

BACライブラリー作製にも最適!

HST08 Premiumのエレクトロポレーション用コンピテントセルが新登場

***E. coli* HST08 Premium Electro-Cells**製品コード 9028 1 Set (50 μ l \times 10) ¥18,000

- ルーチンクローニングはもちろん、長鎖DNA(10 kb以上)のクローニングにもお勧め!
- メチル化DNAのクローニングも可能
- エレクトロポレーション法によるcDNAライブラリーやゲノムライブラリー、BACライブラリーの作製に最適

E. coli HST08 Premium株はタカラバイオが開発した新しい大腸菌株で、クローニングに必要なほぼすべての要素を併せ持ちます。このたび、皆さまからご要望をいただいた同株のエレクトロポレーション用コンピテントセル*E. coli* HST08 Premium Electro-Cellsが新発売となりました。HST08 Premium株は外来のメチル化DNAを切断する遺伝子群(*mcrA*, *mrr-hsdRMS-mcrBC*)を完全に欠失しており、さらに非常に高い形質転換能力を有しているため、メチル化されたDNAのクローニングからcDNAライブラリーやゲノムDNAライブラリーの作製、サブクローニングまで幅広い用途に使用できます。長鎖プラスミドDNAの形質転換能力にも優れており、TaKaRa DNA Ligation Kit LONG(製品コード 6024)と組み合わせることで、10 kb以上の長鎖DNA断片のクローニングやライブラリー作製も容易に行えます。本株はF⁻であり、BAC、Fosmidベクターが使用可能です。また、pUC系プラスミドでの形質転換の際には、 β -ガラクトシダーゼの α -相補性を利用してX-Galによる組換え体の青/白選択が可能です。高電圧パルスを利用するエレクトロポレーション法はさまざまな形質転換法のうち最も効果的な方法の1つです。HST08 Premium Electro-Cellsを用いる高効率の形質転換を皆さまの実験に是非お役立てください。

[HST08 Premiumの遺伝子型]

F⁻, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *relA1*, *gyrA96*, *phoA*, ϕ 80*lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Δ *mcrA*, λ ⁻

■ 実験例

本製品と*E. coli* DH5 α Electro-Cells(製品コード 9027)、ならびにA社製エレクトロポレーション用DH10BおよびB社製高効率エレクトロポレーション用コンピテントセルを用いて形質転換効率を比較しました。カタログに表示された各製品の形質転換効率は、それぞれ $>1.0 \times 10^9$ 、 $>1.0 \times 10^9$ 、 $>1.0 \times 10^{10}$ および $>3.0 \times 10^{10}$ 形質転換体/ μ g pUC19 DNAです。

実験例 1: 精製プラスミドを用いた形質転換効率の比較
【方法】

2 kb(100 pg)、10 kb(100 pg)、20 kb(100 pg)、90 kb(100 pg)のプラスミドDNAを用いて、各コンピテントセルを同条件で形質転換し、アンピシリン含有LB寒天培地にプレーティング後、得られたコロニー数から形質転換効率を計算した(図1)。また、2 kbプラスミドでの各形質転換効率を100%とした場合の、10 kb、20 kb、90 kbプラスミドでの形質転換効率の比率を算出した(図2)。形質転換には*E. coli* Pulser(Bio-Rad社、販売終了)を用いた。

【結果】

いずれのサイズのプラスミドにおいても、*E. coli* HST08 Premium Electro-Cellsを用いた場合に最も高い形質転換効率が得られました(図1)。また、20 kb、90 kbの長鎖プラスミドを形質転換した場合には、長鎖プラスミドでの形質転換によく用いられるDH10B、DH5 α などと比較して高い形質転換効率が維持できることがわかりました(図2)。この特性は通常のクローニング作業を効率的にするだけでなく、特にcDNAライブラリーやゲノムライブラリー作製において、ライブラリー中の長鎖DNA断片の含有率を高める効果があると考えられます。

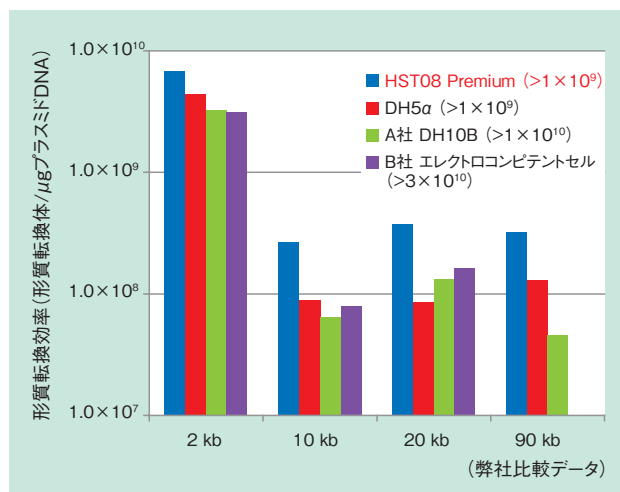


図1 精製プラスミドを用いた形質転換効率の比較

90 kb プラスミドにはBACクローンを使用しています。BACは大腸菌のFプラスミド由来の複製開始点を持っているため、F⁻株であるB社エレクトロコンピテントセルではほとんど形質転換体が得られません。(カッコ内は、カタログ表示形質転換効率: μ g pUC19)

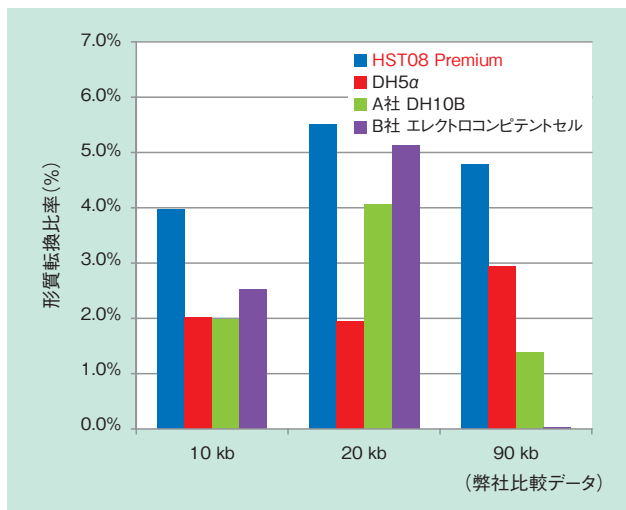


図2 長鎖プラスミド形質転換比率の比較(2 kb プラスミドによる各形質転換効率を100%として算出)

実験例 2 : BAC ライブラリーの作製

【方法】

培養した高度好熱菌をアガロースゲルに包埋後、プロテアーゼ処理を行い、高分子ゲノムDNAを調製した。制限酵素 *Sau3A I* で部分切断後、約100 kbのDNA画分を分取し、TaKaRa DNA Ligation Kit LONGを用いて *BamH I* 切断済みの pCC1BAC ベクター (Epicentre 社) とライゲーション反応を行った。このライゲーション反応液を透析によりTEバッファーに置換後、エレクトロポレーション法を用いて HST08 Premium Electro-Cells および A 社 DH10B へ導入した。得られた形質転換体コロニーから10クローンをランダムに選択し、培養後、アルカリ法でBACクローンDNAを抽出した。各DNAを *Not I* で切断後、パルスフィールド電気泳動によりインサートサイズと含有率を求めた。

【結果】

両方の大腸菌株で、形質転換効率、平均インサート長において同等の形質転換体を得ることができました。DH10B株では10クローンのうち2クローンが目的のインサートを含まず、これらのクローンはPCC1BACベクターの一部欠失と考えられる電気泳動バンドパターンを示しました(図3)。一方、HST08 Premium株はすべてのクローンで長鎖のインサートが確認できました(表1)。

表1 高度好熱菌BACライブラリー作製の比較

	HST08 Premium	A社DH10B
形質転換効率(形質転換体/μgベクターDNA)	5.9×10^5	4.8×10^5
平均インサート長	約80 kb	約80 kb
インサート含有率	10/10	8/10

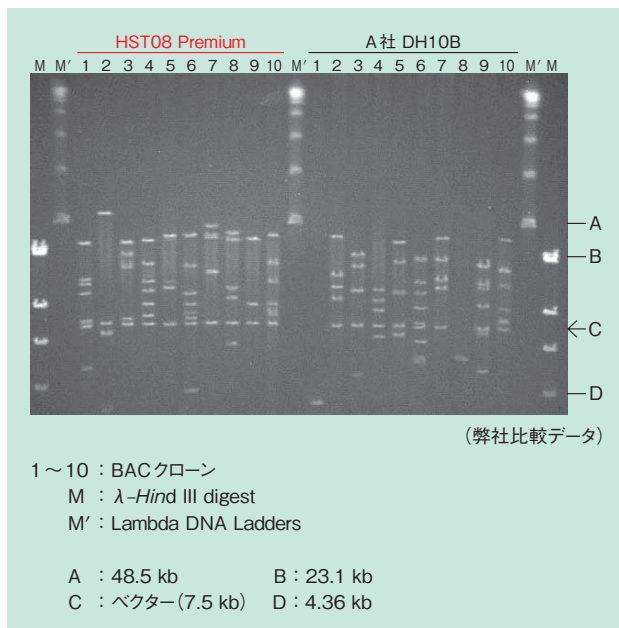


図3 高度好熱菌BACライブラリーからピックアップしたBACクローンの *Not I* 切断後の電気泳動像

■ 最後に

形質転換実験を行った際の効率がカタログ表記の形質転換効率をかなり下回った経験はありませんか。これは、カタログなどに記載されている形質転換効率にはコンピテントセル作製直後に精製プラスミドを用いて取得した値を採用するケースが多いことも一因と考えられます。

タカラバイオでは、コンピテントセルやエレクトロセルのカタログ表記の形質転換効率と実際に形質転換を行う際の効率がかけ離れることがないように、国内発送時点で保証できる形質転換効率をカタログに記載しています(注: 輸送によって幾分低下することがあります)。今回発売した HST08 Premium Electro-Cells もその点は同様です。

また、HST08 Premium株には、外来のメチル化DNAを切断する遺伝子群 (*mcrA*, *mrr-hsdRMS-mcrBC*) 欠損株としてよく使用される DH10B 株よりも生育速度が早いという利点もあり、コロニーの確認が容易です(BIO VIEW 56号 26ページ)。さらに DH10B 同様に F⁻ 株であり、BACライブラリー作製においても良好な結果を得ています。ルーチンのクローニング実験から高性能エレクトロポレーション用コンピテントセルを必要とするさまざまな形質転換操作まで、幅広く皆さまの研究にお役立てください。

■ 関連製品

- ・ TaKaRa DNA Ligation Kit LONG

製品コード 6024	1 Kit	¥26,000
------------	-------	---------
- ・ DNA Ligation Kit <Mighty Mix>

製品コード 6023	1 Kit	¥26,000
------------	-------	---------
- ・ *E. coli* HST08 Premium Competent Cells

製品コード 9128	1 Set (100 μl × 10)	¥21,000
------------	---------------------	---------
- ・ cDNA Library Construction Kit

製品コード 6136	5 回	¥93,000
------------	-----	---------