



Application

アルコール代謝関連遺伝子ALDH2遺伝子のSNPタイピング

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 車 暁芳 様のご厚意により掲載させて頂きました。

実験方法

「ヒトのアルコールに対する強さ」に関連するアルコール代謝関連遺伝子のひとつであるALDH2遺伝子のSNPを判定するため、以下の条件でターゲット領域をPCR増幅し、制限酵素 *Mbo*IIによる制限消化の有無によりSNPタイピングを実施した。

1) サンプル

インフォームドコンセントの得られた健常者の口腔粘膜よりゲノムDNAを抽出した。

2) 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 (Mg ²⁺ free) | 8μl |
| 25mM MgCl ₂ | 2.8μl |
| dNTP Mix (10mM each) | 1μl |
| PrimerF (10μM) | 2μl |
| PrimerR (10μM) | 2μl |
| Template DNA | 20μl |
| PCR grade Water | 4μl |
| total | 40μl |

3) プライマー配列

F ; 5' - CAAATTACAGGGTCAACTGCT -3 '
R ; 5' - GCCCACTCACAGTTTTCTCTT -3 '

4) サイクルプログラム

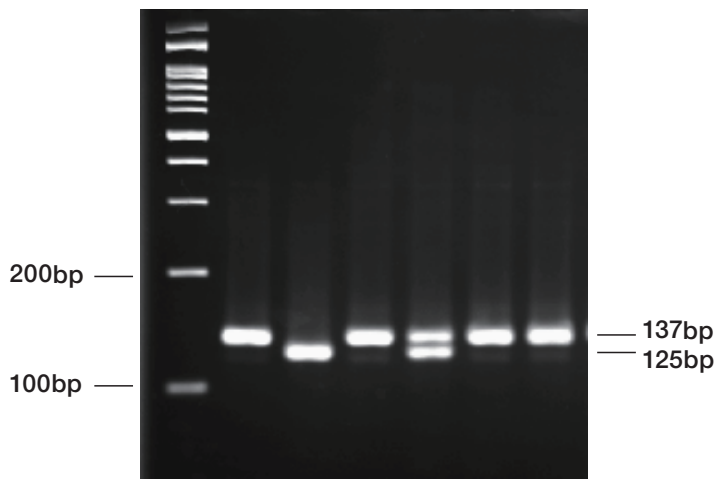
| | | | |
|--------|--------|------------|---------|
| 94°C | 2 min | } 40cycles | 1 cycle |
| 94°C | 30 sec | | |
| 60.5°C | 30 sec | | |
| 72°C | 30 sec | | |
| 72°C | 7 min | | 1 cycle |

サーマルサイクラー : BIO-RAD MyCycler

参考文献 Nakamura, K. *et al.*, *Biochemistry and Molecular Biology International*, 31, 439-445 (1993)

結果

| ALDH2遺伝子型 <i>Mbo</i> II制限酵素 | 野生型ホモ | | ヘテロ | | 変異型ホモ | |
|--------------------------------|-------|---|-----|---|-------|---|
| | - | + | - | + | - | + |



*Mbo*IIによる制限消化前は、いずれも137bpのPCR増幅産物が確認された。

制限酵素 *Mbo*II 処理により、野生型ホモでは125bpの断片が生じた。（*実際には125bpと12bpの断片に制限消化される。）

一方、変異型ホモ（ALDH2-1の114塩基目のGがAに置換）では、*Mbo*IIの認識部位が変異を起こしているため、137bpのまま切断されなかった。

ヘテロでは、137bp、125bp、両方のバンドが確認された。

4%アガロースゲル,60分泳動,TAE buffer



お客様のコメント

KapaTaqExtraPCRキットは、価格に対して性能が高く、きれいな結果が得られましたため、本アッセイにも使用しました。PCRバンドはしっかり出て、信用できるキットです。