

リポーターアッセイ用新規ルシフェラーゼベクター

## Emerald Luc -pELucベクターシリーズ-

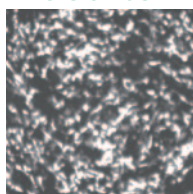
NEW

生細胞アッセイに最適なりポーターアッセイ用ルシフェラーゼベクターです。より高感度に測定できます。

**Emerald Luc** システムは新規に開発されたルシフェラーゼを用いるリポーターアッセイシステムです。本システムに採用されている **ブラジル産ヒカリコメツキムシ由来ルシフェラーゼ** は、従来のホタルルシフェラーゼに比べ、生細胞において安定で、強い発光が観察されます(図1、2)。本ベクターに転写制御配列を挿入していただくことによって、生きた細胞での発光イメージングや非破壊計測によるリポーターアッセイにご利用いただけます。

また、本ルシフェラーゼは破壊系における発光安定性も高く、細胞溶解 (*in vitro*) アッセイ用のルシフェラーゼとしても最適です。

Emerald Luc



ホタルルシフェラーゼ

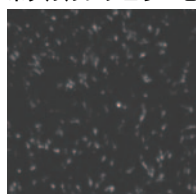


図1. 細胞の発光像  
NIH-3T3細胞にEmerald Lucおよびホタルルシフェラーゼをトランスフェクションし、セルグラフ(アトー社)で3分間露光しました

\* 産業技術総合研究所 中島芳浩先生にご提供いただきました。

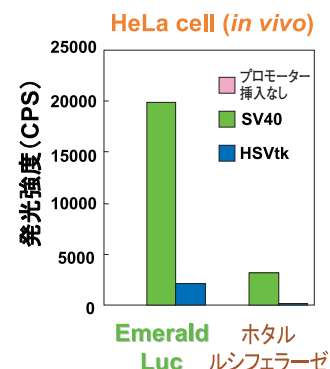


図2. 生細胞中での発光量比較  
同一発現系で2種類のプロモーターを用いて比較

### 特長1 生細胞における高い発光

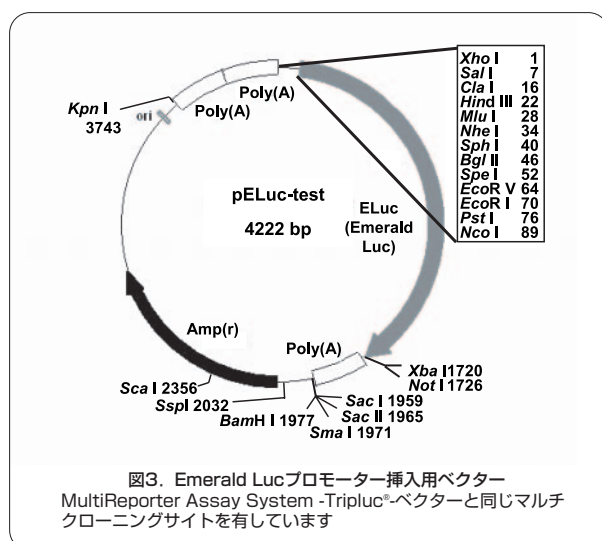
- ・ホタルルシフェラーゼと比べ、生細胞において高い発光を示します。細胞培養液にD-ルシフェリンを添加し、生細胞において発光を測定することが可能です。現在注目されている発光イメージングのプロープとして最適です。

### 特長2 動的な変動解析が可能 Emerald Luc -Short lifeタイプ-

- ・時計遺伝子のリズム解析などの動的変動解析用には、ルシフェラーゼのC末端に分解促進シグナル(PEST配列)を付加したEmerald Luc -Short lifeタイプ-を用いることができます。

### 特長3 高い発光安定性

- ・Emerald Lucはホタルルシフェラーゼと比べ、破壊系測定において高い発光安定性を示しますので、発光の減衰が少なく、HTSアッセイに最適です。 \* Emerald Luc専用破壊系 (*in vitro*) 測定試薬(リポーターアッセイ用)は近日発売予定です。



#### 一口メモ

Emerald Lucは、ブラジル産ヒカリコメツキムシ *Pyrearinus termitilluminans* 由来のルシフェラーゼ<sup>2)</sup> をもとに、哺乳類細胞で発現しやすいように遺伝子工学的に改変されたルシフェラーゼ遺伝子\*です。本酵素は、最大発光波長538nmの緑色の発光を呈します。この発光スペクトルはpHの影響をほとんど受けません。さらに、発光検出に使用される光電子増倍管(PMT)やCCDカメラではこの領域に高い量子効率を示すものが多く、ハード面からも好適なルシフェラーゼといえます。

\* 特許出願中

#### 参考文献

- 1) バイオテクノロジージャーナル, **3-4**, 230-232 (2006)
- 2) *Photochemistry and Photobiology*, **70**: 254-260 (1999)

## 実施例1 ホタルルシフェラーゼとの生細胞系における性能比較

pELuc-test、pELuc (PEST)-test、及びホタルルシフェラーゼ(fLuc)の各ルシフェラーゼ遺伝子上流にAP1応答エレメント、HSVtkプロモーターを挿入したコンストラクトを、96ウェルプレートに播種したHeLa S3細胞にトランスフェクションしました。その後、この細胞を PMAまたはEGF、及び0.2 mM ルシフェリンを含む培養液に置換して5時間インキュベートし、そのままプレートリーダーで発光を計測しました。図3上はシグナル計測値を、下は各コンストラクト毎に誘導比(無添加を1として比率を算出)をプロットしたものです。Emerald Luc (ELuc)を用いた場合、ホタルルシフェラーゼと比べ、約15倍のシグナルが認められ、誘導の検出もホタルルシフェラーゼ(fLuc)に比べて良好でした。

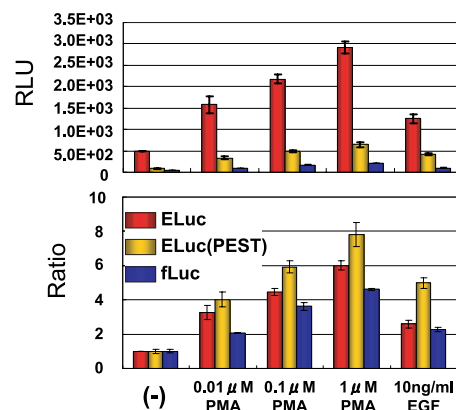


図3. 生細胞中を用いたリポーターアッセイ結果

## 実施例2 概日時計遺伝子の転写変動解析

pELuc-test、pELuc (PEST)-testのルシフェラーゼ遺伝子上流に概日変動性の報告されている*Bmal1*遺伝子プロモーターを挿入したプラスミドを、NIH-3T3細胞へトランスフェクションしました。その後、その細胞を100nMデキサメタゾンで処理し、0.2mM ルシフェリンを含む培地に置換した後、培養しながら連続発光測定装置で3日間発光を測定しました。

その結果、Emerald Luc -Short lifeタイプの方が良好なリズム変動を示すことが確認できました。これは、細胞内におけるリポータータンパク質の寿命が短縮されたことに起因していると考えられます。

\* 産業技術総合研究所 中島芳浩先生にご協力いただきました。

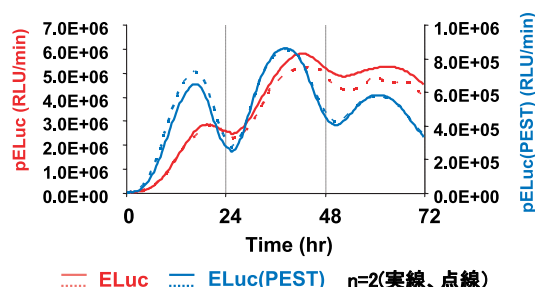


図4. 概日時計遺伝子発現の時間変動

## 実施例3 ホタルルシフェラーゼとの破壊系検出における性能比較

SV40プロモーターの下流にELuc、fLucを連結し、HeLa S3細胞にトランスフェクションし各ルシフェラーゼを強制発現させました。その後、ELuc導入細胞には専用の発光試薬(近日発売予定)を、fLuc導入細胞には他社ホタルルシフェラーゼ検出用試薬AまたはBを、培養液と等量添加しました。10分間放置した後、繰り返し発光を測定し、発光の強度・推移を調べた結果が図5です。上図に発光強度を、下図に相対活性(各測定で最初の計測値を100)を示します。結果、Emerald Luc は発光強度も高く、発光の持続時間も長いことが分かりました。

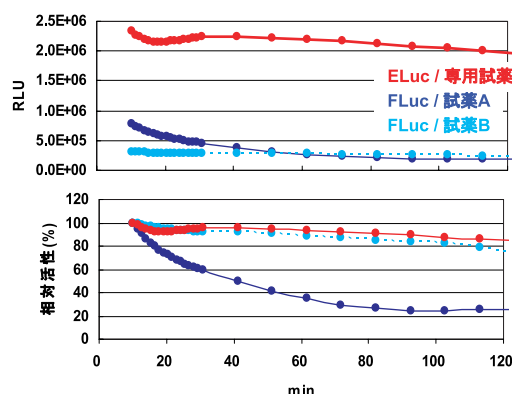


図5. 破壊系でのルシフェラーゼ安定性

| 品 名                                                                   | 包 装* | 保存温度 | Code No. | 価 格     |
|-----------------------------------------------------------------------|------|------|----------|---------|
| Emerald Lucプロモーター挿入用ベクター<br><b>pELuc-test</b>                         | 10μg | -20℃ | ELV-101  | ¥35,000 |
| Emerald Luc -Short lifeタイプ- プロモーター挿入用ベクター<br><b>pELuc (PEST)-test</b> | 10μg | -20℃ | ELV-201  | ¥35,000 |

\* 本製品を弊社の検出用試薬 (D-luciferin Code No.:MRL-101,102) を用い、研究目的で使用する場合は、ライセンス契約の手続きはございません。弊社以外の検出用試薬を用いる場合や、研究目的以外で使用する場合は、ライセンス契約が必要です。製品にライセンスポリシーが添付されていますので、開封前に必ずご確認ください。ご不明な点は弊社までお問い合わせください。

### 関連商品

| 品 名                 | 包 装*          | 保存温度 | Code No.           | 価 格                |
|---------------------|---------------|------|--------------------|--------------------|
| D-luciferin (カリウム塩) | 20mg<br>100mg | -20℃ | MRL-101<br>MRL-102 | ¥24,000<br>¥92,000 |

部位特異的変異導入キット

## KOD -Plus- Mutagenesis Kit



NEW

■2006年12月6日～2007年1月31日の期間中、30%offでご購入いただけます。

**KOD-Plus- を用いたInverse PCR法に基づく部位特異的変異導入キットです。幅広い変異導入が可能です。**

本製品は、KOD -Plus-の高い正確性を活かした、Inverse PCR法に基づく部位特異的変異導入キットです。Inverse PCR法では、プラスミドを鋳型として、逆向きに設定したプライマーを用いてPCRを行い、プラスミド全周の増幅を行います。その際、導入したい変異や挿入配列を付加したプライマーを用いることにより、様々な変異を導入することができます。本製品には、形質転換までに必要な全ての試薬および詳細なプロトコールが含まれています。

### 一口メモ

- KOD -Plus-は、KOD DNA Polymeraseに、常温で活性を抑える2種類の抗体を加えたホットスタート対応型高正確性PCR用酵素です。Taq DNA Polymeraseの約80倍の忠実度 (fidelity) を有し、正確性を要するPCRに最適です。
- 制限酵素 *Dpn* Iは、メチル化されたDNAを基質として切断します。通常のメチラーゼを発現している大腸菌 (JM109やDH5α) から得られたプラスミドは、*Dpn* Iサイトがメチル化されており、本酵素を用いて選択的に分解することができます。

### 特長1 幅広い変異導入に対応

- ・ Inverse PCR法の採用により、数bpの置換、挿入、欠失のみでなく、数10bpの挿入 (Tagの導入) や数100bpの欠失等にも対応可能です。また、特定部位のアミノ酸を20種類のアミノ酸に置換するなどの Mutant Clone Collectionの作製 (Saturation Mutagenesis) も可能です。

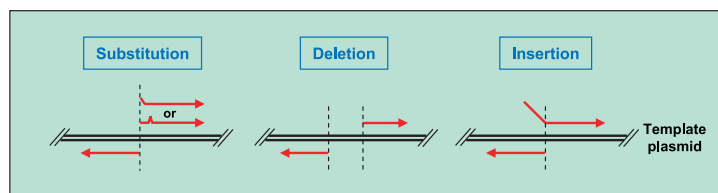


図1. 置換、欠失、及び挿入の各変異導入プライマー設計例

### 特長2 確実な変異導入

- ・ 最大95%の変異導入効率が得られます。また、KOD -Plus-の採用、およびPCRサイクル数を最小限に設定するなど条件の最適化により、PCRエラーによる2nd-site mutation (目的とする変異以外の変異) が入る可能性を最小限にしています。最長約11kbのプラスミドで変異導入を確認済みです。

### 特長3 簡単プロトコール\*

- ・ 本製品では、PCR産物のSelf-ligationを、KinaseとLigaseを同時に反応させて行います。従って、PCR Primerのリン酸化は不要です。また、形質転換まで3ステップの簡単なプロトコールとなっています (図2)。

\* 特許出願中

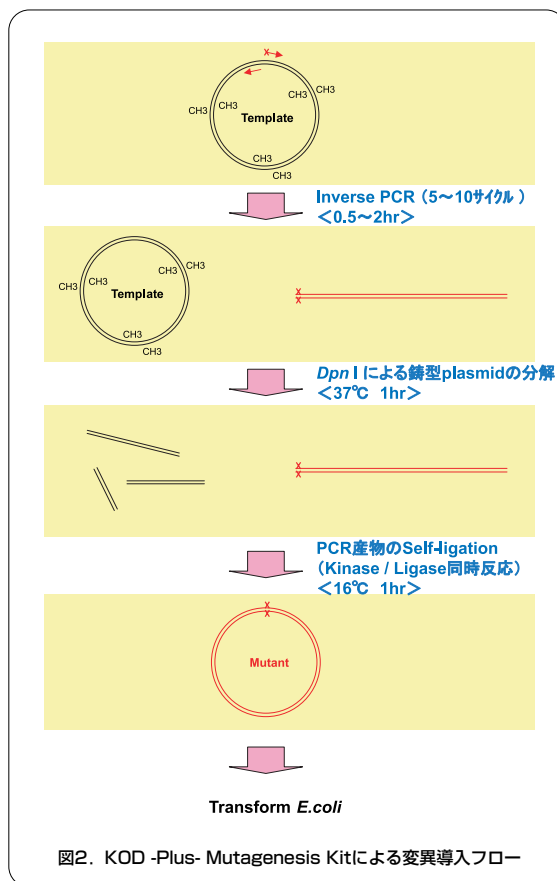


図2. KOD -Plus- Mutagenesis Kitによる変異導入フロー

### 実施例1 種々のサイズのプラスミドをターゲットとした場合の変異導入効率の評価

全長3.3kb～11.3kbの5種類のヒトcDNAクローン (FLJ cDNA Clone: Code No. FLJ-101) に対して、1塩基置換、3塩基欠失、6塩基挿入の変異導入をそれぞれ行い、シーケンシングにて変異導入効率の評価を行いました (変異箇所は、ベクター上の共通領域に設定。 (ベクターサイズ 3.0kb))。その結果、本製品では、plasmidのサイズに特に影響を受けることなく、平均84%の割合で目的の変異体を得ることができました。

| Plasmid  | Plasmid<br>サイズ | 変異導入の<br>タイプ | 配列確認を試みた<br>クローン数 | 目的の変異を有して<br>いたクローン数 | 目的とした変異体の<br>割合 |
|----------|----------------|--------------|-------------------|----------------------|-----------------|
| FLJ20649 | 3.3kb          | 1塩基置換        | 12                | 10                   | 83%             |
|          |                | 3塩基欠失        | 12                | 9                    | 75%             |
|          |                | 6塩基挿入        | 12                | 11                   | 92%             |
| FLJ11212 | 5.3kb          | 1塩基置換        | 12                | 10                   | 83%             |
|          |                | 3塩基欠失        | 12                | 12                   | 100%            |
|          |                | 6塩基挿入        | 12                | 9                    | 75%             |
| FLJ32066 | 7.3kb          | 1塩基置換        | 12                | 9                    | 75%             |
|          |                | 3塩基欠失        | 12                | 12                   | 100%            |
|          |                | 6塩基挿入        | 12                | 11                   | 92%             |
| FLJ13783 | 9.3kb          | 1塩基置換        | 12                | 9                    | 75%             |
|          |                | 3塩基欠失        | 12                | 12                   | 100%            |
|          |                | 6塩基挿入        | 12                | 10                   | 83%             |
| FLJ43903 | 11.3kb         | 1塩基置換        | 12                | 8                    | 67%             |
|          |                | 3塩基欠失        | 12                | 11                   | 92%             |
|          |                | 6塩基挿入        | 12                | 8                    | 67%             |
| 平 均      |                |              | 180               | 151                  | 84%             |

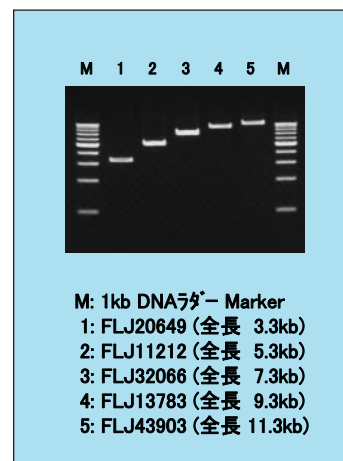


図3. Inverse PCR後のアガロースゲル電気泳動結果

## 実施例2 大きな欠失導入およびHis-tag挿入における他社品との性能比較

7.3kbのプラスミドFLJ32066を対象に、本製品とA社non-PCR法キットを用いて90塩基の欠失、および6xHisに対応する18塩基の導入を行いました。その結果、他社のキットが苦手とするこのような変異導入に対しても、本製品では、高い成功率で変異体を取得することができました。

### ●90bp 欠失

|       | 配列確認を試みた<br>クローン数 | 目的の変異を有して<br>いたクローン数 | 目的とした変異体の<br>割合 |
|-------|-------------------|----------------------|-----------------|
| 本 製 品 | 16                | 14                   | 88%             |
| A社キット | 16                | 7                    | 44%             |

### ●18bp 挿入

|       | 配列確認を試みた<br>クローン数 | 目的の変異を有して<br>いたクローン数 | 目的とした変異体の<br>割合 |
|-------|-------------------|----------------------|-----------------|
| 本 製 品 | 16                | 15                   | 94%             |
| A社キット | 16                | 0                    | 0%              |

## 実施例3 目的外変異 (2nd-site mutation) の挿入頻度の評価

キット付属のコントロールplasmid (4.3kb)を鋳型として変異導入を行い (PCRは8サイクルにて実施)、得られた変異体から24クローンについて各々2000bpの領域のシーケンシングを行いました。その結果、本製品では、実際に解析した合計48,000塩基の内、目的以外の変異はわずか1塩基でした。これは、A社non-PCR法キットと比較しても、同等以上の結果でした。

|       | 変異導入率 | シーケンシングした<br>クローン数 | 総シーケンシング<br>塩基数 | 目的外変異の塩基数 | 目的外変異の挿入率<br>( $\times 10^{-5}$ ) |
|-------|-------|--------------------|-----------------|-----------|-----------------------------------|
| 本 製 品 | >80%  | 24                 | 48000           | 1         | 2.08                              |
| A社キット | >80%  | 24                 | 48000           | 2         | 4.16                              |

| 品 名                        | 包 装  | 保存温度 | Code No. | 価 格     |
|----------------------------|------|------|----------|---------|
| KOD -Plus- Mutagenesis Kit | 20回用 | -20℃ | SMK-101  | ¥38,000 |

\*本製品には、以下の試薬が含まれています。KOD -Plus-, 10×Buffer for iPCR, 2mM dNTPs, *Dpn*I, T4 Polynucleotide Kinase, Ligation high, Control Plasmid, Control Primer #1, Control Primer #2.

※PCR (Polymerase Chain Reaction) は、F. Hoffman-La Roche社が米国特許 (特許番号4,683,195および4,683,202) を有しています。PCRの実施に当たっては許可が必要となります。本品はF. Hoffman-La Roche社が有するPCRに関する特許の使用許可を示唆するものではありません。

## リアルタイムPCR特集

今回は『リアルタイムPCR』を特集させていただきます。

リアルタイムPCR解析は、今日の遺伝子発現解析にはなくてはならないツールとなった感があります。今号では、各種リアルタイムPCR試薬、および関連試薬に関して特集しております。是非、研究にお役立てください。

### Technical Review

## 『RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix』を用いた1-step Realtime PCRによるプロテインキナーゼ発現定量

東洋紡績(株) 敦賀バイオ研究所 川井 淳

### はじめに

リアルタイムPCRを用いて目的の遺伝子の発現量を測定する方法には、まずRNAをcDNAに変換し、それを鋳型としてリアルタイムPCRを行う『2-step反応系』と、RNAを鋳型として逆転写反応とリアルタイムPCRを連続的に行う『1-step反応系』とがあります。1-stepリアルタイムPCRは、試薬の分注操作が1回で済み、ハイスループト化に適しています。また、サンプル間のクロスコンタミネーションの危険性も低減します。

RNA-direct™ Realtime PCR Master Mixは、*Thermus thermophilus* HB8株由来のTth DNA Polymeraseが、2価のマンガンイオン ( $Mn^{2+}$ ) 存在下において強い逆転写活性を示すことを利用した、1酵素系による1-stepリアルタイムPCR用2xマスターミックスです。耐熱性DNAポリメラーゼを用いた逆転写反応は、一般の逆転写酵素と比較して、反応を高温で実施できるため、立体構造をとりやすい鋳型RNAからの増幅や、逆転写反応の特異性を高めるのに適しています。

本キットは、TaqMan®アッセイ・プローブアッセイ用とSYBR® Greenアッセイ用の2種類から選択いただけます。

本号では、RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mixを用いてnovel Protein Kinase C (nPKC)のサブタイプごとのヒト各種組織別発現プロファイル解析を実施した例をご紹介します。



図1. キット外観  
Master Mixと酢酸マンガンをそれぞれ1.5mlチューブに分注され包装されている。

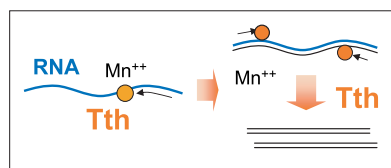
### 一口メモ

#### Tth DNA polymeraseについて

Tth DNA polymeraseは好熱細菌：*Thermus thermophilus*から分離されたpolⅡ型DNA polymeraseです。 $Mn^{2+}$ イオン存在下で、逆転写活性を示すユニークな性質を有しています。

Biochemistry, **30**: 7661-7666 (1991)

※本酵素の基本特許は弊社が有しています。



RT

PCRサイクル

図2. Tthを用いたRT-PCR原理図

### 方法

#### 1. サンプル:

10種類のヒト由来Total RNA (脳、心臓、腎臓、脾臓、肝臓、小腸、筋肉、肺、胃、大腸)を鋳型として用いました。各反応系 (20  $\mu$ l) に対し、それぞれ50ngのtotal RNAを添加して解析を行いました。またこれらとは別に、検量線作成用として上記10種のtotal RNAのうち4種(心臓、脾臓、筋肉、肺)をピックアップして混合したものについて、200ngおよびその5倍希釈系列を作成し、それぞれ同時に反応を行いました。

#### 2. プライマー:

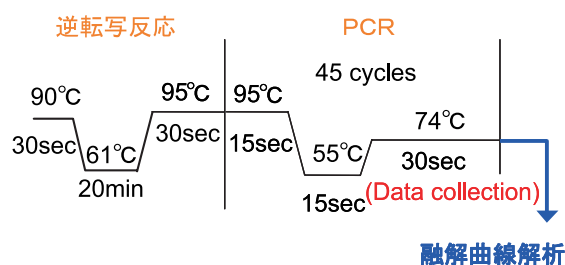
PKC $\delta$ 、PKC $\epsilon$ 、PKC $\eta$ 、PKC $\theta$ それぞれに対して、イントロンを跨ぐ約150~170bpの領域を増幅するように、それぞれ20mer前後の鎖長を持つプライマーを設計しました。また、サンプル間のmRNA量を補正するために、 $\beta$ -Actinを内部標準として使用しました。プライマー濃度は各0.2  $\mu$ Mに設定しました。各プライマーの配列を表1に示します。

表1 増幅用プライマー

|                | Forward Primer       | Reverse Primer       | 領域長   |
|----------------|----------------------|----------------------|-------|
| PKC $\delta$   | AGATTGCCGACTTTGGGATG | TACAGAAGGACCCCGAAAGA | 154bp |
| PKC $\epsilon$ | GGATGTGCAAGGAAGGGATT | GCCATCATCTCGTACATCAG | 151bp |
| PKC $\eta$     | AGGGTCACTGTAAACTGGCA | TCATAGAGCAACACGCCCAT | 168bp |
| PKC $\theta$   | TGTTAGGAGATGCCAAGACG | TGGAAAGGCGACTGACCAAT | 151bp |
| $\beta$ -Actin | AGAAATCTGGCACCACACC  | AGAGGCGTACAGGGATAGCA | 188bp |

## 3. 反応機器・条件:

Applied Biosystems 7900HTを使用して、以下の条件にて増幅検出を行いました。



## 一口メモ

## novel Protein Kinase C (nPKC) について

細胞内シグナル伝達システムにおいて重要な役割を果たしている Protein Kinase C (PKC) は、現在9種類のサブタイプ(ヒトの場合)が知られていますが、それらは、ホルボールエステル結合部位、カルシウムイオン結合部位を持つ conventional PKC (cPKC)、カルシウムイオン結合部位を欠く novel PKC (nPKC)、更にホルボールエステル結合部位も欠く atypical PKC (aPKC) に大別されます。このうち、nPKC に分類されるものは4種類あり、それぞれ  $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\eta$ 、 $\theta$  と呼ばれています。それぞれのサブタイプは組織別の発現量分布に差があることが知られていますが、機能との関わりは完全には解明されていません。

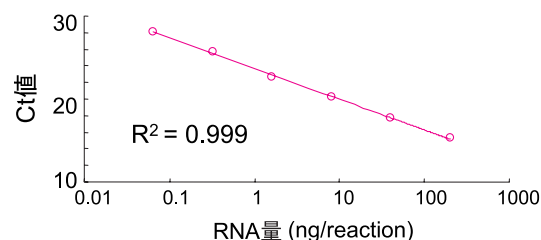
## 結果及び考察

1.  $\beta$ -ActinおよびPKCの標準曲線作成

今回、相対定量に用いる検量線用のスタンダードとして、nPKCの発現が高いと予想された4つの臓器由来のtotal RNAを混合したものを希釈して用いました(200 $\times$ 5 $^{-n}$ ng (n=0,1,2...))。まず、それぞれCt値より、 $\beta$ -Actinおよび各PKCサンプルの検量線を作成しました。また同時に、それぞれの組織由来のサンプルを1反応あたり50ng、および200ngを用いて同様に増幅しました。

その結果、鋳型量とCt値との相関性は極めて良好であることが示されました。 $\beta$ -Actinの検量線を図3に示します。また、融解曲線解析の結果、プライマーダイマー等の生成は確認されませんでした。

相対定量の場合、プラスミド等にクローニングした遺伝子から転写反応を用いて合成したRNAを定量のスタンダードにする方法もありますが、今回のように単に生体より抽出したRNAを希釈して用いるだけでも問題なく検量線を作成できました。

図3.  $\beta$ -Actinの検量線

## 2. PKC各サブタイプの組織毎の発現量算出

$\beta$ -Actin、およびPKC各サブタイプの検量線を用いて、それぞれの遺伝子の組織別存在量を算出しました。次に、 $\beta$ -ActinのmRNAの相対量で補正し、各組織における各PKCの相対発現量を算出しました(図4)。

その結果、PKC $\epsilon$ 、PKC $\theta$ において、組織別発現量分布が大きく偏っていることが明らかになりました。この結果は既に報告されている情報と良く一致していることが確認できました<sup>1)</sup><sup>2)</sup>。また今回、50ngと200ngのtotal RNAを用いてPCR反応を行い、それぞれ相対値を算出しましたが、どちらの濃度のRNAにおいてもほぼ同じ結果を示しました。

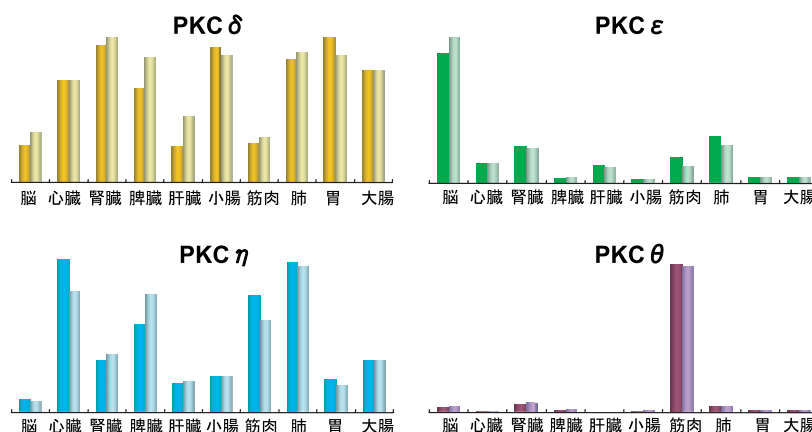


図4. PKC各サブタイプの組織別発現量  
各グラフの左側のバーが50ng RNA使用時、右側のバーが200ng RNA使用時のデータをそれぞれ示す。縦軸は相対発現量を示す。

### 3. 2-step反応系との結果比較:

1-step反応系と2-step反応系（逆転写反応とリアルタイムPCRとを別に実施）の結果に整合性があるかどうかを確認するため、弊社高効率逆転写キットReverTra Ace - $\alpha$ -<sup>®</sup> (Code No.:FSK-101)と、リアルタイムPCRキットSYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mix -Plus- (Code No.: QPK-211) とを用い、核酸増幅リアルタイムモニタリング装置：LineGene (BioFlux社) による2-stepリアルタイムPCRを実施した場合との結果の比較を行いました (PKC $\delta$ のみ実施)。

その結果、図5に示すように、両者の結果はほぼ一致しており、1-step反応系による結果は2-step反応系と同等の信頼性があり、2-step反応系から1-step反応系への移行も容易であることが示されました。

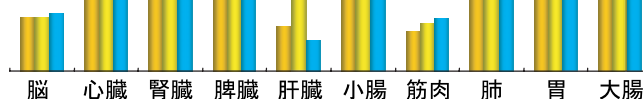


図5. 1-step反応系と2-step反応系の比較 (PKC $\delta$ )  
グラフの左側と中央のバーは図4のPKC $\delta$ の解析結果と同じ物 (1-step: 50ngと200ng)。右側のバーが2-step (Total RNA 10ng相当の逆転写反応液を使用) 反応系での結果を示す。縦軸は相対発現量を示す。

## まとめ

RNA-direct<sup>™</sup> Realtime PCR Master Mixを用いた1-stepリアルタイムPCRでは、多数のサンプルの処理をより簡便に行うことが可能で、実験系のハイスループット化に適しています。今回の検討においても、本系の再現性は良好で、かつ2-step反応系とも高い整合性が示されました。また、1-step系では2-step系に比べ鋳型RNAを多く持ち込める傾向にあるため、発現

量の少ないmRNAの解析にも力を発揮するものと思われます。現在、2-step系の試薬を用いて行っている実験も、1-step系試薬での解析に向いている場合も多々あると推察されます。『RNA-direct<sup>™</sup> Realtime PCR Master Mix』を是非一度お試しください。

## 参考文献

- 1) Akita Y. *et al.*, *J Biol Chem.* **265** : 354-362 (1990)
- 2) Osada S. *et al.*, *Mol Cell Biol.* **12** : 3930-3938 (1992)

| 品 名                                                                                                                              | 包 装*                              | 保存温度 | Code No.            | 価 格**              |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------|---------------------|--------------------|
| One-step qPCR Kit (TaqMan <sup>®</sup> アッセイ・プローブアッセイ用)<br><b>RNA-direct<sup>™</sup> Realtime PCR Master Mix</b>                  | 40回用 (0.5ml×2)<br>100回用 (0.5ml×5) | -20℃ | QRT-101T<br>QRT-101 | ¥17,000<br>¥33,000 |
| One-step qPCR Kit (SYBR <sup>®</sup> Greenアッセイ用)<br><b>RNA-direct<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mix</b> | 40回用 (0.5ml×2)<br>100回用 (0.5ml×5) | -20℃ | QRT-201T<br>QRT-201 | ¥17,000<br>¥33,000 |

\* 1反応50 $\mu$ lとした場合の使用回数を記載しています。

※ RNA-direct<sup>™</sup> Realtime PCR Master Mixおよび RNA-direct<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mixには、Passive Reference色素があらかじめ混合されています。プレートタイプのPCR機器にそのままご使用いただけますが、Passive Reference色素を使用しないPCR機器への影響もありません。

※ RNA-direct<sup>™</sup> Realtime PCR Master Mixおよび RNA-direct<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mixには、必要量の酢酸マンガソ液が別チューブで添付されます。

※ PCR (Polymerase Chain Reaction) は、F. Hoffman-La Roche社が米国特許 (特許番号4,683,195および4,683,202) を有しています。PCRの実施に当たっては許可が必要となります。本品はF. Hoffman-La Roche社が有するPCRに関する特許の使用許可を示唆するものではありません。

※ LightCycler<sup>™</sup>は、Idaho Technology Inc.並びにRoche Molecular Systems Inc.の商標です。

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

※ TaqMan<sup>®</sup>は、Roche Molecular Systems Inc.の登録商標です。

## Web de 温故知新

今号に関連のある記事をピックアップして詳しくご紹介するコーナーです。

## 『TArget Clone<sup>™</sup>』 (本誌p.9掲載)

TArget Clone<sup>™</sup>シリーズは、様々なPCRプロダクトを高効率にTAクローニングするために開発されたキットです。PCRプロダクトの末端の形状によって、2種類のキットを使い分けます。A付加を受けた通常のPCRプロダクトのクローニングには、『TArget Clone<sup>™</sup>』を用います。一方、高正確性酵素であるKOD -Plus- や KOD -Plus- Ver.2で増幅された、末端が**フラントエンド**になっているPCRプロダクトの場合は、『TArget Clone<sup>™</sup> -Plus-』を用います。これらの酵素は、強い3'→5'エキソヌクレアーゼ活性 (校正活性) を有するため、増幅産物はその末端が平滑化されてしまい、通常の方法ではTAクローニングができません。TArget Clone<sup>™</sup> -Plus-には、

KOD DNA polymeraseの活性を抑える2種類のモノクローナル抗体とTaq DNA polymeraseが使われており、PCR後に残存したKOD DNA polymeraseの活性を抑えつつ、Taq DNA polymeraseの活性により増幅産物の末端にA付加を行います。

ただ、紛らわしいのは、Blend Taq<sup>®</sup>やKOD Dash<sup>®</sup>のような、2つのPCR酵素を混合したタイプの高性能ポリメラーゼの場合です。弊社のウェブサイト (<http://www.toyobo.co.jp/bio/>) の『PCRコーナー』では、PCR酵素別にPCRプロダクトの末端の形状を分かりやすくまとめています。是非一度ご参照ください。

## Products

# ヒト正常/病態組織由来cDNA (臨床情報添付)

NEW

正常人および各種疾患患者の組織由来のcDNAです。

本製品は、正常人あるいは各種疾患患者の組織から抽出したTotal RNAを鋳型として、合成したcDNAです。本製品を鋳型としてリアルタイムPCRを行うことで、疾患特異的または組織特異的な目的遺伝子の発現解析を行うことが可能です。また、目的遺伝子のクローニング用の鋳型として用いることもできます。

## 特長1 詳細な臨床情報を添付

- ・ヒト正常/病態組織由来cDNAには、詳細なドナーの臨床情報を添付しております。臨床情報には、ドナーの身体的特徴だけでなく、既往歴、投薬歴等に関する情報が含まれます。それぞれの疾患、組織由来のcDNAについて複数のロットをご用意しております(ロット番号はそれぞれ別のドナーを示します)。ご購入前に各ロットの臨床情報をご確認いただけます。弊社テクニカルライン(TEL: 06-6348-3888・FAX: 06-6348-3833・E-mail: techosk@bio.toyobo.co.jp)までご連絡ください

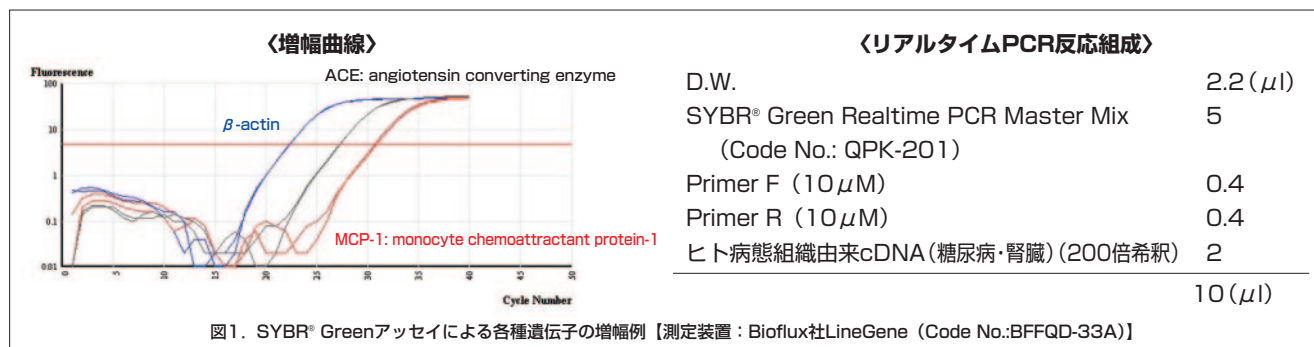
### ※倫理面での対応について

本製品の製造に用いたヒト組織由来Total RNAは、Asterand社(<http://www.asterand.com>)から入手しています。ヒト組織については、研究、臨床開発用途での使用を目的とした試料、関連情報の提供、保有に適用されるすべての法律、規則、ガイドラインに従って入手、提供されています。

- 1) すべてのサンプルでインフォームドコンセントが得られています。
- 2) すべてのサンプルで2度にわたる非連結匿名化が行われています。

## 特長2 簡便な操作

- ・リアルタイムPCRおよびPCRの鋳型として、そのまま、もしくは希釈して使用可能です。
- ・本製品は、高効率逆転写酵素「ReverTra Ace®」を用いて逆転写反応を行った溶液です。逆転写にはオリゴdTプライマーを用いています。製品には、逆転写反応に用いた成分が含まれています。



| 品名                       | 包装*             | 保存温度 | Code No. | 価 格        |         |
|--------------------------|-----------------|------|----------|------------|---------|
| ヒト正常組織由来cDNA<br>(臨床情報添付) | (すい臓)           | 20回用 | -80℃     | DCPN-PC101 | ¥20,000 |
|                          | (腎臓)            | 20回用 | -80℃     | DCPN-KD101 | ¥20,000 |
|                          | (筋肉)            | 20回用 | -80℃     | DCPN-MS101 | ¥20,000 |
|                          | (冠動脈)           | 20回用 | -80℃     | DCPN-HT101 | ¥20,000 |
|                          | (大脳皮質)          | 20回用 | -80℃     | DCPN-CC101 | ¥20,000 |
|                          | (海馬)            | 20回用 | -80℃     | DCPN-HC101 | ¥20,000 |
| ヒト病態組織由来cDNA<br>(臨床情報添付) | (糖尿病・すい臓)       | 20回用 | -80℃     | DCPD-PC101 | ¥20,000 |
|                          | (糖尿病・腎臓)        | 20回用 | -80℃     | DCPD-KD101 | ¥20,000 |
|                          | (糖尿病・筋肉)        | 20回用 | -80℃     | DCPD-MS101 | ¥20,000 |
|                          | (高血圧・冠動脈)       | 20回用 | -80℃     | DCPD-HT101 | ¥20,000 |
|                          | (高血圧・腎臓)        | 20回用 | -80℃     | DCPD-KD201 | ¥20,000 |
|                          | (アルツハイマー病・大脳皮質) | 20回用 | -80℃     | DCPD-CC101 | ¥20,000 |

\*原液を1反応に1 μl使用した場合の使用回数を示しています。適宜希釈してご使用いただけます。 ※ロット情報については、お問い合わせください。

### 関連商品

➡ 2ステップ系のリアルタイムPCR試薬をお使いいただけます。詳しくは、本誌p.10~13「Product Selection Guide (特集)」をご覧ください。

## Products

高効率TAクローニングキット

# TArget Clone™/TArget Clone™ -Plus-

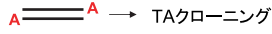
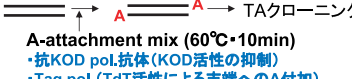
汎用性の高いTAクローニングキットです。リアルタイムのコントロールRNAの調製にも応用可能です。

高効率なTAクローニングキットです。種々のPCRプロダクトに対応することができます。

### 特長1 迅速・高効率TAクローニング

・ライゲーション反応は最短5分で完了します。PCRプロダクトの精製は必要ありません。

### 特長2 様々なPCRプロダクトに使用可能

|                      |                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                               |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TArget Clone™        | Taqをはじめとする一般的なPCR酵素で増幅したPCRプロダクトを高効率でTAクローニング可能。                                                                                                           |                                                                                            |
| TArget Clone™ -Plus- | 高正確性酵素：KOD DNA Polymerase, KOD -Plus-,およびKOD -Plus- Ver.2で増幅したプロダクトを高効率でTAクローニング可能。※KOD DNA polymerase (KOD Dash® 除く) で増幅したPCRプロダクトの末端は強い校正活性により平滑化されています。 | <br>A-attachment mix (60℃・10min)<br>・抗KOD pol.抗体 (KOD活性の抑制)<br>・Taq pol. (TdT活性による末端へのA付加) |

### 特長3 リアルタイムPCRのコントロールRNAの調製に使用可能

・pTA1プラスミドのMCSの両端にT7とT3プロモーターがあり、クローニングした配列のRNAを転写反応で作製することもできます(図1参照)。インサートの有無は、青白判定できるようになっています。

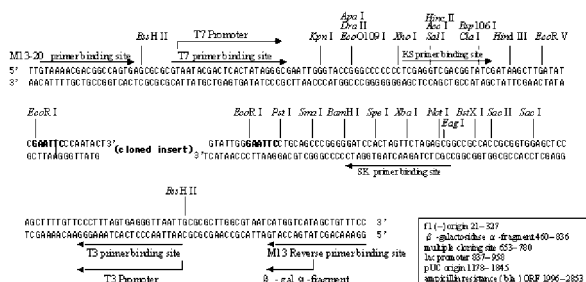


図1. pTA2ベクターのMCSの構造

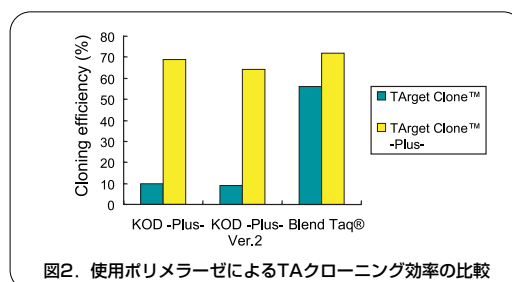


図2. 使用ポリメラーゼによるTAクローニング効率の比較

### 実施例 様々なポリメラーゼのPCR産物を用いたTAクローニング例

高正確性酵素:KOD -Plus-, KOD -Plus- Ver.2, および高性能Taq:Blend Taq®を用いて、human  $\beta$ -globin遺伝子0.5kbを増幅し、精製なしで、TArget Clone™、およびTArget Clone™ -Plus-を用いて、TAクローニングを行いました。

結果、KOD -Plus-およびKOD -Plus-Ver.2の場合、TArget Clone™-Plus-を用いることにより、格段にクローニング効率が向上することが分かりました。一方Blend Taq®では、TArget Clone™を用いても問題なく高効率にTAクローニングできることが分かりました(図2)。(Blend Taq®はTaq DNA polymeraseに、微量の校正活性(3'→5' エキソヌクレアーゼ活性)を有する酵素が混合されていますが、その末端はかなりA付加されていることが確認されています。)

| 品名および内容                                                                                   | 包装   | 保存温度 | Code No. | 価格      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|----------|---------|
| TArget Clone™ (pTA2 Vector, 2×Ligation Buffer, T4 DNA Ligase)                             | 10回用 | -20℃ | TAK-101  | ¥12,000 |
| TArget Clone™ -Plus- (pTA2 Vector, 2×Ligation Buffer, T4 DNA Ligase, 10×A-attachment Mix) | 10回用 | -20℃ | TAK-201  | ¥16,000 |

#### 関連商品

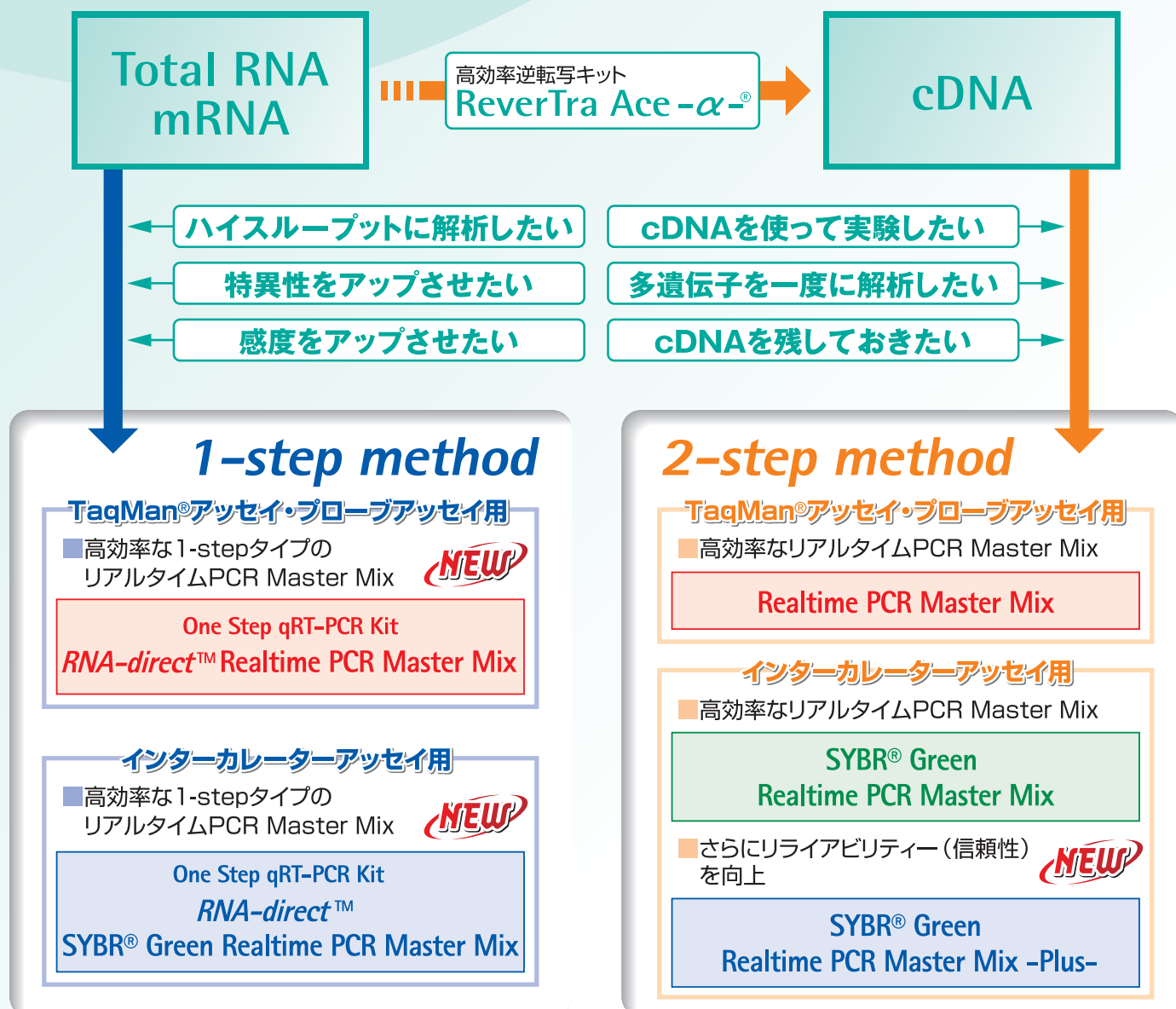
| 品名および内容                                | 備考                           | 包装      | 保存温度 | Code No. | 価格      |
|----------------------------------------|------------------------------|---------|------|----------|---------|
| KOD -Plus-                             | 正確性はTaqの約80倍。ホットスタート対応       | 200U×1本 | -20℃ | KOD-201  | ¥30,000 |
| KOD -Plus- Ver.2                       | 正確性はKOD -Plus-と同等。リライアビリティUP | 200U×1本 | -20℃ | KOD-211  | ¥32,000 |
| Blend Taq®                             | 高性能Taqポリメラーゼ(正確性はTaqの約3~4倍)  | 250U×1本 | -20℃ | BTQ-101  | ¥19,000 |
| Blend Taq® -Plus-                      | ホットスタート対応で更に特異性UP            | 250U×1本 | -20℃ | BTQ-201  | ¥21,000 |
| ScriptMAX® Thermo T7 Transcription Kit | 高効率なT7プロモーターからの転写反応に最適       | 60回用    | -20℃ | TSK-101  | ¥28,000 |

より良いリアルタイムPCR解析のために。



# リアルタイムPCR解析ガイド

Realtime PCR Master Mixシリーズ  
RNA-direct™ シリーズ



## 全てのキットは...

- 抗体を用いたホットスタート法に対応しています。⇒プライマーダイマー生成などの副反応が低減されます。
- ガラスキャピラリーを用いる装置や、パッシブリファレンスの必要な装置など、様々な装置に対応します。

## 1-step method

RNA-direct™  
シリーズ

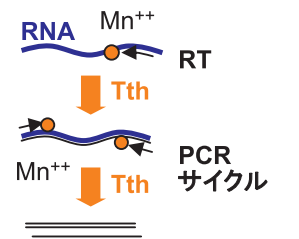
RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix **NEW**  
RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix **NEW**

逆転写活性を示すTth DNA polymeraseをベースとして開発された、1酵素・1-step用のリアルタイムPCR Master Mixです。逆転写反応液をPCR反応液に移し替える工程がなく、ハイスループット解析に向きます。また、高温で逆転写反応ができるため、従来の2酵素・1-step系や2酵素・2-step系に比べ特異性をアップさせることができます。

※Tth DNA polymeraseの基本特許は弊社が保有しております。



キット外観: Master Mix (青)、と酢酸マンガ溶液 (橙) がアルミ袋で遮光包装されている。  
\*酢酸マンガはRNA-direct™シリーズのみへの添付となります。



Tth DNA polymeraseはMn<sup>++</sup>イオン存在下において、逆転写活性を示します。耐熱性酵素なので、60℃付近の温度で逆転写反応を行うことができます。逆転写反応はPCRのリバースプライマーを用います。

## 実施例

1

TaqMan®アッセイによる他社品  
(2酵素・1-step系)との比較

- サンプル** ヒト培養細胞由来Poly(A)<sup>+</sup>RNA (10<sup>n</sup>倍希釈系列 (n=2))  
**使用キット** RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix  
A社 2酵素・1-stepキット (RTase+Taq使用)  
**測定機器** BioFlux社 LineGene  
**ターゲット** β-actin mRNA  
**結果** A社の2酵素・1-stepキットに比べ、立ち上がり速度、および直線性において優れていることが分かりました。

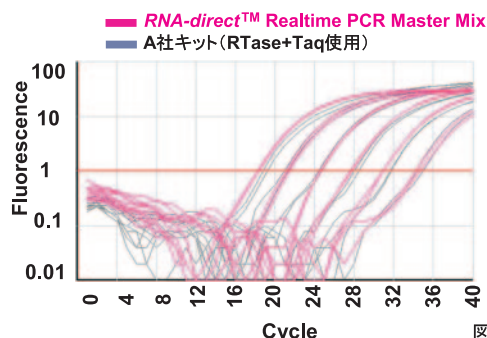


図1

## 実施例

2

SYBR® Greenアッセイによる  
他社品との性能比較

- サンプル** HeLa細胞由来Total RNA (10<sup>n</sup>倍希釈系列 (n=2))  
**使用キット** RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix  
B社 2酵素・1-stepキット (RTase+Taq使用)  
**測定機器** Applied Biosystems 7900HT  
**ターゲット** β-actin mRNA  
**結果** B社キットに比べ、感度、直線性に優れる結果でした。

RNA-direct™ SYBR® Green  
Realtime PCR Master Mix

B社キット (RTase+Taq使用)

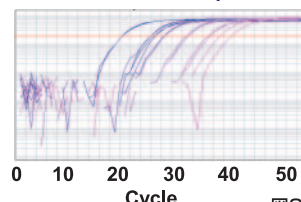
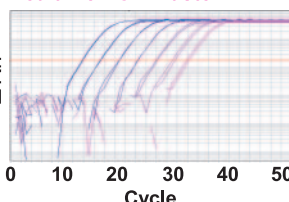
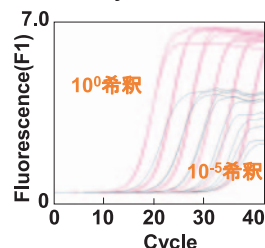


図2

- サンプル** ヒト培養細胞由来Poly(A)<sup>+</sup>RNA (10<sup>n</sup>倍希釈系列 (n=2))  
**使用キット** RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix  
C社 1酵素・1-stepキット (Tth使用)  
**測定機器** Roche社 LightCycler™  
**ターゲット** G3PDH mRNA  
**結果** 同じくTth DNA Polymeraseを用いたC社キットに比べ、感度、増幅効率に優れる結果でした。



RNA-direct™  
SYBR® Green  
Realtime PCR Master Mix  
C社キット (Tth使用)

図3

## 実施例

3

SYBR® Greenアッセイによる  
プロテインキナーゼ遺伝子の定量

- サンプル** ヒト組織由来Total RNA  
・RNA-direct™⇒50ng, 200ng (2種類の濃度で検討)  
・SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-  
⇒10ng相当\* <2-step系> \*逆転写はReverTra Ace -α-使用  
**使用キット** RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix  
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-  
**測定機器** Applied Biosystems 7900HT  
**定量方法** PKCδの発現量をβ-actinの量で補正して算出  
**結果** 2-step法と同じ傾向でmRNA相対量を定量することができました。

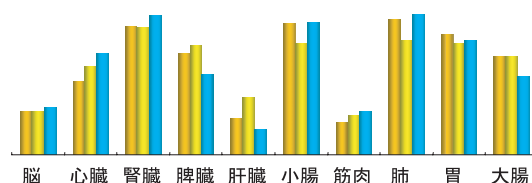


図4 1-step反応系と2-step反応系の比較 (PKCδ)

黄色のバーはRNA-direct™による結果 (Total RNA: 50ng (左), 200ng (右)). 青色のバーが2-step反応系での結果 (Total RNA 10ng相当の逆転写反応液を使用)。縦軸は相対発現量を示す。

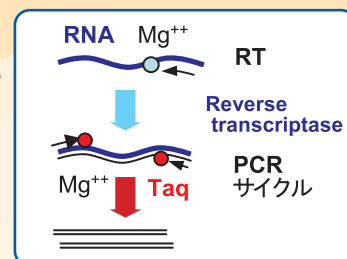
※2-step系の増幅にはBioFlux社LineGeneを使用しました。

## 2-step method

# Realtime PCR Master Mix シリーズ

Realtime PCR Master Mix  
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix  
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-**NEW**

Taq DNA polymeraseをベースとした汎用性の高いリアルタイムPCR Master Mixです。SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-は、組成をさらに最適化することでリアルタイムPCRの信頼性（信頼性）を向上させています。高効率逆転写キット『ReverTra Ace -α-®』を用いることで、より良好な結果を得ることが可能です。（基本的にはどの逆転写酵素も使用可能です）



### 実施例

1

## 2<sup>n</sup>希釈の定量性の検証

- サンプル** マウスβ-actin cDNAの2倍希釈系列（500～16コピーまでの6水準）  
**使用キット** SYBR® Green Realtime PCR Master Mix  
**測定機器** BioFlux社 LineGene  
**ターゲット** β-actin cDNA  
**結果** 検量線を作成したところ相関係数-0.9999となり、精度良く2<sup>n</sup>希釈サンプルの定量ができることが確認できました。

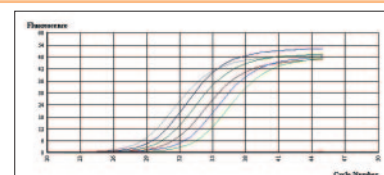


図5 2倍希釈系列の増幅曲線

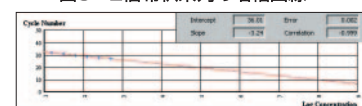


図6 2倍希釈系列の検量線

### 実施例

2

## SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-の特異性の検証

- サンプル** げっ歯類由来ゲノムDNA  
**使用キット** SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-  
**測定機器** BioFlux社 LineGene  
**ターゲット** 遺伝子A 約80bp（ダイマーの出やすい組み合わせで増幅）  
**結果** D社のキットに比べ、Ct値も等間隔であり、測定可能範囲も広い傾向を示しました。

### SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-

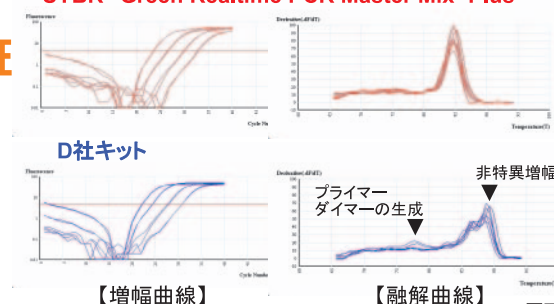


図7

### 実施例

3

## Realtime PCR Master Mixを用いたTaqMan® アッセイ

- サンプル** HeLa細胞 Total RNA(100ng)の逆転写産物の5倍ずつの段階希釈  
**使用キット** Realtime PCR Master Mix  
**測定機器** Applied Biosystems 7700  
**ターゲット** β-actin cDNA  
**結果** Ct値が等間隔で良好な増幅結果が得られました。

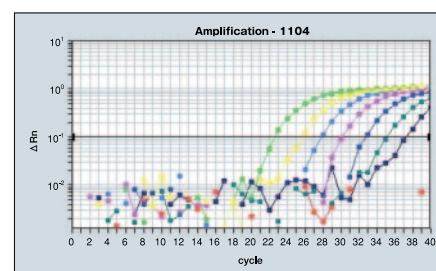


図8 段階希釈系列の増幅曲線

Real Time Monitoring Fluorescent Quantitative Detection System

## LineGene



## 核酸増幅リアルタイムモニタリング装置好評発売中!!

### コストパフォーマンス良好

- 専用チューブやキャピラリー不要（汎用0.2mlチューブを使用可能）
- 反応ボリュームは10μl～
- 0.2mlチューブ×33本に対応

### 多様な系に対応

- SYBR® Green I, TaqMan® probe（リポーター:FAM、クエンチャー:TAMRA等）、Hybridization probes, Molecular Beacon等に対応
- 励起波長:470nm
- 検出波長:530nm、640nm、710nm

### 高感度オプティカルユニット

- 励起用光源に、発熱性が低く安定、長寿命のBlue LED採用。検出器に高感度、低ノイズのPMTを採用

### ソフトウェア

- 増幅曲線のリアルタイム表示
- ランニング中にグラフスケールを変更可能
- 反応中にサイクルを1サイクル単位で削除・追加可能
- 定量解析、融解曲線解析可能
- 測定の実データをダウンロード可能

本製品はすでに販売を中止しております。

# 1-step用リアルタイムPCR試薬

| 品 名                                                                                 | 包 装*                                | Code No.            | 保 存  | 価 格                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix</b><br>(2×濃度) 〔酢酸マンガンを別添〕【TaqMan®・プローブアッセイ用】 | 100回用 (0.5ml×5本)<br>40回用 (0.5ml×2本) | QRT-101<br>QRT-101T | -20℃ | ¥33,000<br>¥17,000  |
| <b>RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix</b><br>(2×濃度) 〔酢酸マンガンを別添〕        | 100回用 (0.5ml×5本)<br>40回用 (0.5ml×2本) | QRT-201<br>QRT-201T | -20℃ | ¥33,000<br>¥17,000  |

## 2-step用リアルタイムPCR試薬・関連商品

| 品 名                                                                     | 包 装*                            | Code No.            | 保 存  | 価 格                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Realtime PCR Master Mix</b><br>(2×濃度) 【TaqMan®・プローブアッセイ用】            | 200回用 (1ml×5本)<br>40回用 (1ml×1本) | QPK-101<br>QPK-101T | -20℃ | ¥37,000<br>¥10,000                                                                                     |
| <b>SYBR® Green Realtime PCR Master Mix</b><br>(2×濃度)                    | 200回用 (1ml×5本)<br>40回用 (1ml×1本) | QPK-201<br>QPK-201T | -20℃ | ¥37,000<br>¥10,000                                                                                     |
| <b>SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-</b><br>(2×濃度) 【バージョンアップ品】 | 200回用 (1ml×5本)<br>40回用 (1ml×1本) | QPK-211<br>QPK-211T | -20℃ | ¥37,000<br>¥10,000  |
| 高効率逆転写キット<br><b>RevaTra Ace -α-</b> ® (逆転写酵素+dNTPs他)                    | 100回用                           | FSK-101             | -20℃ | ¥53,000                                                                                                |
| 高効率逆転写酵素<br><b>ReverTra Ace</b> ®                                       | 10,000U×1本<br>10,000U×5本        | TRT-101<br>TRT-102  | -20℃ | ¥15,000<br>¥60,000                                                                                     |
| <b>Oligo (dT)<sub>20</sub> Primer</b>                                   | 1nmole                          | FSK-201             | -20℃ | ¥8,000                                                                                                 |
| <b>Random Primer</b> (9mer)                                             | 2.5nmole                        | FSK-301             | -20℃ | ¥8,000                                                                                                 |
| <b>RNase Inhibitor</b> (Native type)                                    | 2,500U×1本<br>2,500U×5本          | SIN-101<br>SIN-102  | -20℃ | ¥9,000<br>¥36,000                                                                                      |
| <b>RNase Inhibitor</b> (Recombinant type)                               | 2,500U×1本<br>2,500U×5本          | SIN-201<br>SIN-202  | -20℃ | ¥9,000<br>¥36,000                                                                                      |

\*リアルタイムPCR Master Mixの使用回数は50μl反応を基準に記載しています。

※PCR (Polymerase Chain Reaction) は、F. Hoffman-La Roche社が米国特許 (特許番号4,683,195および4,683,202) を有しています。

PCRの実施に当たっては許可が必要となります。本品はF.Hoffman-La Roche社が有するPCRに関する特許の使用許可を示唆するものではありません。

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

※ABI PRISM®は、Applied Biosystems Inc.の登録商標です。 ※LightCycler™は、Idaho Technology Inc.の商標です。

## 測定機器

訪問デモ実施中 → 弊社ウェブサイト(お問い合わせ・ご請求コーナー) からご依頼いただけます。



| 品 名                                               | 包 装 | Code No.  | 保 存 | 価 格        |
|---------------------------------------------------|-----|-----------|-----|------------|
| 核酸増幅リアルタイムモニタリング装置<br><b>LineGene</b> (本体+ソフトウェア) | 一式  | BFFQD-33A | 室温  | ¥1,890,000 |

\*詳細な情報は弊社ウェブサイト、もしくはwww.bioflux.comをご覧ください。解析ソフトウェア等をダウンロードすることも可能です。

販売中止

製品及び原理等でご不明な点がございましたら。  
下記問い合わせ先までお気軽にお問い合わせください。

↓ (ウェブサイトをリニューアルして見やすくなりました)



### 東洋紡績株式会社

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@bio.toyobo.co.jp

ライフサイエンス事業部 (東京)

〒103-8530 東京都中央区日本橋小網町17番9号  
TEL.03-3660-4819 FAX.03-3660-4951  
E-mail order\_lifescience@bio.toyobo.co.jp

Toyoboテクニカルライン

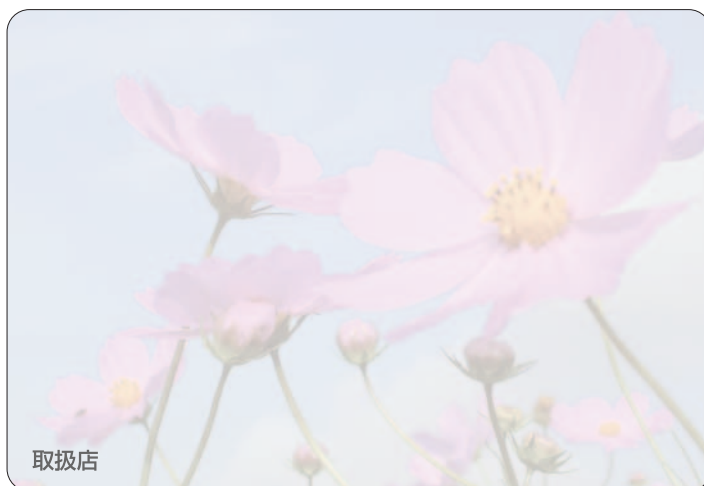
TEL.06-6348-3888  
(9:00~12:00 13:00~17:00 (土・日・祝を除く))

FAX.06-6348-3833

E-mail techosk@bio.toyobo.co.jp

Toyobo Web Site

[ <http://www.toyobo.co.jp/bio> ]



取扱店

本製品はすでに  
販売を中止して  
おります。

## Products

# Real Time PCR Primer/Positive Control Kit・FRET Probe Kit

リアルタイムPCR用プライマーセットとTaqMan®アッセイ用FRETプローブです。

リアルタイムPCR解析に最適なプライマーセット、およびTaqMan®アッセイ用のFRET Probeです。インターカレーターアッセイ、およびTaqMan®アッセイ (FRET Probe使用) にお使いいただけます。弊社のリアルタイムPCRマスターミックス試薬でのアッセイに最適です。

### 特長1 高い特異性

- ・増幅効率が高く、非特異的増幅が起こらないように設計されたプライマーセットです。

### 特長2 インターカレーターアッセイ、およびTaqMan®アッセイに最適

- ・Primer/Positive Control Kitを用いることによりインターカレーターアッセイ、加えてFRET Probe Kitを使用することでTaqMan®アッセイを簡便に行うことができます。プローブの5' 端はFAMで、3' 端に非蛍光クエンチャー (Black Hole Quenchar®) で標識されており、バックグラウンドの低い結果を得ることができます。

### 特長3 Flexible

- ・Primer/Positive Control Kitには、PCR用バッファーが含まれており、Taq DNA polymerase (Code No.:TAP-201など) やSYBR® Green I 等をご準備いただくことにより、そのままリアルタイムPCR用の試薬としてもご使用いただけます。弊社Realtime PCR Master Mixなどの専用試薬をご使用いただくことで、更に簡便に良好な結果を得ることが可能です (本誌p10~13に関連記事がございます)。

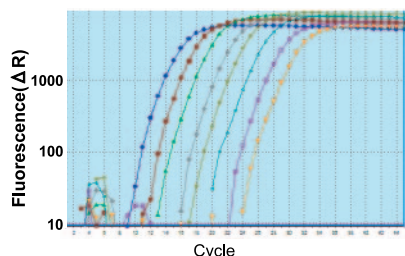


図1. SYBR® Greenアッセイ (IL-6)

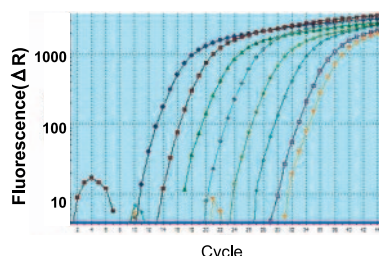


図2. TaqMan® アッセイ (HHV-6)

〈キット内容〉 (キットによって若干異なる場合がございます)

#### 【Primer/Positive Control Kit】

Primers (10×) 500μl  
Positive Control (DNA) 100μl  
<10<sup>6</sup>copies/μl>  
2×Realtime PCR Buffer 1250μl×2  
ddH<sub>2</sub>O (DNase free) 2.0ml

#### 【FRET Probe Kit】

FRET Probe (10×) 500μl

※Primer/Positive Control Kitの場合、製品名は『Real Time PCR Primer/Positive Control Kit “遺伝子名”』となります。

※FRET Probe Kitの場合、製品名は『Real Time PCR FRET Probe Kit “遺伝子名”』となります。

#### ●Human

| 遺 伝 子 名           | 包 装   | 保存温度 | Primer/Positive Control Kit |         | FRET Probe Kit |         |
|-------------------|-------|------|-----------------------------|---------|----------------|---------|
|                   |       |      | Code No.                    | 価 格     | Code No.       | 価 格     |
| Human GAPDH       | 100回用 | -20℃ | MBTM60001                   | ¥34,000 | MBTP10001      | ¥29,000 |
| Human 18S rRNA    | 100回用 | -20℃ | MBTM60002                   | ¥34,000 | MBTP10002      | ¥29,000 |
| Human Bax         | 100回用 | -20℃ | MBTM60003                   | ¥34,000 | MBTP10003      | ¥29,000 |
| Human Bcl-2       | 100回用 | -20℃ | MBTM60004                   | ¥34,000 | MBTP10004      | ¥29,000 |
| Human Bcl-xL      | 100回用 | -20℃ | MBTM60006                   | ¥34,000 | MBTP10006      | ¥29,000 |
| Human β-actin     | 100回用 | -20℃ | MBTM60007                   | ¥34,000 | MBTP10007      | ¥29,000 |
| Human c-Myc       | 100回用 | -20℃ | MBTM60008                   | ¥34,000 | MBTP10008      | ¥29,000 |
| Human Cyclophilin | 100回用 | -20℃ | MBTM60009                   | ¥34,000 | MBTP10009      | ¥29,000 |
| Human HER-2       | 100回用 | -20℃ | MBTM60011                   | ¥34,000 | MBTP10011      | ¥29,000 |
| Human IFN-γ       | 100回用 | -20℃ | MBTM60012                   | ¥34,000 | MBTP10012      | ¥29,000 |
| Human IL-10       | 100回用 | -20℃ | MBTM60013                   | ¥34,000 | MBTP10013      | ¥29,000 |
| Human IL-1 β      | 100回用 | -20℃ | MBTM60016                   | ¥34,000 | MBTP10016      | ¥29,000 |
| Human IL-6        | 100回用 | -20℃ | MBTM60020                   | ¥34,000 | MBTP10020      | ¥29,000 |

| 遺伝子名                | 包装    | 保存温度 | Primer/Positive Control Kit |         | FRET Probe Kit |         |
|---------------------|-------|------|-----------------------------|---------|----------------|---------|
|                     |       |      | Code No.                    | 価格      | Code No.       | 価格      |
| Human p21           | 100回用 | -20℃ | MBTM60022                   | ¥34,000 | MBTP10022      | ¥29,000 |
| Human p27           | 100回用 | -20℃ | MBTM60023                   | ¥34,000 | MBTP10023      | ¥29,000 |
| Human p53           | 100回用 | -20℃ | MBTM60024                   | ¥34,000 | MBTP10024      | ¥29,000 |
| Human TERT          | 100回用 | -20℃ | MBTM60025                   | ¥34,000 | MBTP10025      | ¥29,000 |
| Human TNF- $\alpha$ | 100回用 | -20℃ | MBTM60026                   | ¥34,000 | MBTP10026      | ¥29,000 |
| Human IL-4          | 100回用 | -20℃ | MBTM60028                   | ¥34,000 | MBTP10028      | ¥29,000 |
| Human IL-8          | 100回用 | -20℃ | MBTM60030                   | ¥34,000 | MBTP10030      | ¥29,000 |
| Human IL-18         | 100回用 | -20℃ | MBTM60031                   | ¥34,000 | MBTP10031      | ¥29,000 |
| Human sFLT1         | 100回用 | -20℃ | MBTM60044                   | ¥34,000 | MBTP10044      | ¥29,000 |
| Human Caspase-1     | 100回用 | -20℃ | MBTM60049                   | ¥34,000 | MBTP10049      | ¥29,000 |
| Human Caspase-3     | 100回用 | -20℃ | MBTM60050                   | ¥34,000 | MBTP10050      | ¥29,000 |
| Human FAS           | 100回用 | -20℃ | MBTM60051                   | ¥34,000 | MBTP10051      | ¥29,000 |
| Human FAS Ligand    | 100回用 | -20℃ | MBTM60052                   | ¥34,000 | MBTP10052      | ¥29,000 |
| Human MMP-3         | 100回用 | -20℃ | MBTM60053                   | ¥34,000 | MBTP10053      | ¥29,000 |
| Human IBP-3         | 100回用 | -20℃ | MBTM60054                   | ¥34,000 | MBTP10054      | ¥29,000 |

●Mouse

| 遺伝子名                 | 包装    | 保存温度 | Primer/Positive Control Kit |         | FRET Probe Kit |         |
|----------------------|-------|------|-----------------------------|---------|----------------|---------|
|                      |       |      | Code No.                    | 価格      | Code No.       | 価格      |
| Mouse FLK            | 100回用 | -20℃ | MBTM60005                   | ¥34,000 | MBTP10005      | ¥29,000 |
| Mouse APE            | 100回用 | -20℃ | MBTM60014                   | ¥34,000 | MBTP10014      | ¥29,000 |
| Mouse CD61           | 100回用 | -20℃ | MBTM60015                   | ¥34,000 | MBTP10015      | ¥29,000 |
| Mouse CTA            | 100回用 | -20℃ | MBTM60017                   | ¥34,000 | MBTP10017      | ¥29,000 |
| Mouse FNE            | 100回用 | -20℃ | MBTM60018                   | ¥34,000 | MBTP10018      | ¥29,000 |
| Mouse MGP            | 100回用 | -20℃ | MBTM60019                   | ¥34,000 | MBTP10019      | ¥29,000 |
| Mouse PGFR           | 100回用 | -20℃ | MBTM60021                   | ¥34,000 | MBTP10021      | ¥29,000 |
| Mouse $\beta$ -Actin | 100回用 | -20℃ | MBTM60032                   | ¥34,000 | MBTP10032      | ¥29,000 |
| Mouse 18S            | 100回用 | -20℃ | MBTM60033                   | ¥34,000 | MBTP10033      | ¥29,000 |
| Mouse Bcl-2          | 100回用 | -20℃ | MBTM60035                   | ¥34,000 | MBTP10035      | ¥29,000 |
| Mouse GAPDH          | 100回用 | -20℃ | MBTM60036                   | ¥34,000 | MBTP10036      | ¥29,000 |
| Mouse IL-12p40       | 100回用 | -20℃ | MBTM60037                   | ¥34,000 | MBTP10037      | ¥29,000 |
| Mouse IL-18          | 100回用 | -20℃ | MBTM60038                   | ¥34,000 | MBTP10038      | ¥29,000 |
| Mouse IL-1 $\beta$   | 100回用 | -20℃ | MBTM60039                   | ¥34,000 | MBTP10039      | ¥29,000 |
| Mouse IL-2           | 100回用 | -20℃ | MBTM60040                   | ¥34,000 | MBTP10040      | ¥29,000 |
| Mouse IL-3           | 100回用 | -20℃ | MBTM60041                   | ¥34,000 | MBTP10041      | ¥29,000 |
| Mouse IL-6           | 100回用 | -20℃ | MBTM60042                   | ¥34,000 | MBTP10042      | ¥29,000 |
| Mouse TNF- $\alpha$  | 100回用 | -20℃ | MBTM60043                   | ¥34,000 | MBTP10043      | ¥29,000 |
| Mouse sFLT1          | 100回用 | -20℃ | MBTM60045                   | ¥34,000 | MBTP10045      | ¥29,000 |

●Virus/Bacteria

| 遺伝子名                              | 包装    | 保存温度 | Primer/Positive Control Kit |          | FRET Probe Kit |           |
|-----------------------------------|-------|------|-----------------------------|----------|----------------|-----------|
|                                   |       |      | Code No.                    | 価格       | Code No.       | 価格        |
| HHV6                              | 100回用 | -20℃ | MBTM60027                   | ¥34,000  | MBTP10027      | ¥29,000   |
| CMV, Major immediately early gene | 100回用 | -20℃ | MBTM60034                   | ¥34,000  | MBTP10034      | ¥29,000   |
| HBV+Internal Control              | 100回用 | -20℃ | MBTM60046I                  | ¥49,000* | MBTP10046I     | ¥53,000** |
| HCV+Internal Control              | 100回用 | -20℃ | MBTM60047I                  | ¥49,000* | MBTP10047I     | ¥53,000** |
| CTR                               | 100回用 | -20℃ | MBTM60048                   | ¥34,000  | MBTP10048      | ¥29,000   |
| CTR+Internal Control              | 100回用 | -20℃ | MBTM60048I                  | ¥49,000* | MBTP10048I     | ¥53,000** |

\*インターナルコントロールが添付が添付されています。  
 \*\*ROX標識したインターナルコントロール特異的TaqMan®プローブが添付されています。2波長で励起可能な検出機が必要です。  
 ※詳しくは、MBIのホームページ (<http://www.maximbio.com/>) をご覧ください。  
 ※SYBR®は、Molecular Probes Incの登録商標です。TaqMan®はRoche Molecular Systems Inc.の登録商標です。  
 ※Black Hole Quencher®は Biosearch Technologies, Inc.の登録商標です。

## Products

核酸増幅リアルタイムモニタリング装置

# LineGene

本製品はすでに  
販売を中止して  
おります。

核酸の増幅過程をリアルタイムモニタリング。コストパフォーマンスに自信あり。

LineGeneは、核酸の増幅過程をリアルタイムにモニタリングする装置です。33フォーマットのパーソナル設計で、再現性と精度に優れています。機器本体価格、およびランニングコストについて高パフォーマンスを実現しています。

### 特長1 優れたコストパフォーマンス

- ・測定に専用チューブやキャピラリーは不要で、汎用0.2ml PCR用チューブを使用できます。
  - ・少ない反応ボリューム（10μl〜）で安定した結果を実現します。
  - ・試薬ランニングコストを低減※します。
- ※反応ボリューム10μlで…37円/チューブ（弊社キットSYBR® Green Realtime PCR Master Mixを用いた場合）

### 特長2 高感度オプティカルユニット

- ・励起光源は、発熱性が低く安定かつ長寿命のBlue LEDを採用しています。
- ・検出器は、検出限界が高く高速応答低ノイズのPMTを採用しています。
- ・この光学系により、蛍光シグナル信号を高感度かつ高速に読み取り可能です。

### 特長3 多様な系に対応

- ・対応試薬は、SYBR® Green I、TaqMan® Probes（レポーター分子：FAM、クエンチャー分子：TAMRA）、Hybridization Probes、Molecular Beaconなど、多様な系に対応します。
- 励起波長：470nm
- 検出波長：530nm、640nm、710nm

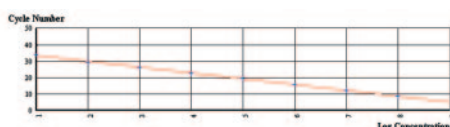
### 特長4 ソフトウェア

- ・増幅曲線のリアルタイム表示により、反応の進行状況を確認可能です。また、ランニング中にグラフのスケールを拡大し反応初期の微小な蛍光をモニタリングすることも可能です。
- ・増幅の程度に合わせ、反応中にサイクルを追加、削除することも可能です。
- ・定量解析および融解曲線解析（SYBR® Green I アプリケーション）のどちらも可能です。
- ・測定の生データをダウンロード可能。

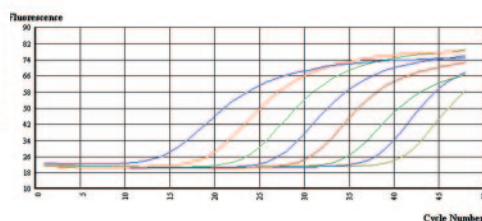
## 性能

■テンプレート濃度2倍差の検出  
初期の鋳型濃度が2倍差のサンプルを、はっきりと区別して検出できます。

■ウェル間均一性  
全ウェルにわたり同等の解析が可能です。



■ダイナミックレンジ（図上・右）  
広範囲かつ正確に未知試料を定量できます。  
10コピー程度の低濃度での検出も可能です。



## 主な仕様



サンプル容量：0.2ml×33本  
励起波長：470nm  
検出波長：530nm 640nm 710nm  
励起光源：Blue LED  
蛍光検出器：フォトマルチプライヤーチューブ（PMT）  
温度制御範囲：30℃～99℃  
温度変化率：最大4℃/sec  
(2ステップ、45サイクルの反応=約90分)

温度精度（設定温度）：  
≤±0.5℃（95℃） ≤±0.3℃（72℃） ≤±0.2℃（55℃）  
温度均一性（設定温度）：  
≤±1.0℃（95℃） ≤±0.5℃（72℃） ≤±0.3℃（55℃）  
電源：100V 50/60Hz  
最大消費電力：1000W  
外形寸法：W514×D456×H292（mm）  
重量：23kg

※製品の性能および仕様・外観は改良のため予告なく変更することがある。

| 品名及び内容                                      | 包装 | Code No.  | 価格         |
|---------------------------------------------|----|-----------|------------|
| 核酸増幅リアルタイムモニタリング装置<br>LineGene（本体 + ソフトウェア） | 1式 | BFFQD-33A | ¥1,890,000 |

※SYBR®は、Molecular Probes社の登録商標です。

※TaqMan®は、Roche Molecular Systems社の登録商標です。

※Hybridization ProbesはHoffman La Roche社の実施許諾が必要です。

### ●訪問デモを行っております

ご依頼は、弊社ウェブサイト（<http://www.toyobo.co.jp/bio>）の『お問い合わせ・ご請求』のコーナーから行うことができます。お気軽にお問い合わせください。

## Products

高正確性PCR用酵素

# KOD -Plus- / KOD -Plus- Ver.2

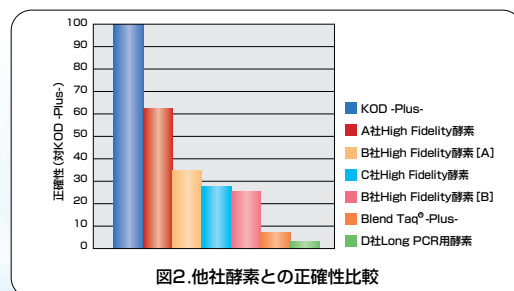
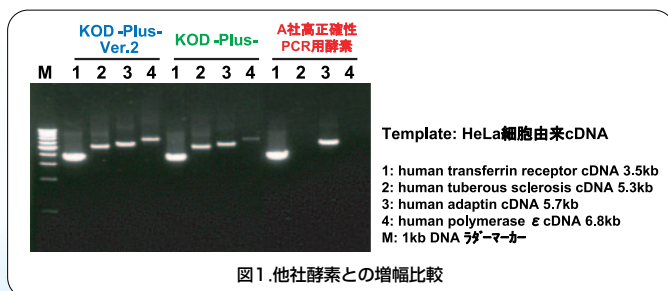
リアルタイムPCR用のコントロール遺伝子のクローニングにも力を発揮します。

本酵素は、KOD DNA polymeraseをベースに開発された高正確性PCR用酵素です。ホットスタート対応で、特性の高いPCRを実現しています（2種類の抗KOD Pol.抗体を混合）。KOD -Plus- Ver.2は、バッファーの改良により、正確性を保ちつつPCRリライアビリティ（成功率）を向上させています。

### 特長 高い正確性

- ・3'→5' エキソヌクレアーゼ活性によって非常に高い正確性を示します（Taq pol.の約80倍）。増幅したPCRプロダクトの末端は平滑化されますが、TARGet Clone™ -Plus-（Code No.: TAK-201：本誌P9に掲載）を用いることによってTAクローニングすることも可能です。

### 実施例



| 品 名              | 包 装      | 保存温度 | Code No. | 価 格      |
|------------------|----------|------|----------|----------|
| KOD -Plus-       | 200U× 1本 | -20℃ | KOD-201  | ¥30,000  |
|                  | 200U× 5本 |      | KOD-202  | ¥120,000 |
|                  | 200U×11本 |      | KOD-203  | ¥230,000 |
| KOD -Plus- Ver.2 | 200U× 1本 | -20℃ | KOD-211  | ¥32,000  |

※PCR (Polymerase Chain Reaction) は、F. Hoffman-La Roche社が米国特許（特許番号4,683,195および4,683,202）を有しています。PCRの実施に当たっては許可が必要となります。本品はF. Hoffman-La Roche社が有するPCRに関する特許の使用許可を示唆するものではありません。

## みんなの広場

### 実験川柳特集

今回は日々の実験の一コマをユニークに切り取った実験川柳を特集いたします。沢山のご投句ありがとうございました。

●詠み人 匿名希望 OHさん

ウェスタン 欲しいバンドは どうしたん

【句評】なかなか良いセンスですね。バンドが得られない場合は、是非、Can Get Signal®をお使いくださいませ。

暗室で 男3人 汗だくに

【句評】あまり遭遇したくない状況ですね。何の実験だったのでしょうか？

エタ沈で 取れた沈殿 流れ落ち

【句評】日常の光景が良く詠めていると思います。少なくとも一度といわず遭遇する体験ですね。

<OHさん、沢山ご投句ありがとうございました。またお待ちしております！>

●詠み人 匿名希望 さすらいのサーファーさん

P2室 バーナー焚いたら 酸欠状態

【句評】かなり字余りですが、リアルな句ですね…。換気の悪い部屋の火気の取り扱いにはお気をつけて！

●詠み人 匿名希望 リクロマトの達人さん

今度こそ 活性宿れ このピーク

【句評】あまりなりたくない達人ですね…。ぎりぎりの心理状態がよく詠めています。その蛋白質、きちんと活性があるといいですね。

募集要項が同封のアンケートの裏面  
ございます。奮ってご応募ください。

受付は終了  
しております

# プロテインキナーゼ・ホスファターゼ 基質ペプチド

■2006年12月6日～2007年2月26日の期間中、プロテインキナーゼ・ホスファターゼ基質ペプチドを20%OFFでご購入いただけます。

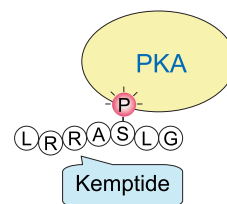
プロテインキナーゼ・ホスファターゼの活性測定に最適な高純度ペプチドです。

AnaSpec社は、様々なペプチド関連試薬を扱っている米国のペプチドカンパニーです。今回、プロテインキナーゼ・ホスファターゼの基質ペプチドを対象に20%OFFでお届けします。ここに掲載した以外にも、アミド化、ビオチン化、蛍光化ペプチド(FAM、TAMRA化等)なども含め、100以上のペプチドを対象といたします。詳しくは、弊社ホームページ(<http://www.toyobo.co.jp/bio>)『キャンペーン』コーナーをご覧ください。一覧表をご参照いただけます。

## 一口メモ

プロテインキナーゼ・ホスファターゼ活性の測定には、N末端をビオチンや蛍光物質で標識したものも使用されます。また、非特異反応を軽減するためにC末端のカルボキシル基をアミド化して使用する場合があります。

有名なペプチド基質には、名前が付いているものも多く存在します。



保存温度：-20℃

| 品名及び内容                                                          | 包装  | Code No.  | 価 格     | キャンペーン<br>価 格 | 参考文献                                                                                                          |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----------|---------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CREBtide [KRREILSRPSYR]                                         | 1mg | AS60510-1 | ¥19,000 | ¥15,200       | Nucleic Acids Res. 20, 6106 (1992).                                                                           |
| Kemptide [LRRASLG]                                              | 5mg | AS22594   | ¥12,000 | ¥9,600        | Insect Biochem. Mol. Biol. 32, 505 (2002); Eur. J. Biochem. 252, 245 (1998).                                  |
| PKA; PKC; MAPKAP-K1 Substrate [RRRLSSLRA-NH <sub>2</sub> ]      | 1mg | AS29983-1 | ¥18,000 | ¥14,400       | Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83, 5968 (1986); FEBS Lett. 175, 219 (1984); J. Biochemistry 42, 849 (2003).  |
| PKC $\mu$ Substrate [AALVRQMSVAFFFK]                            | 1mg | AS29924-1 | ¥18,000 | ¥14,400       | J. B. C. 278, 319 (2003); J. B. C. 277, 45451 (2002); J. B. C. 272, 952 (1997).                               |
| PKC Substrate [RRGRTGRGRRGIFR]                                  | 1mg | AS60542-1 | ¥19,000 | ¥15,200       | J. B. C. 381, 19-27 (2000); J. B. C. 274, 30722-8 (1999).                                                     |
| PKC $\delta$ Substrate [RFAVRDMRQTVAVGVKAVDDKK]                 | 1mg | AS60560-1 | ¥19,000 | ¥15,200       | J. B. C. 277, 41850 (2002); J. B. C. 270, 6156 (1995); J. B. C. 266, 14390 (1991).                            |
| Protein Kinase C $\epsilon$ Peptide Substrate [ERMPRKRQGSVRRRV] | 1mg | AS27183   | ¥21,000 | ¥16,800       | J. B. C. 265, 7301 (1990); FEBS Lett. 243, 351 (1989).                                                        |
| MARCKS Protein (154-165) [KKRFSEFKSKFL]                         | 1mg | AS27165   | ¥12,000 | ¥9,600        | Pharmacol. Ther. 93, 271 (2002); J. B. C. 272, 4072 (1997); J. B. C. 268, 1501(1993).                         |
| Glycogen Synthase 1-8 [PLSRTLSSVAACK-NH <sub>2</sub> ]          | 1mg | AS23013   | ¥12,000 | ¥9,600        | Biochem. J. 268, 303 (1990); J. B. C. 262, 772 (1987); J. B. C. 260, 14471 (1985).                            |
| Neurogranin 28-43 [AAKIQASFRGHMARKK]                            | 1mg | AS27173   | ¥20,000 | ¥16,000       | Biophys. J. 72, 554 (1997); Biochemistry 32, 1032 (1993).                                                     |
| Protein Kinase G Substrate [QKRPRRKDTP]                         | 1mg | AS27185   | ¥18,000 | ¥14,400       | Cell 112, 77 (2003); J. B. C. 274, 3485 (1999).                                                               |
| PKG Substrate [RKRSRAE]                                         | 1mg | AS60298-1 | ¥14,000 | ¥11,200       | J. B. C. 274, 3485-95 (1999); J. B. C. 221, 581-93 (1994).                                                    |
| BPDEtide [RKISASEFDRPLR]                                        | 1mg | AS60506-1 | ¥19,000 | ¥15,200       | J. Pharmacol. Exp. Ther. 283, 885 (1997); J. B. C. 258, 11391 (1983).                                         |
| Autocamtide-2 [KKALRRQETVDAL]                                   | 1mg | AS60249-1 | ¥13,000 | ¥10,400       | Brain Res. 962, 41 (2003); Brain Res. 851, 54 (1999); Am. J. Physiol. 274, E708 (1998).                       |
| Autocamtide-3 [KKALHRQETVDAL]                                   | 1mg | AS29973-1 | ¥17,000 | ¥13,600       | J. Appl. Physiol. 88, 352 (2000); J. B. C. 274, 26199 (1999).                                                 |
| Syntide-2 [PLARTLSVAGLPGKK]                                     | 1mg | AS22551   | ¥12,000 | ¥9,600        | Neurosci. Lett. 336, 121-5 (2003); B. B. R. C. 215, 861-7 (1995); Arch. Biochem. Biophys. 252, 418-25 (1987). |
| Glycogen Synthase 1-10 [PLSRTLSSVSS-NH <sub>2</sub> ]           | 1mg | AS60514-1 | ¥19,000 | ¥15,200       | Brain Res. 962, 41 (2003); J. B. C. 265, 17613 (1990).                                                        |
| CaM Kinase II Substrate 281-291 [MHRQETVDCLK-NH <sub>2</sub> ]  | 1mg | AS29954-1 | ¥14,000 | ¥11,200       | Neurosci. Lett. 336, 121 (2003); J. B. C. 266, 15391 (1991).                                                  |
| AKT/PKB/Rac-Protein Kinase Substrate [ARKRERTYSFGHHA]           | 1mg | AS29944-1 | ¥17,000 | ¥13,600       | J. B. C. 275, 36108 (2000); Annu. Rev. Biochem. 68, 965 (1999).                                               |
| Crosstide [GRPRTSSFAEG]                                         | 1mg | AS60209-1 | ¥12,000 | ¥9,600        | B. B. R. C. 293, 1191 (2002); J. B. C. 272, 30491 (1997); Annu. Rev. Biochem. 68, 965 (1999).                 |
| CDK1 Substrate [HATPPKKKKRK]                                    | 1mg | AS60522-1 | ¥19,000 | ¥15,200       | J. Biochemistry 42, 849-56 (2003); Cell 112, 243-56 (2003).                                                   |
| CDK5 Substrate [PKTPKKAKKL]                                     | 1mg | AS60026-1 | ¥16,000 | ¥12,800       | J. Biochemistry 42, 849-56 (2003); J. B. C. 274, 9600-6 (1999).                                               |
| Protein Kinase p34 (cd2) Substrate [ADAQHATPPKKKKKVEDPKDF]      | 1mg | AS22579   | ¥22,000 | ¥17,600       | J. B. C. 278, 5062 (2003); J. Cell. Biochem. 45, 391 (1991).                                                  |
| Tyrosine Hydroxylase 24-33 [KQAEAVTSPR]                         | 1mg | AS60294-1 | ¥15,000 | ¥12,000       | Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 2365-9 (1992); Ann. N. Y. Acad. Sci. 973, 265-7 (2002).                   |
| EGF Receptor 661-681 [KRELVEPLTPSGEAPNQALLR-NH <sub>2</sub> ]   | 1mg | AS29969-1 | ¥34,000 | ¥27,200       | Int. J. Impot. Res. 14, 217; J. B. C. 268, 7646 (1993); J. B. C. 266, 15277 (1991).                           |
| Casein Kinase I Substrate [RRKDLHDDEEAMSAITA]                   | 1mg | AS60547-1 | ¥19,000 | ¥15,200       | B. B. R. C. 198, 898 (1994); Cell Mol. Biol. Res. 40, 383 (1994).                                             |
| Casein Kinase II Substrate [RRADDSDDDDDD]                       | 1mg | AS60537-1 | ¥19,000 | ¥15,200       | J. B. C. 278, 4474 (2003); Arch. Biochem. Biophys. 325, 289 (1994); B. B. R. C. 198, 898 (1994).              |
| Tyrosine Kinase Peptide 1 [KVEKIGEGTYGVVYK]                     | 1mg | AS60551-1 | ¥19,000 | ¥15,200       | J. Cell Physiol. 194, 13 (2003); Clin. Cancer Res. 9, 516S (2003); Int. J. Pept. Protein Res. 45, 587 (1995). |
| Tyrosine Kinase Peptide 3 [RRLIEDAEYAARG]                       | 1mg | AS22581   | ¥12,000 | ¥9,600        | J. Cell Physiol. 194, 13 (2003); Clin. Cancer Res. 9, 516S (2003); Int. J. Pept. Protein Res. 45, 587 (1995). |
| p60c-src Substrate I [YIYGSKF]                                  | 1mg | AS27197   | ¥12,000 | ¥9,600        | Int. J. Pept. Protein Res. 45, 587-92 (1995); Harvey Lect. 94, 81-119 (1998).                                 |

※詳細に関しましては、<http://www.anaspec.com/>をご参照ください。

本製品はすでに  
販売を中止して  
おります。

## QTL LightSpeed® Assay Kitを用いた プロテインキナーゼの活性測定

-One product for biochemical and cell-based assays-

Frauke Rininsland and Casey Stankewicz (QTL Biosystems : URL: <http://www.qtlbio.com/>)

### はじめに

ゲノムプロジェクトによって明らかとなった500を超える一群のプロテインキナーゼは、今日、ゲノム創薬に適したターゲットの有力候補の一つであると考えられています。既に幾つかのプロテインキナーゼは、主だったシグナル経路の重要な構成要素として研究が進む一方、様々な疾病（ガン、炎症、神経疾患、心臓血管病、および代謝疾患など）との関係が報告されています。

今後、プロテインキナーゼ経路の理解と新規医薬品開発のためには、精製酵素を用いる「生化学的アッセイ」、および細胞粗抽出液を用いる「細胞ベースアッセイ (cell-based assay)」の両方に対応できる活性測定法が必要であると考えられています。生化学的アッセイ法は、反応キネティクスの研究や、阻害物質のスクリーニングなどに有用です。一方、細胞ベースアッセイは、生理的条件下での酵素活性の検討や、機能スクリーニングなどの研

究に不可欠であるといえます。また、プロテインキナーゼの細胞ベースアッセイは、医薬品開発の初期のステージにおける、毒性や代謝の検討などにおいても有用であると考えられています。

しかし、「生化学的アッセイ」と細胞抽出液を用いる「細胞ベースアッセイ」の両方に対応可能な活性測定試薬は思ったほど一般化していないのが現状です。スーパークエンチング法をベースに弊社で開発した『QTL LightSpeed®シリーズ』は「生化学的アッセイ」、および「細胞ベースアッセイ」に適したアッセイ試薬の一つです<sup>1)</sup>。今回、srcキナーゼのアッセイを例として、ご紹介いたします。

### 【QTL LightSpeed® シリーズの特長】

#### 1. スーパークエンチング法を採用

市販の蛍光リーダーを用いて高感度で測定可能です。また、抗体を使用しないため、様々なアッセイに応用できます。洗浄工程は不要です。

#### 2. HTSや細胞ベースアッセイに最適

#### 3. 様々な用途に対応

##### ● Universal assay Development Kit

⇒TAMRA標識ペプチドを合成いただくことで任意のプロテインキナーゼのアッセイ系の構築が可能

##### ● Kinase Activity Assay for Protein substrate Kit

⇒タンパク質基質を用いた活性測定<sup>3)</sup>が可能

##### ● PI3K Activity Assay Kit

⇒PI3Kのような非ペプチド基質をターゲットするキナーゼの活性測定が可能<sup>2)</sup>

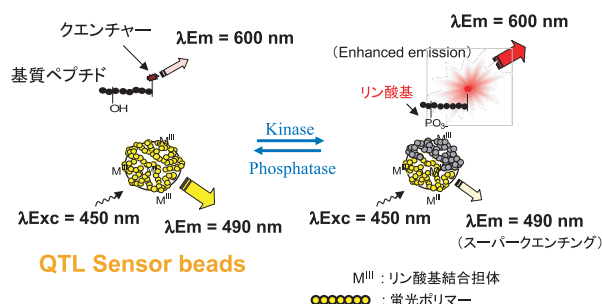


図1. スーパークエンチング法の原理

リン酸化を受けたペプチドが、リン酸結合担体へ結合することにより、クエンチャーがQTLセンサー（蛍光ポリマーを結合した微小ビーズ）に接近し、ポリマー単位での消光（スーパークエンチング）が生じます。また、この消光とは反対に、クエンチャーに起因する蛍光は増大するので（enhanced emission）、2波長の比を求めることによって、化合物に起因する蛍光ノイズを低減したよりクリアなデータを得ることもできます<sup>2)</sup>。

### 方法および結果（生化学的アッセイ）

図2は、リコンビナント法で発現させ精製したserキナーゼの濃度依存的な活性検出曲線を示しています。また、図3は阻害剤の一種であるStaurosporineの濃度依存的な阻害効果を示しています。アッセイには、QTL LightSpeed® src Kinase Activity assayを使用しました。この様に本試薬は、通常の生化学アッセイ系を用いたHTSなどの用途に適している試薬といえます。

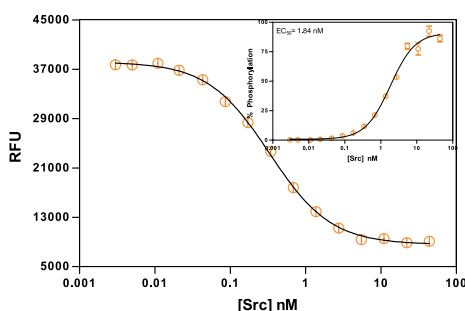


図2. QTL Lightspeed® Kitによるsrc活性測定。serキナーゼを段階希釈し、490 nmの減少（スーパークエンチング）を指標として測定した結果を示します（基質: 1 μM, ATP: 100 μM）。中のグラフは基質ペプチドのリン酸化率を示しています。

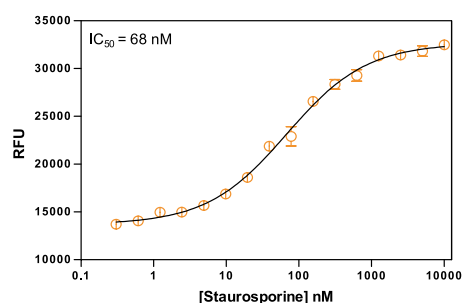


図3. srcの阻害アッセイ。様々な濃度のStaurosporine存在下でのserキナーゼの活性を示しています（基質: 1 μM, ATP 6 μM）。その結果、StaurosporineのIC50は40 nMと算出されました。

## 細胞ベースアッセイ

細胞ベースアッセイは、ヒト扁平上皮癌細胞株A431細胞の内在性のsrcタンパク質をターゲットとして、同試薬を用いて解析を行いました。今回のプロトコル<sup>4)</sup>を用いると、細胞培養、細胞の溶解、およびキナーゼアッセイを全て96穴プレートのウェル内で行うことが可能です。

図4にアッセイの結果を示しました。値が低いほど活性が強いことを示しています。図5は、細胞ベースアッセイ時にser特異的阻害剤を添加したときの阻害カーブを示しています。こちらは、値が高いほど阻害活性が強いことを示しています。両実験ともに良好な結果を得ることができました。

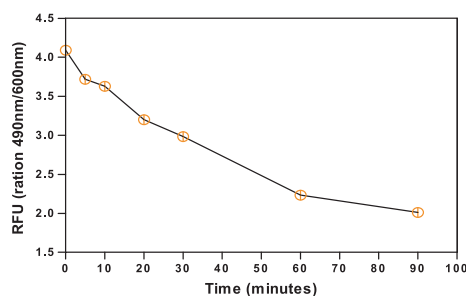


図4. 細胞抽出液を用いたアッセイ例  
A431細胞を96-well white plateで培養した後、20  $\mu$ LのLysis Bufferを添加し、細胞を溶解しました。その後、基質(キット添付)を最終1  $\mu$ Mになるように添加し、ATPを添加することによって反応を開始しました(ATP終濃度 100  $\mu$ M)。反応をpostreaction buffer(キット添付)を加えて停止させ、等量の1 $\times$ Sensor(キット添付)を加えて停止した後、450nmで励起し、490nmと600nmを測定した後、490nm/600nmの比を活性としてプロットしました。

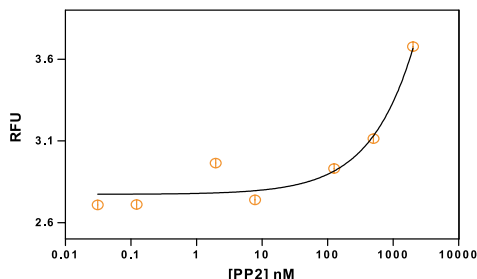


図5. 細胞抽出液を用いた阻害剤実験  
細胞を溶解した後、serの特異的阻害剤であるPP2を段階希釈して各ウェルに添加しました。その他の工程は図4と同じ方法を用いて検出を行いました。

今日、多くのペプチド基質は、一つ以上のプロテインキナーゼによってリン酸化を受けることが知られています。そこで、細胞抽出液中の特定のプロテインキナーゼの活性を測定する方法として、目的のキナーゼに対する抗体を用いてアフィニティー精製を行った後に活性を測定する次のような方法を考案いたしました<sup>4)</sup>。

まず、protein A/Gコートされた96穴プレートに抗キナーゼ抗体を結合させたプレートに、細胞抽出液を加えます。十分結合を行わせた後、洗浄を行い、非特異的に吸着したタンパク質類を除去します。その後、各ウェルに基質溶液を加え反応を行い、上清を蛍光測定用の白色プレートに移し、前述の方法に従って活性

を測定します。図6、7は、この方法を用いて測定したそれぞれの酵素濃度依存的な反応曲線、および阻害剤(Staurosporine)濃度依存的な阻害曲線を示しています。

この方法は、従来の煩雑な免疫沈降試薬を用いる方法に比べ簡便で、96穴プレートを用いることができるため、迅速アッセイに向く方法といえます。ここでは、srcキナーゼについて紹介しましたが、他のプロテインキナーゼへ応用することも可能です。

今回、本システムがHTSなどの生化学的アッセイから、細胞ベースアッセイまで幅広くご使用いただけることをお示しました。是非一度本システムをお試ください。

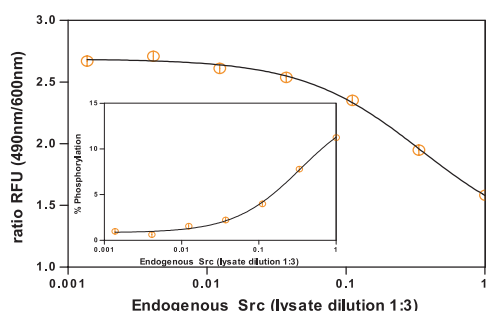


図6. プレート精製したsrcの濃度依存的反応曲線  
段階希釈したA431細胞抽出液を100ngの抗-vSrc抗体を結合したprotein A/Gプレートを用いて精製した後、基質: 0.5  $\mu$ M、ATP: 75  $\mu$ Mを含む反応液で反応を行いました。中のグラフは、算出したリン酸化率を示しています。

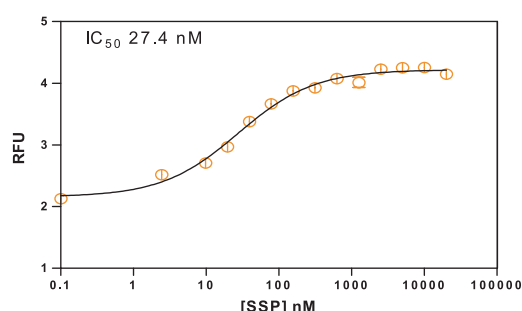


図7. プレート精製したsrcを用いた阻害剤アッセイ  
段階希釈したA431細胞抽出液を100ngの抗-vSrc抗体を結合したprotein A/Gプレートを用いて精製した後、基質: 0.5  $\mu$ M、ATP: 10  $\mu$ M、希釈した阻害剤(Staurosporine)を含む反応液で反応を行った。その結果、StaurosporineのIC50は40 nMと算出されました。

### 参考文献

- 1) Rininsland F. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**(43): 15295-15300 (2004)
- 2) Stankewicz C. and Rininsland F. *J. Biomol. Screen.* **11**(4): 413-422 (2006)
- 3) Rininsland F. *et al.*, *BMC Biotechnol.*, **5**: 16 (2005)
- 4) <http://www.qtlbio.com/O6/pdf/GA dyepepcell.pdf>

この度、センサービーズの製法を改良することにより、安価で安定な供給ができるようになりました。是非、この機会にお試ください。また、技術導入相談等もお受けいたします。相談がございましたら、東洋紡テクニカルライン(TEL: 06-6348-3888、E-mail: techosk@bio.toyobo.co.jp)までお気軽にお問い合わせください。

## QTLセンサービーズのみのバルク供給を開始いたします。お問い合わせください。

【30μlアッセイ系】

400 data point ➡ ¥50/well  
 800 data point ➡ ¥25/well  
 3,000~6,000 data point ➡ ¥20/well  
 > 6,000 data point ➡ ¥10/well

アッセイには、QTLセンサービーズの他に、以下の試薬が必要です。  
 詳細につきましては、お問い合わせください。

- ・ TAMRA標識基質ペプチド（自家調製可能）
- ・ アッセイバッファー（自家調製可能）  
（必要に応じて）
- ・ TAMRA標識キャリアレーション用ペプチド（リン酸化ペプチド）
- ・ Postreaction buffer

※キットのバルク見積りお受けいたします。※TAMRA標識ペプチドの合成お受けいたします。お問い合わせください。

価格改定  
しました

|   | 品 名 及 び 内 容                                                                                     | 包 装               | 保存温度    | Code No.   | 価 格      |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|---------|------------|----------|
| Ⓔ | QTL LightSpeed® Abl Kinase Activity Assay                                                       | 100回用(60μl/well)  | 4℃      | QTK017K100 | ¥49,000  |
|   |                                                                                                 | 400回用(30μl/well)  |         | QTK017K400 | ¥88,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® Akt1/PKBα Kinase Activity Assay                                                 | 100回用(60μl/well)  | 4℃      | QTK002K100 | ¥49,000  |
|   |                                                                                                 | 400回用(30μl/well)  |         | QTK002K400 | ¥88,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® Aurora A Kinase Activity Assay                                                  | 100回用(60μl/well)  | 4℃・-20℃ | QTK014K100 | ¥49,000  |
|   |                                                                                                 | 400回用(30μl/well)  |         | QTK014K400 | ¥88,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® Erk1/Erk2 Kinase Activity Assay                                                 | 100回用(60μl/well)  | 4℃      | QTK016K100 | ¥49,000  |
|   |                                                                                                 | 400回用(30μl/well)  |         | QTK016K400 | ¥88,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® Fyn Kinase Activity Assay                                                       | 100回用(60μl/well)  | 4℃      | QTK015K100 | ¥49,000  |
|   |                                                                                                 | 400回用(30μl/well)  |         | QTK015K400 | ¥88,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® IRAK4 Kinase Activity Assay                                                     | 100回用(60μl/well)  | 4℃      | QTK024K100 | ¥49,000  |
|   |                                                                                                 | 400回用(30μl/well)  |         | QTK024K400 | ¥88,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® Jnk3 Kinase Activity Assay                                                      | 100回用(60μl/well)  | 4℃      | QTK021K100 | ¥49,000  |
|   |                                                                                                 | 400回用(30μl/well)  |         | QTK021K400 | ¥88,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® Lyn Kinase Activity Assay                                                       | 100回用(60μl/well)  | 4℃      | QTK012K100 | ¥49,000  |
|   |                                                                                                 | 400回用(30μl/well)  |         | QTK012K400 | ¥88,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® Msk Kinase Activity Assay                                                       | 100回用(60μl/well)  | 4℃      | QTK020K100 | ¥49,000  |
|   |                                                                                                 | 400回用(30μl/well)  |         | QTK020K400 | ¥88,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® p38α Kinase Activity Assay                                                      | 100回用(60μl/well)  | 4℃      | QTK004K100 | ¥49,000  |
|   |                                                                                                 | 400回用(30μl/well)  |         | QTK004K400 | ¥88,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® p70S6 Kinase Activity Assay                                                     | 100回用(60μl/well)  | 4℃      | QTK008K100 | ¥49,000  |
|   |                                                                                                 | 400回用(30μl/well)  |         | QTK008K400 | ¥88,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® PKA Kinase Activity Assay                                                       | 100回用(60μl/well)  | 4℃      | QTK001K100 | ¥49,000  |
|   |                                                                                                 | 400回用(30μl/well)  |         | QTK001K400 | ¥88,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® PKCα Kinase Activity Assay                                                      | 100回用(60μl/well)  | 4℃・-20℃ | QTK003K100 | ¥49,000  |
|   |                                                                                                 | 400回用(30μl/well)  |         | QTK003K400 | ¥88,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® PKCβI/II Kinase Activity Assay                                                  | 100回用(60μl/well)  | 4℃・-20℃ | QTK011K100 | ¥49,000  |
|   |                                                                                                 | 400回用(30μl/well)  |         | QTK011K400 | ¥88,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® PKCε Kinase Activity Assay                                                      | 100回用(60μl/well)  | 4℃・-20℃ | QTK010K100 | ¥49,000  |
|   |                                                                                                 | 400回用(30μl/well)  |         | QTK010K400 | ¥88,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® PKCζ Kinase Activity Assay                                                      | 100回用(60μl/well)  | 4℃      | QTK009K100 | ¥49,000  |
|   |                                                                                                 | 400回用(30μl/well)  |         | QTK009K400 | ¥88,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® Rsk-2 Kinase Activity Assay                                                     | 100回用(60μl/well)  | 4℃      | QTK006K100 | ¥49,000  |
|   |                                                                                                 | 400回用(30μl/well)  |         | QTK006K400 | ¥88,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® Sgk Kinase Activity Assay                                                       | 100回用(60μl/well)  | 4℃      | QTK007K100 | ¥49,000  |
|   |                                                                                                 | 400回用(30μl/well)  |         | QTK007K400 | ¥88,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® Src Kinase Activity Assay                                                       | 100回用(60μl/well)  | 4℃      | QTK005K100 | ¥49,000  |
|   |                                                                                                 | 400回用(30μl/well)  |         | QTK005K400 | ¥88,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® Yes Kinase Activity Assay                                                       | 100回用(60μl/well)  | 4℃・-20℃ | QTK018K100 | ¥49,000  |
|   |                                                                                                 | 400回用(30μl/well)  |         | QTK018K400 | ¥88,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® Class IA Phosphoinositide 3- Kinase (PI3Kα, PI3Kβ, PI3Kδ, PI3Kγ) Activity Assay | 100回用(60μl/well)  | 4℃・-20℃ | QTK023K100 | ¥49,000  |
|   |                                                                                                 | 400回用(30μl/well)  |         | QTK023K400 | ¥88,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® Universal Assay Development Kit***                                              | 400回用(30μl/well)  | 4℃      | QTK025K004 | ¥78,000  |
|   |                                                                                                 | 800回用(30μl/well)  |         | QTK025K008 | ¥118,000 |
|   |                                                                                                 | 8000回用(30μl/well) |         | QTK025K080 | ¥898,000 |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® Kinase Activity Assay For Protein Substrates***                                 | 100回用(60μl/well)  | 4℃・-20℃ | QTK022K100 | ¥49,000  |
|   |                                                                                                 | 400回用(30μl/well)  |         | QTK022K400 | ¥88,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® PP2A Phosphatase Activity Assay                                                 | 100回用(60μl/well)  | 4℃      | QTP002K100 | ¥49,000  |
| Ⓔ | QTL LightSpeed® PTP-1B Phosphatase Activity Assay                                               | 100回用(60μl/well)  | 4℃      | QTP001K100 | ¥49,000  |
|   | r ATP*                                                                                          | 50μmoles          | -20℃    | ATP-111    | ¥15,000  |

Ⓔ 本キットのパーツには、消防法における第4類第3石油類（等級Ⅲ）であるジメチルスルホキシド（DMSO）が含まれます。ご注意ください。

\*それぞれのキットにはATP濃度を検討いただく場合を想定してATPが添付されておりません。別途添加してご使用いただく必要があります。

\*\*100回用は96ウェルプレート（60μl）、400回用は384プレート（30μl）での使用を前提としたキット構成になっていますが、どちらでも使用可能です。

\*\*\*基質が含まれておりません。別途ご購入いただく必要があります。詳細は、弊社テクニカルラインまでお問い合わせください。

## ● ヒト正常細胞用培地半額キャンペーン ~2006年12月27日 (ご注文分)

Cell Applications社 (CAI) ヒト正常細胞1本とヒト正常細胞用培地1本を一括でご注文いただいたお客様に、培地を半額でご提供させていただきます。詳しくは弊社ウェブサイト・キャンペーンコーナーでご案内しております。

※CAI社の製品を価格改定し、さらにお求め安くなっております。是非この機会にお試しください。

## ● 各種カタログ・ライフサイエンス実験シリーズ発刊



- ・TOYOBO細胞カタログ
- ・バイオ機器カタログ (2006年秋号)
- ・私にもできた! ライフサイエンス実験シリーズ Vol.4  
「遺伝子発現解析編 (後編)」ーリアルタイムPCRに挑戦ー  
《弊社ウェブサイトから資料請求いただけます》

## ● カルナバイオサイエンス社のプロテインキナーゼのラインアップが増えました

ご好評いただいておりますカルナバイオサイエンス社のプロテインキナーゼに19品目が追加されました。

保存: -80℃、容量: 5μg/100μl

| 品 名        | Code No. | 価 格     | 品 名      | Code No. | 価 格     | 品 名    | Code No. | 価 格     |
|------------|----------|---------|----------|----------|---------|--------|----------|---------|
| BUBR1      | CB05-105 | ¥40,000 | MLK2     | CB09-116 | ¥40,000 | skMLCK | CB02-150 | ¥38,000 |
| CDC7/ASK   | CB05-109 | ¥40,000 | MNK1     | CB02-145 | ¥40,000 | TAOK2  | CB07-133 | ¥40,000 |
| CDK9/CycT1 | CB04-110 | ¥40,000 | MNK2     | CB02-146 | ¥38,000 | TSSK2  | CB02-165 | ¥40,000 |
| CK2α1      | CB05-310 | ¥40,000 | P70s6kb  | CB01-155 | ¥38,000 | WNK2   | CB05-180 | ¥40,000 |
| CK2α2      | CB05-183 | ¥38,000 | PAK2     | CB07-124 | ¥38,000 | WNK3   | CB05-181 | ¥38,000 |
| DLK        | CB09-111 | ¥40,000 | PCTAIRE1 | CB04-115 | ¥38,000 | WNK4   | CB05-182 | ¥38,000 |
| MAP4K2     | CB07-111 | ¥40,000 |          |          |         |        |          |         |

本製品はすでに  
販売を中止して  
おります。

## ● *Thermus thermophilus* Ribonuclease H (Tth RNase H) 販売中止

長らくご愛用いただきましたTth RNase H (Code No.:RNH-201) の販売を終了させていただきました。

●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: 毒印は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外毒物です。腐印は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外劇物です。燃印は消防法に基づく危険物です。