

Herstellung von chemisch kompetenten Zellen und anschließende Transformation

Dieses Protokoll dient zur Herstellung von chemisch kompetenten Zellen mit Kalziumchlorid (CaCl_2), welche für eine Transformation mittels Hitzeschock verwendet werden können. Mithilfe dieser Anleitung sollen möglichst ideale Laborzustände erreicht werden um eine gute Qualität von kompetente Zellen zu produzieren (Transformationseffizienz von 10^5 - 10^7 cfu/ μg DNA; colony forming unit = Kolonien) und damit die Transformation erfolgreich verläuft. Abweichungen davon zeigen sich durch massive Reduktion der Transformationsrate, also eine starke Absenkung der Qualität der kompetenten Zellen.

Bei guter mikrobiologischer Praxis und Routine werden die einzelnen Schritte simpler und es gibt genug Biohacks und DIYbio-Abkürzungen, die ebenso zu einer erfolgreichen Transformation führen. Jedoch wollen wir hiermit ein Protokoll veröffentlichen, womit die Transformation auf jeden Fall gelingt. Je näher man am idealen Arbeitsprozess bleibt, desto besser sind die Chancen einer erfolgreichen Transformation, aber auch wir haben schon öfters mit „quick & dirty“ transformiert, richtige Biohacker halt ;) Vielleicht sammeln wir diese Erfahrungen auch mal zusammen zu einer „DIY Biohacker- quick & dirty“ Variante.

Geräte:

- Kühlschrank (4°C)
- Gefrierschrank (-25°C) (wer einen -80°C Freezer hat → Besser!)
- Inkubator (37°C)
- Impföse und Bunsenbrenner oder sterile Zahnstocher
- Sterile Pipettenspitzen (1 mL & 200 μL)
- Photometer (OD_{600}) und Küvetten
- Zentrifuge für 4000 rpm inklusive Rotoreinsätze
- 15 mL Tubes oder geeignete 15 mL Gefäße für den Schwingrotor
- Kühlzentrifuge (4°C) für 14.000 rpm
- (Richtiges Handling bei Zentrifugen beachten! Einsätze austarieren und ausbalancieren!)
- Styroporbox
- Crash Eis oder eisgekühlte Kühlelemente
- 1,5 mL Mikroreaktionsgefäße (=Eppis)
- Eppi Gestell (Rack)
- Wasserbad mit Thermometer (inklusive Schwimmer für Eppis)

Medien:

- LB Medium & Agar mit Selektionsmarker/Antibiotikum (siehe OLGA – Protokolle – Nährmedien mischen)
- 20 mL LB in 50 mL Kulturkolben (mit Aludeckel): 1x pro Stamm + 1x Sterilkontrolle pro Medium für die Vorkultur (VK)
- 200 mL LB in 500 mL (Schüttel-) Kolben: 1x pro Stamm für Hauptkultur (HK)
- LB Agarplatten: 4 Stück pro Stamm
- LB Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum (Selektionsplatte): 2 Stück für 1x transformieren + 2 für die Kontrollen

Lösungen:

- 50 mL CaCl_2 (0,1 mol/L) → Einsatz bei Raumtemperatur (RT)
- 50 mL CaCl_2 (0,1 mol/L) → Einsatz bei 4°C / Eiskalt
- 50 mL CaCl_2 (0,1 mol/L) + Glycerol (30%) → 35 mL 0,1 M CaCl_2 + 15 mL Glycerol (99%)

Plasmid-DNA:

- 1-10 ng pro Transformation von Plasmid DNA, mit dem die Bakterien transformiert werden sollen → entsprechende Selektionsmarker (z.B. Antibiotika) in den Medien verwenden.

Tag 1: Vorbereitung– Arbeitszeit: ~3 h

- LB Medium mischen, Agar-Agar einwiegen und das Medium in die entsprechenden Volumina aufteilen. Autoklavieren (siehe OLGA – Protokolle – Steril Autoklavieren).
- CaCl_2 Lösungen herstellen, autoklavieren und im Kühlschrank vorkühlen, mit Ausnahme der Lösung für RT.
- Agar unter 50°C abkühlen lassen (handwarm) und entsprechendes Antibiotikum hinzugeben.

Tip! Ampicillin (Amp) wird sehr häufig als Antibiotikum verwendet aufgrund der Plasmid vermittelten Amp-Resistenz (Selektionsmarker). Dieses ist UV-sensibel und muss lichtgeschützt getrocknet und gelagert werden.

- LB Agarplatten gießen und trocknen lassen → 1 von den 4 Platten gleich verwenden.
- Einzelkolonie auf LB Agar ausstreichen (z.B. *E. coli* K12), bei 37°C über Nacht inkubieren.
- Crash Eis vorbereiten oder Kühlelemente im Gefrierfach (-25°C) einfrieren.

Tag 2: Vorbereitung – Arbeitszeit: ~ 15 min

- Die bei 37°C über Nacht inkubierte Platte aus dem Inkubator nehmen und eine Einzelkultur mit der abgeflamten Impföse oder einem sterilen Zahnstocher entnehmen. Damit das LB Medium im Kulturkolben (20 mL) für die VK beimpfen/inokulieren. Über Nacht (mind. 8h) bei 37°C mit Sauerstoffzufuhr (Schütteln) inkubieren (dadurch ist VK bei *E. coli* = over night culture (ONC))
- Steril Kontrolle nicht vergessen (LB ohne Bakterium).
- Nicht notwendig, aber man könnte nun eine Selektionsplatte austesten indem man eine frische Einzelkultur des zu transformierenden Stammes ohne Selektionsmarker (z.B. Resistenz gegen Ampicillin) darauf ausstreicht und bei 37°C über Nacht inkubiert. Es dürfen keine Kolonien darauf wachsen (es gibt zwar eine Negativkontrolle bei der Transformation, welcher der exakt gleiche Schritt ist, aber hier findet man einen potenziellen Fehler viel früher, wenn man sich unsicher bei der Antibiotikum-Zugabe war).

Tag 3: Herstellung von chemisch kompetenten Zellen – Arbeitszeit: 4-5 h

1. Optische Dichte der VK photometrisch bestimmen (OD_{600} : ~ 3).
2. Die HK (200 mL) mit der VK beimpfen, sodass eine OD_{600} von ~0,07 erreicht wird.
3. Die inokulierte HK wird bei 37°C unter ständiger Sauerstoffzufuhr (Schütteln) bis zu einer OD_{600} von 0,7 inkubiert (~2-3h bei optimalen Wachstumsbedingungen).

Tipp! OD₆₀₀ = Konzentration, daher Formel zum Verdünnen von Lösungen verwenden:

$$c1 * V1 = c2 * V2$$

c1 ... OD₆₀₀ der VK, photometrisch gemessen

V1 ... Volumen des Inokulum der VK

c2 ... OD der HK, gewünschter Idealwert

V2 ... Volumen der HK

Bsp: OD₆₀₀ einer ONC hat den Wert von 3, als gewünschte Start OD₆₀₀ von 200 mL Hauptkultur nimmt man 0,07. Volumen des Inokulums ist unbekannt und soll berechnet werden.

$$3 * X = 0,07 * 200 \text{ mL} \rightarrow X = 0,07 * 200 \text{ mL} / 3$$

$$X = 4,667 \text{ mL der VK in HK}$$

Warum? Die Kultur soll in einem optimalen Zustand sein, da das Einfrieren und die Hitzeschock Transformation großen Stress auf die Bakterienzellen ausüben. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 ist eine *E. coli* Kultur in der „Exponentiellen Phase“ der Wachstumskurve. Es befinden sich dann wenig alte Zellen, sondern hauptsächlich frische, vitale Bakterien in dieser Kultur, welche besser mit dem nachfolgenden Stress umgehen können und überleben. *E. coli* hat eine Generationszeit (=Verdopplung der Zellen) von ~ 20 min bei optimalen Wachstumsbedingungen (mesophile Temperatur, Aerob), d.h. alle 20 min wird sich die OD₆₀₀ (Start mit 0,07) verdoppeln. Unter realen Bedingungen wird nach 2-3 h die OD₆₀₀ von 0,7 erreicht sein (nach 2h OD₆₀₀ messen).

4. Während dem Wachstum Kühlzentrifuge (Eppis) vorkühlen auf 4°C. Eppis, Racks und Spitzen zum Vorkühlen in den Kühlschrank.
5. Nach Erreichen der OD₆₀₀ von 0,7 werden die Zellen der HK geerntet. Dabei werden die 15 mL Tubes mit der HK gleichmäßig befüllt und die Zellen für 10 min bei 4000 rpm (max. 4000 G) im großen Schwingrotor abzentrifugiert (in unseren Rotor passen 4x4 Tubes pro Runde). Der Überstand wird verworfen, das erhaltene Pellet wird 2x mit 0,1 M CaCl₂ (RT) gewaschen (waschen = Pellet in 1-2 mL resuspendiert & erneut zentrifugiert).
6. Vorbereitung der Kühlkette. Styroporbox mit Labor Eis oder eisgekühlten Kühlelementen befüllen und von nun an nur mehr eiskalte CaCl₂ Lösungen, Eppis, Racks und Spitzen verwenden. Die Zellen dürfen ab dem nächsten Arbeitsschritt nicht mehr warm werden!
7. Nach dem Waschen das Pellet in 1ml eiskalter CaCl₂ (0,1 M) lösen und in vorgekühlte 1,5 mL Eppis überführen.
8. In der Kühlzentrifuge bei 4°C Eppis für 10 min bei 14.000 rpm zentrifugieren. Überstand verwerfen. Pellet erneut in 1ml eiskalter CaCl₂ (0,1 M) lösen, danach 30 min kalt inkubieren (auf Eis oder 4°C). Danach erneut bei 4°C für 10 min bei 14.000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen.
9. Dieses Pellet nun in 1ml eiskalter CaCl₂ + Glycerol (30%) lösen und zu 100 µL in kalte Eppis aliquotiert/aufgeteilt. Diese Aliquote sind nun „ready for transformation“ oder können nun schockgefroren und bei -25°C gelagert werden (siehe Protokolle – Lagerung von Mikroorganismen - Schockgefrieren)

Tipp!

Wenn man sich dazu entschließt die Aliquote sofort einzufrieren einfriert, „opfert“ man 2-3 Aliquote um zu testen, ob die Zellen das Schockgefrieren und das langsame Auftauen auf Eis überleben (ausplattieren) und überhaupt transformationsfähig sind, sprich den Hitzeschock überleben und wachsen (siehe unten Transformation, dann kann man auch gleich die optimale Zeit beim Hitzeschock für diesen Stamm austesten: 45 sec – 2 min). Dann ist man mit den kompetenten Zellen auf der sicheren Seite ;)

Außerdem empfiehlt es sich, die Kompetenz der Charge in Form der Transformationsrate zu ermitteln. Von chemisch kompetenten Zellen kann man sich eine Transformationsrate von $10^6 - 10^8$ Kolonien pro μg eingesetzter DNA erwarten. Der Rekord im OLGA liegt derzeit bei einer Transformationsrate von $1,57 * 10^7$ cfu/ μg DNA.

In der Molekularbiologie ist weniger meist mehr, denn chemisch kompetente Zellen sind empfindlich gegenüber großen Mengen von DNA (max. 100 ng DNA).

Tag 3/ + X: Transformation mit chemisch kompetenten Zellen – Arbeitszeit: ~ 90 min

1. Das Wasserbad wird auf exakt 42°C vorgeheizt.
2. Je ein 100 μL Aliquot mit chemisch kompetenten Zellen pro Transformation auf Eis gestellt (langsam auftauen oder von Herstellung gleich weiterverwendet).
3. Plasmid-DNA (Volumen 1-10 μL , Menge 10-100 ng) wird zu den Zellen hinzu pipettiert, sanft gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert.
4. Nun der Hitzeschock. Die Zellen werden für 2 min in das 42°C warme Wasserbad gestellt. Danach werden die Zellen sofort wieder auf Eis oder in 4°C gestellt und kurz in Ruhe gelassen (max. 5 min).
5. Zu den Zellen wird vorsichtig 900 μL LB (RT & noch ohne Antibiotikum) pipettiert. Diese müssen sich nun für 45 min bei 37°C regenerieren (in dieser Zeit sollen sich Zellen vom Hitzeschock erholen und nicht wachsen, daher auf die Zeit achten → sonst können Plasmide aufgrund des fehlenden Selektionsdrucks verloren gehen).
6. Danach werden 100 μL der Zellsuspension auf eine Platte LB + Antibiotikum (Selektionsplatte) ausplattiert. Die restliche Suspension wird bei 14.000 rpm in der (Tisch-)Zentrifuge für 5 min pelletiert, Überstand verworfen, das Pellet in 100 μL LB resuspendiert und gänzlich auf einer weiteren Selektionsplatte ausplattiert.
7. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Tipp! Kontrollen nicht vergessen, Positiv und Negativ!

Als positive Transformationskontrolle dienen 100 ng eines bekannten Plasmids (z.B. pUC19) im Kontrollansatz.

Als negative Transformationskontrolle wird keine DNA hinzugefügt.

Auch die Kontrollen werden ausplattiert. Auf der Platte mit der Positivkontrolle muss ein Wachstum vorhanden sein (sonst keine erfolgreiche Transformation: Fehler bei Herstellung; Kühlkette; Einfrieren und Auftauen nicht überlebt; Hitzeschock zu heiß oder zu lange).

Auf der Platte mit der Negativkontrolle darf kein Wachstum sein (sonst keine Selektion: Antibiotikum nicht wirksam; in zu heißem Agar gelöst, soll handwarm sein; zu geringe Menge; falsches Antibiotikum).

Tag 4: Auswertung am nächsten Tag – Arbeitszeit: ~ 30 min

Positivkontrolle: sichtbare Kolonien

Negativkontrolle: keine Kolonien

Plasmid-DNA: hoffentlich Kolonien! → Berechnung der Transformationseffizienz möglich

Tipp!

Wenn Kolonien auf der Selektionsplatte wachsen, diese schnell auf frische Selektionsplatten überstreichen, da sich nach einiger Zeit sogenannte „Satellitenkolonien“ um einen Transformanten bilden und damit verwechselt werden können. Diese kleineren Nachzügler wachsen dann, wenn eine erfolgreich transformierte Zelle eine Kolonie ausbildet, welche aufgrund der neu vermittelten Resistenz das Antibiotikum in deren Umgebung unschädlich macht. Dadurch beginnen die nicht-transformierten Zellen, welche überlebt haben aber aufgrund des Antibiotikums sich nicht vermehren konnten, nun zu wachsen.

Eine erfolgreiche Transformation (=Wachstum auf Selektionsplatte) bedeutet nicht automatisch ein erfolgreicher Transformant. Die Ausbildung einer Resistenz gegenüber dem Antibiotikum wird zwar über das Plasmid vermittelt, aber wir können nicht behaupten, dass unser „Gene of Interest“ sich intakt auf dem Plasmid befindet oder etwas über die Qualität des Plasmids aussagen (Ringschluss oder Ringbruch, Verlust von Gensegmenten, sprich Größe und Konformation des Plasmids). Dafür kann man nun aus dem Transformanten das Plasmid isolieren (siehe Protokolle – Plasmid Mini-Präp) und per Agarose-Gelelektrophorese (siehe Protokolle – Agarose Gelelektrophorese) deren Größe und Form bestimmen oder zum Sequenzieren schicken (siehe Protokolle – DNA-Sequenzierung) um die exakte Basenabfolge im Plasmid (z.B. für das bestimmte Gen) zu erhalten.