TwistDx™

Unwind DNA's possibilities

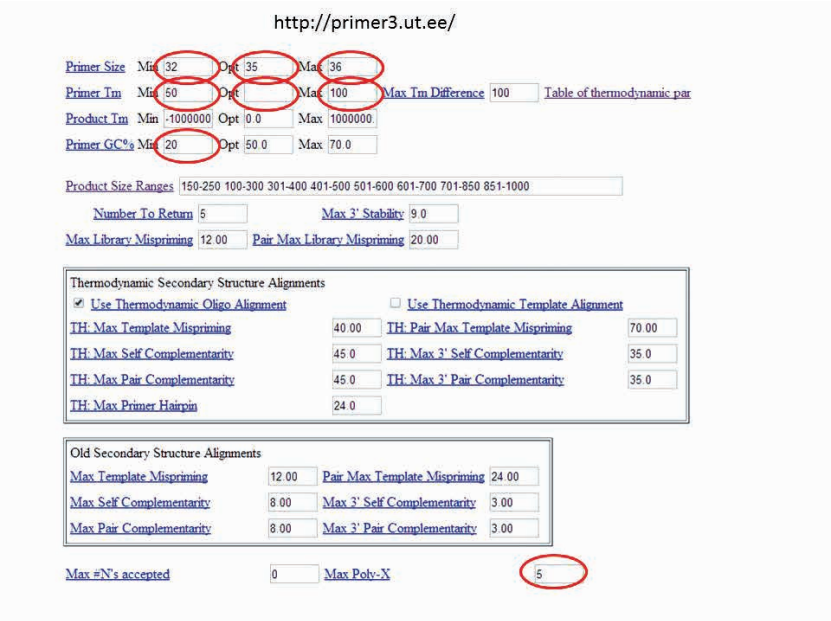
RPA プライマーとプローブに関する ガイドライン

RPA プライマーとプローブに関するガイドライン

プライマーとプローブの設計に関する詳細は、別紙の TwistAmp® キット Appendix も合わせてご参照ください。

プライマー設計ソフトウェア

RPA のプライマーとプローブの設計ソフトウェアについては、まだ最適デザインについて研究途中であるため、公式なソフトウェアは現在提供されていません。現在利用できる PCR プライマー用の設計ソフトウェアは、適切なプライマーペアの判定に融解温度（Tm）を使用していることがほとんどであるため、これを RPA 用に使用することはお勧めしません。RPA 反応では、熱融解は生じないため（すべて酵素によって行われます）、Tm 値と RPA プライマーの性能の間に相関があるのか、また相関があったとしてもどの程度かは分かっていません。従って、現時点ではすべてマニュアルでの設計になります。
一部の RPA ユーザーは、Primer3 など設計ソフトウェアを使って（初期値のプライマー長を 32 ～ 36 base に変更し、Tm 部分のスイッチを切って）プライマーを開発していますが、感度の高いプライマーを使用したい場合は、別紙の TwistAmp® キット Appendix に記載されている内容に従って設計してください。Primer3 の設定方法につきましては、以下のパラメータのスクリーンショットを参考に設定してください。



PCR プライマーには、RPA プライマーにも適用できるいくつかの基本ルールがあります。但し、以下のことは避けるように注意してください。

1）長いホモポリマーの繰り返し配列
2）反復配列
3）多数の二次構造をもちうる領域
4）高い（>70%）GC または AT 領域
5）プライマー -プライマー相互作用を引き起こす可能性がある配列
参考情報：上記のような配列チェックができる web サイトが一般に公開されています。詳しくはお問い合わせください。

リアルタイムで実行したい場合は、特異的 TwistAmp® exo プローブの開発が不可欠です。プライマーの設計とスクリーニングの例を以下に示しますのでご参照ください。ここでは、プローブを追加した配列の一部選択し、別紙の TwistAmp® キット Appendix の内容に従って設計しました。この方法は、検討するすべてのプライマーに有効ではありませんが、検討する多数の中から使用できる適切なプライマーをピックアップするためのスクリーニングプロセスであるとご理解ください。

RPA への PCR プライマー・プローブの使用

PCR に使用される長さのプライマー（例えば 18 ～ 23 ヌクレオチド）が、RPA でも有効であるケースが確認されています。但し、その場合キネティクスは若干遅くなるかもしれません。もし、10 ～ 15 分という迅速な増幅が可能な RPA のメリットをフルに活用しようとする場合は、PCR プライマーよりも若干長めのプライマー（および短めのアンプリコン）をお勧めします。
一般的な PCR プローブシステムは、TwistAmp® キットの使用に適していません。特に、ポリメラーゼの 5’ → 3’ ヌクレアーゼ活性を採用している系は、TwistAmp® キットでは使用できません。そのような酵素活性は、RPA の生化学的特性に基本的に適合しないためです。RPA 反応は、TaqMan プローブと適合しませんし（ポリメラーゼが鎖置換型であるため）、分子ビーコンとも適合しません（反応系に、それらを線形にするシングルストランド結合タンパク質が含まれているため）。

論文に使用されているプライマー設計の例

RPA に関する論文が既に多数発表されており、そこに記載されているプライマーを参考に設計していただくことも可能です。例えば、ドイツの研究グループは、バチルス・アントラシス（炭疽菌）を含む 10 の RPA アッセイを開発し、その論文を発表しています。
Development of a panel of Recombinase Polymerase Amplification assays for the detection of biothreat agents: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23345286
それ以外にも、RPA を使った他の論文も以下のリンクからご確認いただけます。
http://www.twistdx.co.uk/publications/

プライマー・プローブのご注文

プライマーとプローブのご注文につきましては、別途弊社までご相談ください。

RPA について

RPA は、ニュートラルなプラットフォームなため、37 ～ 42℃の一定温度に維持でき、かつヒートリッドのスイッチを切れる装置であれば、どのようなサーマルサイクラーでも操作できます。もし蛍光検出が不要であれば、ヒートブロックや恒温槽でも使用できます。
低コピー数の標的配列を増幅したい場合は、別紙のキットマニュアルに記載のように、反応開始から 4 ～ 6 分後に反応液を撹拌してください。詳細は、キットのマニュアルに記載のプロトコルをご参照ください。

TwistAmp® exo 蛍光プローブを用いたプライマースクリーニング手順

TwistAmp® exo 蛍光プローブを使ってプライマースクリーニングを行う場合は、以下の手順を参考にスクリーニングを行ってください。

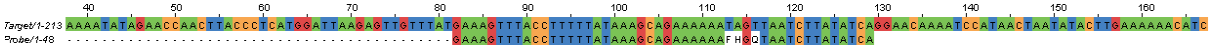
標的配列を選択する

TATACTACCACTGAGATTGATCTAAATGACAT
TATGCAAAATATAGAACCAACTTACCCTCATG
GATTAAGAGTTGTTTATGAAAGTTTACCTTTT
TATAAAGCAGAAAAAATAGTTAATCTTATATCA
GGAACAAAATCCATAACTAATATACTTGAAAA
AACATCAGCGATAGATACAACTGATATTAATA
GGGCTACTGATATGATGAGG

dT-フルオロフォアとそれに応じたdT-クエンチャーに考えられる塩基を同定する

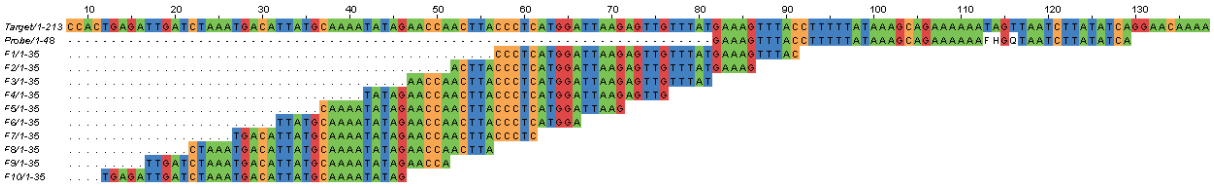
TATACTACCACTGAGATTGATCTAAATGACAT
TATGCAAAATATAGAACCAACTTACCC**T**CA**T**
GGA**TT**AAGAG**TT**G**TTT**A**T**GAAAG**TTT**ACC**TT**
TTTA**T**AAAGCAGAAAAAA**T**AG**TT**AA**T**C**TT**A**T**
A**T**CAGGAACAAAATCCATAACTAATATACTTG
AAAAAACATCAGCGATAGATACAACTGATATT
AATAGGGCTACTGATATGATGAGG

プローブ配列を選択する



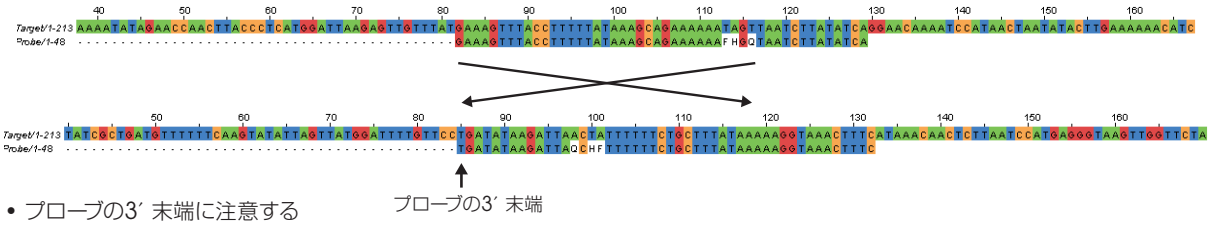
- フルオロフォア (F) とクエンチャー (Q) の間の1〜3塩基にTHFのギャップ (H) を挿入
- 脱塩基部位 (H) から5′ 側に30塩基以上の長さが必要
- 脱塩基部位 (H) から3′ 側に15塩基以上の長さが必要

フォワードプライマーを選択する



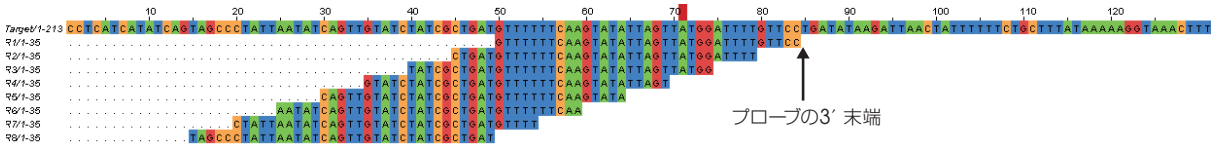
- 35merのプライマー長を選択
- F1 = 10塩基がプローブと重複
- F1-F10 = 5塩基ずつ離す

逆相補配列



- プローブの3′ 末端に注意する
- リバースプライマーはプローブと重複してはならない

リバースプライマーを選択する



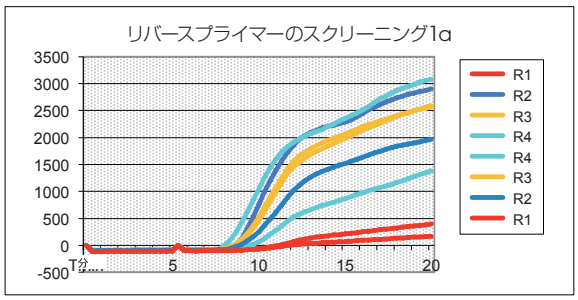
- 35merのプライマー長を選択
- R1 = 0塩基がプローブと重複
- R1-R8 = 5塩基ずつ離す

プライマーのスクリーニングを開始する

- フォワードプライマー1を選択してリバースプライマーR1-R8をスクリーニング
- ベストな結果を得るために最も厳密な条件を使用（50テンプレートコピー/ラン）
- 各プライマー候補を2本ずつ使ってスクリーニングを実施
- キットのプロトコルに従って反応液を撹拌する。（この場合RNAターゲットであるため、5分後に反応液を撹拌）

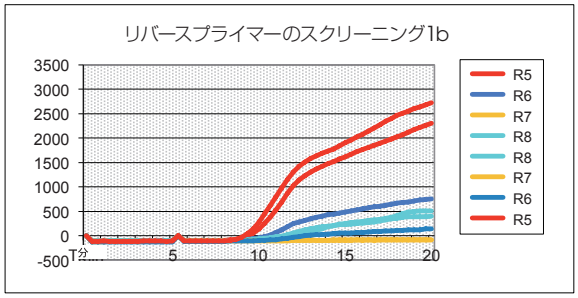
リバースプライマーのスクリーニング　ラウンド1

F1 =フォワードプライマー

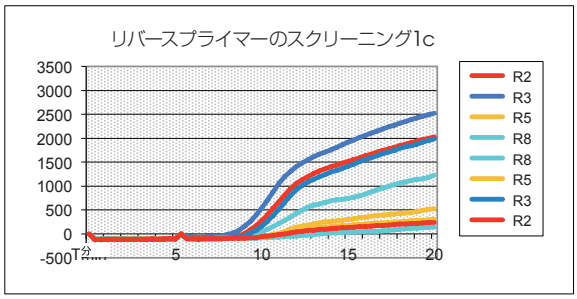


より厳密な試験のためにR2とR3を選択

RPAのヒント：反復結果の不良は、プライマーペアが検出限界に近いことを示すことが多い。



より厳密な試験のためにR5とR8を選択

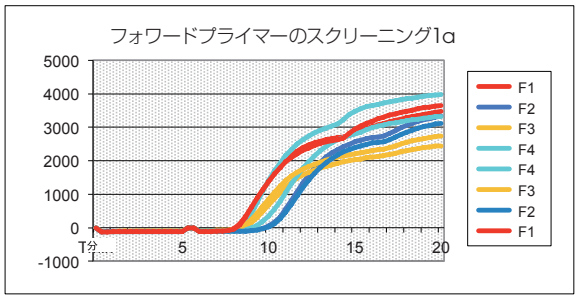


テンプレートコピー数を1反応あたり50から25にして、ストリンジェンシーを改善

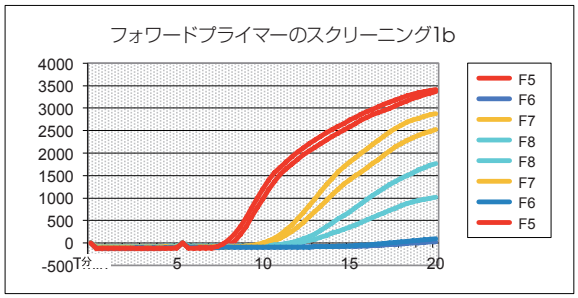
フォワードプライマーのスクリーニングにR3を選択

フォワードプライマーのスクリーニング　ラウンド1

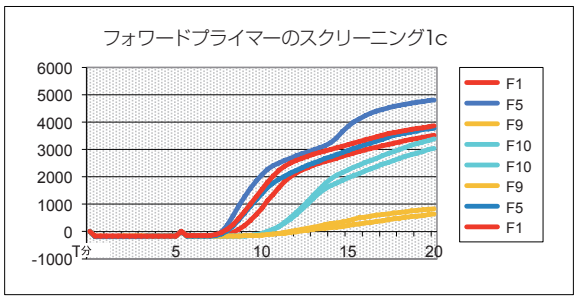
R3 =リバースプライマー



より厳密な試験のためにF1を選択



より厳密な試験のためにF5を選択

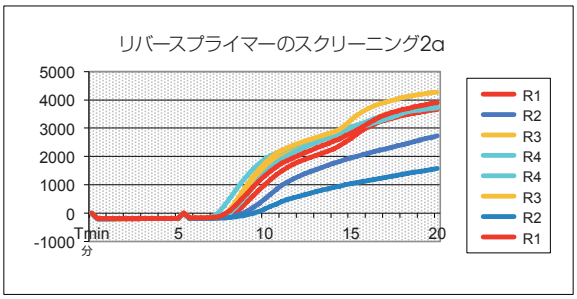


テンプレートコピー数を1反応あたり50から25にして、ストリンジェンシーを改善

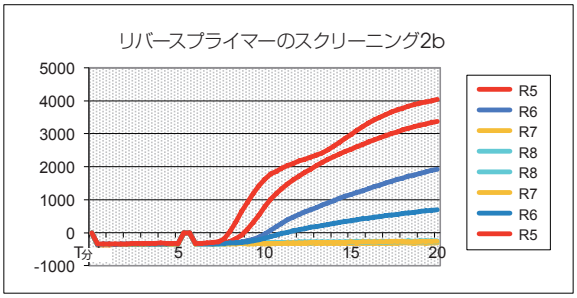
F5を選択してリバースプライマーを再スクリーニング

リバースプライマーのスクリーニング　ラウンド2

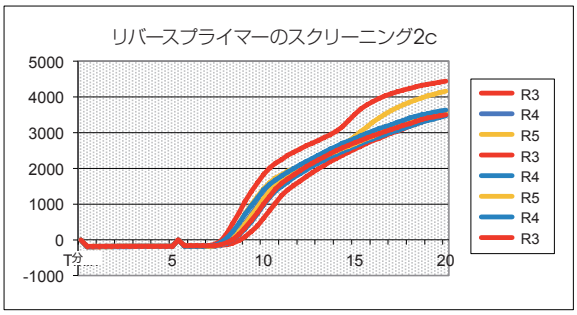
F5 =フォワードプライマー



より厳密な試験のためにR3とR4を選択



より厳密な試験のためにR5を選択

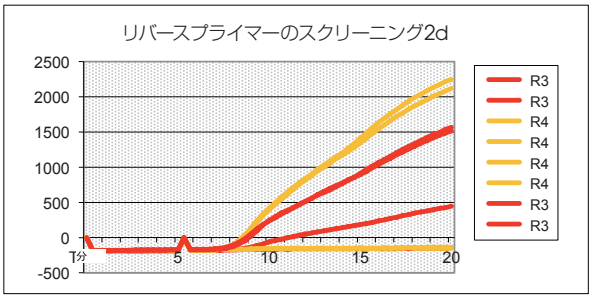


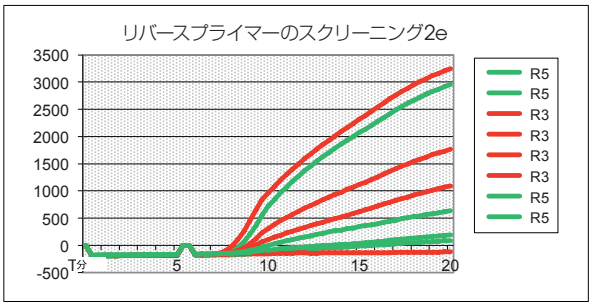
テンプレートコピー数を1反応あたり50から25にして、ストリンジェンシーを改善

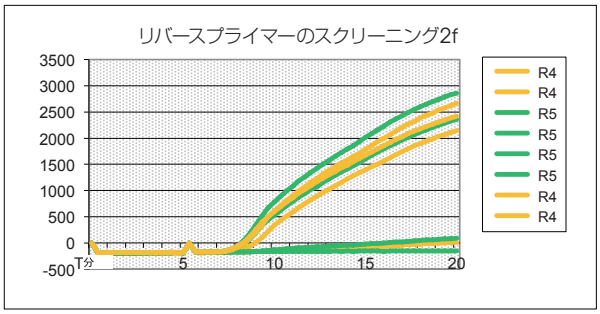
明らかに最適な組み合わせではないため、より厳密な試験を再度実施

リバースプライマーのスクリーニング　ラウンド2を続行

F5 =フォワードプライマー
5テンプレートコピー/ラン





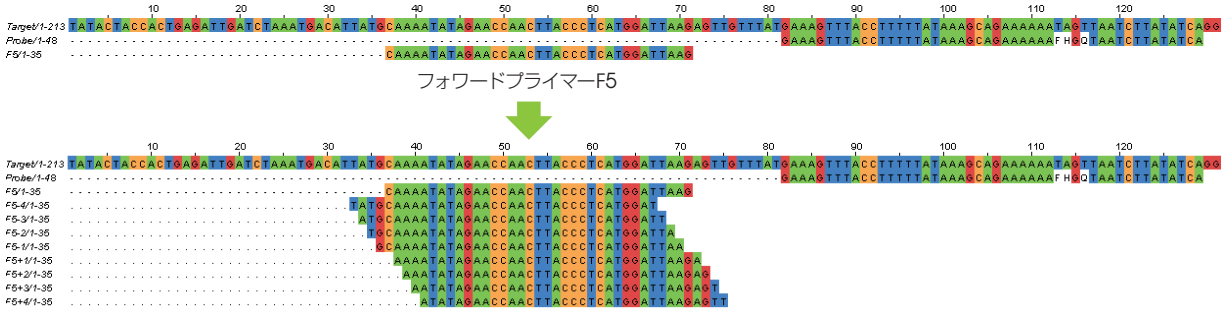


より厳密な試験のためにR4を選択

プライマーのスクリーニングシャッフル

- 選択したプライマーであるF5とR4を1塩基ずつずらしてシャッフル
- ベストな結果を得るため更に厳密な条件を使用（25テンプレートコピー/ラン）
- 各プライマー候補を2本ずつ使ってスクリーニングを実施

フォワードプライマーを選択する

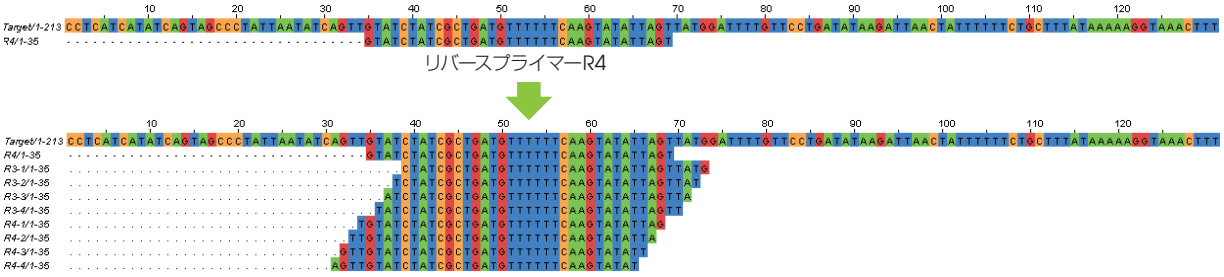


フォワードプライマーF5

F5プライマーシャッフル

- 35merのプライマー長を選択
- F5-x =F5プライマー　5′ 側にx塩基移動
- F5+x = F5プライマー 3′ 側にx塩基移動
- NB F5-5 = F6 及び F5+5 = F4いずれも既に却下

リバースプライマーを選択する



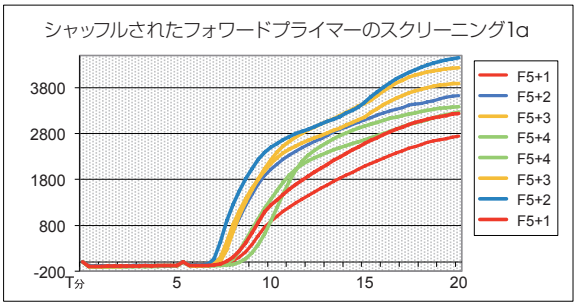
リバースプライマーR4

R4プライマーシャッフル

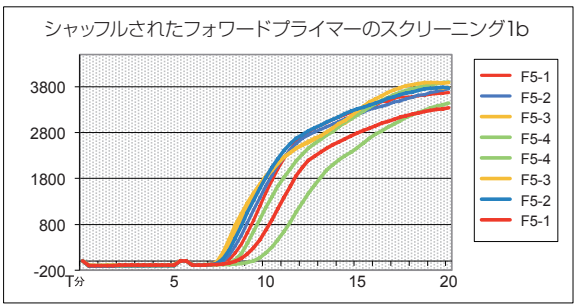
- 35merのプライマー長を選択
- R4-x = R4プライマー 5′ 側にx塩基移動
- R3-x = R3プライマー 5′ 側にx塩基移動
- NB R4-5 = R5既に却下

シャッフルされたフォワードプライマー　スクリーニングラウンド1

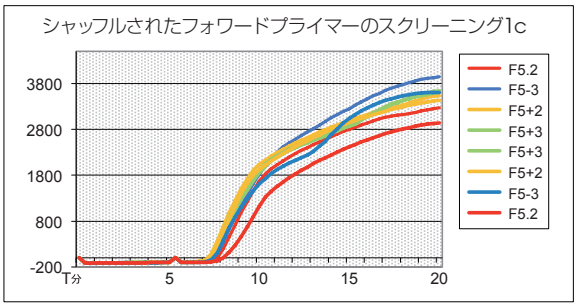
R4 =リバースプライマー
25テンプレートコピー/ラン



次の試験のためにF5+2とF5+3を選択



次の試験のためにF5-3を選択

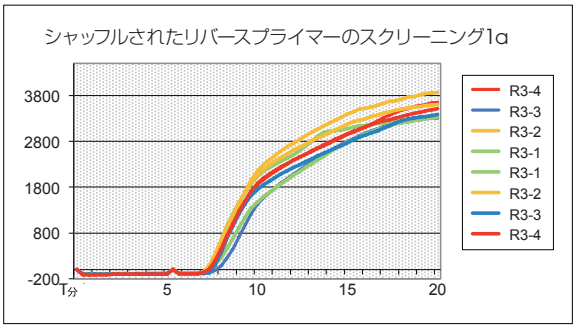


シャッフルされたベストのプライマーに比べ F5 (F5.2)をリメイク

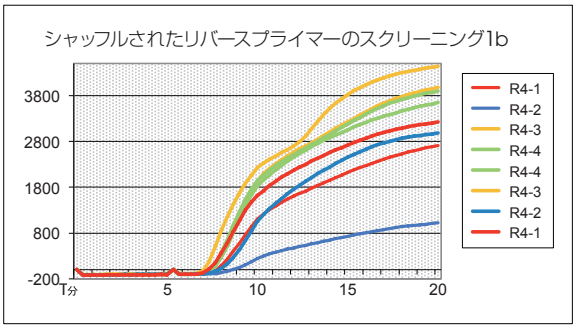
F5+2を選択してリバースプライマーを再スクリーニング

シャッフルされたリバースプライマー　スクリーニングラウンド1

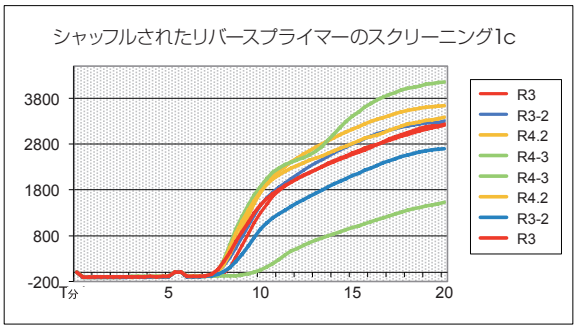
F5 +2 =フォワードプライマー
25テンプレートコピー/ラン



次の試験のためにR3-2を選択



次の試験のためにR4-3を選択



シャッフルされたベストのプライマーに比べ
R3（R3.2）とR4（R4.2）をリメイク

ベストのリバースプライマーとしてR4を選択

このように、幾つかの候補の組み合わせから最適なプライマーを選択することができます。
プライマー、プローブの作製につきましては、別途弊社までお問い合わせください。

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4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。