

Transgene Detection Primer Set for Real Time (Mouse)

TaKaRa Code : D3788

包装量 : 各 100 次量

Shipping at -20°C
Stored at -20°C

●制品说明

转基因鼠中作为导入基因的报告基因, GFP (EGFP、AcGFP1) 和 lacZ 基因被广泛使用。通过 Real Time PCR 方法对报告基因进行检测, 可以筛选导入基因个体。本制品中含有通过 Real Time PCR 方法进行两种基因检测的各种引物对 (Primer Mix, 2 μM each)。

本制品中还含有作为内参照使用的小鼠基因组 DNA 检测用的 Primer Mix (检测 Ywhaz 基因和 Raver2 基因), 使用 Primer Mix (检测 Ywhaz 基因和 Raver2 基因) 可以进行相对定量法对各种样品间导入的基因量进行比较。

●制品内容 (100 次量) *1

Primer 名称	浓度	包装量	扩增片段大小
1.GFP_primer-1*2	2 μM each	500 μl	127 bp
2.GFP_primer-2*3	2 μM each	500 μl	162 bp
3.lacZ_primer-1*4	2 μM each	500 μl	96 bp
4.lacZ_primer-2*4	2 μM each	500 μl	141 bp
5.Reference_primer-1*5	2 μM each	500 μl	115 bp
6.Reference_primer-2*6	2 μM each	500 μl	89 bp

- *1 使用 DRR081 试剂 25 μl 反应体系的使用次数。
- *2 GFP Primer-1 是在 EGFP 和 AcGFP1 相同序列区域设计的引物对 (Primer Mix)。
- *3 GFP Primer-2 是在 EGFP 特异区域设计的引物对 (Primer Mix), 不能检出 AcGFP1 基因。
- *4 lacZ primer-1, 2 是分别在 lacZ (β-galactosidase) 基因两个不同区域设计的引物对 (Primer Mix)。
- *5 Reference_primer-1 是扩增小鼠第 15 号染色体上的 Ywhaz 基因一部分的引物对 (Primer Mix)。
- *6 Reference_primer-2 是扩增小鼠第 4 号染色体上的 Raver2 基因一部分的引物对 (Primer Mix)。

●操作方法

1. 染色体 DNA 的提取。
需要对样品进行准确定量时, 请使用基因组 DNA 提取试剂盒提取高纯度的基因组 DNA。对样品进行导入基因检测时, 可以使用简易法提取基因组 DNA。
2. Real Time PCR 反应。
Primer Mix 以外试剂配成混合液后分装到各 Tube 中, 最后加入各 Primer Mix。按照这个顺序进行反应液配制, 可以减少模板加入量的误差, 得到稳定的实验结果。

<Real Time PCR 反应例>

使用试剂: SYBR® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time)
(TaKaRa Code: DRR081)

Real Time PCR 装置: Thermal Cycler Dice® Real Time System
(TaKaRa Code: TP800)

- 1) 按照下列方法配制 Real Time PCR 反应液。
本制品中有 6 种 Primer Mix, 当 6 种 Primer Mix 都使用时, 除 Primer Mix 以外的其他试剂先配制成 7 份混合液, 各取 20 μl

分装后, 分别加入各 Primer Mix 5 μl。

按下列组份配制 Real Time PCR 反应液 (请在冰上进行)。

试剂	1 个反应	7 个反应混合液
SYBR® Premix Ex Taq™ II (2×)	12.5 μl	87.5 μl
Primer Mix (2 μM each)	5 μl	-
DNA 模板*	2 μl	14 μl
dH ₂ O (灭菌蒸馏水)	5.5 μl	38.5 μl
Total	25 μl	

* 基因组DNA加入量过多, SYBR® Green I 本底会很高, 这时可以将基因组DNA稀释 10 倍或者减少为 10~20 ng 加入。

2) Real Time PCR 反应*。

95°C 1 min
95°C 5 sec
60°C 30 sec } 40 Cycles

* PCR 反应条件请按照 DRR081 试剂的标准条件进行设定。初期变性时间请设定为 1 min。

●使用例

以小鼠基因组 DNA 为模板, 通过 Real Time PCR 方法对纯合体和杂合体基因型进行判定。

从导入 1 copy 的 EGFP 基因及 lacZ 基因的转基因小鼠尾部*材料中提取基因组 DNA, 通过 Real Time PCR 方法进行两个基因的检测。

* 小鼠尾是自然科学研究机构池中先生和竹林先生提供的。
本实验用 5 种样品根据小鼠交配方式判定 Tg#1、Tg#3 为纯合体, Tg#2、Tg#4 为杂合体, Wt 是没有导入 EGFP、lacZ 基因的小鼠。

【方法】

使用 FastPure® DNA Kit (TaKaRa Code: 9191) 从小鼠尾部提取基因组 DNA。取 1 μl 作为 Real Time PCR 反应的模板。利用本制品的 Primer 和 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR081) 进行 Real Time PCR 反应。使用 Multiplate 进行解析, 对两个基因进行相对表达量的解析。

【结果】

使用 ΔΔCt 方法将 Real Time PCR 反应结果进行相对量解析。4 种样品中, 样品 Tg#1、Tg#3 的 EGFP 基因表达量是样品 Tg#2、Tg#4 的 2 倍, 而且都有 lacZ 基因检出, 这个结果与基因型一致。

