

製品コード 9127

研究用

Takara

***E. coli* HST02
Competent Cells**

説明書

v201610Da

I. 内容

<i>E. coli</i> HST02 Competent Cells	100 μ l \times 10
pUC19 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℃ 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

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、効率良く確実にいけ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 HST02 Competent 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るため、遺伝子ライブラリーの作製、サブクローニング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 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 により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* HST02 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) プレートに適量まく。*
- (10) 37℃ で一晩放置する。

* : プレートにまく量は直径 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) 3.5 ml の YT soft agar (46 ~ 48°C 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 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. 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、最適な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 前後に調整し、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 前後に調整し、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してください。
 - 100 mM IPTG を 100 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 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 Competent Cell を再度凍結保存することはお勧めしません。やむを得ず必要な場合、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 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別しました。このとき、 $>1 \times 10^8$ colonies/ μ g \cdot pUC19 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 μ g/ml のアンピシリン、0.3 mM IPTG、60 μ 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 HST02 :

F' [*traD36, proA*⁺*B*⁺, *lacI*^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 ~ 2 × 10⁹ bacteria/ml

VIII. 参考文献

- 1) Hanahan, D. *J Mol Biol.* (1983) **166**: 557.
- 2) Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. *Gene.* (1985) **33**: 103.

IX. 関連製品

E. coli HST02 Electro-Cells (製品コード 9026)

pUC19 DNA (製品コード 3219)

M13 mp18 RF DNA (製品コード 3118)

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