

PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal®

NEW

免疫反応促進試薬Can Get Signal®を用いるウェスタンブロット解析に適した人工合成ブロッキング試薬です。

PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal®は、免疫反応促進試薬「Can Get Signal®」(本誌p.2)を用いるウェスタンブロット解析に適した、Ready-to-useのブロッキング試薬です。

ウェスタンブロット解析において多用されるPVDFなどのメンブレンでの使用に適しており、高いブロッキング性能を発揮します。また本試薬は、人工合成ポリマーを主成分とし、タンパク性の成分を含まず、リン酸化タンパク質等の検出に適しています。Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solutionと組み合わせてご使用ください。

特長1 ▶ 高いブロッキング性能

- 本試薬は、PVDF膜を用いるウェスタンブロット解析での使用に至適化されており、高いブロッキング性能を発揮します。免疫反応促進試薬Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solutionを用いるウェスタンブロット解析に適しています。

特長2 ▶ プロテインフリー

- 本試薬は合成ポリマーであり、タンパク質性の成分を含有しないため、リン酸化タンパク質の検出などに最適です。

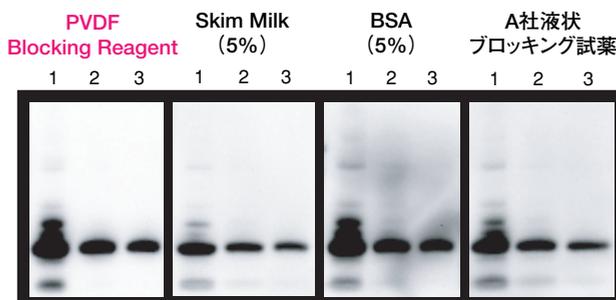
特長3 ▶ マスキング効果を低減

- 本試薬は、スキムミルク・ゼラチン等のブロッキング剤使用時に問題となる、抗原のマスキングによるシグナル低下が少なく、高いS/N比を得ることができます。



実施例1 ▶ 各種ブロッキング剤との性能比較

ブロッキング剤として、本ブロッキング試薬、5%スキムミルク/TBS-T、5%BSA/TBS-T、およびA社製液状ブロッキング試薬を用いて、HeLa細胞溶解液をサンプルとして、ERK2タンパク質のウェスタンブロット法による検出を試みました。抗原抗体反応にはCan Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solutionを用いました。その結果、本試薬を用いた場合で、最もバックグラウンドが低く、かつシグナルが高い明瞭な結果を得ることができました。



1: HeLa細胞溶解液
2: 1/4希釈
3: 1/16希釈

〈使用抗体〉

Santa Cruz Biotechnology社の以下の抗体を使用。
1次抗体：
anti-ERK2 (C-14) rabbit polyclonal IgG (Code No. SASC154), 2,000倍希釈
2次抗体：
anti-rabbit IgG goat polyclonal IgG (Code No. SASC2301), 20,000倍希釈

図1. 各種ブロッキング剤を用いたウェスタンブロットによるERK2タンパク質検出結果

実施例2 リン酸化タンパク質の検出

HeLa細胞溶解液(EGF刺激+/-)をサンプルとして、本製品をブロッキング剤として使用したウェスタンブロットを用いて、リン酸化ERK (p-ERK1、p-ERK2)の検出を行いました。抗体反応には、弊社免疫反応促進試薬 *Can Get Signal*® Immunoreaction Enhancer Solutionを使用しました。

その結果、非特異バンドの出現も少なく、p-ERK1 (44kDa)、p-ERK2 (42kDa) それぞれに由来する2本のバンドが明瞭に確認されました。EGF刺激の有無による差も明確に確認できました。

また、リン酸化タンパク質検出時にしばしば問題となる、ブロック剤中のカゼイン等に起因するバックグラウンドの生成も認められませんでした。



品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
PVDF Blocking Reagent for <i>Can Get Signal</i> ®	500ml×1本	4℃	NYPBR01	¥13,500

※本試薬は使用濃度に調製済みの液状試薬です。通常は希釈せず原液のままご使用ください。
※本試薬は日油株式会社により専用製品として製造されています。

免疫反応促進試薬

Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution

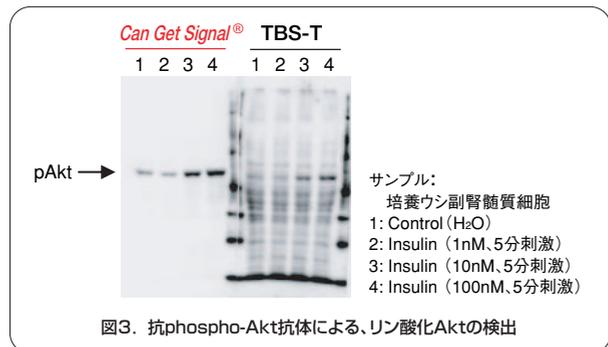


抗原抗体反応を促進し、同時にバックグラウンドを下げる効果のある試薬です。ウェスタンブロット解析/ELISA等の感度不足、特異性を改善することができます。使用方法は、従来、抗原抗体反応用の溶液として使用していたTBS-Tなどの代わりに、本試薬を用いるだけです。検出等に関しては、今までお使いの条件をそのままお使いいただけます。1次抗体用としてSolution 1、2次抗体用としてSolution 2を用います。抗リン酸化タンパク質抗体などの、良い抗体が得られにくいターゲットの検出等に、優れた威力を発揮します。

実施例1 ウェスタンブロットによるリン酸化タンパク質の検出

培養ウシ副腎髄質クロマフィン細胞の培養液にインスリンを任意の濃度で添加し、5分間刺激を行った細胞のライゼートをサンプルとして、ウェスタンブロット法によってリン酸化Akt (p-Akt)の検出を行いました。その結果、従来法(TBS-T使用)に比べ、*Can Get Signal*®を用いた場合、明らかなシグナルの増強と、バックグラウンドの低下が見られました(図3)。

※データは宮崎大学医学部 薬理学講座 柳田俊彦先生にご提供いただきました。



品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
<i>Can Get Signal</i> ® Solution 1 for primary antibody Solution 2 for secondary antibody	各250ml×1本	4℃	NKB-101	¥30,000
	各50ml×1本		NKB-101T	¥10,000
<i>Can Get Signal</i> ® Solution 1 for primary antibody	250ml×1本	4℃	NKB-201	¥17,000
<i>Can Get Signal</i> ® Solution 2 for secondary antibody	250ml×1本	4℃	NKB-301	¥17,000

ペルチェ式温度コントローラー LittleGene2

本製品はすでに
販売を中止して
おります。

安価でコンパクトながら、多機能かつ正確で再現性の高い温度制御を実現します!

LittleGene2は、パーソナルユースに最適なペルチェ式温度コントローラーです。さらに使いやすくなって登場です。

特長1 ▶ 超低価格: ¥310,000

特長2 ▶ 8連チューブ対応

- ・0.2mlシングルチューブはもちろんのこと、0.2ml×8連チューブもご使用いただけます。(8×3=24フォーマット)
- ・従来のLittleGene (5×5=25フォーマット) も別途販売しております。

特長3 ▶ コンパクト設計

- ・B5版ノートパソコンと同じ大きさです。
- ・軽量 (3.2kg)。

特長4 ▶ 優れた温度制御・耐久性

- ・高品質ペルチェ素子サーモモジュールを採用しているため、高精度かつ迅速に温度コントロールを行ないます。

特長5 ▶ さまざまな温度サイクルプログラムに対応

- ・加熱・冷却速度を任意設定できます (0.1°C/sec~)。
- ・サイクル毎の温度および保持時間の増減設定、プログラムファイルの連結が可能です。

特長6 ▶ サンプルコントロールモード (液温推定制御)

- ・ブロックの温度ではなく、サンプルの液量に応じて、液温を推定し、温度制御することが可能です。(設定液量範囲: 10~50μl)

主な仕様



処理検体数:	24検体 (8×3) : 0.2mlチューブ使用
温度調節範囲:	4°C~99°C
温度上昇速度:	55°C~95°Cを約18秒
温度下降速度:	95°C~55°Cを約21秒
温度精度:	±0.4°C
温度均一性:	±0.4°C (55°C)、±0.5°C (72°C)、±0.8°C (95°C)
ホットリッド:	105°C (OFF設定可能)
ディスプレイ:	20文字×2行 (LCD)
最大サイクル回数:	99
1サイクルあたりの最大設定セグメント数:	9
プログラムメモリー数:	99個
付属機能:	停電時のバックアップ機能
電源:	AC100V 50/60Hz
消費電力:	200W
外形寸法:	D285×W218×H178 (mm)
重量:	3.2kg

品名	フォーマット	包装	Code No.	価格
ペルチェ式温度コントローラー LittleGene2	8×3 (0.2mlチューブ)	1台	BFCTC-24H	¥310,000
ペルチェ式温度コントローラー LittleGene	5×5 (0.2mlチューブ)	1台	BFCTC-25A	¥310,000

KOD用高効率TAクローニングキット TArget Clone™ -Plus-

KOD専用のTAクローニングキットです。この度、10×A-attachment Mixが別売りになりました。

KOD DNA Polymerase、KOD -Plus-、KOD -Plus- Ver.2、およびKOD FXによって増幅されたDNA断片の末端は平滑化されており、通常の方法ではTAクローニングすることはできません。TArget Clone™ -Plus-はそのようなKOD系酵素で増幅されたPCR産物を直接用いて、高効率にTAクローニングすることができます。

またこの度、KOD PCR産物にdAを付加するための試薬パーツ「10×A-attachment Mix」の別売りを開始いたしました。この試薬を用いることにより、付属のpTA2ベクター以外の任意のTベクターへのクローニングが可能になります。

特長1 KODのPCR産物に対応

- ・平滑末端を生じるKODのPCR産物を直接用いてTAクローニングすることができます。

特長2 様々なベクターに対応可能

- ・別売りの10×A-attachment Mixを用いることにより、任意のTベクターを用いてTAクローニングを行うことが可能です。

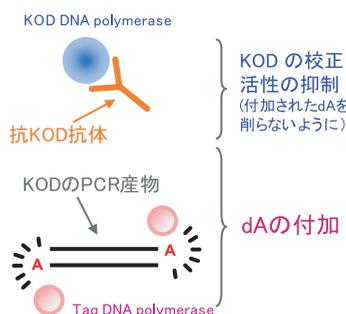


図1. 10×A-attachment Mixの反応原理

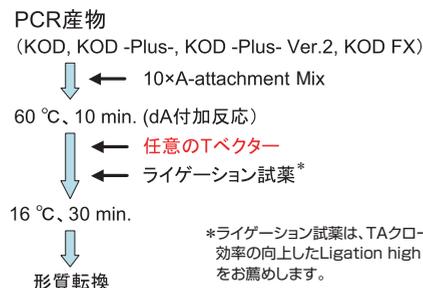


図2. 任意のTベクターへのTAクローニングフロー

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
TArget Clone™ -Plus- (pTA2 Vector, 2×Ligation Buffer, T4 DNA Ligase, 10×A-attachment Mix)	10回用	-20°C	TAK-201	¥16,000
10×A-attachment Mix	25回用 (25μl)	-20°C	TAK-301	¥12,000 NEW

関連商品

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
高正確性ポリメラーゼ KOD -Plus-	200U×1本	-20°C	KOD-201	¥30,000
高正確性ポリメラーゼ KOD -Plus- Ver.2	200U×1本	-20°C	KOD-211	¥32,000
高成功率ポリメラーゼ KOD FX	200U×1本	-20°C	KFX-101	¥35,000
高効率ライゲーションキット Ligation high Ver.2	750μl×1本	-20°C	LGK-201	¥22,000
高効率TAクローニングキット TArget Clone™	10回用	-20°C	TAK-101	¥12,000
高効率大腸菌コンピテントセル Competent high DH5α	0.1 ml×10本	液体窒素	DNA-903	¥17,000
サブクローニング用コンピテントセル Competent Quick DH5α	0.1 ml×20本	-80°C	DNA-913	¥29,000

間葉系幹細胞増殖培地 MF-medium®

■期間：2008年5月7日～2008年8月1日（ご注文分）

細胞樹立後の安定培養に最適です。

本培地は、間葉系幹細胞の増殖に適した低血清培地です。
血清成分は1%まで抑えられています。



特長1 低血清

- ・血清成分を1%に低減しています。

特長3 簡便

- ・基礎培地に2種類の培地添加剤を加えるだけで簡便です。

特長2 優れた増殖性

- ・複数の細胞増殖因子を組み合わせ、優れた増殖性を達成しています。

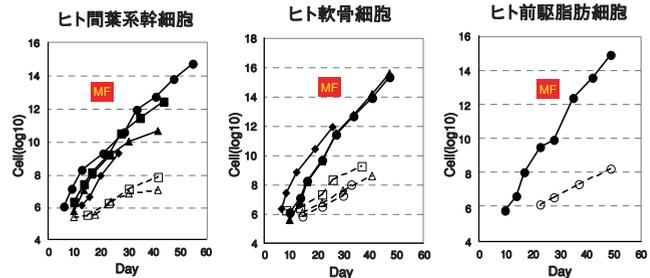
特長4 ヒト由来の成分を使用

- ・添付の牛血清以外のタンパク質成分はヒト型のものを使用しています。

実施例1 組織培養への適用例

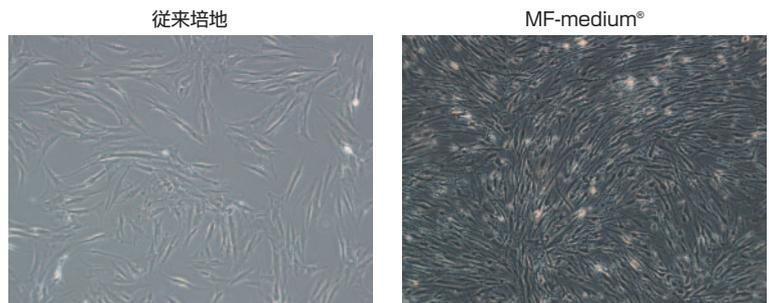
ヒト組織から各細胞を分離し、分離直後1週間MF-start™で培養し、以後MF-medium®に切換え継代培養を行いました。従来培地に比べ優れた増殖性を示しました。

実線／ 培養1週間：MF-start™→以後：MF-medium®
破線／ 培養1週間：20%FCS-DMEM→以後：10%FCS-DMEMで培養



実施例2 MF-medium®と従来培地の比較

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を同じ細胞密度でシャーレに播種した後、MF-medium®と10%牛胎児血清含有DMEM（従来培地）とで、それぞれ5日間培養し、細胞形態を観察しました。その結果、MF-medium®の方がより多くの細胞の増殖が認められました。



品名	包装	保存温度	Code No.	通常価格	キャンペーン価格
MF-medium® ・MF-medium®（基礎培地） 500ml ・Growth Factor Supplement 1ml ・Fetal Calf Serum 5ml	500ml	4℃ -20℃ -20℃	TMMFM-001	¥35,000	¥24,500

関連商品

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
間葉系幹細胞 軟骨分化培地 DF-C	250ml	4℃、-20℃	TMDFC-001	¥65,000
間葉系幹細胞 軟骨分化培地 DF-C (TGF-β1、BMP-2なし)	250ml	4℃、-20℃	TMDFC-002	¥40,000
間葉系幹細胞 骨分化培地 DF-B	250ml	4℃、-20℃	TMDFB-001	¥50,000
間葉系幹細胞 骨分化培地 DF-B (TGF-β1なし)	250ml	4℃、-20℃	TMDFB-002	¥25,000

販売中止

初代細胞スターティング培地 MF-start™



■期間：2008年5月7日～2008年8月1日（ご注文分）

生体組織からの初代細胞の分離培養効率が向上します。

本培地は、生体組織からの、線維芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、及び間葉系幹細胞などの分離培養効率を向上させます（血球系、上皮系細胞には適しません）。マウスiPS細胞樹立に用いられた報告がございます*。

*K. Takahashi and S. Yamanaka, *Cell*, **126**: 663-676 (2006)



特長1 高効率

- ・分離培養直後のアウトグロス効率、及びコロニー形成効率が向上します。

特長3 簡便

- ・基礎培地にStart Supplementを加えるだけで培地調製ができます。

特長2 MF-medium®との相乗効果

- ・MF-medium®（本誌p.5）との組み合わせでより効果的な培養が可能です。

使用方法

1. 細切方法、酵素処理方法などにより組織から目的とする細胞を調製します。
2. 分離した細胞、もしくは処理した組織をMF-start™で培養します。
3. 4～10日間培地交換せず、本培地で培養します。
4. 細胞がコロニー様に増殖しはじめたら、所定の増殖培地に培地交換を行います。
5. 常法に従い細胞培養を行います。
※増殖培地としては弊社MF-medium®のご使用をお薦めいたします。

実施例 従来培地との比較

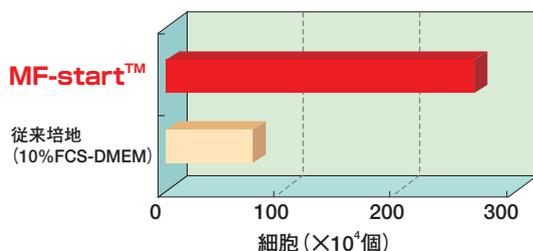


図1. ラット胎児組織からの分離増殖細胞数

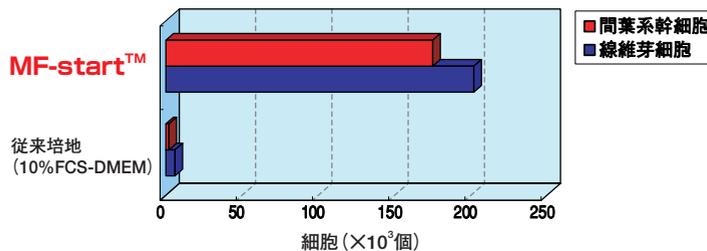


図2. マウス組織からの分離増殖細胞数

ラット胎児から調製した組織を10% FCS-DMEMとMF-start™で5日間培養後の細胞数を比較しました。MF-start™では約4倍の細胞を回収できました（図1）。

同様にマウスから線維芽細胞、骨髄由来間葉系幹細胞を調製し各培地で培養しました。10% FCS-DMEMではほとんど細胞が増えてきませんがMF-start™ではいずれも十分な細胞数を得ることができました（図2）。

また、（図3）は細切りしたヒト関節軟骨からMF-start™を用いて初代細胞を行ったものを示しています（培養1週間目）。多数の軟骨細胞のアウトグロスが確認できました。

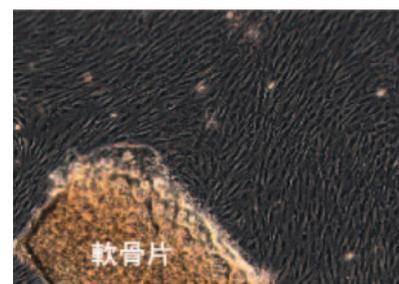


図3. ヒト関節軟骨から細胞樹立

品名	包装	保存温度	Code No.	通常価格	キャンペーン価格
MF-start™ ・MF-start™ (基礎培地) ・Start Supplement	225ml 25ml	4℃ -20℃	TMMFS-001	¥28,000	¥19,600

CELL APPLICATIONS, INC. ヒト皮膚系細胞 30%OFFキャンペーン

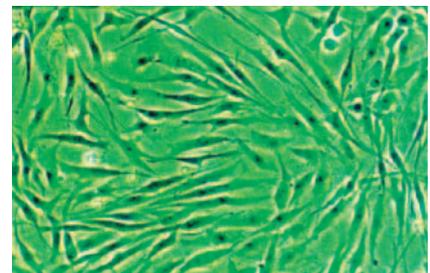
価格を変更しております。
現在の情報は、お問い合わせいただきますようお願いいたします。

ご好評いただいております、ヒト皮膚系細胞及び培地を対象に30%OFFにてお届けします。

期間：2008年5月7日～2008年8月1日【ご注文分】

CELL APPLICATIONS, INC. では、様々な正常細胞、Total RNA、抗体をご提供しております。<詳細はこちらをご覧ください。http://www.cellapplications.com/

今回ご紹介しております皮膚系の細胞は、皮膚の発生・分化、皮膚疾患、紫外線の影響等の実験に幅広く用いられています。中でも、ヒト皮膚線維芽細胞は、最近話題のiPS細胞(induced pluripotent stem cells)を構築するのに使用された報告がございます*。



*K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka, *Cell*, **131**:861-872 (2007)

品名	包装	Code No.	通常価格	キャンペーン価格
ヒト表皮角化細胞 (HEK) 凍結細胞 adult	1vial	CA10205a	¥88,000	¥61,600
fetal	1vial	CA10205f	¥88,000	¥61,600
neonatal	1vial	CA10205n	¥72,000	¥50,400
ヒト表皮角化細胞 (HEK) Total Kit adult	1kit	CA102K05a	¥120,000	¥84,000
fetal	1kit	CA102K05f	¥120,000	¥84,000
neonatal	1kit	CA102K05n	¥104,000	¥72,800
ヒト表皮メラニン細胞 (HEM) 凍結細胞 neonatal	1vial	CA10405n	¥87,000	¥60,900
neonatal, black donor	1vial	CA104B05n	¥94,000	¥65,800
ヒト表皮メラニン細胞 (HEM) Total Kit neonatal	1kit	CA104K05n	¥122,000	¥85,400
neonatal, black donor	1kit	CA104BK05n	¥129,000	¥90,300
ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) 凍結細胞 adult	1vial	CA10605a	¥47,000	¥32,900
fetal	1vial	CA10605f	¥85,000	¥59,500
neonatal	1vial	CA10605n	¥70,000	¥49,000
ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) Total Kit adult	1kit	CA106K05a	¥83,000	¥58,100
fetal	1kit	CA106K05f	¥122,000	¥85,400
neonatal	1kit	CA106K05n	¥106,000	¥74,200
ヒト表皮角化細胞基本培地	500ml	CA130500	¥14,000	¥9,800
ヒト表皮角化細胞増殖培地	500ml	CA131500	¥20,000	¥14,000
ヒト表皮角化細胞カルシウムフリー基本培地	500ml	CA132500	¥14,000	¥9,800
ヒト表皮角化細胞カルシウムフリー増殖培地	500ml	CA133500	¥21,000	¥14,700
ヒト表皮メラニン細胞基本培地	500ml	CA134500	¥14,000	¥9,800
ヒト表皮メラニン細胞増殖培地	500ml	CA135500	¥23,000	¥16,100
ヒト皮膚線維芽細胞基本培地	500ml	CA115500	¥12,000	¥8,400
ヒト皮膚線維芽細胞増殖培地	500ml	CA116500	¥23,000	¥16,100

※1. Total Kit には、各細胞1vial、各細胞用増殖培地、サブカルチャー試薬セット(A) (CA090K) が含まれます。細胞1vial には、 5×10^5 cellsが含まれます。

サブカルチャー試薬セット(A) には、ハンクス平衡緩衝塩溶液(HBSS)、トリプシン-EDTA溶液、トリプシン中和液が各100ml 含まれます。

※2. 保存温度は、細胞：液体窒素、培地、サブカルチャー試薬セット(A)：-20℃です。

※3. 本細胞は、HIV、HBV、HCV、マイコプラズマ、酵母、真菌陰性が確認されています。

私にも
できた!

LIFE SCIENCE SERIES

ライフサイエンス実験シリーズ Vol.5

PCR実戦技術編(1)

技術の多様化にともなって、ライフサイエンス研究に占める研究試薬・キットの役割は日に日々大きくなってきています。その一方において、情報が増えすぎて逆に効果的な研究ができなくなっているとの声も聞かれます。

本シリーズは、そのような情報を一旦整理し、初心者の方にも分かりやすく効果的にライフサイエンス実験を解説できないか、との趣旨から企画されました。

今まで、研究員の実験ノートなども参考に、市販のノウハウ本や実施例集ではカバーできなかったような『生の事例』を紹介することで、より身近に技術を感じていただけないかと考え、『PCRを用いる遺伝子クローニング編(Vol.1)』、『遺伝子発現解析(前・後編)(Vol.2,4)』、及び『ウェスタンブロットング・免疫組織染色編(Vol.3)』をご紹介させていただきました。

その中で、「PCR～タンパク質発現実験」の中で使われるDNA関連技術に関して高い関心をもたれている学生さんや先生方が多い印象を受けました。ポストゲノム時代と呼ばれると昨今ですが、意外とDNAを扱う実験が多いようです。また、ポストゲノム時代になってから、初めて遺伝子実験をされるような方も多いように感じました。

そこで、今回から「PCR実戦技術編」と題したシリーズを4回に分けてお届けさせていただくことになりました。本稿が、研究に携われる方の一助になれば幸いです。

この前のシリーズでは、まだ駆け出しの新人だったA子さんは、入社4年目に突入し、ますます張り切っているようです。そんな中、強力なライバルが登場したようですが…。



研究所近郊でレンゲ草を見つけました

今までの 登場人物



Sリーダー
冷静沈着なライフ
サイエンスグルー
プのリーダー



A子さん
今年入社4年目
になる研究員



N代さん
今年入社3年目
になる研究員
(A子さんのライバル)



S本さん
アシスタント

本シリーズは、弊社ウェブサイト(<http://www.toyobo.co.jp/bio>)の「実験お助けコーナー」でご覧いただけます。

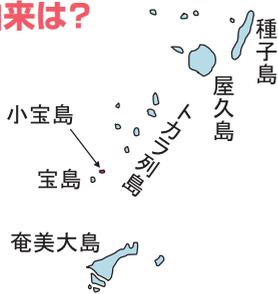
私にも
できた!

ライフサイエンス実験シリーズ Vol.5 1

KOD DNA polymeraseは、1997年に報告されて以来様々な方向へ進化を遂げ、実に多くの分子生物学実験に用いられるようになりました。ここでは、そのKOD DNA polymeraseについて、その過去と応用の歴史について解説いたします。

1-1 KODの名前の由来は？

KOD DNA polymerase (以下、KOD)は当時大阪大学のグループによって鹿児島県の小宝島の硫気孔より分離された超好熱Archaea: *Thermococcus kodakaraensis* KOD1株よりクローニングされました¹⁾。よく、“コダカラ”を“子宝”と思われている方がいらっしゃいますが、“小宝”が正解です。しかし、この島に子宝祈願に訪れる方もいらっしゃるとのこと(このポリメラーゼにご利益があるかは不明ですが…)。ともかく、KODの名前は、“Kodakara Island”に由来します。



このポリメラーゼは、5,013bp (1,671AA)という大変長い open reading frame (Accession No.D29671) 中に見いだされました。KODの分子量は約9万ですので、かなり大きなORFとして発見されたこととなります。実は、このORFにはインティンと呼ばれる2つの挿入配列 (Intein-1:360AA, Intein-2:537AA) が含まれていました。現在販売されているKODは、これらの配列を遺伝子工学的に除去したものです。

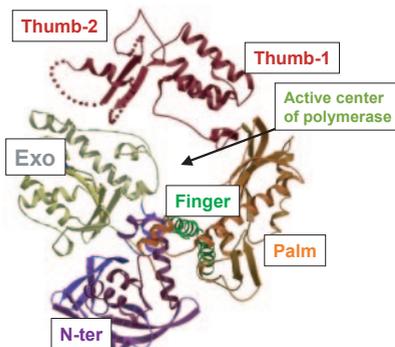
参考までに、インティン (Intein) とはタンパク質分子の一部として翻訳され、合成後に自動的に切除されるアミノ酸配列のことを指します。残った部分 (Extein) はペプチド結合で再結合されます。このインティンは1980年代後半に報告されて以来、生物界に広く確認されています。インティンの多くはhoming endonucleaseのドメインを含み、自身の伝播に関わっていると考えられています。この配列は利己的遺伝子要素として太古の昔にKODの遺伝子中に進入してきたものと推察されます。

1) M. Takagai, M. Nishioka, H. Kakhara, M. Kitabayashi, H. Inoue, B. Kawakami, M. Oka and T. Imanaka, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 4504-4510 (1997)

1-2 KOD DNA polymeraseの特性

Family B (α 型) に分類されるKODのようなPCR用酵素がTaq DNA polymerase (以下、Taq) などの好熱細菌由来のFamily A (PolI型) に属するPCR用酵素と大きく異なる点としては、3'→5'エキソヌクラーゼ活性 (校正活性) を有する点を挙げることができます。この活性を持つことにより、KODは、Taqに比べ、約50~80倍という驚異的に高い正確性を示し、遺伝子のクローニングをはじめとする様々な用途に利用されています。

また、KODだけに備わっている性質も明らかにされています。1分子の酵素が一度に伸長できる塩基数 (Processivity) は同じ α 型に属するPfu DNA polymerase (以下、Pfu) が約20であるのに対し、KODは300以上と、飛びぬけて優れていることが分かっています。また、酵素を過剰量添加した



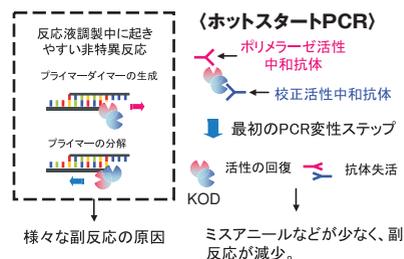
条件での、1秒間の伸長塩基数 (Elongation rate) も、Pfuが約25、Taqが約61であるのに対して、KODは約106-138と極めて優れていることが分かっています。

また、2001年にKODの立体構造が明らかとなり²⁾、その後のKODの改良研究は大きく進展しました。KODに特有な配列が立体的にどの部分に配置されているかも明らかとなり、KODの高い伸長性や効率に対する理解が深まりました。

2) H. Hashimoto, M. Nishioka, S. Fujiwara, M. Takagi, T. Imanaka, T. Inoue and Y. Kai, *J. Mol. Biol.*, **306**: 469-477 (2001)

1-3 様々な分野への応用

PCR反応溶液を調製してからPCRが開始されるまでの間に、ポリメラーゼとエキソヌクラーゼ活性が発現して、プライマーなどを基点として様々な副反応が起こることが、非特

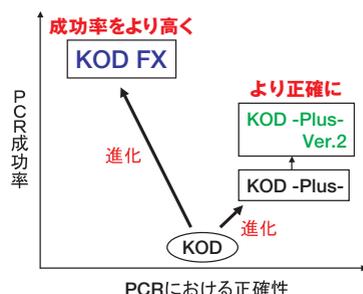


異増幅の要因の一つとして考えられています。そこで、KODのポリメラーゼ活性と校正活性に対する2種類の中和抗体が作製されました³⁾。この抗体を酵素に混合しておくことにより、常温下でのポリメラーゼ、及び校正活性を抑制することができます。抗体は最初の変性ステップで変性し、PCRには影響を及ぼしません。この技術は、『ホットスタートPCR法』と呼ばれ、高正確性PCR酵素「KOD -Plus-」に最初に取り入れられました。KOD -Plus-は更にバッファーを最適化することで、より高い正確性を達成し、現在、クローニング用酵素のスタンダードとなっています。

3) H. Mizuguchi, M. Nakatsuji, S. Fujiwara, M. Takagi and T. Imanaka, *J. Biochem. (Tokyo)*, **126**: 762-768 (1999).

1-4 高成功率という切り口

近年、研究の進展の速度は速まり、様々な分野で分子生物学領域の技術を使用するニーズも増大しました。その中で、最も必要とされるPCR酵素の特性の一つとして、『PCRの成功率』が挙げられるようになりました。難しい配列を増幅しなくてはならない場合や、設計に無理のあるプライマーを使わざるを得ない場合においても、迅速に実験を進める必要がでてきたのです。そこで、KOD -Plus-の正確性をそのまま (Taqの約80倍) に成功率を向上させた「KOD -Plus- Ver.2」と、独自の技術を用いて格段にPCR成功率を向上させた「KOD FX」が開発されました (KOD FXの正確性はTaqの約11倍)。KODは、今後さらに新たな境地を目指して、日々進化を続けています。



A子さんはT社バイオ研究所のライフサイエンス試薬開発グループの研究員です。新人だった彼女も入社4年目となり、そろそろ後輩の指導などのような仕事も増えてきています。

また4月からは、Sリーダー指導の下、A子さんを中心に数名の研究員とアシスタントさんでグループを作り、『PCRをテーマとした調査・改善活動』を行わなくてはなりません。今回、A子さんのグループには、以下のようなテーマが与えられました。しかし、あまりにも抽象的なテーマに、A子さんは少し戸惑っています。

課題：PCR実験を円滑に進めるにはどうすればよいか？

2-1 研究者はPCR実験の何に困っているの？

今日は、1回目の会合です。A子さん達は、早速、「PCR実験を円滑に進めるにはどうすればよいか」について話合うことにしました。しかし、みんながあまりにも色々なことを言ったため、結局全く収集がつかなくなってしまいました。



翌週行われた2回目の会合では、Sリーダーの指導もあって、まず、「PCR実験がうまくいかない」理由について、思いつくままポストイットに理由を書き付けていきました(図1)。みんな、思うところがあったのか、みるみる間に机はポストイットだらけになってしまいました。ざっと眺めると、みんなの意見は、幾つかに分類することができそうです。

そこで次に、「PCR実験がうまくいかない」ことに対する要因を分類してみました(図2)。すると、要因は、ターゲットのGC含量が高いなどの「増幅ターゲット」側の要因、変な場所にしかプライマーを設計できないなどの「実験上の制限」、「ポリメラーゼの選択」、「実験テクニック」の大きく分けて4つにきれいに分類できることが分かりました。順を追って考えると、きちんとまとめることに、みんな少し感動しました。

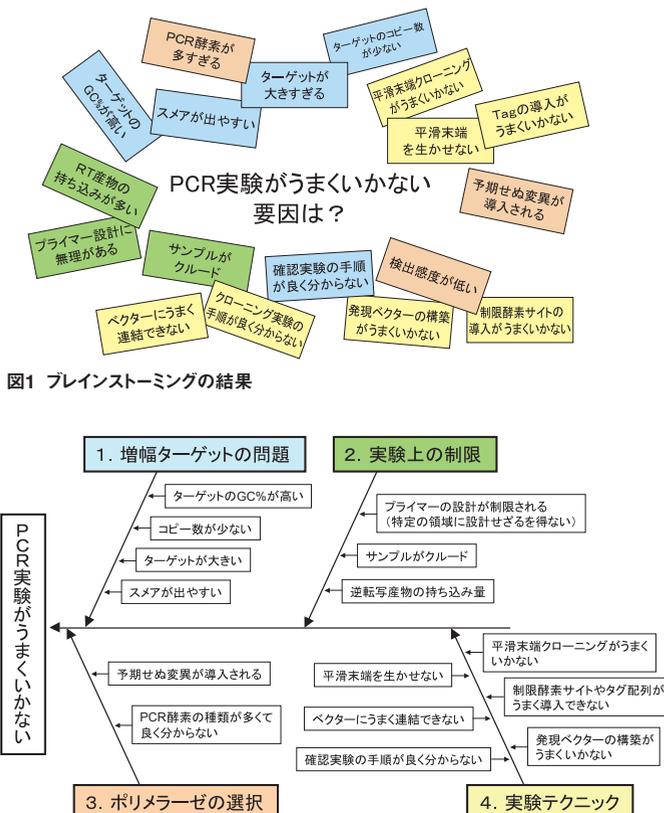


図2 要因の解析結果

2-2 高成功率PCR酵素「KOD FX」

次に、A子さん達は対策を打つことにしました。今回挙げられた要因のすべてに対して対策を打つことで、理論的には、PCR実験はスムーズに進むようになるはずでした。

話し合いを進める中、「要因の1.と2.を考慮して開発されたのが『KOD FX』ではないの?」、という意見が出されました。KOD FXは、KOD DNA polymeraseをベースに、PCR成功率を考慮して最近開発されたPCR酵素です。様々な改良により今までにないくらいまでPCR成功率が向上しています。

そこで、A子さんたちは、要因の3.を『KOD FXをどういう時に使うべきか』、ということに置き換えて、図3に示すような対照表を作成してみました。結局、要因1.と2.はKOD FXをうまく用いることで、解決できそうです。若干正確性が落ちるので、クローニング実験に関してはKOD -Plus-にはかないそうもありませんが、従来のTaqベースの酵素と比べるとはるかに良いに違いありません。

結局、A子さん達は要因1.~3.の対策として、グループで年間を通じて、『KOD FXを用いる成功率向上に関する事例』を作成することにしました。残った要因4.の『実験テクニック』は、PCRでの増幅そのものではなく、PCRの周辺技術という感じです。これに関しては、Sリーダーに何やら良い考えがあるようです。

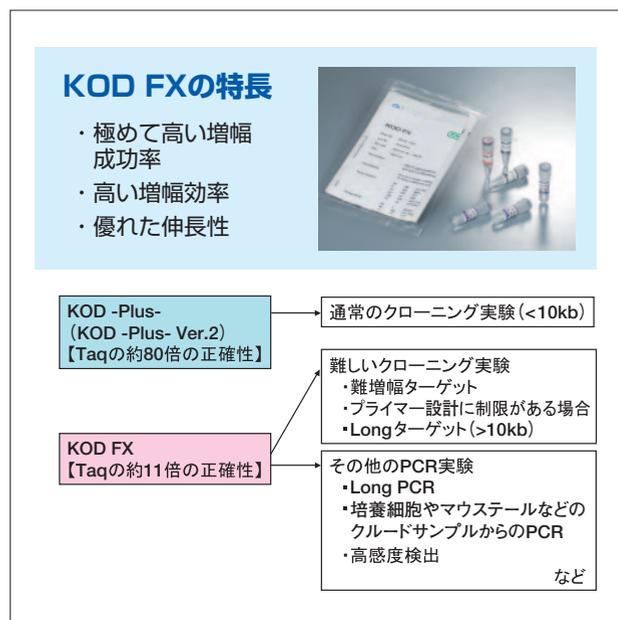


図3 PCR酵素の使い分け



今回は、10kb以上のターゲットの増幅において
度々問題となる、非特異増幅の発生とプライマー長、
及び精製グレードの関係について検討を行いました。

●プライマーの精製グレードの影響の検討

この実験では、比較的増幅が難しく、また、スミアやエ
キストラバンドが出やすいことの知られているβ-
globin遺伝子17.5kbをターゲットとして検討を行いま
した。テンプレートとしては、50μlの反応あたり、ヒトゲ
ノムDNAを50ngを用いて行いました。プライマーは、
脱塩、カートリッジ精製、及びHPLC精製の3通りの方法
で精製されたもの(表1のA及びB)を用いました。サイ
クルは、Long PCRに有効とされている2ステップサイ
クル(30サイクル)とステップダウンサイクル(5→5→
5→20サイクル)で行いました(右図参照)。

その結果、脱塩グレードのプライマーの場合、いず
れのサイクル条件においても、スミアが出やすい傾向に
あることが分かりました(図4)。一方、カートリッジ精製と
HPLC精製グレードのプライマーでは、ステップダウン
のサイクル条件で目的バンドのみのキレイな増幅を確
認することができました。この結果から、長いターゲ
ットを増幅する場合、カートリッジ精製以上のグレード
10kb以上のプライマーを用いることにより良好な結
果が得られることが分かりました(図4)。

●プライマー長の影響の検討

次に、18merから40merまで2base刻みで長さ
を変化させたプライマー(表1のNo.1~12、精製は、い
ずれもカートリッジ精製グレード)を用いて検討を行
いました。

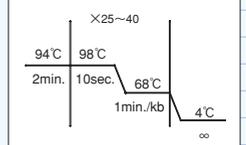
その結果、2ステップのサイクル条件では、24~40
merでターゲットの増幅が認められ、同時に出現したエ
キストラバンドはプライマーが長い程少ない傾向に
あることが分かりました(図5)。一方、ステップダウンのサイ
クル条件では、28~40merでターゲットの増幅が得
られ、エキストラバンドはプライマー長に関わらず出現
しませんでした。この結果から、Long PCRでは、通常
より長めのプライマーを設計し特異性を上げると共に、
アーニリング(及び伸長反応)を比較的高い温度に設定
することでより良い結果が得られることが分かりました。

この傾向は、KOD FX以外のPCR酵素においても、
ある程度当てはまると推察されます。

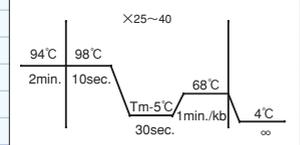
【プロトコル#1】KOD FXの基本反応条件

試薬	添加量(μl)	終温度
2×PCR buffer for KOD FX	25	1×
2mM dNTPs	10	0.4mM each
10pmol/μl Primer #1	1.5	0.3μM
10pmol/μl Primer #2	1.5	0.3μM
Template DNA	X	{ Genomic DNA : ~200ng/50μl Plasmid DNA : ~50ng/50μl cDNA : ~200ng (RNA相当量)/50μl
PCR grade water	Y	
KOD FX (1.0U/μl)	1	1.0 U / 50μl
Total	50 (μl)	

2ステップサイクル



3ステップサイクル



ステップダウンサイクル

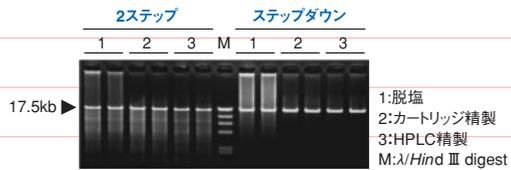
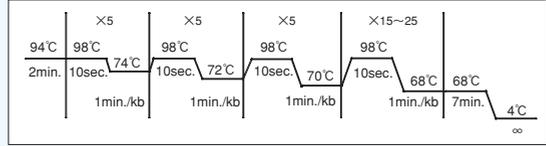
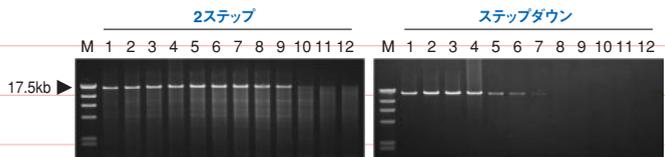


図4. プライマーの精製度が非特異反応に及ぼす影響



F側Primer (Primer長)
1: hBG17.5F40 (40mer) 7: hBG17.5F28 (28mer) R側Primerは、1~12共通で、
2: hBG17.5F38 (38mer) 8: hBG17.5F26 (26mer) hBG17.5R (35mer)を使用。
3: hBG17.5F36 (36mer) 9: hBG17.5F24 (24mer)
4: hBG17.5F34 (34mer) 10: hBG17.5F22 (22mer)
5: hBG17.5F32 (32mer) 11: hBG17.5F20 (20mer)
6: hBG17.5F30 (30mer) 12: hBG17.5F18 (18mer)
M: λHind III digest

図5. プライマー長が非特異反応に及ぼす影響

表1. 実験に用いたプライマー配列

No.	Primer名	Primer配列	PrimerSize (mer)	GC%	Tm (°C)	精製グレード
A	hGB17.5F	TGCACCTGCTCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC	35	49%	77.5	脱塩、カートリッジ、HPLC
B	hGB17.5R	ACATGATTAGCAAAAGGGCCTAGCTTGGACTCAGA	35	46%	76.9	脱塩、カートリッジ、HPLC
1	hGB17.5F40	GACTTTGCACCTGCTCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC	40	48%	78.8	カートリッジ
2	hGB17.5F38	CTTTTGCACCTGCTCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC	38	47%	78.0	カートリッジ
3	hGB17.5F36	TTGCACCTGCTCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC	36	47%	77.7	カートリッジ
4	hGB17.5F34	GCACCTGCTCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC	34	50%	75.9	カートリッジ
5	hGB17.5F32	ACCTGCTCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC	32	47%	72.3	カートリッジ
6	hGB17.5F30	CTGCTCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC	30	47%	69.9	カートリッジ
7	hGB17.5F28	GCTCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC	28	46%	67.4	カートリッジ
8	hGB17.5F26	TCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC	26	42%	64.0	カートリッジ
9	hGB17.5F24	TGTGATTATGACTATCCCACAGTC	24	42%	61.6	カートリッジ
10	hGB17.5F22	TGATTATGACTATCCCACAGTC	22	41%	57.9	カートリッジ
11	hGB17.5F20	ATTATGACTATCCCACAGTC	20	40%	52.7	カートリッジ
12	hGB17.5F18	TATGACTATCCCACAGTC	18	44%	49.7	カートリッジ

2-3 強力ライバル出現

A子さんたちの話し合いの中で、PCR実験の問題の一つとして挙げられた「実験テクニック」に関して、Sリーダーから提案がありました。実験テクニックに関する課題を年間に数回に分けて出して、その課題の解決を通じてそれぞれの手法の裏に潜む注意点・問題点を明らかにするというのです。いつも冷静沈着なSリーダーには、なにやら考えがありそうです。

結局、サークル員の中から代表としてAさんとN代さんに、それぞれ関連のある課題が出されることになりました。Aさんは、後輩のN代さんに先輩の威厳を示さなくてはとあせているようです。一方、N代さんは、Aさんとは違って、学生時代から分子生物学分野の研究を行ってきた経歴がありますし、負けん気では一歩も引けをとりません。

さて、二人には、次のような課題が出されました(皆さんも是非考えてみてください)。



今後の活動方針 (対策)

- 要因1~3 → PCR事例を収集
- 要因4 → Sリーダーの出す課題にチャレンジ

A子さんへの課題：

- 平滑末端を有するPCR増幅断片の平滑末端クローニング方法の手順をまとめなさい。
- その手法を用いて、human β -Actin cDNAのC末端欠損変異体を作製しなさい。

条件：・Accession No.X00351のcDNAクローンを準備するので、そのプラスミドをPCRの鋳型とすること。
 ・開始コドンの位置にNde Iのサイトを導入すること。
 ・732番目のGCTをTGA(ストップコドン)に変更し、なるべくすぐ後ろにXba Iサイトを導入すること。
 ・作製したクローンを大腸菌DH5 α に形質転換した後に、Nde IとXba Iで切り出して、発現ベクターに組換えること。

N代さんへの課題：

- 平滑末端を有するPCR増幅断片をTAクローニングする手順をまとめなさい。
- その手法を用いて、human G3PDH cDNAのC末端欠損変異体を作製しなさい。

条件：・Accession No.M17851のcDNAクローンを準備するので、そのプラスミドをPCRの鋳型とすること。
 ・開始コドンの位置にNco Iサイトを導入すること。
 ・796番目のTATをTGA(ストップコドン)に変更し、なるべくすぐ後ろにXba Iサイトを導入すること。
 ・作製したクローンを大腸菌DH5 α に形質転換した後に、Nco IとXba Iで切り出して、発現ベクターに組換えること。

2-4 平滑末端クローニング (Aさんのプロトコール)

KOD DNA polymeraseの優れた正確性を担っているのは校正活性とも呼ばれる3'→5'エキソヌクレアーゼ活性です。この活性によって、KOD-PlusやKOD FXなどのPCR酵素によって増幅されたPCR産物の末端は平滑化されています。よって、PCR産物は、EcoRVやSma Iなどの平滑末端を生じる制限酵素サイトに直接クローニングすることが可能です。

Aさんは、この課題を与えられた瞬間に過去の失敗を思い出しました(Vol. 1参照)。Aさんは、脱リン酸化処理されたベクターにPCR産物を直接連結しようとして失敗したのです。苦い思い出ですが、今となってはありがたい失敗でもあります。Aさんは、失敗した直後に、平滑末端クローニングのプロトコールを完全にまとめていました。

平滑末端サイトを用いてクローニングする場合、ベクターのセルフライゲーションが問題になります。そこで、ベクターを制限酵素で切断した後に脱リン酸化して使用するのが普通です。ライゲーションが成立するにはDNAの5'末端がリン酸化されていないと、脱リン酸化されたサイト同士は連結することができないからです。

しかし、ここで注意しなくてはならないのが一般的にPCRに用いられるプライマーの5'末端がリン酸化されていないということです。当然、そのプライマーを用いて得られたPCR産物の5'末

端も、制限酵素で処理された末端とは異なりリン酸化されていません。DNA断片を連結するには少なくとも片方の断片の5'末端はリン酸化されていなければならないので、このような場合、リン酸化されたプライマーを用いてPCRを行うか、PCR産物をリン酸化して用いる必要があります。

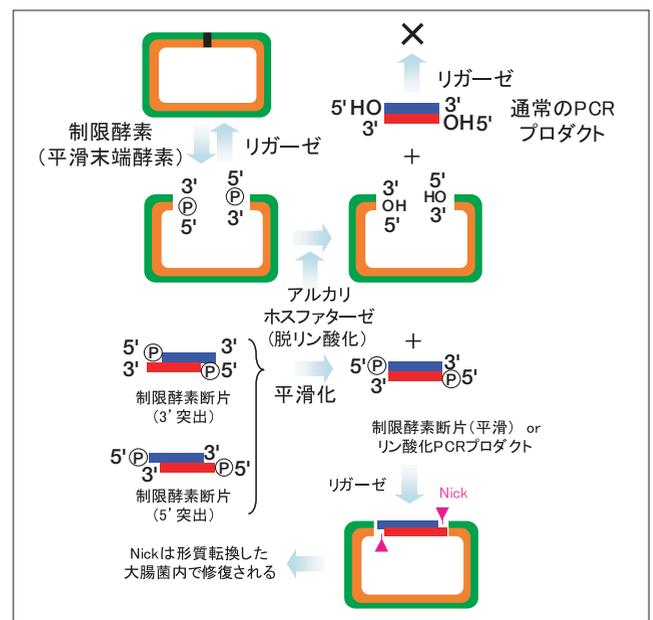


図6 平滑末端クローニングのフロー

ワンポイントメモ ①

- ・KOD -Plus-やKOD FXのPCR産物は平滑化されています。
- ・通常PCRに用いられるプライマーはリン酸化されていません。

【プロトコール#2】プライマーのリン酸化

【使用試薬】

- ・50pmole/ μ l (μ M) 以上のPrimer溶液
- ・T4 Polynucleotide Kinase (Code No. PNK-111)
- ・rA TP (Code No. ATP-111) \rightarrow 10mMに希釈して使用

Primer (50pmole/ μ l [50 μ M])	14 (μ l)
10 \times Protruding End Kinase Buffer	2
10mM rATP (Code No.ATP-111を希釈して使用)	2
T4 Polynucleotide Kinase (5 \sim 20U/ μ l) *1	2
Total	20

↓
37 $^{\circ}$ C、1h反応

↓
95 $^{\circ}$ C、5min (T4 Polynucleotide Kinaseを失活)

↓ ← 50 μ l 滅菌ミQ水を添加します

↓
10pmole/ μ l [10 μ M] primer溶液として使用します*2*3

↓
PCRを行います

↓
MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up- (Code No. NPK-601) などによる精製

*1 T4 Polynucleotide Kinaseは添加できる最大量を添加します(最終液量の10%)。

*2 このままPCR反応に使用します。

*3 凍結して何度でも使用可能です。

【プロトコール#3】PCR産物のリン酸化

【使用試薬】

- ・高正確性PCR酵素の精製PCR産物(平滑末端)
- ・T4 Polynucleotide Kinase (Code No. PNK-111)
- ・rATP (Code No. ATP-111) \rightarrow 10mMに希釈して使用

精製PCR産物	~1 μ g
10 \times Blunt End Kinase Buffer	5
10mM rATP (Code No.ATP-111を希釈して使用)	5
T4 Polynucleotide Kinase (5 \sim 20U/ μ l) *1	5
Total	50 (μ l)

↓
37 $^{\circ}$ C、1h反応

↓
MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up- (Code No. NPK-601) などによる精製

*1 T4 Polynucleotide Kinaseは添加できる最大量を添加します(最終液量の10%)。

【プロトコール#4】ベクターの脱リン酸化

【使用試薬】 *E. coli* Alkaline Phosphatase (Code No. BAP-111)

精製ベクター溶液(制限酵素処理後精製したもの)	0.5 \sim 2.5 μ g
10 \times Buffer	10
<i>E. coli</i> Alkaline Phosphatase (0.1 \sim 1U/ μ l) *	10
Total	100 (μ l)

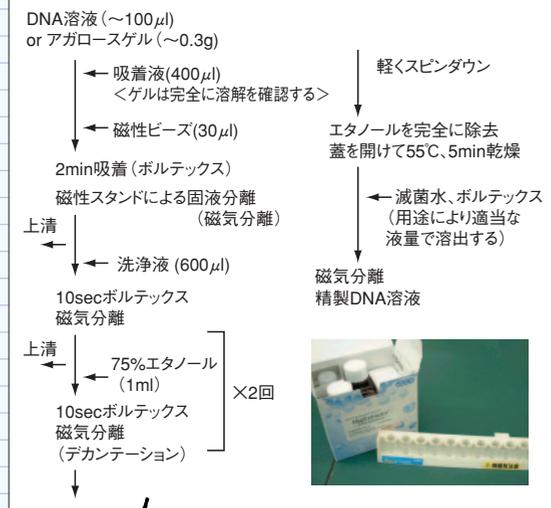
*目安として5 \sim 20pmolesの5'末端に対して2Uですが、添加できる最大量(最終液量の10%)を添加することでほとんどの場合、問題なく脱リン酸化できます。

↓
平滑末端、3'突出末端 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C、60min

↓
5'突出末端 \rightarrow 37 $^{\circ}$ C、60min

↓
MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up- (Code No. NPK-601) などによる精製

【プロトコール#5】MagExtractor™-PCR & Gel clean up- を用いるDNA断片の精製(磁性ビーズ使用)



上に示した平滑末端クローニングで用いられるプロトコールは便利なので、様々な場合に役に立ちます。また、DNA断片の精製は、ほぼすべての組換え工程の中で使用されますので覚えておくと良いと思います(少量の場合は1/2スケールで行うこともできます)。

ワンポイントメモ ②

- プロトコール#5の精製法では約40bp以下のDNA断片は除去されます。
- ゲルからの切り出しは、UV照射によりDNAが損傷を受けるため効率が低下します。トランスイルミネーター上で切り出す際は、アクリル板などを間にはさみ、短時間で切り出す配慮が必要です。

2-5 平滑末端PCR産物のTAクローニング (N代さんのプロトコール)

KOD -Plus-やKOD FXのPCR産物の末端は平滑化されていますので、そのままではTAクローニングすることはできません。このような場合、KOD専用のTAクローニングキット「TARget Clone™ -Plus- (Code No. TAK-201)」を用いると便利です。原理は、増幅産物にTaqを混合して末端にdAを付加するという単純なものです。しかし、KODは熱安定性に優れ、PCR後の反応液の中でも活性を保っているため、せっかくdA付加が起きてもKODの校正活性でまた削られてしまいます。よって、このキットには、KODの校正活性に対する中和抗体が使用されています。つまり、この抗体でKODの校正活性を抑えている間に、Taqを用いてdA付加反応を行うわけです(図7)。そして、そのままTベクターにライゲーションします。この方法は、PCR産物を精製せずにそのままベクターにクローニングすることができるので、とても便利です。

Q & A

A子さん KOD -Plus- Ver.2とKOD FXはどのように使い分ければいいですか？

Sりーダー KOD -Plus- Ver.2はKOD -Plus-の正確性を落とさずに〈Taqの約80倍〉、PCR成功率を向上させています。よって、難しい配列などを、正確性を落とさずに増幅したいような場合に用います。

KOD FXは、KOD -Plus- Ver.2以上にPCR成功率にこだわって改良を加えたポリメラーゼです。GCが高く、どの酵素を用いても増幅が困難なターゲットの増幅や、10~20kb以上程度の比較的大きなターゲットの効果的な増幅、プライマーの設計に制限があり適切な位置にプライマーが設計できなかった場合の増幅などに有効です。しかし、KOD -Plus-に比べて正確性が若干低下している〈Taqの約11倍:PCRエラーは144,535塩基中、19塩基程度〉なので、それを考慮して実験する必要があります。よって、正確性を優先するPCRは、まずはKOD -Plus- もしくはKOD -Plus- Ver.2を用いることを薦めます。

A子さん 高成功率という言葉の意味が良く分からないのですが…

Sりーダー GC含量の高いターゲットなどの増幅を行うときに、一回のチャレンジで成功する確率が向上しているようなイメージです。クルードなサンプルにおいても同様なことが言えます。今までどの酵素を用いても成功しなかったようなPCRもKOD FXを用いることで増幅できる可能性がありますので、冷蔵庫で眠っているプライマーを掘り起こしてきて、一度チャレンジしてみると良いかも知れません。

A子さん KOD FXの末端も完全に平滑化されているのですか？

Sりーダー KOD FXは、KOD -Plus-に比べて正確性は若干低下していますが、末端を平滑化するのに十分な校正活性を有しています。

よって、KOD FXで増幅されたDNA断片は、KOD -Plus-のPCR産物と全く同じ方法を用いて、クローニングすることができます。

A子さん KOD FXはクルードなサンプルの増幅にも有効ですか？

Sりーダー KOD FXは細胞などを含むクルード溶液からのPCRにも有効です。実際の増幅では、細胞懸濁液の液量を反応液50μlに対して2μl以下にすると効果的に増幅できます。ヒトの細胞ならば、1反応に 2×10^4 cells程度あれば十分です。ヒト細胞株 (Jurkat細胞) の培養液を用いて、 2×10^4 cellsから8.5kbの増幅の成功例があります。また、KOD FXはマウステールなどからのPCRにおいても有効です。



関連製品紹介

品名	用途	包装	Code No.	価格
KOD -Plus-	高正確PCR	200U×1本	KOD-201	¥30,000
KOD -Plus- Ver.2	” (さらに高効率)	200U×1本	KOD-211	¥32,000
KOD FX	高成功率PCR	200U×1本	KFX-101	¥35,000
KOD Dash	インサートチェック	250U×1本	LDP-101	¥25,000
Blend Taq®	正確性の不要なPCR全般	250U×1本	BTQ-101	¥19,000
Blend Taq® -Plus-	” (Hot start可能)	250U×1本	BTQ-201	¥21,000
RevaTra Ace -α-®	高効率RT	100回用	FSK-101	¥53,000
Ligation high Ver.2	高効率Ligation	750μl×1本	LGK-201	¥22,000
T4 Polynucleotide kinase	DNAのリン酸化	1,500U×1本	PNK-111	¥15,000
rATP	リン酸化の基質	50μmoles/0.5ml	ATP-111	¥15,000
<i>E. coli</i> Alkaline Phosphatase	DNA断片の脱リン酸化	100U×1本	BAP-111	¥15,000
MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-	DNA断片の精製 (磁性ビーズ使用)	200回用	NPK-601	¥28,000
MagExtractor™ -mRNA-	Poly (A) ⁺ RNAの精製 (磁性ビーズ使用)	5回用	NPK-801	¥44,000
MagExtractor™ -Plasmid-	プラスミドの精製 (磁性ビーズ使用)	500回用	NPK-301	¥33,000
Magical Trapper	磁性分離 (磁性スタンド)	1個	MGs-101	¥38,000
TArget Clone™	TA Cloning	10回用	TAK-101	¥12,000
TArget Clone™ -Plus-	” (KOD専用)	10回用	TAK-201	¥16,000
Competent high JM109	高効率形質転換	0.1ml×10本	DNA-900	¥17,000
Competent high DH5α	高効率形質転換	0.1ml×10本	DNA-903	¥17,000
Competent Quick DH5α	サブクローニング用形質転換	0.1ml×20本	DNA-913	¥29,000

本製品はすでに販売を中止しております。

微生物同定サービス

日本薬局方に沿って微生物同定を実施します。

医薬品等の製品管理や製造工程管理において微生物モニタリングが重要です。日本薬局方「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」に基づいて、細菌の16S rRNA遺伝子の一部(約300bp)をシーケンス解析し、細菌の同定を行います。

特長1 日本薬局方に準拠

- ・日本薬局方「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」に準拠して解析を行います。

特長2 簡便

- ・コロニーが生じたプレートをお送りいただくだけで簡便です。
(注意:人への病原性を有する、もしくは病原性を有する可能性がある微生物の場合、お断りすることがあります)

特長3 様々なオプションを準備

- ・菌の単離作業や16S rRNA全長解析等などもオプションでお引き受けします。

受託フロー

最初に

解析依頼書に解析する菌数などを記載の上、弊社へお問い合わせください。(お問い合わせ先に関しましては裏表紙をご覧ください)

ご提供いただくもの

- ・生菌(プレート)

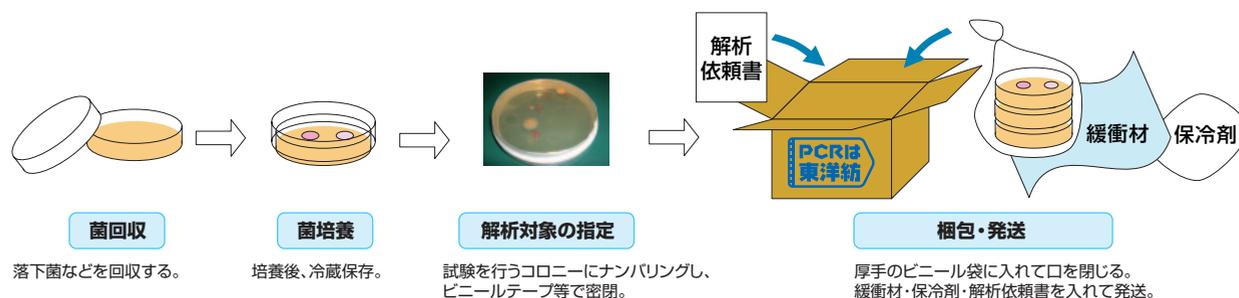
作業

1. コロニーからダイレクトPCR
2. シーケンス反応とDNAシーケンサーによるDNA配列の解析
3. 相同性検索

納品物

- ・報告書(塩基配列解析結果、相同性検索結果を含む)

サンプルをご提供いただく手順



〈サービスの内容〉

項目	Code No.	納期	価格
微生物同定(細菌)	CBI-XXX	2週間	応談*

*基本料金に加え、ご依頼いただいたコロニー数に応じてお見積りいたします。

〈オプション〉

- ・菌の単離
 - ・真菌の同定
 - ・DNA抽出
 - ・16S rRNA遺伝子配列の全長解析
- ※その他ご希望がございましたらお問い合わせください。

高効率逆転写酵素「ReverTra Ace[®]」の反応効率・伸長性能と逆転写反応温度の検討

東洋紡績（株） 敦賀バイオ研究所 川井 淳

はじめに

「ReverTra Ace[®]」は、M-MLV RTaseを遺伝子工学的に改変して開発された高効率逆転写酵素であり、伸長性、および反応効率が格段に向上しています。この「ReverTra Ace[®]」は、高効率逆転写キット「ReverTra Ace - α -[®] (Code No. FSK-101)」やリアルタイムPCR用逆転写キット「ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (Code No. FSQ-101)」に用いられており、ご好評いただいています。

今回は、この「ReverTra Ace[®]」の優れた反応効率、および伸長性を確認するために、高次構造を取りやすく、逆転写が難しいとされる18SリボソームRNAを鋳型とした逆転写反応において、他社の逆転写酵素と比較を行いました。

方法

(1) 使用酵素

- ・ReverTra Ace[®]
(Code No. TRT-101, 100U/ μ l, 推奨反応温度42 $^{\circ}$ C)
- ・A社逆転写酵素
(改変型M-MLV RTase, 200U/ μ l, 推奨反応温度42 $^{\circ}$ C)
- ・B社逆転写酵素
(改変型M-MLV RTase, 200U/ μ l, 推奨反応温度55 $^{\circ}$ C)

(2) 逆転写反応

まず、鋳型となる200ngのHeLa細胞由来total RNAと、4 pmolの配列特異的リバースプライマー (5'-GTTCGACCGTCTTCTCAGCGCTCC-3')、各逆転写酵素推奨量のdNTPs、およびRNase-free水を混合し(合計液量13 μ l)、65 $^{\circ}$ C、5min. インキュベート後、氷上で急冷して、プライマーのプレアニーリングを行いました。その後、各逆転写酵素の反応バッファー、40UのRNase inhibitor (Code No. SIN-101)、2 μ lの各逆転写酵素、およびRNase-free水を混合し(合計液量20 μ l)、42 $^{\circ}$ Cまたは55 $^{\circ}$ C、20分間の逆転写反応を行い、最後に、85 $^{\circ}$ C、5min. 処理することにより、酵素を失活させました。

(3) PCRによる検出

(2)で調製した逆転写反応液を鋳型として、高成功率PCR酵素「KOD FX (Code No. KFX-101)」を用いて様々な鎖長領域のPCRを行いました。リバースプライマーは逆転写反応で用いたものと同じのもの、フォワードプライマーはプライマー#1 (5'-TGACGGAAGGGCACCACAGGAG-3'、増幅鎖長600bp)、プライマー#2 (5'-AGCTAGGAATAATGGAATACGACCGC-3'、増幅鎖長950bp)、プライマー#3 (5'-TAACGAGGATCATTGGAGGGCAAGC-3'、増幅鎖長1220bp)、プライマー#4 (5'-GCCATGCATGTCTAAGTACGCACGG-3'、増幅鎖長1760bp)を、それぞれ5pmol使用しました。その後、逆転写反応液2 μ lを用いて、反応液量25 μ lで、温度条件98 $^{\circ}$ C 2min \rightarrow

(98 $^{\circ}$ C 10sec \rightarrow 68 $^{\circ}$ C 2min) \times 30サイクルのPCRを行いました。PCR終了後、電気泳動を行い、目的バンドのシグナル強度、非特異バンドの出現パターンにより逆転写反応効率、および特異性を評価しました(図2)。

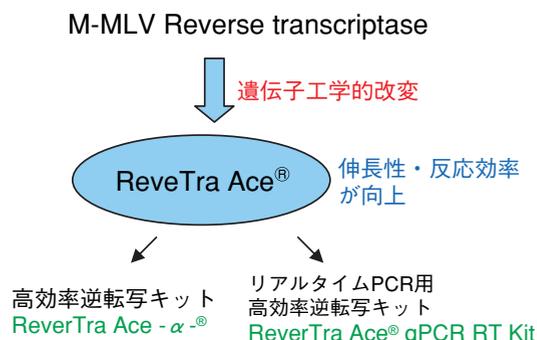
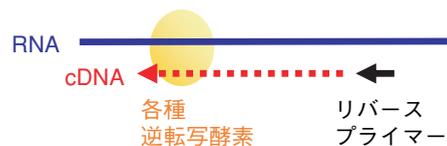
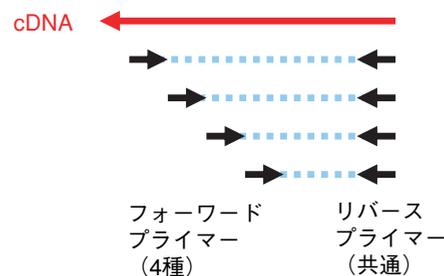


図1. ReverTra Ace[®]のキットへの応用

(1) 逆転写反応 (42 $^{\circ}$ Cおよび55 $^{\circ}$ C)



(2) PCR (KOD FX使用)



(3) アガロースゲル電気泳動

図2. 逆転写反応効率・伸長性比較の実験スキーム

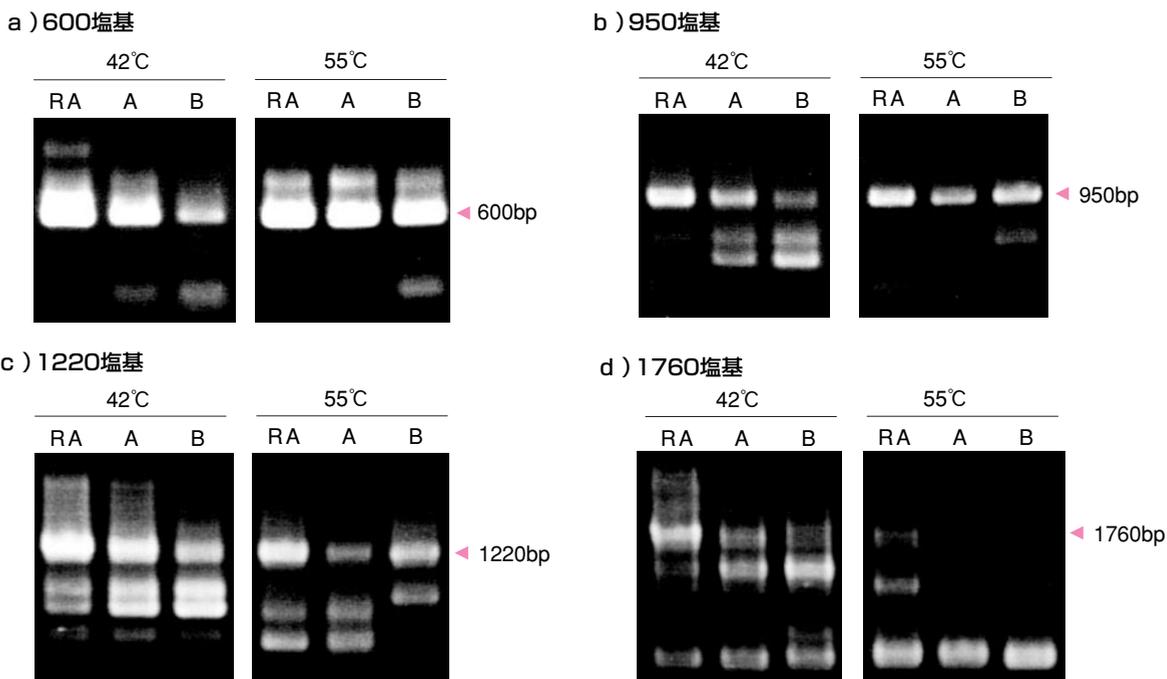


図3. 逆転写伸長性の比較結果
RA : ReverTra Ace®, A : A社逆転写酵素、B : B社逆転写酵素

結果及び考察

結果を図3に示します。cDNA合成量、および伸長距離のいずれにおいてもReverTra Ace®が最も良好な結果を示しました。図3の中でエキストラバンドがみられるものがありますが、それは、rRNAの複雑な立体構造が原因で逆転写のスリップが原因で生じた短い増幅産物であると考えられます。ReverTra Ace®は最もエキストラバンドが少なく、特異性の高い逆転写が行われていることが示唆されました。また今回、逆転写の反応温度を2水準(42℃および55℃)で比較しましたが、いずれの酵素においても、高温で反応を実施するより、それぞれの至適温度(ReverTra Ace®およびA社酵素: 42℃、B社酵素: 55℃)で反応を行った方が良好な結果を示し、18S rRNAのような高次構造をとりやすい鋳型においても、高温での逆転写は必ずしも結果の改善には結びつかないことが示唆されました。これらの結果から、逆転写酵素の選択においては、反応温度

の高さより、酵素に由来備わっている基本性能が重要であることが示唆されました。なお、本酵素の反応効率・伸長性などの基本性能の高さは、弊社独自の遺伝子改変によるものです。

まとめ

今回の結果より、ReverTra Ace®の基本性能は、他社品と比較して極めて優れており、様々な逆転写反応のアプリケーションにおいて安定した性能を発揮すると考えられます。ReverTra Ace®は、単品での販売(TRT-101)のほか、様々なキット製品の酵素としても用いられており、1st strand cDNA合成、定量PCR用のcDNAサンプル調製、RT-PCRによる遺伝子クローニングなど、多様な用途において簡便にご使用いただけます。是非一度、ReverTra Ace®および各種キット製品をお試しください。

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
ReverTra Ace®	2,000U×1本	-20℃	TRT-101T	¥6,000
	10,000U×1本		TRT-101	¥15,000
	(10,000U×1本)×5		TRT-101X5	¥60,000
	(10,000U×1本)×10		TRT-101X10	¥105,000

関連商品

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
高効率逆転写キット ReverTra Ace -α®	100回用(20μl反応)	-20℃	FSK-101	¥53,000
リアルタイムPCR用高効率逆転写キット ReverTra Ace® qPCR RT Kit	200回用(10μl反応)	-20℃	FSQ-101	¥38,000
RNase Inhibitor (Native type)	2,500U×1本	-20℃	SIN-101	¥9,000
RNase Inhibitor (Recombinant type)	2,500U×1本	-20℃	SIN-201	¥9,000



高効率逆転写キット: ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit & ReverTra Ace - α -[®]

「ReverTra Ace[®]」は、M-MLV RTaseを遺伝子工学的に改変して開発された高効率逆転写酵素です。本酵素は、リアルタイムPCR用逆転写キット「ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (Code No. FSQ-101)」や高効率逆転写キット「ReverTra Ace - α -[®] (Code No. FSK-101)」に用いられており、ご好評いただいています。今回は、これらのキットをより効果的にお使いいただくために、これまでに多く寄せられた質問にお答えしながら、各キットについて解説いたします。

〈 ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit と ReverTra Ace - α -[®] の違いについて 〉

Q 1 これらの製品にはどのような違いがありますか？

A 1 どちらも、弊社高効率逆転写酵素ReverTra Ace[®]を用いた逆転写キットですが、ReverTra Ace[®] qPCR RT KitはリアルタイムPCR専用、ReverTra Ace - α -[®]は様々な用途に用いることができる汎用型の製品です。

表1. 各逆転写キットの仕様

	ReverTra Ace [®] qPCR RT Kit	ReverTra Ace - α - [®]
用途	リアルタイムPCR専用	RT-PCR、クローニング、ライブラリ作製、など
逆転写反応時間	15min.	20~30 min.
合成cDNAの鎖長	短い	長い
逆転写用プライマーの添付	Primer Mix	Random primer, Oligo (dT) primer
ポジティブコントロールの添付	なし	あり

〈 ReverTra Ace[®] qPCR RT Kitについて 〉

Q 1 この製品にはどのような特長がありますか？

A 1 リアルタイムPCRに適したcDNAを高効率かつ簡便に合成することができるように、試薬組成や製品構成が最適化されています。簡便・短時間に反応を行うことができ、従来の逆転写キットにくらべ高感度に検出することができます。ただし、合成されたcDNAは短鎖cDNAの割合が多く、長鎖のRT-PCRやクローニング用途には向きません。そのような用途には、ReverTra Ace - α -[®]をお勧めいたします。



Q 2 この製品を使用することで、検出感度は向上しますか？

A 2 本製品はcDNA収量が高いのが特長です。さらに、逆転写反応液をリアルタイムPCR反応液へ最大20%程度まで持ち込むことから、検出が困難な低コピーのターゲットの検出などにおいて威力を発揮します。

Q 3 この製品に含まれているPrimer Mixとはどのようなものですか？

A 3 リアルタイムPCRに適したcDNAを効率よく合成できるように、Random primerとOligo (dT) primerとを最適な比率で混合したものです。このPrimer Mixを用いることにより、様々な検出ターゲットに対し、条件検討を行うことなく、再現性よく、高効率に逆転写反応を行うことができます。

〈 ReverTra Ace - α -[®]について 〉

Q 1 この製品にはどのような特長がありますか？

A 1 幅広い条件検討を行うことができ、それぞれの用途に適したcDNAの合成条件を検討することが可能です。

Q 2 どのような用途に用いることができますか？

A 2 幅広い鎖長のRT-PCR、ライブラリ作製用1st strand合成など、様々な用途に用いることができます。遺伝子クローニング時のcDNA合成にも最適です。

Dualsystems Biotech

新Y2Hシステム

DUALhunter Kit

スプリットユビキチン法を用いる新しいYeast two-hybridシステムです。従来のY2H法では自己活性化により検出できないようなタンパク質をBaitとして使用できます。

特長 1

自己活性化を示す蛋白質をBaitとして選択できます

・Baitタンパク質を膜タンパク質との融合タンパク質と発現させるため、従来のY2H解析では自己活性化 (Self-activation) してしまうタンパク質をBaitとして使用することができます。

特長 2

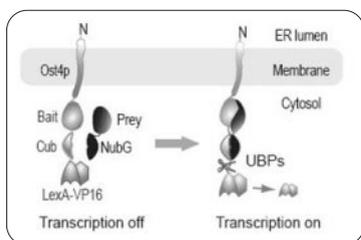
高い感度と特異性

・人工転写因子 (LexA-VP16)、および高感度な3種類のレポーター遺伝子 (HIS3, ADE2, lacZ) を有する酵母株 (NMY51) を用いることにより、高感度かつ特異性の高い相互作用の検出が可能です。

■原理

スプリットユビキチン法はC末端側 (Cub) およびN末端側 (Nub) に分割されたユビキチンドメインが隣接することにより相補し合う性質を利用します。再構築されたユビキチンは、脱ユビキチン化酵素 (UBPs) の作用を受け、ユビキチンのC末端側のペプチド鎖が切断を受けます。本システムでは、CubのC末端側にLexA-VP16が存在し、切断を受けることにより核へ移行し、レポーター遺伝子を活性化します。

Ost4pは酵母で普遍的に発現している単純な膜タンパク質であり、その膜タンパク質に目的とする可溶性タンパク質を融合したものをBaitとして使用します。Baitを融合タンパク質として発現することに



より、Baitの核移行を阻止することができるため、本システムでは、従来のY2Hシステムで自己活性化を示すようなタンパク質をBaitとして用いることができます。

〈輸送・保存：-20℃〉

品名	容量	Code No.	価格
DUALhunter Kit	1Kit	DSP01005	¥380,000
・pDHB1	5µg		
・pPR3-N	5µg		
・pDHB1-largeT	5µg		
・pDSL-p53	5µg		
・pAI-Alg5	5µg		
・pDL2-Alg5	5µg		
・Yeast reporter strain (NMY51)*			

本製品はすでに販売を中止しております。

* NMY51の遺伝子型:[MATa his3Δ200trip-901leu2-3,112 ade2LYS2::(lexAop) 4-HIS3ura::(lexAop) 8-lacZ ade2::(lexAop) 8-ADE2 GAL4]
 ※本システムにはDUALmembrane Kit用のPrey用ライブラリーをご使用いただけます。本ライブラリーには、NubG-xとx-NubGの2種類があり、基本的にはどちらもお使いいただけますが、NubG-xライブラリーを最初にお試しになることをお勧めします。
 ※詳しくは弊社ウェブサイト (www.toyobo.co.jp/bio) もしくは、www.dualsystems.com/ をご覧ください。

PEPROTECH INC.

New Cytokines/ Antibodies

Peprrotech社は、ヒトをはじめ様々な動物のRecombinantタイプのサイトカインを300種以上取り扱っております。各サイトカインはキャリアタンパク質や添加剤を一切含まず、様々な実験にそのままご使用いただけます。

■サイトカイン

〈輸送・保存：-20℃〉

品名	容量	Code No.	価格
Human Adiponectin	5µg	PT45024L	¥13,000
	25µg	PT45024	¥39,000
Human ANG-1	5µg	PT13006L	¥13,000
	20µg	PT13006	¥39,000
Human BD-4	5µg	PT30065L	¥13,000
	20µg	PT30065	¥39,000
Human IL-12p80	2µg	PT20012P80L	¥13,000
	10µg	PT20012P80	¥39,000
Human OX40 Ligand	2µg	PT31028L	¥13,000
	10µg	PT31028	¥39,000
Human sCD23	5µg	PT31026L	¥13,000
	20µg	PT31026	¥39,000
Murine FGF-acidic	10µg	PT45033AL	¥13,000
	50µg	PT45033A	¥39,000
Murine IL-11	2µg	PT22011L	¥13,000
	10µg	PT22011	¥39,000
Murine IL-17F	5µg	PT21017FL	¥13,000
	25µg	PT21017F	¥39,000
Rat Fractalkine (CX3CL1)	5µg	PT40026L	¥13,000
	20µg	PT40026	¥39,000
Rat GDNF	2µg	PT45051L	¥13,000
	10µg	PT45051	¥39,000

■抗体

〈輸送・保存：-20℃〉

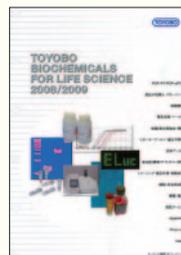
品名	容量	Code No.	価格
Rabbit Anti Human Endostatin	50µg	PT500P262	¥39,000
	100µg	PT500P262V	¥51,000
Rabbit Anti Human IL-33	50µg	PT500P261	¥39,000
	100µg	PT500P261V	¥51,000
Rabbit Anti Human MIA-2	50µg	PT500P255	¥39,000
	100µg	PT500P255V	¥51,000

※詳しくは<http://www.peprotech.com/> をご覧ください。

本製品はすでに販売を中止しております。

●新カタログ発刊のお知らせ

弊社総合カタログ 2008/2009、およびSanta Cruz Biotechnology 社カタログ '08を発刊いたしました。弊社ウェブサイトの、『お問い合わせ・ご請求』のコーナーからご請求いただけます。



●KOD -Plus-の包装を変更しました。

ご好評いただいておりますKOD -Plus- (Code No. KOD-201、¥30,000) の複数パック包装での販売を開始いたしました。単品包装品を写真のようにまとめた形態となります。



品名	包装	保存温度	Code No.	価格
高正確性PCR酵素 KOD -Plus-	(200U×1本)×5	-20℃	KOD-201X5	¥120,000
	(200U×1本)×10	-20℃	KOD-201X10	¥210,000

※複数組みパックのご注文コードは、通常包装コードの末尾にX5 (エックス5) もしくはX10を付けたものになります。

〈以下のコード品は販売中止となりました〉

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
高正確性PCR酵素 KOD -Plus-	200U×5本	-20℃	KOD-202	¥120,000
	200U×11本	-20℃	KOD-203	¥230,000

●販売中止品のお知らせ

長らくご愛顧いただきました「RT-PCR high -Plus-《逆転一発》 (Code No.PCR-301、50回用、¥39,000)」の販売を終了させていただきました。代替品は「RT-PCR Quick Master Mix (Code No.PCR-311、50回用、¥45,000)」となります。感度が約100倍に向上し、さらに使い勝手が向上しております。是非、一度お試しください。

●FASシリーズ用プリンタロール変更のお知らせ

弊社UVサンプル撮影装置FAS用のプリンタロールのCode No.、包装、価格が変更になりました。

■プリンタロール UPP-110HD (適用機:FAS-I, II 適用プリンタ:YP-186XC)

	旧	新
Code No.	FAS-4110	FAS-4210
包装	5巻/1箱	10巻/1箱
価格	¥11,250	¥22,500

■プリンタロール UPP-110HA (適用機:FAS-II, III 適用プリンタ:UP-880)

	旧	新
Code No.	FAS-4111	FAS-4211
包装	5巻/1箱	10巻/1箱
価格	¥12,000	¥24,000

■プリンタロールUPP-110HG (適用機:FAS-III 適用プリンタ:UP-895, UP-897MD)

	旧	新
Code No.	FAS-4113	FAS-4213
包装	5巻/1箱	10巻/1箱
価格	¥12,000	¥24,000

本製品はすでに
販売を中止して
おります。

実験川柳特集 6

皆様、沢山のご投句ありがとうございます。同じものを見ても、人によって色々と感受性が異なるようですね。

このコーナーで頭をやわらかくして、日々の研究に邁進してください。

本コーナーは、弊社ウェブサイト(www.toyobo.co.jp/bio)「読者のコーナー」で最新の投句を確認いただけます。

コロニーが ぼくをひろえと みつめてる

匿名希望 キミにあらびの冠をさん

●キミにあらびの冠をさんのコメント:助教の先生の深夜の空想。

【句評】 私は、中くらいの大きさで、コロニーの表面が少し輝いて見えるコロニーをいつもメインでつづいていました。若干小振りのコロニーの方が当たりが多かったような。

酒池肉林 培地の菌が 羨ましい

匿名希望 知盛さん

●知盛さんのコメント:寝不足の朝など、インキュベーターの中の菌が、羨ましい事があります…

【句評】 大腸菌にそういう意識があると面白いかもしれません。でも、本当の肉林状態を作り出すには、F因子を持った大腸菌が必要かも。(失礼しました…)

その昔 やった実験 今出来ず
腕が落ちたな 情けなや

匿名希望 TSLOVEさん

【句評】 これは川柳ですか? でも、なんとなく共感できるので採用しました。私も、年々自分で実験をする時間が減り、本当に腕が落ちました。昔のチップ詰めは速さも今はさび付いているに違いありません。

スナック菓子 原料名に 酵母エキス

匿名希望 どうーさん

●どうーさんのコメント:実験で酵母エキスの臭いをかいでるので、食べる気が失せました。

【句評】 週1で培地を調製した場合、年間に1gくらいはいつの間にか吸い込んでいるような計算になったりして(笑)。培地を頻繁に調製する人は、健康だったりするのかもしれない。酵母エキスって、とても栄養価が高そうな匂いがしますよね。

調べたら ベクター同士が ライゲーション

匿名希望 kssxさん

●kssxさんのコメント:組換え前のインサートとベクターの長さが変わらないとき。

【句評】 インサートとベクターの長さが同じときも、少し紛らわしいですね。思わずクローン捨てそうになったことがあります。

⇒弊社ウェブサイト(読者のコーナー>ご投稿コーナー)からご投稿、投句いただけます。

<http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/lifescience/tech/reader/contribute/index.html>

採用になった方には、¥2,000の図書カードをご進呈いたします(詳しくはサイトをご覧ください)。奮って投稿・投句ください。

NOTICE TO PURCHASER : LIMITED LICENSE

●PCR関連商品のラベルライセンスについての詳細は、弊社ウェブサイト(www.toyobo.co.jp/bio)「ラベルライセンスコーナー」をご覧ください。

●本ページ掲載の試薬類は全て一般研究用の目的にのみ販売しており、医薬品、診断用医薬品、化粧品、食品用等には使用できませんので、十分ご注意ください。誤用による事故については、当社は一切の責任を負いません。
●本ページ掲載商品には消費税は含まれておりません。実際のご購入価格については弊社代理店へお問い合わせください。
●本ページ中の略号  は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外毒物です。
 は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外劇物です。
 は消防法に基づく危険物です。