

Lærervejledning: Kemisk kompetente *E. coli* bakterier

Introduktion

Denne protokol beskriver hvordan man laver kemisk kompetente *E. coli* bakterier. Når cellekulturen er høstet (efter dag 2 step 3) er det vigtigt at cellerne holdes kolde hele tiden ved at have dem på is. Da der ikke bliver brugt noget antibiotikum er muligheden for kontaminering stor og det er derfor vigtigt at anvende god sterilteknik. Da protokollen kræver megen centrifugering kan man med fordel på dag 2 arbejde i et lige antal rør således at man ikke behøver kontravægte til centrifugen. Udbyttet af protokollen er afhængigt af hvor volumenet af kulturen som startes på anden dagen. Du kan se herunder hvordan du beregner størrelsen af kulturen. Hvis cellerne opbevares på -20 °C skal de bruges inden for 24 timer. Opbevares de på -80 °C kan de opbevares minimum 6 måneder.

Materialer

Materialer	Beregning*	Indskriv mængde
Sterilt LB medie	3 mL + 1,70 mL * x	
Sterilt 100 mM CaCl ₂	0.83 mL * x	
Sterilt 50% (vol/vol) glycerol	0.03 mL * x	
Sterilt reagensglas eller koniskkolbe	2 stk	
Sterile Eppendorfrør	1,2 * x	
<i>E. coli</i> DH5-α - Glycerol stock kommer med biosensor kittet		

*x er antallet af grupper



Procedure

Dag 1

1. Hæld ca. 3 mL LB op i et reagensglas eller konisk kolbe
 - a. *For at sikre at der er luft til bakterierne skal volumen af beholderen være minimum 10 mL*
2. Innokulér *E. coli*
 - a. *Dette gøres ved at skrabe i overfladen af E. coli glycerol stocken med en pipettespids eller en inokuleringsloop*
3. Inkubér kulturen over natten på 37 °C og helst med ryst på 150 - 200 RPM
 - a. *Hvis ikke at du har en rysteinkubator kan du prøver at sætte en magnetomrører ind i et inkubatorskab eller bruge en magnetomrører med varmeplade.*

Dag 2

1. Sæt dine opløsninger af 100 mM CaCl₂, 50% glycerol og eppendorfrør på køl i et køleskab.
2. Tilsæt resterende LB medie til et reagensglas eller en konisk kolbe
 - a. Total volumen af beholderen skal være minimum 3 gange så stor som volumen af LB medie. Det gøres for at sikre luft til bakterierne. Hvis du bruger 20 mL LB skal du minimum bruge en 60 mL kolbe.
3. Beregn inokulum størrelse
 - a. $[\text{Volumen LB medie}] / 100 = [\text{Inokulum volumen}]$
 - b. eks.: $20 \text{ mL} / 100 = 0.2 \text{ mL}$
4. Tilsæt [inokulum volumen] af overnatskulturen til kolben med LB medie
5. Inkubér kulturen ved 37 °C og helst ved ryst på 150 - 200 RPM
 - a. *Hvis ikke at du har en rysteinkubator kan du prøver at sætte en magnetomrører ind i et inkubatorskab eller bruge en magnetomrører med varmeplade.*
6. I ventetiden kan du sætte eppendorfrørene i is så de er klar til senere
7. Mål løbende OD₆₀₀ og lad kulturen vokse til en OD₆₀₀ på mellem 0.5 og 0.6
 - a. *Ved optimale betingelser tager dette 3 - 5 timer*
8. Sæt kulturene øjeblikkeligt på is
9. **Fra nu af skal alt være koldt og holdes på is**
10. Tilsæt 1,5 mL kultur til hver af de kolde eppendorfrør til at der er ikke er mere kultur tilbage
 - a. *Sørg gerne for at have et lige antal rør så er det nemmere at afbalancere centrifugen.*
11. Centrifuger kulturene med 6000 RPM i 5 min, hvis muligt ved 0 °C - 4 °C
 - a. **OBS** husk at afbalancerer centrifugen
12. Når du tager eppendorfrørene ud af centrifugen sættes de straks på is



13. Kasser supernatanten
14. Resuspender forsigtigt pellet i 0,75 mL kølet CaCl_2 i hvert eppendorfrør
 - a. *Pipetér op og ned til at pellet er opløst*
15. Gentag centrifugering med samme forhold som tidligere
16. Når du tager eppendorfrørene ud af centrifugen sættes de straks på is
17. Kasser supernatant
18. Resuspender forsigtigt pellet i 60 μL kølet CaCl_2
 - a. *Pipetér op og ned til at pellet er opløst*
19. Tilsæt 24 μL kølet 50% glycerol
20. Mix forsigtigt indholdet ved at pipettere op og ned
21. Opbevar på $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eller $-80\text{ }^\circ\text{C}$