



Application

HIV薬剤耐性検査

製品名

KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KK2601)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは 国立国際医療研究センターエイズ治療研究開発センター蜂谷敦子様、城谷茜様のご厚意により掲載させていただきました。

実験条件

HIV薬剤耐性試験として、PCR増幅後sequence解析を行い、薬剤のターゲットとなる部位にアミノ酸変化が生じたかどうかを確認しています。この用途において、2nd PCRで安定して産物が得られる酵素を検討しました。

サンプル：ヒト血漿由来ゲノムDNA

PCR条件

1st RT-PCR

Invitrogen SuperScript III one-step RT-PCR system with platinum Taq DNA polymerase kit

2nd PCR (検討箇所)

比較に使用したPCR試薬

1. KAPA/HiFi HotStart Ready Mix
2. L社 野生型Taq DNA polymerase
3. T社 高正確性 DNA polymerase

PCRプログラム

サーマルサイクラー：Applied/ GeneAmp PCR system 9700

1. KAPA HiFi HotStart Ready Mix

Denaturation	95°C	3min	} 35 cycles
PCR	98°C	20sec	
	60°C	30sec	
	72°C	40sec	
Final extension	72°C	5min	
	4°C	forever	

2. L社 野生型Taq DNA polymerase

Denaturation	94°C	2min	} 35 cycles
PCR	94°C	30sec	
	50°C	30sec	
	72°C	60sec	
Final extension	72°C	5min	
	4°C	forever	

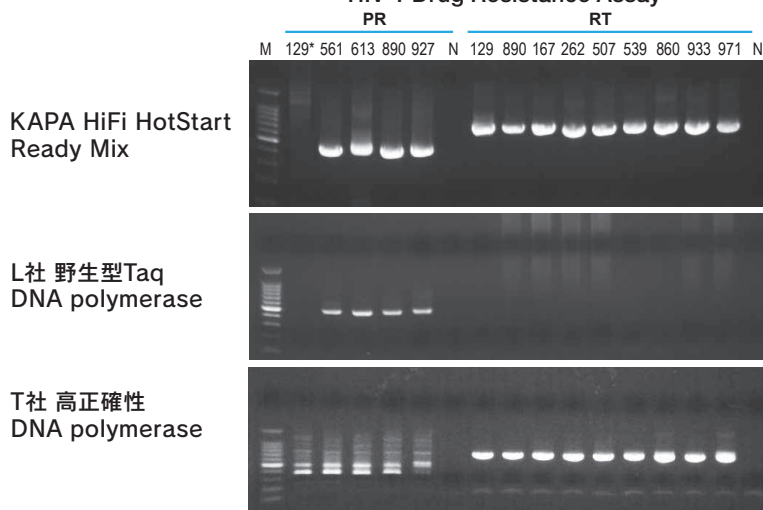
3. T社 高正確性 DNA polymerase

Denaturation	98°C	5min	} 35 cycles
PCR	98°C	10sec	
	50°C	5sec	
	72°C	15sec	
Final extension	72°C	5min	
	4°C	forever	

	KAPA HiFi HotStart Ready Mix (μl)	L社 野生型Taq DNA polymerase (μl)	T社 高正確性 DNA polymerase (μl)
PCR Buffer	12.5	2.5	12.5
10 uM Primer F	0.5	0.5	0.5
10 uM Primer R	0.5	0.5	0.5
DW	11	18.15	9.5
dNTP mix	-	0.5	-
50 mM MgCl ₂	-	0.75	-
Taq	-	0.1	-
1 st product	0.5	2	2

結果

HIV-1 Drug Resistance Assay



PR：HIVのプロテアーゼ領域
RT：HIVの逆転写酵素領域

129~971：サンプル
N：NTC
M：100bp ladder

*サンプル129について
本検討においては3社全ての酵素で解析できなかったが、追試験ではKAPA HiFi HotStart Readymixで増幅され、解析が可能であった。(データ未掲載)



お客様のコメント

Ready mixということで試薬の調整が簡便であり、またHot startが可能でしたので、とても使いやすかったです。RT領域を比較すると、L社では全く検出できなかったが、KAPAではT社と同様、すべて検出が可能であった。PR領域では目的とするバンドの検出が可能であった。