

研究用

TaKaRa

***E. coli* HST02 Electro-Cells**

説明書

I. 内容

<i>E. coli</i> HST02 Electro-Cells	50 μ l \times 10
pUC19 DNA (10 pg/ μ l)	10 μ l
SOC Medium*	1 ml \times 10

* SOC Medium の組成 :	2%	Tryptone
	0.5%	Yeast extract
	10 mM	NaCl
	2.5 mM	KCl
	10 mM	MgSO ₄
	10 mM	MgCl ₂
	20 mM	Glucose

II. 保存

− 80℃

【注意】 保存は − 80℃以下で行ってください。温度管理が不十分な場合、形質転換効率が低下することがあります。そのような事態が予想される場合は、付属の pUC19 DNA を用いて形質転換効率を確認の上、使用してください。
液体窒素では保存しないでください。

III. 特性および用途

Electro-Cells は、エレクトロレーション法のために調製した宿主菌です。この方法は高電圧パルスで細胞膜を破断することにより DNA を細胞内に移入するもので、形質転換効率および結果の再現性に優れており、少量のサンプルを短時間で大腸菌に導入する際、特に威力を発揮します。

E. coli HST02 Electro-Cells は外来のメチル化 DNA を切断する遺伝子群 *mrr-hsdRMS-mcrBC*、*mcrA* を完全に欠失しています。さらに、非常に高い形質転換能力を持っているため、メチル化された DNA のクローニングから遺伝子ライブラリーの作製、サブクローニング等に広く使用できます。また、F'プラスミドを所有するため、M13 ファージベクター DNA の宿主としても利用できます。

pUC 系プラスミドの形質転換や M13 ファージベクター DNA の形質導入の際には、 β -ガラクトシダーゼの α -相補性を利用して X-Gal、IPTG 添加による青白選択を行うことができるため、容易に組換え体を選別できます。

X-Gal : 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside

IPTG : Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

IV. 使用方法

[1] プラスミドベクターで形質転換する場合

- (1) *E. coli* HST02 Electro-Cells (50 μ l) を使用直前に、氷中で融解する。
- (2) 融解した Electro-Cells に 1 ~ 2 μ l の DNA 溶液を加える。(塩が含まれる試料溶液の場合には TE または滅菌水で希釈したものを用いるか、もしくはエタノール沈殿による脱塩を行うとよい。DNA Ligation Kit などのライゲーション反応液を使用する場合は、エタノール沈殿を行ってから用いてください。)
- (3) Electro-Cells および DNA の混合液をあらかじめ氷冷しておいた 0.1 cm キュベットに注入する。
- (4) パルス*¹ をかけた後直ちに、融解後氷冷しておいた 1 ml の SOC Medium を加える。
- (5) 14 ml 丸底チューブ (ファルコンチューブ等) に移し、37℃で 1 時間振とうする (160 ~ 225 rpm)。
- (6) プレートに適当量まく*²。
- (7) 37℃で一晩培養する。

* 1: タカラバイオでは BIO-RAD 社製の MicroPulser を用い、1.5 kV の電圧条件でパルスをかけています。BIO-RAD 社製のジーンパルサーの場合には 200 Ω 、25 μ F、1.5 kV でのパルスが標準です。

* 2: プレートにまく液量は直径 9 cm のプレートの場合 100 μ l 以下にしてください。

[2] M13 ファージベクター DNA で形質導入する場合

- (1) [IV. 使用方法-[1] プラスミドベクターで形質転換する場合]の(1)～(4)までの操作を行う。
- (2) 3 ml の YT- soft agar (46～48℃に保温)に、200 μ l の宿主菌 (*E. coli* HST02、A600 = 0.8～1.0)を加える。
- (3) (1)の適当量を(2)の agar に混和し、すばやく YT- プレート上に広げる。
- (4) プレートを室温で 10～15 分間放置した後、37℃で一晩培養する。

[使用上の注意]

1. 必要本数だけを取り出し、運搬時は、ドライアイス/エタノールに入れてください。
2. 形質転換には高純度な DNA を使用することをお勧めします。また、50 μ l の Electoro-Cells に対して、形質転換する DNA の量を 10 ng 以上使用した場合、形質転換体の絶対数は増えますが効率は低下します。
3. スケール (Electro-Cells の量など)を変えたり、他のチューブやキュベットを用いたりする場合には、最適の条件を検討する必要があります。
4. 回復培養は、SOC Medium の他、L-broth や ψ b-broth でも構いませんが、若干効率が悪くなることがあります。また、14 ml 丸底チューブ (BD 社 Code. 352059 または 352057) の他、1.5 ml マイクロ遠心チューブを用いても可能ですが、効率は若干悪くなります。

< L-broth >

10 g Bacto tryptone、5 g Bacto yeast extract、5 g NaCl/1 L water を 1 N NaOH で pH7.5 前後に調整し、オートクレーブする。

< ψ b-broth >

20 g Bacto tryptone、5 g Bacto yeast extract、5 g MgSO₄·7H₂O/1 L water を 1 N KOH で pH7.5 前後に調整し、オートクレーブする。

5. 希釈が必要な時は、IV. 使用方法 [1]-(4) で加えた培地で希釈してください。
6. YT- プレート : 8 g Bacto tryptone、5 g Bacto yeast extract、5 g NaCl/1 L water を 1 N NaOH で pH7.5 前後に調整し、1.5% になるように agar を添加し、オートクレーブする。
7. YT-soft agar : 0.8 g Bacto tryptone、0.5 g Bacto yeast extract、0.5 g NaCl/100 ml water を 1 N NaOH で pH7.6 前後に調整し、0.6% になるように agar を添加し、オートクレーブする。
8. X-Gal、IPTG を添加する場合は以下の濃度で添加してください。
 - 100 mM (23.8 mg/ml) IPTG (滅菌水に溶解) を調製し、100～300 μ l/100 ml 寒天培地、または 25 μ l/3 ml soft agar で添加する。
 - 20 mg/ml X-Gal (ジメチルホルムアミドに溶解) を調製し、200～300 μ l/100 ml 寒天培地、または 50 μ l/3 ml soft agar で添加する。
9. 宿主菌は、Electro-Cells から培養することができます。
10. 一度融解した Electro-Cells を再度凍結保存することはお勧めしません。やむを得ず行う場合、ドライアイス/エタノール中で凍結させ、-80℃で保存してください。ただし、形質転換効率は 1 オーダー以上低下する可能性があります。

V. 形質転換効率

[IV. 使用方法 -[1] プラスミドベクターで形質転換する場合]の方法に従い、10 pg の pUC19 プラスミドで形質転換し、Amp⁺ のプレートでコロニーを選抜しました。このとき、 $> 1 \times 10^9$ transformants/ μ g pUC19 プラスミド DNA の効率を得ました。

VI. Genotype

E. coli HST02 :
F' [*traD36*, *proA*⁺*B*⁺, *lac*^I_q, *lacZ* Δ M15]/ Δ (*lac-proAB*), *recA*, *endA*,
gyrA96, *thi*, *e14*⁻(*mcrA*⁻), *supE44*, *relA*, Δ *deoR*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)

VII. Cell density > 1×10^{10} bacteria/ml

VIII. 参考文献

- 1) Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W. *Nucl Acids Res.* (1988) **16**: 6127.
- 2) Bottger, E. C. *Biotechniques.* (1988) **6**: 878.

IX. 関連製品

E. coli HST02 Competent Cells (製品コード 9127)
pUC19 DNA (製品コード 3219)
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside) (製品コード 9031)
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) (製品コード 9030)

X. 注意

- ・ 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・ タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・ 本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社