

PCR 産物の精製— 1 (primer、dNTP の除去)  
—High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)—

準備：wash buffer (blue cap)に指示量のエタノールを加え、フタに印を入れる

---

1. PCR 反応液を総量 100 ul に調節 (DDW で調節)  
↓
2. 500 ul Binding Buffer (green cap)を加える  
↓
3. フィルターカラムを添付のフタなしチューブに挿入し、2 のサンプルを添加する  
↓
4. 15,000rpm, 30-60 sec、濾液を捨てて、カラムをチューブにもどす  
↓
5. 500 ul Wash Buffer (blue cap)をカラムに添加し、15,000rpm, 30-60 sec。濾液を捨てて、カラムをチューブにもどす  
↓
6. 200 ul Wash Buffer (blue cap)をカラムに添加し、15,000rpm, 30-60 sec  
↓
7. カラムを新しい 1.5 ml チューブに移す  
↓
8. 50-100 ul Elution Buffer (white cap)をカラムに添加  
↓
9. 15,000rpm, 30-60 sec

PCR 産物の精製—2 (バンドの切り出し)  
— QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社)—

準備：キットを最初に使うときに、Buffer PE に指定量のエタノールを加える

---

(操作手順)

1. メス、カミソリでゲルから目的のバンドを切り出し、1.5ml チューブに入れる  
↓
2. ゲルの重量を測定し、3倍量の Buffer QG を添加  
↓
3. 50Cで10分インキュベートし、ゲルを溶かす。途中で数回、ボルテックスする。  
↓
4. ゲルと同容量のイソプロパノールを添加し、混和  
↓
5. 2ml コレクションチューブにカラムをセット  
↓
6. サンプルをカラムに添加し、15,000rpm、1分遠心  
↓
7. 濾液を捨て、カラムをコレクションチューブにもどす  
↓
8. 0.75ml Buffer PE をカラムに添加、15,000rpm、1分遠心  
↓
9. 濾液を捨て、カラムをさらに 15,000rpm、1分遠心して、メンブレンを乾燥させる  
カラムを新しい 1.5ml チューブにセット  
↓
10. 50 or 30ul Buffer EB (or 1/10 TE)をメンブレン中央に添加  
1分後、15,000rpm、1分遠心  
↓
11. 電気泳動を行い、純度と回収率をチェックする

## TA cloning (Invitrogen pCRII vector)

### PCR 産物の準備

- ・ PCR 終了後、24 時間以内にライゲーションする。無理な場合、凍結保存する。
- ・ 電気泳動ゲルからバンドを切り出し、精製する（再度泳動し、エチプロでバンドが検出されることを確認する）
- ・ PCR 産物のライゲーションへの必要量を次式で計算する

(計算値の 5 倍程度入れる；DNA 濃度測定不能の場合、エチプロでバンドが検出できれば OK)

$$\text{Xng PCR product} = \text{Ybp PCR product} \times 50\text{ng pCRII vector} / \text{Size of pCR II vector (3,900)}$$

### pCRII vector へのライゲーション

#### 1. 溶液の混合

PCR product	X ul	(1-5 ul)
X10 ligation buffer	1 ul	
pCRII vector	2 ul	
T4 DNA ligase	1 ul	
DDW	to 10 ul	

2. 14C で 4 時間以上インキュベート（1 夜が良い）。すぐにトランスフォームしない時は、凍結保存

### トランスフォーメーション

ここでは INVaF' コンピテントセルを使用していますが、DH5 $\alpha$ （別にプロトコル）で構わない。

(準備)

- ・ ウォーターバス・ヒートブロックを 42C に設定
- ・ SOC medium を溶かし、室温にする
- ・ LB agar プレート室温にする（Amp を加えてない場合、20 ul Amp 溶液を塗る）
- ・ LB agar プレートに 50 ul X-Gal 溶液を塗る（ここで使用する大腸菌 INVaF' には、IPTG は不要）

(手順)

1. 0.5M メルカプトエタノールと INVaF' コンピテントセルを氷上で溶解
2. 0.5ul メルカプトエタノールをコンピテントセルに加え、緩やかに混和
3. 2-10ul ライゲーション溶液をコンピテントセルに加え、混和。氷上に 30 分静置
4. 42C で正確に 30 秒インキュベート。2分氷冷（攪拌しないこと）
5. 450ul SOC medium を加える
6. 225rpm、37C で 1 時間インキュベート（ヒートブロックでも OK）
7. 50ul, 200ul コンピテントセルを LB agar に塗る（遠心して細胞を濃縮し、1 枚にまいても良い）
8. 37C、18 時間インキュベート。4C で 2-3 時間冷却

## TA cloning (Qiagen PCR cloning: pDrive vector)

### PCR 産物の準備

- ・ PCR 終了後、24 時間以内にライゲーションする。無理な場合、凍結保存する。
- ・ 電気泳動ゲルからバンドを切り出し、精製する（再度泳動し、エチプロでバンドが検出されることを確認する）
- ・ モル比でベクター(50ng/ul)の 10 倍量の PCR 産物をライゲーションに用いる  
(500bp=65ng, 1000bp=130ng, 2000bp=260ng, 3000bp=390ng)  
(DNA 濃度測定不能の場合、エチプロでバンドが検出できれば OK)

### pDrive vector へのライゲーション

1) 2xLigation Master Mix (DNA ligase とバッファを含む), pDrive vector, DW (kit に添付)を解凍し、氷冷

2) 溶液の混合（緩やかにミックス）

PCR product	X ul (1-4 ul)
X2 Ligation Master Mix	5 ul
pDrive vector	1 ul
DDW	to 10 ul

3) 14C で 2 時間以上インキュベート（1 夜が良い）。すぐにトランスフォームしない時は、凍結保存

### トランスフォーメーション

Invitrogen pCRII vector の場合と同じ