

## ライゲーションから大腸菌へ形質転換まで **edited by Kishimoto**

[操作] (PCR で増やしたインサートをベクターに入れるというオーソドックスな場合)

①制限酵素処理したプラスミドと PCR 産物をとってくる。 インサートは多めに。

- ・ Low-melting のアガロースゲルで電気泳動 (泳動層は冷やししながら)。
- ・ 目的のバンドを切り出す (このときできるだけ小さく切り出す。UV は短時間で。)
- ・ 水 (または TE) を少量入れて、65°C でゲルを溶かす
- ・ フェノールを等量入れて vortex して遠心 (常温、10min)
- ・ フェノクロを等量入れて vortex して遠心 (常温、10min)
- ・ クロホルムを等量入れて vortex して遠心 (常温、10min)
- ・ エタ沈

②ライゲーション

- ・ DNA (dry) の入ったエッペンに DNA ligase を入れる
- ・ 10min 室温で反応 (氷に入れれば反応は止まる)。

③大腸菌への形質転換

- ・ 反応したもののエッペンにコンピテントセル (100  $\mu$ l) を入れる
- ・ 氷上で 30 分放置
- ・ 42°C で 1~2 分
- ・ LB 培地 (抗生物質はいれないほうがよい) に入れて 30~60min
- ・ 遠心 (1min) して上清捨てて 100  $\mu$ l の 0.85% NaCl に懸濁
- ・ LB 培地にひろげて 37°C でインキュベート

④目的のプラスミドが入っているかどうかのチェック

[材料]

Phe/Chl、Cracking solution (3% w/v SDS, 50 mM Tris-base, pH12.6)

[操作]

- ・ Cracking solution を 50  $\mu$ l ずつサンプルチューブに分注する。
- ・ つまようじの頭で菌体を採取し、Cracking solution に懸濁する。
- ・ 65度Cで10分間インキュベートする。
- ・ ほぼ等量の Phe/Chl と数  $\mu$ l の BPB 色素を加え、Vortex。
- ・ 14000rpm. 5min 遠心。
- ・ アガロース電気泳動へ。(インサートが入っていれば元のベクターと泳動度が変化。)