

特異的かつ均一なマルチプレックス PCR に最適！ NGS 用のテンプレート調製に！

マルチプレックス PCR・バイサルファイト処理 DNA 用 高正確性 PCR 酵素

TOYOBO
Beyond Horizons

KOD-Multi & Epi-[®]

KOD-Multi & Epi-[®]

- NGSのテンプレート調製に！
- エピジェネティクス解析に！
- メタゲノム解析に！

改変型
KOD使用

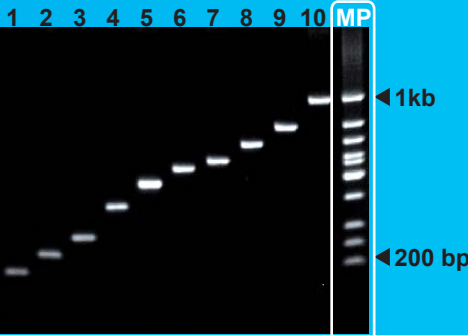
待望の PCR 酵素登場

Multiplex PCR を用いるテンプレート調製に！
バイサルファイト処理 DNA からの増幅に最適！

お試しサンプル(20回用)を
ご用意しております。

Multiplex PCR

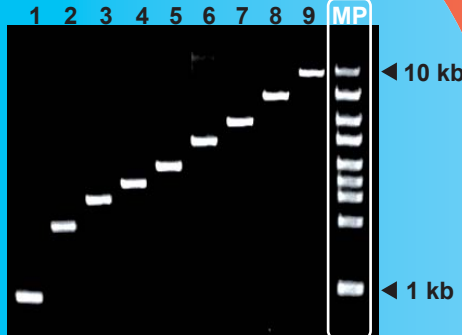
<短鎖：1kb 以下>



1: DDB2 (200 bp), 2: FANGC (250 bp), 3: HBg (300 bp), 4: CDH1 (400 bp), 5: chromosome9 (500 bp), 6: ERCC4 (550 bp), 7: HRAS (600 bp), 8: PRF1 (700 bp), 9: BRCA1 (800 bp), 10: CDK4 (1000 bp), MP: Multiplex PCR (1 ~ 10)

テンプレート： ヒトゲノム DNA 50 ng/ 50 μL 反応

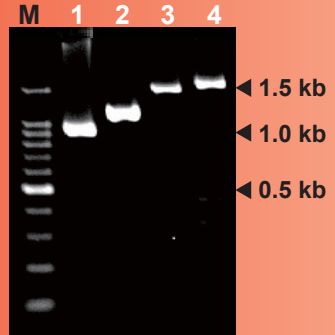
<長鎖：1 ~ 10kb>



1: Chrom9 (1 kb), 2: MSH6 (1.8 kb), 3: BRCA2 (2.3 kb), 4: WT-1 (2.5 kb), 5: FANCE (3 kb), 6: RAD51D (4 kb), 7: KRAS (5 kb), 8: BRCA1 (7 kb), 9: DDB2 (10 kb), MP: Multiplex PCR (1 ~ 9)

テンプレート： ヒトゲノム DNA 50 ng/ 50 μL 反応

Bisulfite PCR



M: 100bp DNA Ladder, 1: TGFβ(917 bp, AT 含有率 69.9%), 2: BRCA2(1,134 bp, AT 含有率 63.9%), 3: APOE(1,487 bp, AT 含有率 69.1%), 4: TGFβ(1,583 bp, AT 含有率 61.8%)

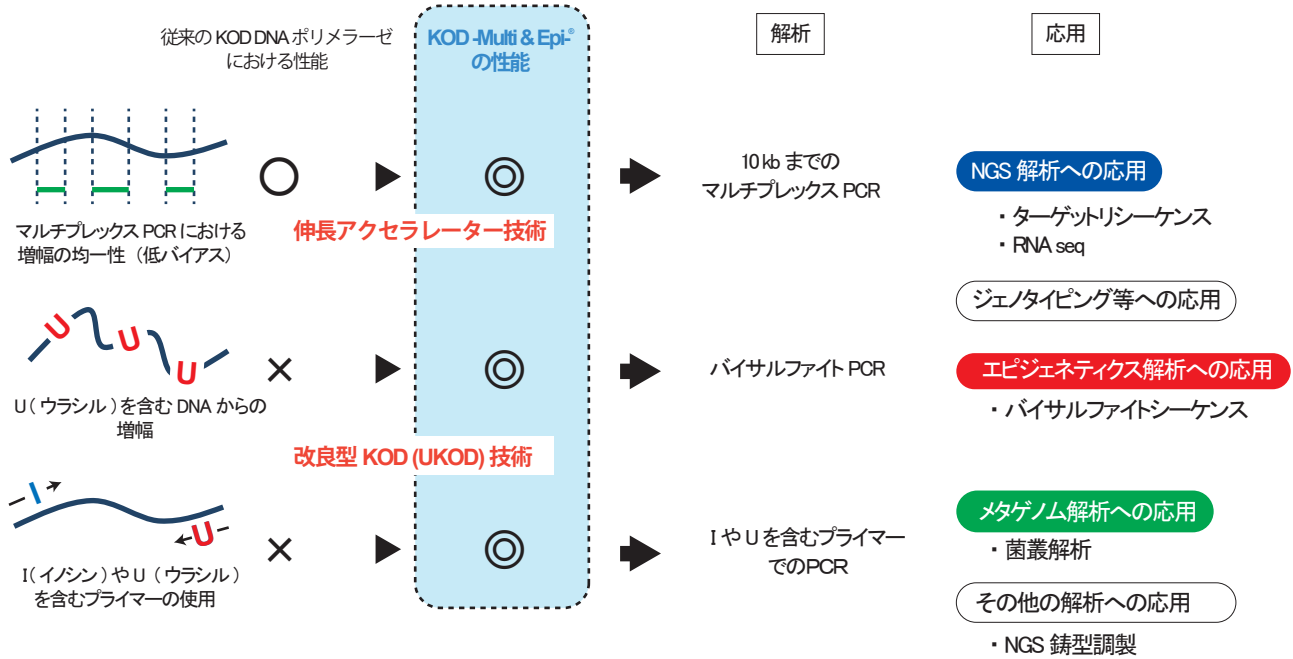
テンプレート： バイサルファイト処理 ヒトゲノム DNA 55 ng/ 50 μL 反応

特長

- 均一な増幅（低バイアス） ▶ 10kb までの幅広い範囲でマルチプレックス PCR を実現
※通常の PCR ではヒトゲノム DNA から約 40kb の増幅を確認しています。
- ウラシルを多く含む DNA からの増幅 ▶ バイサルファイト処理 DNA からの増幅に対応
- イノシンやウラシルを含むプライマーに対応 ▶ メタゲノム解析などへ応用が可能
- 高正確性 ▶ 正確性は Taq の約 11 倍 (KOD FX シリーズと同等)
- クロードサンプルに対応 ▶ 血液や各種ライセート (マウステール、植物等) に対応
- 高効率 (高速 PCR、高 GC・AT 対応) ▶ 難配列を含むターゲットの効率的増幅を実現

ウラシルを多く含むバイサルファイト処理 DNA からの増幅に最適！ 高正確だから安心！

KOD -Multi & Epi[®] の性能と応用範囲



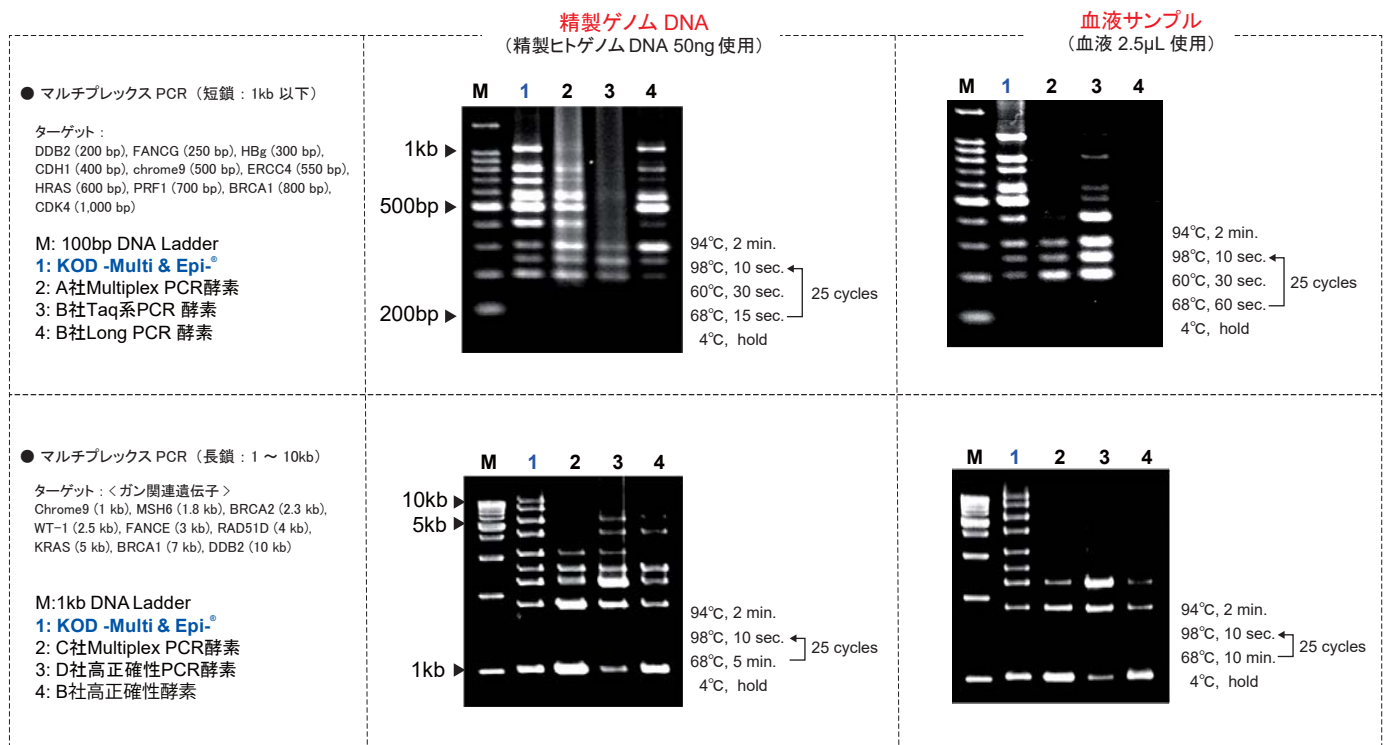
マルチプレックス PCR

・KOD -Multi & Epi[®] は約 10 kb までのマルチプレックス PCR に対応します。

※ 通常の PCR はヒトゲノム DNA から 40kb までの増幅を確認しています。

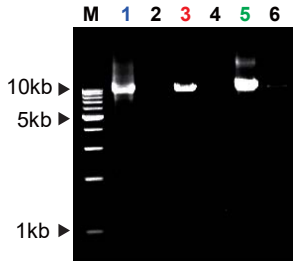
実施例 1 マルチプレックス PCR 性能比較

精製したヒトゲノム DNA および血液サンプルを用いて、1kb 以下、および 1 ~ 10kb の複数のターゲットを様々な PCR 酵素でマルチプレックス PCR を行い性能を比較しました (50 μL 反応系)。その結果、KOD -Multi & Epi[®] を用いた場合のみ、すべての条件でバイアスの少ない良好な結果を得ることができました。KOD -Multi & Epi[®] は、血液成分の阻害をうけにくく、精製ゲノム DNA からの増幅と同様にバイアスの少ない増幅結果を示しました。



実施例 2 NGS を用いた長鎖 (10kb) ターゲットのマルチ増幅におけるバイアスの検証

10 種類の 10kb のターゲット (そのうち 5 種類のターゲットは GC 含量 70% の領域が 300bp 以上ある領域を含む) を 6 種類の PCR 試薬にて増幅を行い、増幅が確認できた試薬の PCR 産物を精製した後に Covaris® で断片化し、TruSeq® nano LT kit (illumina) を用いてライブラリーを調製し、MiSeq® (illumina) を用いてシーケンス解析を行いました。最もリード数の多いターゲットを基準 (1.0) としてそれぞれのリード数の比をプロットしました。



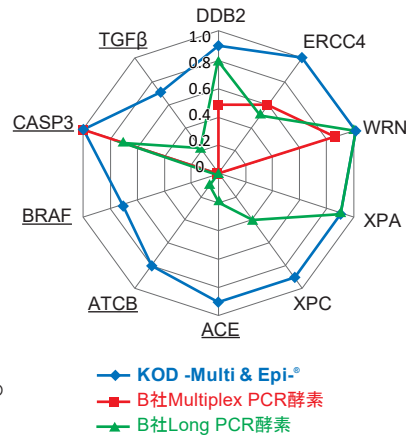
【PCR サイクル条件】
94°C, 2 min.
98°C, 10 sec. ← 25 cycles
68°C, 5 min.
4°C, hold

M: 1kb DNA Ladder
1: KOD -Multi & Epi-®
2: C社 Multiplex PCR 酵素
3: B社 Multiplex PCR 酵素
4: D社 高正確性 PCR 酵素
5: B社 Long PCR 酵素
6: B社 高正確性 PCR 酵素

ターゲット:
DDB2, ERCC4, WRN, XPA, XPC,
ACE, ATCB, BRAF, CASP3, TGFβ

※下線のターゲット遺伝子は GC 含量 70% の領域が 300bp 以上ある領域を含む。

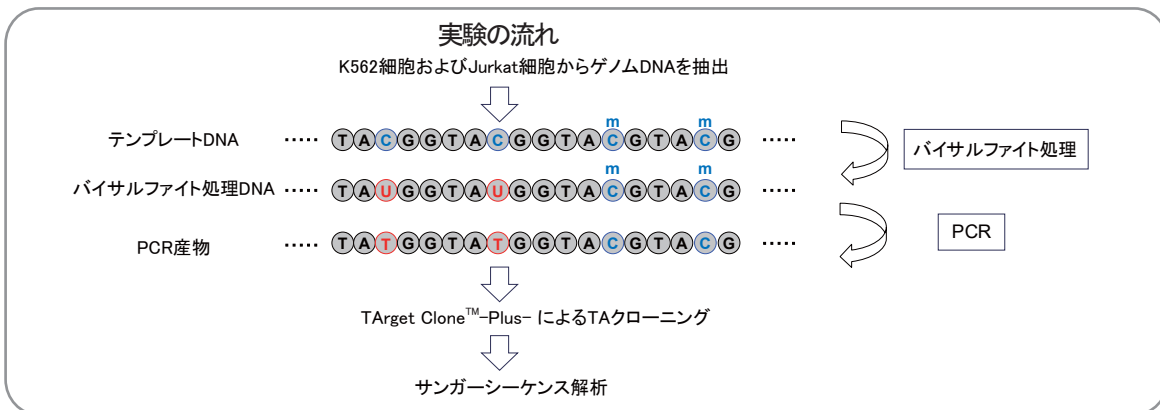
NGS 解析



電気泳動の結果では、レーン 3,5 の B 社の試薬においても良好な増幅を確認できましたが、NGS 解析の結果、増幅に偏りが生じていました。一方、KOD -Multi & Epi-® は 10 種類のターゲットにおいては、リード数の比が 0.6 ~ 1.0 の中にあることから、均質に増幅したことが分かりました。

バイサルファイト PCR

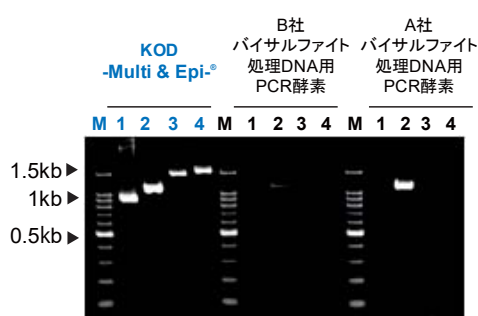
・バイサルファイト処理した DNA から、約 1.5 kb までの DNA 断片を高効率に増幅することができます。



実施例 3 バイサルファイト処理 DNA の増幅効率の比較

バイサルファイト処理を行った Jurkat 細胞由来のメチル化 DNA (55ng) を鋳型として使用し、900~1,500bp の増幅を種々の DNA ポリメラーゼで比較しました。その結果、KOD -Multi & Epi-® は約 1.5 kb までのターゲットについて良好な結果を示しました。さらに、1,583bp の増幅産物に関して、クローニングキット (T-Target Clone™-Plus-) を用いてクローニングした後に、シーケンス解析を行い、バイサルファイト変換されたターゲットが増幅されていることを確認しました (データ示さず)。

また、TGFβ (917bp) について、テンプレート量の検討を行いました。その結果、5ng まで検出することが可能でした。バイサルファイト処理を行うことにより、DNA が断片化されることが知られていますが、そのようなサンプルを用いた場合においても、KOD -Multi & Epi-® を用いて約 1kb のターゲットを高感度で検出することが可能でした。



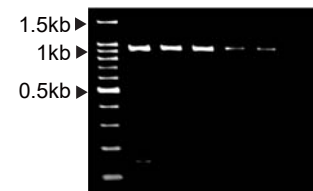
【バイサルファイト処理方法】
EpiTect® Fast DNA Bisulfite Kit (QIAGEN 社)

【サイクル条件】
94°C, 2 min.
98°C, 10 sec.
60°C, 30 sec.
68°C, 30 sec./kb
4°C, hold

M 100bp ladder
1: TGFβ (917 bp, AT 含有率*: 69.9%)
2: BRCA2 (1134 bp, AT 含有率 63.9%)
3: APOE (1487 bp, AT 含有率 69.1%)
4: TGFβ (1583 bp, AT 含有率 61.8%)

*バイサルファイト処理後の AT 含有率を示しています。

バイサルファイト処理 DNA 量 / 反応
M 100bp ladder
100 25 5 1 (ng)



【サイクル条件】
94°C, 2 min.
98°C, 10 sec.
60°C, 30 sec.
68°C, 30 sec.
4°C, hold

I (イノシン) や U (ウラシル) を含むプライマーを用いる PCR

・ I (イノシン) や U (ウラシル) を含むプライマーを用いる高効率かつ高正確な PCR が可能です。

実施例 4 イノシンを含むプライマーを用いた増幅効率比較

イノシンを含む縮重プライマーを *E. coli* の DNA ポリメラーゼ I のアミノ酸配列から設計し、KOD -Multi & Epi-® と KOD -Plus- Ver.2 (従来品) で増幅を行いました。その結果、KOD -Multi & Epi-® を用いることで、従来の KOD DNA ポリメラーゼ等の高正確性 PCR 酵素では使用できなかったイノシンを含む縮重プライマーで増幅することができました。同様にウラシルを含むプライマーを用いる増幅も可能です。

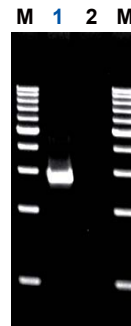
【テンプレート】 *E. coli* ゲノム 100 ng

【サイクル条件】

94°C, 2 min.
98°C, 10 sec. ← 35 cycles
60°C, 30 sec.
68°C, 45 sec.
4°C, hold

【プライマー配列】

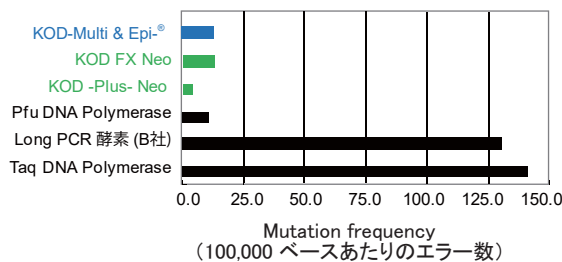
DNA ポリメラーゼ I (2.8kb)
Primer F : ATGGTICARATHCCICARAAY
Primer R : RTGIGCYTGRTCCARTTYTC



M: 1kb DNA Ladder
1: KOD -Multi & Epi-®
2: KOD -Plus- Ver.2 (従来品)

KOD -Multi & Epi-® の PCR 時の正確性について

Taq DNA ポリメラーゼの約 11 倍の正確性 (KOD FX Neo と同等) を示し、増幅産物を様々な用途に用いることができます。



*PCR エラー率は、各酵素にてヒトゲノム DNA を鋳型に β -globin 遺伝子 (2.4 kb) の増幅を行い、PCR 産物を TA クローニング後、96 クローンをシーケンス解析し、測定しました。

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格 (税別)
マルチプレックス PCR・バイサルファイト処理 DNA 用高正確性 PCR 酵素 KOD -Multi & Epi-® ・ KOD -Multi & Epi-® (1.0 U/ μ L) ・ 2×PCR Buffer for KOD -Multi & Epi-® **	200U × 1 本 [200 回用]*	-20°C	KME-101	¥38,000
	(200U × 1 本) × 5 [1,000 回用]*	-20°C	KME-101X5	¥152,000
	(200U × 1 本) × 10 [2,000 回用]*	-20°C	KME-101X10	¥285,000

* 50 μ L 応を行った時の反応回数で表示しています。

** 2×PCR Buffer for KOD -Multi & Epi-® には、dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) および Mg²⁺ (最終濃度 2.0mM) が含まれます。

関連商品

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格 (税別)
高効率 TA クローニングキット TARget Clone™ -Plus-	10 回用	-20°C	TAK-201	¥18,000

KOD -Multi & Epi-® によって増幅された DNA の末端は平滑化されていますので、末端を制限酵素処理するか、平滑末端クローニングの手法を用いてクローニングを行う必要があります。また専用の TA クローニングキット「TARget Clone™ -Plus- [Code No. TAK-201]」を用いることで増幅産物に直接 A を付加し、そのまま容易に TA クローニングを行うことができます。

※ 本資料に記載している会社名および商品名・ロゴマークなどは、各社の商号、商標または登録商標です。

TOYOBO 東洋紡株式会社

バイオプロダクト営業部

(E-mail) order_lifescience@toyobo.jp

(大阪) 〒530-0001

大阪府大阪市北区梅田一丁目13番1号
大阪梅田ツインタワーズ・サウス
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833

(東京) 〒104-8345

東京都中央区京橋一丁目17番10号
住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951

テクニカルライン

(E-mail) tech_osaka@toyobo.jp

TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833

(9:00 ~ 12:00 13:00 ~ 17:00 [土日祝日、休日を除く])

WEBサイト

[<https://lifescience.toyobo.co.jp/>]



サンプル請求
フォーム