



Application

## 細胞株由来cDNAを用いた慢性骨髄性白血病原因遺伝子 (BCR-ABL遺伝子) の検出

製品名 KAPATaqEXtra PCR Kit (KK3009)

メーカー名 KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは、東京医科大学 生化学講座 森谷 昇太 様のご厚意により掲載させて頂きました。

### 実験条件

細胞株 (K-562、およびHL-60) より作成したcDNAを用い、慢性骨髄性白血病の原因となるBCR-ABL遺伝子 (BCR遺伝子とABL遺伝子の異常融合遺伝子) 特異的プライマー、および内部コントロールであるC-ABL遺伝子 (チロシンキナーゼ遺伝子) 特異的プライマーでPCRを行った。

#### 1) 細胞株

K-562 : BCR-ABL (+)、 C-ABL (+)  
HL-60 : BCR-ABL (-)、 C-ABL (+)

#### 2) cDNAの調製

各細胞株よりISOGEN法でRNAを抽出し、RQ1 DNase (プロメガ社) でゲノムDNAを除去、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿後、PrimeScript RT Master Mix (タカラバイオ社) で逆転写反応してcDNAを調製した。

#### 3) PCR反応組成

|                                  |                 |
|----------------------------------|-----------------|
| KAPATaq EXtra DNAポリメラーゼ (5U/μl)  | 0.2μl           |
| 5×KAPATaq EXtraバッファー (Mg2+ free) | 8μl             |
| 25mM MgCl <sub>2</sub>           | 2.8μl           |
| dNTP Mix (10mM each)             | 1.2μl           |
| PrimerF (10μM)                   | 2μl             |
| PrimerR (10μM)                   | 2μl             |
| Template DNA                     | 1μl (40ng cDNA) |
| PCR grade Water                  | 22.8μl          |
| total                            | 40μl            |

#### 4) プライマー配列

##### BCR-ABL

F ; 5' - TTCAGAAGCTTCTCCCTGACAT - 3'  
R ; 5' - TGTTGACTGGCGTGATGTAGTTGCTTGG - 3'

##### C-ABL

F ; 5' - TTCAGCGGCCAGTAGCATCTGACTT -3'  
R ; 5' - TGTTGACTGGCGTGATGTAGTTGCTTGG - 3'

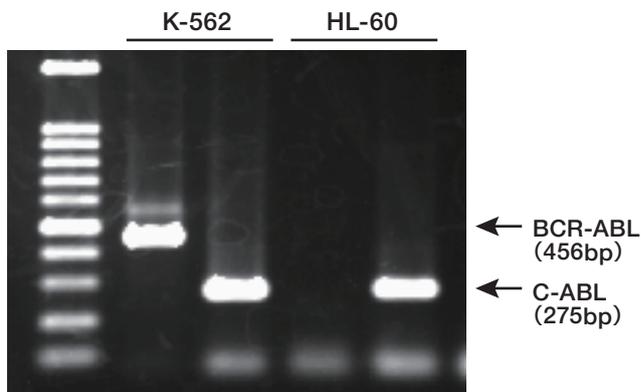
#### 5) サイクルプログラム

|      |     |          |
|------|-----|----------|
| 94°C | 1分  | } 40サイクル |
| 94°C | 1分  |          |
| 64°C | 1分  |          |
| 72°C | 1分  |          |
| 72°C | 10分 |          |
| 16°C | ∞   |          |

サーマルサイクラー : BIO-RAD MyCycler

参考文献 Evans, H., and Sillibourne, J. Promega Notes 57, p21.

### 結果



K-562細胞株は慢性骨髄性白血病のBCR-ABL遺伝子を持っているため、456bpの目的サイズのバンドが検出された。

HL-60細胞株は急性リンパ性白血病細胞株のため、上記異常融合遺伝子は検出されなかった。

275bpのC-ABL遺伝子は、内部コントロールとして両方の細胞株で検出された。



#### お客様のコメント

これまでは基本的にはT社の同等製品を使用しておりました。しかし、学生実習 (学生120名) を行うにあたり、経費削減の観点からコストパフォーマンスに優れたPCRキットを探していました。そこで、KapaTaq Extra PCRキットを試してみたところ、良好な実験結果が得られました。(なお、近年ではdNTPやバッファーなどがすでに混ざってセットになったタイプも市販されていますが、本品は別々になっていることから学生実習でそれぞれの試薬が持つ意味を教育する観点からも選択しました。)

KapaTaq Extra PCRキットは、非常にコストパフォーマンスに優れていると思います。

