

シーケンス解析による *gpt* 遺伝子の変異部位の同定

(000627 ver. 1.0)

・コンファメーション済みの 6TG^r 変異体コロニーから菌体ペレット (-80 保存) を調製しておく。

・-80 保存菌体から、*gpt* gene のコード領域を含む約 740 bp を PCR で増幅する。
(当方では TaKaRa ExTaq 使用)

Primer-1 (forward); 5'-TAC CAC TTT ATC CCG CGT CAG G -3'

Primer-2 (reverse); 5'-ACA GGG TTT CGC TCA GGT TTG C -3'

反応液組成	(μ l)
DW	39.25
$\times 10$ buffer	5
dNTP mix(2.5 mM)	4
Primer-1(10 pmol/ μ l)	0.5
Primer-2(10 pmol/ μ l)	0.5
ExTaq pol.	0.2 ~ 0.25
total	49.5

上記反応液に、菌体ペレットを極少量加える。

具体的には、

市販の楊枝を滅菌したものを用意し、菌液 (凍結菌体のチューブを指で持って溶かす) に楊枝の先を浸した後、チューブの壁面でよく菌液をこすり落とし、反応液のチューブに楊枝の先をつけて数回かきまぜる。菌を加えたチューブは軽く vortex をかけて混合する。

(菌液を入れすぎるとよくない。楊枝の先を湿らせる程度でよい。)

PCR PROGRAM

step 1	94 , 4.5 min
step 2	94 , 30 sec.
step 3	58 , 30 sec.
step 4	72 , 1 min.
step 5	go to step 2, 29 times
step 6	72 , 5 min.
step 7	4 , forever

・反応の終わった PCR mixture の一部 (2 μ l) を使い アガロース電気泳動により PCR product を確認する。

・使用時まで 4 or -20 で保存する。

・PCR product を template に使用し、サイクルシーケンシング反応を行う。
(以下、反応キットおよびシーケンサーのプロトコルにしたがう。)

Sequence primer-A (forward); 5'- GAG GCA GTG CGT AAA AAG AC -3'

Sequence primer-C (reverse); 5'- CTA TTG TAA CCC GCC TGA AG -3'

Filename : Ecogpt
Sequence Size : 794 (coding region: 200-658)

```

                                Primer-1 ->
HindIII      10      20      30      40      50      60
/AAGCTTGGAC ACAAGACAGG CTTGCGAGAT ATGTTTGAGA ATACCACTTT ATCCCGCGTC
TTCGAACCTG  TGTCTGTCC GAACGGTCTA TACAACTCT  TATGGTGAAA TAGGGCGCAG

                                Primer-A ->
                                70      80      90      100     110     120
AGGGGAGAGGC AGTGCCTAAA AAGACGCGGA CTCATGTGAA ATACTGGTTT TTAGTGCGCC
TCCCTCTCCG  TCACGCATTT TTCTGCGCCT GAGTACACTT TATGACCAAA AATCACGCGG

                                130     140     150     160     170     180
AGATCTCTAT  AATCTCGCGC AACCTATTTT CCCCTCGAAC ACTTTTAAAG CCGTAGATAA
TCTAGAGATA  TTAGAGCGCG TTGATAAAAA GGGGAGCTTG TGAAAAATTC GGCATCTATT

                                190     200     210     220     230     240
ACAGGCTGGG  ACACTTCACA TGAGCGAAAA ATACATCGTC ACCTGGGACA TGTTGCAGAT
TGTCCGACCC  TGTGAAGTGT ACTCGCTTTT TATGTAGCAG TGGACCCTGT ACAACGTCTA

                                250     260     270     280     290     300
CCATGCACGT  AAACCTGCAA GCCGACTGAT GCCTTCTGAA CAATGGAAAG GCATTATTGC
GGTACGTGCA  TTTGAGCGTT CGGCTGACTA CGGAAGACTT GTTACCTTTC CGTAATAACG

                                310     320     330     340     350     360
CGTAAGCCGT  GCGGGTCTGG TACCGGGTGC GTTACTGGCG CGTGAAGTGG GTATTCTGCA
GCATTGCGCA  CCGCCAGACC ATGGCCACAG CAATGACCGC GCACTTGACC CATAAGCAGT

                                370     380     390     400     410     420
TGTCGATACC  GTTTGTATTT CCAGCTACGA TCACGACAAC CAGCGCGAGC TTAAAGTGCT
ACAGCTATGG  CAAACATAAA GGTCGATGCT AGTGTCTGTT GTCGCGCTCG AATTCACGA

                                430     440     450     460     470     480
GAAACGCGCA  GAAGGCGATG GCGAAGGCTT CATCGTTATT GATGACCTGG TGGATACCGG
CTTTGCGCGT  CTTCCGCTAC CGCTTCCGAA GTAGCAATAA CTACTGGACC ACCTATGGCC

                                490     500     510     520     530     540
TGGTACTGCG  GTTGCATTTC GTGAAATGTA TCCAAAAGCG CACTTTGTCA CCATCTTCGC
ACCATGACGC  CAACGCTAAG CACTTTACAT AGGTTTTTCG GTGAAACAGT GGTAGAAGCG

                                550     560     570     580     590     600
AAAACCGGCT  GGTCGTCCGC TGGTTGATGA CTATGTTGTT GATATCCCGC AAGATACCTG
TTTTGGCCGA  CCAGCAGGCG ACCAACTACT GATACAACAA CTATAGGGCG TTCTATGGAC

                                610     620     630     640     650     660
GATTGAACAG  CCGTGGGATA TGGGCGTCGT ATTCGTCCCG CCAATCTCCG GTCGCTAATC
CTAACTTGTC  GGCACCCTAT ACCCGCAGCA TAAGCAGGGC GGTTAGAGGC CAGCGATTAG

                                <- Primer-C
                                670     680     690     700     710     720
TTTTCAACGC  CTGGCACTGC CGGGCGTTGT TCTTTTAAAC TTCAGGCGGG TTACAATAGT
AAAAGTTGCG  GACCGTGACG GCCCGCAACA AGAAAAATTG AAGTCCGCCC AATGTTATCA

                                <- Primer-2
                                730     740     750     760     770     780
TTCCAGTAAG  TATTCTGGAG GCTGCATCCA TGACACAGGC AAACCTGAGC GAAACCCTGT
AAGGTCATTC  ATAAGACCTC CGACGTAGGT ACTGTGTCCG TTTGGACTCG GTTTGGGACA

                                790     800
TCAAACCCCG  ATTT
AGTTTGGGGC  TAAA/
                                DraI

```