

じっけんレシピ

大腸菌培養 目次

基本的な試薬の調製方法.....	2
5N 水酸化ナトリウム溶液.....	2
1M 塩化マグネシウム溶液.....	2
1M 硫酸マグネシウム溶液.....	2
1M 塩化カリウム溶液.....	2
1M グルコース溶液.....	3
IPTGストック溶液(0.1 M).....	3
X-GALストック溶液(2%).....	3
微生物用培地の調製方法.....	4
LB培地の作製.....	4
LB寒天培地(LBアガー培地)の作製.....	4
NZYM培地の調製方法.....	5
NZYM寒天培地の作製.....	5
SOC培地の調製方法.....	6
TB培地の調製方法.....	7
大腸菌の培養方法.....	8
画線培養.....	8
シングルコロニーからの液体培養.....	8
抗生物質.....	9
アンピシリン溶液の調製.....	9
カナマイシン溶液の調製.....	9
クロラムフェニコール溶液の調製.....	9
テトラサイクリン溶液の調製.....	9
ピューロマイシン溶液の調製.....	9
大腸菌の形質転換(トランスフォーメーション).....	10

よく使う溶液の調製方法

5N 水酸化ナトリウム溶液

100 mL 用

1. 約 70 mL の蒸留水をビーカーに入れ、水酸化ナトリウム (製品番号 [S8045](#)) 20.0 g を加えて、スターラーなどを用いて完全に溶かします。
2. 100 mL になるように蒸留水でメスアップします。

溶液は室温で保存可能です (オートクレーブは必要ありません)。

水酸化ナトリウム溶液は強いアルカリ性になり、腐食性があるので十分に気をつけてお取り扱い下さい。

水酸化ナトリウム
NaOH 分子量 40.00

1M 塩化マグネシウム溶液

100 mL 用

1. 約 70 mL の蒸留水をビーカーに入れ、塩化マグネシウム 6 水和物 (製品番号 [M2393](#)) 20.3 g を加え、スターラーなどを用いて完全に溶かします。

2. 100 mL になるように蒸留水でメスアップします。

3. オートクレーブ可能な容器に移し、121°C で 15 分間オートクレーブします。

溶液は室温または冷蔵で保存可能です。

塩化マグネシウム 6 水和物
MgCl₂ · 6H₂O 分子量 203.3

1M 硫酸マグネシウム溶液

100 mL 用

1. 約 70 mL の蒸留水をビーカーに入れ、硫酸マグネシウム (製品番号 [M7506](#)) 12.0 g を加え、スターラーなどを用いて完全に溶かします。

2. 100 mL になるように蒸留水でメスアップします。

3. オートクレーブ可能な容器に移し、121°C で 15 分間オートクレーブします。

溶液は室温または冷蔵で保存可能です。

硫酸マグネシウム
MgSO₄ 分子量 120.37

1M 塩化カリウム溶液

100 mL 用

4. 約 70 mL の蒸留水をビーカーに入れ、塩化カリウム (製品番号 [P9333](#)) 7.5 g を加え、スターラーなどを用いて完全に溶かします。

5. 100 mL になるように蒸留水でメスアップします。

6. オートクレーブ可能な容器に移し、121°C で 15 分間オートクレーブします。

溶液は室温または冷蔵で保存可能です。

塩化カリウム
KCl 分子量 74.55

1M グルコース溶液

グルコース
G6H12O6 分子量 180.16

100 mL 用

1. 約 70 mL の蒸留水をビーカーに入れ、グルコース(製品番号 [G7528](#)) 18.0 g を加え、スターラーなどを用いて完全に溶かします。
2. 100 mL になるように蒸留水でメスアップします。
3. 0.22 μm または 0.2 μm 径のフィルターを用いてフィルターろ過滅菌します。

溶液はオートクレーブによる滅菌も可能です。

溶液は室温または冷蔵で保存可能です。

IPTGストック溶液(0.1 M)

IPTG; Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
C9H18O5S 分子量 238.30

10 mL 用

1. IPTG (製品番号 [I6758](#)) 0.24 g に 10 mL の蒸留水を加え、スターラーなどを用いて完全に溶かします。
2. 0.22 μm または 0.2 μm 径のフィルターを用いてフィルターろ過滅菌します。

0.1 M のストック溶液は分注して冷凍で保存可能です。

大腸菌の遺伝子発現誘導には一般的に最終濃度 0.2 mM 以上で使用されます。

X-galストック溶液(2%)

X-gal; 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside
C14H15BrClNO6 分子量 408.63

10 mL 用

1. X-Gal(製品番号 [B4252](#)) 0.2 g を DMF(ジメチルホルムアミド、製品番号 [D4551](#)) 10 mL で完全に溶かします。
- 溶液はガラスビンに分注して-20°C(遮光)で6~12ヶ月は保存可能です。

大腸菌のセレクション用には、25 mL の寒天培地あたり 50 μL の 2% X-Gal ストック溶液を混ぜるか、プレート入れた寒天培地の表面に 2% X-Gal ストック溶液を適量塗ります。

ストック溶液はピンク色に変色したら使用しないで下さい。オートクレーブ後の培地に添加する場合は、培地が十分に冷えてから(42~45°C以下)X-Gal 溶液を添加して下さい。

実験の注意点!

- ・ オートクレーブ耐性のある容器(ガラスのフラスコまたはメディウムビンなど)をご使用下さい
- ・ オートクレーブの際は、圧力によって膨張しますので容器のフタを若干緩めて下さい
- ・ オートクレーブ後は容器および内容物が非常に熱くなりますので、取り扱いには十分注意して下さい
- ・ オートクレーブ後に急に冷やすと容器が破損する恐れがありますので、急冷せず自然に冷まして下さい

微生物用培地の調製方法

LB培地の作製

LB 培地は大腸菌の一般的な培養に用いられています。

使用する物質	使用量(1L 調製用)	製品番号
イーストエクストラクト (酵母エキス; イースト抽出物)	5 g	Y1000
トリプトン	10 g	T7293
塩化ナトリウム	5 g	S7653
(オプション)水酸化ナトリウム溶液	数 100 μL 程度	S8263 (5N溶液)

調製手順

- 10 g のトリプトン、5 g のイーストエクストラクト、5 g の塩化ナトリウムをビーカーまたはフラスコに入れ、蒸留水 1L を静かに入れてスターラーなどを利用してよく混ぜます。
溶解液は酸性になるので、NaOH 溶液を適量加えて pH を中性(7.0 付近)に調製する方法もあります。
正確に培地の濃度を調製するには、1L 弱の水を入れ、pH 調製後にメスシリンダーなどで 1L にメスアップしますが、ほとんどの場合厳密な濃度の調製は必要ありません。
※ 蒸留水を加える際には、粉末が飛散しないように静かに注ぎ入れて下さい
- オートクレーブ可能な容器で 121°C、15 分間オートクレーブします。
- 抗生物質を添加する場合は、オートクレーブ後の培地が十分冷えた状態(通常約 40~50°C 以下)で必要量の抗生物質を無菌的に添加し、よく混ぜます。

分注や培地への植菌などは標準的な無菌状態(バーナーをつけながらの作業)で行います。

未開封の液体培地は冷蔵で保存できますが、特に抗生物質を入れている場合は早めに使用します。

LB液体培地 製品番号[L2542](#)

組成=トリプトン 10g/L, イーストエクストラクト 5g/L, NaCl 10g/L※
フィルター滅菌済み
※滅菌済みの液体培地に適したミラーの組成になっています

LB寒天培地 (LBアガー培地) の作製

上記の手順 1 に、アガー(製品番号~)を 15 g 入れて溶液を調製します。

手順 3 の後、培地が温かいうちに滅菌されたプレートなどに入れ、室温で冷まして固まるまで静置します。

寒天培地は 4°C で保存可能ですが、できるだけ早く使用します。

LB寒天培地粉末 製品番号[L2897](#)

組成=トリプトン 10g/L, イーストエクストラクト 5g/L, NaCl 5g/L, アガー15g/L

NZYM培地の調製方法

使用する物質	使用量(1L 調製用)	製品番号
硫酸マグネシウム七水和物	2 g	M5921
N-Z アミン (N-Z-Amine)	10 g	C7290
イーストエクストラクト (酵母エキス: イースト抽出物)	5 g	Y1000
(オプション)水酸化ナトリウム溶液	数 100 μ L 程度	S8263 (5N溶液)

調製手順

1. 硫酸マグネシウム 7 水和物 2 g、N-Z アミン 10 g、塩化ナトリウム 5 g、イーストエクストラクト 5 g をビーカーまたはフラスコに入れ、蒸留水 1L を静かに入れてスターラーなどを利用してよく混ぜます。
溶解液は酸性になるので、NaOH 溶液を適量加えて pH を中性(7.0 付近)に調製する方法もあります。
正確に培地の濃度を調製するには、1L 弱の水を入れ、pH 調製後にメスシリンダーなどで 1L にメスアップする方法になりますが、ほとんどの場合厳密な濃度の調製は必要ありません。
2. オートクレーブ可能な容器で 121°C、15 分間オートクレーブします。
3. 抗生物質を添加する場合は、オートクレーブ後の培地が十分冷えた状態(通常約 40~50°C 以下)で必要量の抗生物質を無菌的に添加し、よく混ぜます。
分注や培地への大腸菌の植菌などは標準的な無菌状態(バーナーをつけながらの作業)で行います。
未開封の液体培地は冷蔵で保存できますが、特に抗生物質を入れている場合は早めに使用します。

NZYM寒天培地の作製

上記の手順 1 に、アガー(製品番号~)を 15 g 入れて溶液を調製します。
手順 3 の後、培地が温かいうちに滅菌されたプレートなどに入れ、室温で冷まして固まるまで静置します。
寒天培地は 4°C で保存可能ですが、できるだけ早く使用します。

SOC培地の調製方法

SOC 培地は、大腸菌の形質転換後の回復用培地として使用されます。

使用する物質	使用量(1L 調製用)	製品番号
塩化ナトリウム	0.5 g	S7653
トリプトン	20 g	T7293
イーストエクストラクト (酵母エキス; イースト抽出物)	5 g	Y1000
1M 塩化カリウム溶液	2.5 mL (最終濃度 2.5 mM)	2 ページ目参照
1M 塩化マグネシウム溶液	10 mL (最終濃度 10 mM)	2 ページ目参照
1M 硫酸マグネシウム溶液	10 mL (最終濃度 10 mM)	2 ページ目参照
1M グルコース溶液	20 mL (最終濃度 20 mM)	2 ページ目参照
水酸化ナトリウム溶液 (濃度 5N など)	数 100 μ L 程度	S8263 (5N溶液)
蒸留水または脱イオン水	適量	

調製手順

1. 塩化ナトリウム 0.5 g、トリプトン 20 g、イーストエクストラクト 5 g、1M 塩化カリウム溶液 2.5 mL (または塩化カリウム 0.186 g) をビーカーまたはフラスコに入れ、蒸留水 1L を静かに入れてスターラーなどを利用してよく混ぜます。
2. NaOH 溶液を適量加えて pH を 7.0 に調製します。
3. 121°C で 15 分間オートクレーブします。
4. 培地が十分冷えてから、別にオートクレーブした 1M 塩化マグネシウム 10 mL、1M 硫酸マグネシウム 10 mL を無菌的に加え、よく混ぜます。
5. フィルター滅菌した 1M グルコース溶液 20 mL を無菌的に添加し、よく混ぜます。

SOC液体培地 製品番号[S1797](#)

組成=トリプトン 2%、イーストエクストラクト 0.5%、NaCl 8.6 mM、KCl 2.5 mM、MgSO₄ 20 mM、グルコース 20 mM

TB培地の調製方法

TB 培地 (Terrific Broth) は栄養豊富な培地で、大腸菌の培養に用いられます。

使用する物質	使用量(1L 調製用)	製品番号
トリプトン	12 g	T7293
イーストエキストラクト	24 g	Y1000
グリセロール	8 mL	G6279
リン酸水素ニカリウム (K ₂ HPO ₄)	9.4 g	24-5240
リン酸二水素カリウム (KH ₂ PO ₄)	2.2 g	P5655

調製手順

1. トリプトン 12 g、イーストエキストラクト 24 g、リン酸水素 2 カリウム 9.4 g、リン酸 2 水素カリウム 2.2 g をビーカーまたはフラスコに入れ、蒸留水 900 mL を静かに入れてスターラーなどを利用してよく混ぜます。
2. グリセロール 8mL を加えてよく混ぜます。
3. 蒸留水を加えて、1 L にメスアップします。
4. 121°Cで 15 分間オートクレーブします。
5. 抗生物質を添加する場合は、オートクレーブ後の培地が十分冷えた状態で必要量の抗生物質を無菌的に添加し、よく混ぜます。

TB液体培地 製品番号[T5574](#)

組成=トリプトン 12.0 g/L, イーストエキストラクト 24.0 g/L, K₂HPO₄ 9.4 g/L, KH₂PO₄ 2.2 g/L, グリセロール 4 mL/L

TB培地 粉末 製品番号[T9179](#)

製品 48.2 g とグリセロール 8 mL を蒸留水 1L に溶解し、オートクレーブして使用します

大腸菌の培養方法

画線培養

1. 白金耳の先端を 70%アルコールにつけ、バーナーの炎で軽くあぶります。
2. 熱した白金耳の先端をプレート培地の表面に軽くあて(数秒)、白金耳を冷まします。
3. 2 の白金耳の先端を大腸菌の溶液につけ、プレート培地表面に線を描くように塗ります。
4. 塗り終わったらプレートのフタをしめ、37 度で培養します(数時間～一晩)。

シングルコロニーからの液体培養

1. プレート培地で大腸菌を 37 度で数時間～一晩インキュベートしてコロニーを形成させます(画線培養)。
2. プラスチックチューブ(15 mL 遠心チューブなど)に数 mL(2.5 mL など)の液体培地を無菌的に分注します。
補足) 液体培地には使用している大腸菌・プラスミドに適した抗生物質を適量添加します。
3. 滅菌したつまようじ(または白金耳)の先端を、画線培養したプレート上のひとつの大腸菌コロニーに接触させます。
作業は無菌的に行います。
補足) コロニーは完全にかき取る必要はありません。
4. 2 で分注した液体培地に、3 のつまようじの先端を軽く浸します。作業は無菌的に行います。
5. チューブのフタを閉め、ウォーターバス内を用いて 37 度で振とうさせながらインキュベートします。
注意) チューブのフタを完全に閉めると酸素が不足しますので、軽く緩める必要があります。
補足) チューブを斜めにセットすると効率よく振とうすることができます。振とうは激しく(200~300 rpm)行います。ただし、チューブ内にウォーターバスの水が入らないように高さを調整します(揺れたときの培地液面はウォーターバスの水面より下になるようにします)。
6. 数時間～一晩培養します。
補足) このインキュベーション終了時点でプラスミド抽出(プラスミドミニプレップ)を行うこともできます。その他の目的のために大量に培養を行う場合は次の手順に進んで下さい。
7. 予め滅菌した三角フラスコに滅菌済みの液体培地を無菌的に分注し、適切な抗生物質を添加します。
補足) フラスコの容量に対し 1/5~1/4 の液量を入れると効率よく培養できます。培地を三角フラスコに分注してアルミ箔または綿栓でフタをしてオートクレーブを行い、冷めてから抗生物質を添加することもできます。
8. 手順 6 で培養した大腸菌液を 7 のフラスコに無菌的にデカントで注ぎ、アルミ箔または綿栓をして、ウォーターバス内を用いて 37 度で振とうさせながらインキュベートします。
補足) 振とうは激しく(200~300 rpm)行います。ただし、チューブ内にウォーターバスの水が入らないように高さを調整します(揺れたときの培地液面はウォーターバスの水面より下になるようにします)。
9. 目的に応じて数時間～一晩培養します。
補足) 大腸菌の増殖度合いは、分光光度計を用いて 600 nm の吸光度(濁度)を測定することで確認できます。

抗生物質

目的のプラスミドを持つ大腸菌、酵母、植物・動物細胞を選択するために抗生物質が用いられます。プラスミドや宿主によって薬剤の耐性(薬剤耐性遺伝子)が異なりますので、使用するプラスミドに応じて適した抗生物質を用います。

抗生物質は高熱によって失活しやすいので、オートクレーブ後の培地に添加する場合は、十分に冷めてから(40～50℃以下)添加して下さい。

よく用いられる抗生物質	製品番号	
アンピシリンナトリウム塩	A0166	細胞培養テスト済み
カナマイシン硫酸塩	K1377	細胞培養テスト済み
クロラムフェニコール	C1919	細胞培養テスト済み
塩酸テトラサイクリン (テトラサイクリン塩酸塩)	T7660	細胞培養テスト済み
ピューロマイシン二塩酸塩	P9620 (10 mg/mL水溶液)	フィルター滅菌済み
	P8833 (粉)	細胞培養テスト済み

アンピシリン溶液の調製

アンピシリンナトリウム塩(Ampicillin sodium salt)を蒸留水に 5～20 mg/mL の濃度に溶かします。0.22 μ m のフィルターを用いて滅菌します。ストック溶液は-20℃で保存可能です。大腸菌のセレクションには一般的に 20～50 μ g/mL(最終濃度)で使用します。

カナマイシン溶液の調製

カナマイシン硫酸塩(Kanamycin sulfate)を蒸留水に 10 mg/mL の濃度に溶かします。0.22 μ m のフィルターを用いて滅菌します。ストック溶液は 2-8℃で保存可能です。大腸菌のセレクションには一般的に 10～50 μ g/mL(最終濃度)で使用します。

クロラムフェニコール溶液の調製

クロラムフェニコール(Chloramphenicol)をエタノールに 5～20 mg/mL の濃度に溶かしてストック溶液にします。ストック溶液は 2-8℃で保存可能です。大腸菌のセレクションには一般的に 10～20 μ g/mL(最終濃度)で使用します。

テトラサイクリン溶液の調製

塩酸テトラサイクリン(Tetracycline hydrochloride)を蒸留水に 10 mg/mL の濃度に溶かします。0.22 μ m のフィルターを用いて滅菌します。ストック溶液は-20℃で保存可能です。

(注意)塩酸塩ではないテトラサイクリンは水に溶けません。エタノールに可溶です。

大腸菌のセレクションには一般的に 10～20 μ g/mL(最終濃度)で使用します。

ピューロマイシン溶液の調製

ピューロマイシン二塩酸塩(Puromycin dihydrochloride)を蒸留水に 10 mg/mL の濃度に溶かします。0.22 μ m のフィルターを用いて滅菌します。ストック溶液は 4℃で約 1 年、-20℃で長期間保存可能です。真核細胞のセレクションには一般的に 1～10 μ g/mL(最終濃度)で使用します。

大腸菌の形質転換(トランスフォーメーション)

ベクターを導入して宿主の性質を変えることは形質転換(トランスフォーメーション)と呼ばれます。ここではプラスミドで大腸菌を形質転換するプロトコルの例を紹介します。

コンピテントセルと呼ばれる状態の大腸菌にプラスミドを混ぜ、ヒートショックを与えることで大腸菌にプラスミドを導入することができます。

形質転換の例

準備

1. プラスミドに適した抗生物質を含むアガープレート培地を作製します。
2. ウォーターバスを 42°C にセットします。
3. 数 mL 程度の SOC 培地 (製品番号 [S1797](#)) を 20~25°C に温めておきます。

手順

1. 適量のコンピテントセル (50 μ L 程度) をプラスチックチューブ (10~15 mL 程度) に移します。
補足) チューブが厚い場合、熱の伝わり方が弱いことで形質転換の効率が低くなる場合があります。
2. 1~50 ng のプラスミド DNA を手順 1 のコンピテントセルに加え、チューブを指先で軽く数回たたきます (タッピング)。
3. チューブを氷上で 30 秒間静置します。
4. 42°C のウォーターバスにチューブを入れ、正確に 45 秒間静置します (時間が重要です)。
5. チューブを氷上で 2 分間静置します。
6. 450 μ L の SOC 培地を加え、37°C で 1 時間振とう (約 225 rpm) しながらインキュベートします。
7. 準備 1 で作成したプレート培地に大腸菌懸濁液を塗り、37°C で一晩培養します。