

- *E.coli* Competent Cell Kit -

Competent high

JM109

(Code No. DNA-900F)

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

A3272K

(1) キットの内容

Competent Cell	100 μ L	×	10本
SOC medium	1mL	×	10本

(2) 品質

形質転換効率 3pgのpBR322を用いて形質転換した場合
 $\geq 1 \times 10^8$ transformants / μ g \cdot pBR322 (液体窒素保存)
* -80°C保存では1オーダー程度下がります。

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ります。

(3) 保存方法

-80°C、液体窒素

*長期保存する場合は、気相液窒素缶中に保管することをお勧めします。

(4) Genotype

endA1, *gyrA96*, *hsdR17*, *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi*, Δ (lac-proAB)
F' [*traD36*, *proAB*⁺, *lacI*^q, *lacZ* Δ M15]

(5) 形質転換方法

- ① Competent Cellを融解し、Falconチューブに100 μ 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°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。
- ⑥ SOC mediumを900 μ L加え、37°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°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 Mg²⁺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に加えている。

20mM	MgSO ₄ , 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 μ 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 μ L の範囲では効率は変わらないが、10 μ L で半減、400 μ 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°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°Cの間でヒートすればよい。(Fig.5)

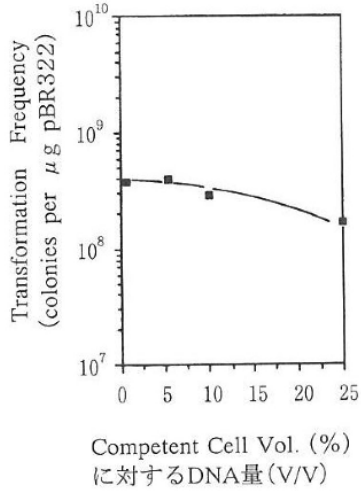
③ヒートショック後の培養について

- (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。

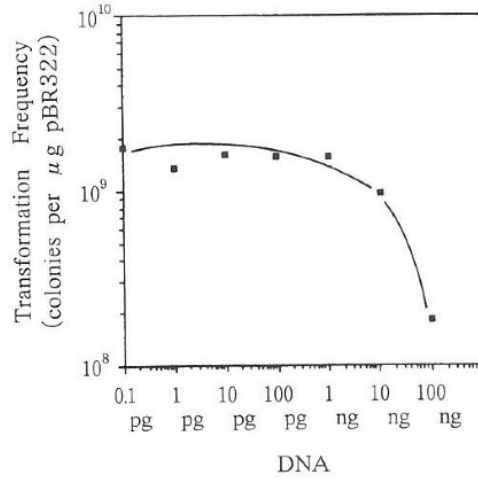
④形質転換効率の安定性について

- (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)

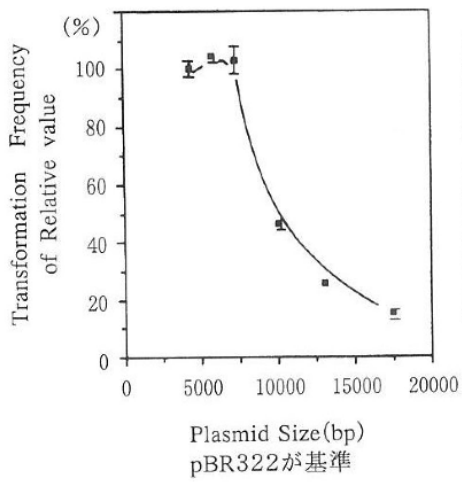
(Fig. 1)



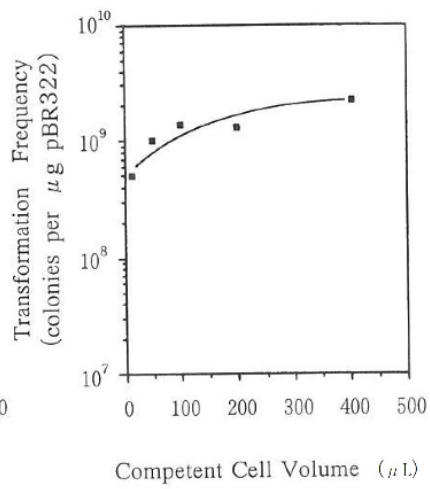
(Fig. 2)



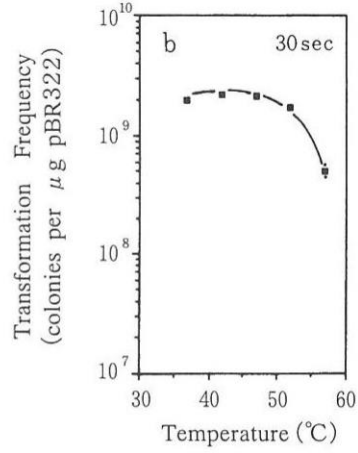
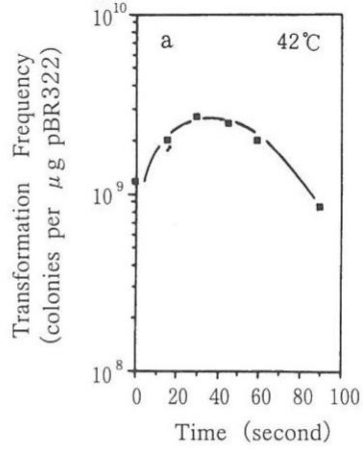
(Fig. 3)



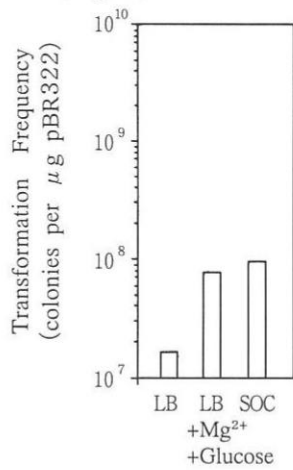
(Fig. 4)



(Fig. 5)



(Fig. 6)



(Table 1)

保存	凍結	
	液体N ₂	-80°C
液体N ₂	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)

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/>