

ECOS™ X Competent *E. coli* DH5 α

イーコスエックス 高効率大腸菌コンピテントセル

ECOS™ X Competent *E. coli* DH5 α マニュアル(第3版)2501KM

製品名	Code No.	包装単位
ECOS™ X Competent <i>E. coli</i> DH5 α	310-07733	100 μ l \times 10 本
	314-07731	100 μ l \times 2 本

V 注意

・本品は試験研究用ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。また、試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱いしないで下さい。本品の取扱いはマニュアル記載内容通りに行ってください。マニュアル記載内容と異なった取り扱いによるトラブルにつきましては、弊社では責任を負いかねます。

<関連製品>

製品名	Code No.	包装単位	備考
Bac' n' Roll Beads	314-06251	100 回分	大腸菌塗布用ガラスビーズ
Ligation-Convenience Kit (2 \times Ligation Mix)	315-05963	10 回分	1 液タイプのライゲーションキット
	319-05961	100 回分	
Hi-Competence Broth	319-01343	1 ml \times 20 本	大腸菌用回復培地

その他詳細についてはニッポンジーンのホームページをご覧ください。

<https://www.nippongene.com/siyaku/index.html>

I 製品説明

本品は大腸菌 DH5 α のコンピテントセルです。本品ではヒートショック処理後の SOC 培地を使用した回復培養が不要なため、形質転換実験を 6 分で行うことができます。

また、形質転換効率が高いため、高効率が必要となる実験に使用することができます。

■ 特長

- ・短時間で高効率形質転換が可能
- ・高度なクローニングやライブラリー作製に使用可能

II 遺伝子型

DH5 α	F ⁻ , Φ 80d/lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17 (r _k ⁻ m _k ⁺), recA1, endA1, relA1, deoR, supE44, thi-1, gyrA96, λ ⁻
--------------	--

III 形質転換効率

ECOS™ 6 分間プロトコールを以下の条件で実施した場合

$$\text{DH5 } \alpha \geq 1 \times 10^9 \text{ (cfu/}\mu\text{g pUC19 DNA)}$$

- ・コンピテントセルを 25°C のウォーターバスで約 2/3 量を融解して DNA 溶液を添加。
- ・形質転換には pUC19 DNA を使用。
- ・全て氷上で連続的に操作。
- ・アンピシリンは 50 μ g/ml で使用。
- ・LB プレートは 4°C のものを使用。

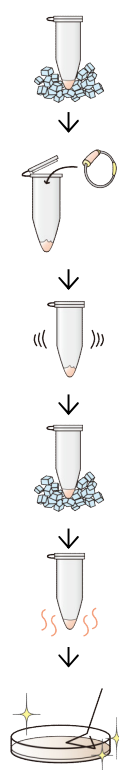
IV 保存と凍結融解(再凍結)について

保存温度: -80°C

- ・温度変化の少ない条件下であれば長期間安定して保存することができます。長期保存による形質転換効率低下の目安は、1 年間で約 1/2 に低下する程度です。
- ・一度の凍結融解(再凍結)を行うと、形質転換効率が約 25~30%程度低下する可能性があります。凍結融解(再凍結)を行う場合は、融解、操作は氷上で素早く行い、-80°C で再凍結して下さい。また、凍結融解の繰り返しは形質転換効率の大幅な低下の原因となりますので避けて下さい。
- ・これらの内容については製品の性能として保証するものではありませんので、ご了承下さい。

VI ECOS™ 6 分間プロトコール(高効率迅速形質転換法)

本プロトコールは、大腸菌の形質転換を高効率に短時間(6 分間)で行うことができる優れたプロトコールです。

- 
- ① コンピテントセルの約 2/3 量が融解するまで氷上に静置する。(* 1)
 - ② 直ちに、4℃または氷上で冷却したプラスミド溶液またはライゲーション溶液を添加する。(* 2)
 - ③ 直ちにボルテックスで 2 秒間攪拌する。(* 3)
 - ④ 氷上で 5 分間インキュベートする。
 - ⑤ 直ちに 42℃のウォーターバスで 30 秒間インキュベートする。
 - ⑥ 直ちに全量を LB プレートに移し均一に塗布する。(* 4)
 - ⑦ 37℃で 12~16 時間インキュベートする。

VII 高効率のためのコツ

・ LB プレートは良く乾燥させたものを準備し、ご使用前に 4℃にて 30 分程度冷やしてからご使用下さい。また、セルを塗り拡げる際にガラスビーズをご使用される場合、予めガラスビーズをプレートに入れた上で 4℃にて冷やして下さい。

・ コンピテントセルをプレートに塗布する際に、ガラスビーズ(5~8 粒/プレート)を使用することで、均一にセルを塗り拡げることができます。ご使用の際は、予めガラスビーズを LB プレートに入れておき、形質転換後のコンピテントセルをプレートにのせたら、直ちにプレートを横方向にシェイクすることで塗り拡げて下さい(全体にガラスビーズが行き渡るように、プレートの方を変えながら 50~70 回程度シェイクすることで、均一に塗り拡げることができます)。また、ガラスビーズには以下の製品の使用をお勧めします。

製品名	Code No.	包装単位
Bac'n'Roll Beads	314-06251	100 回分

VIII プロトコールに関する注意

ECOS™ 6 分間プロトコールは、薬剤にアンピシリンを使用する場合にのみ有効です。薬剤耐性機構の違いにより、薬剤にカナマイシンやテトラサイクリンを使用する場合には形質転換効率が低下しますので、熱処理後に培地を添加し回復培養を行ってからプレートに移して下さい。

- ① コンピテントセルの約 2/3 量が融解するまで氷上に静置する。(* 1)
- ② 直ちに、4℃または氷上で冷却したプラスミド溶液またはライゲーション溶液を添加する。(* 2)
- ③ 直ちにボルテックスで 2 秒間攪拌する。(* 3)
- ④ 氷上で 5 分間インキュベートする。
- ⑤ 直ちに 42℃のウォーターバスで 30 秒間インキュベートする。
- ⑥ 氷上で 2 分間インキュベートする。
- ⑦ あらかじめ 37℃で保温しておいた Hi-Competence Broth または SOC 培地を、コンピテントセルの 4 倍量程度加え、37℃で約 30 分間振とう培養する。
- ⑧ 100 µl~全量を LB プレートに移し均一に塗布する。(* 4)
- ⑨ 37℃で 12~16 時間インキュベートする。

(* 1) ウォーターバスでコンピテントセルを融解することも可能です。その場合、25℃で 30 秒程度加温することによりコンピテントセルの約 2/3 量が融解します。約 2/3 量が融解した時点で氷上に置いて、直ちに DNA 溶液を添加する次のステップに進んで下さい。完全に融解させた場合、形質転換効率が低下します。

(* 2) 添加する DNA 溶液の量はコンピテントセル容量の 5%以下にして下さい。5%以上の DNA 溶液を添加した場合には、形質転換効率が低下することがあります。

(* 3) 2 秒間のボルテックスは形質転換効率に悪影響を与えません。ECOS™ X Competent *E.coli* はボルテックスに耐えられるように調製されています。

(* 4) LB プレートは 4℃のものを使用することができます。また、セレクションに使用する薬剤は以下の濃度で使用することをお勧めします。

アンピシリン	50 µg/ml
カナマイシン	25 µg/ml
テトラサイクリン	12.5 µg/ml

薬剤濃度が高すぎる場合には、形質転換効率が低下する場合があります。また薬剤濃度が低すぎる場合には、サテライトコロニー数が増加する場合があります。