



Application

バイサルファイト処理済みDNAからの安定的なPCR増幅

製品名

KAPA HiFi Hotstart Uracil+ ReadyMix (KK2801)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは、京都大学大学院・薬学研究科・医薬創成情報科学専攻システムケモセラピー・制御分子学分野 服部明准教授のご厚意により掲載させて頂きました。

実験条件

下記の細胞由来のバイサルファイト処理済みDNAサンプルでは、これまでなかなかPCRで増幅しませんでした。今回、KAPA HiFi Hotstart Uracil+ ReadyMixでバイサルファイト処理済みDNAから安定的に増幅が可能か、検討しました。

●比較評価した製品

- (1) A社製品 (Bisulfite処理DNAからのPCR増幅用)
- (2) KAPAHiFi HotStart Uracil+ ReadyMix

●サンプル

下記の細胞株から抽出したゲノムDNAをバイサルファイト処理した試料
Human Diploid Fibroblasts
Human Retinal Pigment Epithelial Cells

●増幅サイズ

651bp
Target Gene :
Human C7orf24/γ-glutamyl-cyclotransferase gene

●PCR 反応条件 (20μL 反応)

A社製品

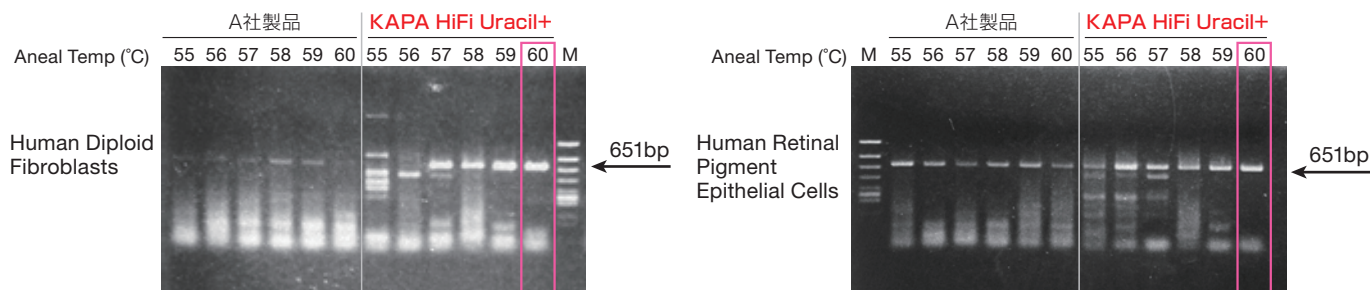
PCR 反応Buffer	x1	Denature	95°C	5min	} 40 cycles
MgCl ₂	2.5mM	PCR cycle	98°C	10sec	
dNTP	300μM		55°C*	30sec	
Primer (sense)	200nM		72°C	1min	
Primer (antisense)	200nM		72°C	2min	
Template	~30ng	※温度は 55°Cから 60°Cまで検討しました。 (推奨: 55°C)			
A社酵素	25U/mL				

KAPA HiFi Uracil+

HiFi Uracil+ Mix	x1	Denature	95°C	5min	} 40 cycles
Primer (sense)	300nM	PCR cycle	98°C	20sec	
Primer (antisense)	300nM		60°C*	15sec	
Template	~30ng		72°C	1min	
			72°C	2min	
				※温度は 55°Cから 60°Cまで検討しました。 (推奨: 60°C)	

結果

1. アニーリング温度の条件検討

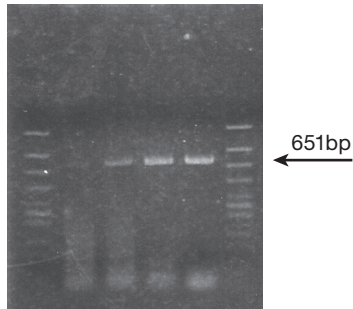


アニーリング温度条件を振って検討したところ、KAPAHiFi Uracil+ では、推奨プロトコールどおり、60°Cで最適な結果が得られました。

2. 推奨アニーリング温度条件での再現性の確認

A社製品 KAPA HiFi Uracil+

M F E F E M



M : DNA size Marker (φx174/Hinc II digested)
F : Human Diploid Fibroblasts
E : Human Retinal Pigment Epithelial Cells

推奨温度条件で再度比較評価したところ、KAPAHiFi Uracil+ は、特異性も高く、高収量で増幅できることが確認されました。

A社製品 : アニーリング温度 55°C
KAPA HiFi Uracil+ : アニーリング温度 60°C



お客様のコメント

プロトコール記載の条件にて増幅を行った結果、これまで増幅が困難であった試料から、目的のバンドが安定的かつ高収量で得られました。