

製品 KOD FX を用いた実施例

KOD FXを用いた麹菌 *Aspergillus oryzae* の遺伝子破壊の確認

データご提供 白鶴酒造株式会社 研究開発室 山下伸雄様

※本実施例は、第61回 日本生物工学会大会(2009)にて発表されたものです。

麹菌の遺伝子破壊を行った際の確認は、従来、DNAの抽出を伴った煩雑なものであった。今回、KOD FXを用い、麹菌の分生胞子を溶液中で加熱しただけのサンプルを用いて増幅を行い遺伝子型の判定を行った。

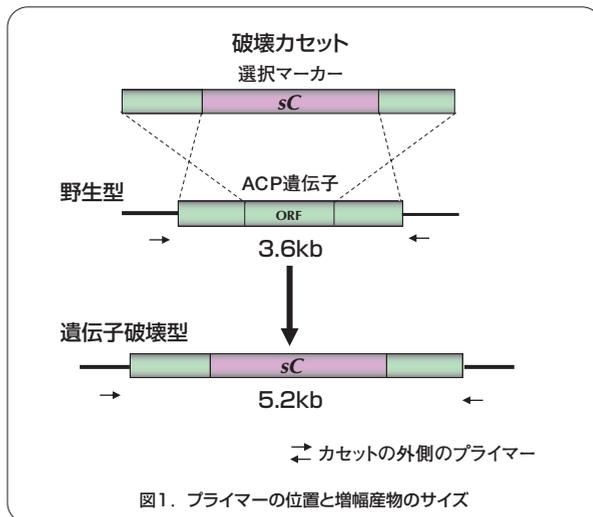
実験方法

サンプル 麹菌の遺伝子破壊候補株の分生胞子

- サンプルの処理**
- ① 胞子を微量かぎとりBuffer* (50 μ l) に懸濁
*Buffer: 100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 1 M KCl, 10 mM EDTA
 - ② 95°C 10分 → Vortex → 上清1 μ l / 50 μ l PCR反応液

遺伝子名 推定酸性カルボキシペプチダーゼ (ACP) 遺伝子

ターゲット長 3.6~5.2 kb



結果

遺伝子破壊株を明瞭に判定でき、酵素活性が低下していたことから遺伝子の機能を特定できた。

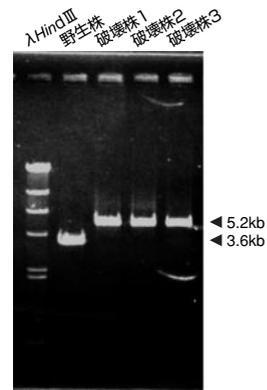


図2. 麹菌を用いて行ったPCRの電気泳動結果

お客様からのコメント

従来、麹菌等、糸状菌はコロニーPCRが困難で、遺伝子破壊株を判定する際、ゲノムDNAを抽出精製する必要があったが本製品を用いることで、その作業が不要となり、容易に多検体のクローンの遺伝子型を調べることが可能になった。

反応液組成	滅菌水	10 (μ l)
	2x PCR Buffer for KOD FX	25
	2mM dNTPs	10 (final 0.4 μ M)
	10pmol / μ l Primer F	1.5 (final 0.3 μ M)
	10pmol / μ l Primer R	1.5 (final 0.3 μ M)
	KOD FX (1.0U/ μ l)	1 (1U)
	前処理サンプル溶液	1
	Total	50 μl

サイクル 94°C, 2 min.
↓
98°C, 10 sec. ←
68°C, 5 min. ← } 35 cycles