



Application

# ノックアウトマウスのジェノタイピング

製品名

KAPA MG Kit (KK7150MG)  
KAPATaqEXtra HotStart Readymix with Dye (KK3606)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは、愛媛大学大学院医学系研究科 循環生理学 青戸守 様のご厚意により掲載させて頂きました。

実験条件

①従来法 (T社製品)

<Mouse tail DNAの抽出>  
Mouse tail (2mm) in 1.5ml tube  
↓  
+ 75μl Alkaline Lysis Buffer  
(25mM NaOH, 0.2mM EDTA)  
↓  
95°C, 30min  
↓  
4°C  
↓  
+ 75μl Neutralization Buffer  
(40mM TrisHCl, pH 5)  
Vortex well

<PCR反応組成>

10x反応 Buffer	2.5μl
2.5mM MgCl <sub>2</sub>	2μl
2.5mM dNTP mix	2.5μl
10μM Fwd Primer	1.25μl
10μM Rev Primer	1.25μl
Template	1μl
T社酵素	0.25μl
MilliQ water	14.25μl
total	25μl

②KAPA MG Kit

<Mouse tail DNAの抽出>  
Kitのマニュアルに従った。

<PCR反応組成>

KAPA2G Robust	
HotStart ReadyMix (2x)	12.5 μl
10μM Fwd Primer	1.25μl
10μM Rev Primer	1.25μl
Template	1μl
MilliQ water	9μl
total	25μl

③KAPATaq EXtra HotStart ReadyMix with dye (2x)

<Mouse tail DNAの抽出>  
従来法と同じ。

<PCR反応組成>

KAPATaq EXtra	
HotStart ReadyMix with dye (2x)	12.5 μl
10μM Fwd Primer	1.25μl
10μM Rev Primer	1.25μl
Template	1μl
MilliQ water	9μl
total	25μl

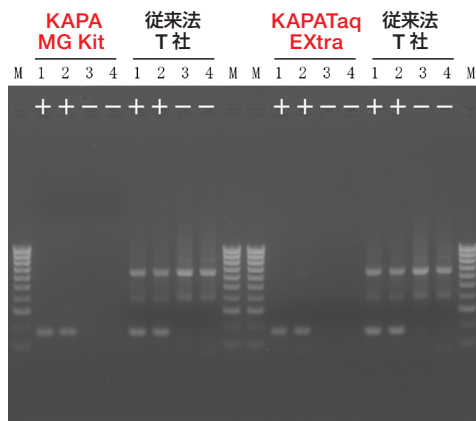
● PCR 装置 : BIO-RAD T100 Thermal Cycler

● PCR プログラム

95 °C, 3min ×1 cycle  
95 °C, 15sec  
64 °C, 15sec } ×35 cycle  
72 °C, 15sec  
16 °C, ∞

● 増幅サイズ : 163bp

結果



操作およびPCR結果について、KAPA社キット2製品 (KAPA MG Kit, KAPATaqEXtra HotStart ReadyMix with dye) と従来法 (T社) を比較した。

KAPA社キットと従来法 (T社) の比較結果まとめ

- 両キットとも、従来法で見られた非特異的なバンドが検出されなかった。
- 両キットとも、増幅効率は従来法と変わらない。
- 両キットとも、PCR反応液の調製が楽であるためミスが少ない (特に初学者にとって)。
- KAPA MG Kitは、従来法に比べてDNA抽出にかかる時間が短くて済む。
- KAPATaqEXtraは色素入りなので、PCR後すぐに電気泳動が出来る。

M : マーカー  
1,2 : ノックアウトマウス (+)  
3,4 : 野生型マウス (-)

電気泳動条件  
1% アガロースゲル、100V、30min  
各反応液 10μl をアプライ。マーカーは 5μl。



お客様のコメント

ジェノタイピングのためのPCRで、KOのalleleを検出しています。  
KapaBiosystems社キットでは、両キットとも非特異的な増幅が起こらず、結果が分かり易くなりました。  
実験経験の少ない学生 (医学部1年生) でもミスなくジェノタイピングができました。

