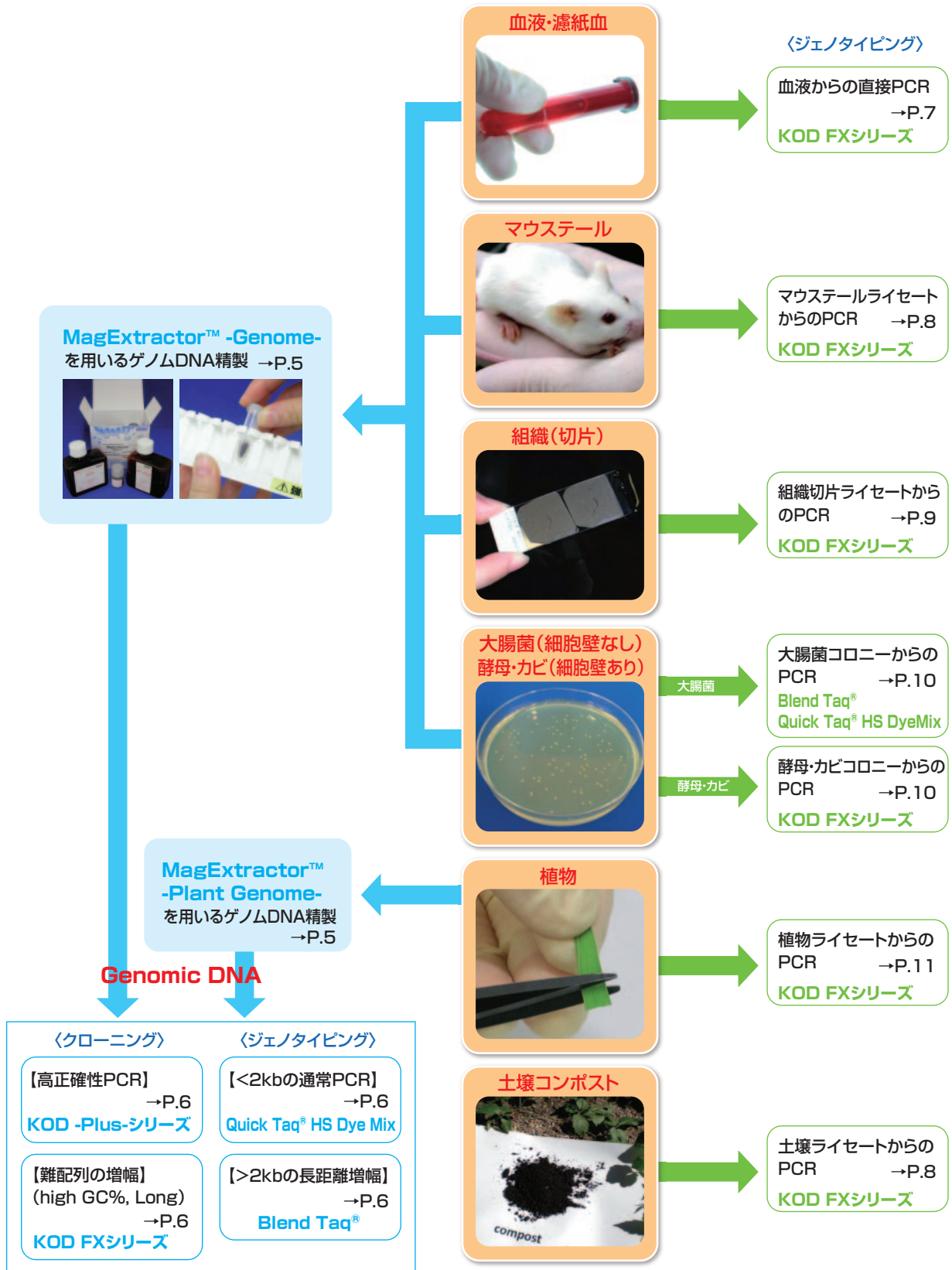


材料別 用途別 PCRプロトコール

近年、実験材料・用途の多様化に伴い、簡便かつ効率的なPCRのための様々なプロトコールが考案されてきました。本特集では、材料別・用途別にプロトコールを整理し、分かりやすく解説いたします。



使用商品一覧

MagExtractor™ -Genome-



磁性ビーズを用いるDNA抽出キットです。全血や動物組織、微生物などから高純度のゲノムDNAを抽出することができ、抽出したDNAは主にPCRに使用することができます。

【用途】全血・動物・微生物サンプルからのゲノムDNA精製

MagExtractor™ -Plant Genome-

磁性ビーズを用いるDNA抽出キットです。植物組織は多糖を多く含みますが、本キットは多糖の混入を抑え、様々な材料から高純度なゲノムDNAを抽出することができます。

【用途】植物サンプルからのゲノムDNA精製

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
MagExtractor™ -Genome-	100回用	4℃	NPK-101	¥28,000
MagExtractor™ -Plant Genome-	100回用	4℃、室温	NPK-501	¥28,000
磁性スタンド Magical Trapper	1個	室温	MGS-101	¥38,000

※抽出は遠心法でも可能ですが、磁性スタンドを用いるとより簡便に行うことができます。

KOD -Plus-シリーズ



KOD DNA Polymeraseをもとに開発された高正確性PCR酵素です。Taqポリメラーゼの約80倍の正確性を示し、クローニング等の用途にご使用いただけます。KOD -Plus- Neoは伸長エンハンサーを含み、高速PCR、及び最長24kbまでの増幅が可能です。ホットスタートに対応します。

【用途】高正確性PCR

KOD FXシリーズ



KOD DNA Polymeraseをもとに開発された高成功率PCR酵素です。1) 難配列の増幅 (高G/C%, Long)、2) クールドサンプルからの増幅、3) 細胞壁を有する微生物 (酵母、カビ) からのコロニーPCRに力を発揮します。

KOD FX Neoは伸長エンハンサーを含み、高速PCR、及び最長40kbまでの増幅が可能です。正確性はTaqの約11倍であり、クローニング用としてもご使用いただけます。ホットスタートに対応します。

【用途】難配列PCR、クールドサンプルからのジェノタイプング、細胞壁を有する微生物からのコロニーPCR

Blend Taq®シリーズ



Taqポリメラーゼに微量の校正活性を有するポリメラーゼを混合することで、高効率、高感度を達成した高性能Taqです (混合型酵素)。最長で23kbまでの増幅が可能であり、その範囲で様々な用途に使用可能です。コロニーPCRにも最適です。Blend Taq® -Plus-はホットスタートに対応します。

【用途】一般的なPCR、Long PCR、コロニーPCR

Quick Taq® HS DyeMix



プレミックスTaqです。電気泳動用の色素を含んでおり、PCR後の溶液をそのまま電気泳動に供することができます。ホットスタートに対応します。

【用途】一般的なPCR、コロニーPCR

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
KOD -Plus-	200U×1本 (200回用)	-20℃	KOD-201	¥30,000
KOD -Plus- Ver.2	200U×1本 (200回用)	-20℃	KOD-211	¥30,000
KOD -Plus- Neo	200U×1本 (200回用)	-20℃	KOD-401	¥30,000
KOD FX	200U×1本 (200回用)	-20℃	KFX-101	¥35,000
KOD FX Neo	200U×1本 (200回用)	-20℃	KFX-201	¥35,000
Blend Taq®	250U×1本 (200回用)	-20℃	BTQ-101	¥19,000
Blend Taq® -Plus-	250U×1本 (200回用)	-20℃	BTQ-201	¥21,000
Quick Taq® HS DyeMix	100回用	-20℃	DTM-101	¥9,800

※複数本組のお得なパックもございます。詳しくは、総合カタログやウェブサイトをご参照ください。

様々なサンプルからのゲノムDNA抽出

MagExtractor™シリーズは様々なサンプルから高効率かつ迅速にゲノムDNAを精製することができます。
ここでは、動物、微生物、及び植物からの抽出方法をご紹介します。

プロトコールA 様々な動物・微生物・全血サンプルからのゲノムDNA精製

【準備するもの】

- ・試薬 MagExtractor™ -Genome- (Code No. NPK-101)
70% エタノール 滅菌水
- ・器具 *Magical Trapper* (Code No. MGS-101) :
磁性スタンド
- ・材料 動物組織、酵母、血液(全血)

【前処理】

A) 溶解・吸着液によりサンプルを溶解する方法

- 組織片(10mg以下)または
マウステール(2~5mm程度)
- ↓ ← 850 μ l 溶解・吸着液
- ↓ ホモジナイズ(マイクロチューブ用ホモジナイザーを
使用して十分に行う)
- ↓ 遠心分離(10,000rpm., 5min.)
- 上清(約850 μ l)

B) Proteinase K消化によりサンプルを溶解する方法

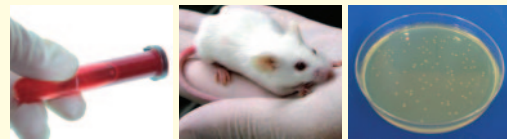
- 組織片(10mg以下)または
マウステール(2~5mm程度)
- ↓ ← 90 μ l Proteinase K buffer (100mM NaCl,
10mM Tris-HCl (pH8.0), 25mM EDTA)
- ↓ ← 5 μ l 10mg/ml Proteinase K (30U/mg)
- ↓ ← 5 μ l 10% SDS
- ↓ 55 $^{\circ}$ C, 6~18hr. 加温
(途中、2・3回混合し、消化を十分に行う)
- ↓ 遠心分離(10,000rpm., 5min.)
- 上清(約100 μ l)

- 酵母 (YPD培地で培養後に集菌したもの1~80.D相当)
- ↓ ← 100 μ l の10mg/ml Zymolyase 20T/Sorbitol溶液*
- ↓ ← 0.5 μ l の2-Mercaptoethanol
- ↓ 37 $^{\circ}$ C, 1hr. 加温
- 全量(約100 μ l)

*Sorbitol溶液:
0.9M Sorbitol
0.1M Tris-HCl(pH8.0)
0.1M EDTA

【DNA抽出】

- 前処理サンプル A) (850 μ l)、B)、酵母または全血(100 μ l)
- ↓ 1.5mlチューブに分注
- ↓ ← 溶解・吸着液(前処理サンプルB)、酵母または
全血の場合のみ: 750 μ l)
- ↓ ← 40 μ l 磁性ビーズ(転倒攪拌して均一混和したもの)
- ↓ 10min. 攪拌
- ↓ 磁性スタンドで上清を除去
- ↓ ← 900 μ l 洗浄液 ← 2回行う
- ↓ 5sec. 攪拌
- ↓ 磁性スタンドで上清を除去 ← 2回行う
- ↓ ← 900 μ l 70%エタノール ← 2回行う
- ↓ 5sec. 攪拌
- ↓ 磁性スタンドで上清を除去
- ↓ ← 100 μ l 滅菌水
- ↓ 10min. 攪拌
- ↓ 磁性スタンドでビーズを除去
- 上清(精製DNA溶液)



プロトコールB 様々な植物サンプルからのゲノムDNA精製

【準備するもの】

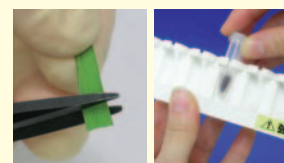
- ・試薬 MagExtractor™ -Plant Genome- (Code No. NPK-501)
70%エタノール 滅菌水
クロロホルム/イソアミルアルコール
- ・器具 *Magical Trapper* (Code No. MGS-101) :
磁性スタンド
- ・材料 植物組織

【前処理】

- 植物サンプル0.01~0.1g
- 液体窒素の存在下でパウダー状に粉碎
- ↓ 1.5ml のチューブにサンプルを移す
- ↓ ← 300 μ l 溶解液
- ↓ ボルテックスミキサーを使用して10sec. 激しく攪拌
- ↓ 65 $^{\circ}$ C, 10min. 加温
- ↓ ← 300 μ l クロロホルム/イソアミルアルコール
- ↓ 3~5sec. 激しく上下に振って混合
- ↓ 遠心分離(12,000rpm., 1min.)
- 上清(約250 μ l)

【DNA抽出】

- 前処理サンプル(約250 μ l)
- ↓ 1.5ml チューブに分注
- ↓ ← 40 μ l 磁性ビーズ(転倒攪拌して均一混和したもの)
- ↓ 1min. 激しく混合
- ↓ 磁性スタンドで上清を除去
- ↓ ← 900 μ l 洗浄液 ← 2回行う
- ↓ 5sec. 激しく混合
- ↓ 磁性スタンドで上清を除去 ← 2回行う
- ↓ ← 900 μ l 70%エタノール ← 2回行う
- ↓ 5sec. 激しく混合
- ↓ 磁性スタンドで上清を除去
- ↓ ← 100 μ l TE buffer
- ↓ 1min. 激しく混合
- ↓ 磁性スタンドでビーズを除去
- 上清(精製DNA溶液)



精製DNAからの増幅におけるPCR基本条件

精製したDNAを用いるPCRは大きく分けて、「クローニング用」と「検出・ジェノタイピング用」に分けることができます。ここでは、4種類のPCR試薬を用いる増幅をご紹介します。

KOD -Plus- Neo

(クローニング用)

滅菌蒸留水	X <μl>	
10XPCR Buffer	5	
2mM dNTPs	5	
25mM MgSO ₄	3	
10pmol/μl プライマー 各0.75-1.5		
KOD -Plus- Neo (1U/μl)	1	Genomic DNA ~200ng/50μl Plasmid DNA ~50ng/50μl cDNA ~200ng/50μl
テンプレート	Y	
	50μl	

*プライマーのTm値が63℃以下の場合は、3ステップで行います。

KOD Neoシリーズサイクル条件*

<2ステップサイクル>

94℃	2 min.	
98℃	10 sec.	25~45 cycles
68℃	0.5 min./kb	

<3ステップサイクル>

94℃	2 min.	
98℃	10 sec.	25~45 cycles
(Tm)℃	30 sec.	
68℃	0.5 min./kb	

<ステップダウンサイクル>

94℃	2min.	
98℃	10sec.	5cycles
74℃	0.5min./kb	
98℃	10sec.	5cycles
72℃	0.5min./kb	
98℃	10sec.	5cycles
70℃	0.5min./kb	
98℃	10sec.	15~30 cycles
68℃	0.5min./kb	
68℃	7min.	

*2ステップサイクルで増幅がみられない場合は3ステップサイクルをお試しください。また、エキストラバンドあるいはスメアが認められた場合はステップダウンサイクルをお試しください。

KOD FX Neo

(クローニング・検出・ジェノタイピング用)

滅菌蒸留水	X <μl>	
2XPCR Buffer	25	
2mM dNTPs	10	
10pmol/μl プライマー 各0.75-1.5		
KOD FX Neo (1U/μl)	1	Genomic DNA ~200ng/50μl Plasmid DNA ~50ng/50μl cDNA ~200ng/50μl
テンプレート	Y	
	50μl	

*プライマーのTm値が68℃未満の場合は、3ステップで行います。

Target Clone™ -Plus-

KOD -Plus-シリーズ、KOD FXシリーズで増幅したPCR産物の末端は平滑化されています。高効率TAクローニングキット「Target Clone™ -Plus-」には、増幅産物の末端にdAを付加するための試薬が添付されており、KODシリーズのPCR産物を高効率でTAクローニングすることができます。

<A付加反応>

PCR産物	9 <μl>
10XA-attachment Mix	1
	10μl

↓
60℃, 10min

<ライゲーション>

滅菌蒸留水	(3-X) <μl>
2XLigation buffer	5
pTA2 Vector	1
上記処理済みPCR産物	X
T4 DNA Ligase	1
	10μl

↓
室温 (15~25℃) 30min

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
Target Clone™ -Plus-	10回用	-20℃	TAK-201	¥16,000

Blend Taq®

(検出・ジェノタイピング用)

滅菌蒸留水	X <μl>	
10XPCR Buffer	5	
2 mM dNTPs	5	
10pmol/μl プライマー 各1		
Blend Taq® (2.5U/μl)	0.5	Genomic DNA ~1,000ng/50μl Plasmid DNA ~50ng/50μl
テンプレート	Y	
	50μl	

*プライマーのTm値が73℃未満の場合は、3ステップで行います。

<2ステップサイクル>

94℃	2min.	
94℃	30sec.	30 cycles
68℃	1min./kb	

<3ステップサイクル>

94℃	2min.	
94℃	30sec.	30 cycles
(Tm-5)℃	30sec.	
72℃	1min./kb	

Quick Taq® HS DyeMix

(検出・ジェノタイピング用)

滅菌蒸留水	X <μl>	
2xQuick Taq® HS DyeMix	25	
10pmol/μl プライマー 各1		
テンプレート	Y	Genomic DNA ~200ng/50μl Plasmid DNA ~50ng/50μl
	50μl	

*プライマーのTm値が73℃未満の場合は、3ステップで行います。

<2ステップサイクル>

94℃	2min.	
94℃	30sec.	25~40 cycles
68℃	1min./kb	

<3ステップサイクル>

94℃	2min.	
94℃	30sec.	25~40 cycles
(Tm-5)℃	30sec.	
68℃	1min./kb	

血液からの直接PCR

KOD FXシリーズは、血液に含まれるヘムや抗凝固剤に含まれるヘパリンなどの多糖の阻害を受けにくいという性質を有しています。ここでは、KOD FXを用いる全血、及び濾紙にしみこませた血液（濾紙血）を用いて直接増幅する方法をご紹介します。

全血サンプルからの増幅例

EDTA採血管によって採血したヒト全血（1～4μl）をサンプルとして、1.3kbのβ-globin遺伝子の増幅を行いました。

【準備するもの】

- ・試薬 KOD FXもしくはKOD FX Neo
- ・材料 ヒト血液（EDTA採血、ヘパリン採血など）

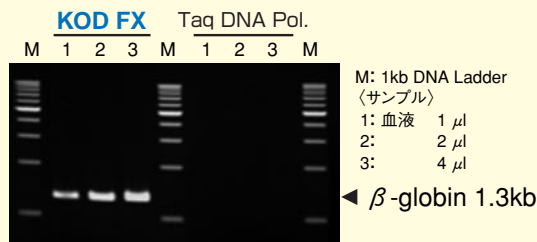
【反応液組成】

滅菌蒸留水	7～10 <μl>
2x PCR buffer for KOD FX	25
2mM dNTPs	10
10pmol /μl Primer F	1.5
10pmol /μl Primer R	1.5
KOD FX (1.0U/μl)	1
血液	1～4
Total	50μl

【サイクル条件】

94°C	2 min.	} 30 cycles
98°C	10 sec.	
68°C	1 min.	

【結果】



【プライマー配列】

1.3 kb β-globin Target
Forward primer : 5' -TTAGGCCTTAGCGGGCTTAGAC-3'
Reverse primer : 5' -CCAGGATTTTGTATGGGACACG-3'

【考察】

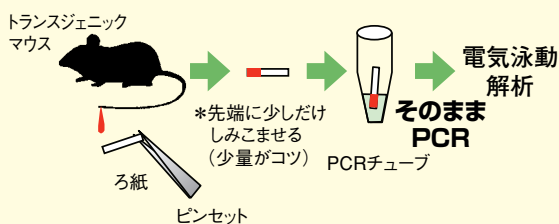
Taq DNA Polymeraseでは全く増幅が確認できませんでしたが、KOD FXでは血液量にほぼ比例して増幅産物の増加が見られました。これは、KOD FXが血液中の夾雑物によるPCR阻害をほとんど受けていないことが示唆されます。

濾紙血を用いる方法

【準備するもの】

- ・試薬 KOD FXもしくはKOD FX Neo
- ・材料 マウス等の血液

【前処理】



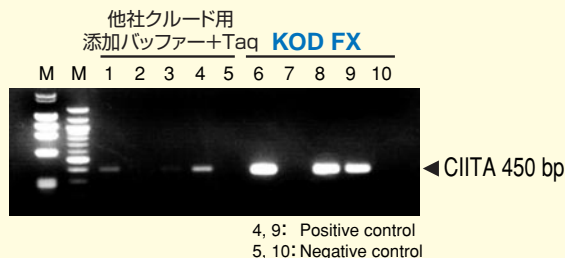
【反応液組成】

滅菌蒸留水	11 <μl>
2x PCR buffer for KOD FX	25
2mM dNTPs	10
10pmol /μl Primer F	1.5
10pmol /μl Primer R	1.5
KOD FX (1.0U/μl)	1
Total	50μl

【サイクル条件】

94°C	2 min.	} 30 cycles
98°C	10 sec.	
60°C	30 sec.	
72°C	40 sec.	
72°C	7 min.	

【結果】



【考察】

クルードサンプル用添加バッファーを加えたTaq DNA Polymeraseでは、弱い増幅しか得られませんでした。KOD FXでは、良好な結果が得られました。

データご提供 名古屋市立大学 医科学研究科 細胞分子生物 金澤 智先生

魚ヒレを用いて直接PCRを行うことも可能です。詳細につきましては、弊社ウェブサイト掲載、KOD FXのユーザー様からの実施例27をご参照ください。

マウステールライセートからのPCR

KOD FX シリーズは、クールドサンプルに含まれる不純物の阻害を受けにくく、様々なライセートからの増幅に向きます。ここでは、最近盛んになったトランスジェニックマウスのマウステールライセートからのPCRを中心にご紹介いたします。

【準備するもの】

- ・試薬 KOD FXもしくはKOD FX Neo
- ・材料 マウステール

【サイクル条件】

94°C 2 min.
98°C 10 sec. ←
68°C 2.5 min. } 30 cycles

【前処理】

アルカリ溶解法



【ターゲット】

Mouse membrane glycoprotein (Thy-1) gene<M10246>

【結果】

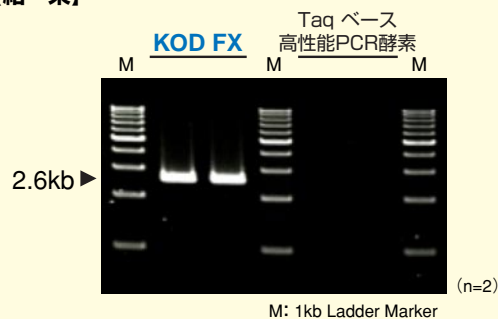


図1. マウステールライセートを用いたPCRの結果

【反応液組成】

●PCR	
滅菌蒸留水	10.5 μl
2x PCR Buffer for KOD FX	25
2mM dNTPs	10
10pmol/ μl Primer F	1.5
10pmol/ μl Primer R	1.5
KOD FX (1U/ μl)	1
ライセート(アルカリ溶解法)	0.5 μl (最大2 μl)
Total	50 μl

※PCR産物の制限酵素処理

PCR産物	10 μl
制限酵素	1 μl (約10U)
Total	11 μl → 37°C, 60 min

【プライマー配列】

Primer F: 5' -CCACAGAATCCAAGTCGGAAGTCTTG-3'
Primer R: 5' -GTAGCAGTGGTGGTATTATACATGGTG-3'

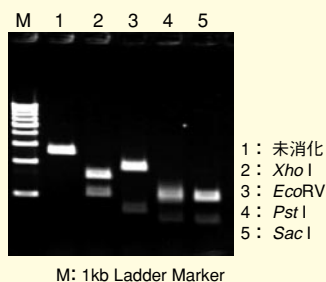


図2. PCR産物の制限酵素消化結果

【考察】

KOD FXはマウステール中の夾雑物の影響をほとんど受けないことが分かります。明瞭な増幅が認められ、また、PCR産物の制限酵素での消化も、今回用いた酵素では良好でした。アルカリ溶解法は、Proteinase Kを用いる方法よりも手間が少ないため、本方法を行うことにより、より簡便にトランスジェニックマウスの遺伝子解析ができるものと思われま

アルカリ溶解法を用いて、昆虫やコンポストでPCRを行なうこともできます。詳細につきましては、弊社ウェブサイト掲載のKOD FXのユーザー様からの実施例19やKOD FX Neoの実施例7をご参照ください。

ホルマリン固定組織（組織切片ライセート）からのPCR

【準備するもの】

- ・試薬 KOD FXもしくはKOD FX Neo
- ・材料 ホルマリン固定パラフィン包埋材料(ヒト)
(今回使用した切片は厚さ約10 μ mで、
大きさは1cm \times 2cm程度)



【反応液組成】

滅菌蒸留水	3.6 (μ l)
2x PCR buffer for KOD FX	10
2mM dNTPs	4
10pmol/ μ l Primer F	0.5
10pmol/ μ l Primer R	0.5
KOD FX (1.0U/ μ l)	0.4
精製DNA ①またはライセート ②	1 *
Total	20 μ l

*20 μ lのPCR反応系に対しては、①は100ng
②は1 μ lの添加を目安とします。

【前処理】

- 5~10 μ mパラフィン包埋切片を1.5mlチューブに移す
- ↓
- 脱パラフィン
キシレンを入れ5分放置後遠心してキシレンを除去
(3回繰り返す)
- ↓
- 脱キシレン
100%エタノールを入れ5分放置してエタノールを除去
(4回繰り返す)
- ↓
- エタノールを除いた後、70 $^{\circ}$ C・5分でエタノールを完全に除去
- ↓
- 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 300 μ lを加えた後、
Proteinase K(10mg/ml)を10 μ l加え、
37 $^{\circ}$ Cで一晩放置
- ↓
- 加熱処理 (70 $^{\circ}$ C、10 min)
⇒ そのままPCR用サンプルとして使用②
- ↓
- カラム精製(シリカメンブレンを用いたスピナカラムタイプを使用)
⇒ DNA鑄型として使用①

※本実験では、10mM Tris-HCl (pH 8.0)を300 μ l添加していますが、サンプル量に応じて50~300 μ lを使用します。Proteinase Kはその量に応じて、増減させてください。

※切片が大きいたときは、bufferを加えた後、眼科用のはさみで1mm以下になるぐらいまで細かく切ってからProteinase Kを添加します。

※37 $^{\circ}$ Cで一晩おいて未消化の組織が多いときは、さらに5~10 μ l Proteinase Kを加えて2~3時間消化します。

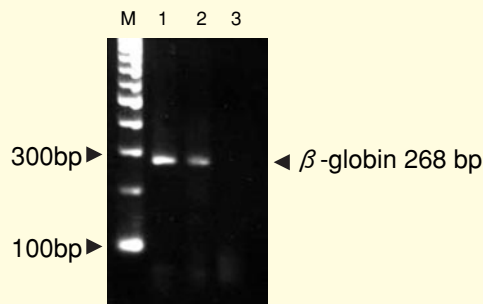
※組織の細胞密度や種類によって消化の具合はかなり変化します。線維組織はProteinase Kで消化されないため、筋肉や膜などが多い組織は完全には溶解しません。

【サイクル条件】

94 $^{\circ}$ C	15 min*	
↓		
98 $^{\circ}$ C	10 sec.	} 38 cycles
57 $^{\circ}$ C	30 sec.	
68 $^{\circ}$ C	30 sec.	

*ホルマリン固定組織から得られたDNAの増幅では、最初の変性ステップを7~15分程度に設定することで良好な結果を得ることができるようです。

【結果】



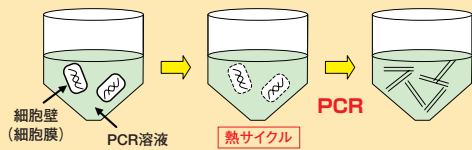
M: 100bp DNA Ladder
1: Proteinase K処理後、カラム精製したDNA①
2: Proteinase K処理後、70 $^{\circ}$ C10分処理した
クールドサンプル②
3: 滅菌蒸留水
(アプライ量:2 μ l / Lane)

【考察】

他社のポリメラーゼを用いた場合は、精製DNAを用いても増幅できない検体が多かったが、KOD FXを用いることで精製DNAおよび、Proteinase K処理後のパラフィン包埋材料のライセートから高効率にPCR産物を得ることができた。

データご提供 福岡大学 医学部 病理学講座 石黒 晶子先生、竹下 盛重先生、福重 智子先生

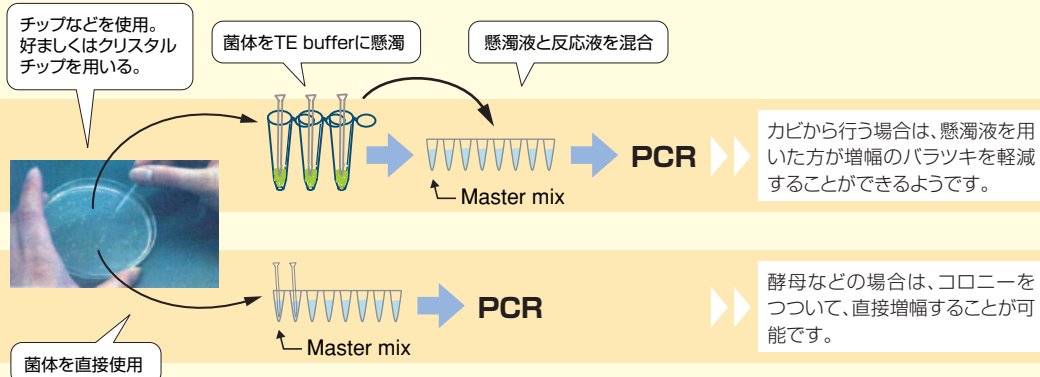
細胞壁を有する微生物（酵母・カビコロニー）からのPCR



解説

大腸菌などのグラム陰性菌からの直接PCRはプラスミドのインサート確認などで頻繁に行われますが、酵母やカビなどをサンプルとする場合、細胞壁が存在するため、通常、酵素処理が行われます。KOD FXシリーズは、バッファーに特別な技術を使用しており、熱サイクル中に細胞壁を効率よく破壊するため、多くの微生物を直接サンプルとしてPCRを行うことができます。

微生物からの直接PCR



【準備するもの】

- ・試薬 KOD FXもしくはKOD FX Neo
- ・材料 カビ、酵母

【前処理】

サンプルがカビの場合は、菌体をチップでつついてTE bufferに懸濁します。

【反応液組成（懸濁液を使用する場合）】

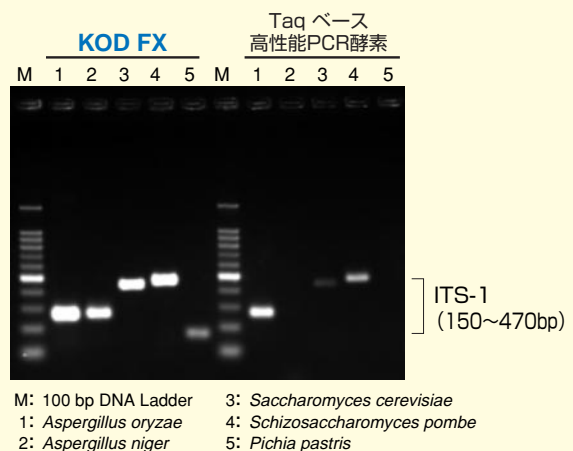
滅菌蒸留水	7 (μl)
2x PCR Buffer for KOD FX	25
2mM dNTPs	10
10pmol/μl Forward Primer	1
10pmol/μl Reverse Primer	1
KOD FX (1U/μl)	1
菌懸濁液*	5
Total	50 μl

*コロニーから直接行う場合はこの分だけ滅菌蒸留水を増やします。

【サイクル】

94°C	2 min.	} 30 cycles
98°C	10 sec.	
55°C	30 min.	
68°C	1 min.	

【結果】



【プライマー配列】

Primer F: 5'-GTAACAAGGT (T/C) TCCGT-3'
Primer R: 5'-CGTTCCTT CATCGATC-3'

【考察】

KOD FXではカビ、酵母各種において、ターゲットが良好に増幅され、酵素処理を行わなくても、直接高効率検出が可能であることが確認できました。

大腸菌のような細胞壁を持たない微生物をサンプルとして用いる場合は、KOD FXシリーズの他にBlend Taq®、QuickTaq® HS DyeMixでも同様にColony Direct PCRを行っていただくことが可能です。

植物ライセートからのPCR

KOD FXシリーズは、植物に含まれるクロロフィルや多糖などの成分の阻害を受けにくいという特長があります。ここでは、植物ライセートを用いるPCRをご紹介します。

【準備するもの】

- ・試薬 KOD FXもしくはKOD FX Neo
- ・材料 トマト葉、タバコ葉、イネ葉、精米

【前処理】

ワンステップ法またはホモジナイズ法

ワンステップ法



① 葉 (3mm角) 精米 (1粒) をマイクロチューブへ投入する。

② 葉と精米をマイクロチューブへ投入する。

③ Buffer A 100μlを添加し、Vortexにて良く攪拌する。
Buffer A: 100mM Tris-HCl (pH9.5), 1M KCl, 10mM EDTA

④ 95°C・10 min. Vortexにて良く攪拌する。

⑤ 上清1 μlをPCR反応液に添加 (植物組織は完全には溶解しません)。左:葉 右:精米

参考文献: *Bio Techniques*, 19: 394 (1995)

ホモジナイズ法



① 葉 (3mm角) をマイクロチューブへ投入する。

② 葉をマイクロチューブへ投入する。

③ Buffer A 100μlを添加し、Vortexにて良く攪拌する。
Buffer A: 100mM Tris-HCl (pH9.5), 1M KCl, 10mM EDTA

④ ベッセルを用いてホモジナイズする。

⑤ 上清1 μlをPCR反応液に添加する。

【反応液組成】

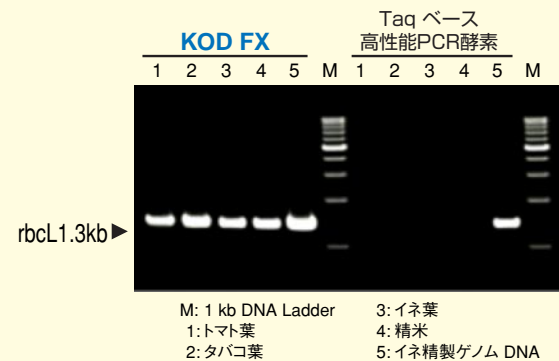
●PCR	
滅菌蒸留水	10 (μl)
2x PCR Buffer for KOD FX	25
2mM dNTPs	10
10pmol/μl Primer F	1.5
10pmol/μl Primer R	1.5
KOD FX (1U/μl)	1
ライセート (ワンステップ法)	1
Total	50 μl

【サイクル条件】

94°C	2 min.	} 30 cycles
98°C	10 sec.	
68°C	1.5 min.	

【結果】

本方法を用いることで、トマト、タバコ、イネの葉、及び精米のライセートをサンプルとして、明瞭な増幅が認められました。



【プライマー配列】

Primer F1: 5'-ATGTCACCACAAAACAGAGACTAAAGC-3'
(トマト&タバコ用)

Primer R1: 5'-AAGCAGCAGCTAGTTCCGGGCTCCA-3'
(トマト&タバコ用)

Primer F2: 5'-ATGTCACCACAAAACAGAAACTAAAGC-3'
(イネ用)

Primer R2: 5'-AAGCTGCGGCTAGTTCAGGACTCCA-3'
(イネ用)

【考察】

KOD FXは植物由来の阻害物質の影響を受けにくいことがわかりました。ワンステップ法 (もしくはホモジナイズ法) とKOD FXを組み合わせることで、植物の遺伝子解析を簡便化できると思われまます。

※ワンステップ法でPCRがかからない場合でも、ホモジナイズ法で結果が得られる場合があります。詳細につきましては、弊社ウェブサイト掲載のKOD FXのユーザー様からの実施例26をご参照ください。