Genetics

Application

マウステールからのgDNA回収量測定

製品名　KAPAExpressExtract／KAPAマウスジェノタイピングキット

メーカー名　KAPA BIOSYSTEMS 社

はじめに

KAPAExpressExtractは、マウステールなどのサンプルを100μl反応液で簡便に溶解し、DNAを抽出することができます。
PCRによるマウスジェノタイピングの場合、通常はKapa2GRobustHotStartマスターミックス反応液25μlあたり、このライセートをわずか1μl用いることで、十分なPCR結果を得ることが可能です。

しかし、PCR以外にサザンブロッティング解析が必要となった場合には、より多くのDNA（通常5～15μg）が必要とされます。
一方で、KAPAExpressExtractのライセートには不純物が含まれるため、吸光度によるDNA量の測定は推奨されておらず、そのままではライセート中にどの程度のゲノムDNAが含まれているか確認できません。

そこで、マウステールからより多くのゲノムDNA量が得られるように、KAPAExpressExtractの溶解反応時間を30分間に延長したうえで、イソプロパノール沈殿法によりゲノムDNAを回収し、吸光度でDNA収量を測定しました。

方 法

KAPAExpressExtractの変更プロトコール

1. マウス尾（約3mm）をサンプルチューブに入れる
2. KAPAExpressExtract反応液100uLを加え、ボルテックスする
3. 以下のプログラムで反応させる
   75℃　30分間　（＊通常は10分間）
   95℃　5分間
4. ボルテックスし、卓上遠心機で6,000rpm1分間遠心分離する

イソプロパノール沈殿のプロトコール（KapaBiosystems社推奨法）

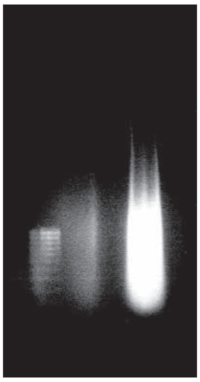
1. 遠心後のライセート上清を新しいチューブへ移す
2. 等量のイソプロパノール（室温）を加え、混合する
3. 室温で5分間以上インキュベートする
4. 16,000xgで4℃30分間、遠心分離する
5. チューブ底のペレットを吸わないように、溶液を取り除く
6. 70%エタノール（室温）500uL加える
7. 16,000xgで4℃15分間、遠心分離する
8. チューブ底のペレットを吸わないように、溶液を取り除く
9. ペレットを5～20分間風乾する
10. 適切なバッファーで再溶解する

結 果

マウステール3匹分のKAPAExpressExtract溶解液上清を、1本のチューブに回収し、イソプロパノール沈殿を実施しました。
最終的に、回収したDNAを10μlのTEバッファーで再溶解しました。

（吸光度測定により算出されたDNA収量結果）
3匹分のマウステールから回収されたゲノムDNAのトータル量は43.31μgでした。
1匹あたりのDNA量は14.44μgと推定されました。

M　1μl　2μl



（電気泳動結果）
TEバッファーで溶解したDNA溶液を1μl（4.3μg相当）、2μl（8.6μg相当）、それぞれ電気泳動しました。

KAPAExpressExtractのプロトコール変更により、マウステール約3mmから約14μgのゲノムDNAが回収されました。これにより、本キットをサザンブロッティング解析などのアプリケーションにも応用できることが示唆されました。

Copyright(C) NIPPON Genetics Co, Ltd All Rights Reserved. 2010.DEC

日本ジェネティクス株式会社
http://www.n-genetics.com
TEL 03（3813）0961 FAX 03（3813）0962 info@genetics-n.co.jp