

=====

プラスミドの培養について (2)

=====

入手したプラスミド DNA を形質転換した菌が増えない、という相談を受けました。こういう時には、たいてい、そのプラスミドの宿主として本来指定されている大腸菌系統以外の系統にプラスミドを導入したか、あるいは、プラスミドの薬剤耐性遺伝子を間違えて本来でない抗生物質を含む培地で培養した場合が考えられます。また、本来の正しい抗生物質を含む培地であっても、コンピテントセルと DNA を混ぜた後、寒天培地に播く前に抗生物質を含まない培地中で 30 分程度培養しないと、形質転換効率が低下することがあります。そのような可能性がないかたずねましたところ、抗生物質は正しく使っているし、プラスミドのための特殊な菌株の指定もない。菌はちゃんと生えている、という答えです。

あれあれ？最初の質問は菌が増えない、ということだったので、菌が生えないのかと思っていました。菌は生えている、と言っているのだから、もしかしたら、菌は増えるのに、プラスミドの収量が少ない、と言いたいのだろうか。そう思い、バンクホームページ、ラボマニュアルの Technical notes #01 の「プラスミドの培養について」を紹介しました。そこには、「前培養が長いと、菌は増殖してもプラスミドが増幅されない」ということが書かれています。

ところが、これも違うということでした。つまり、入手したプラスミド DNA で形質転換した直後の大腸菌は、寒天培地の上でコロニーを形成している、ということ。問題はその後で、コロニーをピックアップし、液体培養で大腸菌を大量に得ようとしても、菌が全く増えていない、ということです。それならば、抗生物質を間違えているか、抗生物質の濃度が濃すぎるか？あるいは、寒天培地上では生えて液体培地では生えないということは、液体培養でエアレーションが上手

くっていないのか？そういう可能性を考えて、2 ml 培養で、抗生物質の濃度を変えて何本か培養してはどうか、と勧めました。

さあこれで、菌が増えてくれるだろう、と思いきや、抗生物質の濃度を低くしても、さらには抗生物質を全く入れていない培地でも菌そのものが増えにくい、というお答え。もしかして、もとの DNA にファージでも混入しているのでは？そういう理由で、形質転換してすぐの大腸菌コロニーは得られても、それから培養を重ねた菌は育たないのでは、と思い、次のようなことを勧めました。

1. 入手した DNA で大腸菌を形質転換し、寒天培地上に生やす。
2. そこに TE あるいは PBS をたらし、寒天培地上の菌を回収する。
3. 回収した菌から、通常通りプラスミド DNA を調製する。
4. その調製した DNA をさらにフェノール抽出して精製する。
5. その精製した DNA で新たに形質転換した大腸菌を寒天培地上に生やす。
6. 寒天培地上のコロニーから液体培養する。

このやり方は、見事に的を得、無事、プラスミド DNA を大量調製できたそうです。(T.M.)
(Mail News 2007.08.04 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/>

=====