

Colony PCR (E.coli)

Chie Mori 110830

Takara SpeedSTAR HS DNA polymerase
Primer
DW
滅菌爪楊枝
LB+抗生物質のプレート (マスタープレート用)
アイスバス
PCR サーマルサイクラー
アガロースゲル
電気泳動装置

1) PCR 反応溶液の調整 (20 μ l)

0.04 μ l	primer A (100pmol/ μ l)
0.04 μ l	primer B (100pmol/ μ l)
1.6 μ l	dNTP mixture (2.5mM each)
2 μ l	buffer
0.1 μ l	SpeedSTAR HS DNA polymerase
17 μ l	DW

- ・ 反応溶液の調整は氷上で行う。
- ・ Buffer は増幅したい断片が \sim 4kb の場合は I、2kb \sim の場合は II を使用する。

2) 大腸菌を懸濁する

滅菌した爪楊枝で大腸菌のシングルコロニーをピックアップする。
LB+抗生物質のプレートに突いてマスタープレートを作製する。
爪楊枝を反応液に浸けて軽く混ぜる。

3) PCR 反応

3step の場合

x1	95 $^{\circ}$ C	2min
x30~40	98 $^{\circ}$ C	5sec
	55 $^{\circ}$ C *1	10~15sec
	72 $^{\circ}$ C	5~10sec/kbp
x1	72 $^{\circ}$ C	2min

2step の場合

x1	95 $^{\circ}$ C	2min
x30~40	98 $^{\circ}$ C	5sec
	65 $^{\circ}$ C	10sec/kb

- ・ Annealing の温度は使用するプライマーによって適宜変更。(Tm-5 $^{\circ}$ Cが目安) (*1)
- ・ 調整したサンプルは氷上に置き、温度が 90 $^{\circ}$ C以上に上がってから装置にセットする。

4) アガロースゲル電気泳動により増幅をチェック。

- ・ 1 \sim 10 μ l 程度 (増幅量により適宜変更)