

# GMP オリゴ核酸合成、プローブ合成サービス

## GMP オリゴDNA合成

- ◎ 商用キットや、体外診断薬用のオリゴ核酸合成品を供給致します。
  - ◎ 分注、ラベリング、パッケージング等、幅広いOEMサービスに対応しております。
  - ◎ 商用ライセンスの必要ない「Freedom™ Dyes」もご利用いただけます。
- まずは弊社までお問い合わせ下さい。

IDTは、GMP製造にも力を入れています。商用キットや体外診断薬用オリゴ核酸合成品は、ISO13485:2003に準拠した専門のGMP製造部にて合成致します。GMP製造部のオリゴ核酸合成品は、IVD、ASR及びLDT（※）への使用をFDAから認可されています。また、GMP製造部では、お客様の要望に応じた各種規制に対応するため、お客様の希望に応じた品質基準を設けて製造を行います。トレーサビリティも整備されており、品質及び規格の再現性も検証可能です。製造量のスケールアップや、精製、納品物の分注、複数の合成品の混合、最終包装にも対応致します。

※ IVD (In Vitro Diagnostics)、ASR (Analyte Specific Reagents)、LDT (Laboratory Developed Tests)

## GMP オリゴの製造

- ◎ LIMS (Laboratory Information Management System) により、製造情報を記録します。
- ◎ クリーンルームの規格であるISO14644のClass 8に準拠した合成、加工、包装を行います。
- ◎ 品質分析書を提供します。
- ◎ 同一品質の合成品を複数年にわたって供給するための供給契約締結も可能です。

## 納品形態のカスタマイズ

お客様のご要望に応じて設定します。

- ・ 納品量：数ナノモル～数グラム
- ・ 濃度
- ・ 複数のオリゴ核酸合成品の混合
- ・ プレートでも納品可能
- ・ 包装やラベルの作成・貼付
- ・ キットのOEM製造
- ・ 特殊な品質分析

## Freedom™ Dyes (商用ライセンスが必要の無い蛍光色素)

IDTから、商用ライセンスが必要無い蛍光色素、Freedom™ Dyesを提供可能です。IDTから購入するFreedom™ Dyes 標識オリゴ合成品であれば、商用キットあるいは体外診断薬の構成成分として使用する場合にも、蛍光色素使用のロイヤリティの支払いは不要です。

### ■ 蛍光色素の種類

FAM, HEX™, JOE™, MAX™, TET™, ROX™, TAMRA™, Yakima Yellow®

また、Freedom™ Dyesには、ZEN™ 及び Iowa Black®のIDTオリジナルのクエンチャーや、VIC®, LIZ®, and Alexa Fluor® dyesなどの代替色素となるATTO™も含まれます。

※ 各色素の詳細については、修飾オプションのp.7～11をご覧ください。

## 修飾

IDTで行える様々な修飾をオリゴ核酸合成品に付加できます。

お客様の希望の修飾に対応できるかどうか、まずはお問い合わせください。

## GMP プローブ・MGB Eclipse® プローブ合成

お客様が開発する商用キットや体外診断薬の構成成分として利用できる定量PCRプローブの提供が可能です。IDTでは、2種類のプローブが提供可能です。

◎ GMP プローブ：クエンチャーに Iowa Black® を用います。研究用はもちろん商用にもご利用頂けます。

◎ MGB Eclipse® プローブ：クエンチャーに MGB Eclipse® を用います。ヒト診断を目的とした商用にのみご利用頂けます。

※ Iowa Black® については p.17 をご参照下さい。

GMP プローブ	
蛍光色素	FAM, Cy <sup>3</sup> , Cy <sup>5</sup> , HEX™, JOE™, ROX™, TET™, Yakima Yellow®
クエンチャー	Iowa Black® FQ, Iowa Black® RQ, ZEN™, TAO™
長さ	15 ~ 45 bases
納品量	ご要望に応じて検討
精製グレード	HPLC 精製
納期予定	3 ~ 4 週間

MGB Eclipse® プローブ	
蛍光色素	FAM, HEX™, TET™, Yakima Yellow®
クエンチャー	MGB Eclipse®
長さ	通常 13 ~ 20 bases
納品量	6 nmole, 20 nmole, 50 nmole
精製グレード	HPLC 精製
納期予定	3 ~ 4 週間

### お見積り・お問い合わせ

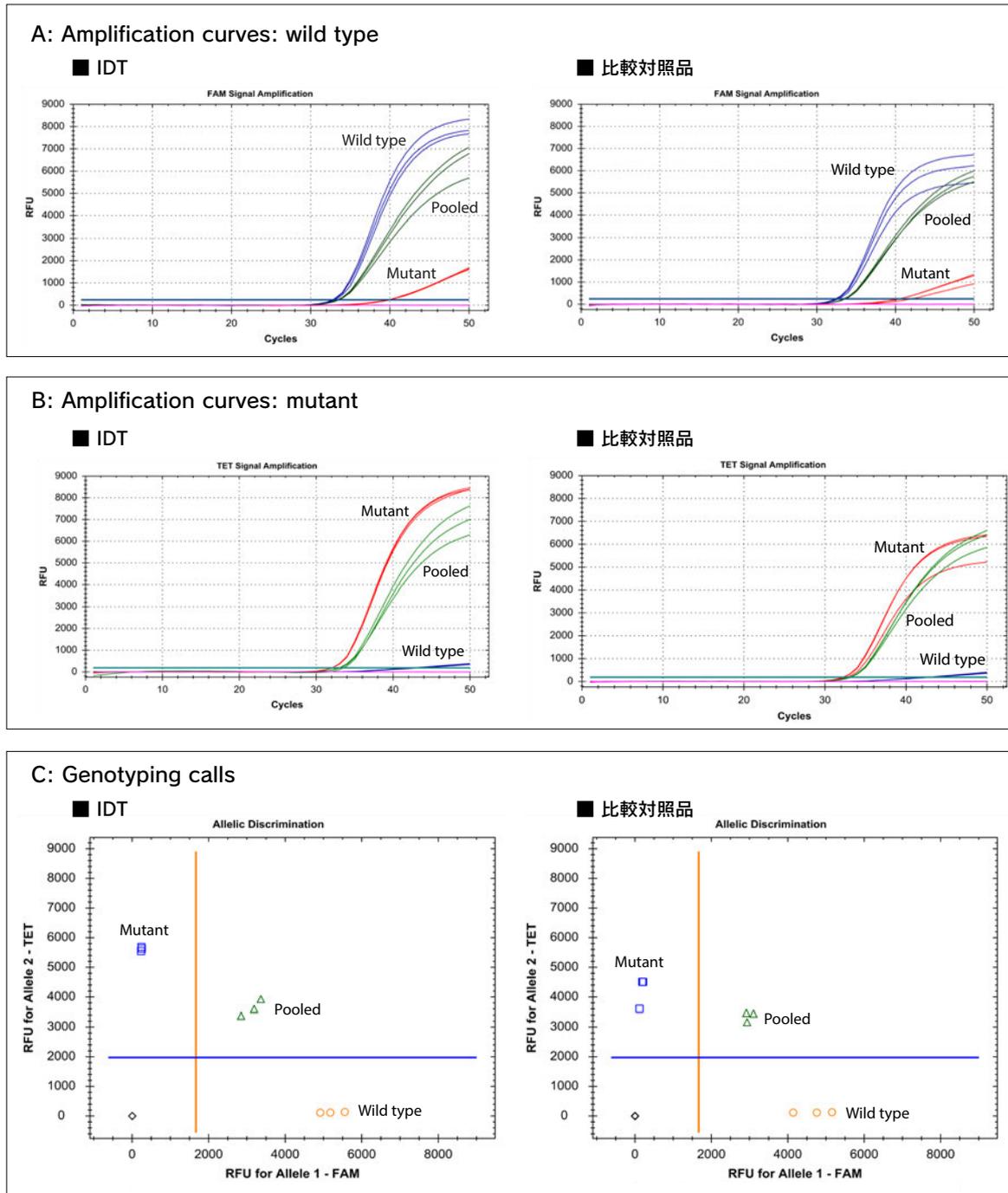
お見積りやお問合せは、まず日本法人の IDT-MBL KK へ一度ご連絡ください。最終的には米国の GMP 製造部との契約になりますが、出来るだけ弊社でサポートさせて頂きます。ご連絡をお待ちしております。

連絡先：oligo@mbi.co.jp



## MGB Eclipse® プローブの性能について

弊社で合成したMGB Eclipse® プローブを用いてKRAS遺伝子のジェノタイピング実験を行いました。他社様の同等品と比較しても、同等以上の性能を示しました。



### ■ 実験条件

- ・ターゲット変異 : KRAS 遺伝子 G12R
- ・プローブと色素 : Wild type - FAM™プローブ、Mutant - TET™プローブ
- ・反応系 : 10 μL
- ・テンプレート : すべて gBlocks® で作製した。Pooled は Wild-type と Mutant を等量混合したサンプル。サンプル量はそれぞれ 10 の 4 乗コピーずつ。
- ・マスターミックス : TaqMan® Gene Expression Master Mix (Life Technologies)
- ・検出機器 : CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- ・サイクル条件 : 3 min. 95℃ ; 50 x (10 sec. 95℃ , 30 sec. 60℃ )

### ■ 結果

- ・図Aおよび図B : Wild type (野生型) および Mutant (変異型) の検出。左列が IDT の MGB Eclipse® プローブ、右列が比較対照品。
- ・図C : IDT の MGB Eclipse® プローブ、比較対照品ともに、明確にジェノタイピングが行えた。

# SNP タイピング 特集

例えばKRAS 遺伝子に変異のある大腸がんでは、抗EGFR抗体薬の効果が期待できないため、事前にKRAS 遺伝子の変異が調べられています。このコンパニオン診断薬に代表される様に、近年、SNPのタイピングはますます重要になっています。本特集では、IDTが提供できるSNP検出ツールをご紹介しますのでございます。

## LNAプローブ

詳細 ▶▶▶ p.18

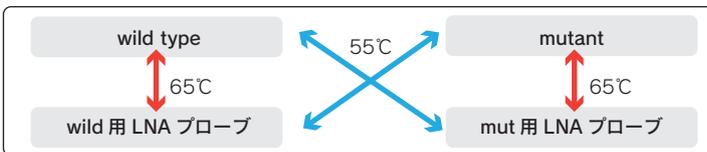
PrimeTime® qPCR Probe に LNA 塩基 (Locked Nucleic Acids) を用いたプローブです。

LNA 塩基は、A と T の様に相補的である場合には強く結合するため Tm 値を大きく上昇します。逆に、A と C の様にミスマッチである場合は、Tm 値が著しく下がります。このように、1 塩基の違いに対して Tm 値が大きく変化するため LNA プローブは SNP タイピングに大変有用です。

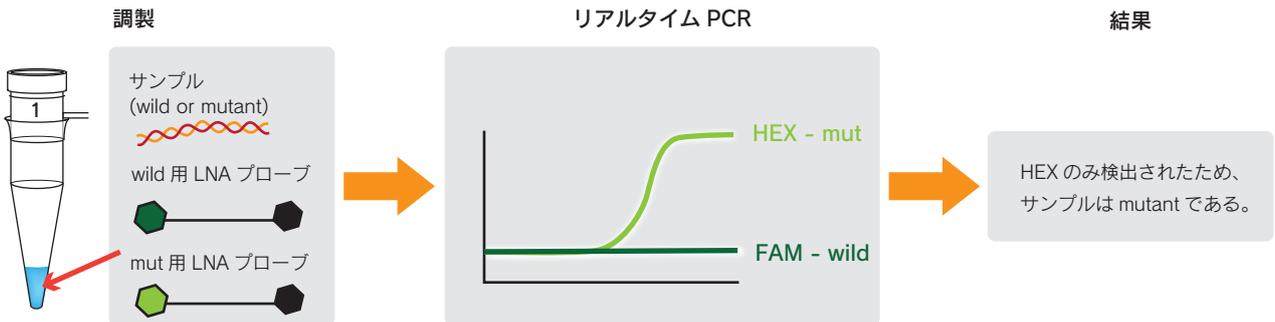
1) 例えば下記のような SNP の場合、2 種類の LNA プローブを設計します。LNA 塩基は、塩基の前に「+」を付けて表しています。(設計方法は p.76 参照)

<b>wild type</b> XXXXATG <b>G</b> TGAXXXX	<b>mutant</b> XXXXATG <b>A</b> TGAXXXX
<b>wild 用 LNA プローブ</b> FAM/XXXXAT+G+G+TGAXX+XX/IBFQ	<b>mut 用 LNA プローブ</b> HEX/XXXXAT+G+A+TGAXX+XX/IBFQ

2) この時の Tm 値は下記の様になり、wild type は wild 用 LNA プローブと、SNP は SNP 用プローブとのみ反応致します。



3) そのため、サンプルが wild か mut か、簡便に判断できます。



## Surveyor® Mutation Detection Kits

詳細 ▶▶▶ p.38

Surveyor® Mutation Detection Kits は、基準となるコントロール配列に対して、テストサンプル配列に変異がある場合に、変異の箇所を切断するというキットです。変異の有無を電気泳動で簡単に検出できます。

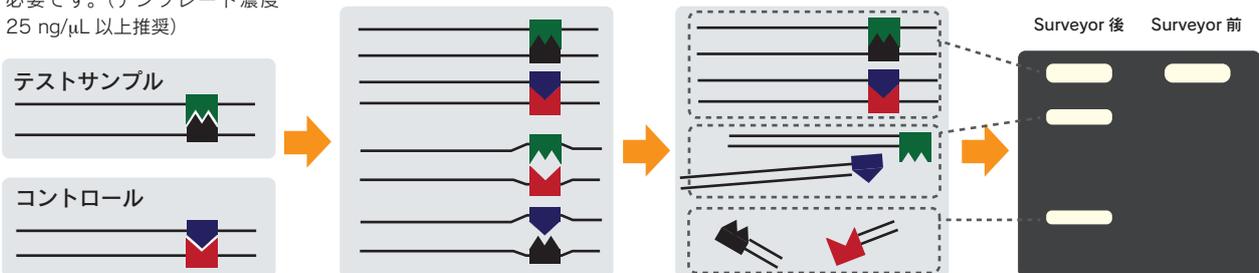
### ■ SNP がある場合の実験の流れ

コントロール配列と変異のあるテストサンプルを用意します。量が少ない場合は事前に PCR が必要です。(テンプレート濃度 25 ng/μL 以上推奨)

サンプルを混ぜあわせ、熱変性および再会合を行います。

Surveyor Nuclease を用いて、ミスマッチ塩基の 3' 側を切断します。

最後に電気泳動で切断を確認します。

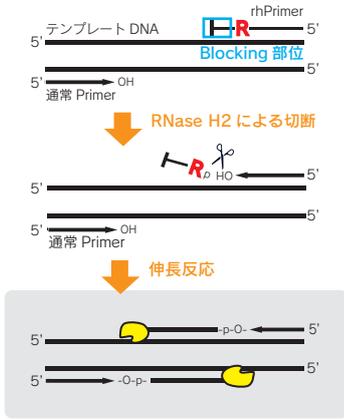


変異がない場合は切断が起こらないため、テストサンプルに SNP があったか否かは電気泳動の結果ですぐに分かります。

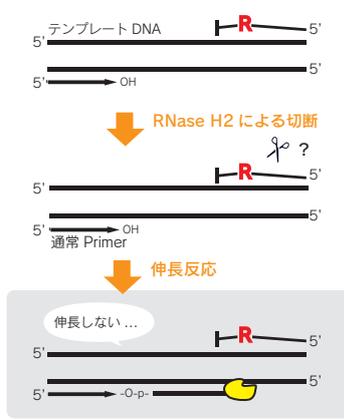
rhPCRとは、RNA/DNAのハイブリッドを認識・切断するRNaseH2を用いたPCRで、プライマー内にRNAを持つrhPrimerというプライマーを用います。RNAとDNAが相補となる時のみRNaseH2による切断が起こりPCRが伸長するため、SNPの有無を簡単に判別出来ます。

SNP タイピングにおける rhPCR の作用スキーム

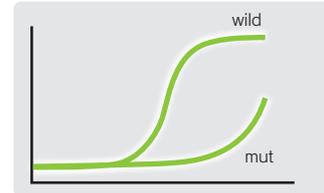
■ RNA/DNA がマッチ (wild) である場合



■ RNA/DNA がミスマッチ (mut) である場合



■ wild・mut で qPCR を行くと、下記のような曲線を描きます。



このようにサンプルが wild であるか mut であるかは、増幅曲線で一目瞭然です。

■ RNA/DNA の組み合わせと Cq 値の差異について

下記の様に、rhPrimerのRNAがrC、テンプレートDNAがGの場合 (A) と、rhPrimerのRNAがrU、テンプレートDNAがGの場合 (B) では、Cq値に10.9の差異がありました。また、rhPrimerのRNAがrAの場合は13.6、rGの場合は、12.7の差異がありました。この様に、RNAとDNAの組み合わせによりCq値は変わりますが、いずれもマッチ/ミスマッチを明確に判別出来ます。(この実験に用いた配列はhuman SMAD7遺伝子(NM\_005904)です。詳細は参考文献をご参照ください。)

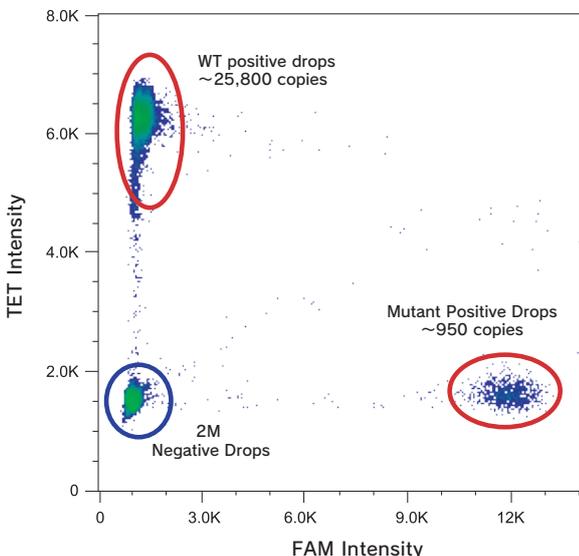


<参考文献>

Dobosy JR, et al. RNase H-dependent PCR (rhPCR): improved specificity and single nucleotide polymorphism detection using blocked cleavable primers. BMC Biotechnol. 11, 80 (2011) [Open Access]

デジタルPCRとダブルクエンチャー LNA プローブを用いたレアアレル変異の検出

dPCR機器の開発を行っているRainDance社は、レアアレル変異の検出において、LNA-ZENプローブを用いております。LNAを用いる事で、短いプローブを作成することができ、さらにZENを加える事でバックグラウンドを下げる事が出来るためです。例えば下記の図は、EGFR T790M (2369C>T)のレアアレル変異をLNA-ZENプローブを用いて検出した図です。



通常、LNAプローブにはZEN修飾は行っていません。しかしながら、特別注文という形で承ることが可能です。(p.21参照) 合成出来るかどうか判断いたしますので、下記のウェブサイトよりお気軽にお問い合わせ下さい。

IDT社サイトの使い方：LNAプローブの設計方法

[http://ruo.mbl.co.jp/bio/idt/How\\_to\\_design\\_LNA\\_probes.html](http://ruo.mbl.co.jp/bio/idt/How_to_design_LNA_probes.html)

IDT LNA