

## エレクトロコンピテントセルの作り方 ---English follows Japanese---

\*Biorad の protocol 参考、2012.5.26 作成 by AM  
2024.4.16 modified by AM

### アウトライン：

プレ培養 (3 mL) → 本培養 (1:100 の割合でプレ培養の菌液を新しい培地に入れる。例: 1 mL を 100 mL に) O.D.600 が 0.5~0.7 まで → グリセロール水溶液に置換

実際の手順 \*可能な限りクリーンベンチ内で行うこと。

### Day0: 大腸菌をプレートに播種 (夕方以降)

- 1) -80 °C から取り出した大腸菌を LB プレート (w/o 抗生物質) にストリーク。
- 2) 37 °C で一晩培養。

### Day1\_morning: 下準備 (必須ではない)

- 1) 1.5 mL エッペンチューブ 10~12 本のオートクレーブ滅菌。\*無ければ別にオートクレーブしていないチューブでも OK。
- 2) 三角フラスコに 100 mL の LB を作り (大きめの 200~300 mL のフラスコに作る)、オートクレーブしておく。\*オートクレーブした空フラスコがあれば、実際に培養する時にそのフラスコにオートクレーブした LB を加えればよい。

### Day1\_evening: プレ培養

- 1) スピッツ管に LB を 3 mL 程度入れ、そこに **Day0** で準備した大腸菌のシングルコロニーを植菌。
- 2) 37°C 一晩振とう培養。

### Day2\_morning: 本培養

- 1) 一晩培養した菌液 1 mL を三角フラスコ中の LB100 mL に加える (この時点で培地はわずかに濁る程度)
- 2) 37 °C で振とう培養。OD600 が 0.5~0.7 になるまで。分光光度計で 600 nm の吸光度を測定。

### Day2\_afternoon: コンピ作製

- 3) 氷上で菌液を冷やす (~20 min)。コンピを入れるチューブ等も冷やしておく。以降、菌体を厳密に 0 °C 付近に保つように。
- 4) 4000 x g、4 °C、15 min 遠心。

- 5) 上清を捨て（菌体を犠牲にしても上清をしっかり捨てるほうが大事）、100 mL の 10%グリセロール水溶液に再懸濁、4000 x g、4 °C、15 min 遠心。
- 6) 上清を捨て、50 mL の 10%グリセロール水溶液に再懸濁、4000 x g、4 °C、15 min 遠心。
- 7) 上清を捨て、5 mL の 10%グリセロール水溶液に再懸濁、4000 x g、4 °C、15 min 遠心。
- 8) 上清を捨て、0.4 mL の 10%グリセロール水溶液に再懸濁、100  $\mu$ L ずつチューブに分注して-80 °C に保存（エレクトロコンピは液体窒素で急冷しない方がいいって言う人もいるので、そのまま Deep freezer に放り込んで OK。液チで急冷するプロコロールももちろんよくある）。すぐに使うときは、そのままエレクトポレーションへ。

## Preparation of electrocompetent cells

### OUTLINE:

Pre-culture (3 mL) → Culture (add the pre-cultured bacteria to the fresh medium at a ratio of 1:100 (e.g., 1 mL to 100 mL). Allow the culture to grow until O.D. 600 reaches 0.5–0.7 → Replace the culture medium with a glycerol solution.

**Procedure:** \*Perform all subsequent procedure within a tissue culture hood, whenever possible.

### Day0: Plating *E.coli* (evening)

- 1) Retrieve tubes containing competent *E.coli* cells (10 µL) from –80 °C (Deep freezer), and streak the cells on a LB plate without antibiotics.
- 2) Culture overnight at 37 °C.

### Day1\_morning: Advance preparation (NOT always necessary)

- 1) Autoclave 10–12 1.5 mL Eppendorf tubes. \*If you don't have autoclaved tubes, it is OK to use non-autoclaved ones.
- 2) Prepare 100 mL of LB in an Erlenmeyer flask (use larger 200–300 mL flask) and autoclave it. \*If you have an empty autoclaved flask, you can add the autoclaved LB to it when you are ready to culture.

### Day1\_evening: Pre-culture

- 3) Prepare approx. 3 mL of LB medium to a Spitz tube and inoculate the *E. coli* from a single colony in the medium.
- 4) Incubate overnight at 37 °C with shaking.

### Day2\_morning: Culture

- 1) Inoculate 1 mL of a fresh overnight *E.coli* culture into 100 mL of fresh LB medium (without antibiotics). \*The medium becomes just slightly cloudy.
- 2) Grow the cells at 37 °C with shaking to an OD600 of 0.5–0.7. \*The best results are obtained with cells that are harvested at early to mid-log phase (corresponding to a cell density of 4–5 x 10<sup>7</sup> cells/mL).

### Day2\_afternoon: Making competent cells

- 3) Chill the cells on ice for ~20 min. For all subsequent steps, keep the cells as close to 0°C as possible (in an ice/water bath) and chill all containers in ice before adding cells.
- 4) Transfer the cells to a clean, cold 50 mL conical tube and centrifuge at 4000 x g for 15 minutes at 4°C.

- 5) Carefully pour off and discard the supernatant. \*It is better to sacrifice yield by pouring off a few cells than to leave any supernatant behind. Gently resuspend the pellet in 100 mL of ice-cold 10% glycerol. Centrifuge at 4000 x g for 15 minutes at 4°C.
- 6) Carefully pour off and discard the supernatant. Resuspend the pellet in 50 mL of ice-cold 10% glycerol. Centrifuge at 4000 x g for 15 minutes at 4°C.
- 7) Carefully pour off and discard the supernatant. Resuspend the pellet in ~5 mL of ice-cold 10% glycerol. Centrifuge at 4000 x g for 15 minutes at 4°C.
- 8) Carefully pour off and discard the supernatant. Resuspend the cell pellet in a final volume of 0.4 mL of ice-cold 10% glycerol. Aliquot 100 µL of the suspension per 1.5 mL tube and keep the cells in a deep freezer (< -80 °C). For immediate use, proceed directly to electroporation.