- *E.coli* Competent Cell -

Competent Quick DH5α

(Code No. DNA-913F)

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. 液体窒素およ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分置いてください。
   次に氷上に移し、約１分置いた後、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薦めいたします。）

本製品は研究用試薬です。診断･臨床用試薬として決して使用しないでください。
また、本試薬の使用にあたっては実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

TOYOBO CO., LTD.
Bioproducts Sales and Marketing Department
OSAKA JAPAN

TOYOBO

［1］はじめに

本製品は、短時間で高い形質転換効率が得られるように調製された大腸菌コンピテントセルです。従来のコンピテントセルでは、形質転換に1.5～2時間を要しましたが、本製品では、10分以下のプロトコールで確実に形質転換体を得ることができます。

［2］内容

Competent Quick DH5α　コンピテントセル　100μL　×　20本

［3］品質

形質転換効率　3pgのpBR322を用いて形質転換を行い、LB/アンピシリンプレートに播種した場合、≧3 × 10^7 transformants / μg・pBR322 の効率が得られる。

β-ガラクトシダーゼのα相補性

pUC19を用いて形質転換を行い、LB/アンピシリン/X-gal/IPTGプレートに播種した場合、99%以上のコロニーが青コロニーになる。

［4］保存

-80℃ あるいは 液体窒素

- -80℃保存で少なくとも 3 ヶ月は安定にご使用いただけます。但し、頻繁に開閉するフリーザーや温度管理が不十分なフリーザーでは、形質転換効率が低下する場合があります。可能な限りフリーザーの一番底や奥に保管し、温度変化が及ばないようにご注意ください。
- 3ヶ月を超えて長期間保存する場合は、液体窒素での保存をお薦めします。

  ※液体窒素で保管する場合、保管中にチューブ内に液体窒素が入る可能性があります。液体窒素から取り出す際には、保護手袋、保護めがね等を着用し、ドライアイスの入った容器に移した後、約1分置いてからご使用ください。急に室温に戻した場合、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。

［5］Genotype

E.coli DH5α : *deo*R, *end*A1, *gyr*A96, *hsd*R17(r_K^-,m_K^+), *pho*A, *rec*A1, *rel*A1, *sup*E44, *thi*-1, Δ(*lac*ZYA-*arg*F)U169, φ80d*lac*ZΔM15, F^-, λ^-

［6］ 形質転換プロトコール

【ご注意】

- 本プロトコールは、セレクションにアンピシリンを用いる場合に特に有効です。アンピシリンを用いる場合の本プロトコールによる形質転換効率はSOC培地使用時の約1/3です。
- カナマイシンをセレクションに用いる場合には、寒天培地中の薬剤濃度により、SOC培地使用時に比べ形質転換効率が約1/3～1/10に低下します。使用する薬剤濃度に注意が必要です。
- テトラサイクリン、クロラムフェニコールでのセレクションは、本製品には適しません（次ページ図1ご参照）。また、上記以外の薬剤を使用される場合は、あらかじめ検討を行った後に使用されることをお薦めします。
- すべての薬剤で高効率な形質転換効率を望まれる場合は、SOC培地を用いる回復培養が必要です。その用途には、SOC培地が添付されたCompetent high DH5α（Code No.DNA-903F）をお薦めします。

【プロトコール】

① Competent Quick DH5αをフリーザーから取り出し、氷上で素早く融解します[注1]。
② 形質転換するプラスミドDNAを加え[注2]、ピペットの先で軽く攪拌します。
③ 氷上で5分間静置します。
④ 42℃で30秒間インキュベートします（ヒートショック）。
⑤ LB寒天培地（+抗生物質）プレートに適当量を播種します[注3]。
⑥ 37℃で一晩培養します。

注1）フリーザーから取り出したら、37℃の湯浴あるいは指先にて素早く半融解状態にし、直ちにプラスミドDNAを加えると、より高い形質転換効率が得られます。

注2）形質転換に供するプラスミドDNAの液量は、コンピテントセル容量の30%程度以下になるようにします（図2ご参照）。また、DNA量は、コンピテントセル100μLに対し10ng以下にします（図3ご参照）。

注3) LB寒天培地中の抗生物質は、以下の濃度にすることをお薦めします。濃度が高すぎる場合、形質転換効率が低下する場合があります。また、低すぎる場合には、サテライトコロニーが出現する場合があります。

アンピシリン	50～100 μg/ mL
カナマイシン	10～50 μg/ mL

また、X-galを添加する場合は、40mg/mL (ジメチルホルムアミド) X-gal 20μLをLB寒天培地プレートに予め塗布して、完全に乾燥させておきます。

注4）一度融解したコンピテントセルを再度凍結し、使用することも可能ですが、その場合の形質転換効率は、再凍結しないものに比べて50%以下となります。

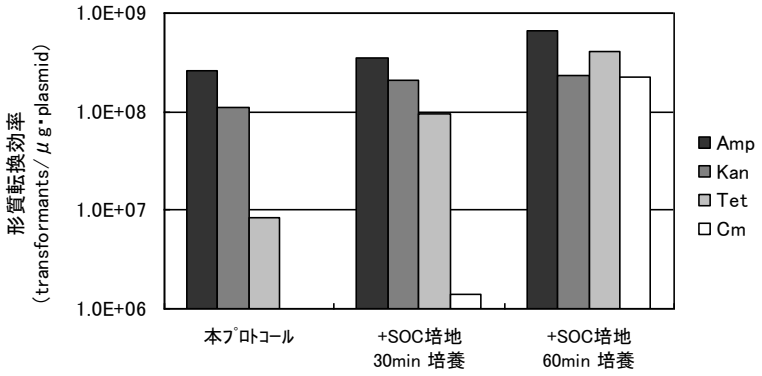

図１　様々な抗生物質を使用した場合における形質転換効率

pBR322(Ampicillin^r, Tetracycline^r)、pAK119M(Kanamycin^r)、pAT5（Chloramphenicol^r）の各プラスミド 10pg / 5μL TE buffer を用いて本取扱説明書記載のプロトコールにて形質転換を行い、各抗生物質でセレクションした場合の形質転換効率の評価を行いました。また、同時に、本プロトコールに SOC 培地での培養ステップ（37℃、30 分間あるいは 60 分間）を追加したプロトコールでも評価を行いました。その結果、アンピシリン及びカナマイシンでセレクションした場合には、わずか 10 分間の本プロトコールで 10^8 transformants / μg・plasmid 以上の効率が得られました。一方、テトラサイクリン及びクロラムフェニコールでセレクションした場合では、ヒートショック後に SOC 培地での培養ステップを追加することにより、10^8 以上の効率が得られることが分かりました。

なお、本実験では、LB 寒天培地の各抗生物質は下記の濃度にて実施しました。

- ・アンピシリン(Amp)：50μg/mL
- ・カナマイシン(Kan)：10μg/mL
- ・テトラサイクリン(Tet)：20μg/mL
- ・クロラムフェニコール(Cm)：100μg/mL

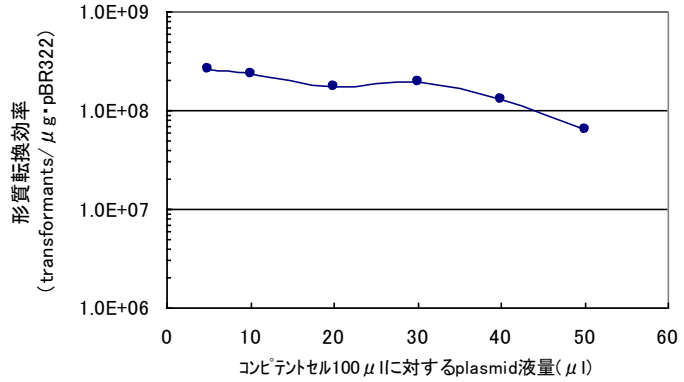

図２　プラスミドDNAの液量の形質転換効率への影響

pBR322(Ampicillin^r) 5pg / 5～50μL TE buffer を用いて本取扱説明書記載のプロトコールにて形質転換を行い、各液量での形質転換効率の評価を行いました。その結果、形質転換に供するプラスミド DNA の液量が、コンピテントセル容量の 30%を超えると、効率が低下傾向にあることが分かりました。

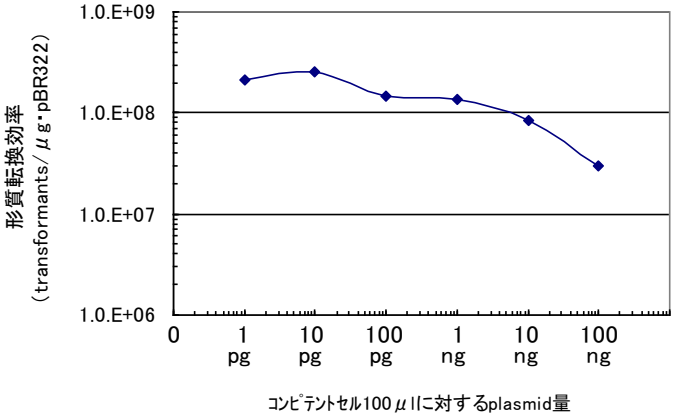

図 3　プラスミドDNA量の形質転換効率への影響

pBR322(Ampicillin^r) 1pg～100ng / 5μL TE buffer を用いて本取扱説明書記載のプロトコールにて形質転換を行い、各 DNA 量での形質転換効率の評価を行いました。その結果、形質転換に供するプラスミドDNA 量が、コンピテントセル 100μL に対し 10ng を超えると、効率が低下傾向にあることが分かりました。

[7] 参考文献

・Hanahan D., *J. Mol. Biol*., **166**, 557 (1983)
・Inoue H., Nojima H., and Okayama H., *Gene*, **96**, 23-28 (1990)

[8] 関連商品

品　名	内　容*	Code No.
Competent high JM109 <高効率 *E. coli* JM109 コンピテントセル、SOC 培地付>	100μL　×10 本	DNA-900F
Competent high DH5 <高効率 *E. coli* DH5 コンピテントセル、SOC 培地付>	100μL　×10 本	DNA-901F
Competent high DH5α <高効率 *E. coli* DH5α コンピテントセル、SOC 培地付>	100μL　×10 本	DNA-903F

*SOC培地：1mL×10本を含みます。

TOYOBO

【製造・販売元】

－価格・在庫に関するお問い合わせ－

東洋紡株式会社　バイオプロダクト営業部　(大阪)
〒530-0001　大阪府大阪市北区梅田一丁目13番1号
大阪梅田ツインタワーズ・サウス
TEL 06-6348-3786　FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社　バイオプロダクト営業部　(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

－製品の内容・技術に関するお問い合わせ－

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　(土日祝日、休日を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
［URL］https://lifescience.toyobo.co.jp/

DNA-913F