

Colony PCR

2014. 4 ver.1

by S. Tanimura

1. 大腸菌を爪楊枝でかき取り、15 μ l Milli-Q H₂O/0.5 ml チューブのなかに懸濁する。
 - ☞ 爪楊枝でかき取った大腸菌の一部を新しいプレートにうえ継ぎ、37°Cで培養しておく。Colony PCR 終了後に、このプレートからポジティブクローンをピックアップする。
 - ☞ 爪楊枝の先端をチューブの壁にこすりつけるようにして懸濁すると良い。
2. 99°Cにて 5 min 熱処理する。
3. 15,000 rpm にて 10 min 遠心する。
4. 上清 (E. coli lysate) を PCR の鋳型として用いる。

5. Colony PCR

	(15 μ L)
GoTaq Green Master Mix (2X)	7.5 μ L
Primer-1 (10 μ M)	1.5 μ L
Primer-2 (10 μ M)	1.5 μ L
E. coli lysate	4.5 μ L

95°C	2 min	} 25 ~ 30 cycles
95°C (Denaturation)	30 ~ 60 sec	
55°C (Annealing)	30 ~ 60 sec	
72°C (Extension)	1 min/1 kbp	
95°C	5 min	

GoTaq Green Master Mix (Promega)

#M7122 (100 reactions)

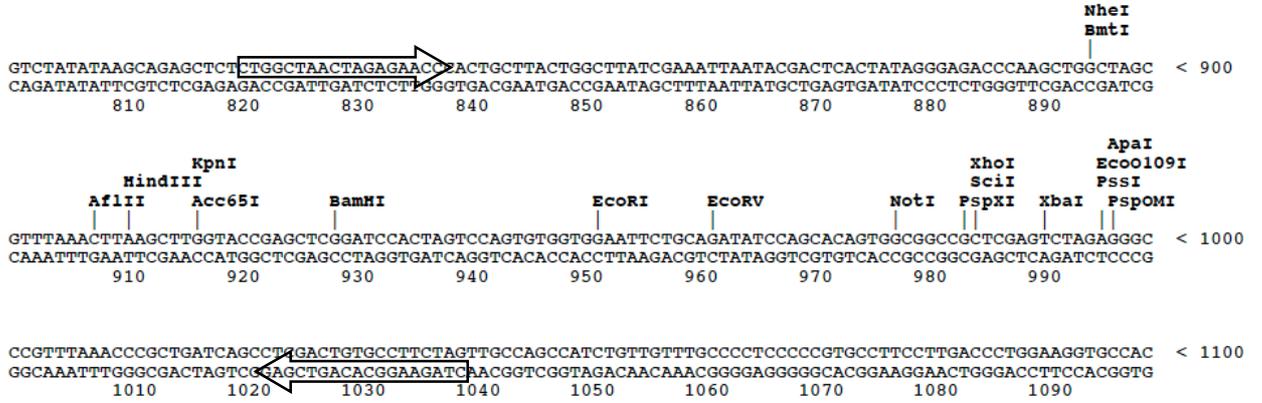
#M7123 (1,000 reactions)

- ☞ Annealing の温度は用いる Primer に応じて適宜変更する。
 - ☞ 各ベクターに対応した Primer set は次ページの通りであるが、非特異バンドが増幅される場合などは、クローニング時に用いたインサート側の Primer とのコンビネーションを検討すると良い。
6. アガロースゲル(目的に応じてゲルの濃度を変える)に PCR 反応溶液全量をアプライして電気泳動する。
 7. Et-Br 染色液にてゲルを染色した後、UV トランスイルミネータにて観察、写真撮影する。

pcDNA3 (Invitrogen)

STN57 5'-CTGGCTAACTAGAGAACC-3'

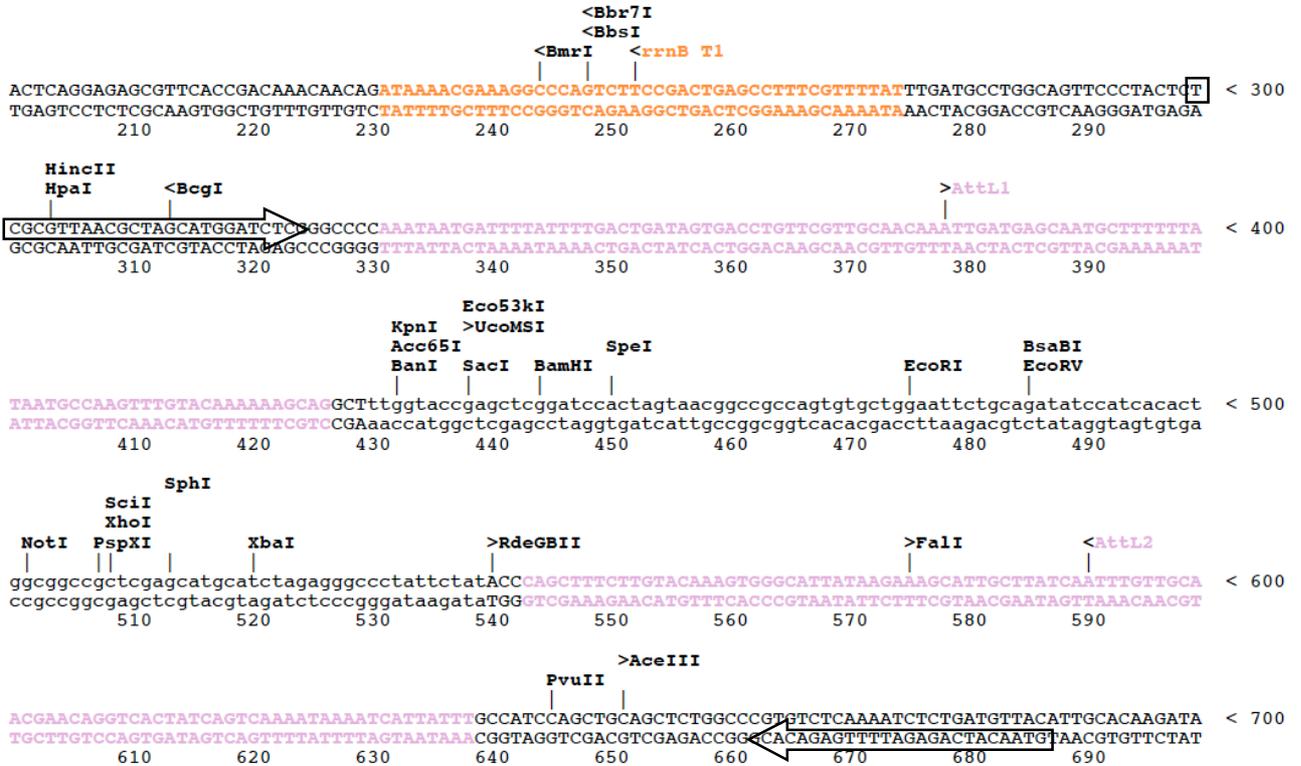
STN58 5'-CTAGAAGGCACAGTCGAG-3'



pENTR-pc3MCS

pENTR-F 5'-TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC-3'

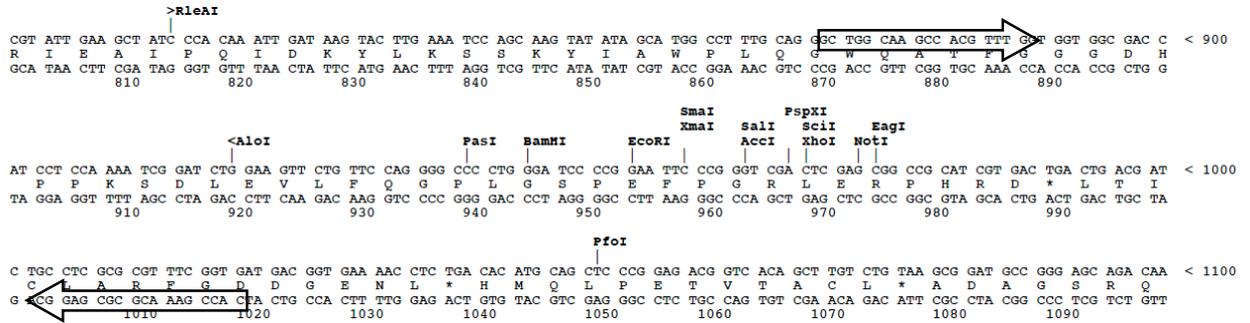
pENTR-R 5'-GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC-3'



pGEX-4T/-6P-1/-2/-3

GST-F (STN29) 5'-GCTGGCAAGCCACGTTTG-3'

GST-R (STN30) 5'-CACCGAAACGCGCGAGGC-3'



pEGFP-C1 (Clontech #6084-1)

AH053 5'-CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG-3'

AH078 5'-TCAGTTATCTAGATCCGGTG-3'

