

## 「KOD FX Neo」を用いた短鎖および長鎖ターゲットのマルチプレックスPCRによる検出例

東洋紡（株） 敦賀バイオ研究所 新井 康広

### はじめに

マルチプレックスPCRとは、1回の反応で複数のターゲットを増幅するPCRです。マルチプレックスPCRは、試薬、機材や時間を節約することができ、複数のPCR産物を同時に検出することができるというメリットがあります。

しかしながら、マルチプレックスPCRでは、非特異増幅やプライマーダイマーが発生しやすくなる、また各ターゲットの増幅効率に隔たりが出やすいといった問題点が存在します。これらの問題点を解決するために、バッファー組成やプライマー配列を最適化する必要があります。

KOD FX Neoは長鎖ターゲットの増幅に強く、成功率が高いという利点を有しています。さらに、クルード成分の阻害に強いといった特長を有しています。今回はKOD FX Neoの特長を生かして、短鎖および長鎖のターゲットに対して精製・クルードサンプルからのマルチプレックスPCRを行った例をご紹介します。

### 精製サンプルからのマルチプレックスPCR増幅

KOD FX Neoを使用してマルチプレックスPCRを実施しました。マルチプレックスPCRとして、一般的に行われている1kb以下の短鎖マルチプレックスPCRだけでなく、KOD FX Neoの高い伸長性と増幅効率を生かして1kb～10kbと比較的長い長鎖の広い範囲でのマルチプレックスPCRについて評価を行いました。

### 方 法

#### 短鎖マルチプレックスPCR

DMD/BMD遺伝子増幅用のプライマー<sup>\*1</sup>を用いて短鎖マルチプレックスPCRを行いました。KOD FX Neoを使用し、以下に示す反応組成とPCRサイクルで実施しました。他のPCR試薬については取扱説明書推奨の条件にてPCRを実施し、比較を行いました。

\*1 : Alan H.Beggs *et al.*, *Human Genetics*, **1990**, *86*, 45-48

#### 短鎖ターゲット（増幅長）

PmF (535bp), Exon3 (410bp), Exon6 (202bp), Exon13 (238bp), Exon43 (357bp), Exon47 (181bp), Exon49 (439bp), Exon50 (271bp), Exon60 (139bp)

#### 長鎖マルチプレックスPCR

長鎖マルチプレックスPCRでは以下に示される1kb～10kbの増幅長のターゲットについてPCRを行いました。KOD FX Neoを使用し、以下に示す反応組成とPCRサイクルで実施しました。他のPCR試薬については取扱説明書推奨の条件にてPCRを実施し、比較を行いました。

#### 長鎖ターゲット（増幅長）

Chrome9 (1kb), MSH6 (1.8kb), BRCA2 (2.25kb), WT-1 (2.5kb), FANCE (3kb), RAD51D (4kb), KRAS (5kb), BRCA1 (7kb), DDB2 (10kb)

#### 【反応組成】

DW	7 $\mu$ l
2xBuffer for KOD FX Neo	25 $\mu$ l
2mM dNTPs	10 $\mu$ l
Primer mix (各primer : 2.5 pmol/ $\mu$ l)	6 $\mu$ l
50 ng/ $\mu$ l Human genomic DNA	1 $\mu$ l
KOD FX Neo	1 $\mu$ l
total	50 $\mu$ l

#### 【PCRサイクル】

##### 短鎖マルチプレックスPCR

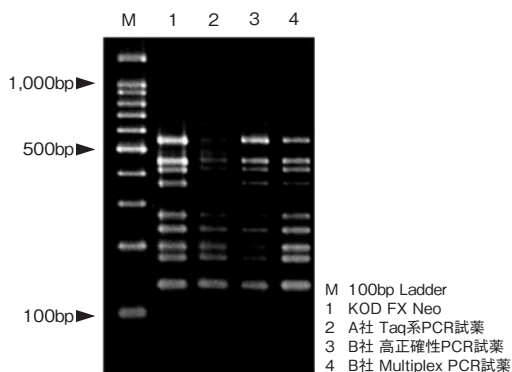
98°C, 2min.	30 cycles
↓	
98°C, 10sec.	
60°C, 30sec.	
68°C, 1min.	↓
↓	4°C

##### 長鎖マルチプレックスPCR

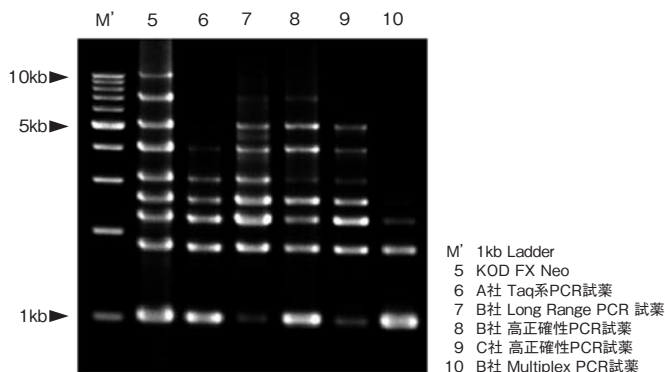
98°C, 2min.	30 cycles
↓	
98°C, 10sec.	
68°C, 10min.	
↓	4°C

結果および考察

短鎖マルチプレックスPCR



長鎖マルチプレックスPCR



短鎖マルチプレックスPCRにおいて、KOD FX Neoが最も均一な増幅を示しました。また、長鎖マルチプレックスPCRでは、KOD FX Neoのみ他のポリメラーゼで増幅が困難であった7kbと10kbのターゲットを含むすべてのターゲットの増幅が確認できました。以上の結果より、KOD FX Neoは短鎖から長鎖までの幅広い範囲においてマルチプレックスPCRに適用することが可能であると考えられます。

クルードサンプルからのマルチプレックスPCR増幅

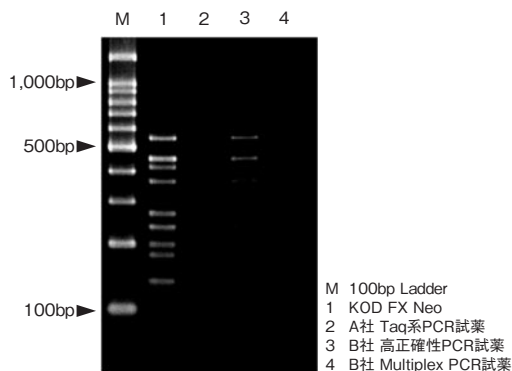
KOD FX Neoはクルード成分の阻害を受けにくい特長を持っています。そこで、この特長を生かして血液サンプルからマルチプレックスPCRによる増幅を実施しました。

方法

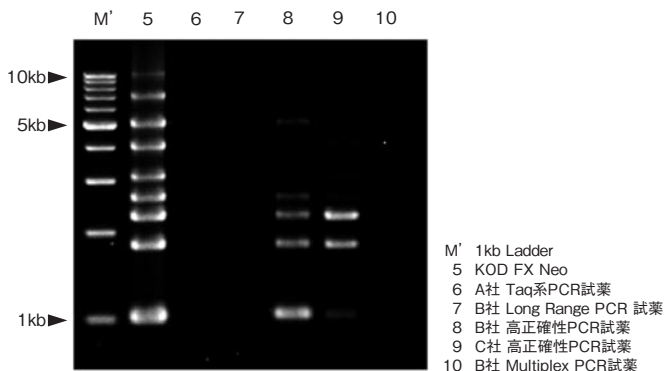
反応組成とPCRサイクルは前述の短鎖および長鎖マルチプレックスPCRと同条件で行い、50ng/μl Human genomic DNAの代わりに血液2.5μlをテンプレートとしてPCR増幅を行いました。

結果および考察

短鎖マルチプレックスPCR(クルードサンプル)



長鎖マルチプレックスPCR(クルードサンプル)



KOD FX Neoは血液サンプルからの増幅においても、短鎖および長鎖マルチプレックスPCRの両方で全てのターゲットの増幅が確認されました。KOD FX Neoを用いることで、血液などのクルードサンプルから前処理なしで直接マルチプレックスPCRが可能となることから、今まで煩雑だった様々な解析を効率化できる可能性があります。

まとめ

今回の検討において、KOD FX Neoを用いるマルチプレックスPCRにおける有用性が示されました。KOD FX Neoは正確性が高いという利点もあるため、増幅の有無やサイズの確認の他に、増幅産物を用いた様々な解析に応用可能であると考えられます。マルチプレックスPCRを行う際、是非一度、KOD FX Neo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 FX Neo KOD FX Neo (1.0U/μl) 2×PCR Buffer for KOD FX Neo 2mM dNTP	200U×1本 [200回用]*	-20℃	KFX-201	¥35,000
	(200U×1本)×5 [1,000回用]*	-20℃	KFX-201X5	¥140,000
	(200U×1本)×10 [2,000回用]*	-20℃	KFX-201X10	¥260,000

\*包装欄に記載の反応回数は、50μl反応時のものです。