

ユーザーインストラクション：VB 超安定コンピテントセル

Cat. # UC001-010

製品内容

納入品	容量
VB UltraStable™ chemically competent cells	10 × 100 ul
pUC19 プラスミド DNA	20 ul, 50 ng/ul
S.O.C. 培地	5 ml

保存および取り扱い

1. 製品受け取り後、コンピテントセルは長期保管用に -80°Cで保存して下さい。S.O.C. 培地と pUC19 プラスミド DNA は -80°Cで長期保管、または 4°Cで 2 週間まで保存できます。
2. コンピテントセルのチューブは使用前に氷上で融解してください。S.O.C. 培地と pUC19 プラスミド DNA は使用前に室温にしてください。

製品説明

VB 超安定コンピテントセルは高い形質転換効率 (1×10^9 cfu/ug 以上) とリピート配列を持つプラスミドの増幅に最適化されています。



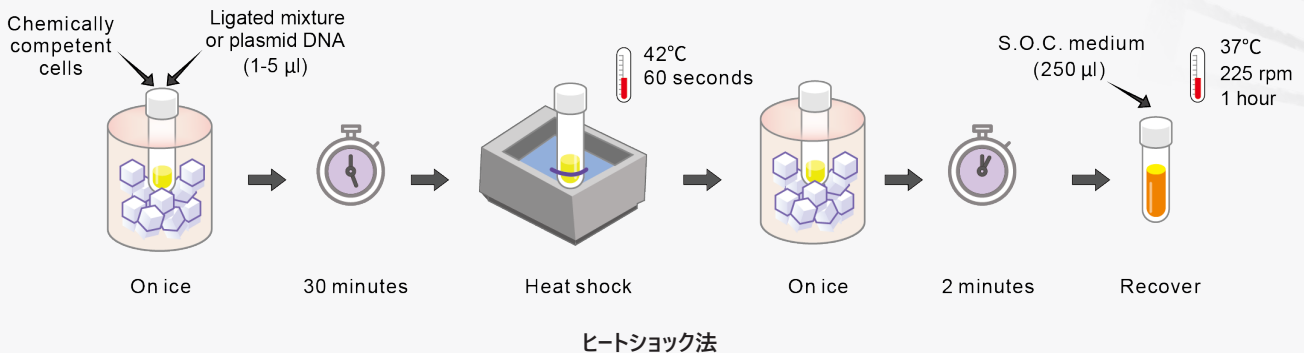
特長

- 反復配列や不安定なインサートを持つベクター（特にレンチウイルス、レトロウイルス、AAV などのベクター）のクローニングに最適化されている。
- recA 遺伝子に変異を持ち、相同組み換えが起きない。
- ccdAB オペロンを欠失しているため、Gateway クローニングに使用可能である。
- fhuA 遺伝子に変異を持ち、T1 ファージの感染に対して耐性である。
- endA 遺伝子に変異を持つため、精製プラスミドにエンドヌクレアーゼ I のコンタミネーションがない（エンドヌクレアーゼによるプラスミド DNA の分解がおこらない）。
- lacZ 遺伝子の omega-fragment を発現するため、ベクターが alpha-complementation 能を持つ場合、コロニーのブルー / ホワイトスクリーニングが可能。

遺伝子型

F' [Δ ccdAB *proAB*⁺ *lacIq* *lacZ* Δ M15 *zzf::Tn10* (Tet^R)] *recA1* *endA1* *thiA* *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*dlacZ* Δ M15 Δ (*ara*, *leu*)7697 *araD*139 Δ *lacX74* *galK*16 *galE*15 *e14-* *relA*1 *nupG* *rpsL* (Str^R) *rph* *spoT*1

形質転換方法



- 氷上で VB 超安定コンピテントセルを形質転換ごとに融解します。
- コンピテントセルに 1-5 μ l のプラスミド DNA (10 pg ~ 100 ng) を入れ、チューブをタッピングしてやさしく混合します。ピペッティングによる混合は避けてください。形質転換効率を算出するためには、別のコンピテントセルチューブに pUC19 プラスミド 10pg を加えてください。
- 氷上で 30 分、インキュベーションします。
- ヒートショック：チューブを 42°C のウォーターバスで 60 秒インキュベーションします。チューブは振とうさせないで下さい。
- すぐにチューブを氷上に移し、氷上で 2 分間インキュベーションします。
- 予め室温に戻しておいた S.O.C. 培地を 250 μ l ずつチューブに加えます。蓋をしっかりと閉め、37°C で 45 分から 1 時間、225rpm で水平方向に振とう培養します。
- LB 寒天選択培地プレート を 37°C で温めておきます。
- 25-100 μ l の形質転換大腸菌液をプレーティングします。少なくとも 1 プレートは十分にばらけたコロニーを得られるように、異なる 2 つの容量でプレーティングすることをお勧めします。形質転換効率の算出用の pUC19 プラスミド形質転換溶液は、コロニー数が多すぎないようにするために、10 ~ 1000 倍に希釈してから 25-100 μ l をプレーティングするようにしてください。
- プレートを裏返し、37°C で一晩インキュベーションします。
- コロニーをピックアップし、シーケンシング、PCR、プラスミド精製などへとお進みください。

形質転換効率の算出 (Transformation Efficiency: TE)

TE (# colony-forming unit / μ g DNA) = 希釈率 \times (コロニー数 / 10 pg pUC19 DNA transformed) \times (10⁶ pg / 1 μ g) \times (350 μ l 全容量 / X μ l プレーティングした容量)