



Ideas & Chemistry

Marker Gene Detection Kit

(Code No. MGK-101)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A5363K

－ 目 次 －

[1] はじめに	2.3
[2] 製品内容	4
[3] PCR テンプレートの調製	5.6
[4] 検出プロトコールの選択	7
[5] 使用方法	8.9.10
[6] 判別	11.12
[7] トラブルシューティング	13.14
[8] 関連製品	14

ご注意

本製品に含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。診断および臨床検査には使用しないでください。本製品は臨床診断薬ではありません。本製品の使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

[1] はじめに

本製品は、理化学研究所バイオリソースセンターにて開発された遺伝子組換え系統の交雑による意図しない遺伝的汚染を検出する方法^{*1,2}を遺伝子組換え動物の利用者が誰でも簡単に自家検査できるようにしたキットです。

本キットは遺伝子改変動物に導入頻度が高い9種類の代表的なマーカー遺伝子をマルチプレックスPCRにて増幅し、電気泳動にて遺伝子の有無を判定します。

PCR酵素には、高効率・高成功率PCR酵素「KOD FX Neo」を採用しており、精製ゲノムDNAに加え、マウス尾(テール)・耳等のライセートからも高効率に検出することが可能です。

^{*1} Nakata H et al., *Exp. Anim.*, **58**: 437-442 (2009)

^{*2} 吉木 淳 実験動物技術:第49巻1号35-40 (2014)

【表1 検出対象動物および使用可能サンプル】

検出対象動物種	使用可能サンプル
マウス	尾(テール)・耳・培養細胞
ラット	尾(テール)・耳・培養細胞
ヒト	培養細胞

※上記以外の動物種では内部標準に使用しているトランスフェリンレセプター遺伝子が増幅されません。

マウス、ラット、ヒト以外の動物種のサンプルからは内部標準として使用しているトランスフェリンレセプター遺伝子は増幅されませんが表2記載の遺伝子を検出することは可能です。

【表2 検出対象遺伝子】

遺伝子名	略称	備考	対象配列
トランスフェリンレセプター遺伝子	Tfrc (IC)	内部標準 (Internal Control)	NM_011638
βガラクトシダーゼ遺伝子	lacZ	レポーター遺伝子	NC_011750
フリッパーゼ遺伝子	flp	組換え酵素	U46493
Cre リコンビナーゼ遺伝子	cre	組換え酵素	NC_005856
ハイグロマイシン耐性遺伝子	hyg	薬剤耐性遺伝子	V01499
ピューロマイシン耐性遺伝子	puro	薬剤耐性遺伝子	M25346
ネオマイシン耐性遺伝子	neo	薬剤耐性遺伝子	NC_008460
GFP (Green fluorescence protein)	GFP	蛍光タンパク質	U55763
Cas9 (CRISPR associated protein 9)	cas9	切断酵素	^{*3}
IRES (Internal Ribosome Entry Site)	IRES	リボソーム進入部位	X74312

^{*3} A human codon-optimized SpCas9 Cong L et al., *Science*. **339**(6121):819-23 (2013)

本キットでは以下の検出対象遺伝子のバリエーションも検出されます。

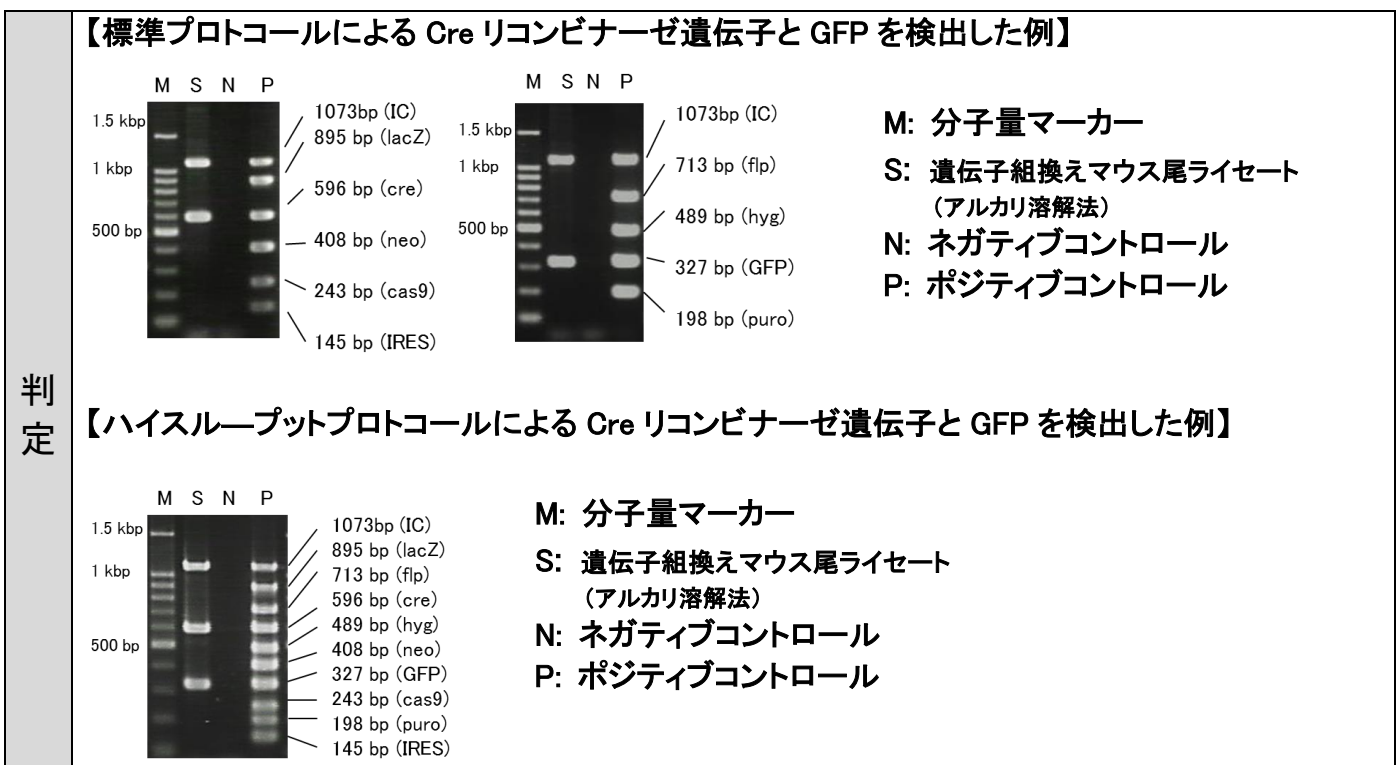
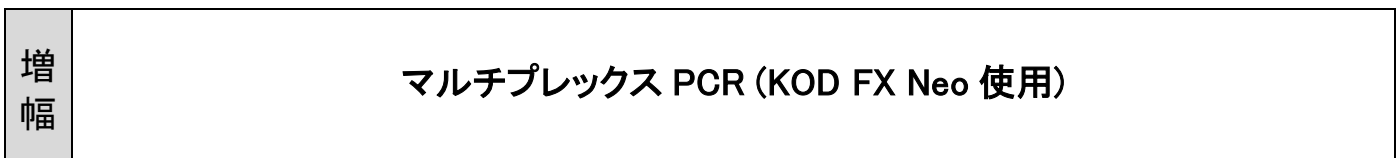
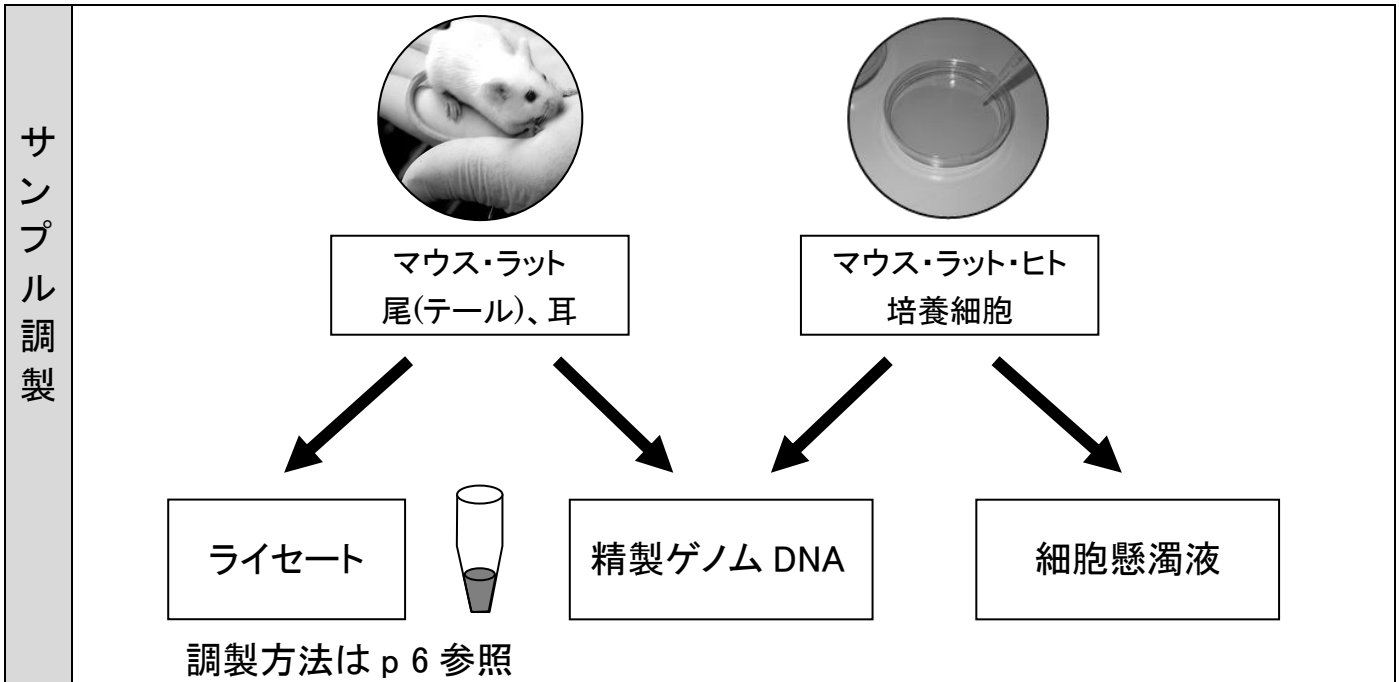
【表3 検出されるバリエーション】

検出される GFP バリエーション
EGFP (Enhanced Green fluorescent protein)
EBFP (Enhanced Blue fluorescent protein)
ECFP (Enhanced Cyan fluorescent protein)
EYFP (Enhanced Yellow fluorescent protein)
Venus
EmGFP

※本キットで使用しているプライマーは表2に記載のGenBank等の配列を基に設計されています。表3に示すように主なバリエーションに関しては検出されますが、部分配列の挿入やコドンユーセージが変更されている場合は検出できない場合もございます。予めご了承ください。

検出される FLP バリエーション
FLPe

【作業フロー】



[2] 製品内容

本製品には、以下の試薬が含まれています。本製品は、50 μ l の PCR が 200 回実施可能です。

製品構成	パーツ名	ラベルの色	保存	容量
Primer and Control template	Primer Set 1	赤	-20°C	1.2 ml \times 1
	Primer Set 2	青	-20°C	1.2 ml \times 1
	Control template	橙	-20°C	100 μ l \times 1
KOD FX Neo* (Code: KFX-201)	KOD FX Neo	ピンク	-20°C	200 μ l \times 1
	2 \times PCR Buffer for KOD FX Neo	緑	-20°C	1.7 ml \times 3
	2 mM dNTPs	グレー	-20°C	1 ml \times 2

* KOD FX Neo(Code:KFX-201)が 1 セット含まれます。

本キットは KOD FX Neo で最適化されています。異なる PCR 酵素との組み合わせで使用しないでください。

Primer Set 1 および Primer Set 2 には以下の検出対象を増幅するプライマーセットが含まれています。

増幅サイズ bp	Primer Set 1		Primer Set 2	
1073	トランスフェリンレセプター遺伝子	IC*	トランスフェリンレセプター遺伝子	IC*
895	β ガラクトシダーゼ遺伝子	lacZ		
713			フリッパーゼ遺伝子	flp
596	Cre リコンビナーゼ遺伝子	cre		
489			ハイグロマイシン耐性遺伝子	hyg
408	ネオマイシン耐性遺伝子	neo		
327			GFP	GFP
243	Cas9	cas9		
198			ピューロマイシン耐性遺伝子	puro
145	IRES	IRES		

※内部標準(IC)として増幅します。マウス、ラット、ヒトのトランスフェリンレセプター遺伝子を増幅するように設計されています。

IC の増幅サイズは動物種により異なります。(マウス 1073 bp、ラット 1071 bp、ヒト 1134 bp)

Control template

- ・検出対象マーカー遺伝子 9 種類と内部標準(IC)の DNA 断片を含んでいます。
 - ・想定されるテンプレート DNA 中の各遺伝子と同じレベルのコピー数になるように濃度が調整されており、PCR 反応におけるポジティブコントロールとして使用します。
- ポジティブコントロールとしてサンプルと同時に増幅させることで、電気泳動した際にバンドサイズを確認しやすく、判別が容易になります。

本製品の保存、使用について

- ・製品到着後は、-20°Cで保存してください。
- ・使用時は、融解後、ボルテックスまたは転倒混和し、溶液を完全に均質化した上でご使用ください。
- ・使用後は、再度凍結して保存してください。Primer Set 及び Control template 10 回程度の凍結融解の繰り返しは、品質に影響がないことを確認しています。

[3] PCR テンプレートの調製

本キットはマウス、ラット、ヒト由来のサンプルを使用することができます。トランスフェリンレセプター遺伝子を内部標準としており、マウス、ラット、ヒトから検出されるように設計されています。

※マウス、ラット、ヒト以外の動物種のサンプルからは内部標準として使用しているトランスフェリンレセプター遺伝子は増幅されませんが、表 2 記載の遺伝子を検出することは可能です。検出を行う際には精製 DNA をテンプレートとして使用し、既知の組換え系統動物をポジティブコントロールとして同時に解析することをお勧めします。

【表 4 本キットの使用可能な動物種、サンプルおよびテンプレート】

動物種	サンプル	テンプレート
マウス・ラット	尾(テール) 耳	ライセート
	培養細胞	細胞懸濁液、精製 DNA
	血液・様々な組織等	精製 DNA
ヒト	培養細胞	細胞懸濁液、精製 DNA

詳しい PCR テンプレート調製方法は p 6 を参照してください。

本キットは高効率・高成功率 PCR 酵素「KOD FX Neo」を使用しており、マウス尾(テール)・耳、培養細胞から簡易に調製したライセートをテンプレートとして用いることができます。また、培養細胞は細胞懸濁液を直接テンプレートとして用いることも可能です。さらに様々なサンプルから精製された DNA を用いることもできます。

※操作上の注意

試薬汚染(コンタミネーション)による誤った判定を防ぐために、使用するマイクロピペット用チップは 1 回毎に交換してください。

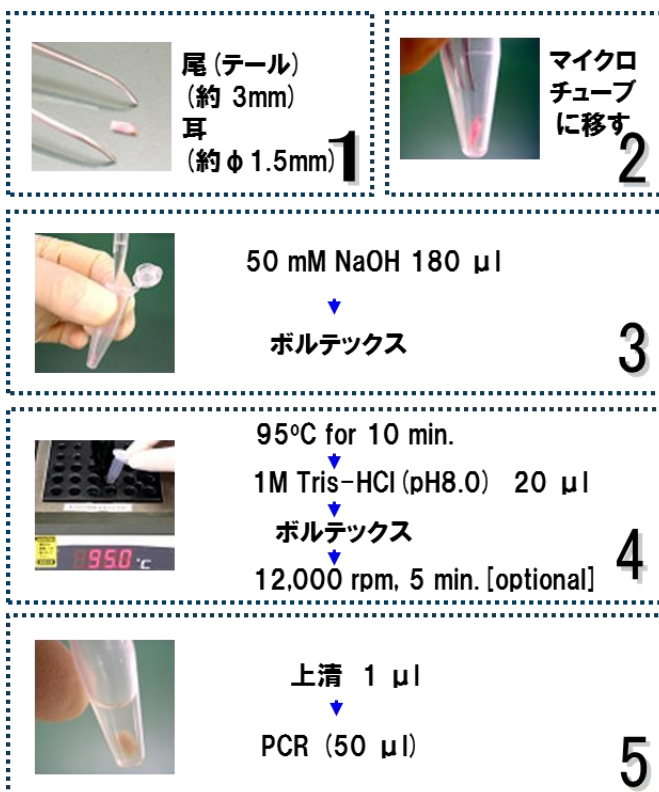
(1) アルカリ溶解法によるライセートの調製

準備するもの

品名	備考
50 mM NaOH	1 サンプルあたり 180 μ l
1 M Tris HCl (pH8.0)	1 サンプルあたり 20 μ l
卓上遠心機	

※試薬は目安として調製してから1年以内の物をご使用ください。
アルカリ溶解がうまくいかない場合は新しく調製してください。

- ① 尾(テール)を 3 mm 程度、または耳を ϕ 1.0~2.0 mm 程度にカットします。
※耳をカットする場合は耳パンチ等をご使用ください。
- ② 1.5 ml チューブにサンプリングした試料を入れます。
※マウス試料は、液に浸るようにしてください。
- ③ 50 mM NaOH を 180 μ l 加え、ボルテックスし、卓上遠心機にて遠心します。
- ④ 1.5 ml チューブに入った抽出液を 95°C で 10 分間加熱します。1 M Tris HCl (pH8.0) を 20 μ l 加え、チューブのふたを閉め、軽くボルテックスします。
※熱アルカリにご注意ください。
- ⑤ アルカリ抽出液の遠心上清 1 μ l をテンプレートとして使用します。



※処理後、マウス試料は完全には溶解しません。

マウス試料の表面が溶ける程度です。

※作製当日に PCR を行わない場合は凍結して保存してください。

数日間凍結保存可能ですが、お早めにご使用ください。

(2) 細胞懸濁液の調製

必要に応じてトリプシン処理等で細胞を回収し、PBS(-)等で 1×10^4 cells/ μ l 前後になるように懸濁し、そのまま 1 μ l を PCR のテンプレートとして使用します。

(3) 精製 DNA の調製

一般的に用いられているフェノール法やスピнкаラム法などで精製された DNA をテンプレートとして 10~30 ng をご使用ください。

[4] 検出プロトコルの選択

本キットは2種類のプロトコルによる検出が可能です。

【標準プロトコル】または**【ハイスループットプロトコル】**を選択してください。

【標準プロトコル】による検出

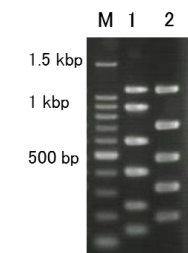
Primer Set 1 と Primer Set 2 を別々で使用し、2つのグループに分けてマーカー遺伝子を検出します。Primer Set 1 は IC を含む 6 遺伝子、Primer Set 2 は IC を含む 5 遺伝子を同時にマルチプレックス PCR で検出します。

- ・電気泳動の際、各バンドの間隔が広いので、結果の判別が容易です。
- ・本キットを初めて使用する場合や複数のマーカー遺伝子を検出する場合に推奨します。

増幅サイズ(bp)	Primer Set 1
1073	Tfrc(IC [※])
895	lacZ
596	cre
408	neo
243	cas9
145	IRES

増幅サイズ(bp)	Primer Set 2
1073	Tfrc(IC [※])
713	flp
489	hyg
327	GFP
198	puro

アガロース電気泳動例
(Control template を増幅した場合)



M:分子量マーカー
1: Primer Set 1 で増幅
2: Primer Set 2 で増幅

【ハイスループットプロトコル】による検出

Primer Set 1 と Primer Set 2 を混合し、一度に IC を含む 10 種類すべての検出対象マーカー遺伝子を検出します。

- ・多サンプルの解析を行う場合に推奨します。
- ・バンドが重なり、判別しにくいサンプルに関しては①標準プロトコルを用いて再度解析することで、より正確な解析が可能です。

増幅サイズ(bp)	Primer Set 1 + Set 2
1073	Tfrc(IC [※])
895	lacZ
713	flp
596	cre
489	hyg
408	neo
327	GFP
243	cas9
198	puro
145	IRES

アガロース電気泳動例
(Control template を増幅した場合)



M:分子量マーカー
1: Primer Set 1 と Primer Set 2 で増幅

※内部標準(IC)として増幅します。マウス、ラット、ヒトのトランスフェリンレセプター遺伝子を増幅するように設計されています。

IC の増幅サイズは動物種により異なります。(マウス 1073 bp、ラット 1071 bp、ヒト 1134 bp)

[5] 使用方法

反応液の調製を行う前に以下の点をご確認ください。

※操作上の注意

キャリーオーバー汚染を防ぐために以下の対策をお薦めします。

- ・反応液の調製と電気泳動は別の作業区内で行うことをお薦めします。
電気泳動装置周辺は PCR 産物が存在しキャリーオーバー汚染する可能性が高くなっています。
- ・反応液の調製および電気泳動作業時は、グローブ等を着用し、ピペット、チップは反応液調製用、電気泳動用に区別して専用の物を使用することをお薦めします。
- ・チューブ開閉時には飛沫が飛び跳ねない様にご確認ください。

※ポジティブコントロール試験、ネガティブコントロール試験について

検出結果の信頼性を確保するためにポジティブコントロール試験、ネガティブコントロール試験を同時に実施することを推奨します。

ポジティブコントロール試験

各反応液のテンプレートとして、DNA 溶液の代わりにキット付属の Control template を 1 μ l 添加し最終反応液を 50 μ l にします。

ネガティブコントロール試験

各反応液のテンプレートとして、DNA 溶液の代わりに滅菌水 1 μ l を添加し、最終反応液を 50 μ l にします。

(1) 反応液の調製

以下のように反応液を調製してください。

【標準プロトコール】で行う場合

	Primer Set 1	Primer Set 2
滅菌水	7 μ l	7 μ l
2 × PCR Buffer for KOD FX Neo	25 μ l	25 μ l
2 mM dNTPs	10 μ l	10 μ l
KOD FX Neo (1U/ μ l)	1 μ l	1 μ l
Primer Set 1	6 μ l	
Primer Set 2		6 μ l
テンプレート ・アルカリ溶解法によるライセート 精製ゲノム DNA (10~30 ng/ μ l) 細胞懸濁液 (1~3 × 10 ⁴ cells/ μ l) ・Control template (ポジティブコントロール) ・滅菌水 (ネガティブコントロール)	1 μ l	1 μ l
total	50 μ l	50 μ l

【ハイスルーブットプロトコール】で行う場合

	Primer Set 1+Set 2
滅菌水	1 μ l
2 × PCR Buffer for KOD FX Neo	25 μ l
2 mM dNTPs	10 μ l
KOD FX Neo (1U/ μ l)	1 μ l
Primer Set 1	6 μ l
Primer Set 2	6 μ l
テンプレート ・アルカリ溶解法によるライセート 精製ゲノム DNA (10~30 ng/ μ l) 細胞懸濁液 (1~3 × 10 ⁴ cells/ μ l) ・Control template (ポジティブコントロール) ・滅菌水 (ネガティブコントロール)	1 μ l
total	50 μ l

推奨液量 (50 μ l) よりも少ない液量で反応を行うと、マルチプレックス PCR の効率が低下したり、ターゲット間で増幅に偏りが生じたりすることがあります。正しい結果を得るため、推奨液量で反応を行ってください。

(2) PCR サイクル条件

PCR 装置にて以下のサイクル条件で PCR を行います。

ステップ		温度	時間
初期変性		94° C	2 分
PCR (35 サイクル)	変性	98° C	10 秒
	アニーリング	65° C	30 秒
	伸長	68° C	1 分

※増幅量が多い場合は 30~35 サイクルの間で調整してください。

(3) アガロース電気泳動・検出

準備するもの

品名(試薬)
アガロース
電気泳動用 buffer
DNA マーカー
DNA 染色剤(エチジウムブロマイド等)

品名(機器)
電気泳動装置
UV トランスイルミネーター
電気泳動用ゲル撮影用装置

※操作上の注意

エチジウムブロマイド等を扱う場合、および DNA 染色液で染色したゲルを取り扱う場合は、必ず手袋を着用し、直接液に触れないようにご注意ください。

- ① アガロースゲル*¹を作製する場合は 2%(W/V)になるようにアガロースを電気泳動用緩衝液で溶解し、ゲルを作製します。
- ② ゲル調製に使用した緩衝液で満たした電気泳動槽にアガロースゲルを設置します。
- ③ PCR 反応液 2~3 μ l に泳動用色素*²0.5~1 μ l を添加し、全量を泳動します。
- ④ 50~100 V の定電圧をかけ、BPB 色素がゲルの下端から 3 cm 程度になるまで泳動を行います。
- ⑤ 1 μ g/ml のエチジウムブロマイド水溶液*³により 30 分程度ゲルを染色します。
- ⑥ UV トランスイルミネーターにゲルをセットし、写真を撮影します。

*¹ 本キットは染色方法として後染めを推奨しています。

*² BPB 色素の入った泳動用色素をお勧めします。

弊社 6 × Loading Dye (Code No. RE-DYE)を用いる場合は、PCR 反応液 2.5 μ l と 6 × Loading Dye 0.5 μ l を混合し、全量泳動を行うことを推奨します。

*³ 他の蛍光色素を用いる場合は、その色素の推奨条件をご使用ください。

[6] 判別

検出されたバンドのサイズをポジティブコントロールの結果と比較することにより、遺伝子を判別してください。以下に例を示します。

実施例 1

4 系統のマウスサンプルを用いてマーカー遺伝子の検出を行いました。

使用サンプル: アルカリ溶解法によるマウス尾(テール)ライセート(p 6 参照)

マウス系統	マーカー遺伝子の有無
系統 1	—
系統 2	cre, GFP
系統 3	hyg, neo, GFP
系統 4	lacZ, neo, IRES

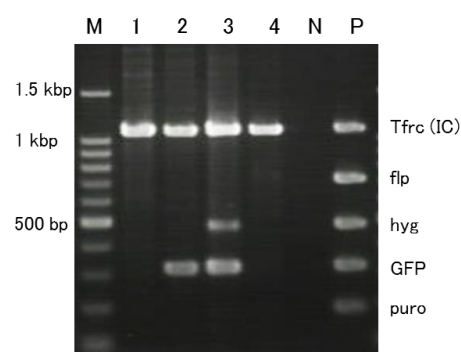
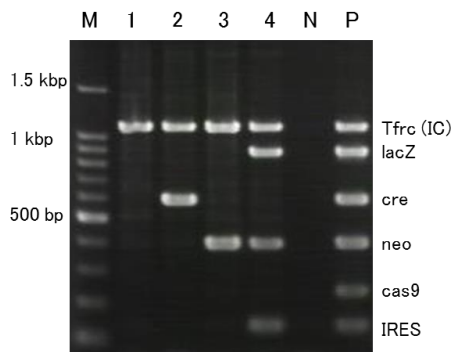
【標準プロトコール】による検出

Primer Set 1

増幅サイズ(bp)	遺伝子名
1073	Tfrc(IC)
895	lacZ
596	cre
408	neo
243	cas9
145	IRES

Primer Set 2

増幅サイズ(bp)	遺伝子名
1073	Tfrc(IC)
713	flp
489	hyg
327	GFP
198	puro



M: 分子量マーカー

1: 系統 1

2: 系統 2

3: 系統 3

4: 系統 4

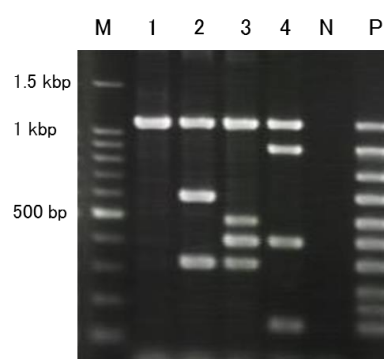
N: ネガティブコントロール

P: ポジティブコントロール

(Control template を使用)

【ハイスループットプロトコール】による検出

増幅サイズ(bp)	Primer Set 1+Set 2
1073	Tfrc(IC)
895	lacZ
713	flp
596	cre
489	hyg
408	neo
327	GFP
243	cas9
198	puro
145	IRES



M: 分子量マーカー

1: 系統 1

2: 系統 2

3: 系統 3

4: 系統 4

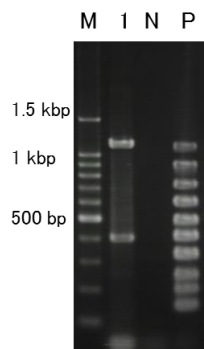
N: ネガティブコントロール

P: ポジティブコントロール

(Control template を使用)

実施例 2

使用サンプル:細胞の PBS(-)懸濁液 (p 6 参照)



M:分子量マーカー

1: neo を有するヒト細胞株懸濁液(1×10^4 cells 相当)

N: ネガティブコントロール

P: ポジティブコントロール (Control template を使用)

[7] トラブルシューティング

現象	原因	対策
ポジティブコントロールの増幅が見られない。増幅が弱い。	PCR がうまく進んでいない。	PCR 反応液の調製をもう一度お試しください。PCR 反応液を調製後は放置せず、直ちに検体の添加を実施してください。また、推奨の PCR サイクル条件で行われているかご確認ください。
	反応液量が少ない。	推奨液量 (50 μ l) よりも少ない液量で反応を行うと、マルチプレックス PCR の効率が低下したり、ターゲット間で増幅に偏りが生じたりすることがあります。正しい結果を得るため、推奨液量で反応を行ってください。
内部標準の増幅が見られない。増幅が弱い。	サンプルが適切でない。	サンプル量を増やして実施し、改善されない場合は再度サンプルを調製してください。また、精製 DNA を用いて確認することをお勧めします。
	テンプレート量が極端に多い。	アルカリ溶解で調整したライセートを更に 5~10 倍程度滅菌水等で希釈してご使用ください。精製ゲノムをご使用の場合は 10~30 ng/ μ l 程度に希釈してご使用ください。
	テンプレート量が少ない。	テンプレート量を増やす方向で検討してください。
	アルカリ溶解する際の加熱処理が十分でない。	ヒートブロックの温度、加熱時間をご確認ください。
	アニーリング温度が高い。	アニーリング温度が 65°Cであることをご確認ください。
検出対象マーカ―遺伝子の増幅が見られるが、ポジティブコントロールや内部標準に比べてバンドがうすい。	検出対象配列と配列が異なる部分がある。	表 2、表 3 (p2 参照)を確認し、検出対象遺伝子の配列をご確認ください。部分配列の挿入やコドンユースが変更されている場合は検出できない場合があります。
	非特異増幅が発生している。	推奨とは異なるサイクル条件を用いたり、テンプレート量が多い場合、紛らわしい領域にエキストラバンドが生じた可能性があります。 ^{*1} 推奨された条件を用いているかご確認ください。
ネガティブコントロールに増幅が見られる。	キャリアオーバー汚染が発生している。	キャリアオーバー汚染が発生している可能性があります。汚染源を特定し、汚染されていない試薬をご使用ください。また、汚染除去作業(拭き取り、UV 照射等)を実施してください。
エキストラバンドが見られる。	テンプレート量が極端に多い。	テンプレート量を減らす、またはサイクル数を 30~35 サイクルの間で検討してください。
	アニーリング温度が低い。	アニーリング温度が 65°Cであることをご確認ください。

現象	原因	対策
100 bp 以下にバンドが見える。	プライマーダイマーの発生している。	プライマーダイマーが発生したと考えられますが判定には問題ありません。推奨条件で実験を行っているかご確認ください。
予測されるマーカー遺伝子が検出されない。	検出対象配列でない。	表 2、表 3 (p2 参照)を確認し、検出対象遺伝子の配列をご確認ください。 部分配列の挿入やコドンユースージが変更されている場合は検出できない場合があります。
	バリエーションの可能性が ある。	表 2、表 3 (p2 参照)を確認し、検出対象バリエーションをご確認ください。
バンドが重なり判別しにくい。	電気泳動の条件が悪い。	アガロースゲルの濃度を最適化するか、バンドの判別がしやすい標準プロトコールをお試しください。
	電気泳動へのアプライ量が多い。	PCR 反応液 2~3 μ l を用いて電気泳動解析することをお勧めします。多くアプライするとバンドが重なり判別しにくくなる場合があります。

*1 推奨量のテンプレートを用いて表2 (p2) の対象配列を増幅した際、サンプルとポジティブコントロールの増幅量が同程度になるようにControl templateのコピー数が調整されています。よって、ターゲット領域付近に微弱な増幅が認められるような場合は、非特異増幅である可能性が考えられます。そのような場合、内部標準(IC)の増幅強度なども考慮に入れて、総合的に判定してください。

全体的に増幅量が多い場合、微弱な非特異増幅が生じることがあります。その場合、サイクル数を30~35の間で調整することで非特異増幅を抑えることが可能です。

[8] 関連商品

品名	包装	Code No.
KOD FX Neo	200 反応	KFX-201

より詳細な情報は、弊社ウェブサイトをご覧ください

◆東洋紡ライフサイエンス事業部ウェブサイト◆

<http://lifescience.toyobo.co.jp/>



【製造・販売元】

ー納期・注文に関するお問い合わせー

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部（大阪）
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部（東京）
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目17番10号 住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

ー製品の内容・技術に関するお問い合わせー

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00（土、日、祝を除く）
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <http://lifescience.toyobo.co.jp/>