
 ■■■ プラスミドの培養について ■■■

■ プラスミドが増えたり増えなかったりという経験はありませんか？3 ml の少量培養なら DNA がとれるのに、それを大量培養するとプラスミドの収量がとても少ない。同じ問題は、あるプラスミドクローンの overnight culture を培養し直した時に起こりました。全く DNA が無いわけではないのですが、大量培養にしては量が少ない。しかし、overnight culture そのものではプラスミド DNA がある程度は取れている。前培養をすると DNA の収量が減る。それはなぜか？もしかしたら、いったん菌が増えきったらプラスミドが脱落していくのではないだろうか？

■ そう考えて、log phase で増やし続ければ問題は起きないのではないだろうか、という前提のもとで実験しました。

■ 08:00、プレートの single colony を 4 ml の培地に植え付けました。

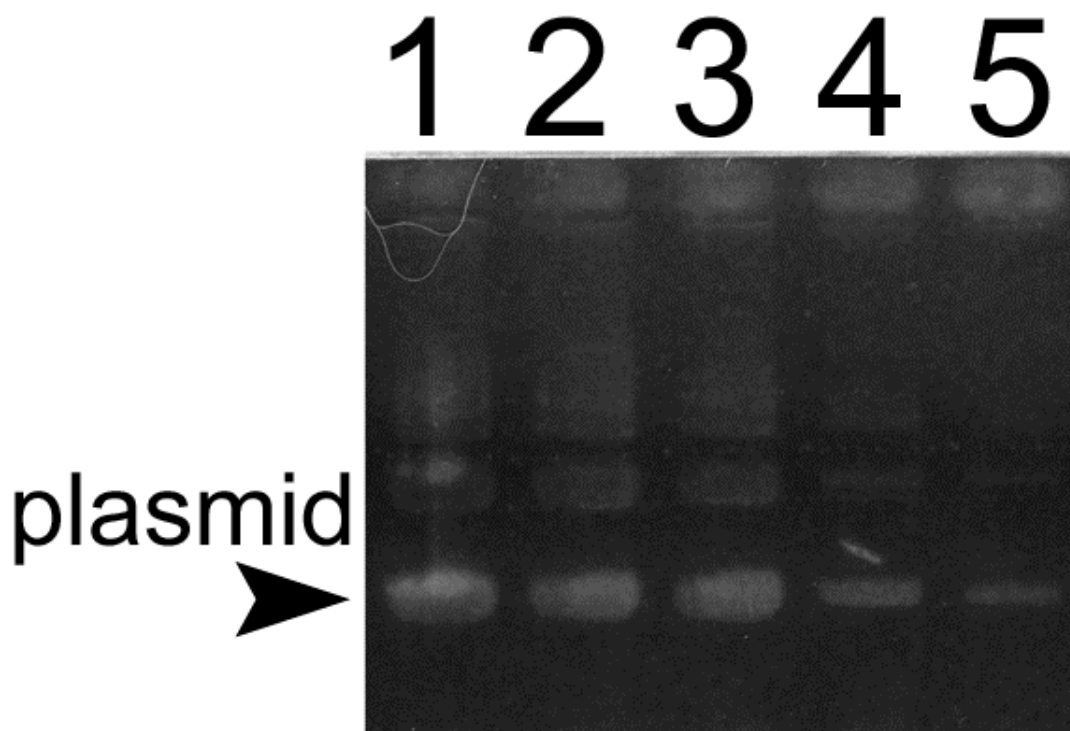
■ 12:00、そこから 100 ul ずつ 5 本の 2 ml 培地に植えました（前培養）。

■ 13:30 から 1 時間おきに、それぞれから 100 ul 取り、2 ml の培地に植えました（本培養）。前培養 3.5 時間で菌の増殖は最大に達しました。

植え付けた時刻とその時の OD は、

1	13:30	0.255
2	14:30	0.680
3	15:30	0.792
4	16:30	0.840
5	17:30	0.799

■ 23:30、それぞれから DNA を調製しました。ゲルイメージは下記にあります。



■ 前培養の増殖が最大に達した菌（4と5）を植え付けた場合は、増殖途中の菌を植え付けた場合（1から3）に比べ、DNAの収量が少なくなりました。このことから、増殖しきった前培養を植え付けた場合は、DNAの収量が少なくなることが分かりました。

■ DNA調製のための大腸菌培養時間に違いがありますが、一番遅く植え付けた場合でも6時間の培養時間があります。12:00にはじめた前培養は、本培養と同じく100ulを2mlの培地に植えていますが、3.5時間で菌の増殖が最大に達していますので、6時間の培養時間は、菌の増殖に十分な時間を経過していると思います。従って、菌の増殖の差がDNAの収量に反映されたわけではないと考えています。

■ プラスミドを大腸菌から調製する場合、菌は増殖させ過ぎずにDNAを調製することが大切であることが分かります。もちろん全ての場合にあてはまるわけではありませんが、いつもうまく行くDNA取りが急にうまく行かなくなった場合には、このお話を思い出して下さい。(TM)

(Mail News 2005.07.30 掲載記事)

=====

発行

理化学研究所・バイオリソースセンター

遺伝子材料開発室

dnabank@brc.riken.jp

<http://www.brc.riken.jp/lab/dna/ja/>

=====