

PCR with Phusion

Phusion での PCR プロトコル。

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
- ・ 5x Phusion HF Buffer 4ul /sample
- ・ 10mM(2.5mM each) dNTPs Mixture 2ul /sample
- ・ 5 ~ 10uM Primer 2ul x2 /sample
- ・ ミリ Q 8.8ul /sample
- ・ Phusion 0.2ul /sample
- ・ 鋳型 DNA 水溶液 1ul

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
2. チューブに 5x Phusion HF Buffer 4ul、10mM(2.5mM each) dNTPs Mixture 2ul、5 ~ 10uM Primer 2ul x2、ミリ Q 8.8ul 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 SPW 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 Phusion 0.2ul をサンプル数 +2 倍加える
5. 3 を 1 のチューブ立てに移して 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

典型的な反応サイクル

- | | |
|------|--------------|
| 1.98 | 30s |
| 2.98 | 10s |
| 3.48 | 30s |
| 4.72 | 30s 2 へ 30 回 |
| 5.72 | 5m |

HotStart 用でも同じ。アニーリング温度は Taq の場合より +3 °C にする。伸長時間は Taq の半分。