

UPLOAD

2017 January
VOL. 104

Brand-New item

- 1 イルミナ社次世代シーケンサー用ライブラリー定量キット
GenNext™ NGS Library Quantification Kit

HOT ITEM

- 3 高効率リアルタイムPCR用マスターミックス
KOD SYBR® qPCR Mix
- 4 高効率・高成功率PCR酵素
KOD FX Neo

Brand-New item

- 5 実験動物用マーカー遺伝子検出キット
Marker Gene Detection Kit

HOT ITEM

- 7 高効率One-step qRT-PCR Kit
THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit

TECHNICAL REVIEW

- 9 「THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit」を用いた
RNAウイルスの検出事例

HOT ITEM

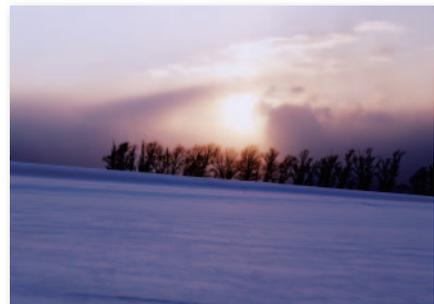
- 11 マルチプレックスPCR・バイサルファイト処理DNA用 高正確性PCR酵素
KOD -Multi & Epi-®

TECHNICAL REVIEW

- 13 「KOD -Multi & Epi-®」を用いたDNAメチル化解析



GenNext™ NGS Library Quantification Kit
→本誌p.1~2に詳細記事がございます。



イルミナ社次世代シーケンサー用ライブラリー定量キット

GenNext™ NGS Library Quantification Kit

NEW

イルミナ社次世代シーケンサー用ライブラリーを低バイアスかつ正確に定量できます。

GenNext™ NGS Library Quantification Kitはイルミナ社次世代シーケンサー用のライブラリー定量キットです。

イルミナ社次世代シーケンサーではロードするライブラリー量がデータの量および質に大きな影響を与えます。ライブラリー量が少ないとクラスター密度が低くなり、得られるシーケンスデータ量が少なくなります。逆に、ライブラリー量が多すぎると、クラスター解像度が悪くなりデータの質が下がります。このため、ライブラリーを正確に定量することが大変重要となります。

ライブラリーを定量する方法として分光光度測定や蛍光測定がありますが、これらの測定法では、すべてのDNAを測定するため、シーケンスに有効なP5、P7配列が付加したDNAの濃度を正確に求めることができません。

GenNext™ NGS Library Quantification Kitは、イルミナ社が採用している P5、P7配列にアニーリングするように設計されたプライマーを用いるqPCR法によって解析するため、フローセル上に結合する有効なライブラリーの濃度を正確に定量できます。また、KOD SYBR® qPCR Mix (p.3掲載)を採用しているため、長鎖やGCリッチターゲットにおいても、安定したライブラリー定量が可能です。



特長1 低バイアスで正確な定量

KOD SYBR® qPCR Mixを採用しており、ライブラリーのGC含量やサイズに影響を受けにくく、どのようなライブラリーにおいても正確な定量値を得ることができます。本製品で定量した値を用いることで、安定したクラスター密度を実現することができます。

特長2 幅広いレンジで定量可能

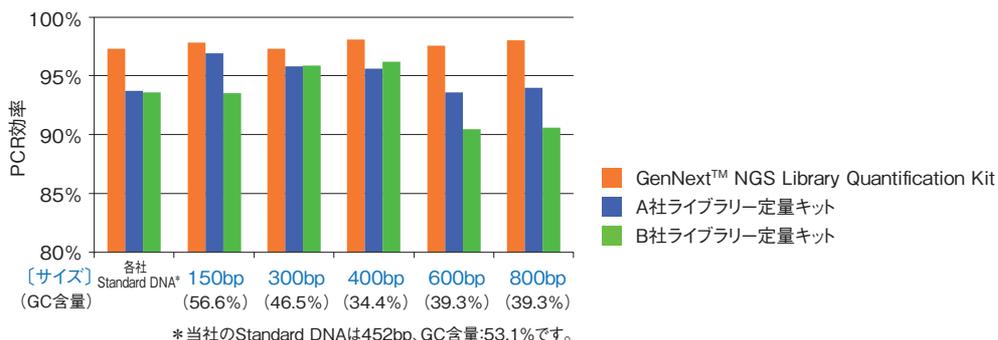
20pMから50.0002pMまでの6種類の濃度のStandard DNAを用意しており、幅広いレンジで正確に定量することができます。

特長3 簡便

本製品はライブラリー定量に必要なすべての試薬 (qPCR試薬、Primer Mix、Standard DNA、およびライブラリーの希釈バッファー) を含み、容易にライブラリーの定量を行うことができます。

実施例1 さまざまなサイズのターゲットにおけるPCR効率

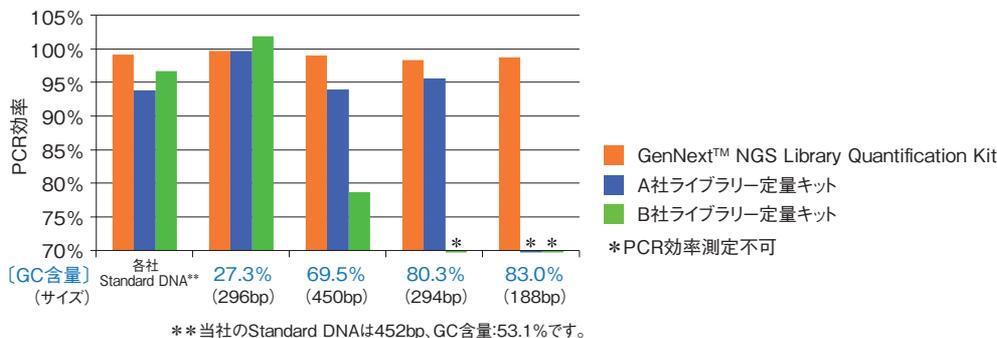
アダプター配列を有する150~800bpのターゲットについて各社ライブラリー定量キットを用いて解析し、PCR効率を比較しました。その結果、他社ライブラリー定量キットではターゲットサイズが長くなるに伴いPCR効率の低下がみられましたが、本製品ではターゲットサイズによるPCR効率の低下は認められませんでした。



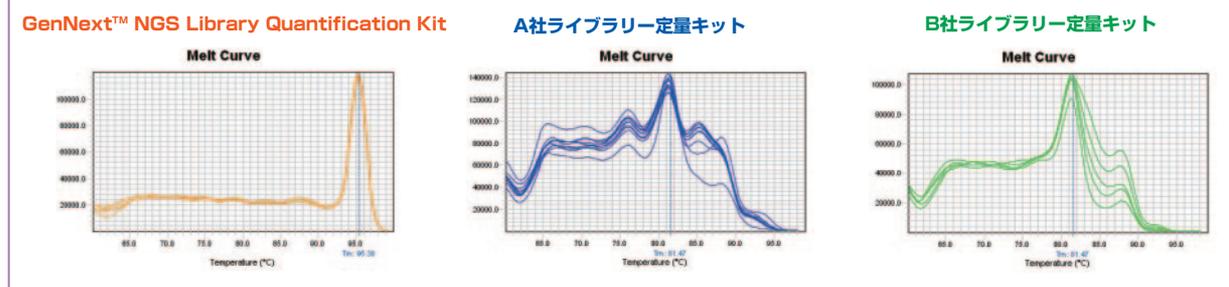
実施例2 さまざまなGC含量のターゲットにおけるPCR効率の比較

アダプター配列を有する、さまざまなGC含量のターゲットについて各社ライブラリー定量キットでPCR効率を比較しました。その結果、他社ライブラリー定量キットではGC含量の高いターゲットに関して下図の融解曲線のように目的ターゲットが増幅せず、PCR効率を測定できませんでした。一方、本製品ではすべてのターゲットを特異的に増幅することができ、PCR効率のバラツキが最も小さい結果となりました。

一般的にCpGを含むプロモーター領域や好熱菌などのバクテリアではGC含量が高いことが知られています。そのようなライブラリーの定量には、GCの影響を受けにくい本製品を用いることで正確に定量することができます。



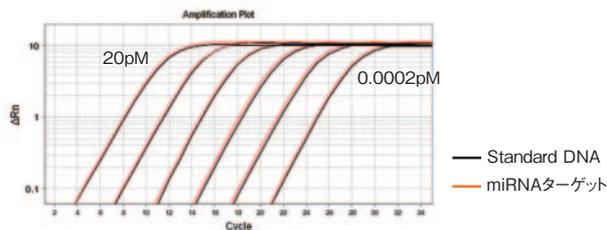
【GC含量83.0%のターゲットの融解曲線】



実施例3 2次構造を形成しやすい短鎖ターゲットを用いた検討

アダプター配列を付加したmiRNA (human 1et-7a) 配列 (144bp) と Standard DNA をテンプレートとした解析で得られた増幅曲線を比較しました。miRNAターゲットは20pMまで希釈した後、10倍で段階希釈し、キット添付のStandard DNAと同時に解析を行いました。

その結果、miRNAターゲットとStandard DNAの増幅曲線は各希釈水準でほぼ一致し、PCR効率も97.8% (miRNA) と97.1% (Standard DNA) とほぼ同等でした。本検討により、miRNAのような短鎖のターゲットにおいても本製品を使用することで正確に定量できることがわかりました。



品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
イルミナ社次世代シーケンサー用ライブラリー定量キット GenNext™ NGS Library Quantification Kit <KOD SYBR® qPCR Mix> ** ・ KOD SYBR® qPCR Mix ・ 50×ROX reference dye <Standard & Primer Set> ・ Standard DNA 1~6*** ・ 5×Primer mix ・ 50×Dilution Buffer	500回用*	-20℃	NLQ-101	¥68,000

*包装欄に記載の反応回数は、20μl反応時のものです。

**KOD SYBR® qPCR Mix (Code No. QKD-201) が1セット含まれます。

***20pM、2pM、0.2pM、0.02pM、0.002pM、0.0002pMの濃度のStandard DNAが含まれます。

※SYBR®はThermo Fisher Scientific K.K.の登録商標です。

高効率リアルタイムPCR用マスターミックス KOD SYBR® qPCR Mix

GCリッチ等の難配列の増幅に最適。今まで設計したプライマーを使用可能。

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' エキ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』や『クルード成分の阻害を受けにくい』という性質を最大限に発揮し、安定したリアルタイムPCR解析が可能になりました。



特長1 長鎖ターゲットの増幅が可能(～2kb)

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、2kb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。

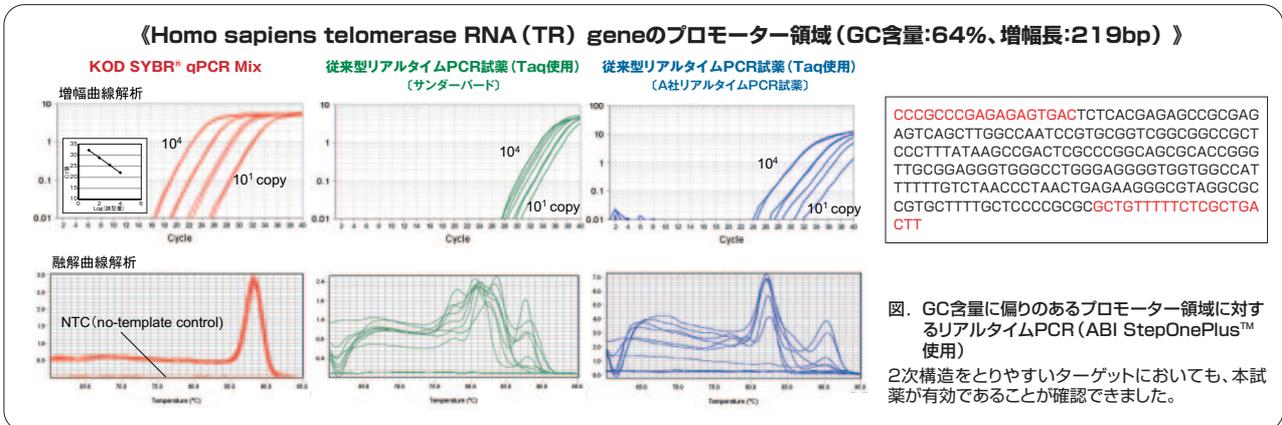
また、2kbまでの様々なターゲット長を選択できるため、幅広い融解曲線解析が可能です。プライマーダイマーの発生領域(短鎖領域)を外して増幅領域を選べるため、エンドポイントアッセイを用いる多型解析、マルチプレックスPCR解析などに有利です。

従来の試薬との比較

	従来品 (Taq使用)	KOD SYBR® qPCR Mix
酵素	Taq DNA Polymerase	KOD DNA Polymerase [exo(-) mutant]
増幅長	70 ~ 300 bp	70 ~ 2000 bp
GCリッチなターゲット	増幅しにくい	増幅しやすい
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直接増幅可能)

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であった塩基に偏りがあるような配列やプロモーター近傍の2次構造をとりやすい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。



特長3 クルードサンプルを用いる解析が可能

クルード成分による阻害を受けにくいため、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。

特長4 高い特異性

プライマーダイマーなどの非特異的反応を抑えることで、低コピー域までの幅広い定量を可能とします。また、弊社リアルタイムPCR用cDNA合成キット「ReverTra Ace® qPCR RTシリーズ」を併用することで安定した検出が得られます。

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	1ml×1本 [40回用]	-20°C	QKD-201T	¥9,800
	1.67ml×3本 [200回用]	-20°C	QKD-201	¥32,000
	(1.67ml×3本)×5 [1,000回用]	-20°C	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® qPCR Mixのみ示しています。

*SYBR®, StepOnePlus™はThermo Fisher Scientific K.K.の登録商標または商標です。

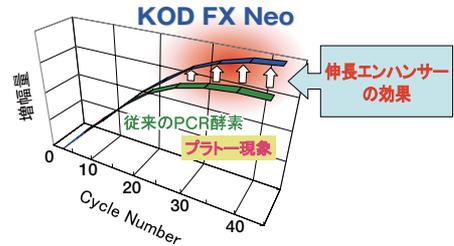
高効率・高成功率PCR酵素 KOD FX Neo

難配列・Long PCR・
クルードサンプルにお勧め

伸長性・クルードサンプルからの増幅性能が格段にアップしました。

KOD DNA polymerase*は、優れた伸長性を有し、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。KOD FXは、この特性を利用して開発された高成功率PCR酵素であり、難配列やクルードサンプルからの増幅などにご好評いただいております。

しかし、KOD FXをはじめ従来のPCR酵素は20~30サイクル以降、増幅が持続しなくなる「プラトー現象」が生じ、PCR機能が完全には発揮できていませんでした。「KOD FX Neo」は、KOD FXの技術に、弊社で新たに開発した「伸長エンハンサー」などの技術を応用することで、「プラトー現象」を抑え、長いターゲットや難配列ターゲット、クルードサンプルなどからの増幅効率をさらに向上させることに成功しました。



伸長エンハンサーの効果

* M. Takagi et al., Appl. Environ. Microbiol., 63 : 4504-4510 (1997)

特長1 優れたPCR性能

ゲノムDNAを鋳型として最大40kbの増幅が可能です。

30sec./kbの高速サイクルを実現しました。(クルードサンプルでは1min./kbをお勧めしております)

高GCターゲットなどの難配列の増幅に最適です。

※正確性はTaq DNA Polymeraseの約11倍です

特長2 クルードサンプルからの増幅性能アップ

PCR阻害物質の影響を受けにくく、かつ増幅効率が高く微量サンプルからの増量が可能なため、従来はサンプルからDNAを精製してから行っていたようなケースにおいても、精製が不要であったり、または簡単なサンプルの前処理のみで増幅が可能になっています。

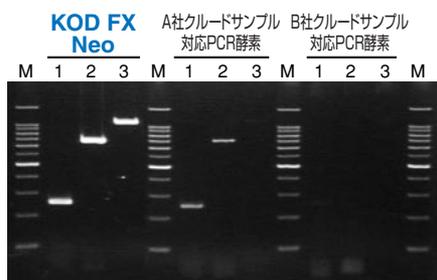
増幅可能なサンプル

種類	サンプルの由来	種類	サンプルの由来
ライセート	マウステール ホルマリン固定組織 植物(イネ、米粒、タバコ、トマトなど) ヒト毛根 ショウジョウバエの羽	直接	血液(ヒト、マウス、ラット) 紙血 爪(ヒト、マウス) 体液(精液、鼻水、涙、汗) 植物(タバコの葉) 植物プランクトン
夾雑物の多いDNAサンプル	糞便から精製したDNA		培養細胞 真菌(カビ、酵母、クリプトコッカスなど) コンポスト(堆肥)

実施例 マウステールの直接PCR

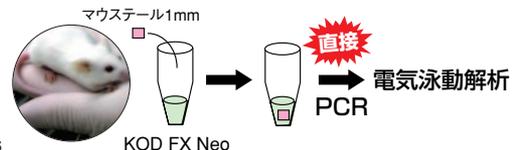
マウステールを直接PCR反応液に添加し、様々なPCR酵素で増幅を比較しました。その結果、KOD FX Neoを用いた場合のみ増幅を確認することができました。

このように、KOD FX Neoではサンプルを直接PCRに持ち込むことが可能であり、煩雑な精製を省略することが可能です。



【サイクル条件】
94℃, 2min.
98℃, 10sec. ← 30cycles
68℃, 1min./kb
4℃, Hold

M: 200 bp DNA ラダー
1: Mouse TATA box binding protein (TBP) 0.5 kb
2: Mouse transferrin receptor (Tfr) 1.5 kb
3: Mouse membrane glycoprotein (Thy-1) 2.6 kb



*マウステールなど動物組織を直接増幅した場合、PCR産物がアガロースゲル電気泳動のウェルに残ることがあります。泳動する際は、PCR産物50μlに対し、20mg/ml Proteinase K 10μlを添加してから泳動することをお勧めします。

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
高効率・高成功率PCR酵素 KOD FX Neo ・ KOD FX Neo (1.0U/μl) ・ 2×PCR Buffer for KOD FX Neo ・ dNTP Mixture (2mM)	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

*50μl反応を行ったときの反応回数で表示しています。

実験動物用マーカー遺伝子検出キット

Marker Gene Detection Kit

NEW

遺伝子改変動物に使用頻度の高い9種類のマーカー遺伝子をマルチプレックスPCRで検出

再現性の高い動物実験を行うには、実験に使用する動物の遺伝子的な情報を正確に把握しておくことが重要です。本製品は、理化学研究所バイオリソースセンターにて開発された遺伝子組換え系統の交雑による意図しない遺伝的汚染を検出する方法^{*1,2}を遺伝子組換え動物の利用者が誰でも簡単に実施できるようにしたキットです。

遺伝子改変動物に導入頻度が高い9種類の代表的なマーカー遺伝子をマルチプレックスPCRにて増幅し、電気泳動にて各マーカー遺伝子の有無を判定することができます。



特長1 さまざまなサンプルから高効率に検出

高効率・高成功率PCR酵素「KOD FX Neo」(p.4掲載)を使用しているため、表1に示すように精製ゲノムDNAに加え、マウス尾(テール)・耳をアルカリ溶解法により簡易調製したライセートや、細胞懸濁液をそのままテンプレートとして用いることが可能です。マウス・ラット・ヒトにおいては内部標準(IC)としてトランスフェリンレセプター遺伝子を検出するよう設計されています。



表1. 使用可能な動物、サンプルおよびテンプレート

動物種	サンプル	テンプレート
マウス・ラット	尾(テール)・耳	ライセート
	培養細胞	細胞懸濁液、精製DNA
	血液・さまざまな組織等	精製DNA
ヒト	培養細胞	細胞懸濁液、精製DNA

特長2 9種類のマーカー遺伝子を同時に検出

マルチプレックスPCRにより遺伝子改変動物に使用頻度の高い9種類のマーカー遺伝子(表2)をマルチプレックスPCRにて同時に検出することが可能です。

本キットにはPrimer Set 1とPrimer Set 2が含まれており、目的により標準とハイスルーブットの2種類のプロトコルを選択して検出できます。標準プロトコルではPrimer Set 1、2で別々にPCRを行い、ハイスルーブットプロトコルではPrimer Set 1、2を同時に使用し、ICを含む10種類すべての検出対象遺伝子を検出します。

表2. 検出対象遺伝子

遺伝子名	略称	備考	対象配列	Primer Set
トランスフェリンレセプター遺伝子	Tfrc (IC)	内部標準 (Internal Control)	NM_011638	1, 2
βガラクトシダーゼ遺伝子	lacZ	レポーター遺伝子	NC_011750	1
フリッパーゼ遺伝子	flp	組み換え酵素	U46493	2
Creリコンビナーゼ遺伝子	cre	組み換え酵素	NC_005856	1
ハイグロマイシン耐性遺伝子	hyg	薬剤耐性遺伝子	V01499	2
ネオマイシン耐性遺伝子	neo	薬剤耐性遺伝子	NC_008460	1
GFP (Green fluorescence protein)	GFP	蛍光タンパク質	U55763	2
Cas9 (CRISPR associated protein 9)	cas9	切断酵素	*3	1
ピューロマイシン耐性遺伝子	puro	薬剤耐性遺伝子	M25346	2
IRES (Internal Ribosome Entry Site)	IRES	リボソーム進入部位	X74312	1

* マウス、ラット、ヒト以外の動物種では内部標準(IC)に使用しているトランスフェリンレセプター遺伝子は検出されませんが、基本的に表2記載の遺伝子を検出することは可能です。

特長3 容易に判別が可能

本キットには特長2記載の検出対象のマーカージン遺伝子9種類と内部標準(IC)のDNA断片を含むControl templateが付属されています。

ポジティブコントロールとしてサンプルを同時に増幅させることで、電気泳動した際にバンドサイズを確認しやすく、判別が容易になります。

実施例 マウステールライセートを用いたマーカージン遺伝子の検出

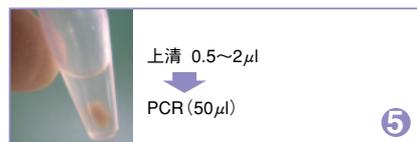
標準プロトコールとハイスループットプロトコールを使用し、下記の4系統のマウステールライセートを用いてマーカージン遺伝子の検出を行いました。マウステールライセートはアルカリ溶解法により調製し、テンプレートとして1μl 使用しました。

その結果、アルカリ溶解法によるライセートから矛盾なく4系統に使用されているマーカージン遺伝子を検出することができました。

【解析したマウスの系統】

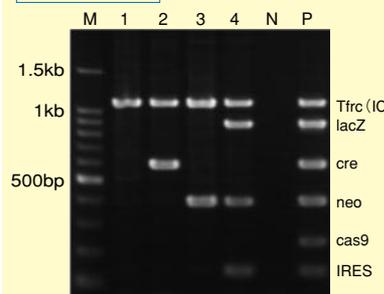
マウス系統	マーカージン遺伝子
系統1	—
系統2	cre, GFP
系統3	hyg, neo, GFP
系統4	lacZ, neo, IRES

【アルカリ溶解法によるライセート】

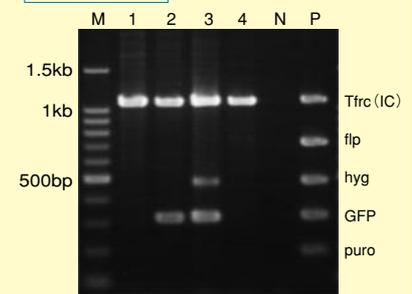


①標準プロトコールを用いた解析結果 (検出対象遺伝子を2つに分けて解析しました)

Primer Set 1

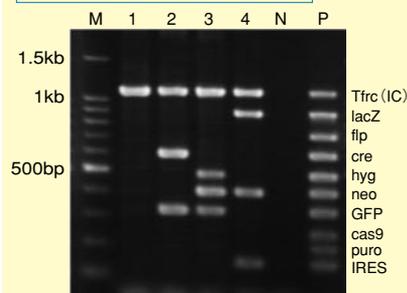


Primer Set 2



②ハイスループットプロトコールを用いた解析結果 (検出対象を一度に解析しました)

Primer Set 1 + Primer Set 2



M: 分子量マーカー
 1: 系統1
 2: 系統2
 3: 系統3
 4: 系統4
 N: ネガティブコントロール
 P: ポジティブコントロール (Control templateを使用)

文献

- * 1 Nakata H *et al.*, *Exp. Anim.*, **58** : 437-442 (2009)
- * 2 吉木 淳, *動物実験技術* : 第49巻1号35-40 (2014)
- * 3 Cong L *et al.*, *Science*, **339** (6121): 819-23 (2013)

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
Marker Gene Detection Kit ・ Primer and Control template Primer Set 1 Primer Set 2 Control template ・ KOD FX Neo* KOD FX Neo (1.0U/μl) 2×PCR Buffer for KOD FX Neo dNTP Mixture (2mM)	1セット (200反応用**)	-20℃	MGK-101	¥82,000

*KOD FX Neo (Code: KFX-201) が1セット含まれます。
 **50μl反応を行った時の反応回数で表示しています。

HOT ITEM

高効率One-step qRT-PCR Kit

THUNDERBIRD[®] Probe One-step qRT-PCR Kit

RNAウイルスなどの迅速・高感度定量に最適です。

本キットは、高効率逆転写酵素ReverTra Ace[®]とPCR酵素Tth DNA Polymeraseを用いた2酵素系によるワンステップリアルタイムRT-PCR 用キットで、主にTaqMan[®]アッセイ法に用いることができます。

逆転写反応とPCRを同一の反応系で連続的に行うため、反応液の分注操作が1回で済み、ハイスループット化に適しています。

また、サンプル間のクロスコンタミネーションの危険性も低減します。

本製品は2種類の酵素と最適化されたバッファー組成を組み合わせることで、微量なRNAを迅速に定量することを可能にしました。RNAウイルスや発現量の少ないmRNAの定量に有利です。また、ターゲットの配列の影響を受けにくく、さまざまなRNAを高感度に検出することが可能です。



従来の1-step法の欠点	本キットの改良点
◆プライマーの最適化が難しい (高感度化が難しい)	◆プライマー・プローブやターゲットの配列に起因する増幅の偏りの影響を最小限に抑えます
◆配列によって測定感度に偏り(バイアス)が生じやすい	▶さまざまなウイルスやmRNAの迅速・高感度検出/定量に有利です
◆RNA中の夾雑物によって感度低下が起きやすい	◆夾雑物による阻害を回避できます
◆TaqMan [®] probeによる多色解析が難しい	◆マルチプレックス検出における各ターゲットの増幅の偏りを最小限に抑えます ▶ハウスキーピング遺伝子をコントロールとする複数遺伝子の相対定量などに最適です

特長1 迅速・高感度

TaqMan[®] probeを用いるワンステップリアルタイムRT-PCR法により、微量なRNAを迅速・高感度に検出することができます。RNAウイルスや発現量の少ないmRNAの定量に有利です。

特長2 配列バイアスの低減

ターゲットの配列に左右されることなく、様々なRNAを高感度に検出が可能です。多色検出 (Multiplex) での各ターゲットの増幅の偏りも最小限に抑えます。

特長3 夾雑物耐性の向上

ヘマチンなどのPCR阻害物質による感度低下を回避できます。

特長4 dUTPを使用

本製品は2×Reaction Buffer 中にdUTPが含まれています。市販のUracil-N-Glycosylase(UNG)を添加することで、キャリアオーバーコンタミネーションによる偽陽性を防止することができます。

※本製品にUNGは含まれません。



特長5 複数のターゲットを同時に検出可能

検出波長の異なるTaqMan® probeを使用することで、複数のターゲットを同時に検出することが可能です。同一反応内でコントロール遺伝子と標的遺伝子を検出することができ、迅速、簡便に正確性の高い遺伝子定量が可能です。

特長6 高速ホットスタート

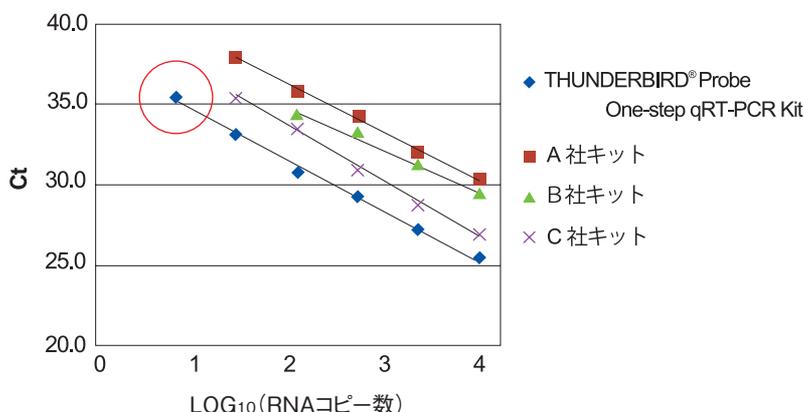
抗DNAポリメラーゼ抗体を用いたホットスタートシステムを採用しています。抗体を用いたホットスタートは非特異反応の抑制に強力な効果を示し、また、加熱によって速やかに抗体が失活するため、酵素の再活性化も迅速であり、酵素への高温によるダメージを最小限に抑えることができます。

特長7 さまざまな機器に対応

本製品は、一般的なブロックタイプの機器、ガラスキャピラリータイプなど、各種リアルタイムPCR装置にご使用頂けます。Fast Mode搭載の装置にも対応します。また、50×ROX Reference dyeが別添付されているため、パッシブリファレンスを必要とする機器 (Applied Biosystems®の機器など) においても、各機器に適したROX濃度でご使用頂けます。

実施例 エンテロウイルスRNAの高感度検出

エンテロウイルスRNAを4倍希釈し、TaqMan® probe法を用いて検出感度・定量性を他社製品と比較しました。プライマー・TaqMan® probeは論文記載のものを(最適化することなく)そのまま使用しました。解析にはApplied Biosystems® StepOnePlus™を用いました。本試薬でのみ10コピー以下のRNAを検出することが可能であり、幅広いダイナミックレンジでの定量を行うことができました。本キットは、RNAウイルスや発現量の少ないmRNAの検出・定量に有効です。



品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
高効率 One-step qRT-PCR Kit THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit ・ 2×Reaction Buffer ・ DNA Polymerase ・ RT Enzyme Mix ・ 50×ROX Reference Dye** ・ RNase free water	100回用*	-20℃	QRZ-101	¥33,000

*50μl反応を行ったときの反応回数で表示しています。
 **ROX溶液が別添付となっており、ほとんどのリアルタイムPCR測定機器に対応可能です。
 ※TaqMan®は、Roche Diagnostics K.K.の登録商標です。
 ※Applied Biosystems®, StepOnePlus™は、Thermo Fisher Scientific K.K.の登録商標または商標です。

「THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit」を用いたRNAウイルスの検出事例

東洋紡（株） 敦賀バイオ研究所 塩江 那佳

はじめに

近年、RNAウイルスの検出法として、迅速で検出感度や特異性に優れるワンステップqRT-PCR法が広く用いられるようになりました。一方、本方法で検体中の微量なウイルスを高感度で検出するためには、プライマー・プローブおよび反応条件を高度に最適化する必要がありました。

「THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit」は2酵素系によるワンステップリアルタイムPCR用キットです。ターゲットの配列の影響を受けにくく、RNAを高感度に検出することができるという特長を有しています。

今回は本キットを用いてウイルスRNAを論文のプライマー・プローブ条件をそのまま用いて検出を行った例、および臨床検体から抽出したRNAサンプルを用いて異なる2種類のプローブによって検出およびタイピングを行った例をご紹介します。



方法

(1) さまざまなウイルスRNAの検出【使用機器：Applied Biosystems® StepOnePlus™】

下記の11種類（RSウイルスは2種類の亜型）のウイルスRNAについて、本キットと2社のワンステップキットを用い、TaqMan® probe法にて検出感度の比較を行いました。プライマー・TaqMan® probeは論文記載のものをそのまま使用しました。C型肝炎ウイルスのRNAは合成RNAを、C型肝炎ウイルス以外のウイルスRNAは、RNAコントロール（VIRCELL社）を、それぞれRNase free waterで段階希釈して用いました。

麻疹ウイルス*1、ムンプスウイルス*2、黄熱ウイルス*3、エンテロウイルス*4、ライノウイルス*5、RSウイルスA型、RSウイルスB型*6、チクングニアウイルス*7、ウェストナイルウイルス*8、C型肝炎ウイルス*9、デングウイルス*10

(2) 咽頭ぬぐい液中のRSウイルスA型・B型の同時検出【使用機器：Roche Diagnostics社 LightCycler® 96】

20検体の咽頭ぬぐい液から抽出したRNAについて本キットを用いてRSウイルスA型・B型の同時検出（qRT-PCR法）を行い、RT-PCR法、抗体検査法と比較しました。qRT-PCR法では、RSウイルスのA型とB型を判別できるよう、それぞれに特異的なプライマーと異なる色素で標識したTaqMan® probeを用いました。

【反応液組成】

RNase free water	1.2 μl
2×Reaction Buffer	10 μl
DNA Polymerase	0.5 μl
RT Enzyme Mix	0.5 μl
10 μM Forward Primer	1 μl
10 μM Reverse Primer	1 μl
10 μM TaqMan® probe	0.4 μl
50×ROX Reference dye	0.4 μl
RNA溶液(1)及び(2)	5 μl
Total Volume	20 μl

【PCRサイクル】

逆転写反応	50°C, 10min.
	↓
初期変性	95°C, 1min.
	↓
PCR変性	95°C, 15sec.
伸長(アニーリング)*	60°C, 45sec. (45cycles)

*Data collectionは伸長ステップに設定しました。

※他社の試薬では、取扱説明書推奨の条件にて反応を行いました。なお、リアルタイムPCRの機種により最適ROX量が変わる可能性があります。取扱説明書をご参照ください。

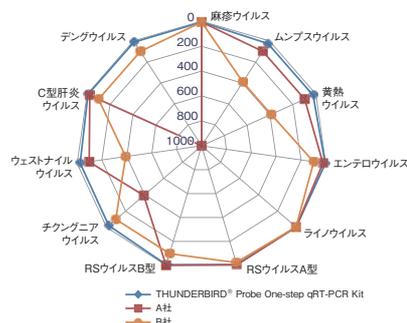
結果および考察

(1) さまざまなウイルスRNAの検出

11種類のウイルスRNAの希釈系列を作製し、2社のqRT-PCRキットとの最小検出感度を比較しました。グラフは検出された最も低いコピー数を各試薬ごとにプロットしています。

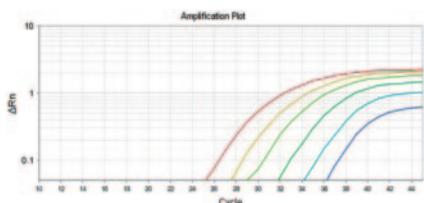
実験の結果、本キットでは全てのターゲットを30コピー以下の感度で検出・定量することができました。一方、A社やB社のキットではターゲットの配列により検出感度にばらつきがみられました。

このように、本キットではターゲットの配列に左右されずRNAを高感度に検出することがわかりました。また、測定したほとんどのターゲットで良好なPCR効率と相関性を示し、優れた定量性が示されました。

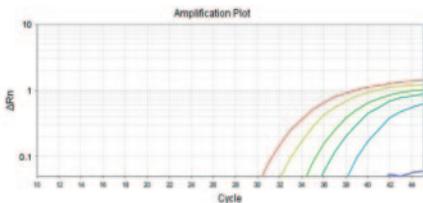


【エンテロウイルスRNA検出時の増幅曲線】

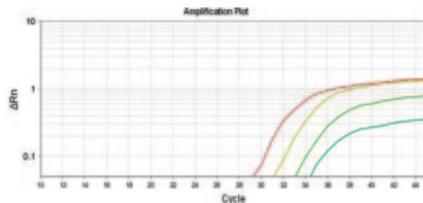
THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit



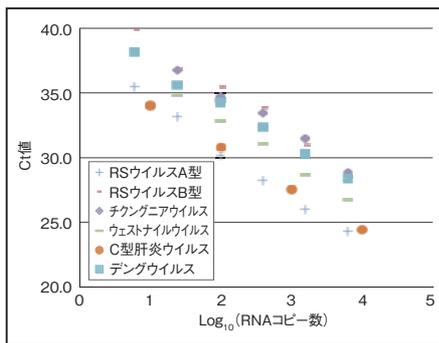
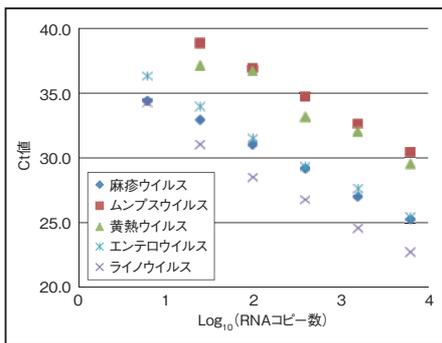
A社



B社



【THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kitでの検出時のPCR効率及びR²値】



ウイルスの種類	PCR効率	R ² 値
麻疹ウイルス	98.6%	0.998
ムンプスウイルス	96.9%	0.999
黄熱ウイルス	90.8%	0.998
エンテロウイルス	90.1%	0.997
ライノウイルス	85.0%	0.988
RSウイルスA型	85.0%	0.993
RSウイルスB型	89.6%	0.988
チクングニアウイルス	107.0%	0.987
ウエストナイルウイルス	98.7%	0.998
C型肝炎ウイルス	103.0%	0.999
デングウイルス	107.0%	0.995

(2) 咽頭ぬぐい液中のRSウイルスA型・B型の同時検出

本キットでの解析の結果、抗体検査法で偽陰性と判定された検体(5、6、14、18、19、20)についても、RT-PCR法での定性試験と高い相関で感染の有無を確認でき、型判別の結果も完全に一致していました。

検体番号	抗体検査法	RT-PCR (定性・型判別)	qRT-PCR解析での定量値(コピー数)		検体番号	抗体検査法	RT-PCR (定性・型判別)	qRT-PCR解析での定量値(コピー数)		検体番号	抗体検査法	RT-PCR (定性・型判別)	qRT-PCR解析での定量値(コピー数)	
			A型検出	B型検出				A型検出	B型検出				A型検出	B型検出
1	+	+(A)	1.6×10 ⁵	—	8	—	—	—	—	15	+	+(A)	3.9×10 ³	—
2	—	—	—	—	9	+	+(A)	1.5×10 ⁵	—	16	+	+(A)	2.4×10 ⁵	—
3	+	+(A)	8.1×10 ⁴	—	10	+	+(A)	6.7×10 ⁵	—	17	—	—	—	—
4	+	+(A)	2.7×10 ⁵	—	11	—	—	—	—	18	—	+(A)	4.2×10 ⁴	—
5	—	+(A)	9.6×10 ²	—	12	+	+(A)	1.6×10 ⁵	—	19	—	+(A)	3.4×10 ²	—
6	—	+(A)	3.6×10 ³	—	13	+	+(A)	9.4×10 ³	—	20	—	+(B)	—	9.6×10 ³
7	+	+(A)	2.3×10 ⁶	—	14	—	+(A)	9.5×10 ³	—					

まとめ

今回の検討から、THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kitはターゲットの配列による影響を受けにくく、論文に掲載されたプライマー・プローブ配列をそのまま用いてもさまざまなRNAを検出することが可能であることがわかりました。また、臨床サンプルを用いる実験においても他法と高い相関を示しました。

また本キットは2×Reaction Buffer中にdUTPを含み、Uracil-N-Glycosylase (UNG) を添加することでキャリーオーバーコンタミネーションによる偽陽性を防止することができます。また、上記実験でマルチプレックス系も可能なため、臨床検体の検出に適していると思われます。

是非一度、THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kitをお試しください。

文献

- 高尾信一 他、広島県獣医学会雑誌 No.27 (2012)
- J. D. Boddicker *et al.*, *J.Clin. Microbiol.*, Sept.**45** (9) : 2902-2908 (2007)
- C. Drosten *et al.*, *J.Clin. Microbiol.*, July.**40** (7) : 2323-2330 (2002)
- E. Haramoto *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, May **71** (5) : 2403-2411 (2005)
- Duc H. Do *et al.*, *J. Mol. Diagn.*, Jan. **12** (1) : 102-108 (2010)
- A. Hu *et al.*, *J.Clin. Microbiol.*, Jan. **41** (1) : 149-154 (2003)
- B. Pastorino *et al.*, *J. Virol. Methods*, **124** (1-2) : 65-71 (2005)
- 国立感染症研究所 ウェストナイルウイルス病原体 検査マニュアル (第4版)
- H. Okamoto *et al.*, *Jpn. J. Exp. Med.*, Aug.**60** (4) : 215-222 (1990)
- B. W. Johnson *et al.*, *J.Clin. Microbiol.*, Oct.**43** (10) : 4977-4983 (2005)

※TaqMan®, LightCycler®は、Roche Diagnostics K.K.の登録商標です。

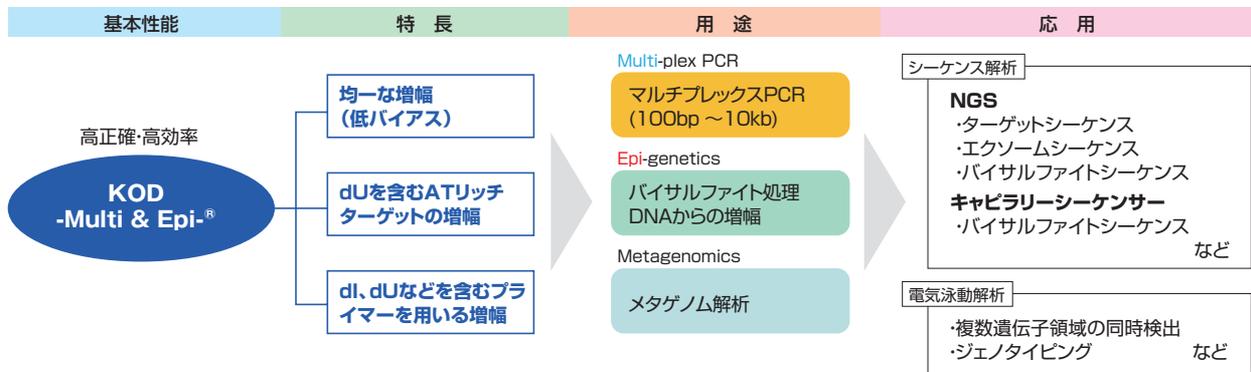
※Applied Biosystems®, StepOnePlus™は、Thermo Fisher Scientific K.K.の登録商標または商標です。

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-[®]

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。ポリメラーゼの改変により、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 DNA 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

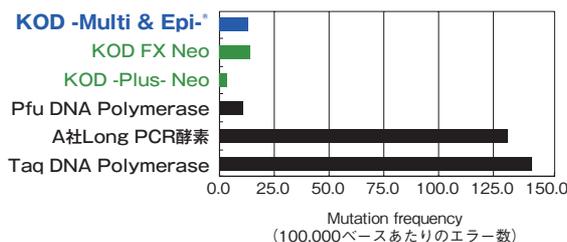
バイサルファイト処理後のウラシルを多く含むDNAから高い効率で増幅を行うことができます。最大で約1.5kbの増幅を確認しています。

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 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(2.4kb)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 クルードサンプルに対応

クルー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。

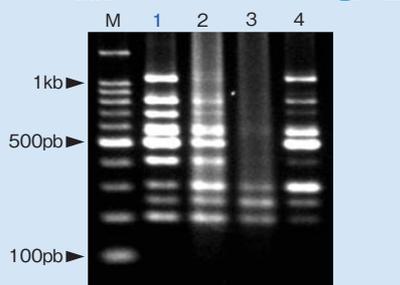
※クルードサンプルやバイサルファイト処理を行ったDNAサンプルを用いる場合や長鎖のマルチプレックスPCRを行う場合は、効率を優先するため30~60sec./kbを推奨する場合があります。詳しくは取扱説明書をご覧ください。

実施例 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。

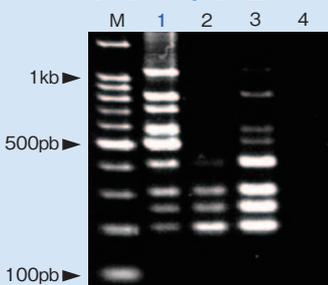
マルチプレックスPCR (短鎖:1kb以下)

●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. ← 25 cycles
60℃, 30 sec.
68℃, 15 sec.
4℃, hold

●血液サンプル (血液 2.5μl使用)



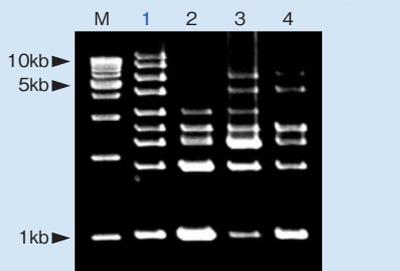
【PCRサイクル条件】
94℃, 2 min.
98℃, 10 sec. ← 25 cycles
60℃, 30 sec.
68℃, 60 sec.
4℃, hold

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)

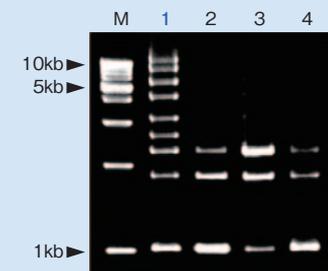
マルチプレックスPCR (長鎖:1~10kb)

●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. ← 25 cycles
68℃, 5 min.
4℃, hold

●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. ← 25 cycles
68℃, 10 min.
4℃, hold

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>
Chrome9 (1 kb), MSH6 (1.8 kb), BRCA2 (2.3 kb),
WT-1 (2.5 kb), FANCF (3 kb), RAD51D (4 kb),
KRAS (5 kb), BRCA1 (7 kb), DDB2 (10 kb)

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	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
	(200U×1本)×5 [1,000回用]	-20℃	KME-101X5	¥140,000
	(200U×1本)×10 [2,000回用]	-20℃	KME-101X10	¥260,000

*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。

「KOD -Multi & Epi-[®]」を用いたDNAメチル化解析

東洋紡（株） 敦賀バイオ研究所 新井 康広

はじめに

エピジェネティクス分野の一つであるDNAのメチル化は癌などの疾患と関わっていることが明らかになり、DNAメチル化解析の重要性が増しつつあります。

DNAのメチル化を解析する手法としてバイサルファイトシーケンス解析が広く使われています。この方法では、バイサルファイト処理により、メチル化されていないシトシン(C)がウラシル(U)に変換される一方で、メチル化されたシトシン(5mC)は変換されないため、PCR後にシーケンス解析を行うことにより、メチル化されたCを区別することができます。しかし、この処理により、ターゲットの配列はATリッチとなり、さらに断片化されるため、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。

また、KODをはじめとする高正確PCR酵素は、ウラシルを含むテンプレートからの増幅が困難であることが知られており、高正確かつ高効率にバイサルファイト処理後のDNAからターゲット遺伝子を増幅できるPCR酵素が望まれていました。

「KOD -Multi & Epi-[®]」は遺伝子改変型KOD DNA ポリメラーゼ(UKOD)を採用しており、バイサルファイト処理後のDNAのようにウラシルを多く含む鋳型からの増幅効率が大幅に向上しています。(右図)

今回、このような本製品の特長を生かして、培養細胞のメチル化状態を識別した例をご紹介します。

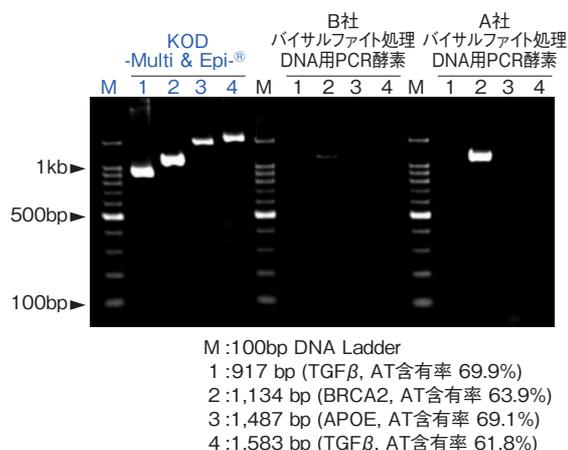


図 バイサルファイト処理DNAの増幅効率の比較

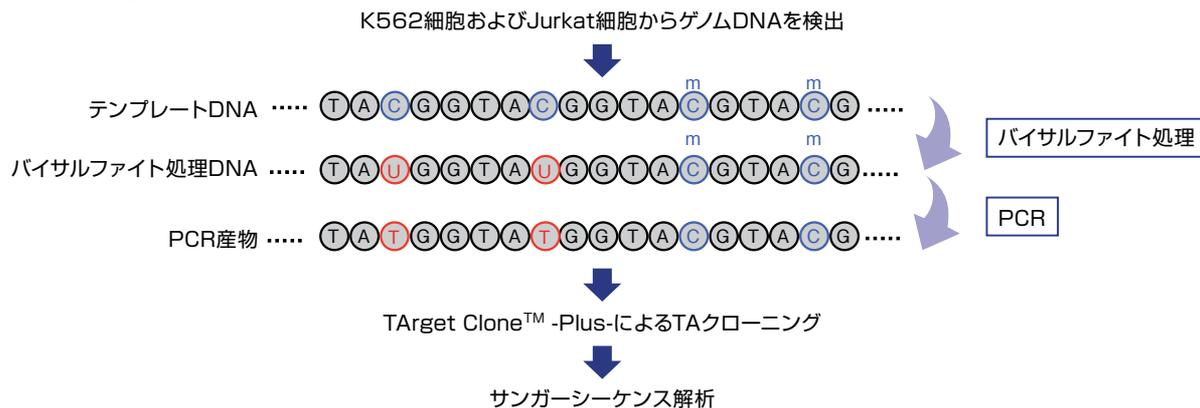
方法

培養細胞のメチル化状態を解析した例として、ヒトCDCP1遺伝子のメチル化状態を検出する文献^{*1}を参考にして、以下の実験の流れでバイサルファイトシーケンス実験を行いました。まず、K562細胞およびJurkat細胞からゲノムDNAを抽出し、EpiTect[®] Fast DNA Bisulfite Kit (QIAGEN社)を用いてバイサルファイト処理を行いました。バイサルファイト処理したゲノムDNAをテンプレートとして、文献記載のプライマー配列でKOD -Multi & Epi-[®]を使用し、次ページに示す反応液組成とPCRサイクルで実施しました。

また、増幅産物に関してクローニングキット(TArget Clone[™] -Plus- Code No.TAK-201)を用いてクローニングした後、得られた各5クローンについてサンガーシーケンス解析を行い、細胞の種類によるメチル化状態の比較を実施しました。

*1 : H Kimura *et al.*, *Leukemia*, **20**, 1551-1556 (2006)

【実験の流れ】



バイサルファイト条件

【バイサルファイト処理方法】

EpiTect® Fast DNA Bisulfite Kit
(QIAGEN社)

【バイサルファイト処理量】

K562 1 µg
Jurkat 1 µg

【バイサルファイト処理DNA】

K562 70.2ng/反応
Jurkat 54.1ng/反応

PCR条件

【プライマー配列】

5'-TAGATTTGGGAAGGAAGATTAAGT-3'
5'-ACAACAAAACCCCTAACAAATA-3'

【反応液組成】

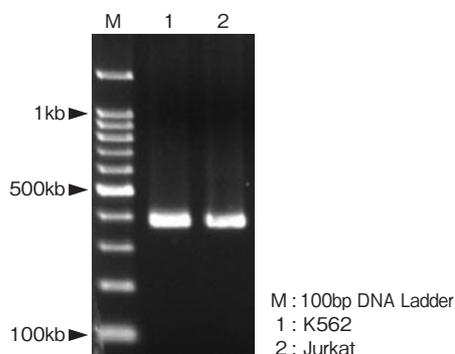
滅菌蒸留水	20 µl
2xBuffer for KOD -Multi & Epi®	25 µl
10pmol/µl Primer Forward	1.5 µl
10pmol/µl Primer Reverse	1.5 µl
バイサルファイト処理DNA	1 µl
KOD -Multi & Epi®	1 µl
Total Volume	50 µl

【PCRサイクル】

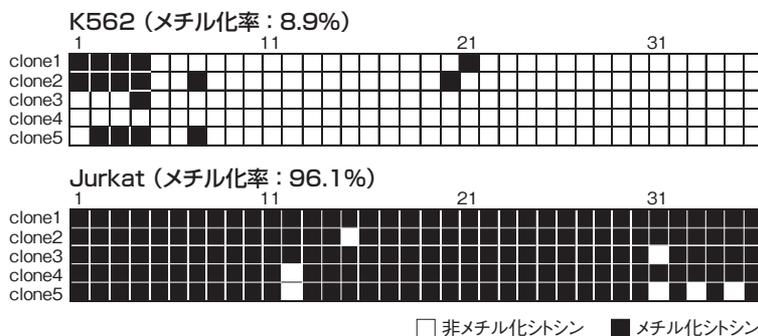
94°C, 2min.	40 cycles
↓	
98°C, 10sec.	
60°C, 30sec.	
68°C, 15sec.	↓
4°C, hold	

結果および考察

【電気泳動結果】



【メチル化解析結果】



解析を行った5クローンについて、増幅領域の36か所のシトシン(C)のみを抜き出し、白四角で非メチル化、黒四角でメチル化シトシンを表しています。

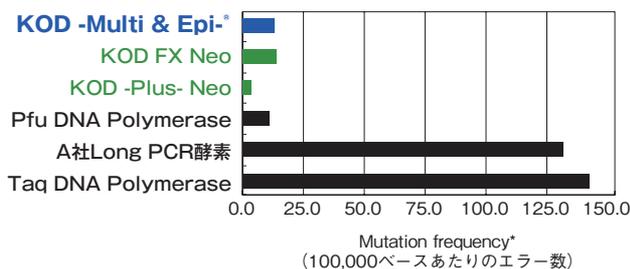
電気泳動結果が示すように、KOD -Multi & Epi®を使用することで、少ないテンプレート量からでも K562およびJurkatの両方とも短時間で効率良くターゲット遺伝子を増幅することができました。また、メチル化解析の結果では、参考とした論文と同様な結果を得ることができました。

まとめ

従来バイサルファイト処理DNAからのPCRは高正確PCR酵素が使えないため、Taq DNA ポリメラーゼが用いられることが多かったのですが、増幅産物にエラーが入るといった難点がありました。

今回、KOD -Multi & Epi®を用いることで効率よく解析を実施できることが示されました。本酵素で増幅したPCR産物は平滑末端となるため通常ではTAクローニングができませんが、専用のキット (Target Clone™ -Plus- Code No.TAK-201) を用いることで容易にTAクローニングを行うことができ、そのクローンをサンガーシーケンスにより解析しました。このような用途においては、PCRの正確性が重要となりますが、本製品は右図に示すようにTaq DNA ポリメラーゼの約11倍の正確性を持つため、最適であると考えられます。

DNAメチル化解析を行う際は、是非一度、KOD -Multi & Epi®をお試しください。



*Mutation frequency 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クローンについてシーケンス解析を行い、算出しました。

※EpiTect®は、QIAGEN N.V.の登録商標です。

新発売

イルミナ社次世代シーケンサー用ライブラリー定量キット

GenNext™ NGS Library Quantification Kit

本製品はイルミナ社次世代シーケンサー用のライブラリー定量キットです。KOD SYBR® qPCR Mixを採用しているため、長鎖やGCリッチターゲットにおいても、安定したライブラリー定量が可能です。
6種類のStandard DNAやライブラリー希釈バッファーが付属しており簡便に解析を進めることができます。

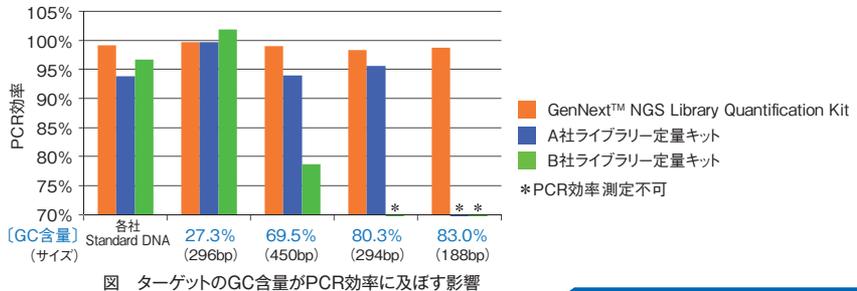


図 ターゲットのGC含量がPCR効率に及ぼす影響

⇒本誌p.1~2に詳細記事がございます。

アルファベットを入れてください

バイオ“ナンバー”クロスワード ~クローニング~

プレゼント付き



- ①同じ数字のマスには、同じアルファベットが入ります。
- ②すでに入っているアルファベットを参考に、縦横のマスにアルファベットを入れていきます。縦横のマスをつなげると、クローニングに関係のある単語になります。

(対応表)

1	2	3	4	5	6	7	8
		l		n	t		
9	10	11	12	13	14	15	16
	s			c	d	o	

- ③対応表からアルファベットを抜き出してクイズの答えを完成させてください。
- ※単語は弊社総合カタログ4章または下記ウェブサイトから入った製品ページに出ている言葉です。(表記はカタカナになっているものもあります)
- http://lifescience.toyobo.co.jp/user_data/category-idenshi.php

答え

11	9	11	16	11	9	12	7
----	---	----	----	----	---	----	---

クイズの解答に加え、UPLOADのアンケート(下記クイズコーナーに記載)にご回答いただいた方から抽選で、3名様に2,000円分の図書カードをご進呈いたします。

ご応募はこちらから

1 弊社ウェブサイト (<http://lifescience.toyobo.co.jp/>)

2 クイズコーナー

※ご応募期間 2017年1月17日~2017年3月31日 <http://lifescience.toyobo.co.jp/page/quiz/>



東洋紡株式会社

◆◆納期・注文に関するお問い合わせ◆◆

ライフサイエンス事業部 (大阪)
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
TEL.06-6348-3786 FAX.06-6348-3833
E-mail order_lifescience@toyobo.jp

ライフサイエンス事業部 (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
E-mail order_lifescience@toyobo.jp

◆◆製品内容・技術に関するお問い合わせ◆◆

テクニカルライン
TEL.06-6348-3888 FAX.06-6348-3833
開設時間：9:00~12:00 13:00~17:00
(土・日・祝を除く)
E-mail tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <http://lifescience.toyobo.co.jp/>

