



Application

植物乾燥標本から抽出した増幅困難な葉緑体DNAのPCR

製品名

KAPA2GRobust HotStart ReadyMix with Dye (KK5706)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは、東京大学総合研究博物館 マクロ先端研究発信グループ 高山 浩司様のご厚意により掲載させて頂きました。

実験条件

植物乾燥標本から抽出したDNAは、安定的にPCR増幅することが困難で、DNAの断片化が進んでいるものと考えられました。そこで、KAPA2GRobust HotStart readyMix with dyeによるPCR増幅を試みました。

1) PCR comp.

2X KAPA	15 μ l
Primer 1	1.5 μ l
Primer 2	1.5 μ l
DNA*	5.0 μ l
MiliQ W	7.0 μ l
total	30.0 μ l

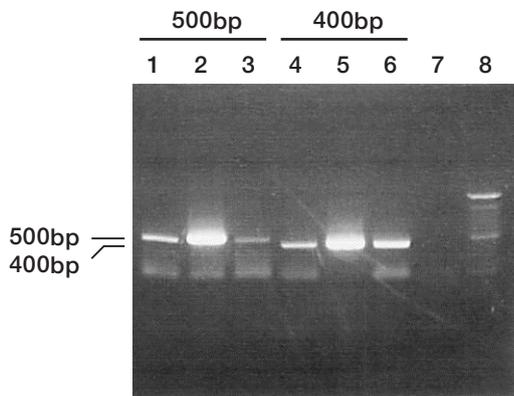
2) PCR inst. prog.

Bioer, GeneQ thermal cycler (TC-24H)	
a. 96°C	60sec
b. 96°C	15sec
c. 55°C	15sec
d. 72°C	15sec
e. 72°C	10sec

} 43 cycle

※いずれも10ng以下で断片化が進んでいる
(Qiagen社DNA Plant mini kitで精製)

結果



1. sample 1, primer trnLFC-trnLFd (expected 500 bp) 1 μ l
2. sample 2, primer trnLFC-trnLFd (expected 500 bp) 1 μ l
3. sample 3, primer trnLFC-trnLFd (expected 500 bp) 1 μ l
4. sample 1, primer trnLFe-trnLFf (expected 400 bp) 1 μ l
5. sample 2, primer trnLFe-trnLFf (expected 400 bp) 1 μ l
6. sample 3, primer trnLFe-trnLFf (expected 400 bp) 1 μ l
7. sample 4, ITS1-ITS5 (expected 600 bp)
8. 100bp DNA ladder (invitrogen) 0.1 μ g

1-6は葉緑体、7はリボソーマルDNAのITS領域です。

2, 5はT社でも増幅ができたのですが、他のサンプルはほぼ全くといって良いほど増幅が見られなかったものです。

サイクル数を増やしたためか、プライマーダイマーの様なものが見られました。このあと、フナコシ社の Gene clean kit を用いてゲルからの抽出を行い、ABI3100 で塩基を決定しました (7以外)。



お客様のコメント

T社と増幅の傾向はよく似ていたのですが、KAPA2GRobust HotStart readyMix with dyeの方が概して増幅率が良かったです。

以前、全く増幅が見られなかったサンプルの塩基配列を決定できたので、大変助かりました。