

long-range PCR に適した DNA 採取キット Oragene

M.Keddache¹ and P.Lem²

¹ DNA Sequencing Service, Cincinnati Children's Hospital Research Center, Cincinnati, OH, USA

² DNA Genotek Inc, Ottawa, ON, Canada

イントロダクション

long-range PCR は遺伝子工学の分野に置いて様々な応用が可能である。これを成功に導くには long-range PCR では Oragene を用いて得られるような 23kb 以上の高品質、高分子量の DNA が求められる。ここでは Oragene を使って唾液から抽出した DNA と血液から抽出した DNA の long-range PCR のパフォーマンスの比較を行う。

実験方法 DNA の精製方法

唾液は Oragene を使用して採取し、DNA は Oragene の精製方法に従って行った。比較対照として血液から DNA を抽出し、MagneSil Blood Genomic, Max Yield System(Promega) KingFisher 96 自動システム(ThermoElectron)を使用した。

実験方法 Long-range PCR の方法

ヒト GBA 遺伝子の 7.3kb 断片を Expand Long PCR kit with Buffer System 2(Roche Diagnostics)を使用して増幅した。ヒト GBA 遺伝子よりのプライマーは Integrated DNA Technologies Inc. を使用して合成する(Table 1)。全ての PCR 試薬の濃度は製造元の指示に従って調整した(Table 2)。

Primer	Sequence
GBA Forward	5'-TTC TCC ATG CAA ATC TGT GT-3'
GBA Reverse	5'-GAA CCA GAT CCT ATC TGT GC-3'

(Table 1.) Primer sequence

Roche Expand Long PCR kit	Final Concentration
Buffer	1x
MgCl ₂	2.25mM
dNTPs	500uM
Forward Primer	20pmol
Reverse Primer	20pmol
Enzyme Mix	1U
Template DNA	200ug

(Table 2.) Final PCR reagent concentration

温度サイクルは DNA Engine Tetrad machine(MJ Research)を使用して行った。PCR 設定を (Table 3)に示す。

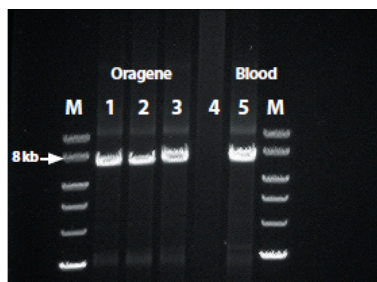
PCR 生産物は 0.8%アガロースゲル 1 時間 20 分、80V で電気泳動した。泳動後、ゲルはエチジウムブロマイド溶液で染色後、写真を撮影した。

Cycle	温度	時間
1x	93°C	2 分
10x	93°C	10 秒
10x	60°C	30 秒
10x	68°C	4 分 40 秒
20x	93°C	10 秒
20x	60°C	30 秒
20x	68°C	4 分 40 秒 サイクル毎に+20 秒
1x	68°C	7 分
1x	4°C	停止

(Table 3.)温度サイクルパラメーター

結果

Figure 1 は Oragene から抽出した DNA と血液から抽出した DNA を使った long-range PCR の結果を示している。レーン 1~3 は Oragene から抽出した DNA をもとにしたもの、レーン 5 は血液から抽出した DNA である。両 DNA ともヒト GBA 遺伝子 7.3kb を増幅している。



(Figure 1)long-range PCR 反応後の電気泳動の結果

レーン 1~3 : Oragene から抽出した DNA

レーン 4 : コントロール

レーン 5 ; 血液から抽出した DNA

考察

結果から Oragene から抽出された DNA は、血液から抽出されたそれと同じような結果が得られた。Oragene は DNA の切断を最小限にしながら、かつ long-range PCR に適した高い分子量を持つ DNA を抽出することができると言えるだろう。