



Application

# ES細胞のジェノタイピングによるスクリーニング

製品名

KAPATaqEXtra HotStart Readymix with Dye (KK3606)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは、岐阜大学大学院医学系研究科 再生工学講座 生命機能分子設計分野 大沢 匡毅様のご厚意により掲載させて頂きました。

## 実験条件

ES細胞に対しノックアウトコンストラクトを導入し、ジェノタイプPCRで相同性組み替えを起こしたクローンをスクリーニングした。

● **サンプル** : ES 細胞をプロティナーゼ K で溶解した後、精製せずにクルードな Genome DNA を使用した。

### ● PCR 反応組成

#### a) KAPA Taq ExtraHot Start

2×ExtraHot Start Ready Mix	10μl
Primer 1	200pM
Primer 2	200pM
Mouse genomic DNA	1μl
Total	20μl

#### b) T社製品

10×Buffer	2μl
酵素	0.1μl
dNTP	1.6μl
Primer 1	200pM
Primer 2	200pM
Mouse genomic DNA	1μl
Total	20μl

● **PCR 装置** : ABI GeneAmp 9700

● **増幅サイズ** : 約 2kb

### ● PCR プログラム

#### a) KAPA Taq ExtraHot Start

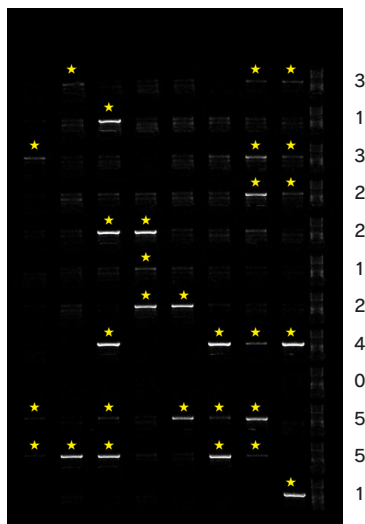
94 °C	3min	} 35 cycle
94 °C	20sec	
57 °C	20sec	
72 °C	2min	

#### b) T社製品

94 °C	1min	} 35 cycle
94 °C	20sec	
57 °C	20sec	
72 °C	2min	

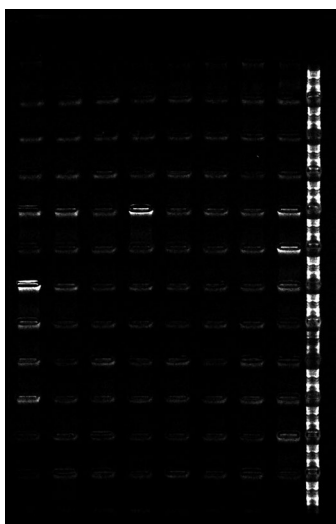
## 結果

KAPA



星印のとおり、  
合計29  
29クローンでポジティブと判断出来ました。

T社製品



バンドは全く検出されませんでした。  
(\*一部のウェルがバンドのように見えています。)

T社製品ではバンドが出なかったのですが、KAPA Taq ExtraHot Startではクリアーにバンドが出ました。

マウスのES細胞を溶解してプロティナーゼK処理した後にGenome DNAを精製せずに使っているため、夾雑物が多くT社製品ではバンドが検出出来なかったのだと思います。また、増幅サイズも 約2kbと比較的大きいのも原因だと思われます。

一方、KAPA Taq ExtraHot Startでは、全く同条件でバンドが検出出来ました。



お客様のコメント

現在では、KAPA Taq ExtraHot Startを用いてトータルのPCRの容量を10ulまで減らしPCRをしております。このように容量を減らしても再現良くバンドが検出できます。ノックアウトES細胞のスクリーニングでは、一度に500クローン近くのサンプルをスクリーニングしますので、KAPA Taq ExtraHot Startのように全てミックスしてあると、PCRから電気泳動までシームレスに実行でき大変便利です。

また、PCRに使うゲノムDNAを調整するための時間、PCRの試薬を調整する手間と時間、およびPCRしたサンプルをゲルにローディングするまでの手間と時間を短縮でき、煩雑な操作が不要になった分、一度に多数のサンプルを処理できるようになったということも大きなメリットです。

KAPA Taq ExtraHot Startを使用する事で、細胞の溶解から電気泳動による検出まで96wellフォーマットでき、これまでは500サンプルを数日に分けて解析をしていたのですが、一日で全て完了できるようになりました。