

ECOS™ Competent *E. coli*

DH5 α , JM109, XL1-Blue, BL21(DE3)

マニュアル(第14版)1806KM

| 製品名 | Code No. | 包装単位 |
|--|-----------|---------------------------|
| ECOS™ Competent <i>E. coli</i> DH5 α | 310-06236 | 50 μ l \times 40 本 |
| | 310-06231 | 100 μ l \times 2 本 |
| | 316-06233 | 100 μ l \times 20 本 |
| | 314-06234 | 100 μ l \times 80 本 |
| ECOS™ Competent <i>E. coli</i> JM109 | 317-06246 | 50 μ l \times 40 本 |
| | 317-06241 | 100 μ l \times 2 本 |
| | 313-06243 | 100 μ l \times 20 本 |
| | 311-06244 | 100 μ l \times 80 本 |
| ECOS™ Competent <i>E. coli</i> XL1-Blue | 311-06521 | 100 μ l \times 2 本 |
| | 317-06523 | 100 μ l \times 10 本 |
| | 315-06524 | 100 μ l \times 20 本 |
| ECOS™ Competent <i>E. coli</i> BL21(DE3) | 318-06531 | 100 μ l \times 2 本 |
| | 314-06533 | 100 μ l \times 10 本 |
| | 312-06534 | 100 μ l \times 20 本 |

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)では形質転換効率はあまり低下しませんが、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。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。
- ・ 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。

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りません。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わないで下さい。本品の取り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。

- ・ 本品に関連する技術については、現在特許出願中です。

- ・ BL21(DE3)株は T7 Gene Expression System 関連製品であり、T7 Gene Expression System については Brookhaven National Laboratory が米国特許を有しております。T7 Gene Expression System 関連製品およびこれを利用して製造した製品を国外に持ち出すことを想定している場合には、Brookhaven National Laboratory とライセンスを締結する必要があります。ライセンス締結については下記担当者に直接お問い合わせ下さい。

担当者 Christine Brakel
 電話 +1-631-344-7134 / Fax +1-631-344-3729
 Email brakel@bnl.gov

本製品を日本国内のみで研究用途にご使用いただく場合にはライセンス締結の必要はありません。

- ・ 製品「ECOS™ Competent *E. coli* BL21(DE3)」について (Code No. 318-06531, 314-06533, 312-06534)

| | |
|---|---|
| 遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第26条第1項に基づく情報提供 | |
| 遺伝子組換え生物等の第二種使用等をしていません | |
| 宿主: | <i>Escherichia coli</i> BL21 (B株由来) |
| 核酸又はその複製物: | T7 フェージ由来 RNA Polymerase 遺伝子を含む バクテリオファージ lambda DE3 (溶原化) |
| 連絡先: | 〒930-0834 富山県富山市問屋町 2-7-18 株式会社ニッポンジーン 組換え DNA 実験安全委員会 担当責任者: 二上正裕 TEL(076)451-6548 |

使用に際しては貴施設の安全委員会の指示に従って下さい。

- ・ カルタヘナ法(遺伝子組換え生物等規制法)につきましては、下記 URL に大変詳しく記述されておりますので、ご参考下さい。
 文部科学省ホームページ
<http://www.lifescience.mext.go.jp/bioethics/anzen.html#kumikae>

I 製品説明

本品は大腸菌 DH5 α 、JM109、XL1-Blue、BL21(DE3)のコンピテントセルです。本品ではプレーティング前の回復ステップである SOC 培地での約 1 時間の培養が不要なことから、短時間で形質転換を行うことができます。また、本品は長期間高い形質転換効率を保ったまま保存できることや、1 度凍結融解(再凍結)しても形質転換効率があまり低下しないことなど、従来のコンピテントセルにはなかった特長を持ち合わせています。

■ 特長

- ・ ECOS™ 6 分間プロトコルで高効率形質転換が可能
- ・ ECOS™ 1 分間プロトコルで最高速形質転換が可能
- ・ 凍結融解に対する高い耐性
- ・ 長期保存が可能

II 各菌株の遺伝子型

| | |
|--------------|--|
| DH5 α | F^{-} , $\Phi 80$ <i>lacZ</i> Δ <i>l</i> <i>M15</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169</i> , <i>hsdR17</i> ($r_k^{-} m_k^{+}$), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , λ^{-} |
| JM109 | F' [<i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q , <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>], Δ (<i>lac-proAB</i>), <i>hsdR17</i> ($r_k^{-} m_k^{+}$), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , $e14^{-}$ (<i>mcrA</i> ⁻) |
| XL1-Blue | <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac[F'</i> , <i>proAB</i> , <i>LacI</i> ^q Δ <i>M15</i> , <i>Tn 10</i> (<i>tef</i>)] |
| BL21(DE3) | <i>E. coli</i> B, F^{-} , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> ($r_B^{-} m_B^{-}$), <i>gal</i> , λ (DE3) |

III 形質転換効率


ECOS™ 1 分間プロトコルを以下の条件で実施した場合

DH5 α 、JM109、XL1-Blue $\geq 1 \times 10^7$ (cfu/ μ g pUC19 DNA)
 BL21(DE3) $\geq 1 \times 10^6$ (cfu/ μ g pUC19 DNA)

- ・ コンピテントセルを室温のウォーターバスで約 1/3 量を融解して DNA 溶液を添加。
- ・ 形質転換には pUC19 DNA を使用。
- ・ 全て室温で連続的に操作。
- ・ 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。

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(ECOS™ 1 分間プロトコールの 2~3 倍)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。特に、6 kbp 以上の大きなプラスミドを使用する場合には、必ず本プロトコールで行って下さい。ECOS™ 1 分間プロトコールでは形質転換効率が低下する場合があります。

- 
- ① 氷上でコンピテントセルを融解する。(* 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 1 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℃で 45 秒間インキュベートする。
 - ⑥ 直ちにボルテックスで 1 秒間攪拌する。(* 3)
 - ⑦ 直ちに全量を LB プレートに移し均一に塗布する。(* 4)
 - ⑧ 37℃で 12~16 時間インキュベートする。

VII ECOS™ 1 分間プロトコール(最速形質転換法)

本プロトコールは、最も時間と手間がかからないプロトコールです。1 チューブずつの操作であれば、氷上での操作も必要ありません。42℃のウォーターバスとボルテックスがあれば、約 1 分間で形質転換を行うことができます。複数本を同時に形質転換に用いる場合など、各操作を直ちに連続操作で進めることができない場合には、全ての操作を氷上で行うことで、安定した形質転換効率を得ることができます。

- ① 氷上でコンピテントセルを融解する。(* 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 1 秒間攪拌する。(* 3)
- ④ 直ちに 42℃で 45 秒間インキュベートする。
- ⑤ 直ちにボルテックスで 1 秒間攪拌する。(* 3)
- 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。

VIII プロトコールに関する注意

ECOS™ 1 分間・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 氷上でコンピテントセルを融解する。(* 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 1 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℃で 45 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 分間インキュベートする。
- 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) 水道水や室温のウォーターバスでコンピテントセルを素早く融解することも可能です。その場合は、約 1/3 量を融解した時点で DNA を添加して下さい。完全に融解させた場合には形質転換効率が約 1/3 に低下することがあります。

(* 2) 添加する DNA 溶液の量はコンピテントセルの容量の 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) 1 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™ 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。

IX 関連製品

| Code No. | 製品名 | 包装単位 |
|-----------|---|---------------|
| 314-07731 | ECOS™ X Competent <i>E. coli</i> DH5α | 100 µl × 2 本 |
| 310-07733 | (イーコスエックス 高効率コンピテントセル) | 100 µl × 10 本 |
| 319-05961 | Ligation-Convenience Kit (2 × Ligation Mix) | 100 回分 |
| 314-06251 | Bac' n' Roll Beads | 100 回分 |
| 319-01343 | Hi-Competence Broth | 1 ml × 20 本 |

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>