

## 簡便で正確なリアルタイム PCR 実現のために

### PCR 特異性に影響する各ファクターと簡便な最適化

リアルタイム PCR を成功させるためには特異性の高い PCR 反応を行なうことが重要です。非特異的なアニーリングから得られた産物と特異的な産物の増幅が競合した結果、特異的な増幅産物の収量が大幅に低下し、リアルタイム PCR 反応の感度および検量線の直線性が低下します。特に SYBR® Green I を検出に用いた際には、プライマーダイマーやその他の非特異的な PCR 産物によっても蛍光シグナルが発生するため、アッセイ全体の感度が低下し、目的の核酸の正確な定量もできなくなります。本稿では PCR の最適化に必要ないくつかの要素について説明いたします。

#### ホットスタート PCR 用ポリメラーゼ

eubacterium *Therumus aquaticus* から分離された *Taq* DNA ポリメラーゼは PCR で使用されている最も一般的な酵素です。この酵素は室温でも活性があるため、室温でのセットアップの際にプライマー同士あるいはテンプレートとプライマーが非特異的に結合すると、非特異的な産物を形成してしまいます。このような非特異的な増幅は、高温で活性化される DNA ポリメラーゼを使用することで回避することができます。ホットスタート DNA ポリメラーゼを形成するには抗体と化学修飾による方法があります (表 1)。抗体による方法では、抗体が比較的弱い非共有結合力によりポリメラーゼに結合しているため、一部のポリメラーゼ分子が活性化状態にあり、非特異的なプライマーの伸長産物が PCR 中に増幅されることがあります (図 1)。一方、ポリメラーゼ分子内のアミノ酸と共有結合を形成する化学修飾は、最初の熱活性化ステップ中に共有結合が切断されるまで完全にポリメラーゼ活性を抑制するため、抗体に比べ厳密に抑制されています。全ての QIAGEN のリアルタイム PCR 試薬には、化学修飾をベースにしたホットスタート酵素である HotStarTaq® DNA polymerase (活性化 15 分) あるいは高速サイクリング用 HotStarTaq Plus DNA Polymerase (活性化 5 分以下) が使用されています。

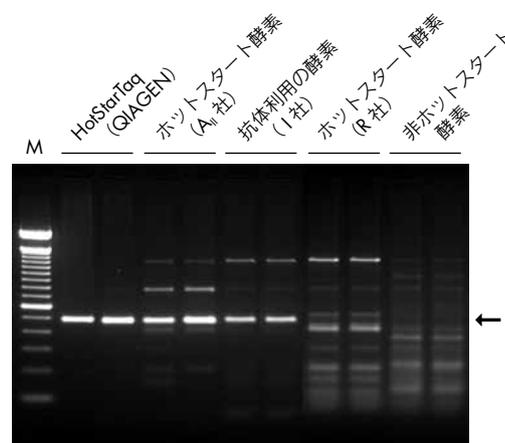


図 1. 様々なホットスタート DNA ポリメラーゼによる PCR  
1 µg のヒトゲノム DNA に添加した HIV-pol 遺伝子コンストラクトの 50 コピーから 497 bp フラグメントを次の酵素を使用して増幅した。QIAGEN の HotStarTaq DNA Polymerase ; A<sub>1</sub> 社と R 社のホットスタート酵素 ; I 社の Taq 抗体ミックスと非ホットスタート酵素。矢印は特異的な PCR 産物を示す。各 PCR 反応液から同量を 2% アガロースゲルにロードし、分析した。M : マーカー

表 1. ホットスタート Taq DNA Polymerase の形成方法の違いとその特徴

形成方法	酵素の活性状態	特徴
抗体	活性化ステップ前から一部の酵素が活性化	セットアップ時に非特異的な増幅の可能性あり 1 ステップ RT-PCR の RT 反応時に非特異的な増幅の可能性あり
	初めの活性化ステップで全ての酵素が活性化	プライマー/テンプレート複合体に対し活性化 Taq DNA ポリメラーゼが多いため、非特異的な増幅が起こる
化学修飾	活性化ステップまたは DNA 変性ステップまで完全に不活性	セットアップ時の非特異的な増幅なし 1 ステップ RT-PCR において、RT 反応時でも不活性
	初めの活性化ステップで、一部のポリメラーゼが活性化	プライマー/テンプレート複合体に対し活性化 Taq DNA ポリメラーゼが多すぎず、非特異的な増幅がない PCR 反応の過程で徐々に酵素が活性化する

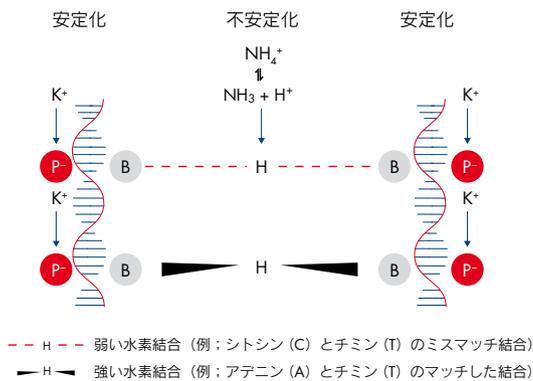


図 2. QIAGEN PCR バッファースの特異性増加モデル

$\text{K}^+$  は DNA のリン酸基に結合し、テンプレートへのプライマーのアニーリングを安定にする。サーマルサイクル条件下で、アンモニアやアンモニウムイオンとして存在する  $\text{NH}_4^+$  は、塩基対間の水素結合に影響を及ぼし、ミスマッチ塩基対間の水素結合を不安定化させる。これら二つのイオンを組み合わせは、幅広い温度範囲に対応可能となり、特異性の高い性能が維持される。

## PCR バッファースのアニーリングへの影響

特異性の高い PCR にはアニーリングステップが非常に重要です。プライマーがテンプレートに特異的にアニーリングすると、特異性の高い PCR 産物が高収量で得られ、増幅反応の感度が増加します。QIAGEN PCR バッファースシステムでは、独自の陽イオンの組み合わせにより広範囲にわたる条件下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。

### 特異性をあげる QIAGEN PCR バッファース

ほとんどの市販の PCR バッファースに含まれている陽イオン、 $\text{K}^+$  および  $\text{Mg}^{2+}$  イオンは、DNA のリン酸基に結合し、プライマー/テンプレート複合体を安定化しますが、非特異的なアニーリングも安定化するため (図 2)、特異性が低下する場合があります。

QIAGEN PCR バッファースは  $\text{NH}_4^+$  を含み、ミスマッチ塩基間の水素結合を不安定化します。この  $\text{K}^+$  と  $\text{NH}_4^+$  の固有の配合比により、幅広い  $\text{Mg}^{2+}$  濃度やアニーリング温度条件下で特異性の高い増幅が可能となっており、プライマー/テンプレートごとの反応条件の至適化は不要です。

### 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、反応バッファース条件に依存しています。 $\text{K}^+$  と  $\text{NH}_4^+$  を含有する QIAGEN PCR バッファースを用いると、広範囲の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、より適応性の高い反応バッファース条件によって得られ、それにより時間のかかるアニーリング温度の至適化実験が不要です。一方、 $\text{K}^+$  だけを含む PCR バッファースを用いた場合、最適な PCR アニーリング温度の範囲は狭く、特異性も低くなっています (図 3)。

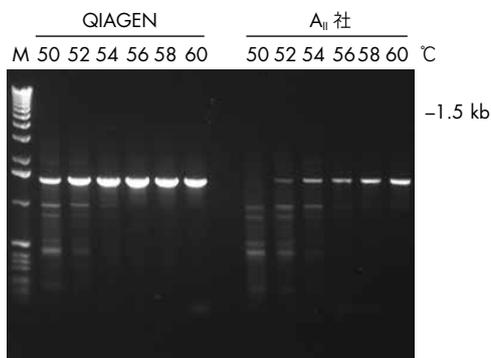


図 3. 幅広い至適アニーリング温度

表記のアニーリング温度で QIAGEN PCR バッファースと QIAGEN Taq DNA Polymerase を用いて PCR 増幅を行なった (HotStarTaq DNA Polymerase の場合も同様の結果が得られた)。同時に他社 (A<sub>11</sub> 社) の  $\text{K}^+$  のみを含む PCR バッファースと Taq DNA Polymerase を用いて同じ PCR を行なった。ターゲットはシングルコピーのヒト囊胞性繊維症遺伝子。

### マグネシウムイオン濃度

$\text{Mg}^{2+}$  は Taq DNA ポリメラーゼの活性に必要な補因子であるため、低濃度では Taq DNA ポリメラーゼの活性は低下します。しかし、過剰な  $\text{Mg}^{2+}$  濃度ではミスマッチ塩基対の形成を促進し、非特異的な増幅が生じます (次ページ、図 4B)。また、様々な成分 (dNTPs、プライマー、テンプレート DNA、EDTA、タンパク質など) と結合し遊離の  $\text{Mg}^{2+}$  濃度が減少するため、同一の  $\text{Mg}^{2+}$  濃度で多検体にわたり増幅効率と特異性を維持することが困難です。一方、QIAGEN PCR バッファースに含まれている  $\text{NH}_4^+$  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、広範囲の  $\text{Mg}^{2+}$  濃度で特異的なアニーリングが行なわれ、 $\text{Mg}^{2+}$  濃度の至適化はほとんど必要ありません (次ページ、図 4A および図 5)。

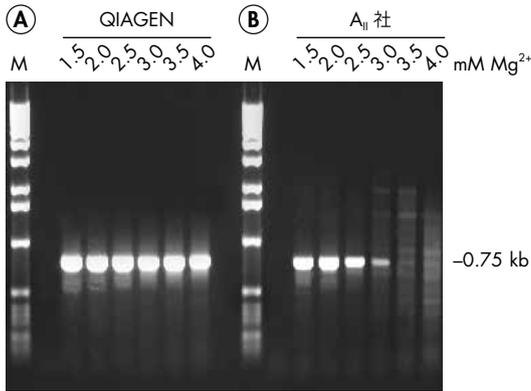


図 4.  $Mg^{2+}$  濃度に依存しない QIAGEN PCR バッファースystem  
 (A)  $NH_4^+$  を含む QIAGEN PCR システム。  
 (B)  $NH_4^+$  を含まない他メーカーの PCR システム。  
 サイクリング条件：3 min 94°C (45 sec 94°C、1 min 56°C、1 min 72°C) x 35 cycles。  
 テンプレート：150 ng のヒトゲノム DNA。  
 ターゲット：シングルコピーのプリオンタンパク質遺伝子。

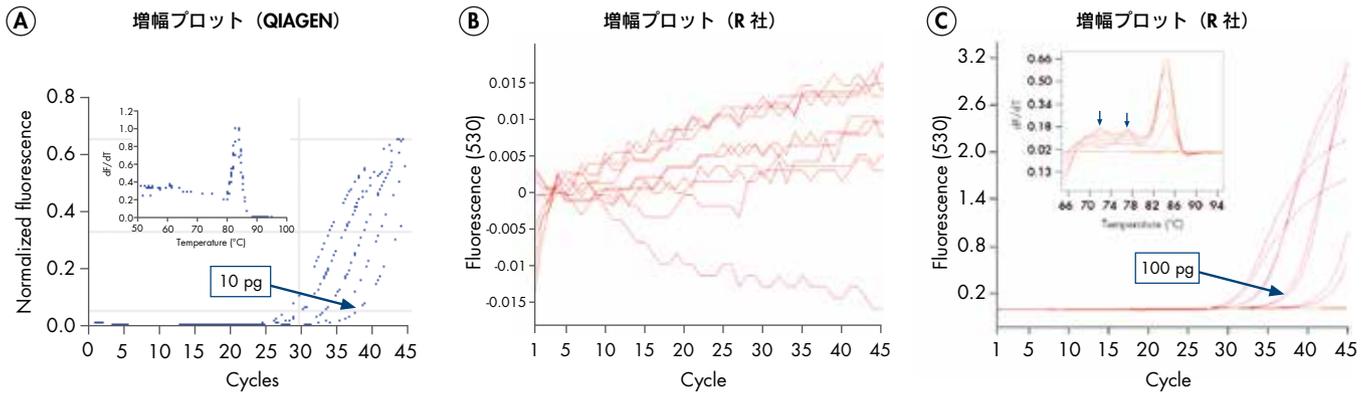


図 5.  $Mg^{2+}$  濃度の至適化なしで感度と特異性の高い検出  
 ヒト白血球 RNA の 10 倍段階希釈液 (100 ng ~ 10 pg) をテンプレートとし、SYBR Green を用いた 1 ステップリアルタイム RT-PCR で使用した。BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2) の QuantiTect Primer Assay を用いて、duplicate で反応を行なった。挿入図は融解曲線を表す。(A) Rotor-Gene™ Q および Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Kit を用いた反応では全てのテンプレートで増幅が起こり、また融解曲線で単一のピークが得られた。(B) および (C) : R 社の装置とキットを用いた反応。(B) マスターミックスをそのまま用いた場合、増幅はほとんど起こらなかった。(C)  $Mg^{2+}$  濃度の至適化後に初めて増幅が検出された。増幅プロットより検出限界は 100 pg で、また融解曲線より非特異的な増幅が観察された。

### プライマーデザイン

PCR 産物の長さは PCR の感度に影響します (図 6)。その他プライマーデザインやプライマー濃度は PCR の高い特異性や増幅効率に重要です。プライマーデザインのガイドラインを表 2 に示します。

QIAGEN では SYBR Green 検出用に開発された QuantiTect® Primer Assay (4 ページ) をご用意しております。

表 2. リアルタイム PCR のためのプライマーデザイン

配列：	<ul style="list-style-type: none"> <li>PCR 産物の長さは 150 bp 以下が理想である</li> <li>プライマーおよびプローブ内とそれぞれの間での相補的配列を避ける</li> <li>ミスマッチを避ける</li> <li>ミスマッチが起こりやすい 3' 末端 T を避ける</li> </ul>
長さ：	18 ~ 30 ヌクレオチド
GC 含有：	40 ~ 60%
$T_m$ (simplified)：	$T_m = 2^{\circ}C \times (A+T) + 4^{\circ}C \times (C+G)$

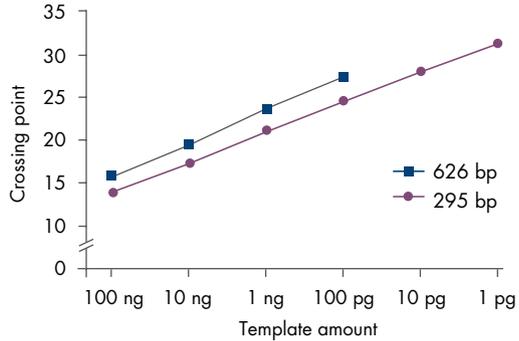
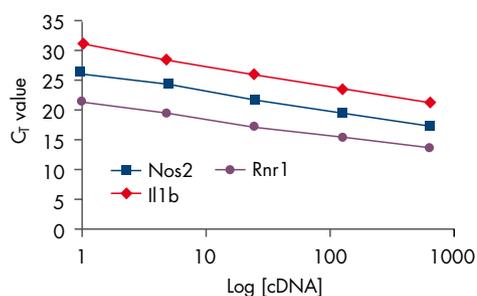


図 6. より短い PCR 産物による PCR 増幅効率と感度の改善  
 LightCycler® システム上で QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit を用いて、 $\beta$ -アクトチン遺伝子の 295 bp フラグメントと 625 bp フラグメントの 1 ステップリアルタイム定量 RT-PCR を行なった。表記のように様々なテンプレート RNA 量を用いて反応を行なった。295 bp フラグメントの時より高感度に検出されたことが示された。



<b>Nos2</b>	Y = -3.38x + 26 R <sup>2</sup> = 0.9981 E = 97.6%
<b>Il1b</b>	Y = -3.55x + 30 R <sup>2</sup> = 0.9995 E = 91.3%
<b>Rnr1</b>	Y = -3.25x + 21 R <sup>2</sup> = 0.9853 E = 103.1%

図 7. 理想的な増幅効率を示す QuantiTect Primer Assay

QuantiTect SYBR Green PCR Kit および QuantiTect Primer Assay を用いて ABI PRISM® 7900 で 2 ステップリアルタイム RT-PCR を行なった。ラット大動脈培養細胞に由来する cDNA を 5 倍連続希釈 (100 ng ~ 0.16 ng RNA に相当) し、5 種類のテンプレートとした。Nos2、Il1b、Rnr1 (内因性コントロール) は融解曲線解析において単一ピークを示し (データ未提示)、同等の増幅効率を得られた。

Y: 検量線の一次方程式

R<sup>2</sup>: 検量線とそのサンプル実測値との相関係数の二乗

E: 増幅効率

データ提供: Miriam Cortese, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany.

## QuantiTect Primer Assay

PCR の特異性および効率を最大にするためには、ホットスタート PCR ポリメラーゼや PCR バッファーでの効果に加え、プライマーデザインも重要です。SYBR Green 検出用に開発された QuantiTect Primer Assay (リアルタイム PCR プライマーセット) は、QIAGEN SYBR Green Kit を用いたとき、同一サイクリング条件下で高い特異性と 100% に近い増幅効率を示します (図 7)。

QuantiTect Primer Assay は、開発時に数千の遺伝子を用いた検証実験を行ない、以下の事項を確認しています。

- cDNA をサンプルとした反応における融解曲線解析で単一のピーク
- NTC (No Template Control) におけるプライマーダイマー (primer dimer) 増幅が無い

QuantiTect Primer Assay は、これらの結果を基に開発した QIAGEN 独自のアルゴリズムによりデザインされています。本アッセイはバイオインフォマティクスで検証済みのゲノムワイドなプライマー・セットです (表 3)。

QuantiTect Primer Assay は数千の標的遺伝子での使用が報告されています (1)。遺伝子特異的製品を検索する GeneGlobe® ウェブサイト ([www.qiagen.com/GeneGlobe](http://www.qiagen.com/GeneGlobe)) からゲノムワイドの QuantiTect Primer Assay を検索・入手可能です (表 3)。

表 3. ゲノムワイドな SYBR Green 用リアルタイム PCR アッセイ

<b>Human</b>	40,150 assays	<b>Chicken</b>	23,600 assays
<b>Mouse</b>	60,000 assays	<b>Drosophila</b>	18,300 assays
<b>Rat</b>	49,500 assays	<b>Zebrafish</b>	21,459 assays
<b>Dog</b>	30,000 assays	<b>C. elegans</b>	28,158 assays
<b>Arabidopsis</b>	31,600 assays		

注: 逐次データが更新されるため Assay 数は概数です。

## 引用文献

1. Krueger, U. et al. (2007) Insights into effective RNAi gained from large-scale siRNA validation screening. *Oligonucleotides* 17, 237.

## 1 ステップおよび 2 ステップリアルタイム RT-PCR

リアルタイム RT-PCR は 1 ステップあるいは 2 ステップ反応で行なえます。2 ステップ RT-PCR では実験の必要性に応じて異なるタイプの RT プライマーを選択することが可能です。また、貴重な RNA サンプルをより安定な cDNA で保存することができます。1 ステップ RT-PCR では、同一チューブ内で逆転写反応とリアルタイム PCR を行ないます。簡便な手法のため、多くのサンプルを迅速に処理でき、自動化も可能です。また実験操作ステップが少ないので、サンプル間の再現性は高くなり、コンタミのリスクも大幅に回避できます (図 8、表 4)。

表 4. 1 ステップと 2 ステップ RT-PCR 法の利点

方法	使用する RT プライマー	利点
1 ステップ RT-PCR	遺伝子特異的プライマー	迅速な工程 高い再現性 コンタミのリスクが低い
2 ステップ RT-PCR	oligo-dT プライマー、ランダムプライマー、遺伝子特異的プライマー	一回の RT 反応液から複数の PCR RT プライマー選択の柔軟性が高い cDNA での長期保存が可能

一般的に 1 ステップ RT-PCR は 2 ステップ RT-PCR よりも感度の低いことが観察されています。この 1 ステップ RT-PCR での感度の低下は、レトロウイルス由来の逆転写酵素が PCR を阻害するために起こることがよくあります (2、3)。逆転写酵素量を増加すると、より高い  $C_T$  値へシフトし、このことは逆転写酵素の強い阻害作用を証明しています (図 9)。PCR 阻害の問題を回避するために、QIAGEN の 1 ステップ RT-PCR 用の QuantiTect、QuantiFast™ Kits および Rotor-Gene SYBR Green Kit には特許を持つ添加物が反応バッファ中に含まれています。この画期的な添加物は、2 ステップ RT-PCR に匹敵する高感度で効率的な 1 ステップ RT-PCR を実現します (図 10)。

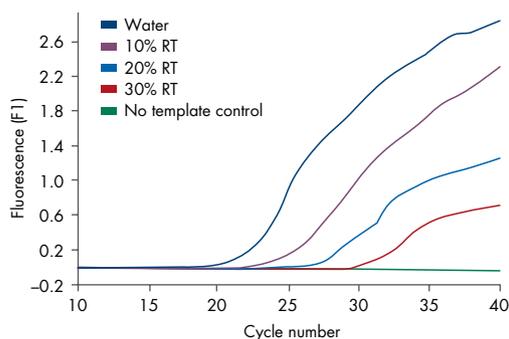


図 9. 逆転写酵素による PCR の阻害

一定量のプラスミド DNA と表記された量の熱変性した RT 反応液を添加し、PCR 反応液をセットアップした。スタンダードの PCR 試薬およびダブル標識プローブを用いて反応を行なった。熱変性した RT 反応液量の増加に比例して PCR 阻害が生じた。

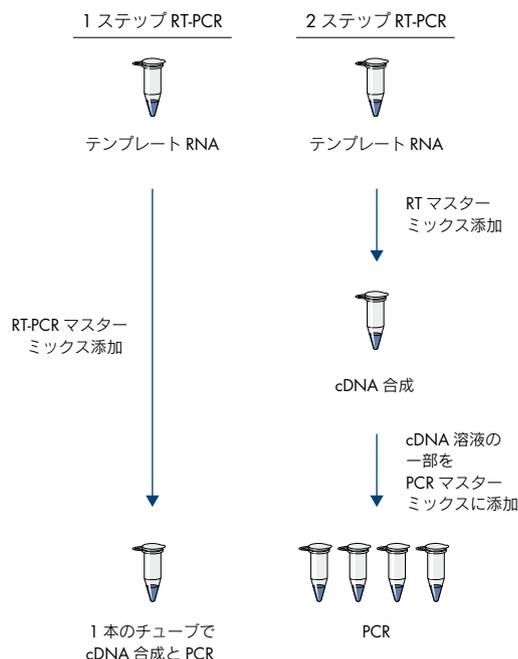


図 8. 1 ステップと 2 ステップ RT-PCR の比較

1 ステップ RT-PCR では逆転写反応および PCR 反応を同一チューブ内で続けて行なう。2 ステップ RT-PCR では、1 本のチューブで cDNA 合成を行ない、他のチューブに cDNA 溶液を分注して PCR を行なう。

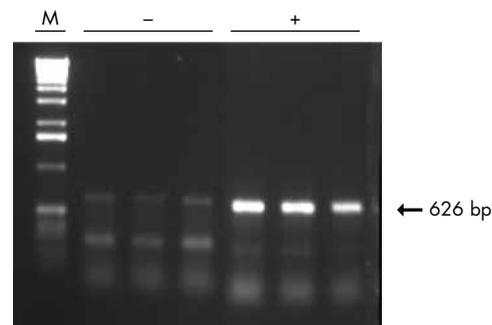


図 10. 逆転写酵素の 1 ステップ RT-PCR 反応への阻害を独自の添加物により回避

QIAGEN 独自の添加物が 1 ステップ RT-PCR に及ぼす影響を示した。ヒト  $\beta$ -アクチン遺伝子に特異的なプライマーを用いて 1 ステップ RT-PCR を行なった。スタンダードの PCR バッファと Omniscrip® Reverse Transcriptase および HotStarTaq DNA Polymerase を用いて増幅した。テンプレートとしてトータル RNA (1 ng) を用い、逆転写酵素による阻害を回避する添加物の存在下 (+) および非存在下 (-) で RT-PCR を行なった。

### 引用文献

- Sellner, L.N., Coelen, R.J., and Mackenzie, J.S. (1992) Reverse transcriptase inhibits Taq polymerase activity. *Nucleic Acids Res.* **20**, 1487.
- Chandler, D.P., Wagnon, C.A., and Bolton, H., Jr. (1998) Reverse transcriptase (RT) inhibition of PCR at low concentrations of template and its implications for quantitative RT-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 669.

## SYBR Green マスターミックスの比較評価のポイント

SYBR Green 検出を用いたリアルタイム PCR/RT-PCR は、ライフサイエンスメーカーの提供するマスターミックスを用いて簡便に行なえます。それらのマスターミックスの性能を評価する際には、 $C_T$  値を比較するだけでなく PCR 産物の特異的な増幅が行なわれているか、増幅効率は 100%に近いかなどの他のパラメーターも考慮しなければなりません。

以下を用いて、NTC あるいは融解曲線解析を用いた特異性の比較、ならびに増幅効率によりマスターミックスの性能を評価しました。

- プライマー：QuantiTect Primer Assay (ヒト BAX [BCL2-associated X protein])
- キット：QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit および A<sub>11</sub> 社類似キット
- サンプル：ヒト白血球 RNA 10 倍連続希釈液 (10 ng ~ 10 pg)

これらを使用して ABI PRISM 7000 上で triplicate で反応を行ないました。

### No template control (テンプレートを含まないコントロール) を用いた PCR 特異性の比較

リアルタイム PCR を行なう際に常に NTC (No template control) 実験を加えることは必須です。NTC によりコンタミやプライマーダイマーを検出できます。テンプレートを含まない NTC では、目的の PCR 産物は増幅されないため、SYBR Green 蛍光が観察されるべきではありません。

QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit では 45 サイクルに至るまで NTC に蛍光シグナルが検出されませんでした (図 11A)。一方、A<sub>11</sub> 社のキットを用いた反応では 10 pg と同様の増幅が NTC にも見られ (図 11B)、このことは、PCR 反応液がコンタミしているかプライマーダイマーが形成されたことを示唆しています。

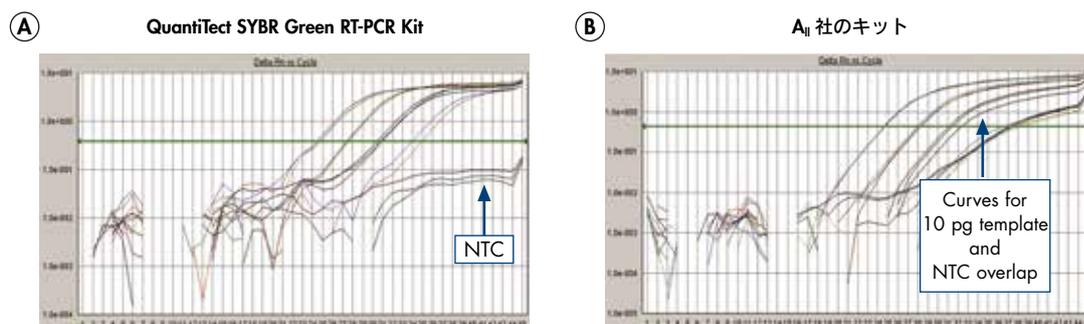


図 11. 増幅曲線  
ヒト BAX をターゲットとして表記のキットを用いたリアルタイム RT-PCR の増幅曲線。

### 融解曲線解析を用いた PCR 特異性の比較

プライマーダイマーや非特異的 PCR 産物は SYBR Green 蛍光強度に影響し不正確なリアルタイム PCR 定量の要因となります。リアルタイム PCR の最後にリアルタイム用サーマルサイクラー上で融解曲線解析を行ない、反応の特異性をチェックすることができます。融解曲線解析では、増幅された PCR 産物は設定した温度範囲内で緩やかに加熱 (例: 65 ~ 95°C) されることで徐々に DNA の解離が起こり、その際 SYBR Green 蛍光が連続的に測定されます。特異的な PCR 産物であることを示すシングルピークのみが観察されなければなりません。

QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit を用いると一本のピークのみが融解曲線解析で観察されました (図 12A)。一方、A<sub>II</sub> 社のキットを用いた場合、融解曲線解析において2本のピークが観察されました (図 12B)。メインのピークは特異的な PCR 産物を示し、その他のピークはプライマーダイマーの存在を示します。

## PCR 増幅効率の比較

PCR の増幅効率が 1 あるいは 100% であることは、PCR 産物が各サイクルで 2 倍に増えていることを意味しています。高い増幅効率は信頼できるリアルタイム PCR 定量に必須です。増幅効率は、テンプレート量の対数値に対して C<sub>T</sub> 値をプロットした検量線を作成し、その傾きを計算することにより求めることができます。傾きから増幅効率は次式に従って計算できます：

$$E = 10^{(-1/S)} - 1$$

ここで E は増幅効率、S は検量線の傾き。

増幅効率の計算は以下のように Microsoft® Excel® を用いて行なえます：

- 傾き (S) をセル A1 に入れる
- 次の式をセル B1 に入れる：= 10<sup>(-1/A1)</sup> - 1

信頼性の高いリアルタイム PCR 定量を行なうためには、傾きが -3.3 ~ -3.8 の範囲内にあるべきです。この範囲の時の増幅効率は 100 ~ 83.3% に相当します。

QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit と A<sub>II</sub> 社のキットを用いて行なった増幅反応の検量線を作成し、比較しました。検量線の傾きから、A<sub>II</sub> 社のキットの増幅効率よりも QuantiTect Kit の増幅効率が高いことが観察されました (図 13)。

1 ステップあるいは 2 ステップ RT-PCR での高い特異性と効率は QuantiFast、QuantiTect あるいは Rotor-Gene SYBR Green Kits で達成することができます。また、デザイン済みプライマーセットである QuantiTect Primer Assays と組み合わせて使用することにより、本キットは SYBR Green を用いたリアルタイム RT-PCR で良好な結果が得られます。

## 結論

- コンタミやプライマーダイマーを NTC により検出
- プライマーダイマーや非特異的 PCR 産物を融解曲線解析により検出
- 信頼できるリアルタイム PCR 定量を行なうためには増幅効率がほぼ 100% であることが重要

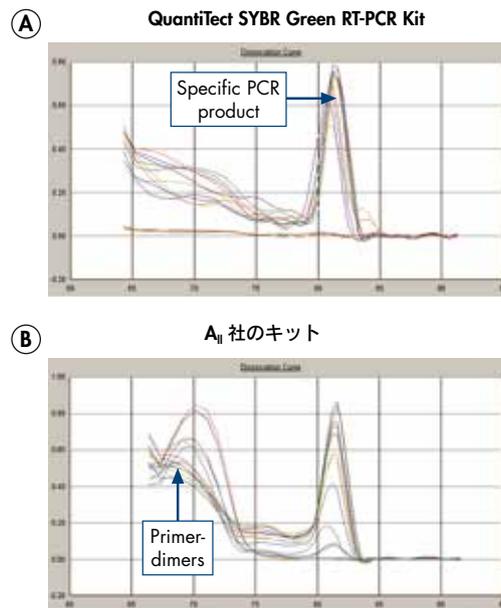
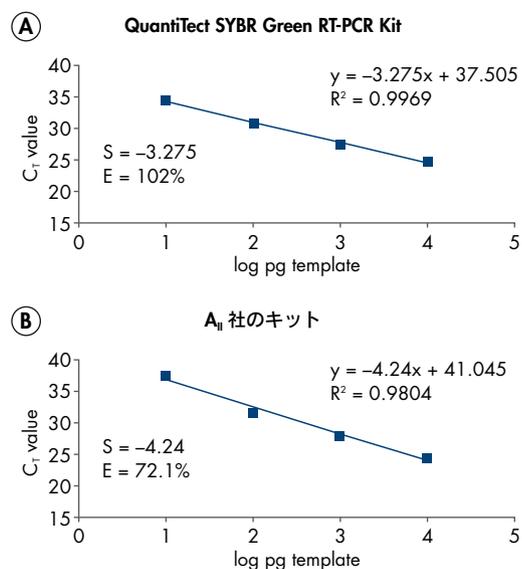


図12. 融解曲線解析  
ヒトBAXをターゲットとして表記のキットを用いたリアルタイムRT-PCRの融解曲線解析。



cDNA 量	C <sub>T</sub> 値	
	QIAGEN キット	A <sub>II</sub> 社のキット
10,000 pg	24.61	24.57
1,000 pg	27.47	28.09
100 pg	30.76	31.58
10 pg	34.43	37.54
NTC	45	37.21

図13. 検量線  
ヒトBAXをターゲットとして表記のキットを用いたリアルタイムRT-PCRの検量線。

## オーダーインフォメーション

製品名	内容	Cat. no.
<b>SYBR Green を用いたスタンダードリアルタイム PCR および RT-PCR (HotStarTaq DNA Polymerase を含む)</b>		
QuantiTect SYBR Green PCR Kit (200)*	For 200 x 50 µl reactions: 3 x 1.7 ml 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 2 x 2 ml RNase-Free Water	204143
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (200)*	For 200 x 50 µl reactions: 3 x 1.7 ml 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix, 100 µl QuantiTect RT Mix, 2 x 2 ml RNase-Free Water	204243
<b>SYBR Green を用いたサイクラーを選ばない高速リアルタイム PCR および RT-PCR (HotStarTaq Plus DNA Polymerase を含む)</b>		
QuantiFast SYBR Green PCR Kit (400)*	For 400 x 25 µl reactions: 3 x 1.7 ml 2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (contains ROX dye), 2 x 2 ml RNase-Free Water	204054
QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit (400)*	For 400 x 25 µl reactions: 3 x 1.7 ml 2x QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix (contains ROX dye), 100 µl QuantiFast RT Mix, 2 x 2 ml RNase-Free Water	204154
<b>SYBR Green を用いた Rotor-Gene Q による高速リアルタイム PCR および RT-PCR (HotStarTaq Plus DNA Polymerase を含む)</b>		
Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (400)*	For 400 x 25 µl reactions: 3 x 1.7 ml 2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix, 2 x 2 ml RNase-Free Water	204074
Rotor-Gene Probe RT-PCR Kit (400)	For 400 x 25 µl reactions: 3 x 1.7 ml 2x Rotor-Gene Probe RT-PCR Master Mix, 100 µl Rotor-Gene RT Mix, 2 x 2 ml RNase-Free Water	204574
<b>遺伝子特異的リアルタイム RT-PCR 用プライマーセット (SYBR Green 用)</b>		
QuantiTect Primer Assay (200)*	For 200 x 50 µl reactions or 400 x 25 µl reactions: 10x QuantiTect Primer Assay (lyophilized) supplied in single tube	Varies
<b>効果的なゲノム DNA 除去ステップを含む高感度なリアルタイム PCR 用の迅速な cDNA 合成</b>		
QuantiTect Reverse Transcription Kit (10)*	Trial kit for 10 x 20 µl reactions: 100 µl 7x gDNA Wipeout Buffer, 10 µl Quantiscript Reverse Transcriptase, 200 µl 5x Quantiscript RT Buffer, 50 µl RT Primer Mix, 1.9 ml RNase-Free Water	205310
QuantiTect Reverse Transcription Kit (50)*	For 50 x 20 µl reactions: 100 µl 7x gDNA Wipeout Buffer, 50 µl Quantiscript Reverse Transcriptase, 200 µl 5x Quantiscript RT Buffer, 50 µl RT Primer Mix, 1.9 ml RNase-Free Water	205311

\* その他のサイズのキットも入手可能です。お問い合わせください。

記載の QIAGEN 製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。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 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) の “Trademarks and Disclaimers” をご覧ください。QIAGEN キットの Handbook および User Manual は [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) から入手可能です。

遺伝子発現解析に関する製品および情報は [www.qiagen.com/geneXpression](http://www.qiagen.com/geneXpression) をご覧ください。

Trademarks: QIAGEN®, HotStarTaq®, GeneGlobe®, QuantiFast™, QuantiTect®, Omniscript®, Rotor-Gene™ (QIAGEN Group); ABI PRISM®, SYBR® (Life Technologies); LightCycler® (Roche Group); Microsoft®, Excel® (Microsoft Corporation).

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。

製品情報、仕様、カタログ番号 (Cat. no.)、価格等は予告なく変更する場合がございます。予めご了承ください。© 2016 QIAGEN, all rights reserved.

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

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