



Application

# 野生動物糞便抽出物をテンプレートとした 16S rRNA gene PCR

製品名

KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KK2601)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

以下のアプリケーションデータは 京都府立大学 動物機能学研究室 土田さやか様のご厚意により掲載させていただきました。

## 方法

野生動物の腸内細菌叢の網羅解析のため、野生動物の糞便からDNA抽出\*を行い、それら粗DNA溶液をテンプレートとし、16 S rRNA gene増幅を行った。市販のTaq ポリメラーゼを用いたが、増幅が見られない、もしくは弱い増幅しか見られなかったため、本製品によるPCRを試みた。

\*ビーズ破砕とプロテアーゼ処理をおこない、エタノール沈殿でDNAを回収

### ①PCR reaction mixture

〈KAPA〉

2×KAPA HiFi HotStart Ready Mix	12.5μl
Forward primer (10uM)	0.75μl
Reverse primer (10uM)	0.75μl
Templete DNA (<25ng)	1μl
dH2O	10μl
	25μl

〈他社製品〉

2×酵素 Ready Mix	12.5μl
Forward primer (10uM)	1μl
Reverse primer (10uM)	1μl
Templete DNA (<25ng)	1μl
dH2O	9.5μl
	25μl

### ②PCR condition

〈KAPA〉

95°C	3min	} ×30cycle
98°C	20sec	
55°C *	15sec	
72°C	15sec	
72°C	3min	
4°C	∞	

\* KAPA HiFi HotStart ReadyMixのプロトコルでは、アニーリング温度60℃以上を推奨しておりますが、今回は55℃で最適な結果が得られました。

〈他社製品〉

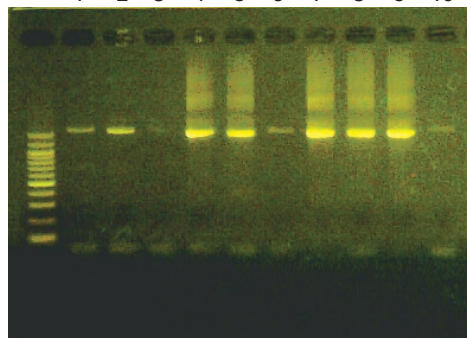
94°C	3min	} ×30cycle
94°C	30sec	
55°C	30sec	
72°C	90sec	
72°C	3min	
4°C	∞	

・ Thermal Cycler: BIO-RAD iCycler

## 結果

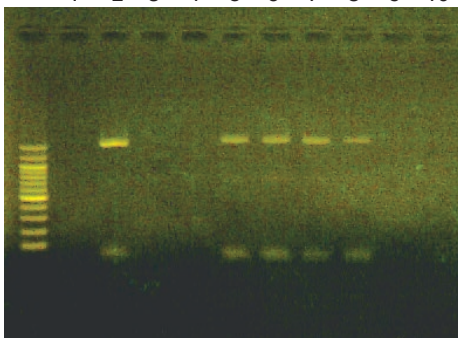
KAPA HiFi HotStart ReadyMix

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



他社製品

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



KAPA HiFi HotStart ReadyMixでは、10検体全てでバンドが確認できた。(レーン1～10)

一方、他社製品では同じ検体を用い、5検体でバンドが確認できなかった。(レーン1、3、4、9、10)

←約1600bp

ゲル : 1.2%TAEアガロース  
アプライ量 : PCR産物3μl/レーン

テンプレートは、糞便中のすべての細菌種由来のDNAが混在した状態のため、ターゲット領域のGC含量も、低い菌種や高い菌種が混在する。以前に他社製品を用い、アニーリング温度をおよそ50℃でPCRを行った結果では、GC含量の高い菌種は、クローニングやメタゲノム解析では検出できなかった。

可能であれば高いGC含量の菌種の分布を知りたいと考え、今回、KAPA HiFi HotStart ReadyMixを使った結果、増幅が確認でき、その後の解析に用いることが可能となった。



お客様のコメント

野生動物の糞便由来の粗DNA溶液は、フェノール類などの植物二次代謝産物が含まれていることが多く、PCR増幅の阻害となってしまう十分な増幅産物が得られなかったり、増幅しないということが多々ありました。アニーリング温度を下げるなどして対応してきましたが、GCリッチな配列等の増幅には、あまりアニーリング温度を下げることもできず困っておりました。本製品を使用させていただき、PCR阻害物質を含むサンプルに対しても、最適なアニーリング温度での増幅を確認することができました。