

製品コード 9028

研究用

Takara

***E. coli* HST08 Premium
Electro-Cells**

説明書

v202106Da

I. 内容

<i>E. coli</i> HST08 Premium 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°C

【注意】 保存は− 80°C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、エレクトロポ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 HST08 Premium Electro-Cells は外来のメチル化 DNA を切断する遺伝子群 *mrr-hsdRMS-mcrBC* と *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、長鎖プラスミド DNA の形質転換能力にも優れており、コロニー形成速度も速いため*、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うことができ、BAC ベクターなどを使用した長鎖ゲノムライブラリー作製にも適しています。

*：同様の遺伝子型を持つ他のコンピテントセルと比較した場合です。

なお、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 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

IV. 使用方法

- (1) *E. coli* HST08 Premium Electro-Cells (50 μ l) を使用直前に、水中で融解する。
- (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)。
- (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°C 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°C 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。

【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 Electro-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) 使用する DNA の液量は 50 μ l の Electro-Cells に対して 5 μ l 以下をお勧めします。液量が多くなると Electro-Cells が希釈され、形質転換効率が低下します。
- (4) 塩が含まれる試料溶液や、高濃度 DNA を使用するとスパークの原因となります。この場合、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後に滅菌水に溶解したものを使用することをお勧めします。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。
- (5) DNA の鎖長により形質転換効率が変わります。一般的に鎖長が長くなるほど、形質転換効率は低下します。
- (6) 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。
- (7) 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/1L 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/1L water を 1 N KOH で pH 7.5 前後に調整し、オートクレーブする。

- (8) X-Gal を添加する場合は以下の濃度で添加してください。
 - ・ 20 mg/ml X-Gal (ジメチルホルムアミドに溶解) を 200 ~ 300 μ l/100 ml 寒天培地に添加する。
- (9) 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は、ドライアイス中で凍結させ、- 80°C 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. 品質

1. 形質転換効率
IV. 使用方法に従い、10 pg の pUC19 プラスミド形質転換し、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/ μg pUC19 プラスミド DNA の効率を得ました。
2. β -ガラクトシダーゼの α -相補性の確認
pUC19 DNA を用いて形質転換を行い、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン、60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ X-Gal を含む L-寒天培地にプレートした場合、青色のコロニーが出現することを確認しています。

VI. Genotype

E. coli HST08 Premium :
F⁻, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *relA1*, *gyrA96*, *phoA*, $\phi 80\text{dlacZ}\Delta\text{M15}$, Δ (*lacZYA-argF*)
U169, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Δ *mcrA*, λ^-

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 HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128)
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)
TaKaRa DNA Ligation Kit LONG (製品コード 6024)

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 <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社