



Application

## 2型糖尿病モデルマウスのジェノタイピング

製品名

KAPA2G Robust HotStart ReadyMix with Dye (KK5706)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは、奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 神経機能科学研究室 常陰 幸乃 様のご厚意により掲載させて頂きました。

### 方法

2型糖尿病モデルマウスであるdb系統マウスを使用しており、db/dbとdb・m+/-を識別するため、PCRによるジェノタイピングを実施している。現行法よりも明確なタイピング結果を得るために、KAPA2G Robust HotStart ReadyMix with dyeを検討した。

#### ● Sample

マウスの耳または尾を採取し、50 mM NaOH 600  $\mu$ lを入れて、95 $^{\circ}$ Cで20~30分インキュベート  
(ときどきボルテックスでかき混ぜることにより、組織を融解させる。胎児・新生児以外は、完全には溶け切らない。) インキュベート後、1M Tris-HCl (pH8.0)を50  $\mu$ l入れて中和し、遠心。  
上清をテンプレートとして使用。

#### ● Primer mix

Forward primerとWT reverse primer (481bp) とmutation reverse primer (200bp) の各primerを10 $\mu$ Mになるようにmix

#### ● 反応組成

##### 現行法 (T社製品)

Sample DNA溶液	1 $\mu$ l
10 x buffer	2 $\mu$ l
dNTP (2.5 mM) mix	1.6 $\mu$ l
Primer Mix	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	12.2 $\mu$ l
酵素	0.2 $\mu$ l
トータル	20 $\mu$ l

##### KAPA2G Robust

Sample DNA溶液	1 $\mu$ l
Primer Mix	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	8 $\mu$ l
2X KAPA2G Robust HotStart ReadyMix	10 $\mu$ l
トータル	20 $\mu$ l

#### ● PCR条件 (両製品共通)

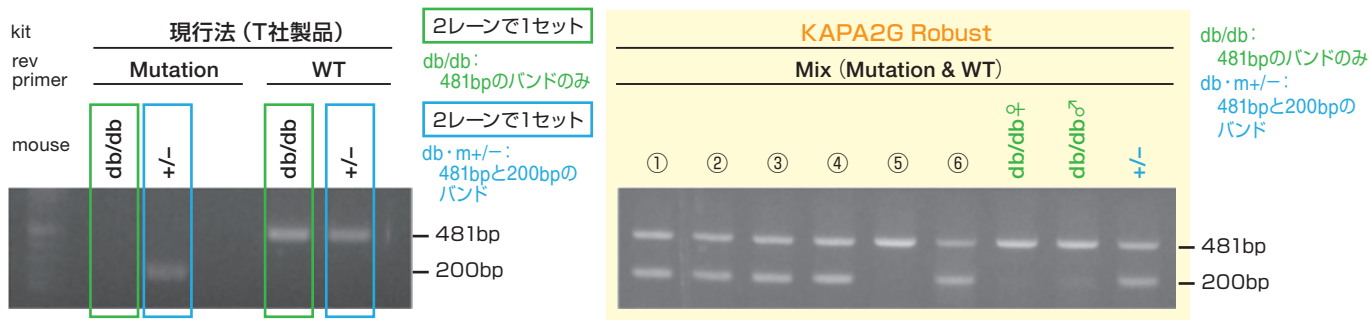
ライフタッチ サーマルサイクラー (Bioer) を使用。

94 $^{\circ}$ C	5min
94 $^{\circ}$ C	10sec
60 $^{\circ}$ C	10sec
72 $^{\circ}$ C	30sec

}  $\times$ 35

10 $\mu$ lを1.2%アガロースゲルで電気泳動し、チェック

### 結果



現行法ではReverse Primer 2種類を混ぜて使用するとうまくバンドが出ず、分けて使用しても、バンドがぼやけて比較しにくかったが (図左)、KAPA2G Robust HotStart ReadyMixではPrimerを全てmixして使用出来る上に、結果も非常に明瞭であった (図右)。

(図右: ①~④および⑥がdb・m+/-、⑤がdb/dbと判定された。)



#### お客様のコメント

私の使用しているDNAサンプルは非常に簡易な抽出法を用いているため、純度が低い。KAPA2G Robust HotStart ReadyMixはそのようなサンプルでもPCRの高い成功率を誇ると聞いたので試用した。T社製品では増幅があいまいであったが、KAPA2G Robust HotStart ReadyMixでは、よりクリアな結果が得られたので、大変満足できる製品であった。