



Application

ヒト爪からのKAPA3G Plant PCR Kitを用いたダイレクトPCRの事例

製品カテゴリ

PCR酵素

製品名

KAPA3G Plant PCR Kit

(Cat.No. KK7251 (250回用), KK7252 (500回用), 08041091001 (1000回用))

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS

下記のデータは、東京医科大学 生化学 森谷 昇太様のご厚意により掲載させていただきました。

実験概要

クルードなサンプルから抽出を行わずに、ダイレクトにPCRを行うことは、手順の簡便化にもつながり、非常に有用な手段です。しかし、クルードなサンプルは、PCR阻害物質を含むことが多く、アプリケーションとしての難易度は高くなります。阻害物質への耐性が非常に高いKAPA3G Plant PCR Kitにてクルードかつ微量なヒト爪サンプルにて、ダイレクトPCRが行えるかを検証しました。
*本PCR酵素は、植物など、PCR阻害物質（ポリフェノールや多糖類など）を大量に含むサンプル用に開発された酵素です。

PCR条件

<サンプル>

- ダイレクト
- アルカリ抽出
- カラム精製

ダイレクトPCRはヒト爪を米粒 1/3 程度、アルカリ抽出とカラム精製はヒト爪を米粒程度を使用した。

※アルカリ処理は危険を伴うので、安全ゴーグルを着用して操作を行うこと。

ダイレクト PCR

KAPA3G Plant Kit 条件

● 反応試薬

2X KAPA Plant PCR Buffer	25.0 μL
10 μM Forward Primer	1.5 μL
10 μM Reverse Primer	1.5 μL
KAPA3G Plant DNA Polymerase	0.4 μL
H ₂ O	21.6 μL
Total	50.0 μL

● PCR 条件

95°C	5分
95°C	20秒
55°C	15秒
72°C	60秒
72°C	5分
16°C	hold

×40サイクル

ヒト ALDH2 遺伝子 564 bp
F : AGACTTTGGGGCAATACAGGG
R : AAATGACCGCATAGGCCTGAT

以上の反応液にヒト爪（米粒 1/3 程度の大きさ）を加えた

他社 クルードサンプル対応酵素 条件

● 反応試薬

2X PCR Buffer	25.0 μL
2 mM dNTPs	10.0 μL
10 μM Forward Primer	1.5 μL
10 μM Reverse Primer	1.5 μL
他社酵素	1.0 μL
H ₂ O	29.0 μL
Total	50.0 μL

● PCR 条件

94°C	5分
98°C	10秒
55°C	30秒
68°C	60秒
68°C	5分
16°C	hold

×40サイクル

← サイクル数をKAPA3G Plant PCR Kit と揃えた。

プライマーはKAPA3G Plant PCR Kitで使用したヒトALDH2 遺伝子と共通
以上の反応液にヒト爪（米粒 1/3 程度の大きさ）を加えた。

アルカリ抽出・カラム精製

抽出操作をどの程度省略できるかを確認するために、ダイレクトPCRに加えて、下記の抽出条件でも検証を行った。

反応試薬に抽出液0.5 μLを加える分、H₂Oの量を0.5 μL減らし、Total 液量を50.0 μLとした。

その他の条件は、ダイレクトPCRの条件と同様

■ アルカリ抽出（粗抽出）

ヒト爪（米粒程度）

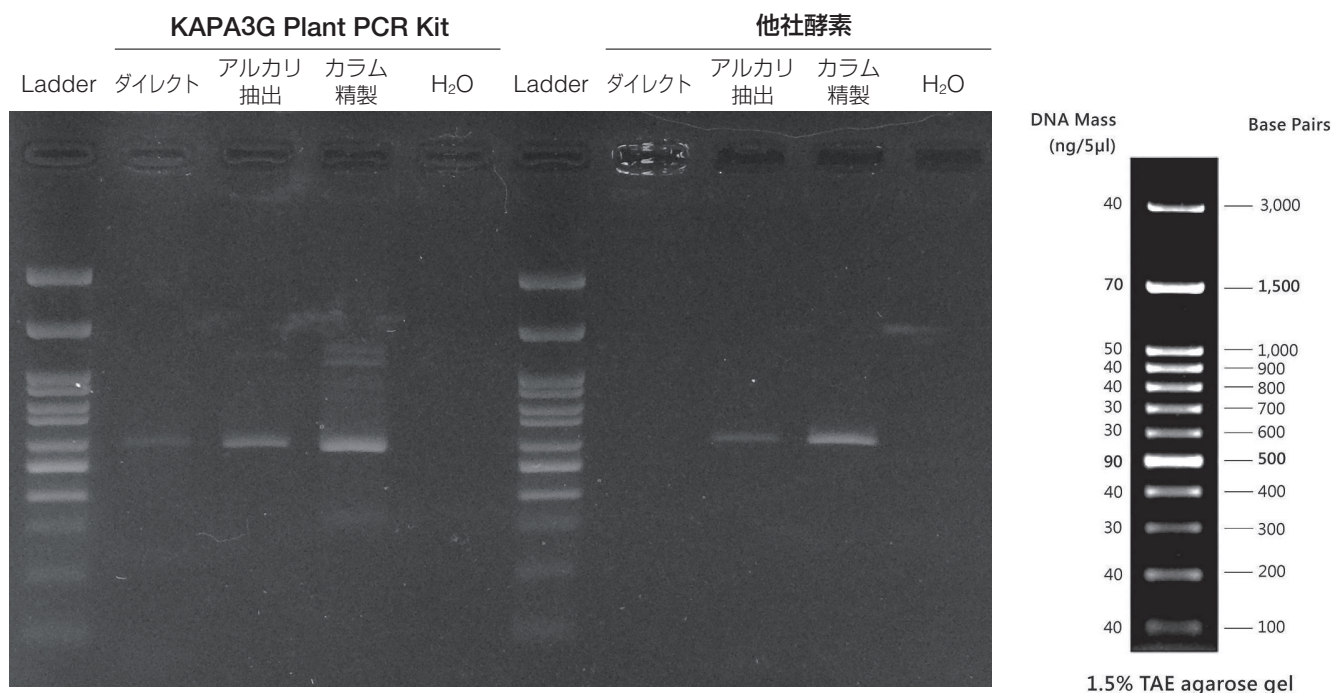
- ← 50 mM NaOH 180 μLを加え、Vortexにて良く攪拌した。
- 95°C 10 min インキュベート
- ← 1 M Tris-HCL (pH8.0) 20 μLを加え、Vortexにて良く攪拌した。
- ↓ 12,000 rpm 5 min

上清0.5 μLをPCRに使用した。

■ カラム精製（キアゲンカラム処理）

QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit (Cat.No. 69581) を用いてヒト爪（米粒程度）から抽出を行った。
得られたgDNA溶液0.5 μLをPCRに使用した。

結果



KAPA3G Plant PCR Kit を用いた場合、ダイレクト PCR で確認することができた。

*Ladder : FastGene™ DNA Ladder (NE-MWD100P)

● まとめ

KAPA3G Plant PCR Kitにて、ヒト爪からのダイレクトPCRを行った結果、増幅を確認することができた。

また、他社PCR酵素と比較試験を行った結果、KAPA3G Plant PCR Kitのほうが増幅効率が良い可能性が示唆された。

学生実習で、口腔内粘膜細胞をサンプルとしたPCR実習を行っています。

(アプリケーションノート2018 <11> PCR法によるアルデヒド脱水素酵素のSNP解析 参照)

しかしながら、新型コロナウイルス感染症の蔓延により、口腔内粘膜以外(感染リスクの低い検体)をサンプルとしたテーマを検討する必要性が生じました。

そこで、予備実験として、クールなサンプルの増幅に定評がある日本ジェネティクスさんのKAPA3G Plant PCR Kitを試してみたところ驚くべきことに、爪から直接、PCR増幅することに成功しました。

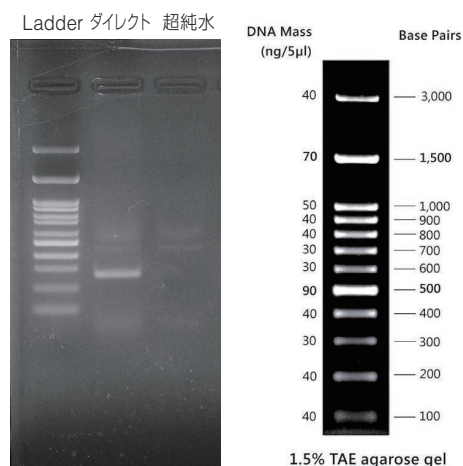
「Plant (植物)」という商品名ですが、実験動物のジェノタイピングなどにも幅広く活用できる可能性を感じました。

ダイレクトPCRに興味がある方は一度試されてみてはいかがでしょうか。



お客様のコメント

補足：ヒト爪からのダイレクトPCRの再現性の確認



*Ladder : FastGene™ DNA Ladder (NE-MWD100P)

ヒト爪からのダイレクトPCRの再現性を確認するために、 β -globin遺伝子の増幅を試みた。

● 反応試薬

2X KAPA Plant PCR Buffer	25.0 μ l
10 μ M Forward Primer	1.5 μ l
10 μ M Reverse Primer	1.5 μ l
KAPA3G Plant DNA Polymerase	0.4 μ l
H ₂ O	21.6 μ l
Total	50.0 μl

以上の反応液にヒト爪(米粒 1/3 程度の大きさ)を加えた。

 β -globin

F : 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'

R : 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3' 268bp

● PCR 条件

95 $^{\circ}$ C	5分	} ×40 サイクル
95 $^{\circ}$ C	20秒	
55 $^{\circ}$ C	15秒	
72 $^{\circ}$ C	60秒	
72 $^{\circ}$ C	5分	
16 $^{\circ}$ C	hold	

β -globin遺伝子についても増幅が認められた。

このため、本ダイレクトPCR法について、再現性が得られた。