



Application

大腸菌コロニーPCRによるGFP遺伝子の迅速検出

製品名

KAPA2GFast Hotstart ReadyMix with dye (KK5610)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは、東京大学のお客様のご厚意により掲載させて頂きました。

実験条件

下記の条件のとおり、KAPA2GFast HotStart ReadyMix with dye を用いて、「GFP遺伝子を発現ベクターにクローニングし、コロニーPCRにより確認する」実験を実施しました。

本実験においては、学生実験の予備実験として「反応時間の短縮」、「学生が容易に試薬調製できること（簡便性）」、「安全な検出系が適用できること（安全性）」について、検証しました。

1) 使用した PCR 試薬と PCR 反応組成

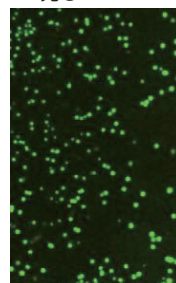
KK5610 : KAPA2G Fast HotStart ReadyMix with dye

| | |
|-----------------|------|
| 滅菌水 | 23μl |
| primer F (50μM) | 1μl |
| primer R (50μM) | 1μl |
| 2×PCR マスターミックス | 25μl |
| 計 | 50μl |

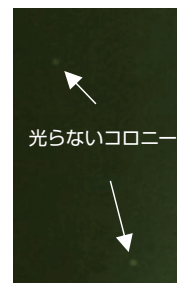
上記の溶液を10 μlずつ0.2mlチューブ4本に分注しました。

↓
LED照射により光るコロニーと光らないコロニー（右図）をチップで触り、付着した微量の大腸菌を上記反応液に入れました。

光るコロニー



+GFP



-GFP

2) PCR 装置、PCR プログラム、増幅サイズ

● PCR 装置 : Applied Biosystems GeneAmp PCR system 2700

● 増幅サイズ : 約 700 bp

今回のプロトコール

(参考) 従来のプロトコール*

| | |
|------------------|-------------|
| 94℃ 5min | } 30 cycles |
| 95℃ 5sec | |
| 55℃ 15 sec | |
| 72℃ 5 sec | |
| (total 約 50 min) | |

| | |
|------------------|-------------|
| 94℃ 5min | } 30 cycles |
| 94℃ 30 sec | |
| 55℃ 30 sec | |
| 72℃ 60 sec | |
| (total 約 90 min) | |

*市販の各種 PCR 試薬で確認済み

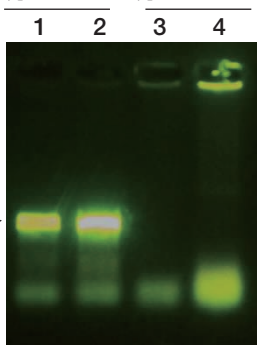
● PCR 時間 : 約 50 min (今回)、約 90 min (従来)

● 短縮時間 : 約 40 min

結果

電気泳動画像

光るコロニー 光らないコロニー



GFP遺伝子 →
(約700bp)

染色液 : GR Green loading buffer (LabSupply社)
LED検出 : Epi-Blue LED48 Aqua (リライオン社)
撮影 : DigiCapt DC-1200 (リライオン社)

LED照射により光る大腸菌でのみ、GFP遺伝子の増幅が見られました。



お客様のコメント

PCR反応時間を従来の約90分から約50分と、大幅に短縮できました。
とにかく速く、増幅効率が良いため、学生実習の実験計画が組みやすいです。
また、ReadyMixになっている点も、学生がミスなく実験できて好ましいです。
時間短縮性、作業性 (PreMix, Hot Start)、安全性などの点で学生実習に適していると思います。
研究室での実験にも使いたいと思います。