

Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen ist ein wichtiges Verfahren in der Molekularbiologie. Kompetenz beschreibt die Fähigkeit einer Zelle Fremd-DNA aufzunehmen, beispielsweise in der Form von Plasmiden. Es gibt verschiedene Wege die Kompetenz von Zellen zu erreichen, bei Bakterien ist die Behandlung mit Calciumchlorid-Lösung oder Calciumphosphat-Lösung üblich. Der am häufigsten im Labor verwendete Vektor ist *Escherichia coli*, welcher selbst keine natürliche Kompetenz besitzt (anders als einige andere Arten wie *Bacillus subtilis*). Um fremde Gene in *E. coli* klonieren zu können, müssen die Zellen zunächst kompetent gemacht werden.

Geräte:

Zentrifuge (mind. 5000 rpm), (Schüttel-)Inkubator, Vortexer, Bunsen- oder Teclubrenner, Kulturröhrchen mit Kappe/Aluminiumfolie, Mikroliterpipette 100 – 1000 µl, Mikroliterpipette 20 – 100µl, Sterile Pipettenspitzen im Rack 100 – 1000 µl, Sterile Pipettenspitzen im Rack 20 – 100 µl, Reaktionsgefäße 1,5 ml ("Eppis"), Eiskübel mit Crushed-Eis, Dewargefäß, Timer (obligatorisch)

Chemikalien/Medien:

LB-Medium, Typ Lennox

Calciumchlorid-Lösung c= 0,1 mol/l

2-Propanol, wässrig (70 %) (F, Xi)



Flüssiger Stickstoff



Stamm:

E. coli K12 DH5α

Hinweis: Das hier beschriebene Verfahren erzeugt keine transgenen Organismen. Sollten die kompetenten Zellen weiterverwendet werden, um beispielsweise fremde Gene in die Bakterien einzuschleusen, so müssen die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes (GenTG) berücksichtigt werden! Die verwendeten Medien und Gefäße müssen steril sein! Das gilt insbesondere für Reaktionsgefäße, als auch Pipettenspitzen und selbstverständlich für die Medien. Die Sterilität erreicht man durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 Minuten. Um Kontaminationen zu vermeiden sollte der Arbeitsplatz mit 2-Propanol (70 %) desinfiziert werden. Es sollte in der Nähe einer Flamme gearbeitet werden, der Hitzekegel vernichtet Fremdorganismen in der Luft. Sollten große Mengen kompetenter Zellen hergestellt werden, so empfiehlt es sich die Verwendung einer Sicherheitswerkbank. Vorsicht bei der Arbeit mit Flüssigen Stickstoff, bei falscher Handhabung drohen schweren Erfrierungen!

Durchführung

Am Tag vor der Herstellung der kompetenten Zellen, wird ein Klon (Kolonie) mit einem sterilen Zahnstocher von einer LB-Agarplatte entnommen, in ein Kulturröhrchen mit sterilem LB-Medium überführt und dieses kurz gevortext. Vor dem Öffnen und dem Schließen des Kulturröhrchens sollte der Deckel/Folie, sowie die Öffnung kurz abgeflammt werden. Das Röhrchen wird eine Nacht, möglichst unter Schüttelinkubation, bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden je 1000 µl der Übernachtskultur in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt und anschließend für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Reaktionsgefäße für 5 Minuten bei 5000 rpm (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert.

Der Überstand wird verworfen, das Bakterienpellet in 200 µl CaCl₂-Lösung resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird wieder bei 5000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun wird das Pellet nochmals in CaCl₂-Lösung resuspendiert und diesmal für eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend können die Zellen sofort für die Transformation verwendet werden. Sollten sie zu einem späteren Zeitpunkt verwendet werden, so werden diese mit flüssigen Stickstoff schockgefroren und können in einem -80 °C-Tiefkühlschrank bis zu 3 Monate gelagert werden. Sollten die Zellen bereits in den nächsten Tagen verwendet werden, ist eine kurzfristige Lagerung bei -20 °C möglich.

Entsorgung:

Biologische Abfälle werden grundsätzlich vor der Entsorgung autoklaviert! Dies soll verhindern, dass pathogene oder transgene Bakterien in die Umwelt gelangen. Um eine ausreichende Sterilisation sicherzustellen, sollte Autoklavierband mit Indikator verwendet werden. Sind keine weiteren Stoffe verwendet worden, können autoklavierte Rückstände und Kulturen im Ausguss entsorgt werden.

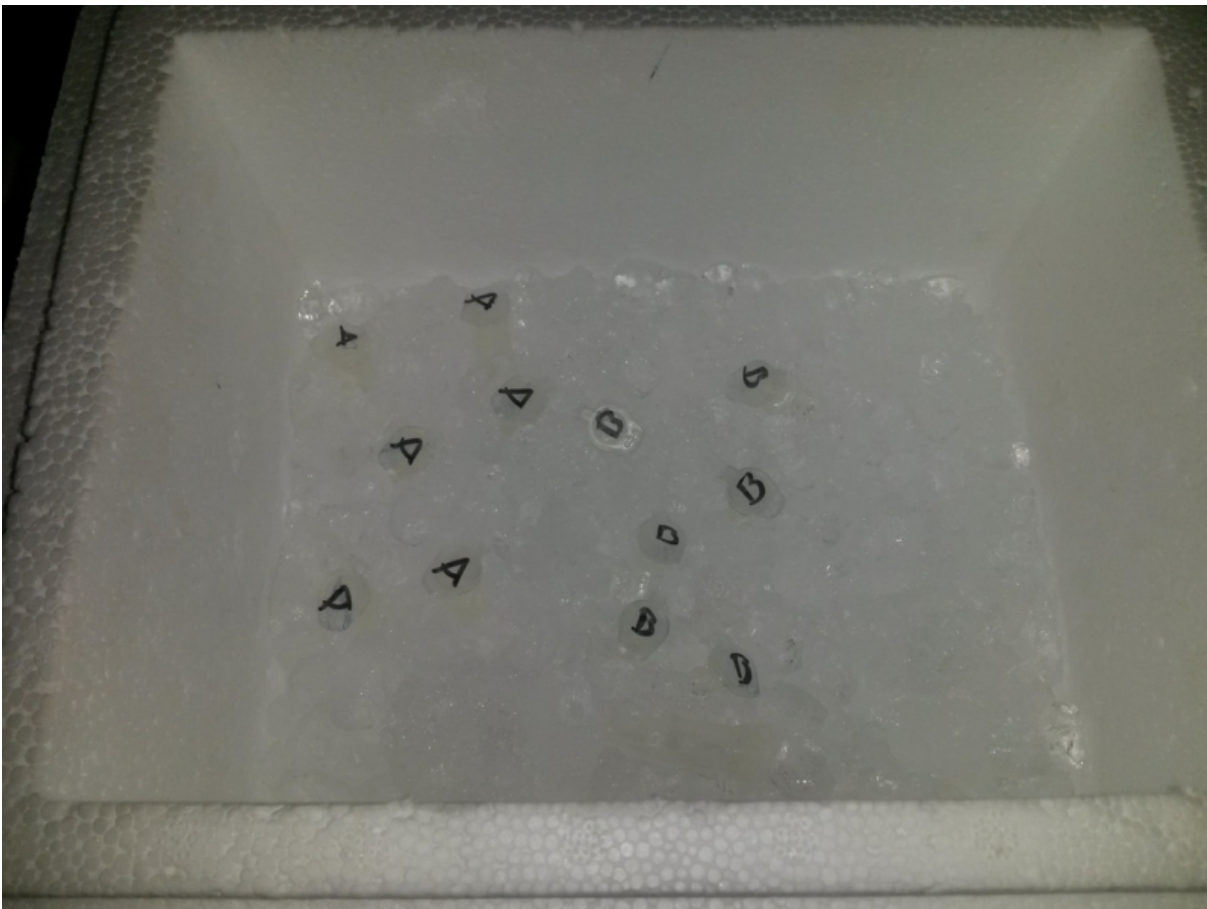
Erklärung:

Ein erhöhter Gehalt an Calcium-Kationen erhöht die Porosität der zellulären Membran. Zusammen mit weiteren Schritten, wie einem Hitzeschock, kann eine deutliche Weitung von Poren erzielt werden, was die Aufnahme von Fremd-DNA ermöglicht. Der genaue molekulare Prozess ist noch nicht geklärt. Das Schockgefrieren mit flüssigen Stickstoff begünstigt eine rasche Bildung kleiner Eiskristalle, welches die Zelle wesentlich besser verkraftet, als ein langsames Gefrieren, welches zur Bildung größerer Eiskristalle führt.

Bilder:



Entnahme aus der Übernachtskultur.



Kompetente Zellen auf Eis.



Schockgefrieren mit Stickstoff.