

Realtime PCR Master Mix

品名	包装	Code No.	価格
Realtime PCR Master Mix	200回用 (1ml×5本)	QPK-101	¥37,000
	40回用 (1ml×1本)	QPK-101T	¥10,000
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	200回用 (1ml×5本)	QPK-201	¥37,000
	40回用 (1ml×1本)	QPK-201T	¥10,000

汎用性の高いリアルタイムPCR試薬です。様々な条件で能力を発揮します。

はじめに

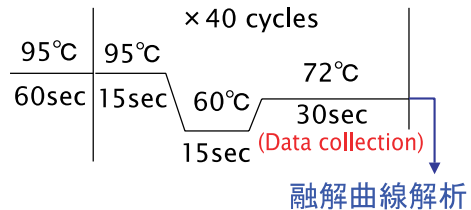
本試薬はTaq polymeraseをベースとした高性能なリアルタイムPCR用マスターミックスです。プライマー以外の全ての組成を含む2倍濃度の反応溶液で供給されます。TaqMan®アッセイ、プローブアッセイ、及びインターカレーターアッセイに対応する2種類のキットが準備されており、それぞれ以下のような特長があります。今号では、これらキットを用いて比較実験等を行った例を紹介いたします。

	Realtime PCR Master Mix	SYBR® Green Realtime PCR Master Mix
用途	TaqMan®アッセイ ハイブリダイゼーションプローブアッセイ	インターカレーターアッセイ
対応機器	・LineGene (BioFlux社、Code No.: BFFQD-33A) ・LightCycler™ (Roche Diagnostics社) ・ABI PRISM®シリーズ (Applied Biosystems社) など	(⇒ 本号 p.6をご参照ください)
特長	・BSAを含有しておりLightCycler™等のガラスキャピラリーシステムに対応します。 ・バシプリファレンスが添加されており、ABI PRISM®シリーズなどに対応します。 ・Taq polymeraseの中和抗体により、ホットスタートに対応します。 化学修飾によるホットスタートに比べ活性化の時間が短く、解析時間を短縮することができます。 ・LineGeneを用いることにより、10µlでのアッセイが可能です。 ・弊社逆転写酵素 (ReverTra Ace®) とRNase inhibitorの組み合わせにより“1ステップ” RT-PCRが可能です。	

方法

LineGeneを用いる標準的なインターカレーターアッセイのプロトコールを以下に示します。

DW	2.2 (µl)
SYBR® Green Realtime PCR Mix	5
Primer 1 (10pmole/µl)	0.4
Primer 2 (10pmole/µl)	0.4
希釈逆転写反応溶液(cDNA溶液) or DNA溶液	2
Total	10



他社のキットは、それぞれの取扱い説明書に従い至適条件で行いました。サンプルとしては、30ngのヒトゲノムDNAを10倍ずつ段階希釈したものをサンプルとして、β-actin遺伝子をターゲットとしてPCRを行いました。〈ReverTra Ace®を用いて逆転写した溶液を直接用いる場合は、DWにて10倍に希釈したものを用います。〉

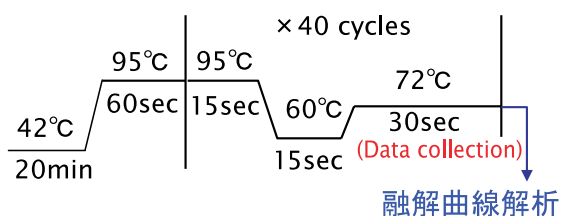
〈RT希釈液の調製〉

DW	28 (µl)
RNase inhibitor (40U/µl)	4
ReverTra Ace® (100U/µl)	1
Total	33

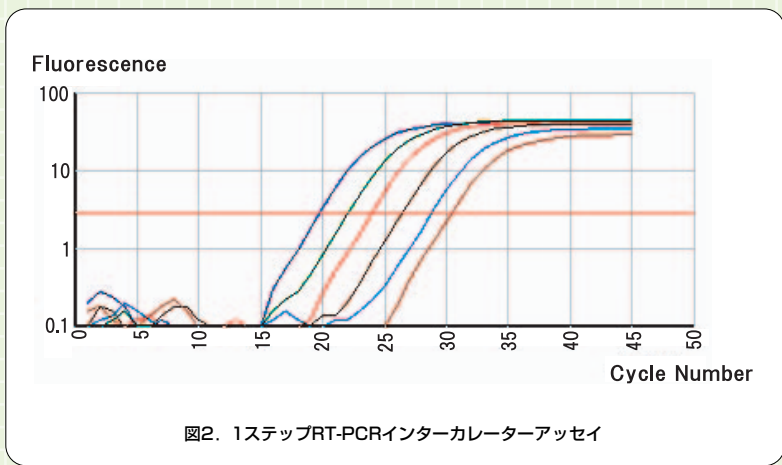
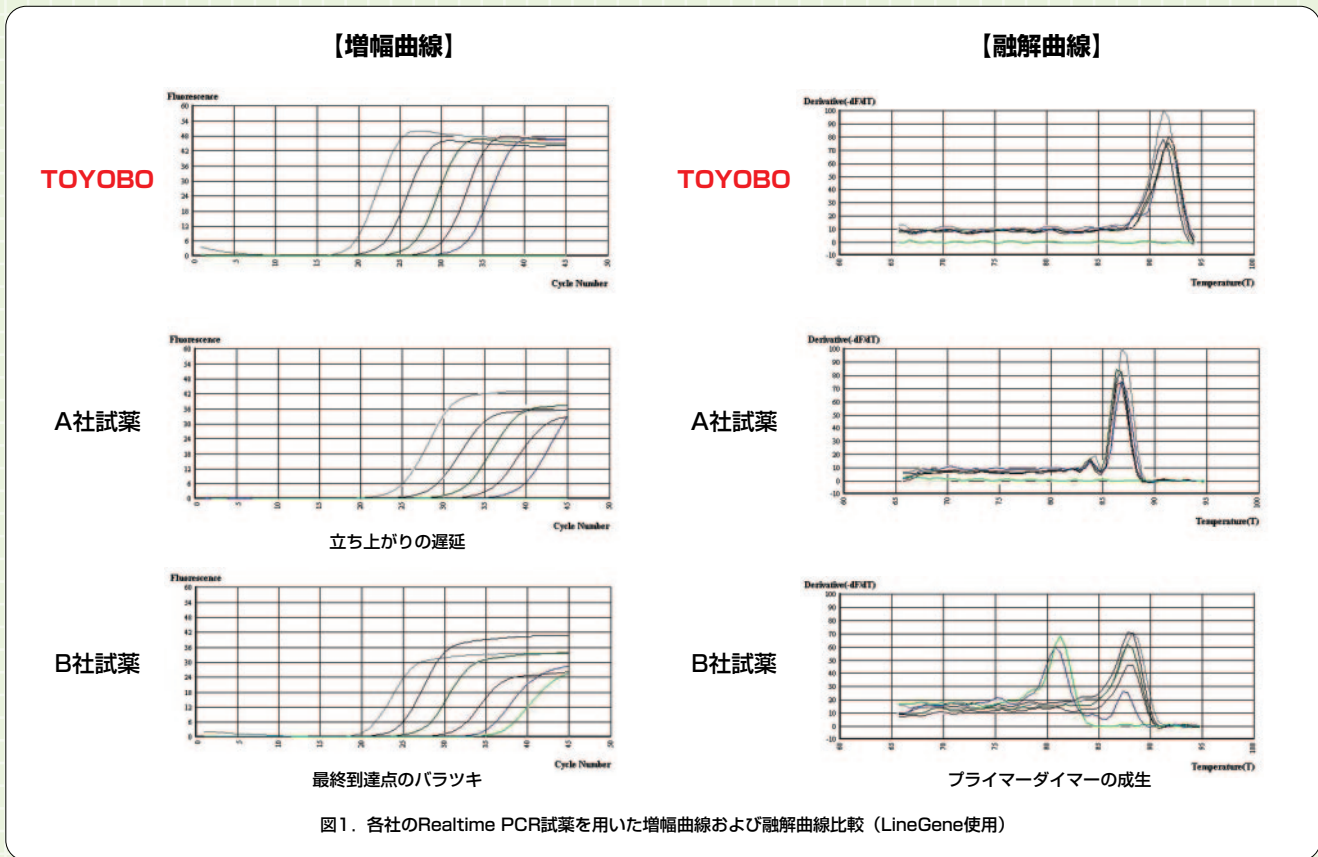
〈PCR反応溶液の調製〉

DW	2.2 (µl)
SYBR® Green Realtime PCR Mix	5
Primer 1 (10pmole/µl)	0.4
Primer 2 (10pmole/µl)	0.4
RT希釈液	1
RNA溶液	1
Total	10

LineGeneを用いた1ステップRT-PCRは次のプロトコールに従いました。サンプルは*in vitro* transcriptionにより作成したG3PDH mRNAの希釈系列(10°copyの5°希釈系列)を用いました。〈ダイマーの発生見られる場合、ReverTra Ace®の濃度を下げて検討します〉



結 果



SYBR® Greenを用いるインターカレーターアッセイでは、弊社の試薬を用いることにより、定量性の高い結果が得られることが分かりました。プライマーダイマーの生成もありませんでした(図1)。

1ステップRT-PCRインターカレーターアッセイにおいても、いずれの濃度でも良好な増幅曲線を得ることができました(図2)。一方で、逆転写していないサンプルでは増幅しないことも確認しています。〈このアッセイ法では2ステップでの反応に比べプライマーダイマー成生等の非特異反応が発生することがあるため、予備検討をお薦めします〉

このように、本試薬を用いることにより、再現性に優れた結果を簡便に得ることが可能です。是非一度お試しください。

関連商品

品 名	包 装	保存温度	Code No.	価 格
1stストランドcDNA合成キット ReverTra Ace -α-® (逆転写酵素+dNTPs他)	100回用	-20℃	FSK-101	¥53,000
逆転写酵素 ReverTra Ace®	10,000U×1本 10,000U×5本	-20℃	TRT-101 TRT-102	¥15,000 ¥60,000
RNase Inhibitor	2,500×1本 2,500×5本	-20℃	SIN-101 SIN-102	¥9,000 ¥36,000
LineGene(本体+ソフトウェア)	1式	-20℃	BFFQD-33A	¥1,890,000

※リアルタイムPCR試薬は、F. Hoffman-La Roch Ltd.、Roche Molecular Systems Inc.並びにPerkin-Elmer Corporationとのライセンスに基づき販売されるものです。

※ LightCycler®は、Idaho Technology Inc.並びにRoche Molecular Systems Inc.の商標です。

※ SYBR®は、Molecular Probes Inc.の登録商標です。

※ TaqMan®は、The Perkin-Elmer Corporationの登録商標です。