



Application

パラフィン切片を用いたVHL遺伝子エクソン2および3の増幅

製品名

KAPATaq Extra PCR Kit (KK3009)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは大雄会医科学研究所 澤村卓宏 様のご厚意により掲載させていただきました。

概要

癌抑制遺伝子の一つであるVHL (Von Hippel-Lindau フォン・ヒッペル・リンドウ) 遺伝子は常染色体上に存在し、優性遺伝を行います。この遺伝子は中枢神経や網膜に血管芽腫を多発するVHL病に関係するだけでなく、腎臓癌においても高頻度で遺伝子異常が認められます。臨床の現場では、このような遺伝性疾患に対して様々な目的でPCRを用いた検査が行われています。本アプリケーションでは、従来使用していた製品の代替としてKAPATaq Extra PCR KitがPCR検査に使用できるかを検討しました。

実験条件

● サンプル：DNA

腎癌患者23症例から採取した5μmのパラフィン切片1枚より癌部のみ採取後、High Pure FFPE Isolation Kit (Roche) を用いgDNAを抽出した。

● プライマー配列 (5' → 3') :

VHL exon 2
forward accggtgtggctctttaaca
reverse ttggataacgtgcctgacat
VHL exon 3
forward ggcaaagcctctgttcggt
reverse tgcaccaccttctcctgat

● PCR反応組成 :

< KAPATaq Extra PCR Kit >		<S社製品> (高正確性のブレンドタイプ)	
KAPATaq Extra DNAポリメラーゼ	0.1 μL	Enzyme Blend	0.1 μL
5×KAPATaq Extra バッファー	4 μL	×10 PCR Buffer	2 μL
25mM MgCl ₂	1.4 μL	dNTPs (10mM each)	0.4 μL
dNTPs (10mM each)	0.6 μL	each forward primer (10μM)	1 μL
each forward primer (10μM)	1 μL	each reverse primer (10μM)	1 μL
each reverse primer (10μM)	1 μL	template DNA solution	2 μL
template DNA solution	2 μL	water	13.5 μL
water	9.9 μL	total	20 μL
total	20 μL		

● PCRプログラム (共通) :

94°C 5 min
94°C 1 min
60°C 1 min
72°C 1 min

35サイクル

● 電気泳動条件

バッファーの種類：TBEバッファー
電圧：100V
泳動時間：20 min
核酸染色試薬：エチジウムブロマイド(先染め)
イルミネーター：UV

● PCR装置：Applied Biosystems 2720

結果

High Pure FFPE Isolation Kit (Roche) を用いたDNAの収量

Sample Name	Concentration Units	A260/A280	A260/A230
1	32.6 ng/uL	1.84	1.93
2	75.3 ng/uL	1.83	1.94
3	53.5 ng/uL	1.83	1.92
4	99.5 ng/uL	1.82	1.98
5	92.2 ng/uL	1.82	2.02
6	34.0 ng/uL	1.80	1.76
7	65.7 ng/uL	1.78	1.85
8	35.5 ng/uL	1.76	1.64
9	26.6 ng/uL	1.73	1.50
10	33.1 ng/uL	1.62	1.01
11	76.4 ng/uL	1.69	1.31
12	27.8 ng/uL	1.68	1.06

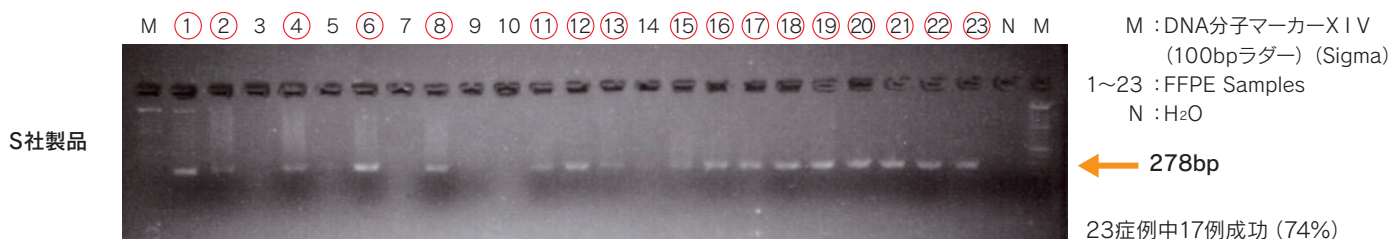
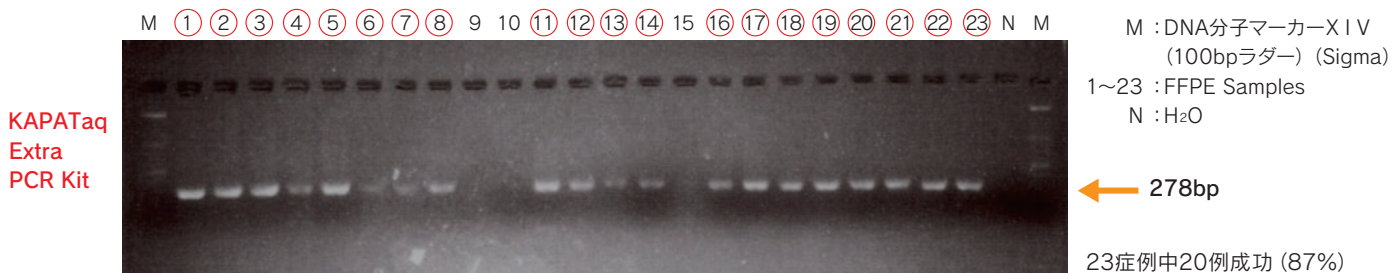
Sample Name	Concentration Units	A260/A280	A260/A230
13	31.1 ng/uL	1.71	1.62
14	40.0 ng/uL	1.63	1.08
15	48.2 ng/uL	1.78	1.78
16	62.1 ng/uL	1.66	1.30
17	37.9 ng/uL	1.78	1.79
18	33.1 ng/uL	1.59	1.21
19	30.0 ng/uL	1.75	1.61
20	33.4 ng/uL	1.54	0.87
21	57.7 ng/uL	1.69	1.36
22	33.9 ng/uL	1.65	1.20
23	53.3 ng/uL	1.77	1.80

これらのサンプルを2μL、PCRに使用した

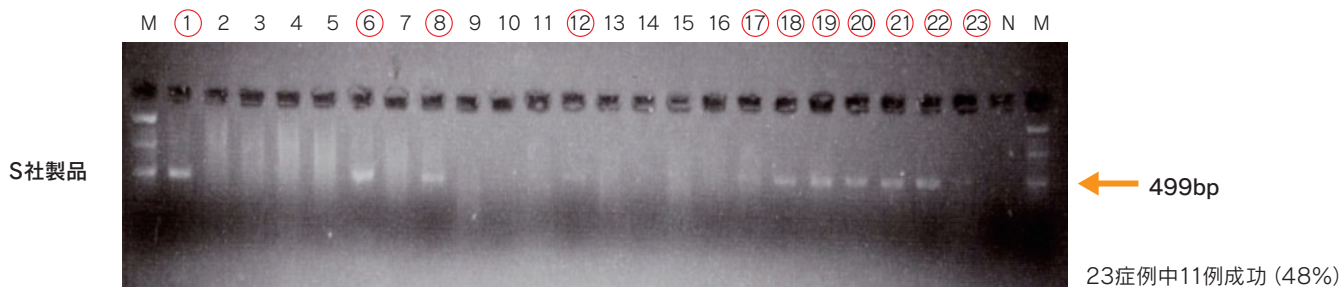
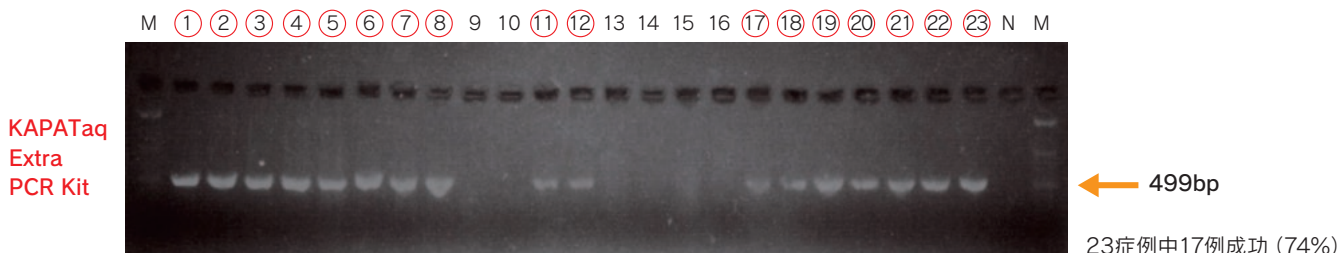


反応終了後、3%アガロースゲルによる電気泳動を実施する。想定分子量のポジションに明瞭なバンドを認めた例をPCR成功例とする。

VHL exon2



VHL exon3



VHL exon2においてKAPATaq Extraでは23症例中20例 (87%) に対し、S社酵素では17例 (74%) が電気泳動にて特異バンドを認めた。また、VHL exon3においては、KAPATaq Extraでは23症例中17例 (74%) に対し、S社酵素では11例 (48%) の特異バンドを認めた。



お客様のコメント

臨床検査におけるPCR検査の目的は様々ですが、我々の検査室ではアンプリコンを用いてシーケンスの検査に供することが少なくありません。つまり、増幅試薬にはPCR反応の阻害物質にも対応でき、さらに一定以上のフィデリティーも必要と考えます。従来使用していた製品は、いくつかの同等品との比較の末に選択し数年来継続的に使用しておりました。今回、検討する機会を得てKAPA製品と性能比較をいたしました。予想以上のPCR成功率でした。また、データはお示しませんが、このアンプリコンを用いたダイレクトシーケンスにおいても問題なく使用できました。