

# PCR および RT-PCR の成功率を高めるために

Second edition

PCR 実験における  
重要項目と新技術



Sample & Assay Technologies

# 序論

1985年にK. Mullisと共同研究者により見つけられたPCR (polymerase chain reaction) は分子生物学および分子医学に革命をもたらしました。バイオマーカーの発見、遺伝子制御、がん研究 (図1参照) など主要な研究分野において、現在もPCRテクノロジーの改良が常に要求されています。その中には、低コストながら高いサンプル処理数、より高いアッセイ感度、信頼性の高いデータ標準化などがあります。しかしながら、アッセイ系の確立や評価、データの再現性、結果を得るまでの所要時間など大きな問題に未だ直面しています。

現在のPCRにおける要求に対応するためには、サンプル採取から、サンプルの安定化、核酸精製、増幅と検出までのワークフローにおける全ステップで進歩が必要です。ここでは増幅反応の重要性に焦点を当て解説しています。

研究分野	バイオマーカーの発見 病原体同定 遺伝子制御研究 細胞発生研究 がん研究 医薬品のバリデーション/バイオマーカーの応用			遺伝子サイレンシング (siRNA/miRNA) エピジェネティクス 遺伝子発現解析 ジェノタイピング 食品検査 血液検査 ワクチン		
	課題	サンプルの品質と量	コスト	標準化	感度	信頼できる結果
方法	サンプル採取と安定化		核酸精製	増幅	検出	

図1. 研究分野および関連する課題の概要

## PCR 実験の成否を決める重要な要因

PCR 実験はルーチンで行なわれ、多数のPCRプロトコルが開発されています。しかしながら、研究者はPCR実験において技術的な問題に直面して目的の増幅産物が得られないことも多々あります。いくつかの困難な問題 (例; スメア発生、低収量、非特異的増幅) がありますが、PCRの失敗あるいは満足できない結果の主な原因は、“反応の特異性” および “テンプレートの二次構造” の2点に集約できます。

ここでは良好なPCR実験結果が得られるように、PCRおよびRT-PCRの特異性およびテンプレート変性に影響する要因について説明します。

検討すべき要因:

- 酵素の選択 (3 ページ)
- プライマーのデザイン (11 ページ)
- 反応の条件 (例; バッファーやアニーリング温度などの選択) (6 ページ)
- テンプレートの品質 (12 ページ)
- PCRの自動化 (8 ページ)
- 高度なPCR法と新技術 (12 ページ)
- 操作の簡便性 (10 ページ)

# 酵素の選択

## Taq DNA ポリメラーゼ

特性の異なるいくつかの耐熱性 DNA ポリメラーゼが PCR 用に市販されています (表 1)。

eubacterium 属の *Thermus aquaticus* から分離された Taq DNA ポリメラーゼは標準的なエンドポイント PCR に使用される最も一般的な酵素です。この酵素は適応度が高いため、様々な PCR アッセイに使用できます。しかし室温で活性があるため、非特異的な増幅を回避するために氷上で反応液をセットアップしなければなりません。QIAGEN の TopTaq™ DNA Polymerase はこの問題を克服しました。この革新的な非ホットスタート酵素は室温でプライマーやテンプレートへの結合が制限されるので、氷を使用することなく即反応セットアップができます。

ホットスタート、シングルセル、マルチプレックス PCR のような様々なダウンストリームアプリケーションの必要性に応じて、オリジナルの “PCR ポリメラーゼ” — Taq DNA ポリメラーゼを修飾した多数の酵素が入手可能です (12 ページ)。Taq DNA ポリメラーゼやその誘導体で塩基の取り込み誤り率は平均 10,000 ヌクレオチドに対し 1 個なので、耐熱性 DNA ポリメラーゼ family B と比べて正確性が劣っています。しかし、適応度が高いため Taq DNA ポリメラーゼは現在もルーチンで汎用されており、厳密なホットスタート特性を付与することによって本酵素は困難な PCR アプリケーションにも適用可能です (12 ページ、表 4)。

表 1. PCR で使用される DNA ポリメラーゼ \*

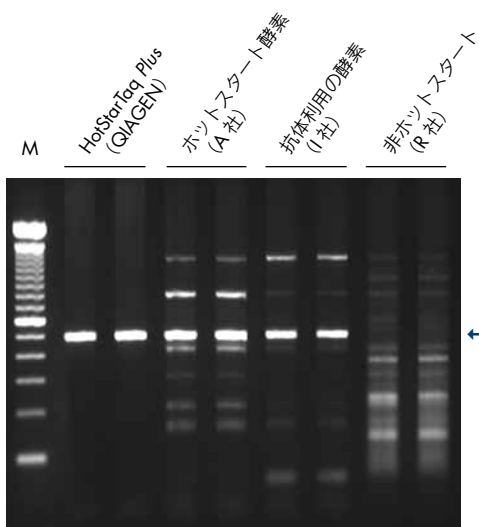
	DNA ポリメラーゼ family A	DNA ポリメラーゼ family B
入手可能な酵素	Taq DNA ポリメラーゼ <sup>†</sup> 、 ホットスタート DNA ポリメラーゼ <sup>‡</sup>	ブルーフリーディング酵素 <sup>§</sup>
5' ~ 3' エキソヌクレアーゼ活性	+	-
3' ~ 5' エキソヌクレアーゼ活性	-	+
伸長速度 (ヌクレオチド/秒)	~ 150	~ 25
誤り率 (per bp/per cycle)	1 in 10 <sup>3</sup> /10 <sup>4</sup>	1 in 10 <sup>5</sup> /10 <sup>6</sup>
PCR アプリケーション	スタンダード、ホットスタート、 逆転写、リアルタイム	ハイファイテリティ、クローニング、 部位特異的突然変異
A 付加	+	時々 <sup>§</sup>

\* 文献: Pavlov, A.R. et al. (2004) Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient amplifications. Trends in Biotechnology **22**, 253  
<sup>†</sup> 例; TopTaq DNA Polymerase  
<sup>‡</sup> 例; HotStarTaq Plus DNA Polymerase  
<sup>§</sup> HotStar HiFidelity DNA Polymerase は A 付加するので、TA/UA クローニングが容易

## ホットスタート PCR 用ポリメラーゼ

増幅反応液を低温でセットアップする際、プライマー同士が非特異的に結合してプライマーダイマーを形成します。増幅サイクル中にこのプライマーダイマーが伸長して非特異的な産物を増幅するため、特異的な増幅産物の収量が低下します。困難な PCR アプリケーションで特異的な結果を得るには、ホットスタート PCR を使用します。ホットスタート PCR 用ポリメラーゼとして機能させるために抗体による修飾で低温での Taq DNA ポリメラーゼ活性を阻害しますが、ポリメラーゼ分子内のアミノ酸間で共有結合を形成する化学修飾の方が効果的です。化学修飾は、最初の熱活性化ステップで共有結合が解裂するまで完全にポリメラーゼ活性を抑制します。一方、抗体によるホットスタート法は抗体が比較的弱い非共有結合力によりポリメラーゼと結合しているため、ポリメラーゼ分子の活性部位のいくつかはブロックされていません。その結果、非特異的なプライマーの伸長産物が PCR 中に増幅することがあります。アガロースゲル電気泳動の結果、これらの非特異的な産物はスミアあるいは目的の増幅産物とは異なるサイズのフラグメントとして観察されます (4 ページ、図 2)。





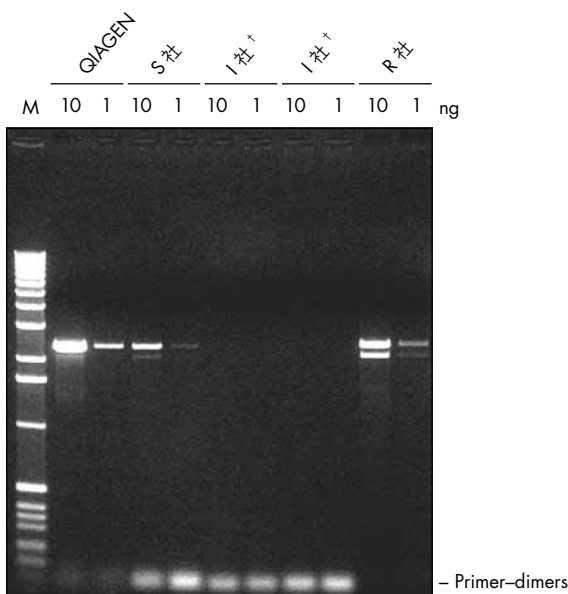
**図 2. 様々なホットスタート PCR 法の比較**  
ヒトゲノム DNA 1 µg と混合した HIV-pol-gene コンストラクト 50 コピーから 497 bp の DNA フラグメント (矢印) を増幅し、様々なホットスタート法を比較した。QIAGEN の HotStarTaq Plus DNA Polymerase (化学修飾); A 社のホットスタート酵素 (化学修飾); I 社の Taq 抗体混合液; R 社の非ホットスタート。すべての反応は duplicate で行なった\*。M: マーカー。特異性の高い増幅は HotStarTaq Plus DNA Polymerase を使用したときのみ得られた。

\* メーカーの解説書を参照。

化学修飾をベースにした QIAGEN® のホットスタート酵素を使用したユニークなホットスタート法は、5 分間 (HotStarTaq® Plus DNA Polymerase) あるいは 15 分間 (HotStarTaq DNA Polymerase) の初期変性ステップを設定するだけでどのような PCR プログラムにも簡単に組み込めます。

## ハイフィデリティ DNA ポリメラーゼ

Taq DNA ポリメラーゼのような標準的な DNA ポリメラーゼと異なり、ハイフィデリティ PCR 酵素は不正確な塩基の取り込みを回避するために 3' ~ 5' エキソヌクレアーゼ活性を持っています。ハイフィデリティ PCR 酵素は、クローニング、シーケンシング、部位特異的突然変異誘発法のような低い取り込み誤り率を必要とするアプリケーションに最適です。しかし、3' ~ 5' エキソヌクレアーゼ活性により PCR のセットアップ中や PCR の初期にプライマーを分解することがあります。短くなったプライマーが原因でおこる非特異的なプライミングのためスミアな増幅産物を生じたり、微量のテンプレートを使用した時など目的産物が増幅できないことがあります (図 3、4)。プルーフリーディング機能があるためにハイフィデリティ酵素は他の DNA ポリメラーゼに比べて反応が遅いことも注意しなければなりません。さらに直接 UA/TA クローニングを行なうのに必要な A 付加機能が非常に低いため、ライゲーションやトランスフォーメーション効率の低い平滑末端クローニングが必要です。エキソヌクレアーゼをホットスタートで活性化する HotStar HiFidelity DNA Polymerase はこれらの問題を克服し、類似の酵素と比べて正確で感度の高い結果を実現します (図 3、4)。さらにこの酵素は最後の伸長ステップで A オーバーハングも付加できるので、UA/TA クローニングを直接行なえます。



**図 3. 高感度で正確な PCR 結果を実現するために至適化されたハイフィデリティ・システムの重要性**  
HotStar HiFidelity DNA Polymerase Kit (QIAGEN) および表記のメーカーのハイフィデリティ酵素 4 種類を用いてハイフィデリティ PCR を行なった。ヒト IL9R 遺伝子の 2.3 kb フラグメントを表記のゲノム DNA 量から増幅した (40 サイクル)。M: マーカー。HotStar HiFidelity DNA Polymerase は 1 ng のテンプレートを用いて高感度な結果が得られた。

† I 社の異なる 2 種類のハイフィデリティ酵素。

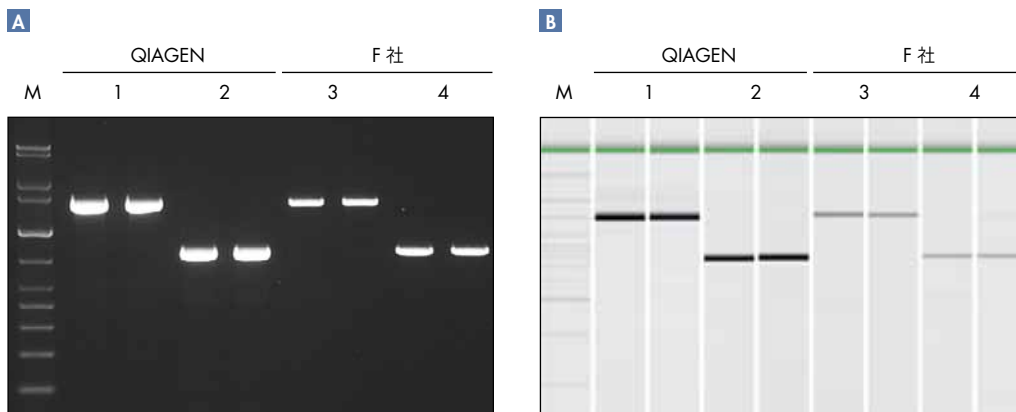


図 4. QIAGEN の HotStar HiFidelity DNA Polymerase Kit を用いた感度と信頼性の高い PCR

HotStar HiFidelity DNA Polymerase Kit と F 社のハイフィデリティ DNA ポリメラーゼを用いて PCR を行ない、アガロースゲル電気泳動 ( A ) ならびに QIAxcel™ Advanced System ( B ) により解析した。テンプレートとして 100 ng のヒトゲノム DNA を用いて、1.5 kb ( レーン 1 および 3 ) と 750 bp ( レーン 2 および 4 ) を増幅した。HotStar HiFidelity DNA Polymerase は F 社のポリメラーゼと比べて収量と感度の高い結果が得られた。

## 逆転写酵素

RT-PCR は逆転写酵素と PCR を用いて RNA 解析を実現します。通常は様々なレトロウイルス ( 例 ; Avian Myeloblastosis Virus [AMV] あるいは Moloney murine leukemia virus [MMLV] ) から分離された RNA 依存 DNA ポリメラーゼである逆転写酵素を用いてテンプレート RNA から cDNA を合成します。

Tth DNA ポリメラーゼのような耐熱性 DNA ポリメラーゼは特殊な条件下で逆転写酵素活性を示しますが、これらの酵素は中温性の逆転写酵素と同等の効果的な逆転写は行ないません。

逆転写酵素により合成された 1 本鎖 cDNA は 2 本鎖 DNA ( 例 ; ゲノム DNA ) より低温で非特異的にプライマーがアニーリングしやすいので、特異性の低い増幅結果しか得られないことがあります。特に cDNA 量が少ない場合や発現量の低いテンプレートの場合には、感度や再現性の低下に繋がります。特異性の高い増幅は RT-PCR の成功にとって非常に重要で、革新的なバッファー溶液と特殊な修飾を施した逆転写酵素、およびホットスタート PCR 法と組み合わせることにより良い結果が得られます。

至適化された逆転写反応用バッファー溶液および特別に開発された逆転写酵素 ( QIAGEN OneStep RT-PCR Kit に含まれる Ominiscript® や Sensiscript® ) を使用することで、1 本鎖 RNA 分子内に存在する二次構造を解離することができます。さらに cDNA クローニングとシーケンシングのために完全長の cDNA が必要になることがありますが、QIAGEN LongRange 2Step RT-PCR Kit に含まれるロングレンジ逆転写酵素であれば最長 12.5 kb までの転写物を作製することが可能です。

# 反応の条件

## プライマーのアニーリング特異性および PCR バッファー

PCR ではプライマーがテンプレート内の相補的な DNA 配列にアニーリングします。増幅を成功させるには、プライマーのアニーリングが特異的でなければなりません。短いアニーリング時間で効率的なハイブリダイゼーションを実現するためにプライマー濃度を上げると、非相補的な配列にもアニーリングする可能性が高くなります。非特異的なアニーリングから得られた産物の増幅は特異的な増幅と競合し、特異的な増幅産物の収量が大幅に低下します（4 ページ、図 2）。プライマー分子の非特異的なアニーリングに対する特異的なアニーリングの割合を高く保持することが PCR 成功の大きな鍵となります。アニーリングは、主に PCR バッファーの成分（特に陽イオン）およびアニーリング温度に大きく影響されます。陽イオンの最適な組み合わせにより、広範なアニーリング温度でプライマーのアニーリングに対して高い特異性を保持できます。この特性により、プライマーとテンプレートの組み合わせごとにアニーリング温度の最適化が不要になり、プライマーのアニーリング温度が異なる実際によくある PCR システムにも使用できます。

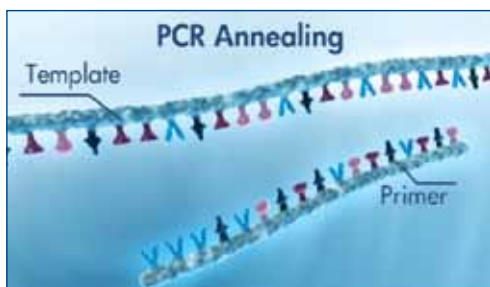


図 5. QIAGEN のユニークな PCR バッファーシステム (動画) [www.qiagen.com/PCR-video](http://www.qiagen.com/PCR-video) でご覧いただけます。

## 陽イオンの最適な組み合わせがプライマーの特異的なアニーリングを実現

PCR バッファーで汎用される陽イオンは、DNA 骨格で負電荷を持つリン酸基と結合してこれらの負電荷を中和します。そのためテンプレート DNA とプライマー分子間の静電的な反発力を弱め、プライマーのハイブリダイゼーションをより安定化します。市販のほとんどの PCR バッファーには 1 価の陽イオン  $K^+$  が 1 種類だけ含まれますが、 $K^+$  イオンは特異的および非特異的なプライマーのアニーリングを共に安定化します。その結果スミアな増幅産物が生じ、非特異的な DNA が増幅されて収量の低下に繋がります。QIAGEN はプライマーのアニーリング特異性を大幅に増大する  $K^+$  と  $NH_4^+$  の組み合わせで配合比を最適化し、全ての QIAGEN PCR バッファーに使用しています。

すなわちミスマッチ結合している塩基間の弱い水素結合を  $NH_4^+$  イオンが不安定化することにより特異性が改善されます（図 5、6）。

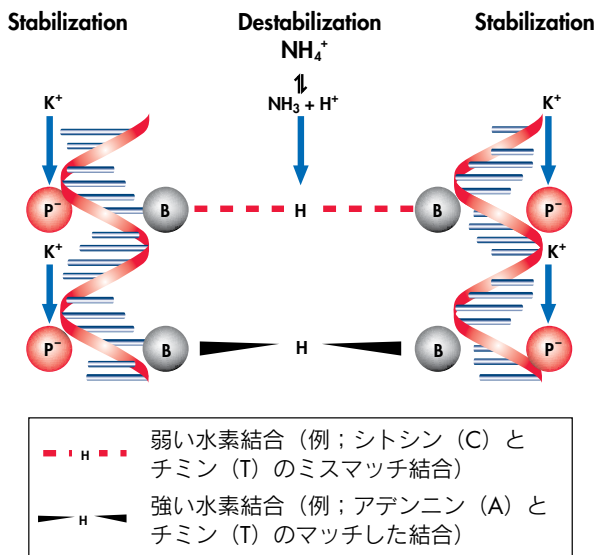


図 6. QIAGEN PCR Buffer 中の  $NH_4^+$  と  $K^+$  がプライマーのアニーリングにおける特異性を増加  
 $K^+$  は DNA 骨格のリン酸基 (P) に結合し、テンプレートへのプライマー・アニーリングを安定化する。サーマルサイクリング条件下では、アンモニウムイオンおよびアンモニアの両方として存在する  $NH_4^+$  は、塩基 (B) 間の水素結合に相互作用するため、ミスマッチ塩基対の弱い水素結合を不安定化する。これら 2 種類の陽イオンの組み合わせ効果により、幅広い温度範囲において非特異的なプライマー・テンプレート結合に対して特異的な結合の比率が高く保たれる。

## アニーリング温度

最適なプライマーのアニーリング温度は塩基成分 (A、T、G、C ヌクレオチドの割合)、プライマー濃度、イオン性の反応溶液環境に依存しています。K<sup>+</sup> と NH<sub>4</sub><sup>+</sup> を含有する QIAGEN PCR バッファーを用いると、広範なアニーリング温度で特異的な PCR 産物が高収量で得られます。この特異性は非特異的なプライマー結合の不安定化とより適応度の高い反応溶液環境によって得られ、時間のかかるアニーリング温度の至適化実験の必要がなくなります。一方、PCR バッファーあるいは 1 ステップ RT-PCR バッファーが K<sup>+</sup> イオンのみを含む場合は最適な PCR アニーリング温度の範囲が狭くなり、特異性も低くなってしまいます (図 7)。

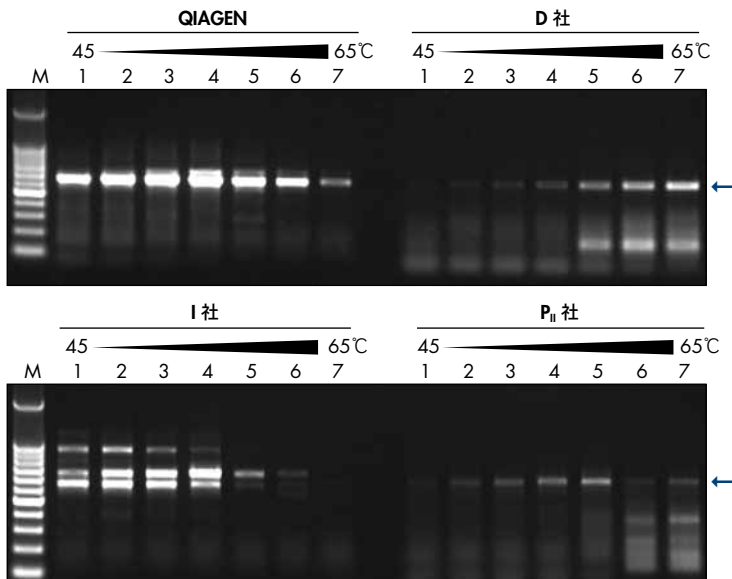


図 7. 1 ステップ RT-PCR の特異性に対するアニーリング温度の影響

一定のアニーリング温度範囲で表記のメーカーのキットを用いて 1 ステップ RT-PCR を実施した。HeLa 細胞の RNA からヒト RCC1 遺伝子のフラグメント (1,289 bp) を逆転写し、増幅した (矢印)。**M**: マーカー。至適化実験なしで特異性の高い増幅が QIAGEN OneStep RT-PCR Kit を用いた場合にのみ観察された。

## マグネシウムイオン濃度

マグネシウムイオン (Mg<sup>2+</sup>) は DNA ポリメラーゼが酵素活性を持つために必要な補因子です。K<sup>+</sup> と類似した挙動で (図 6)、Mg<sup>2+</sup> も増幅反応液に含まれる DNA、プライマー、核酸に結合します。Mg<sup>2+</sup> 濃度は一般的に dNTPs やプライマー濃度より高く、異なるテンプレートやプライマー濃度でいくつかの至適化実験が必要になることがあります。最適な濃度を越えた Mg<sup>2+</sup> は非特異的な結合を安定化し、特異的な PCR 産物の収量低下 (図 8) およびスミアな増幅産物や他の PCR アーティファクトが観察される場合があります。NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (QIAGEN PCR バッファーに含まれる) は非特異的なプライマーのアニーリングを不安定化するため、広範な Mg<sup>2+</sup> 濃度で特異的なアニーリングが優先的に行なわれて Mg<sup>2+</sup> 濃度の至適化は殆ど必要ありません。

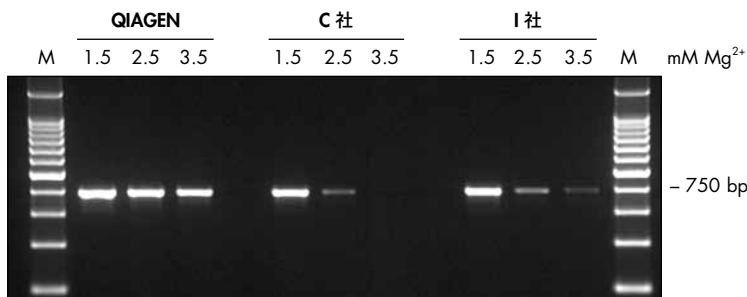
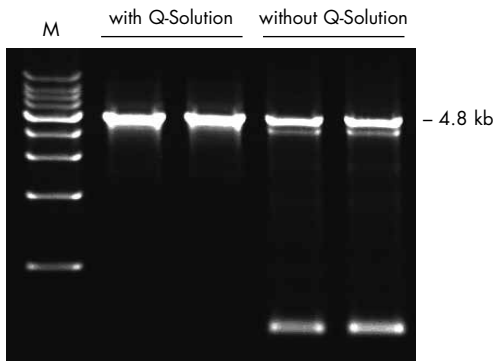


図 8. PCR 増幅を左右する Mg<sup>2+</sup> 濃度の影響

白血球からのゲノム DNA 20 ng と表記のメーカーの DNA ポリメラーゼを用いてヒト PRP 遺伝子から 750 bp のフラグメントを増幅した (反応液は 50 μl)。PCR バッファーは 1.5、2.5、3.5 mM の Mg<sup>2+</sup> を含む。PCR 産物 (5 μl) を 1.5% アガロースゲル上での電気泳動に使用した。**M**: マーカー。QIAGEN Taq DNA Polymerase と画期的なバッファーシステムを用いた場合にのみ全ての Mg<sup>2+</sup> 濃度で非常に特異性の高い増幅が観察された。



**図 9. PCR 増幅を左右する Q-Solution の効果**  
 Q-Solution を添加あるいは未添加の条件で TopTaq DNA Polymerase を用いて標準的な反応液中で 4.8 kb のフラグメントを増幅した。M：マーカー。Q-Solution を添加した反応でのみ特異的な増幅結果が得られた。

## PCR 添加物

PCR 結果を改善するいくつかの PCR 添加物が現在入手可能です。これらの試薬は、DNA の二次構造（例；GC リッチ領域や長い増幅産物）の解離、テンプレートの融解温度の低下、酵素のアクセスの促進、DNA ポリメラーゼの安定化、あるいはポリメラーゼのプラスチック容器への付着防止を促すといわれています。よく使われる PCR 添加物には DMSO (dimethyl sulfoxide)、BSA (ウシ血清アルブミン)、グリセロールがあります。

一方、殆どの QIAGEN PCR Kits には Q-Solution™ (18 ~ 19 ページ、選択ガイド参照) が添付されています。GC リッチな DNA や強固な二次構造を持つターゲットを増幅する際に、Q-Solution は PCR 反応のダイナミクスを変化させて感度を増大する斬新な変性試薬です (図 9)。

## PCR の自動化

PCR 実験の各操作の再現性と標準化は良好な実験結果を得るため必須です。この二つを達成するためには、自動化セットアップのための信頼できるツールならびにフラグメント検出のための高感度プラットフォームが必要です。

### PCR セットアップ

反応セットアップのマニュアル操作による間違いは、不正確なピペット較正および/あるいはヒューマンエラーの結果起きるピペッティングのばらつきにより起きやすくなります。これは異なる実験および施設間で矛盾した結果が出る原因になります。ピペッティングの精度を維持することおよび再現性を確実にすることは、96/384 ウェルプレートにピペッティングする際にさらに困難になります。実験結果も施設間および実験間で変動することがあり、PCR 結果およびダウンストリーム解析の比較は困難になります。PCR 試薬のマニュアル操作によるピペッティングはヌクレアーゼによるコンタミのリスクを上げ、RNA をテンプレートとして使用する際に特に問題になります。マニュアル操作によるピペッティングは時間と労力もかかり、実験者に反復運動過多損傷を引き起こす可能性もあります。

### 高精度の PCR セットアップを実現する QIAGEN の自動化プラットフォーム

ピペッティングの間違いを排除して実験の一貫性/スピード/信頼性を高めるために、高精度な PCR セットアップを全フォーマットで迅速に実現する自動化プラットフォーム、QIAgility™ を QIAGEN から入手可能です。QIAgility は複数のマスターミックスのセットアップと複数の PCR セットアップの同時処理を可能にする点で画期的であり、研究の効率化を実現します。コンタミのリスクは大幅に抑えられるのでマニュアル操作による間違いは最小限になり、高い PCR 産物の収量が得られます。

### PCR フラグメントの解析

PCR 結果の解析は通常アガロースゲル電気泳動を用いて行なわれます。従来のアガロースゲル電気泳動は時間と労力がかかり、特に多数のサンプルを解析する場合は膨大になります。ゲル



調製の際にはエチジウムブロマイドのような有害物質に接触する危険もあります。フラグメントサイズや濃度に関するデータの解析は非常に難しく、特に既に解析した PCR 産物とデータを比較しなければならない場合はさらに困難になります。アガロースの品質や割合などの要因が電気泳動の所要時間に影響し、結果に影響することもあります。電気泳動中に高圧をかけると核酸のバンドがスメアになり、結果解析が難しくなります。別々の電気泳動のデータを比較する際に、実験の標準化は正確な電気泳動条件やデータを保存するために欠かせない重要なポイントです。

## QIAGEN の自動化プラットフォームにより DNA フラグメントを簡便に解析

QIAGEN は高分解能キャピラリー電気泳動の自動化を実現するために QIAxcel Advanced System を推奨します。12 サンプルの DNA フラグメント解析をわずか 3 分で行なえます (図 10)。即使用可能なゲルカートリッジを用いると、最小限の手作業で 96 サンプルを解析でき、手作業による間違いが減少し時間のかかるゲル調製も不要です。0.5 kb 未満のフラグメントの分離能は 3 ~ 5 bp であり、QIAxcel Advanced System ではスラブゲル法よりさらに正確で信頼できる解析データを得られます。サンプルの自動アプライや充填済みゲルカートリッジにより、エチジウムブロマイドなどの有害物質への曝露が最小限に抑えられます。



図 10. QIAxcel Advanced System (動画)  
[www.qiagen.com/gel-analysis](http://www.qiagen.com/gel-analysis) でご覧いただけます。

## 研究のトータルソリューション

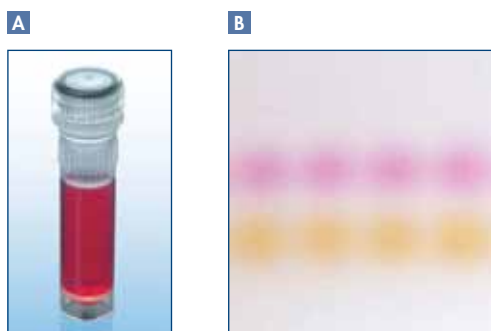
PCR セットアップおよび DNA フラグメント解析用の自動化プラットフォームで QIAGEN のエンドポイント PCR キットを使用することにより、PCR 関連の全ステップを標準化できます (図 11)。PCR セットアップには QIAgility が、正確な DNA フラグメント解析には QIAxcel システムが最適です。



図 11. PCR ワークフローの標準化  
PCR 自動化のためのトータルソリューションに関する情報ならびにアプリケーションデータは [www.qiagen.com/PCR-literature](http://www.qiagen.com/PCR-literature) をご覧ください。

## 操作の簡便性

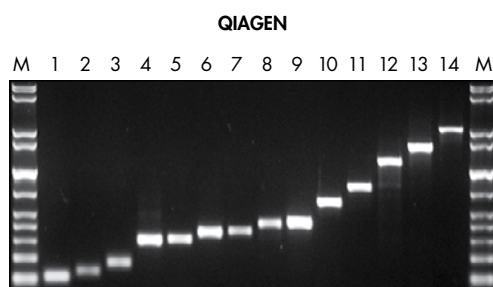
PCR 実験では、最適な酵素／反応条件／テンプレート品質／プライマーデザインなどの要因に加え、使いやすさや簡便さもまた考慮されなければなりません。異なる塩濃度、アニーリング温度、サイクル数など様々な条件下における特殊な PCR 反応の適応度についても評価する必要があります。



**図 12. Loading Dye による実験操作の効率化**  
多くの QIAGEN PCR キットに入っている CoralLoad® PCR Buffer はマーカ色素を含み容易なピペッティングを実現し (A)、PCR 産物を即ゲルにアプライでき、DNA の移動度を簡単に可視化できる (B)。

### 簡単な操作

PCR 実験を効率化し、マニュアル操作による間違いやリスクを軽減するために多くの PCR 試薬には様々な特長 (例; マスターミックス、可視化色素、簡便な室温でのセットアップ) が付加されています。QIAGEN ではこれらの特長に加え、dNTPs や時間節約のため直接ゲルにロード可能な色素を付加した様々なキットを取り揃えています (図 12)。室温では不活性なホットスタート PCR 酵素を用いて簡便に PCR および RT-PCR のセットアップができます。さらに、TopTaq DNA Polymerase Kit 中の斬新な酵素安定化剤は、標準的な PCR 酵素と比較してセットアップを非常に簡便化します。また冷蔵庫に保存できるため、試薬の凍結融解は必要ありません。QIAGEN PCR および RT-PCR 製品の優れた特長に関する概要一覧は 18 ~ 19 ページをご覧ください。



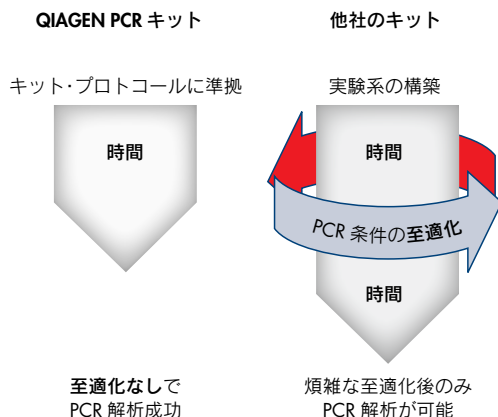
**図 13. 至適化なしで PCR 産物を確実に増幅**  
100 bp から 2 kb までの大きさの 14 種類の PCR 産物を哺乳動物ゲノム DNA から増幅するために TopTaq DNA Polymerase を用いた。PCR は至適化済みの標準なプロトコールに従い、同一のサイクリング条件を用いた。

### 様々なアッセイに一つのプロトコール

QIAGEN の PCR および RT-PCR キットで採用されている画期的な dual-cation buffer system は高感度増幅を実現し、至適化のための時間とコストを大幅に削減します。新しいアッセイの確立、評価のための至適化やグラジエント PCR にかかる時間は不要です; サーマルサイクラーにプログラム可能な 1 種類の至適化済みプロトコールで、良好な結果が容易に得られます (図 13)。

### 時間とコストを顕著に削減

QIAGEN PCR キットを用いた単純な反応セットアップ、迅速な操作手順、安定した結果、高い操作性により試薬同様に時間とコストも節約できます。すなわち PCR パラメーターの至適化は不要です。繰り返し実験の必要性も回避でき、はじめての PCR 実験で良好な結果が得られます。PCR アッセイの確立は、1 種類の至適化済みプロトコールを用いて簡単かつ容易に行なえます (図 14)。



**図 14. 至適化実験なしで良好な PCR 実験**  
QIAGEN PCR キットは、簡単な操作で信頼性の高い結果を迅速に実現する。現在汎用されている方法と異なり、QIAGEN PCR キットは PCR パラメーターの至適化が不要で、アッセイの確立を迅速かつ容易に行なえる。

# プライマーのデザイン

PCRの特異性および効率を最大にするためには、最適なプライマー配列と適切なプライマー濃度が重要です。標準的なPCR、マルチプレックスPCR、1ステップRT-PCRに使用するプライマーデザインの概要を表2に記載します。

表2. プライマーのデザインおよび使用方法に関するガイドライン

	スタンダード PCR	マルチプレックス PCR	1 ステップ RT-PCR
長さ	18 ~ 30 nt	21 ~ 30 nt	18 ~ 30 nt
GC 含有率	40 ~ 60%	40 ~ 60%	40 ~ 60%
$T_m$ 値の計算	$2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})$ 全てのプライマーペアの $T_m$ 値は類似	$2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})$ 全てのプライマーペアの $T_m$ 値は類似 60 ~ 88°Cの $T_m$ 値で最適な結果が得られる	$2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})$ 全てのプライマーペアの $T_m$ 値は類似 $T_m$ 値は逆転写反応温度より低くならないようにする (例; 50°C)
最適なアニーリング温度	$T_m$ 計算値より 5°C 低い温度	$T_m$ 計算値より 5 ~ 8°C 低い温度 ( $T_m$ 値が 68°C 以上の場合) $T_m$ 計算値より 3 ~ 6°C 低い温度 ( $T_m$ 値が 60 ~ 67°C の場合)	$T_m$ 計算値より 5°C 低い温度
プライマーの設定部位	-	-	<b>gDNA の検出を回避するため:</b> あるエキソンの 3' 末端と隣接するエキソンの 5' 末端境界領域にプライマーをハイブリダイズさせる  あるいは、少なくとも一つのイントロンを含むフランキング領域 (非翻訳領域) にプライマーをハイブリダイズさせる  mRNA 配列しかわからない場合には、300 ~ 400 bp 離れたところにプライマーのアニーリング部位を選ぶ
配列	プライマーペアの 3' 末端における 2 ~ 3 塩基の相補性を回避 プライマーとテンプレートの 3' 末端間のミスマッチを回避 プライマーの 3' 末端で 3 個あるいはそれ以上 C が連続するのを回避 プライマー内あるいはプライマーペア間での相補性を回避 3' 末端では T を回避 プライマー配列が目的のテンプレート配列にとって特異的であることを確認		
$A_{260}$ での濃度	20 ~ 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 各プライマー 0.1 ~ 0.5 $\mu\text{M}$ を最終濃度として添加 (0.2 $\mu\text{M}$ を推奨)	20 ~ 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 各プライマー 0.2 $\mu\text{M}$ を最終濃度として添加	20 ~ 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 各プライマーの 0.5 ~ 1 $\mu\text{M}$ を最終濃度として添加 (0.6 $\mu\text{M}$ を推奨)
保存条件	TE に溶解し -20°C で保存	TE に溶解し -20°C で保存	TE に溶解し -20°C で保存

## テンプレートの品質

PCR 実験では酵素反応を逐次的に複数サイクル行なうため、一回のみの酵素反応に比べて不純物（タンパク質、フェノール/クロロホルム、塩類、エタノール、EDTA、その他の有機溶媒など）に、より影響されます。ホームメイド法で調製したテンプレートに存在するこれらの夾雑物は、PCR 増幅の感度および効率を低下させます。フェノール抽出、エタノール沈殿、あるいは塩析を用いたテンプレート調製法では全ての夾雑物を除去できず、結果として PCR 実験の信頼性に悪影響を及ぼします（表 3）。確実な PCR 結果を得るためには QIAGEN のサンプル調製テクノロジーを駆使したシリカメンブレン・ベースのキット（例；QIAamp<sup>®</sup> や QIAprep Kits）を推奨します。さらにスタート DNA 量が少ない場合は、配列によるバイアスがなく微量ゲノム DNA を均一に増幅する全ゲノム増幅キット（例；REPLI-g<sup>®</sup> Kits）も使用できます。

表 3. PCR を阻害する不純物

不純物	阻害する濃度
SDS	> 0.005% (w/v)
フェノール	> 0.2% (v/v)
エタノール	> 1% (v/v)
イソプロパノール	> 1% (v/v)
酢酸ナトリウム	≥ 5 mM
塩化ナトリウム	≥ 25 mM
EDTA	≥ 0.5 mM
ヘモグロビン	≥ 1 mg/ml
ヘパリン	≥ 0.15 i.U./ml
尿素	> 20 mM
RT 反応液	≥ 15% (v/v)

様々なサンプルから高純度な DNA を精製し、正確な PCR 結果に導く各種 DNA 精製製品に関しては [www.qiagen.co.jp](http://www.qiagen.co.jp) を参照ください。

DNA の品質に加えて PCR 実験に使用するテンプレート量も PCR 結果に影響します。特にテンプレート量が多いとスミアな、あるいは非特異的な増幅産物が生じます。

## 高度な PCR 法と新技術

バイオマーカー探索、遺伝子多型解析、遺伝子制御やがん研究のような多くの研究分野においてスタンダードな PCR アプリケーションがルーチンで使用されています。さらに、より高性能で正確さを追求する要望に焦点をあてた新しい PCR 法も開発されています。これらの開発は、コストの削減、アッセイ感度の増大、信頼性のあるデータ標準化、さらにスループットの増大という難しい要求に応じて行なわれてきました（表 4）。これらの要求に対応し良好な結果を得るためには、特化した PCR バッファーシステム、および特別な添加物や試薬が必要になります。

表 4. 難しい PCR アプリケーションを成功に導く PCR 増幅法

アプリケーション	課題	最適 PCR 法
ジェノタイピング	複数の産物を同時に増幅	マルチプレックス PCR
ハイスループット/高速 PCR	結果までの時間を短縮	マルチプレックス PCR / 高速サイクリング、ホットスタート PCR
シングルセル PCR	感度の増大	特異性の高いホットスタート PCR
クローニング	正確な配列	ハイフィデリティ PCR
	長い PCR 産物の増幅	ロングレンジ PCR
メチル化 DNA の検出	PCR 特異性	MSP (Methylation-specific PCR)
ウイルス負荷のモニタリングおよび遺伝子発現解析	感度の増大	1 ステップ RT-PCR

## マルチプレックス PCR

マルチプレックス PCR では一つの反応液中で多数のプライマーペアを使用して複数のターゲットを同時に増幅します。このタイプの PCR 実験では、異なるプライマー/テンプレートシステムで最大の増幅効率を得るためにアニーリング条件の大規模な至適化が必要であり、非特異的な PCR 副産物もしばしば増幅されます。厳密なホットスタート法および特別に至適化されたバッファーシステムは、マルチプレックス PCR を成功させるための必須条件です。マルチプレックス PCR の問題を克服する方法は [www.qiagen.com/news-2](http://www.qiagen.com/news-2) をご覧ください。

一つのプライマーペアを用いるスタンダード PCR システムと比較して、マルチプレックス PCR の問題はプライマーペアごとにハイブリダイゼーション速度が異なることです。高い確率で結合するプライマーは PCR 反応成分をより多く消費するため、その他のプライマーから増幅される PCR 産物の収量が低下します。その結果、増幅されない DNA 配列が生じ、予想された PCR 結果が得られないことがあります。この問題を克服するために、QIAGEN は特別にマルチプレックス PCR 用バッファー (QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit に添付) を開発しました。このバッファーにはユニークな化合物である Factor MP が含まれています。Factor MP は様々なプライマーの核酸テンプレートへの効率的で安定したアニーリングを促進します。特定の条件下で目的のターゲット配列とプライマーペアの結合条件が最適でない場合でさえ、ハイブリダイゼーション効率およびプライマーの安定性の増大により高い収量の増幅産物が得られます (図 15)。この原理は Type-it™ Microsatellite PCR Kit にも採用されています。このキットではテンプレート量から正確なサイクル数まで操作の各ステップが至適化されています。このユニークなキットにより、ターゲット数の多いマイクロサテライトアッセイの確立がこれまでになく容易になります (図 16)。

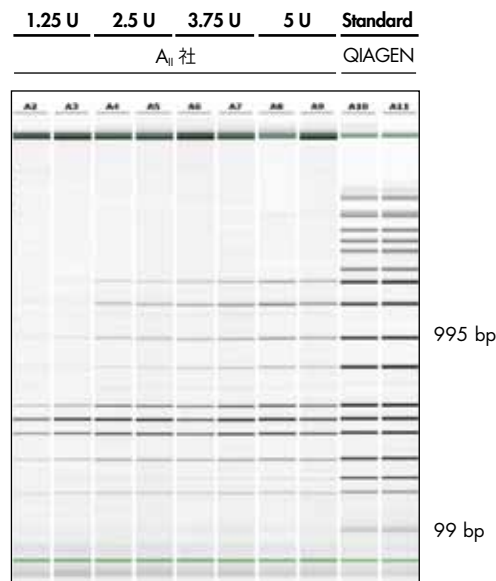


図 15. QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit による 19-plex PCR の成功例

QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit の標準的な条件を用いて 19 ターゲット領域 (99 ~ 955 bp) のマルチプレックス PCR を行なった。至適化なし (QIAGEN) あるいは A 社のホットスタート DNA ポリメラーゼを異なる濃度で用いた。解析は QIAxcel Advanced System を用いて行なった。QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit は至適化の必要がなく、全ターゲット領域を特異的に増幅した。A 社のキットを用いて行なったマルチプレックス PCR では、各濃度を用いて煩雑な至適化を行なったにもかかわらず、高濃度を用いた場合でも PCR 断片の消失が観察された。

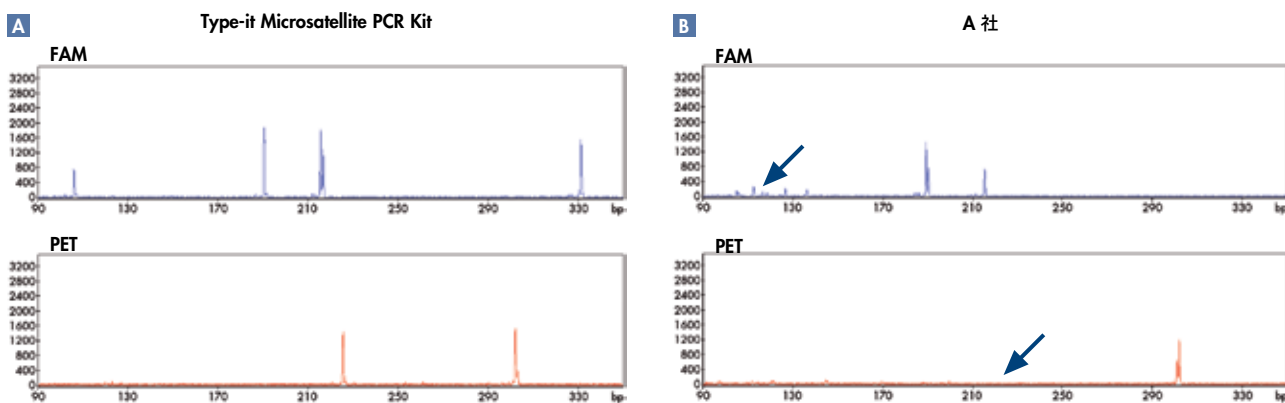


図 16. 至適化不要の Type-it Microsatellite PCR Kit を用いて正確な 13-plex STR 解析  
3730 xl Capillary Sequencer (ABI™) の 4 チャンネルのうち 2 チャンネル (FAM™ と PET®) で解析した 13 種類の STR 遺伝子座のうち 6 種類の結果を表示している。標準的な条件下で Type-it Microsatellite PCR Kit を用いて 6 種類の STR 遺伝子座すべてが確実に増幅されている。Type-it Microsatellite Kit での 25 サイクルおよび標準プロトコルを用いた結果に対し、A 社のキットではホットスタート用に至適化済みの PCR 条件とサイクル数を増加したにもかかわらず、いくつかの特異的なピークが検出されず (矢印)、また非特異的なシグナルが観察された。Type-it Microsatellite PCR Kit を用いたイヌのタイピングを [www.qiagen.com/news-4](http://www.qiagen.com/news-4) でご紹介しています。

“QIAGEN Fast Cycling PCR Kitにより、5,000年前の骨からの法医学的 DNA サンプルを短時間で再現性良く安定して増幅できました。このキットは最短時間で良好な結果を得る最高のツールです”

Dr. Alex Nikitin, Assistant Professor,  
Grand Valley State University, Minnesota.

## 高速サイクリング PCR

PCR 増幅時間の短縮は PCR のスループット数を増大し、研究者にダウンストリーム解析に必要な十分な時間を与えます。

実験完了までの時間を短縮するという要望（2 ページ、図 1 参照）は、高速 PCR 技術の最近の開発により実現しました。高速 PCR は高速での温度制御が可能な新型のサーマルサイクラーを用いるか、変性、アニーリングおよび伸長時間とサイクリング時間を顕著に短縮する革新的な PCR 試薬類を用いることにより可能です。高速サイクリング PCR 試薬は増幅の特異性および感度を維持するため至適化されていなければなりません。

QIAGEN Fast Cycling PCR Kit は斬新な Q-Bond™ Molecule の採用により、標準的なサーマルサイクラーでも高速サイクリング PCR を行なえ、良好な結果を得られます。この試薬分子は DNA ポリメラーゼの 1 本鎖 DNA への結合親和性を大幅に向上させるため、アニーリング時間をわずか 5 秒に短縮できます。ユニークなバッファー組成および至適化された DNA ポリメラーゼ濃度により変性および伸長時間も顕著に短縮できます。高速サイクリング PCR に関する文献はウェブサイト [www.qiagen.com/PCR-literature](http://www.qiagen.com/PCR-literature) をご覧ください。

## シングルセル PCR

限られた量のスタートサンプルで遺伝子解析を行なう場合にシングルセル PCR は非常に有用なツールです。フローサイトメトリーやマイクロマニピュレーションで、細胞表面マーカーや物理的な可視化を基に目的細胞の分離が可能です。微量のテンプレート分子（1 または 2 遺伝子コピー）の増幅には HotStarTaq Plus DNA Polymerase のような効率、特異性、感度の高い PCR システムが必要です（図 17）。

## ロングレンジ PCR

標準的な PCR プロトコルを用いると 4 kb までの PCR 産物をルーチンで増幅できます。しかし、4 kb 以上の PCR 産物の増幅では時間のかかる至適化を行わなければ失敗することがあります。失敗の原因として、プライマーの非特異的なアニーリング、テンプレート DNA の二次構造、不適切なサイクリング条件があり、これらの要因は短い PCR 産物より長い PCR 産物の増幅に大きく影響します。

テンプレート内に DNA 損傷が一箇所あると PCR 酵素反応が停止するため、長い PCR 産物の増幅には DNA の脱プリン化のような DNA 損傷を回避することが特に重要です。増幅反応の pH を安定化する特殊な緩衝物質により PCR サイクリング中の DNA 損傷は最小限に抑えられます。QIAGEN LongRange PCR Kit は最長 40 kb までの PCR 産物の増幅に最適です。PCR を開始する前に QIAGEN LongRange PCR Buffer とインキュベートした DNA は、損傷していないコントロール DNA と

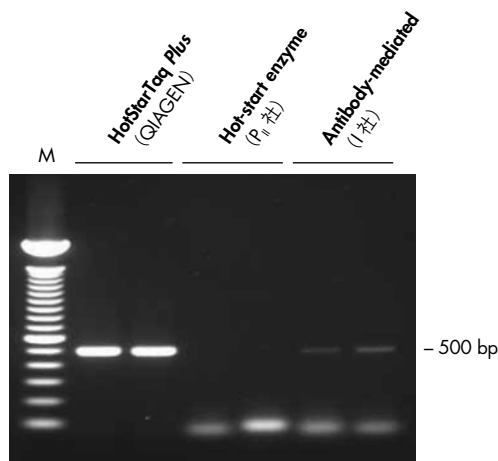
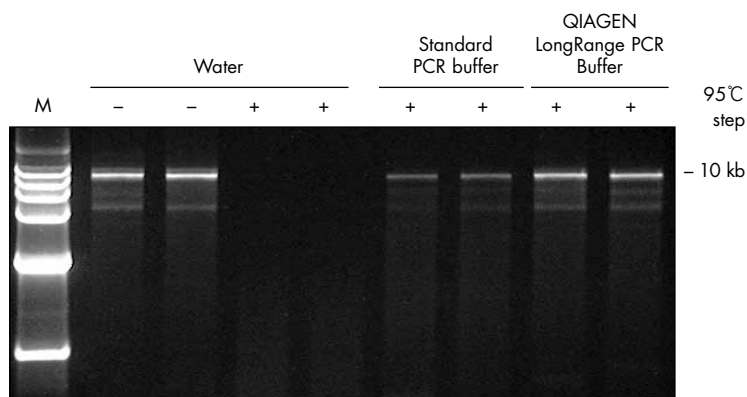


図 17. シングルセル PCR で良好な結果を実現  
フローサイトメトリーで分離し、個別の PCR チューブに直接採取したシングルセルからネズミ p53 遺伝子のフラグメント（500 bp）を増幅した。HotStarTaq Plus DNA Polymerase (QIAGEN)、P<sub>II</sub> 社のホットスタート酵素 (Hot-start enzyme)、I 社の抗体によるホットスタート酵素とバッファー (Antibody-mediated) を用いて増幅反応を行なった。M：マーカー。HotStarTaq Plus DNA Polymerase を用いた場合のみ特異的な単一のフラグメントが得られた。

同等の PCR 産物の収量があり、このバッファースステムの損傷回避能力が長鎖の PCR 産物の増幅に最適な反応環境であることを証明しています (図 18)。類似のキットと異なり、QIAGEN LongRange PCR Kit はそのユニークな特長によりロングレンジ PCR の問題点を克服します (図 19)。

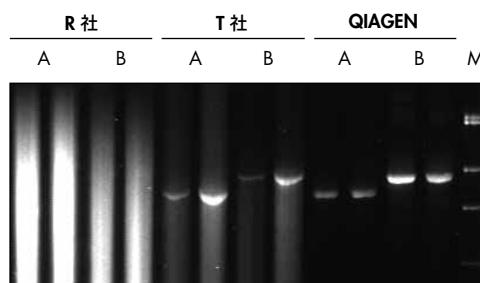


**図 18. LongRange PCR Buffer によるゲノム DNA 損傷の回避**  
水 (Water)、A 社のロングレンジ PCR バッファー (Standard PCR buffer)、または QIAGEN LongRange PCR Buffer (QIAGEN LongRange PCR Buffer) 中の白血球由来ゲノム DNA を PCR に直接使用 (-)、あるいは PCR 前に 95°C でインキュベートした (+)。増幅反応 (50  $\mu$ l) は QIAGEN LongRange PCR Kit を用いて行なった。M: マーカー。増幅産物の収量低下が示唆するように、水あるいは一般的なロングレンジ PCR バッファー中で前処理した DNA では QIAGEN LongRange PCR Buffer 中で前処理した DNA より損傷が大きかった。ロングレンジ PCR の問題点解決法に関しては [www.qiagen.com/news-3](http://www.qiagen.com/news-3) をご覧ください。

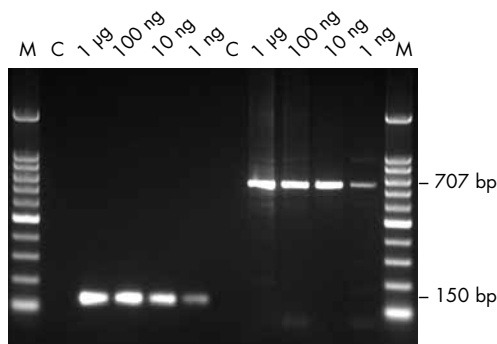
## Methylation-specific PCR (MSP)

Sodium Bisulfite で処理 (例; EpiTect<sup>®</sup> Plus Bisulfite Kit を使用) した後、ターゲット DNA のメチル化状態は MSP により調べることができます。この方法では 2 セットのプライマーペアすなわち、Bisulfite 処理で非変換のシトシン (ゲノム DNA 内のメチル化シトシンに由来) にアニーリングするセットと、ゲノム DNA 内の非メチル化シトシンが Bisulfite 処理により変換したウラシルにアニーリングするセットの 2 種類が必要です。非変換の配列に対応するプライマーセットで増幅された産物は、シトシンがメチル化されており、Bisulfite 処理による変換 \* から保護されたことを示しています。

さらに非特異的なプライマー結合や PCR アーティファクトの増幅を回避するため厳密で特異性の高い PCR 条件を使用しなければなりません。非メチル化シトシンのウラシルへの変換により DNA 配列の複雑性が低下し、非特異的なプライマー・テンプレート結合の傾向が増大するため、至適化された PCR 条件は特に重要です。GC 含有率の高いテンプレート DNA の増幅用にデザインされた HotStarTaq Plus DNA Polymerase は MSP でも使用され、良好な結果を示します (図 20)。さらに QIAGEN の EpiTect MSP Kit は、エピジェネティクス・アプリケーションにおいて信頼性の高い MSP を実現するために特別に至適化されています。



**図 19. QIAGEN LongRange PCR Kit を用いるロングレンジ PCR 結果の優秀性**  
テンプレートとして 40 ng のヒトゲノム DNA を使用して、表記のキットで PCR を行なった。R 社および T 社のキットと異なり、QIAGEN LongRange PCR Kit は簡単なプロトコルを用いて良好な増幅を実現し、7.6 kb と 8.9 kb に増幅産物が得られた。M: マーカー



**図 20. 高感度な MSP 増幅**  
QIAamp DNA Blood Mini Kit を用いて血液からヒトゲノム DNA を精製し、様々な量の DNA (1 ng ~ 1  $\mu$ g) を EpiTect Bisulfite Kit を用いて変換した。変換した DNA の増幅用にデザインした 2 セットのプライマーと HotStarTaq Plus Master Mix Kit を用いて PCR を行なった。5  $\mu$ l の各 PCR 産物を 1.3% アガロースゲルにロードした。HotStarTaq Plus Master Mix Kit は全ての DNA 量から特異的な増幅を実現した。M: マーカー; C: ネガティブコントロール

\* 文献: Derks, S. et al. (2004) Methylation-specific PCR unraveled. Cell Oncol. 26, 291.

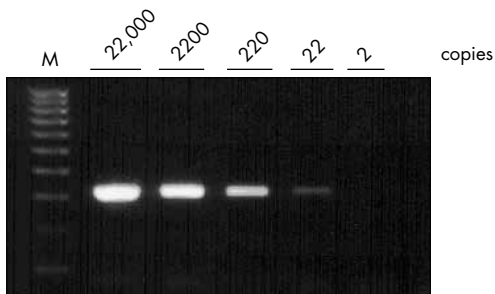


図 21. ウイルス RNA の効果的な検出

持続感染 Vero 細胞から分離したセンダイウイルス RNA から F 遺伝子 mRNA の 336 bp フラグメントを逆転写し、増幅した。表記したウイルスゲノムのコピー数で QIAGEN OneStep RT-PCR Kit を用いて反応を行なった\*。M：マーカー

\* データ提供：H. Rausch, Max Planck Institute for Biochemistry, Martinsried, Germany as part of the project "Experimental control of virological work at safety levels 2 and 3 in Bavaria," supported by the Bavarian Ministry of the Environment.

## 1 ステップ RT-PCR を用いたウイルス研究

RNA の二次構造は、多岐にわたり RT-PCR 結果に影響します。逆転写反応中に複雑な二次構造を持つ RNA 領域で逆転写反応が停止したり、テンプレート RNA から逆転写酵素が遊離する原因になることがあります。結果として得られるプライマー結合部位を含まない不完全な cDNA は、PCR で増幅されません。逆転写酵素がループ構造をスキップした結果として cDNA に欠損部分が生じ、不完全な PCR 産物が増幅される場合もあります。

発現量の低い転写物あるいはウイルス RNA 配列を増幅する際に、これらの問題はさらに深刻になります。最大の感度が要求されるウイルス検出や遺伝子発現解析のようなアプリケーションでは、バランスの取れた逆転写酵素システム、厳密なホットスタート酵素、至適化済みのバッファシステムの組み合わせが非常に重要です。ウイルスサンプルに特化した 1 ステップ RT-PCR プロトコルを弊社ウェブサイト [www.qiagen.com/PCR-literature](http://www.qiagen.com/PCR-literature) でダウンロードしてご利用ください。

QIAGEN OneStep RT-PCR Kit に添付されているバッファーにより高温 (50°C) での逆転写反応が可能です。この高い反応温度は二次構造を解離して逆転写反応の効率を改善します。特に少量のテンプレートを用了 1 ステップ RT-PCR には重要です。

## まとめ

PCR 法は、最新の分子生物学研究のため強力かつ急速に開発されているツールです。最近の PCR テクノロジーの進歩により、感度や特異性の向上だけでなく結果が迅速に得られるようになりました。初めての実験でも最適な PCR 実験結果を得るため、ここに記載されている簡単なガイドラインを参考にしてください。QIAGEN の PCR および RT-PCR 製品は至適化なしで最良の結果が得られるように特別に開発されています。さらにマスターミックス、ゲルに即ロードできる PCR バッファー、わかりやすいプロトコル、セットアップから検出までのワークフローの各ステップの自動化など実験を簡便化するツールも提供しています。QIAGEN は信頼できる定量 PCR および定量 RT-PCR、全ゲノム増幅キットも取り揃えています。QIAGEN の PCR 製品を用いてエンドポイント PCR の問題点をどのように克服できるかをウェブサイト [www.qiagen.com/news-1](http://www.qiagen.com/news-1) でご確認ください。

どのような PCR 増幅でもお客様のご要望にあったキットを QIAGEN はご用意しています(18 ~ 19 ページ、選択ガイド)。



## オーダーインフォメーション

製品名	内容	Cat. no.	価格 (¥)
<b>スタンダード PCR — スタンダードおよび特殊な PCR アプリケーション</b>			
TopTaq DNA Polymerase (250)*	Fridge storage and room temperature setup	200203	19,000
TopTaq Master Mix Kit (250)	Fridge storage and room temperature setup	200403	25,000
Taq DNA Polymerase (250)*	With ready-to-load PCR buffer	201203	19,000
Taq PCR Master Mix Kit (250)*	Ready-to-use master mix format	201443	26,000
<b>ホットスタート PCR — 全てのアプリケーションにおける迅速で特異性の高い増幅用</b>			
HotStarTaq Plus DNA Polymerase (250)*	With ready-to-load PCR buffer	203603	23,000
HotStarTaq Plus Master Mix Kit (250)*	Ready-to-use master mix format	203643	27,500
HotStarTaq DNA Polymerase (250)*	With PCR enhancer — Q-Solution	203203	23,000
HotStarTaq Master Mix Kit (250)*	Ready-to-use master mix format	203443	32,000
<b>高速サイクリング、ホットスタート PCR — どのサーマルサイクラーでも超高速かつ特異的に増幅</b>			
QIAGEN Fast Cycling PCR Kit (200)*	Ready-to-use master mix format	203743	23,000
<b>ハイファイデリティ PCR — 感度および信頼性の高いハイファイデリティなホットスタート PCR</b>			
HotStar HiFidelity Polymerase Kit (100)*	Complete kit format with dNTP mix	202602	20,000
<b>ロングレンジ PCR — 長鎖フラグメントを高感度かつ正確に増幅</b>			
QIAGEN LongRange PCR Kit (20)*	With dNTP mix	206401	6,400
<b>マルチプレックス PCR — 複数のターゲットを高い感度と特異性で増幅</b>			
QIAGEN Multiplex PCR Kit (100)*	Ready-to-use master mix format	206143	37,000
QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit (30)*	Ready-to-use and ready-to-load master mix format	206151	10,500
<b>1 ステップ RT-PCR — 迅速で高感度かつ効率的な 1 ステップ RT-PCR</b>			
QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (25)*	Complete kit format with dNTP mix	210210	21,500
<b>2 ステップ RT-PCR — 高感度で正確な 2 ステップ、ロングレンジ RT-PCR</b>			
QIAGEN LongRange 2Step RT-PCR Kit (20)*	Complete kit format with dNTP mix	205920	13,000
<b>dNTPs — 感度および再現性の高い PCR および RT-PCR 用</b>			
dNTP Set (100 µl)*	100 mM each dATP, dCTP, dGTP, dTTP	201912	7,900

\* その他のサイズまたはフォーマットもございます。お問い合わせください。また、弊社の定量 PCR および全ゲノム増幅に関連する全製品群に関してはウェブサイト [www.qiagen.co.jp](http://www.qiagen.co.jp) をご覧ください。

**PCR 関連製品については弊社ウェブサイト [www.qiagen.com/goto/PCR](http://www.qiagen.com/goto/PCR) をご覧ください。**

最新のライセンス情報および製品ごとの否認声明に関しては、各 QIAGEN 製品の英語版 Handbook あるいは User Manual をご覧ください。QIAGEN キットの Handbook および User Manual は [www.qiagen.co.jp](http://www.qiagen.co.jp) から入手可能です。

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, QIAGility™, QIAprep®, QIAxcel™, Coralload®, EpiTect®, HotStarTaq®, Omniscript®, Q-Bond™, Q-Solution™, REPLI-g®, Sensiscript®, TopTaq™, Type-it™ (QIAGEN Group); ABI™ (Applied Biosystems or its subsidiaries); FAM™, PET® (Life Technologies); TaqMan® (Roche Group). 本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

© 2011 QIAGEN, all rights reserved.



特徴 — 選択ガイド

利点	特長	PCR kits														RT-PCR kits				
		GIAGEN Multiplex PCR Kit	GIAGEN Multiplex PCR plus Kit	Type-i Microsatellite PCR Kit	Type-i Mutation Detect PCR Kit	GIAGEN Fast Cycling PCR Kit	GIAGEN Longrange PCR Kit	Hotstar Httidely polymerase PCR Kit	Hotstar Httidely polymerase PCR Kit	Hotstarq DNA polymerase PCR Kit	Hotstarq Master Mix Kit	Hotstarq plus DNA polymerase PCR Kit	Hotstarq plus Master Mix Kit	Taq DNA polymerase PCR Kit	Taq PCR Core Kit	Taq PCR Master Mix Kit	Taqq DNA polymerase PCR Kit	Taqq Master Mix Kit	RT-PCR kits	
信頼できる結果	至適化不要	GIAGENの全 PCR および RT-PCR Kit																		
		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
スピード	Ultrafast PCR	■																		
	Multiplex PCR	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	Hot-start (5分間活性)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	Hot-start (15分間活性)	■																	■	
	Hot-start (5分間活性)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
PCR 性能	高い特異性	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	高い感度	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	Q-Solution (増幅困難なテンプレートへの増幅)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
簡便性	ファイデリティ	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	
	増幅産物サイズ	≤3.5 kb	≤3.5 kb	≤3.5 kb	≤40 kb	≤5 kb	≤5 kb	≤5 kb	>10x	≤5 kb	≤5 kb	≤5 kb	≤5 kb	≤5 kb	≤5 kb	≤5 kb	≤5 kb	≤5 kb	≤5 kb	
簡便性	直接 UA/TA クローニング	GIAGENの全 PCR および RT-PCR Kit																		
	PCR buffer、マーカー色素添付 (CordLoad)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	室温でセットアップ	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	冷蔵保存	■*	■†	■†	■†	■†	■*	■*	■†	■†	■†	■†	■†	■†	■†	■†	■†	■†	■†	■†
	スクレオチド添付の完全キットフォーマット	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	スクレオチド添付のマスターミックスフォーマット	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

\* 最高6ヶ月 † 最高2ヶ月

[www.qiagen.co.jp](http://www.qiagen.co.jp)

株式会社 キアゲン ■ 〒 104-0054 ■ 東京都中央区勝どき 3-13-1 ■ Forefront Tower II  
Tel: 03-6890-7300 ■ Fax: 03-5547-0818 ■ E-mail: [techservice-jp@qiagen.com](mailto:techservice-jp@qiagen.com)

