

Brand-New item

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-™



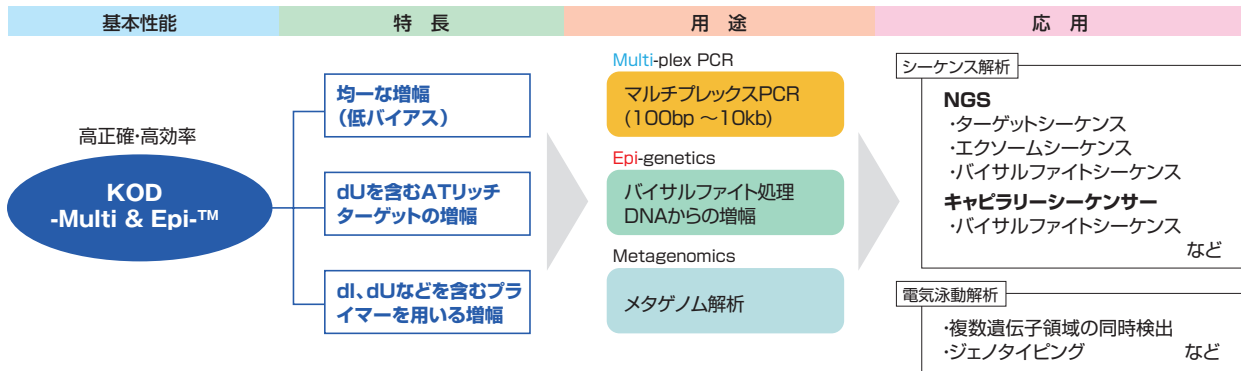
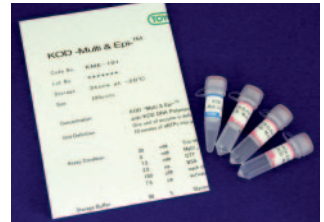
NEW

■期間：2015年9月7日～2016年3月18日（ご注文分）

特異的かつ均一なマルチプレックスPCRおよびバイサルファイト処理DNAの増幅に最適

KOD -Multi & Epi-™ は、遺伝子改変型KOD DNA ポリメラーゼ（UKOD）を用いて開発された高正確性PCR用酵素です。改変により、今まで困難だったウラシルを多く含む鋳型やイノシンを含むプライマーなどを用いることができるようになりました。更に、伸長アクセラレーター等の添加により、伸長性が向上することで配列や増幅サイズなどによる増幅バイアスを受けにくくなりました。

よって、KOD -Multi & Epi-™は、マルチプレックスPCRやバイサルファイト処理後のDNAの増幅（エピジェネティクス解析）、メタゲノム解析など様々な用途に用いることが可能です。また、本酵素はTaqポリメラーゼの約11倍の正確性を示すため、得られた増幅産物はクローニングを介した従来のシーケンス解析や次世代シーケンスなどに幅広く用いることが可能です。



特長1 均一な増幅（低バイアス）

1kb以下の短鎖のターゲットから10kb前後の長鎖のターゲットまでの幅広い範囲で特異的かつ均一なマルチプレックスPCRを行うことができます。GCの偏りによる増幅への影響を最小限に抑えており、ゲノムやトランスクリプトームの様々な領域を均一に増幅することが可能です。

この特性を生かし、次世代シーケンサー解析に使用する増幅産物の調製にも使用することができます。

特長2 ウラシルを多く含むDNAからの増幅

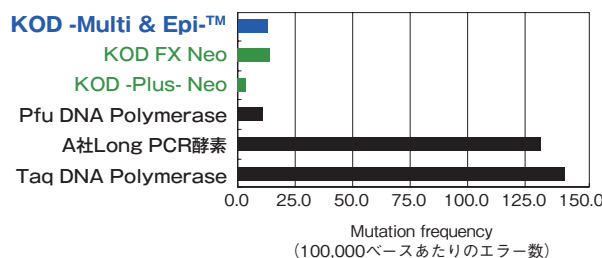
バイサルファイト処理後のウラシルを多く含むDNAから高い効率で増幅を行うことができます。最大で約1.5kbの増幅を確認しています。

特長3 イノシンやウラシルを含むプライマーに対応

従来の高正確性PCR酵素では、イノシンやウラシルを含むプライマーを用いる解析が困難でしたが、KOD -Multi & Epi-™ はそれらのプライマーを用いて解析することができます。

特長4 高正確性

Taq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(2.4kb)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シング解析し、測定しました。

特長5 クールドサンプルに対応

クールドサンプルの影響を受けにくく、血液検体を用いたマルチプレックスPCRの他、動植物のライセートからのジェノタイピングや土壌、食品サンプルなどからの増幅などにも用いることが可能です。

特長6 高効率

伸長アクセラレーターを添加することでPCR効率が向上し、シングルプレックスPCRでは伸長時間を最短で15sec./kbまで短縮することが可能です。

※クールドサンプルやバイサルファイト処理を行ったDNAサンプルを用いる場合や長鎖のマルチプレックスPCRを行う場合は、効率を優先するため30~60sec./kbを推奨する場合があります。詳しくは取扱説明書をご覧ください。

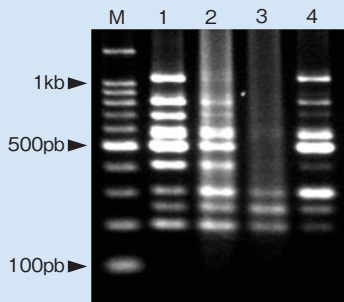
実施例1 マルチプレックスPCR性能比較

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(50μl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、血液成分の阻害を受けにくく、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。

マルチプレックスPCR (短鎖: 1kb以下)

●精製ゲノムDNA

(精製ヒトゲノムDNA 50ng使用)



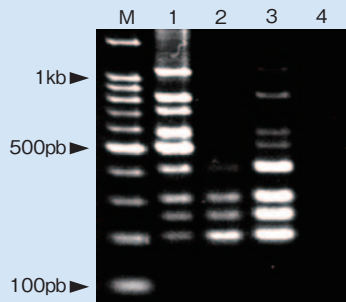
【PCRサイクル条件】

94℃, 2 min.
98℃, 10 sec. ←
60℃, 30 sec. ←
68℃, 15 sec. ←
4℃, hold

25 cycles

●血液サンプル

(血液 2.5μl使用)



【PCRサイクル条件】

94℃, 2 min.
98℃, 10 sec. ←
60℃, 30 sec. ←
68℃, 60 sec. ←
4℃, hold

25 cycles

M 100bp DNA Ladder

1. KOD -Multi & Epi™
2. B社Multiplex PCR酵素
3. A社Taq系PCR酵素
4. A社Long PCR酵素

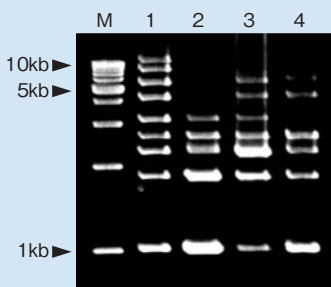
1kb以下ターゲット (増幅長)

DDB2 (200 bp), FANCG (250 bp), HBg (300 bp), CDH1 (400 bp), chromosome9 (500 bp), ERCC4 (550 bp), HRAS (600 bp), PRF1 (700 bp), BRCA1 (800 bp), CDK4 (1,000 bp)

マルチプレックスPCR (長鎖: 1~10kb)

●精製ゲノムDNA

(精製ヒトゲノムDNA 50ng使用)



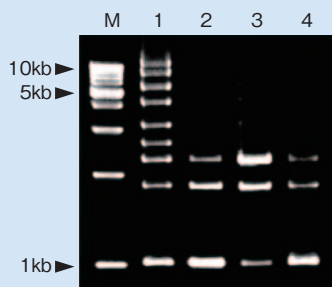
【PCRサイクル条件】

94℃, 2 min.
98℃, 10 sec. ←
68℃, 5 min. ←
4℃, hold

25 cycles

●血液サンプル

(血液 2.5μl使用)



【PCRサイクル条件】

94℃, 2 min.
98℃, 10 sec. ←
68℃, 10 min. ←
4℃, hold

25 cycles

M 1kb DNA Ladder

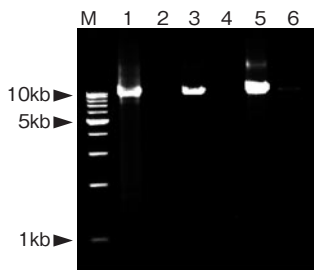
1. KOD -Multi & Epi™
2. C社Multiplex PCR酵素
3. D社高正確性PCR酵素
4. A社高正確性PCR酵素

1~10kbターゲット (増幅長) <ガン関連遺伝子>

Chromosome9 (1 kb), MSH6 (1.8 kb), BRCA2 (2.3 kb), WT-1 (2.5 kb), FANCG (3 kb), RAD51 D (4 kb), KRAS (5 kb), BRCA1 (7 kb), DDB2 (10 kb)

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種類のターゲットを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。



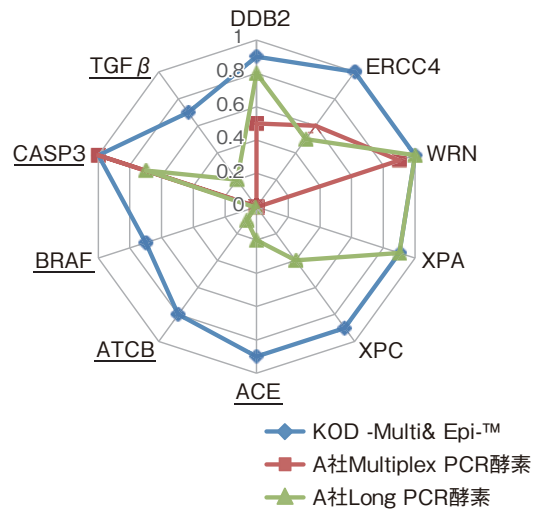
M 1kb DNA Ladder
 1. KOD -Multi & Epi™
 2. C社Multiplex PCR酵素
 3. A社Multiplex PCR酵素
 4. D社高正確性PCR酵素
 5. A社Long PCR酵素
 6. A社高正確性PCR酵素

【PCRサイクル条件】

94℃, 2 min.
 98℃, 10 sec. ← 25 cycles
 68℃, 5 min.
 4℃, hold

DDB2, ERCC4, WRN, XPA, XPC, ACE, ATCB, BRAF, CASP3, TGFβ

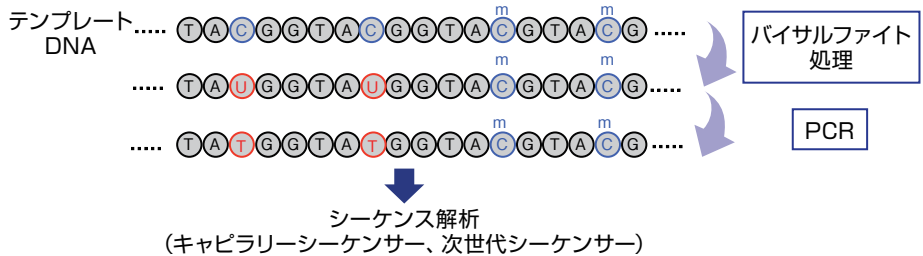
※下線のターゲット遺伝子はGC含量70%の領域が300bp以上ある領域を含む。



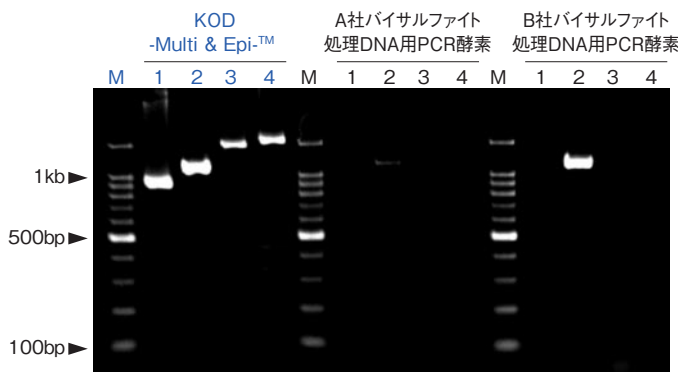
電気泳動の結果では、レーン3,5のA社の試薬においても良好な増幅を確認できましたが、NGS解析の結果、増幅に偏りが生じていることがわかりました。一方、KOD -Multi & Epi™は10種類のターゲットにおいてはリード数の比が0.6~1.0の中にあることから、均質に増幅したことがわかりました。

実施例3 バイサルファイト処理DNAの増幅効率の比較

メチル化されていないシトシン(C)は、バイサルファイト処理によりウラシル(U)に変換されるため、PCR後にシーケンス解析により、メチル化されたCを区別することができます。この処理により、ターゲットの配列はATリッチとなり、また断片化されるため、一般的にバイサルファイト処理されたDNAの増幅は難しいとされています。



この検討では、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(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)。



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%)

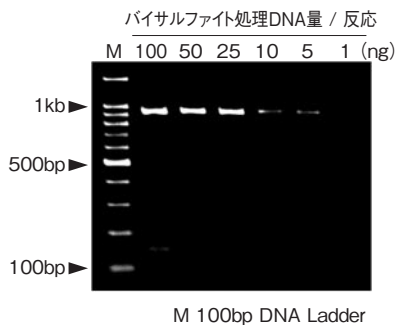
*バイサルファイト処理後のAT含有率を示しています。

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

【バイサルファイト処理DNA】
 55ng/反応

【PCRサイクル条件】
 94℃, 2 min.
 98℃, 10 sec. ← 40 cycles
 60℃, 30 sec.
 68℃, 30 sec./kb
 4℃, hold

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)

【PCRサイクル条件】
94℃, 2 min.
98℃, 10 sec. ←
60℃, 30 sec. ← 40 cycles
68℃, 30 sec. ←
4℃, hold

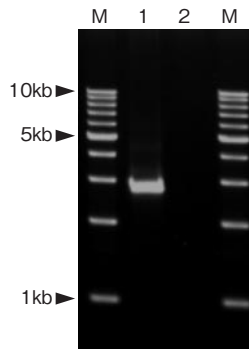
実施例4 イノシンを含むプライマーを用いた増幅効率比較

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。

【Template】
E.coli ゲノムDNA 100ng

【プライマー配列】
DNA ポリメラーゼ I (2.8kb)
Primer F : ATGGTICARATHCCICARAAY
Primer R : RTGIGCYTGRTCCARTTYTC

【PCRサイクル条件】
94℃, 2 min.
98℃, 10 sec. ←
60℃, 30 sec. ← 35 cycles
68℃, 45 sec. ←
4℃, hold



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

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	通常価格	キャンペーン価格
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-™ (1.0U/μl) ・2×PCR Buffer for KOD -Multi & Epi-™	200U×1本 [200回用]*	-20℃	KME-101	¥35,000	¥21,000

*50μl反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⁺ (終濃度2.0mM) が含まれています。

関連商品

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
高効率TAクローニングキット (KOD用) TARget Clone™ -Plus-	10回用	-20℃	TAK-201	¥16,000

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。