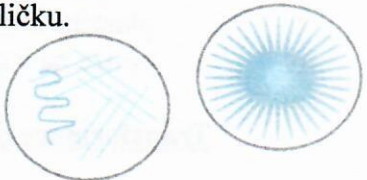


Kultivace bakterií a izolace plazmidu

1. Namíchat LB agar – 35g/1 dH₂O. Dělat to v 500 ml lahvích, kam dám 400ml roztoku. Pořádně rozmíchat! Vyautoklávovat na program tekutiny.
2. **Misky:** Sterilní LB-agar rozehrát v mikrovlnce – 5 min nejsilnější, pak asi 30 min na rozmrazovací stupeň (jinak to vyvře). Rozmíchat případně poslední celistvé kousky a dát do vodní lázně na 45°C. Dále pracujeme ve flow boxu. Na bok je nutné misky popsat „A“ nebo „K“. Nejlepší postup se mi osvědčil tento – je sice nejpomalejší, ale je nej přesnější a hlavně si nenaděláš všude binec z agaru. LB-agar nesmí být horký! Jinak se inaktivuje antibiotikum. Naliju si 45 ml do vysterilizované zkumavky, přidám 45μl ampicilinu nebo 225μl kanamycinu. Toto rozdělím do dvou 90mm Petriho misek. Nechat alespoň 20 minut ve flow boxu s odchýleným víčkem. Pak schováme v pytlíku do lednice.
3. **Ředění antibiotik:** nutné pracovat po celou dobu na ledu!!!
Ampicilin: 1g (=2ml epp v krabíčce) rozmíchat v 10 ml sterilní destilované vodě a rozalikvotovat po 1 ml do 1,5ml epp.
 Při použití po 250μl => 1 maxi kit) a 60 μl => 5 mini kit. Po každém použití napsat na víčko tečku
Kanamycin: 100 mg rozmíchat v 10 ml sterilní destilované vodě a rozalikvotovat po 1 ml do 1,5ml epp.
 Při prvním použití po 240μl => 4 mini kit. Značení a použití jako amp.
4. **Dávka antibiotik:**
Ampicilin z připraveného aliquotu **1μl/1ml LB** agaru/brothu, (fin. koncentrace 100μg/ml)
Kanamycin z připraveného aliquotu **5μl/1ml LB** agaru/brothu (fin. koncentrace 50μg/ml)
5. **Očkování na agar:** pracovat ve flow boxu
 a) z tekutého média/zmrzlého stocku modrou kličkou nanést 10μl média s bakteriemi a zelenými kličkami rozočkovat na 4 části viz obr. Na každou část novou kličku.
 b) z agaru (to co přijde z firmy) 200μl špičkou zajet do viditelného vpichu bakterií a přenést na agar (udělat špičkou 2-3 čáry) a rozočkovat zelenými kličkami

 Vložit na 24 hodin do inkubátoru (bez CO₂).
 Vždy si pak agarovou misku schovám (oblepit parafilmem a dát do lednice) pro případ, že by izolace nevyšla – vyberu si pak jen jinou kolonii, ze které buď rovnou izoluju, nebo ji zoočkuji na novou půdu.
6. **Očkování do LB broth:** pracovat ve vypnutém flow boxu při plameni
 Na **MINI** kit potřebujeme 12 ml média – do 50-100ml Erlenky/baňky, na **MAXI** kit potřebujeme 250 ml médi – po přidání atb rozdělit na dvě přibližně stejné poloviny do 250 ml Erlenek/baněk. Vybereme si hezkou kolonii = nejsou kolem ní mikrosatelity, je větší a je dost daleko od ostatních, abychom nezasáli do sousední kolonie, a zelenou kličkou tuto kolonii přeneseme do tekutého agaru. Jestliže dělám MAXI kit, nejprve si kolonii dám do asi 5 ml LB broth s atb do 50 ml Erlenky a nechám kultivovat alespoň 2 hodiny (může být přes noc) a teprve potom toto rozdělím do dvou připravených 250 ml Erlenek. Kultivace v třepačce na 220 rpm, 37°C alespoň 16 hod.
7. Zamrazit vzorek bakterií! Pracovat ve vypnutém flow boxu při plameni. 300μl 40% glycerolu (je připravený na dlouhou dobu © udržovat sterilní! Připraví se z glycerolu a destilované vody, vyautoklávovat na program tekutiny) + 300μl média s bakteriemi do zamrazovací zkumavky – popsat: pořadové číslo, název, LB+atb, kat.č., datum a iniciály – lze vytisknout štítek. Pořadové číslo napsat vždy i přímo na zkumavku! Zařadit do krabíčky v mrazáku na -80°C.

8. Mini kit dle návodu. Pracovat ve vypnutém flow boxu při plameni do kroku 4. Poté pracovat v zapnutém flow boxu bez plamene, případně lze i mimo flow box.
9. Maxi kit – Pracovat ve vypnutém flow boxu při plameni do kroku 4. Poté pracovat v zapnutém flow boxu bez plamene, případně lze i mimo flow box. Rozdělit 250 ml do 7 50 ml zkumavek – do 1 dát maximálně 40 ml média, jinak dochází v karbonovém rotoru k úniku tekutiny. V jiném typu rotoru lze rozdělit po 45ml. Postupovat dle návodu, navíc jsem dělala centrifugaci na 16000rpmi 1 min před 1. filtrací (mezi krokem 5 a 6)– cucky totiž filtr ucpávají a je obtížné přefiltrovat vše. Peletku na konci rozpipetovat dle velikosti v 150-300μl TE bufferu. Po změření koncentrace je optimální naředit plazmid do koncentrace $\pm 1000 \text{ ng}/\mu\text{l}$ a rozdělit ro minimálně 2 epp.
10. Vyzolovaný plazmid uchovávat v mrazáku na -20°C . Já jsem si vždy oddělila 10μl plazmidu pro případnou kontrolu a na tyto je zvlášť krabička. Na zkumavce musí být název, datem a koncentrace, na víčku je pořadové číslo a případně připsat MAXI. Lze zavést systém štítků s podrobnějším popisem jako u stocků.

Transformace plazmidu

1. Bakterie (Top10, Stbl3, DH5alpha-jsou v -80°C) 30 min rozpouštět na ledu
2. 50μl bakterií + 1μg (optimálně, lze pracovat i s menším množstvím) plazmidu, zmixovat v ruce a dát 30 min na led.
3. Inkubace 45s při 42°C (plotna=termoblok, vodní lázeň) a na 2 min dát zpátky do ledu
4. Přidat 250μl Sock média (udržovat přísně sterilní! Je to malá lahvička, ale pekelně drahá) a dát na 60 min kultivovat do shakeru při 37°C . Jestliže jsme měli k dispozici méně než 400μg plasmidu pro transformaci, přidat jen 150μl Socku.
5. Očkování na agar - 50μl na jeden a 250μl na druhý. Rozhojekovat = tím modrým plastem ve tvaru hokejky rozetřít po celém povrchu. Jestliže máme jen 150μl, očkujeme pouze na jednu miskou.

Transformace plazmidu z papíru

- Celou dobu ve flow boxu

 1. Vystříhnout kolečko a dát do 2 ml epp
 2. Napipetovat 100-200 μl EB/TE solution a párkrát přepipetovat přes papírek
 3. Nechat 1-2 hodiny louhovat papírek v tekutině
 4. Znovu propipetovat přes papírek
 5. Změřit na Nanodropu – výtěžky jsou velmi malé! Např. jen $20 \text{ ng}/\mu\text{l}$, ale i s tím se dá pokračovat v klasické transformaci.
 6. Papírky vždy schovat do lednice pro případ opětovného použití.

Restrikční digest, loading a imaging gelu

- Pokud to po vás někdy někdo bude chtít, tak poproste Honzu Vrbského, ať vám vysvětlí co a jak. Případně se domluvte se mnou – popsat to na papír není snadné...ale zkusím zde napsat aspoň něco

 7. Restrikční digest = kontrola restrikčních míst plasmidu. Je potřeba znát velikost restrikčních fragmentů.
 - a) Do 1,5ml epp smícháme přibližně 500ng plasmidu, pufr (např NCO1), fast digest green buffer a do 10/15μl vody – jako 1. se do epp dá voda, pak green buffer 1μl, pak spočítané množství plasmidu a nakonec 1μl pufru
 - b) Smíchat a na pár vteřin stočit a inkubovat v termobloku 10 min při 37°C

8. Loading go gelu – gel si připravíte dle návodu a vložíte do něj hřeben. Jakmile je gel tuhý, hřeben se vyndá a do vzniklých dírek aplikujete jako 1. žebříček (ladder) a do dalších plasmidy.

Gel úplně ponořit jamkami k – katodě, nastavit 50 min a víc, přibližně 80V (tyto 2 údaje vždy domluvit se zadavatelem – časem budete vědět sami – čas a voltáž záleží na velikosti fragmentů) a spustit RUN

9. Imaging gelu

- a) Vzít vaničku s gelem a vylít vodu
- b) Přenést do ChemiDocu – dát tam jen gel! (ChemiDoc se nahřívá asi 10 min, takže si ho zapněte předem)
- c) Na počítači spustit program Image Lab
 - File → New protocol → Single channel → sekect (zobrazí se gel – posunout tak, aby byl celý vidět) → nuclei acid gel-syber green
 - Run protocol → vidíš gel s bandy – to můžeš upravit (černobílé sluníčko) – invert image display √, highlit saturated pixels x
 - Export – uloží, kam to chci → uloži (export for publications → export)
 - Pokud není dost rozběhnuté – může se gel vrátit do vaničky a nechat ho zase běžet třeba 30 min
 - Sklo na ChemiDoc po práci umýt destilovanou vodou a utřít papírem do sucha