



Application

## マウス由来骨芽細胞特異的遺伝子の発現ベクターへの挿入

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、K大学のお客様のご厚意により掲載させて頂きました。

### 概要

骨粗鬆症発症のメカニズムや骨芽細胞の機能解析等には、基礎研究による分子機構の解明が必要となり、現在はマウスや臨床での研究が進められています。

本アプリケーションノートではマウス骨芽細胞の機能解析をするためにサンプルの調製を行いました。

マイクロアレイで同定した骨芽細胞に発現している遺伝子を発現ベクターにクローニング後、培養細胞へ遺伝子導入し、機能解析を行いました。本アプリケーションノートではシーケンスまでの一般的なサンプル調製のフローの中でFastGene™ 製品を幅広く使用できた実例をご紹介します。

### 実験準備

- サンプル : マウスの頭蓋骨より培養した骨芽細胞 (初代培養細胞)
- 大腸菌株 : DH5α
- ベクター : pcDNA3.1 (5.3~5.4kb) ※インサート(1.7 kb) を含まない
- PCR 酵素 : KAPA HiFi HS ReadyMix (KK2601, KK2602)  
KAPA 2G Fast HotStart PCR Kit without dNTP (KK5523)
- 核酸精製 : FastGene™ Gel/PCR Extraction Kit  
FastGene™ Plasmid Mini Kit
- ラダー : 1kb DNA Ladder (NE-MWD1)
- ゲル切り出し : ゲルカッター (FG-830)
- 核酸染色試薬 : SAFELOOK™ プレグリーン核酸染色液 (和光純薬工業株式会社)
- イルミネーター : UV
- PCR 装置 : T100™ サーマルサイクラー (Bio-Rad)  
GeneAmp PCR システム 9700 (Applied Biosystems)

### プロトコル

1. RNA 抽出
2. cDNA 合成
3. PCR 反応 — KAPA HiFi HS ReadyMix を使用して cDNA の増幅を行った。
4. 電気泳動 — ゲルカッターでゲルの切り出しを行った。(結果 1)
5. ゲル抽出 — FastGene™ Gel/PCR Extraction Kit を使用してゲル抽出を行った (溶出バッファー量 30 μL)。  
(※回収率を上げるために、サンプル準備の時にイソプロパノールを 100 μL 添加した。)
6. 制限酵素処理 — 制限酵素で目的の遺伝子サイズに切断した。
7. ライゲーション — ベクター pcDNA3.1 にサンプルをライゲーションした (インサートサイズは 1.7kb)。
8. 大腸菌へ形質転換 — 大腸菌 DH5α に形質転換をし、プレート培養をした。
9. コロニー PCR — KAPA 2G Fast HotStart PCR Kit without dNTP を使用して、増幅を行った。
10. 電気泳動によるサイズ確認 (インサートチェック)
11. 10 の大腸菌培養 — LB 培地 3 mL で培養
12. プラスミド精製 — FastGene™ Plasmid Mini Kit を使用して、培養液 2 mL を精製した。  
(※溶出バッファーは 50 μL を使用し、回収率を上げるため 50℃ 程度に加熱した。)
13. 電気泳動によるサイズ確認 (プラスミドチェック) (結果 2)
14. シーケンス — ナノドロップで DNA 濃度・純度を測定し、シーケンスに供した。(結果 3 および 4)
15. 培養細胞へ遺伝子導入



FastGene™  
Gel/PCR Extraction Kit



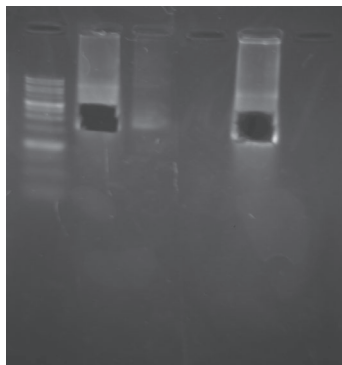
FastGene™ ゲルカッター



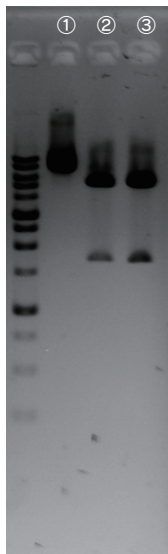
FastGene™  
Plasmid Mini Kit

**結果****結果1**

ゲルカッターによる切り出し

**結果2**

プロトコル13の電気泳動



①: ② のサンプルの切断なし  
 ②: +NheI/XhoI (サンプル1)  
 ③: +NheI/XhoI (サンプル2)

**結果3**

DNA濃度・純度

サンプル名	核酸(ng/uL)	A260/A280	A260/A230	A260	A280
サンプル1	156.492	1.895	2.304	3.13	1.651
サンプル2	195.499	1.883	2.297	3.91	2.076

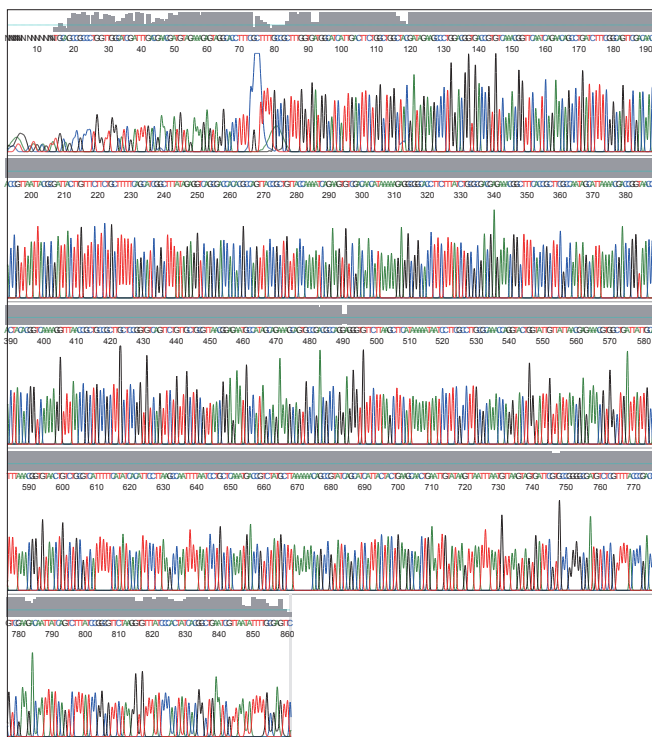
**結果4**

シーケンス

サンプル1

Signal Strengths: A = 793, C = 739, G = 935, T = 759  
 Lane/Cap#: 87  
 Matrix: n/a  
 Direction: Native

Geospiza  
 www.geospiza.com



Printed: 2/22/2017 4:00PM

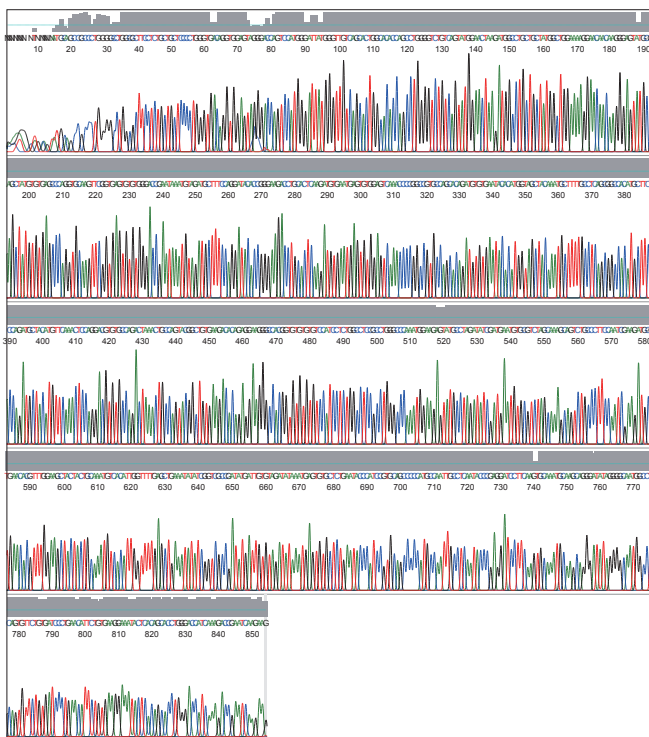
FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

サンプル2

Signal Strengths: A = 717, C = 591, G = 973, T = 579  
 Lane/Cap#: 85  
 Matrix: n/a  
 Direction: Native

Geospiza  
 www.geospiza.com



Printed: 2/22/2017 4:06PM

FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

シーケンスの結果、サンプル1は大腸菌由来ゲノム、サンプル2は遺伝子Eであることを確認した。



お客様のコメント

骨代謝という分野での研究を昨年から始めました。持ち合わせている技術を用いて研究を展開しています。貴社の製品は経済的にも品質も優れていると思っています。