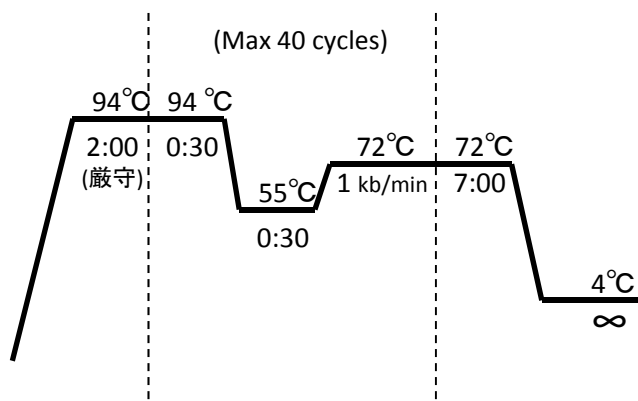


PCR ～GoTaq～

- Go taq は完全に溶解して1 mlチューブに分注して保存(-30℃推奨)する
- プライマーとDNAテンプレートを混ぜるだけでPCRにかけられる
- Loading dyeを加えずに泳動可能である
- 泳動時に適切なDNA markerを使用する
- 1 reaction (20 μ l) は約28円相当
- バンドが出ないときはTm値を下げる (場合によってはDMSOを3%となるように加える)

基本的な反応条件

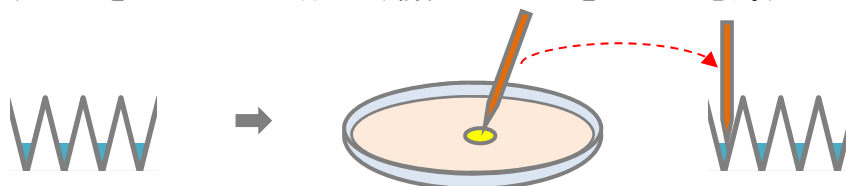
2xGoTaq mix	10 μ l	5 μ l
10 μ M Primer A	0.4 μ l	0.2 μ l
10 μ M Primer B	0.4 μ l	0.2 μ l
DW	7.2 μ l	3.6 μ l
DNA template	2 μ l	1 μ l
total	20 μ l	10 μ l



(DNA template以外を予め良く混ぜておきPCRチューブに分注する)

コロニーPCR with GoTaq

- ① 5 μ lずつDWをPCRチューブに分注し、楊枝でコロニーをつついて懸濁する



- ② サーマルサイクラーで95℃, 10 min加熱後、4℃で冷やす

- ③ 1サンプルにつき、5 μ l 2xGoTaq mixと0.4 μ lのプライマー(10 μ M each: 2つのプライマーを予め混ぜておき、保存しておく)をサンプル数だけチューブに入れ、良く混ぜる

- ④ ③の混合液を5 μ lずつ②のPCRチューブに分注する



- ⑤ サーマルサイクラーで35-40サイクルでPCRする

- ① 抽出バッファーを調整する (使用時にSDSの沈殿がある場合は加熱して溶解)
200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS
- ② 抽出バッファーをTEバッファーで10倍に希釈する
- ③ 1.5 mlチューブに葉などをサンプリングし、②の溶液を加える
1 mgに対して100 μ lが目安。15日目ぐらいの幼苗の第一葉を一枚に対して約20 μ lでも可能
- ④ 1 mlチップなどでサンプルを潰す (溶液が薄らと緑色になれば良い。完全に潰す必要はない)
- ⑤ 最高速度で5 minほど遠心する
- ⑥ 上清を1 μ l使用してtotal 20 μ l、40 cycleでPCRする。

