

## **Chemisch kompetente Zellen und Transformation**

Diese Anleitung ist so genau wie möglich, um die idealen Laborzustände für das OLGA zu erreichen, damit gute kompetente Zellen produziert werden und die chemische Transformation mittels Hitzeschock so gut wie möglich abläuft. Abweichungen davon zeigen sich durch massive Reduktion der Transformationsrate, sprich eine starke Absenkung der Qualität.

Bei guter, mikrobiologischer Praxis und Routine werden die einzelnen Schritte simpler und es gibt genug Biohacks und DIYbio Abkürzungen, die trotzdem zu einer erfolgreichen Trafo führen. Jedoch wollen wir hiermit ein Protokoll veröffentlichen, womit die Trafo auf jeden Fall gelingt. Je näher man am idealen Arbeitsprozess bleibt desto besser sind die Chancen einer erfolgreichen Trafo, 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 (OD600)  
Küvetten  
15 mL Tubes oder 15 mL Gefäße für den Schwing Rotor.  
Zentrifuge für 4000 rpm inklusive Rotor Einsätze  
Kühlzentrifuge (4°C) für 14.000 rpm  
Styroporbox  
Labor Eis oder eis-gekühlte Kühlelemente  
1,5 mL Eppis  
Eppi-Rack  
Wasserbad mit Thermometer (inklusive Schwimmer für Eppis)

### **Medien:**

50 mL Kulturkolben (mit Aludeckel) mit 20 mL LB (1x pro Stamm + 1x Steril Kontrolle pro Medium) = Vorkultur (VK) = Übernacht Kultur (ONC)  
500 mL (Schüttel-) Kolben mit 200 mL LB = Hauptkultur (HK)  
LB Agar Platten: 4 Stück pro Stamm  
LB Agar Platten mit Antibiotikum (Selektionsplatte): 2 Stück für 1x Trafo + 2 für Kontrollen

### **Lösungen:**

50 mL CaCl<sub>2</sub> (0,1 mol/L) → Einsatz bei Raumtemperatur (RT)  
50 mL CaCl<sub>2</sub> (0,1 mol/L) → Einsatz bei 4°C / Eiskalt  
50 mL CaCl<sub>2</sub> (0,1 mol/L) + Glycerol (30%) → 35 mL 0,1 M CaCl<sub>2</sub> + 15 mL Glycerol (99%)

### Vorbereitung (2 Tage zuvor) – Arbeitszeit: ~3 h

- Nährmedien mischen, in Gefäße aufteilen und Agar hinzu, autoklavieren.
- CaCl<sub>2</sub> Lösungen herstellen, autoklavieren und im Kühlschrank vorkühlen, mit Ausnahme der Lösung für RT.
- Agar unter 50°C abkühlen lassen (Handwarm) und Antibiotika hinzugeben.
- LB Agar Platten gießen und trocknen lassen → 1 Platte gleich verwenden.

**Tipp!** Ampicillin wird sehr häufig als Antibiotikum verwendet. Dieses ist UV-Sensibel und muss Licht geschützt getrocknet und gelagert werden.

- Einzelkolonie auf LB Agar ausstreichen (z.B. *E. coli* K12) bei 37°C über Nacht inkubieren.
- Labor Eis vorbereiten oder Kühlelemente im Gefrierfach (-25°C) einfrieren.

### Vorbereitung am Vorabend – Arbeitszeit: ~ 15 min

- Von der angewachsenen Platte eine frische Einzelkultur entnehmen und damit das LB Medium im Kulturkolben (20 mL) für die Vorkultur (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 Negativ Kontrolle 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).

### Haupt Tag/ Herstellung von chemisch kompetenten Zellen – Arbeitszeit: 4- 5 h

1. Optische Dichte der VK photometrisch bestimmen (OD600: ~ 3).
2. Die HK (200 mL) mit der VK beimpfen, sodass eine OD600 von ~0,07 erreicht wird.
3. Die inokulierte HK wird bei 37°C unter ständiger Sauerstoffzufuhr (Schütteln) bis zu einer OD600 von 0,7 inkubiert (~2-3h bei optimalen Wachstumsbedingungen).

**Tipp!** OD600 = Konzentration:

$c1 * V1 = c2 * V2$  (photometrisch gemessene OD der VK \* Volumen Inokulum der VK = gewünschte OD der HK \* Volumen der HK)

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

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

Warum? Die Kultur soll in einem optimalen Zustand sein, da darauffolgende Prozesse wie Einfrieren und Hitzeschock Transformation großen Stress auf die Bakterienzellen ausüben. Bei einer OD600 von 0,6-0,8 ist eine Bakterienkultur in der „Exponentiellen Phase“ der Wachstumskurve. Frische, vitale und wenig alte Zellen sind in dieser Kultur, genau das brauchen wir. *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 Kühl-Zentrifuge (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 unserem Rotor passen 4x4 Tubes pro Runde). Der Überstand wird verworfen, das erhaltene Pellet wird 2x mit 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (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 CaCl<sub>2</sub> 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 CaCl<sub>2</sub> (0,1 M) lösen und in vorgekühlte 1,5 mL Eppis überführen.
8. In der Kühlzentrifuge bei 4°C Eppis für 10min bei 14.000 rpm zentrifugieren. Überstand verwerfen. Pellet erneut in 1ml eiskalter CaCl<sub>2</sub> (0,1 M) lösen, danach 30 min kalt inkubieren (auf Eis oder 4°C). Danach erneut bei 4°C für 10min bei 14.000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen.
9. Dieses Pellet nun in 1ml eiskalter CaCl<sub>2</sub> + Glycerol (30%) lösen und zu 100 µL in kalte Eppis aliquotiert/aufgeteilt. Diese Aliquote sind nun sind „ready for transformation“ oder können nun schockgefroren und bei -25°C gelagert werden (siehe Protokolle – Lagerung von Mikroorganismen - Schockgefrieren)

### **Tipp!**

Wenn man sie einfriert „opfert“ man 2-3 Aliquote um zu testen, ob die Zellen das Schockgefrieren und das langsame Auftauen auf Eis überleben (ausplattieren) und überhaupt Transformations-fähig 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 Sicherer 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<sup>6</sup> – 10<sup>8</sup> Kolonien pro µg eingesetzter DNA erwarten. Der Rekord im OLGA liegt derzeit bei einer Traforate von 1,57 \* 10<sup>7</sup> cfu/µg DNA (colony forming unit).

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

## **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 fehlendem Selektionsdruck 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 Kontroll Ansatz.

Als negative Transformationskontrolle wird keine DNA hinzugefügt.

Auch die Kontrollen werden ausplattiert. Auf der Platte mit der Positiv Kontrolle 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 Negativ Kontrolle darf kein Wachstum sein (sonst keine Selektion / Antibiotikum nichtwirksam – in zu heißem Agar gelöst, soll Handwarm sein; zu geringe Menge; falsches Antibiotikum).

### **Auswertung am nächsten Tag:**

+ Kontrolle: Kolonien

- Kontrolle: keine Kolonien

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

### **Tipp!**

Wenn Kolonien auf der Selektionsplatte wachsen diese schnell auf frische Selektionsplatten überstreichen, da sich nach einiger Zeit sogenannte „Satelliten Kolonien“ 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 Gen-Segmenten, 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.