

# Multiplex PCR Assay Kitの極め付けの 反応特異性をあなたのPCRにお役立てください!

Multiplex PCR Assay Kitは独自のアクセサリタンパク質の添加により、極めて高い反応特異性を提供します。複雑なマルチプレックスPCRにおいても、各プライマーペアによる特異的な増幅性能が向上し、非常に良好な結果が得られます。これまで困難であった遺伝子に対するマルチプレックスPCRにも効果が期待できます。

また、通常のシングルPCRでスミアやエキストラバンドが生じるプライマー対を使用する場合にも、反応特異性が劇的に改善し目的産物のみを効率よく得ることができるため(BIO VIEW 52号14ページ参照)、多型解析やダイレクトシーケンス用DNA断片調製などにも有効と考えられます。今回は、本キットを用いたマルチプレックスPCRにより、cDNAを鋳型として各種遺伝子発現を一回の反応で検出した実験例と、GC リッチで増幅鎖長の長いターゲットでのマルチプレックスPCRの実験例を紹介します。

## ■ 実験例1：cDNAを鋳型とした複数遺伝子の同時増幅

### 【方法】

ヒト肝臓由来total RNA 5  $\mu$ g(Clontech社)を鋳型とし、25  $\mu$ l反応系で、oligo dTプライマーとrandom hexamerを使用して逆転写反応を行い、得られた1st strand cDNAをマルチプレックスPCRの鋳型として用いた。ターゲットとした遺伝子は、Ribosomal protein L19(208 bp)、Ribosomal protein L32(287 bp)、GAPDH(393 bp)、HPRT(503 bp)、Cyclophilin(727 bp)、TFR(970bp)の6種類である。このうちの4対、5対、6対のプライマーを使用し、Multiplex PCR Assay KitならびにTaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> HSを使用してマルチプレックスPCRを行った。また、A社マルチプレックスPCR用キットを用いて推奨条件下で

同様のマルチプレックスPCRを行い、結果を比較した。いずれも50  $\mu$ lの反応系に、逆転写反応液を滅菌蒸留水で10倍に希釈したもの1  $\mu$ lを鋳型として使用し、GAPDH増幅用プライマーは最終濃度0.1  $\mu$ Mで、その他のプライマーは最終濃度0.2  $\mu$ Mで使用した。

【装置】 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Gradient

【PCR条件】 94 $^{\circ}$ C 1分

|                     |          |
|---------------------|----------|
| 94 $^{\circ}$ C 30秒 | } 35サイクル |
| 57 $^{\circ}$ C 90秒 |          |
| 72 $^{\circ}$ C 4分* |          |
| 72 $^{\circ}$ C 10分 |          |

\*: TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> HSの場合は2分に設定

### 【結果】

TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> HSでもマルチプレックスPCRは行えましたが、Multiplex PCR Assay Kitを使用した反応では、5対、6対のプライマーを使用した場合の長い鎖長の増幅産物量に明確な差が認められ、またエキストラバンドも低減していました。この結果は、A社マルチプレックスPCR用キット(添付液追加)の結果と同等でした(図1)。

## ■ 実験例2：Tth HB8ゲノムDNAを鋳型としたGC リッチで増幅差長の長い複数ターゲット領域の増幅

### 【方法】

鋳型として高度好熱菌*Thermus thermophilus* HB8(*Tth* HB8)のゲノムDNAを使用し、そのDNA塩基配列より、以下の増幅鎖長(GC%)のプライマーを9対選んだ。

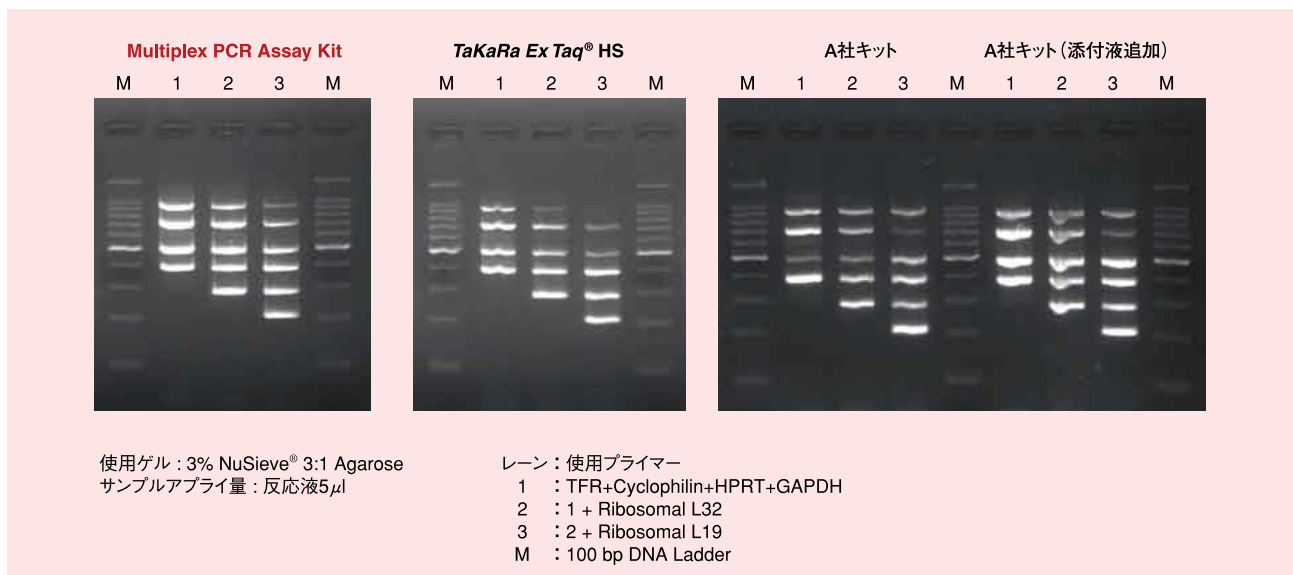


図1 cDNAを鋳型としたMultiplex PCR

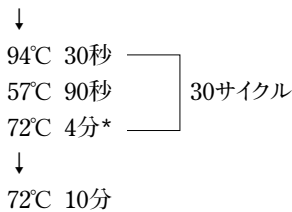
[primer pair]

- 1 : 315 bp (66 %)    2 : 508 bp (68.3 %)    3 : 613 bp (68 %)  
 4 : 797 bp (70.2 %)    5 : 984 bp (66.6 %)    6 : 1,211 bp (71.5 %)  
 7 : 1,508 bp (61.5 %)    8 : 1,787 bp (67.5 %)    9 : 2,101 bp (69.5 %)

これらより、primer mix-7 (7 対; primer pair 1 ~ 7)、primer mix-8 (8 対; primer pair 1 ~ 8)、primer mix-9 (9 対; primer pair 1 ~ 9) の 3 種類のプライマーミックスを用意し、Multiplex PCR Assay Kit ならびに *TaKaRa Ex Taq*<sup>®</sup> HS を使用してマルチプレックスPCRを行った。また、A社マルチプレックスPCR用キットを用いて推奨条件下で同様のマルチプレックスPCRを行い結果を比較した。いずれも 50  $\mu$ l の反応系に、10 ng/ $\mu$ l の *Tth* HB8 ゲノムDNA溶液 1  $\mu$ l を鋳型として用い、各プライマーは最終濃度 0.2  $\mu$ M で使用した。

[装置] *TaKaRa* PCR Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Gradient

[PCR条件] 94°C 1分



\*: *TaKaRa Ex Taq*<sup>®</sup> HS の場合は 2 分に設定

【結果】

*TaKaRa Ex Taq*<sup>®</sup> HS を用いた反応では、増幅が認められないターゲットが多く、エクストラバンドも確認されましたが、Multiplex PCR Assay Kit の場合、primer mix-7、primer mix-8 (8 対目 ◁)、primer mix-9 (9 対目 ◀) のいずれのプライマーミックスを使用した反応でも、期待される増幅産物のバンドすべてが得られました。一方、A社マルチプレックスPCR用キットでは、増幅が認められないターゲットやエクストラバンド(→)の発生が確認されました(図2)。

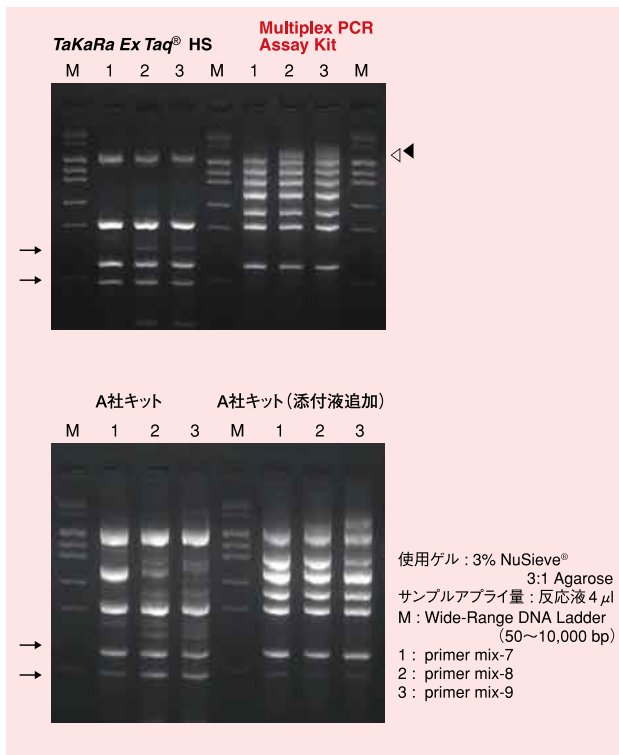


図2 *Tth*ゲノムDNAを鋳型としたマルチプレックス PCR

■最後に

マルチプレックスPCRを成功させるためには、プライマーの選択、増幅サイズの設定など反応系構築の工夫とともに、PCR酵素、バッファー系の選択が大変重要です。本キットは、ノーマルなターゲットはもちろん、GCリッチなターゲットに対するマルチプレックスPCRにも非常に効果的です。マルチプレックスPCR系を構築される際には、高い特異性、増幅性を持つ本キットで是非ご検討ください。

■マルチプレックスPCRのコツ

反応系の構築には、以下の点を考慮してください。

【ターゲットの設定とプライマーの設計】

- プライマー設計においては、Tm 値の差をできる限り小さく、また、GC 含量の偏りをできる限り少なくしてください。
- PCRを行った際の増幅効率が同じくらいになるように設定してください。
- ターゲットサイズは、1,000 bp 以内になるように設定してください。
- 設計したプライマーについては、あらかじめターゲットごとに反応を行い、非特異的増幅の有無および反応性を確認してください。同時に鋳型なしの反応でプライマーダイマーの有無も確認してください。

【反応条件】

- アニーリング温度は、1°C きざみで適切な温度を検討してください。サーマルサイクラーのグラジエント機能が有効です。
- 伸長時間を必要以上に長くすると、非特異的増幅が生じる場合があります。
- PCR サイクル終了後に 72°C、10 分のステップを加えることで、スミアが軽減する場合があります。

■本稿でご紹介した製品

●Multiplex PCR Assay Kit

|       |              |                       |         |
|-------|--------------|-----------------------|---------|
| 製品コード | RR060A       | 100回 (50 $\mu$ l 反応系) | ¥31,000 |
| 製品コード | RR060B (A×4) | 400回 (50 $\mu$ l 反応系) | ¥99,000 |

●*TaKaRa* PCR Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Gradient

|       |       |    |          |
|-------|-------|----|----------|
| 製品コード | TP600 | 1台 | ¥780,000 |
|-------|-------|----|----------|

●*TaKaRa Ex Taq*<sup>®</sup> Hot Start Version

|       |              |        |         |
|-------|--------------|--------|---------|
| 製品コード | RR006A       | 250U   | ¥30,000 |
| 製品コード | RR006B (A×4) | 1,000U | ¥96,000 |

●*Thermus thermophilus* HB8 (*Tth* HB8) Genomic DNA Solution

|       |      |           |         |
|-------|------|-----------|---------|
| 製品コード | 3071 | 2 $\mu$ g | ¥31,000 |
|-------|------|-----------|---------|

本文中の製品に該当するライセンス確認事項は39ページをご覧ください。

① ② ③