

EUKARYONTENTRANSFORMATION

Ziel dieser Übung ist es, einen *pyr4*-negativen Stamm des Pilzes *Trichoderma reesei* (TU 6), dem also eine funktionelle Kopie des für Orotidin-5'-monophosphat-decarboxylase-kodierenden Gens fehlt, und der aus diesem Grund die Gabe von Uridin benötigt (= Uridin auxotroph), zur Uridin-Prototrophie zu transformieren. Dazu werden Sporen dieses Stammes mit Wolframpartikeln, auf denen ein Plasmid präzipitiert wurde, welches das *pyr4*-Gen enthält (pFG1), mittels Genkanone beschossen. Das soll eine Aufnahme der Plasmid-DNA und eine Integration derselben ins Pilzgenom sowie die Expression des *pyr4*-Gens bewirken. Das führt in weiterer Folge zum Wachstum von erhaltenen Transformanten auf Medium ohne Uridin (= Selektionsmedium).

Hinweise:

* wird von dem/r Betreuer/in ausgegeben

(B) befindet sich am Betreuertisch

(E) befindet sich im allgemeinen Entnahmebereich auf RT

(G) befindet sich in der Gefrierlade

(K) befindet sich im Kühlschrank

alle weiteren Materialien/Lösungen sind selbst herzustellen oder am Hörer/innenplatz vorhanden

Gerahmte Teile: es ist unter sterilen Bedingungen zu arbeiten!

Abkürzungen:

MEX, Malzextrakt

RG, Reaktionsgefäß

RT, Raumtemperatur

sb, steriles, bi-distilliertes Wasser

Uri, Uridin

Reservierung der Genkanone sowie erfolgreiche Vorbereitungsbesprechung erforderlich!

Materialien und Lösungen

Feststoffe: siehe Punkt 1.

Lösungen: 0,5 M Uridin (K)
NaCl (0,8 %)-Tween80 (0,05 %)-Lösung (E)
0,1 M Spermidin-Lösung (G)
2,5 M CaCl₂-Lösung (K)
Plasmid pFG1 (G)
sb Wasser
EtOH_{abs} (B)
70%ige EtOH-Lösung

Materialien: Schottflasche oder autoklavierfähiges Gefäß
Mensur, Wägeschälchen, Magnetrührstäbchen
Petrischalen (E)
Platte mit *Trichoderma reesei* TU6 bewachsen (K)
sterile 1,5-mL-RG
Säulchen mit Glaswolle (E)
Aliquote (je 50 µL) M17 Tungsten Wolframpartikel in sb (K)
Genkanonenteile*

1. Herstellung der Medien

Für eine Platte werden ca. 30 mL Medium benötigt.

Zusammensetzung des MEX/Uri-Mediums:

Menge/L	Substanz
30 g	Malzextrakt (E)
20 g	Agar-Agar (E)

- benötigte Menge an Feststoffen in Schottflasche geben
- mit dest. Wasser auf gewünschtes Volumen auffüllen, schwenken

- Schottflasche verschließen (und Vierteldrehung retour)
- autoklavieren
- auf ca. 50 °C abkühlen lassen/temperieren (Wasserbad)

- Uridin auf eine Endkonzentration von 5 mM zugeben
- Medium in Petrischalen gießen

- Medium fest werden lassen

Zusammensetzung des Minimalmediums:

Menge/L	Substanz
1 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O (E)
10 g	KH ₂ PO ₄ (E)
6 g	(NH ₄) ₂ SO ₄ (E)
3 g	Natriumcitrat·2H ₂ O (E)
10 g	Glukose (E)
1 g	Pepton (E)
20 mL	50x Spurenelementlösung (E)
15 g	Agar-Agar (E)

- benötigte Menge an Feststoffen (außer Agar-Agar) in Schottflasche geben
- benötigte Menge an Lösungen zugeben und rühren
- mit dest. Wasser auf gewünschtes Volumen auffüllen, rühren
- benötigte Menge an Agar-Agar zugeben
- Schottflasche verschließen (und Vierteldrehung retour)
- autoklavieren
- auf ca. 50 °C abkühlen lassen/temperieren (Wasserbad)

- Medium in Petrischalen gießen

- Medium fest werden lassen
- alle Platten können 2-3 Tage auf RT, längerfristig auf +4 °C gelagert werden

2. Herstellung der Sporen

- mit einer Nadel ein ca. 5 x 5 mm großes Stück aus der bereitgestellten TU6-Kultur (Agarplatte) ausstechen
- bewachsenes Agarstück mittig auf eine MEX/Uri-Platte setzen

- die Platte 5 - 7 Tage bei 30 °C inkubieren bis diese völlig bewachsen und durchgehend sporuliert (grün) ist
- die Platte kann kurzfristig bei RT oder mehrere Tage auf +4 °C aufbewahrt werden

3. Herstellung der Sporensuspension

- alle Sporen von der Platte abschaben und in 1 ml NaCl-Tween80-Lösung resuspendieren
 - Suspension über ein mit steriler Glaswolle gefülltes Säulchen filtrieren
 - je ca. 120 µL Sporensuspension auf den Selektionsmediumplatten auf ca. 2/3 der inneren Agaroberfläche ausstreichen (Drigalskyspatel)
- Hinweis: Die Sporensuspension muss vor dem Beschießen mit Wolframpartikeln getrocknet sein, die Sporen dürfen aber nicht auszukeimen beginnen.

4. Präzipitation der DNA auf Wolframpartikeln

- 105 μL 0,1 M Spermidin-Lösung mit 263 μL 2,5 M CaCl_2 -Lösung vermischen
- Plasmid pFG1 auftauen, schütteln, kurz abzentrifugieren, auf Eis stellen
- 2 Aliquote Wolframpartikel auf Eis stellen
- 5 μg Plasmid pFG1 bzw. dasselbe Volumen sb Wasser (Leerprobe) zu je einem Aliquot Partikelsuspension geben
- jeweils 70 μL Spermidin/ CaCl_2 -Lösung hinzufügen
- 3 min am Vibrationsschüttler mischen
- 10 min auf Eis inkubieren
- kurz abzentrifugieren und den Überstand verwerfen
- 250 μL EtOH_{abs} zugeben und Partikel **sanft** resuspendieren
- kurz abzentrifugieren und Überstand verwerfen
- Partikel sanft in 50 μL EtOH_{abs} resuspendieren und bis zur Verwendung auf Eis lagern

5. Transformation

Die Durchführung erfolgt laut Herstellerangaben (BIORAD, Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System) mit 900 psi Rupture Discs.

Der eigentliche Transformationsschuss darf dreifach erfolgen (unter Verwendung eines Präzipitationsansatzes).

Es sind drei Negativkontrollen vorzuweisen:

- ✓ eine Platte beschossen mit Partikeln ohne DNA (Ersatz der DNA durch sb Wasser)
- ✓ eine Selektionsplatte mit Sporen
- ✓ eine Selektionsplatte unbeimpft

- Reinraumbank reinigen und sterilisieren
- dort alle verwendeten Teile und Materialien sterilisieren
Hinweis: Sprühflasche mit 70%igem EtOH vorhanden; leere Petrischalen, 70%ige EtOH -Lösungen und Pinzette zum Einlegen von Kleinmaterial mitbringen.
- Teile und Materialien trocknen (EtOH verdampfen) lassen
- alle Partikel (mit möglichst wenig EtOH) mittig auf die benötigte Anzahl an Macrocarrier aufbringen und trocknen (EtOH verdampfen) lassen
- Zusammenbau der Apparatur
- eine Platte mit Sporen im zweiten Einschub von oben platzieren
- Türe schließen, Kammer evakuieren, schießen
- belüften, Platte entnehmen und schließen, Apparatur abbauen und Reste entfernen
- Vorgang für alle Macrocarrier wiederholen
- benutzte Teile sterilisieren, trocknen lassen und retournieren
- Reinraumbank reinigen und sterilisieren

- alle Platten (inkl. Negativkontrollen) bei 30 °C vier bis fünf Tage inkubieren

6. Auswertung/Abgabe

- Platten können ggf. mit einem Algensucher* genauer betrachtet werden
- alle Platten mit Parafilm (E) verschließen, mit Klebeband (E) zusammenbinden (Beschriftung!) und abgeben