

UPLOAD

2013 November **VOL. 101**



SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR
→本誌p.1~4に詳細記事がございます。

Brand-New item

- 1 リアルタイムPCR用細胞溶解&cDNA合成キット(培養細胞用)
SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR キヨンパーン

HOT ITEM

- 5 高効率リアルタイムPCR用マスターミックス
THUNDERBIRD® qPCR Mix
- 7 高効率リアルタイムPCR用マスターミックス
KOD SYBR® qPCR Mix

USER'S NOTE

- 9 製品KOD SYBR® qPCR Mixを用いた実施例
生物農薬糸状菌の特異的検出及び定量

TECHNICAL REVIEW

- 11 高効率リアルタイムPCR用マスターミックス
「KOD SYBR® qPCR Mix」を用いたプロモーター領域、
CpGアイランドを含む領域の定量的増幅の事例

Q&A

- 13 高効率リアルタイムPCR用マスターミックス
KOD SYBR® qPCR Mix

NEW RELEASE

- 14 ViroStat社抗体・組換え抗原



リアルタイムPCR用細胞溶解&cDNA合成キット (培養細胞用)

SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR



NEW

■期間：2013年10月9日～2014年3月20日 (ご注文分)

培養細胞から簡便・短時間にリアルタイムPCR用の鑄型cDNAの調製が可能です。

SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code:SCQ-101)は、リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析のための細胞溶解試薬 (Lysis Reagents) と逆転写反応試薬 (RT Reagents) からなるキットです。本製品をご使用いただくことで、96ウェルプレートなどで培養した細胞から、逆転写反応の鑄型として利用可能なRNAを含む細胞ライセートを簡便に調製することができます。さらに、本キットに含まれる逆転写反応試薬は、この細胞ライセートからのRT反応に最適化されています。本キットにより、簡便、迅速に培養細胞からリアルタイムPCR用の鑄型cDNAの合成が可能であり、ハイスループットアッセイに適しています。

SuperPrep™ Cell Lysis Kit for qPCR (Code:SCQ-201)は、細胞溶解試薬 (Lysis Reagents) の別売品です。1-stepリアルタイムRT-PCRによる簡易アッセイのための細胞ライセートの調製にご使用いただけます。

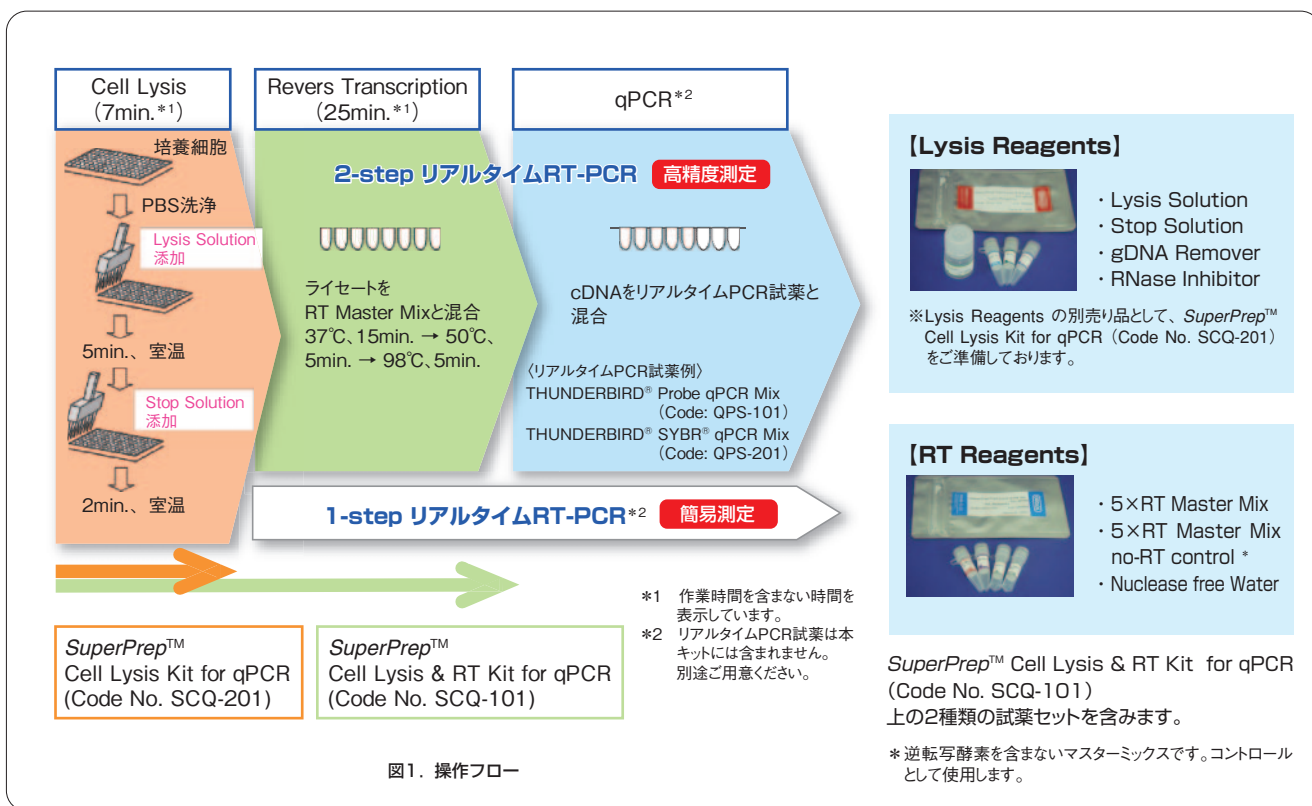


図1. 操作フロー

特長1 RNA精製不要

- 細胞をPBS (-) で洗浄後、Lysis Solution (gDNA Remover添加) を細胞に添加、懸濁し、室温で5分間インキュベートすることによって、細胞溶解とゲノムDNAの分解を同時に行います。反応停止はStop Solutionを添加して処理するのみで、熱処理は必要ありません。
- 逆転写反応は、細胞ライセート (希釈不要) を加え、20分間インキュベートします。

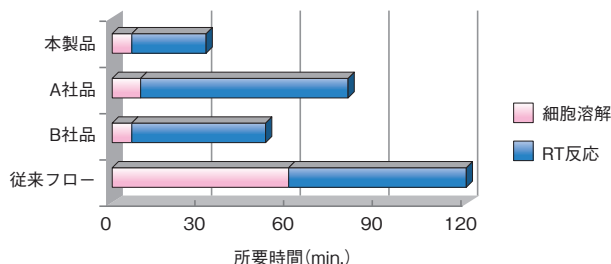


図2. cDNA合成までの所要時間
 従来フローの細胞溶解時間はRNA抽出作業時間を示します。

特長2 ▶ ライセートから高品質なcDNAを合成

最適化されたバッファー組成により、RNase等の細胞成分によるRNAの分解を効果的に抑えます(調製したRNAは氷上で2時間安定です)。また、DNase I 処理後にcDNA合成を行うことから、ゲノムDNAのコンタミの少ない高品質なcDNAを合成することができます。逆転写試薬は弊社の高効率逆転写酵素「ReverTra Ace®」をもとに最適化されたマスターミックス*となっており、簡便・高効率にcDNA合成を行うことができます。合成したcDNAは長期保存可能です。

本試薬は、幅広い種類の細胞を用いるアッセイに使用可能です。下表の代表的な細胞について適用できることを確認しています。

*マスターミックスにはランダムプライマーとOligo dTプライマーが最適比率で混合されています。

表1. 本製品の適用確認済み細胞

細胞名	接着/浮遊	種	細胞	由来
1 A431	接着	<i>H. sapiens</i>	epidermoid carcinoma cell line	上皮様細胞がん
2 C2C12	接着	<i>M. musculus</i>	myoblast cell line	筋芽細胞
3 Caco-2	接着	<i>H. sapiens</i>	colon adenocarcinoma cell line	大腸がん
4 CHO-K1	接着	<i>C. griseus</i>	ovary cell line	卵巣
5 COLO205	浮遊	<i>H. sapiens</i>	colon adenocarcinoma cell line	大腸がん
6 DLD-1	接着	<i>H. sapiens</i>	colon adenocarcinoma cell line	大腸がん
7 HCT-15	接着	<i>H. sapiens</i>	colon adenocarcinoma cell line	大腸がん
8 HDF	接着	<i>H. sapiens</i>	primary foreskin fibroblasts (primary cell)	皮膚線維芽細胞
9 HEK293	接着	<i>H. sapiens</i>	embryonic kidney cell line	胎児腎
10 HeLa S3	接着	<i>H. sapiens</i>	cervix carcinoma cell line	子宮頸がん
11 HepG2	接着	<i>H. sapiens</i>	hepatocellular carcinoma cell line	肝がん
12 Jurkat	浮遊	<i>H. sapiens</i>	T lymphocyte cell line	白血病T細胞
13 K562	浮遊	<i>H. sapiens</i>	myelogenous leukemia cell line	赤芽球様白血病細胞
14 KUSA-A1	接着	<i>M. musculus</i>	bone marrow stromal stem cell line	骨芽細胞様株
15 L929	接着	<i>M. musculus</i>	aneuploid fibrosarcoma cell line	結合組織
16 MCF7	接着	<i>H. sapiens</i>	breast adenocarcinoma cell line	乳腺がん
17 Neuro2a	接着	<i>M. musculus</i>	neuroblastoma cell line	神経芽細胞腫
18 NIH-3T3	接着	<i>M. musculus</i>	embryo fibroblast cell line	胎仔由来線維芽細胞
19 PC12	接着	<i>R. norvegicus</i>	adrenal pheochromocytoma cell line	副腎褐色細胞腫
20 rMSC	接着	<i>R. norvegicus</i>	bone marrow stromal stem cells (primary cell)	骨髄間質細胞
21 THP-1	浮遊	<i>H. sapiens</i>	acute monocytic leukemia cell line	単球
22 U937	浮遊	<i>H. sapiens</i>	leukemic monocyte lymphoma cell line	単球

特長3 ▶ ハイスループット解析のバラツキ低減

プロトコルから少量の分注工程や希釈工程を減らすことで、ハイスループット解析におけるバラツキを低減しました。また、細胞溶解時のピペティング操作を無くし、DNaseI 処理を並行して行うことで操作性を向上させました。DNase Iの反応の停止はStop Solutionを加えるのみで、RNAを不安定化する加熱工程などは不要です。

特長4 ▶ 様々なリアルタイムPCR試薬に使用可能

様々なリアルタイムPCR試薬(SYBR® Green I、TaqMan®アッセイ両方に対応可能)と組み合わせて使用可能です。また、弊社THUNDERBIRD® qPCR Mix (Code No. QPS-101、QPS-201)等と組み合わせて用いることによって、培養細胞から簡便かつ高精度の遺伝子発現解析が可能であることを確認しています。(p.5~p.6をご参照ください) さらに、弊社RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix (Code No. QRT-101、QRT-201)等の1-stepリアルタイムPCR試薬と組み合わせる簡易アッセイも可能です。

実施例1 データのバラツキを考慮したアッセイ系の質の評価

HeLa S3細胞を96ウェルプレートに 2×10^4 cells/wellずつ播種し、100nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を加えて 24 時間インキュベートしました。その後、PMA処理した12ウェル、未処理の12ウェルについてPBS (-) で細胞を洗浄し、SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCRで処理してcDNA合成を行いました。このcDNAを鋳型にTHUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (Code No.QPS-101) を用いてIL-6、IL-1 β 、 β -actin遺伝子についてTaqMan®プローブアッセイを行いました (n=12にて実施)。同様にA社同等品を用いてリアルタイムPCR解析を行いました (逆転写反応試薬とリアルタイムPCR試薬もA社キット付属品を使用)。IL-6、IL-1 β 遺伝子のCt値を β -actin遺伝子で補正し (Δ Ct)、PMA処理の有無の差 ($\Delta\Delta$ Ct) を算出しました。続いてZ'-factorを算出し、比較を行いました。

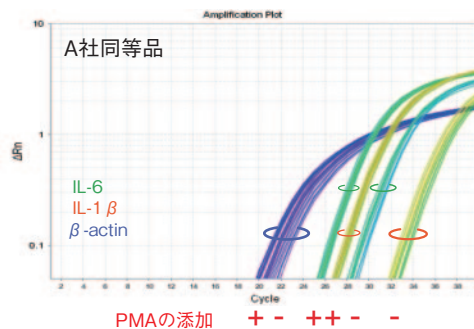
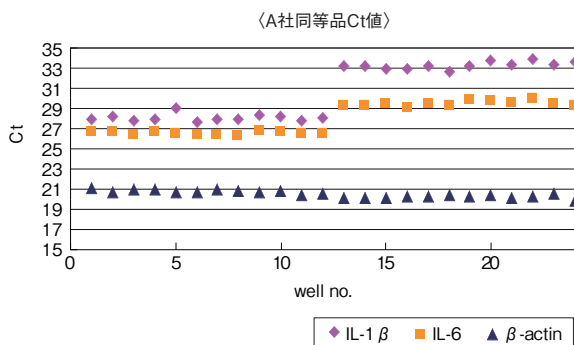
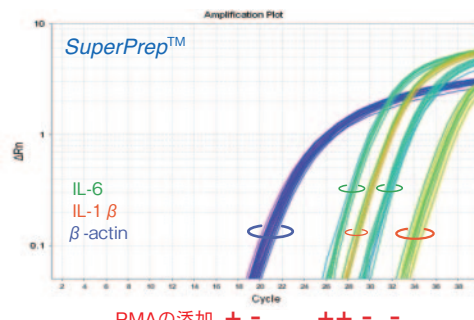
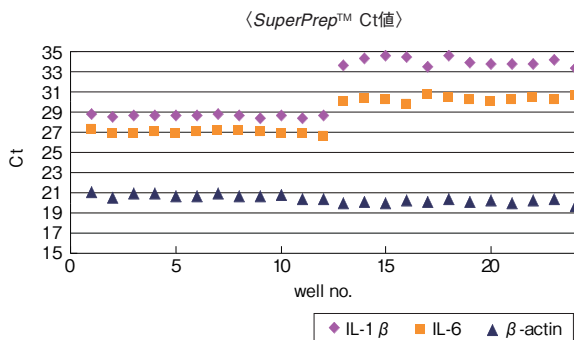


図3. Ct値の比較

図4. 増殖曲線の比較

表2. 解析結果からのZ'の算出

〈IL-6〉

	PMA	Ct (IL-6) 平均	Δ Ct (IL-6 - β -actin)		$\Delta\Delta$ Ct	Z'
			平均	標準偏差		
SuperPrep™	(+)	26.96	6.27	0.14	-3.85	0.62
	(-)	30.24	10.12	0.35		
A社同等品	(+)	26.50	4.30	0.34	-3.88	0.59
	(-)	29.44	8.18	0.19		

〈IL-1 β 〉

	PMA	Ct (IL-1 β) 平均	Δ Ct (IL-1 β - β -actin)		$\Delta\Delta$ Ct	Z'
			平均	標準偏差		
SuperPrep™	(+)	28.62	7.93	0.15	-5.94	0.74
	(-)	33.99	13.87	0.38		
A社同等品	(+)	28.00	5.80	0.47	-6.19	0.61
	(-)	33.26	11.99	0.34		

* Z'-factor :

データのバラツキを考慮した、ハイスループットアッセイ系の質の目安となる数値です。一般に0.5以上で良好と考えられます。今回は下記の式で算出しました。

Z'-factor=

$$1 - 3 \times (\Delta Ct(+)\text{標準偏差} + \Delta Ct(-)\text{標準偏差}) / |\Delta\Delta Ct|$$

この結果、いずれもZ'-factorとしてはアッセイ系の質の目安となる0.5をクリアしましたが、SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR、THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (Code No. QPS-101) を用いた実験において、A社同等品と比較して高いZ'-factorを示し、アッセイ系としてよりバラツキが少なく良好であることが分かりました。

実施例2 精製RNAと細胞ライセートでのCtの相関の検証

SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCRを用いて、HEK293 細胞 2.5×10^4 cells からcDNAを合成しました(40 μ l反応系)。また、HEK293細胞から抽出したTotal RNA 66.6ngからReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (Code No. FSQ-201)を用いてcDNA合成(40 μ l 反応系)を行いました。

その後、それぞれのcDNAを鋳型にTHUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Code No. QPS-201)を用いて15種類のHouse Keeping GeneについてリアルタイムPCRを行い、得られたCt値の相関性を検証しました。この結果、今回解析した15種類の遺伝子において、精製RNAと細胞ライセートを用いた解析に良好な相関が認められました。

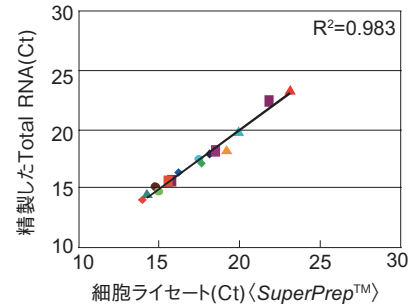


図5. 精製RNAとの定量性の比較

実施例3 RNase活性が強い細胞における解析効率の検証

単球由来の細胞株U937は比較的RNaseの活性が高く、細胞溶解液を用いるアッセイは困難であるとされてきました。

本実験では、U937細胞 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10 cellsから調製した細胞ライセート8 μ lを用いてcDNA合成(40 μ l 反応系)を行った後、THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Code No. QPS-201)を用いて、 β -actin遺伝子についてリアルタイムPCRを行いました。

同様に、A社同等品を用いて同様のアッセイを行いました(逆転写反応試薬とリアルタイムPCR試薬もA社キット付属品を使用)。

また、同じサンプルから精製したTotal RNAの相当量を用いて解析を行いました(ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix [Code No. FSQ-201]、THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix [Code No. QPS-201] 使用)。

この結果、弊社品での解析においてのみ、精製RNAを用いた場合同様に高い直線性を示しました。

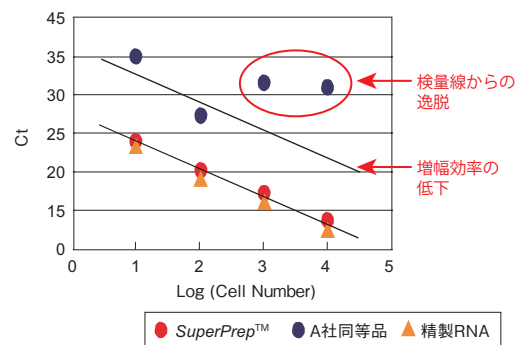


図6. U937細胞における β -actin遺伝子の検出

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	通常価格	キャンペーン価格
SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR 〈Lysis Reagents〉 〈RT Reagents〉 ・Lysis Solution ・5 x RT Master Mix ・Stop Solution ・5 x RT Master Mix no-RT control ・gDNA Remover ・Nuclease free Water 評価用サンプル ・RNase Inhibitor ございます	100回用*1	-20℃	SCQ-101	¥76,000	¥45,600
	100回用×5	-20℃	SCQ-101X5	¥325,000	対象外
SuperPrep™/THUNDERBIRD® Probe qPCR set*3 ・SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR (SCQ-101)と THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (QPS-101) *2とのセット	1セット	-20℃	SCQ101/ QPS101	¥99,750	¥59,850
SuperPrep™/THUNDERBIRD® SYBR® qPCR set*4 ・SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR (SCQ-101)と THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (QPS-201) *2とのセット	1セット	-20℃	SCQ101/ QPS201	¥99,750	¥59,850
SuperPrep™ Cell Lysis Kit for qPCR*5 ・Lysis Solution ・gDNA Remover 評価用サンプル ・Stop Solution ・RNase Inhibitor ございます	100 回用	-20℃	SCQ-201	¥39,000	対象外

- *1 40 μ lで逆転写反応をした場合に100回用としてご使用いただけます。
- *2 50 μ l反応で 200回用、20 μ l反応で 500回用としてご使用いただけます。
- *3 SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR (100回用) [¥76,000 → ¥72,450]とTHUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (Code No. QPS-101: 200回用) [¥29,000 → ¥27,300]とのセット販売品です。
- *4 SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR (100回用) [¥76,000 → ¥72,450]とTHUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Code No. QPS-201: 200回用) [¥29,000 → ¥27,300]とのセット販売品です。
- *5 SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCRに含まれるLysis Reagentsの別売り品です。

関連商品 高効率1-step用リアルタイムPCR試薬

品名	包装*	保存温度	Code No.	価格
(TaqMan® アッセイ用) RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix	0.5ml×5本	-20℃	QRT-101	¥33,000
(SYBR® Green I アッセイ用) RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	0.5ml×5本	-20℃	QRT-201	¥33,000

- * 50 μ l反応で100回用、20 μ l反応で250回用としてご使用いただけます。
- * SYBR® は Molecular Probe Inc.の登録商標です。TaqMan®は Roche Molecular Systems Inc.の登録商標です。



高効率リアルタイムPCR用マスターミックス

サンダーバード

THUNDERBIRD® qPCR Mix

特異性、ダイナミックレンジ、コストパフォーマンスに優れたリアルタイムPCR試薬です。

THUNDERBIRD® qPCR Mixは、Taq DNA polymeraseをベースとして開発された、高効率リアルタイムPCR用マスターミックス(2×濃度)です。本製品は、新規エンハンサーの採用を含め、組成を根本的に見直すことによって、反応特異性とPCR効率が一躍的に向上しています。これらの改良によって、幅広い定量可能域(ダイナミックレンジ)を実現しました。また、実験のランニングコストを大幅におさえることが可能になりました。



特長1 高い特異性(プライマーダイマーの低減)

- 組成の最適化により、PCRの特異性が向上。非特異反応の低減によって、SYBR® Green I、およびTaqMan®アッセイにおいて、低コピー数のターゲットの検出感度が向上しました。

特長2 様々なターゲットを高効率に精度良く検出

- 新規エンハンサーを採用し、高効率かつ高精度での増幅が可能となり、ターゲットごとのPCR効率のばらつきも低減されています。

*特許出願中

特長3 広いレンジで検出可能

- 特異的(特長1)、かつ高効率(特長2)な増幅により、広い測定レンジでの解析が可能になりました。

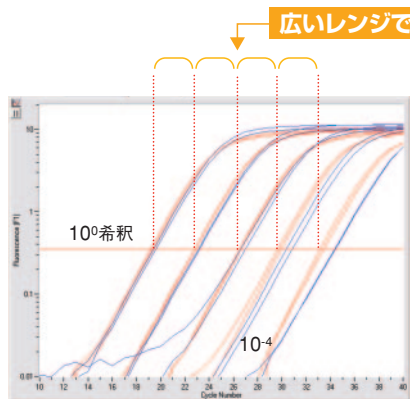


図1. SYBR® Green I 検出系によるノロウイルスGI cDNAの検出(縮合プライマー使用)(Roche Diagnostics LightCycler® 1.1使用)

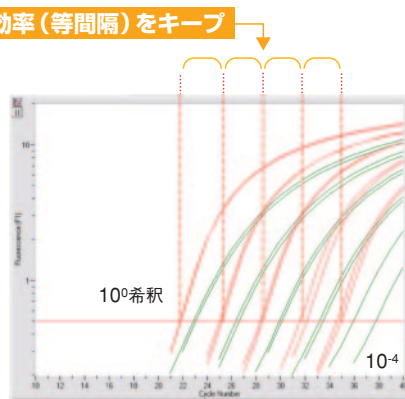


図2. TaqMan® 検出系によるGAPDH cDNAの定量(Roche Diagnostics LightCycler® 1.1使用)

— THUNDERBIRD® qPCR Mix
— B社試薬
— C社試薬

特長4 様々な機器に対応

- 一般的なブロックタイプの機器(Fast Modeにも対応)のほか、ガラスキャピラリーを用いる高速サイクラーにも対応しています。また、50× ROX reference dyeが別添付されているため、パッシブリアレンスを使用する機器(Applied Biosystems社製機器、Agilent Technologies社製機器など)においても、各機種の特性に応じた最適なROX濃度でご使用いただけます。

表 代表的な対応機器

Applied Biosystems	ABI PRISM® 7000
	ABI PRISM® 7700
	Applied Biosystems® 7300
	Applied Biosystems® 7500
	Applied Biosystems® 7500 Fast
	Applied Biosystems® 7900HT
	Applied Biosystems® StepOne™
Roche Diagnostics	Applied Biosystems® StepOnePlus™
	LightCycler® 1.x / 2.0
	LightCycler® Nano LightCycler® 480

Bio-Rad/MJ	iCycler iQ®
	MiniOpticon™
	CFX96 Touch™
Agilent Technologies	Mx3000P
	Mx3005P
	Mx4000
TaKaRa	Thermal Cycler Dice®
BioFlux	Line Gene

※リスト中Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, Agilent Technologies Mx3000P, Mx3005P, Mx4000をご使用の場合のROX reference dyeの最適濃度は、最終濃度0.1×(1/500量添加)となります。その他は1×(1/50)濃度を推奨します。

特長5 高速ホットスタート

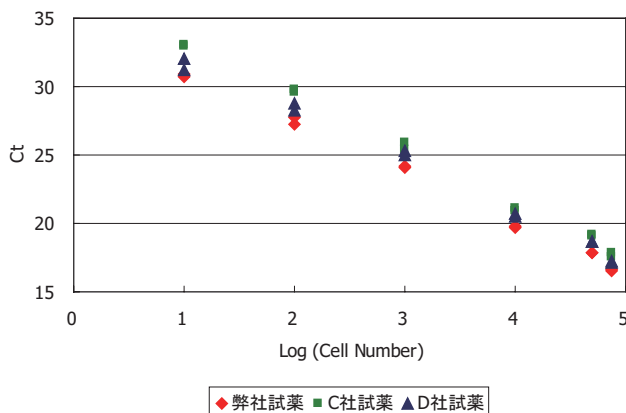
・抗Taq DNA polymerase抗体を用いるホットスタートシステムを採用しています。抗体は加熱により速やかに失活するため、最初の変性時間を短時間に設定できます。

特長6 高いコストパフォーマンス

・実験のランニングコストを大幅におさえることが可能になりました。

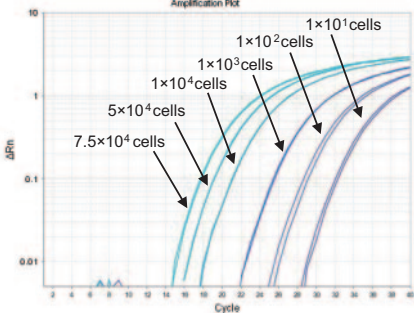
実施例 SuperPrep™で調製したcDNAを用いた解析

SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code No. SCQ-101) を用いて、HeLa S3細胞 7.5×10^4 , 5×10^4 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10 cells から細胞ライセートを調製し、続いてcDNA合成 (40 μ l 反応系) を行いました。それぞれのcDNAを鋳型にTHUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (Code No. QPS-101)、C社及びD社製リアルタイムPCR試薬を用いて、 β -actin遺伝子についてTaqMan®アッセイを行いました。

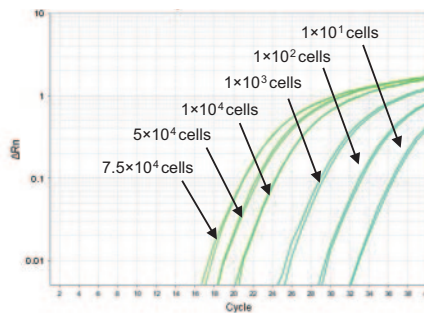


この結果、いずれのリアルタイムPCR試薬においても良好な増幅を認めることができました。特にTHUNDERBIRD® Probe qPCR Mixとの組み合わせで最も良好なCtと直線性を示しました。

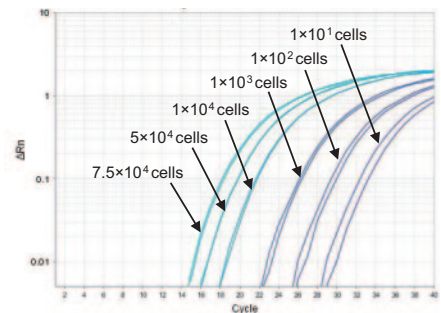
THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix



C社試薬



D社試薬



品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix ・THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix ・50× ROX reference dye	1ml×1本 (40回用)	-20℃	QPS-101T	¥8,500
	1.67ml×3本 (200回用)	-20℃	QPS-101	¥29,000
	(1.67ml×3本)×5 (1000回用)	-20℃	QPS-101X5	¥133,000
THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix ・THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix ・50× ROX reference dye	1ml×1本 (40回用)	-20℃	QPS-201T	¥8,500
	1.67ml×3本 (200回用)	-20℃	QPS-201	¥29,000
	(1.67ml×3本)×5 (1000回用)	-20℃	QPS-201X5	¥133,000
SuperPrep™/THUNDERBIRD® Probe qPCR set*1 SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR (SCQ-101) と THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (QPS-101) とのセット	1セット	-20℃	SCQ101/ QPS101	¥99,750
SuperPrep™/THUNDERBIRD® SYBR® qPCR set*2 SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR (SCQ-101) と THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (QPS-201) とのセット	1セット	-20℃	SCQ101/ QPS201	¥99,750

※50× ROX reference dyeがマスターミックスとは別容器で供給されます。

※包装の欄に記載の反応回数、50 μ l 反応時のものです。容量はqPCR Mixのみ示しています。

※大包装品 (QPS-101X5およびQPS-201X5) は、QPS-101もしくはQPS-201の5セット組です。

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

*1 SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR (100回用) [¥76,000 → ¥72,450] と THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (Code No. QPS-101: 200回用) [¥29,000 → ¥27,300] とのセット販売品です。

*2 SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR (100回用) [¥76,000 → ¥72,450] と THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Code No. QPS-201: 200回用) [¥29,000 → ¥27,300] とのセット販売品です。

高効率リアルタイムPCR用マスターミックス KOD SYBR® qPCR Mix

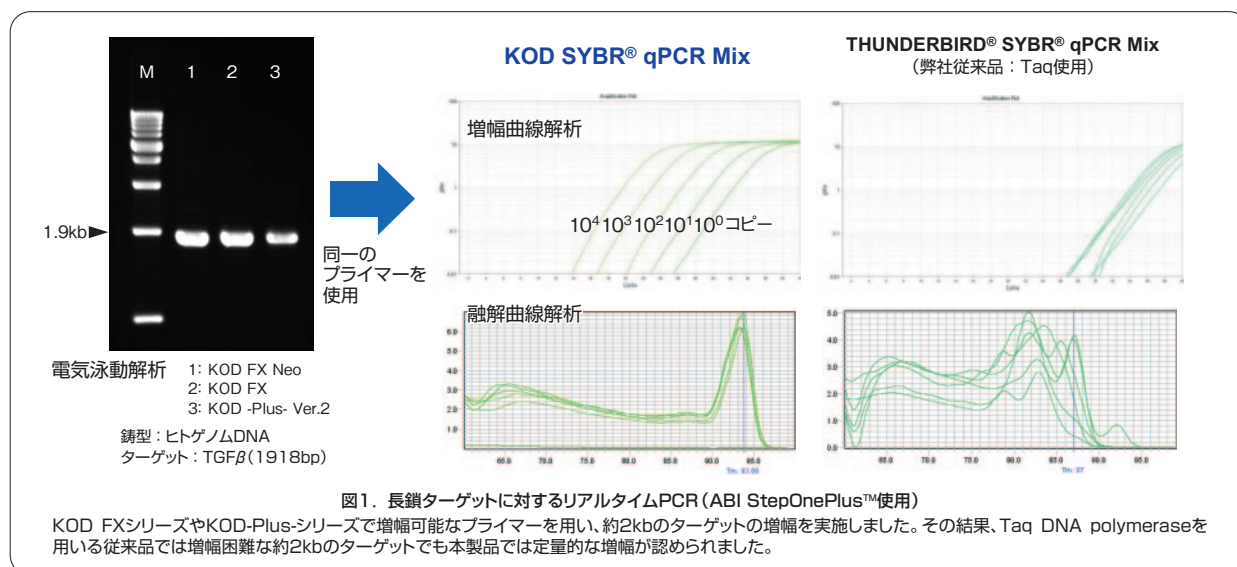
GCリッチ等の難配列の増幅に最適。今まで設計したプライマーを使用可能。

KOD SYBR® qPCR Mixは、KOD DNA polymerase (KOD)を使用したSYBR® Green I 検出系によるリアルタイムPCR用マスターミックスです。3'→5'エキソヌクレアーゼ活性(校正活性)を除去したKOD exo(-) DNA polymeraseと最適化されたバッファー条件を組み合わせることで、KODの『優れた合成能』や『クルード成分の阻害を受けにくい』という性質を最大限に発揮し、安定したリアルタイムPCR解析が可能になりました。



特長1 長鎖ターゲットの増幅が可能(～2kb)

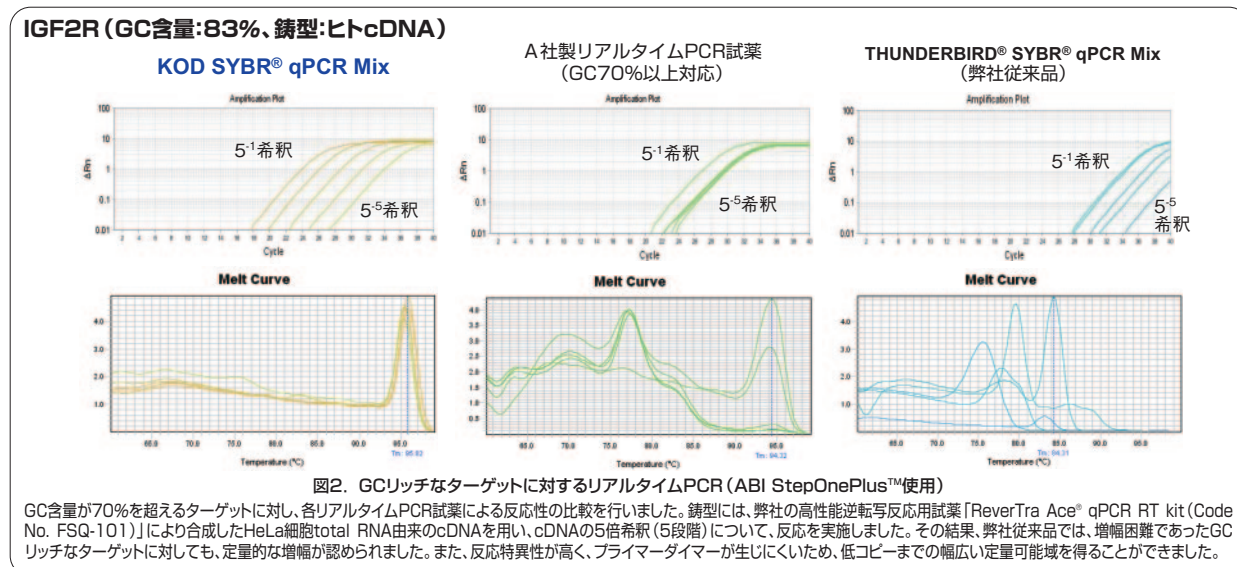
KOD DNA Polymeraseの特長を活かして長鎖ターゲット増幅での定量性に優れます。プライマーの選択幅が格段に広がり、2kbまでのターゲットであれば、多くの場合今まで設計したプライマーをそのまま用いることも可能です。



また、2kbまでの様々なターゲット長を選択できるため、幅広い融解曲線解析が可能です。プライマーダイマーの発生領域(短鎖領域)を外して増幅領域を選べるため、エンドポイントアッセイを用いる多型解析、マルチプレックスPCR解析などに有利です。

特長2 GCリッチターゲットに対応

KOD DNA polymeraseを使用することで、Taq DNA polymeraseを用いる従来品では困難であったGC含量が70%を超えるようなターゲットにおいても、定量的な増幅が認められます。



特長3 クールドサンプルを用いる解析が可能

クールド成分による阻害を受けにくい、血液やマウステール、植物ライセート等を用いるアッセイが可能です。長鎖増幅やTail配列を付加したプライマーを用いる増幅によるジェノタイピング解析等に应用することができます。

マウステールライセートを用いるジェノタイピング例

アルカリ溶解法

- ① マウステール (約3mm)
- ② マイクロチューブへ
- ③ 50mM NaOH 180µl添加
Vortexにて良く攪拌
- ④ 95°C・10min.
1M Tris-HCl (pH8.0) 20µl添加
Vortexにて良く攪拌
遠心 (12,000rpm, 10min.)
- ⑤ 20µl反応系に上清0.5~2µlを添加
(マウステールは完全には溶解しません)

Wild type (WT) 100bp/予測Tm値:79°C
WT用 primer
共通 primer

CreER knock-in (KI) 341bp/予測Tm値:84°C
Cre用 primer

WT/WT, WT/KI, KI/KI

Temperature (°C)

※本実験で使用したトランスジェニックマウスのマウステールは、東京大学 分子細胞生物学研究所 情報伝達研究分野 平林祐介先生よりご供与いただきました。

図3. 融解曲線解析を用いるワンチューブマウスジェノタイピング (ABI 7500使用)

マウステールアルカリ熱抽出液を用い、ワンチューブでジェノタイピング解析を実施しました。WT特異的増幅産物とknock-in特異的増幅産物の増幅長を変えることで、計算上、増幅産物のTm値に差異が生じるように設計しました。WT特異的プライマーは、CreER knock-inに対しては、増幅長が長いので、伸長時間を30秒と短くすることで増幅できないようにしています。また、ヘテロ検出におけるピーク比のバランスをとるために、WT特異的プライマー:knock-in特異的プライマー=1:3として検出の結果、すべてのタイプで増幅が認められジェノタイピングを実施することができました。

特長4 高い特異性

プライマーダイマーなどの非特異的反応を抑えることで、低コピー域までの幅広い定量を可能とします。また、弊社リアルタイムPCR用cDNA合成キット「ReverTra Ace® qPCR RTシリーズ」を併用することで安定した検出が得られます。

特長5 様々な機器に対応

ブロックタイプの機器 (Fast Modelにも対応) のほか、ガラスキャピラリーを用いる高速サイクラーにも対応しています。また、50×ROX reference dyeが別添付されているため、バシプリファレンスを必要とする機器においても、各機器に適したROX濃度でご使用頂けます。

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
KOD SYBR® qPCR Mix ・KOD SYBR® qPCR Mix ・50×ROX reference dye	1ml×1本 (40回用)	-20°C	QKD-201T	¥9,800
	1.67ml×3本 (200回用)	-20°C	QKD-201	¥32,000
	(1.67ml×3本)×5 (1,000回用)	-20°C	QKD-201X5	¥147,000

※50×ROX reference dyeがマスターミックスとは、別添付されています。

※包装欄に記載の反応回数は、50µl反応時のものです。容量は、KOD SYBR® qPCR Mixのみ示しています。

※SYBR®は、Molecular Probes Inc.の登録商標です。

関連商品

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
リアルタイムPCR用cDNA合成キット ReverTra Ace® qPCR RT Kit	200回用	-20°C	FSQ-101	¥38,000
リアルタイムPCR用cDNA合成キット 完全プレミックスタイプ ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix	200回用	-20°C	FSQ-201	¥38,000
リアルタイムPCR用cDNA合成キット 完全プレミックスタイプ (ゲノムDNA除去試薬付き) ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover	200回用	-20°C	FSQ-301	¥40,000

※包装欄に記載の反応回数は、10µl反応時のものです。

製品 KOD SYBR® qPCR Mix を用いた実施例

生物農薬糸状菌の特異的検出及び定量

データご提供

神戸大学大学院 農学研究科 生命機能化学専攻 細胞機能構造学研究室
池田 健一 先生、宿南 良 様

糸状菌ゲノムDNAの抽出は、異なる種によって生成される糖類の影響によって精製度合いが異なってきます。本実験で使用した糸状菌も多糖を生成することによって、PCR増幅効率が低下していることが予想されました。

本実験では、研究室において従来使用していたA社のqPCRキット（RNA発現解析では十分満足な結果が得られています）とKOD SYBR® qPCR Mixを使用して増幅効率を比較しました。

実験方法

サンプル 糸状菌ゲノムDNA

サンプルの処理 VIOGENE社のPlant Genomic DNA Extraction Miniprep Systemキットを用いて液体培養した菌体より糸状菌ゲノムDNAを精製した。

遺伝子名 rDNA ITS領域

ターゲット長 105bp

プライマー配列 F: 塩基数19 Tm値53.9 R: 塩基数20 Tm値58.4

反応液組成 KOD SYBR® qPCR Mix、A社リアルタイムPCR試薬は、共に以下の組成で実験を行った。

qPCR酵素mix	10 μ l
Primer F	2 μ l
Primer R	2 μ l
Template	1 μ l
DDW	5 μ l
反応液	20 μ l

サイクル <KOD SYBR® qPCR Mix>

98°C 2min.

↓

(98°C 10sec., 60°C 10sec., 68°C 30sec.) × 45

↓

融解曲線解析 60°C to 99°C

<A社qPCRキット>

95°C 10min.

↓

(95°C 15sec., 60°C 1min.) × 40

↓

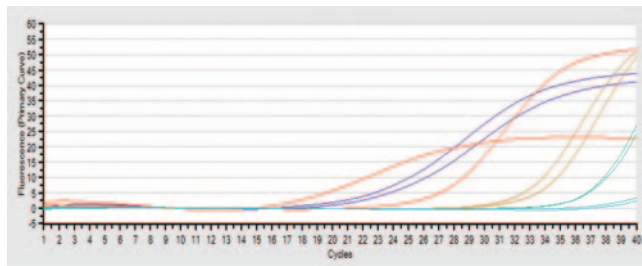
融解曲線解析 60°C to 95°C

測定機器 TaKaRa Thermal Cycler Dice® Real Time System Single

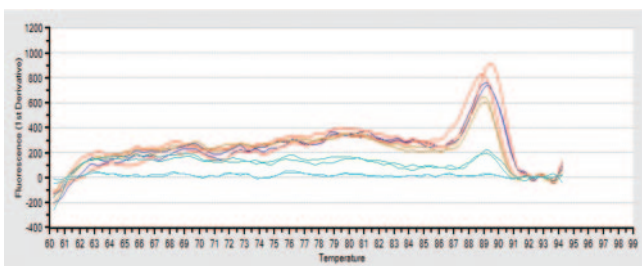
結果

1. A社qPCRキットでの結果

a. 増幅曲線

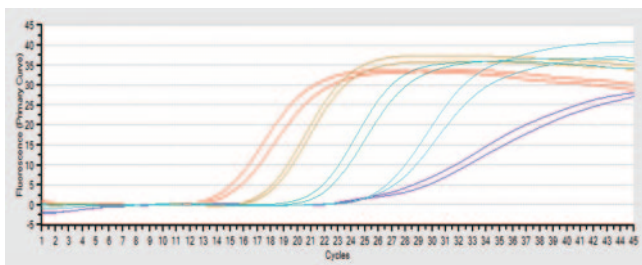


b. 融解曲線

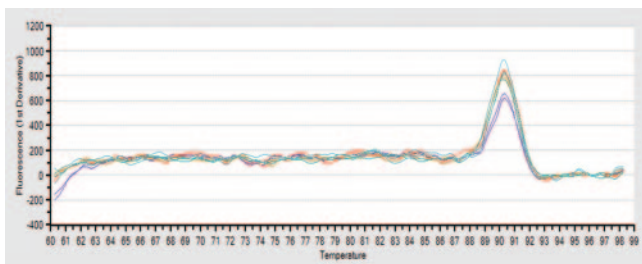


2. KOD SYBR® qPCR Mixでの結果

a. 増幅曲線



b. 融解曲線



— : $5 \times 10^{-13} \text{g}/\mu\text{l}$
 — : $5 \times 10^{-12} \text{g}/\mu\text{l}$
 — : $5 \times 10^{-11} \text{g}/\mu\text{l}$
 — : $5 \times 10^{-10} \text{g}/\mu\text{l}$
 — : $5 \times 10^{-9} \text{g}/\mu\text{l}$

先生からのコメント

増幅曲線解析においては同一テンプレート濃度でおおむねKOD SYBR® qPCR Mixの方がCt値が低く、検出能力を改善することができました。また、テンプレートが高濃度になるといずれも増幅効率が低下してしまう傾向が認められましたが、その中でもKOD SYBR® qPCR Mixはより高濃度テンプレート（赤= $5 \times 10^{-10} \text{g}/\mu\text{l}$ ）まで増幅することができました。融解曲線解析においても結果の改善が見られました。KOD SYBR® qPCR MixではA社のものよりもサンプルごとのばらつきが小さく、増幅曲線のピークもほとんど一致しています。このことから、より正確に目標産物を増幅できていると考えています。

KODシリーズについては、本研究室において、KOD FX Neoを糸状菌形質転換体スクリーニング用として使用しています。形質転換体のスクリーニングは、よりスモールスケールで迅速に行う必要があります。一次スクリーニングにより得られたコロニーの菌糸片より簡易的にゲノムDNAを抽出し、PCRにより目的遺伝子の挿入を確認する必要がありますが、KOD FX Neoは少量かつクルードなサンプル（菌糸片を30秒3回の電子レンジ照射処理した上清を使用）を用いても陽性バンドを安定して拾うことが可能であるので重宝しています。

これら使用実績より、KOD SYBR® qPCR MixおよびKOD FX Neoのバッファー系統一式は、糸状菌抽出サンプルとの相性が良いのではないかと考えています。

高効率リアルタイムPCR用マスターミックス「KOD SYBR® qPCR Mix」を用いたプロモーター領域、CpGアイランドを含む領域の定量的増幅の事例

東洋紡(株) 敦賀バイオ研究所 松本 弘嵩

はじめに

PCRではGCリッチな配列、例えばCpGアイランドを含む領域の増幅が困難であることが知られています。CpGアイランドは、哺乳類遺伝子のプロモーター領域の約50%以上を占めており、エピジェネティック解析の対象となる領域の一つです。このプロモーター領域の解析には、クロマチン沈降 (ChIP) 法を用いる方法が知られており、リアルタイムPCRによる定量が行われています。しかしながら、従来のTaq DNA polymeraseを用いたリアルタイムPCR試薬では、GC含量に偏りがあるGCリッチなターゲットを定量的に増幅できない場合があるため、CpGアイランドを含むプロモーター領域のリアルタイムPCRでは、プライマー設計が著しく困難になることがあります。



KOD SYBR® qPCR Mixは、KOD DNA polymerase (KOD) を使用したSYBR® Green I 検出系によるリアルタイムPCR用マスターミックスです。3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性 (校正活性) を除去したKOD exo (-) DNA polymeraseと最適化されたバッファー条件を組み合わせることで、KODの優れた合成能を最大限に発揮し、70%を超えるようなGCリッチなターゲットにおいても安定したリアルタイムPCR測定が可能になっております。

今回は、本キットを用いて、GC含量に偏りのあるプロモーター領域と、CpGアイランドを含む領域の定量的な増幅を行った例をご紹介します。

方 法

【増幅ターゲットとプライマー設計】

ターゲット1: Homo sapiens telomerase RNA (TR) gene のプロモーター領域 (GC含量:64%、増幅長:219bp)

```
CCCGCCCCGAGAGAGTGACTCTCACGAGAGCCGCGAGAGTCAGCTTGGCCAATCCGTGCGGTGCGCGGCCGCTCCCT
TTATAAGCCGACTCGCCCGCAGCGCACCGGGTTGCGGAGGGTGGCCCTGGGAGGGGTGGTGGCCATTTTTTGTCT
AACCCTAACTGAGAAGGGCGTAGCGCCGTGCTTTTGTCCCGCGCGCTGTTTTTCTCGCTGACTT
```

Primer #1:CCCGCCCCGAGAGAGTGAC (18bp, Tm: 68.6°C)

Primer #2:AAGTCAGCGAGAAAAACAGC (20bp, Tm: 61.1°C)

ターゲット2: Human β-actin のCpGアイランド (GC含量 :73%, 増幅長:131bp)

```
GCTTCCTTTGTCCCAATCTGGGCGCGCGCCGGCGCCCTGGCGCCTAAGGACTCGGCGCGCCGGAAGTGGCCA
GGGCGGGGGCGACTTCGGCTCACAGCGCGCCCGGCTATTCTCGCAGCTCACCATG
```

Primer #1: GCTTCCTTTGTCCCAATCT (20bp, Tm: 64.1°C)

Primer #2: CATGGTGAGCTGCGAGAATA (20bp, Tm: 63.9°C)

【反応組成】

KOD SYBR® qPCR Mix	10 µl
50×ROX	0.4 µl
10pmol/µl Primer #1	0.4 µl
10pmol/µl Primer #2	0.4 µl
Human genomic DNA	X µl
DW	Y µl
total	20 µl

【PCRサイクル】

98°C, 2 min.	40 cycles
↓	
98°C, 10 sec.	
60°C, 10 sec.	
68°C, 30 sec.	*Data collectionは伸長ステップに設定しました。
↓	
Melting	

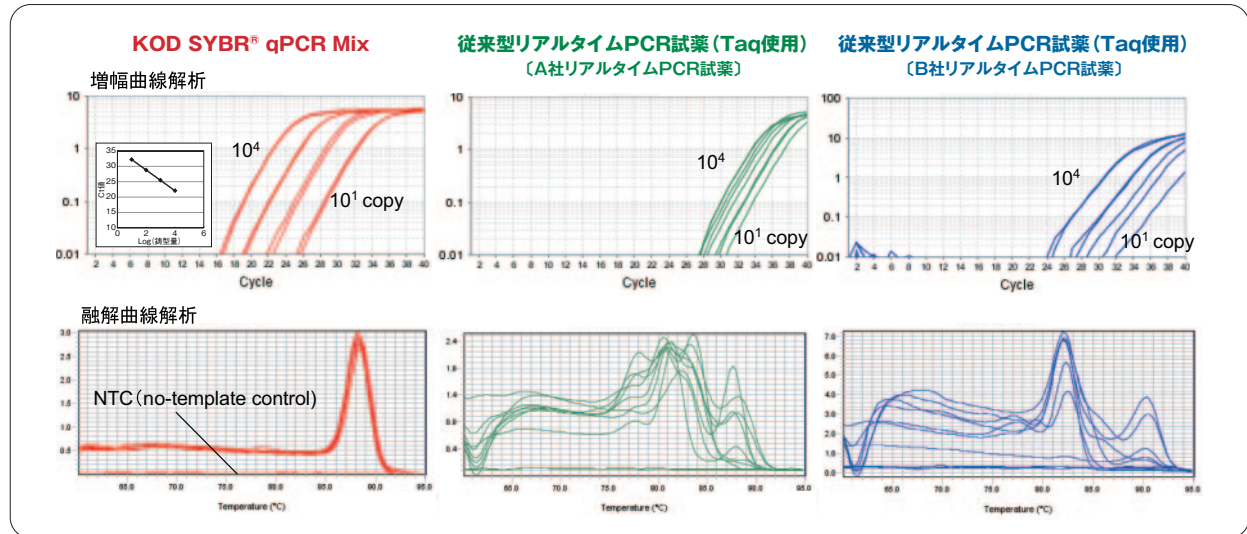
【使用機器】

Applied Biosystems StepOnePlus™

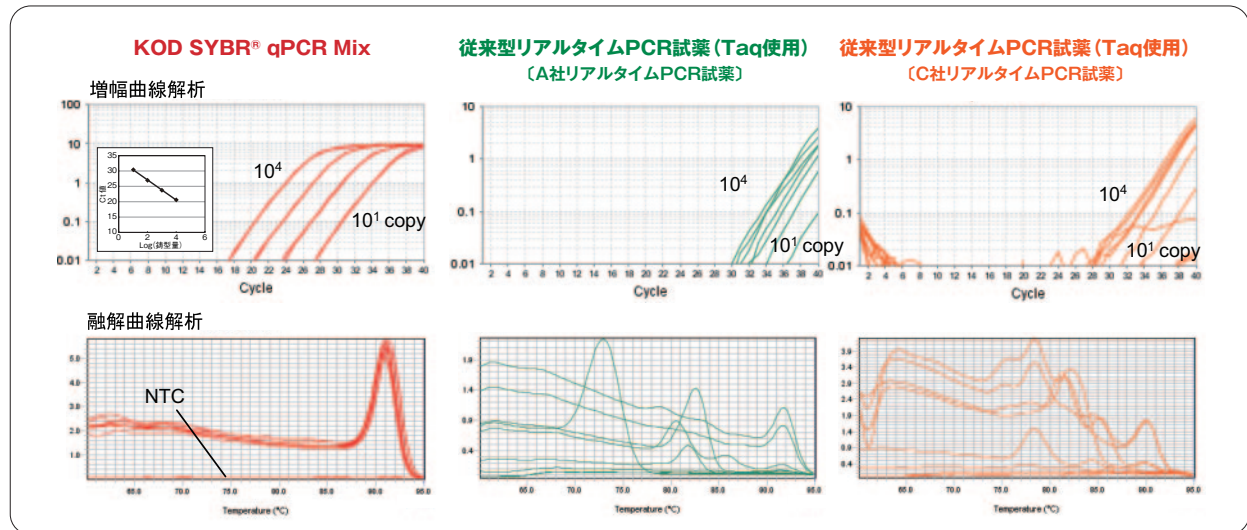
※比較のため、TaqベースのリアルタイムPCR試薬でも、取扱説明書推奨の条件にてリアルタイムPCRを実施し、比較を行いました。

結果及び考察

ターゲット1: Homo sapiens telomerase RNA (TR) geneのプロモーター領域 (GC含量:64%、増幅長:219bp)



ターゲット2: Human β -actin のCpGアイランド (GC含量:73%、増幅長:131bp)



GC含量が偏ったプロモーター領域をターゲットとした場合、従来のTaq DNA polymeraseをベースとしたリアルタイムPCR試薬では定量的な増幅が認められませんでした。KOD SYBR[®] qPCR Mixを使用することで、特異性が高く、定量的な増幅が認められるようになりました。また、no-template control (NTC) においてもプライマーダイマーが検出されませんでした。

通常のPCRと同様に、GC含量が偏ったターゲットのリアルタイムPCRによる増幅は、KOD DNA polymeraseを使用したリアルタイムPCR試薬の方が、Taq DNA polymeraseを使用したリアルタイムPCR試薬よりも適していると考えられます。

まとめ

本事例でお示したように、Taq DNA polymeraseを用いたリアルタイムPCR試薬で定量的な増幅が困難であった場合でも、KOD SYBR[®] qPCR Mixを使用することで、定量的な増幅が可能となります。GC含量が高いターゲットでも増幅可能であるため、従来困難であったプロモーター領域の定量も、KOD SYBR[®] qPCR Mixをご使用いただくことで、容易に行うことができると考えられます。

また、本キットはGCリッチなターゲットに限らず、Taq DNA polymeraseを用いたリアルタイムPCR試薬では困難な、長鎖ターゲット (~2kb) の定量的な増幅、クールドサンプル (マウステール、植物、血液等) からの増幅が可能です。そのため、Taq DNA polymeraseをベースとしたリアルタイムPCR試薬を用いた解析でお困りのターゲットをお持ちの方は、是非一度、KOD SYBR[®] qPCR Mixをお試しください。

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
KOD SYBR [®] qPCR Mix ・KOD SYBR [®] qPCR Mix ・50×ROX reference dye	1ml×1本 (40回用)	-20℃	QKD-201T	¥9,800
	1.67ml×3本 (200回用)	-20℃	QKD-201	¥32,000
	(1.67ml×3本)×5 (1,000回用)	-20℃	QKD-201X5	¥147,000

※50×ROX reference dyeがマスターミックスとは、別添付されています。

※包装欄に記載の反応回数は、50μl反応時のものです。容量は、KOD SYBR[®] qPCR Mixのみ示しています。



高効率リアルタイムPCR用マスターミックス

KOD SYBR® qPCR Mix

Q1 KOD SYBR® qPCR Mixと従来品 (Taq使用) にはどのような違いがありますか?

F1 KOD SYBR® qPCR MixはKOD DNA Polymeraseの酵素特性 (高効率、クールド成分の阻害を受けにくい) を活かし、SYBR® Green I アッセイの利便性と汎用性を高めた製品です。右表のような特性の違いがございます。

【従来品との特性比較】

	従来品 (Taq使用)	KOD SYBR® qPCR Mix
酵素	Taq DNA Polymerase	KOD DNA Polymerase [exo (-) mutant]
増幅長	70 ~ 300 bp	70 ~ 2000 bp
GCリッチなターゲット	増幅しにくい	増幅しやすい
阻害物質の影響	受けやすい (DNAの精製が必要)	受けにくい (クールドサンプルから直接増幅可能)

Q2 どのくらいのGC含量のサンプルが使用できますか?

F2 GC含量83% のIGF2R遺伝子 (cDNA) を検出した事例があります。*

Q3 融解曲線による増幅長多型解析は可能ですか?

F3 2kb以下の増幅長で、増幅産物間のTm値の差が3℃以上 (機器によっては5℃以上) あれば、ワンチューブ反応でマルチプレックスPCRや増幅長多型解析などを行うことができます。*

Q4 PCR反応液に生体組織などのクールドサンプルをどのくらいまで添加できますか?

F4 エンドポイント検出において以下のサンプル量 (20µl反応の場合) が添加可能です。

全血	1/10に希釈し、2µl添加
爪	米粒1/3程度を直接添加
髪	毛根から1~2cmを直接添加
口腔粘膜	綿棒などで採取後、200µlの水で懸濁、反応液に5µl添加
培養細胞	~10 ³ cells
動物組織	アルカリ熱抽出液の上清を0.5~2µl添加
植物組織	ワンステップ法による植物ライセートの10倍希釈液の上清を0.5~2µl添加

Q5 一般的なPCR用のプライマーは使用できますか?

F5 KOD シリーズ等を用いる一般的なPCRにおいて設計した、増幅長が2kbまでの特異性の高いプライマーは、基本的にはそのまま使用可能です。

Q6 精製が脱塩のみのプライマーは使用できますか?

F6 プライマーの精製純度は反応特異性に大きな影響を与えます。可能であればHPLC精製、少なくともカートリッジ (OPC) 精製のグレードのプライマーをご使用ください。

Q7 プライマーや増幅産物のTm値の計算はどのように行えば良いですか?

F7 最近接塩基対法によるプライマーのTm値および増幅産物のTm値計算表 (EXCEL) は、製品ページをご覧ください。*

Q8 どのような機器に使用できますか?

F8 以下のような機器に使用可能です。

【対応機器例】

メーカー	機種
Applied Biosystems	7000, 7300, 7500, 7500Fast, 7700, 7900HT, StepOne™, StepOnePlus™
Bio-Rad/MJ	MiniOpticon™, CFX96 Touch™, iCycler iQ®
Roche Diagnostics	LightCycler® 1.x/2.0, Nano, 480
Agilent Technologies	Mx3000P, 3005P, 4000
TaKaRa	Thermal Cycler Dice® Real Time System
BioFlux	LineGene

* ROXが別添となっているため、補正のためのパッシブリアジェンツを用いる機器においても特性に応じた最適なROX濃度でご使用いただけます。

※実施例、Tm値計算表などの詳細に関しましては、弊社のウェブサイト (www.toyobo.co.jp/bio) の KOD SYBR® qPCR Mixのページをご覧ください。

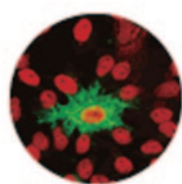
ViroStat社抗体・組換え抗原

診断薬原料用の感染症関連抗体および組換え抗原です。

ViroStat社は、感染症に関連する抗体および抗原を提供するため、1985年 Dr. Douglas McAllisterによって設立された米国の製造メーカーです。

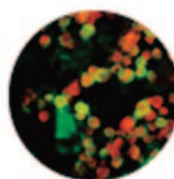
MONOTOPE™、OMNITOPE™、RABMAB®および組換え抗原を含む、500以上のウイルスや細菌関連の試薬を提供しており、確かな実績がございます。

これらの製品は主に診断薬原料用として製造されておりバルク品などの特注も対応可能です。



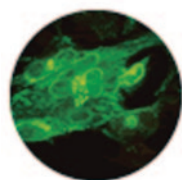
【MONOTOPE™】

腹水または培養上清からProtein Aを用いて、純度>90%に精製された、モノクローナル抗体です。各種ウイルス、細菌などに対する非標識及びFITC標識抗体をご用意しています。



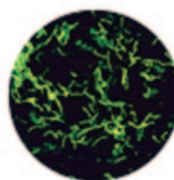
【OMNITOPE™】

ViroStat社が開発した精製法にて、純度>95%まで精製されたポリクローナル抗体です。各種ウイルス、細菌などに対する非標識及びBiotin、FITC、HRP標識抗体をご用意しています。



【RABMAB®】

RABMAB®はEpitomics, Inc.の登録商標で、ウサギのモノクローナル抗体です。レジオネラ菌、レンサ球菌がございます。



【Recombinant Protein】

大腸菌、酵母などで生産され、高純度に精製された組換え抗原です。肝炎、HIVなどがございます。

代表的な品目

Adenovirus	Aflatoxin	Alphavirus	Aspergillus
Astrovirus	Bacillus anthracis	Bordetella pertussis	Borrelia burgdorferi
Bovine Papillomavirus	Brucella abortus	Campylobacter jejuni	Candida albicans
Canine Distemper virus	Canine Heartworm	Canine Parvovirus	Chikungunya virus
Chlamydia	Cholera toxin	Clostridia	Cryptosporidium parvum
Cytomegalovirus	Dengue virus	Diphtheria toxin	E. coli
Enolase	Entamoeba histolytica	Enterococcus	Enterovirus
Epstein-Barr virus	Feline Immunodef. virus	Feline Leukemia virus	Flavivirus
Francisella tularensis	Giardia	Helicobacter pylori	Hepatitis A, B, C virus
Herpes Simplex virus	HIV	Human Papilloma virus	Influenza virus
Klebsiella	Legionella	Leptospira	Lipid A
Listeria	Lyme (B. burgdorferi)	M. tuberculosis	Marburg virus
Metapneumovirus	Mumps virus	Mycoplasma	Neisseria
Norovirus	Papillomavirus	Parainfluenza virus	Parvovirus
Pichia pastoris	Plasmodium	Poliovirus	Prion Protein
Pseudomonas	Rabies virus	Respiratory Syncytial virus	Rhinovirus
Rotavirus	Rubella virus	S. cerevisiae	Salmonella
SARS coronavirus	Shiga toxins	Shigella	Staphylococcus
Streptococcus	Tetanus	Toxic Shock toxin	Toxoplasma gondii
Treponema pallidum	Trichomonas	Ureaplasma parvum	Vaccinia virus
Varicella-Zoster virus	West Nile Virus	Yellow Fever virus	Yersinia pestis

製品リストは、弊社ウェブサイト www.toyobo.co.jp/bio の新着製品情報より、ViroStatのページに入っていたとき、製品リストをクリックしてください。また、データシートはリストの品名をクリックしていただければご覧いただけます。

製品の内容や価格はサイト下方のお問い合わせフォームよりお問い合わせください。

新発売 **40%off** キャンペーン

リアルタイムPCR用細胞溶解&cDNA合成キット(培養細胞用)

【期間:2013年10月9日~2014年3月20日(ご注文分)】

SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR

96ウェルプレートなどで培養した細胞から逆転写反応の鋳型として利用可能なRNAを含む細胞ライゼートを簡単に調製することができます。さらに、本キットに含まれる逆転写反応試薬は、この細胞ライゼートからのRT反応に最適化されています。本キットにより、簡便、迅速に培養細胞からリアルタイムPCR用の鋳型cDNAの合成が可能であり、ハイスループットアッセイに向いています。



HEK293細胞 2.5×10^4 cellsを本製品を用いて処理し、cDNA合成を行いました。また、HEK293細胞から抽出したTotal RNA からReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (Code No.FSQ-201)を用いてcDNA合成(40 μ l反応系)を行いました。それぞれのcDNAを鋳型にTHUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Code No. QPS-201)を用いて15種類のHouse Keeping GeneについてリアルタイムPCRを行いました。
いずれの遺伝子についても精製RNAを鋳型とした場合と良好な相関が認められました。

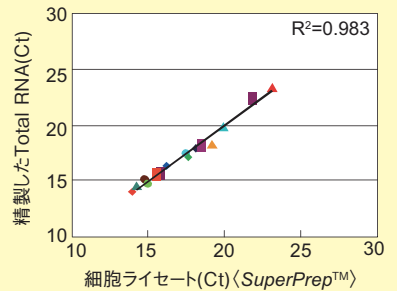


図. 精製RNAとの定量性の比較

⇒本誌p.1~4に詳細記事がございます

アルファ
ハットを
入れてください

バイオ・クロスワードパズル ~バイオ実験手法編~

プレゼント
付き

ミソのカギ

- RACE法は、転写配列の部分配列の情報を使って、転写産物の全長のシーケンスを明らかにする方法です。_____ Amplification of cDNA Endsの略です。
- 電気泳動と抗体を使ってタンパク質を解析する手法の一つです。_____ Blot法。
- 制限酵素を使って遺伝子を切断することをこのようにも言います。
- “入れ子”という意味です。PCR産物を、更に内側に設定したプライマーを用いてもう一度PCRを行う手法です。感度と特異性が格段に向上します。_____ PCR。

タテのカギ

- ELISAは、Enzyme-linked Immuno_____ Assayの略です。
- 遺伝子導入しやすく処理した大腸菌をこのように呼びます。_____ cell。
- リンカーなどをリン酸化することを英語でこのように言います。

【以下の選択肢の中から選んでください】

RECORD PROPER RANDOM NESTED WESTERN INVERSE SOLVENT
 LIGATION KINATION COMPETENT DIGESTION HYDRATION FORMATION
 CHROMATIN SUSPEND

abcdefghi

バイオクロスワードパズルの解答に加え、UPLOADのアンケート(下記クイズコーナーに記載)にご回答いただいた方から抽選で、5名様に2,000円分の図書カードまたはアマゾンギフト券をご進呈いたします。

ご応募はこちらから

1 弊社ウェブサイト
(www.toyobo.co.jp/bio)

2 読者のコーナー

3 クイズコーナー

※ご応募期間 2013年11月6日~2014年1月31日 <http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/lifescience/tech/reader/quiz/index.html>



東洋紡株式会社

◆◆納期・注文に関するお問い合わせ◆◆
ライフサイエンス事業部(大阪)
 〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
 TEL.06-6348-3786 FAX.06-6348-3833
 E-mail order_lifescience@toyobo.jp

ライフサイエンス事業部(東京)
 〒141-8633 東京都品川区東五反田二丁目10番2号
 東五反田スクエア
 TEL.03-6422-4819 FAX.03-6422-4951
 E-mail order_lifescience@toyobo.jp

◆◆製品内容・技術に関するお問い合わせ◆◆
テクニカルライン
 TEL.06-6348-3888 FAX.06-6348-3833
 開設時間: 9:00~12:00 13:00~17:00
 (土・日・祝を除く)
 E-mail tech_osaka@toyobo.jp
 [URL] <http://www.toyobo.co.jp/bio>

