

PCR

ポリメラーゼ連鎖反応法を利用して特定の範囲の DNA のみを増幅させる。反応に利用するポリメラーゼは高価で、常温以上でどんどん劣化するので十分に注意する。ここでは Taq DNA ポリメラーゼを用いた典型的な場合を記す。

必要なもの

- ・ 適当なチューブ 1 本
- ・ 600ul チューブ 1 本 or 8 連チューブ 1/8 本 /sample
- ・ 10x PCR Buffer 2ul /sample
- ・ 10mM(2.5mM each) dNTPs Mixture 2ul /sample
- ・ 5 ~ 10uM Primer 2ul x2 /sample
- ・ ミリ Q 10.9ul /sample
- ・ Taq DNA ポリメラーゼ (5U/ul) 0.1ul /sample
- ・ 鋳型 DNA 水溶液 1ul

マージンは実際に使用するサンプルよりも 1 サンプル分多めに作成することで用意するのが正道ではあるが、1 サンプル当たり 0.25ul、8 サンプル当たり 2ul 多めにミリ Q を加えるという対処法も使えなくはない (推奨はしない)。

手順

1. 使用するチューブが入るチューブ立てを冷凍庫に入れておくか、熱伝導性の高いアルミ製チューブ立てを用意しておく
2. チューブに 10x PCR Buffer 2ul、10mM(2.5mM each) dNTPs Mixture 2ul、5 ~ 10uM Primer 2ul x2、ミリ Q 10.9ul をサンプル数 +2(ネガコン + マージン) だけ入れる
3. 使用するチューブに鋳型 DNA 水溶液を 1ul(ネガコンではミリ Q 1ul) 入れておく (あらかじめ薄くしておいてピペットで取りやすい量入れてもよい。ただし 2 でミリ Q を減らすこと)
- 4.2 を氷上に移して Taq 0.1ul をサンプル数 +2 倍加える
- 5.3 を 1 のチューブ立て (鉄製チューブ立ては氷冷) に移して 4 を 19ul ずつ加える
6. 必要ならミネラルオイルを一滴加える
7. サーマルサイクラーにセットして PCR
8. アガロースゲル電気泳動でスクリーニング

Taq は TaKaRa の Ex-Taq でも NEB の激安 Taq でも濃度は同じなので全く同じプロトコルでよい。コスト削減のため液量をさらに減らすことを推奨。ただし 10ul 未満は失敗する可能性が高まるので非推奨。PCR のプログラムはアニーリング温度に注意。非特異的増幅を減らすには Taq を加える段階からは全て氷上で作業する (チューブ立てを冷凍庫で冷やすのはその代用)、徐々にアニーリング温度を下げていく Step Down サイクルなどプログラムを工夫する、Applied Biosystems の AmpliTaq Gold などの HotStart 用ポリメラーゼを使う、などの対処を取る。