



Application

メダカの組織特異的遺伝子をターゲットとした in situ ハイブリダイゼーションのサンプル調製

製品名

FastGene™ Gel/PCR Extraction Kit (FG-91302) FastGene™ Plasmid Mini Kit (FG-90502) FastGene™ ゲルカッター (FG-830)

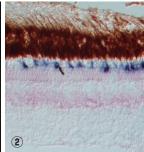
メーカー名

日本ジェネティクス株式会社

下記のデータは、岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 細胞組織学分野 佐藤恵太 様のご厚意により掲載させて頂きました。

目的





本アプリケーションは、メダカの神経組織(網膜・脳)に おいて、光受容に関わる種々の遺伝子が機能する細胞群を メッセンジャー RNAの発現を指標に可視化する目的で 行った。

画像①: サンプル (メダカ) 画像②: メダカ組織 (網膜) の

in situ ハイブリダイゼーションの結果

ワークフロー

メダカの組織特異的遺伝子をターゲットとした in situ ハイブリダイゼーションを行うために、メダカ組織から RNA を抽出し、ターゲット遺伝子 を増幅し、シーケンスに供した。

その後、RNA合成用のプラスミドを調製し、RNAを合成した後、目的の遺伝子の *in situ ハイブリダイゼーションを*行った。

cDNA 合成 **PCR** 電気泳動

- 1. サンプル (メダカ脳、眼球) から RNA 抽出
- 2. 抽出したRNAから逆転写して、cDNAを合成
- 3. 特異的プライマーによりターゲット遺伝子を TaKaRa PrimeSTAR® MaxでPCR 増幅 ※増幅サイズ (500 - 2500 bp)

GFast Gene™ FastGene™ ゲルカッタ-

4. PCR産物を電気泳動

5. ゲルを切り出す(図1)-

6. Gel/PCR Extraction Kitを使用して、抽出 ※溶出バッファーの使用量:20μL ※回収 DNA 濃度:約5μg/mL(普段はここで定量しない)

形質転換

- 7. PCR産物をpBluescriptII KS+(EcoRV処理) にライゲーション (TOYOBO Ligation high ver. 2使用)
- 8. 大腸菌 DH5 α にトランスフォーメーションして X-gal, アンピシリン塗布 LB プレートへ
- 9. 白コロニーをつついてレプリカプレートを作製する
- 10. コロニー PCR でインサートの長さを確認 ※プライマー: T7,T3 プライマー ※ポリメラーゼ: Takara Emerald amp max またはGenedire X OnePCR

シーケンス

- 11. 1/50 程度に希釈した PCR 産物と T7 プライマーをシーケンス反応 (BigDye terminator v1.1 使用) ※PCR 産物の精製はしない
- 12. 反応産物をエタノール沈殿後、HiDi formamide に溶解してシーケンス解析 (図2) (ABI3130使用)
- 13. インサートのシーケンスが確認できた大腸菌クローンを、 step9 で作製したレプリカプレートから液体培養(37℃終夜振盪)

- ・アガロースゲルから簡単にバンドの切り出 しが可能です。
- ・切り出し操作がとても早くなり DNA への ダメージが少なくなります。
- 同じゲルから切り出した断片は基本的に同 じ重さになり秤量の手間を省けます。
- イルミネーター表面の フィルターを傷つけて しまうことも低減でき ます。



FastGene™ Gel/PCR Extraction Kit

- 遠心/吸引どちらも使用可能
- PCR 産物の精製、アガロースからの DNA
- ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ がり間 いん かり いいん の かまます。 ・ ゲル切片の切り出しに使利な "ゲルバンドカッター"が 5 個付属しています。





RNA 合成用 プラスミド調製

RNA 合成

in situ

イブリダイゼ-

14. Plasmid Mini Kitを使用して、プラスミド精製

※培地の種類:2xYT培地(アンピシリン添加)

※1プレップあたりの使用量:1mL

※使用した菌株: DH5α ※プラスミドサイズ:2961bp

※インサートサイズ:500 - 2500 bp ※溶出バッファーの使用量:50μL ※プラスミド DNA 濃度:約250 μg/mL

15. 1/100 倍希釈したプラスミドをテンプレートとして TaKaRa PrimeSTAR® Max でPCR 増幅

※プライマー:T7,T3 プライマー PCR産物の一部を電気泳動してシングルバンドを確認

16. PCR 産物を Gel/PCR Extraction Kitで精製 -これをテンプレートとしてT7, T3 RNA pol それぞれでRNA合成

17. in situ ハイブリダイゼーション

SFastGene™

FastGene™ Plasmid Mini Kit

- 安定した収量が得られます!
- ・LB 培地タブレット無償添付中!
- ・遠心/吸引どちらも使用可能 ・より簡便に早く精製したい場合には、Fast プロトコルが使用可能



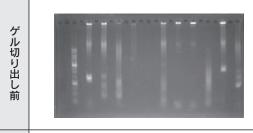
& Fast Gene

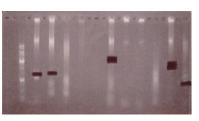
FastGene™ Gel/PCR Extraction Kit

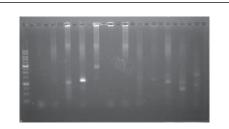
結果

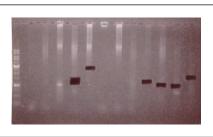
ゲル切り出し後

図1. ゲルカッターによるバンドの切り出し









FastGene™ ゲルカッター

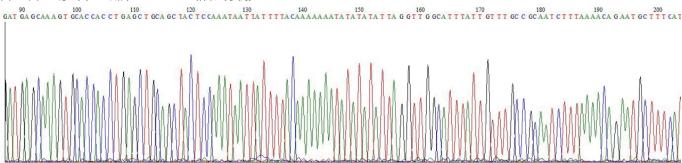


イルミネーター: UV

核酸染色試薬: エチジウムブロ

マイド(後染め)

図2. 図1で切り出した断片のシーケンス結果(事例)





簡便・迅速なプロトコルかつ低コストということでFastGeneのExtractionキット、Plasmid miniキットを使用 しています。またゲル抽出の際にはこれまでカミソリ刃を用いていたのですが、ゲルカッターを使うようになっ てから非常に作業が楽になりました。ゲルカッターは洗って繰り返し使っていますが今のところコンタミもなく 使えています。

Copyright(C) NIPPON Genetics Co, Ltd All Rights Reserved.2016.NOV

