



Application

青果物由来野生酵母の簡易同定 (ITS1領域PCR増幅)

製品名

KAPATaq EXtra HotStart ReadyMix with dye (KK3606, KK3607)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

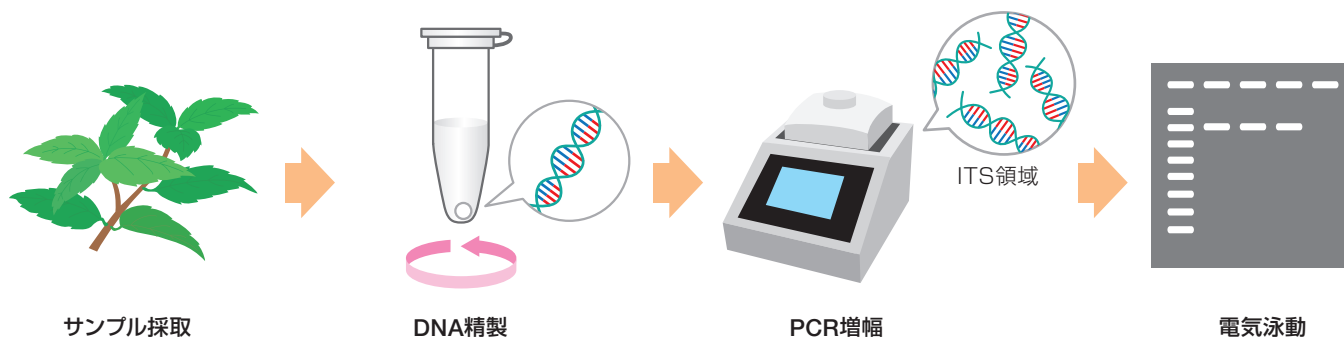
下記のデータは、文教大学健康栄養学部管理栄養学科 白須 由治 様のご厚意により掲載させていただきました。

研究内容紹介

野生酵母の簡易同定

醸造・発酵用途として野菜や果実などの植物に生息している野生酵母を収集している。主として食品に利用することを目的としているため酵母 (*Saccharomyces.cerevisiae*) を特異的にスクリーニングできる集積培養方法を工夫している。しかしながら、得られるコロニーには他属のものも含まれるため、簡易同定をPCRで推定する方法を検討している。大量の酵母サンプルをPCR増幅させる必要があり、KAPATaq Extra キットの経済性と凍結保存性に注目して試用したところ、有用な結果が得られたので本アプリケーションに記載した。

ワークフロー



方法

1. テンプレートDNAの準備

- D : ドライイースト (*S.cerevisiae*)
 - WY1 : 野生酵母 (野菜から採取)
 - WY2 : 野生酵母 (果実から採取)
 - D' : ドライイースト (*S.cerevisiae*) 熱アルカリ^注抽出したゲノムDNAをテンプレートにした
- } Genとるくん (TaKaRa) で精製したゲノムDNAをテンプレートにした

注) 酵母コロニー1白金耳を180 μ L の50mM 水酸化ナトリウム溶液に懸濁、沸騰水浴中10分間加熱溶菌した。
20 μ L の1MTris-HCl (pH8.0) を添加 12,000 rpm, 5min遠心上清1 μ Lをテンプレートとした。

2. 反応溶液の調製

- PCR酵素 : 2X KAPA Taq EXtra HotStart ReadyMix with dye
- Primer : ITS1F (GTA/ACA/AGG/TTT/CCG/T) 3pmole/ μ L
ITS1R (CGT/TCT/TCA/TCG/ATG) 3pmole/ μ L

〈反応組成〉

Sample/reagent	(μ L)
2X KAPA Taq EXtra HotStart ReadyMix with dye	12.5
ITS1 Primer F (15pmole)	5
ITS1 Primer R (15pmole)	5
テンプレート DNA	1
精製水	1.5
計	25

3. PCR反応

〈サイクルプログラム〉

Initial denaturation	94 $^{\circ}$ C	2 min	1cycle
Denaturation	94 $^{\circ}$ C	30 sec	} 30cycle
Annealing	55 $^{\circ}$ C	1 min	
Extension	68 $^{\circ}$ C	1 min	
Final extension	68 $^{\circ}$ C	1 min	1cycle

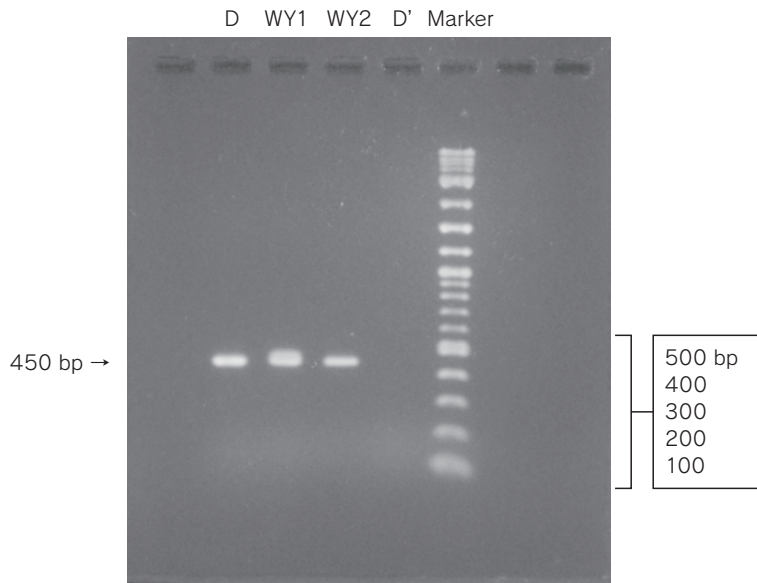
4. PCR産物の電気泳動

〈電気泳動条件〉

- 染色試薬: エチジウムブロマイド
- イルミネーター: UV
- アプライ量: 1レーン5 μ L使用
- 電気泳動バッファの種類: TBEバッファ
- 電気条件: 100V 40分間



結果



D : ドライイースト (*S.cerevisiae*)
WY1 : 野生酵母 (野菜から採取)
WY2 : 野生酵母 (果実から採取)
D' : ドライイースト (*S.cerevisiae*)

D, WY1, WY2では
450 bpにPCR増幅DNAを確認、いずれも*S.cerevisiae*と
考えられる。

なお、熱アルカリ抽出したテンプレートでダイレクトPCRを
試みたが、増幅できなかった (D')。
その後、熱アルカリ+フェノクロ処理を組み合わせることでテンプレ
ートDNAを調製したところ、PCR増幅が可能であった。
(データ未掲載)



お客様のコメント

PCR後のサンプルをローディングバッファー (色素入り) で希釈する必要がなく、そのままアガロースゲルに
アプライできる点が便利です。