



Application

マウステールからのジェノタイピング

製品名

KAPA Express Extract + PCR ReadyMix (KK7151)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは、国内のお客様のご厚意により掲載させていただきました。

目的：遺伝子検査のコスト削減のため、安価・確実・簡単なPCR試薬を探す。

方法：マウスのジェノタイピングPCRを、常法と「KAPA Express Extract + KAPA2G Robust HotStart Ready Mix」を用いて行い、結果を比較した。

テンプレート溶液の調製：DNA抽出/精製

1. Q社 DNA tissue Kitを用いて、DNAを抽出・精製(常法)

方法省略

2. KAPA Express Extractキット

(1) 下記の組織溶解液を作る

組織溶解液 (1検体あたり)	
10×KAPA Express Extract Buffer	10 μL
1U/μl KAPA Express Extract Enzyme	2 μL
PCR-grade water	Up to 100 μL

(2) Lysis protocol

75°C, 10分 → 95°C, 5分 (Eppendorf Master Cyclerを使用) これをそのままテンプレートとする

実験1：ジェノタイピング

PCR反応組成

(反応条件)

	Q社 DNA Tissue Kit + Q社ホットスタートTaq Master Mix(常法)	KAPA Express Extract + KAPA2G HotStart Ready Mix	Q社 DNA Tissue Kit + Q社ホットスタートTaq Master Mix(常法)	KAPA Express Extract + KAPA2G HotStart Ready Mix
water	8.5	9	95°C 15分	95°C 3分
Taq (Mix)	10	12.5	94°C 30秒	94°C 15秒
Primer-Fw	0.5	1.25	60°C 30秒 ×35	60°C 15秒 ×35
Primer-Rv	0.5	1.25	72°C 30秒	72°C 15秒
DNA	0.5	1	72°C 5分	72°C 5分
Reaction Volume	20	25	4°C ∞	4°C ∞

単位：μL

(その他条件)

Thermal Cycler : Eppendorf Master Cycler
Gel : 2% アガロース
Running Buffer : 1×TAE
ポジティブコントロール : マウスゲノム
ネガティブコントロール : マウスゲノム : C57BL/6(wild type)
(いずれもQ社 DNA Tissue Kitにて抽出精製済のもの)

結果

 Product size : 330bp
 Marker : 100bp ladder

実験2: KOマウスの確認
PCR反応組成

(反応条件)

	Q社 DNA Tissue Kit + Q社ホットスタートTaq Master Mix (常法)	KAPA Express Extract + KAPA2G HotStart Ready Mix
water	7.5	6.5
Taq (Mix)	10	12.5
Primer1	0.5	1.25
Primer2	0.5	1.25
Primer3	0.5	1.25
Primer4	0.5	1.25
DNA	0.5	1
Reaction Volume	20	25

	Q社 DNA Tissue Kit + Q社ホットスタートTaq Master Mix (常法)	KAPA Express Extract + KAPA2G HotStart Ready Mix
	95°C 15分	95°C 3分
	94°C 30秒	94°C 15秒
	60°C 30秒 ×35	60°C 15秒 ×35
	72°C 1分	72°C 15秒
	72°C 5分	72°C 5分
	4°C ∞	4°C ∞

 単位: μ L

(その他条件)

 Thermal Cycler : ABI Veriti
 Gel : 2% アガロース
 Running Buffer : 1×TAE
 ポジティブコントロール : KOゲノムとWTゲノム
 (いずれもQ社 DNA Tissue Kitにて抽出精製済のもの)

結果

 Product size
 KO allele : 570bp
 WT allele : 242bp

 Marker
 100bp ladder



時間コストまとめ

■ 実験1：ジェノタイピング

	Q社 DNA Tissue Kit + Q社ホットスタートTaqMaster Mix (常法)	KAPA Express Extract + KAPA2G HotStartReady Mix
組織溶解液調整時間(9検体)	15分	15分
組織溶解にかかった時間	Over Night(ただし、2時間でも可能)	35分
PCR反応液調製時間(9検体)	20分	20分
PCR反応時間	1時間50分	1時間20分
合計時間	最短4時間35分	2時間30分
コスト	¥870/検体	¥280/検体

■ 実験2：KOマウスの確認

	Q社 DNA Tissue Kit + Q社ホットスタートTaqMaster Mix (常法)	KAPA Express Extract + KAPA2G HotStartReady Mix
組織溶解液調整時間(9検体)	15分	15分
組織溶解にかかった時間	Over Night(ただし、2時間でも可能)	35分
PCR反応液調製時間(9検体)	20分	20分
PCR反応時間	1時間45分	1時間
合計時間	最短4時間20分	2時間10分
コスト	¥870/検体	¥280/検体

*コストは2010年9月現在の参考価格です。



お客様のコメント

今回試した系統では、時間と費用を削減でき、結果の確実性も保てることがわかった。
当製品で使用できることが確認できた動物系統については、順次当製品に移行していきたい。
また、GCリッチなプライマーのPCR条件についてもよく走る。