

## ルーチン・ハイフィデリティーPCR



## 長いDNAフラグメントのルーチン・ハイフィデリティー増幅を困難にしているのは、多くのブルーフリーディングDNAポリメラーゼの“低いプロセシビティ”と“増幅性能の不足”

※プロセシビティ：酵素が核酸と結合し、伸長反応させる能力

KAPA HiFi DNA ポリメラーゼは、まったく新しいエンジニア・DNAポリメラーゼであり、市販のブルーフリーディング酵素の中でも最も高い正確性を誇ります。最適な条件で使用した場合、他のブルーフリーディング酵素よりも短いサイクル時間で、複雑なテンプレート由来の長くて難しい標的につて、強固な増幅、高い収量、そして高い感度を実現します。

### イントロダクション

DNAのハイフィデリティー増幅は、DNAクローニング、遺伝子プロファイリング、一分子シーケンスなどのアプリケーションで重要です。ブルーフリーディング酵素を用いた長くて難しい標的のルーチン・ハイフィデリティー増幅は、ポリメラーゼの低いプロセシビティと増幅性能の不足のため以前から困難とされてきました。このため研究者はブレンドした酵素（ブルーフリーディングDNAポリメラーゼの割合が少ないTaqとのブレンド）を使用し、複雑なテンプレートと少ないテンプレートコピー数から高い収量のロングフラグメントを取り出そうとします。しかし酵素ブレンドの増幅性はフィデリティーを犠牲にして得ているのです：エラー率は通常、野生型Taqの2~4倍低いだけで、PCR由来の突然変異も一般的に起こります。

KAPA HiFi DNA ポリメラーゼは、エンジニア加工された新しい酵素で、ユニークな特長を持っています。増幅性、感度、そして酵素ブレンドの長いフラグメントを増幅する能力と共に、単一酵素ブルーフリーディングポリメラーゼの高いフィデリティーがその特長の一つです。KAPA HiFiは、市販されているブルーフリーディング酵素のなかで最も高いフィデリティー（正確性）を誇ります（ $2.8 \times 10^{-7}$  エラー/ヌクレオチド）。そのフィデリティーは、酵素ブレンドの約40倍、野生型Taqの100倍となります。よってKAPA HiFiはルーチン・ハイフィデリティーPCRにおける必須アイテムとなります。

このようなKAPA HiFiの新しい特質を支えているのは、酵素のユニークな配列と構造、強い3'→5'エキソヌクレアーゼ活性、向上したプロセシビティ、酵素の能力を増強するために開発されたキット専用のバッファーです。この真に差別化された酵素システムには注意点が一つあります。そのユニークな性質から、**最適なパフォーマンスを得るためには、他のブルーフリーディング酵素と酵素ブレンドで使用されるものとは違うサイクル条件が必要となります。**他のシステムから切り替える際は、初期最適化が求められる場合があります。しかしそのような手間は、KAPA HiFi DNAポリメラーゼがもたらす長期的な利点を考慮すればとても小さなものです。

このアプリケーションノートの目的は、KAPA HiFiの使用において、最適なパフォーマンスに求められる条件を明示し、最適化を促進するためのガイドラインを提供することです。

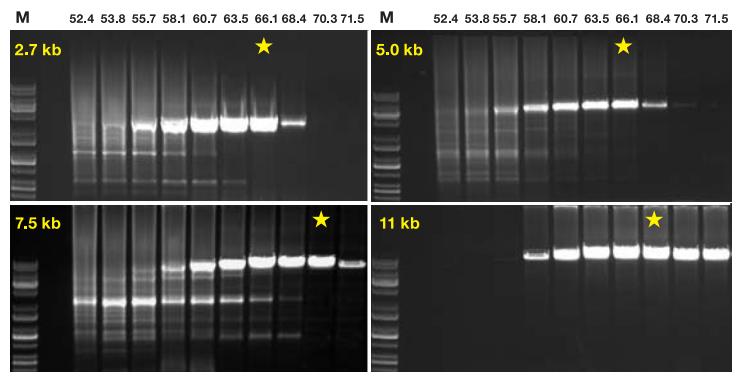


図1. KAPA HiFiのパフォーマンスにおけるアニーリング温度の効果

アニーリング温度グラジエントPCRで、KAPA HiFi HotStart ReadyMixを使用し、4つのヒトアンプリコン(2.7–11 kb; 37.0–52.9% GC)を増幅した。各アンプリコンにつき、10反復の反応液(25  $\mu$ l)を用意した。各反応液はテンプレートとして50 ngのヒトゲノムDNAと、0.3  $\mu$ Mのプライマーを含む。PCRは、Eppendorf Mastercycler epgradient Sを使用し、推奨条件を用いて行った（裏面の表2参照、35サイクル）。全てにおいて、アニーリング温度はグラジエントにより52.4℃から71.5℃の間で実施した。この方法を用いることにより、各アンプリコンの最適アニーリング温度（特異産物の収量が最大になる温度）が決定した。★印は後のテンプレート希釈系列PCRにおいて各アンプリコンに用いられたアニーリング温度を示す（裏面の図2参照）。M印のレーンはDNAラダーを含む。

### 決定的な要素：アニーリング温度

KAPA HiFiを開発するにあたっての重要な目的のひとつは、多くの単一酵素ブルーフリーディング・システムの大きな欠点に対処するために酵素のプロセシビティを劇的に向上させることでした。その欠点とはまさに増幅性能の不足、感度の低さ、そして伸長時間の長さです。高いプロセシビティを持つKAPA HiFi DNAポリメラーゼで最適なパフォーマンスを達成するために、特別な反応バッファーが調製されました。KAPA HiFiバッファーの組成、とりわけ塩濃度は他のブルーフリーディング酵素および酵素ブレンドに付属しているバッファーとは大きく異なります。バッファーの組成は、プライマー・アニーリングだけではなく、最終的な反応効率にも劇的な影響を及ぼします（図1参照）。

## ルーチン・ハイフィデリティPCR

KAPA HiFiバッファーの場合は、いかなるプライマー・ペアであっても、“異なるバッファーで同じプライマー・ペアを用いた場合”よりも最適アニーリング温度が高くなります。KAPA HiFiで、最適ではない（低すぎる）アニーリング温度が用いられた場合、収量が低いか標的フラグメントが無い場合、反応産物は一般的に非特異アンプリコンに占められます。特に長いアンプリコンを強固に増幅させるためには、KAPA HiFiバッファーシステムにおいて、特定のプライマー・ペアに最適なアニーリング温度を用いることが必須となります。この最適なアニーリング温度を決定するために、二つの方法が推奨されます。

- ・アニーリング温度グラジェントPCRにおいて最適なアニーリング温度を決定すること
- ・いくつかの反復反応液を用意し、65℃～72℃の範囲で異なるアニーリング温度を用いてPCRを行うこと（例：1.0℃～2.5℃区切りを上昇させる）

アニーリング温度の最適化の際に用いる他の条件については、表1と表2を参照。

表1. ルーチン・ハイフィデリティPCRのためのKAPA HiFi反応セットアップ

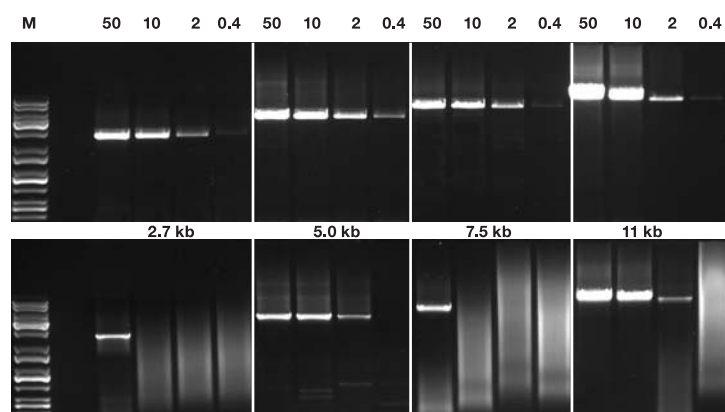
反応組成 <sup>1</sup>	最終濃度	25μlあたりの反応
PCRグレードウォーター	—	Up to 25.0μl
5X KAPA HiFi Fidelity もしくは GC Buffer <sup>2</sup>	1X	5.0μl
10mM dNTP Mix	各dNTPにつき 0.3 mM	0.75μl
Forward プライマー (10μM)	0.3μM	0.75μl
Reverse プライマー (10μM)	0.3μM	0.75μl
テンプレートDNA	10—50 ng	—
DNA Polymerase (1U/μl)	0.5U/リアクション	0.5μl

- 1 KAPA HiFi HotStart ReadyMixにも同様の反応条件が推奨される。もしReadyMixを使用する場合、5Xバッファー、dNTPs、ポリメラーゼを、25μl反応につき12.5μl 2X ReadyMixと入れ替え、水の量を調整する。KAPA HiFi HotStart ReadyMixは、1X 2.5mMの濃度のMg<sup>2+</sup>を含んでいる。
- 2 どちらのKAPA HiFiバッファーも、1X 2mM濃度のMg<sup>2+</sup>を含んでいる。これは、最適な収量と感度を得るために増やすこともあり得る。0.5 mMのMg<sup>2+</sup>（1X濃度）を加えるためには、25μl反応につき、キットに付属している25mMのMgCl<sub>2</sub>溶液を0.5μl加える。

表2. ルーチン・ハイフィデリティPCRのためのKAPA HiFiサイクル条件

サイクルステップ	温度&時間	
初期変性	95℃で2～5分	1
変性	98℃で20秒	x 25～35サイクル
アニーリング	最適温度で15秒	
伸長 <sup>1</sup>	72℃で15～30秒/kb	
最終伸長	72℃で1～5分	1

- 1 アンプリコン≤1kbに15秒/kbを用いる。より長いアンプリコンには30秒/kbが推奨される。



上段：KAPA HiFi HotStart ReadyMix

下段：F社製品

図2. KAPA HiFiによって、複雑なテンプレートからの長いDNAフラグメントの、強固で高感度なルーチン・ハイフィデリティ増幅が可能になった

テンプレート希釈系列において、KAPA HiFi HotStart ReadyMix（上）またはF社製品（下）を用い、4つのヒトアンプリコン（2.7—11 kb；37.0—52.9% GC）の増幅を行った。反応液（25μl）は各メーカーの推奨に従い調整し、テンプレートとして50ng、10ng、2ng、400pgのヒトゲノムDNAを添加した。PCRは、各酵素システムの推奨条件に従い、Eppendorf Mastercycler epgradient Sを用いて行った。各アンプリコンおよび酵素システムの最適アニーリング温度は、図1に示されているように決定された。Mの印がついたレーンはDNAラダーを含む。

## 結論

KAPA HiFiリアクションにおける特定のプライマーペアの最適アニーリング温度が一度決まった場合、強固で感度のある増幅を行うための追加の最適化はほぼ不要となります。しかし、最適なパフォーマンスのためには、以下に挙げる推奨事項を守る必要があります。

- ・PCRサイクル数は最少にとどめる。これにより、最適なフィデリティと増幅の特異性が確保されます。もしもスミアが起きた場合、サイクル数を35もしくはそれ未満に減らします。
- ・DNAを多く使わずに済ませないこと。ほとんどのアプリケーションでは、25μl反応液（もしくは同等）あたり10—50ngで十分です。それよりもDNAが多い場合、収量の減少および非特異増幅につながります。
- ・初期変性は95℃で2～5分間行う必要があります（テンプレートの複雑性およびGC含量による）、各サイクルの変性は98℃で20秒間行います。これは、高塩濃度のKAPA HiFiバッファーにおいて、増幅産物の完全な変性を確実に行うためであり、最高の反応効率を確保します。
- ・常にDNAとプライマーを希釈して、10mM Tris-HCl (pH8.0—8.5)に保存するか、その一貫性を保護するためにTEに保存してください。ニックDNAまたは分解されたDNAからの長いフラグメントの強固かつ感度の高い増幅や、ロー・クオリティーのプライマーの使用はできません。

反応セットアップ、サイクル条件、最適化などに関する詳細な情報については、KAPA HiFi、KAPA HiFi HotStart、またはKAPA HiFi HotStart ReadyMixのテクニカルデータシートをご確認いただくか、[www.kapabiosystems.com](http://www.kapabiosystems.com)にて、よくある質問（FAQs）をご参照ください。