

TaKaRa PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (#R046A)

☞ http://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/r046a_j.pdf を参照のこと。

1. プライマー設計

【例】「GAC」を「TAG」に変異させる場合

基本設計：変異部分を中心にオーバーラップ領域を 15 塩基選定する。

さらに、変異導入部分から 3' 側に 18 塩基伸ばしたものを選擇する。



2. PCR 反応液の調製

鋳型とするプラスミドは 10~100 pg/μL に希釈したものを使用する。PCR 反応液中 (20 μL) のプラスミド量が 40 pg を超えると鋳型プラスミド由来の形質変換体得られてしまうため、変異体の取得率が低下する恐れがある。

Prime STAR Max Premix (2×)	10.0 μL
Primer-1 (10 μM)	0.4 μL
Primer-2 (10 μM)	0.4 μL
Plasmid (10~100 pg/μL)	0.4 μL
Milli-Q	8.8 μL
Total	20.0 μL

☞ 添付のプロトコールでは PCR の反応を 50 μL で行っているが、20 μL にスケールダウンして操作を行っても PCR の結果に影響しない。

3. PCR

98 °C	1 min	}	30 cycle
98 °C	10 sec		
55 °C	15 sec		
72 °C	30 sec/kb		
10 °C	over night		

☞ Annealing の温度は用いる Primer に応じて適宜変更する。

☞ このキットは高速増幅が可能であるため 5 sec/kb でも伸長反応に十分であるが、増幅が見られない場合もあるため長め (30 sec/kb) に設定している。適宜変更してもよい。

4. PCR 産物のチェック

パラフィルム上で以下を混合してアガロースゲル電気泳動に供する。

PCR 産物 4 μL

10×loading buffer 1 μL

Milli-Q 5 μL

☞ PCR 産物のバンドが認められれば、次のトランスフォーメーションへ進む。

(バンドとして検出されれば目的の変異遺伝子プラスミドが増幅されていると考えられる。)

5. トランスフォーメーション

PCR 産物 5 μL をコンピテントセル (XL1-blue) 100 μL と混和する。

→ On ice 30 min

→ 温浴 43 °C、35~45 sec

→ On ice 2 min

→ SOC を 900 μL 添加し、37°C、45 min インキュベートする。

→ 3,000 rpm × 3 min

→ 上清の 800 μL を捨て、残りを温和にピペッティングして懸濁する。

→ 抗生物質入り LB プレートに播種する。

→ 37°C、over night

6. Colony PCR あるいは Plasmid Mini Prep → 制限酵素消化によって、適切な組み換えベクターを確認する。

☞ PCR に使用した鋳型プラスミド 0.4 μL を Milli-Q で 20 μL に希釈し、そのうち 5 μL を大腸菌にトランスフォーメーションしておく、鋳型によるバックグラウンドの確率が検討できる。

☞ PCR によって得られた cDNA については、その塩基配列をシーケンスで確認すること。