



Non-Heat Shock Transformation: Protocol Book

製品概要

HIT コンピテントセルを使うと、世界最速の形質転換が行えます。独自の製造技術により、簡単な1ステッププロトコールを使用した1~10分での高効率な形質転換が可能になりました。

内容

- HIT Competent Cells™
- pUC19 Control Plasmid (ug/ul) : 5ul
- Protocol Book

輸送方法

HIT コンピテントセルは、生産・輸送・保管の全工程において常に-70°Cの温度管理が行われています。

保管方法

HIT コンピテントセルは、受け取り後すぐに-70°Cの安定な超低温フリーザーで保存してください。適切に保管すれば、12ヶ月間品質と性能を保つことができます。

注：HIT コンピテントセルは、液体窒素の中では保存しないでください。

形質転換効率の算出方法

HIT コンピテントセルの形質転換効率は、 $10^7 \sim 10^9$ transformation / ug pUC19 plasmid DNA に及びます。(効率は製品やプラスミドの大きさに依存します。)

Formula	transformation efficiency = (transformed colonies) / (μg of plasmid)
Example	$8.2 \times 10^8 / \mu\text{g}$ (efficiency) = 823 (transformed colonies) / $10^{-6} \mu\text{g}$
Test for	RH619: HIT Competent Cells™-DH5a Super 10^9
Selection	LB agar (Ap 50 μg/ml)
Results	test with $10^{-6} \mu\text{g}$ pUC19 plasmid, resulted in efficiency of $8.2 \times 10^8 / \mu\text{g}$



用途別製品リスト

Cloning Applications	HIT™-DH5a	HIT™-JM109	HIT™-21
Large Plasmids > 6 kb*	Ideal	+	+
Subcloning	Ideal	Yes	+
cDNA Library	Yes	Yes	+
Fast Growth	+	Ideal	Yes
Single Stranded DNA	+	Ideal	+
Toxic Protein Expression	No	No	No
Mutagenesis	Yes	+	No
Protein Expression	No	No	Ideal
Blue/White Screen	Yes	Yes	No

+ : 使用可能だが、最適な結果を得られない場合がある

* 6kb以上の大きいプラスミドで(サブクローニングよりも)高効率な形質転換を求める場合は、通常の1ステッププロトコールではなく改変プロトコール(Q&A参照)をご使用ください。

遺伝子型リスト

遺伝子型	用途	HIT™-DH5a	HIT™-JM109	HIT™-21
		<i>F-</i> (80d <i>lacZ</i> M15) (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>hsdR17</i> (<i>r- m +</i>) <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>relA1</i> <i>deoR</i>	<i>F'</i> <i>traD36 proA+ proB+ lacIq</i> (<i>lacZ</i>)M15 I (<i>lac-proAB</i>) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>relA1</i>	<i>E. coli</i> B, <i>F-</i> , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>rB-mB-</i>), <i>gal</i> (DE3)
<i>endA1</i>	抽出中のプラスミドの分解を防ぐ	Yes	Yes	No
<i>recA1</i>	DNAの組換えを防ぐ	Yes	Yes	No
<i>hsdR</i>	特定のPCR DNA鎖やcDNAライブラリーの形質転換効率を上げる	Yes	Yes	Yes
<i>deoR</i>	高分子量のプラスミドやコスミドの形質転換効率を上げる	Yes	No	No
<i>LacZ</i> M15	Blue/Whiteスクリーニング	Yes	Yes	No
<i>Lon</i> & <i>ompT</i>	<i>Lon</i> & <i>ompT</i> プロテアーゼ欠損により、タンパク質の収量を上げる	No	No	Yes
<i>me131</i>	RNase Eを阻害し、mRNAの安定性を向上する	No	No	Yes
<i>dam/dcm</i>	DNAメチル化を防ぐ	No	No	Yes/No

ヒートショック不要形質転換プロトコール (1-10 分間、形質転換効率=10⁷ ~10⁹ /μg)

- プロトコールを実施する前に必ず 12 ページの注意事項をよくお読みください。
- 形質転換に先立ち、プレーティングビーズを乾かし、アガープレートに 37°C に温めてください。(強く推奨)
- ボルテックスはチューブ内の氷がすべて解ける前に終了してください。

氷、37°C に保温したプレーティングビーズ、および選択培地のプレートを用意する。コンピテントセルを室温の水につけ(10-20秒)、1/3量を融解させる。

▽ DNA溶液(コンピテントセルの容量の10%以下)をコンピテントセルのチューブに加える。ボルテックス1秒。

▽ 氷冷、1~10分

▽ 37°C の乾いた選択培地上に注ぎ、RBCプレーティングビーズで広げる。

▽ すぐに37°C でインキュベーションする (HIT-JM109 : 8-16時間、HIT-DH5a 他 : 16-18時間)。形質転換されたコロニーの増加を見ながら実施してください。

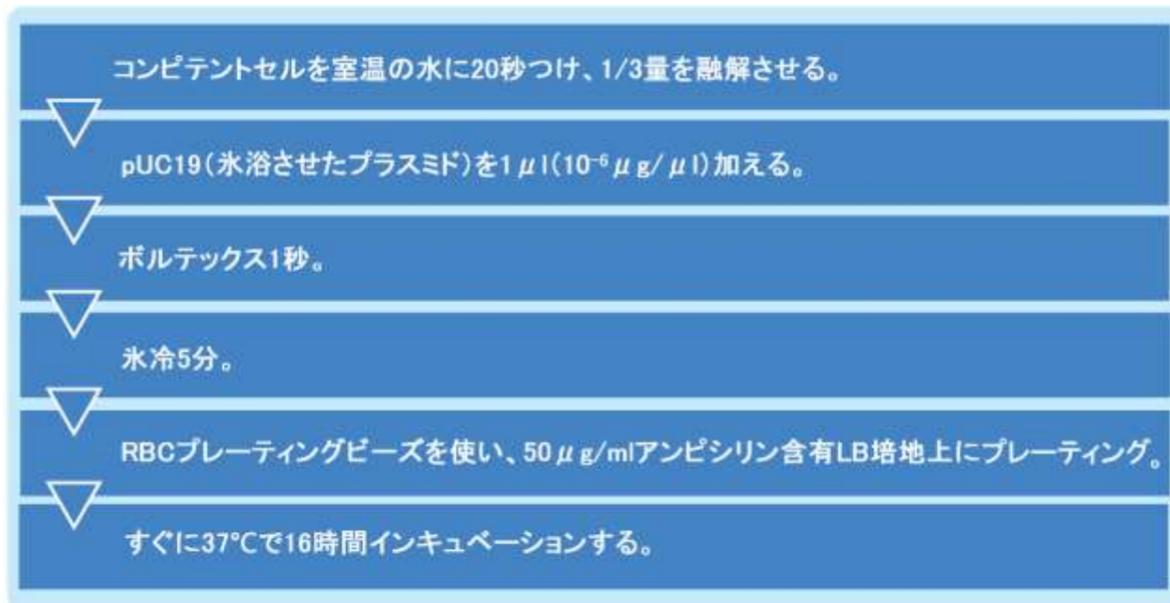


10⁷ to 10⁹ Efficiency: High Ice Transformation

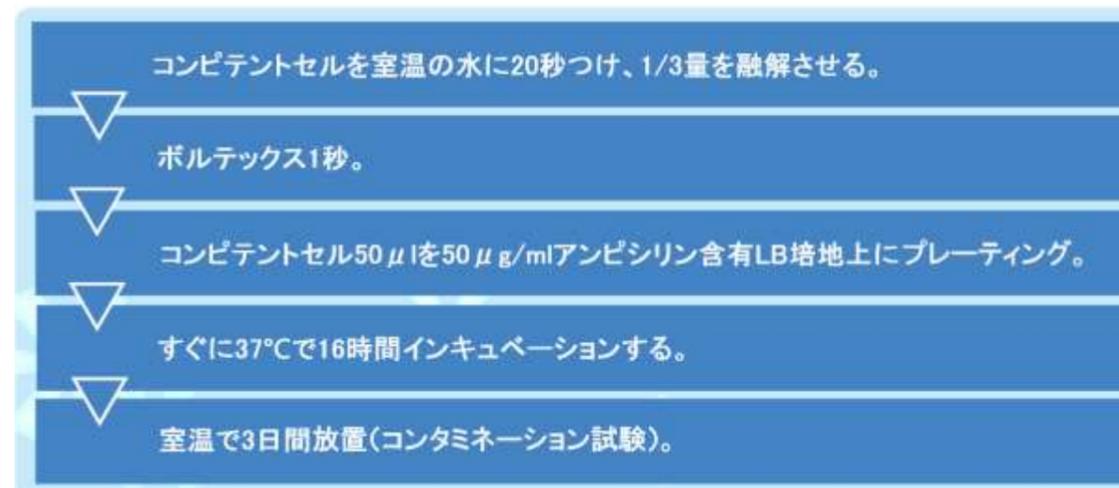


品質管理

形質転換効率試験及びαコンプリメンテーション試験



アンピシリン耐性試験



品質試験レポート(オンライン公開中!): HIT コンピテントセルはバッチごとに、生産時の形質転換効率その他各種品質試験を行っています。WWW.REALBIOTECH.COMにアクセスして製品のロット番号を入力することで品質試験レポートをご覧いただけます。また、製品の出荷においても常に-70°Cの温度管理を行い、品質の維持に努めています。

抗生物質分析試験

Strain	Plasmid	Ampicillin (μg/ml)		Chloramphenicol (μg/ml)		Kanamycin (μg/ml)				Tetracycline (μg/ml)			
		20	50	20	30	10	15	20	25	7.5	15	25	
DH5a (Cat. No. RH619)	pUC19(size: 2.7 Kb)	1.7x10 ⁹	9.1x10 ⁸										
	pUC4k (size: 4.0 Kb)	9.8x10 ⁸	8.5x10 ⁸			*	9.5x10 ⁷	3.7x10 ⁷	1.5x10 ⁷				
	pBR325-KR(size: 7.4Kb)	3.2x10 ⁸	2.9x10 ⁸	5.5x10 ⁸	3.0x10 ⁸	*	*	*	*	3.5x10 ⁸	1.2x10 ⁸	1.5x10 ⁷	
JM109 (Cat. No. RH718)	pUC19(size: 2.7 Kb)	4.9x10 ⁸	3.6x10 ⁸										
	pUC4k (size: 4.0 Kb)	3.6x10 ⁸	1.9x10 ⁸			5.5x10 ⁷	1.7x10 ⁷	1.3x10 ⁷	2.9x10 ⁶				
	pBR325-KR(size: 7.4Kb)	7.9x10 ⁷	5.8x10 ⁶	1.5x10 ⁸	1.4x10 ⁸	*	*	*	*	*	1.4x10 ⁸	3.2x10 ⁷	
BL21 (DE3) (Cat. No. RH217)	pUC19(size: 2.7 Kb)	1.5x10 ⁸	4.8x10 ⁷										
	pUC4k (size: 4.0 Kb)	1.4x10 ⁸	3.3x10 ⁷			*	*	1.5x10 ⁷	6.2x10 ⁶				
	pBR325-KR(size: 7.4Kb)	8.2x10 ⁶	3.6x10 ⁵	2.3x10 ⁷	1.8x10 ⁷	*	*	*	*	2.2x10 ⁷	1.9x10 ⁷	6.2x10 ⁵	

* 非推奨

注意事項

- HIT コンピテントセルは、約 1/3 量が融解した状態の時、形質転換効率が最高となります。(完全に融解させた状態で使用した場合、形質転換効率が 1/3 程度に落ちます。)
- 1 秒間ボルテックスにかけても形質転換効率には影響しません。(HIT コンピテントセルは高速のボルテックスにも耐えることができます。)
- 大きいプラスミド (>6kb) や cDNA ライブラリー用の改変プロトコール:
氷冷 20 分→42°C湯浴 1 分→氷冷 20 分
この方法により形質転換効率は 2-5 倍向上します。
- SOC や LB 培地と混ぜて追加のインキュベーションを行う必要はありません。
- 37°Cのプレーティングビーズと選択培地を用いてプレーティングを行うと、室温のプレーティングビーズを使用した場合に比べて、最大 3 倍程度形質転換効率が向上します。
- HIT-DH5a と HIT-JM109 では、Ap: 50 μg/ml、Km: 25 μg/ml、Tc: 12.5 μg/ml の抗生物質濃度が推奨となります。高い濃度では形質転換効率が落ち、低いとサテライトが増加します。
- HIT-DH5a と HIT-JM109 では、37°Cで 18~24 時間のオーバーインキュベーションを行うとサテライトコロニー (pseudo-positive) が増加するので注意してください。

FAQ

- Q: 大きいサイズのプラスミドを形質転換するには、プロトコールを変えた方がいいですか?**
A: 高分子量のプラスミドや cDNA ライブラリー (ベクター+インサート>6kb) を形質転換するには、形質転換効率を向上させるため、氷冷 20 分→42°C湯浴 1 分→氷冷 20 分 にプロトコールを改変した方が良い場合があります。
- Q: 保存の温度や融解の方法は、形質転換効率に影響しますか?**
A: HIT コンピテントセルは-70°C~-80°Cで保存してください。停電や不安定なフリーザーにより徐々に融解が起こると、形質転換効率の低下につながります。室温の水につけて融解させた方が、氷の上で融解させるよりも形質転換効率が良くなります。
- Q: プレーティングビーズとプレーティンググループの間で形質転換効率に違いがありますか?**
A: プレーティングビーズの使用により、プレーティンググループを用いた時に比べ、非常に高い形質転換効率を実現することが可能です。
- Q: プレーティングビーズとプレートの温度や湿度は形質転換効率に影響しますか?**
A: 乾いたプレーティングビーズとプレートを用いた場合、形質転換効率が非常に良くなります。
- Q: コンピテントセルの融解に静水でなく循環水を使った場合、どのような違いがありますか?**
A: 循環水を使って融解すると、形質転換効率が 1.5~3 倍高くなります。
- Q: 氷冷の最適な時間は?**
A: 1~10 分間の氷冷時間の違いは、形質転換効率に大きな影響を及ぼしません。10 分を超えて氷冷を行うと形質転換効率は低下します。

Q: 乾いた温かい選択培地の作り方は?

A: シャーレに培地を流し込んだ後、クリーンベンチ内でシャーレの蓋を外し、30~60 分間余分な水分を蒸発させた後、蓋をしてください。形質転換に先立ち、37°Cで 1 時間以上インキュベートしてください。

Q: HIT コンピテントセルを繰り返し凍結融解することは可能ですか?

A: 凍結融解の試験を広範に行った結果、HIT コンピテントセルは、3 分以内に作業を終わらせれば、融解後、小分けして、再凍結しても形質転換効率を 90%以上維持することがわかりました。流水や水浴 (10~20 秒) で、すばやくコンピテントセルが 1/3 量融解した状態にしてください。次に完全に融解するまで氷冷し、氷上で小分けしてください。保存は-70°Cで行ってください。最大 3 回凍結融解できます。

Q: HIT コンピテントセルの菌株の主な違いについて教えてください。

A: HIT コンピテントセルの菌株は、広く用いられている公開された菌株です。HIT-DH5a は大きめのプラスミドやライブラリーの構築のために改良された菌株です。HIT-JM109 は増殖が速く、ブルー/ホワイトスクリーニングや自動化スクリーニングに最適です。HIT-21 はタンパクの発現のために最適です。詳細は 3~5 ページの用途別製品リストと遺伝子型リストをチェックしてください。

Q: サテライトコロニーを減らすためにはどうすれば良いですか?

- A:** 1. 温かく乾いたプレーティングビーズとプレートを使ってください。
 2. 新しく調整された適切な濃度の抗生物質を使用してください。

Q: 選択培地中のアンピシリンの濃度は形質転換効率に影響を及ぼしますか?

A: 【HIT-DH5a の場合】 LB+Ap 50~60 μg/μl は、LB+Ap 100 μg/μl に比べて 2~3 倍の形質転換効率を示します。形質転換されたコロニーは 11~16 時間の培養で観察されますが、18 時間後はポジティブ・コロニーの周囲にサテライトが出現します。

【HIT-JM109 の場合】 LB+Ap 50~100 μg/μl は同様の形質転換効率です。8~10 時間の培養の後、形質転換されたコロニーが観察されますが、24 時間後にはサテライトコロニーがポジティブ・コロニーの周囲に出現します。

Q: プラスミドのサイズが形質転換効率に影響を及ぼしますか?

A: 形質転換効率=形質転換されたコロニー数/プラスミド量 (μg)。例えば Super 109 コンピテントセルの場合、2.7kb のプラスミドに対し 1.6~5.5×10⁹/μg の効率ですが、10.0kb のプラスミドでは 4.0~9.0×10⁶/μg に効率が落ちます。その差は約 100~1000 倍です。

Q: プレート上にコロニーが見つかりません。HIT コンピテントセルの不良でしょうか?

A: HIT コンピテントセルは製造工程でバッチごとにテストされています。また、輸送・保存においても常に温度管理がなされています。コンピテントセルそのものの問題とは考えにくい状況です。疑わしい場合は、添付のコントロール・プラスミドで形質転換のテストを行ってください。コントロール・プラスミドでも形質転換が起こらず、かつコンピテントセルの保存状態および操作方法も正しい場合は、サイトローブにご連絡ください。