

コンピテントセル作成法

Deep Freezerか液体窒素に保存すれば1〜2ヶ月は利用可。時間の省略には大変便利！

(Nojima *et al.*による方法) *Best Competent cells!!!!*

材料

Transformation Buffer (TB)

950 ml の水に10 mM PIPES (3.0g), 15 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2.2g), 250 mM KCl (18.6g) を溶解しKOHでpH 6.7に調整する。さらに $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ を10.9g (55 mM)加え、終量1literにfill up。濾過滅菌後4度Cにて保存。

- 1 50 ml SOB (LBで可) 培地で $\text{OD}_{610}=0.5$ くらいまで培養(低温で培養するほうが効率がよい)。
- 2 10分間氷冷。
- 3 4度Cで冷却しながら集菌 (中型遠心機3000rpm, 10min) 。
- 4 氷冷したTB 16 mlに懸濁 (しっかり懸濁！これがポイント。)、10分間氷冷。
- 5 4度Cで冷却しながら集菌。
- 6 4 mlの氷冷したTBに懸濁、さらに0.3 mlのDMSOを加え(final 7%)、10分間氷冷。
- 7 100 μl ずつエッペンチューブに分注し液体窒素で急冷、そのまま保存(1〜2ヶ月は大丈夫)。
- 8 形質転換する際は氷上でコンピテントセルを溶解し、DNA sampleを加え1時間氷冷 (30分でも十分)。
- 9 42度Cでヒートショックを30秒(あるいは120秒)与え、ただちに氷冷。
- 10 氷冷を2分した後、SOC培地あるいはLB培地 2mlに懸濁、37度Cで穏やかに1時間振盪する(振盪無しでも可、30分でも十分)。
- 11 集菌し plating、12〜18 時間培養。