



Application

ダイレクトPCRによるペチュニア分離集団のジェノタイピング

製品名

KAPA3G Plant PCR キット (KK7252)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 細胞間情報学研究室 (高山研究室) 久保健一様のご厚意により掲載させていただきました。

方法

● ゲノムDNAテンプレートの調製

- ① ペチュニア種子を、1/2濃度のMS塩を含む固形培地に無菌播種
- ② 播種後1週間でほぼ全ての芽生えの子葉が展開する。展開した子葉を1枚ずつ採集、8連PCRチューブに1枚ずつ集める。
- ③ DNA溶出バッファー (100mM Tris-HCl (pH8.0), 1M KCl, 10mM EDTA) 100μlを加え、ピペットの先端で子葉片を押しつぶす。
子葉組織から気泡を押し出す感覚で押しつぶし、組織をバラバラに壊さないことがコツ。
- ④ 95℃, 5 min インキュベートする。
- ⑤ 軽く遠心し、上清の一部をTEバッファーで10倍希釈する。

● 反応組成

⑤ の希釈DNA溶液	1.0 μl
2×KAPA Plant Buffer	2.5 μl
10 μM Forward Primer	0.15 μl
10 μM Reverse Primer	0.15 μl
KAPA3G Plant DNA Polymerase	0.05 μl
100×KAPA Plant PCR enhancer	0.01 μl
DW	1.14 μl
Total	5.0 μl*

● プログラム

95℃	5 min	} ×40サイクル
95℃	20 sec	
54℃	15 sec	
72℃	30 sec	
72℃	2 min	

● 解析

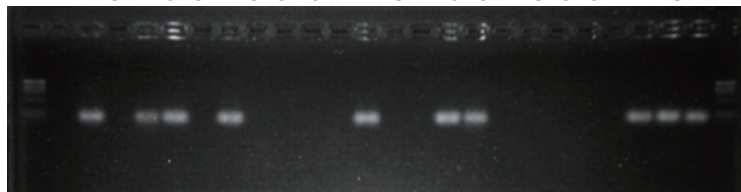
PCRプロダクト全量を用い電気泳動する。

*KAPA3G Plant PCR Kitのプロトコルでは、阻害物質の影響を軽減するため、反応量は50μlから検証を始めることを推奨しております。
結果に応じて反応量を減らすことが可能です。

結果

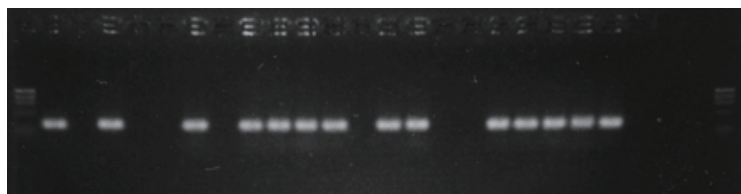
KAPA3G Plant PCRキットによるPCR結果 (対立遺伝子ABヘテロ接合体の次世代分離集団のジェノタイピングの一例)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



— 対立遺伝子A (210 bp)

対立遺伝子A (210bp) および対立遺伝子B (359bp) において、1 ~ 24の全てのサンプルでどちらか一方のバンドのみ増幅がみられた。



— 対立遺伝子B (359 bp)

結果として、KAPA3G Plant PCRキットでは、各個体で安定して特異的に増幅が見られ、対立遺伝子を持つ個体と持たない個体の区別がはっきりでき、遺伝子型が容易に特定できた。

マーカー : φX174 HaeIII

lane 1-24 : 芽生え子葉由来PCR産物

電気泳動条件: 1x TAEバッファー, 1.5 %アガロースゲル, 100V, 15 min. 反応液全量 (5μl) をアプライ



お客様のコメント

ナス科植物ペチュニアの芽生え96個体の子葉からゲノムDNAテンプレートを調製し、PCRによってジェノタイピングを行った。複数遺伝子の遺伝的連鎖を観察するため、多検体に対して複数のプライマーセットで増幅を行い、安定な結果を得る必要があり、そのためのテンプレート調製方法や反応ボリュームの最適化を行った。本法で作製したテンプレートを用い、1ヶ月以上安定な増幅が可能であったので、多数の遺伝子の連鎖を解析することができた。これまで他社キットでは安定に増幅しなかったが、KAPA3G Plant PCR キットでは、プライマーペアの間で増幅にばらつきが小さく、安定していて使いやすい。