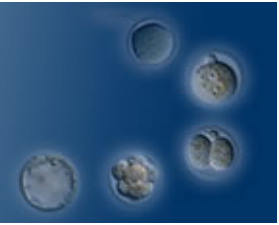


## LARGE

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



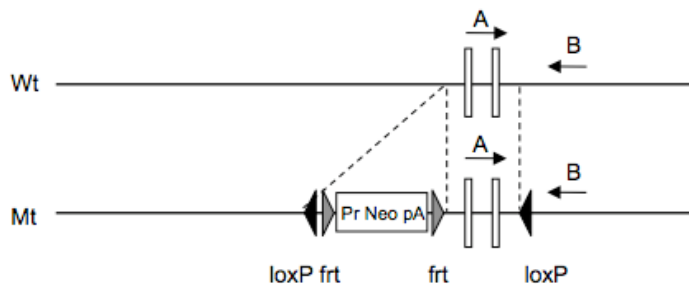
### 09. PCRによるloxP配列挿入の確認

Neoから離れたloxP配列は、loxPで挟む領域が長いほど挿入されないことが多く、long PCRでのスクリーニングのポジティブクローンに対して、PCRにより確認する必要がある。

実際には、conditional KOのコンストラクションは相同組換え効率が良く、long PCRの結果が出た後、直ちにPCRを行う必要があるため、long PCRを行う際にはloxPを確認するprimer等を用意しておく。

#### 1. 条件検討

##### 1) Primer設定(Conditional KOのloxP配列)



Wt：野生型

Mt：変異型

Primer A：Neoから離れたloxP配列よりも5'上流

Primer B：Neoから離れたloxP配列よりも3'下流

PCR産物のサイズはloxP配列とvector配列が100bpぐらいなので、その差が分離できる範囲のサイズにする。

loxP配列挿入の確認はES細胞のスクリーニングの際もPCRで行っているが、ES細胞の段階では、WtのES細胞が混ざることもあり、評価が難しいので、F1マウスで再度行う必要がある。

あるいは、Mtのみを検出するprimerを設定する。

## 2)PCR反応

Promega GoTaq DNA polymerase

	Final Conc.
2X GoTaq	1X
Primer A(50uM)	0.5uM
Primer B (50uM)	0.5uM
Primer C (50uM)	0.5uM
Targeting Vector	100fg/50ul
TT2 Genomic DNA	10~20ng/50ul
D.W	
Total Vol	25ul

1: 96°C 2min

2: 96°C 30sec

3: X°C 30sec

4: 72°C 1min/kbp

5: 4°C

2~4を35サイクル