

# 反応特異性が格段にアップ!! マルチプレックスPCRに是非お試しください。

## Multiplex PCR Assay Kit 近日発売

製品コード RR060A 100回(50 µl 反応系) ¥30,000  
RR060B(A x 4) 400回(50 µl 反応系) ¥96,000

独自のアクセサリタンパク質の添加により反応特異性が劇的にアップしました。

複雑なマルチプレックスPCRに最適です。

スミアやエキストラバンドを生じるプライマー対での増幅特異性も改善します。

微生物検査や品種判定などさまざまな場面で、複数ターゲットを同時に増幅するマルチプレックスPCR法が採用されています。マルチプレックスPCRでは一つの反応系に複数のプライマー対が用いられるため、プライマーの選択、増幅サイズの設定など反応系構築に工夫が必要です。さらに、反応特異性が十分に高いPCR酵素を用いることも、マルチプレックスPCRで良好な結果を得るためには重要なポイントとなります。

今回新発売となる Multiplex PCR Assay Kit では、独自に開発したアクセサリタンパク質の添加により、反応特異性が格段に向上しています。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性の高い増幅が期待できますので、是非お試しください。

もちろん、通常のシングルPCRにおいても、スミアやエキストラバンドが生じるプライマー対での反応特異性が劇的に改善し、目的増幅産物を効率よく得ることができます。

### 内容

Multiplex PCR Mix 1	25 µl
Multiplex PCR Mix 2	1.25 ml x 2

### 実験例1：マルチプレックスPCR

#### 【方法】

ヒトゲノムDNAを鋳型とする10対のプライマー(増幅サイズ: 84 bp、100 bp、116 bp、153 bp、183 bp、237 bp、273 bp、319 bp、432 bp、650 bp)のうち4対、8対、および10対を用い、*TaKaRa Taq*<sup>TM</sup> HS、*TaKaRa Ex Taq*<sup>®</sup> HSならびに Multiplex PCR Assay Kit を使用してマルチプレックスPCRを行った。いずれも50 µl 反応系に鋳型として50 ngのヒトゲノムDNAを添加し、各プライマーは最終濃度0.2 µMで使用した。また、A社マルチプレックス用キットを用いて、同様のマルチプレックスPCRを推奨条件下で行い比較した(図1)。

[ 反応条件 ]	94	1分	
	94	30秒	
	57	90秒	30 サイクル
	72	90秒*	
	72	10分	

\* : *TaKaRa Taq*<sup>TM</sup> HS、*TaKaRa Ex Taq*<sup>®</sup> HS の場合は30秒に設定

#### 【結果】

*TaKaRa Taq*<sup>TM</sup> HS や *TaKaRa Ex Taq*<sup>®</sup> HS では、ターゲットが4個の場合でも増幅効率の悪いバンドやエキストラバンドが認められましたが、Multiplex PCR Assay Kit では、10種類のプライマー対による増幅が1チューブのPCRで良好に行えていることが確認できました。この結果は、◀印で示すエキストラバンドが認められたA社マルチプレックスPCR用キットの結果と比べて同等以上でした。

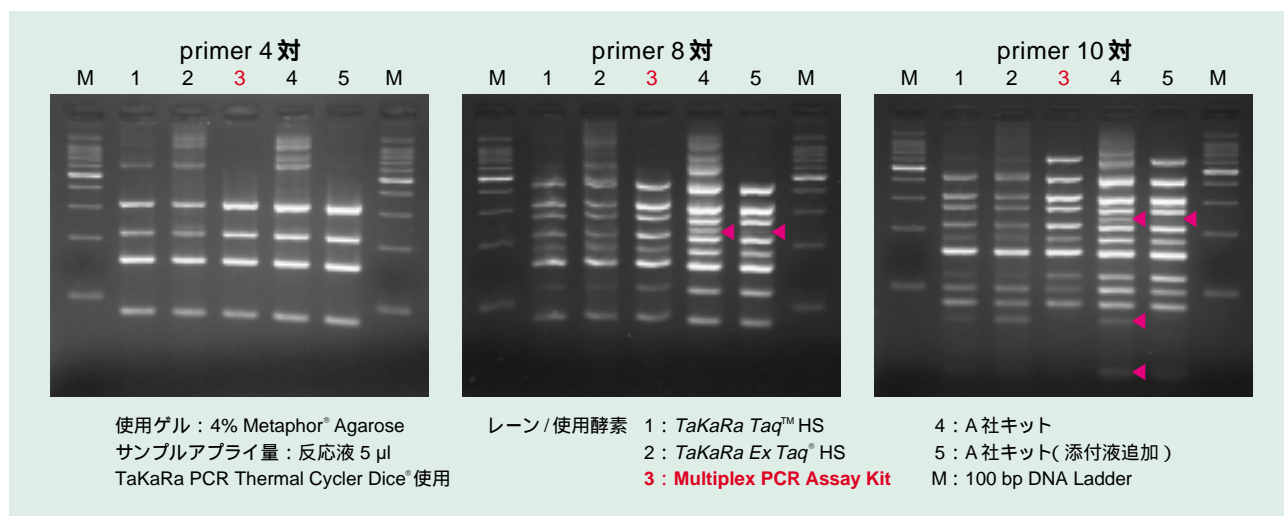


図1 マルチプレックスPCRの電気泳動結果

## 実験例 2：シングルPCRにおける反応特異性の上昇

### 【方法】

ラン藻ゲノムDNAおよびヒトゲノムDNAを鋳型とし、反応特異性の低いプライマー対による増幅を、*TaKaRa Ex Taq*<sup>®</sup> HS ならびに Multiplex PCR Assay Kit を用いて比較した（増幅サイズ：ラン藻ゲノムDNA 400 bp、ヒトゲノムDNA 250 bp および 650 bp）。

反応系は 25 μl とし、鋳型としてラン藻ゲノムDNA は 5 ng、ヒトゲノムDNA は 25 ng を使用した。プライマーはそれぞれ最終濃度 0.1 μM で使用した。

【反応条件】	94	1分	
	94	30秒	
	55	30秒	35 サイクル
	72	2分	

### 【結果】

*TaKaRa Ex Taq*<sup>®</sup> HS ではプライマー特性によりエキストラバンドやスミアが多く認められる反応も、Multiplex PCR Assay Kit を用いることで、それらのエキストラバンドやスミアが劇的に減少し、目的産物が特異的に増幅していることが確認できました。

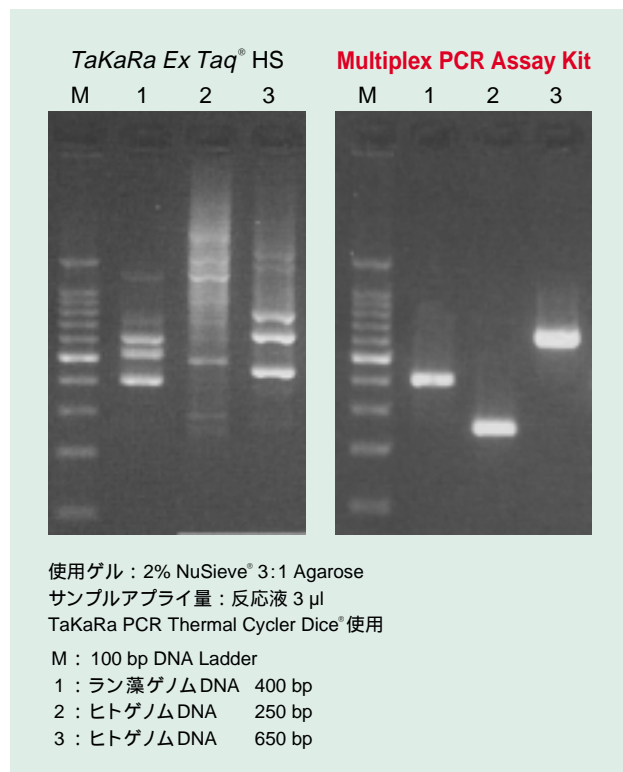


図2 シングルPCRでの反応特異性の改善

## 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、 $T_m$  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 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 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。

### 関連製品

- ・TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Gradient  
 製品コード TP600 1台 ¥780,000

本文中の製品に該当するライセンス確認事項は35ページをご覧ください。

[1](#) [2](#) [18](#)