**Μέθοδος εισαγωγής DNA σε E. coli.**

H ίδια μέθοδος, με κατάλληλες τροποποιήσεις μπορεί να χρησιμοποιηθή και για άλλα βακτηρίδια με λεπτο κυτταρικό περίβλημα.

1. Τα βακτηριακά κύτταρα καλλιεργούνται στο κατάλληλο υγρό θρεπτικό μέσον έως πυκνότητος 5x107 κύτταρα ανά ml θρεπτικού διαλύματος. *Εάν πρόκειται για E. coli, απαιτούνται περίπου 2.5 h έως να επιτευχθή αυτή η πυκνότητα. Τότε η καλλιέργεια έχει απορόφηση 0.2 στα 550nm (OD550=0.2), εάν είναι ποικιλία rec+ ή OD550=0.5,εάν είναι ποικιλία rec- (DH1, HB101).*

2. Τα κύτταρα καθιζάνουν με φυγοκέντρηση επί 5΄ στην κατάλληλη για κάθε βακτηρίδιο. *Για την E. coli χρησιμοποιούνται 3.000-4.000xg.*

3. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 1/5 του αρχικού όγκου της καλλιέργειας, 0o C, 50mM CaCl2 και φυγοκεντρούνται ξανά στην ίδια ταχύτητα και χρόνο.*Η δεύτερη αυτή φυγοκέντρηση αποσκοπεί στο να εκπλύνει όσο το δυνατόν τα απομένοντα ίχνη του καλλιεργητικού μέσου.*

4. Το νέο ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 1/10-1/20 του αρχικού όγκου της καλλιέργειας 0o C, 50 mM CaCl2.

*Για μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα πρόσληψης DNA , μπορεί στο διάλυμα του ασβεστίου να προστεθεί στο στάδιο αυτό και RbCl σε συγκέντρωση 10-100 mM. Αναλόγως του βακτηριδίου, κάποιον ρόλο παίζει και το pH του διαλύματος. Τιμές pH=5.8-6.5 επιτυγχάνονται με ρυθμιστικά διαλύματα 10 mM PIPES ή MOPS, ή οξικό νάτριο-οξικό οξύ, ενώ για pH=8 μπορεί να χρησιμοποιηθή Tris. Για ορισμένα κύτταρα, περιέχεται και γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 10-15% v/v. Αντί του Ca++, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο Rb+ ή Mn++, ή K+.*

5. Τα κύτταρα επαφίονται επί 5΄ στους 0-4o C.

*Κατά τον χρόνο αυτό καθίστανται ικανά να προσλάβουν εξωτερικά τεμάχια DNA και ονομάζονται ικανά κύτταρα. Μπορούν να αποθηκευθούν επί 1-2 ημέρες στους 4οC χωρίς να χάσουν την ικανότητα πρόσληψης DNA. Τουναντίον μάλιστα, η ικανότητα πρόσληψης DNA αυξάνει 4-6 φορές μετά από 24 h στους 4 oC. Μπορούν επίσης να αποθηκευθούν για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (>6 μήνες) στους -70 oC σε μικρές ποσότητες των 100μl, διατηρώντας την ικανότητα πρόσληψης DNA.*

6. Σε 100μl ικανών κυττάρων προστίθενται 1-200 ng DNA. To DNA περιέχεται σε 1-100 μl διαλύματος TE ή νερό ή μπορεί ακόμη, εάν ο όγκος του είναι μικρός (<0.5% του όγκου του διαλύματος των ικανών κυττάρων), να προέρχεται κατ΄ευθείαν από μια αντίδραση, όπως μία αντίδραση λιγάσης, χωρίς προηγούμενο καθαρισμό.

7. Το παρασκεύασμα επαφίεται στούς 0-4οC επί 10-30΄.

*Κατά το στάδιο αυτό η πρόσληψη DNA βελτιώνεται εάν προστεθεί και DMSO σε ποσότητα 3-5 μl ανά 100 μl ικανών κυττάρων. Το DMSO δεν πρέπει να είναι οξειδωμένο διότι τότε παρεμποδίζει την πρόσληψη DNA.*

8. Τα κύτταρα μεταφέρονται στους 42οC επί 1-2΄ ή στους 43-44οC επί 30΄΄και ψύχεται απότομα σε πάγο επί 2΄.

*Η απότομη αυτή θέρμανση και ψύξη διευκολύνει την εισαγωγή DNA. 2-10% των κυττάρων είναι ικανά να προσλάβουν DNA. Κατά μέσον όρο προσλαμβάνεται 1 μόριο DNA στα 10.000. Η αναλογία αυτή εξαρτάται από την συγκέντρωση του DNA στο διάλυμα των ικανών κυττάρων και για την E. coli eίναι η μέγιστη εάν το DNA είναι περίπου 10 ng /100 μl ικανών κυττάρων. Επίσης φθάνει την μέγιστη τιμή εάν ο προστιθέμενος στα κύτταρα όγκος του DNA δεν υπερβαίνει το 10%. Για περαιτέρω βελτίωση της απόδοσης, του σταδίου αυτού μπορεί να προηγηθή απότομη ψύξη σε μίγμα ξηρού πάγου/αιθανόλης (-55 οC) επί 30΄΄-1΄.*

9. Στα κύτταρα προστίθεται θρεπτικό μέσον (LB ή SOC για την E. coli) και επαφίονται στην κατάλληλη θερμοκρασία (37οC για την E. coli) επί 1 h χωρίς ανακίνηση, ώστε να ανακάμψουν από την διαδικασία και τυχόν γονίδια εμπλεκόμενα στην διαδικασία επιλογής των κυττάρων πού προσέλαβον DNA, όπως γονίδια για αντίσταση σε αντιβιοτικά, ευρισκόμενα επί του εισαχθέντος DNA, να εκφρασθούν επαρκώς πρίν την μεταφορά των κυτττάρων σε θρεπτικά μέσα

*Εάν το γονίδιο επιλογής προσδίδει αντίσταση στην τετρακυκλίνη, επαρκεί για την E. coli 1/2 h. Για έκφραση αντίστασης στην καναμυκίνη χρειάζεται 1 h.*

10. Τα κύτταρα μεταφέρονται και επιστρώνονται σε θρεπτικά μέσα με άγαρ, περιέχοντα τον παράγοντα επιλογής (αντιβιοτικό ή άλλον) και καλλιεργούνται υπό τις κατάλληλες για κάθε είδος βακτηρίου συνθήκες.

*Μόνο τα βακτηριακά κύτταρα πού προσέλαβαν το DNA το φέρον γονίδια που δίνουν στο κύτταρο ικανότητα επιβίωσης σε θρεπτικά μέσα με τον παράγοντα επιλογής, θα επιβιώσουν και θα δώσουν αποικίες.*