



Application

ヒトのゲノムインプリンティングの解析における バイサルファイト処理済みゲノムDNAの効果的な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、慶應義塾大学医学部小児科学教室 山澤一樹 様のご厚意により掲載させて頂きました。

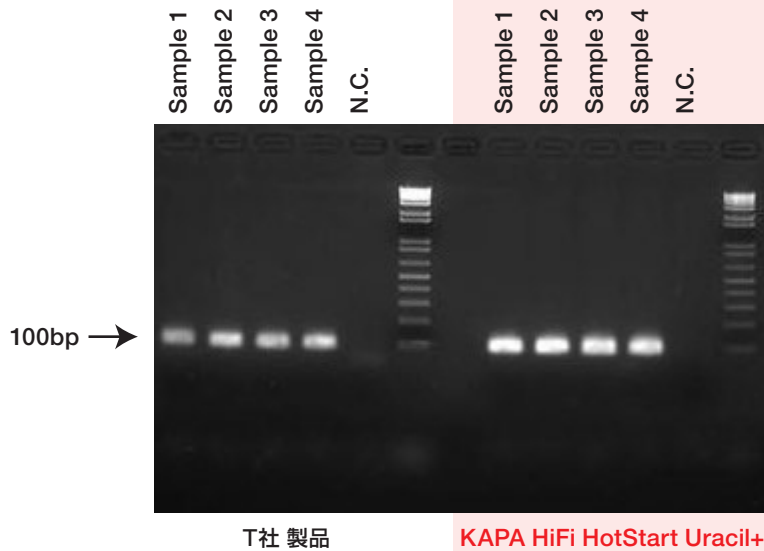
方法

ヒトメチル化可変領域におけるメチル化解析にあたり、ウラシルを含むバイサルファイト処理したサンプルを効果的に増幅するため、KAPA HiFi Hotstart Uracil+ ReadyMixを検討しました。

- サンプル: バィサルファイト処理済みヒト末梢血DNA
- PCR装置 : Bio-Rad S1000 Thermal Cycler
- 増幅サイズ : 100 bp

PCR試薬	T社 製品 (酵素ブレンド、ホットスタートタイプ)	KAPA HiFi HotStart Uracil+ ReadyMix	
PCR反応組成	DNA polymerase	0.2μl	KAPA HiFi HotStart Uracil+ ReadyMix 10μl Bisulfite template 0.8μl Primer (10 uM) Forward 0.2μl Primer (10 uM) Reverse 0.2μl Water 8.8μl 計 20μl
	Bisulfite template	0.8μl	
	10x Buffer	2μl	
	dNTP (2 mM)	2μl	
	Primer (10 uM) Forward	0.2μl	
	Primer (10 uM) Reverse	0.2μl	
	Water	14.6μl	
	計	20μl	
PCRプログラム	98°C 10s 60°C 30s 72°C 15s	40 サイクル	95°C 3min 98°C 20s 60°C 15s 72°C 15s 72°C 1min

結果



KAPA HiFi Hotstart Uracil+ ReadyMixでは、4サンプル全てでより効果的に増幅することが可能でした。

このことから、KAPA HiFi Hotstart Uracil+ ReadyMixでは、より少ないサイクル数でも十分に増幅できる可能性が示唆されました。この後、PCR産物をサブクローニング、シーケンスによりメチル化を定量します。PCRサイクル数を極力少なくすることで増幅バイアスを軽減できるため、KAPA HiFi Hotstart Uracil+ ReadyMixにより正確なメチル化解析が可能となることが期待されます。



お客様のコメント

メチル化解析にあたり、ウラシルを含むバイサルファイト処理したサンプルを効果的に増幅したかった。想像以上の効果でした。バイサルファイト処理DNA増幅のスタンダードとなり得ると思いました。

