

June 12, 2014

Competent cells の作り方 (XL-1 Blue と EZ-10 用)

Kenichiro Donai

事前準備

① 以下 3 種類の培地及び buffer を準備する。

i) TYM 培地

2% トリプトン

0.5% 乾燥酵母エキス

0.1M NaCl (終濃度)

0.01M MgCl₂ (終濃度)

を dH₂O に溶解し、オートクレーブで滅菌する。

600ml ほど作成し、500ml を培養に用いる 2L フラスコごと滅菌、残り 100ml を pre-culture 用にとすると良い。

ii) Tfb I

30mM CH₃COOK (終濃度、以下同様)

50mM MnCl₂

100mM KCl

10mM CaCl₂

15%(w/v) グリセリン

になるように dH₂O に溶解し、フィルター滅菌し冷蔵保存する。

250-500ml 程度で作ると良い。

iii) Tfb II

10mM Na-MOPS pH7.0 (終濃度、以下同様)

75mM CaCl₂

10mM KCl

15%(w/v) グリセリン

になるように dH₂O に溶解し、フィルター滅菌し冷蔵保存する。

使用量は少ないので 200ml も作れば十分である。

② LB Agar plate を作成する。抗生物質等を入れないのでコンタミを防ぐためにも長期保存されていないものが望ましい。

③ 実験に用いる道具をオートクレーブする。遠心する 250ml チューブは必ず滅菌すること。分注し保存する 1.5ml チューブもオートクレーブする。

作成手順

Day 1

大腸菌の菌液にガラス棒をつけ、LB Agar plate にストリークする。

Day 2

50ml tube に TYM 培地を 10ml 程度入れ、plate からピックアップしたシングルコロニーをさらに 37°C で振とう培養する。

Day 3

① 予め加温しておいた TYM500ml の入った 2L フラスコに、菌液 10ml を加え、30°C で振とう培養する。OD₆₀₀ が 0.6 を超えないように注意する。培養開始前に菌液を入れた直後の OD を計測し、その後 1 時間毎に菌液の OD を計測、OD が 0.2-0.3 になったら 30-40 分ごとに計測する。0.5 を超えたら培養を止めてよい。またこの間に、TfbI 及び TfbII の入ったボトルを氷上で冷却しておくとともに、遠心機の電源を入れ 4°C にしておくこと。以後の操作の氷もボックスに別に用意しておく。

② 滅菌済み 250ml 遠沈管に 250ml ずつ菌液を移し、3,000 rpm で 10 分遠心する。

③ TfbI を 5ml 加え菌体ペレットをサスペンドする。泡立てないようにすること。その後 TfbI を 95ml 加え 100ml に fill up する。氷中に 10 分以上静置する（厳密でない、長くなっても良い）。その後、4,800 rpm で 10 分遠心する。

④ TfbII を 10ml 加え、また菌体ペレットをサスペンドする。これも泡立てな

いようにすること。その後氷中に 15 分静置する。

⑤ 1.5ml チューブに分注していく。グリセリンで菌液に粘性があるため、分注したい容量よりも少し多めに入れる（例: 200 だったら 250 μ l 入れる）。分注し終わったらフタをしっかりと閉める。また分注は出来る限り手早く行う（瞬間凍結までの時間をかけるほど大腸菌の competency が下がっていく）。

⑥ 保存ボックスの格子状の仕切りの内側にチューブを詰めていく。大きめの発泡スチロールの箱に液体窒素を適量入れる。その後、チューブの入った仕切りだけを持ち上げ、発泡スチロール箱内の液体窒素に漬けて瞬間凍結させる。その後上部からもう一度液体窒素をかけ完全に凍結させる。凍結したらまたチューブの入った仕切りを保存ボックスに戻し、発泡スチロール箱内に残った液体窒素を保存ボックスの中に適量入れる（チューブが浸かるくらい）。そのまま -80°C で冷凍保存する。

Titration check

薬剤耐性遺伝子をもつ適当なプラスミドベクターを濃度を振って transformation し、形質転換効率を確かめる。今回は Amp 耐性の pBluescript SK+ を用いて行う。

① プラスミドの濃度をしっかりと計測し、濃度を振った希釈サンプルを作る。ストックしてあったプラスミドの濃度が 90ng/ μ l だったので、ここから 50ng/ μ l、10ng/ μ l、1ng/ μ l の 3 サンプルを作る。濃度を測る BIOSPECNANO は 1ng/ μ l を正確に計測できないので、10ng/ μ l を正確に作り、それを 10 倍希釈して用いる。また、37°C に加温した SOC 培地を用意しておく。

② 希釈サンプルが出来たら、それぞれの濃度のプラスミドを 1 μ l ずつ 1.5ml チューブに分注し、氷上で溶かしたコンピテントセルを 100 μ l 加え、10~30 分氷上で静置する。

③ 氷上に静置していたチューブを、ゆっくり 37°C に加温したウォーターバスに

移し、2 分間 incubate する。

④ 再び氷上に戻し、5 分間静置する。その後 50ml チューブに SOC900 μ l を無菌的に加え、そこにそれぞれの菌液を加える。37°C、150-200rpm で 30 分振とう培養する。

⑤ それぞれのチューブをよく振り、100 μ l の菌液を 1 プレートに撒く。各濃度で 3 枚程度撒くと正確に結果が得られる。37°C で 16 時間ほど培養する。

⑥ プレートに生えているコロニーを計数し、形質転換効率を求める。

例えば、1ng/ μ l のプレートで 100 個コロニーが現れたとする。

撒いた大腸菌中に含まれるプラスミドは $1\text{ng} \times 100 \mu\text{l} / 1000 \mu\text{l} = 0.1\text{ng}$

$100 \text{個} \times 1 \mu\text{g} / 0.1\text{ng} = 100 \times 1 / 0.0001 = 1,000,000 = 1 \times 10^6 \text{cfu} / \mu\text{g}$ になる。

最低でも 10^6 オーダーの形質転換効率でなければ transformation には使えないので注意。