



Application

極地産試料から分離した菌類の遺伝子増幅

製品名

KAPATaq EXtra HotStart ReadyMix with dye (KK3606, KK3607)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは、国立極地研究所 辻 雅晴 様のご厚意により掲載させて頂きました。

背景

極地の生物は、長い年月をかけて生息困難な環境に適応してきました。この適応戦略の解明は、生物多様性の研究において非常に重要です。しかし、極地の生物が、どのような適応の遷移をしてきたのか、まだ多くの部分が解明されていません。極地に生息している菌類からの遺伝子増幅は難しく、多くのDNAポリメラーゼでは増幅させることが困難です。本アプリケーションではKAPATaq Extra キットを使用して、他社の高正確性酵素と比較しました。

方法

● サンプルの条件 純培養した菌体からISOPLANT II (ニッポンジーン) を用いてDNA を抽出

● PCR反応組成

〈KAPATaq EXtra HotStart ReadyMix with dye〉		〈TO社 高正確性酵素〉	
2×KAPATaq EXtra HotStart ReadyMix with dye	12.5 μL	TO社 高正確性酵素	0.5 μL
Primer F	1.25 μL	10×PCR Buffer	2.5 μL
Primer R	1.25 μL	2mM dNTPs	2.5 μL
Template	1.0 μL	25mM MgSO4	2.0 μL
Milli-Q water	9.0 μL	Primer F	0.75 μL
		Primer R	0.75 μL
		Template	1.0 μL
		Milli-Q water	15.0 μL
Total	25 μL	Total	25 μL

● PCR条件 PCR 装置 : eppendorf Mastercycler nexus

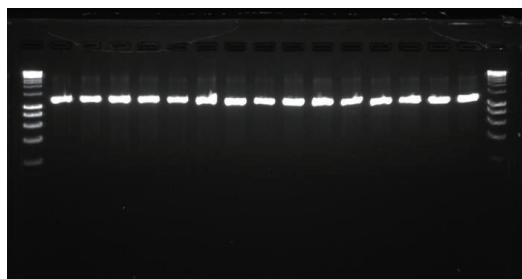
〈KAPATaq EXtra HotStart ReadyMix with dye〉		〈TO社 高正確性酵素〉	
95°C 3min	} × 35	94°C 2min	} × 35
95°C 15sec		98°C 10sec	
52°C 15sec		52°C 30sec	
72°C 60sec		68°C 90sec	
72°C 60sec		68°C 5min	
total 57min		total 83min	

● 泳動・撮影条件

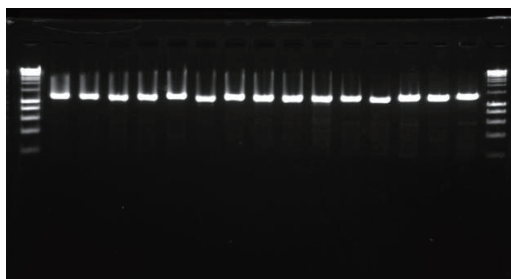
1.5%アガロースゲル
100V, 25min
マーカー : Hyper Ladder 1kb (Cat.No. BIO-33025)
核酸染色試薬 : Midori Green Direct (Cat.No. NE-MG06)
ゲル撮影装置 : FAS V

結果

〈KAPATaq EXtra HotStart ReadyMix with dye〉



〈TO社 高正確性酵素〉



← 約1200 bp

増幅領域 : ITS-26S rDNA D1/D2領域

極地に生息している菌類は極限環境下でも細胞の凍結を回避するため、細胞内にPCR阻害物質を蓄積している。ITS領域から26S rDNAのD1/D2領域にかけてKAPATaq EXtra HotStart ReadyMix with dyeで増幅を試みた結果、目的の約1200bp付近にバンドが確認できた。PCR産物はApplied Biosystems社の3130xl Genetic Analyzerで遺伝子配列を取得し、BLAST検索等により菌類の同定を行なった。



お客様のコメント

極地に生息している菌類は細胞内に大量の多糖類が含まれていることが多く、これまではTO社のDNAポリメラーゼ以外では極地産菌類の遺伝子の増幅は確認できませんでした。KAPATaq EXtra HotStart ReadyMix with dyeはPCR阻害物質である多糖類を含むDNAサンプルでも、TO社のDNAポリメラーゼと同等に増幅することが確認でき、またPCRの反応時間を短縮することができました。