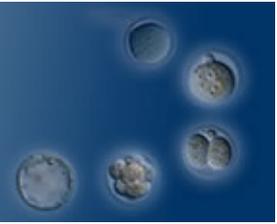


LARGE

Laboratory for
Animal Resources and
Genetic Engineering
RIKEN, Center for Developmental Biology



04. PCRによるスクリーニングの条件検討

Control Vectorが完成したらPCRの条件検討を行う

1. 精製法

Vectorの精製は塩化セシウム密度勾配遠心分離法で行うのが良いが、全く塩化セシウム密度勾配遠心分離法を行ったことがない場合は、Endotoxin Freeのカラムの方が良い。

QIAGEN EndoFree plasmid kit (QIAGEN)

(QCによるWashを3回行うなど多めにしたり、ElutionしたDNAをさらにエタノール沈殿させると精製度が上がります。)

NucleoBond® Xtra Maxi (日本ジェネティクス)

Wizard Plus Maxiprep DNA purification system (Promega)

PureYield Plasmid Maxiprep System (Promega)

PureLink HiPure Plasmid Filter Kits (Invitrogen)

2. サーマルサイクラー

当方ではサーマルサイクラーはABI Gene Amp PCR System 9700を使用しており、実際のスクリーニングに使うのも9700である。そのため同機種で条件検討を行う方がよい結果になる傾向がある。サーマルサイクラーが変わるとPCR反応条件に影響を与えることが頻繁に起こっているので注意が必要である。

3. 増幅領域

NeoのPGK promoterを挟むようなPCRはES細胞へ導入すると全く増幅されないことが経験的に知られているので絶対に避けること。

4. Primerの設定

Neoを識別するPrimer

L-Neo1 5'-GTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTC-3'

Neo gt-1 5'-CTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACG-3'

内在性のPrimerの設定

Tm値 50℃～70℃、GC含量55～65%を目安に設定している (アニーリング温度68℃が望ましい)。また注意点としてGCがまばらになるようにし、3'側末端の1、2塩基はGかCになるようにしている。また他の染色体との保存性が高い領域はスメアーの原因になるので、あらかじめBlast Searchを行い、確認しておくが良い。Blast Searchは<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>を利用すると便利である。

5. Taqについて

当方はLA-Taq(TAKARA)を用いており、他のTaqを使用する場合は、LA-Taqほどの経験則はないので、ご了承頂きたい。

6. 反応条件

		Final Conc.
Genome(2ng/ul)	2.5	10ng
10xLA PCR Buffer II (TAKARA)	2.5	1X
25mM MgCl ₂ (TAKARA)	2/2.25	2.0/2.25mM
2.5mM dNTP(TAKARA)	4	0.4mM
primer FW :(50uM)	0.5	1uM
primer REV :(50uM)	0.5	1uM
Control Vector		0/0.5/1/5/10fg
LA-Taq (5U/ul TAKARA)	0.25	2.5U
D.W		
Total Vol	25ul	

注) TT2ゲノムは分与可能です。

1: 96℃ 1min

2: 96℃ 20sec

3: 68 or 70℃ 1min/kb

4: 4℃

2-3を35サイクル

チューブをセットする前は氷上に静置し、サーマルサイクラーの温度が80℃以上になってからセットする。これで非特異が減少することがあり、かなり効果的である。

7. 条件検討の手順

まずNeo primerとの相性をみるため、endogenousなprimerと前述したNeo primerとの組み合わせを行い最適なものを選び、MgCl₂を2.0と2.25mMで最適化を行う。基本的にアニーリング温度が68℃と70℃のシャトルPCRを行う。

8. 結果の提出

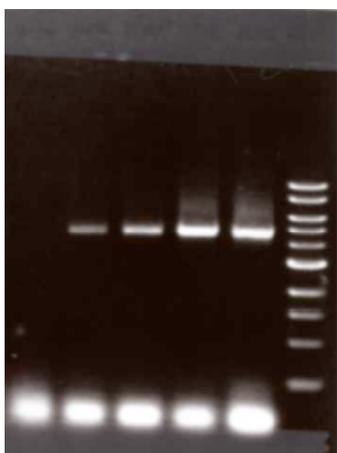
0fgはNegative Control、0.5fgは検出感度、10fgは鑄型が多いときの非特異的なバンドの増幅傾向を判断するために必要ですので、必ず5つの条件についての結果を mutant@cdb.riken.jpへ提出して下さい。検出感度や非特異的なバンドの有無を確認し、場合によっては再検討を行って頂くこともあります。

例) PCR条件検討

遺伝子名:

担当者:

左から0、0.5、1、5、10fg、マーカー



結果を受け取り問題が無ければ線状化Control Vector送付して頂きます。

9. Control Vectorのリニアライズ

設計図のようにPCRで検出する側へpBluscriptなどの余分な配列が付加されるようにリニアライズを行う。制限酵素はarmを挿入していない側のMCSを使う。

10. 調整法

Vector (注1) を制限酵素で線状化し(200ulの系でOver Night)、切れ残りが無いことを確認後、フェノール/クロロホルム処理を行う。繰り返しフェノール/クロロホルム処理を行い、上清を移す作業から、無菌的に操作する。クロロホルム処理後、エタノール沈殿を行い、HBS (注2) で溶解し、濃度を60nM に調整する。60nM のDNA 溶液をControl Vector の場合300 μ l以上、Targeting Vector の場合500 μ l以上送付してください。

なお、10kbpのVectorであれば45 μ gを100 μ lのHBSへ溶解すると60nM/100 μ lとなります。

(注1)Vectorの精製方法

精製は、塩化セシウム密度勾配遠心分離法が良い。しかし、全く塩化セシウム密度勾配遠心分離法を行ったことがない場合はカラム(Endotoxin Free)で良いが、カラムを用いた場合は、ES細胞へ導入すると細胞へダメージを与えることがある。

(注2)HBSの組成

25 mM HEPES

137mM NaCl

5mM KCl

0.7mM Na₂HPO₄·12H₂O

6mM Dextrose

pH 7.0 にあわせ、濾過滅菌

11. 送付方法

冷凍でも冷蔵も問題ありません。チューブには必ず掲示板の遺伝子名、担当者を明確に記載すること。記載が無い場合は紛失や手違いにつながるので忘れないようにして下さい。