



Application

HumanTGFR2 mutation analysisによる 正確性の検証

製品名

KAPA HiFi HotStart DNAポリメラーゼ

メーカー名

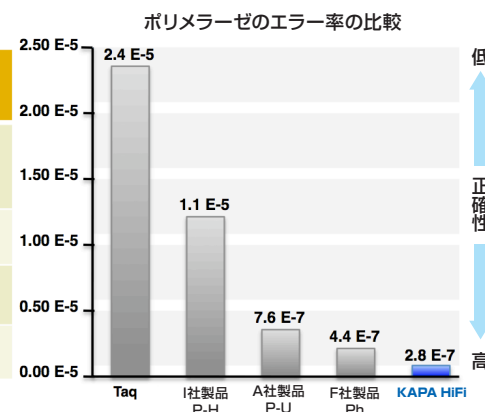
KAPA BIOSYSTEMS 社

はじめに

KAPA HiFi DNAポリメラーゼは、KapaBiosystems社が開発した全く新しいエンジニアPCR酵素で、1億種類以上の野生型DNAポリメラーゼ変異株から選抜され、卓越した正確性と増幅性能を併せ持っています。

次世代シーケンサー (Roche FLX) 解析データ

	KAPAHiFi™	I社製品P-H
酵素の種類	正確性が高いエンジニア酵素 単一製品	正確性が高い酵素と Taqポリメラーゼの混合製品
総シーケンス数 (塩基)	17,724,794	7,273,424
総シーケンス数/総エラー数 (塩基)	3,544,959	89,795
エラー率	2.82 E-07	1.11 E-05



*Data courtesy of Dr. Phillip Buckhaults, University of South Carolina

実際にこのような正確性が高いPCR酵素のエラー率を数値化するためには、「相当数のシーケンスを実施してエラー率を算出する」、「大腸菌にクローニングしてブルー/ホワイトコロニー選択によりエラー率を算出する」など、かなりの手間や時間が必要とされます。今回は「正確にPCR増幅することが困難な100bp程度の配列」を実際にPCR/シーケンス解析することで、実際にお客様の使い方に沿った方法で、KAPA HiFi DNAポリメラーゼの正確性を他社製品と比較しました。

今回実施したHuman TGFR2 mutation analysisでは、配列中にAが10連続するWildTypeと、Aが9連続するMutantを解析する必要がありますが、同一塩基が連続して存在することが原因となり、正確にPCR増幅することが困難となっています。この場合、PCR産物を用いたシーケンスにおいて、良好なシーケンス結果が得られなくなります。そこで、KAPA Biosystems社 KAPA HiFi HotStart DNAポリメラーゼを含め、様々な市販のPCR試薬を用いてこの配列をPCR増幅し、シーケンス解析によりどのPCR試薬が最も正確に増幅できたか検証しました。

方法

下記の参考文献に基づき、Human TGFR2 mutation analysisを実施しました。

- Markowitz S, Wang J, Myeroff L, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability, Science 1995;268:1336-1338.
- Yamashita S et al, Methylation Silencing of Transforming Growth Factor-β Receptor Type II in Rat Prostate Cancers, Cancer Res 68:2112-2121, 2008

<PCR>

●プライマー配列

Forward AAGCTCCCCTACCATGACT
Reverse TGCACTCATCAGAGCTACAG

●増幅サイズ

118bp

●PCR試薬

- 1 KAPA HiFi HotStart DNAポリメラーゼ
- 2 F社 製品Ph (ホットスタート仕様)
- 3 T社 製品Pr (ホットスタート仕様)
- 4 T社 製品Ko (ホットスタート仕様)
- 5 野生型Taq DNA Polymerase

●テンプレートDNA

配列情報が明らかな、以下の2種類のヒト前立腺癌由来細胞株から精製されたゲノムDNAテンプレートを用いました。

- (1) 22Rv1 (A9 / Mutant)
- (2) LNCaP (A10 / Wild)

●反応組成

各社の推奨条件どおり実施しました。

●サーマルサイクラー

Bioer社 LifePro (グラジエント機能付き)

●サイクルプログラム

各社の推奨条件どおり実施しました。
アニーリングの最適温度を決定するため、グラジエントPCRを実施しました。

<シーケンス>

シーケンス用テンプレートは、市販のキットを用いてPCR産物を精製し、調製しました。
2種類のテンプレート (22Rv1, LNCaP) に対し、Forward、Reverseそれぞれシーケンスしました。

●プライマー配列

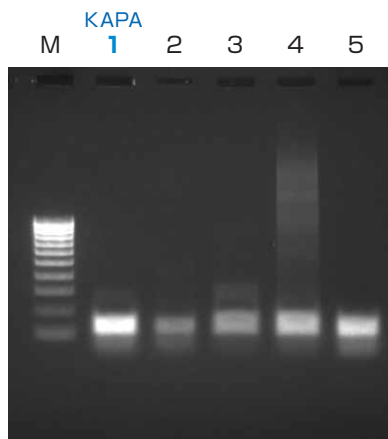
Forward CCCCTACCATGACTTTATTCT
Reverse TCATCAGAGCTACAGGAACAC

方法

<PCR>

それぞれのPCR試薬についてグラジエントPCRを実施し、非特異増幅が見られず、最も増幅効率が良い最適アニリング温度が決定されました。

その結果、全てのPCR試薬で、最適条件により良好なPCR結果が得られました。シーケンス用テンプレートには、それぞれの最適条件で実施したPCR産物を使用しました。



LNCaP (A10) のデータ

- 1 KAPA HiFi HotStart DNAポリメラーゼ
- 2 F社 製品Ph (ホットスタート仕様)
- 3 T社 製品Pr (ホットスタート仕様)
- 4 T社 製品Ko (ホットスタート仕様)
- 5 野生型Taq DNA Polymerase

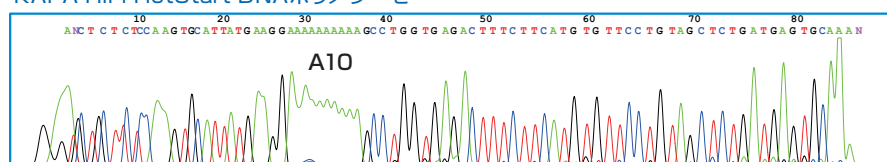
KapaHiFiHotStartで最も良好な増幅が見られました。

← 118bp

<シーケンス>

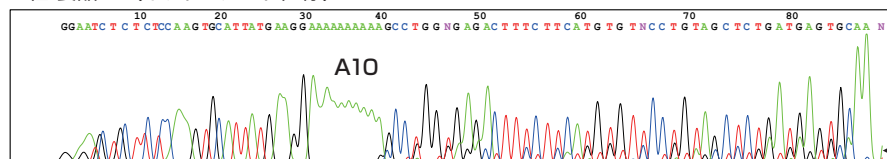
KAPA HiFi HotStart DNAポリメラーゼ

LNCaP (A10) のデータ

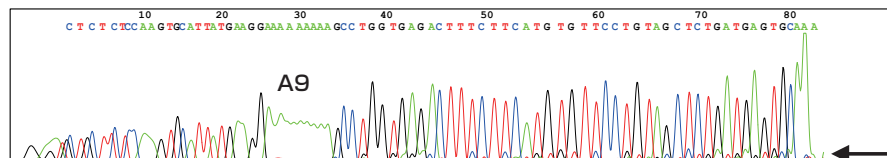


バックグラウンドが低く、非常に良好なシングルピークが得られました。また、A10の連続が確認されました。

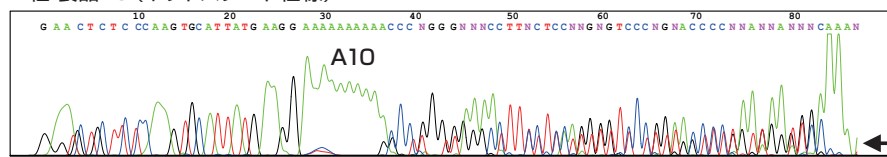
F社 製品Ph (ホットスタート仕様)



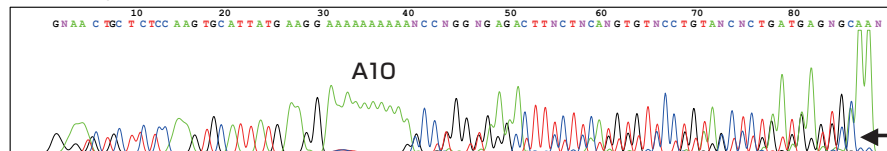
T社 製品Pr (ホットスタート仕様)



T社 製品Ko (ホットスタート仕様)



野生型Taq DNA Polymerase



Aが連続したところで、スリッピング（誤複製）が起り、その後のシーケンスデータのバックグラウンドが高くなっています。また、T社製品PrではAの連続が9となっています。

以上の結果から、KapaHiFiHotStartが最も良好なPCR増幅を示しました。

かつ、シーケンスでも、4条件：“テンプレート2種類×両鎖”とも、スリッピング（誤複製）が少なく、最も正確なシーケンスデータが得られました。（データはLNCaPのForward解析のみ掲載）

謝辞

今回の検証実験で実施したHuman TGFBR2 Mutation Analysisにおいて、独立行政法人国立がん研究センター研究所エビゲノム解析分野山下聡先生に数多くのご指導・ご助言を賜りました。ここに深く感謝申し上げます。