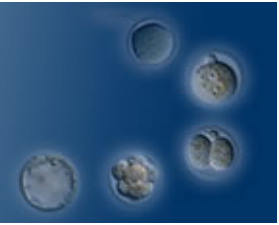


## **LARGE**

Laboratory for  
Animal Resources and  
Genetic Engineering  
RIKEN, Center for Developmental Biology



### **05. Control Vectorランダムインテグレーションの検出**

#### **1. 目的**

ES細胞へランダムインテグレーションによりControl Vectorの導入を行いES細胞内においてもPCR条件が上手く働くかを再度確認する。クルードな細胞抽出液により非特異的な増幅などが起こらないかを確認できる。

また、相同組換え体のスクリーニングのときPCRがかからないことは致命的であるので、実際に当施設のサーマルサイクラーでPCR条件が再現できるか確認することは重要である。

注) ES細胞へのエレクトロポレーション、ES細胞のピックアップまで当方で行いますので、ProK処理、PCR、電気泳動を行って頂きます。

#### **2. ランダムインテグレーション検出の実際**

##### **(1) 持参物**

Control Vector

必ずポジティブコントロールとしてControl Vectorを用意すること。ポジティブコントロールがないと上手く行かなかった場合に原因を探ることが困難となり、対応策がたてにくくなりますので、必ずお持ちください。

Primerなどの試薬

##### **(2) 提供可能なもの**

ProK、TAE、PBS、D.W、アガロース、ラダーマーカ―などの試薬類  
ピペットマン、チップ、泳動装置などの実験器具

##### **(3) スケジュール**

1) 当日11～12時までに細胞の準備が完了するので、それまでにCDB C棟3階変異マウス開発ユニットへお越し下さい。[http://www.cdb.riken.jp/jp/08\\_contact/0802\\_directions01.html](http://www.cdb.riken.jp/jp/08_contact/0802_directions01.html)

ES細胞は細胞の状態にもよるが、基本的には0.6mlチューブに1~20の番号が記載したものが2本ずつの計40本培地に入れた状態で用意される。全てのチューブをPBSで洗浄する。まずPCRを行うのは1~10の10本のみで、残りはペレットの状態でも凍保存する。

2) PBSで洗浄した後Pro K処理を行う。

1. ピックアップした後、10,000rpmで5min(4℃)遠心して培地を除く  
(細胞をすってしまうので、ぎりぎりまで除去せず、10ulほど残して問題ない)

細胞のペレットの確認

2. 冷PBS(-)を100ul加えて、即10,000rpmで5min遠心し、PBSを除く  
(細胞をすってしまうので、ぎりぎりまで除去せず、10ulほど残して問題ない)

細胞のペレットの確認

即PCRを行わないときは、ペレットの状態でも-20℃にて保存する

3. ペレットの細胞に40ulのDWを加えてる

4. Proteinase K(1mg/ml in DW)を10ul加えてる

5. 55℃ 60min

6. 95℃ 10min

7. ボルテックス後10,000rpmで5min遠心

8. 上清5ulをPCR(反応体積 25ul)に使用

3) PCR反応

必ずポジティブコントロールとしてControl Vectorを用いる。

4) 翌日、あるいは当日に電気泳動する。

5) 結果を翌日の午前中あるいは当日の場合は18時まで報告する。

10クローン中8クローン以上のポジティブを検出できれば相同組換え体のスクリーニングへ進んで頂きます。もし8クローン以下であれば、残りのサンプルを研究室に持ち帰り、再度行って頂きます(PCR条件が良くないのか、PCR反応を再現できないのかを判断するため)。結果についてディスカッションして方針を決めます。