

DNA-500

DNA-1000

DNA-2500

RNA

マルチプレックス PCR によるラットのジェノタイピング

—Ampdirect® を用いた FTA® カードに塗布したラット血液からの PCR—

●はじめに

SER (Spontaneously Epileptic Rat)¹⁾は、重度の欠神経様発作と強直性けいれんを発症するヒトてんかんのモデル動物です。SER は京都大学医学研究科附属動物実験施設にて、異なる2つのミュータント系統、tremor ラット²⁾と zitter ラットの遺伝的交雑によって得られたラットで、突然変異遺伝子 tremor (*tm*)と zitter (*zi*)を共にホモにもつダブルミュータントです。*tm*は *Aspa* (aspartoacylase) 遺伝子を含むゲノム(約 200 kb)の欠失、また *zi*は *Atrn* (attractin) 遺伝子の 8bp 欠失です。

継代維持は、*zi* 遺伝子をホモに *tm* 遺伝子をヘテロにもつ個体同士の兄妹交配によって維持されています。次世代作出用の親ラットを選抜するためにこれらの欠失を検出することが必須です。

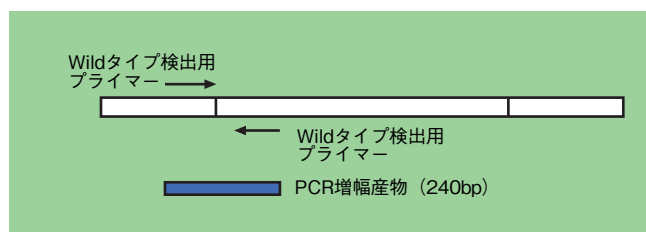
2つの突然変異遺伝子のうち *tm* 突然変異は約 200 kb という長い領域の欠失であり、その欠失の有無を検出するために2組のプライマーを用いてマルチプレックス PCR を実施します。

1組は wild タイプ検出用であり、その欠失領域にアニールするプライマーを用いて増幅するためその欠失領域がない場合のみ PCR 産物が得られます。

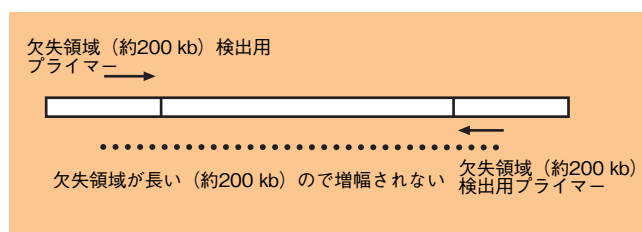
もう1組の *tm* 遺伝子欠損領域検出用は欠失領域を挟み形でアニールするので、欠失がある場合にのみ PCR 産物(240bp 程度)が得られます。欠損がない場合は約 200 kb という非常に長い領域を挟み込むために PCR 産物は得られません。

1) 欠損領域がないラットの場合

■Wildタイプ検出

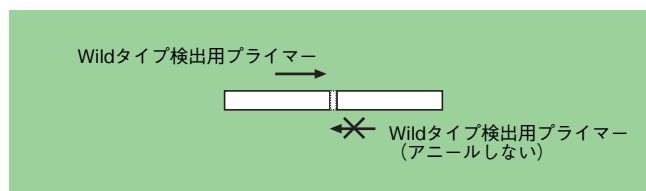


□*tm*遺伝子欠損領域検出

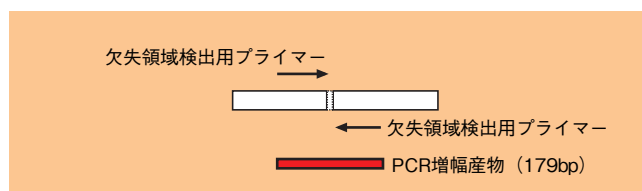


2) 欠失領域があるラットの場合

■Wildタイプ検出



□*tm*遺伝子欠損領域検出

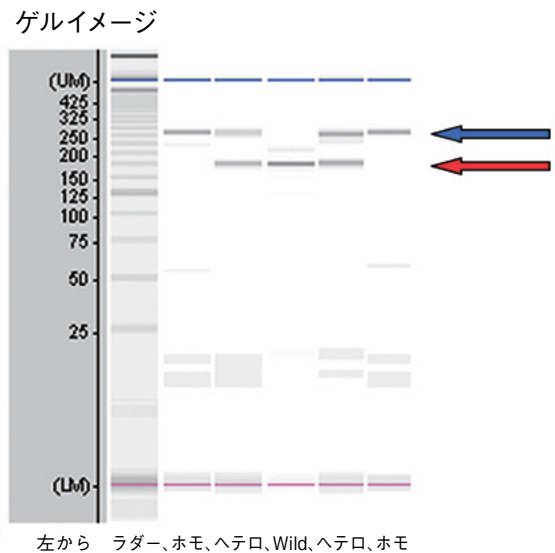
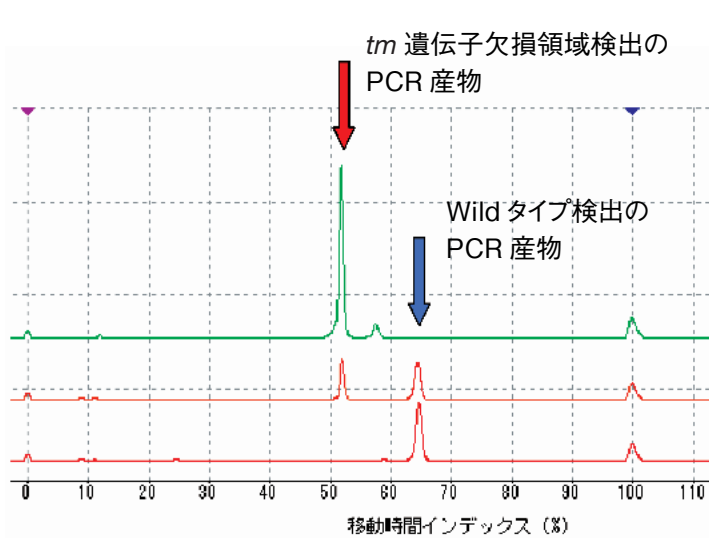


表にまとめると、以下のようになります

	Wildタイプ検出のPCR増幅産物	tm遺伝子欠損領域検出のPCR増幅産物
Wild	○ 検出される	— 検出されない
ホモ	— 検出されない	○ 検出される
ヘテロ	○ 検出される	○ 検出される

● 結果

1. MultiNA による分析(使用キット：DNA-500 プレミックスモード)



● 分析手順

分析装置：MCE-202 “MultiNA”

分析モード：DNA-500 プレミックス

PCR プライマー：以下の web を参照ください。

http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/nbr/strainsx/Strains_dJp.aspx?StrainID=28

サンプル：FTA[®] カードに塗布したラット血液から、
Ampdirect[®] 試薬を用いて PCR した増幅産物

試薬：

- DNA-500 Reagent Kit for MultiNA
(島津製作所) P/N 292-27910-91
- SYBR[®] Gold nucleic acid gel stain
(インビトロジェン) S-11494
- 25bp DNA ラダー
(インビトロジェン) 10597-011

サンプルのご提供：

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設准教授
庫本 高志 先生

● 参考文献

1. Serikawa, T. *et al.* Epileptic seizures in rats homozygous for two mutations, zitter and tremor. *Journal of Heredity*. 77, 441-444 (1986).
2. Kitada, K. *et al.* Accumulation of N-Acetyl-L-Aspartate in the Brain of the Tremor Rat, a Mutant Exhibiting Absence-Like Seizure and Spongiform Degeneration in the Central Nervous System. *Journal of Neurochemistry*. 74, 2512-2519 (2000).