



Application

トランスジェニックマウスのジェノタイピング (迅速化の検討)

製品名

KAPA2GFast Hotstart ReadyMix with dye (KK5610)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは、独立行政法人 産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 脳遺伝子研究グループ 落石知世様、戸井基道様のご厚意により掲載させて頂きました。

実験条件

トランスジェニックマウスのジェノタイピングにおいて、親を解剖して胎生15日の子供から培養細胞を樹立するため、解剖後1~1.5時間以内に胎児の遺伝子型を判断する必要があり、最速でトランスジーンの有無を確認できるプロトコルを模索していました。そこで、KAPA2GFast Hotstart ReadyMix with dye (KK5610) を検討しました。

- サンプル：マウス（胚）のテールから
スピンカラム精製キット（Sigma 社）で
抽出したゲノム DNA

- PCR 反応組成
(KAPA2GFast Hotstart ReadyMix with dye)
マウスゲノムDNA 8μl (約 200ng)
KAPA ReadyMix 10μl
Primer (Forward) 1μl (最終濃度 1pmol)
Primer (Backward) 1μl (最終濃度 1pmol)
20μl

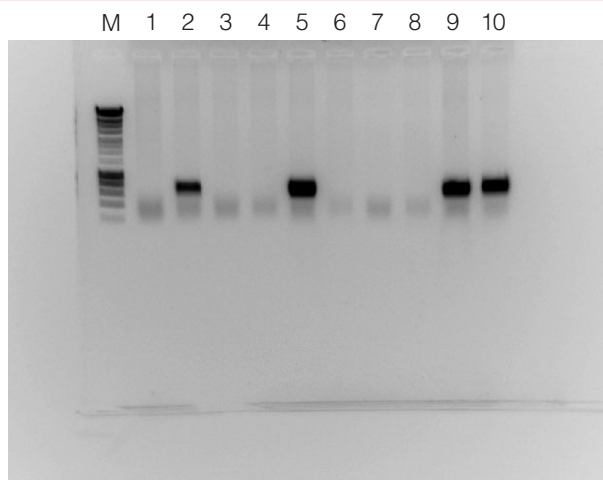
- PCR プログラム
95 °C 2min
98 °C 10sec
55 °C 10sec
72 °C 5sec } 25 cycle

- PCR 装置：Biorad C1000

- 増幅サイズ：780bp

- 電気泳動：時間短縮のため、サンプルに直接 SYBR® GreenI を加え、15 分間の短い泳動時間で実施しました。

結果



M : マーকার
2, 5, 9, 10 : トランスジェニックマウス
1, 3, 4, 6, 7, 8 : トランスジーン無し (ネガティブ)

〈実際にジェノタイピングに掛かった操作時間 (実測)〉

ゲノム抽出	25分
PCR	30分
電気泳動	15分
トータル作業時間	1時間20分間

トランスジーンを持つ胎児と持たない胎児それぞれの脳から初代神経培養細胞を確立しており、これまでは胎児組織の蛍光を目視で確認していました。

しかし、この時期にはGFP蛍光がはっきりしない胎児が多いため、あらかじめPCRで胎児の遺伝子型を確認し、ポジティブとネガティブに分けて脳組織を取りだして培養することとしました。

このケースでは、親の解剖を始めてから出来るだけ早く胎児脳組織を取りだして培養を始める事で、細胞の生存率を高めることができるため、解剖後1~ 1.5時間以内に胎児の遺伝子型を判断できるような、迅速なジェノタイピングを試みる事にしました。

今回、KAPA2GFast Hotstart ReadyMix with dyeを使用したところ、反応液の調製作業が簡便で、30分のPCR時間でバンドが検出できました。

前後の作業も入れてトータルで1時間20分でトランスジェニックマウスのジェノタイピングが可能でした。

現在は、KAPA MG Kit (KK7153) に付属しているDNA簡易抽出キット (KAPA ExpressExtract Kit) を用いてゲノムDNAの抽出を行うことで、さらに10分くらい早くなっています。



お客様のコメント