

製品コード 9115

研究用

TAKARA

Agrobacterium tumefaciens
LBA4404 Electro-Cells

説明書

v202003Da

Agrobacterium tumefaciens (*Rhizobium radiobacter*) は、自身の持つ Ti プラスミドの一部である T-DNA (transfer DNA) を宿主植物の細胞内に移行させ、植物染色体 DNA に挿入した後に T-DNA 上の遺伝子を発現させることにより、感染部位にクラウンガール (Crown gall) を形成させます。この仕組みを利用して、T-DNA 上の病原性遺伝子を取り除き、選択マーカー遺伝子とともに目的外来遺伝子に置き換えることにより、宿主植物の細胞、核 DNA に外来遺伝子を移行させ (*Agrobacterium*-mediated gene transfer)、植物を形質転換するバイナリーベクター法が考え出されました。¹⁾

Agrobacterium tumefaciens LBA4404 株はバイナリーベクター法の開発者であるオランダのライデン大学の P. J. J. Hooykaas 教授らが開発した菌株²⁾で、T-DNA の *vir* 領域 (T-DNA の切り出しから移行に関わる遺伝子が存在) のみを含むプラスミド pAL4404 を保有しており、植物の形質転換での多くの使用実績があります。

本製品は、バイナリーベクター法に使用されるベクター DNA を菌体内に導入するためのエレクトロポレーション法³⁾用のコンピテントセルとして調製されており、得られた形質転換 *A. tumefaciens* は様々な植物の感染実験 (形質転換実験) に使用できます。

I. 内容

<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404 Electro-Cells	40 μ l \times 5
pRI 900 DNA *1 (1 ng/ μ l)	10 μ l
SOC Medium *2	1 ml \times 10

* 1 pRI 900 DNA : pRI 910 DNA (製品コード 3261) からマルチクローニングサイトを除いたプラスミド DNA です。

* 2 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℃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 pRI 900 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. 使用方法

形質転換プロトコールの例 (Bio-Rad 社製キュベットと Gene Pulser II の組み合わせの場合)

1. *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 Electro-Cells の入ったチューブを氷上でゆるやかに融解する。
2. 形質転換に使用するバイナリーベクタープラスミド DNA 1 μ l (1 ng) と融解したコンピテントセル 20 μ l を氷上に置いた 1.5 ml チューブに加え、ゆるやかに混和する。
※ 残ったコンピテントセルを保存する場合は、ドライアイス/エタノールまたはドライアイス中で再凍結させ、 -80°C で保存してください。その場合、形質転換効率は、少し低下する可能性があります。
3. 0.1 cm エレクトロポレーション・キュベット (Bio-Rad 社製) を氷上に用意する。
4. Gene Pulser II の Pulse 条件を 25 μ F、200 Ω 、2 ~ 2.5 kV にセットする。^{*1}
5. コンピテントセルと DNA の混合液をエレクトロポレーション・キュベットに移し、キュベットを軽くたたいて底に集める。キュベットを Gene Pulser II にセットし、Pulse ボタンを押す。
6. キュベットを取り出し、SOC Medium^{*2} を 1 ml 加え、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。
7. 30°C で 1 時間振とう培養し (100 rpm)、50 μ g/ml カナマイシン^{*3} および 100 μ g/ml ストレプトマイシンを含む LB 寒天培地へ 50 ~ 100 μ l 播種した後、 30°C で 48 時間培養する。^{*4}

* 1 : キュベットの種類、遺伝子導入装置の種類により条件は異なります。

Bio-Rad 社の MicroPulser の場合は、2.5 kV にセットしてください。

* 2 : 他の培地で置き換えることもできますが、形質転換効率が落ちる場合があります。

* 3 : 使用するバイナリーベクタープラスミドが、カナマイシン耐性以外の場合は、そのプラスミドに適した抗生物質に変更してください。

* 4 : SOC Medium で 10 倍希釈したサンプルと原液の両方を播種することをお勧めします。

IV. 形質転換効率

III. 使用方法に従って、1 ng の pRI 900 DNA で形質転換し、カナマイシンおよびストレプトマイシンを含むプレートでコロニーを選別しました。

このとき、 $> 5 \times 10^6$ colonies/ μ g \cdot pRI 900 DNA の効率を得ました。

V. 参考文献

- 1) A Hoekema, P R Hirsch, P J J Hooykaas, and R A Schilperoort. *Nature*. (1983) **303**: 179-180.
- 2) G Ooms, P J J Hooykaas, R J M V Veen, P V Beelen, T J G Regensburg-Tuink, and R A Schilperoort. *Plasmid*. (1982) **7**: 15-29.
- 3) S Wen-jun and B G Forde. *Nucleic Acids Research*. (1989) **17** (20): 8385.

VI. 関連製品

pRI 909 DNA (製品コード 3260)
pRI 910 DNA (製品コード 3261)
pRI 101-AN DNA (製品コード 3262)
pRI 101-ON DNA (製品コード 3263)
pRI 201-AN DNA (製品コード 3264)
pRI 201-ON DNA (製品コード 3265)
pRI 201-AN-GUS DNA (製品コード 3266)
pRI 201-ON-GUS DNA (製品コード 3267)

VII. 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