PCR Protocol for Genotyping ABCA1 Targeted Mice

前処理

マウステイル溶解液

溶解液	Final 濃度	(作成)	
SNET		<u>100ml 作成し作りおき</u>	
Tris• HCl pH8.0	20mM	1M Tris・HCl pH8.0 を 2ml	
EDTA	5mM	0.18g	
NaCl	400mM	2.33g	
SDS	0.3%	0.3g	
ProK 溶解液			
Proteinase K	200ug/ml	100mgを 5ml に溶解	

いずれも使用時まで-20 で保存。

SNET1ml に対し ProK 溶解液 10uL を加え 100uL ずつ分注する。

溶解液 100ul にマウステイル約 1mm を入れ、55 、3 時間(O/N が望ましい)で溶解。

溶解処理液を蒸留水で 10 倍希釈して、その 0.5ul を PCR に使用。

PCR

PCR						
PC	CR 条件		バンド	のサイズ		
94	4.5min	_	wild	:750bp		
94	0.5min		mutant	:540bp		
55	1min	40cycles	hetero	: 750bp & 540bp		
72	1min					
72	7 min					
4	5 min					
	94 94 55 72 72	PCR 条件 94 4.5min 94 0.5min 55 1min 72 1min 72 7 min	PCR 条件 94	PCR 条件 バンド 94 4.5min wild 94 0.5min mutant 55 1min 40cycles hetero 72 7 min	PCR 条件 バンドのサイズ 94 4.5min 94 0.5min 55 1min 72 1min 72 7 min バンドのサイズ wild :750bp mutant :540bp hetero : 750bp&540bp	PCR 条件 バンドのサイズ 94 4.5min wild : 750bp 94 0.5min mutant : 540bp 55 1min 40cycles hetero : 750bp & 540bp 72 7 min

PCR buffer

2 × Ampdirect Plus	10 uL
Ex-Taq Hot Start Version	0.1 uL
10uM Primer oIMR 1487-mut	1 uL
10uM Primer oIMR 1488-mut	1 uL
10uM Primer oIMR 1489-wt	1 uL
10uM Primer oIMR 1490-wt	1 uL
Sample	0.5 uL
dH2O	5.4 uL
Total	20 uL

本プロトコルは、大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学 循環器脂質研究室の奥 裕之様から ご提供いただきました。