

製品コード RR060A

研究用

---

**Takara**

**Multiplex PCR Assay Kit**

---

説明書

v201510Da

---

マルチプレックス PCR は、一つの PCR 反応系に複数のプライマー対を同時に使用することで、複数の遺伝子領域を同時に増幅する方法です。マルチプレックス PCR を行うことで、試薬や機材の節約による経済性、同時検出による迅速性でのメリットに加え、貴重なサンプルの有効利用も可能です。

しかし、マルチプレックス PCR を行う際には、それぞれのターゲットの増幅が一つの PCR 反応系で良好に行えるように、使用するプライマーの設定、反応条件の検討を行わなければならない、煩雑な作業が必要となります。

本キットは、そのような煩雑な作業を必要とせず、最小限の検討でマルチプレックス PCR を行うことができるように調製されたキットです。PCR 初期のミスプライミングを軽減するための Hot Start 用酵素と反応特異性を向上させる独自のアクセサリータンパク質を用いて至適化した反応 Mixture で構成されています。

また、マルチプレックス PCR 以外にも、extra band やスミアが多数出現し、目的の増幅フラグメントを得にくいプライマー対を用いるシングル PCR においても、本キットを使用することで extra band やスミアを低減し、目的の増幅断片を特異的に増幅することが可能です。

## I. 内容 (100 反応分 ; 50 $\mu$ l 反応系)

Multiplex PCR Mix 1	25 $\mu$ l
Multiplex PCR Mix 2 *	1.25 ml $\times$ 2 本

\* : 反応に必要なバッファー、dNTP Mixture が含まれています。Mg<sup>2+</sup>濃度は最終濃度 2 mM です。

## II. 保存

− 20°C

## III. 操作上の注意

本キットを使用する場合の注意事項です。**使用前に必ずお読みください。**

- (1) PCR の際に調製する反応液は、Master mix (Multiplex PCR Mix 1、Multiplex PCR Master Mix 2、滅菌水などの混合液) を数回〜 10 回分くらいまとめて調製すると便利です。Master mix を作ることで、ピペッティングによるロスや、試薬の分注・攪拌回数が少なくなり、正確な試薬の分注をおこなうことができます。その結果実験間のデータのバラツキも防げます。
- (2) Multiplex PCR Mix 1、Multiplex PCR Mix 2 の攪拌は泡立えないようにゆるやかに行ってください。ボルテックスによる攪拌は避けてください。また、ピペッティングの前に試薬を軽く遠心してチューブの底に落としてください。  
Multiplex PCR Mix 1 は 50%グリセロール溶液で粘度が高いので、注意深くゆっくりとピペッティングを行ってください。
- (3) Multiplex PCR Mix 1、Multiplex PCR Mix 2 は使用直前まで − 20°C で保存し、使用後は直ちに − 20°C に保存してください。
- (4) 試薬の分注を行うときは、必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。
- (5) 本説明書中に記載されている PCR 条件は TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® を用いた場合のもので、他の遺伝子増幅装置をご使用される場合は至適 PCR 条件が変わる可能性があります。

## IV. マルチプレックス PCR 用プライマーの設計方法

- ・各プライマーの Tm 値の差をできるだけ小さくする。
- ・ターゲットの長さが 1 kb 以下になるようにする。
- ・20 ~ 25 mer のプライマー長で、GC 含量が 50 ~ 60% となるようにし、部分的に GC あるいは AT リッチにならないようにする。
- ・あらかじめターゲット毎に反応を行い、非特異的な反応の有無、および反応性を確認しておく。

## V. 操作

### A. マルチプレックス PCR

- (1) 以下の反応液を、0.2 ml 反応チューブに調製する。

試薬	使用量
Multiplex PCR Mix 2	25 $\mu$ l
Primer mix*	適宜
Multiplex PCR Mix 1	0.25 $\mu$ l
template DNA	適宜
dH <sub>2</sub> O	up to 50 $\mu$ l

\*：各プライマーは、通常それぞれが最終濃度 0.2  $\mu$ M となるように加える。  
反応によっては使用量を変化させることで結果が改善されることがある。

- (2) Thermal Cycler にセットし、以下の反応条件で反応を行う。

94°C、60 sec.  
↓  
94°C、30 sec.  
57 ~ 60°C、90 sec. } 30 ~ 40 cycles  
72°C、90 sec.\*  
↓  
72°C、10 min.

\*：増幅鎖長 1 kb までの反応条件。1 kb 以上の長いターゲットの増幅を行う場合は、1 kb につき 2 分を目安に設定する。

- (3) 反応後、反応液の一部を電気泳動などで解析する。1 kb までのマルチプレックス PCR の場合、3 ~ 4% アガロースゲル (PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A) など) を使用すると、それぞれの増幅産物を分離良く泳動することができる。

---

B. PCRの特異性を上げたい場合 (プライマー 1 対を使用)

(1) 以下の反応液を、0.2 ml 反応チューブに調製する。

試薬	使用量
Multiplex PCR Mix 2	25 $\mu$ l
Primer 1 (20 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
Primer 2 (20 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
Multiplex PCR Mix 1	0.25 $\mu$ l
template DNA	適宜
dH <sub>2</sub> O	up to 50 $\mu$ l

(2) Thermal Cycler にセットし、以下の反応条件で反応を行う。

94°C、 30 sec.  
↓  
94°C、 30 sec.  
55 ~ 60°C、 10 ~ 15 sec.\*1  
72°C、 x sec.\*2 } 30 ~ 40 cycles

あるいは、

↓  
94°C、 30 sec.  
65°C、 x sec.\*2 } 30 ~ 40 cycles

\* 1 : アニーリングの時間は短めに設定する

\* 2 : 1 kb までは、1分を目安に設定する。1 kb 以上の増幅を行う場合は、1 kb につき 2分を目安に設定する。

(3) 反応後、反応液の一部を電気泳動などで解析する。

## VI. 実施例

### (1) マルチプレックス PCR 反応例

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）を用いてマルチプレックス PCR を行った。

50  $\mu$ l 反応系に鋳型とする 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  $\mu$ M で使用した。

#### <サイクル条件>

94°C、60 sec.

↓

94°C、30 sec.

57°C、90 sec.

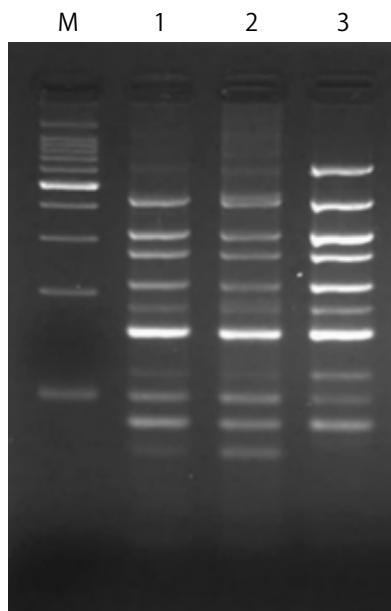
72°C、90 sec.

30 cycles

↓

72°C、10 min.

#### <結果>



M : 100 bp DNA Ladder

1 : *TaKaRa Taq™* HS

2 : *TaKaRa Ex Taq®* HS

3 : Multiplex PCR Assay Kit

4%アガロースゲル、反応液 5  $\mu$ l

(2) 非特異的反應産物の低減効果例（プライマー 1 対を使用）

反応特異性の低いプライマー（増幅サイズ 250 bp）を用いて、3 step、および 2 step の条件で増幅を行った。

50  $\mu$ l の反応系に鋳型として 50 ng のヒトゲノム DNA を添加し、プライマーは最終濃度 0.1  $\mu$ M で使用した。

<サイクル条件>

3 step PCR での反応

94°C、30 sec.

↓

94°C、30 sec.

55°C、10 sec.

72°C、60 sec.

↓

72°C、5 min.

35 cycles

2 step PCR での反応

94°C、30 sec.

↓

94°C、30 sec.

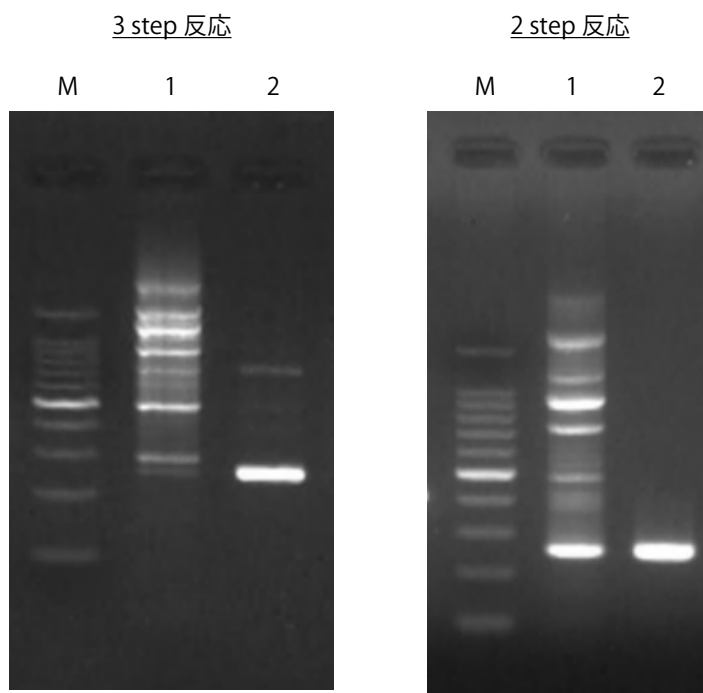
65°C、60 sec.

↓

72°C、5 min.

35 cycles

<結果>



2%アガロースゲル、反応液 5  $\mu$ l

M : 100 bp DNA Ladder

1 : *TaKaRa Ex Taq HS* を使用した増幅反応

2 : Multiplex PCR Assay Kit での反応

---

## VII. 至適パラメーターの設定

### <マルチプレックス PCR の場合>

- ・ アニーリング温度は 1°C 刻みで適切な温度を検討する。
- ・ アニーリングの時間は 90 秒を基本とする。
- ・ 伸長時間は 1 kb までのマルチプレックス PCR の場合は、90 秒を基本とする。さらに長いターゲットを増幅しようとする場合は、1 kb あたり 2 分を目安に設定する。

### < PCR の特異性を上げたい場合 > (プライマー 1 対を使用)

- ・ アニーリング温度は 1°C 刻みで適切な温度を検討する。
- ・ 3 step PCR で反応を行う場合、アニーリング時間はなるべく短くする（長くすると非特異的増幅が起こる場合がある）。

## VIII. トラブルシューティング

1. 増幅産物が少ない、見えない。
  - ・ アニーリングの温度を下げる。(1°C 刻みでの検証をお勧めします。)
  - ・ 鋳型量を増やす。
  - ・ PCR のサイクル数を増やす。
  - ・ プライマーの使用量を増やす。
  - ・ 鋳型 DNA の純度を確認する。(再調製を行う。)
2. 目的の増幅産物以外のバンドが得られた。
  - ・ アニーリングの温度を上げる。(1°C 刻みでの検証をお勧めします。)
  - ・ 鋳型量を少なくする。
  - ・ PCR のサイクル数を減らす。
  - ・ プライマーの使用量を減らす。
  - ・ cDNA を鋳型とする場合、pseudogene (偽遺伝子) の増幅がないかを確認する。(プライマーの再デザイン)
  - ・ PCR サイクル終了後に 72°C、10 分のステップを加える。

## IX. 関連製品

Multiplex PCR Assay Kit Ver.2 (製品コード RR062A)  
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)  
100 bp DNA Ladder (製品コード 3407A/B)  
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)  
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Gradient/Standard* (製品コード TP600/TP650)  
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap (製品コード NJ200)

## X. 注意

- 本製品は、研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- Thermal Cycler Dice、*TaKaRa Ex Taq* はタカラバイオ株式会社の登録商標です。*TaKaRa Taq*、PrimeGel はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。
- 本製品は、NEDO プロジェクトの成果のもとに製品化しました。

製品についての技術的なお問い合わせ先

**TaKaRa** テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

---

タカラバイオ株式会社