

# Lærervejledning: Kemisk kompetente *E. coli* bakterier

## Introduktion

Denne protokol beskriver hvordan man laver kemisk kompetente *E. coli* bakterier. Når cellekulturen er høstet (efter dag 2 step 3) er det vigtigt at cellerne holdes kolde hele tiden ved at have dem på is. Da der ikke bliver brugt noget antibiotikum er muligheden for kontaminering stor og det er derfor vigtigt at anvende god sterilteknik. Da protokollen kræver megen centrifugering kan man med fordel på dag 2 arbejde i et lige antal rør således at man ikke behøver kontravægte til centrifugen. Udbyttet af protokollen er omkring 28 eppendorfrør med 75 µL kompetente celler i hvert rør - hvilket er nok til at 28 grupper kan lave en biosensor. Protokollen kan uden problemer skaleres op, hvis man ønsker at lave en større mængde kompetente celler. Hvis cellerne opbevares på -20 °C skal de bruges inden for 24 timer. Opbevares de på -80 °C kan de opbevares minimum 6 måneder.

## Materialer

Materialer	Mængde
LB medie	23 mL
100 mM CaCl <sub>2</sub>	11,2 mL
50% glycerol	640 µL
10 ml Falconrør	2 stk
Eppendorfrør	28 stk
<i>E. coli</i> DH5-α - Glycerol stock kommer med biosensor kittet	

*Materialer og mængden til at lave ca. 28 x 75 µL kompetente celler.*

## Procedure

### Dag 1

1. Innokulér *E. coli* i ca. 3 mL LB
  - a. Dette gøres ved at skrabe i overfladen af *E. coli* glycerol stocken med en pipettespids eller en innokuleringsloop
2. Inkubér kulturen over natten på 37 °C med ca. 200 RPM ryst

### Dag 2

1. Sæt CaCl<sub>2</sub>, glycerol og eppendorrør på køl - enten i is eller køleskab.
2. Tilsæt 200 µL af overnatskulturen til 20 mL LB i et falconrør
3. Lad kulturen vokse til en OD<sub>600</sub> på mellem 0.5 og 0.6.
- 4. Fra nu af skal alt være koldt og holdes på is**
5. Flyt halvdelen af kulturen over i et nyt falconrør, således at du nu har to med lige meget volumen. Alt efterfølgende skal gøre for begge rør.
  - a. Noget volumen vil være gået tabt til OD målinger
6. Centrifuger kulturene med 6000 RPM i 5 min ved 0 °C - 4 °C
7. Kasser supernatanten
8. Resuspender forsigtigt pellet i 5 mL kølet CaCl<sub>2</sub>
  - a. Det kan være en fordel resuspendere i et mindre volumen og tilføje det resterende volumen efterfølgende
9. Gentag centrifugering med samme forhold som tidligere
10. Kasser supernatant
11. Resuspender forsigtigt pellet i 800 µL kølet CaCl<sub>2</sub>
12. Tilsæt 320 µL kølet 50% glycerol
13. Fordel cellerne i kølede eppendorfrør 75 µL i hvert rør
14. Opbevar på -20 °C eller -80 °C