

Optimierung der Plasmidausbeute in Schüttelkulturen

BLANDINE VANBELLINGHEN, SILVIA TEJERINA, AURELIE TACHENY, EPPENDORF APPLICATION TECHNOLOGIES, S.A., NAMUR, BELGIEN
INES HARTMANN, EPPENDORF SE, HAMBURG

Zusammenfassung

Rekombinante Plasmid-DNA wird in Bakterienkulturen erzeugt, zumeist in *E. coli*. Die Plasmidausbeute sowie deren Qualität hängen von zahlreichen Faktoren ab, wie z.B. dem Insert, der Auswahl des Bakterienstamms, dem Vektordesign und den Methoden, welche für die Kultivierung sowie für die Aufreinigung gewählt werden. Wir konzentrieren uns hier auf die Optimierung der *E. coli* Schüttelkultur und untersuchen den Einfluss von Kulturmedium, Gefäßdesign, Füllvolumen und Schüttelgeschwindigkeit auf die Bakterien- und Plasmidausbeute. Wir zeigen auf, wie eine größere Produktionsbandbreite mit Hilfe der geeigneten Kombination aus einem Hochkapazitäts-Inkubationsschüttler, optimierten Kulturbedingungen und speziell konzipierten Kulturflaschen erzielt werden kann.



Innova S44i mit Ultra Yield Kolben

Einleitung

Plasmide dienen als Vehikel in der Gentechnologie, um DNA-Fragmente wie z.B. Gene zu klonieren und zu amplifizieren, oder um rekombinante Proteine zu exprimieren. Plasmid-DNA (pDNA) kann mit einfachen Mitteln genetisch manipuliert und in großen Mengen in *E. coli* produziert werden. Eine Vielzahl von gebrauchsfertigen Produktlösungen ermöglicht die problemlose nachfolgende Aufreinigung. Abhängig von der Anwendung kann die Produktion der pDNA im Labormaßstab (bis zu ein paar mg) bis hin zum industriellen Maßstab (im mg- bis g-Bereich) durchgeführt werden. Hier untersuchen wir den Einfluss der Kulturbedingungen auf die Generierung von pDNA in großvolumigen 2,5 L Ultra Yield® Kolben.

Material und Methoden

E. coli DH5 α und JM109 wurden mit pUC19 Plasmid und pGEM®-3Z transformiert. Glycerin-Stammkulturen wurden bei -80°C gelagert. Lennox-Broth (LB) Medium und modifiziertes TB-Medium wurden angesetzt und frisch mit Ampicillin und Anti-Schaum versetzt. Die Flüssigkulturen wurden mit einer identischen Startmenge von 1% (v/v) angeimpft und in Triplikaten durchgeführt.

Die Experimente wurden im Eppendorf Innova® S44i mit einem Schütteldurchmesser von 25 mm bei 37°C in Erlenmeyerkolben (mit und ohne Schikanen) sowie Ultra Yield Kolben (Thomson) durchgeführt. Die Bakteriendichte wurde bei OD₆₀₀ nm gemessen, die Biomasse wurde aus abgeernteten Kulturproben ermittelt, die pDNA wurde isoliert und bei OD₂₆₀ nm gemessen.

Ergebnisse und Diskussion

Einfluss des Kolbendesigns

Schüttelflaschen stellen die am häufigsten verwendeten Kulturgefäße für die Plasmidherstellung im Labormaßstab dar. Die Auswahl des adäquaten Kolbendesigns hängt von dem Sauerstoffbedarf des Organismus sowie den individuellen Anforderungen der jeweiligen Anwendung ab. Heutzutage sind verschiedene Schüttelflaschen-Designs erhältlich, welche den Sauerstofftransfer in die Kultur erhöhen (Abb. 1).



Abb. 1 (von links nach rechts): Erlenmeyerkolben traditionell (ohne Schikanen), mit Schikanen, Ultra Yield Kolben

Die abgebildeten Kolben-Designs wurden untersucht, um das für eine hohe Ausbeute am besten geeignete Design für Kolben größeren Volumens zu ermitteln. Das Ultra Yield Design schnitt etwas besser ab als der Standard-Erlenmeyerkolben mit Schikanen (Daten sind in der originalen Application Note 449* einzusehen); dieses Design wurde für die nachfolgenden Tests eingesetzt.

Einfluss der Medienzusammensetzung

Das Medium versorgt die Kultur mit Nährstoffen, wie Proteinen, Mineralien, Vitaminen und Kohlenhydraten. Abbildungen 2 und 3 zeigen den Einfluss der Medienzusammensetzung auf die Biomasse sowie die pDNA-Ausbeute klar auf. Die gesamte bakterielle Biomasse in angereichertem TB-Medium erzielte gegenüber klassischem LB-Medium eine 2- bis 4-fach erhöhte Biomasse, je nach Füllvolumen und Schüttelgeschwindigkeit (Abb. 2).

Die daraus resultierenden pDNA-Ausbeuten zeigten ähnliche Ergebnisse, mit 4- bis 5-fach erhöhter pDNA-Ausbeute bei Kultivierung in TB-Medium (Abb. 3). Klassisches LB-Medium eignet sich hervorragend für routinemäßige molekularbiologische Anwendungen; allerdings sind die Ausbeuten bei einer $\text{OD}_{600} \leq 7$ gesättigt, nachdem die verwertbaren Kohlenstoffquellen erschöpft sind. Um höhere Ausbeuten mit OD-Werten ≥ 20 zu erzielen, ist ein gepuffertes, nährstoffreiches Medium, welches z.B. Glycerin

Optimierung der Plasmidausbeute in Schüttelkulturen

als zusätzliche Kohlenhydratquelle enthält, besser geeignet.

Einfluss der Schüttelgeschwindigkeit

Standardmäßige Schüttelgeschwindigkeiten betragen zwischen 200 und 250 rpm. Die positiven Effekte einer höheren Schüttelgeschwindigkeit können hier in nährstoffreicher TB-Medienkultur klar aufgezeigt werden. Die besten Ergebnisse mit Bezug auf Biomasse und pDNA ergaben Kulturen mit 20 % Füllvolumen, welche bei 400 rpm inkubiert wurden. Im Vergleich zur Standard-Schüttelgeschwindigkeit von 250 rpm resultierte eine Erhöhung auf 400 rpm nach 8 Stunden in einer nahezu 2-fach erhöhten Biomasse (Abb. 2) sowie einer ~30% erhöhten pDNA-Ausbeute (Abb. 3).

Einfluss des Arbeitsvolumens

Ein größeres Kulturvolumen kann ebenfalls die Plasmidausbeute verbessern. Das höhere Füllvolumen (bei gleichbleibender Schüttelgeschwindigkeit von 250 rpm) erzielte höhere Ausbeuten: eine Verdopplung des Kulturvolumens von 20 auf 40 % ergab eine ~1,4-fach erhöhte Biomasse (Abb. 2) und eine Erhöhung der pDNA-Ausbeute um >15 % nach 8 Stunden (Abb. 3). Dies stellte ein unerwartetes Ergebnis dar, da ein höheres Füllvolumen im Normalfall zu Einschränkungen der Sauerstoffversorgung führt.

Eine mögliche Erklärung könnte im spezifischen Design der Schikanen sowie im Fließverhalten innerhalb des speziellen Ultra Yield-Kolbens liegen.

Einfluss des Schüttler-Designs

Um so viele Kolben wie möglich parallel zu inkubieren, sind stapelbare Hochkapazitäts-Inkubationsschüttler das Produkt der Wahl für die Plasmidproduktion mit hoher Ausbeute. Bei Verwendung von 2,5 L Ultra Yield Flaschen erreicht man, abhängig vom Füllvolumen, ein Gesamtvolumen zwischen 19,5 L (20 % Füllvolumen) und 45 L (40 % Füllvolumen) in einem dreifach gestapelten Hochkapazitätsschüttler, wie z.B. dem Eppendorf Innova S44i. Der Schüttler sollte bei hoher Gewichtsbelastung und bei hohen Schüttelgeschwindigkeiten zuverlässig arbeiten. Schüttler mit einem Mehrfach-Exzenter-Antriebssystem stabilisieren

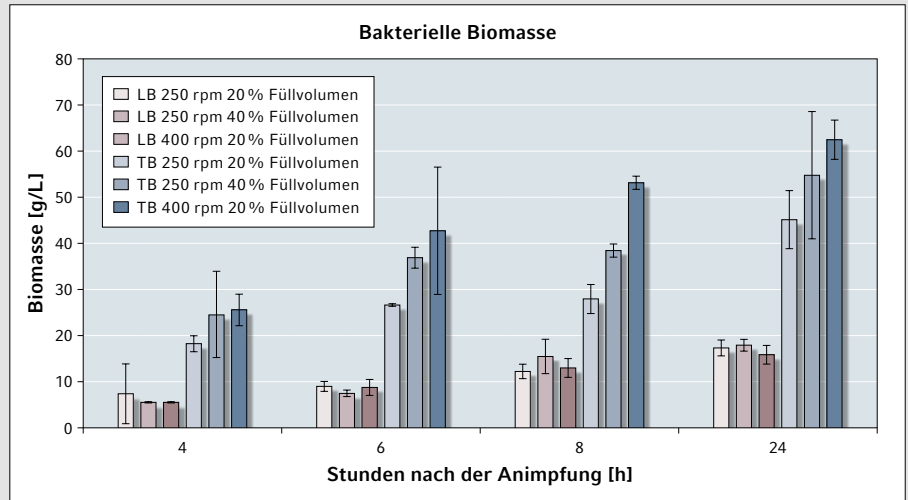


Abb. 2: Bakterielle Biomasse (DH5α mit pUC19 Plasmid) in 2,5 L Ultra Yield Kolben mit verschiedenen Medien, Arbeitsvolumina und Schüttelgeschwindigkeiten, inkubiert bei 37 °C

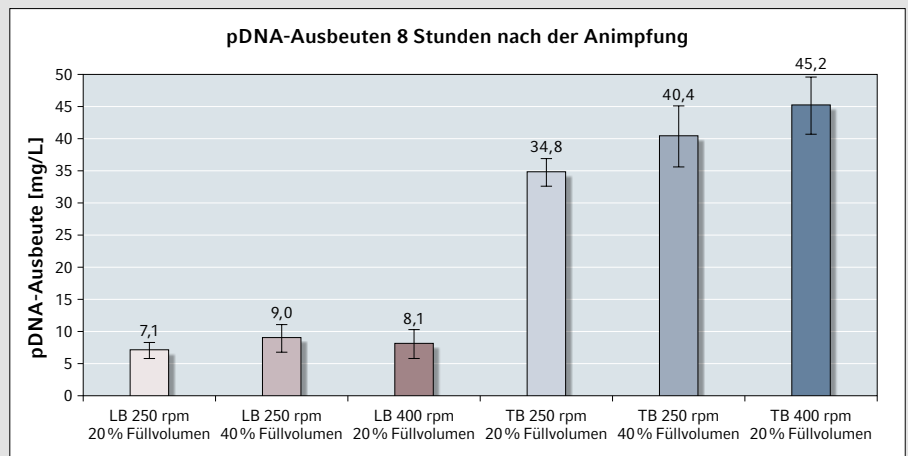


Abb. 3: pDNA-Ausbeuten (DH5α mit pUC19 Plasmid) in 2,5 L Ultra Yield Kolben mit verschiedenen Medien, Arbeitsvolumina und Schüttelgeschwindigkeiten, inkubiert bei 37 °C

die Plattform an mehreren Punkten, was bei Inkubation mit hoher Geschwindigkeit und Beladung für maximale Stabilität sorgt. Um die von der Flüssigkeitsmasse erzeugte Zentrifugalkraft zu kompensieren, sollte der Antrieb des Schüttlers zusätzlich mit einem guten Gegengewicht ausgestattet sein, um Unwuchten zu verhindern und somit den Schüttler langfristig vor Verschleiß zu schützen.

Fazit

Die Optimierung der Bedingungen einer Bakterienkultur kann zur Steigerung der pDNA-Ausbeute beitragen. Der Einsatz eines nährstoffreichen Mediums anstelle von LB-Medium sowie von Kolben mit Schikanen oder speziellem Design, wie z.B. Ultra Yield Kolben, zusammen mit einer Erhöhung der Schüttelgeschwin-

digkeit kann das Bakterienwachstum und somit nachfolgende Produktionsausbeuten positiv beeinflussen. Daher sollten die Auswahlkriterien bei Schüttlern neben der Kapazität auch einen robusten Antrieb mit Gegengewichtssystem miteinschließen, um bei hoher Gewichtsbelastung und hohen Schüttelgeschwindigkeiten zuverlässig arbeiten zu können.

*Application Note 449 steht unter www.eppendorf.com/appnote449 zur Verfügung.

Die Eppendorf SE behält sich das Recht vor, ihre Produkte und Dienstleistungen jederzeit zu ändern. Diese Application Note kann ohne Vorankündigung geändert werden. Wenn gleich größte Sorgfalt darauf verwendet wurde, die Richtigkeit und Vollständigkeit dieser Informationen zu gewährleisten, übernimmt die Eppendorf SE keine Haftung für eventuelle Fehler oder Schäden, die sich aus der Anwendung oder dem Gebrauch dieser Informationen ergeben. Die Heranziehung von Application Notes allein kann das Lesen und Einhalten der jeweils aktuellsten Version der Bedienungsanleitung nicht ersetzen.