

LB-Medien und -Agars

Empfohlene Medien zur Kultivierung von rekombinanten *Escherichia coli* in der Molekularbiologie

X964, 6669, 0155, X965, 6671, 0159, X968, 6673, X969, 6675

Zusammensetzung in g/l (angenähert):

Best.-Nr.	Nährmedium	Trypton*	Pflanzliches Pepton	Hefeextrakt	NaCl	Agar-Agar	pH Wert	Granulierung	Menge im Ansatz
X964	LB-Medium (Lennox)	10 g/l	-	5 g/l	5 g/l	-	7,0±0,2	-	20 g/l
6669	LB-Medium (Lennox), granuliert	10 g/l	-	5 g/l	5 g/l	-	7,0±0,2	granul.	20 g/l
0155	LB-Medium (Lennox) vegetal	-	10 g/l	5 g/l	5 g/l	-	7,0±0,2	-	20 g/l
X965	LB-Agar (Lennox)	10 g/l	-	5 g/l	5 g/l	15 g/l	7,0±0,2	-	35 g/l
6671	LB-Agar (Lennox), granuliert	10 g/l	-	5 g/l	5 g/l	15 g/l	7,0±0,2	granul.	35 g/l
0159	LB-Agar (Lennox) vegetal	-	10 g/l	5 g/l	5 g/l	15 g/l	7,0±0,2	-	35 g/l
X968	LB-Medium (Luria/Miller)	10 g/l	-	5 g/l	10 g/l	-	7,0±0,2	-	25 g/l
6673	LB-Medium (Luria/Miller), granul.	10 g/l	-	5 g/l	10 g/l	-	7,0±0,2	granul.	25 g/l
X969	LB-Agar (Luria/Miller)	10 g/l	-	5 g/l	10 g/l	15 g/l	7,0±0,2	-	40 g/l
6675	LB-Agar (Luria/Miller), granuliert	10 g/l	-	5 g/l	10 g/l	15 g/l	7,0±0,2	granul.	40 g/l

* Aus pankreatischem Verdau von Casein.

HERSTELLUNG

Die in der oben stehenden Tabelle angegebene Menge des Mediums wird in einem Liter destillierten Wassers suspendiert. Gut mischen und unter häufigem Rühren/Schütteln erhitzen. LB-Agar sollte eine Minute kochen bis das Pulver vollständig gelöst ist. Im Autoklaven bei 121 °C 15 Minuten lang sterilisieren.

Im Wasserbad auf 45-50 °C abkühlen lassen. Optional: Zugabe von Antibiotika nach Bedarf und nachdem das Medium auf unter 50 °C abgekühlt ist. Gut mischen und in sterilisierte Röhrchen (Medium) bzw. Petrischalen (Agar) gießen.

Nach dem Ansatz sollte das Medium bei 2-8 °C aufbewahrt werden und kann für etwa 4 Wochen verwendet werden, solange die Sterilität garantiert ist. Die Farbe ist bernsteinfarben, gelierter Agar ist leicht schillernd.

EINSATZGEBIET

LB (Lysogeny Broth) Medien bilden eine Gruppe von reichhaltigen Nährlösungen zur Anzucht und Kultivierung von *E. coli* Bakterien. Das erste LB-Medium wurde ursprünglich von Guiseppe Bertani im Jahr 1951 entwickelt, um das Wachstum von *Shigella* und die Plaquebildung von P1, P2 und P3 Phagen¹ zu optimieren. Seitdem werden die Medien äußerst häufig zur Vermehrung von *E. coli* im Allgemeinen und von rekombinanten *E. coli* im Besonderen verwendet, sowie zur Plasmidpropagation und die Proteinexpression *in vitro*.

Während der folgenden Jahre wurden einige Modifikationen eingeführt, u.a. durch das Weglassen der ursprünglich enthaltenen Glucose. In einigen Formulierungen wurde das Natriumchlorid reduziert^{2,3}, um optimale Bedingungen für salzsensitive Bakterienstämme oder die Verwendung salzsensitiver Antibiotika (z.B. Blastidicin, Hygromycin B, Puromycin) zu schaffen. Standardantibiotika, die für die Selektion rekombinanter Bakterien verwendet werden (z.B. Ampicillin, Tetracyclin, Kanamycin B oder Chloramphenicol), sind nicht salzsensitiv und können problemlos mit Hochsalz-LB-Medium verwendet werden. Die niedrigeren Salzkonzentrationen werden außerdem für die Phagenpropagation verwendet, da in diesen Fällen Magnesiumchlorid zugegeben werden muss, das den osmotischen Druck weiter erhöht.

Trypton stellt Stickstoff, Vitamine, Mineralien und essentielle Aminosäuren für das Bakterienwachstum bereit. Hefeextrakt ist eine reichhaltige Quelle für Vitamine, vor allem der B-Gruppe. Natriumchlorid liefert wichtige Elektrolyte. In LB-Agar ist hochreiner Agar-Agar als Geliermittel zugegeben.

Durch Zugabe von Antibiotika kann ein selektives LB-Medium hergestellt werden. IPTG und X-β-Gal können zur Induktion der Proteinexpression zugegeben werden (Blau/Weiß-Selektion). Die Addition von 10-20 mM Magnesium (als MgCl₂ oder MgSO₄) kann in den flüssigen Medien die erzielte Zelldichte steigern.

MIKROBIOLOGISCHE TESTS

Die folgenden Ergebnisse wurden erzielt nach Inkubation von Referenzstämmen im angegebenen Medium / Agar bei einer Temperatur von 35±2 °C für 18-24 Stunden.

Mikroorganismen	Wachstum
<i>Escherichia coli</i> ATCC 23724	Gut
<i>Escherichia coli</i> ATCC 53868	Gut
<i>Escherichia coli</i> ATCC 33694	Gut
<i>Escherichia coli</i> ATCC 33849	Gut

Nach:

- 1.) Bertani, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62:293-300 (1951)
- 2.) Lennox, E. S. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* 1:190-206 (1955)
- 3.) Luria, S. E.; Adams, J. N.; Ting, R. C. Transduction of lactose-utilizing ability among strain of *E. coli* and *S. dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles. *Virology* 12:348-390 (1960)
- 4.) Miller, J. H. Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, N.Y. (1972)
- 5.) Atlas, R.M., Parks L.C. Handbook of Microbiological Media. *CRC Press*, Inc. London (1993)
- 6.) Sambrook and Russell. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)

LB-Medium (Lennox)	500 g	X964.1
	1 kg	X964.2
	2,5 kg	X964.3
	5 kg	X964.4

LB-Agar (Lennox)	500 g	X965.1
	1 kg	X965.2
	2,5 kg	X965.3

LB-Medium (Lennox), granuliert	500 g	6669.1
	1 kg	6669.2
	2,5 kg	6669.3
	5 kg	6669.4

LB-Agar (Lennox), granuliert	500 g	6671.1
	1 kg	6671.2
	2,5 kg	6671.3

LB-Medium (Lennox) vegetal	500 g	0155.1
	1 kg	0155.2

LB-Agar (Lennox) vegetal	500 g	0159.1
	1 kg	0159.2

LB-Medium (Luria/Miller)	500 g	X968.1
	1 kg	X968.2
	2,5 kg	X968.3
	5 kg	X968.4

LB-Agar (Luria/Miller)	500 g	X969.1
	1 kg	X969.2
	2,5 kg	X969.3
	5 kg	X969.4

LB-Medium (Luria/Miller), granuliert	500 g	6673.1
	1 kg	6673.2
	2,5 kg	6673.3
	5 kg	6673.4

LB-Agar (Luria/Miller), granuliert	500 g	6675.1
	1 kg	6675.2
	2,5 kg	6675.3

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 • 76185 Karlsruhe • Postfach 100121 • 76231 Karlsruhe
 Telefon: +49 (0) 721/ 5606-0 • Fax: +49 (0) 721/ 5606-149 • info@carlroth.de • www.carlroth.de

Die Firma ist eine Kommanditgesellschaft mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRA 100055. Persönlich haftende Gesellschafterin ist die Roth Chemie GmbH mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRB 100428. Geschäftsführer: André Houdelet

sse 07/2021



LB Media and -Agars

Recommended media for growth of recombinant *Escherichia coli* in genetic engineering

X964, 6669, 0155, X965, 6671, 0159, X968, 6673, X969, 6675

Approximate formulation in g/l:

Art. No.	Nutrient Medium	Tryptone*	Vegetable peptone	Yeast extract	NaCl	Agar-Agar	pH value	Granulation	Preparation
X964	LB Broth (Lennox)	10 g/l	-	5 g/l	5 g/l	-	7.0±0.2	-	20 g/l
6669	LB Broth (Lennox), granulated	10 g/l	-	5 g/l	5 g/l	-	7.0±0.2	yes	20 g/l
0155	LB Broth (Lennox) vegetal	-	10 g/l	5 g/l	5 g/l	-	7.0±0.2	-	20 g/l
X965	LB Agar (Lennox)	10 g/l	-	5 g/l	5 g/l	15 g/l	7.0±0.2	-	35 g/l
6671	LB Agar (Lennox), granulated	10 g/l	-	5 g/l	5 g/l	15 g/l	7.0±0.2	yes	35 g/l
0159	LB Agar (Lennox) vegetal	-	10 g/l	5 g/l	5 g/l	15 g/l	7.0±0.2	-	35 g/l
X968	LB Broth (Luria/Miller)	10 g/l	-	5 g/l	10 g/l	-	7.0±0.2	-	25 g/l
6673	LB Broth (Luria/Miller), granulated	10 g/l	-	5 g/l	10 g/l	-	7.0±0.2	yes	25 g/l
X969	LB Agar (Luria/Miller)	10 g/l	-	5 g/l	10 g/l	15 g/l	7.0±0.2	-	40 g/l
6675	LB Agar (Luria/Miller), granulated	10 g/l	-	5 g/l	10 g/l	15 g/l	7.0±0.2	yes	40 g/l

* Pancreatically digested peptone from casein.

PREPARATION

Suspend the amount of the powdered medium mentioned in the table (see above) in one litre of distilled or deionized water. Mix well and heat with frequent agitation. LB agars should be boiled for one minute until fully dissolved. Sterilize in an autoclave at 121 °C for 15 minutes.

Cool to 45-50 °C in a water bath. Optionally add antibiotics as required after the medium has cooled to below 50 °C. Mix well and dispense into sterilized tubes (broth) or petri dishes (agar). The prepared medium should be stored at 2-8 °C and may be used for approx. 4 weeks, as long as sterility is guaranteed. The colour is amber, hardened agars are slightly opalescent.

USES

LB (Lysogeny Broth) media is a group of nutritionally rich growth solutions for the propagation and maintenance of *E. coli* bacteria. Originally, the first LB medium has been developed by Guiseppe Bertani in 1951 in order to optimise growth of *Shigella* and plaque formation of P1, P2 and P3 phages¹. Since then, the media were, and still are, widely used for growth of *E. coli* in general and recombinant *E. coli* in particular, as well as for propagation of plasmids and expression proteins *in vitro*.

During the following years, some modifications were implemented including the omittance of the originally used glucose. In some formulations, sodium chloride has been reduced^{2,3}, in order to provide optimised conditions for salt sensitive bacterial strains or salt sensitive antibiotics (e.g. blasticidin, hygromycin B, puromycin).

Standard antibiotics used for selection of recombinants, for instance ampicillin, tetracycline, kanamycin B or chloroamphenicol, are not salt sensitive and may well be used with high-salt LB medium. Lower salt concentrations are also used for phage propagation, since magnesium chloride has to be added, raising the osmotic pressure further.

Tryptone provides nitrogen, vitamins, minerals and amino acids essential for growth. Yeast extract is a rich source of vitamins, particularly the B-group. Sodium chloride supplies essential electrolytes for transport and osmotic balance. In LB agars, high-pure agar-agar is added as solidifying agent.

By addition of antibiotics, a selective LB medium may be prepared. IPTG and X-β-Gal may be added for induction of protein expression. In the liquid media, addition of 10-20 mM magnesium (as MgCl₂ or MgSO₄) may increase the cell density achieved.

MICROBIOLOGICAL TEST

The following results were obtained in the performance of the given medium from type cultures after incubation at a temperature of 35±2 °C and observed after 18-24 hours.

Microorganisms	Growth
<i>Escherichia coli</i> ATCC 23724	Good
<i>Escherichia coli</i> ATCC 53868	Good
<i>Escherichia coli</i> ATCC 33694	Good
<i>Escherichia coli</i> ATCC 33849	Good

Acc. to:

- 1.) Bertani, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62:293-300 (1951)
- 2.) Lennox, E. S. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* 1:190-206 (1955)
- 3.) Luria, S. E.; Adams, J. N.; Ting, R. C. Transduction of lactose-utilizing ability among strain of *E. coli* and *S. dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles. *Virology* 12:348-390 (1960)
- 4.) Miller, J. H. Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.* (1972)
- 5.) Atlas, R.M., Parks L.C. Handbook of Microbiological Media. *CRC Press, Inc. London* (1993)
- 6.) Sambrook and Russell. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.* (2001)

LB Broth (Lennox)	500 g	X964.1	LB Agar (Lennox)	500 g	X965.1
	1 kg	X964.2		1 kg	X965.2
	2.5 kg	X964.3		2.5 kg	X965.3
	5 kg	X964.4			

LB Broth (Lennox), granulated	500 g	6669.1	LB Agar (Lennox), granulated	500 g	6671.1
	1 kg	6669.2		1 kg	6671.2
	2.5 kg	6669.3		2.5 kg	6671.3
	5 kg	6669.4			

LB Broth (Lennox) vegetal	500 g	0155.1	LB Agar (Lennox) vegetal	500 g	0159.1
	1 kg	0155.2		1 kg	0159.2

LB Broth (Luria/Miller)	500 g	X968.1	LB Agar (Luria/Miller)	500 g	X969.1
	1 kg	X968.2		1 kg	X969.2
	2.5 kg	X968.3		2.5 kg	X969.3
	5 kg	X968.4		5 kg	X969.4

LB Broth (Luria/Miller), granulated	500 g	6673.1	LB Agar (Luria/Miller), granulated	500 g	6675.1
	1 kg	6673.2		1 kg	6675.2
	2.5 kg	6673.3		2.5 kg	6675.3
	5 kg	6673.4			

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 • 76185 Karlsruhe • P.O. Box 100121 • 76231 Karlsruhe
 Phone: +49 (0) 721/ 5606-0 • Fax: +49 (0) 721/ 5606-149 • info@carlroth.com • www.carlroth.com

The company is a limited partnership with headquarters in Karlsruhe, reg. court Mannheim HRA 100055. Roth Chemie GmbH, with headquarters in Karlsruhe, reg. court Mannheim HRB 100428, is the personally liable partner. Managing Director: André Houdelet. Sales tax identification number: DE 143621073.

sse 07/2021