

研究用

Takara

***E. coli* HST04 *dam*⁻/*dcm*⁻
Competent Cells**

説明書

I. 内容

<i>E. coli</i> HST04 <i>dam</i> ⁻ / <i>dcm</i> ⁻ 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、効率良く確実に行え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 HST04 *dam*⁻/*dcm*⁻ Competent Cells は本来大腸菌が持っているメチル化遺伝子 *dam*、*dcm* を欠損しているため、DNA が大腸菌によりメチル化されることがありません。本製品で調製された プラスミドは *dam* または *dcm* methylase の影響を受ける制限酵素で切断することが可能です。

なお、*dam*、*recA* の 2 重変異株は致死になるため、本株は *recA*⁺ 株になっています。このため、反復配列をもつような外来 DNA は *recA* 遺伝子により、組換えが起こることが予想されます。

本製品はクローニング用の宿主には適していません。形質転換の際には、あらかじめ構築されたプラスミドの使用をお勧めします。

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* HST04 *dam*⁻/*dcm*⁻ 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 (ボルテックスは使用しない)。
- (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。

【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 -(7) で加えた培地で希釈してください。
7. 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。
8. 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. 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⁺ のプレートでコロニーを選別しました。
このとき、 $> 1 \times 10^6$ colonies/ μ g \cdot pUC19 プラスミド DNA の効率を得ました。

VI. Genotype

E. coli HST04 *dam*⁻/*dcm*⁻ :

F⁻, *ara*, Δ (*lac-proAB*) [Φ 80d *lacZ* Δ M15], *rpsL* (*str*), *thi*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Δ *mcrA*, *dam*, *dcm*

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

pUC118 DNA (製品コード 3318)
pUC119 DNA (製品コード 3319)
制限酵素切断 BAP 処理済 pUC118 DNA (製品コード 3320 ~ 3324)

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