

# タカラバイオのSYBR® アッセイ用リアルタイムPCR 試薬に 新製品2種類が加わり、さらにパワーアップ!!

## SYBR® *Premix Ex Taq*™ GC (Perfect Real Time)

製品コード RR071A	200回(50 μl反応系)	¥43,000
RR071B(A×2)	400回(50 μl反応系)	¥82,000

## MightyAmp™ for Real Time (SYBR® Plus)

製品コード R075A	200回(50 μl反応系)	¥50,000
R075B(A×2)	400回(50 μl反応系)	¥96,000

タカラバイオでは、特長の異なる3種類のSYBR® Green I検出用リアルタイムPCR試薬を販売しています。

- ・SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Perfect Real Time)  
製品コード RR041A/B
- ・SYBR® *Premix Ex Taq*™ II (Perfect Real Time)  
製品コード RR081A/B
- ・SYBR® *Premix DimerEraser*® (Perfect Real Time)  
製品コード RR091A/B

(以下では各々RR041、RR081、RR091と略記)

増幅効率と反応特異性のバランスが良いRR081は、タカラバイオのPerfect Real Timeサポートシステムで設計・合成したリアルタイムRT-PCR用プライマーを用いる遺伝子発現解析に最適です。さらに高い反応特異性を求める場合には、RR091をお試しください。ご自身で設計されたプライマーを用いる場合には、増幅効率に優れたRR041の使用をお勧めしています。

今回、この強力なラインナップにさらに2種類のSYBR® Green I検出用リアルタイムPCR試薬が加わりました。SYBR® *Premix Ex Taq*™ GC (Perfect Real Time) (製品コード RR071A/B)はGCリッチなターゲット(GC含量60~70%、増幅サイズ~200 bp)でより精度の高いリアルタイムPCR解析が可能な試薬です。RR041と同様、ご自身で設計されたプライマーを用いる場合の選択肢としてお勧めします。一方、MightyAmp™ for Real Time (SYBR® Plus) (製品コード R075A/B)は、クルードなサンプルを用いるリアルタイムPCRや、エンドポイントPCR用プライマーをそのまま利用する増幅サイズが大きいリアルタイムPCR(増幅サイズ: ~2 kb)、GC含量70%以上のターゲットに対するリアルタイムPCRなど、これまでリアルタイムPCRを行うことを諦めていたケースにチャレンジしていただける特殊な用途のための試薬です。

本稿ではこの新しい2製品について、実験例を交えてご紹介いたします。

### [1] SYBR® *Premix Ex Taq*™ GC (Perfect Real Time)

製品コード RR071A	200回	¥43,000
RR071B(A×2)	400回	¥82,000

- 独自の添加因子により、GC含量60~70%の増幅しにくいターゲットの反応性が大幅に向上
- GC含量60%未満のターゲットも良好に反応

GC含量の高いゲノムDNAを鑄型に解析を行いたい、CpGアイランドを含むGCリッチな領域を増幅したい、cDNAのGCリッチ領域をターゲットとしたいというような場合、従来のリアルタイムPCR試薬ではプライマーの選定が難しかったり、PCR前のcDNAのRNase H処理や長時間の熱処理、あるいはPCR条件の検討といった煩雑な作業が必要となることがあります。

新製品SYBR® *Premix Ex Taq*™ GC (Perfect Real Time)はタカラバイオ独自の添加因子と反応液組成の改良により、GC含量60~70%のGCリッチ領域に対する反応性と定量性が大幅に向上しており、特別な前処理なしで精度の高い解析が行えます(ターゲットサイズ: ~200 bpを推奨)。また、GC含量60%未満の標準的なターゲットに関しても反応性は良好ですので、同一のPCR条件で定量解析を行うことができます。

### ■ 内容(50 μl反応系×200回)

SYBR® <i>Premix Ex Taq</i> ™ GC (Perfect Real Time) (2×)	1 ml×5本
ROX Reference Dye (50×)	200 μl
ROX Reference Dye II (50×)	200 μl

### ■ 実験例 1 : cDNAを鑄型としたGCリッチ領域の反応性の比較

cDNAを鑄型として、本製品(RR071)と従来製品SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Perfect Real Time) (RR041)を用いて、GC含量が60~70%のターゲット3種類とGC含量が60%未満のターゲット3種類をリアルタイムPCRにより検出し、その反応性を比較しました。

本製品ではGC含量が60~70%のターゲットに対し、従

来製品と比べて定量性、感度、反応効率の向上が認められました。また、GC含量が60%未満のターゲットに対しても従来製品と同等のCt値を示し、良好な反応性を確認できました(図1)。

cDNAを鋳型としたリアルタイムPCR解析において、本製品では従来製品以上に広範なターゲット配列に対して精度の高い定量性を期待できます。

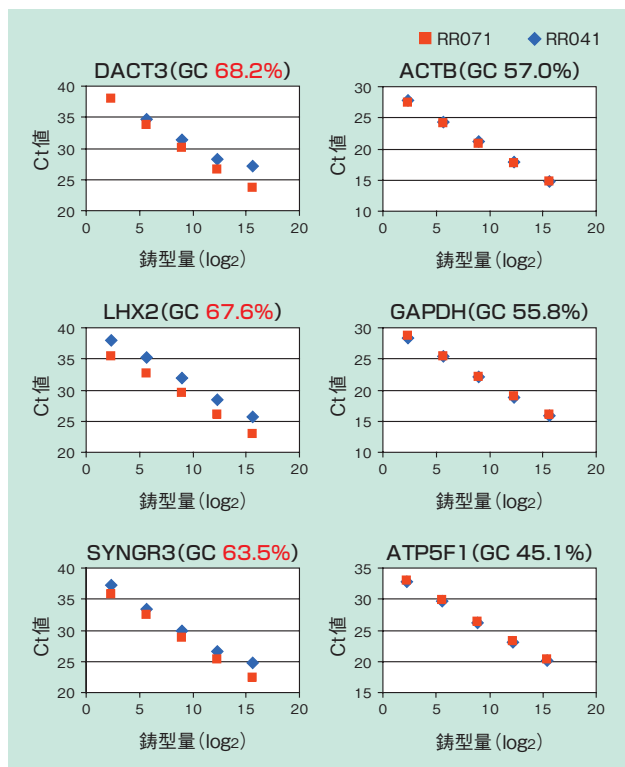


図1 cDNAを鋳型とした反応性の比較

試薬 : SYBR® *Premix Ex Taq*™ GC (Perfect Real Time) (製品コード RR071A)  
 : SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Perfect Real Time) (製品コード RR041A)  
 装置 : Thermal Cycler Dice® Real Time System  
 反応条件: 95℃ 30秒 → (95℃ 5秒 / 60℃ 30秒) × 40 サイクル  
 → 融解曲線分析  
 鋳型 : cDNA (Human Fetal Brain total RNA 5 pg ~ 50 ng相当量)

## ■ 実験例 2 : ゲノムDNAを鋳型としたGCリッチ領域の反応性の比較

ヒトゲノムDNAを鋳型として、本製品(RR071)と従来製品(RR041)を用いて、CpGアイランドを含むGC含量が60~70%のターゲット3種類をリアルタイムPCRにより検出し、その反応性を比較しました。

本製品ではCpGアイランドを含むGC含量が高いターゲットに対し、従来製品と比べて定量性、感度、反応効率の向上が認められました(図2)。

ゲノムDNAを鋳型にしたリアルタイムPCR解析においても、本製品を用いることで従来製品以上に広範なターゲット配列に対して精度の高い定量性を期待できます。

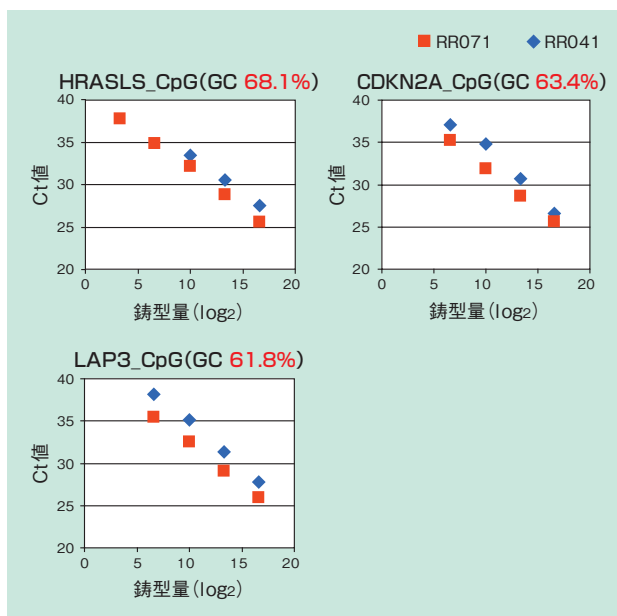


図2 ゲノムDNAを鋳型とした反応性の比較

試薬 : SYBR® *Premix Ex Taq*™ GC (Perfect Real Time) (製品コード RR071A)  
 : SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Perfect Real Time) (製品コード RR041A)  
 装置 : Thermal Cycler Dice® Real Time System  
 反応条件: 95℃ 30秒 → (95℃ 5秒 / 60℃ 30秒) × 40 サイクル  
 → 融解曲線分析  
 鋳型 : Human genomic DNA 10 pg ~ 100 ng

## [2] MightyAmp™ for Real Time (SYBR® Plus)

製品コード R075A	200回	¥50,000
R075B	400回(A×2)	¥96,000

これまでリアルタイムPCRを諦めていた以下のような場合でも、新製品のMightyAmp™ for Real Time (SYBR® Plus) ならリアルタイムPCRをお試しいただけます。

- クルードなサンプルを用いるリアルタイムPCR
- GC含量が70%を超えるターゲットに対するリアルタイムPCR
- エンドポイントPCR用プライマーを利用する増幅サイズが大きめ(~2 kb)のリアルタイムPCR

本製品はPCR酵素に極限の反応性を追求して開発したMightyAmp™ DNA Polymeraseを用いるリアルタイムPCR用試薬です。これにより従来リアルタイムPCR試薬では増幅できなかったクルードなサンプル、GC含量が70%を超えるターゲット(CpGアイランドを含む配列など)、増幅鎖長が300 bpを超えるターゲットに対して良好な反応が期待できます。

本稿では、従来PCR増幅が困難であったサンプルやターゲットに対する本製品を用いた定量解析の成功例を紹介します。

(注意) 本製品は特殊な用途のために開発した製品です。標準的なサンプル、ターゲットに対する精度の高いリアルタイムPCR解析には、Perfect Real Timeシリーズの製品をご使用ください。

## ■ 内容(50 $\mu$ l 反応系 $\times$ 200回)

MightyAmp™ for Real Time (SYBR® Plus) (2 $\times$ )	1 ml $\times$ 5本
ROX Reference Dye (50 $\times$ )	200 $\mu$ l
ROX Reference Dye II (50 $\times$ )	200 $\mu$ l

## ■ 実験例 3 : クールドなサンプルを用いたリアルタイム PCR

### 【方法】

牛肉 13.4 mg あるいはマウス臍臓 10.5 mg に 50 mM NaOH を 180  $\mu$ l 添加し、95  $^{\circ}$ C で 10 分インキュベーションした後、1 M Tris-HCl (pH8.0) を 20  $\mu$ l 加えて中和し、アルカリ熱抽出液を得た。各抽出液の原液、4 倍希釈液、16 倍希釈液のそれぞれ 1.5  $\mu$ l を鋳型に、ウシ *cox1* 遺伝子 (289 bp) およびマウス *Hbb-b1* 遺伝子 (165 bp) をターゲットとして、本製品 (R075) と従来製品 SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Perfect Real Time) (RR041) を用いてリアルタイム PCR を行い、反応性を比較した。

### 【結果】

本製品はどちらのクールドサンプルに対しても、鋳型量に応じた定量的な増幅を示しました。一方、従来製品ではサンプル中の阻害物質により著しく反応阻害が起きました (図 3)。本製品を使用することで PCR 阻害物質を多く含むサンプルに対して、高感度なリアルタイム検出が期待できます。

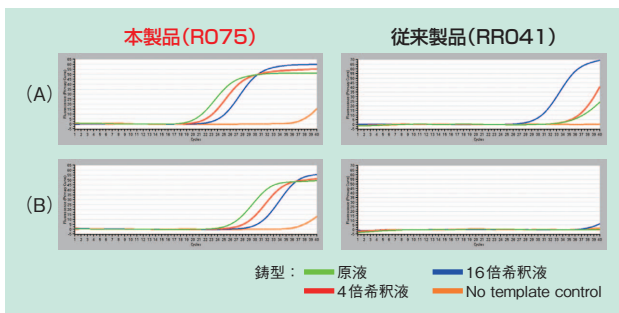


図 3 クールドなサンプルでのリアルタイム PCR

試薬 : MightyAmp™ for Real Time (SYBR® Plus) (製品コード R075A)  
 (製品コード R075A)  
 : SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Perfect Real Time) (製品コード RR041A)  
 (製品コード RR041A)  
 装置 : Thermal Cycler Dice® Real Time System  
 反応条件 :  
 (R075A) 98  $^{\circ}$ C 2 分  $\rightarrow$  (98  $^{\circ}$ C 10 秒 / 60  $^{\circ}$ C 15 秒 / 68  $^{\circ}$ C 30 秒)  $\times$  40 サイクル  
 $\rightarrow$  融解曲線分析  
 (RR041A) 95  $^{\circ}$ C 30 秒  $\rightarrow$  (95  $^{\circ}$ C 5 秒 / 60  $^{\circ}$ C 30 秒)  $\times$  40 サイクル  
 $\rightarrow$  融解曲線分析  
 サンプル : (A) 牛肉アルカリ熱抽出液  
 : (B) マウス臍臓アルカリ熱抽出液  
 ターゲット : (A) *cox1* (B) *Hbb-b1*

## ■ 実験例 4 : GC 含量が 70% を超えるターゲットのリアルタイム PCR

### 【方法】

cDNA あるいはヒトゲノム DNA を鋳型に、本製品 (R075) と新製品 SYBR® *Premix Ex Taq*™ GC (Perfect Real Time) (RR071) ならびに従来製品 (RR041) を用いて GC 含量が 70% を超える 4 種類のターゲットをリアルタイム PCR により検出し、その反応性を比較した。

### 【結果】

従来製品 RR041 や新製品 RR071 で増幅できないような 70% を超える GC リッチターゲットに対しても、本製品は定量的な増幅を示しました (図 4)。

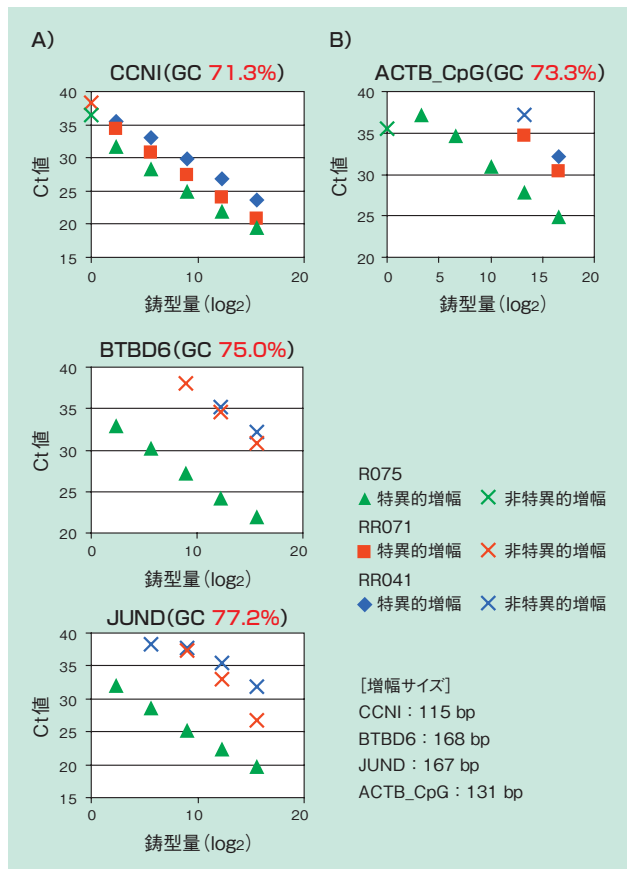


図 4 GC 含量が 70% を超えるターゲットに対するリアルタイム PCR

試薬 : MightyAmp™ for Real Time (SYBR® Plus) (製品コード R075A)  
 : SYBR® *Premix Ex Taq*™ GC (Perfect Real Time) (製品コード RR071A)  
 : SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Perfect Real Time) (製品コード RR041A)  
 装置 : Thermal Cycler Dice® Real Time System  
 反応条件 :  
 (R075A) 98  $^{\circ}$ C 2 分  $\rightarrow$  (98  $^{\circ}$ C 10 秒 / 60  $^{\circ}$ C 15 秒 / 68  $^{\circ}$ C 30 秒)  $\times$  40 サイクル  
 $\rightarrow$  融解曲線分析  
 (RR071A) 95  $^{\circ}$ C 30 秒  $\rightarrow$  (95  $^{\circ}$ C 5 秒 / 60  $^{\circ}$ C 30 秒)  $\times$  40 サイクル  
 $\rightarrow$  融解曲線分析  
 (RR041A) 95  $^{\circ}$ C 30 秒  $\rightarrow$  (95  $^{\circ}$ C 5 秒 / 60  $^{\circ}$ C 30 秒)  $\times$  40 サイクル  
 $\rightarrow$  融解曲線分析  
 鋳型 : (A) cDNA (Human Testis total RNA 5  $\mu$ g  $\sim$  50 ng 相当量)  
 : (B) Human genomic DNA 10  $\mu$ g  $\sim$  100 ng

## ■ 実験例 5 : エンドポイント PCR 用プライマーを用いたリアルタイム PCR

### 【方法】

ヒトゲノム DNA を鋳型に、増幅鎖長がそれぞれ 550 bp、985 bp、1,954 bp のターゲット領域に対して、電気泳動で増幅を確認するエンドポイント PCR 用に設計したプライマーと本製品 (R075) を用いてリアルタイム PCR を行い、その反応性を評価した。

### 【結果】

従来製品ではリアルタイム PCR 増幅が難しい 300 bp を超えるターゲットに対しても、本製品は通常のエンドポイント

PCRの反応条件(伸長時間を1分/kbに設定)で定量的な増幅を示しました(図5)。

電気泳動解析用に設計したプライマーとそのPCR条件を利用して、増幅サイズが2 kbまでのターゲットをリアルタイムPCRで検出したい場合には、本製品をお試しいただくことで良好な結果が期待できます。

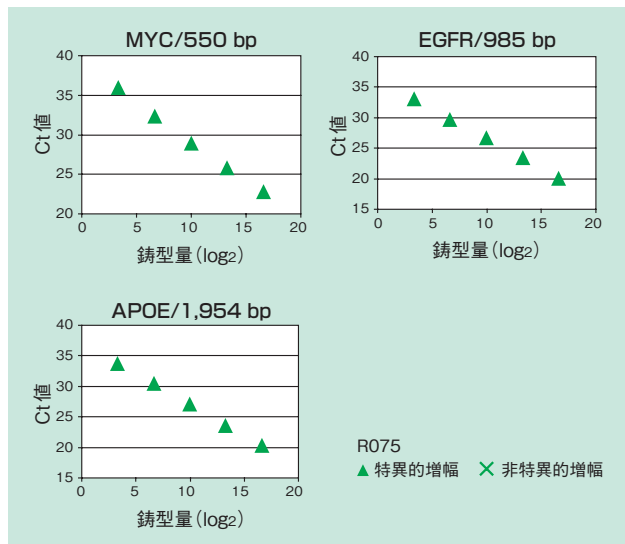


図5 エンドポイントPCR用プライマーを用いたリアルタイムPCR(増幅サイズ: 500 bp~2 kb)

試薬 : MightyAmp™ for Real Time (SYBR® Plus) (製品コード R075A)

装置 : Thermal Cycler Dice® Real Time System

反応条件: (MYC/550 bp)

98℃ 2分→(98℃ 10秒/60℃ 15秒/68℃ 30秒)×40サイクル  
→融解曲線分析

: (EGFR/985 bp)

98℃ 2分→(98℃ 10秒/60℃ 15秒/68℃ 60秒)×40サイクル  
→融解曲線分析

: (APOE/1,954 bp)

98℃ 2分→(98℃ 10秒/60℃ 15秒/68℃ 120秒)×40サイクル  
→融解曲線分析

鋳型 : Human genomic DNA 10 pg ~ 100 ng

## ■ 関連製品

### ・ SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time)

製品コード RR041A 200回 (50 µl 反応系) ¥41,000

RR041B (A×2) 400回 (50 µl 反応系) ¥79,000

### ・ SYBR® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time)

製品コード RR081A 200回 (50 µl 反応系) ¥41,000

RR081B (A×2) 400回 (50 µl 反応系) ¥79,000

### ・ SYBR® Premix DimerEraser® (Perfect Real Time)

製品コード RR091A 200回 (50 µl 反応系) ¥43,000

RR091B (A×2) 400回 (50 µl 反応系) ¥82,000

### ・ Thermal Cycler Dice® Real Time System

製品コード TP800 一式 ¥3,600,000

本文中の製品に該当するライセンス確認事項は54~55ページをご覧ください。

① ② ⑤ ⑧ ⑫