

製品コード 3788

研究用

TAKARA

Transgene Detection Primer Set for Real Time (Mouse)

説明書

v202204Da

本製品は、トランスジェニックマウスに導入遺伝子マーカーとして広く用いられる GFP (EGFP, AcGFP1) と lacZ をリアルタイム PCR により検出するためのプライマーセットです。マーカー遺伝子をリアルタイム PCR で検出することにより、遺伝子導入個体のスクリーニングが可能です。また、リファレンスとして使用するマウスゲノム DNA 検出用のプライマー (Ywhaz, Raver2) も含まれていますので、相対定量法により導入遺伝子量をサンプル間で比較することもできます。

I. 内容 (各プライマー 100 反応分*1)

以下の 6 種類のプライマー対が含まれます。

	濃度	容量	増幅サイズ	Primer Set ID
1. GFP_primer-1*2	2 μ M each	500 μ l	127 bp	
2. GFP_primer-2*3	2 μ M each	500 μ l	162 bp	
3. lacZ_primer-1*4	2 μ M each	500 μ l	96 bp	
4. lacZ_primer-2*4	2 μ M each	500 μ l	141 bp	
5. Reference_primer-1*5	2 μ M each	500 μ l	115 bp	MA050370*7
6. Reference_primer-2*6	2 μ M each	500 μ l	89 bp	

* 1 : TB Green® *Premix Ex Taq*™ II を用いた 25 μ l 反応系での使用回数です。

* 2 : GFP_primer-1 は EGFP と AcGFP1 の共通配列に設計されています。

* 3 : GFP_primer-2 は EGFP を対象に設計されています。AcGFP1 の検出には適していません。

* 4 : lacZ_primer-1, 2 は、lacZ (β -galactosidase) 遺伝子を対象に別の位置に設計されています。

* 5 : Reference_primer-1 はマウス 15 番染色体上の Ywhaz 遺伝子領域の一部を増幅します。

* 6 : Reference_primer-2 はマウス 4 番染色体上の Raver2 遺伝子領域の一部を増幅します。

* 7 : Perfect Real Time サポートシステムの Primer Set ID です。この製品と同一のプライマーを Perfect Real Time サポートシステム*8 でご購入いただけます。

* 8 : Perfect Real Time サポートシステム

ヒト、マウス、ラット、イヌ、ウシ、ニワトリ、イネ、シロイヌナズナの RefSeq 登録遺伝子または Ensembl Plants 登録遺伝子に対してインターカレーター法 (TB Green 検出) によるリアルタイム RT-PCR 用のプライマーが設計済みです。ターゲット遺伝子を検索し、ご希望のプライマーセットを選択すれば簡単にオンラインで注文できます。

(<https://www.takara-bio.co.jp/research/prt/>)

キット以外に必要な試薬、機器 (主なもの)

・リアルタイム PCR 試薬

TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B)

TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B) など

・1.5 ml マイクロチューブ

・マイクロピペットおよびチップ

・リアルタイム PCR 装置

Thermal Cycler Dice® Real Time System // MRQ (製品コード TP960 : 終売) など

II. 保存

– 20℃

※ 適切に保存し、受取り後 2 年を目途にご使用ください。

III. 使用法

1. ゲノム DNA の抽出

マウス尾の先端などを材料としてゲノム DNA を抽出します。正確な定量を行うには、NucleoSpin Tissue 等のカラム精製法、あるいはフェノール/クロロホルム抽出法を利用して高純度のゲノム DNA を調製することをお勧めします。導入遺伝子の有無の判定の場合は、簡易的な方法で抽出したゲノム DNA も使用可能です（「IV. 参考」を参照）。

2. リアルタイム PCR

まず、プライマー以外のマスターミックスを調製し、各々のチューブに分注します。最後に各プライマーを添加します。この手順で反応液を調製すると、鋳型分注量の誤差によるバラツキを最小限に抑え、安定した結果を得ることができます。

<リアルタイム PCR 反応例>

使用試薬 : TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus)
リアルタイム PCR 装置 : Thermal Cycler Dice Real Time System II (終売)

- 1) 下記に示す PCR 反応液を調製する。本製品に含まれる 6 種類のプライマー対を全種類使用する場合は、プライマー以外のコンポーネントで 7 反応分のマスターミックスを調製し、20 μ l ずつ分注後、各プライマー対を 5 μ l 添加するとよい。

試薬	< 1 反応分 >	< 7 反応分 >
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> II (2 ×)	12.5 μ l	87.5 μ l
Primer mix (2 μ M each)	5 μ l	-
ゲノム DNA*	2 μ l	14 μ l
滅菌精製水	5.5 μ l	38.5 μ l
Total	25 μ l	

注：ゲノム DNA の添加量が多すぎると、インターカレーター (TB Green) のバックグラウンドが高くなる場合があります。その場合には、ゲノム DNA 量を 1/10 程度あるいは 10 ~ 20 ng に減らしてください。

- 2) リアルタイム PCR 反応を行う。

95℃ 1分 (初期変性)
↓
95℃ 5秒
60℃ 30秒 } 40 サイクル

融解曲線分析

注：PCR 反応の条件は、TB Green *Premix Ex Taq* II の標準条件に従ってください。初期変性の時間は、1 分に変更してください。

IV. 使用例

マウスゲノム DNA をテンプレートに用いた PCR によるホモ接合体／ヘテロ接合体の遺伝子型判定

1 コピーの EGFP 遺伝子および lacZ 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (ホモ接合体あるいはヘテロ接合体) * の尾からゲノム DNA を調製し、リアルタイム PCR による両遺伝子の検出を行った。

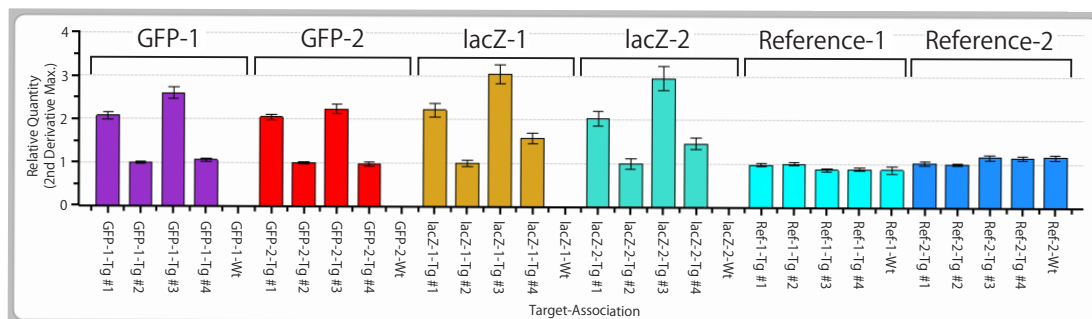
* : マウス尾は自然科学研究機構 池中先生、竹林先生よりご供与いただきました。
本実験に用いた 5 種類のサンプルは、マウス交配による Zygosity (ホモ・ヘテロ) 判定で Tg#1, Tg#3 はホモ、Tg#2, Tg#4 がヘテロと判定されています。
また、Wt は EGFP、lacZ とともに導入されていないマウスです。

【方法】

マウス尾から NucleoSpin Tissue を用いてゲノム DNA を調製し、1 μ l をリアルタイム PCR の鋳型とした。リアルタイム PCR には本製品のプライマーと TB Green Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) を用いた。解析には Multiplate RQ を使い、2 種類の遺伝子をリアルタイム解析とした相対定量解析を行った。

【結果】

リアルタイム PCR の結果から $\Delta \Delta$ Ct 法により相対定量解析を行った。4 種類のサンプルのうち、サンプル Tg#1、Tg#3 はサンプル Tg#2、Tg#4 の 2 倍量の EGFP および lacZ 遺伝子を有している結果となり、この結果は実際の遺伝子型と一致した。また、Wt では EGFP、lacZ とともに検出されず、この結果も遺伝子型と一致していた。



V. 参考

【アルカリ熱抽出によるゲノム DNA 簡易調製法】

1. マウス尾の先端 2 ~ 3 mm を切除し、1.5 ml のスクリュウキャップチューブに入れる。
2. 100 μ l の NaOH solution (0.025N NaOH, 2 mM EDTA) を添加する。
3. 100°C で 20 ~ 30 分インキュベートする。
4. 軽くスピンドウンして、100 μ l の 40 mM Tris-HCl (pH7.5 ~ 8.0) を添加し、すぐにフタを閉める。
5. ボルテックスで混合する。
6. 30 秒間スピンドウンし、上清 0.5 ~ 1.0 μ l をリアルタイム PCR の鋳型として用いる。

VI. 関連製品

NucleoSpin Tissue (製品コード 740952.10/.50/.250)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B)

VII. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・TB Green、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。*Premix Ex Taq* はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社