



Bio-Rad News

 Contents
Vol.19
2021年11月

- **NEW** 廃水中のSARS-CoV-2検出キット発売開始
Droplet Digital PCR用SARS-CoV-2変異株アッセイ
- **NEW** リアルタイムPCR用SARS-CoV-2変異株アッセイとコントロール
- **NEW** デジタルPCRの専用アッセイサイトが
リニューアルオープン
New ddPCR Assay Site & Expert Design Assays
Line-up
- ウェスタンブロットング関連ウェブコンテンツのご紹介
- **NEW** 希少な短鎖RNAを逃さないRNA-Seq用
rRNA除去キット SEQuoia RiboDepletion Kit
- Cas9スクレアーゼタンパク質の2ステップクロマトグラフィー
精製
- BrdU抗体とBrdUアッセイのご紹介
- **NEW** StarBright抗体

NEW

廃水中のSARS-CoV-2検出キット発売開始 Droplet Digital PCR用SARS-CoV-2変異株アッセイ

Droplet Digital PCR (ddPCR) を用いた廃水中のSARS-CoV-2検出キット販売開始

廃水のモニタリングは、地域社会におけるCOVID-19の感染状況を把握するための包括的で費用対効果の高い方法であり、研究者や公衆衛生当局による感染規模のモニタリングおよび公衆衛生的介入をサポートするデータとなることが期待されています。ddPCRは廃水サンプル中のウイルスの存在を極めて低い濃度でも確実に検出するために必要な感度と精度を備えており、廃水モニタリングの精度を向上させることが可能となるプラットフォームです。

以下でご紹介するPREvalence SARS-CoV-2 ddPCR Wastewater Quant Kitは、ddPCRを用いて廃水中のSARS-CoV-2を検出することに特化した製品であり、米国CDCが推奨している1-step RT-ddPCR法を採用しているため、サンプル中の阻害物質による反応系への影響も最小限に抑えることが可能なキットです (<https://www.cdc.gov/healthywater/surveillance/wastewater-surveillance/testing-methods.html>)。

PREvalence SARS-CoV-2 ddPCR Wastewater Quant Kit (200ウェル) の特長

- ☑ 低コピーのウイルスを高感度に検出
- ☑ 検量線が不要で、絶対定量が可能
- ☑ PCR阻害物質に対する強い耐性
- ☑ N (N2領域)、E遺伝子、プロセスコントロール (MHV) をマルチプレックス アッセイにて測定
- ☑ インジケーター (PMMoV、crAssphage) 用のアッセイも可能 (オプション)

製品の詳細はウェブページ [bio-rad.com/PREvalence](https://www.bio-rad.com/PREvalence) でもご確認いただけます。



※本カタログに記載の製品は研究用であり、診断目的にはご利用いただけません。



Droplet Digital PCR用SARS-CoV-2変異株アッセイ

新型コロナウイルス感染症の感染拡大が続く状況下では、症例をモニタリングするための高感度で信頼性の高いアッセイの必要性が高まっています。ワクチン接種が世界中で展開されていますが、同時にSARS-CoV-2に関する新たな課題も発生しています。特にアルファ株 (B.1.1.7)、ベータ株 (B.1.351)、ガンマ株 (P.1)、デルタ株 (B.1.617.2) などの新しい変異株の出現について、研究者や公衆衛生当局は警鐘を鳴らしています。それぞれのウイルス株の特徴はゲノム配列上の特定の変異に由来し、そのうちのいくつかは感染力や病原性が高

まり、時には免疫反応を回避する能力を獲得する場合があります。このような変化を明確に把握し対応するためには、ウイルスゲノム上のどこに変異が生じ、それらがいつ出現し、また時間の経過とともにどの程度流行するかを特定する必要があります。そこでバイオ・ラッドでは、高感度かつ信頼性の高いddPCR用のSARS-CoV-2変異株アッセイの販売を開始し、日々新しい変異株に対するアッセイを更新しております。各変異を検出するためにデザインされた各アッセイについては、下記Table 1をご参照ください。

Table 1. SARS-CoV-2 変異株検出用ddPCRアッセイ

Spike Gene		Variants of Concern				Variants of Interest								Other	
		B.1.1.7	B.1.351	P.1	B.1.617.2	B.1.526	B.1.525	B.1.427/9	B.1.617.1	P.2	P.3	C.37	B.1.621	B.1.619	C.1.2
Unique Assay ID	Mutation	Alpha	Beta	Gamma	Delta	Iota	Eta	Epsilon	Kappa	Zeta	Theta	Lambda	Mu		
dMDS661453998	E484K		●	●		●	●			●	●	●	●	●	●
dMDS407172175	E484Q								●						
dMDS731762551	N501Y	●	●	●							●				●
dMDS717219297	A701V		●			●									
dMDS614146070	F490S											●			
dMDS944624402	HV 69-70	●					●								
dMDS847708889	P681H	●									●		●		●
dMDS696550979	P681R				●				●						
dMDS767776914	V1176F			●						●	●				
dMDS983315944	L452R				●			●	●						
dMDS837383308	L452Q											●			
dMDS514195527 (T/A)	N440K													●	●
dMDS894386716 (T/G)	N440K													●	●
dMDS853545728	A570D	●													
dMDS817055273	K417N		●												
dMDS673301504	K417T			●											
dMDS189046990	T478K				●										
dMDS132328032	S477N					●									
dMDS530720961	Q677H						●								
dMDS204963366	W152C							●							
dMDS514710681	Y449H														●
dMDS972893553	T859I									●					
dMDS603660596	T859N											●			●
dMDS670659197	Y145N												●		
dMDS351104554	R346K												●		
dMDS752667135	D950N				●								●		

変異株に対する全てのアッセイはddPCR PrimePCR Assay サイト (bio-rad.com/digital-assays) でユニークアッセイIDを用いて検索し、発行したオーダーフォームを取扱店へご提出いただくことで受注となります。新たな変異株に関するアッセイは順次ラインナップされていますので、最新の変異株に対するデザイン済みアッセイの情報をご希望の場合は、弊社テクニカル (life_ps_jp@bio-rad.com) へお問い合わせください。

Ordering Information

ddPCR用 廃水中のSARS-CoV-2検出キット

カタログ番号	製品名	反応数	価格
12015402	PREvalence SARS-CoV-2 ddPCR WasteWater Quant Kit (200ウェル)	200反応	¥320,000
12015961	PREvalence ddPCR crAssphage Fecal Indicator Assay (100ウェル)	100反応	¥65,000
12015962	PREvalence ddPCR PMMoV Fecal Indicator Assay (100ウェル)	100反応	¥65,000

ddPCR用SARS-CoV-2変異株アッセイ

カタログ番号	アッセイ名	ユニークアッセイ ID	蛍光色素	反応数	価格
10049047	全てのSARS-CoV-2 変異株アッセイ (マルチプレックスを除く)	各アッセイのID参照	FAM/HEX	200反応	¥66,000
10049048	全てのSARS-CoV-2 変異株アッセイ (マルチプレックスを除く)	各アッセイのID参照	FAM/HEX	1,000反応	¥198,000
10049049	全てのSARS-CoV-2 変異株アッセイ (マルチプレックスを除く)	各アッセイのID参照	FAM/HEX	2,500反応	¥330,000

本製品は全て200反応、1,000反応、2,500反応から選択可能であり、ddPCR専用Supermixは含まれておりません。

本製品は研究用試薬です。診断および治療目的には使用できません。

NEW

リアルタイムPCR用SARS-CoV-2変異株アッセイとコントロール



新型コロナウイルス変異株調査の必要性

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の流行に伴い、感染性、伝播性や抗原性の異なる変異株の調査が重要性を増しています。ウイルスゲノムのシーケンスにはコストがかかるため、それ以前に変異のあるサンプルをスクリーニングすることが有効です。バイオ・ラッドはこれらのニーズに応えるため、リアルタイムPCR用SARS-CoV-2変異検出アッセイ (研究用)、およびSARS-CoV-2スパイク遺伝子の変異検出アッセイ用コントロールの提供を開始しました。

PrimePCR SARS-CoV-2 Multiple Mutation Assay

最大5個のSARS-CoV-2スパイク遺伝子の変異を同時検出可能なアッセイです。K417N、L452R、E484K/Q、N501Yをターゲットとした Assay 1と、K417T、L452R、T478K、N501Yをターゲットとした Assay 2の2種類があります (Table 1)。変異のない領域をターゲットとした Multiplexed control (MPC) 用プローブも含まれています。

PrimePCR SARS-CoV-2 Single Mutation Assay

SARS-CoV-2ゲノム全長中で、各種変異株に見られる変異をターゲットとした、全32種類のアッセイです。変異型をFAM、野生型をHEXで検出し、内部コントロール (IC) としてhuman *RPP40*をCy5で検出します。

Table 1. PrimePCR SARS-CoV-2 Multiple Mutation Assayのターゲット

	SARS-CoV-2 Variant					
	K417N	L452R	MPC	E484K	E484Q	N501Y
Multiple Mutation Assay 1	Alpha (B.1.1.7)					
	Beta (B.1.351)	*				
	Delta (B.1.617.2)		*			
	Epsilon (B.1.427/B.1.429)		*			
	Gamma (P.1)		*			
Multiple Mutation Assay 2	Kappa (B.1.617.1/ B.1.617.3)		*			
	MPC, multiplexed control.					
	SARS-CoV-2 Variant					
	K417T	L452R	MPC	T478K	N501Y	
	Alpha (B.1.1.7)					
Beta (B.1.351)						
Delta (B.1.617.2)		*				
Epsilon (B.1.427/B.1.429)		*				
Gamma (P.1)		*				
Kappa (B.1.617.1/ B.1.617.3)		*				
MPC, multiplexed control.						

Table 2. 各PrimePCR SARS-CoV-2 Mutation Assayの特徴

特徴	PrimePCR SARS-CoV-2 Single Mutation Assay	PrimePCR SARS-CoV-2 Multiple Mutation Assay
フォーマット(研究用)	プライマーセット、リファレンスおよび変異用プローブ	プライマーセット、および最大6種類のプローブ
検出可能変異数	1	最大5
蛍光色素	FAM, HEX, Cy5	FAM, HEX, Texas Red, ATTO 647, Cy5.5
内部コントロール	<i>RPP40</i> プライマーセットおよびプローブ	スパイク遺伝子中の保存領域に対するプローブ (multiplexed control (MPC))
ラン時間	< 60分	
製品サイズ	200, 1,000, 2,500 反応	

これらのアッセイで使用の際は、RT-qPCR反応試薬としてReliance One-Step Multiplex Supermixをご使用ください。

PrimePCR SARS-CoV-2 Mutationアッセイの製品情報は、下記ページからご覧いただけます。今後、新規の変異株に対応したアッセイが追加された際も、こちらのページでアッセイ情報をご覧いただけます。

bio-rad.com/SARS-CoV-2_assays_JP

EDX SARS-CoV-2 S Gene Variant Controls

バイオ・ラッドではこれまで第三者の外部コントロールとしてご使用いただける新型コロナウイルス検査用の標準物質としてEDX SARS-CoV-2 Standard, Negativeをご提供してきました。さらにこの度、各変異株に対応したコントロール (アルファ、ベータ、ガンマ、デルタ/カッパ、イブシロン株) を販売開始します。ddPCRにより定量された200,000コピー/mlの合成RNAおよびヒトゲノムDNA (75,000コピー /ml) を含み、輸送用保存液を模したマトリックスとなっています。



バイオ・ラッドの
COVID-19 ソリューション

bio-rad.com/covid19

Ordering Information

カタログ番号	品名	価格
Single Mutation Assays		
12016270	PrimePCR SARS-CoV-2 Variant Assay *1, 200反応	¥86,000
12016287	PrimePCR SARS-CoV-2 Variant Assay *1, 1,000反応	¥180,000
12016286	PrimePCR SARS-CoV-2 Variant Assay *1, 2,500反応	¥320,000
Multiple Mutation Assays		
12016711	PrimePCR SARS-CoV-2 Variant Multi Kit *1, 200反応	¥240,000
12016731	PrimePCR SARS-CoV-2 Variant Multi Kit *1, 1,000反応	¥580,000
12016689	PrimePCR SARS-CoV-2 Variant Multi Kit *1, 2,500反応	¥980,000
コントロール製品		
10019	EDX SARS-CoV-2 Standard	¥70,000
10000	EDX SARS-CoV-2 Negative	¥60,000
10011	EDX SARS-CoV-2 S Gene Alpha Variant Control	お問い合わせください
10012	EDX SARS-CoV-2 S Gene Beta Variant Control	お問い合わせください
10013	EDX SARS-CoV-2 S Gene Gamma Variant Control	お問い合わせください
10014	EDX SARS-CoV-2 S Gene Delta, Kappa Variant Control	お問い合わせください
10015	EDX SARS-CoV-2 S Gene Epsilon Variant Control	お問い合わせください
関連製品		
12011319J1	CFX Opus 96 リアルタイムPCRシステム	¥5,100,000
12011452J1	CFX Opus 384 リアルタイムPCRシステム	¥6,500,000
12010176	Reliance One-Step Multiplex Supermix, 200反応分	¥48,000

*本カタログに記載の製品は研究用であり、診断目的にはご利用いただけません。

*1 PrimePCR製品の発注には弊社サイトでのオーダーフォーム発行が必要となります。詳細は弊社テクニカル (life_ps_jp@bio-rad.com) までお問い合わせください。

NEW

デジタルPCRの専用アッセイサイトがリニューアルオープン

ddPCR Assay Site & Expert Design Assays Line-up

弊社PrimePCR Droplet Digital PCR (ddPCR) アッセイ専用ウェブサイトは、ddPCRに最適化されたプローブアッセイおよびインターカレートダイアッセイをアプリケーションごとに提供しておりますが、この度、サイトのインターフェイスがリニューアルされ、さらに使いやすくなりました。トップ画面のアプリケーション選択では新たにCell and Gene Therapy (CGT) が追加され、注目のアッセイに関しては弊社アッセイスペシャリストが設計、または共同研究先で開発されたExpert Design Assayシリーズがカテゴリごとに拡大しています。

New ddPCR Assay Siteの主な変更点

- ☑ アプリケーションにCell and Gene Therapyが追加
- ☑ アッセイ決定時にSingle TubeまたはTwo Tubeが選択可能
- ☑ Expert Design AssayシリーズにInfectious Disease等が追加

Expert Design Assayはウェットラボでの検証は行われておりません。アッセイ情報はオンラインで各アッセイ詳細ページからそれぞれダウンロードできます。ご注文にはバイオ・ラッドのWebサイトのアッセイページからの出力したオーダーフォームが必要となります。

新たに追加されたCell and Gene Therapyアプリケーションの詳細

新しく追加されたCell and Gene Therapyでは、対象となるGene of Interest (GOI) に最適化されたカスタムddPCRアッセイを素早く作成することができます。このアッセイを支えるCGTデザインエンジンはバイオ・ラッドのデジタルバイオロジーセンターに所属するデジタルPCRの専属スタッフによって構築され、GCコンテンツ、Tm、プライマーの配置、プローブの長さ、制限酵素の互換性などが考慮されています。また、一般的なウイルスベクターバックボーンやプラスミドエレメントを対象とした、デザイン済みのVector Backboneアッセイも提供しています。さらに、一部のカタログ製品はアッセイシーケンスを購入する事が可能です。

Pre-Design済みのCell and Gene Therapyアッセイ一覧

Gene Therapy Assays

アッセイ名	Unique Assay ID	蛍光色素
AAV-ITR2 (FAM)	dEXD15274642	FAM
AAV-ITR2 (HEX)	dEXD23004642	HEX
WPRE (FAM)	dEXD39054642	FAM
WPRE (HEX)	dEXD13324415	HEX
HivPsi (FAM)	dEXD14812826	FAM
HivPsi (HEX)	dEXD79082599	HEX
HivLtr (FAM)	dEXD66273280	FAM
HivLtr (HEX)	dEXD40543053	HEX

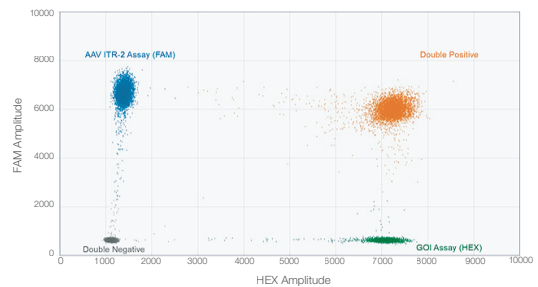
General Backbone Assays

アッセイ名	Unique Assay ID	蛍光色素
CMV promoter (FAM)	dEXD96423937	FAM
CMV promoter (HEX)	dEXD70693710	HEX
CMV promoter (Cy5.5)	dEXD30054188	Cy5.5
CMV enhancer (FAM)	dEXD44963483	FAM
CMV enhancer (HEX)	dEXD19233256	HEX
eGFP (FAM)	dEXD45075072	FAM
eGFP (HEX)	dEXD22434642	HEX
hGFP (FAM)	dEXD72134642	FAM
hGFP (HEX)	dEXD96535526	HEX
SV40 poly A (FAM)	dEXD19344845	FAM

Ordering Information

カタログ番号	アッセイ名	Unique Assay ID	蛍光色素	価格
12003909	表記のPre-Design済みCell and Gene Therapyアッセイ	上記対応表参照	FAM/HEX/Cy5/Cy5.5	¥330,000

本製品は研究用試薬です。診断および治療目的には使用できません。本製品は全て1,000反応分であり、ddPCR専用Supernixは含まれておりません。対象の全製品はカタログ番号: 12003909、価格: 330,000円です。* CD-19 CAR-T Assay (dEXD88164642) はAxi-cel and Tisa-cel constructに、** CD-19 CAR-T Assay (dEXD45718942) はAxi-cel constructのみに対応しています。



AAV ITR-2アッセイ(FAM) (ddPCR EXD Assay: dEXD15274642)、カスタムGene of Interest (GOI) アッセイ(HEX) (ddPCR CGT Assay) を用いてAAV ITR2 (ウイルス希釈液) を測定した6つの複製Wellをマージした2-Dプロット結果を示しています。

General Backbone Assays (continued)

アッセイ名	Unique Assay ID	蛍光色素
SV40 poly A (HEX)	dEXD83614618	HEX
SV40 poly A (Cy5.5)	dEXD55784415	Cy5.5
BGH poly A (FAM)	dEXD57884391	FAM
BGH poly A (HEX)	dEXD32154164	HEX
HGH poly A (FAM)	dEXD97544642	FAM
HGH poly A (HEX)	dEXD71814415	HEX

Antibiotic Resistance Gene Assays

アッセイ名	Unique Assay ID	蛍光色素
KanR (FAM)	dEXD77594188	FAM
KanR (HEX)	dEXD51863961	HEX
PuroR (FAM)	dEXD64673280	FAM
PuroR (HEX)	dEXD38943053	HEX
NeoR/KanR (FAM)	dEXD26133734	FAM
NeoR/KanR (HEX)	dEXD90403507	HEX

Cell Therapy Assays

アッセイ名	Unique Assay ID	蛍光色素
CD-19 CAR-T Assay*	dEXD88164642	FAM
CD-19 CAR-T Assay**	dEXD45718942	FAM

ウェスタンブロッティング関連ウェブコンテンツのご紹介

バイオ・ラッドは長年にわたり電気泳動やウェスタンブロッティングに関連した研究用機器・試薬を販売しております。現在では実験の上流から下流に至る幅広い製品ラインアップを取り揃えており、お陰様で大変多くの研究者の皆様にご使用いただいております。

これらの製品をご使用のお客様に、より適切かつ効果的に製品をご使用いただくため、弊社ウェブサイトでは、製品情報に加えて、テクノロジーや原理、トラブルシューティング、Tips、関連のアプリケーション情報などの様々な情報を提供しております。

ここではその一部をご紹介します。是非ご活用ください。



ウェスタンブロット ラーニングセンター

ウェスタンブロッティングの工程は、複数のステップから構成されており、いずれのステップも再現性のある高品質なデータを得るために重要なポイントが存在します。

本サイトでは、サンプル調製から最終の画像解析にわたる各ステップの原理や実験の流れに加え、より実践的な情報をご提供いたします。



サイトへのアクセスはこちら

[▶ bio-rad.com/learn-wb-jp](https://bio-rad.com/learn-wb-jp)



ウェスタンブロッティング ラーニング動画シリーズの配信のお知らせ

バイオ・ラッドは、ウェスタンブロッティング関連製品の販売を通じて研究者の皆様をサポートさせていただく中で多くのアプリケーションやTips、トラブルシューティング情報を蓄積させていただいております。これらの情報をより多くのお客様の研究にお役立ていただけるよう、新しくラーニング動画シリーズとしてご提供させていただきます。

配信中の動画タイトル

- 1 論文投稿で求められるウェスタンブロッティングデータ
- 2 ハウスキーピングタンパク質と総タンパク質染色によるデータ補正
- 3 Stain-Freeテクノロジーを用いた総タンパク質補正

ご視聴の申し込みはこちら

[▶ info.bio-rad.com/wb-video-form-jp-2021](https://info.bio-rad.com/wb-video-form-jp-2021)



ChemiDocユーザーサイト

バイオ・ラッドのウェスタンブロッティング用撮影装置ChemiDocシリーズをご使用のお客様専用のウェブサイトを開設しております。サイト内では装置関連の情報はじめ、電気泳動やウェスタンブロッティング関連機器、試薬を特別価格でご購入いただける特別注文書のダウンロードが可能です。

ご登録がまだのお客様はご登録の上、ご活用いただけますようお願いいたします。

登録専用サイトへのアクセスはこちら

[▶ info.bio-rad.com/cd_user_reg_jp](https://info.bio-rad.com/cd_user_reg_jp)



※ご登録にはご使用のChemiDocシリーズのシリアル番号が必要です

NEW

希少な短鎖RNAを逃さないRNA-Seq用 rRNA除去キット SEQuoia RiboDepletion Kit

新製品 SEQuoia RiboDepletion Kit

バイオ・ラッドのNGS関連試薬SEQuoiaシリーズにリボソームRNA除去キットSEQuoia RiboDepletion Kitが新たに加わりました。

リボソームRNA (rRNA) は、total RNAの80～90%を占めているため、RNAサンプルのシーケンスを効率良く行うには、rRNAを効率良く除去することが重要です。ライブラリ構築前にtotal RNAからrRNAを除去する方法では、希少な転写産物や少量の転写産物が失われる可能性が高くなります。SEQuoia RiboDepletion Kitで採用されているポスト・ライブラリ調製のrRNA除去ストラテジーは、限られたサンプルを扱う研究者、希少な転写産物を対象とする研究者、あるいは完全なトランスクリプトームを表したシーケンスデータが必要な研究者にとって理想的な選択肢となります。

SEQuoia RiboDepletion Kitは、トランスクリプトーム全体のプロファイリングにおいて優れた性能を発揮し、希少な転写産物や限られたサンプル中のRNAの損失を最小限に抑えながら、短鎖RNAを保持します。このスタンドアローンのrRNA除去キットは、幅広いインプット量 (0.1～20 ngのRNA-Seqライブラリ) で使用できるよう最適化されており、ほとんどのRNA-Seqライブラリ調製キットと互換性があります。この革新的なポスト・ライブラリ調製rRNA除去テクノロジーにより、複数のインデックス付きライブラリをプールし、一度の反応でrRNA除去をすることが可能となるため、rRNA除去ステップの効率を最大化し、時間とコストを大幅に削減することができます。

効率的なポスト・ライブラリ調製rRNA除去ストラテジー

SEQuoia RiboDepletion Kitは、ヒト、マウス、ラットの細胞質rRNA (5S、5.8S、18S、28S rRNA) およびmt rRNA (12S、16S mt rRNA) から生成されたcDNAに相同性のある、合成ビオチン化オリゴヌクレオチドを独自に混合して使用しています。Fig.1に本キットによるrRNA除去工程を示しました。ターゲットのcDNA配列は、相補的なビオチン化オリゴヌクレオチドにハイブリダイズし、オリゴヌクレオチドはDNA合成反応によって伸長されます。

得られた二本鎖DNAは、ストレプトアビジンをコーティングした磁気ビーズでキャプチャされ、ライブラリから除去されます。この効率的なワーク

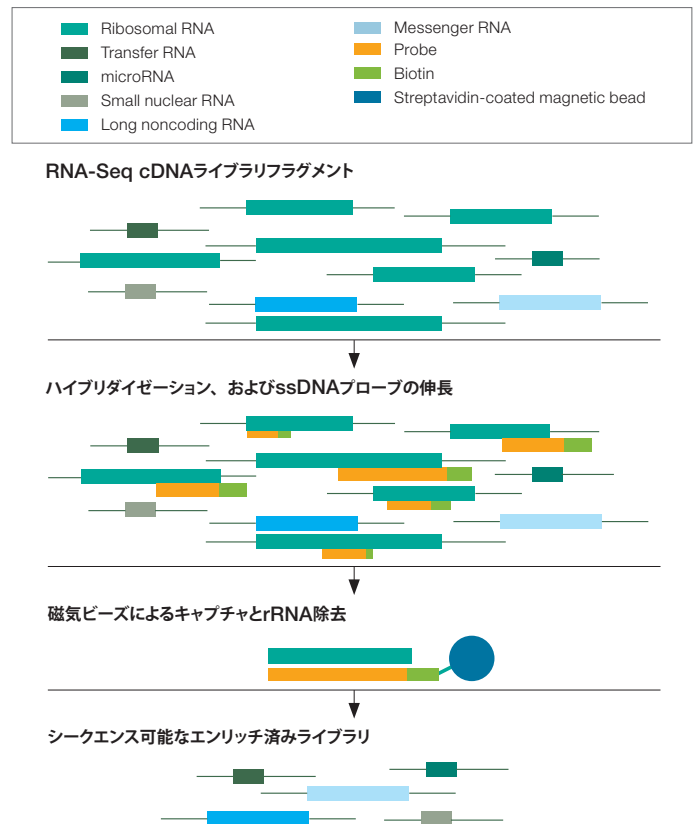


Fig.1. SEQuoia RiboDepletion kitによるrRNAの除去工程

フローは2時間で完了します。

このポスト・ライブラリ調製ストラテジーによって、ライブラリ調製前にrRNA除去を行う手法に比べて、希少な低分子RNAのロスを低減することが可能となっています。また、複数のライブラリをマルチプレックス処理することも可能となり、rRNA処理にかかる時間とコストの削減が可能となります。

SEQuoia RiboDepletion kitは、ほとんどのRNA-Seq用ライブラリ調製キットと互換性があるスタンドアローンのキットのため、現在ご使用のライブラリ調製キットと組み合わせでの使用も可能です。

Table 1. SEQuoia RiboDepletion Kitの製品特長

主な特長	利点
ポスト・ライブラリ調製 rRNA 除去ストラテジー	ライブラリ調製前の rRNA 除去処理では失われがちな希少な低分子転写産物を保持することで、より多くのトランスクリプトームからシーケンスデータを得ることができます。
一度の反応で複数のライブラリを処理可能	最大 96 のプールされたライブラリから、一度の反応で rRNA 由来のフラグメントを除去することで、時間とコストを削減します。 様々なライブラリ調製キットを用いて構築されたライブラリプールをまとめて除去処理することで、シーケンスの効率性と柔軟性を大幅に高めます。
幅広いインプットレンジ	cDNA インプット量 0.1～20 ng のライブラリから、生物学的に適切なシーケンスデータを得ることができます。
効率的なワークフロー	シンプルな 4 チューブのキットで、より一貫した結果を得ることができます。 2 時間のプロトコルでスループットを向上させ、より多くのデータを迅速に生成します。
ほとんどの RNA-Seq ライブラリ調製キットと互換性のあるスタンドアローンキット	実験のニーズに合わせて、ライブラリ調製と rRNA 除去方法を選択できます。

希少な短鎖RNAのロス进行低減

ライブラリ調製前にrRNA除去を行う手法 (NEBNext rRNA Depletion Kit, New England Biolabs [NEB], #E6350L) と比較して、ポスト・ライブラリ調製のrRNA除去を行うSEQuoia RiboDepletion kitを使用することで、検出される短鎖RNAの数は有意に多く、より豊富な情報を持ったライブラリ構築が可能であることが分かりました (Fig.2)。この比較はどちらの手法においても、ライブラリ調製にSEQuoia Complete Stranded RNA Library Prep Kitを用いました。

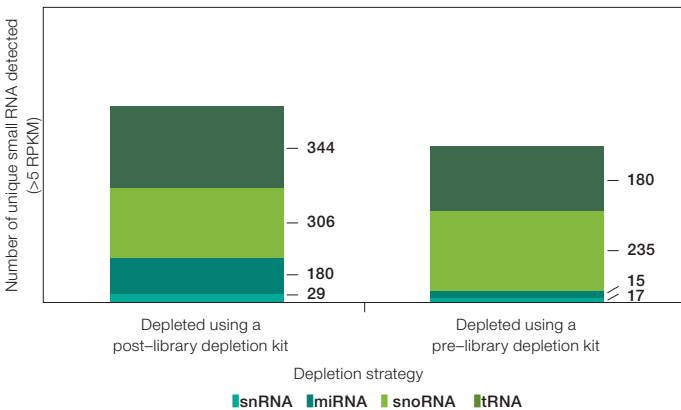


Fig.2. ポスト・ライブラリ調製rRNA除去手法 (左) と、ライブラリ調製前rRNA除去手法 (右) における、検出された短鎖RNA数 (RPKM \geq 5) の比較

複数のライブラリを混合したマルチプレックス化 rRNA除去処理

SEQuoia RiboDepletion Kitは、インデックス化した複数のライブラリをプールして、マルチプレックスでのrRNA除去処理が可能です。シングルプレックス処理と、96-plexでの処理を比較すると、同等のrRNA除去効率を得られていることが分かります (Fig.3)。SEQuoia LibrariesにおいてrRNAの残存率が高くなっているのは、SEQuoia Complete Stranded RNA Library Prep Kitの短鎖RNAに対するキャプチャ効率の高さによるもので、より多くの短鎖RNAがライブラリ化されているためです。

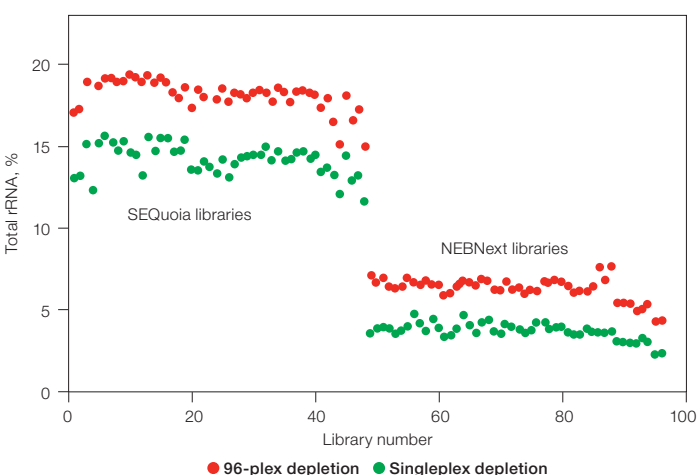


Fig.3. SEQuoia RiboDepletion Kitによる、シングルプレックスおよびマルチプレックスでのrRNA除去効率

低発現のRNAを見逃さず、全トランスクリプトームを一度に解析するSEQuoiaワークフロー

miRNAなどの短鎖RNAから長鎖RNAまでを同時にライブラリ化するSEQuoia Complete Stranded RNA Library Prep Kitと、ポスト・ライブラリ調製戦略により希少な短鎖RNAをロスすることなくrRNA除去処理を行うSEQuoia RiboDepletion Kitの組み合わせは、全トランスクリプトームを対象としたRNA-Seqにおいて、高いパフォーマンスを発揮します。ライブラリ調製ステップは4時間以下、rRNA除去ステップは2時間以下で実施できる効率的なワークフローです。さらに、プールした複数のライブラリをrRNA除去することにより、実験の効率化と作業時間の短縮、実験コストの削減が可能となります。

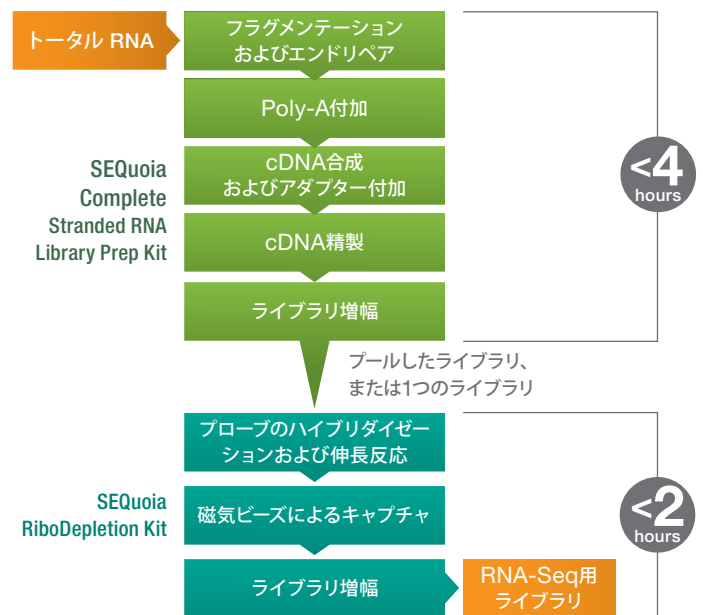


Fig.4. SEQuoiaシリーズを用いた全トランスクリプトーム解析ワークフロー

● 製品情報はこちらから

SEQuoiaシリーズの製品情報は下記URLからご覧いただけます。
日本語版の取扱説明書PDFもダウンロードいただけます。

bio-rad.com/NGS

Ordering Information

カタログ番号	品名	価格
rRNA除去キット		
17006487	SEQuoia RiboDepletion Kit, 24反応	¥210,000
RNA-Seq用ライブラリ調製キット		
17005726	SEQuoia Complete Stranded RNA Library Prep Kit, 24反応	¥290,000
17005710	SEQuoia Complete Stranded RNA Library Prep Kit, 96反応	¥940,000
Dual Indexed Primers		
12011928	SEQuoia Dual Indexed Primers Set, Unique dual index 12本, 96反応分	¥82,000
12011930	SEQuoia Dual Indexed Primers Plate, Unique dual index 96 wellプレート1枚, 96反応分	¥82,000

Cas9ヌクレアーゼタンパク質の2ステップクロマトグラフィー精製

Cas9ヌクレアーゼを利用したCRISPR-Cas9技術はgRNAと組み合わせることでゲノム編集を正確に行えるようになり、2020年にノーベル化学賞を受賞しました。

精製標品としてのCas9ヌクレアーゼ（以下Cas9）は多くのベンダーから購入することが可能ですが、大規模なゲノム編集実験には大量に必要となり、コストの面で問題が生じます。また、実験によっては変異を入れたCas9を利用したい場合には発現、精製を行う必要が生じます。

一般的には、アフィニティー、陽イオン交換、ゲルろ過を利用した3ステップの精製方法が用いられますが、本記事では応用性が高く、迅速に、比較的安価に行えるクロマトグラフィーによる2ステップ精製法を紹介いたします（Fig.1）。また、市販品、精製品Cas9の活性測定は、in vitro、およびバイオ・ラッドのZOE蛍光セルイメージャー、ZE5 Cell Analyzer等を用いた in vivoアッセイで確認を行いました（Fig.1B）。

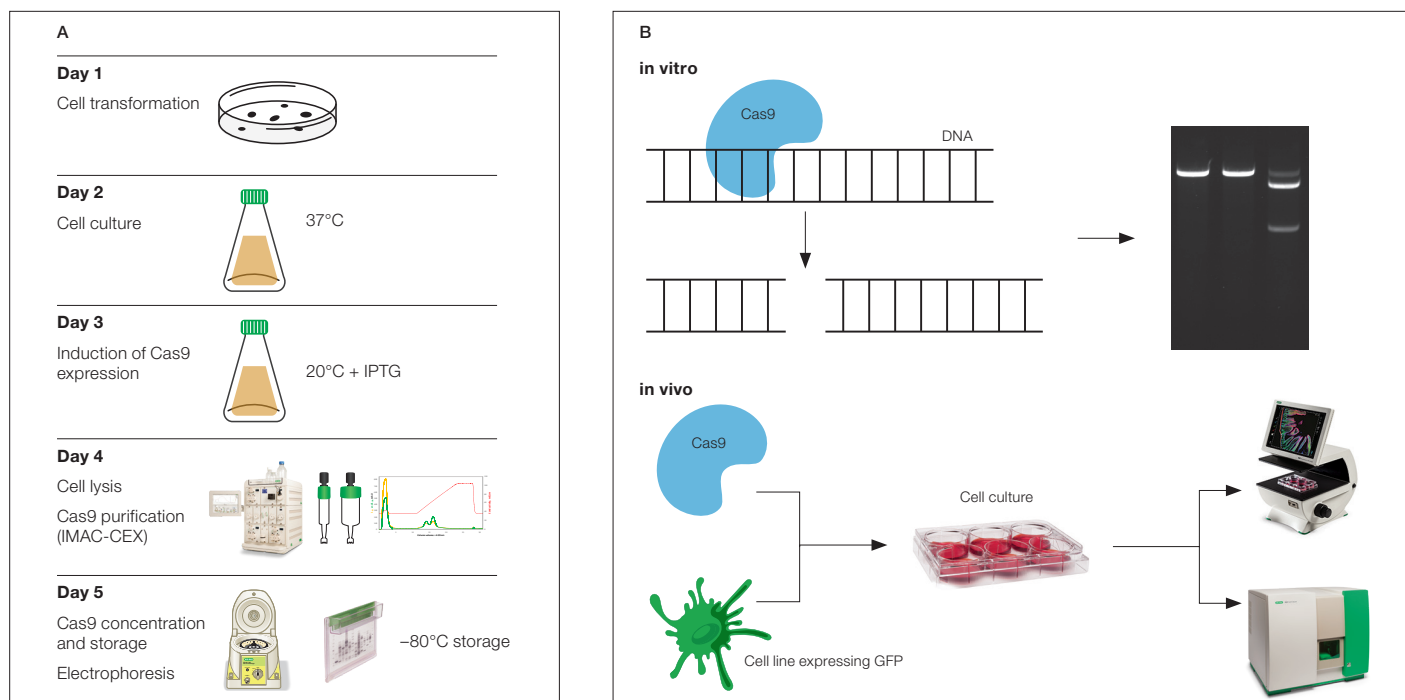


Fig.1. A: 培養、発現、精製の流れ、B: バリデーションの流れ

NGC Discover ProシステムによるCas9精製

NGC Discover Proシステムは、低圧から高圧カラムまで幅広く使用できる、多波長検出機、サンプルポンプを搭載した生体分子精製用クロマトグラフィー装置です。

このNGC Discover Proを用い、250 mlのセルライゼート（1 mg/ml）をスタートサンプルとして精製を行います。なお検出は、核酸の混入を予想し、260 nmと280 nmの2波長同時測定を行っています。使用したカラム、バッファー、流速は以下の通りです（Table1）。

Column Type	Resin Type	Buffer A	Buffer B	Flow Rate, ml/min
EconoFit Nuvia IMAC (5 ml)	Affinity	20 mM HEPES, 300 mM NaCl, 25 mM imidazole, 10% (v/v) glycerol, and 0.5 mM TCEP, pH 7.5	Buffer A with 0.5 M imidazole	4
EconoFit Macro-Prep High S (5 ml)	Strong cation exchanger	20 mM HEPES, 10% (v/v) glycerol, and 0.5 mM TCEP, pH 7.5	Buffer A with 1 M NaCl or KCl	2
EconoFit UNOsphere S (5 ml)	Strong cation exchanger	20 mM HEPES, 10% (v/v) glycerol, and 0.5 mM TCEP, pH 7.5	Buffer A with 1 M NaCl or KCl	2
ENrich SEC 650 10 x 300 mm (24 ml)	Size exclusion	20 mM HEPES, 10% (v/v) glycerol, 300 mM NaCl or KCl, and 0.5 mM TCEP, pH 7.5	N/A	0.75-1

Table 1. カラム、バッファー組成、および使用流速。（カラム：比較検討のため2本記載しています。また、SEC（ゲルろ過）カラムは精製品確認のため用いています）

精製は以下の流れで行いました（Fig.2）

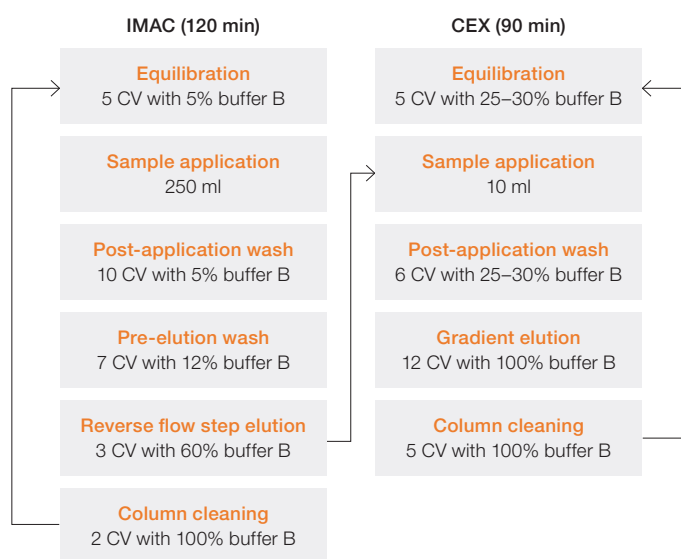


Fig.2. アフィニティー（IMAC）と陽イオン交換（CEX）によるステップワイズ/グラジェント溶出による2ステップ精製フロー。（CV: カラムボリューム）

Step 1 : アフィニティークロマトグラフィー精製

250 mlのセルライゼート (1 mg/ml) をサンプルポンプでカラムにアプライし、60 mMイミダゾール溶液で洗浄後、300 mMイミダゾールで溶出を行いました (Fig.3)。EconoFit IMACカラムから300 mMイミダゾールで溶出されたフラクションのSDS-PAGE結果より、ライゼートでは低い比率であったCas9を濃縮した形で高い精製度で回収できていることがわかります (Fig.4 レーン2、4)。

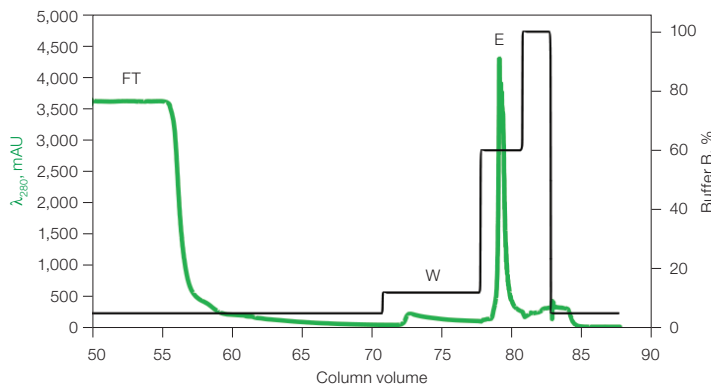


Fig.3. EconoFit IMACによる精製クロマトグラム (FT: Flow Through, W: Wash, E: Elution)

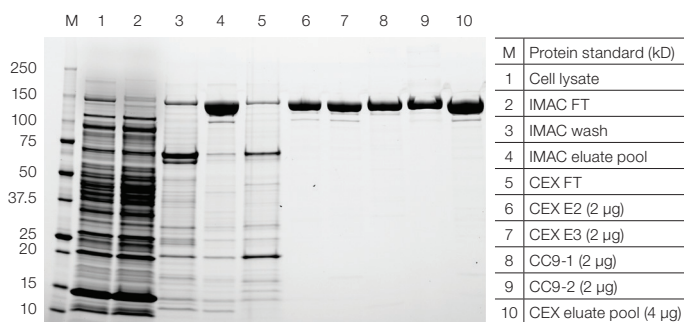


Fig.4. 精製状況確認のためのSDS-PAGEによるフラクションチェック (CC9-1, CC9-2は市販されているCas9サンプル)

Step 2 : 陽イオン交換クロマトグラフィー精製

IMACカラムで得られた約10 mlのフラクションを2ステップ目の陽イオン交換カラムによる分離を実施しました。イオン交換樹脂は樹脂素材やサイズ、官能基の構造や密度により分離挙動が異なる場合があるため、Macro-Prep High S担体を充填したEconoFitカラム、UNOsphere S担体を充填したEconoFitカラムの2種類の検討を行いました。NGC DiscoverProシステムにはカラムスイッチングバルブが装備されており、カラムポジションを変更するだけで同じ条件で比較検討することが容易です。

UNOsphere Sが充填されたEconoFitカラムを用いた場合、EconoFit MacroPrep High Sでは分離されなかった (ピークショルダーとなっていた) ピークを検出することができ、EconoFit UNOsphereカラムがよりCas9精製に適していることがわかります (Fig.5)。

2番目のピーク (E2) と3番目のピーク (E3) は、SDS-PAGEでは同じ成分 (Cas9) を含むように見えますが (Fig.5)、ゲルろ過カラム (ENrich SEC 650カラム) による分析の結果、E2は260 nmの吸収を持つ分子量の大きい成分をより多く含んでいることがわかります (Fig.6)。核酸と会合したCas9が持つネットチャージがよりマイナスになったことで、陽イオン交換カラム分離において先に溶出されたことが推測されます。

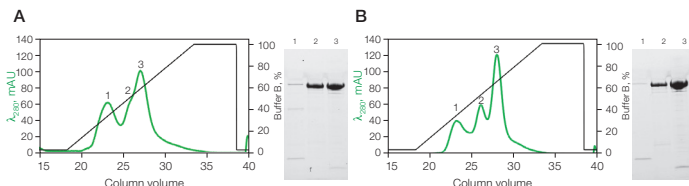


Fig.5. 陽イオン交換カラムによる分離結果

A: EconoFit Macro-Prep High Sカラムによる分離パターンとフラクションのSDS-PAGE結果、B: EconoFit UNOsphere Sカラムによる分離パターンとフラクションのSDS-PAGE結果

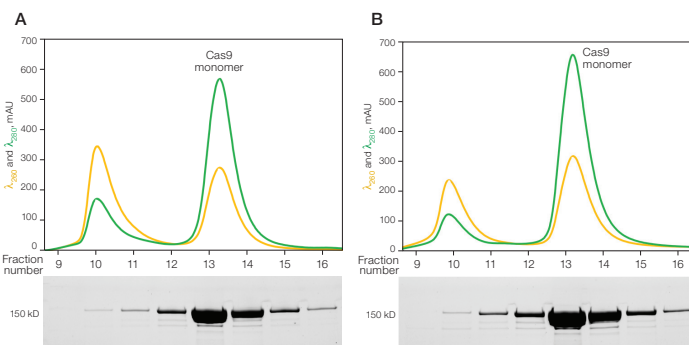


Fig.6. E2、E3フラクションのENrich SEC 650カラムによる分析。

A: E2フラクション、B: E3フラクション

精製Cas9サンプル活性確認

in vitro活性確認

RNA非依存性DNA切断活性、RNA依存性DNA切断活性は、E2、E3共に市販品Cas9と同等の結果となった (データはBulletin 3211をご参照ください)。

in vivo活性確認

CopGFPを導入した脾臓腫瘍細胞セルライン (T3M-4) でのRNP輸送モデルシステムを利用し、精製したCas9サンプルの評価を行いました (Fig.1B)。

ZOE蛍光セルイメージャー、およびZE5セルアナライザーでのGFP観察の結果、精製したCas9は市販品と同等の結果を示しました (データはBulletin 3211をご参照ください)。

まとめ

EconoFit IMACカラムによるアフィニティークロマトグラフィーとEconoFit UNOsphereカラムによる陽イオン交換を組み合わせた2ステップ精製で市販品と同等の性能のCas9タンパク質を得られることがわかりました。また、NGC DiscoverProシステムの便利な機能により得た情報から、フラクション成分に関する推測をすることができ、効率的に精製を進めることが可能となりました。

これらの結果から、大量に精製品が必要な場合でも、発現、精製をすることでより安価に必要な量入手できる選択肢はコストの面でも検討に値するものと思われます。

Ordering Information

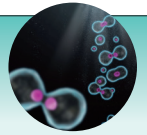
カタログ番号	品名	価格
12009286	EconoFit Nuvia IMAC	¥16,000
12009305	EconoFit UNOsphere S	¥16,000
7880011J1	NGC Discover 10 Proクロマトグラフィーシステム	¥10,340,000

※EconoFitカラムはパイオ・ラッドの各種クロマト樹脂をプレパックしたシリーズです。様々なラインアップがございます。お問合せください。

※NGCシステムは ¥5,200,000 からラインアップが揃っています。用途に応じてシステム構成をカスタマイズ提案いたします。

詳細な実験条件、データは技術資料 Bulletin3211でご覧いただけます。

BrdU抗体とBrdUアッセイのご紹介



チミジン類似体BrdU (5'-プロモ-2'-デオキシウリジン) は、がん研究から神経科学研究に至るまで、様々な科学分野で人気のある試薬です。この化学物質は、哺乳類細胞株などのサンプルに頻りに添加され、その後、複製中に新たに合成されたDNAに組み込まれます。バイオ・ラッドではBrdU検出用に複数の高品質な抗BrdU抗体を販売しています。

BrdUとは何か?

-化学構造と細胞増殖アッセイでの使用

チミジン類似体5'-プロモ-2'-デオキシウリジン (BrdU) の組み込みは、植物から哺乳類細胞に至るまで、多種多様な種の細胞増殖速度を決定するための一般的アッセイとして確立されています (Cecchini et al. 2012, Nagar et al. 2002)。一般的アッセイ方法の1つは、増殖中の細胞の培地にBrdUを添加することです。それにより、複製細胞は、細胞周期のS期に、チミジンの代わりにBrdUを新しく合成されたDNAに組み込みます。

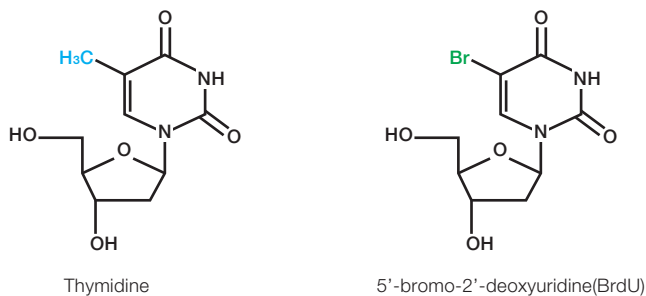


Fig.1. DNAヌクレオシドチミジンとその類似体BrdUの化学構造。

Structures adapted from Liboska et al. (2021) (BrdU) and Yong et al. (1969) (Thymidine).

BrdUは、チミジンと非常によく似た化学構造を特徴としています。BrdUとチミジンの構造の違いをFig.1に示します。BrdUの場合、チミジンの5-メチル基 (青で表示) が臭素 (緑で強調表示) に置き換えられています (Kolb et al. 1999, Sivakumar et al. 2004)。

臭素の代わりに、チミジンの5-メチル基を塩素 (5'-クロロ-2'-デオキシウリジン、CldU) やヨウ素 (5'-ヨード-2'-デオキシウリジン、IdU) などの他のハロゲンで置き換えることができます (Sivakumar et al. 2004)。

組み込まれたBrdUの抗BrdU抗体による検出

組み込まれたBrdUは、マウス抗BrdU抗体、クローンBu20a (MCA2483)、ウサギ抗BrdU抗体 (AHP2405) などの抗BrdU抗体で簡単に検出できます。ただし、染色を成功させるには、組み込まれたBrdUへの抗体のアクセスを可能にするDNA変性ステップを含めることが重要です。この目的のために、塩酸などの酸が頻りに使用されます。銅イオン、熱、ヌクレアーゼ、および水酸化ナトリウムによる処理も報告されています (Liboska et al. 2012, Kennedy et al. 2000)、BrdUの検出は、通常、トータルDNA染色と組み合わせで行われます。細胞周期分析を行う場合、ヨウ化プロピジウム (PI) がDNA染色として選択される傾向があります (Fig.2)。

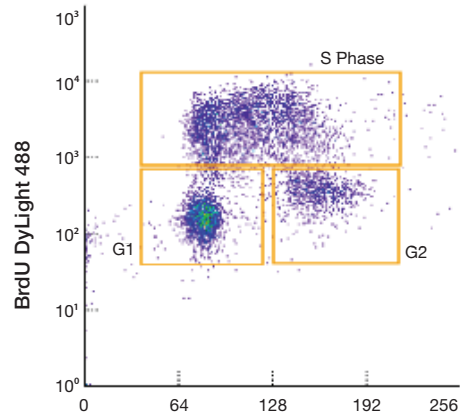


Fig.2. Jarkat細胞を100 μ M BrdUで処理し、細胞をクローンRF4-2 Rat抗BrdU抗体 (カタログ番号:MCA6143) で染色した結果。

二次抗体として、RabbitF (ab^o) 2 Anti-Rat IgG : DyLight488標識抗体 (カタログ番号:STAR16D488GA) を使用しました。DNA (S期) を活発に合成している細胞はBrdUの取り込みを示し、BrdU : DyLight488からの明るいシグナルを示します。

抗BrdU抗体によるBrdU取り込みの測定

細胞増殖を測定するために、組み込まれたBrdUは、マウス抗BrdU抗体、クローンBu20a (カタログ番号:MCA2483)、ウサギ抗BrdU抗体 (カタログ番号: AHP2405) などの抗BrdU抗体で検出されます。ただし、抗体がBrdUに結合できるようにするには、抗体染色の前にDNA処理を行う必要があります (Liboska et al. 2012)。文献では、DNase I (デオキシリボヌクレアーゼ) などのエンドヌクレアーゼや塩酸などの酸を使用してDNAを切断または変性させ、組み込まれたBrdUに抗体が結合できるようにします (Liboska et al. 2012)。

抗BrdU抗体の交差反応性

チミジンとその類似体BrdUの化学構造はほぼ同じですが、Fig.1で強調表示されているように、マウス抗BrdU抗体、クローンBu20aなどの抗BrdU抗体は、チミジン自体との交差反応性がほとんどありません (Aten et al. 1992, Magaud et al. 1989)。ただし、クローンBu20aを含む多くの抗BrdU抗体は、他のハロゲン化チミジン類似体である5'-クロロ-2'-デオキシウリジン (CldU) および5'-ヨード-2'-デオキシウリジン (IdU; Fig.2) を認識します (Liboska et al. 2012, Kimoto et al. 2008)。これは、Fig.1に示す3つの異なるハロゲン化チミジン類似体の構造的類似性によるものです。BrdUおよびその他の非ハロゲン化チミジン類似体を使用して二重標識実験を行う場合、抗BrdU抗体の交差反応性を知ることは特に重要です。

BrdU抗体とBrdUアッセイのご紹介

抗BrdU抗体のアプリケーション

チミジン類似体BrdUは、細胞周期のS期に分裂細胞がBrdUを新たに合成されたDNAに組み込むため、細胞増殖速度を決定するためのツールとして科学文献で広く使用されています。さらに、マウス抗BrdU抗体、クローンBu20a (カタログ番号:MCA2483)、ウサギ抗BrdU抗体 (カタログ番号: AHP2405) などの抗BrdU抗体を使用して、組み込まれたBrdUを検出および視覚化します。これは通常、フローサイトメトリー、免疫細胞化学 (ICC)、免疫組織化学 (IHC) などの免疫検出技術によって行われます。

BrdUは、植物、魚、無脊椎動物 (扁形動物 *Macrostomum lignano* など) から哺乳類種を含む脊椎動物に至るまで、進化の多様な生物研究に成功裏に使用されてきた普遍的なツールです (Caronia et al. 2010、Huang et al. 2013、Nagar et al. 2002、Verdoodt et al. 2012)。

研究ツールとしてのBrdUの限界と抗BrdU抗体によるその検出

BrdUは多くの生物学的システムのツールとして成功裏に確立されていますが、BrdUおよび他のチミジン類似体の使用には限界があります。たとえば、酵母は、新たに合成されたDNAへの外因性チミジン (またはその類似体) の取り込みと取り込みに必要なチミジンヌクレオシドトランスポートとチミジンキナーゼを欠いているため、BrdUを酵母DNAに容易に組み込むことはできません (Lengronne et al. 2001)。これらの重要

なタンパク質の欠如を補うために、*Saccharomyces cerevisiae* 株は、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子やヒト平衡型ヌクレオシドトランスポートなどの外因性遺伝子を発現するように遺伝子操作されています (Lengronne et al. 2001、Viggiani and Aparico 2006)。

DNAの構造により、組み込まれたBrdUは抗BrdU抗体と結合できないことがよくあります。したがって、BrdUを検出するには、抗BrdU抗体とインキュベートする前にDNAを変性または切断する必要があります。一般的に使用されるDNA変性法には、塩酸 (HCl) または水酸化ナトリウム (NaOH) による処理が含まれます (Ligasová et al. 2017)。ただし、HClなどの酸による処理の強度により、タンパク質の変性が発生し、免疫染色が損なわれる可能性があります (Tkatchenko 2006)。代替のより穏やかな処理オプションには、ヌクレアーゼ (DNase I など) または一価の銅イオンへの曝露などがあります (Liboska et al. 2012)。バイオ・ラッドのマウス抗BrdU抗体であるクローンBu20aは、多くの論文で使用されており、フローサイトメトリーおよび免疫細胞化学 (ICC) プロトコールで使用されています。

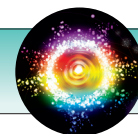
バイオ・ラッドの抗BrdU抗体

弊社のBrdU抗体については以下のURL
もしくはQRコードからWebをご参照ください。
bio-rad-antibody.jp/static/cell-health-antibodies-dyes-kits.html#cellbio_rcd3_4



NEW

StarBright抗体



フローサイトメトリー用蛍光標識抗体 “StarBright抗体”

バイオ・ラッドのフローサイトメトリー用StarBright標識抗体は、フローサイトメトリーに実績のある抗体に独自の高輝度蛍光物質 “StarBright” を標識して製品です。

すでに発売しているStarBright Violet 440、515、610、670、StarBright Blue 700の5種類の蛍光標識に加えて、StarBright 475、570、710、790の4種類の蛍光標識が追加されます。フローサイトメーターのViolet(405 nm)レーザーをより活用できる製品です。是非お試しください。

StarBright標識抗体の特長

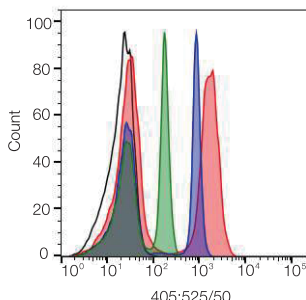
第三世代のポリマー色素であるStarBright蛍光色素は、フローサイトメトリーで利用するために、強力な以下のような特長を持っています。

- ☑ シグナル強度が強い (明るい)
- ☑ 狭い励起波長、蛍光波長幅により、マルチカラーに最適
- ☑ 様々な機器や試薬で使用可能
- ☑ 専用バッファー不要の柔軟性
- ☑ ロット間誤差の無い高い再現性
- ☑ 光安定性が高い

明るい蛍光物質

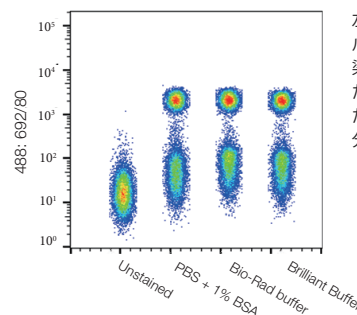
StarBrightは既存の蛍光物質よりも明るいため、レアポピュレーションや低密度抗原の検出にも有効です。

Unstained
CD4 AMO, SI = 5.65
CD4 BV510, SI = 29.5
CD4 SBV515, SI = 44



特別なバッファーは不要

StarBrightシリーズは特別なバッファーを必要とせず、また様々なバッファー中でも安定した染色、検出が行えます。バッファーの制限がないことにより、マルチカラーパネルをより制限なく自由に構築することが可能になります。



左図: StarBright Blue 700でラベルされた抗CD4抗体で末梢血細胞を染色し、様々なバッファーで検出を行った。バッファー組成によらず、安定した分離を得ることが可能であることが分かる。

StarBright抗体については以下のURL
もしくはQRコードからWebをご参照ください。
info.bio-rad.com/jp-StarBright-Dyes



Think Antibodies.

Think Bio-Rad.

— これからは、抗体もバイオ・ラッド —



日本語抗体検索サイトのご案内

フローサイトメトリー、IHC、IF、Western Blotting、ELISAなど多用途の抗体を免疫学、獣医学、癌研究、神経科学、細胞生物学など幅広い分野をカバーするラインアップで取り揃えております。

検索アルゴリズムを改良し、より正確かつ別名によるターゲット(抗原名)検索に対応いたしました。さらに日本語抗原名による検索機能も追加しています。

検索サイト内に「細胞生物学」、「免疫学」、「獣医学」、「創薬開発」、「フローサイトメトリー」についての日本語コンテンツを追加し、蛍光スペクトルビューアーや免疫細胞マーカーツールへのリンクも追加いたしました。是非、バイオ・ラッドの抗体検索サイトをご利用ください。



bio-rad-antibody.jp/



BIO-RAD

バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社

取扱店

ライフサイエンス www.bio-rad.com

本 社 〒140-0002 東京都品川区東品川 2-2-24 天王洲セントラルタワー
TEL: 03-6361-7000 FAX: 03-5463-8480

※学術のお問い合わせは

TEL: 03-6404-0331 FAX: 03-6404-0334

※価格(税抜き)、仕様などは予告無く変更することがありますので、ご了承ください。
※価格は2021年11月現在のものです。メーカー希望小売価格(税別)です。
※本カタログに記載されている会社名、商品名は各社の商標または登録商標です。
※掲載されている製品は研究用であり、診断目的にはご利用いただけません。