

研究用

---

# Takara

## *E. coli* DH5 $\alpha$

# Competent Cells

---

説明書

## I. 内容

<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ Competent Cells	100 $\mu$ l $\times$ 10
pUC19 DNA (0.1 ng/ $\mu$ l)	10 $\mu$ 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 <sub>4</sub>
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
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には、付属の pUC19 DNA を用いて形質転換効率を確認のうえ、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。形質転換に際しては、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。

pUC 系プラスミドを使用して遺伝子ライブラリーの作製や組換え体プラスミドのサブクローニングを行う場合、本宿主菌と組合せると、 $\beta$ - ガラクトシダーゼの  $\alpha$ - 相補性を利用して X-Gal 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- $\beta$ -D-Galactoside

## IV. 使用方法 (プラスミドベクターで形質転換する場合)

- (1) *E. coli* DH5  $\alpha$  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  $\mu$ l のコンピテントセルを 14 ml 丸底チューブ (Falcon 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) 氷中に 30 分間放置する。
- (5) 42°C で 45 秒間インキュベートする。
- (6) 氷中で 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 時間振盪する (160 ~ 225 rpm)。
- (9) プレートに適量まく\*。
- (10) 37°C で一晩培養する。

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

## 【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) 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  $\mu$ 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。(例えばマイクロ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  $\psi$ 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。

### < $\psi$ b-broth >

20 g Bacto tryptone、5 g Bacto yeast extract、5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O/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 -(7) で加えた培地で希釈してください。
7. X-Gal を添加する場合は以下のように行ってください。  
・20 mg/ml X-Gal (ジメチルホルムアミドに溶解) を 200  $\mu$ l/100 ml 寒天培地に添加する。
8. DH5 $\alpha$  で M13mp ベクターを複製させることはできませんが、この株は F 因子を持たないため、プラークを形成できませんのでご注意ください。
9. 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 (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 pUC19 プラスミドで形質転換し、Amp<sup>+</sup> のプレートでコロニーを選別しました。  
このとき、 $>1 \times 10^8$  transformants/ $\mu$ g pUC19 プラスミド DNA の効率を得ました。
2.  $\beta$ -ガラクトシダーゼの  $\alpha$ -相補性の確認  
pUC19 DNA を用いて形質転換を行い、100  $\mu$ g/ml のアンピシリン、60  $\mu$ g/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* DH5 $\alpha$  :

F<sup>-</sup>,  $\phi$  80dlacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), *phoA*, *supE44*,  $\lambda^-$ , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

## VII. Cell density 1 ~ 2 $\times$ 10<sup>9</sup> bacteria/ml

## VIII. 参考文献

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

## IX. 関連製品

*E. coli* DH5 $\alpha$  Electro-Cells (製品コード 9027)

pUC19 DNA (製品コード 3219)

X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactoside) (製品コード 9031)

## 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**