

ECOS™ SONIC Competent *E. coli* BL21(DE3) Derived

マニュアル(第1版)2101TM

| 製品名 | Code No. | 包装単位 |
|--|-----------|---------------|
| ECOS™ SONIC Competent <i>E. coli</i> BL21(DE3) Derived | 318-09071 | 100 µl × 2 本 |
| | 314-09073 | 100 µl × 10 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わないで下さい。本品の取り扱いに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。

・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 が米国特許を保有しております。

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。

・「ECOS™ SONIC Competent *E. coli* BL21(DE3) Derived」について (Code No. 318-09071, 314-09073)

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す

宿主: *Escherichia coli* 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ください。

・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 BL21(DE3)株から *recA* および *endA* 遺伝子を欠損させた改変株のコンピテントセルです。クローニングとタンパク質発現の両方に使用することができるため、別々の菌株で行う従来法と比べて、作業時間を大幅に短縮することができます。また、本品は薬剤にアンピシリンを使用する場合にヒートショック処理後の SOC 培地による回復培養が不要なため、形質転換を 6 分で行うことができます。

■ 特長

- ・クローニングおよびタンパク質発現に使用可能
- ・ECOS™ 6 分間プロトコールで高効率形質転換が可能
- ・長期保存が可能

II 遺伝子型

E. coli B, F⁻, *dcm*, *ompT*, *hsdS*(*r_B*⁻, *m_B*⁻), *gal*⁻, λ (DE3), Δ*endA*, Δ*recA*

III 形質転換効率

「VI ECOS™ 6 分間プロトコール」で実施した場合

≥ 1 × 10⁷ (cfu/µg pUC19 DNA)

IV 保存と凍結融解(再凍結)について

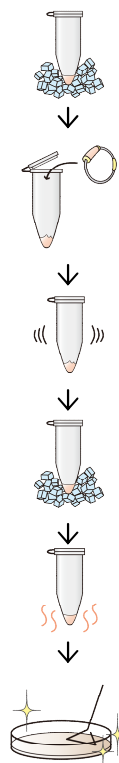
保存温度: -80°C

・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 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。再凍結後の効率等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。

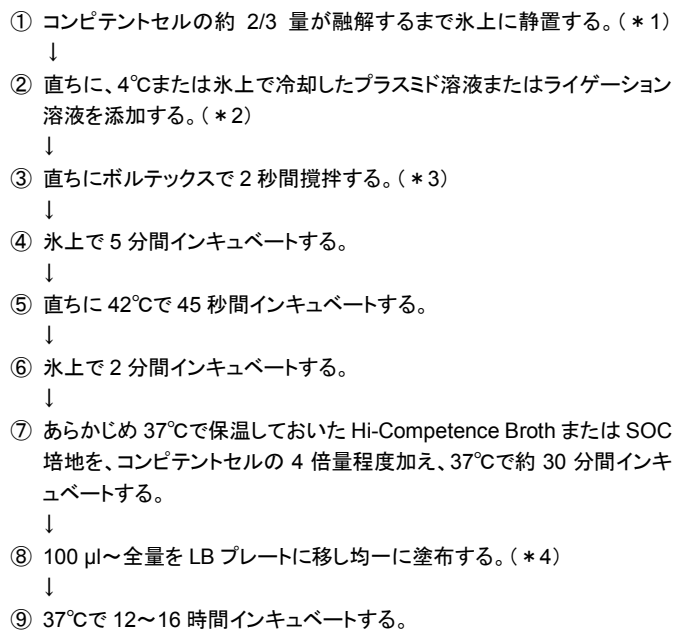
VI ECOS™ 6 分間プロトコール (薬剤耐性にアンピシリンを使用する場合)

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。本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。

- 
- The diagram illustrates the 6-minute protocol steps for Ampicillin resistance. It shows a sequence of actions: 1. Competent cells are thawed on ice. 2. Plasmid or ligation solution is added. 3. The mixture is vortexed for 2 seconds. 4. The mixture is incubated on ice for 5 minutes. 5. The mixture is incubated at 42°C for 45 seconds. 6. The mixture is spread onto an LB plate. 7. The plate is incubated at 37°C for 12-16 hours.
- 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℃で 45 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 プロトコール (薬剤耐性にカナマイシンやテトラサイクリン等を使用する場合)

本プロトコールは、薬剤にカナマイシンやテトラサイクリン等を使用する場合のプロトコールです。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等(アンピシリン以外)を使用する場合には、「VI ECOS™ 6 分間プロトコール」を用いると形質転換効率が低下しますので、本プロトコールに従って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。

- 
- The diagram illustrates the 6-minute protocol steps for Kanamycin or Tetracycline resistance. It shows a sequence of actions: 1. Competent cells are thawed on ice. 2. Plasmid or ligation solution is added. 3. The mixture is vortexed for 2 seconds. 4. The mixture is incubated on ice for 5 minutes. 5. The mixture is incubated at 42°C for 45 seconds. 6. The mixture is incubated on ice for 2 minutes. 7. The mixture is incubated at 37°C for 30 minutes. 8. The mixture is spread onto an LB plate. 9. The plate is incubated at 37°C for 12-16 hours.
- 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℃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) 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%以下にしてください。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。本品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℃で保管してあるものを使用し、セクションに使用する薬剤は以下の濃度でを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。