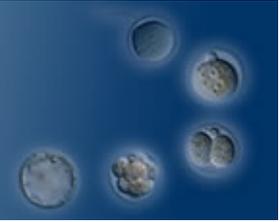


LARGE

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



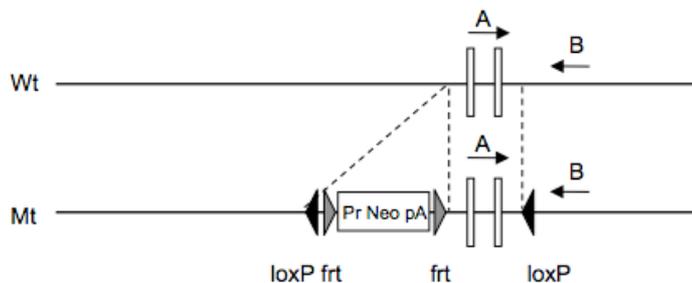
09. PCRによるloxP配列挿入の確認

Neoから離れたloxP配列は、loxPで挟む領域が長いほど挿入されないことが多く、long PCRでのスクリーニングのポジティブクローンに対して、PCRにより確認する必要がある。

実際には、conditional KOのコンストラクションは相同組換え効率が良く、long PCRの結果が出た後、直ちにPCRを行う必要があるので、long PCRを行う際にはloxPを確認するprimer等を用意しておく。

1. 条件検討

1) 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。

あるいは、Mtのみを検出するprimerを設定する。

2)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