

製品コード HB116

研究用

Takara

***Brevibacillus* Competent Cells**

説明書

v202104

I. 内容

1. <i>Brevibacillus</i> Competent Cells	100 μ l \times 10
2. MT medium	1 ml \times 10
3. Solution A	1 ml
4. Solution B	1 ml \times 2

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。
液体窒素では保存しないでください。

III. 特性および用途

Brevibacillus Competent Cells は *Brevibacillus* (ブレヴィバチルス) 発現ベクター pNCM02 DNA (製品コード HB112)、pNC-HisT DNA (製品コード HB121) などの形質転換に用いる *B. choshinensis* SP3 株の NTP 法形質転換用コンピテントセルです。

本製品は、エレクトロポレーション法ではなく、ケミカルトランスフォーメーションの一種である NTP 法 (New Tris-PEG 法) での形質転換のために調製されています。NTP 法で行う場合、エレクトロポレーション用の装置を使用せずに、エレクトロポレーションとほぼ同等の形質転換効率が得られます。さらにエレクトロポレーションの場合とは異なり、ライゲーション溶液をエタノール沈殿による精製を経ずにそのまま形質転換に使用することができます。

Brevibacillus 発現システムの使用方法については、BIC 法の場合は BIC System (製品コード HB300/HB310)、分泌発現の場合は *Brevibacillus* Expression System II (製品コード HB200)、菌体内発現の場合は pNI DNA/pNI-His DNA (製品コード HB131/HB132) の取扱説明書をご参照ください。

IV. 使用方法

<準備>以下の試薬および器具を準備してください。

- ・目的遺伝子発現用プラスミドまたはライゲーション反応液
- ・MT 液体培地*1
- ・MTNm プレート*1
- ・培養用チューブ*2
- ・滅菌済みマイクロチューブs *1: 培地組成

MT 液体培地

グルコース ^{注)}	10.0 g/L
ファイトンペプトン	10.0 g/L
35%エルリッヒ カツオエキス	5.75 g/L
酵母エキス 青ラベル	2.0 g/L
FeSO ₄ ・7H ₂ O	10 mg/L
MnSO ₄ ・4H ₂ O	10 mg/L
ZnSO ₄ ・7H ₂ O	1 mg/L
MgCl ₂ ・6H ₂ O	4.1 g/L

NaOH で pH7.0 に調整する。

注) グルコースとグルコースを除いた培地は別滅菌してください。滅菌後に混合してください。

MTNm プレート

500 ml の MT 液体培地に 7.5 g の寒天を懸濁し、オートクレーブで滅菌してください。約 50℃ まで放冷後、ネオマイシン溶液 (ストック溶液 50 mg/ml) を 50 μg/ml になるように添加し、緩やかに混合後、プレートに分注します。

*2: 例として、14 ml 丸底滅菌チューブ (ファルコン・ラウンドチューブ等) を推奨します。

< NTP 法による形質転換 >

- (1) Solution A、Solution B、MT medium を融解しておく。
- (2) *Brevibacillus* Competent Cells を 37℃ 温水中で急速解凍 (30 秒程度) する。
- (3) 微量遠心機により集菌 (12,000 rpm、30 秒 ~ 1 分) し、上清をマイクロピペットで除去する。

— 以下は、室温で操作を行ってください。 —

- (4) 5 μl 以下の量に調製した DNA 溶液*1 と 50 μl の Solution A を混合する。
- (5) 混合した DNA 溶液を (3) のチューブに全量加え、ボルテックスにより菌のペレットを完全に懸濁する。*2
- (6) そのまま 5 分間静置する。
- (7) 150 μl の Solution B (PEG 溶液) を加え*3、液が均一になるまで (5 ~ 10 秒) ボルテックスにより混和する。
- (8) 微量遠心機により集菌 (5,000 rpm、5 分) し、上清を除去する。
- (9) 再度、軽く遠心 (5,000 rpm、30 秒程度) し、完全に上清を除去する。
- (10) MT medium を 1 ml 加え、マイクロピペットを使って完全に懸濁する。
- (11) 菌を懸濁した培養液を培養用チューブに移し、37℃、120 rpm で 2 時間振とうする。
- (12) MTNm プレートに播き、37℃ で 1 晩培養する。
- (13) 得られたコロニーをプラスミド解析またはタンパク質発現実験に用いる。

* 1: ライゲーション反応液を用いる場合は、反応液 5 μl をそのまま、Solution A と混合してください。精製プラスミドを用いる場合は、10 ~ 100 ng 使用してください。

* 2: 菌の分散が不足すると形質転換効率が低下しますので、十分に懸濁してください。

* 3: Solution B (PEG 溶液) は粘性が高いため、1,000 μl 用のマイクロピペットを使用してゆっくり吸い上げてください。

【使用上の注意】

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。

V. 形質転換効率

IV. 使用方法に従って 10 ng の pNY326 プラスミドで形質転換し、Nm⁺のプレートでコロニーを選別しました。

このとき、> 10⁵ transformants/μg pNY326 プラスミド DNA の効率を得ました。

VI. Genotype

B. choshinensis SP3 は孢子形成関連遺伝子が破壊されており、滅菌が簡単に行えます。また、わずかに活性を示していた菌体内プロテアーゼ遺伝子 (*imp*)、菌体外プロテアーゼ遺伝子 (*emp*) が破壊されており、生産された目的タンパク質の分解を最小限に抑えています。

VII. 関連製品

BIC System (製品コード HB300)
pBIC DNA Set (製品コード HB310)
Brevibacillus Expression System II (製品コード HB200)
pNCMO2 DNA (製品コード HB112)
pNC-HisT DNA (製品コード HB121)
pNC-HisF DNA (製品コード HB122)
pNC-HisE DNA (製品コード HB123)
pNI DNA (製品コード HB131)
pNI-His DNA (製品コード HB132)

VIII. 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。

本製品のうち、*Brevibacillus choshinensis* HPD31-SP3 には、*Saccharomyces cerevisiae* 由来 2 μm プラスミド DNA の部分配列が含まれます (製品コード HB200、HB116)。これらは、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」で規定する遺伝子組換え生物等に該当します。また、「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置を定める省令」(平成 16 年文科省・環境省令第 1 号)における実験分類ではクラス 1 に分類されます。ご使用の際は、上記の省令および貴組織内の安全委員会の指示に従い拡散防止措置を行ってください。

※本製品はヒゲタ醤油株式会社が開発・製造し、タカラバイオ株式会社が販売しています。

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 <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社