

研究用

Takara

***E. coli* JM109
Competent Cells**

説明書

I. 内容

<i>E. coli</i> JM109 Competent Cells	100 μ l \times 10
pBR322 DNA (0.1 ng/ 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 pBR322 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

コンピテントセルは、外来 DNA を取り込む能力を持つ受容菌で、遺伝子組換え体プラスミドなどを取り込みます。形質転換、形質導入の際に重要なツールです。タカラバイオでは、Hanahan の方法に改良を加え、このコンピテントセルを調製しました。

E. coli JM109 Competent Cells は遺伝子ライブラリーの作製、サブクローニングに利用できる他、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 系プラスミドでの形質転換や M13 ファージベクター DNA で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、X-Gal、IPTG による青白選択を行うことができ、組換え体の選別が容易となります。

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* JM109 Competent Cells を使用直前に、氷中で融解する。
- (2) 融解したら、穏やかに混和して均一にし、100 μ l のコンピテントセルを 14 ml 丸底チューブ (ファルコン・ラウンドチューブ等) に移す (ボルテックスは用いない)。
- (3) 形質転換する DNA を加える (10 ng 以下が望ましい)。
- (4) 氷中、30 分間放置する。
- (5) 42°C で 45 秒間インキュベートする。
- (6) 氷中 1 ~ 2 分間放置する。
- (7) あらかじめ 37°C に保温しておいた SOC Medium を最終 1 ml になるように加える。
- (8) 37°C で 1 時間振とうする (160 ~ 225 rpm)。
- (9) プレートに適量まく*。
- (10) 37°C で一晩放置する。

* : プレートにまく液量は直径 9 cm 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) プラスミドベクターで形質転換する場合の (1) から (8) までの操作を行う。
- (2) 3 ml の YT soft agar (46 ~ 48°C に保温) に、200 μ l の宿主菌 (*E. coli* JM109 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 L-プレート上に広げる。
- (4) プレートを室温で 10 ~ 15 分置いた後、37°C で一晩インキュベートする。

【使用上の注意】

1. コンピテントセルは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. 14 ml 丸底チューブ (BD 社 Code. 352059 または 352057 等) の他、1.5 ml マイクロ遠心チューブを用いても形質転換は可能ですが、効率が若干悪くなることがあります。
3. 100 μ l のコンピテントセルを用いる場合、形質転換に用いる DNA の量を、高純度なもので 10 ng 以下にしないと、効率は悪くなります。
4. スケール (コンピテントセルの量など) を変えたり、他のチューブ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。(例えば、1.5 ml マイクロ遠心チューブを用いるときは、42°C で 60 秒間インキュベートしてください。)
5. 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。

< L-broth >

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

< ψ b-broth >

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

6. 希釈の必要なときは、IV. 使用方法 [1] - (7) で加えた培地で希釈してください。
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 agar を添加し、オートクレーブする。
8. L-プレート : 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、1.5% になるよう agar を添加し、オートクレーブする。
9. 宿主菌は、コンピテントセルから培養することができます。
10. X-Gal、IPTG を添加する場合は以下のように行ってください。
 - 100 mM IPTG を 100 ~ 300 μ l/100 ml 寒天培地、25 μ l/3 ml soft agar に添加する。
 - 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、50 μ l/3 ml soft agar に添加する。
11. 一度融解したコンピテントセル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°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 [1] プラスミドベクターで形質転換する場合]の方法により 1 ng の pBR322 プラスミドで形質転換し、Amp⁺ のプレートでコロニーを選別しました。このとき、 $> 1 \times 10^8$ colonies/ $\mu\text{g} \cdot \text{pBR322}$ プラスミド DNA の効率を得ました。

2. F⁺ プラスミドの安定性

pUC19 DNA を用いて形質転換を行い、100 $\mu\text{g/ml}$ のアンピシリン、0.3 mM IPTG、60 $\mu\text{g/ml}$ X-Gal を含む L-寒天培地にプレートした場合、白色のコロニーの出現率は 1%以下です。

VI. Genotype

E. coli JM109 :

recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (rk⁻mk⁺), e14^(mcrA⁻), supE44, relA1, Δ (lac-proAB)/F' [traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZ Δ M15]

VII. Cell density

1 ~ 2 $\times 10^9$ bacteria/ml

VIII. 参考文献

1) Hanahan, D. *J Mol Biol.* (1983) **166**: 557.

2) Messing, J. *Gene.* (1985) **33**: 103.

IX. 関連商品

E. coli JM109 Electro-Cells (製品コード 9022)

M13 mp18 RF DNA (製品コード 3118)

pUC118 DNA (製品コード 3318)

pUC119 DNA (製品コード 3319)

pUC118 BAP 処理 DNA (製品コード 3320 ~ 3324)

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