



Application

リアルタイムPCR装置を利用したTwistAmp® exoの検出系の評価

製品名

TwistAmp® exo (Cat.No. TAEXO02KIT)

メーカー名

TwistAmp®

下記のデータは、株式会社 生物技研 事業開発部 半田 佳宏 様のご厚意により掲載させていただきました。

背景

TwistAmp® exoは、RPA増幅技術*とRPA用にデザインした蛍光プローブを組み合わせ、蛍光検出システム (T8-ISO 等温増幅装置を推奨) で検出するキットです。

本アプリケーションノートでは、推奨の装置を用いずに、一般的なリアルタイムPCR装置を用いて、蛍光を検出した一例をご紹介します。

※RPA増幅技術とは

RPAとは、リコンビナーゼポリメラーゼアンプリフィケーションの略で、RPA増幅は迅速かつ、高感度で核酸検出が可能な等温増幅技術です。少量の核酸分子で10分～20分のうちに検出可能なレベルまで増幅することができます。従来のPCR法に比べて温度を上げてディネーターを行ったり、温度を下げてアニーリングを行ったりする必要がないので、短時間で反応することができます。また、LAMP法に比べて低い温度で増幅することができます。

方法

震生湖と渡良瀬遊水地の水 (1L) をステリベクスを用いてろ過を行い、DNA抽出を行った。その後、MPureを用いて、DNAを精製後、TwistAmpに使用した。

SAMPLE

Primer A (10 uM)	2.1 μL
Primer B (10 uM)	2.1 μL
Probe (10 uM)	0.6 μL
Primer Free Rehydration buffer	29.5 μL
DNA Template	2.0 μL
Water	11.2 μL
MgOAc (後入れ)	2.5 μL
Total	50.0 μL

POSITIVE CONTROL

Positive control primer mix	8.0 μL
Primer Free Rehydration buffer	29.5 μL
Positive control DNA template	1.0 μL
Water	9.0 μL
MgOAc (後入れ)	2.5 μL
Total	50.0 μL

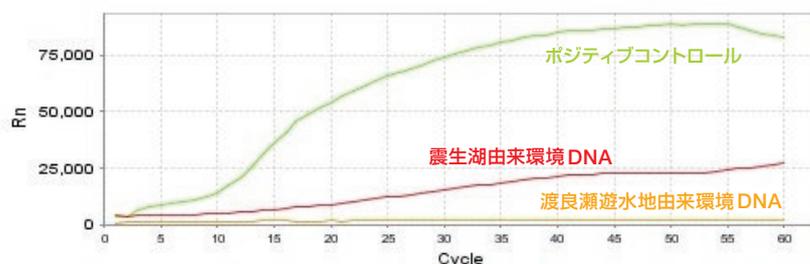
Lepomis macrochirus (ブルーギル)

Primer A 5' - CCTAGGCCTCTGCCTAGCAACCCAGATTTTAACA - 3'

Primer B 5' - ATTACGGATAAGTCATCCGTAATTCACGTCCCGG - 3'

Probe 5' - TGCCATACACTACCTCCGACATCGCAAC[FAM-dT][dSpacer]CC[BHQ-dT]TCT-
- CTTTAGTAGCAC[C3-spacer] - 3'

結果



StepOne Plus
・ 39°C, 20 sec, 60 cycle
・ Heat Cover (105°C) ON

定量PCRの系から震生湖からブルーギルDNAが検出され、渡良瀬遊水地から検出されていない。

今回のTwistAmpの結果は、定量PCRの結果と一致した。



お客様のコメント

推奨の機器を使用しなくても、ラボにある一般的なリアルタイムPCR装置でも問題なくDNA増幅が検出できた。また、PCR阻害物質を含む環境DNA溶液でもDNAが増幅されたことから、増幅阻害に強い反応系と考えられる。