

# Preparazione delle cellule competenti XL1Blue

## Composizione delle soluzioni:

### **Buffer 1 (20 ml):**

RbCl (12 g/l)  
MnCl \* 4H<sub>2</sub>O (9.9 g/l)  
Soluzione di KAc 1M a pH 7.5 (30mM)  
CaCl<sub>2</sub> \* 2H<sub>2</sub>O (1.5 g/l)  
Glicerolo (150 g/l)

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.

### **Buffer 2 (10 ml):**

Soluzione di MOPS 0.5 M a pH 6.8 (10mM)  
RbCl (1.2 g/l)  
CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O (11 g/l)  
Glicerolo (150 g/l)

Si porta a volume (20 ml) con acqua milliQ e si filtra con una membrana con pori di 0.22 µm sotto cappa.

## **Procedimento**

- ✓ Fare un inoculo delle cellule di partenza in 40 ml di LB sterile e incubare a 37 °C in agitazione finché l'OD non arriva a 0.35-0.4.
- ✓ Ogni gruppo deve prelevare 5ml di inoculo. (tubi da 15)
- ✓ Centrifugare 5 minuti a 3000 g a 4 °C (centrifuga nel lab a fianco).
- ✓ Eliminare il surnatante e risospendere dolcemente in 1 ml di buffer 1.
- ✓ Trasferire in eppendorf.
- ✓ Lasciare in ghiaccio 15 minuti.
- ✓ Centrifugare 5 minuti a 3000 g a 4 °C. (centrifuga refrigerata)
- ✓ Eliminare il surnatante e risospendere il pellet in 0.5 ml di buffer 2.
- ✓ Trasferire gli 0.5 ml in eppendorf sterili (aliquote da 100 µl).
- ✓ Congelare con N liquido e conservare a -80 °C.

N.B. Le cellule competenti non hanno nessuna resistenza perciò bisogna lavorare in assoluta sterilità.