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ータン 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でスメ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 µg(Clontech社)を鋳型とし、25 µl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(970 bp)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*® 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 山の反応系に、逆転写反応液を滅菌蒸留水で10倍に 希釈したもの1 μl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 µMで、その他のプライマーは最終濃度0.2 μMで使用した。

[装置] TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (終売) 「PCR条件] 94℃ 1分

> 94℃ 30秒 57℃ 90秒 35サイクル 72℃ 4分* 72℃ 10分

*: TaKaRa Ex Tag® HSの場合は2分に設定

【結果】

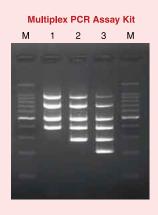
TaKaRa Ex Tag® HSでもマルチプレックスPCRは行えましたが、 Multiplex PCR Assay Kitを使用した反応では、5対、6対のプ ライマーを使用した場合の長い鎖長の増幅産物量に明確な差 が認められ、またエキストラバンドも低減していました。この結果は、 A社マルチプレックスPCR用キット(添付液追加)の結果と同等 でした(図1)。

■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

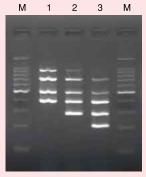
【方法】

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。

A社キット(添付液追加)



使用ゲル: 3% NuSieve® 3:1 Agarose サンプルアプライ量:反応液5μ



TaKaRa Ex Taq® HS

A社キット

レーン:使用プライマー

: TFR+Cyclophilin+HPRT+GAPDH

: 1 + Ribosomal L32 : 2 + Ribosomal L19 : 100 bp DNA Ladder

図1 cDNAを鋳型としたMultiplex PCR

[primer pair]

これらより、primer mix-7(7 対; primer pair $1 \sim 7$)、primer mix-8(8対; primer pair $1 \sim 8$)、primer mix-9(9対; primer pair $1 \sim 9$)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 $TaKaRa\ Ex\ Taq^{\otimes}$ 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 50μ lの反応系に、 $10\ ng/\mu$ lのTthHB8 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® Gradient **(終売)** [PCR条件] 94℃ 1分

```
↓
94°C 30秒
57°C 90秒
72°C 4分*
↓
72°C 10分
```

*: TaKaRa Ex Tag® HSの場合は2分に設定

【結果】

 $TaKaRa\ Ex\ Taq^{\$}$ 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 \triangleleft)、primer mix-9(9対目 \blacktriangleleft)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)。

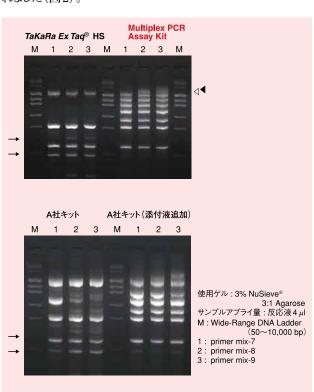


図2 Tth ゲノムDNAを鋳型としたマルチプレックス PCR

■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℃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、 スメ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(50μl反応系) ¥31,000 製品コード RR060B(A×4) 400回(50μl反応系) ¥99,000

• TaKaRa Ex Tag® 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 2μg ¥31,000

本文中の製品に該当するライセンス確認事項は39ページをご覧下さい。 [1][2][8]