



Ideas & Chemistry

14-02  
16D3



- *E.coli* Competent Cell Kit-

# Competent high

# DH5

(Code No. DNA-901)

## 取扱説明書



**ご注意**

本製品を液体窒素中で保管する場合は、液体窒素から取り出す際以下の点にご注意ください。

保管中、チューブ内に液体窒素が入っていることがあります。

いきなり室温に戻すと入った液体窒素が急激に気化し、チューブが破裂する恐れがあります。

これを避けるために以下の手順に従って液体窒素から取り出してください。

1. 液体窒素及びドライアイスを取り扱うときは保護めがね、保護手袋等の保護具を着用ください。
2. 液体窒素中から本製品をドライアイスの入った容器に移し、約1分おいてください。

次に氷上に移し、約1分おいた後、ご使用ください。

(長期保管する場合は、気相液窒缶中に保管することをお勧めいたします。)

### (1) キットの内容

Competent Cell	100 $\mu$ l $\times$ 10本
pBR 322 DNA (1 pg / $\mu$ l)	50 $\mu$ l $\times$ 1本
SOC medium	1 ml $\times$ 10本

### (2) 品質

形質転換効率 1 pgのpBR 322 で形質転換した場合  
 $1 \times 10^9$  transformants/ $\mu$ g  $\cdot$  pBR 322 (液体窒素保存)  
\*  $-80^\circ\text{C}$ 保存では $10^8$ オーダーになります。

### (3) 保存方法

$-80^\circ\text{C}$ , 液体窒素

※長期保管する場合は、気相液窒素缶中に保管することをお勧めいたします。

### (4) Genotype

supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96  
thi-1 relA1

### (5) 形質転換方法

- ①Competent Cellを融解し、Falconチューブ(2059)に100  $\mu$ l 移す。
- ②形質転換するDNAを加える。
- ③氷中に30分間放置する。
- ④ $42^\circ\text{C}$ のヒートショックを30秒間行う。
- ⑤氷中で2分間冷却する。
- ⑥SOC mediumを900  $\mu$ l 加え、 $37^\circ\text{C}$ で1時間振とう培養する。
- ⑦適当な選択培地に適量まく。
- ⑧ $37^\circ\text{C}$ で一晩培養する。

SOC medium	2%	Bacto tryptone
	0.5%	Bacto yeast extract
	10mM	NaCl
	2.5mM	KCl

上記組成の培地をオートクレーブ滅菌後、フィルターろ過した $\text{Mg}^{2+}$ ストック溶液と、別殺菌したグルコースストック溶液を、下の濃度になるよう加えている。

20mM	$\text{MgSO}_4$ , $\text{MgCl}_2$ (10mM each)
20mM	Glucose

## (6) 参考文献

Hanahan, D. J. Mol. Biol., 166, 557. (1983)

## (7) 形質転換に関する特記事項

(以下の検討は、DH5, JM109, HB101等種々のコンピテントセルで行った。)

### ①DNA及びコンピテントセル量について

- (1)加えるDNAの液量がコンピテントセル容量の25%に達すると効率は半減する。(Fig.1)
- (2)DNAを10ng以上用いると、1 $\mu$ gDNAあたりのTransformant数は減少する。(Fig.2)
- (3)プラスミドサイズが7.5Kb以上になると効率がかなり低下する。(Fig.3)  
(使用plasmidの分子数が同数となるようにして形質転換を行った。)
- (4)コンピテントセル使用量が50~200 $\mu$ lの範囲では効率は変わらないが、10 $\mu$ lで半減、400 $\mu$ lで倍増する。(Fig.4)

### ②ヒートショックについて

- (1)DNAをコンピテントセルに添加してからヒートショックを行うまでの時間が15~60分間のとき形質転換効率に影響しない。
- (2)42 $^{\circ}$ Cヒートの場合、ヒート時間は15~60秒が適している。また30秒ヒートの場合、35~52 $^{\circ}$ Cの間でヒートすればよい。(Fig.5)

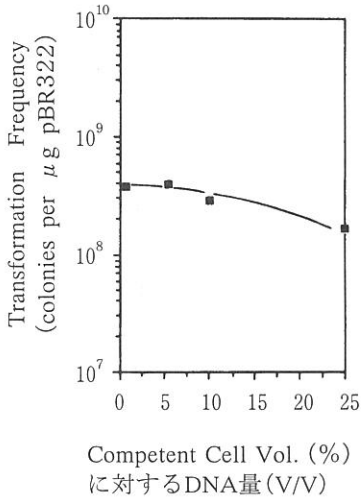
### ③ヒートショック後の培養について

- (1)LB培地に比べSOC培地を用いたときは、効率が5倍上がる。(Fig.6)
- (2)培養時間や培養時の振とう数は効率に影響しない。

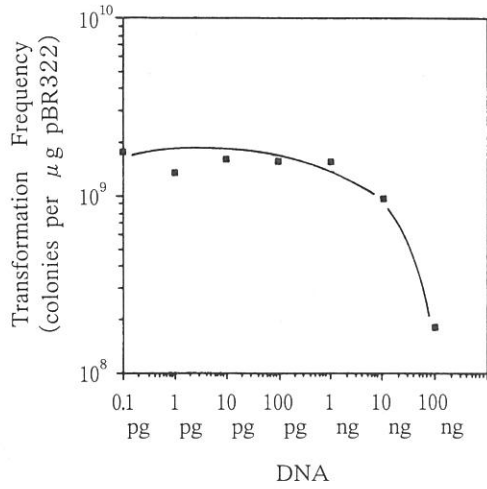
### ④形質転換効率の安定性について

- (1)一度融解したコンピテントセルを再凍結すると、効率は1/4~1/10に低下する。(Table 1)

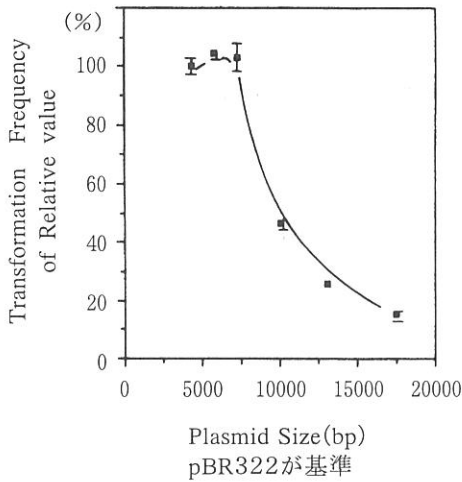
(Fig. 1)



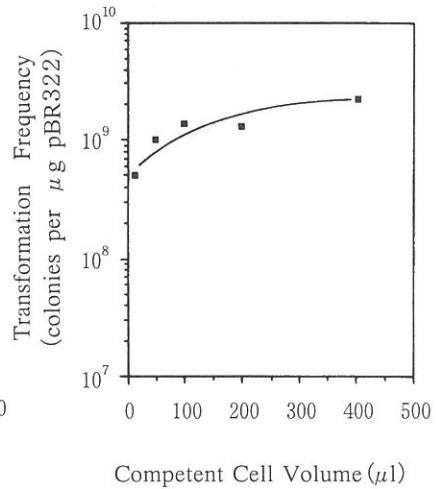
(Fig. 2)



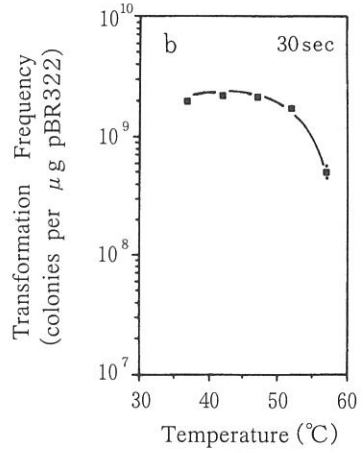
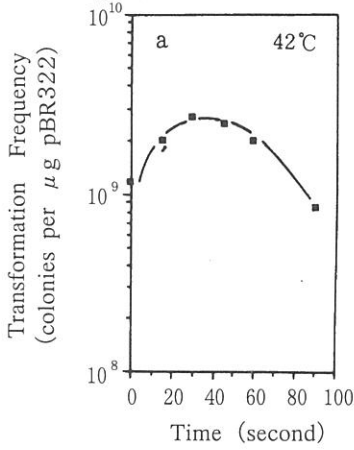
(Fig. 3)



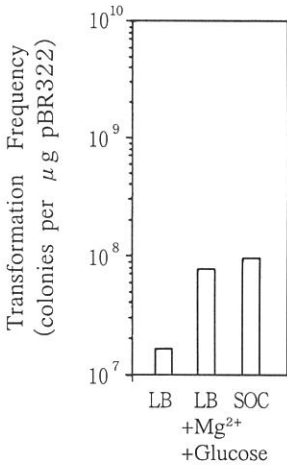
(Fig. 4)



(Fig. 5)



(Fig. 6)



(Table 1)

保存	凍結	液体N <sub>2</sub>	-80°C
液体N <sub>2</sub>		27%	—
-80°C		10%	8.3%

再凍結前のコンピテントセルの形質転換効率を 100%とし、上記条件で1ヵ月保存後の形質転換効率を調べた。

(— は未実施)



【製造・販売元】

ー納期・注文に関するお問い合わせー

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部（大阪）  
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号  
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833  
E-mail : order\_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部（東京）  
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目17番10号 住友商事京橋ビル  
TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951  
E-mail : order\_lifescience@toyobo.jp

ー製品の内容・技術に関するお問い合わせー

テクニカルライン  
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833  
開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土、日、祝を除く)  
E-mail : tech\_osaka@toyobo.jp  
【URL】 <http://www.toyobo.co.jp/bio>