

KAPA3G Hotstart DNA Polymerase

感染症検査のスピードと精度を両立

アプリケーションノート

November 2023

Alexander Latta, Ph.D, Caleb Comoglio, MS - Roche Diagnostics Corporation

Michael Schwemlein, Ph.D - Roche Diagnostics GmbH

隠れたパンデミックに光を当てる

2023年のWHO推計によれば、世界中で毎日100万人以上の性感染症 (STIs) 患者が新たに発生しています。¹ その多くが無症状であるため、STIは20年以上にわたって「隠れた流行」となり²、その罹患率は上昇し続けています。³ STIは、は、あらゆる社会的経済的階層の人々の健康と健康状態に影響を与えます。適切な治療計画を立て、薬剤耐性 (AMR) の拡大を防ぐためには、迅速かつ正確な診断が不可欠です。⁴

性感染症のウイルスや細菌感染症を検出するための遺伝子検査の検体には、一般的に血液または尿が用いられます。例えば、全血成分由来の検体は、エプスタイン・バーウイルス (EBV)、B型肝炎ウイルス (HBV)、単純ヘルペスウイルス (HSV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) などの感染症の検出やモニタリング検査に用いられています。

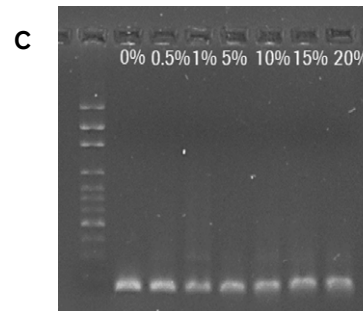
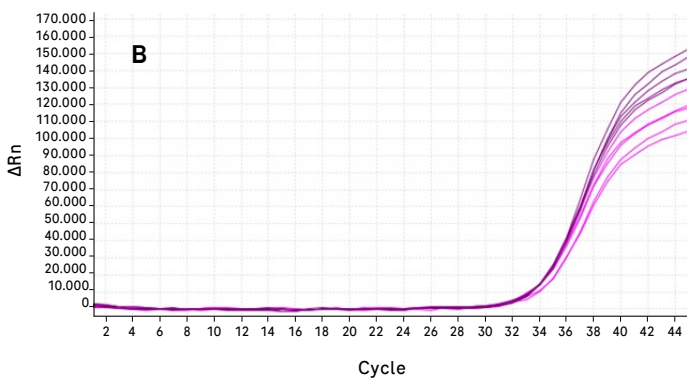
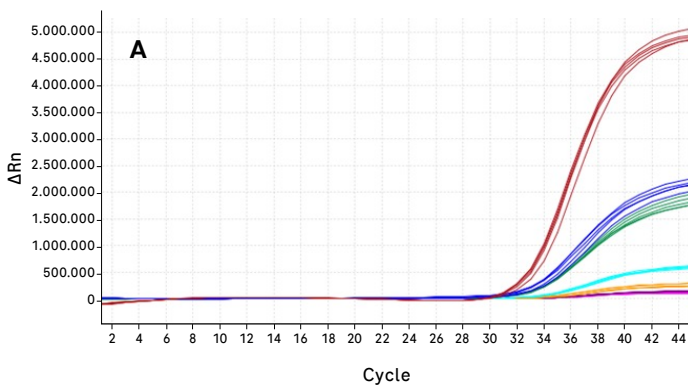
尿検体はクラミジアや淋病、そして尿路感染症 (UTI) の診断によく用いられます。血液検体と尿検体はどちらも、有意義かつ迅速な診断を提供することを目指す遺伝子検査開発者にとっては、課題となる場合があります。これらのサンプルは、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) または逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) に使用する前に、煩雑な精製や核酸精製手順を必要とします。処理時間の短縮とプロトコルの簡素化への需要の高まりにより、サンプル精製手順を削減または省略できるアッセイの開発に焦点が移りつつありますが、粗雑な検体調製法を用いると、阻害物質が混入し、従来のアッセイでは結果に一貫性が無くなるという問題が生じます。

PCR阻害物質への耐性を高めた次世代酵素を用いることで、この課題は克服することができます。次頁では、未精製の血液および尿検体を含むアッセイでのKAPA3G HotStart DNA ポリメラーゼの堅牢な性能を紹介します。

KAPA3G HotStart DNA ポリメラーゼ 最大20%の「全血添加」でも安定した増幅

血液には、ヘモグロビン、ラクトフェリン、IgGなど既知のPCR阻害物質が含まれます。そのため、血液中のDNAやRNAを検出するPCRベースの検査では、通常、これらの物質を除去するための精製・分離プロセスが必要になります。⁵ このプロセスは時に煩雑で、オペレーターに多くの時間と費用を負担させることとなります。これらの負担の要因を除く可能性を検証するため、KAPA3G HotStart DNA ポリメラーゼを使用した検出アッセイの最終反応にさまざまな量の全血を添加する実験を行いました。

全血を反応に添加すると全体的な蛍光は大幅に減少しましたが (Fig. 1A), 全血を最大 15% または 20% とした反応では、全体的な蛍光は低下したものの、一貫性があり再現性のあるリアルタイムPCR結果が示されました (Fig. 1B)。蛍光減少は、DNAポリメラーゼ自体の阻害よりも、蛍光プローブの消光によるものと考えられました。すべての反応条件において、PCR産物が一貫して生成されたことは (Fig 1C) この可能性を裏付けるものであり、反応液中に全血が20%も含まれていても、KAPA3G HotStart DNA ポリメラーゼは強力な阻害物質耐性を発揮できることが示されました。



01

A) 全血を含む反応の増幅曲線。KAPA3G HotStart DNA ポリメラーゼを用いて、全血の量を増加させながらウイルス DNA を増幅した。全血は、反応液全体の 0% (赤), 0.5% (青), 1.0% (緑), 5.0% (シアン), 10% (オレンジ), 15% (紫), and 20% (ピンク) の濃度で反応に添加した。

B) Fig 1A のプロットを全血 15% (紫) および 20% (ピンク) を選択して再スケールした図。

C) 一貫した増幅フラグメントを示すアガロースゲル



PCR 条件: 初期変性時間: 3 min at 95 °C,

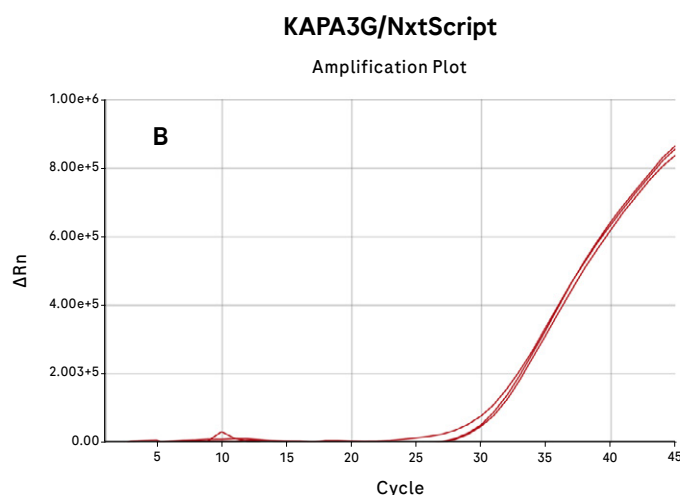
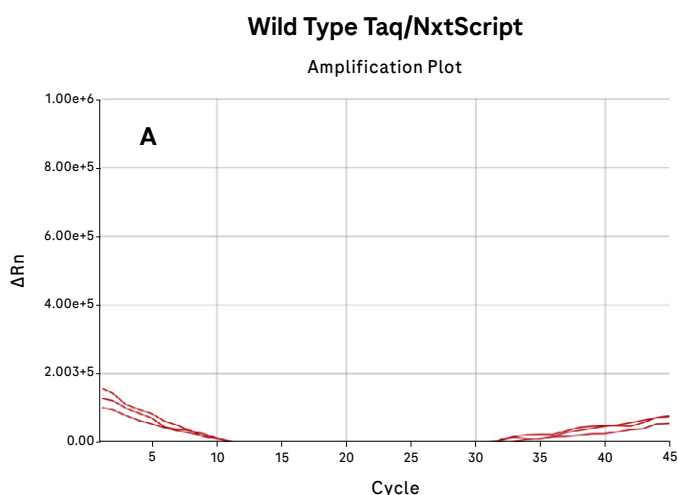
45 cycles: denaturation: 1 sec at 95 °C, annealing/extension: 10 sec at 60 °C

未精製尿の短時間測定

尿は、尿路感染症 (UTI) や特定の性感染症 (STI) 検査においてよく用いられる検体です。多くの検査開発者が、診断検査の簡素化と迅速化を図るため、未精製尿の使用を模索しています。血液と同様に、未精製の尿を検体として使用すると、尿素やさまざまな高濃度の塩などの阻害物質が測定系に入り込みます。^{5,6}

NxtScript逆転写酵素とKAPA3G HotStart DNAポリメラーゼの尿中RNA検出における性能限界を探るため、RT-PCRアッセイの検体量を最大化しました。この実験での反応ミックスは、未精製尿が75%を占める組成となりました。

従来品の酵素では、未精製尿検体中の阻害物質により性能を発揮できませんでした (Fig. 2A)。一方で、NxtScript逆転写酵素とKAPA3G HotStart DNAポリメラーゼの組み合わせでは、未精製尿が反応ミックスの75%を占めるサンプルであっても、検体中のウイルスRNAに対する優れた検出性能を示しました。 (Fig. 2B) また、酵素とマスターミックスが高濃度仕様であったため、反応液中に検体を多量に添加して測定することができました。これら試薬の高濃度組成と阻害物質耐性により、反応液中により多くの測定検体量を添加する余地が生まれ、結果として検査の検出能を向上させることができるようになります。



02

A) wild-type Taq と NxtScript リバーストランスクリプターゼを用いて未精製尿検体中のウイルス RNA を検出した際の増幅曲線。有効な増幅は認められなかった。

B) KAPA3G HotStart DNA ポリメラーゼと NxtScript リバーストランスクリプターゼを用いた、同じ未精製尿検体に対する反応の増幅曲線。全ての検体で一貫して協力的な増幅が認められた。



RT-PCR 条件: RT hold: 5 min at 55 °C, initial denaturation hold: 1 min at 95 °C,

45 cycles: denaturation: 10 s at 95 °C, annealing/extension: 30 s at 60 °C

結論

性感染症のケースは、遺伝子検査が医療にインパクトを与える分野の一つに過ぎません。ここでとりあげた課題と特徴は、呼吸器感染症や院内感染の検査など、他の多くの分野でも応用することが可能です。臨床検体中のPCR阻害物質に耐性を持つ次世代酵素は、ターンアラウンドタイム短縮とワークフローの簡素化により、遺伝子検査の作業時間とコストの節約をもたらします。

さらに、高濃度、阻害耐性、合成速度といった試薬特性を複数組み合わせ最適化することで、遺伝子検査の開発者はより多くの設計目標を達成できます。

本稿に記載した実験結果は、KAPA3G HotStart DNA ポリメラーゼが、現代の集約型遺伝子検査やポイントオブケア遺伝子検査の要求に敵う製品であることを示しています。

オーダーインフォメーション

製品	包装	製品番号
KAPA3G HotStart Master Mix	カスタムフィル	09084711103
KAPA3G HotStart DNA Polymerase	カスタムフィル	08918651103
関連製品		
KAPA3G PCR Buffer	カスタムフィル	09160914103
NxtScript Reverse Transcriptase	カスタムフィル	07051166103
NxtScript 2G Reverse Transcriptase	カスタムフィル	09085220103



Ready for faster turnaround times?

Scan the QR code to see how KAPA3G HotStart DNA Polymerase and other Roche CustomBiotech enzymes can accelerate your assay. Detailed data on KAPA3G performance (speed, robustness, inhibitor tolerance) is available upon request.

Regulatory disclaimers, warranty limitations and legal notes

are listed on the respective product page on custombiotech.roche.com

Trademarks

KAPA and NXTSCRIPT are trademarks of Roche.

© 2025

All rights reserved.

Published by

ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社
〒108-0075
東京都港区港南1-2-70

custombiotech-roche.jp

カスタムバイオテック担当者へ
お問い合わせください

Japan

japan.custombiotech@roche.com

Tel:0120-600-152

References

- ¹ Sexually transmitted infections (STIs). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-\(stis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis)). Accessed: 10-Oct-2023
- ² Institute of Medicine (US) Committee on Prevention and Control of Sexually Transmitted Diseases. The Hidden Epidemic: Confronting Sexually Transmitted Diseases: Summary. Eng TR, Butler WT, editors. Washington (DC): National Academies Press (US); 1997. PMID: 25165803.
- ³ Sexually Transmitted Infections Prevalence, Incidence, and Cost Estimates in the United States. <https://www.cdc.gov/std/statistics/prevalence-incidence-cost-2020.htm>. Accessed: 10-Oct-2023.
- ⁴ The role of diagnostic testing in an era of antimicrobial stewardship. <https://diagnostics.roche.com/global/en/article-listing/health-topics/infectious-diseases/amr-ams.html>. Accessed 10-Oct-2023
- ⁵ PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. Schrader C, et al. <https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>. Accessed 26-Oct-2023
- ⁶ Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1646235/>. Accessed 26-Oct-2023