



Application

簡易・短時間のマウスジェノタイピング法の確立

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 健康工学研究部門 バイオインターフェース研究グループ 清末和之様、大西恵様のご厚意により掲載させて頂きました。

方法

KAPA2GFast Hotstart ReadyMix with dyeを用い、DNA精製をせずに簡易・短時間でマウスのジェノタイピングを実施する方法を確立しました。

通常はこの方法で十分判断可能で、従来法では2日かかっていたが、この方法では一時間程度で結果を得ることが可能となりました。

● サンプル準備

- マウス (胚) のテール (1-2mm) または組織
- ↓ +200 μ l of 50mM NaOH
- ↓ 100 $^{\circ}$ C 10min
- ↓ +22 μ l of 1M Tris-HCl pH8.0
- ↓ 遠心 15sec
- 上清 DNA粗抽出サンプル

● PCR反応組成

(KAPA2GFastHotstart Ready Mix with dye)	
マウスゲノムDNA	0.75 μ l
KAPA Ready Mix	7.5 μ l
Primer	0.3 μ l (final 0.2 μ M)
Primer	0.3 μ l (final 0.2 μ M)
DW	6.15 μ l
Total	15 μ l

● PCR反応プログラム

95 $^{\circ}$ C	3min	} 30 cycle
95 $^{\circ}$ C	15sec	
50 $^{\circ}$ C	15sec	
72 $^{\circ}$ C	3sec	
72 $^{\circ}$ C	1min	
15 $^{\circ}$ C	∞	

● PCR 装置

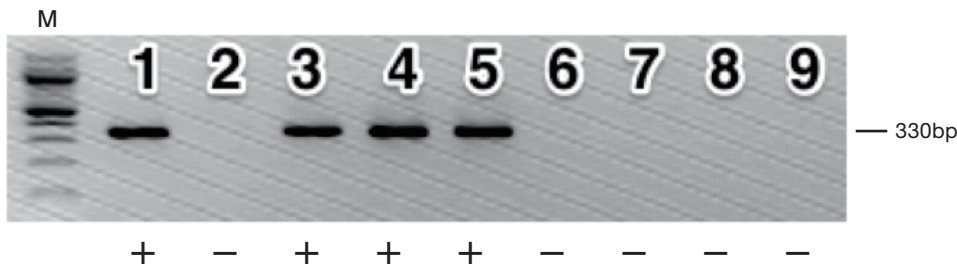
ABI2720 Thermal cycler

● 増幅サイズ: 330bp

● 電気泳動: 2% agarose
135V 10分間泳動

実施例

GFP発現マウスと野生型マウスの交配によって得られた仔マウスのジェノタイピングを実施しました。9標本を泳動し、4標本がGFP遺伝子陽性でした。



■ 実際にジェノタイピングに掛かった操作時間

ゲノム抽出	15分
PCR	50分
電気泳動	10分

* 同じプロトコルで、660bpなど他のサンプルでも問題なく増幅することが確認されました。(データ未掲載)



お客様のコメント

従来は、マウスの尻尾を溶解し、フェノクロ・エタ沈で精製、その後、PCRの鋳型とする手法で実施していましたが、結果ができるまでに2日ほどかかり、次のステップの実験に円滑に移行できないため、苛立ちを感じていました。そのため、簡便で、時間のかからない方法を検討していました。検討のポイントは、①粗精製サンプルでもPCRできること。②ホットスタートの酵素であること。③安価であること。でした。コマーシャルされているS社、P社、T社の溶解液・PCR酵素等を使用して検討をしましたが、3つの要件ですべてを満たしたのがKAPA2G FastHotStartReadyMixwithDyeでした。増幅にかかる時間が短く、増幅度も十分で、偽陽性も少ない、現時点では非常に満足のいく酵素に巡り会え、実験がスムーズになりました。特に、胎児神経細胞の調整をする場合には有効で、解剖して氷冷維持可能な時間内で、個々の胚のジェノタイプが可能となるからです。

