

製品コード 6028

研究用

---

**Takara**

**Mighty TA-cloning Kit**

---

説明書

v201701Da

---

*Taq* DNA ポリメラーゼなどをベースとする PCR 酵素を用いて得られた増幅産物のほとんどは、その 3' 末端にデオキシリボアデノシン (dA) が一塩基付加されています。これらの PCR 増幅産物をクローニングする方法として、3' 末端にデオキシリボチミジン (dT) を一塩基付加した T ベクターを使用し、PCR 増幅産物の dA 一塩基突出部分と相補的となることを利用してクローニングを行う、TA クローニングの方法があります。

Mighty TA-cloning Kit は、この TA クローニング法により、PCR 産物を短時間で簡便にクローニングするためのキットです。ライゲーション反応に DNA Ligation Kit <Mighty Mix> を使用していますので、簡便な操作で短時間に高効率なライゲーション反応を行うことが可能です。

## I. 内容 (20 回分)

1. pMD20-T vector (50 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ g (20 $\mu$ l)
2. Ligation Mighty Mix* <sup>1</sup>	50 $\mu$ l $\times$ 2
3. Positive Control Insert* <sup>2</sup>	10 $\mu$ l

\* 1 : Ligation Mighty Mix は DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (製品コード 6023) と同じものです。

\* 2 : 3'-末端に dA オーバーハングを有する約 200 bp の DNA フラグメント (*E. coli* ゲノム DNA を鋳型として、*TaKaRa Ex Taq*<sup>®</sup> で増幅したもの) (10 ng/ $\mu$ l)

## II. 保存

− 20℃

## III. キット以外に必要な試薬 (主なもの)

- コンピテントセルまたはエレクトロセル (*E. coli*)
- SOC 細菌培養培地
- アンピシリン / X-Gal および IPTG を添加した LB プレート

#### IV. ベクターマップ

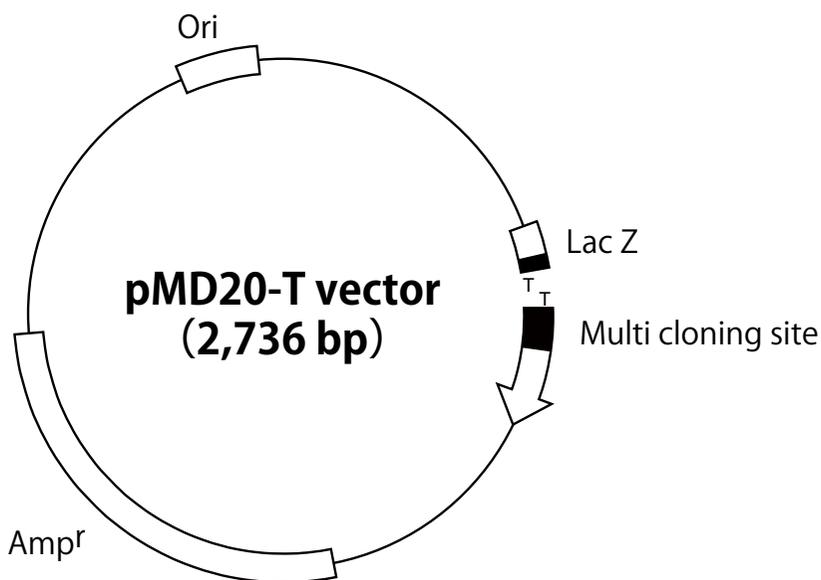


図 1. pMD20-T のベクターマップ

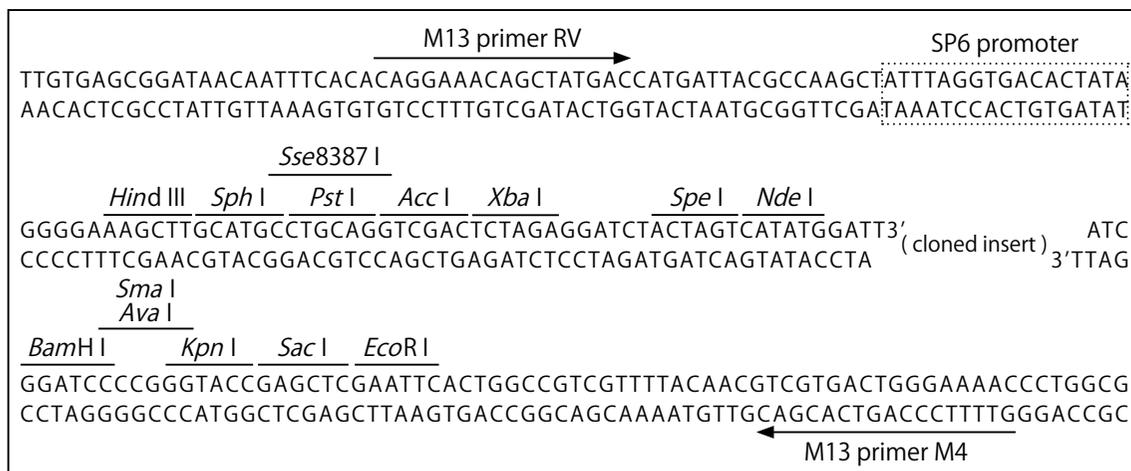


図 2. pMD20-T クローニングサイト

---

## V. 使用上の注意

1. Ligation Mighty Mix は水中で溶解し、穏やかに攪拌してから使用してください。
2. クローニングするフラグメントによっては、挿入されるフラグメントの長さや向きにより停止コドンの出現やフレームシフトが起こらず、カラーセレクションプレート上で淡青色のコロニーとなることがあります。このような場合、コロニー PCR を行ってインサートを確認することをお勧めします。
3. アガロースゲルから目的の増幅フラグメントを回収する場合、UV の照射に注意してください。長い時間照射されると DNA がダメージを受け、クローニングの効率が低下します。
4. PCR の鋳型にクローニングベクターと同一の選択マーカー (pMD20-T vector の場合は Amp<sup>r</sup>) を有するプラスミドを用いる場合は、鋳型プラスミドそのものを保持する形質転換コロニーの出現を防ぐため、PCR 反応液を電気泳動後、アガロースゲルから目的バンドを回収・精製して本操作に使用することをお勧めします。

## VI. 操作

### (1) 目的遺伝子の増幅、精製

*TaKaRa Taq*<sup>™</sup>、*TaKaRa Ex Taq*、*TaKaRa Ex Taq Hot Start Version*、*TaKaRa LA Taq*<sup>®</sup> などを用いて PCR を行い、目的領域を増幅します。反応液の一部を使用し、増幅産物を電気泳動で確認してください。

- 増幅産物がシングルバンドの場合、(2) ライゲーション反応に進む。
- プライマーダイマーが認められた場合、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250) などを使用して簡易精製を行う。その後、(2) ライゲーション反応に進む。
- 非特異的な増幅バンドが認められた場合は、電気泳動後、アガロースゲルから目的バンドを回収する。この際、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up などを使用すると良い。これらの操作の後に (2) ライゲーション反応に進む。

### (2) ライゲーション反応

1. 新しいマイクロチューブに上記の PCR 産物を 1  $\mu$ l\*1 入れる。
2. pMD20-T vector を 1  $\mu$ l、滅菌精製水 3  $\mu$ l\*1 を加え混合する。  
\* 1：適宜調整可能。PCR 産物と滅菌精製水をあわせて 4  $\mu$ l になるように調整してください。
3. Ligation Mighty Mix を 5  $\mu$ l 加え、穏やかに混合する。
4. 16°C で 30 分間インキュベートする。
5. 100  $\mu$ l のコンピテントセル\*2 に対して 4. の溶液全量を用いて形質転換を行う。エレクトロポレーション法により形質転換する場合は、フェノール抽出～エタノール沈殿でバッファー交換してから行う。  
\* 2：*E. coli* HST08 Premium Competent Cells、*E. coli* JM109 Competent Cells などをご使用ください。( *E. coli* HST08 Premium Competent Cells の場合は、IPTG は不要です。)
6. アンピシリン、X-Gal、IPTG を含む LB プレートに塗布する。\*3  
\* 3：適宜 SOC 培地で希釈して、複数のプレートに塗布してください。
7. 37°C で一晩培養し、青/白判定で白コロニーを候補とする。

---

### (3) インサートの有無の確認

目的とする DNA 断片が組み込まれた組換え体を確認するための簡便な方法として、大腸菌の保持するプラスミドのインサートサイズをコロニー PCR により確認する方法があります。

pMD20-T vector は M13 primer M4、M13 primer RV が使用できるので、これらのプライマーと EmeraldAmp® PCR Master Mix、SapphireAmp® Fast PCR Master Mixなどを組み合わせることで、迅速にインサートの有無を確認することが可能です。

## VII. コントロール反応

1. 新しいマイクロチューブに Positive Control Insert を 1  $\mu$ l 入れる。
2. pMD20-T vector を 1  $\mu$ l、滅菌精製水 3  $\mu$ l を加え混合する。
3. Ligation Mighty Mix を 5  $\mu$ l 加え、穏やかに混合する。
4. 16°C で 30 分間インキュベートする。
5. 100  $\mu$ l のコンピテントセル\*1 に対して 4. の溶液全量を用いて形質転換を行う。  
エレクトロポレーション法により形質転換する場合は、フェノール抽出～エタノール沈殿でバッファー交換してから行う。

\* 1 : *E. coli* HST08 Premium Competent Cells、*E. coli* JM109 Competent Cells などをご使用ください。( *E. coli* HST08 Premium Competent Cells の場合は、IPTG は不要です。)

6. アンピシリン、X-Gal、IPTG を含む LB プレートに塗布する。
7. 37°C で一晩培養し、青/白判定で白コロニーを候補とする。\*2

\* 2 :  $1 \times 10^8$  コロニー /  $\mu$ g pUC119 DNA の形質転換効率を持つ *E. coli* JM109 コンピテントセルを使用した場合、ベクター 50 ng あたり、約  $1 \sim 5 \times 10^4$  個の白色コロニーが得られます。

## IX. 関連製品

Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR® (製品コード 6019)  
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (製品コード 6027)  
T-Vector pMD20 (製品コード 3270)  
*E. coli* HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128)  
*E. coli* HST08 Premium Electro-Cells (製品コード 9028)  
*E. coli* JM109 Competent Cells (製品コード 9052)  
*E. coli* JM109 Electro-Cells (製品コード 9022)  
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250)  
M13 Primer M4 (製品コード 3832A/B)  
M13 Primer RV (製品コード 3830A/B)

### < PCR 酵素 >

MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3 (製品コード R076A/B)  
*TaKaRa Ex Taq*® (製品コード RR001A/B/C)  
*TaKaRa Ex Taq*® Hot Start Version (製品コード RR006A/B)  
*TaKaRa LA Taq*® (製品コード RR002A/B)  
*TaKaRa LA Taq*® Hot Start Version (製品コード RR042A/B)  
*TaKaRa Taq*™ (製品コード R001A/B/C)  
*TaKaRa Taq*™ Hot Start Version (製品コード R007A/B)

### < インサートチェック用 >

EmeraldAmp® PCR Master Mix (製品コード RR300A/B)  
EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix (製品コード RR320A)  
SapphireAmp® Fast PCR Master Mix (製品コード RR350A/B)

## X. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・*TaKaRa Ex Taq*、*TaKaRa LA Taq*、EmeraldAmp、SapphireAmp、PrimeSTAR はタカラバイオ株式会社の登録商標です。*TaKaRa Taq*、MightyAmp はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

**テクニカルサポートライン**

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

**タカラバイオ株式会社**