



Application

増幅が困難な糸状菌ゲノムDNA上の特定遺伝子のコロニーダイレクトPCR検出

製品名 KAPA3G Plant PCRキット

メーカー名 KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは 福島大学大学院 共生システム理工学研究科 杉森研究室 平野佳孝様、准教授 杉森大助様のご厚意により掲載させていただきました。

実験条件

糸状菌ゲノムDNA上の特定遺伝子について、糸状菌のコロニーダイレクトPCRでの検出を試みました。

■ PCR反応組成 (50μl反応)

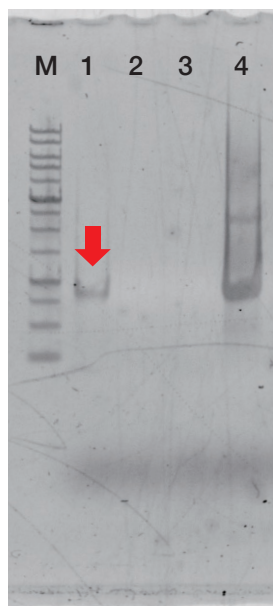
- KAPA Plant PCR buffer (1x)
- Forward Primer (0.3μM)
- Reverse Primer (0.3μM)
- KAPA3G Plant DNA Pol. (1U)
- DNA Template (≤10ng, or crude sample*)
- KAPA Plant PCR Enhancer (1x)

■ サイクルプログラム

- 95℃ 5min.
 - 95℃ 20sec.
 - 58℃ 15sec.
 - 72℃ 30sec.
 - 72℃ 30sec.
 - 4℃ ∞
- } 30サイクル

*プレート上に生育した糸状菌コロニーを滅菌チップで採取し、PCR反応液に直接添加

結果



- M : マーカー
 1 : 糸状菌コロニーサンプル
 2 : ネガティブコントロール*
 *糸状菌コロニーサンプル (センスプライマーのみ添加)
 3 : ネガティブコントロール*
 *糸状菌コロニーサンプル (アンチセンスプライマーのみ添加)
 4 : ポジティブコントロール
 (目的遺伝子が導入された精製プラスミドを鋳型として使用)

— 約800bp

以前、他社ポリメラーゼを用いて糸状菌菌糸からのダイレクトPCRを試みましたが、その時は特異的な増幅は見られませんでした。

その後、精製ゲノムに対して細かなPCR条件（アニーリング温度、ステップ数、サイクル数）の検討を行ったことで、ようやく目的バンド（800 bp）の増幅に成功しました。（データ未掲載）

今回、KAPA3G Plant PCRキットを用い、糸状菌コロニーからのダイレクトPCRで、特に条件の検討（グラジエントPCR等）を行うことなく目的のバンドの増幅に成功しました（左の画像、レーン1）。



お客様のコメント

真核生物の遺伝子をターゲットにするのが初めてで、増幅しにくいゲノムでした。

また、ゲノムDNA精製等々の面で苦労していましたため、KAPA3G Plant PCRキットによるコロニーダイレクトPCR検出を試してみました。

Enhancerを添加したために反応液組成を調製するのが多少面倒でしたが、クールドサンプルに対してもエラーを出さずに正確な増幅が確認できました。

増幅配列をシーケンシングしたところ、配列のGC含量は52.2%と、そう高くない配列ではありましたが、配列中にはポリA配列を含むイントロンも存在し、遺伝子が分断された状態でした。

このような複雑な配列でもKAPA3G Plant PCRキットによるダイレクトPCRで増幅できていたものと思われ

ます。