

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 omkring 14 eppendorfrør med 160 µL kompetente celler i hvert rør - hvilket er nok til at 14 grupper kan lave en biosensor. Protokollen kan uden problemer skaleres op, hvis man ønsker at lave en større mængde kompetente celler. 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	Mængde
Sterilt LB medie	23 mL
Sterilt 100 mM CaCl ₂	11,2 mL
Sterilt 50% (vol/vol) glycerol	640 µL
Sterilt reagensglas eller koniskkolbe	2 stk
Sterile 10 ml Falconrør	2 stk
Sterile Eppendorfrør	14 stk
<i>E. coli</i> DH5-α - Glycerol stock kommer med biosensor kittet	

Materialer og mængden til at lave ca. 14 x 160 µL kompetente celler.



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 eppendorrør på køl i et køleskab.
2. Tilsæt 20 mL 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. Tilsæt 200 µL af overnatskulturen til kolben med LB medie
4. 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.*
5. 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.*
6. Sæt kulturene øjeblikkeligt på is
7. **Fra nu af skal alt være koldt og holdes på is**
8. Fordel kulturen i to falconrør, således at du nu har to med lige meget volumen. Alt efterfølgende skal gøres for begge rør.
 - a. *Noget volumen vil være gået tabt til OD målinger*
9. Centrifuger kulturene med 6000 RPM i 5 min ved 0 °C - 4 °C
10. Kasser supernatanten
11. Resuspender forsigtigt pellet i 5 mL kølet CaCl₂
 - a. *Det kan være en fordel resuspendere i et mindre volumen og tilføje det resterende volumen efterfølgende*
12. Gentag centrifugering med samme forhold som tidligere



Biosensor
by Biotech Academy

13. Kasser supernatant
14. Resuspender forsigtigt pellet i 800 μL kølet CaCl_2
15. Tilsæt 320 μL kølet 50% glycerol
16. Fordel cellerne i kølede eppendorfrør 160 μL i hvert rør
17. Opbevar på $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eller $-80\text{ }^\circ\text{C}$