

In-Fusion反応を利用した複数箇所への同時変異導入例

No.CLI_005

カテゴリ:変異導入

キーワード:クローニング、In-Fusion HD、複数断片、クローニング効率

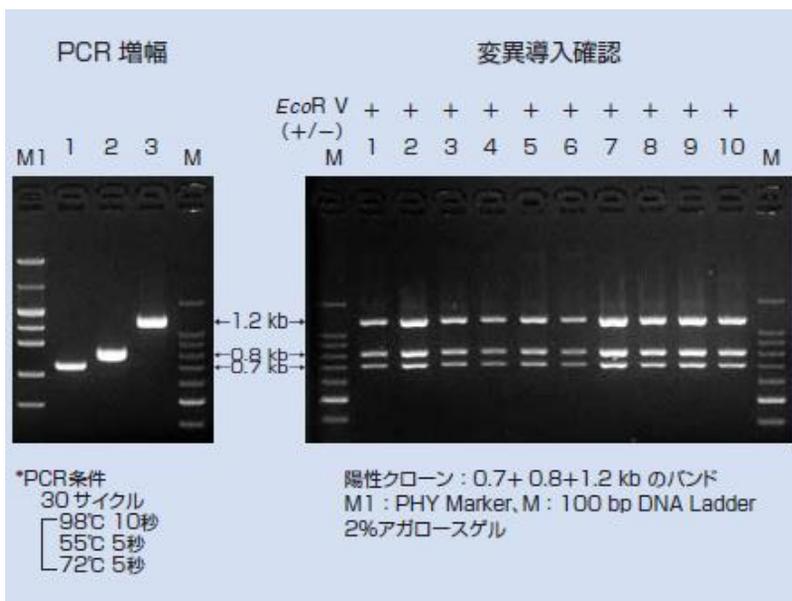
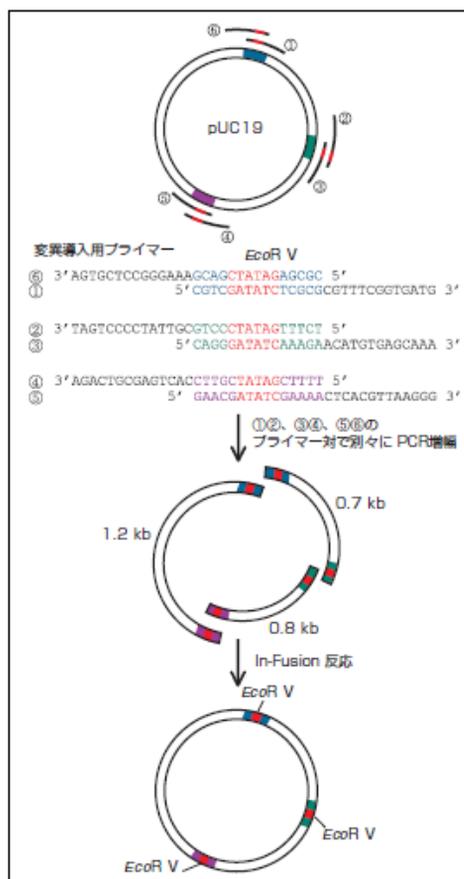
データソース: タカラバイオ株式会社

方法:

pUC 19を鋳型に、PCR増幅後の3つのDNA断片の末端が $EcoR$ V認識配列導入変異部位を中心に15塩基重複するように設計したプライマーを用いてPrimeSTAR[®] Max (製品コード R045A)でPCR増幅した。それぞれの増幅断片を連結させるIn-Fusion反応は、各PCR産物 1 μ lを用い、Cloning Enhancer処理とIn-Fusion反応を同時に行う簡便プロトコールで行った。形質転換には*E. coli* HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128)を使用した。3カ所への $EcoR$ Vサイトの導入の確認は、各形質転換体より調製したベクターの $EcoR$ Vによる切断パターン(0.7 kb + 0.8 kb + 1.2 kb)により行った。

結果:

In-Fusion反応液の1/10量を播種し、3,956個の形質転換体コロニーを取得しました。任意にピックアップした10個のクローンから調製したプラスミドDNAのすべてに、3カ所の $EcoR$ Vの同時変異導入が確認できました。



本実験に使用したIn-Fusion[®] Advantage PCR Cloning Kitは終売となりました。現在は、より性能に優れたIn-Fusion[®] HD Cloning Kit (製品コード 639648~639650)の使用を推奨しています。

備考: