



Application

大腸菌コロニーダイレクトPCR

製品名

KAPATaq EXtra HotStart ReadyMix with dye (KK3606)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは、東京医科大学 生化学分野 森谷 昇太 様のご厚意により掲載させていただきました。

方法

プラスミドを制限酵素処理し、他プラスミド由来の外来遺伝子を組み込む実験を行いました。

そこで、目的のインサートを持ったコロニーを選別するためのコロニーダイレクトPCRにKAPATaq EXtra HotStart ReadyMix with dyeを使用しました。

● 反応組成

KAPATaq EXtra HotStart ReadyMix with dye	10.0 μ L
100 μ M forward primer (ベクター既存配列内に設計)	0.2 μ L
100 μ M reverse primer (インサート配列内に設計)	0.2 μ L
超純水	9.6 μ L
Total	20.0 μ L

16.5本分まとめて作成し、各20 μ Lで16本分注。

コロニーを滅菌爪楊枝で採取し、PCR反応液に直に懸濁

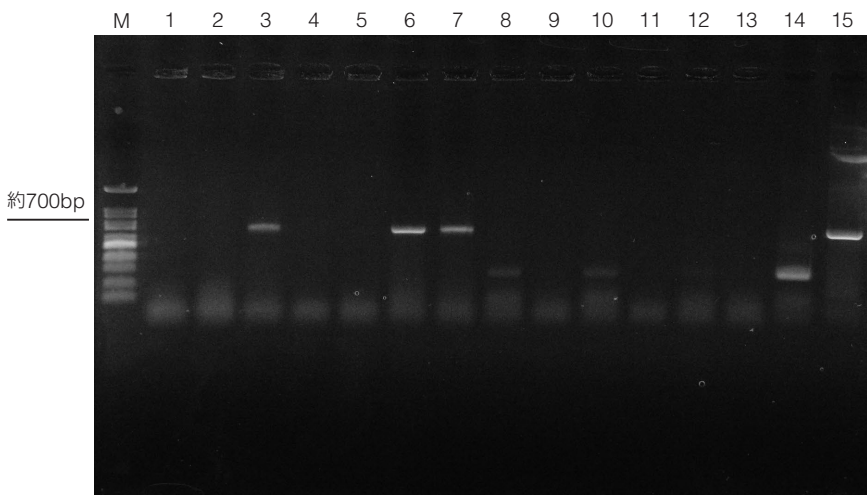
● PCRプログラム

95 $^{\circ}$ C	5分	} 35 サイクル
95 $^{\circ}$ C	30秒	
55 $^{\circ}$ C	1分	
72 $^{\circ}$ C	2分	
72 $^{\circ}$ C	5分	
16 $^{\circ}$ C	hold	

増幅サイズ：約700bp

サーマルサイクラー：BIO-RAD MyCycler

結果



レーン3、6、7、15で目的のインサート由来のバンド(約700bp)が確認されました。(画像は16サンプルのうちの15サンプル分の結果を示しています。)

使用ゲル：1%TBEアガロースゲル
(アガロース：NE-AG02 日本ジェネティクス)
核酸染色試薬*：ミドリグリーンアドバンス
(NE-MG04 日本ジェネティクス)
電気条件：100V 30分、TBE緩衝液
ゲル撮影：FAS-Digi & Blue/Green LEDイルミネーター
(日本ジェネティクス)

*先染めにてアガロースゲル30mlあたりミドリグリーンアドバンス1.5 μ l添加 (1:20,000)



お客様のコメント

日常の実験で使用できる安価なDye入りホットスタートタイプのTaqポリメラーゼを探していました。ホットスタートタイプのものは高価なため、従来は他社Dye入りのホットスタートではない標準タイプを使用していました。プライマーダイマーなどに悩まされてしまうことも多々ありました。今回、日本ジェネティクスさんからDye入りで安価なホットスタートタイプのものが発売されたとのことで使用してみました。結果、写真のようなクリアな実験結果が得られ、陽性コロニー率が低い実験でしたが、目的の配列を持ったコロニーを簡単に選別することが出来ました。Dye入りのため、多検体での電気泳動にかかる手間も大幅に短縮できました。今後も様々な用途に重宝しそうです。