

TwistDx™

Unwind DNA's possibilities

等温核酸増幅試薬

TwistAmp® exo

Cat.No. TAEXO02KIT

マニュアル ver.01



TwistAmp® exo は、RPA増幅技術とTwistDx独自の蛍光TwistAmp® exoプローブを同じフォーマットで組み合わせたい場合に推奨されます。基本的なコンポーネントに加えて、増幅反応の間にTwistAmp® exoプローブを処理しリアルタイムのリードを生成する強力なヌクレアーゼ（エキソヌクレアーゼIII）を含んでいます。エキソヌクレアーゼIIIの存在は、最終的には増幅された産物の収量を減少させてしまうのでゲル分析には適していませんが、RPAシステムにおいて強い蛍光シグナル動態を生成するシステムです。

始める前に

TwistAmp® 増幅プロセスには、効率的に機能する適切なオリゴヌクレオチドプライマーが必要です。

PCRアッセイ用に設計されたプライマーは、TwistAmp® 反応にはあまり適していません。

TwistAmp® プライマーは典型的なPCRプライマーよりも長く、PCRとは対照的にオリゴヌクレオチドの融解温度（T_m値）はプライマーとしての性能にとって重要な要素ではありません。

アプリケーションに適したTwistAmp® プライマーを決定するために、プライマーのスクリーニングを行ってください。

注記: RPA反応は、標準的な *E.coli* の系の増幅には適していません（現在の製造方法が関係しています）。

蛍光による増幅のリアルタイム検出には、TwistAmp® exoのバイオケミストリーに適合した特殊プローブ、いわゆるTwistAmp® exoプローブが必要です。これらのプローブの設計は、以下でより詳細に説明されます。PCRおよび他の核酸増幅プロセス（Taqman® 等）での使用を意図したプローブは、TwistAmp® exo反応では機能しません。

キットコンポーネント

	入数	保存温度
• 凍結乾燥RPA反応ペレット（96反応）	1本	-20°C
• TwistAmp® Rehydration バッファー 4ml	1本	-20°C
• 酢酸マグネシウム（280mM） 500μl	1本	-20°C
• ポジティブコントロールテンプレート（DNA） 100μl	1本	-20°C
• ポジティブコントロールプライマー / プローブミックス 75μl （プライマーとプローブ）	1本	-20°C

追加で用意いただくもの

- 増幅プライマー
- 検出のためのTwistAmp® exoプローブ
- サーマルインキュベーター / 蛍光光度計（例えば、T8-ISO等温増幅装置等）

プローブ設計に関して

リアルタイム検出フォーマットにおけるフルオロフォア（蛍光色素分子） / クエンチャー（消光剤） プローブの使用は、TwistAmp® 反応における増幅状態をモニターするための非常に便利な方法です。プローブは、異なるプライマーペアの速度および感度に関する比較データを迅速に生成するために特に有用であり、したがって潜在的なプライマー候補のスクリーニングにおいて非常に貴重なツールとなります。（プライマーの選択については、別紙のTwistAmp® キットAppendixを参照してください）。

TwistAmp® exo技術と互換性のあるタイプのオリゴヌクレオチドプローブはTwistAmp® exoプローブです。これらのプローブは、主となる増幅プライマー間のアンプリコン内の領域と相同性を有するように設計されます。

TwistAmp® exoプローブの構造と機能

TwistAmp® exoプローブは、dT-フルオロフォアおよび対応するdTクエンチャー基に隣接する脱塩基ヌクレオチド類似体（テトラヒドロフラン残基（THF）あるいはdSpacer）を含むオリゴヌクレオチド骨格から形成されます。さらに、プローブは、適切な3' 修飾基（C3-スパーサー、リン酸、ピオチン-TEGまたはアミン等）によってポリメラーゼ伸長からブロックされます。

フルオロフォア（フルオレセインまたはTAMRA）によって生成された蛍光シグナルは、通常フルオロフォアの3' 側2～6塩基に位置するクエンチャー（一般的には適切なブラックホールクエンチャー（BHQ））によって消光されます。

二本鎖の状況では、THF残基はTwistAmp® exoキットに存在するエキソヌクレアーゼIIIの基質となります。エキソヌクレアーゼIIIはプローブをTHF位置で切断し、それによりフルオロフォアとクエンチャーを分離し、蛍光シグナルを発生させます。このヌクレアーゼ工程は、プローブが増幅産物内のその標的配列にアニーリングした場合に限定されます。したがって、プローブの切断は、増幅現象そのものを示し、TwistAmp® 反応の進行をモニターするために使用することができます。

現時点におけるT残基に対する適切なプローブ位置については、6つ未満の介在ヌクレオチドで2つのTが見出され得る配列に限定されます。

しかし、このような適切なプローブの設計が問題であると判明した場合、このテーマにはいくつかのバリエーションがあります。詳細は別紙のTwistAmp® キットAppendixに記載されています。

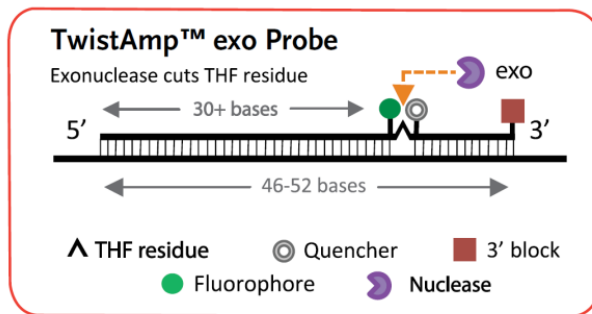


図2：アニーリングされたTwistAmp[®] exoプローブの構造図

無塩基THF残基は、プローブがその標的に結合している場合にのみ、エキソヌクレアーゼIIIによって切断されます。この切断工程は、フルオロフォアおよびクエンチャーを分離し、蛍光シグナルを発生します。

TwistAmp[®] exoプローブの作製につきましては、別途弊社までご相談ください。

TwistAmp[®] exoプローブの長さや位置

TwistAmp[®] exo プローブは、通常46～52ヌクレオチドの長さで構成されます。少なくとも30個の塩基がTHFサイトの5'側に配置され、また少なくとも15個の塩基が3'側に配置されるように設計してください。TwistAmp[®] exoプローブに対応する増幅プライマーについては、最良のポジションを説明できるような固定されたルールはありません。

プローブが増幅プライマーと重複する場合、プローブによってプライマーアーチファクトが検出される可能性を避けるための注意を払う必要があります。一般的には、増幅プライマー間のアンプリコン内に存在するユニークな配列が使用されます。

しかし、増幅プライマーは、プローブの無塩基部位から3'方向にプローブよりも多い塩基を含まないことを条件として、プローブの5'方向に重複することができます（プライマーの重複は、5'末端側プローブの27～30ヌクレオチドに制限されます）。これは、プローブの感度の高い切断配列エレメントに対する人為的なハイブリダイゼーション標的の不注意による生成を防止することになります。

プライマー/プローブダイマーの発生を避けるために、プローブの方向に対向するプライマーは重複しないように設計してください。プローブを折り返す可能性のある二次構造は避けるように注意してください。

TwistAmp[®] exoプローブの例

適切な標的配列が与えられた場合、最も重要なファクターは、お互いに（1～5個の介在するヌクレオチドのみを用いて）近接した一対のT残基を同定することです。一例として、標的配列を、それを検出するために設計することができる2つの推奨されたプローブと共に以下に示します。

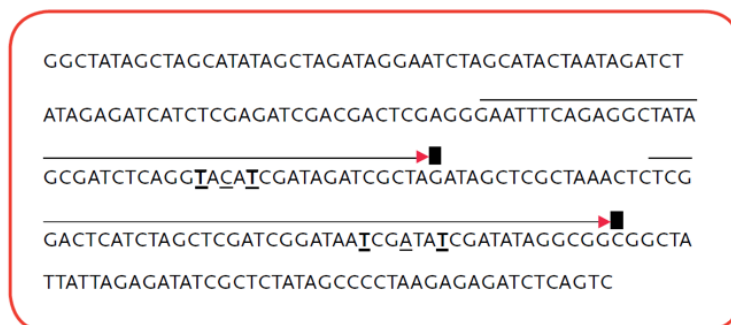


図3：dT-フルオロフォアまたはdT-クエンチャーのいずれかによって置換されたT残基は太字および下線が引かれていますが、THFで置換された塩基は下線が引かれています。

この場合、順序付けられた1つのプローブは、配列中の関連するT残基がdTフルオロフォア残基またはdT-クエンチャー残基によって置換され、1塩基（この場合、C）がTHF残基によって置換された以下の配列を有しています。

GAATTCAGAGGCTATAGCGATCTCAGG (FAM-dT) A (THF) A (BHQ-dT)
CGATAGATCGCTA (3' -block)

dT-フルオロフォアまたはdT-クエンチャーとTHFとの間のヌクレオチドの数は、0、1または2でもよく、これらの介在するヌクレオチドのための既知の配列条件も、THFと置き換えられる塩基のための配列条件も解明されていません。これらの原理に基づいて、2番目に可能なプローブがシーケンスで示されています。

TCGGACTCATCTAGCTCGATCGGATAA (FAM-dT) CG (THF) TA (BHQ-dT)
CGATATAGGCGG (3' -block)

一般的には、プローブの3' 末端をC3-スパーサー、ビオチン-TEG、またはリン酸などのグループでブロックします。

注記: 蛍光標識としてdT-FAMを使用する場合は、クエンチャーとしてdT-BHQ1を使用することをお勧めします。また、蛍光標識としてdT-TAMRAを使用する場合、クエンチャーとしてdT-BHQ2を使用することをお勧めします。
増幅プライマーは、ほとんどの場合プローブ配列に隣接するように設計されていますが、プローブの5' 部分と上記で詳述した増幅プライマーとの間にいくらかの重複が存在することもあります。

TwistAmp® **exo**プローブの一般的な設計エラー

プローブの標的配列:

GAATTCAGAGGCTATAGCGATCTCAGGTCATCGATAGATCGCTA

F = FAM-dT H = Tetrahydrofuran Q = BHQ-dT

良いプローブ例:

GAATTCAGAGGCTATAGCGATCTCAGGFAHAQCGATAGATCGCTA
(3' -block)

≥30 bases 5' of THF

≥15 bases 3' of THF

- フルオロフォアとクエンチャーの間が5塩基以下である
- フルオロフォアとクエンチャーの間にTHFが1つだけ配置されている

悪いプローブ例:

GAATTCAGAGGCTATAGCGATCTCAGGFHHHQCGATAGATCGCTA
(3' -block)

- 複数のTHFが配置されている（プローブあたりのTHFは1つ）

GAATTCAGAGGCTATAGCGATCTCAGGTACATCGAFAHAQCGCTA
(3' -block)

- エキソヌクレアーゼが効率的に切断するためには、THFから3' 側に15個以上の塩基が必要

GAATTCAGAGGCTATAGCGATCFCAHGGACATCGATAGATCGCTA
(3' -block)

- プローブが切断されたときプライマーとして作用することができるように、THFの5' 側に30 ~ 38塩基が必要

GAATTCAGAGGCTATAGCGATCTCAGGFAHATCGAQAAGATCGCTA
(3' -block)

- フルオロフォアとクエンチャーの間の距離が大きすぎる（クエンチングされにくいことがあります）。

TwistAmp® **exo**プローブ候補

最適なパフォーマンスが必要な場合は、ターゲット内に2つ以上の潜在的なプローブをテストすることをお勧めします。しかし、最適化がなされていない場合であっても、記載された原理に従って設計されたほとんどのプローブは適切に機能し、異なるプライマーペアの性

能を識別する目的に適しています。

プローブがプライマースクリーニングに使用される場合は、最も小さい候補アンプリコン内に位置するようにプローブを設計するのが良い戦略といえるでしょう(候補プライマーの順方向および逆方向群中の最も内側のプライマーとして定義されます。別紙のTwistAmp®キットAppendixを参照ください)。

プローブを使用して、すべての周辺プライマーの性能をテストすることができます。状況によっては、アッセイ全体のパフォーマンスを高めるために複数のプローブをテストして比較することが望ましいでしょう。

なお、いずれかのストランドのために設計することができるプローブは、与えられた標的に対して設計することができるプローブの候補数を増やすことができるかもしれません。

プロトコル

キットコンポーネントの保管に関して

TwistAmp® exoキットのコンポーネントは、適切な条件下で長期間の保存が可能です(最長6ヵ月)。

TwistAmp® exo反応ペレットは、8連チューブの中にあらかじめ小分けされ、真空シールされたパウチの中に入っています。密閉された製品を、-20℃以下の状態で保存してください。

使用する際は、真空シールを破った後、30分以内に使用開始してください。残りのペレットは、入っていたパウチに戻し更にそれを密閉袋等に入れて密閉し、-20℃以下の状態で保存してください。

TwistAmp® exo Rehydrationバッファーは、4本の1 ml分注で提供されます。-20℃以下の状態で保存してください。

TwistAmp® exoキットには、コントロールプライマー溶液とコントロールDNAテンプレートが含まれています。-20℃以下の状態で保存し、必要に応じて再凍結してください。

増幅の実施：反応ペレットの再水和 (Rehydration) およびマグネシウムによる反応開始

TwistAmp® exoの反応は、供給された凍結乾燥反応ペレットを適切なRehydration溶液で再構成(再水和)することによって確立されます。この溶液は、TwistAmp® exo rehydrationバッファー(キット付属)、増幅プライマー、検出用プローブ、およびテンプレート(および水でサンプルあたり47.5µlの全容量まで)で構成されています。

2.5µlの容量の酢酸マグネシウム溶液(キット付属)を添加することによって反応が開始され、最終反応容量は1サンプルあたり50µlとなります。

rehydration溶液の成分は、必要なサンプル数のマスターミックスで組み合わせることができます。プライマースクリーニングを行う場合は、プライマーペアの数に応じていくつかの異なるrehydration溶液を作製してください。この場合、すべての反応に共通の成分(テンプレート、rehydrationバッファー、水)はマスターミックスとして調製し、それを対応する容量で新鮮なチューブに分配した後、必要な容量の異なるプライマーペアと混合します。次に、これらの異なるrehydration溶液をプロトコルに従って通常通り使用してください。

注意：組換えフィラメント形成の偏りを避けるために、プライマーとプローブをペレットに同時に添加する必要があります。

プロトコル詳細

1. 各サンプルについて、次のようにrehydration溶液を調製します。

Primer A (10µM)	2.1µl
Primer B (10µM)	2.1µl
TwistAmp® exo Probe (10µM)	0.6µl
Rehydration Buffer	29.5µl
Template and dH2O	13.2µl
(Total Volume	47.5µl)

よく攪拌して短時間スピンドアウンします。

2. 各サンプルについて、47.5µlのrehydration溶液を反応ペレットに移します。ペレット全体が再懸濁されるまでピペットで上下に混合します。

3. 各サンプルについて、2.5 μ lの280mM酢酸マグネシウムを添加し、よく混合します。
これを同時に多数のサンプルに対して行う1つの方法は、反応チューブ（8連ストリップ）のキャップに酢酸マグネシウムを入れ、注意深くチューブをキャップして酢酸マグネシウムを再水和した材料に添加してスピンドウンさせることです。短時間ボルテックスしてもう一度スピンドウンしてください。
4. 直ちにT8-ISO等温増幅装置のような適切なインキュベーション/モニタリング装置に入れます（代替の蛍光光度計の使用については以下を参照ください）。

注意: TwistAmp[®] 反応ペレットは、rehydration溶液と酢酸マグネシウム溶液を使用して活性化されます。RPA反応は、室温でも酢酸マグネシウムが添加されるとすぐに開始します。選択されたインキュベーション温度でのサンプルのインキュベーションまで、ペレットの再懸濁から迅速に進めてください。ヒートリッド付きの装置を使用する場合は、このスイッチをオフにする必要があります。

TwistAmp[®] exo増幅反応のモニタリング

ここでは、T8-ISO等温増幅装置によるリアルタイム蛍光検出について説明します（T8-ISOの使用方法については、装置に付属のマニュアルを参照してください）。T8-ISO以外の蛍光検出装置を使用する場合は、プロトコルを適宜変更する必要があります。

Rehydration（再水和）したサンプルは、適切な反応容器（マルチウェルプレート等）に移し、代替装置での条件に従ってインキュベート/モニタリングしてください。

TwistAmp[®] 技術とプローブを利用して、最適な増幅および蛍光シグナル発生を達成するための超高感度検出が要求される場合は、インキュベーション反応中に攪拌工程を追加することをお勧めします（少量で少数のコピーから急速に増幅すると、局在した基質が枯渇する可能性があります）。ここで記載されているプロトコルでは、反応開始から4分後にマニュアル操作により混合するとしていますが、長い（または遅い）アンプリコンを増幅する場合は、更に遅い時間に攪拌工程を加えることで、より良い結果を得られることがあります。

代替装置を使用してTwistAmp[®] exo反応をモニターする場合、攪拌方法は以下のプロトコルを参考にして調整してください。（4分間のブレイクインキュベーション/混合工程の後に、振とう機能の付いた装置を使用する、または反応容器のモニタリング装置へ移す等）。また、ヒートリッド付きの装置を使用する場合は、このスイッチをオフにして使用してください。

1. 本体の電源を入れてください。
2. 本体タッチスクリーンの「Login」ボタンを押します。
3. HOME画面の「TEST」ボタンを選択してください。
4. 「Run Default Test」ボタンを押してください。
5. Run IDとSample IDを入力します。
 - *入力欄を押すとキーボードが表示されます。
 - *画面右下のチェックマーク（緑）がエンターキーです。
6. 自動的にブロックのヒーティングが開始されます。
7. 画面に「INSERT SAMPLE TUBES」の表示が現れたら本体ブロックにチューブを挿入します。
8. 本体上部のリッドを閉めると、自動的に測定が開始されます。

注意: 反応液の増幅後の処理は、増幅産物による機器、作業面などのコンタミネーションの危険性が非常に高いことに注意してください。このリスクを軽減するための対策については、以下に記載のテンプレートクロスコンタミネーション防止に関する注意事項を参照してください。

ポジティブコントロール反応

TwistAmp[®] exoキットには、ポジティブコントロールのプライマー/プローブとテンプレートが含まれており、キットコンポーネントの活性および検出装置をテストすることができます。ポジティブコントロール試料は、TwistAmp[®] exo反応ペレットおよびrehydrationバッファーと共に使用されます。

1. ポジティブコントロールのプライマーミックスを解凍します。
2. ポジティブコントロールDNAの1/10希釈液10 μ lを調製します。

-
3. 8 μ lのプライマー /プローブ溶液を新しい1.5 mlマイクロ遠心チューブにピペットで移します。
 4. ステップ3のプライマー /プローブ溶液に29.5 μ lのrehydrationバッファーを加えます。短時間攪拌してスピンドウンします。
 5. ステップ4の溶液に希釈したポジティブコントロールDNA10 μ lを添加します。短時間攪拌してスピンドウンします。この混合物がrehydration溶液となります。
 6. 凍結乾燥されたTwistAmp[®] exo反応ペレットが入っているチューブのキャップを外し、キャップをチューブの前に逆さまに置きます。
 7. 各ペレットをプライマー /プローブおよびテンプレートDNAを含む47.5 μ lのrehydration溶液に再懸濁します。ペレット全体が再懸濁されるまでピペットで上下に混合します。
 8. 280mM酢酸マグネシウム2.5 μ lを添加し、よく混合して反応を開始します。
適切な数のチューブキャップに2.5 μ lの酢酸マグネシウム溶液（キット付属）をピPETTINGし、酢酸マグネシウム溶液がキャップ内に残っていることを確認してからチューブを慎重にリキャップします。酢酸マグネシウム溶液が再水和したサンプルと確実に混合するように、チューブをスピンさせます。その後、激しく反転させて8～10回混合してから再びスピンドウンします。
 9. チューブをT8-ISOに入れ、測定を開始します。

ポジティブコントロールは、フルオレセイン・フルオロフォアで標識されたプローブを使用します。励起最適値は488nmであり、発光最大値は520nmです。通常ポジティブコントロール反応で期待される結果は、約1000mVの初期ベースラインで読み出し、約6～7分後にシグナル生成の検出可能となり、ベースライン蛍光の約3倍～4倍で最終的なプラトーシグナルとなります。

ブラックホールクエンチャー（BHQ）を使用したプローブとDABCYLクエンチャーを使用したプローブとでは、ベースラインの高さが変わることがあります。

注意：続けて別の実験を行う際は、核酸のキャリーオーバーの可能性を最小限に抑えるための注意を払ってください。前処理ステップと後処理ステップには別々の作業領域とピペッターを使用してください。ポジティブディスプレイメント方式ピペットまたはエアゾール耐性フィルターピペットチップを使用してください。使用済みのピペットチップや反応に使った容器などは気密容器に回収してください。アンプリコンを精製し、アガロースゲル上でそれらを分析するときは、特別な注意を払ってください。

 **日本ジェネティクス株式会社**

☞ <http://www.n-genetics.com>

✉ info@genetics-n.co.jp

〒112-0004 東京都文京区後楽1-4-14 後楽森ビル18階
Tel. 03 (3813) 0961 Fax. 03 (3813) 0962

本製品はライフサイエンス分野における研究での使用を目的としています。仕様は2018年5月現在のものです。製品は改良のため予告なく変更する場合があります。

M0064