

# TempliPhi 100 / 500 DNA Amplification Kit

【100 反応用：コード番号 25-6400-10】【500 反応用：コード番号 25-6400-50】

## プラスミド DNA 用 簡易プロトコール

一晚（16 時間）培養した大腸菌プレートからピペットチップの先などで  
シングルコロニー（直径 1 mm 程度）を取り、TE バッファー（pH 8.5）50  $\mu$ l に懸濁する<sup>#1</sup>

上記の大腸菌懸濁液 0.2~0.5  $\mu$ l を Sample Buffer 5  $\mu$ l に加えてサンプル溶液を調製する

大腸菌懸濁液	0.2~0.5 $\mu$ l
Sample Buffer	5.0 $\mu$ l
合計	5.2~5.5 $\mu$ l

サンプル溶液を 95 で 3 分間インキュベートする

サンプル溶液を氷上に置き、スピンドアウンしてサンプルをチューブ底に集める

Reaction Buffer 5  $\mu$ l と Enzyme Mix 0.2  $\mu$ l

を混ぜた酵素反応溶液を調製する<sup>#2</sup>

Reaction Buffer	5.0 $\mu$ l
Enzyme Mix	0.2 $\mu$ l
合計	5.2 $\mu$ l

酵素反応溶液 5  $\mu$ l と サンプル溶液 5.2~5.5  $\mu$ l を混ぜる

サンプル溶液	5.2~5.5 $\mu$ l
酵素反応溶液	5.0 $\mu$ l
合計	10.2~10.5 $\mu$ l

30 で 4~18 時間 インキュベートする<sup>#3</sup>

65 で 10 分間インキュベートし、酵素を失活させる

【オプション】 制限酵素消化 / 電気泳動により DNA 増幅を確認する<sup>#4</sup>

シングルカットできる制限酵素でサンプルの一部を消化し、電気泳動を行う

シーケンシング反応

#1 培養時間が 16 時間よりも短くコロニーが小さい場合や、低コピー数のプラスミドの場合は、懸濁する TE の量を適宜減らしてください。あらかじめ予備検討することをおすすめします。

#2 数本分まとめたマスターミックスとして調製することも可能です。用時調製してください。

#3 通常 18 時間で反応が飽和に達します。

#4 濃度既知のサイズマーカーと同時に泳動し、増幅した DNA 量を見積もってください。また、反応後にサンプルに粘性がある場合には蒸留水で希釈してください。