



Application

分裂酵母のrif1遺伝子欠失ミュータントのスクリーニング

製品名

KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KK2601)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは、大阪大学 蛋白質研究所 細胞核ネットワーク研究室 村山真一様、田中麻紀子様、独立准教授 加納純子様のご厚意により掲載させて頂きました。

方法

分裂酵母のrif1遺伝子欠失ミュータント作製 (Nat 薬剤耐性マーカーによるRif1 ORFのリプレイス) 作業における、PCRによる当たり株を同定するスクリーニングの工程において、市販のHigh-Fidelityのポリメラーゼを用いたが、欠失ミュータントにおける増幅が見られなかった。そこで、本製品によるPCRを試みた。

● PCR reaction mixture

Kapa-HiFi

Template DNA (0.1µg/µl)	1 µl
2xKAPA Hifi Hot Start Ready Mix	12.5 µl
Forward Primer (10µM)	0.75 µl
Reverse Primer (10µM)	0.75 µl
DMSO	1.25 µl
ddH2O	8.75 µl
Tota	25.0 µl

A 社製品 P (高正確性酵素)

Template DNA (0.1µg/µl)	1 µl
酵素	0.2 µl
5 x GC Buffer	4 µl
2.5mM dNTPs	1.6 µl
Forward Primer (100µM)	0.1 µl
Reverse Primer (100µM)	0.1 µl
DMSO	0.6 µl
ddH2O	13 µl
Total	20 µl

B 社製品 E (酵素ブレンド)

Template DNA (0.1µg/µl)	1 µl
酵素	0.2 µl
10 x Buffer	2 µl
2.5mM dNTPs	1.6 µl
Forward Primer (100µM)	0.1 µl
Reverse Primer (100µM)	0.1 µl
ddH2O	15 µl
Total	20 µl

● PCR condition

95°C	2 min	} X 30
98°C	20 sec	
60°C	15 sec	
72°C	3 min	
72°C	5 min	
4°C	∞	

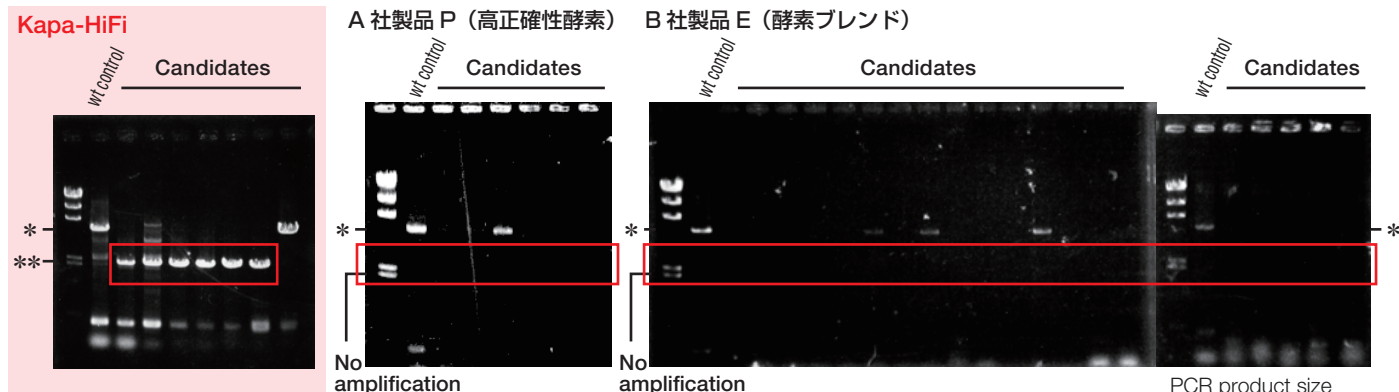
98°C	2 min	} X 30
98°C	10 sec	
51°C	30 sec	
72°C	3 min	
72°C	5 min	
4°C	∞	

98°C	1 min	} X 30
98°C	10 sec	
53°C	30 sec	
72°C	6 min	
72°C	5 min	
4°C	∞	

● Thermal Cycler: Gene Amp® PCR system 9700

結果

Screening for the rif1::nat+ deletion mutants



図のように欠失ミュータント遺伝子からも増幅を得られた。



お客様のコメント

これだけの規模の無料配布キャンペーンを行うということは相当な自信作なんだろうということで、今回試しに使用させて頂きました。とはいうものの、アニーリング温度が通常より高く設定されているなど、普段の条件から変更するには少しハードルが高いです。そこで、性能面でも評価の高かった当製品を、普段使用している酵素で増幅が得られない時に、試しに使用してみたところ上記のような結果を得ました。他のラボメンバーからも増えなかったものが増えたなど好評を得ています。他に良い点は、当製品は凍結融解の影響を考慮しなくて良くホットスタート仕様なので氷上で作業しなくてもよいということです。これだけでPCRのセットアップが案外と楽になりました。最後に、KAPA-HiFiはそのコスト面も大変魅力的であります。

