

Rat genotyping 簡便法プロトコール

A 目的

現在私たちは、バソプレッシン遺伝子の C 末端に eGFP を導入したトランスジェニックラットを用いている。交配は、eGFP ネガティブのメスと eGFP ポジティブ(ヘテロ)のオスを掛け合わせているため、生まれてくるラットはヘテロまたはネガティブのものとなる。実験に使用するラットはヘテロのラットであるため、生まれてきた仔ラットに実際に eGFP が発現しているかどうかをチェックする必要がある。この方法は、ラットの尻尾から得た微量血液サンプルを用いて PCR 法で簡便にチェックする事を目的としたプロトコールである。

B 材料

1. サンプル:アルギニンバソプレッシン-eGFP トランスジェニック Wister rat 3 週令 血液
[Ueta Y., et al., 2005, Endocrinology 146 (1), 406-413]
2. ターゲット遺伝子・・・eGFP 遺伝子
3. 使用する道具
 - ・ろ紙(Whatman 社 filter paper1 または 2 90mm)
 - ・パンチ(Whatman 社 Harris Uni-Core 1.25mm)
 - ・PCR 用チューブ
4. 使用する試薬
 - ・プライマー (For: CACCATCTTCTTCAAGAACGAC,
Rev: ATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGT)
[Ueta Y., et.al., 2005 ,Endocrinology 146 (1), 406-413]
 - ・PCR grade water
 - ・ 2 × Ampdirect Plus (Shimadzu)
 - ・ Nova Taq (Novagen)または
 - ・ KOD FX (TOYOBO)
 - ・ dNTP MIX (TOYOBO の KOD FX の酵素にセットになっているもの)
 - ・ Buffer (TOYOBO の KOD FX の酵素にセットになっているもの)

C 方法

1. ラットの尻尾の先端をアルコール消毒し、約 1mm 切断する。(写真 1)
2. 先端に出てきた血液を、ろ紙上のあらかじめマークしておいた箇所に吸わせる。(写真 2)
3. 1-2 時間室温で乾燥させる。(注 1)
4. どちらかの反応液を調整する。

Ampdirect Plus を用いた場合 (μl)

2 × Ampdirect Plus	10.0
Nova Taq (HS) 5U/μl	0.1
Primer (For) (10 μM)	1.0
Primer (Rev) (10 μM)	1.0
PCR grade water	7.9
Total	20.0

KOD FX を用いた場合(μl)

2 × PCR buffer for KOD FX	10.0
2mM dNTPs	4.0
Primer (For) (10 μM)	0.6
Primer (Rev) (10 μM)	0.6
PCR grade water	4.4
KOD FX (1.0U/ μl)	0.4
Total	20.0

- 5.パンチでパンチアウトしたろ紙を4.で作成した反応液が入っているチューブの中に入れる。(注2)
(写真3)
- 6.サンプルをそれぞれのPCRサイクルで反応させる。(注3)

Ampdirect Plus を用いた場合 (μl)

95	10 min
94	30 sec
55	30 sec
72	30 sec
72	7 min

40 cycles

KOD FX を用いた場合(μl)

94	2 min
98	10 sec
60	30 sec
68	10 sec
68	20 sec

30 cycles

7. 3% AGAROSE ゲル/TAE にサンプルを 12 μl 投与し、電気泳動する。

- 注1 : しっかり乾燥させた方がパンチアウトしたときのコンタミを防ぎやすく、またきれいな結果も出やすい。
- 注 2-1: コンタミしないよう、毎回パンチの先端をアルコールに浸した脱脂綿で拭き、キムワイブなどで十分に水分を除去する。その後、ろ紙の血液の付着していない部分に 3-4 回パンチアウトし、水分がパンチに付着していないことを確認してから血液のついた部分をパンチアウトする。
- 注 2-2: ろ紙が反応液に浸っていることを確認する。
- 注 3 : アニールングの温度は作成したプライマーに応じて調節する。
反応時間はターゲットにしている PCR 産物の長さに応じて調節する。

写真1



しっぽを切っている所

写真2



ろ紙に血液をつけている所



血液を付着させたろ紙

写真 3

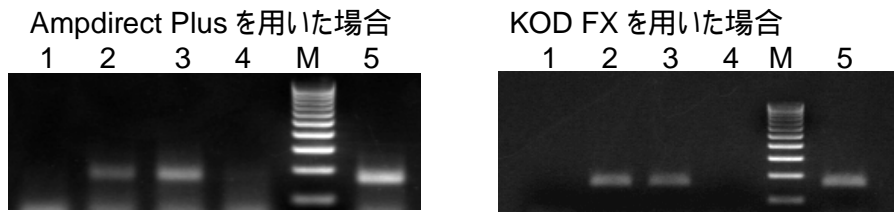


パンチアウトしている所



反応液とろ紙が入ったチューブ

D 結果



Positive sample: 2, 3, 5

Negative sample: 1, 4

M: 100 bp DNA Ladder

E 総括

一般に知られている方法は、尻尾を proteinase K などで溶解したものをサンプルとして用い、フェノール、クロロホルム、イソプロパノール等を用いてゲノム DNA を抽出し、PCR で確かめるという方法である。しかし、この方法は尻尾を溶解するだけで半日以上を要する上に、作業過程が多いためコンタミを起こしてしまう危険性がある。尻尾を溶かした液体をサンプルとして直接 PCR にかけるという方法もあるが、尻尾を溶解するため、やはり長い時間を要する。ジェノタイピングは作業の途中でほしいサンプルが得られているか確認ができないため、時間がかかり、作業過程が増えるほど緊張と不安が募り、ストレスのたまる実験になる。

ろ紙に付着させた血液を用いる方法は、少量の血液をろ紙につけるだけでよいから、1 人でもサンプリングが容易にできる。さらに、ろ紙に血液をつけて乾かし、パンチアウトしたものを反応液に入れるだけであるため、作業過程がとて少ない上に、乾燥時間も 1-2 時間で済むため、短時間で全工程を行うことができる。

使用する薬品について、一般的に使用されている方法は劇物に指定されているフェノールやクロロホルムを使用するため危険が伴うが、ろ紙に付着させた血液を用いる方法は、劇毒物に指定されている薬品を一切使用しないため、安全性も確保されている。その点で、とても画期的な方法と言える。

コストについても、主に使用する消耗品は、ろ紙と PCR に使用する酵素、PCR チューブだけであるため、とても安く抑えることができる。