

GoTaq® Green Master Mix を使ったコロニーPCR 法と 制限酵素処理の組み合わせによる簡易インサート確認法

GoTaq® Green Master Mix は、PCR 反応液に色素が添加されており、PCR 後に泳動用の色素と混合する必要がなく、すぐにアガロース電気泳動などにより PCR 反応により DNA が増幅されたか確認できるという特長があります。

今回は、簡易 PCR プロトコールと、PCR 産物に直接、制限酵素を加えるという超速インサート確認方法を紹介します。

コロニーPCR は、以下のステップで行うことができます。

ステップ1:

まずGoTaq® Green Master Mixにプライマーを入れて1xマスターミックス溶液を作ります。pGEM-T Easy Vectorでは、T7とSP6のプライマーが利用できます（インサートが短い場合（100 bp以下の場合）にはPCR産物が長くなるM13forwardとreverseの組み合わせが良いでしょう）。

組成:

2x GoTaq® GreenMaster Mix	12.5 µl
10 µ M Primer A	2.5 µl
10 µ M Primer B	2.5 µl
Nuclease-Free water	7.5 µl
Total	25 µl

ステップ2:

コロニー（0.5mm程度）が出てきたら、チップ*の先でコロニーをつついて、GoTaq® Green Master MixのPCR溶液に懸濁します。断片が検出されたクローンが確認できるように、つついたコロニーに番号を記入するか、チップの先をそのまま新しいLBプレートにストリークします。（注*: つま楊枝でも可能ですが、PCR溶液を吸収してしまうので、注意してください）

ステップ3:

下記の温度設定でPCRを行います（機器、プライマーによって最適化してください）。

95°C 2分

[95°C 30秒、55°C 1分、72°C 2分] x 25-30サイクル

72°C 7分

4-16°C Hold

ステップ4:

PCR反応後に、アガロース電気泳動します。GoTaq® Green Master Mixを使えば、色素等を添加する必要がないので、PCR後にサンプルをすぐに電気泳動することができます。

(オプション)

上記のコロニーPCR 法では簡単にインサートの有無は、確認できますが、インサートの向きは確認できません（インサートの内部配列のプライマーを使えば向きも確認できます）。ベクターとインサートの中の配列に存在する制限酵素サイトを使って、断片の大きさから、向きを確認することができます。

GoTaq® Buffer中で、以下の酵素は活性が保持されますので、PCR終了後に直接酵素を反応液中に加えることで、インサートの向きを確認することもできます(表1)。多くの酵素が、反応液(25 µl)に直接加える(0.5 µl)だけで使用可能です。

表 1 GoTaq® Buffer 中で活性が確認されている制限酵素 [酵素名(カタログ番号)]

AgeI (R7251)/ **Apal** (R6361)/ BamHI(R6021)/ BglII (R6081)/ ClaI (R6551)/ EcoRV (R6351) / HindIII (R6041) / KpnI (R6341)/
MluI (R6381)/ **NcoI** (R6513)/ **NdeI** (R6801)/ NheI (R6501) / **PstI** (R6111)/ PvuI (R6321) / **SacII** (R6221)/ **SalI** (R6051)/ **SphI** (R6261)/
XbaI (R6181)/ XhoI (R6161)

太字は、pGEM-T Easy vector で使用できる制限酵素

表 2 GoTaq® Buffer 中で使用できない可能性がある酵素(スター活性など) [酵素名(カタログ番号)]

EcoRI (R6011)/ ScaI (R6211)/

制限酵素の切断に関する資料:

<http://www.promega.com/enotes/applications/ap0075.htm>

本プロトコールは、プロメガ株式会社テクニカルサービス部で作成したものです。ユーザー様の実験を保証するプロトコールではありませんが、参考にしていただき GoTaq®GreenMaster Mix の利便性を感じていただければ幸いです。

製品名	サイズ	カタログ番号
GoTaq® Green Master Mix	100 回分	M7122
	1000 回分	M7123

プライマー(すべて合成してお使いください)

T7 promoter primer	5' -d(TAATACGACTCACTATAGGG)-3'
SP6 promoter primer	5' -d(TATTTAGGTGACACTATAG)-3'
pUC/M13 Forward primer	5' -d(GTTTTCCTCAGTCACGAC)-3'
pUC/M13 Reverse primer	5' -d(CAGGAAACAGCTATGAC)-3'

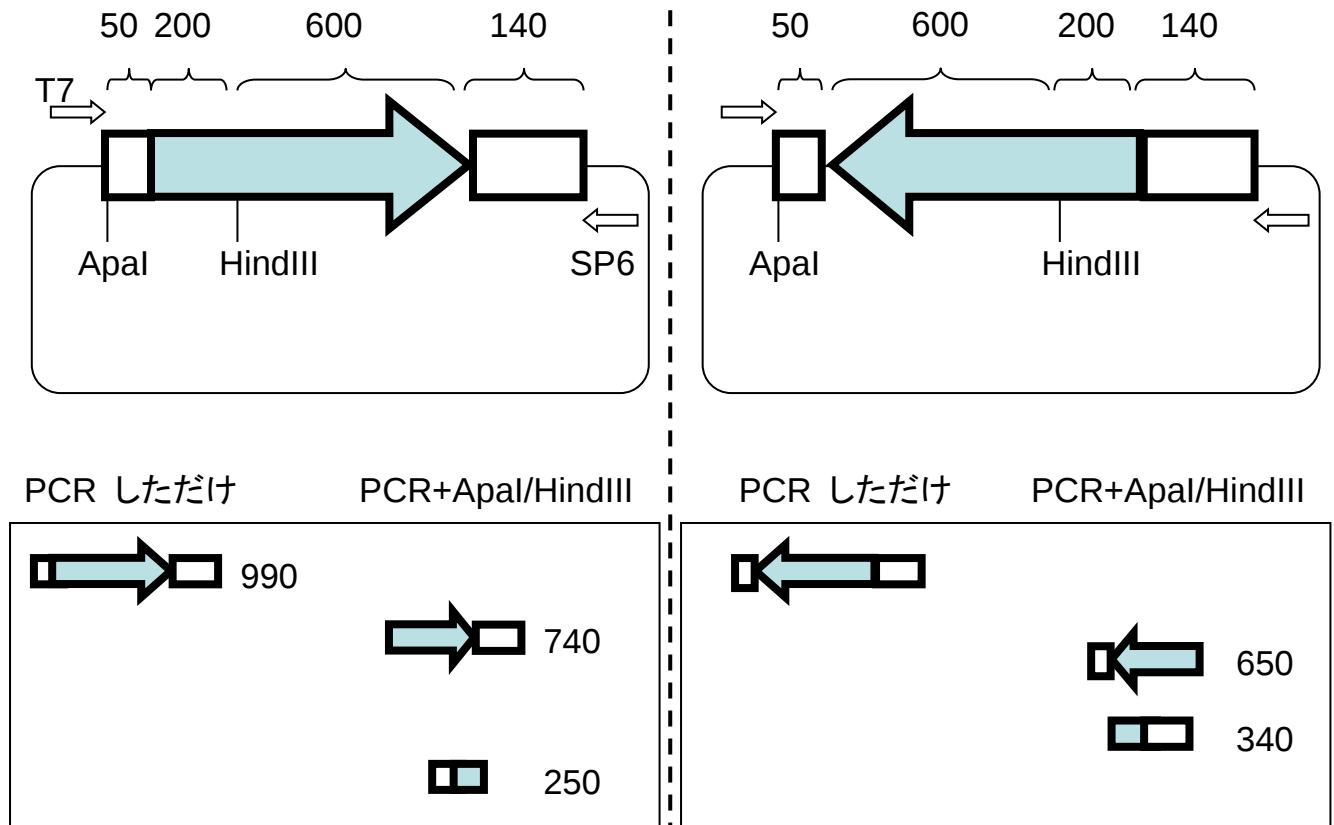
お問い合わせ先:
プロメガ(株) テクニカルサービス部
電話: 03-3669-7980 Fax: 03-3669-7982
E-mail: prometec@jp.promega.com

2020/2/5 改定

<参考資料>

コロニーPCR から向きの確認ができる例

インサートの内部に以下のように HindIII で切断される配列があるとする。



上記の例はT7 とSP6 でインサートが入っているか確認できる。確認後、さらにApal と HindIII をPCR 反応液に加えて37℃で一時間処理して、泳動すると向きが確認できる。下の図は、電気泳動したときのイメージです。