

製品 KOD FX を用いた実施例

KOD FXを用いた植物葉からの迅速DNA増幅

データご提供 京都大学大学院 農学研究科 地域環境科学専攻 生物環境科学講座 森林生化学分野 坂本正弘先生

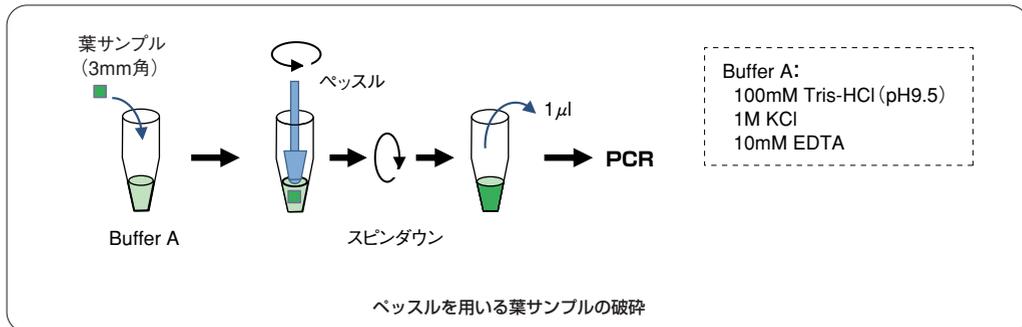
KOD FX実施例集に植物の前処理方法として記載されていた、95℃10分間の加熱によるワンステップ法では、目的とするDNAの増幅が見られませんでした。そこで、ペッスルを用いて葉を破碎する少量多サンプルからのDNA簡易抽出法と、その抽出液を用いる高効率PCRの検討を実験の目的としました。

※ワンステップ法: Buffer A(下記参照)中で葉を95℃, 10min.処理した後、その上清をPCRのサンプルとする方法です。(p.2ご参照)

実験方法

サンプル イネおよびタケ類の葉

サンプルの処理 抽出液は実施例集に記載されていたBuffer Aと同じです。実施例集に記載されていたように、植物の葉を約3mm角にハサミで切断し、マイクロチューブに入れ、これにBuffer Aを100μl加えました。ペッスルによってBufferが緑色になる程度まで葉を砕きました。その後、簡単にスピンドウンし、上清を1μl用いてPCR(50μl)を行いました。



遺伝子名 gibberellin 20-oxidase gene

ターゲット長 1686 bp

反応液組成	滅菌水	10 (μl)
	2x PCR Buffer for KOD FX	25
	2mM dNTPs	10 (final 0.4μM)
	10pmol / μl Primer F	1.5 (final 0.3μM)
	10pmol / μl Primer R	1.5 (final 0.3μM)
	KOD FX (1.0U/μl)	1 (1U)
	葉の破碎上清	1
	Total	50 μl

サイクル [3 Step cycle]

94℃	2 min.	35 cycles
98℃	10 sec.	
60℃	30 sec.	
68℃	1 min.	
68℃	7 min.	

[2 Step cycle]

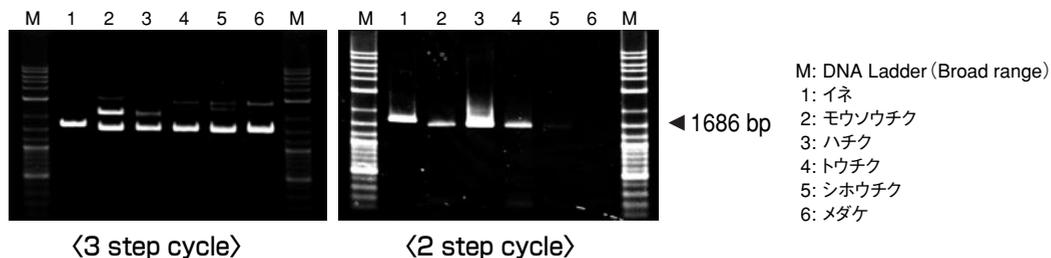
94℃	2 min.	35 cycles
98℃	10 sec.	
68℃	1 min.	
68℃	7 min.	

プライマー配列 Primer F: 5'-ATGCGGTGCAACTGCTACCC-3'

Primer R: 5'-TATACCTCCCGTTCGACAGC-3'

※イネの遺伝子のDNA配列を基に作成

結果



ベッスルで粉砕した方法では、いずれのサンプルにおいてもDNAの増幅が見られました。PCR反応を3ステップで行った場合（アニール温度60℃）と2ステップでおこなった場合を比較すると、2ステップでも増幅効率が若干落ちるもののDNAの増幅が見られました。

実施例集では葉緑体DNAからの増幅であり、コピー数が多いため加熱処理による方法でも増幅が可能であると思われましたが、ゲノムDNAからの増幅には適しませんでした。今回のベッスルによって粉砕した粗抽出液からは問題なくゲノムDNAからの増幅が行えました。また、実施例集にはプライマー長を長めに設定した方がよい、と記載されていましたが、今回は上述した20-merのプライマー長でもPCR反応が問題なく行えました。

先生からのコメント

従来、PCR反応の鑄型に使用するDNAは、サンプルを液体窒素によって粉砕し、その後に抽出処理を行わねばならず、操作が煩雑で時間もかかりました。そのため、多数のサンプルを調製するにはかなりの労力を強いられました。今回のベッスルによる粉砕法では1サンプルに要するのは、ほんの数秒であり、サンプル数が多くても簡単にPCRできる利点があります。PCRを行うだけであれば、今回の簡易抽出法によって得た抽出液を鑄型としてKOD FXによる反応で十分です。従来のDNAの抽出操作をすることを考えると時間と労力が大幅に節約できます。

今回のUSER'S NOTEにご紹介しました記事は「KOD FX」を用いたものですが、新商品「KOD FX Neo (p1)」にも充分応用できるものと考えられます。今後の、先生方の研究に広くお役立てください。

40%off
 ウィンターキャンペーン
 対象品

■期間：2010年11月25日～2011年3月31日（ご注文分）

高成功率PCR酵素 KOD FX



包装	Code No.	価格	キャンペーン価格
200U × 1本	KFX-101	¥35,000	¥21,000
(200U × 1本) × 5	KFX-101X5	¥140,000	対象外
(200U × 1本) × 10	KFX-101X10	¥260,000	対象外

KOD FXは、マウステールライセート、植物ライセート、血液など様々なクールドサンプルから直接、高効率なPCRを行うことができます。

実施例は弊社ウェブサイト (<http://www.toyobo.co.jp/bio>) KOD FXコーナーで公開しております。是非一度ご覧ください。