

TAクローニング

1日目

1. PCR
2. 電気泳動で確認
3. PCR産物を精製
4. ライゲーション

※PCR産物の精製にMinElute PCR Purification Kit (QIAGEN)のKitを用いる場合の Protokol

1. PCR

※Blend-taqは酵素。
使用直前に取り出し、使用後はすぐに冷凍庫へ戻す。

NFW	36.5uL	94°C	2:00	30 cycles
10 x PCR Buffer	5uL	94°C	0:30	
dNTPs	5uL	(各自で設定)	0:30	
F primer 10uM	1uL	72°C	(各自で設定)	
Rv primer 10uM	1uL	72°C	7:00	
Blend-taq	0.5uL	4°C	∞	
	49uL			

+ Template DNA 1uL (1-1000ng/reaction)

※N.C (Temp DNAなし) を必ず置くこと。

※アニーリング温度はプライマーのT_m値に基づき設定する。

※伸長反応の時間はターゲットサイズによって決定する。
(1kbpで1minが目安)

2. 電気泳動で確認

目的のサイズ、シングルバンドであることを確認する。

2% Agarose gel を作成する。(w/v = g/mL)

<小さいゲルの場合 15mL>

- ① 0.3gのAgaroseを量り、専用のフラスコに入れる。
 - ② 16mLの0.5 x TAE bufferを加え、混ぜる。
 - ③ サランラップで蓋をし、何個か穴を開ける。
 - ④ 電子レンジで完全に溶かす。※突沸に注意
 - ⑤ 60°C程度まで冷まし、トレイに流し入れる。
 - ⑥ 小さいウェルのコームをはめて、固まるまで30分程度待つ。※しっかり固まらないと、破れるので注意
- 大きいゲルは30mLで計算し、31mLのbufferで溶かす。

泳動する。

- ① コームを外し、トレイごと泳動槽へセットする。
※ゲル全体が0.5 x TAE bufferに浸っているところを確認
- ② パラフィルムの上にbufferを適量落とす。
- ③ 3 μ LのMarker (100bp)をbufferとパラフィルム上で混ぜる。
- ④ 全量を取り、ウェルにアプライする。
- ⑤ 5 μ LのPCR産物をbufferとパラフィルム上で混ぜる。
- ⑥ 全量を取り、ウェルにアプライする。
- ⑦ 蓋を閉め、100v・30min泳動する。
- ⑧ だいたい下から2本目の線上に来たら止める。

染色する。※発がん性物質のため、必ず手袋着用！

- ① ゲルだけをEtBr液(10000倍希釈)に10~30min浸ける。※トレイは入れない
- ② トランスイルミネーターにラップを引き、ゲルを乗せる。
- ③ UVを当てバンドを観察、写真を撮る。※UVは直視しない

3. PCR産物の精製

MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いる。

※カラムは冷蔵庫で保存

※精製後、電気泳動で確認する。2uL/小さいwell

4. Ligation

2 x Ligation buffer	5uL
PCR産物	3uL
pGEM-T Easy vector	1uL
T4 DNA Ligase	1uL
	10uL

※T4 DNA Ligaseは酵素。
使用直前に取り出し、使用後はすぐに冷凍庫へ戻す。

- ① レシピ通り1.5mLチューブ内で混ぜる。
- ② 室温で3-4時間静置。
または、4°Cで一晩静置する。

2日目 5. Transformation

5. Transformation

- ① 氷を用意する。
- ② competent cellを氷上で溶かす(8min程度)。
※温度に弱いため、competent cellの部分は触らない。
この間に...
 - ・ライゲーション反応液も氷上で冷やす
 - ・SOC培地を37°Cインキュベーターで溶かす
 - ・ウォーターバスを42°Cにセットする
- ③ ライゲーション反応液へcompetent cellを全量(20uL)移し、
ゆっくりと2.3回ピペッティング

※competent cellに使ったチップはオートクレーブする。=銀のカン

- ④ 氷上で30minインキュベート
- ⑤ ウォーターバスで、42°C・45secの熱処理をする
- ⑥ 氷上で2min冷ます。
- ⑦ 500uLのSOCを加える。
- ⑧ 37°Cで1H振盪培養する。

※42°Cの熱処理により、competent cellは安定になる。
以後、室温でOK

- この間に...
 - ・LB寒天培地2枚をクリーンベンチ内で乾燥させる
- ⑨ クリーンベンチ内で、LB寒天培地に大腸菌を100uL・50uLずつ撒く。
※残った菌液は-80°Cでグリセロールストック。
最終濃度30%以上にする。
 - ⑩ 37°Cで一晩培養する。

※competent cellは新しいものは分注してから-80°CのBOXへ保存すること。

competent cellの分注の仕方

- ① 氷上でcompetent cellを溶かす。
同時に、1.5mLチューブを5本氷上で冷やす。
- ② competent cellを軽くタッピングし、20uLずつ分注する。
この時、気泡を防ぐため、ピペットは一段階目で止めること。
- ③ -80°CのBOXへ保存する。

3日目

6. Insert check、SOC培地で前培養

6. Insert check (コロニーPCR)、SOC培地で前培養

<準備> SOC培地とAmpicillinを溶かす。(室温でOK)

PCR反応液を作る。

NFW	15uL
10 x PCR Buffer	2uL
dNTPs	2uL
F primer 10uM	0.4uL
Rv primer 10uM	0.4uL
Blend-taq	0.2uL
	20uL

※ N.C (Temp DNAなし) を必ず置くこと。

※ サンプル数 + 1 ~ 2 でmixtureを作る。

※Blend-taqは酵素。

使用直前に取り出し、使用後はすぐに冷凍庫へ戻す。

コロニーをSOC培地、PCR反応液に移す。

※ここからはクリーンベンチ内で行う。

- ① 1mLのSOC培地に2uLのAmpicillin(50mg/mL)を加える。
- ② 白いコロニーの半分を爪楊枝で拾い、SOC培地の入っている1.5mLチューブの壁に塗る。
- ③ 同じ爪楊枝で残りのコロニーを拾い、同じラベルのPCRチューブに塗る。
※PCR反応液を爪楊枝が吸わないように素早く行う。

※寒天培地は4°Cでストックできる。
ただし、水滴が溜まったり、乾燥したらNG

1. ガスバーナーでピンセットを炙る。
2. ピンセットで爪楊枝の上の方をつまみ取り出す。
さらに上の方を手で持つ。
3. 爪楊枝でコロニーを半分ほど拾う。
培地はできるだけすくわないように。
4. 1.5mLチューブの壁にコロニーを塗る。
光に照らすとわかりやすい。
5. 同じ爪楊枝で同じコロニーを拾い、PCRチューブに移す。
PCRチューブへ入れるコロニーはほんの少しでOK

SOC培地で前培養する。

- ① 37°Cで一晩、振盪培養する。

PCR反応を行う。

- ① 右の条件で反応させる。
- ② 2% Agarose gelで電気泳動する。
※Markerは100bp

94°C	2:00	
94°C	0:30	30 cycles
(各自で設定)	0:30	
72°C	(各自で設定)	
72°C	7:00	
4°C	∞	

※アニーリング温度はプライマーのT_m値に基づき設定する。

※伸長反応の時間はターゲットサイズによって決定する。
(1kbpで1minが目安)

4日目

7. LB培地で16H培養

7. LB培地で16H培養

※ クリーンベンチ内で行う。

LB液体培地	3mL
1M Glucose	60uL
50mg/mL Ampicillin	6uL

- ① 上述通り、15mLファルコンチューブに入れる。
- ② 100uLの菌液を加える。
- ③ 37°Cで16時間、振盪培養する。

※ 液が漏れることがあるので、下にキムタオルを敷く。
翌日液が漏れていたら、エタノールで拭く。

※ 菌液は必ず最後に入れる。コンタミ防止

※ 残った菌液は-80°Cでグリセロールストック。
最終濃度30%以上にする。

5日目

8. プラスミド抽出
9. DNA量測定
10. Insert check (しなくてもOK)

8. プラスミド抽出

Mini Puls Plasmid DNA Extraction System (VIOGENE)を用いる。

※新しいキットを使うとき

- WNIに24mLのEtOHを加える。
- MSに40mLのEtOHを加える。
- MX1にRNase Aを全量加え、4°Cで保存する。

- ① 1.5mLチューブにラベルする。(1サンプルにつき4本)
- ② 3mLある菌液を1.5mLチューブ2本に分けて全量入れる。
- ③ 13000rpm・5min・RT
- ④ デカントで上清を捨てる。
- ⑤ スピンドアウン後、黄色チップで上清を完全に除去する。
- ⑥ 200uLのMX1を1本目の1.5mLチューブに注ぎ、ピペティングする。 ※ ペレットを完全に懸濁することが大切。
- ⑦ ⑥を2本目の1.5mLチューブに移し、ピペティングする。 ※ MX2を加えると液色が白濁からクリアになる。
細胞壁を壊し、DNAを1本鎖に変性させるための作業。
- ⑧ 250uLのMX2を加え、転倒混合する。 ※ MX3を入れた後は、核DNAが2本鎖に戻る隙を与えないよう、
すぐに転倒混合する。
DNAを2本鎖に戻す作業。
これにより生じた白濁沈殿はタンパク質。
E.coliの核DNAはこのタンパク質に絡まることで沈殿する。
プラスミドDNAはサイズが小さいため上清中に残る。
- ⑨ 5min・RTでインキュベート
- ⑩ 350uLのMX3を加え、すぐに転倒混合する。
- ⑪ 10000g・7min・RT
この間にカラムを用意し、ラベルする。

- ⑫ 上清をカラムに移す。
※ペレットは絶対吸わないこと。
- ⑬ 7000g・1min・RT
- ⑭ 下に溜まった液は捨てる。
- ⑮ 500uLのWNをカラムに加える。
- ⑯ 7000g・1min・RT
- ⑰ 下に溜まった液は捨てる。
- ⑱ 700uLのWSをカラムに加える。
- ⑲ 7000g・1min・RT
- ⑳ 下に溜まった液を捨て、10000g・3min・RT
この間に、新しい1.5mLチューブを用意し、ラベルしておく。
- ㉑ 50uLのEBをカラムの膜に広がるように、真ん中に落とす。
- ㉒ 3min・RTでインキュベート
- ㉓ 10000g・3min・RT
- ㉔ 下に溜まった液がプラスミドDNA抽出液。-20°Cで保存する。

9. DNA量測定

- ① NanoDropで測定する。
- ② 0.8% Agarose gelで電気泳動する。

※ウェルは大きい方で。

1kbp markerを3uL

プラスミド抽出液は1uLをアプライする。

※ ペレットを吸うとカラムが詰まるので、ペレットは吸わないように注意。

※ 次に制限酵素処理に使う場合は、NFWでEluteすることが大切。

<NanoDropの使い方>

1. 5uLのNFWで洗う
2. 2uLの溶媒でBlankをとる
3. 2uLのプラスミドDNA抽出液で測定する
4. 2回測定し、平均値をとる
5. 使用後は5uLのNFWで洗浄し、キムワイプを挟んでおく

※ NanoDropは正確な値がでないこともあるので、NanoDropだけでなく、電気泳動でも確認したほうがいいらしい。

10. Insert check

※しなくてもよい。先生と相談してください。

① プラスミドPCR

※Blend-taqは酵素。
使用直前に取り出し、使用後はすぐに冷凍庫へ戻す。

NFW	14uL
10 x PCR Buffer	2uL
dNTPs	2uL
F primer 10uM	0.4uL
Rv primer 10uM	0.4uL
Blend-taq	0.2uL
	20uL

※ N.C (Temp DNAなし) を必ず置くこと。

※ サンプル数 + 1 ~ 2 でmixtureを作る。

94°C	2:00	30 cycles
94°C	0:30	
(各自で設定)	0:30	
72°C	(各自で設定)	
72°C	7:00	
4°C	∞	

※アニーリング温度はプライマーのT_m値に基づき設定する。

※伸長反応の時間はターゲットサイズによって決定する。
(1kbpで1minが目安)

② 電気泳動で確認する

※ 2% Agarose gel
markerは100bp

シーケンス

1. シーケンス反応
2. エタノール沈殿

1. シーケンス反応

BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit(Applied Biosystems)を用いる。

※ Bufferは4°Cで保存、BigDyeは-20°Cで保存。

Big Dyeは酵素なので使用直前に取り出し、使用後はすぐに冷凍庫に戻す。遮光！

※ 蛍光色素の退色を避けるためにできるだけ素早く行う。

① Mixtureを作る。

5×Seaquence Buffer	3.5uL
<u>M13 primer 0.8uM (FまたはRv片方のみ)</u>	4uL
Big Dye v3.1	1uL
	8.5uL

※ PCRと違い、N.C (Temp DNAなし) は無し。

※ サンプル数 + 1 ~ 2 でmixtureを作る。

② PCRチューブにNFW・プラスミド抽出液を入れる。

NFW	合わせて
<u>プラスミド抽出液 (200-500ng/reaction)</u>	11.5uL

③ PCRチューブにMixtureを8.5uLずつ分注する。

④ 以下の条件でサーマルサイクラーにかける。

96°C	1:00	
<hr/>		
96°C	0:10	↑ 25 cycles ↓
50°C	0:05	
60°C	4:00	
<hr/>		
4°C	∞	

※ すぐにエタノール沈殿を行う。

その後、すぐに農学部を持って行かない場合は-20°Cで保存。

2. エタノール沈殿

※ 蛍光色素の退色を避けるためにできるだけ素早く行う。

- ① 1.5mlチューブにラベルする。
- ② ピペットマンを25 μ lくらいにして、PCR産物を全量1.5 μ lチューブに移す。
- ③ 3M 酢酸ナトリウムをPCR産物の1/10量加え、ピペッティングとタッピング。
- ④ 100%エタノールを1mlずつ加え、10回くらい転倒混合する。
- ⑤ 4°C・RTで5分間インキュベート
- ⑥ 15,000rpm・4°Cで15分間遠心
- ⑦ デカントで上清を捨てる。
- ⑧ 70%エタノールを1ml加える。※ペレットを剥がさないよう、ゆっくり行う。
- ⑨ 15,000rpm・4°Cで3分間遠心
この間にヒートブロックを95°Cにセットしておく。
- ⑩ 上清を捨てる。スピンドウンして、残りの上清も完全に取り除く。
- ⑪ キムワイプの上にふたを開け、逆さまに5分間置いて乾燥させる。
- ⑫ 乾燥したら、ホルムアミドを15 μ l入れ、ピペッティング。
- ⑬ 95°Cのブロックインキュベーターで2分間インキュベート。
タイムラグができないように、5秒間隔で入れるとよい。
- ⑭ 2分後、氷上に5秒間隔で取り出し、2分間放置。
- ⑮ サンプルバッグに入れ、アルミホイルで包む。
アルミホイルにラベルをする。
すぐに農学部へ持って行かないときは-20°Cで保存。

ダイレクトシーケンス

1. シーケンス反応
2. エタノール沈殿

1. シーケンス反応

BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit(Applied Biosystems)を用いる。

※ Bufferは4°Cで保存、BigDyeは-20°Cで保存。

Big Dyeは酵素なので使用直前に取り出し、使用後はすぐに冷凍庫に戻す。遮光！

※ 蛍光色素の退色を避けるためにできるだけ素早く行う。

① Mixtureを作る。

5×Seaquence Buffer	3.5uL
primer 0.8uM (FまたはRv片方のみ)	4uL
Big Dye v3.1	1uL
	8.5uL

※ PCRと違い、N.C (Temp DNAなし) は無し。

※ サンプル数 + 1 ~ 2 でmixtureを作る。

② PCRチューブにNFW・プラスミド抽出液を入れる。

NFW	合わせて
PCR産物 (必ず精製したもの)	11.5uL

③ PCRチューブにMixtureを8.5uLずつ分注する。

※ PCR産物の濃度は下の表を参考にする。

ターゲットサイズ	DNA量(ng/reaction)
100-200bp	1-3
-500bp	3-10
-1000bp	5-20
-2000bp	10-40
>2000bp	20-50

④ 以下の条件でサーマルサイクラーにかける。

96°C	1:00	
<hr/>		
96°C	0:10	↑ 25 cycles ↓
50°C	0:05	
60°C	4:00	
<hr/>		
4°C	∞	

※ すぐにエタノール沈殿を行う。

その後、すぐに農学部を持って行かない場合は-20°Cで保存。

2. エタノール沈殿

※ 蛍光色素の退色を避けるためにできるだけ素早く行う。

シーケンスのエタノール沈殿と同様。