



Application

点突然変異遺伝子改変マウスのジェノタイピング

製品名

KAPATaqEXtra HotStart Readymix with Dye (KK3606)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは、広島国際大学 薬学部 分子細胞薬理学教室 山脇 洋輔 様のご厚意により掲載させて頂きました。

実験条件

我々が作成した点突然変異遺伝子改変マウス (論文未発表) のジェノタイピングにおいて、アニーリング温度が高くなるため、増幅効率が低下してしまうことが問題となっていた。

そこで、より簡便かつ信頼できるGenotype法を確立するため、KAPATaqEXtra HotStart Readymix with Dye (KK3606) を検討した。

- サンプル Mouse tailよりNaOH処理で抽出したゲノムDNA
- 比較評価した試薬 Tb社製品A (リコンビナントTaq DNAポリメラーゼ)
Tb社製品B (電気泳動用色素入りプレミックス)
KAPATaqEXtra HotStart Readymix with Dye (KK3606)

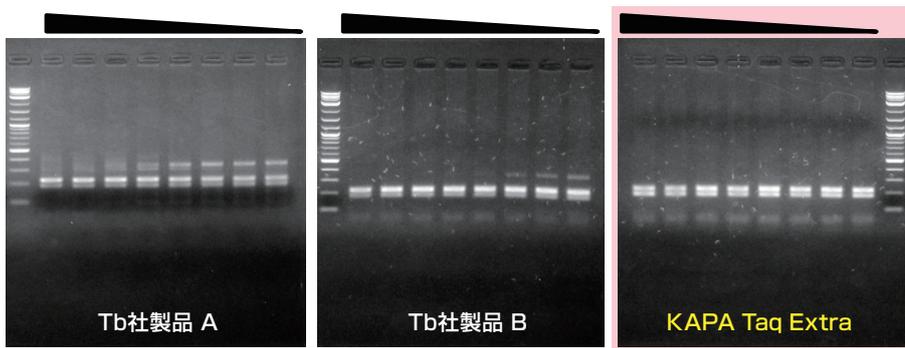
	Tb社製品 A	Tb社製品 B	KAPA Taq Extra (KAPA)
PCR反応組成 (10μl反応)	Tail Genome 2μL MgCl ₂ 2.5mM final dNTPs 0.2mM Primer 0.2μM each rTaq 0.1U/10μL in 1X Taq Buffer	Tail Genome 2μL Primer 0.2μM each in 1X Master Mix	Tail Genome 2μL Primer 0.5μM each in 1X Master Mix
PCR反応 プログラム	95°C 5min 95°C 15sec 55-65°C 30sec 72°C 1min 15°C ∞ } 35 Cycles	94°C 2min 94°C 30sec 55-65°C 30sec 68°C 1min 15°C ∞ } 35 Cycles	95°C 3min 95°C 15sec 55-65°C 30sec 72°C 1min 15°C ∞ } 35 Cycles

- PCR装置 BIO-RAD社 T100
- 増幅サイズ 183bp (野生型) および217bp (ノックインマウス) *変異部位近傍のloxP配列の有無で判定

結果

アニーリング温度 (3製品共通)

レーン左から、65.0, 64.3, 63.0, 61.1, 58.8, 56.9, 55.7, 55.0°C



KAPATaqEXtra HotStart ReadyMix は、他社2製品と比較し、以下の点で優れていた。

- 低アニーリング温度における特異性の優位性が観察された。
- 全体的にバンドが濃く、また、WT由来 (下方) と MT由来 (上方) のバンドの濃さが均一であった。

— 217bp (ノックインマウス)
— 183bp (野生型)



お客様のコメント

—アミノ酸置換マウスのgenotypeを行っています。これまでの製品では非特異的バンドの出現を避けるため、アニーリング温度が高く設定する必要があり、増幅効率が低下してしまうことが悩みの種でした。

KAPATaqEXtra HotStart ReadyMixでは、特異性、反応性ともに、従来使用していた製品より明らかに優れた結果を得ることができ、とても満足しています。

Master Mixであるため、わずらわしい試薬の混合の手間を省くことができることに加えて、PCR後にDyeを加える必要がなく、経験の少ない学生でもすぐに実験ができました。

