

TOPO TA Cloning[®] Kits

25-0185 Version J; 24 July 2006

QUICK
REFERENCE
CARD

PCR産物の調製

1. 各プロトコールに従い、*Taq*ポリメラーゼを使用してPCR産物を調製してください。PCR反応の最後に7～10分間の伸長反応を行ってください。
2. 各PCR産物をアガロースゲル電気泳動で解析してください。

TOPO[®]クローニング 反応

1. エレクトロポレーションを行う場合は、Salt Solutionを4倍希釈したDilute Salt Solutionを使用してください。
2. 以下の表に従い、6 µl TOPO[®] Cloning 反応液を調製してください。

Reagent	Chemical Transformation	Electroporation
Fresh PCR Product	0.5 to 4 µl	0.5 to 4 µl
Salt Solution	1 µl	--
Dilute Salt Solution	--	1 µl
Water	全量 (TOPO [®] Vector を除く) が5 µl になるように添加	全量 (TOPO [®] Vector を除く) が5 µl になるように添加
TOPO [®] Vector	1 µl	1 µl

3. 静かに混合し、室温で5分間インキュベートしてください。
4. チューブを氷上に置いて、形質転換操作に進んでください (One Shot[®] Chemical Transformation、またはOne Shot[®] Electroporation)。

One Shot[®] Chemical Transformation

1. One Shot[®] 大腸菌を氷上で融解してください。
2. One Shot[®] 大腸菌チューブにTOPO[®]クローニング反応液2 µlを添加し、静かに混合してください。
3. 5～30分間氷上で静置してください。
4. 42°Cで30秒間、細胞に熱ショックを与えてください (この際チューブは振らないでください)。回復およびプレーティングに進んでください。

次頁に続く

Corporate Headquarters
Tel: 800 955 6288
Fax: 760 602 6500
tech_support@invitrogen.com



For contact information for
other countries, visit our Web
site at www.invitrogen.com.

TOPO TA Cloning[®] Kits,

One Shot[®] Electroporation

1. One Shot[®] Electrocomp™大腸菌を氷上で融解してください。
2. One Shot[®] Electrocomp™大腸菌チューブにTOPO[®] クローニング反応液2 µlを添加し、静かに混合してください。
3. エレクトロポレーションを行ってください。**注記:** アーク放電が起こる場合はマニュアルをご参照ください。
4. 直ちに、チューブを氷上に移動させ、**回復およびプレーティング**に進んでください。

回復および プレーティング

1. 250 µlのS.O.C培地(室温)をチューブに添加してください。エレクトロポレーションを行った細胞は、15 ml 試験管に移した後、250 µlのS.O.C.培地(室温)と混合してください。
2. チューブ、試験管にキャップをして37°Cで1時間振蕩培養をしてください。
3. あらかじめ温めたLBプレート(適当な抗生物質、また青白判定を行う場合はX-galを添加してください)に、形質転換を行った大腸菌液を10-50 µlプレーティングしてください。TOP10F'大腸菌を用いて青白判定を行う場合には、IPTGとX-galの両方をLBプレートに添加してください。
4. プレートに37°Cで一晩インキュベートしてください。
5. 複数のコロニーを選択してください。青白判定を行った場合は、白色かうすい青色のコロニーを選択してください。濃い青色のコロニーは選ばないでください。**ポジティブクローンの選別**に進んでください。

ポジティブクローンの選別

1. 適切な濃度の抗生物質(50-100 µg/mlアンピシリンまたは50 µg/mlカナマイシン)が入ったLB液体培地でコロニーを培養してください。
2. 適当な方法でプラスミドDNAを抽出してください。
3. 挿入の有無および方向性を確認するために電気泳動(制限酵素切断後)、配列解析を行ってください。

詳細は添付のマニュアルをご参照ください。

以上の製品はリミテッドラベル・ライセンスの対象になっている可能性があります(添付のマニュアルをご参照ください)。使用は研究目的に限られ、いかなる動物、人の治療または診断用途には使用できません。