

Premix Colony Direct PCR Kit

Insert Check -Ready-

(Code No. PIK-101)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A3273K

—目次—

[1]はじめに	1
[2]キットの内容	2
[3]保存	2
[4]ご用意いただくもの	2
[5]主なベクターとインサートがない場合のPCR産物のサイズ	3
[6]プロトコール	3
[7]PCR産物の処理	5
[8]トラブルシューティング	6
[9]参考文献	6

ご注意

本キットは研究用試薬です。診断および臨床検査用試薬として使用しないようご注意ください。また、本キットの使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

クロロホルムなど、人体に有害な試薬も一部取り扱いますので、保護具を使用するなど各試薬に添付されている注意書きを厳守してください。

[1] はじめに

DNA断片をプラスミドにサブクローニングしたときに欠かせないのが、得られたクローンに目的の断片が入っていることの確認です。従来は、コロニーからスモールスケールの液体培養を行い、ミニプレップによりプラスミドを精製し、制限酵素で切断してインサートサイズを確認するという煩雑な操作が必要でした。最近では、これに代わってコロニーから直接PCR (Colony Direct PCR)を行い、インサートを確認する方法が用いられるようになってきました。しかしながら、この方法でもDNA Polymerase、Buffer、dNTPsなどを使用前に混合する必要がありました。

Insert Check -Ready- は、Colony Direct PCRに必要なすべての試薬を含んだプレミックスPCRキットで、試薬をPCR用チューブに分注し、コロニーを加えるだけでPCRを行えます。また、λZAP[®] II ^{*1}で作製したライブラリーのインサートサイズの確認にもご使用いただけます。

Insert Check -Ready-には、以下の特徴があります。

- Primer、dNTPs、DNA PolymeraseなどPCRに必要な試薬が1x濃度でミックスされており、すぐにPCRを行えます。
- Primerにシーケンシング用のM13 Primerを用いているため、pBluescript^{®*1}、pUC、pGEM^{®*2}などのプラスミドで使用できます。また、λZAP[®] II ^{*1}でも使用できます。
- DNA PolymeraseはDNA合成速度および増幅効率に優れたKOD Dashを用いているため、Taqに比べて短時間でPCRが完了します。
- このキットを用いることにより、目的とするクローンの確認やDeletion Mutantのサイズの確認が容易に行えます。また、得られたPCR産物は弊社DNAフラグメント精製キットMagExtractor[™] -PCR & Gel Clean up- (Code No. NPK-601)などを用いて精製することにより、シーケンシング用の鋳型としても利用できます。
- 安定性に優れたKOD Dashを用いているため、凍結融解を50回まで繰り返しても活性の低下は認められません。

*1 pBluescript[®]およびλZAP[®]はAgilent社の登録商標です。

*2 pGEM[®]はPromega社の登録商標です。

[2] キットの内容

Insert Check -Ready- Solution (1ml×5本)

<Insert Check -Ready- Solutionに含まれているもの>

- 0.05U/μl KOD Dash
- 0.2mM dNTPs
- 0.2μM M13 Primer P7 (5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3')
- 0.2μM M13 Primer P8 (5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGGAAAC-3')
- 1x Reaction Buffer (1.4mM MgCl₂含有)

[3] 保存

本品は-20℃で保存してください。また、激しい攪拌操作はできるだけ避けてください。

[4] ご用意いただくもの

1. 機器・器具

- サーマルサイクラー
- アガロースゲル電気泳動装置
- UVトランスイルミネーターおよび撮影装置
- レプリカ用プレート
- レプリカ用爪楊枝またはチップ
- PCR用チューブ

2. 試薬

- ミネラルオイル
- アガロースゲル
- DNAサイズマーカー
- SM Buffer (ファージ懸濁用)
- クロロホルム (ファージ懸濁用)

[5] 主なベクターとインサートがない場合のPCR産物のサイズ

ベクター	pUC19	pBluescript® II	pGEM-11zf(-)	pCR2.1
サイズ (bp)	149	275	230	245

pBluescript® II SK(-)のマルチクローニングサイト周辺の塩基配列とPrimer配列

(573) M13 Primer P7		
5' -CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'		<i>BssH</i> II
5' -TAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGAC		
3' -ATTGCGGTCCCAAAGGGTCAGTGCTGCAACATTTTGTGCCGGTCACTCGCGCGCATTATGCTG		
<i>Kpn</i> I (657)		<i>Sac</i> I (759)
TCACTATAGGGCGAATTGGGTACC	MCS	GAGCTCCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGG
AGTGATATCCCGCTTAACCCATGG		CTCGAGGTCGAAAACAAGGGAAATCACTCCG
<i>BssH</i> II		
TTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCAC-3'		
AATTAACGCGCGAACCGCATTAGTACCAGTATCGACAAAGGACACACTTTAACAATAGGCGAGTG-5'		
		3' -CAAAGGACACACTTTAACAATAGGCGA-5'
		M13 Primer P8 (847)

[6] プロトコール

操作上の留意点

- Insert Check -Ready- Solutionは時々攪拌しながら室温または手で融解させてください。高温で融解するとプライマーダイマー発生の原因になります。また、激しい攪拌操作はできるだけ避けてください。
- 融解後は瞬時遠心し、氷上に置いてください。

1. 大腸菌プラスミドのインサートチェック

【準備】

- トランスフォーメーションしてコロニーのできたプレート
- レプリカ用の新しい抗生物質入りプレート
- 滅菌済み爪楊枝またはチップ

- (1) 融解したInsert Check -Ready- SolutionをPCR用チューブに50μlずつ分注する。^{*1}
- (2) 爪楊枝またはチップでコロニーを軽く突く。^{*2}
- (3) レプリカ用のプレートに爪楊枝(またはチップ)の先端を突き刺す。^{*3}
- (4) 爪楊枝(またはチップ)の先端を(1)のPCR用チューブに入れ、すすぐ。^{*4}
- (5) 必要に応じてミネラルオイルを加えて蓋をする。
- (6) チューブをサーマルサイクラーにセットしてPCRを行う。

<PCR条件>

94°C、4min



94°C、30sec^{*5}

60°C、5sec

72°C、Xsec^{*6}

30cycles

- (7) PCR終了後、各反応液の一部を電気泳動でチェックする。
- (8) 電気泳動の結果からポジティブクローンの判定を行い、レプリカしたプレートの当該クローンを必要に応じて液体培養し、プラスミドを抽出する。

^{*1} 液量は50μlが標準ですが、25～100μlの範囲で十分な増幅量が得られます。

^{*2} 菌体成分などによるPCR阻害を回避するため、できるだけ直径1mm前後のコロニーを選択してください。

^{*3} レプリカしたプレートは逆さにして37°Cで培養してください。6～8時間程度でコロニーが確認できる程度の生育がみられます。

^{*4} 溶液に爪楊枝を長時間浸すと溶液を吸収します。サンプル数が多い場合には爪楊枝の代わりにチップを使用し、チューブに立てて目印とすることで、サンプルを混同する可能性を低減できます。

^{*5} オイルフリータイプのサーマルサイクラーの場合は20secにしてください。

^{*6} ターゲット長が2kb以下の場合は30sec、それ以上の場合は1min/2.5kbを目安としてください。

2. ファージのインサートチェック

【準備】

- トランスフェクションしてプラークのできたプレート
- SM Buffer^{*1}およびクロロホルム

- (1) プレート上のプラークを先を切ったチップで取り、200 μ lのSM Bufferに懸濁する。クロホルムを20 μ l加えて20sec程度ボルテックスした後、室温で2時間放置する。
- (2) 融解したInsert Check -Ready- SolutionをPCR用チューブに50 μ lずつ分注する。^{*2}
- (3) (1)のファージ液1 μ lを(2)のPCRチューブに加える。
- (4) 必要に応じてミネラルオイルを加えて蓋をする。
- (5) チューブをサーマルサイクラーにセットしてPCRを行う。

<PCR条件>

94°C、4min

↓

94°C、30sec^{*3}

68°C、Xsec^{*4}

30cycles

-
- (6) PCR終了後、各反応液の一部を電気泳動でチェックする。

^{*1} SM Buffer (1リットルあたり)

NaCl	5.8g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.0g
1M Tris-HCl (pH 7.5)	50ml
2% Gelatin Solution	5ml

^{*2} SM Bufferに含まれるMg²⁺の影響を受けますので、Insert Check -Ready- Solution 50 μ lに対してファージ液1 μ lでPCRを行ってください。

^{*3} オイルフリータイプのサーマルサイクラーの場合は20secにしてください。

^{*4} ターゲット長が2kb以下の場合は30sec、それ以上の場合は1min/2.5kbを目安としてください。

[7] PCR産物の処理

1. 制限酵素処理

- 本キットには15mMのK⁺が存在します。使用する弊社制限酵素の反応BufferがH BufferまたはM Bufferの場合、反応ボリュームの20%を目安にPCR産物を加えて処理してください。L Bufferの場合は、弊社MagExtractorTM -PCR & Gel Clean up (Code No. NPK-601)を使用してPCR産物を精製することをおすすめします。詳しい使用法はキットに付属の取扱い説明書をご参照ください。

2. シーケンシング

- 弊社MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up- (Code No. NPK-601)を使用してPCR産物を精製してください。詳しい使用法はキットに付属の取扱い説明書をご参照ください。

[8] トラブルシューティング

1. バンドがみられない

- (1) 培養時間が長くコロニーが大きすぎる場合、プラスミドが欠落していることがあります。コロニーの大きさは直径1mm程度を目安にしてください。
- (2) GC含量の高い遺伝子をターゲットとする場合は、変性を98°C、20secとしてPCRを行ってみてください。
- (3) PCRに用いる菌やファージの数が少ない可能性があります。コロニーの場合はレプリカの前に爪楊枝(チップ)をPCR溶液に浸してください。また、プラークの場合はタイターを確認してください。6kb以上のターゲットでは 5×10^5 以上のタイターが必用な場合があります。

2. 非特異的増幅産物が多い

- (1) PCRの反応時間が長すぎる可能性があります。伸長時間を30%程度短くして反応を行ってください。
- (2) PCRに用いる菌やファージの数が多すぎることを考えられます。レプリカを行わない場合は、サイクル数を25回としてPCRを行ってください。

[9] 参考文献

- 1) Takagi, M., Nishioka, M., Kakihara, H., Kitabayashi, M., Inoue, H., Kawakami, B., Oka, M., and Imanaka, T. (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4504-4510
- 2) Barns, W. M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2216-2220



【製造・販売元】

－納期・注文に関するお問い合わせ－

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部（大阪）

〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号

TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833

E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部（東京）

〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目17番10号 住友商事京橋ビル

TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951

E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

－製品の内容・技術に関するお問い合わせ－

テクニカルライン

TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833

開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00（土、日、祝を除く）

E-mail : tech_osaka@toyobo.jp

[URL] <http://www.toyobo.co.jp/bio>