

## ●液体培養 (図30)

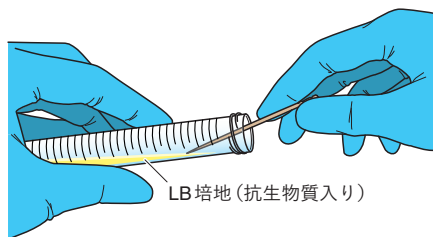
プラスミドを大量に得たいときなど、単一コロニー由来の大腸菌をたくさん殖やしたいときに液体培地での培養を行う。クローニングやコンストラクト作製が目的であれば、3 mL程度の培養液中での培養で充分である。ここでは、一般に使用される遠沈管またはガラス管\*74を用いた液体培養について説明する。

□Step1 予め、培養する容器に抗生物質入りの液体LB培地を分取しておく。15 mL遠沈管またはガラス管を用いる場合は、3 mL程度入れる。

菌体を回収するときにそのまま遠心分離にかけられるので、15 mL遠沈管で培養すると、便利

↓

□Step2 LB培地への植菌



つまようじ\*75でコロニーをつついて先端に付着した菌を、チューブを少し傾け、液体LB培地に植菌する。

↓

□Step3 図31のように、斜めに立てて一晩振盪培養。遠沈管を用いる場合は、大腸菌が酸欠にならないように、蓋は完全には閉めない。ガラス管を用いる場合は、通気性のよいシリコセン®をいれるだけでOK。

また、ガラス管とシリコセン®(図32)を用いる場合は、培養液を回収した後にオートクレーブ処理して洗浄することで、何度でも利用できる。

\*74 タンパク質発現用など、より大量に培養したいときは、表3 (p.18) に示すような容器を用いる

\*75 使用後のつまようじはオートクレーブして廃棄



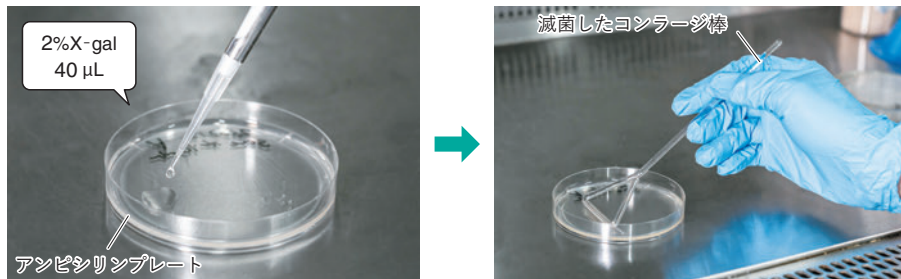
図31 液体培養に用いる恒温シェーカー

斜めに遠沈管またはガラス管を立てて振盪培養する



図32 シリコセン

- Step5 アンピシリン入りLBプレートに、2% X-galを40  $\mu$ Lを撒く(エタノール+バーナー等で滅菌したコンラージ棒を用いる、[動画7](#)) lacZ $\Delta$ M15変異をもたない大腸菌がよく使われる。大腸菌株の多くがこの変異をもつため(p.21 [表4](#) 参照), IPTG添加は多くの場合不要。用いる場合には100 mM IPTGも40  $\mu$ L加える。

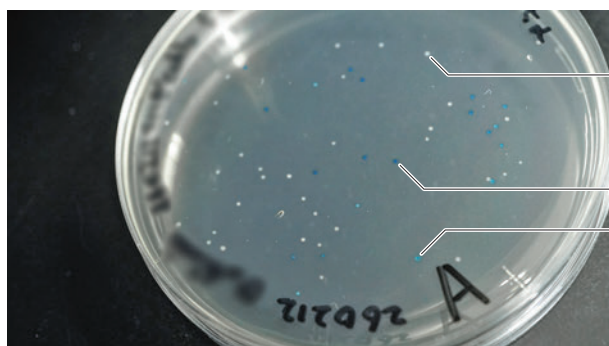


- Step6 Step5で用意したLB/Amp+X-galプレートにSOC入りのコンピテントセルを全量撒く  
通常100  $\mu$ Lくらい<sup>\*15</sup>。

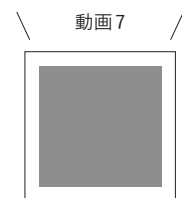


- Step7 プレートを一晩37°Cで培養(静置)

- Step8 翌日、「白色コロニー」を確認後、コロニーPCRの準備を行う



青いコロニーはインサートが入っていない(セルフライゲーションした)ベクターである。ただ、インサートが入っていても「薄い青」がでることもあるので、念のため「薄い青」もコロニーPCRで検証することもある。



大腸菌をプレートに撒く



トランスフォーメーションからPCRまで

<sup>\*15</sup> p.30に示した濃淡2種類作る撒き方を推奨

## ● 試薬の組成

マスターミックス

	1 sample	(n+2) sample
□ KAPA SYBR Fast qPCR Kit (2×ready mix)	10 μL	10 × (n+2) μL
□ 10 μM Forward プライマー	0.6 μL	0.6 × (n+2) μL
□ 10 μM Reverse プライマー	0.6 μL	0.6 × (n+2) μL
□ 超純水	3.8 μL	3.8 × (n+2) μL
合計	15 μL	

n = サンプルとスタンダードの数の合計

## ● 手順 (アプライからPCR装置へセットするまで)

- Step1 鋳型cDNA溶液以外のマスターミックスを作製し、96ウェルプレート<sup>\*30</sup>の各ウェル(図8)に15 μLずつ入れる<sup>\*31</sup>
  - ↓
- Step2 1ウェルに5 μLずつcDNA溶液〔サンプルまたはスタンダード(スタンダードの作り方についてはp.125参照)〕を入れる
  - ↓
- Step3 蓋を締める, または, シールしたのち, プレート遠心機(図9)<sup>\*32</sup>で壁面に残った溶液を落とし, リアルタイムPCR装置にセットする



図8 96ウェルプレート

\ダウンロード/



リアルタイムPCRの試薬の組成

**\*30** リアルタイムPCRで使用可能な8連チューブもある。このタイプはシールではなく透明な蓋をしめる。また、ウェルが100 μLのもの、200 μLのもの、色が白と透明のものがある。一般に透明のものより白い方が蛍光強度が高く検出される。リアルタイムPCR装置の推奨品を用いた方が失敗や故障のリスクが少ないため、初めて使う場合は指導者に消耗品を確認すること



**\*31** 電動マイクロピペット(本シリーズ『分子生物学実験の基本』p.39参照)を使用すると便利



**\*32** 遠心機がない場合は, サラダスピナーで代用可能



\ダウンロード/



96ウェルプレートのサンプルシート表(excel)