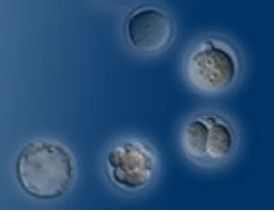


## LARGE

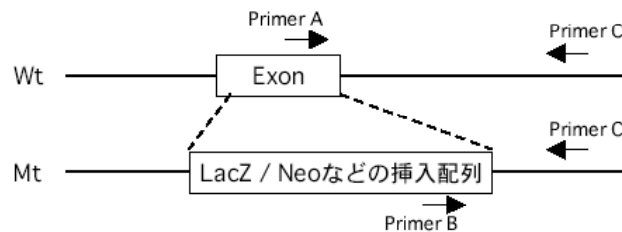
Laboratory for  
Animal Resources and  
Genetic Engineering  
RIKEN, Center for Developmental Biology



## 07. PCRによるGenotyping

### 1. 条件検討

#### 1) Primer設定(Conventional KO)



Wt：野生型

Mt：変異型

Primer A：Wtアレルの挿入配列によって削る領域内部、または挿入部位よりも5'上流

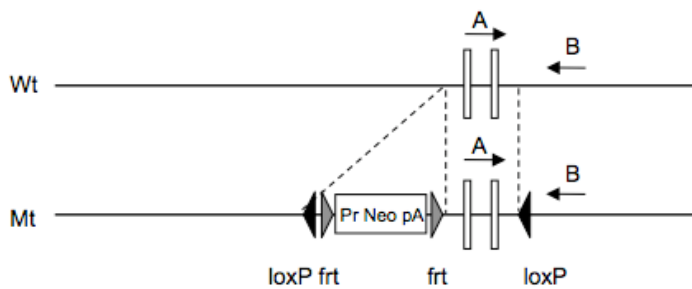
Primer B：Mtアレルの挿入配列

Primer C：WtアレルとMtアレルに共通のWtの配列

PCR産物のサイズは100bp～1Kbp以内で設定する。基本的には5'側、3'側のどちらでもよいが5'側はGCリッチであることが多くPCRによる検出が困難な場合がある。

primer A、B、Cを全て同時に用い、WtとMtがそれぞれ検出できるのが望ましいが、WtとMt別々で行ってもよい。重要なことは明確にバンドが検出できることである。

#### 2) Primer設定(Conditional KOのloxP配列)



Wt：野生型

Mt：変異型

Primer A：Neoから離れたloxP配列よりも5'上流

Primer B：Neoから離れたloxP配列よりも3'下流

PCR産物のサイズはloxP配列とvector配列が100bpぐらいなので、その差が分離できる範囲のサイズにする。

loxP配列挿入の確認はES細胞のスクリーニングの際もPCRで行っているが、ES細胞の段階では、WtのES細胞が混ざることもあり、評価が難しいので、F1マウスで再度行う必要がある。

### 3)PCR反応

Promega GoTaq DNA polymerase

	Final Conc.
2X GoTaq	1X
Primer A(50uM)	0.5uM
Primer B (50uM)	0.5uM
Primer C (50uM)	0.5uM
Targeting Vector	100fg/50ul
TT2 Genomic DNA	10~20ng/50ul
D.W	
Total Vol	25ul

1: 96°C 2min

2: 96°C 30sec

3: X°C 30sec

4: 72°C 1min/kbp

5: 4°C

2~4を35サイクル

### 2. マウステールからのPCR(アルカリ溶解法)

1. テールを1~2mm(根元からの場合)カットして、チューブに移す
2. 50mM NaOHを180ul加える
3. 95°C 10min
4. 1M Tris-HCl(pH8.0)を20ul加える
5. ボルテックする
6. cfg. at 12,000rpm for 10min (RT)
7. 25ul PCR反応溶液あたり2ulでPCRを行う

### **3. Genotypingデータの送付について**

- 1)PCR条件を決定する。
- 2)キメラマウスとC57BL/6の雌を交配し、最初に得られたF1 mouse(F1 mouseの毛色が良好な場合)に関して、PCRによるGenotypingを行う。さらにサザン解析を行い(5'側、3'側の一方で構いません)、genotype用PCRの信頼性を確認する(確認後のgenotypeはPCRのみで構いません)。最初Genotypingに関してはPCRおよびサザン解析の結果をmutant@cdb.riken.jpへ必ず提出して下さい。
- 3)F1世代で12週齢以降20週齢以内のヘテロ変異マウスの雄を、1ラインにつき3匹、当方へ送付する(系統保管のため、ヘテロ変異マウスが十分増えてからで構いません)。