

## 早く快適なルーチン・エンドポイントPCR : KAPA2G Fast ReadyMix



電気泳動用色素入りPCRマスターミックスが、  
早くて快適な反応セットアップと解析を可能にします。  
野生型Taq入りマスターミックスでは、ルーチン・エンドポイントPCRにおいて  
利点がほとんどありません。

KAPA2G Fast ReadyMix with dyeには、快適なready-to-useフォーマットに高いプロセシビティ\*を持つKAPA2G Fast DNA Polymeraseが含まれております。このエンジニア・ポリメラーゼ特有の性質により、パフォーマンスを落とすことなくPCRサイクル時間を大幅に削減することができます。これこそが、快適なルーチン・エンドポイントPCRのための業界最高レベルのソリューションです。

\*プロセシビティ：酵素が核酸と結合し、伸長反応させる能力

## イントロダクション

民間、診断、学術を問わず、ルーチンでPCRを実施しているラボでは、高い成功率と少ない所要時間が求められます。このことから、調製済みのPCRマスターミックスがルーチンのPCRワークフローに広く導入されてきております。このようなPCRマスターミックスは早くて快適な反応セットアップをもたらすだけでなく、失敗や再試験につながり得る反応セットアップ中のバラつきや操作エラーのリスクを軽減します。エンドポイントPCR産物をアガロースゲル電気泳動によって解析するワークフローでは、電気泳動用色素入りPCRマスターミックスを用いることによって、解析前のPCR産物の操作ステップを減らすことができます。PCRマスターミックスは、ラボ内において別々の試薬から調製し、性能を確認しておくことができるかもしれません。しかし市販の調製済みPCRマスターミックスで必要となる追加費用は、ロット間の再現性と高いパフォーマンスを考慮すれば、十分な費用対効果があると言えます。

野生型酵素入りPCRマスターミックスは、「早くて快適な反応セットアップおよび解析」を除けば利点がほとんどありません。それは、試薬のパフォーマンスが、野生型酵素に特有の性質によって制限されているからです。PCRのパフォーマンス（収量と感度）と成功率を向上させるために、野生型酵素を含んだ市販の調製済みPCRミックスでは、「個別の試薬で調製する標準的な反応セットアップで使用される酵素量」と比較して、しばしば高濃度の酵素で調製されます。これはエンドユーザーには大きな利点となりますが、非効率なPCRをもたらす要因のいくつかは、単に酵素の濃度を増すだけでは解決できないものもあるのです。また、酵素の濃度を高めることによって、非特異増幅の可能性も同時に高まり、結果の分析を困難にすることもあり得ます。

KAPA2G Fast ReadyMix with dyeは、業界最高レベルのソリューションを提供することによって、早くて快適なルーチン・エンドポイントPCRを実現いたします。この調製済みPCRマスターミックスには、ハイ・パフォーマンスFast PCRのために分子進化プロセスを経て開発された、高いプロセシビティを持つ新しいエンジニア酵素KAPA2G Fast DNA Polymeraseが含まれております。この酵素に特有の性質が、PCRサイクル時間を大きく削減します（図表1）。また、電気泳動用色素入りready-to-useフォーマットによる利点に加え、所要時間の短縮にも大きく貢献します。KAPA2G Fast ReadyMix with dyeのもう一つの特長は、プライマー・アニーリングと反応効率を向上させるために開発された独自のバッファーにあります。このバッファーにより、（一つのアニーリング温度を用いて）より幅広いレンジのアンプリコンの増幅が成功し、選択したアッセイにおける高い収量と感度が実現します。

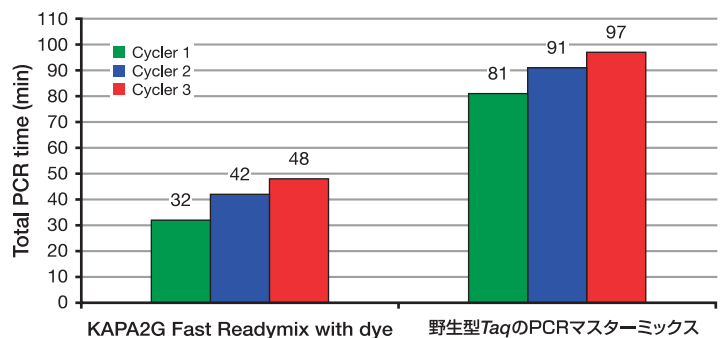


図1.KAPA2G Fast ReadyMix with dyeによって、ルーチン・エンドポイントPCRでPCRサイクル時間を合計50%以上削減

ヒトゲノムDNAの $\leq 1$  kbアンプリコンのルーチン増幅に要するPCRサイクル合計時間(分)

左：KAPA2G Fast ReadyMix with dye

右：野生型Taq DNAポリメラーゼ入りPCRマスターミックス

サーマルサイクラーを3台使用(ランプ速度  $> 1.5-6^{\circ}\text{C}/\text{秒}$ )

表示の時間は、下記の標準プログラムによるもの

## KAPA2G Fast ReadyMix:

初期変性	95°C × 3分	} × 35サイクル
変性	95°C × 15秒	
アニーリング	60°C × 15秒	
伸長	72°C × 5秒	

## 野生型Taq入りミックス:

変性	95°C × 30秒	} × 35サイクル
アニーリング	60°C × 30秒	
伸長	72°C × 1分	

このデータは、使用したサイクラーに関わらずPCRサイクル合計時間が50%超削減されたことを示す。これにより所要時間が短縮され、サーマルサイクラーの処理能力が大きく向上することになる。

KAPA2G Fast ReadyMix with dyeには、PCRマスターミックスをグリーンに染める二種類の電気泳動用色素に加え、PCR産物のダイレクトローディングのための高い比重の成分が含まれております。

電気泳動中にその色素は、ゆっくりと移動するブルーと早く移動するオレンジに分離します。1%アガロースゲルでは、ブルーの色素は約5 kbのdsDNAフラグメント相当、オレンジの色素は100 bp未満のフラグメント相当で移動します。

## 早く快適なルーチン・エンドポイントPCR : KAPA2G Fast ReadyMix

## 方法

ルーチン・エンドポイントPCRにおいて、業界最高レベルであるKAPA2G Fast ReadyMix with dyeのパフォーマンスを示すために、2種類の実験を行いました。

1つ目の実験では、KAPA2G Fast ReadyMix with dyeと他社3社（P社、S社、F社）の製品を用いて、15種類のヒトアンプリコン（222—626bp、GC含量27～75%）を増幅しました。P社とS社の製品には野生型Taq DNAポリメラーゼが入っており、F社製品には「エンハンスTaq」が入っています。全ての製品には、1XPCRミックス、10ngのヒトゲノムDNA、最終濃度が各0.5μMのプライマーが入った反応液（25μl）が含まれております。GC含量が60%を超えるアンプリコンには、最終濃度が5%でDMSOを加えました。

PCRは、高速ランピングサイクラーを用い各製品の推奨プログラムに従って行いました。KAPA2G Fastの場合、ルーチン高速PCRの伸長時間は1サイクル5秒となります。最適な収量および感度を得るために、1サイクル15秒に増やす場合もあります。この実験では1サイクル15秒を採用しました。それぞれの反応溶液の半量が、1%TBEアガロースゲル内で直接解析され、結果はエチジウムブロマイド染色によって可視化されました。その結果が図2です。この結果から、KAPA2G Fast ReadyMix with dyeが、他社製品よりも54%少ないPCR時間で同じだけの収量を得ていることがわかり、他社製品よりも優れていることが示されました。さらに、KAPA2G Fast ReadyMixは最も高い増幅特異性を示し、この実験における成功率が100%に達した2つの製品のうちの1つでした。

2つ目の実験では、KAPA2G Fast ReadyMix with dyeと前述の他社3社の製品を用い、ヒトアンプリコン（327bp、52%GC）でテンプレート希釈系列のPCRを行いました。反応液（25μl）には、1X PCRミックス、最終濃度が各0.5μMのプライマー、表示のとりのヒトゲノムDNA（1反応あたり50ng—16pgテンプレートの範囲をカバーする6段階の5倍希釈液）が含まれております。PCRは、高速ランピングサイクラーを用い、各製品の推奨プログラムに従って行いました。KAPA2G Fastの場合、伸長時間は1サイクルあたり5秒としました。他社製品では2セット行いました（推奨プログラムで1セット、KAPA2G Fastのプロトコルで1セット）。それぞれの反応溶液の半量が、1%TBEアガロースゲル内で直接解析され、結果はエチジウムブロマイド染色によって可視化されました。図3が示すように、KAPA2G Fast ReadyMix with dyeは、（反応時間の合計が半分未満でありながら）他社製品と同等の収量と感度をもたらしました。これに加え、他社の野生型Taq入り調製済みPCRマスターミックスは、エンジニア酵素製品で達成された所要時間を満たすことができませんでした。

## 結論

KAPA2G Fast ReadyMix with dyeを用いれば、反応セットアップと反応産物の解析を早く快適に行うことができます。それに加え、エンジニア酵素KAPA2G Fast DNAポリメラーゼは、PCRサイクル時間を大きく削減するので、ルーチンエンドポイントPCRにおいて、野生型Taq入りの調製済みPCRマスターミックスを上回る業界最高レベルのパフォーマンスを提供できるのです。

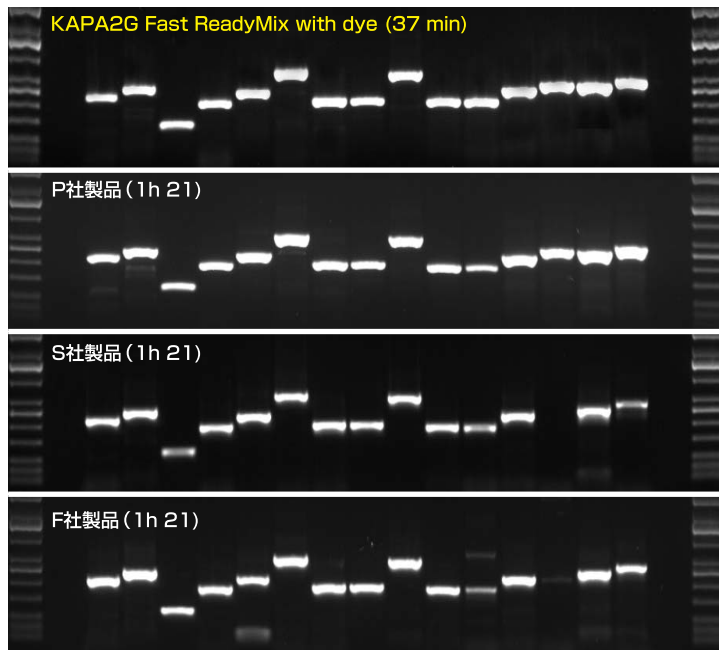


図2:KAPA2G Fast ReadyMix with dyeおよび他社のTaq入り調製済みPCRミックスを用いて、15種類のヒトアンプリコンを増幅

反応液は、「方法」の項目に従い調製する。  
サイクルプロトコル

KAPA2G Fast ReadyMix with dye:		他社製品:	
初期変性	95°C×3分	変性	95°C×30秒
変性	95°C×15秒	アニーリング	60°C×30秒
アニーリング	60°C×15秒	伸長	72°C×1分
伸長	72°C×15秒	サイクル時間の合計	1時間21分
サイクル時間の合計	37分		

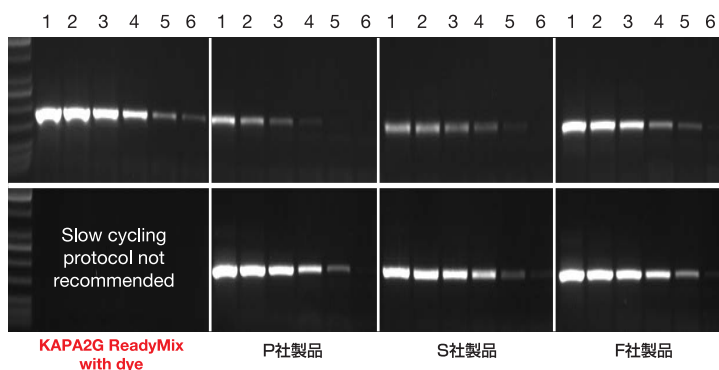


図3:KAPA2G Fast ReadyMix with dye（ファストサイクルプロトコル）および他社製品（標準またはファストサイクルプロトコル）を用い、5倍段階希釈のヒトゲノムDNAからの327 bpヒトアンプリコンを増幅

反応液は、「方法」の項目に従い調製する。  
各反応液のテンプレートDNAの量は以下の通り

1 = 50ng, 2 = 10ng, 3 = 2ng, 4 = 400pg, 5 = 80pg, 6 = 16pg  
サイクルプロトコル

KAPA2G Fast (上段):		野生型酵素プロトコル (下段):	
初期変性	95°C×3分	変性	95°C×30秒
変性	95°C×15秒	アニーリング	60°C×30秒
アニーリング	60°C×15秒	伸長	72°C×1分
伸長	72°C×5秒	サイクル時間の合計	1時間37分

サイクル時間の合計は、ファストサイクルプロトコルで48分、スローサイクルプロトコルで1時間37分