

Optimierung der Bakterienkultur und Plasmidaufreinigung mit Hilfe von Eppendorf Conical Tubes 25 mL

RAFAL GRZESKOWIAK, EPPENDORF AG, HAMBURG

SANDRINE HAMELS, BLANDINE VANBELLINGHEN, EPPENDORF APPLICATION TECHNOLOGIES, S.A., NAMUR, BELGIEN

Zusammenfassung

Die Plasmidaufreinigung aus Bakterienkulturen stellt ein weitverbreitetes Protokoll in Laboren der Molekularbiologie und der Life Sciences dar. Für mittelgroße Ansätze werden meist 15 mL konische Gefäße mit Schraubdeckelverschluss eingesetzt; diese ziehen jedoch häufig Nachteile in der Handhabung nach sich und erzielen weder eine optimale Produktivität der Bakterienkultur noch eine maximale DNA-Ausbeute. Eppendorf Conical Tubes 25 mL mit Schnappdeckel nehmen sich dieser Hindernisse an. In der vorliegenden Application Note zeigen wir, dass die Produktivität der Bakterienkultur sowie die DNA-Ausbeute beim Einsatz von 25-mL-Gefäßen im Vergleich wesentlich höher ausfielen als mit standardmäßigen 15 mL konischen Gefäßen, und dass gleichzeitig sowohl die Handhabung als auch die Durchführung des Workflows deutlich verbessert werden konnten.

Einleitung

Die Bakterienkultur und die nachfolgende Plasmidaufreinigung gehören zweifelsohne zu den am häufigsten durchgeführten Protokollen in Laboren der Molekularbiologie und der Life Sciences. Trotz zunehmender Verfügbarkeit und Erschwinglichkeit von Plasmidaufreinigungs-Kits verschiedener Anbieter ist die Standardmethode der alkalischen Lyse [1] nach wie vor weit verbreitet und im akademischen Sektor fest etabliert. Diese Methode ist kostengünstig und skalierbar, und sie erzielt typischerweise hohe Ausbeuten an reiner Plasmid-DNA, welche sodann direkt in zahlreichen nachfolgenden Anwendungen, wie z.B. Restriktionsverdau, Klonierungen oder Sequenzierungen, eingesetzt werden kann.

Für mittelgroße Ansätze werden in der Regel 15 mL konische Gefäße mit Schraubdeckel eingesetzt. Diese bieten einen dichten Deckelabschluss und gute Zentrifugationsstabilität; allerdings sind sie ebenfalls mit Nachteilen bei der Handhabung behaftet (der Umgang mit dem Schraubdeckel, Kreuzkontamination, schwierige Erreichbarkeit der Probe am Boden des

Gefäßes), und häufig dienen sie daher nicht der optimalen Produktivität einer Bakterienkultur und somit der maximalen DNA-Ausbeute – insbesondere bei low-copy Plasmiden.

Diese Nachteile werden speziell durch die Eppendorf Conical Tubes 25 mL mit Schnappdeckel (SnapTec®) in Angriff genommen. Sie bieten eine deutlich verbesserte Einhandbedienung, bei gleichbleibender Sicherheit für Applikationen im mittleren Volumenbereich zwischen 15 mL und 50 mL.

Im Rahmen dieser Anwendung wurden sowohl die Bakterienkultur als auch die nachfolgende Aufreinigung von low-copy Plasmid-DNA durch standardmäßige alkalische Lyse mit Hilfe von entweder Eppendorf Conical Tubes 25 mL oder regulären 15 mL konischen Gefäßen miteinander verglichen. Der Einsatz von 25-mL-Gefäßen erzielte eine erhöhte Produktivität der Bakterienkultur sowie eine erhöhte Ausbeute an Plasmid-DNA, bei gleichzeitiger Verbesserung der Handhabung sowie des gesamten Workflows.

Material und Methoden

Bakterienkultur

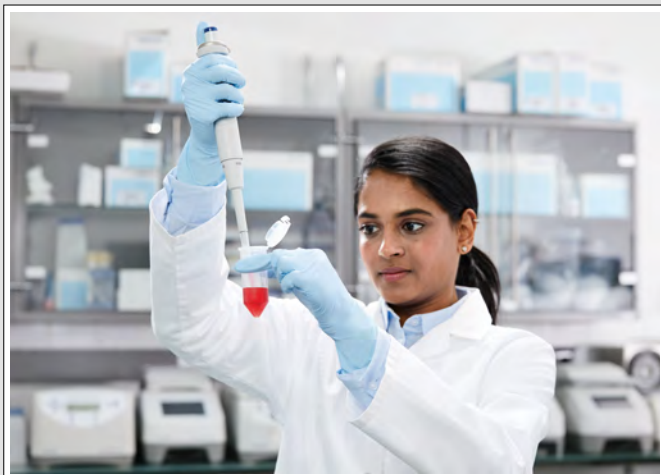
Escherichia coli Bakterien (DH5α, Invitrogen™), transformiert mit low-copy Plasmid-DNA (pBR322™, Invitrogen), wurden in dreifacher Ausführung über einen Zeitraum von 16 Stunden in LB-Medium mit Ampizillin kultiviert (37°C, 250 Upm, Innova® S44i Schüttler, Eppendorf). Das Zellwachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) mit Hilfe eines Eppendorf BioSpectrometer® bestimmt, und eine Schätzung der Anzahl an *E. coli* Bakterien wurde durch die folgende Umrechnungsformel vorgenommen:

$$OD_{600} \text{ von } 1,0 \approx 5 \times 10^8 \text{ Zellen/mL}$$

Extraktion von low-copy Plasmid-DNA

Die Extraktion von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe eines standardmäßigen alkalischen Lyse-Protokolls: 7,5 mL der Bakterienkultur wurden bei 10.000 x g zentrifugiert (5 min, Raumtemperatur), und die Pellets wurden in 1,5 mL Lösung 1 (50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris pH 8,0; 100 µg/mL RNase A) aufgenommen. Nach 5 min Inkubationszeit wurden 3 mL der Lösung 2 (0,2 NaOH; 1% SDS) hinzugegeben, gefolgt von einer weiteren Inkubation (10 min, Eis). Sodann wurden 2,25 mL der Lösung 3 (3M KOAc, pH 5,4) hinzugefügt. Die Proben wurden durchmischt und bei 17.000 x g (30 min, 4°C) zentrifugiert. Die Überstände wurden in frische Gefäße überführt, mit einem Volumen Isopropanol gefällt, durchmischt und sodann erneut bei 17.000 x g (30 min, 4°C) zentrifugiert. Die Pellets wurden gewaschen und in 200 µL TE Puffer resuspendiert.

Für die 15 mL Bakterienkultur wurden die Puffer zur alkalischen Lyse um den Faktor 2 hochskaliert. Die Zentrifugation wurde in der Eppendorf Centrifuge 5810 R mit dem Rotor FA-45-6-30 und entsprechenden Gefäßadaptern durchgeführt.



Optimierung der Bakterienkultur und Plasmidaufreinigung mit Hilfe von Eppendorf Conical Tubes 25 mL

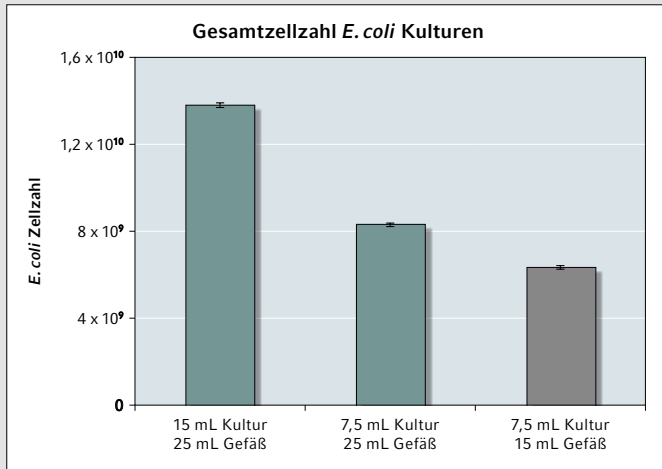


Abb. 1: Gesamtzellzahl der *E. coli* Kulturen, inkubiert in Eppendorf Conical Tubes 25 mL mit Schnappdeckel bzw. standardmäßigen 15 mL konischen Gefäßen

Die Plasmidausbeute und -qualität wurden durch Absorptionsmessungen bei 260 nm bestimmt (Eppendorf BioSpectrometer).

Ergebnisse und Diskussion

Der Vergleich von Wachstum und Produktivität der verschiedenen Bakterienkulturen ist in Abb. 1 dargestellt. Die Dichte der Bakterienkultur sowie die Gesamtzellzahlen waren sowohl für die 7,5 mL als auch die 15 mL Kulturvolumina, welche in Eppendorf Conical Tubes 25 mL mit Schnappdeckel inkubiert worden waren, höher. Dies weist auf bessere Wachstumsraten sowie eine bessere Gesamtproduktivität durch effizientere Belüftung und Mischeigenschaften in Eppendorf Conical Tubes 25 mL im Vergleich zu regulären 15-mL-Gefäßen hin.

Extraktion von low-copy Plasmid-DNA

Bakterienkulturen wurden direkt zur Extraktion von low-copy Plasmid-DNA (pBR322, Invitrogen) mit Hilfe eines standardmäßigen alkalischen Lyseprotokolls eingesetzt. Insbesondere ist hervorzuheben, dass im Rahmen dieser Methode mehrfache Hochgeschwindigkeits-Zentrifugationsschritte (bis zu 17.000 x g) sowie Misch- und Phasengewinnungsschritte stattfinden. Die dichte Versiegelung des Deckels und die damit einhergehende Sicherheit der Eppendorf Conical Tubes 25 mL waren mit den regulären 15 mL konischen Gefäßen mit Schraubdeckel vergleichbar.

Kreuzkontaminationen sind bei der parallelen Bearbeitung mehrerer Schraubdeckelgefäße nicht auszuschließen; die Schnappdeckel ermöglichten ein drastisch reduziertes Kontaminationsrisiko bei gleichzeitig schnellerer Handhabung.

Wie in Abb. 2 gezeigt, waren die mittels Eppendorf Conical Tubes 25 mL erzielten Ausbeuten an Plasmid-DNA deutlich höher als jene, die mit regulären 15 mL konischen Gefäßen gewonnen worden waren. Für die 7,5 mL und 15 mL Bakterienkultur-Volumina konnten 70 % bzw. 400 % höhere Ausbeuten verzeichnet werden, was auf eine hohe Kulturdichte und verbesserte Wachstumsparameter schließen lässt, wodurch eine erhöhte Produktion von Plasmid-DNA ermöglicht wurde.

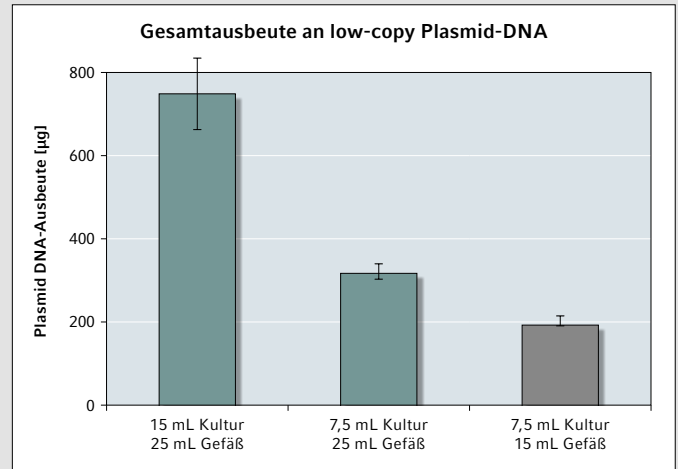


Abb. 2: Gesamtausbeute an low-copy Plasmid-DNA (pBR322), aufgereinigt aus Bakterienkulturen, welche entweder in Eppendorf Conical Tubes 25 mL mit Schnappdeckel oder in standardmäßigen 15 mL konischen Gefäßen inkubiert worden waren

OD-Quotienten bestätigten die Reinheit der DNA-Aufbereitungen: $A_{260}/A_{280} > 1,9$ und $A_{260}/A_{230} > 2,0$.

Fazit

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Produktivität der in Eppendorf Conical Tubes 25 mL mit Schnappdeckel (SnapTec) kultivierten Bakterienkulturen als auch die daraus resultierenden Ausbeuten an Plasmid-DNA sehr viel höher waren (70 % bis 400 %) als Kulturen aus den standardmäßigen 15 mL konischen Gefäßen. Die signifikant erhöhten Wachstumsraten, die mit den 25-mL-Gefäßen erzielt wurden, waren auf die effizientere Belüftung sowie Mischeigenschaften der Bakterienkultur zurückzuführen.

Sowohl die dichte Deckelversiegelung und die sichere Handhabung als auch die Zentrifugationsstabilität der Eppendorf Conical Tubes 25 mL standen den 15 mL konischen Gefäßen mit Schraubdeckel in nichts nach. Gleichzeitig wird die Handhabung von Ansätzen im mittleren Volumenbereich zwischen 15 mL und 50 mL deutlich optimiert.

Nicht zuletzt ermöglichten Eppendorf Conical Tubes 25 mL einen verbesserten Zugang zur Probe, was das Risiko einer Kreuzkontamination während der Aufreinigung reduzierte. Dies bietet weitere Vorteile bei der Durchführung zahlreicher Protokolle in der Molekularbiologie und den Life Sciences.

Literatur

[1] Birnboim, HC. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 1983; 100: 243–255.