



Application

マウステールによるジェノタイピング

製品名

KAPA Express Extract + PCR ReadyMix (KK7151)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは、国内のお客様のご厚意により掲載させていただきました。
自動精製装置による従来の方法と比較し、KapaExtractExpressKitによるDNA抽出方法、
およびKapa2GRobustReadyMixKitのPCRにおける増幅性能の有用性を評価しました。

テンプレート溶液の調製：DNA抽出／精製

1. A社自動精製装置による精製（現状）

- (1) マウステール 5mm程度 を溶解液で55℃、一晚（12時間） インキュベート
- (2) 精製装置にて自動精製（15分）

2. Kapa社ExpressExtractキット

- (1) マウステール 2mm程度 + ExpressExtract反応Buffer10μL + ExpressExtract酵素2μL + DW88μL
- (2) 75℃ 10分、95℃ 5分 インキュベート
- (3) ボルテックスし、遠心分離15000xg 1分
- (4) 上清を回収して別容器に移し、テンプレートとして用いる。
- (5) 残った上清に5倍量の1×TE Bufferを添加して-20℃保存

3. B社DNA抽出キット

- (1) マウステール 2mm程度 + 反応Buffer10μL + 酵素1μL + DW89μL
- (2) 75℃ 25分、95℃ 5分 インキュベート
- (3) 1～2回転倒混和し、遠心分離20000 x g 3分
- (4) 上清25μLを回収して別容器に移し、1×TE Buffer 50μL を添加、テンプレートとして用いる。
- (5) 残ったサンプルを-20℃保存

PCR条件

PCR反応組成

C社ホットスタートTaq

		(終濃度)
10×Buffer(Mg2なし)	1.0 μl	
10mM dNTPs Mix(2.5mM each)	0.8 μl	0.8mM(0.2mM each)
50mM MgCl2	0.6 μl	3.0mM
30μM Forward Primer-WT	0.1 μl	0.3μM
30μM Forward Primer-KO	0.1 μl	0.3μM
30μM Reverse-Common Primer	0.2 μl	0.6μM
テンプレート溶液	2.0 μl	
DNA Polymerase(5U/μl)	0.05 μl	0.25units/10 μl
DW	5.15 μl	
Total	10.0 μl	

Kapa2GRobustHotStartReadyMix

		(終濃度)
2×Kapa2GRobustReadyMix	5.0 μl	
30μM Forward Primer-WT	0.1 μl	0.3μM
30μM Forward Primer-KO	0.1 μl	0.3μM
30μM Reverse-Common Primer	0.2 μl	0.6μM
テンプレート溶液	1.0 μl	
DW	3.6 μl	
Total	10.0 μl	

PCRプログラム

サーマルサイクラー：PTC-200（BioRad社）

1) 現状

Temp (°C)	Time	
94	3 min	} 35 cycles
94	60 sec	
55	60 sec	
72	60 sec	
72	3 min	
10	∞	

2) Kapa2GRobustHotStartReadyMix推奨

Temp (°C)	Time	
95	3 min	} 35 cycles
95	15 sec	
55	15 sec	
72	15 sec	
72	3 min	
10	∞	

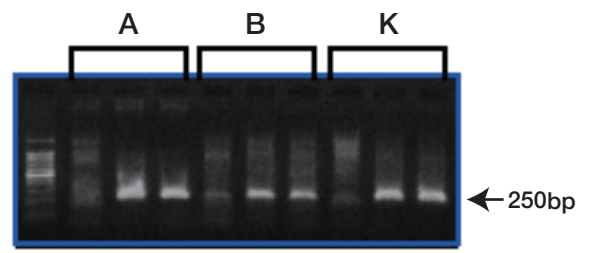
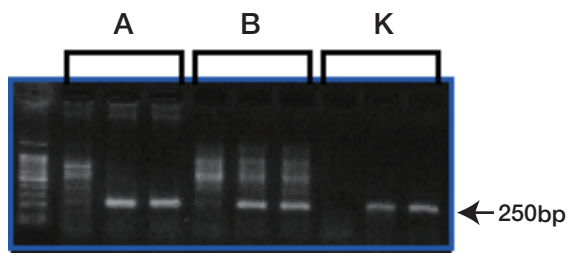
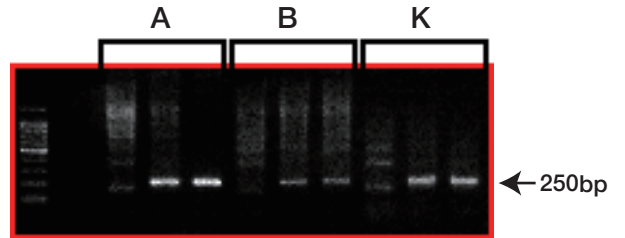
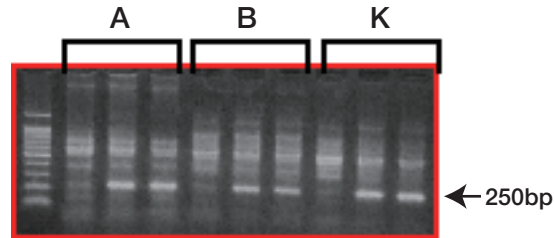
電気泳動結果

C社ホットスタートTaq

Kapa2GRobustHotStartMasterMix

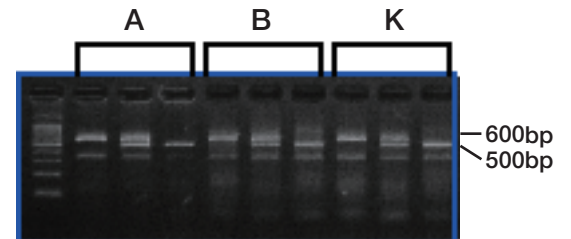
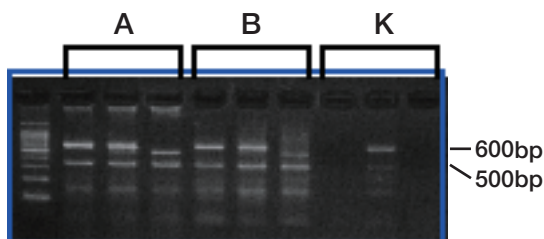
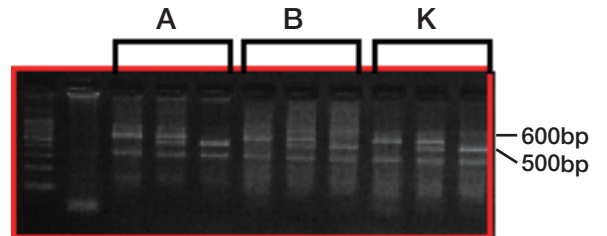
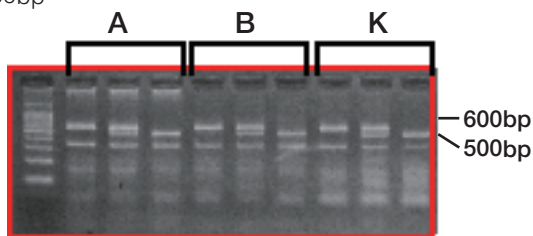
テストA

左から順に
(-) バンドなし
(+) 250 b p
(+) 250 b p



テストB

左から順に
ホモ : 600bpのみ
ヘテロ : 500bp, 600bp
ホモ : 500bpのみ



A : A社自動精製
B : B社DNA抽出キット
K : Kapa,ExpressExtract

上段 : 現状プログラム
PCR時間 約 2.5時間
下段 : Kapa2GRobustHotStartReadyMix推奨プログラム
PCR時間 約 1.5時間

- ・ B社抽出キット、KapaExpressExtractキットとも、現状の精製方法よりも短い抽出時間でタイピングが可能であった。
- ・ PCR試薬としてKapa2GRobustHotStartReadyMixを使用した場合、どのPCRプログラムでも、すべてのテンプレートでタイピングが可能であった。
- ・ 抽出試薬KapaExpressExtractキットとKapa2GRobustHotStartReadyMixの組み合わせが最も効果的であった。



時間コストまとめ

1. 結果まとめ

		現状法	評価試験			
抽出/精製方法		A社自動精製装置 +	KapaExp.Extract	KapaExp.Extract	KapaExp.Extract	KapaExp.Extract
PCR用試薬		C社ホットスタートTaq	+ C社ホットスタートTaq	+ C社ホットスタートTaq	+ Kapa2GRobust	+ Kapa2GRobust
PCRプログラム		現状プログラム	現状プログラム	Kapa推奨プログラム	現状プログラム	Kapa推奨プログラム
コスト	精製/抽出	@¥286.5	@¥131	@¥131	@¥225	@¥225
	PCR	@¥18.9	@¥18.9	@¥18.9		
	トータル	@¥305.4	@¥149.9	@¥149.9	@¥225	@¥225
時間	前処理	12時間				
	精製/抽出	15min.	15min.	15min.	15min.	15min.
	PCR時間	2.5時間	2.5時間	1.5時間	2.5時間	1.5時間
	トータル	12時間 翌日~3時間	~3時間	~2時間	~3時間	~2時間
性能	PCR結果	○	増幅不安定	増幅せず	○	○

2. 年間コスト試算比較

現状vsKapaキット	1頭あたり	年間コスト	
		50頭/月	100頭/月
現状法	@ ¥305.4	¥183,240	¥366,480
Kapaキット	@ ¥225	¥135,000	¥270,000
削減額	@ ¥80.4	¥48,240	¥96,480
削減率	-26.3%		

*コストは2010年8月現在の参考価格です。

Kapa社ExpressExtractキットを採用することにより、現状では翌日まで掛かっていたタイピングが2~3時間以内で実施可能となり、ランニングコストも26%の削減が可能であった。