

TB Autoinduct-Medium

Autoinduktives TB-Medium für die IPTG-freie Proteinexpression in rekombinanten *Escherichia coli*.

9191

Zusammensetzung in g/l (angenähert):

Trypton.....	12,0
Hefeextrakt	24,0
Lactose	2,0
Glucose.....	0,5
Salze nach Studier	17,05
pH	7,0 ± 0,2

HERSTELLUNG

55,55 g des Mediums werden in einem Liter destillierten Wasser suspendiert. Gut mischen und unter häufigem Rühren/Schütteln erhitzen. Eine Minute kochen bis das Pulver vollständig gelöst ist. Im Autoklaven bei 115 °C 20 Minuten lang sterilisieren.

Optional: Zugabe von Antibiotika nach Bedarf und nachdem das Medium auf unter 50 °C abgekühlt ist. Gut mischen und in sterilisierte Rörchchen oder Kolben verteilen.

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.

EINSATZGEBIET

TB-Medium ohne Spurenelemente, mit Zusatz der Autoinduktionsmischung nach Studier¹.

TB Autoinduct-Medium bietet sehr reichhaltige Nährstoffe, vor allem auf Basis von Hefeextrakt, für ein schnelles Wachstum rekombinanter Stämme von *E. coli*. TB Autoinduct-Medium ist geeignet zur Autoinduktion jeder *lac*-Promotor gesteuerten, IPTG-induzierbaren Proteinexpression in rekombinanten *E. coli*.

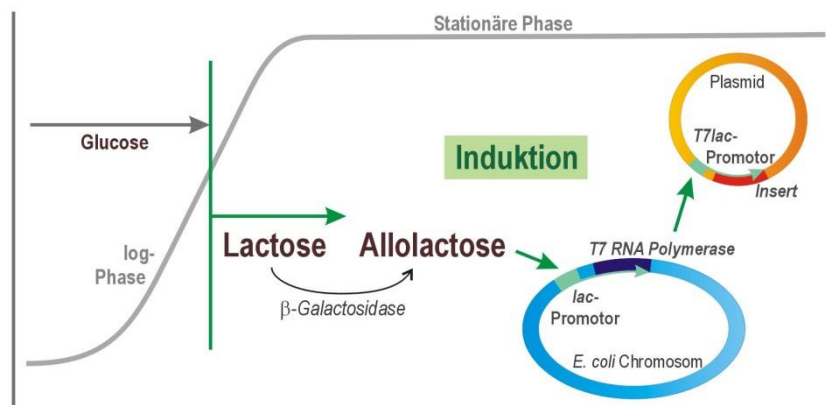
TB (Terrific Broth)-Medium ist eine besonders reichhaltige Nährlösung, die eine sehr hohe Zelldichte fördert und die Kultur für längere Zeit in der logarithmischen Wachstumsphase hält. In Folge werden große Mengen Plasmid-DNA und rekombinante Proteine in den Zellen produziert und können eluiert werden². Durch den hohen Nährstoffgehalt und die Bereitstellung von Aminosäuren, Nukleotidprecursors und (im Besonderen) Vitaminen wachsen *E. coli* in TB-Medium zu einer höheren Zelldichte als in LB-Medien.

TB-Medium gilt als optimales Medium für die Bakterienpropagation, wenn Plasmid-codierte Proteine isoliert werden sollen.

Die Stärke des Zellwachstums in den Flüssignährmedien ist wie folgt:

LB Medium < 2x YT Medium < Super Broth < TB-Medium (Terrific Broth)

Autoinduktionsmedien erzielen eine hohe Zelldichte und eine Proteinexpressionsrate, die um ein Vielfaches über der von IPTG-gesteuerten Prozessen liegt. In Autoinduktionsmedien startet die Proteinexpression spontan zu einem bestimmten Punkt während der Entwicklung der Bakterienkultur, ohne dass die Kulturdichte überwacht werden oder IPTG zugegeben werden muss. Durch Zugabe von Antibiotika kann ein Selektivmedium hergestellt werden.



Der Wirkmechanismus der Autoinduktionsmedien basiert auf Kohlenstoffquellen im Medium, die differentiell metabolisiert werden, resultierend in einer hohen Zelldichte und der automatischen *lac*-Promotor-vermittelten Proteinexpressionsinduktion.

Autoinduktionsmedien enthalten als Kohlenstoffquellen Lactose und eine begrenzte Menge Glucose. Während der Zellproliferation wird zunächst die Glucose verstoffwechselt. Während dieser Zeit, bis etwa zur mittleren bis späten log-Phase, bleibt die Aufnahme der Lactose inhibiert. Sobald die Glucose verbraucht ist, kann die Lactose aufgenommen werden und wird intrazellulär durch das Enzym β -Galactosidase in den Induktor Allolactose umgewandelt. Allolactose bewirkt die Freisetzung des Lac-Repressors von seiner spezifischen Bindungsstelle in der DNA, vor allem *lac*-Operatoren, sodass *lac*-Promotor gesteuerte Gensequenzen exprimiert werden können. In *E. coli* des Genotyps DE3 deblockiert sie *T7lac*-Promotoren und induziert die *lacUV5*-gesteuerte Expression der T7 RNA-Polymerase, was zur Expression der T7-RNA-Polymerase Targetproteine führt.

Trypton stellt Stickstoff, Vitamine, Mineralien und essentielle Aminosäuren für das Bakterienwachstum bereit. Hefeextrakt ist eine reichhaltige Quelle für Vitamine, vor allem der B-Gruppe. Die Glucose stellt anfänglich ein Energiereservoir für das Wachstum dar, während die Lactose nach Verbrauch der Glucose die Proteinexpression induziert. Die Studiersalze bilden eine optimierte, physiologische Umgebung für die Zellen.

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 33694	Gut
<i>Escherichia coli</i> ATCC 33849	Gut
<i>Escherichia coli</i> ATCC 53868	Gut

Nach:

- 1.) Studier, F.W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* 41:207-234 (2005)
- 2.) Tartof, K.D., Hobbs, C.A. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res. Lab. Focus* 9:12 (1987)
- 3.) Sambrook und Russell. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)

TB Autoinduct-Medium	100 g	9191.1
	250 g	9191.2
	500 g	9191.3
	1 kg	9191.4
	2,5 kg	9191.5

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 _ 76185 Karlsruhe
 Postfach 100121 _ 76231 Karlsruhe
 Telefon: +49 (0) 721/5606-0 _ Telefax: +49 (0) 721/5606-149
 E-Mail: info@carlroth.de _ Internet: www.carlroth.de

Product Data Sheet



Terrific Broth Autoinduct

Autoinductive Terrific Broth for IPTG free protein expression in recombinant *Escherichia coli*

9191

Approximate formulation in g/l:

Tryptone.....	12.0
Yeast Extract	24.0
Lactose	2.0
Glucose.....	0.5
Salts acc. to Studier.....	17.05
pH	7.0 ± 0.2

PREPARATION

Suspend 55.55 g of the medium in one litre of distilled or deionized water. Mix well and heat with frequent agitation. Boil for one minute until fully dissolved. Sterilize in an autoclave at 115 °C for 20 minutes. Optionally add antibiotics as required after the medium has cooled to below 50 °C. Mix well and dispense into sterilized tubes. 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.

USES

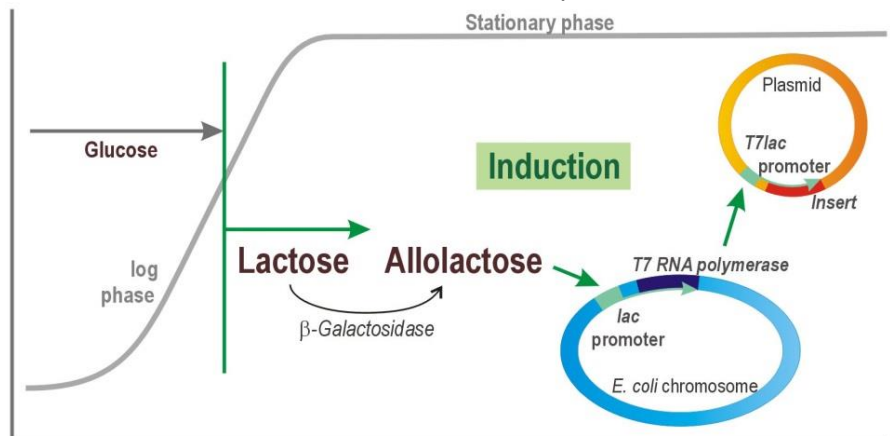
Terrific Broth without trace elements, supplemented with the autoinduction mixture acc. to Studier¹. Due to the heavy enrichment of nutrients, yeast extract in particular, Terrific Broth Autoinduct is well suited for fast growth of recombinant strain of *E. coli*. Terrific Broth Autoinduct may be used for autoinduction of each *lac* promoter-driven, IPTG-inducible, protein expression in recombinant *E. coli*.

Terrific Broth is a very rich growth solution which supports a high cell density and maintains growth in the logarithmic phase for a long time. It, therefore, results in high amounts of produced - and recovered - plasmic DNA and recombinant proteins². In Terrific broth, *E. coli* grows to higher cell density as is known from LB or 2x YT broth, as it contains amino acids, precursors of nucleotides, vitamins in particular and other metabolisms in a very high amount.

Terrific Broth is regarded as best choice for bacterial propagation when plasmid encoded proteins are to be isolated.

Quality of cell growth in the liquid media is as follows: LB Broth < 2x YT Broth < Super Broth < Terrific Broth

Autoinduction media result in high cell density and a protein expression rate several-fold as high as known from IPTG-induced processes. Hereby, protein expression is occurring spontaneously at a certain point in bacterial culture development, eliminating the need of monitoring the culture density or adding IPTG. By addition of antibiotics, a selective medium may be prepared.



The principle of autoinduction media is based on carbon sources in the medium that are metabolized differentially to promote high density cell growth and automatically induce protein expression driven by *lac* promoters. Autoinduction media contain lactose as well as a limited concentration of glucose as the carbon source. The Glucose is metabolized preferentially during cell proliferation, which prevents uptake of lactose until the glucose is depleted, usually in mid to late log phase. As the glucose is depleted, lactose can be taken up and is then converted by the enzyme β -galactosidase to the inducer allolactose. Allolactose causes the release of the Lac repressor from its specific binding sites in the DNA, particularly *lac* operators, leading to the expression of *lac* promoter driven gene sequences. In *E. coli* of genotype DE3 it unblocks *T7lac* promoters and induces the *lacUV5* driven expression of T7 RNA polymerase, resulting in the expression of T7 RNA polymerase target proteins.

Tryptone provides nitrogen, vitamins, minerals and amino acids essential for growth. Yeast extract is a rich source of vitamins, particularly the B-group. Glucose initially provides growth energy, while lactose induces protein expression after depletion of glucose. Studier salts provide an optimised physiologic environment for the cells.

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 33694	Good
<i>Escherichia coli</i> ATCC 33849	Good
<i>Escherichia coli</i> ATCC 53868	Good

Acc. to:

- 1.) Studier, F.W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* 41:207-234 (2005)
- 2.) Tartof, K.D., Hobbs, C.A. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res. Lab. Focus* 9:12 (1987)
- 3.) Sambrook and Russell. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)

Terrific Broth Autoinduct	100 g	9191.1
	250 g	9191.2
	500 g	9191.3
	1 kg	9191.4
	2.5 kg	9191.5

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 _ 76185 Karlsruhe
 Postfach 100121 _ 76231 Karlsruhe
 Telefon: +49 (0) 721/5606-0 _ Telefax: +49 (0) 721/5606-149
 E-Mail: info@carlroth.de _ Internet: www.carlroth.de