

## コンピテントセル (Competent cells)

Chie Mori 110830

### 必要な物

E. coli strain ; DH5 $\alpha$

-80°C の KArc stock #1 の BOX に入っているの、LB プレートにシングルコロニーがとれるようにストリークして 37°C で一晩培養 (フリーズストックからおこして 3 日以内のコロニーを使う)

Transformation Buffer (TB)

PIPES 3.0 g  
CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 2.2 g  
KCl 18.6 g

これらを約 950ml の滅菌水に懸濁した後、5N KOH にて pH を 6.7~6.8 に合わせる。  
次いで、最終濃度が 55 mM になるように MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O(10.9g) を添加、溶解し、液量を 1 L に調整後、0.22 $\mu$ m フィルター滅菌する。

SOB 培地

Tryptone Peptone 2 g  
Yeast Extract 0.5 g  
5 M NaCl 0.2 ml  
2 M KCl 0.125 ml  
H<sub>2</sub>O to 100 ml

1L フラスコに 100ml ずつ 4 本、または 200ml ずつ 2 本調整する。オートクレーブ後、別滅菌しておいた 2M Mg<sup>2</sup> 溶液 (1M MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O + 1M MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O) を SOB 100ml につき 1ml 加える。

液体窒素

当日の午前中に 5L タンクに充填してもらえるように、前日までに山名総鉄(078-912-3939)に連絡しておく

### 必要な機器

エアージャージャーインキュベーター (18°C で予約しておく)

### <プロトコール>

1 日目

DH5 $\alpha$ を LB プレートにおこす。37°C、一晩培養。

2 日目

シングルコロニーを 10ml LB liquid に植菌。37°C で振とう培養 (preculture)

3 日目

(インキュベーターを 18°C にしておく)  
100ml SOB 当たり、約 5ml の前培養液を加える。

4 日目

(培養が終わるくらいの時間に、遠心機を 4°C に冷却しておく)  
本培養をはじめて 20 時間後位に、OD600 の値を測定してみる。  
OD600 = 0.6 前後がベスト。0.4~0.8 に達していれば、培養を止めて、すぐに水中にて約 10 分間冷却する。菌数が少ないようなら最後に懸濁する TB の量を調節する。

以下の操作は総て氷上で行う。  
50ml の滅菌済み遠心チューブ(イワキの物でよい)に培養液をうつし、4°C, 3000rpm 15 min 遠心し、菌体を回収する (合計 8 本)。  
ペレットを 15 ml の TB に懸濁し、さらに 10 分間氷冷する。  
4°C, 3000rpm、15 min 遠心し、菌体を回収する。  
ペレットを 4ml の TB に懸濁する (懸濁後、4 本ずつを 1 本のチューブにまとめておくとよい)。  
最終濃度 7%になるように DMSO を添加する (16ml の懸濁液に対し、1.12ml DMSO)。  
10 分間、氷冷する。  
50  $\mu$ l ずつ分注後、液体窒素により凍結、-80°C にて保存する。

<形質転換効率チェック>

作成したコンピテントセルを氷上で溶かす (50  $\mu$ l)。

1pg の pBR322 を加え、混合する。

60 分間、氷中放置

42°C、60 秒間ヒートショックを加える。

2 分間、氷上放置。

450  $\mu$ l の SOC を加え、37°C で 90 分間インキュベート。

50  $\mu$ l, 250  $\mu$ l をそれぞれ LB+Amp プレートにまく。

37°C にて一晩培養後、コロニー数を数える。

形質転換効率は、

50  $\mu$ l まいたプレート (DNA 0.1pg 相当)

コロニー数  $\times 10 \times 10^6$  cfu/ $\mu$ g

250  $\mu$ l まいたプレート (DNA 0.5 pg 相当)

コロニー数  $\times 2 \times 10^6$  cfu/ $\mu$ g