldo (100 e 500mL)
- LB sólido (250mL e placas) e caldo (100 e 500mL)
- SOB (250mL e placas)
- SOC (1, 100 e 500mL)
- Podem ser suplementados com antibióticos, IPTG e X-Gal.

**Ligue e faça sua cotação conosco!!**

Phoneutria Biotecnologia

Rua Teles de Menezes, 148, Santa Branca Belo Horizonte - MG

Fone/fax: (31) 3427-6413

[www.phoneutria.com.br](http://www.phoneutria.com.br)

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.