

Sigma-Aldrich®

Lab & Production Materials

2020年4月
Vol.05

sigmania

シグマニア

Sigma-Aldrichを中心に、バイオロジー研究に
役立つ新製品と注目の試薬を一気に紹介！
すでに人気の製品から、隠れた人気製品まで。
ぜんぶ知っているあなたはシグマニア？

テーマ：
遺伝子



CONTENTS

特集

遺伝子実験のキソ PCR あれこれ

SigMania が考える遺伝子解析の世界 2

PCR 法確立の扉を開いた、
DNA ポリメラーゼの改良 2

ダイレクト PCR 4

定量 PCR (quantitative PCR) 5

 × **sigmania**
PCR 試薬セレクトチャート 6

RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) 7

シグマニア ホットピック＜環境＞

魚を獲らずに生態調査
環境 DNA とは 8

環境をおもうリデザイン
Stericup® / Steritop® E 9

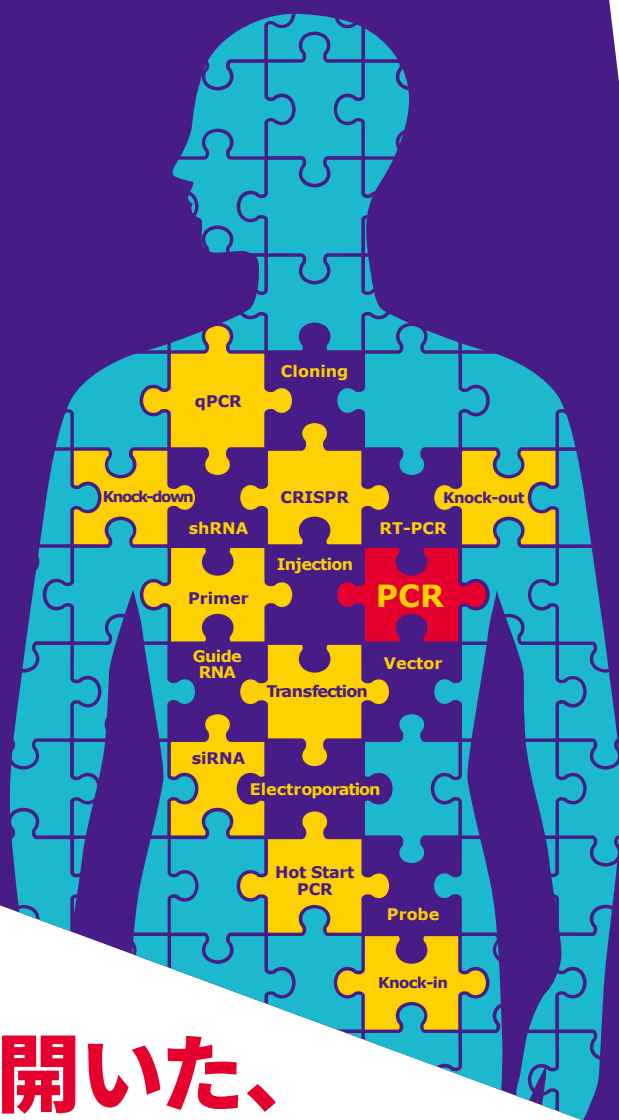
2次元電気泳動装置
Auto2D® 10

クロスワードでハカセと対決！ 12

sigmaMania が考える 遺伝子解析の世界

PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）技術は生命科学研究に大きな変化をもたらし、臨床、法医学および診断などあらゆる分野で PCR 技術をベースにした様々な遺伝子解析技術が用いられています。

シグマ アルドリッチでは PCR 法の特許を有していた Roche 社の酵素から、遺伝子編集のツールである「CRISPR」まで、幅広いラインナップで皆様の研究をサポートしていきます。



PCR 法確立の扉を開いた、 DNA ポリメラーゼの改良

基礎研究から創薬、臨床診断に至るまで、DNA 増幅技術として幅広く用いられる PCR 法。歴史を紐解くと、開発への長い道のりは 1967 年の冬に端を発したといえます。12 月 14 日、生化学者のアーサー・コーンバーグが、「試験管内で人工的に DNA を増幅させることに初めて成功した」と発表したのです。増やしたのはウイルス DNA で、増幅後に感染能を維持していることも確かめられました⁽¹⁾。

この時にコーンバーグが使ったのは、DNA 修復のために働く「DNA ポリメラーゼ I (大腸菌由来)」という酵素でしたが、その後、DNA 複製を担う DNA ポリメラーゼ II (大腸菌)、ポリメラーゼ α 、 δ 、

ϵ (真核生物) などが発見されました。さらに、「PCR 法実現への鍵」となる次のようなメカニズムも明らかにされました。「DNA ポリメラーゼは、合成中の DNA 鎖の 3' 末端に『鋳型と相補的な部品 (ヌクレオシド : デオキシリボヌクレオシド三リン酸)』を付加することで、DNA 鎖を 5' から 3' 方向に伸長させる」。「ヌクレオチドの付加反応は 3' 末端に水酸基がないとおきない。つまり、単なる 1 本鎖 DNA を相手に合成反応を開始させることはできず、合成するには、3' 末端に『1 本鎖 DNA と相補的な短い断片 (プライマー)』が必要となる」。

マリスのアイデアが開いた 実現への扉

時代は下り、1983年の夏のことです。とある企業でDNA合成を担当していた生化学者のキャリー・マリスは、バカンス中に突然、PCR法のアイデアを思いつきます^{(2),(3),(4)}。「増やしたいDNAの鋳型となる1本鎖DNA、プライマー、ヌクレオチド、DNAポリメラーゼを試験管内に入れ、繰り返し反応させればよいのではないかと。さっそく実験を試みましたが、DNAを1本鎖にするために熱を加えると、DNAポリメラーゼの活性が失われてしまい、増幅反応が得られませんでした。

そこで再び考えをめぐらせ、今度は「高温の間欠泉にいる好熱性細菌由来のDNAポリメラーゼなら、高温下でも機能するのではないかと」思いつきます。その時、マリスの頭に浮かんだのは、デートでよく訪れたイエローストーン国立公園の間欠泉だったようです。

マリスの予想は当たっていました。好熱性細菌からDNAポリメラーゼを精製することに成功し、この酵素で「標的とするDNA」を増幅できることを確認したのです⁽⁵⁾。

1985年には特許を申請し、会社の同僚が中心になって書いた「鎌状赤血球症の迅速診断にPCR法が有効」とする論文がScience誌に掲載されました⁽⁶⁾。もちろん、マリス自身もPCR法の原理にフォーカスした論文を書き、natureに投稿していました。ところが、こちらは実験不足を理由に断られ、1987年にMethods Enzymolへの掲載となりました⁽⁷⁾。

好熱性細菌由来のDNAポリメラーゼ(Taq DNAポリメラーゼ)は、95℃でも活性を維持します。そのため、「DNAの熱処理(約72℃)→プライマーとの反応→DNA鎖の増幅反応」のステップを連続して50サイクル以上繰り返すことが可能です。1サイクルでDNAが2倍に増幅されますので、理論上は25サイクルでDNAが2の25乗、つまり10万倍以上に増える計算となります(実際には反応効率が100%になることはありません)。

1980年代半ばから90年代といえ、遺伝子組み換え、クローニング、シーケンスなどの技術が華々しく登場し、急速に普及していった時代です。ここにPCR法が加わることで、大腸菌を使わなくて済むクローニングが可能になったばかりでなく、血液1滴、髪の毛1本といった、ごく微量の試料からDNAを増幅できるようにもなり、分子生物学に新たな風を吹き込むことになりました。

組換え体による酵素ラインナップの 充実

その後は、さまざまな企業から試薬としてTaq DNAポリメラーゼが発売され、増幅精度や使い勝手をさらに高めるために、遺伝子組み換え技術による酵素改良が進みました。ベーリンガー・マンハイム(現 ロシュ・ダイアグノスティックス)も、その一つです⁽⁸⁾。

同社はまず、1989年にTaq DNAポリメラーゼを発売。1994年に、DNA増幅中に転写エラー(突然変異)が起きるとエラー修正活性を発揮する「ブルーフリーディングDNAポリメラーゼ」を発売しました。翌1995年には、Taq DNAポリメラーゼ、ブルーフリーディングDNAポリメラーゼ、その他のタンパク質をブレンドして使える酵素ブレンドシステム「Expand High Fidelity PCR System」を発売し、より長いDNA(最長35 kb)での安定した増幅も実現させました。

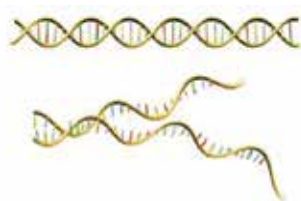
さらに現在では、室温ではたらず、特定の温度下でのみ活性化する「FastStart Taq DNA Polymerase」なども販売しています。

このように多様なDNAポリメラーゼがラインナップされたことで、小さなラボや検査機関でも負担なく高精度なDNA増幅ができるようになったのです。

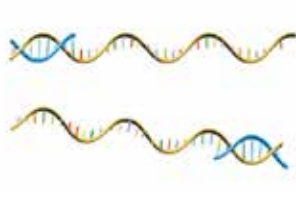
文・西村尚子(サイエンスライター)

参考：

1. Goulian M., et al. : Proc Natl Acad Sci USA. 1967 Dec 15;58 (6) : 2321-2328.
2. マリス博士の奇想天外な人生 キャリー・マリス(著)、福岡伸一(訳) 2004
3. <https://www.rnaj.org/newsletters/item/471-furuichi-9> (as of 2020-3-24)
4. <http://life-science-project.com/683/> (as of 2020-3-24)
5. Saiki RK., et al.: Science. 1988 Jan 29;239 (4839) :487-91
6. Saiki RK., et al.: Science. 1985 Dec 20;230 (4732) :1350-4
7. Mullis KB and Faloona FA: Methods Enzymol. 1987;155:335-50.
8. PCR アプリケーションマニュアル[第3版] ロシュ・ダイアグノスティックス 株式会社 2006



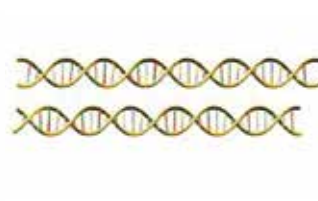
PCRステップ①：
テンプレートの熱変性



PCRステップ②：
プライマーとテンプレートの
アニーリング



PCRステップ③：
耐熱性DNAポリメラーゼを用いた
プライマーの伸長反応



PCRの最初のサイクル終了後：
1コピーだったターゲットの数は
2コピーになります。

PCR サイクル (PCR アプリケーションマニュアル[第3版]より引用)：

PCRはサイクルを繰り返しながらを増幅するプロセスです。各サイクルは詳説する段階から構成されます。サイクルが繰り返される結果、ターゲットの総コピー数が急速に増加します。

本誌 P6 では多様な DNA ポリメラーゼのラインナップをご紹介します。

ダイレクト PCR

Extract-N-Amp™ PCR および REExtract-N-Amp™ PCR キットは血液や組織、植物からの DNA 抽出と PCR による遺伝子増幅までの一連のプロセスを迅速に行う、ダイレクト PCR 用のキットです。サンプルを長時間酵素処理することや溶解液を精製することなく PCR を行うことができます。

キットは哺乳動物組織用や血液用などいくつかの種類があり、どれも抽出溶液、中和溶液（または希釈液）、Taq DNA ポリメラーゼを含む 2x PCR 反応ミックスから構成されています。キットによっては、さらにその他の試薬も含まれています。キットに付属する PCR 反応ミックスは、通常の透明なタイプ（Extract-N-Amp PCR Reaction Mix）と赤い色素が含まれたタイプ（REExtract-N-Amp PCR Reaction Mix）から選べます。赤い色素はアガロースゲル電気泳動のトラッキング用色素です。PCR 反応後にそのままアガロースゲル電気泳動にローディングすることができます。

さらに、動物組織用と植物用についてリアルタイム PCR 用として、PCR 反応ミックスに SYBR Green I を混合させているキットがあります。

血液サンプル用

製品名	内容量	カタログ番号
Extract-N-Amp Blood PCR Kit	100 回反応分	XNAB2-1KT
REExtract-N-Amp Blood PCR Kit	10 回反応分	XNABS-1KT

種子サンプル用

製品名	内容量	カタログ番号
Extract-N-Amp Seed PCR Kit	100 回反応分	XNAS2-1KT

植物サンプル用

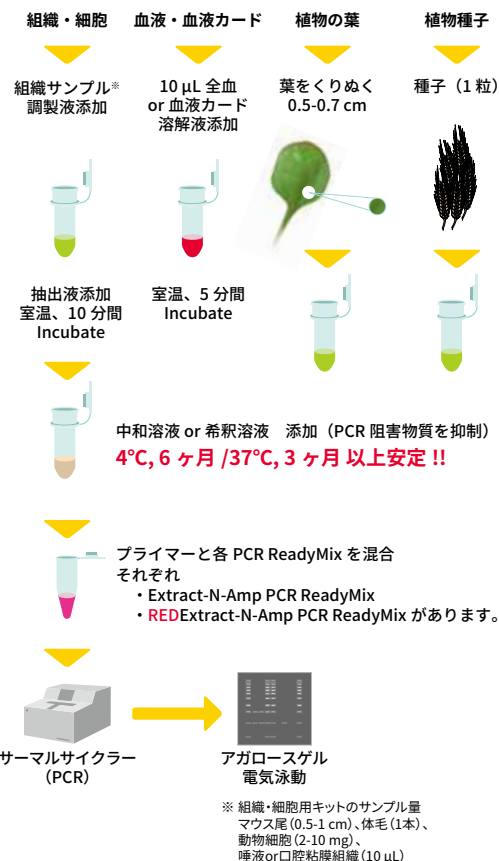
製品名	内容量	カタログ番号
Extract-N-Amp Plant PCR Kit	100 回反応分	XNAP2-1KT
REExtract-N-Amp Plant PCR Kit	10 回反応分	XNAPS-1KT

動物組織サンプル用

製品名	内容量	カタログ番号
Extract-N-Amp Tissue PCR Kit	100 回反応分	XNAT2-1KT
REExtract-N-Amp Tissue PCR Kit	10 回反応分	XNAT-10RXN

※カタログ番号は最小容量のみ記載しています

各キットの標準操作



サンプルからダイレクトにリアルタイム PCR

SYBR Green Extract-N-Amp Tissue PCR キットは、マウスの尾、体毛、動物細胞、唾液または口腔粘膜組織からゲノム DNA を抽出し、目的の DNA 配列をリアルタイム PCR (SYBR Green 法) により定量するためのキットです。有機溶媒抽出や遠心作業は不要です。

製品の特長

- わずか 15 分間で DNA を抽出
- 抽出した DNA 溶液は 4°C で 6 ヶ月間保存可能
- 操作が簡便でジェノタイピングに有用
- ホットスタート PCR 法により特異的な増幅

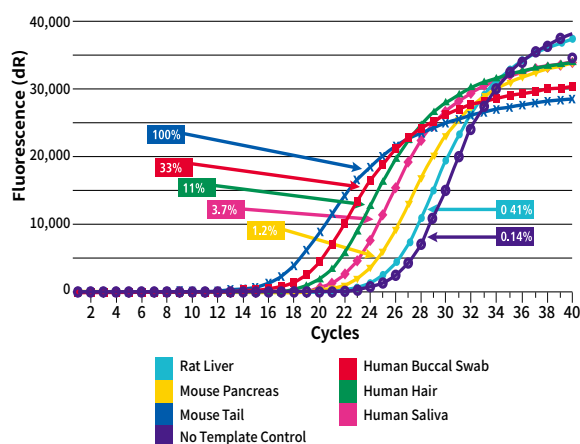
動物組織サンプル用

製品名	内容量	カタログ番号
SYBR Green Extract-N-Amp Tissue PCR Kit	100 回反応分	XNATG-1KT

植物サンプル用

製品名	内容量	カタログ番号
SYBR Green Extract-N-Amp Plant PCR Kit	100 回反応分	XNAPG-1KT

※カタログ番号は最小容量のみ記載しています



SYBR Green Extract-N-Amp Tissue PCR キットにより様々なサンプルから DNA を抽出し、リアルタイム PCR を実施した結果です。

定量 PCR (quantitative PCR)

定量 PCR (qPCR, リアルタイム PCR) には SYBR Green I 蛍光色素のように二本鎖 DNA に結合する色素を用いる方法とプローブを用いる方法があります。

SYBR® Green I 蛍光色素

この色素は、最も一般的な二本鎖 DNA 結合色素であり、分子生物学において長く使用されてきました。SYBR Green I 蛍光色素は、一本鎖 DNA (ssDNA) しか存在しない場合、DNA に結合せずに溶液中に遊離した状態で存在し、低強度のシグナルを発しています (図 1)。PCR が進行し二本鎖 DNA 量が増えると、アンプリコンに結合する色素が増えるため、結果としてシグナル強度が上昇します。しかし、この色素はすべての増幅産物に非選択的に結合するため、プライマーダイマーやプライマーの非特異的結合などに起因するアーティファクト (予期せぬ副産物) も蛍光発光全体に含まれてしまいます。このため、特にテンプレート濃度が低い場合などに正確な定量データが得にくくなりますが、PCR 後の融解曲線解析は、反応の特異性を決定するのに役立つ可能性があります¹ (図 2)。

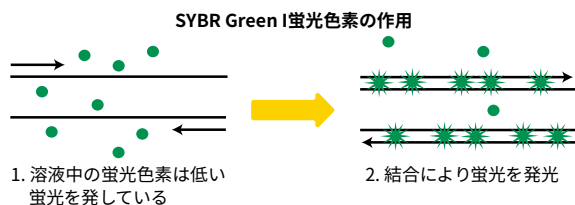


図 1. 反応が進行し、アンプリコン量の増加に伴ってシグナル強度が上昇すると、SYBR Green I 蛍光色素は、非結合 (変性) 状態と結合 (伸長反応によるアニーリング) 状態を繰り返す。

プローブ (両末端蛍光プローブ)

両末端蛍光プローブは、両末端がレポーター蛍光色素および消光基で標識された一本鎖オリゴヌクレオチドです。レポーターは 5' 末端に位置し、消光基は 3' 末端に位置します。DNA と反応していない状態では、消光基はフェルスター型の蛍光共鳴エネルギーの移動 (蛍光共鳴エネルギー転移 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) と呼ばれることが多い) により、レポーター蛍光色素が発している蛍光を吸収しています。フォワードプライマーから増幅した後、Taq DNA ポリメラーゼはプローブと接触します。その後、Taq DNA ポリメラーゼに本来備わっている 5' エキソヌクレアーゼ活性により、5' レポーターが 3' 消光基から離されることで (表 1、図 3)、アンプリコンの合成量に比例する蛍光シグナルが放出されます。

加水分解プローブアッセイは、低コピー数のターゲットの定量にとって特異的で正確なものです。プローブのなかに LNA[®] などの修飾ヌクレオチドを含ませることで、特異性がさらに向上する可能性があります。LNA 修飾プローブは、一塩基多型 (SNPs) などの極めて良く似ている配列同士または他の類似配列を区別するのに特に有用です。両末端蛍光プローブは綿密にデザインする必要があり、一般的に二本鎖 DNA 結合色素よりも高価です。さらに、非特異的な産物の増幅が見過ごされる可能性があり、副反応が起きて全体の反応の効率を下げる原因になることもあります。したがって、プローブに関わるアッセイはまだ最適化が有用です。

参考文献:

1. Kitchen, R.R., Kubista, M., Tichopad, A. Statistical aspects of quantitative real-time PCR experiment design. *Methods* 2010; 50: 231-236.

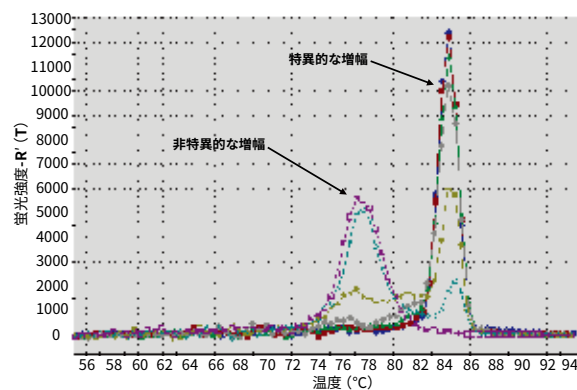


図 2. 融解曲線解析の例。二本鎖 DNA 結合色素は可逆的に結合するため、反応温度が融解温度 (Tm) を上回ると蛍光強度が減少する。このタイプの解析は、コントロールと併せて用いることで、特異的な産物とは異なる温度で融解する非特異的な産物の検出を可能にする。

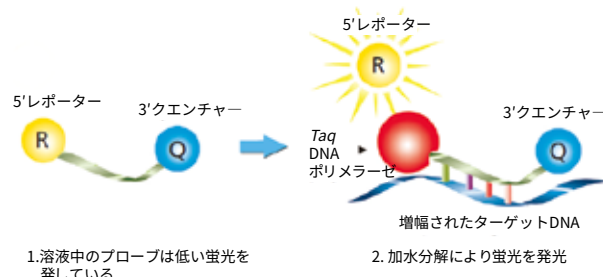


図 3. 両末端蛍光プローブのメカニズム。Taq DNA ポリメラーゼは、プローブの位置に達するまでプローブと同じ鎖に位置しているプライマーを伸長する。内在するエキソヌクレアーゼ活性がプローブを 5' → 3' 方向に加水分解し、溶液中にレポーター蛍光色素を放出することにより、蛍光発光を増加させる。測定した蛍光シグナルはターゲット DNA 量に正比例する。

表 1. 一般的な両末端蛍光プローブレポーター蛍光色素の波長特性

品名	励起極大 (nm)	発光極大 (nm)	適合する消光色素
レポーター蛍光色素			
6-FAM TM	494	515	BHQ [®] -1, TAMRA
JOE TM	520	548	BHQ-1, TAMRA
TET TM	521	536	BHQ-1, TAMRA
Cal Fluor [®] Gold 540 ^a	522	541	BHQ-1
HEX ^{TM b}	535	555	BHQ-1, TAMRA
Cal Fluor Orange 560 ^b	540	561	BHQ-1
TAMRA TM	555	576	BHQ-2
Cyanine 3	550	570	BHQ-2
Quasar [®] 570 ^c	548	566	BHQ-2
Cal Fluor Red 590 ^d	565	588	BHQ-2
ROX TM	573	602	BHQ-2
Texas Red TM	583	603	BHQ-2
Cyanine 5	651	674	BHQ-3
Quasar 670 ^e	647	667	BHQ-3
Cyanine 5.5	675	694	BHQ-3

a: JOE/TET の代替 c: シアニン 3 の代替 e: シアニン 5 の代替
b: VICTM の代替 d: TAMRA の代替

ほとんどのリアルタイム PCR サーマルサイクラーには、複数の検出チャンネルが備わっており、プローブ標識の柔軟な選択を可能としている。機器の検出チャンネルに対応可能なレポーター蛍光色素の選択に加えて、適正なフィルターの設定とキャリブレーションが確実に実行されていることが重要である。多重解析の場合、光学的なクロストークを最小化するために可能な限り互いに異なるレポーターの組み合わせが必要とされる。代表的なレポーターとしては、FAM、HEX、Texas Red およびシアニン 5 がある。通常は、同一の条件下で異なるレポーターからの発光強度の差を観察する。これは、(プローブ発光に適した異なるしきい値設定により) それぞれのレポーターの組み合わせから個別にデータを解析するのが望ましいためである。

定量 PCR の原理とプローブのデザインが分かる動画はこちら

http://bit.ly/qpcr_video



PCR 試薬セレクトチャート

PCR 用酵素の選択は、PCR の結果を大きく左右します。P3 で解説したように、研究者の努力により多くの種類の PCR 酵素が精製、修飾され、製品化されてきました。以下ではそれらの製品をわかりやすく比較表にしています。

	ホットスタート PCR			増幅困難な テンプレートのPCR	高正確性 PCR		ロングテンプレート PCR	
鎖長	~3 kb	~3 kb	~5 kb	~5 kb	~3 kb	~5 kb	5~20kb	20~35kb
特異性	✓✓	✓✓✓✓	✓✓✓✓	✓✓✓	✓✓	✓✓✓	✓✓✓	✓✓
感度	✓✓	✓✓✓✓	✓✓✓✓	✓✓✓	✓✓	✓✓✓	✓✓	✓✓
正確性*		1 x	4 x	3 x	18 x	6 x	3 x	2 x
UNG を用いたキャリアオーバー防止	yes	yes	yes	no	no	yes	no	no
マスターミックスの有無	yes	yes	no	no	yes	yes	no	no
	Taq DNA Polymerase	FastStart Taq DNA Polymerase	FastStart High Fidelity PCR System	GC-RICH PCR System	Pwo SuperYield DNA Polymerase	Expand High Fidelity PLUS PCR System	Expand Long Template PCR System	Expand 20kb PLUS PCR System
	1	2★	3★	4	5	6	7	8

* Taq DNA Polymerase との比較

製品名	内容量	カタログ番号
1 Taq DNA Polymerase, dNTPack (1 unit/μl)	250 units, 4 x 250 units	04 738 225 001
1 Taq DNA Polymerase, dNTPack (5 unit/μl)	100 units, 2 x 250 units, 4 x 450 units, 10 x 250 units, 20 x 250 units	04 728 866 001
1 Taq DNA Polymerase (1 unit/μl)	250 units, 4 x 250 units	11 647 679 001
1 Taq DNA Polymerase (5 unit/μl)	100U, 500U, 4 x 250 units, 10 x 250 units, 20 x 250 units	11 146 165 001
FastStart PCR Master (2x 濃度 マスターミックス)	2.5 mL, 8 x 1.25 mL, 10 x 5 mL	04 710 436 001
2 FastStart Taq DNA Polymerase, dNTPack (5 unit/μl)	100 units, 2 x 250 units, 4 x 250 units, 10 x 250 units, 20 x 250 units	04 738 314 001
2 FastStart Taq DNA Polymerase (5 unit/μl)	100 units, 2 x 250 units, 4 x 250 units, 10 x 250 units, 20 x 250 units	12 032 902 001
3 FastStart High Fidelity PCR System	10 x 250 units, 2 x 250 units	03 553 361 001
3 FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack	125 units, 2 x 250 units	04 738 284 001
4 GC-RICH PCR System	100 units (50 回反応分)	12 140 306 001
4 GC-RICH PCR System, dNTPack	100 units (50 回反応分)	04 743 784 001
5 Pwo Master (2x 濃度 マスターミックス)	10 x 250 μL (100 回反応分)	03 789 403 001
5 Pwo SuperYield DNA Polymerase, dNTPack	100 units	04 743 750 001
5 High Fidelity PCR Master (2x 濃度 マスターミックス)	200 回反応分	12 140 314 001
6 Expand High Fidelity PCR System	100 units, 2x250 units, 10x250 units	11 732 641 001
6 Expand High Fidelity PCR System, dNTPack	100 units, 2 x 250 units, 10 x 250 units	04 738 250 001
6 Expand High Fidelity PLUS PCR System, dNTPack	125 units, 2 x 250 units	04 743 725 001
7 Expand Long Template PCR System	150 units, 2 x 360 units, 10 x 360 units	11 681 834 001
8 Expand 20kb PLUS PCR System	200 units	11 811 002 001

※カタログ番号は最小容量のみ記載しています

ホットスタート PCR とは

PCR 反応に必要なすべてのコンポーネントを加えた状態の PCR 反応液は、低温で非特異的なプライマーのアニーリングが起こってしまう可能性があります。Taq DNA ポリメラーゼは低温でも伸長活性を示すため、この非特異的にアニールしたプライマーから伸長反応が起こり、目的以外の DNA が増幅され収率の低下を招きます。

ホットスタート PCR は低温下において DNA ポリメラーゼの活性を抑制することによって、非特異的な伸長反応を抑える実験手法です。FastStart Taq DNA Polymerase は高い感度と高いクオリティを兼ね備え、最良の結果をもたらします。この酵素は 75°C 以下では不活性ですが、DNA の熱変性温度で活性化されます。この『ホットスタート』酵素を用いることにより、反応セットアップおよび PCR 反応中に問題になるプライマーダイマーの形成が最小限に抑えられます。

便利な FastStart シリーズ

FastStart PCR Master は、マスターミックス調製の必要がなく、そのまま使用可能 (ready-to-use) なシリーズです。2 × 濃縮マスターミックスには、FastStart Taq、バッファー、ヌクレオチドおよび MgCl₂ が含まれており、より少ないピペット操作で PCR 反応溶液の調製を行うことができます。この FastStart シリーズは、ホットスタート PCR の機能も兼ね備えています。

※チャート中の★マークが FastStart シリーズ製品です。

https://bit.ly/pcr_lp



RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR)

RT-PCR とは

RNA は PCR のテンプレートとして使用できないため、最初に RNA の情報を逆転写酵素により cDNA に合成（転写）する必要があります。合成された cDNA は通常の PCR 酵素により検出可能なレベルにまで増幅されます。この逆転写反応と PCR の組み合わせ（RT-PCR）は、一般的に研究室で用いられる手法となっています。

① 操作方法の選択

逆転写とそれに続く PCR を行う場合、ツーステップ操作（RT と PCR を別々のチューブ内で行う）、またはワンステップ操作（RT と PCR を同一のチューブ内で連続的に行う）のいずれかを選択します。どちらの操作にも特長があります。

② 逆転写反応のためのプライマーの選択

逆転写に使用されるプライマーは、合成される cDNA のサイズおよび特異性の両方に影響を与えます。RT-PCR には通常 4 種類のプライマーがあり、特長によって使い分けられます。

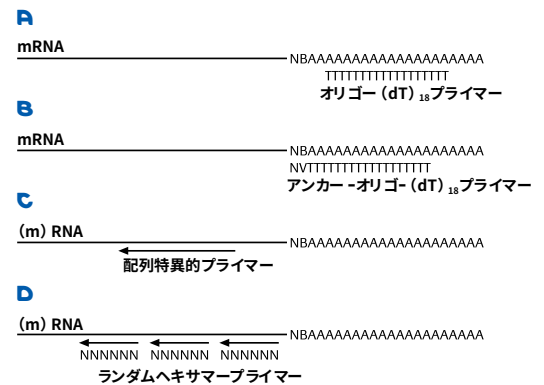
ツーステップ操作の特長

- RT および PCR でそれぞれ最適な反応条件を検討可能
- 長い配列の増幅が可能

ワンステップ操作の特長

- 所要時間が短い
- コンタミネーションのリスクが低い

逆転写反応用 プライマーのタイプ	結合部位	特長またはコメント
A オリゴ (dT) _n	真核生物（ほ乳類等） mRNA の 3' 末端のポリ A テール	▶ 完全長の cDNA を合成させます。 ▶ オリゴ (A) ストレッチを含むテンプレートの場合、プライマーはこの部位に結合し、ミスプライミングを起こします。
B アンカーオリゴ (dT) _n	ポリ A テールの開始 部位（テールの 5' 側）	▶ ポリ A テールの内部でのプライミングを防ぎます。 ▶ 完全長の cDNA を合成させます。 ▶ ツーステップ RT-PCR アプリケーションの多くに適したプライミング法です。 ▶ Transcriptor First Strand cDNA Synthesis のパーツとしてのみ供給されます。
C 配列特異的	プライマーの配列に 対して厳密に相補性 をもつ配列のみ	▶ 特定の RNA だけを選択的に転写します。 ▶ RT-PCR の特異性を大幅に高めます。 ▶ ワンステップのアプリケーションに使用できる唯一のタイプのプライマーです。
D ランダム ヘキサマー	RNA 鎖全般にわたる 多くの部位	▶ mRNA 内のすべての RNA 配列から均一の転写物を得ることができます。 ▶ ポリ A テールを含まない RNA から cDNA 転写物を得ることが可能です。 ▶ RT 反応において、RNA に対するランダムプライマーの混合比を調整することで、合成される cDNA の平均的な長さを調節できます。 例：プライマーの比率が高いと、比較的短い cDNA が合成されます。ターゲット配列の全領域をコピーする確率が増加します。 ▶ RNA の二次構造に起因する反応への障害を解決するためには、短い cDNA の転写は理想的です。



パネル A

オリゴ (dT) n プライマー（ここでは n = 18）。

パネル B

アンカーオリゴ (dT) n プライマー（ここでは n = 18）。ポリ A テールの開始点にプライミング。

パネル C

配列特異的（遺伝子特異的）プライマー。

パネル D

ランダムヘキサマー。

V = A, C または G。B = C, G または T。N = A, C, G または T。

③ RNase Inhibitor の使用

RNA の分解を防ぐため、逆転写反応時に RNase に対する阻害剤（RNase inhibitor）がよく用いられます。ロシュ社の Protector RNase Inhibitor は一般的なほとんどの RNase を不活化します。また、多くの RNase Inhibitor は +50°C 以上で活性を失うため、cDNA の合成中に RNA を保護することができませんが、Protector RNase Inhibitor は広い温度範囲（+25 ~ +55°C、ときには +60°C）で活性を示すため、多くのアプリケーションに使用可能です。

手法	テンプレートの最大長	製品名	容量	カタログ番号
ツーステップ	12 kb	cDNA Synthesis Kit	10 回反応分	11 117 831 001
ワンステップ	6 kb	Titan One Tube RT-PCR System	50 回反応分	11 939 823 001
関連製品	—	ランダムヘキサマープライマー (Primer "random")	2 mg	11 034 731 001
関連製品	—	p (dT) 15 プライマー (Primer for cDNA Synthesis)	40 µg	10 814 270 001
関連製品	—	RNase 阻害剤 (Protector RNase Inhibitor)	2,000 units	03 335 399 001
関連製品	—	RNase 阻害剤 (Protector RNase Inhibitor)	10,000 units	03 335 402 001

※カタログ番号は最小容量のみ記載しています

https://bit.ly/pcr_lp



魚を獲らずに生態調査

環境 DNA とは

日本で確立された生体相モニタリングの新技术

水を汲むだけで魚の生態が分かる？

生態学分野の調査といえば、生物個体を捕獲して分析を重ねる手法が一般的です。ところが生物サンプルを捕獲せず、河川・湖・海などから採取した水に含まれる DNA を解析することで、そこに棲む魚などの個体の種類や数などを調べる「環境 DNA 解析」という技術が研究者のみならず産業界からも注目されています。

環境 DNA とは

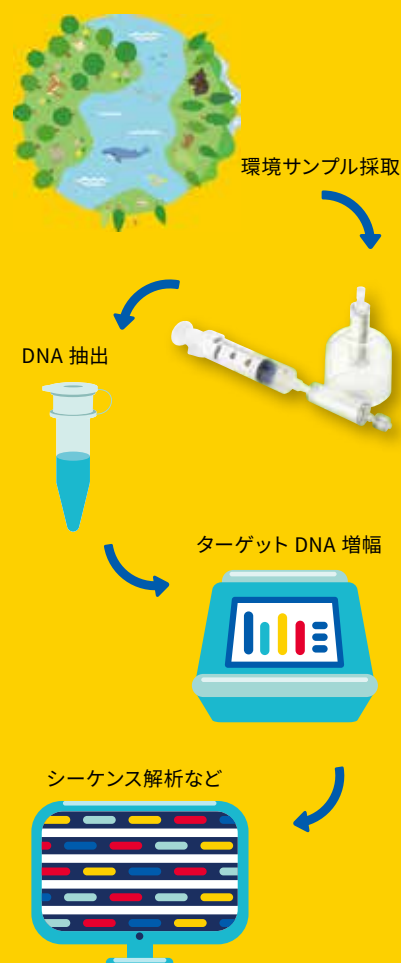
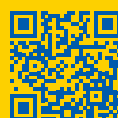
水中、土壌中、空気中などあらゆる環境中には、そこに生息している生物由来の DNA が存在しています。その DNA を総称して、環境 DNA (environmental DNA, eDNA) と呼びます。シーケンス技術やサンプル調製技術の進歩により、その環境 DNA を採取し分析することで、生物の存在や生物量・個体数、さらには遺伝情報などの膨大なデータを得ることが可能となってきました。

環境 DNA の魅力

環境 DNA 研究の最前線とその魅力については、環境 DNA 学会 (<http://ednasociety.org/>) の立ち上げにも関わられた龍谷大学の山中先生のインタビュー記事をご覧ください。

インタビュー記事はこちら：

<https://m-hub.jp/biology/1670/93-1>



環境 DNA 技術標準化委員会作成実験マニュアル記載

ステリベクス

大容量のフィルトレーションに

- 特長**
- フィルターを円筒状にした設計により目詰まりを抑制
 - エアVENTフィルターによりエアロックを防止
 - シリンジフィルターや加圧ポンプでのろ過が可能
 - ベル付きは、ろ液の外気からの汚染を最小限に低減
 - 孔径、膜材質、形状による複数の製品ラインナップ

環境 DNA を解析する前の段階に
おすすめの一品です



製品詳細はこちら

ステリベクス

検索

製品名	孔径	直径	入数	カタログ番号
ステリベクス - HV	0.45 μm	—	15	SVHV01015
			10	SVHVB1010
			15	SVHVL10RC
グラスファイバーフィルター APFF タイプ	0.7 μm	25 mm	100	APFF02500
		47 mm	100	APFF04700
		90 mm	50	APFF09050

販売取扱について：カタログ番号を青で表記している製品の取扱いはメルク株式会社、赤で表記している製品の取扱いはシグマ アルドリッチジャパン合同会社となります。ご確認のうえ、各社へご注文くださいますようお願い申し上げます。

環境をおもうリデザイン

Stericup / Steritop E

製品デザインを大幅に見つめなおし、研究が与える環境負荷を軽減

ステリカップおよびステリトップ 滅菌フィルターデバイスは、培地やバッファーの滅菌における安定かつ確実なパフォーマンスにより、世界中の細胞培養を行う研究室から信頼されています。

新しく「E (エコ・フレンドリー)」が付いたステリカップ / ステリトップのラインナップでは、プラスチック製のファネル部分なくなり、培地ボトルを直接取り付けるためのネジ山になりました。本製品をお使いいただくことで、環境負荷を軽減することにつながります。

数字でみる環境負荷軽減効果

	プラスチック量	包装材
ステリカップ E ファネル部分の削減	最大 26%	最大 20%
ステリトップ E ファネル部分と 容器ボトルを削減	最大 48%	最大 69%

ステリカップ / ステリトップ E のメリット

- 廃棄プラスチックの削減
- 実験室の保管スペースの削減
- 廃棄物コストの削減
- 施設のサステナビリティ要求事項や環境責任目標の達成手段



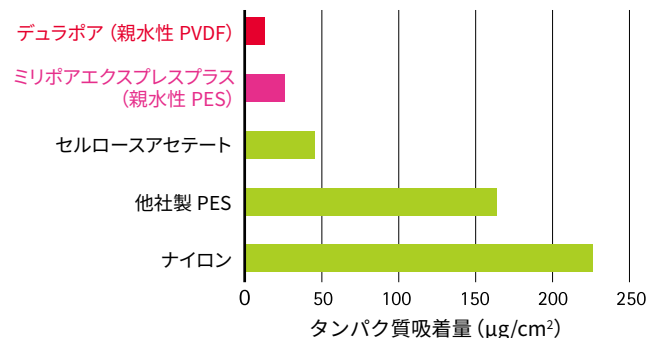
ステリカップ / ステリトップ E 滅菌フィルターは、販売されているほぼ全ての培地ボトルとガラスボトルに直接取り付けることができます。(口径 38 mm および 45 mm)



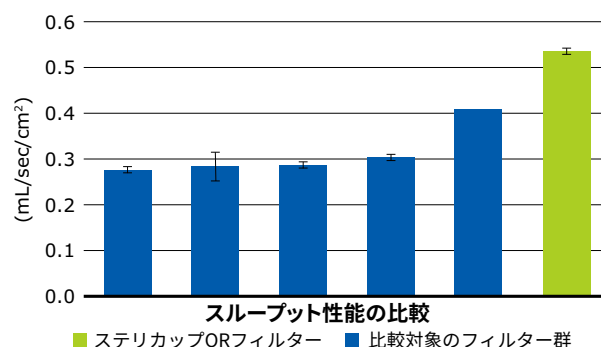
ステリカップ E 製品の包装は大幅に削減されており、包装材は環境負荷の少ない原料から作られています。

ステリカップ / ステリトップ E に採用している ミリポアエクスプレスプラス (親水性 PES) フィルターの特長

タンパク質低吸着



目詰まりが少なく高スループット



10% FBS を添加した 500 mL の DMEM のろ過に必要な時間を計測しました

製品名	フィルター材質	膜孔径	接続ボトル口径	フラスコ容量	入数	カタログ番号
ステリカップ -E	親水性 PES	0.22 μm	38 mm	500 mL	12 pk/ 箱	SEGPU0538
			45 mm	500 mL	12 pk/ 箱	SEGPU0545
			38 mm	1,000 mL	12 pk/ 箱	SEGPU1138
			45 mm	1,000 mL	12 pk/ 箱	SEGPU1145
ステリトップ -E	親水性 PES	0.22 μm	38 mm	—	12 pk/ 箱	SEGPT0038
			45 mm	—	12 pk/ 箱	SEGPT0045

2次元電気泳動装置 Auto2D

特長

- 1次元目(等電点電気泳動)と2次元目(SDS-PAGE)を自動制御により実行するため、再現性の高い泳動結果が得られます。
- 高電圧制御により分離時間が大幅短縮(60-100分)と、分解能の向上を実現しました。

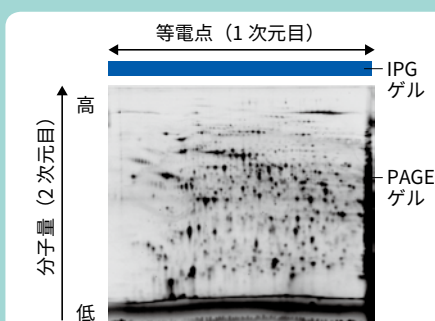
2次元電気泳動法とは

タンパク質分子の持っている2つの物理的性質(等電点、分子量)の違いを利用して、タンパク質の混合物を2次元的に分離する方法です。実際には、タンパク質の複合体が特殊なゲルの中を通過することで、等電点および分子量の違いによって分離します。

1次元目の分離は、タンパク質の持つ電気化学的性質の一つである等電点の違いを利用して行います(等電点電気泳動)。分離用のゲル上で何種類ものタンパク質が含まれるサンプルをアプライして高電圧をかけます。すると、タンパク質固有の等電点の値に応じてサンプル中に含まれるタンパク質が分離します。

2次元目の分離は、タンパク質の分子量の違いを利用して行います(SDS-PAGE)。1次元目の分離が完了した分離用ゲルを2次元目のゲルの一辺に接着させ、電圧をかけて電気泳動を行うことにより、分子量に応じた移動度の差異によってタンパク質を分離することができます。

最終的には、ゲルシート内に、分離された各タンパク質を、それぞれ異なる点(スポット)として確認することができます。スポットの位置やパターンによって構成タンパク質のプロファイルをすることや、スポットからタンパク質を抽出して質量分析などを行うことにより、タンパク質の同定を行うこともできます。



サイズ : 幅 240 mm × 奥行 428 mm × 高さ 445 mm
(使用時 : 高さ 536 mm)

質量 : 約 17 kg

電源 : AC 100 V、50/60 Hz、定格容量:160 VA (最大)

2次元電気泳動法と従来法との違い

従来法は、2次元電気泳動でタンパク質を分離するため、1次元目の等電点電気泳動と2次元目のSDS-PAGEを別々に実施します。そのため、多くの時間がかかるとともに、手技の良し悪しが結果に反映されてしまい、再現性をキープすることが難しい、いわば職人技でした。Auto2Dは1次元目の等電点電気泳動と2次元目のSDS-PAGEをオートメーションで連続実施するため、手技による差が出ず、サンプル間差に信頼性・再現性の高い結果を得ることができます。また、安全なクロードシステムのため、従来法と比べて高い電圧で電気泳動を行うことができることから、高い分解能と大幅な時間短縮を実現しています。

アップグレードでさらに使いやすく Auto2D Plus

Auto2Dのソフトウェアのアップグレードと専用チップを組み合わせることにより、さらに性能を向上させることができます。

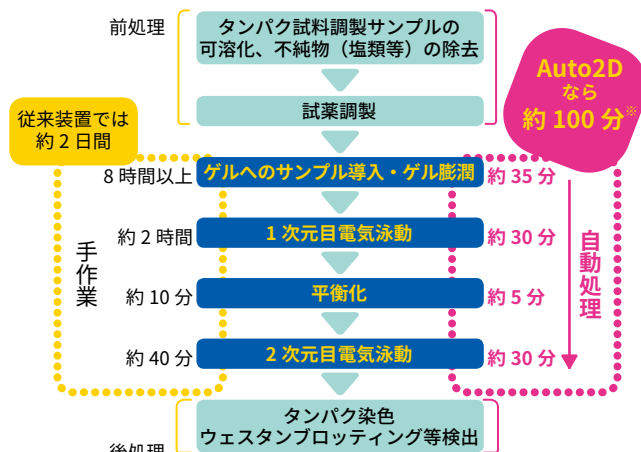
アップグレードのメリット

- ゲルへのサンプル導入効率の向上
- サンプル前処理の簡略化(脱塩プロトコルを搭載)
- 最大サンプルアプライ量の増大
- 自動中間染色(ラベリング)機能を追加
- 泳動時間の短縮(最短約60分)

高速分離

独自の制御・自動化技術で分離時間を大幅に短縮

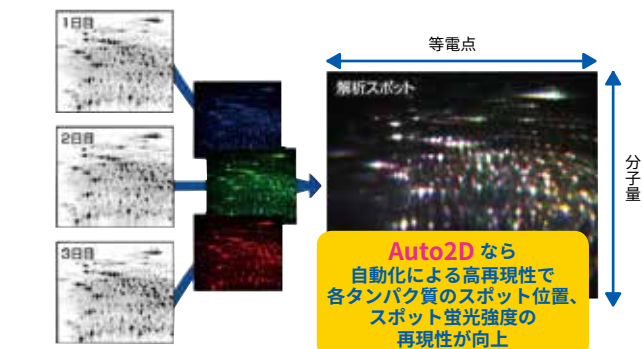
■ 2次元電気泳動によるタンパク質解析の流れ



再現性

安定した結果が得られ、定量分析にも効果

■ マウス肝臓可溶性タンパク質を 3 回分離した結果



● IEF チップ: pH 4-7
● PAGE チップ: 10.0%

評価のまとめ (評価スポット 20 個 [n=5])

スポットの 蛍光強度平均	スポット位置 ばらつき等電点	スポット位置 変動誤差 CV%	スポット 解像度分子量	スポット 解像度等電点
11.3%	0.055 pH	4.38%	2 kDa	0.02 pH

高分解能

タンパク質の分離パターンをクリアに確認

■ ヒトヒメニンタンパク質のリン酸化パターンの検出

Auto2D を用いてヒト悪性脳腫瘍タンパク質を 2 次元電気泳動した後、抗ヒメニン抗体を用いて検出した結果

● IEF チップ: pH 4-7 ● PAGE チップ: 10.0%

結果

ヒト悪性脳腫瘍由来ヒメニンタンパク質の N 末端切断シフトおよびリン酸化シフトを同時に検出できた

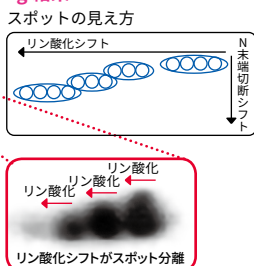
癌の悪化に関係のあるヒメニンタンパク質の
Auto2D-Western Blotting 結果

Auto2D を用いた結果

解像度 0.02 pH, 2 kDa
IEF 所要時間: 45 分

従来装置を用いた結果

解像度 0.1 pH
IEF 所要時間: 20 時間



共同開発者: 熊本大学大学院生命科学研究部: 荒木令江先生 提供

簡単操作

分析チップをセットし、画面を見ながら簡単操作

■ 画面を見ながら簡単操作・設定

タンパク質分析チップへの試薬・サンプルの投入から、各種プロトコルの設定・スタートまでのセッティングを、モニタ画面を確認しながら行えるので、誤りを防げます。

運転画面例



タンパク質分析
チップセット



アプリケーション例

バイオ医薬品製造

- HCP (宿主細胞由来タンパク質) のプロファイル
- 抗 HCP 抗体の適格性評価

医学研究

- 正常細胞と不死化 (がん化) 細胞のタンパク質比較解析
- 腫瘍タンパク質のリン酸化パターンの検出

食品関係

- アレルゲンタンパク質の検出
- 食品原料の原産地特定

製品名	入数	カタログ番号
Auto2D 本体		
Auto2D 本体	1 式	BM-100
Auto2D 専用消耗品		
Auto2D 用 電極チップ	1 個	BM-1E
Auto2D 用 溶液チップ	10 個	BM-1S
Auto2D Plus アップグレード、専用消耗品		
BM-100 アップグレードソフト	1 式	BM-100AP
電極チップ Plus	1 個	BM-1EP
溶液チップ Plus	10 個	BM-1SP
Auto2D / Auto2D Plus 共通消耗品		
Auto2D 用 1 次元目 IEF チップ pH 勾配 4-7	10 枚	BM-114070
Auto2D 用 1 次元目 IEF チップ pH 勾配 3-10	10 枚	BM-113010
Auto2D 用 1 次元目 IEF チップ pH 勾配 4-5.5	10 枚	BM-114055
Auto2D 用 1 次元目 IEF チップ pH 勾配 5-6.5	10 枚	BM-115065
Auto2D 用 1 次元目 IEF チップ pH 勾配 6-10	10 枚	BM-116010
Auto2D 用 1 次元目 IEF チップ pH 勾配 7-10	10 枚	BM-117010
Auto2D 用 PAGE チップ 6.5%	10 枚	BM-12065
Auto2D 用 PAGE チップ 7.5%	10 枚	BM-12075
Auto2D 用 PAGE チップ 10.0%	10 枚	BM-12100
Auto2D 用 PAGE チップ 12.5%	10 枚	BM-12125
Auto2D 用 Glicine 系試薬セット	1 セット	BM-1RYSJ1

Auto2D は 2018 年 12 月にシャープライフサイエンス株式会社より譲渡された製品です。販売先は日本国内のみに限定させていただきます。

【製品の技術的なお問い合わせ (テクニカルサービス)】

<メルク製品>

<シグマ製品>

TEL: 03-4531-1140

TEL: 03-6756-8245

FAX: 03-5434-4859

FAX: 03-6756-8302

Email: jpts@merckgroup.com

Email: jpts@merckgroup.com

クロスワードで ハカセと対決!

A~Dをならべて、できることばは?

A	B	C	D
---	---	---	---

**4月20日(月) ~
6月12日(金)まで!**

正解者の中から抽選で計10名様に、
メルクオリジナルのビーチサンダル
(Sサイズ(25 cm)を5名様、Mサイ
ズ(27 cm)を5名様)にプレゼントい
たします。ぜひご応募ください。



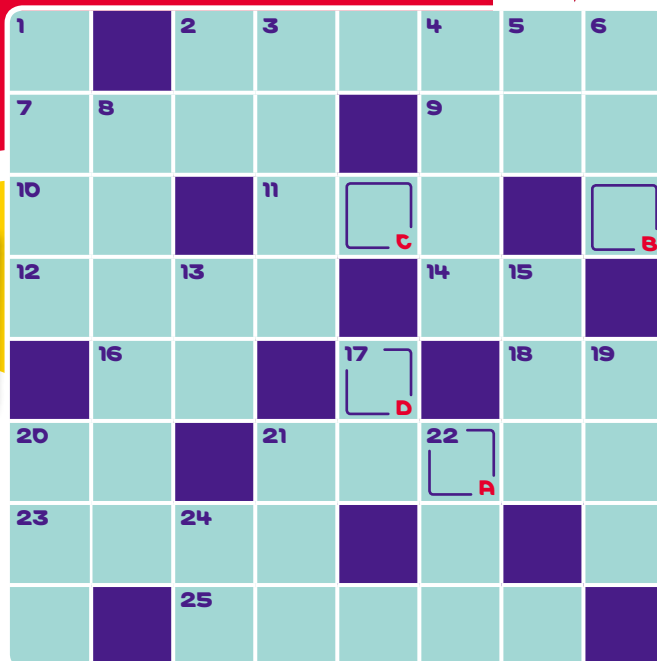
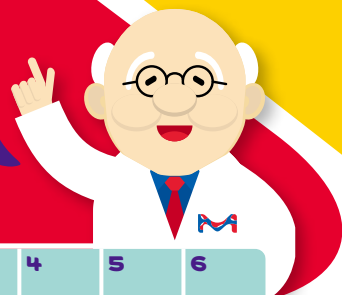
ご応募はこちらから

<http://bit.ly/SigMania05>



※ 当選者は厳正な抽選の上決定し、発表は賞品の発送をもって代えさせていただきます。
※ 住所・転居先不明などにより賞品をお届けできない場合には、当選を無効とさせていただきます。
※ 当選賞品の交換、換金、返品はできませんので予めご了承ください。

応募待ってるぞ!



タテのキー

- 化学実験で使うガラス管を見ると、このパスタを思い出します。
- 正しい論理。○○を通す。
- 空間に置いた手の位置で音程と音量を制御する電子楽器。
- 大きさや方向を持った量。スカラーの対義語。
- アナログのメーターは、6と読んだり7と読んだり、個人の○○が出ます。
- 大切なデータを消すところでしたが、○○○のところで回避しました。
- 実験のこれが詰まっていて、時間が取れません。
- 内科ではムリ。手術が必要なので、○○の出番です。
- 劇団など興業者の団。旅回りの○○○。
- 近畿地方の県。琵琶湖で有名です。
- 寒天の入ったシャーレなど。これで、細菌を培養します。
- 表面に酸化物の○○○があるため、アルマイトは丈夫です。
- 研究に没頭すると、話しかけても○○○向いて無視するんだから。
- 吉野彰博士は、○○○の苦難を乗り越え、ノーベル賞を受賞しました。
- 表情に出やすいから、ダウトのゲームで嘘がすぐに○○てしまう。

ヨコのキー

- サンプル前処理で、大容量のろ過に向いているフィルター製品は?
- 汁料理のひとつ。酒粕が入っています。
- 苦しい戦い。この理論の証明には、○○○を強いられました。
- 映画制作などで、現地に行って撮影すること。○○ハン。
- コンピュータに強い人はハッカー。では「ハッカ」を英語で言う?
- Auto2Dは、簡単に再現性の高い○○○○電気泳動ができます。
- 野球選手は、これを盗むのも仕事です。
- リノリウム張りや、うぐいす張りなどもあります。
- 今年認定された地質区分、○○ニアン。
- 「彼」を意味する英語の一人称。動物のオス。
- cDNA合成中にはRNaseに対する○○○○○が、よく用いられます。
- 正しければ○、間違っていれば×。○○○○式テスト。
- 定量PCRプローブの標識として用いられる色素のこと。

Sigmania Vol.04 の正解:「サイボウカブ」

個人情報の保護について:ご提供いただきました情報につきましては、賞品の発送や、弊社の製品やサービスに関しての情報をお客様に提供する以外の目的では利用いたしません。お客様からお預かりした個人情報はメルク株式会社で管理し、弊社 Web サイトにて公表している個人情報保護方針に従い取り扱いをいたします。(http://www.merck.co.jp/ja/privacy_statement/privacystatement.html)



メルク公式アカウント
友だち追加は
コチラ



サイエンス系
お役立ちメディア
M-hub



かんたんカタログ検索
カタログ
ファインダー



メルクライフサイエンス公式 Facebook ページ
メルクライフサイエンス - Merck で検索



メルクライフサイエンス公式 Twitter アカウント
メルクライフサイエンス - Merck で検索



メルクライフサイエンス - メールニュース
www.merckmillipore.jp/wm

本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。掲載価格は希望販売価格(税別)です。実際の価格は弊社製品取扱販売店へご確認ください。なお、品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。記載内容は2020年4月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2020 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.

メルク株式会社

ライフサイエンス リサーチ事業部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら www.merckmillipore.com/bio

E-mail: jpts@merckgroup.com

Tel: 03-4531-1140 Fax: 03-5434-4859

RBM162-2004-20K-H