

GCリッチターゲット等の難配列の増幅に最適

高効率リアルタイムPCRマスターミックス

TOYOBO

KOD SYBR™ qPCR Mix

KOD

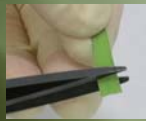


お試用サンプルとして、40回用の商品をご進呈いたします！

難配列

ロングターゲット

カールドサンプル

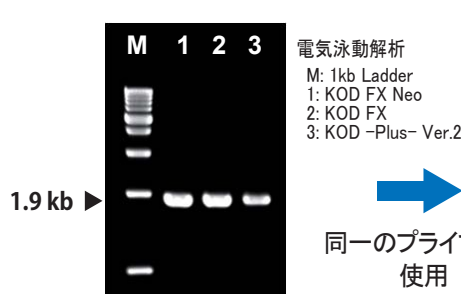


KOD exo(=) DNA Polymerase 採用で特異性アップ!

● プライマーの選択幅を広げたい方に！

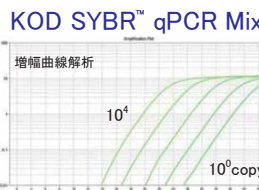
● せっかくプライマーを設計したのに、リアルタイムPCR用(増幅長:~200 bp)に変更が必要なのだ...

➡ ご心配なく、ターゲットが 2kb 以下ならばそのままご使用いただけます。



約 2 kb のターゲットまで定量可能

➡ 同一のプライマーを使用



➡ 融解曲線解析によるジェノタイプング解析などにも応用可能です

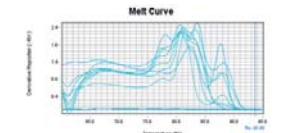
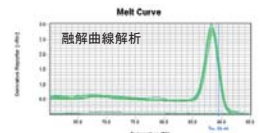
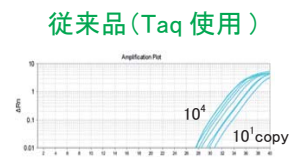
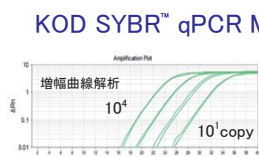
● 難配列を増幅したい方に！

● プロモーター領域の近傍で塩基に偏りがあるのですが...

➡ ご心配なく、そのようなターゲットでも効率良く増幅できる可能性があります。

CCCGCCGAGAGAGTGACTCTCACGAGAGCCCGGAGAGTCAAGCTTGGCCAATCCGTG
CGGTGGGGGGCGCTCCCTTTATAAGCCGACTCGCCCGGAGCGCACCGGGTTGCGG
AGGGTGGGCTGGGAGGGTGGTGGCCATTTTTGTCTAACCCCTAACTGAGAAGGGCG
TAGGGCCGCTGCTTTTGTCCCGGCGCTGTTTTCTCGCTGACTT

ターゲット配列 (GC 含量: 64%, 219 bp):
Homo sapiens telomerase RNA (TR) gene, promoter and complete sequence
テンプレート: ヒトゲノム DNA
プライマー (ChIP 法の論文より引用):
上記赤字で示した配列を使用しました。



今まで設計したプライマーを使用可能 プライマー設計の選択幅が広がります

KOD SYBR™ qPCR Mix は KOD DNA Polymerase の酵素特性（高効率、クルード成分の阻害を受けにくい）を活かし、SYBR™ Green I アッセイの利便性と汎用性を更に高めることを目指しました。

● 従来の試薬との特性比較

	従来品 (Taq 使用)	KOD SYBR™ qPCR Mix
酵素	Taq DNA Polymerase	KOD DNA Polymerase [exo(-) mutant]
増幅長	70 ~ 150 bp (最大: 300 bp)	70 bp ~ 2 kb
GC 含量の高いターゲットの増幅	不得意	GC 含量の影響を受けにくい
阻害物質の影響	受けやすい (DNA の精製が必要)	受けにくい (クルードサンプルからの増幅に適している)

■ 対応機種一覧表

さまざまな機器に対応するため、ROXが別添付されております。

メーカー	機種
Applied Biosystems	ABI PRISM® 7000/7700
	Applied Biosystems 7300, 7500/7500 Fast, 7900HT
	Applied Biosystems StepOne™/StepOnePlus™
	ViiA™ 7, QuantStudio
Bio-Rad/MJ	MiniOpticon™
	CFX96 Touch™
Roche Diagnostics	LightCycler® 1.x / 2.0
	LightCycler® Nano
	LightCycler® 480
Agilent Technologies	Mx3000P / Mx3005P / Mx4000
TaKaRa	Thermal Cycler Dice® Real Time System
BioFlux	LineGene

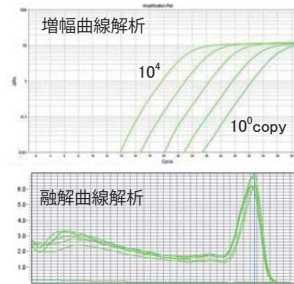
KOD SYBR™ qPCR Mix は、3'→5' エクソヌクレアーゼ活性（校正活性）を除去した KOD DNA Polymerase [KOD exo(-) DNA Polymerase] と最適化されたバッファー条件を組み合わせることで、以下のような特長を示します。

特長 1 長鎖ターゲットの増幅が可能（～ 2 kb）

● KOD DNA Polymerase の特長を活かして長鎖ターゲット増幅での定量性に優れます。プライマーの選択幅が格段に広がり、2 kb までのターゲットであれば、多くの場合今まで設計したプライマーをそのまま用いることも可能です。



KOD SYBR™ qPCR Mix



THUNDERBIRD® SYBR™ qPCR Mix (弊社従来品: Taq 使用)

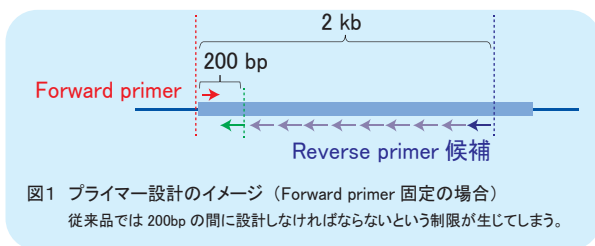
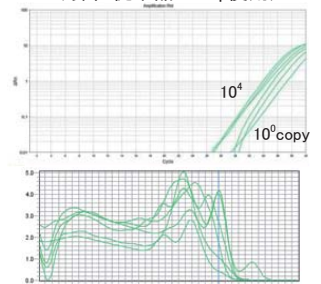


図2 長鎖ターゲットに対するリアルタイムPCR (ABI StepOnePlus™ 使用)

KOD FX シリーズや KOD-Plus- シリーズで増幅可能なプライマーを用い、約 2kb のターゲットの増幅を実施しました。その結果、Taq DNA Polymerase を用いる従来品では増幅困難な約 2kb のターゲットでも本製品では定量的な増幅が認められました。

● 融解曲線解析を用いるエンドポイントでのマルチプレックス PCR 解析に有利です。標準的な遺伝子において約 1kb までの増幅産物の Tm 値に変化を持たせることが可能です。

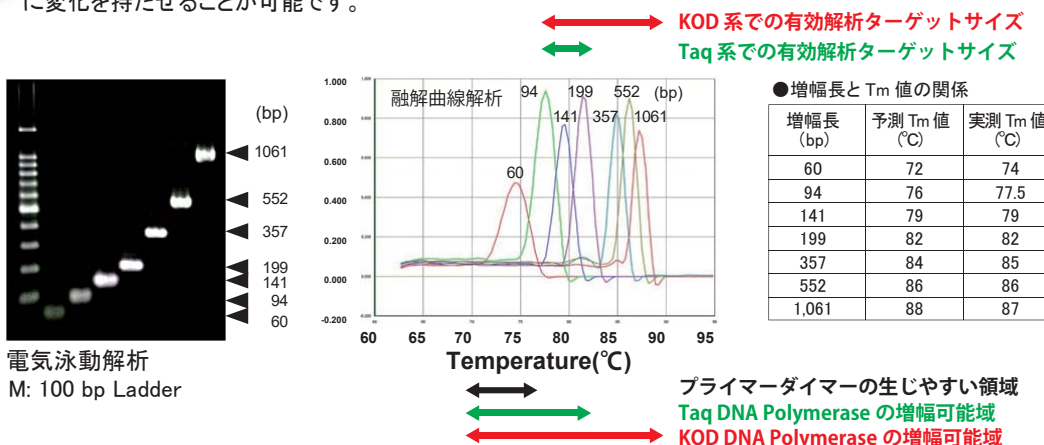


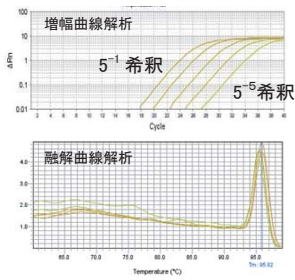
図3 増幅長が異なるターゲットを用いた解析例 (ABI 7500 使用)

ヒトゲノム DNA を鋳型に β -actin 遺伝子上の増幅長が異なるターゲットの増幅、及び融解曲線解析を実施しました。その結果、約 60bp ~ 1kb までの増幅産物が得られ、融解曲線解析によって 74 ~ 87°C の幅広い温度域で今回増幅した PCR 産物の識別が可能でした。本実施例のように、各増幅産物の Tm 値を約 3°C ずらして設計することで、エンドポイントでの増幅産物の識別が可能となります。よって、本方法をワンチューブでのジェノタイピング解析などにも応用することが可能です。増幅産物の Tm 値は計算によってある程度予測することが可能です。

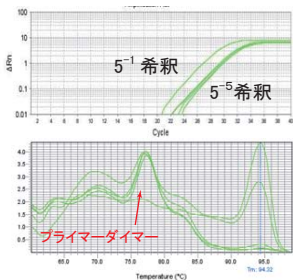
特長2 GC リッチターゲットに対応

KOD DNA Polymerase を使用することで、Taq DNA Polymerase を用いる従来品では困難だった GC 含量が 70% を超えるようなターゲットにおいても定量的な増幅が認められます。

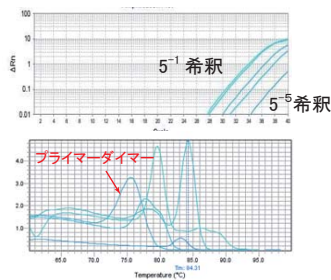
KOD SYBR™ qPCR Mix



A 社リアルタイム PCR 試薬 (高 GC 対応)



THUNDERBIRD® SYBR™ qPCR Mix (弊社従来品)



ターゲット：IGFR2 (189 bp / GC 含量：83%)
 鋳型：HeLa 細胞由来 cDNA
 Total RNA から高効率 cDNA 合成キット
 ReverTra Ace® qPCR RT Kit [Code No.FSQ-101]
 を用いて合成を行いました。

図4 GC リッチなターゲットに対するリアルタイム PCR 解析 (ABI StepOnePlus™ 使用)

GC 含量が 70% を超えるターゲットに対し、各リアルタイム PCR 試薬による反応性の比較を行いました。その結果、従来品では増幅困難であった高い GC 含量のターゲットにおいても定量的な増幅が認められました。また、プライマーダイマーを生じることなく、低コピーまでの広く定量を行うことができました。

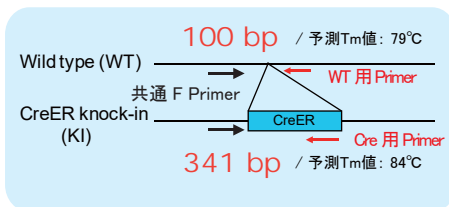
特長3 クールドサンプルを用いる解析が可能

クールド成分による障害を受けにくい、血液やマウステール、植物ライセート等を用いるアッセイが可能です。長鎖増幅や Tail 配列を付加したプライマーを用いる増幅によるジェノタイピング解析等に応用することができます。

マウステールライセートを用いるジェノタイピング例

アルカリ溶解法

1. Mouse tail (約 3mm) を採取し、マイクロチューブへ入れる。
2. 50 mM NaOH 180 μL を添加する。
3. 95°C, 10 min インキュベートする。
4. 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 20 μL を添加し、ボルテックスする。12,000 rpm, 5 min [optional]。
5. 上清 0.5 ~ 2 μL を取り出し、PCR (20 μL) を行う。



ターゲット：ターゲティング部位 (Cre ER) 及び前後の配列を含む領域 (WT:100 bp, KI: 341 bp)

鋳型：マウステールライセート (アルカリ溶解法)

反応組成：Primer: F: WT: Cre = 0.2: 0.2: 0.67 μM (final)
 ROX (0.1x)
 マウステールライセート 2 μL / 20 μL

サイクル条件：

98°C, 2 min
 ↓
 98°C, 10 sec
 ↓
 60°C, 10 sec

* 伸長時間は 30 sec / 500 bp で設定します。

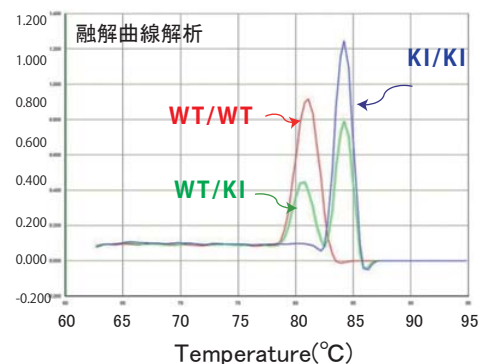


図5 融解曲線解析を用いるワンチューブマウス

Wild type 及び knock-in 特異的増幅産物の増幅長を変えることで増幅産物の Tm 値に差が生じるようにプライマーを設計し、エンドポイントでの融解曲線解析を用いてジェノタイピング解析を行いました。その結果、ホモ、ヘテロともに良好な判定を行うことが可能でした。

植物ライセートからの増幅例

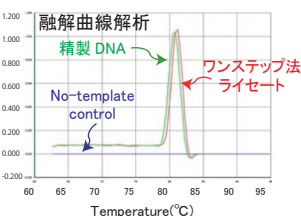
ワンステップ法

1. 葉 (3x3mm) と精米を採取し、マイクロチューブへ入れる。
2. Buffer A 100 μL を添加する。
3. Buffer A*: 100mM Tris-HCl (pH9.5), 1M KCl を添加し、ボルテックスする。
4. 95°C, 10 min インキュベートし、ボルテックスする。
5. 上清を滅菌水で 1/10 希釈し、上清 0.5 ~ 2 μL を取り出し、PCR (20 μL) を行う。

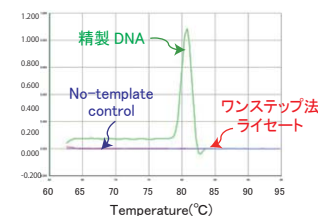
※Buffer A 中でベッセルを用いて植物組織をホモジナイズすることで効率を向上させることができます。その際は加熱は不要です。

(A) 短鎖ターゲット：イネ rbcL(257bp)

KOD SYBR™ qPCR Mix



THUNDERBIRD® SYBR™ qPCR Mix (弊社従来品：Taq 使用)



KOD SYBR™ qPCR Mix

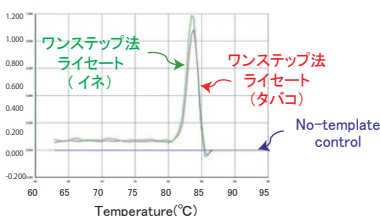


図6 植物ライセートからの検出例 (ABI 7500 使用)

(A) ワンステップ法にて作製したイネ葉ライセート及び精製 DNA を用いて、従来品と本製品の比較を行いました。その結果、本製品でのみライセートからの増幅が確認できました。

(B) ワンステップ法にて作製したイネ及びタバコ葉ライセートを用いて、長鎖ターゲット (1.3 kb) の増幅を行いました。その結果、本製品を用いてクールドサンプルから直接長鎖ターゲットの増幅を行うことが可能でした。

● ASP (Allele specific primer)-PCRを用いる SNP (Single nucleotide polymorphism) 解析

一方のプライマーの5'末端にGC tailを付加することにより、同サイズのターゲットの識別を融解曲線解析により行うことができます。様々な原理のASP-PCRに応用可能です。以下の例では、3'末端から2塩基目にSNP部位、3塩基目にミスマッチ部位となるように設計し、解析を行いました。

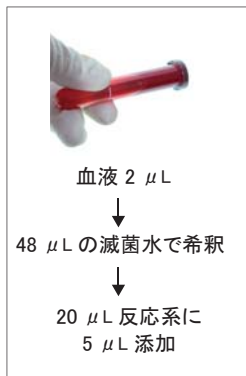
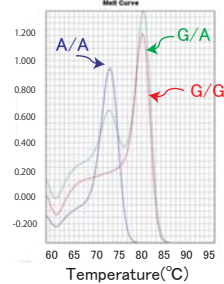


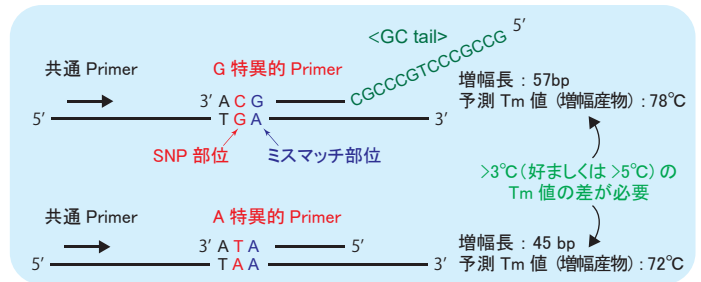
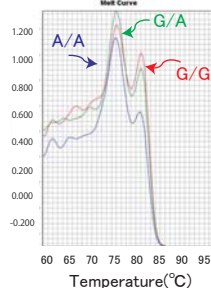
図7 血液検体を用いたワンチューブ ASP-PCR 解析 (ABI 7500 Fast real-time PCR system 使用)

上に示すように、片側に GC tail を付加したプライマーペアを用いて SNP 解析を行いました。同時にクルードサンプルに対応した A 社リアルタイム PCR 試薬を用いる検討を行いました。うまくタイピングすることができませんでした。また、同時に Taq DNA Polymerase を用いる従来品を用いても検討を行いました。反応が阻害され増幅産物を得ることができませんでした。

KOD SYBR™ qPCR Mix



A 社リアルタイム PCR 試薬 (クルード対応)



共通プライマー 5'-GTACGGGCTGCAGGCATAC-3'
G 特異的プライマー 5'-GCCGCCCTGCCCGCCACACTCAGAGTTTCTACTGCA-3'
A 特異的プライマー 5'-CCACACTCAGAGTTTCTACTATA-3'

※ 上記では A 及び G 特異的プライマーミスマッチ部位の塩基が異なるように設計されていますが、T 以外の A と相補しない塩基であれば特に制限はありません。また、プライマーの T_m 値を調整するため特異的配列部分の長さを変えています。
※ GC tail 及び ASP-PCR の方法は一例を示しています。様々な方法が報告されていますので、それらに応用することも可能です。

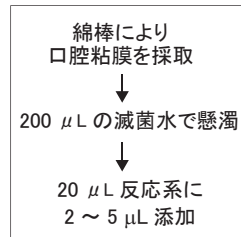
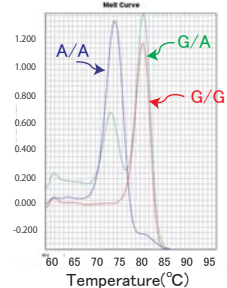


図8 口腔粘膜検体を用いたワンチューブ ASP-PCR 解析 (ABI 7500 Fast real-time PCR system 使用)

KOD SYBR™ qPCR Mix



品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
KOD SYBR™ qPCR Mix ・ KOD SYBR™ qPCR Mix ・ 50 × ROX reference dye	1.67 mL X 3 本 (200 回用)	-20°C	QKD-201	¥ 35,000
	1 mL X 1 本 (40 回用)	-20°C	QKD-201T	¥ 1,1000
	(1.67 mL X 3 本) X5	-20°C	QKD-201X5	¥ 161,000

※ 50 × ROX reference dye がマスターミックス試薬に別添されています。

※ 包装欄に記載の反応回数は 50 μL 反応時のものです。容量はマスターミックス試薬のみ示しています。

●リアルタイム PCR 用高効率 cDNA 合成試薬『ReverTra Ace® qPCR RT シリーズ』とのセット品

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
KOD SYBR™ qPCR/RT Set KOD SYBR™ qPCR Mix (200 回用) と ReverTra Ace® qPCR RT Kit (200 回用) とのセット	1 セット	-20°C	QKD201/FSQ101	¥ 72,400
KOD SYBR™ qPCR/RT Set II KOD SYBR™ qPCR Mix (200 回用) と ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (200 回用) とのセット	1 セット	-20°C	QKD201/FSQ201	¥ 72,400
KOD SYBR™ qPCR/RT Set III KOD SYBR™ qPCR Mix (200 回用) と ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (200 回用) とのセット	1 セット	-20°C	QKD201/FSQ301	¥ 74,300

* ReverTra Ace® qPCR RT シリーズの反応回数は 10 μL 応時のものです。

※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