

製品コード 9053

研究用

Takara

***E. coli* CJ236
Competent Cells**

説明書

v201609Da

I. 内容

<i>E. coli</i> CJ236 Competent Cells	100 μ l \times 10
pUC119 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℃

【注意】 保存は− 80℃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 pUC119 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、形質導入などの際には、効率良く確実に外来 DNA を導入できるコンピテントセルが必要となります。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 CJ236 Competent Cells は、Site-directed mutagenesis を Kunkel 法にて行う際に必要なコンピテントセルで、DNA 中の Thymine (T) の一部が deoxyuracil (dU) に置きかわった一本鎖 DNA を調製するための宿主菌です。このコンピテントセルを用いて形質転換、形質導入後、ssDNA を回収することにより Kunkel 法で使用できる ssDNA が得られます。

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* CJ236 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 を入れる (10 ng 以下が望ましい)。
- (4) 氷中、30 分間放置する。
- (5) 42℃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℃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℃で 1 時間振とうする (160 ~ 225 rpm)。
- (9) プレートに適当量まく。*
- (10) 37℃で一晩培養する。

* : 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) 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* CJ236 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な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、最適な条件を検討する必要があります。(例えば、エッペンドルフ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. IV. 使用方法 [1] - (9) で用いるプレートにクロラムフェニコール (30 μ g/ml) を加えておくと、F' プラスミドの脱落が防げます。
8. YT-soft agar : 0.8 g Bacto tryptone、0.5 g Bacto yeast extract、0.5 g NaCl/100 ml water を 1N NaOH で pH7.6 前後に調製し、0.6% になるよう agar を添加し、オートクレーブする。
9. YT- プレート : 8 g Bacto tryptone、5 g Bacto yeast extract、5 g NaCl/1 L water を 1N NaOH で pH7.6 前後に調製し、1.5% になるよう agar を添加し、オートクレーブする。
10. 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。
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は、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. 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 pUC119DNA 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、 $> 1 \times 10^7$ colonies/ μ g \cdot pUC119 プラスミド DNA の効率を得ました。

VI. Genotype *E. coli* CJ236 : *dut1, ung1, thi-1, relA1/pCJ105 (F' cam^r)*

VII. Cell density 1 ~ 2 × 10⁹ bacteria/ml

VIII. 参考文献

- 1) Hanahan, D. *J Mol Biol.* (1983) **166**: 557.
- 2) Kunkel, T. A. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1985) **82**: 488.
- 3) Kunkel, T. A., *et al. Methods in Enzymology.* (1987) **154**: 367.
- 4) Zoller, M. J., and Smith, M. *Methods in Enzymology.* (1983) **100**: 468.
- 5) 広瀬進 続生化学実験講座 vol.1 遺伝子研究法 II (1986) 105

IX. 関連製品

pUC119 DNA (製品コード 3319)

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