

FTA カードと Ampdirect を用いたジェノタイピング方法



サンプリング

1. サンプリングには3週齢程度の動物を用いる。
2. 耳パンチ法、色素塗布法により個体識別をする。
3. FTA カードに個体番号、雌雄の別、採取日などを記載部分に記入する。
4. 尾の先端を2mmほどカットし、漏出してくる血液をFTAカードに擦り付けるように塗布する。

注意点

- ・血液の色素がなるべく残らないように。
- ・血液中の主なPCR阻害物質はヘモグロビンである。
- ・血液は少なければ少ないほどPCRの増幅効率が高い。

Ampdirect を用いた PCR

1. 以下の表をもとにPCRバッファーを調整する。
2. FTAカードに塗布した血液を耳パンチ(1.5mm径)などで打ち抜き、テンプレートとする。
3. 打ち抜いたテンプレートをPCRプレート穴に入れ、調整したPCR bufferを15µl加える。混ぜる必要はない。
4. PCR bufferが乾燥しないようにキャップもしくはミネラルオイルを重層しPCR反応(40サイクル)を行う。

PCR buffer 調整

	1検体当たり
2 × Ampdirect buffer	7.5 µl
20 µ M Primer-F	0.15 µl
20 µ M Primer-R	0.15 µl
H ₂ O	7.1 µl
5u/uL Nova Taq Hot start DNA polymerase	0.1 µl
Total	15 µl

注意点

- ・2 × Ampdirect 融解後析出物があるときは、十分にピペティング(ボルテックスはダメ)を行い析出物を溶解する。
- ・2 × Ampdirect は非常に泡立つので、ボルテックスによる攪拌は行わない。PCR反応液を調整する場合も同様。
- ・Taqポリメラーゼは他社のものでも増幅可能。TAKARA EX Taq, GIBCOのTaqポリメラーゼでもPCR産物が得られることを確認している。
- ・PCRのサイクル数は40サイクルが望ましい。
- ・PCR産物は、通常のPCRバッファーで得られるPCR産物同様、精製せずに酵素処理(制限酵素、アルカリフォスファターゼなど)が可能。

変更履歴

2005/04/16 nakanishi
2005/05/16 kuramoto