

# UPLOAD

T O Y O B O B I O C H E M I C A L S

## Brand-New item

- 1 初代培養細胞トランスフェクションキット  
Cytfectシリーズ キャンペーン

## HOT ITEM

- 3 高効率・高成功率PCR酵素  
KOD FX Neo

## TECHNICAL REVIEW

- 5 高効率・高成功率PCR酵素『KOD FX Neo』を用いた  
環境・生態系サンプルからの簡便な検出法

## Q&A

- 7 高効率・高成功率PCR酵素 & 高正確性・高効率・高速PCR酵素  
KOD FX Neo & KOD -Plus- Neo

## FLASH NEWS

- 8 Cell Applications, INC. ヒト皮膚細胞、HUVEC価格改定のお知らせ

## HOT ITEM

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

## NEW RELEASE

- 11 哺乳類細胞タンパク質高発現システム  
Mammalian PowerExpress System®

## INFORMATION

- 13 展示会出展およびセミナーのご案内  
13 大包装品発売のご案内  
13 新カタログ発刊のご案内

## みんなの広場

- 14 実験川柳特集13



KOD FX Neo  
→本誌p.3~6に詳細記事がございます。



2011 June  
VOL. 97

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。

## 初代培養細胞トランスフェクションキット Cytofectシリーズ



NEW

■期間：2011年6月13日～2011年9月30日（ご注文分）

新発売を記念して40%OFFでご提供いたします。

初代培養細胞専門メーカーCell Applications INC.より初代培養細胞用トランスフェクションキット『Cytofectシリーズ』が新発売されました。

初代培養細胞でのトランスフェクションにお困りの方は是非一度お試しください。



### 特長1 初代培養細胞のトランスフェクション効率が20%以上

- ・新開発カチオンポリマートランスフェクション試薬によりDNAを濃縮、核移行の効率アップ。
- ・新開発ペプチドエンハンサーにより、細胞内でのDNAの分解を保護。
- ・専用のトランスフェクション培地、細胞種別に設定された抗生物質フリー培地により、これまで初代培養細胞では得られなかった遺伝子高導入効率を達成。

### 特長2 簡便なプロトコール:DNAと培地や試薬を混合し、細胞に添加するだけ

#### プロトコール

1. DNAを専用トランスフェクション培地で希釈します。
2. 上記1.にトランスフェクション試薬、ペプチドエンハンサーを添加、37℃・25分インキュベートします。
3. 培地を除去した細胞に上記2.の混合液を添加、37℃・1時間インキュベートします。
4. 添加した混合液を除去、専用抗生物質フリー培地を添加、37℃・24時間インキュベートします。

### 特長3 低毒性:トランスフェクション後のバイアビリティーの変化は-20%以内

- ・細胞種別の専用培地を用いることで、高いバイアビリティーを維持します。

### 特長4 多種の細胞で実績有り:以下の細胞で使用できることを確認しています

#### Cytofect内皮細胞トランスフェクションキット (CATF101K)

細胞名		Code No.
ヒト	臍帯静脈内皮細胞 HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)	CA20005n
	大動脈内皮細胞 HAOEC (Human Aortic Endothelial Cells)	CA30405a
	冠動脈内皮細胞 HCAEC (Human Coronary Artery Endothelial Cells)	CA30005a
	肺動脈内皮細胞 HPAEC (Human Pulmonary Artery Endothelial Cells)	CA30205a
	肺微小血管内皮細胞 HLMVEC (Human Lung Microvascular Endothelial Cells)	CA54005a
ウシ	大動脈内皮細胞 BAOEC (Bovine Aortic Endothelial Cells)	CAB30405a
	肺動脈内皮細胞 BPAEC (Bovine Pulmonary Artery Endothelial Cells)	CAB30205a
	冠動脈内皮細胞 BCAEC (Bovine Coronary Artery Endothelial Cells)	CAB30005a
ラット	大動脈内皮細胞 RAOEC (Rat Aortic Endothelial Cells)	CAR30405a

#### Cytofect線維芽細胞トランスフェクションキット (CATF103K)

細胞名		Code No.
ヒト	皮膚線維芽細胞 HDF (Human Dermal Fibroblasts)	CA10605n
	心臓線維芽細胞 HCF (Human Cardiac Fibroblasts)	CA30605f
	肺線維芽細胞 HLF (Human Lung Fibroblasts)	CA50605a

### 実施例

本キットまたは他社品を用いて、蛍光タンパク質の遺伝子をヒト臍帯静脈内皮細胞またはヒト皮膚線維芽細胞（新生児由来）にトランスフェクションし、その発現量をFACSで解析しました。

Cytofect内皮細胞または線維芽細胞トランスフェクションキット 操作

1. 12wellプレートにヒト臍帯静脈内皮細胞またはヒト皮膚線維芽細胞を $1 \times 10^5$  cells播きこみました。
  2. 18時間培養しました。
  3. 蛍光タンパク質発現プラスミド0.4  $\mu$ gを専用トランスフェクション培地400  $\mu$ lに添加し、混和しました。
  4. 上記3混和液にトランスフェクション試薬2  $\mu$ lを添加し、混和しました。
  5. 上記4混和液にペプチドエンハンサーをヒト臍帯静脈内皮細胞の場合は6  $\mu$ l、ヒト皮膚線維芽細胞の場合は4  $\mu$ lを添加し、混和しました。
  6. 上記5混和液を37°Cで25分間インキュベートしました。
  7. 培地を除去した細胞に上記6混和液を添加し、1時間インキュベートしました。
  8. 添加した混和液を除去し、専用抗生物質フリー培地1000  $\mu$ lを添加し24時間インキュベートしました。
  9. FACSにて解析しました。
- (他社品は蛍光タンパク質発現プラスミド1-2 $\mu$ gを使用し、各キット推奨の条件でトランスフェクションを行いました)

ヒト皮膚線維芽細胞

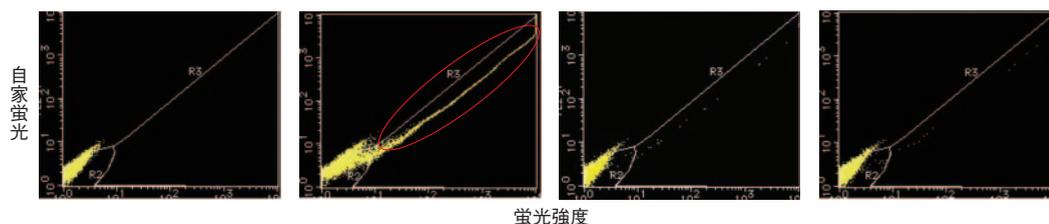
Cytofect線維芽細胞トランスフェクションキットでは21%の細胞で蛍光タンパク質の発現が観察されました。A社低毒性タイプトランスフェクション試薬では0.2%、B社低毒性タイプトランスフェクション試薬では発現は観察されませんでした。

ヒト臍帯静脈内皮細胞

Cytofect内皮細胞トランスフェクションキットでは21%の細胞で蛍光タンパク質の発現が観察されました。C社低毒性タイプトランスフェクション試薬では0.4%、D社低毒性タイプトランスフェクション試薬では発現は観察されませんでした。またC社品では生細胞率の低下が観察されました。

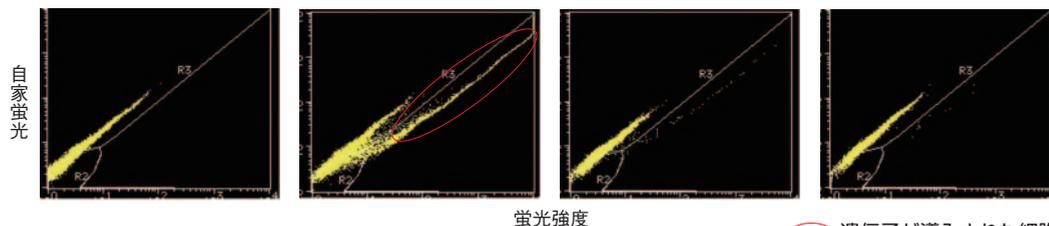
■ヒト皮膚線維芽細胞

	トランスフェクションなし	Cytofect 線維芽細胞 トランスフェクションキット	A社 低毒性タイプ トランスフェクション試薬	B社 低毒性タイプ トランスフェクション試薬
導入率	0%	21%	0.2%	0%
生細胞率	89%	86%	91%	93%



■ヒト臍帯静脈内皮細胞

	トランスフェクションなし	Cytofect 内皮細胞 トランスフェクションキット	C社 低毒性タイプ トランスフェクション試薬	D社 低毒性タイプ トランスフェクション試薬
導入率	0%	21%	0.4%	0%
生細胞率	68%	71%	47%	63%



○ 遺伝子が導入された細胞群

(保存・輸送温度:4°C)

品名	キット内容	包装	Code No.	価格	キャンペーン価格
Cytofect 内皮細胞トランスフェクションキット	・トランスフェクション試薬 ・ペプチドエンハンサー* ・トランスフェクション培地 ・抗生物質フリー培地	250回用 (24穴プレートスケール)	CATF101K	¥100,000	¥60,000
Cytofect 線維芽細胞トランスフェクションキット			CATF103K	¥92,000	¥55,200
Cytofect セルライントランスフェクションキット			CATF104K	¥55,000	¥33,000
Cytofect HUVECトランスフェクションキット**			CATF200K	¥68,000	¥40,800

\*セルライントランスフェクションキットにはペプチドエンハンサーは含まれません。

\*\*添加するDNA量が内皮細胞トランスフェクションキットの3倍に設定されています。HUVEC専用のお得なキットです。

上記トランスフェクションキットをご購入のお客様に、Cell Applications, INC.のヒト表皮角化細胞、ヒト表皮メラニン細胞、ヒト皮膚線維芽細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞(各細胞単品およびTotal Kit)を20%OFFでご提供します。対象の細胞リストおよびお申し込み方法は、p8をご覧ください。

【期間:2011年6月13日~2011年9月30日ご注文分】 ※トランスフェクションキットとの同時購入の場合に限ります。

# HOT ITEM

## 高効率・高成功率PCR酵素 KOD FX Neo

難配列・Long PCR・  
クールドサンプルにお勧め

### 伸長性・クールドサンプルからの増幅性能が格段にアップしました。

KOD DNA polymerase\*は、優れた伸長性を有し、クールド成分の阻害に強いといった特長を持っております。KOD FXは、この特性を利用して開発された高成功率PCR酵素であり、難配列やクールドサンプルからの増幅などにご好評いただいております。

しかし、KOD FXをはじめ従来のPCR酵素は20~30サイクル以降、増幅が持続しなくなる〈プラトー現象〉が生じ、PCR機能が完全には発揮できていませんでした。「KOD FX Neo」は、KOD FXの技術に、弊社で新たに開発した「伸長エンハンサー」などの技術を応用することで、〈プラトー現象〉を抑え、長いターゲットや難配列ターゲット、クールドサンプルなどからの増幅効率をさらに向上させることに成功しました。

\* M. Takagi et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **63** : 4504-4510 (1997)

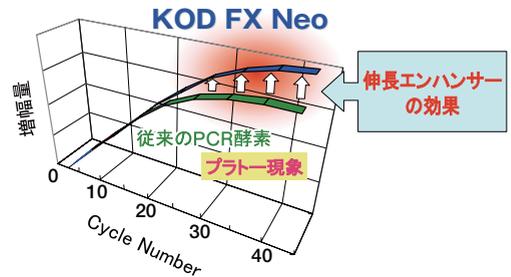


図1. 伸長エンハンサーの効果

### 特長1 ▶ 優れたPCR性能

- ・ゲノムDNAを鋳型として最大40kbの増幅が可能。
  - ・30sec./kbの高速サイクルを実現。(クールドサンプルでは1min./kbをお薦めしております)
  - ・高GCターゲットなどの難配列の増幅に最適。
- ※正確性はTaq DNA Polymeraseの約1.1倍

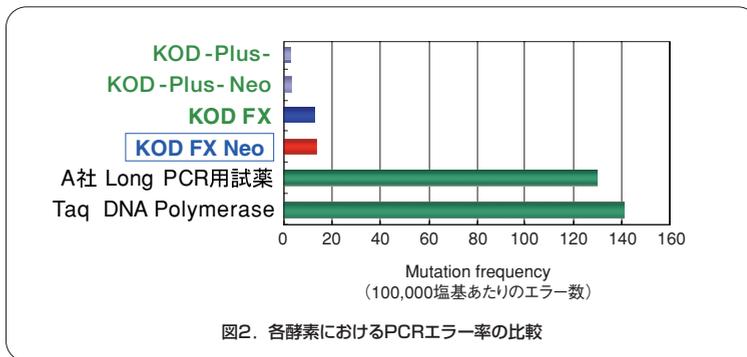


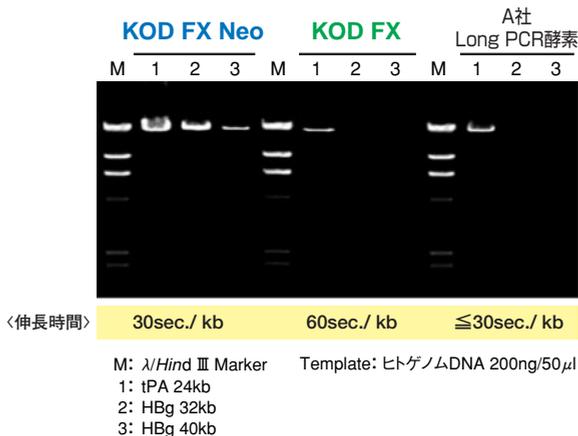
図2. 各酵素におけるPCRエラー率の比較

### 実施例1 ▶ 増幅長の比較

KOD FX Neo及び従来品を用いて、ヒトゲノムDNAを鋳型に長鎖ターゲットの増幅を行いました。

その結果、KOD FX Neoを用いた場合のみ、今まで増幅が困難であった40kbの増幅を確認することができました。また、KOD FX Neoでは従来品に比べ、伸長時間を半分(30sec./kb)で行うことが可能です\*。そのため、反応時間を大幅に短縮することができました。

\*クールドサンプルでは1min/kbで実施することをお薦めしております。



#### 【サイクル条件】

#### KOD FX Neo

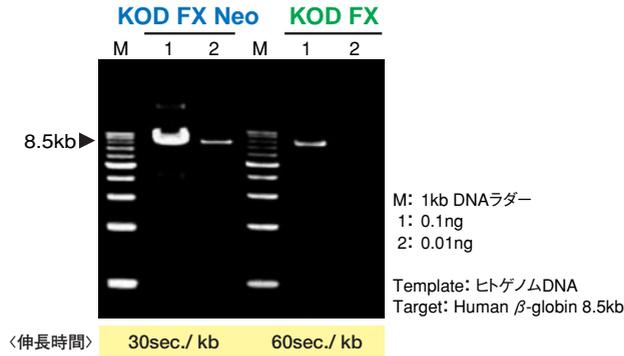
- 94°C, 2min.
- 98°C, 10sec. ← 5 cycles
- 74°C, 30sec./kb
- 98°C, 10sec. ← 5 cycles
- 72°C, 30sec./kb
- 98°C, 10sec. ← 5 cycles
- 70°C, 30sec./kb
- 98°C, 10sec. ← 5 cycles
- 68°C, 30sec./kb ← 20 cycles
- 68°C, 7min.
- 4°C, Hold

#### KOD FX

- 94°C, 2min.
- 98°C, 10sec. ← 5 cycles
- 74°C, 60sec./kb
- 98°C, 10sec. ← 5 cycles
- 72°C, 60sec./kb
- 98°C, 10sec. ← 5 cycles
- 70°C, 60sec./kb
- 98°C, 10sec. ← 5 cycles
- 68°C, 60sec./kb ← 20 cycles
- 68°C, 7min.
- 4°C, Hold

## 実施例2 検出感度の比較

ヒトゲノムDNAを鋳型として検出感度の比較を行いました。その結果、KOD FX Neoは、従来品に比べ約一桁感度の向上を認めました。



【サイクル条件】  
**KOD FX Neo**  
 94℃, 2min.  
 98℃, 10sec. ← 40 cycles  
 68℃, 4.5min.  
 4℃, Hold  
**KOD FX**  
 94℃, 2min.  
 98℃, 10sec. ← 40 cycles  
 68℃, 9min.  
 4℃, Hold

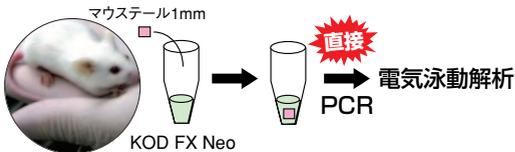
## 特長2 クルードサンプルからの増幅性能アップ

- ・グラム陽性菌や酵母・カビなどの微生物、髪の毛・爪などの動物組織、哺乳類培養細胞や血液などからの直接PCRが可能です。
- ・従来品よりもPCR阻害物質に強く、土壌や食品などのよりクルードなサンプルからの増幅が可能です。
- ・植物ライセートやマウステールなどからの増幅効率が向上。

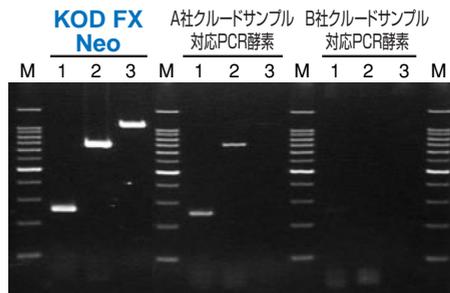
## 実施例3 マウステールの直接PCR

マウステールを直接PCR反応液に添加し、様々なPCR酵素で増幅を比較しました。その結果、KOD FX Neoを用いた場合のみ増幅を確認することができました。

このように、KOD FX Neoではサンプルを直接PCRに持ち込むことが可能であり、煩雑な精製を省略することが可能です。



\*マウステールなど動物組織を直接増幅した場合、PCR産がアガロースゲル電気泳動のウェルに残ることがあります。泳動する際は、PCR産物50μlに対し、20mg/ml Proteinase K 10μlを添加してから泳動することをお薦めします。

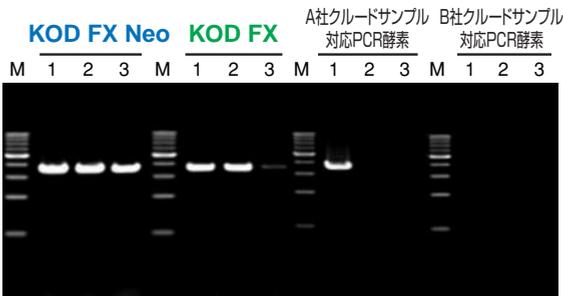


【サイクル条件】  
 94℃, 2min.  
 98℃, 10sec. ← 30 cycles  
 68℃, 1min./kb  
 4℃, Hold

## 実施例4 フミン酸添加実験

フミン酸 (humic acid) とは、腐植土や土壌などに存在する赤褐色または黒褐色の有機物であり、PCRを阻害することが知られています。通常行われるDNAの精製ではこのフミン酸は除くことはできません。そのため、環境・生態系サンプルを鋳型としたPCRはとても難しいとされています。ここでは、例としてヒトゲノムDNAにフミン酸を混合し、PCRの阻害に関する評価を行いました。その結果、KOD FX Neoが最もフミン酸の阻害に強い傾向を示しました。KOD FX Neoを用いれば環境・生態系のサンプルからでもPCRが可能であると考えられます。

(関連記事がp5にございます)



【サイクル条件】  
 94℃, 2min.  
 98℃, 10sec. ← 30 cycles  
 68℃, 4min.  
 4℃, Hold

\*フミン酸: OD280=1の溶液を使用

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
高効率・高成功率PCR酵素 <b>KOD FX Neo</b> KOD FX Neo (1.0U/μl) 2×PCR Buffer for KOD FX Neo 2mM dNTP	200U×1本 [200回用]*	-20℃	KFX-201	¥35,000
	(200U×1本)×5 [1,000回用]*	-20℃	KFX-201X5	¥140,000
	(200U×1本)×10 [2,000回用]*	-20℃	KFX-201X10	¥260,000

\*50μl反応を行ったときの反応回数で表示しています。

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
高効率TAクローニングキット (KOD用) <b>TArget Clone™ -Plus-</b>	10回用	-20℃	TAK-201	¥16,000

KOD FX Neoによって増幅されたDNAの末端は平滑化されていますので、末端を制限酵素処理するか、平滑末端クローニングの手法を用いてクローニングを行う必要があります。また専用のTAクローニングキット「TArget Clone™ -Plus- (Code No. TAK-201)」を用いることで増幅産物に直接Aを付加し、そのまま容易にTAクローニングを行うことができます。

## 高効率・高成功率PCR酵素『KOD FX Neo』を用いた 環境・生態系サンプルからの簡便な検出法

県立広島大学 生命環境学部 有馬 寿英 先生・西村 和之 先生  
東洋紡績(株) 敦賀バイオ研究所 小林 哲大・歌島 悠

### はじめに

環境微生物学、そしてその産業利用に向けては、環境・生態系サンプルは様々な側面において重要であるとともに、その研究対象の一つであります。そこに生息する微生物の生態・機能などに関する科学的知見の蓄積は、環境微生物学を支える個別技術素材を提供するためには必要不可欠です。しかし、その重要性及び可能性は認識されながら、その全体像を知ることは非常に困難であります。

従来の微生物検出・同定は、希釈平板法などによりそのコロニーに関する形状・色、そして資化性などの特徴を観察することにより行われてきました。しかしながら、従来法ではその結果が得られるまでには数日～数週間を要する上、難培養性微生物のその検出は極めて困難であると言われていました。近年、PCR法を利用することによって、微生物における特定DNA領域を増幅、そしてそのサイズや塩基配列情報などにより検出・同定が可能になるとともに、新規性の高い遺伝子群(酵素遺伝子など)を含む未開拓遺伝子資源としての利活用を行うことも期待されています。

そこで今回は、『KOD FX Neo』と簡便な前処理を組み合わせることによって、環境・生態系サンプルからDNAを精製することなく、そのPCR増幅を行うことを試みました。以下にその方法、及び結果をご紹介します。

### 方 法

#### 1. 前処理

環境・生態系サンプルは、本学部のある庄原キャンパス周辺の雑木林から腐朽材と腐葉土を採取し、その一部をサンプルとしました。そして、図1に示すアルカリ溶解法にてそのライセートを調製しました。なお、本溶解法ではサンプルは完全に溶解しませんので、ご注意ください(完全に溶解させる必要はありません)。また、必要に応じて、滅菌水による希釈を行いました。

#### 2. PCR反応

PCR反応は、(1)で調製したライセート1  $\mu$ lを直接PCR反応液に添加し、以下の条件にて実施しました。

##### ①反応液組成

PCR grade water	10 $\mu$ l
2x PCR buffer for KOD FX Neo	25 $\mu$ l
2mM dNTPs	10 $\mu$ l
10pmol / $\mu$ l Primer #1	1.5 $\mu$ l
10pmol / $\mu$ l Primer #2	1.5 $\mu$ l
前処理ライセート	1 $\mu$ l
KOD FX Neo (1.0U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Total reaction volume	50 $\mu$ l

Target 1: 16S ribosomal RNA (bacteria)

Primer #1: GTTTGATCCTGGCTCA

Primer #2: TACCAGGGTATCTAATCC

Target 2: ITS (fungi)

Primer #1: GTAACAAGGTYTCCGT

Primer #2: CGTTCCTCATCGATG

Target 3: tRNA-Leu (plant)

Primer #1: CGGACGAGAATAAAGATAGAGT

Primer #2: TTTTGGGGATAGAGGGACTTGA

#### 環境・生態系サンプル 100mg

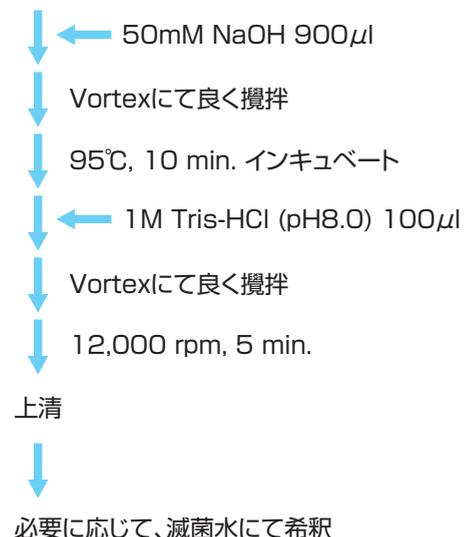
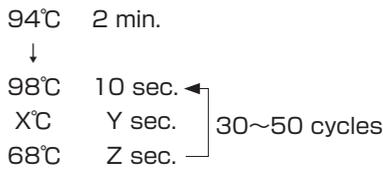


図1. ライセート調製方法  
(アルカリ溶解法)

②PCRサイクル



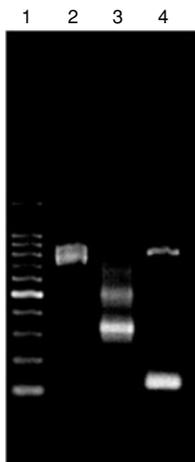
Target 1: X; 55°C, Y; 30 sec., Z; 60 sec., 30 cycle  
Target 2: X; 50°C, Y; 5 sec., Z; 10 sec., 50 cycle  
Target 3: X; 60°C, Y; 10 sec., Z; 10 sec., 50 cycle

図2. PCRサイクル

結果及び考察

PCR産物は、1.5%アガロースゲルに5µlアプライして解析を行いました。その結果、何れのサンプル・プライマーを用いた場合でも、明瞭なその増幅を確認することができました(図3、4)。さらに、Target 2 (ITS (fungi)) においては、そのPCR産物をクローニング、そしてシーケンス解析などを行った結果、使用したサンプルには木材腐朽菌である*Perenniporia subacida* (腐朽材)、森林環境下において生息することが知られている*Russula*属 (腐葉土) などとともに、data baseに登録されていない塩基配列が幾つか確認できたため、未同定株が存在している可能性があることも明らかになりました(図3、4)。これらの結果より、それぞれの環境下において適応可能な微生物が生息し、その異なる微生物叢を構成していることが示唆されます。特に、未同定株のその存在は、未開拓遺伝子資源を利活用するためのその候補の一つになると考えられます。

今回、KOD FX Neoを用いることにより、DNA抽出過程におけるそのバイアスをより少なくした簡便な前処理によって得られるDNAを鋳型としてPCR法による増幅が可能でした。そして、KOD FX NeoはTaq DNA polymeraseの約11倍の正確性を有していることから、PCRエラーによる誤判定の減少が期待され、今回のような塩基配列解析を基本とした環境・生態系サンプルにおける微生物の分類・同定などには適していると思われる。このことは、環境微生物学とその関連研究分野などでの遺伝子レベルの研究において、その適応が可能であると考えられます。



1: 100bp DNA ladder  
2: Target 1 (bacteria)  
3: Target 2 (fungi)  
4: Target 3 (plant)

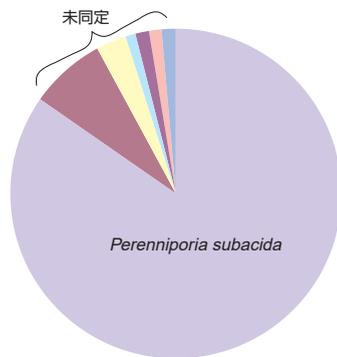
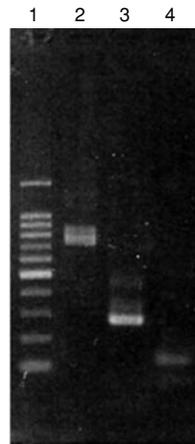


図3. 泳動結果と微生物叢 (腐朽材)



1: 100bp DNA ladder  
2: Target 1 (bacteria)  
3: Target 2 (fungi)  
4: Target 3 (plant)

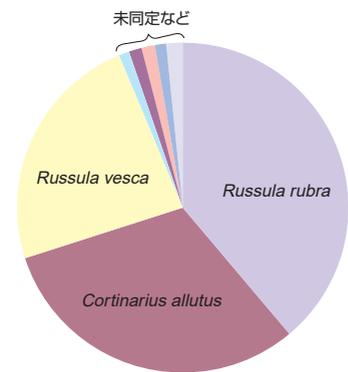


図4. 泳動結果と微生物叢 (腐葉土)

まとめ

DNA抽出に関する従来法は時間と労力などを必要とし、さらには有害なタンパク質変性剤を用いる機会があるため、多数のサンプルを処理することは困難と危険を伴う上、実験廃液処理に関するコストも必要となります。一方、図1に示した前処理は、特別な機器類や有害試薬を使用することなく、環境・生態系サンプルからPCR法において使用可能なゲノムDNAを簡便・迅速に抽出できる手法であり、KOD FX Neoと組み合わせることによって、クルードサンプルからの遺伝子増幅を実現することができます。

➔ KOD FX Neoに関する商品情報は、本誌p3をご覧ください。



高効率・高成功率PCR酵素

高正確性・高効率・高速PCR酵素

# KOD FX Neo & KOD -Plus- Neo

## ＜ KOD FXシリーズとKOD -Plus-シリーズの違いについて ＞

**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** 両シリーズともにKOD DNA polymeraseをベースとしていますが、KOD -Plus-シリーズは高い正確性を、KOD FXシリーズは難配列やクールドサンプルからの増幅効率を重視して開発されました。

表 KODシリーズの特性と用途

		正確性	伸長性 (ロング性能)	増幅効率 (収量)	増幅成功率	GCリッチ サンプル	増幅末端	伸長時間 (/kb)	ホット スタート
PCRがうまくいかに 困っている。 (幅広いPCRで力を発揮)	KOD FX Neo	★★★ (Taqの約11倍)	★★★★★	★★★★★	★★★★★	★★★★★	平滑末端	30sec. (1min.)	○
	KOD FX	★★★ (Taqの約11倍)	★★★★	★★★★★	★★★★★	★★★★★	平滑末端	1min.	○
高正確性 PCRをしたい	KOD -Plus- Neo	★★★★★ (Taqの約80倍)	★★★★	★★★★	★★★★	★★★	平滑末端	30sec.	○
	KOD -Plus- Ver.2	★★★★★ (Taqの約80倍)	★★★	★★★	★★★	★★★	平滑末端	1min.	○
	KOD -Plus-	★★★★★ (Taqの約80倍)	★★★	★★★	★★	★★★	平滑末端	1min.	○
	KOD DNA Polymerase	★★★★ (Taqの約50倍)	★★	★★	★	★★★	平滑末端	30sec.	—

## ＜ KOD FX Neoについて ＞

**Q 2** KOD FXとの違いは何ですか？

**A 2** 伸長エンハンサー技術の応用により、増幅効率・伸長性が改善されており。また、伸長反応の時間もクールドサンプルではない場合は、1 min./kbから 30sec./kbに短縮されており。

**Q 3** 増幅できるターゲット長についての情報を教えてください。

**A 3** ヒトゲノムDNAを鋳型に40kbの増幅を確認しています。

**Q 4** 長鎖ターゲットを増幅する際のコツはありますか？

**A 4** >10kbのターゲットの増幅には、長め(27mer以上)にプライマーを設計し、アニーリング(及び伸長反応)を比較的高い温度に設定します。特に、ステップダウンサイクル\*での増幅が有効です。また、精製度の低いプライマーではなく、カートリッジ精製、もしくはHPLC精製グレードのプライマーのご使用をお薦めします。

## ＜ KOD -Plus- Neoについて ＞

**Q 5** KOD -Plus- / KOD -Plus- Ver.2との違いは何ですか？

**A 5** 伸長エンハンサー技術の応用により、増幅効率・伸長性が改善されており。また、伸長反応の時間も1 min./kb から 30 sec./kb に短縮されており。

**Q 6** 増幅できるターゲット長についての情報を教えてください。

**A 6** Genomic DNA ; ~24kb (KOD -Plus- / KOD -Plus- Ver.2では12kb) 程度までの実績があります。

## ＜ KOD FX Neo & KOD -Plus- Neoについて ＞

**Q 7** プライマーのTm値の計算はどのように行えば良いですか？

**A 7** 最近接塩基対法によるプライマーのTm値計算表(EXCEL)は、こちらからダウンロードいただけます。  
<http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/lifescience/products/product/jisshirei/archives/2009/10/tm.html>

**Q 8** PCR産物のTAクローニングは可能ですか？

**A 8** 専用TAクローニングキット「TARget Clone™ -Plus-」をお薦めいたします。このキットを用いると精製なしでKOD -Plus- NeoのPCR産物を高効率でTAクローニングすることができます。

**Q 9** 増幅産物をそのまま制限酵素で処理して、クローニングできますか？

**A 9** 増幅産物をクローニングに用いる場合は、制限酵素処理前に増幅産物の精製を行ってください。DNA Polymeraseが残存している場合、本酵素の持つ3' → 5' Exonuclease活性により制限酵素処理中に突出末端が削られる可能性があります。

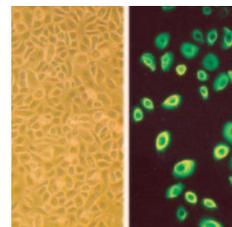
**Q 10** 増幅産物の精製はどういった方法で行えば良いですか？

**A 10** フェノール/クロロホルム処理を行った後、エタノール沈殿を行うか、弊社の磁性ビーズを利用したDNA精製キット「MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-(Code No. NPK-601)」を利用すると便利です。

※他のQ&Aにつきましては、ウェブサイト[\[http://www.toyobo.jp/bio\]](http://www.toyobo.jp/bio)の製品FAQのコーナーをご覧ください。

## Cell Applications, INC. ヒト皮膚細胞、HUVEC価格改定のお知らせ

Cell Applications, INC.はヒトをはじめとする様々な動物の初代細胞を中心に幅広くお取り扱いしております。この度、日頃のご愛顧に感謝し、下記のヒト皮膚由来細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) について、価格を改定しお求め安くなりました。



対象商品：下記リストの製品

品名	Code No.	従来価格	新価格
ヒト表皮角化細胞； adult	CA10205a	¥70,000	¥52,000
ヒト表皮角化細胞； fetal	CA10205f	¥88,000	¥68,000
ヒト表皮角化細胞； neonatal	CA10205n	¥72,000	¥55,000
ヒト表皮角化細胞Total Kit； adult	CA102K05a	¥98,000	¥77,000
ヒト表皮角化細胞Total Kit； fetal	CA102K05f	¥120,000	¥95,000
ヒト表皮角化細胞Total Kit； neonatal	CA102K05n	¥104,000	¥79,000
ヒト表皮メラニン細胞； adult	CA10405a	¥115,000	¥79,000
ヒト表皮メラニン細胞； neonatal	CA10405n	¥87,000	¥64,000
ヒト表皮メラニン細胞； neonatal, black donor	CA104B05n	¥94,000	¥68,000
ヒト表皮メラニン細胞Total Kit； neonatal, black donor	CA104BK05n	¥129,000	¥96,000
ヒト表皮メラニン細胞Total Kit； adult	CA104K05a	¥145,000	¥105,000
ヒト表皮メラニン細胞Total Kit； neonatal	CA104K05n	¥122,000	¥92,000
ヒト皮膚線維芽細胞； adult	CA10605a	¥47,000	¥35,000
ヒト皮膚線維芽細胞； fetal	CA10605f	¥85,000	¥60,000
ヒト皮膚線維芽細胞； neonatal	CA10605n	¥67,000	¥52,000
ヒト皮膚線維芽細胞Total Kit； adult	CA106K05a	¥77,000	¥63,000
ヒト皮膚線維芽細胞Total Kit； fetal	CA106K05f	¥113,000	¥88,000
ヒト皮膚線維芽細胞Total Kit； neonatal	CA106K05n	¥96,000	¥80,000
ヒト臍帯静脈内皮細胞； neonatal	CA20005n	¥50,000	¥36,000
ヒト臍帯静脈内皮細胞Total Kit； neonatal	CA200K05n	¥81,000	¥63,000
ヒト臍帯静脈内皮細胞； neonatal, pooled	CA200p05n	¥49,000	¥33,000
ヒト臍帯静脈内皮細胞Total Kit； neonatal, pooled	CA200pK05n	¥80,000	¥60,000

※Total Kit には以下のものが含まれます。

- ・凍結細胞 (5×10<sup>5</sup>cells) 1 vial (保存:液体窒素)
- ・専用培地 500ml (保存:4℃、-20℃)
- ・サブカルチャー試薬セット 1 set (保存:-20℃)
  - ハンクス平衡緩衝塩溶液 100ml
  - トリプシン-EDTA溶液 100ml
  - トリプシン中和液 100ml

新発売のトランスフェクションキット (p1・2) と上記リストの細胞を同時にご購入いただいた場合、新価格がさらに20%OFFになるキャンペーンを行っております。特典ご利用クーポンを弊社ウェブサイトよりダウンロードし、必要事項をご記入の上、ご注文時に代理店様へお渡しください。

**Cytofectシリーズ 発売記念キャンペーン**  
【期間:2011年6月13日~2011年9月30日まで注文分】

弊社ウェブサイト  
([www.toyobo.co.jp/bio](http://www.toyobo.co.jp/bio))

キャンペーン  
コーナー

- ・各細胞のロットごとのドナー情報をメールにてお届けしております。ご希望の方は弊社ウェブサイトからお申し込みください。  
([https://secure.toyobo.co.jp/bio01/html/cai/cai\\_form.html](https://secure.toyobo.co.jp/bio01/html/cai/cai_form.html))
- ・ロット指定のお取り置きも承っております。詳細は弊社ライフサイエンス事業部までお問い合わせください。
- ・バルクサイズのご希望がございましたら、お気軽にご相談ください。

# HOT ITEM

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効率が飛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、抗体を用いるホットスタート機能や、ガラス壁への吸着防止に加え、ROXの濃度を調整できることから、幅広い機器で同様に用いることができます。



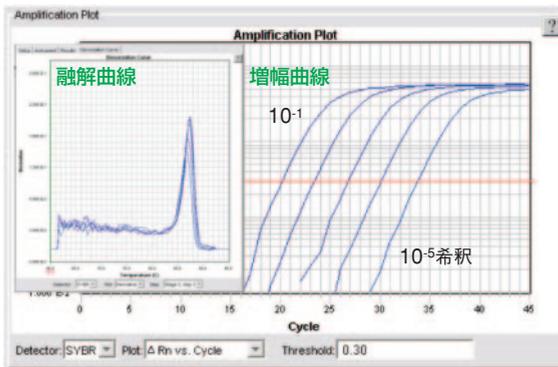
### 特長1 高い特異性(プライマーダイマーの低減)

- ・バッファーに改良を加えることにより、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、定量性が向上しました。

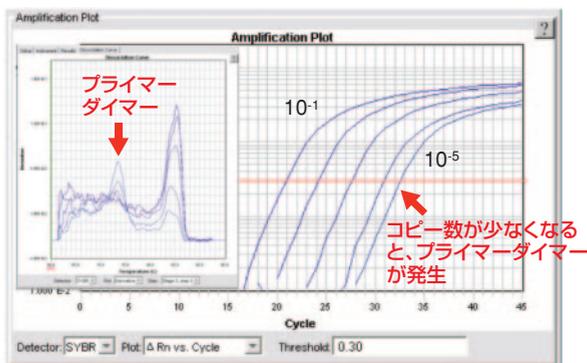
【対応機器一覧】

Applied Biosystems	ABI PRISM 7000
	ABI PRISM 7700
	Applied Biosystems 7300
	Applied Biosystems 7500
	Applied Biosystems 7500 Fast
	Applied Biosystems 7900HT
Roche Diagnostics	Applied Biosystems Step One™
	Applied Biosystems Step One Plus™
Roche Diagnostics	LightCycler 1.x
	LightCycler 2.0
Bio-Rad/MJ	LightCycler 480
Stratagene	iCycler iQ
	Mx3000P
TaKaRa	Mx3005P
	Mx4000
TaKaRa	Thermal Cycler Dice
BioFlux	Line Gene

#### THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix



#### A社試薬



#### B社試薬

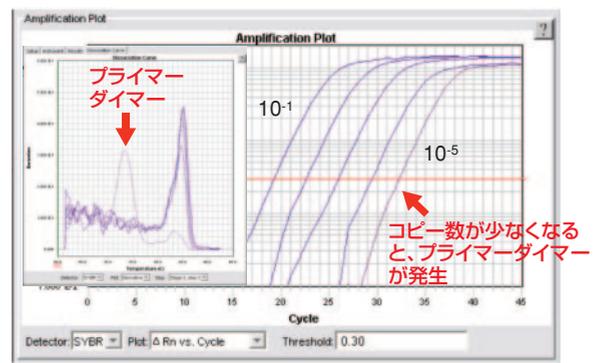


図1. SYBR® Green I 検出系による反応特異性の比較(Applied Biosystems 7900HT使用)  
プライマーダイマーが発生しやすいプライマーセットを用いて、各リアルタイムPCR試薬による反応特異性の比較を行いました。HeLa細胞Total RNAから合成したcDNAを用いてヒトβ-Actin 遺伝子(188bp)を増幅しました。

**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、広いダイナミックレンジを実現しました。\*特許出願中  
また、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。

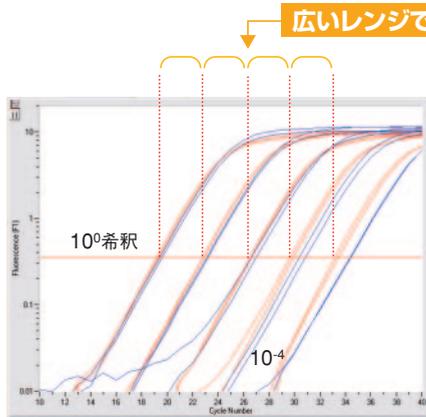


図2. SYBR® Green I 検出系によるノロウイルスGI cDNA の検出 (縮合プライマー使用)  
(Roche Diagnostics LightCycler® 1.1使用)

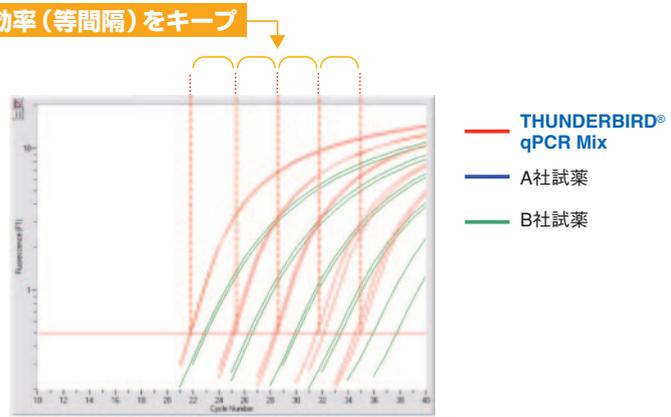


図3. TaqMan® 検出系によるGAPDH cDNAの定量  
(Roche Diagnostics LightCycler® 1.1使用)

- ・微妙なコピー数の差を、精度よく検出することができます。

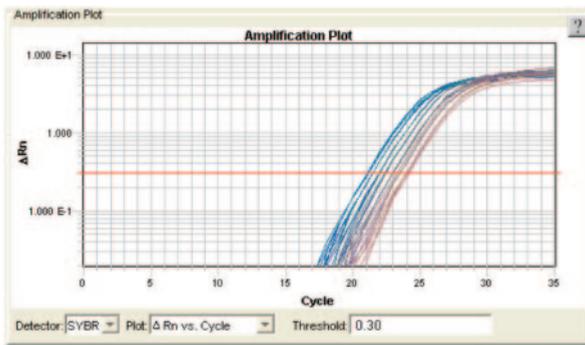
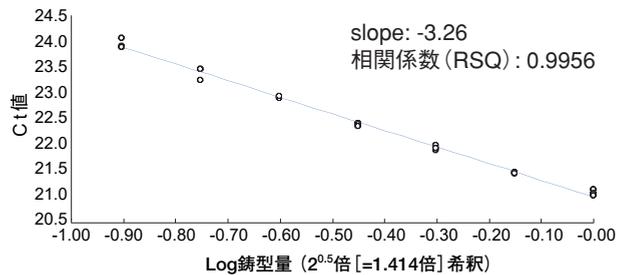


図4. SYBR® Green I 検出によるcDNA 2<sup>0.5</sup>倍希釈系列の検出 (Applied Biosystems 7900HT使用)  
・サンプル: HeLa細胞Total RNA由来cDNAの2<sup>0.5</sup> (=1.414) 倍希釈系列 (7水準、N=4)  
・ターゲット遺伝子: GAPDH  
・反応液量: 20μl



- ・PCR効率を改善しており、多くの場合、従来の製品より比較Ct法 (ΔΔCt法) 等に用いやすくなっております。

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
THUNDERBIRD® Probe qPCR/RT Set THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (200回用)と ReverTra Ace® qPCR RT Kit (200回用)とのセット	1セット	-20℃	QPS101/FSQ101	¥63,000
THUNDERBIRD® SYBR® qPCR/RT Set THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (200回用)と ReverTra Ace® qPCR RT Kit (200回用)とのセット	1セット	-20℃	QPS201/FSQ101	¥63,000

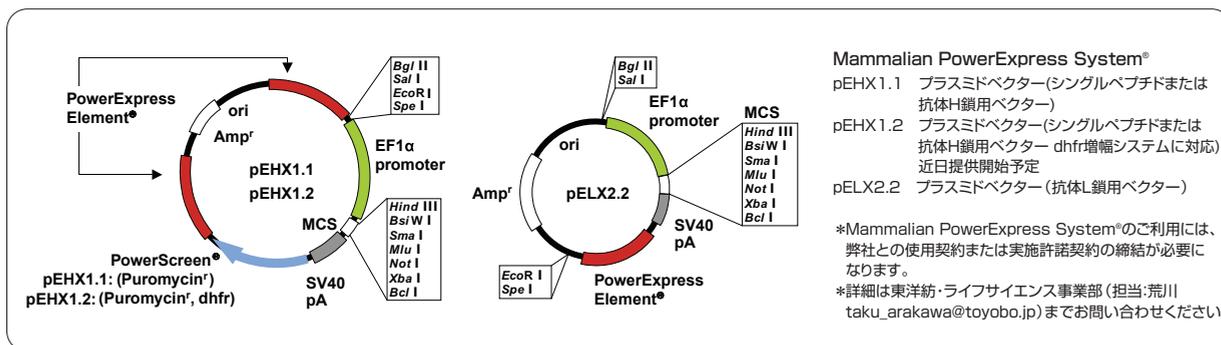
※50× ROX reference dyeがマスターミックスとは別容器で供給されます。  
 ※包装の欄に記載の反応回数は、50μl反応時のものです。容量はqPCR Mixのみ示しています。  
 ※大包装品(QPS-101X5およびQPS-201X5)は、QPS-101もしくはQPS-201の5セット組です。  
 ※TaqMan®は、Roche Molecular Systems Inc.の登録商標です。  
 ※SYBR®は、Molecular Probes Inc.の登録商標です。

哺乳類細胞タンパク質高発現システム

## Mammalian PowerExpress System®

医薬品、診断薬、検査キット用タンパク質の生産に適した高発現システムです。

Mammalian PowerExpress System®は医薬品、診断薬、検査キットなどに使用される抗体等のタンパク質の生産に適した哺乳類細胞タンパク質高発現ベクターシステムです。Mammalian PowerExpress System®では、遺伝子発現安定化のためのPowerExpress Element®と、高発現細胞株の効率的な選択のためのPowerScreen®テクノロジーにより、目的タンパク質を安定かつ高度に生産する細胞株を効率的に取得することができます。



### 特長1 遺伝子発現の安定化

・CHO(チャイニーズハムスター卵巣)細胞のゲノムより単離された遺伝子発現安定化エレメントPowerExpress Element®を発現ベクターに配置しています。PowerExpress Element®により、導入部位のゲノム環境により目的タンパク質の発現が不活性化される現象を低減し、導入された遺伝子の発現を安定化しています。

図1はPowerExpress Element®を含む抗体発現ベクターを導入して取得した2つのクローンの継代安定性を調べた結果です。各クローンの1継代と20継代の発現量比を縦軸にとりました。抗生物質を添加して選択圧をかけた場合(Puromycin(+))、抗生物質を添加せずに選択圧をかけなかった場合(Puromycin(-))、いずれの場合も1継代と20継代の発現量の比は100%前後となり、20継代後でも発現量が低下していないことがわかります。

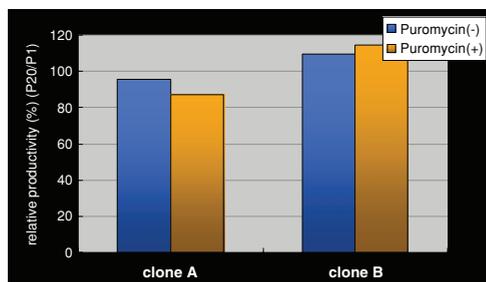


図1. PowerExpress Element®を含む抗体発現ベクターで取得した2クローンの継代安定性評価

### 特長2 高発現クローン選択の効率化

・弱化した薬剤選択マーカを使用し、目的タンパク質高発現株の取得効率を高めています(PowerScreen®テクノロジー)。PowerScreen®テクノロジーにより薬剤選択培養後に生じるコロニーの数は約10分の1に減少し、生じたコロニーの多くが目的タンパク質を高度に発現しています。

### 特長3 dhfr遺伝子を用いた遺伝子増幅に対応

・pEHX1.2プラスミドベクターはdhfr遺伝子をコードしており、MTX(メトレキセート)による遺伝子増幅が可能です。(本ベクターは近日提供開始予定です)

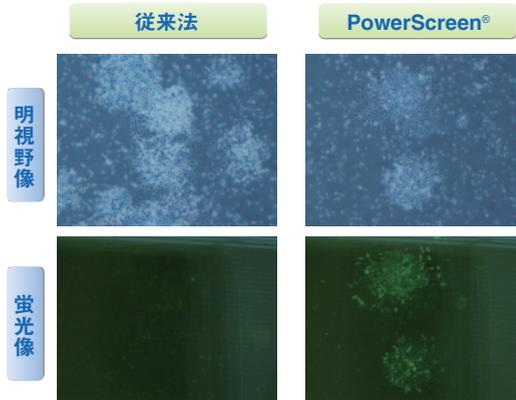


図2. PowerScreen®を含む蛍光タンパク質発現ベクターを遺伝子導入、薬剤選択培養後の細胞写真

### 特長4 ラボスケールから工業化スケールでの製造まで多様な用途

・抗体医薬などのバイオ医薬品の治験薬製造、市販品製造用としてはもちろんのこと、開発候補品選択のための多種類サンプル生産用としても有効です。

### 実施例1 抗体発現ベクターの構築

- ・ pEHX1.1のマルチクローニングサイトに抗体重鎖遺伝子を挿入しpEHCを得ました。
- ・ また、pELX2.2のマルチクローニングサイトに抗体軽鎖遺伝子を挿入しpELC2を得ました。
- ・ pEHCの*Bgl*II-*Eco*RI間にpELC2の*Bgl*II-*Eco*RI断片を挿入し、抗体発現ベクターpELC+HCを得ました。

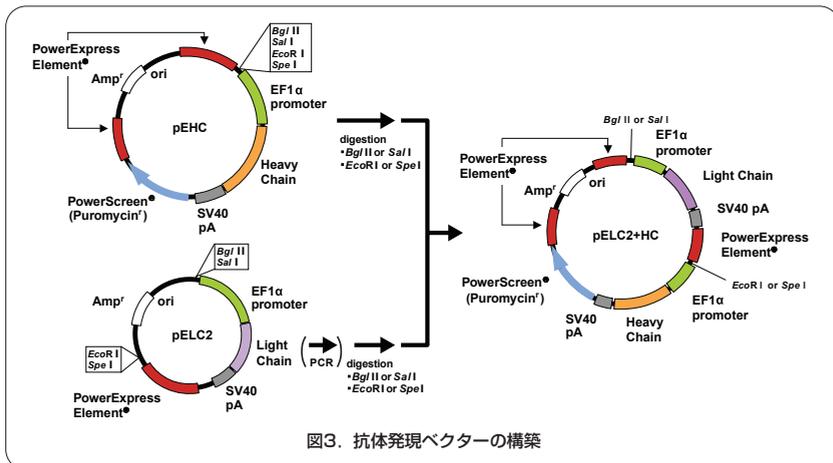


図3. 抗体発現ベクターの構築

### 実施例2 抗体発現における従来ベクターとMammalian PowerExpress System®との比較(クローンプール状態での比較)

抗体の重鎖、軽鎖遺伝子を、

1. 従来ベクター
2. PowerExpress Element®ベクター (PowerScreen®テクノロジーは使用していません)
3. Mammalian PowerExpress System®ベクターへ、それぞれ挿入し、CHO-K1細胞へ遺伝子導入、薬剤選択培養後、選択された細胞のクローン化を行う前のプール状態で、抗体の生産性を評価しました。Mammalian PowerExpress System®ベクターでは、従来ベクターに比べ5倍以上生産性が増加することを確認しました。

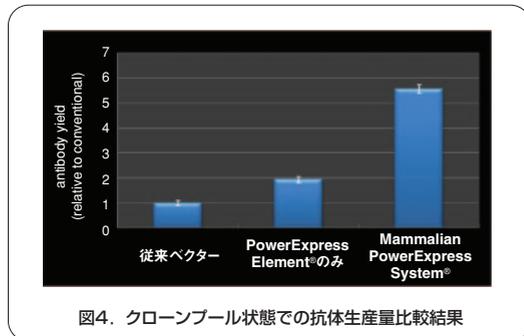


図4. クローンプール状態での抗体生産量比較結果

### 実施例3 抗体発現における従来ベクターとMammalian PowerExpress System®との比較(モノクローン化した状態での比較)

実施例2の、1.従来ベクター、3.Mammalian PowerExpress System®ベクターを用いて取得した薬剤選択培養後の細胞集団を限界希釈して、96ウェルプレート2枚に播種しました。2週間後、それぞれのクローンの抗体生産量を測定し、度数分布で比較しました。Mammalian PowerExpress System®では、クローンの分布が高発現側へ顕著にシフトしていることを確認しました。

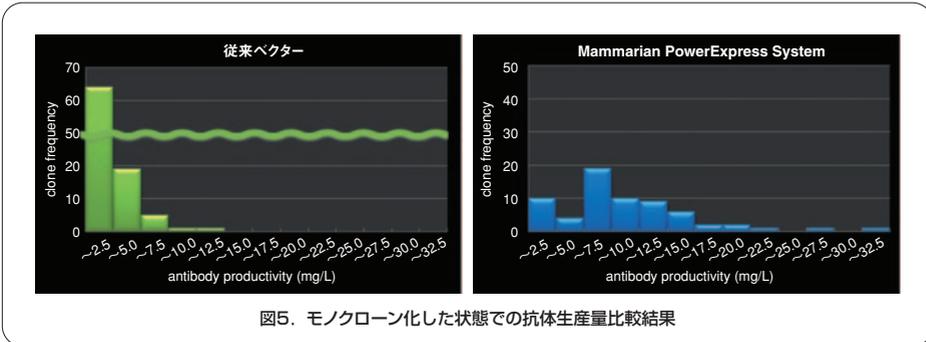


図5. モノクローン化した状態での抗体生産量比較結果

### 実施例4 dhfr遺伝子を含むMammalian PowerExpress System®でのMTXによる選択効果の検討

- ・ 抗体の重鎖遺伝子を、dhfr遺伝子を含むpEHX1.2のマルチクローニングサイトへ挿入しpEHC2.2を得ました。
- ・ 実施例1と同様に、軽鎖遺伝子を含むpELC2の*Bgl*II-*Eco*RI断片をpEHC2.2の*Bgl*II-*Eco*RIサイトに挿入し抗体発現ベクターpELC+HC2.2を得ました。
- ・ pELC+HC2.2をCHO/dhfr細胞へ遺伝子導入後、薬剤選択培養により安定発現細胞集団を取得しました。この細胞集団から取得した高発現細胞クローンを、MTXで選択培養を行った後、細胞のクローン化を行う前のプールの状態で抗体の生産性を評価しました。MTXでの選択培養により最大で3倍、平均して1.8倍の生産性の増加が可能であることを確認しました。

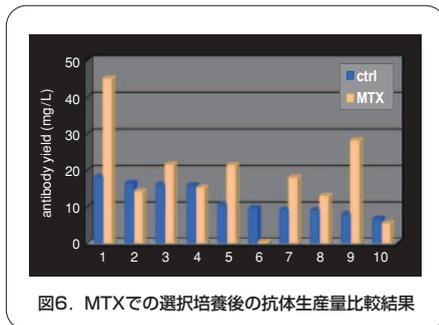


図6. MTXでの選択培養後の抗体生産量比較結果

\* Mammalian PowerExpress System®のご利用には、弊社との使用契約または実施許諾契約の締結が必要になります。  
 \* 詳細は東洋紡・テクニカルライン (tech\_osaka@toyobo.jp) までお問い合わせください。

## ● 展示会出展およびセミナーのご案内

下記の日程で、製品やキャンペーンなどのご紹介を行います。また、フードセーフティジャパンではセミナーも行います。是非ご参加ください。

### ■ フードセーフティジャパン (展示およびセミナー)

期間：2011年8月31日(水)～9月2日(金)

会場：東京ビッグサイト・東ホール

(セミナー)

#### 「腸内細菌検査の新技术法: プール・マルチPCR法による正確性の向上とコストダウン」

東洋紡績(株) ライフサイエンス事業部 荒川 琢

日時：確定しましたら弊社ウェブサイトのお知らせコーナーに掲載いたします。

### ■ 国際微生物学連合会2011会議(IUMS2011) (展示)

期間：2011年9月6日(火)～9月16日(金) [9月6日(火)～9月10日(土)のみ出展]

会場：札幌コンベンションセンター、札幌市産業振興センター

## ● 大包装品発売のご案内

ご好評をいただいております、『KOD FX Neo』および『KOD -Plus- Neo』の大包装品の販売を開始いたしました。

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
高効率・高成功率PCR酵素 <b>KOD FX Neo</b> KOD FX Neo (1.0U/μl) 2×PCR Buffer for KOD FX Neo 2mM dNTPs	200U×1本 [200回用]*	-20℃	KFX-201	¥35,000
	(200U×1本)×5 [1,000回用]*	-20℃	KFX-201X5	¥140,000
	(200U×1本)×10 [2,000回用]*	-20℃	KFX-201X10	¥260,000

NEW

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
高正確・高効率・高速PCR酵素 <b>KOD -Plus- Neo</b> KOD -Plus- Neo (1.0U/μl) 10×PCR Buffer for KOD -Plus- Neo 2mM dNTPs 25mM MgSO <sub>4</sub>	200U×1本 [200回用]*	-20℃	KOD-401	¥30,000
	(200U×1本)×5 [1,000回用]*	-20℃	KOD-401X5	¥120,000
	(200U×1本)×10 [2,000回用]*	-20℃	KOD-401X10	¥210,000

NEW

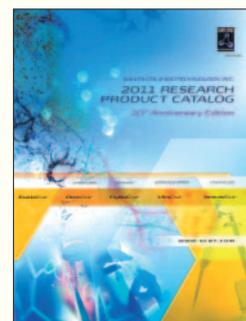
\*50μl反応を行ったときの反応回数を表示しています。

## ● 新カタログ発刊のご案内

Santa Cruz Biotechnology社2011カタログが発刊されました。

弊社ウェブサイト [お問い合わせ・ご請求](#) のコーナーより、ご請求いただけます。

是非ご活用ください。



## 実験川柳特集 13

本コーナーは、弊社ウェブサイト ([www.toyobo.co.jp/bio](http://www.toyobo.co.jp/bio)) 「読者のコーナー」で最新の作品を確認いただけます。

### 変わりゆく 実験結果と 細胞形態

匿名希望 kssxさん

【句評】細胞を扱っている研究者の共通の悩みかも知れませんね。それにしても、kssxさんの細胞が都合よく変わっていくと良いですね。

### Klenowよ 俺の生え際 削ってねえ？

匿名希望 切り捨て御免さん

【句評】毎日の実験お疲れさまです。Klenowにはポリメラーゼ活性もありますので、実験がうまくいくと生え際が回復するかも…

●切り捨て御免さんのコメント: クレノーをつかってdeletion mutantの作成していますが、なかなか上手くいかずに、ストレスで髪も薄くなってきたような…

### 会社内 自販機栄養剤 ばかりなり…

匿名希望 せつない補助員さん

【句評】ほのぼのとした川柳ありがとうございます。未曾有の大不況。栄養つけて頑張りましょう。

●せつない補助員さんのコメント: コレ飲んで働け! ってか!!

### 腹減った 培地のにおいが 芳ばしい

匿名希望 のらたいぞーさん

【句評】深夜の研究室の一コマでしょうか? この手の投稿が結構多いのですが、皆さん、培地のにおいに食欲を掻き立てられる傾向があるようですね。

●のらたいぞーさんのコメント: 腹が減ったとき、大腸菌の培地のにおいがカップラーメンのにおいに感じられて仕方ありません。

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

ご投句はこちらから

1

弊社ウェブページ  
([www.toyobo.co.jp/bio](http://www.toyobo.co.jp/bio))

2

読者のコーナー

3

ご投稿コーナー

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

採用になった方には、¥2,000の図書カードと認定証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](http://www.toyobo.co.jp/bio)) 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。
- 本ページ掲載商品の価格(弊社希望価格)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:
  - ☑印は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外毒物です。
  - ☒印は消防法に基づく劇物取締法に基づく医薬用外劇物です。
  - ☓印は消防法に基づく危険物です。
  - ☒印は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(カルタヘナ法)に基づく組換え体または昆虫細胞組換え体で生産された蛋白質です。