

## 高効率リアルタイムPCR用マスターミックス「KOD SYBR® qPCR Mix」を用いたプロモーター領域、CpGアイランドを含む領域の定量的増幅の事例

東洋紡(株) 敦賀バイオ研究所 松本 弘嵩

### はじめに

PCRではGCリッチな配列、例えばCpGアイランドを含む領域の増幅が困難であることが知られています。CpGアイランドは、哺乳類遺伝子のプロモーター領域の約50%以上を占めており、エピジェネティック解析の対象となる領域の一つです。このプロモーター領域の解析には、クロマチン沈降 (ChIP) 法を用いる方法が知られており、リアルタイムPCRによる定量が行われています。しかしながら、従来のTaq DNA polymeraseを用いたリアルタイムPCR試薬では、GC含量に偏りがあるGCリッチなターゲットを定量的に増幅できない場合があるため、CpGアイランドを含むプロモーター領域のリアルタイムPCRでは、プライマー設計が著しく困難になることがあります。



KOD SYBR® qPCR Mixは、KOD DNA polymerase (KOD) を使用したSYBR® Green I 検出系によるリアルタイムPCR用マスターミックスです。3' → 5' エクソヌクレアーゼ活性 (校正活性) を除去したKOD exo (-) DNA polymeraseと最適化されたバッファー条件を組み合わせることで、KODの優れた合成能を最大限に発揮し、70%を超えるようなGCリッチなターゲットにおいても安定したリアルタイムPCR測定が可能になっております。

今回は、本キットを用いて、GC含量に偏りのあるプロモーター領域と、CpGアイランドを含む領域の定量的な増幅を行った例をご紹介します。

### 方 法

#### 【増幅ターゲットとプライマー設計】

ターゲット1: Homo sapiens telomerase RNA (TR) gene のプロモーター領域 (GC含量:64%、増幅長:219bp)

```
CCCGCCCCGAGAGAGTGACTCTCACGAGAGCCGCGAGAGTCAGCTTGGCCAATCCGTGCGGTGCGCGGCCGCTCCCT
TTATAAGCCGACTCGCCCGCAGCGCACCGGGTTGCGGAGGGTGGCCCTGGGAGGGGTGGTGGCCATTTTTTGTCT
AACCCCTAACTGAGAAGGGCGTAGCGCCGTGCTTTTTGCTCCCCGCGCGCTGTTTTTCTCGCTGACTT
```

Primer #1:CCCGCCCCGAGAGAGTGAC (18bp, Tm: 68.6°C)

Primer #2:AAGTCAGCGAGAAAAACAGC (20bp, Tm: 61.1°C)

ターゲット2: Human β-actin のCpGアイランド (GC含量 :73%, 増幅長:131bp)

```
GCTTCCTTTGTCCCAATCTGGGCGCGCGCCGGCGCCCTGGCGCCTAAGGACTCGGCGCGCCGGAAGTGGCCA
GGGCGGGGGCGACTTCGGCTCACAGCGCGCCCGGCTATTCTCGCAGCTCACCATG
```

Primer #1: GCTTCCTTTGTCCCAATCT (20bp, Tm: 64.1°C)

Primer #2: CATGGTGAGCTGCGAGAATA (20bp, Tm: 63.9°C)

#### 【反応組成】

KOD SYBR® qPCR Mix	10 µl
50×ROX	0.4 µl
10pmol/µl Primer #1	0.4 µl
10pmol/µl Primer #2	0.4 µl
Human genomic DNA	X µl
DW	Y µl
total	20 µl

#### 【PCRサイクル】

98°C, 2 min.	40 cycles
↓	
98°C, 10 sec.	
60°C, 10 sec.	
68°C, 30 sec.	*Data collectionは伸長ステップに設定しました。
↓	
Melting	

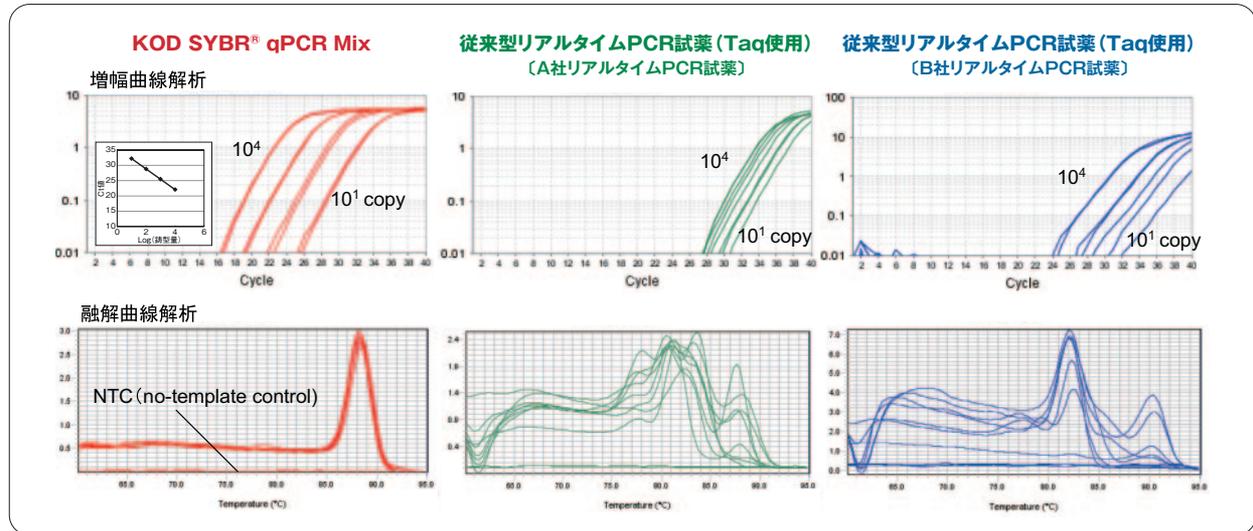
#### 【使用機器】

Applied Biosystems StepOnePlus™

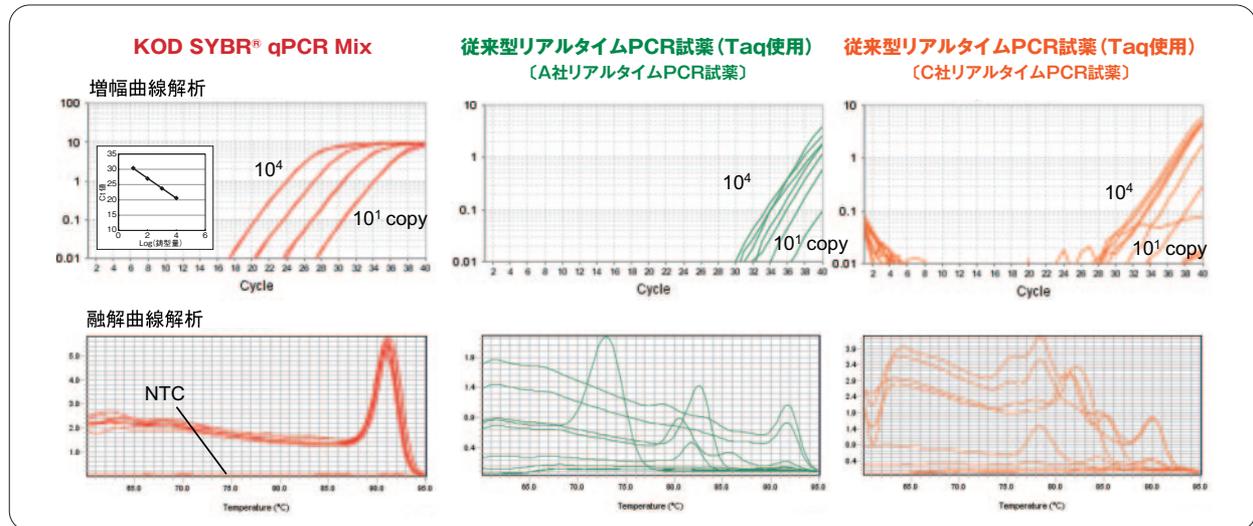
※比較のため、TaqベースのリアルタイムPCR試薬でも、取扱説明書推奨の条件にてリアルタイムPCRを実施し、比較を行いました。

結果及び考察

ターゲット1: Homo sapiens telomerase RNA (TR) geneのプロモーター領域 (GC含量:64%、増幅長:219bp)



ターゲット2: Human β-actin のCpGアイランド (GC含量:73%、増幅長:131bp)



GC含量が偏ったプロモーター領域をターゲットとした場合、従来のTaq DNA polymeraseをベースとしたリアルタイムPCR試薬では定量的な増幅が認められませんでした。KOD SYBR<sup>®</sup> qPCR Mixを使用することで、特異性が高く、定量的な増幅が認められるようになりました。また、no-template control (NTC) においてもプライマーダイマーが検出されませんでした。

通常のPCRと同様に、GC含量が偏ったターゲットのリアルタイムPCRによる増幅は、KOD DNA polymeraseを使用したリアルタイムPCR試薬の方が、Taq DNA polymeraseを使用したリアルタイムPCR試薬よりも適していると考えられます。

まとめ

本事例でお示したように、Taq DNA polymeraseを用いたリアルタイムPCR試薬で定量的な増幅が困難であった場合でも、KOD SYBR<sup>®</sup> qPCR Mixを使用することで、定量的な増幅が可能となります。GC含量が高いターゲットでも増幅可能であるため、従来困難であったプロモーター領域の定量も、KOD SYBR<sup>®</sup> qPCR Mixをご使用いただくことで、容易に行うことができると考えられます。

また、本キットはGCリッチなターゲットに限らず、Taq DNA polymeraseを用いたリアルタイムPCR試薬では困難な、長鎖ターゲット (~2kb) の定量的な増幅、クールドサンプル (マウステール、植物、血液等) からの増幅が可能です。そのため、Taq DNA polymeraseをベースとしたリアルタイムPCR試薬を用いた解析でお困りのターゲットをお持ちの方は、是非一度、KOD SYBR<sup>®</sup> qPCR Mixをお試しください。

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
KOD SYBR <sup>®</sup> qPCR Mix ・KOD SYBR <sup>®</sup> qPCR Mix ・50×ROX reference dye	1ml×1本 (40回用)	-20℃	QKD-201T	¥9,800
	1.67ml×3本 (200回用)	-20℃	QKD-201	¥32,000
	(1.67ml×3本)×5 (1,000回用)	-20℃	QKD-201X5	¥147,000

※50×ROX reference dyeがマスターミックスとは、別添付されています。

※包装欄に記載の反応回数は、50μl反応時のものです。容量は、KOD SYBR<sup>®</sup> qPCR Mixのみ示しています。