

これからのクローニングはハイクオリティー コンピテントセルで！！

E. coli HST08 Premium Competent Cells

製品コード 9128 1 Set (100 μ l \times 10) ¥20,000

- ルーチンクローニングにも、長鎖 DNA (10 kb 以上) のクローニングにも最適！
- メチル化 DNA のクローニングが可能
- cDNA ライブラリーやゲノムライブラリーの作製にもお勧め！
- SOC 培地、コントロールプラスミドを添付

E. coli HST08 Premium Competent Cells は、クローニングに必要なほぼすべての要素を併せ持つ新しい大腸菌株のコンピテントセルです。

HST08 Premium 株は外来のメチル化 DNA を切断する遺伝子群 (*mcrA*, *mrr-hsdRMS-mcrBC*) を完全に欠失しており、さらに非常に高い形質転換能力を有しているため、メチル化された DNA のクローニングから cDNA ライブラリーやゲノム DNA ライブラリーの作製、サブクローニングまで幅広い用途に使用できます。長鎖プラスミド DNA の形質転換能力にも優れており、TaKaRa DNA Ligation Kit LONG (製品コード 6024) と組み合わせることで、10 kb 以上の長鎖 DNA 断片のクローニングやライブラリー作製も容易に行えます。本株は F⁻ であり、BAC、Fosmid ベクターが使用可能です。また、pUC 系プラスミドでの形質転換の際には、 β -ガラクトシダーゼの α -相補性を利用して X-Gal による組換え体の青/白選択が可能です。

【HST08 Premium の遺伝子型】

F⁻, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *relA1*, *gyrA96*, *phoA*, ϕ 80*dlacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*) U169, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Δ *mcrA*, λ ⁻

■ 実験例

本製品と *E. coli* DH5 α Competent Cells (製品コード 9057)、ならびに A 社製 DH10B コンピテントセルを用いて形質転換効率を比較しました。カタログに表示された各製品の形質転換効率は、 $>1.0 \times 10^8$ 、 $>1.0 \times 10^8$ 、および $>1.0 \times 10^9$ 形質転換体 / μ g pUC19 DNA です。

実験例 1：精製プラスミドを用いた形質転換効率の比較

【方法】

2 kb (100 pg)、10 kb (1 ng)、20 kb (1 ng) のプラスミド DNA を用いて各コンピテントセルを形質転換し、アンピシリンを含む LB 寒天培地にプレーティング後、得られたコロニー数から形質転換効率を計算した。さらに、

2 kb プラスミド DNA での形質転換効率をそれぞれ 100 % として、10 kb、20 kb プラスミドでの形質転換効率の比率を算出した (形質転換比率)。

【結果】

E. coli HST08 Premium Competent Cells では、2 kb、10 kb、20 kb のいずれのサイズのプラスミド DNA でも、A 社製 DH10B コンピテントセルと同等以上の形質転換効率を得られました (図1)。また、10 kb、20 kb のプラスミド DNA の形質転換では、長鎖プラスミドの形質転換によく用いられる DH5 α 、DH10B と比較して約 2 倍高い形質転換比率を得ることができました (図2)。

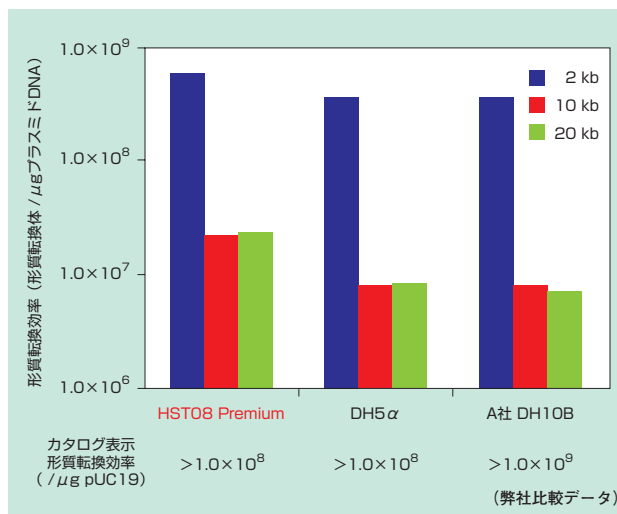


図1 精製プラスミドを用いた形質転換効率の比較

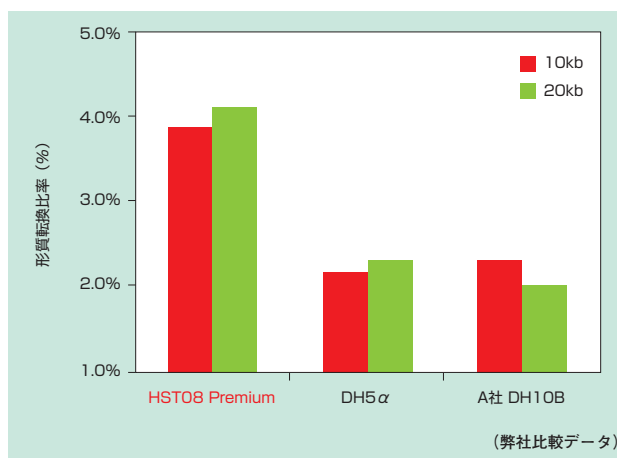


図2 長鎖プラスミド形質転換比率の比較 (2 kb プラスミド DNA の各形質転換効率を 100 % として算出)

実験例 2 : ライゲーション反応液を用いた形質転換効率の比較

【方法】

2 kb、20 kbの DNA断片と pUC118 *Hind* III/BAP (製品コード 3324) のライゲーション反応を、それぞれ DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (製品コード 6023) および TaKaRa DNA Ligation Kit LONG を用いて実施した。上記反応液の一部を用いて各コンピテントセルを形質転換し、アンピシリンを含む LB (+X-Gal) 寒天培地にプレティング後、得られた白色コロニーの数から形質転換効率を計算した。さらに、2 kb DNA断片のライゲーション反応液による形質転換効率をそれぞれ 100 % として、20 kb DNA断片ライゲーション反応液による形質転換比率を算出した。

- **2 kb DNA断片のライゲーション反応条件**
2 kb DNA/*Hind* III (100 ng) と pUC118 *Hind* III/BAP (50 ng) のライゲーション反応は、DNA Ligation Kit <Mighty Mix> を用いて行った。
- **20 kb DNA断片のライゲーション反応条件**
20 kb DNA/*Hind* III (75 ng) と pUC118 *Hind* III/BAP (25 ng) は、TaKaRa DNA Ligation Kit LONG を用いて 16°C で 6 時間、ライゲーション反応を行った。

【結果】

ライゲーション反応液を用いた形質転換においても、インサートサイズ 2 kb、20 kb の両者で *E. coli* HST08 Premium Competent Cells を用いた場合に最も高い形質転換効率が見られました (図 3)。特に 20 kb 断片のクローニングでは顕著な差が見られ、DH5α、DH10B と比較して長鎖断片のクローニングでの形質転換比率が高いことがわかりました (図 4)。この特性は通常のクローニング作業を効率的にするだけでなく、特に cDNA ライブラリーやゲノムライブラリー作製において、ライブラリー中の長鎖 DNA断片の含有率を高めると考えられます。

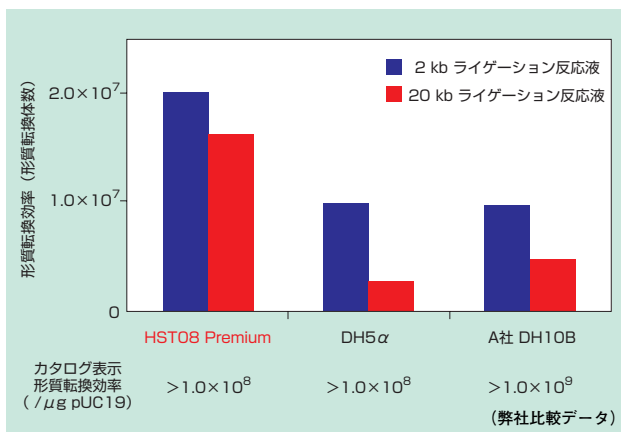


図 3 ライゲーション反応液を用いた形質転換効率の比較

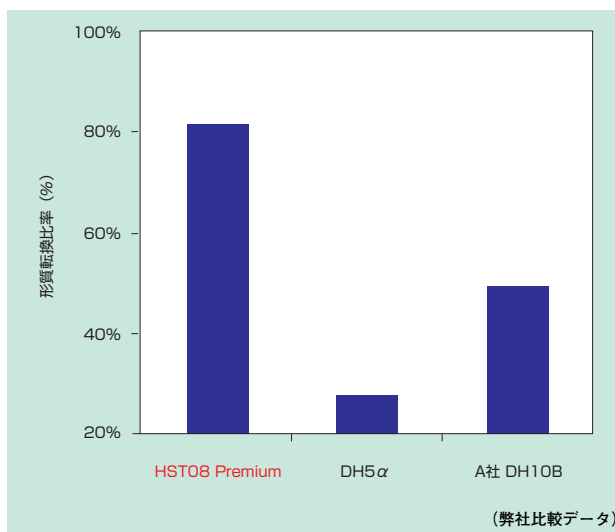


図 4 20 kb DNA断片クローニング時の形質転換比率 (2 kb DNA断片クローニング時の各形質転換効率を 100 % として算出)

実験例 3 : 形質転換体の寒天培地上での生育速度の比較

【方法】

2 kb、10 kb のプラスミド DNA を用いて、実験例 1 の方法に従い、*E. coli* HST08 Premium Competent Cells およびメチル化配列制限欠損など類似した遺伝形質を持つ A 社製 DH10B コンピテントセルをそれぞれ形質転換し、15 時間培養後の寒天培地上のコロニーを撮影した。

【結果】

2 kb プラスミド DNA を導入した場合、両大腸菌株で形質転換コロニーの生育速度に明らかな差は確認されませんでした (図 5 上段)。一方、10 kb プラスミド DNA を導入した場合には、HST08 Premium 株は DH10B 株に比べて明らかに生育速度が速く、15 時間後に形質転換コロニーを容易に確認することができました (図 5 下段)。大腸菌株によっては長鎖プラスミドの導入により生育が遅くなる現象がしばしば見られますが、HST08 Premium 株ではかなりの程度生育速度を維持することができ、通常の培養時間で十分な大きさのコロニーを確認できました。

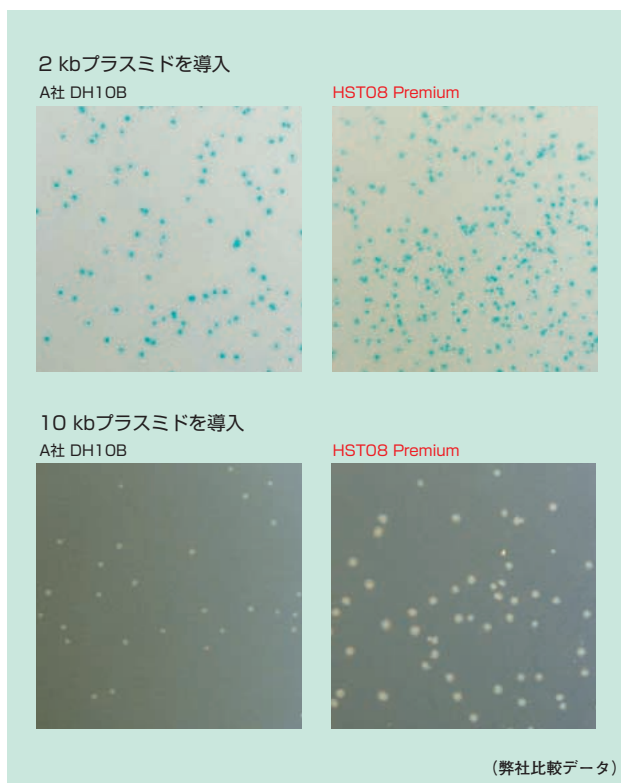


図5 形質転換後 15 時間培養したコロニー

■ 最後に

コンピテントセルの性能を表す尺度としてカタログなどに記載されている形質転換効率は、一般的にコンピテントセル作製直後に精製プラスミドを用いて得られた値が採用されています。そのため、実際に実験に用いる際の形質転換効率が表記の値をかなり下回ってしまうことがあります。また、通常はライゲーション反応液をそのまま形質転換に用いますが、反応液のバッファー組成などにより形質転換が阻害され、十分な効率が得られない場合もあります。従って、カタログ記載の形質転換効率だけを基準にコンピテントセルの性能を適切に判断することは、かなり難しい問題です。

タカラバイオのコンピテントセルは、形質転換効率の表記と実際にコンピテントセルを使用する際の効率がかけ離れることがないように、国内発送時点で保証できる形質転換効率をカタログに記載しています(注: 輸送によって幾分低下することがあります)。さらに、新製品の *E. coli* HST08 Premium Competent Cells では実験例に示す通り、精製プラスミド、ライゲーション反応液のいずれにおいても高い形質転換効率が得られることを確認しています。ルーチンのクローニング作業からライブラリー作製まで、日々使用するコンピテントセルとして、ぜひ皆様の研究にお役立てください。

同時発売

E. coli HST04 *dam*⁻/*dcm*⁻ Competent Cells

製品コード 9129 1 Set (100 μ l \times 10) ¥20,000

遺伝子組換え実験用ホストとして汎用されている大腸菌株の多くは *dam* メチラーゼ、*dcm* メチラーゼを保有しており、導入された外来プラスミドは GATC、CCWGG の塩基配列部分がメチル化されます。これらの配列を認識部位に含む一部のメチル化感受性制限酵素では、調製したプラスミド上に認識配列が存在しても切断することができません。

新発売の *E. coli* HST04 *dam*⁻/*dcm*⁻ Competent Cells は本来大腸菌が有しているメチル化遺伝子 *dam*、*dcm* を欠損しており、本株を用いて調製したプラスミド DNA は *dam* メチル化 (G^m ATC)、*dcm* メチル化 (C^m CWGG) を受けません。本製品は、これらのメチル化感受性の制限酵素でも切断可能なプラスミド DNA 調製のホスト株としてご利用いただけます。

(注) 本製品はクローニング用の宿主には適していません。形質転換の際には、あらかじめ構築したプラスミドをご使用ください。

■ 関連製品

- **TaKaRa DNA Ligation Kit LONG**
製品コード 6024 1 Kit ¥25,000
- **DNA Ligation Kit < Mighty Mix >**
製品コード 6023 1 Kit ¥25,000