

Transformation

2011.08.26(okamasa.k)

LiAC 法(簡便法)

◆調整する試薬類

<u>×10 Lithium acetate (pH7.5)</u>	オートクレーブ後、室温保存
Lithium acetate	1M
<u>×10TE(pH7.5)</u>	オートクレーブ後、室温保存
Tris-HCl	0.1M
EDTA	0.01M
<u>40% PEG/LiAC/TE</u>	使用前に調整、フィルター滅菌
PEG4000(WAKO)	40%(W/V)
10×LiAc	1/10
10×TE	1/10
<u>salmon sperm DNA 10mg/ml</u>	分注して-30℃保存
<u>DMSO</u>	分注して-30℃保存

◆プロトコール

1. シングルコロニーを掻き取り YES:10ml に懸濁し、33℃でオーバーナイト培養する。
2. 培養液を 50ml 遠心管に移し、3000rpm, 2min, room temp で集菌。
3. 細胞を D.W.:1ml に懸濁しエッペンチューブに移して 10000rpm, flash, room temp. で集菌(×2)。
4. 細胞を 0.1M LiAc /TE (pH7.5)に 2×10^9 cell/ml 程度になるよう懸濁する。
5. 細胞液を 100 μ l ずつエッペンチューブに分注し、DNA:10 μ l, salmon sperm DNA 2 μ l を加え room temp 10min で静置。
6. 40%PEG/LiAc/TE 260 μ l を加え 30℃, 時々混ぜて 1hr incubate する。
7. 43 μ l DMSO を加え 42℃で 5min ヒートショック。10000rpm, flash, room temp. で集菌し、細胞を EMM₂ 500 μ l に懸濁する。
8. 再び 10000rpm, flash, room temp. で集菌し、細胞を EMM₂ 110 μ l に懸濁する。
9. 1/10, 9/10 量を選択培地にまき、数日間 33℃で培養する。

注意: 選択マーカーが G418, hyg, NAT などの薬剤の場合 YES で wash 後 3hr ほど 30℃でインキュベートしてから培地にまく。ただし、Aur の場合はこのようなプレインキュベートは必要なく、YES で wash 後そのまま

プレートにまける。

LiAc 法

◆調整する試薬類

0.1M Lithium acetate (pH4.9)	オートクレーブ後、室温保存
Lithium acetate	100mM
50% PEG4000	フィルター滅菌後、室温保存
PEG4000(WAKO)	50%(W/V)

◆プロトコール

1. シングルコロニーを掻き取り YES:10ml に懸濁し、33°Cでオーバーナイト培養する。
2. cell 数をカウントし 1×10^6 cell/ml になるよう希釈し(50ml for 3 samples)、33°Cで 4hr 培養する。
3. 培養液を 50ml 遠心管に移し、3000rpm, 2min, room temp. で集菌。
4. 細胞を D.W.:1ml に懸濁しエッペンチューブに移して 10000rpm, flash, room temp. で集菌。
5. 細胞を 0.1M lithium acetate (pH4.9):300 μ l に懸濁し、30°C, 1hr インキュベート。この時 50% PEG4000(和光純薬工業)も一緒にインキュベートする。
6. 細胞液を 100 μ l ずつエッペンチューブに分注し DNA:10 μ l, 50%PEG4000:290 μ l を加え 30°C, 50min インキュベートする。
7. 42°Cで 10min ヒートショック。10000rpm, flash, room temp. で集菌し、細胞を EMM₂:200 μ l に懸濁する。
8. 再び 10000rpm, flash, room temp. で集菌し、細胞を EMM₂:1ml に懸濁する。
9. 1/10, 9/10 量を選択培地にまき、数日間 33°Cで培養する。

注意: 選択マーカーが G418, hyg, NAT などの薬剤の場合 YES で wash 後 3hr ほど 30°Cでインキュベートしてから培地にまく。ただし、Aur の場合はこのようなプレインキュベートは必要なく、YES で wash 後そのままプレートにまける。