



Application

インバースPCRによるポイントミューテーションの導入

製品名

KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KK2601)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは、鹿児島大学 Y. K. 様のご厚意により掲載させて頂きました。

方法

プラスミドにサブクローニングしたDNAに対して変異導入を行うために、インバースPCRを実施し、引き続きライゲーションを行い、環状DNAを取得後、大腸菌にトランスフォーメーションした。

T社Mutagenesis Kitを用い、添付のプロトコールに沿って実験を行った。

インバースPCRに用いた酵素は、KAPA HiFi HotStartReadyMixと、比較対象としてT社Mutagenesis Kitに付属する酵素を用いた。

〈インバースPCR〉

● 反応組成

- 10 μ l water
- 1.5 μ l primer mix
- 1 μ l template
- 12.5 μ l KAPA HiFi

● PCR cycle

95°C	5 min	} 35 cycle
98°C	20 sec	
60, 65, 70°C	15 sec	
72°C	4 min	
72°C	5 min	

● PCR装置: PC818 (Astec)

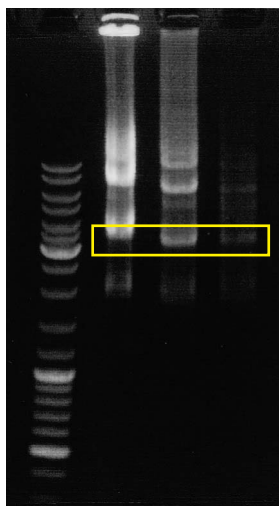
● 増幅サイズ: 3.2 kbp

結果

〈インバースPCRの結果〉

(KAPA HiFiのみ)

(°C) 60 65 70

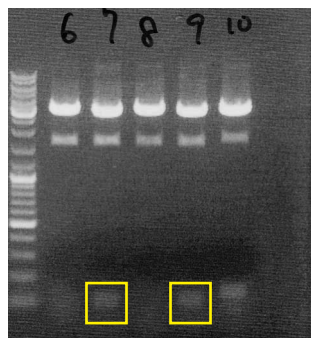


← 目的のバンド (3.2kb)

KAPA HiFiを用いたインバースPCRの結果、上記の写真の様なバンドを得た。

〈制限酵素消化によるインサートチェック〉

(KAPA HiFi)

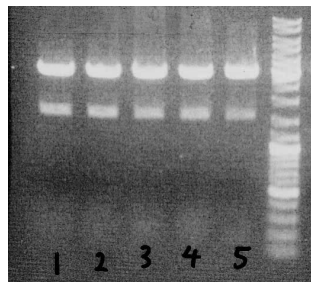


目的のバンドを切り抜き、ライゲーションを行い、環状DNAを取得後、大腸菌にトランスフォーメーションをすると、左記の写真の様に5コロニー中2コロニーのポジティブクローンを取得出来た。

変異導入済みのインサートを用いたシーケンスの結果、目的の変異は導入され、その他の非特異的なPCRに由来する変異は観察されなかった。このことは、KAPA HiFiが高正確性であることを実証している。

← 制限酵素処理後、生成される変異導入済みのインサートサンプル7、9では、実際にシーケンスを確認済み。

(T社)



同時に進めたT社製品を用いた場合においては、左記の写真の様に変異導入済みのプラスミドを取得することが出来なかった。

← 変異導入済みのインサートは観察されなかった。



お客様のコメント

KAPA HiFiのアプリケーションにはインバースPCRを用いた変異導入について書かれていないものの、本酵素の正確性からインバースPCRの様な長いテンプレートの正確なPCRに適しており、実際にT社Mutagenesis Kit付属の酵素を用いた場合よりも高確率で変異導入済みのプラスミドを取得出来ました。

KAPA HiFiは非常に正確性が高く、どんなテンプレートでもPCRがかかるのでとても重宝しています。その上、Ready mixでHot startなので使用も非常に簡単です。遺伝子のサブクローニングを目的としたPCRには第1選択の酵素です。

