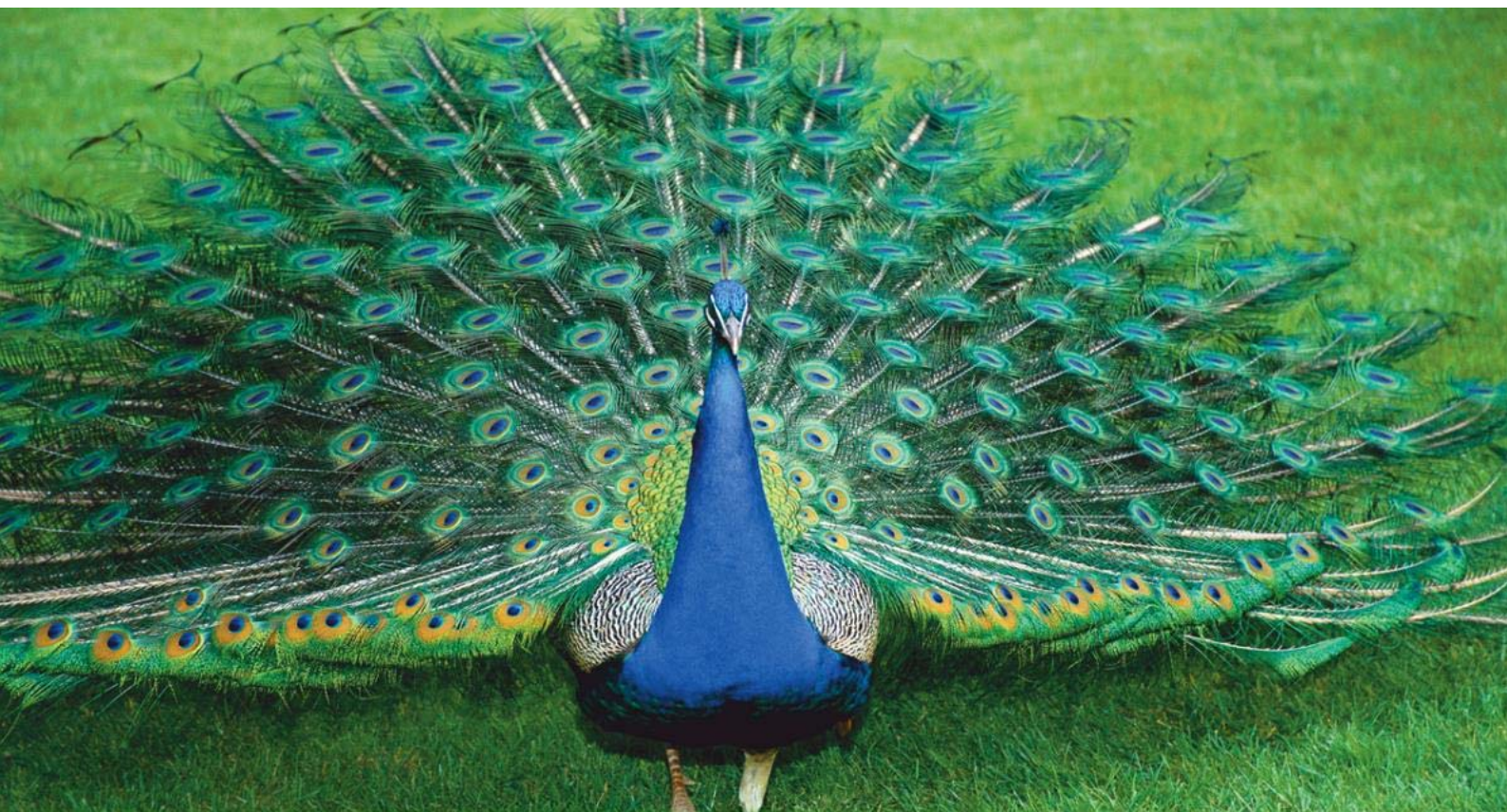




Roche Applied Science

ユニバーサル・プローブライブラリー
アッセイデザインガイド

Universal ProbeLibrary
Guide to successful qPCR Assays



Universal ProbeLibrary は、#1~#165 のプレバリデートされたプローブです。アクセス無料の Web 上デザインソフトを使用して、あらゆる生物種のほぼすべての転写産物の発現定量アッセイを迅速にデザインすることのできるシステムです。

ヒト、マウス、ラットについてはそれぞれ 90 種類からなるプローブのセットをご用意しています。

* #1~#165 のプローブは単品での購入も可能です。

* ヒトセットについては#1~#90 が含まれますが、マウス・ラットはそれぞれ含まれるプローブの種類が異なります。

Universal ProbeLibrary ユニバーサル・プローブライブラリー

いつものリアルタイム PCR を見直してみませんか？

わずか 165 種類のプレバリデートされた短鎖の加水分解プローブと、簡単に迅速にデザインできる無料のデザインソフトウェアからなるユニバーサル・プローブライブラリー (UPL) では、僅かな時間で様々な生物種における 500 万以上もの転写産物からリアルタイム qPCR アッセイをデザインすることが可能です。

■ デザイン時間を大幅短縮

アクセス無料・登録不要の ProbeFinder ソフトウェアで、さまざまな生物種について、特異的でイントロンをはさんだプライマーデザインが短時間で可能です。

www.universalprobelibrary.com

■ 信頼性の高い加水分解プローブアッセイ

SYBR Green I のような反応の条件検討や、ダイマーのチェックは必要ありません。

■ コスト削減

SYBR Green I フォーマットに迫るコストで、配列特異的な加水分解プローブ検出が可能です。時間もコストもかかる蛍光ラベルプローブのカスタム合成はもう必要ありません。

■ あらゆるリアルタイム PCR 機器で使用が可能

FAM が検出できる (SYBR Green I と同等チャンネル) 機器であれば、どんなリアルタイム PCR 機器でも使用可能です。

また、すぐに使える UPL リファレンス遺伝子アッセイセット*でマルチプレックス反応も可能です。

*LC Yellow 555 を検出可能な機器のみで使用できます。

The image shows a blue tray filled with small vials, likely containing PCR probes, and a single larger vial in the foreground. To the right, a computer screen displays the Roche Applied Science website interface for the Universal ProbeLibrary. The screen shows the following information:

Roche Applied Science

Universal ProbeLibrary for Human

ProbeFinder has designed the optimal real-time PCR assay for:

[NM_0011312](#) Homo sapiens actin, beta (ACTB), mRNA.

Assay details:

Use Universal ProbeLibrary probe: #11, cat.no. 04685105001
(Formerly Exon ProbeLibrary probe: Human#11)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left Primer	18	821 - 838	59	50	attggcaatgagcggttc
Right Primer	19	878 - 896	60	58	ggatgccacaggactccat

Probe (78 nt)

gagcgggtccgctgcctgaggcactcttcagccttccttcctggcatg
ggcatcc

Download peak meet Download report Order probes or set

Universal ProbeLibrary – プローブ

わずか 165 種類のプレバリデートプローブで、あらゆる遺伝子のリアルタイムが可能で

テクノロジー

Universal ProbeLibrary(UPL)は、わずか 165 種類の、5'末端を FAM、3'末端付近をダーククエンチャーでラベルされた短鎖の加水分解プローブです。

UPL があらゆる転写産物をカバーできる理由は、プローブがわずか 8~9 塩基という長さのためです。UPL プローブには、LNA (Locked Nucleic Acid)と呼ばれる、DNA よりも結合力の強いアナログ(類似体)が組み込まれているため、リアルタイム qPCR においてプローブがハイブリダイズするのに必要な特異性と融解温度(T_m 値)を持っています。

165 種類の UPL プローブの配列は、既知の転写産物(トランスクリプトーム)の配列中に高頻度で出現する 8~9 塩基のモチーフから選ばれています。たとえばヒトの転写産物について見ると、165 種類の各プローブは、理論上約 7,000 の転写産物に結合サイトを持ち、逆に各転写産物は、約 16 種類のプローブにより検出できる可能性を持っていることとなります。検索された UPL プローブとプライマーを合わせて使用することで、特定の転写産物のみを特異的に検出することができます。

特異的なリアルタイム PCR のデザインは、Web 上のアッセイデザインセンターにあるアクセスフリーの ProbeFinder ソフトウェアで簡単に行うことができます。本ソフトウェアは、最適なプライマーとプローブ番号の複数の候補を提示し、それぞれ検出領域や配列も表示できるので、目的に合わせたデザインの候補を簡単に選択することが可能です。

カバー率

UPL では、アッセイデザインセンター対応生物種の転写産物の 94~99%をカバーしています。またそのほとんどにおいてイントロンを挟んだデザインが可能です(表 1)。

対応生物以外の他の生物種についても、配列を入力すればアッセイのデザインが可能です(イントロン情報はマニュアル指定が可能です。また、この場合は自動の Blast チェックは行われません)。

▼ 表 1 : 各生物種における UPL のカバー率

生物名	生物種	理論上のアッセイ数	カバー率
ヒト	Homo sapiens	> 639,500	99 %
マウス	Mus musculus	> 509,500	99 %
ラット	Rattus norvegicus	> 364,000	98 %
霊長類	Pan troglodytes	> 519,500	96 %
ショウジョウバエ	Drosophila melanogaster	> 253,500	99 %
シロイヌナズナ	Arabidopsis thaliana	> 199,000	98 %
線虫	Caenorhabditis elegans	> 134,000	95 %
トウモロコシ	Zea mays	> 61,500	94 %
イネ	Oryza sativa	> 898,500	98 %
ゼブラフィッシュ	Danio rerio	> 630,000	98 %
酵母	Saccharomyces cerevisiae	> 42,000	95 %
トータル		> 5,000,000	

UPL のコンセプト

UPL プローブは、レポーター色素に FAM を使用しているため、FAM と励起/検出波長の近いフルオレセインや FITC、SYBR Green I などを検出できるすべてのリアルタイム PCR 機器で使用することが可能です。

UPL プローブは番号ごとの単品でも購入が可能です。ヒト、マウス、ラットについては 90 種類のプローブがセットになった製品もご用意しています*1。

また、#1~#165 の “完全セット” *2 を用意しておけばあらゆる生物に対応できます。*3

*1 ヒト、マウス、ラットの生物種を指定して検索する場合、各セットに含まれる 90 種類のプローブ中からの検索結果が表示されます。

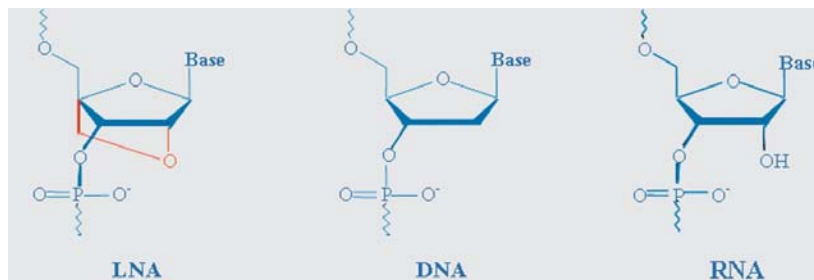
*2 完全セットは、UPL セット ヒト(#1~#90/Cat. No. 4 683 633)と UPL Extension セット(#91~#165/Cat. No. 4 869 877)を組み合わせたものです。ご購入の際はそれぞれをお求めください。

*3 Other OrganismJ(Sequence Only) カテゴリで検索すると、#1~#165 の中からデザインが検索されます。

注意 : 各遺伝子のプライマーは、単品の UPL プローブやプローブセット製品には含まれません。別途オリゴ合成会社にて合成をご依頼ください。

LNA テクノロジー

Locked Nucleic Acid (LNA) はヌクレオチドアナログの一種です。2'-O 原子と 4'-C 原子をメチレン架橋することでリボース環が "Lock" された構造が形成されます (右図)。LNAヌクレオチドには、一般的に知られる 6 種類の塩基 (T、C、G、A、U、メチル化 C) を含むものがあり、通常のヌクレオチドと同様、相補的な塩基との塩基対形成が可能のため、DNA や RNA へ取り込むことが可能です。LNA が含まれた核酸は、塩基がスタッキング (積み重なり) し、基本骨格の安定性が高まるため、温度安定性 (T_m 値) や 2 本鎖の安定性が高くなります。



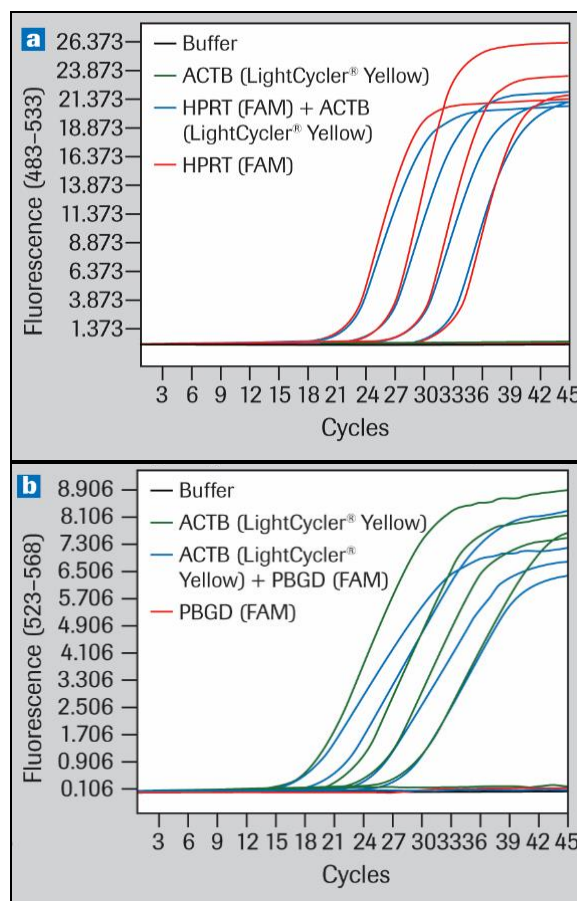
	パーフェクトマッチ	1 塩基ミスマッチ	ΔT_m
	3'-ACGACCAC-5'	3'-ACGCCAC-5'	
 LNA 8mer 5'-TGCTGGTG-3'	71°C	45°C	26°C
 DNA 8mer 5'-TGCTGGTG-3'	35°C	25°C	10°C

Universal ProbeLibrary リファレンス遺伝子アッセイを使用したマルチプレックスアッセイ

ヒト、マウス、ラットについては、UPL と UPL リファレンス遺伝子アッセイを同一反応液中で反応させてデュアルカラー (2 色) 検出することで、目的遺伝子の内在性遺伝子に対する発現レベルを相対定量することが可能です。UPL リファレンス遺伝子アッセイセットは、ヒトについては 10 種類 (PBGD、HPRT、ACTB、PGK1、G6PD、PPIA、TBP、B2M、GUSB、GAPD) が、マウスとラットについてはそれぞれ 2 種類 (ACTB、GAPD) をご用意しています。

各 UPL リファレンス遺伝子アッセイ製品には、12base の各リファレンス遺伝子アッセイ用プローブ (LNA を含む) と、各遺伝子特異的プライマーが含まれています。UPL リファレンス遺伝子アッセイのプローブは、5'-末端を LightCycler® Yellow 555 (LCY555)、3'-末端付近をダーククエンチャーでラベルされているため、FAM ラベルされたナンバー付の UPL プローブと組み合わせ、デュアルカラーアッセイを行うことが可能です。UPL リファレンス遺伝子アッセイのプローブは、励起波長 470 ~ 530 nm、検出波長 550 ~ 610 nm (VIC/HEX) を搭載したリアルタイム PCR 機器での検出が可能です。

ターゲット遺伝子と UPL リファレンス遺伝子アッセイとのマルチプレックス PCR アッセイのデザインは、Assay Design Center の ProbeFinder ソフトウェアで行うことが可能です。



▲ 図 1 : UPL リファレンス遺伝子アッセイを使用したマルチプレックスアッセイの例

段階希釈 cDNA をテンプレートとし、LightCycler® 480 を使用してモノカラーおよびデュアルカラーアッセイを行い、それぞれ FAM (483-533) (a)、LCY 555 (523-568) (b) で検出した。

Universal ProbeLibrary – アッセイデザイン

オンラインの ProbeFinder ソフトウェアでは、あらゆる転写産物のアッセイデザインが可能です。

ProbeFinder ソフトウェア

ProbeFinder ソフトウェアは、UPL のアッセイデザインを行うためのアクセス無料の Web ベースツールです。ターゲット遺伝子情報を入力するとターゲット特異的なプライマーペアと UPL プローブを組み合わせたリアルタイム PCR アッセイがデザインされ、ターゲット遺伝子特異的なリアルタイム PCR を可能にします。

ProbeFinder ソフトウェアは、Primer3 をベースとして、アッセイデザインを行うためにあらかじめ UPL プローブを使用したリアルタイム PCR アッセイの最適条件に設定されています。条件はデフォルト設定以外にも、必要に応じて手動でパラメーターを変更して使用することも可能です (Primer3 の設定方法などの詳細は Primer3 のサイトの Help を参照ください)。

In silico PCR

ProbeFinder ソフトウェアでデザインされたプライマーのペアは、独自に開発された *in silico* PCR アルゴリズムを用いて確認が行われます。このアルゴリズムでは、対象生物のゲノムや転写産物へのミスプライミングの可能性の検証が行われます。ゲノムや転写産物上へのミスプライミングにより非特異的産物が生じる可能性がある領域は、デザインから避けられたり低いスコアにランクされ、*in silico* PCR スコアに failed フラグと共に表示されます。

In silico PCR チェックの利点

- ゲノム DNA 由来の偽陽性シグナルの抑制。
- スプライシングバリエントや同種の遺伝子ファミリーなどに由来する偽陽性シグナルの抑制。
- Pseudogene (偽遺伝子) 検出の抑制。
- イントロン介在デザインにおいて短すぎるイントロンの回避。

リファレンス遺伝子とのマルチプレックスアッセイのデザイン(ヒト、マウス、ラット)

ProbeFinder ソフトウェア上の、“Design multiplex PCR with reference gene” オプションでは、ターゲット遺伝子と、ユーザーが選択した UPL リファレンス遺伝子アッセイとのマルチプレックス反応を *in silico* テストと同時に進めたデザインをすることが可能です。マルチプレックスアッセイのための *in silico* PCR では次のような検証が行われます。

- ・ プライマー–プライマー間の相互作用
- ・ プライマー–プローブ間の相互作用
- ・ プローブ–プローブ間の相互作用
- ・ プローブ–増幅産物間の相互作用 (増幅産物上への非特異的結合)
- ・ 4 種類のプライマーすべてについての *in silico* PCR (cDNA に対する非特異的増幅) テスト

アッセイデザインのながれ

ProbeFinder ソフトウェアは、リアルタイム PCR に適した Universal ProbeLibrary プローブとプライマーセットについて、いくつかのステップを経た検索を行います。ProbeFinder ソフトウェアでは、次のデータベースを参照することが可能です。

h_sap_gene, h_sap_exon, h_sap_refseq, h_sap_embl, h_sap_genome

データベースは定期的にアップデートされます (データベースについての詳細や利用可能な遺伝子配列の ID などについては用語解説の章を参照ください)。

<p>① エクソン-エクソン ジャンクションの検索</p>	<p>イントロンは次のいずれかの指定に従って検索されます：</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ Ensembl データベースからの引用（情報がある場合のみ） ・ BLAST 検索を基にした独自のアルゴリズムによる予測 ・ ユーザーにより遺伝子配列中に指定された箇所 <p>イントロンが決まると、ProbeFinder ソフトウェアは次のクライテリアに従って検索を進めます：</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 95 % 以上の相同性があること ・ エクソンが 40 bp 以上連続していること ・ イントロンが 30 bp 以上連続していること
<p>② UPL プローブの検索</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・ 入力された配列から、SNP (Ensembl データベースから引用できる情報のみ) を避ける UPL プローブが検索されます。 ・ Human、Mouse、Rat については、各生物種の UPL セットに含まれる 90 種類のプローブから検索されます。その他の生物種については、165 種類から検索されます。
<p>③ PCR プライマーの検索</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・ ゲノムに対してプライマーの特異性が確認されます。 ・ 遺伝子のファミリーやバリエーションが検索されます（登録されているもののみ）。 ・ <i>in silico</i> PCR が行われます。
<p>④ 検索されたデザインのランク付け</p>	<p>以下のクライテリアについてランク付けを行います。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ ゲノム中の別の領域へクロスハイブリダイゼーションが起こらない特異的なアッセイであること (<i>in silico</i> PCR) ・ ゲノム DNA の混入による偽陽性シグナルを避けるために増幅産物にイントロンを挟むデザインであること (Intron spanning) ・ 再現性が高く安定した PCR 効率を得るために増幅産物の長さが短いこと。(Amplicon length) ・ リファレンス遺伝子を選択している場合、マルチプレックスアッセイの条件を満たしていること。
<p>⑤ 検索結果の表示</p>	<p>上記のクライテリアを満たした中で、もっともスコアの高いアッセイデザインの UPL プローブ番号、プライマー配列、増幅産物の配列が表示されます。UPL リファレンス遺伝子アッセイとのマルチプレックス反応のオプションを選択している場合はその候補も表示されます。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ “More Assays” をクリックすると、目的遺伝子に対する検索結果のすべての候補とその詳細を表示させ、実験目的に合ったアッセイデザインを選択することができます。 ・ “Transcript Overview” や “Detailed View” ではより詳細な内容 (配列情報など) が表示されます。転写産物配列中の SNP 箇所が赤で表示され、カーソルを当てるとその詳細を確認することができます。 ・ 検索結果は PDF およびテキスト形式のレポートとしてダウンロードすることが可能です。

目的遺伝子情報の入力フォーマット

アッセイデザインの検索は、Assay Design Center のトップ画面より、生物種を選択し、ターゲット遺伝子の情報を入力するところから始まります。ターゲット遺伝子の情報は、アクセッション番号、遺伝子名、キーワード、塩基配列のいずれかを入力します。

入力可能なアクセッション番号のフォーマットは、RefSeq、GenBank/EMBL、Ensembl です(データベースについての詳細や利用可能な遺伝子配列の ID などについては用語解説の章を参考ください)。遺伝子名やキーワードが入力された場合、そのキーワードが含まれる各種データベースをテキスト検索し、該当する gene ID や塩基配列の候補を表示します(偽遺伝子や関連遺伝子等も候補に含まれます)。

「Other Organism」カテゴリ

目的の生物種がアッセイデザインセンターの画面上のドロップダウンメニューのリストにない場合でも ProbeFinder ソフトウェアを使用して検索をすることができます。UPL プローブはあらゆる生物種のあらゆる配列(人工的な配列も含む)に対して、プローブの結合サイトと条件を満たすプライマーを検索することができます。そのような配列を対象とした検索をする場合は、“Other Organisms”を選択し、配列入力ウィンドウ内へ配列をペーストします。

複数の配列の入力

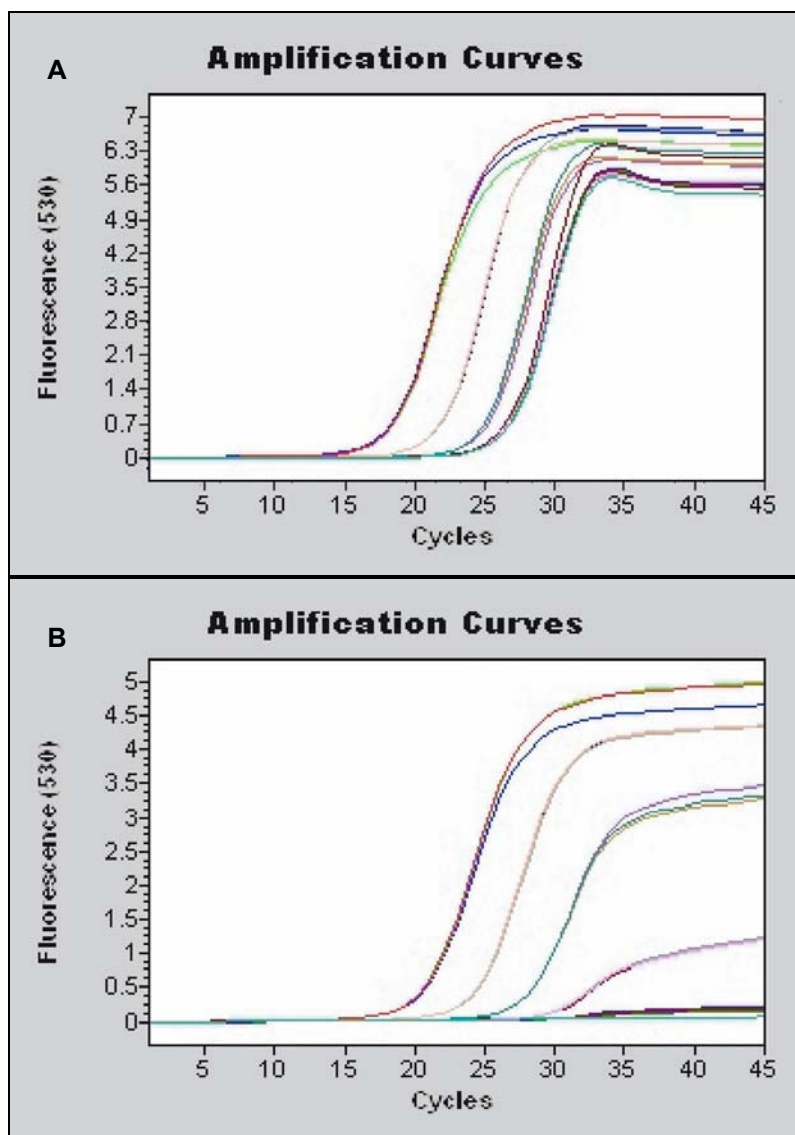
ProbeFinder ソフトウェアでは複数の対象を同時に検索することが可能です。

- 同時に10種類までのターゲット遺伝子を入力することができます。(Batch Assay)
- すべての検索結果を同じページ内に表示することができます。
- ターゲット遺伝子のスプライスバリエントや遺伝子ファミリーを考慮したアッセイを検索することができます。(Common/Differentiating Assay)

Universal ProbeLibrary - パフォーマンスデータ

SYBR Green I アッセイと変わらないフレキシビリティながら、プライマーダイマーには悩みません。

UPL アッセイでは、プライマーデザインからは独立した蛍光ラベルプローブを使用することで、SYBR Green I フォーマットのようなフレキシビリティを実現しました。特異性は、配列特異的な加水分解プローブや HybProbe プローブフォーマットと同等です。プライマーダイマーや非特異反応への対策は必要ありません。



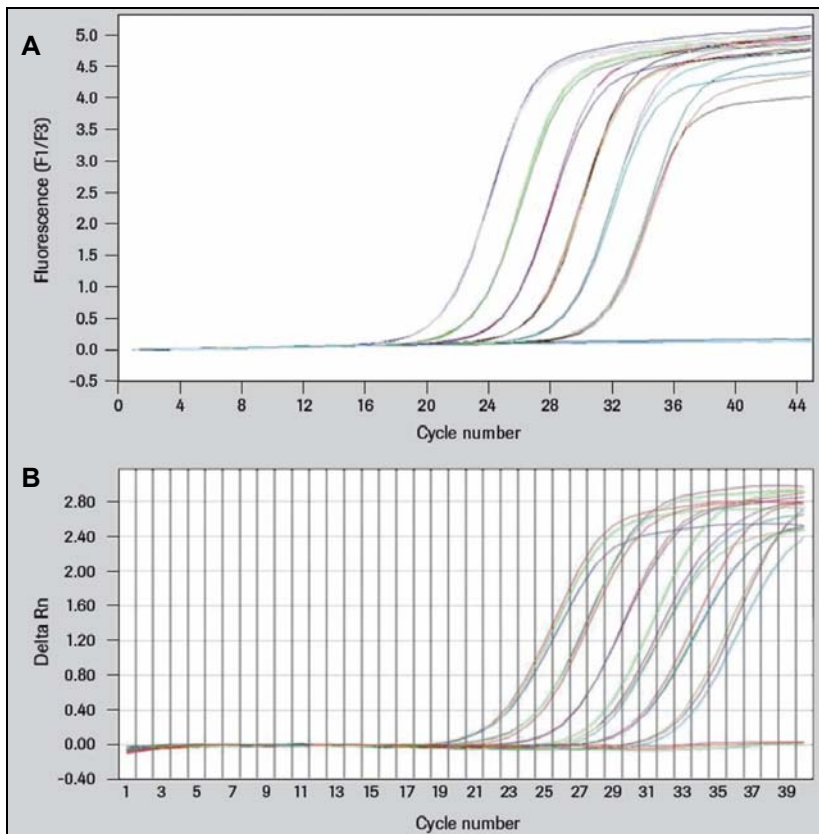
◀ 図 2 : LightCycler® 2.0 を使用したリアルタイム RT-PCR アッセイ。cDNA 段階希釈をテンプレートとして GAPDH を検出した。
A : SYBR Green I アッセイでの増幅曲線
B : UPL アッセイでの増幅曲線

データは Amy Jassen, Ph.D., New England Primate Research Center, Harvard Medical School. 提供

UPL を使用したトウモロコシ (*Zea mays*) mRNA の定量

トウモロコシ (*Zea mays*) の転写産物の検出に UPL が適しているかを検証しました。代表的な 20 種類の mRNA 配列についてアッセイをデザインしたところ、高い確率でデザインができ、大多数においてよい結果を得ることができました。また、LightCycler® システムと他社製のリアルタイム PCR システムを使用して、UPL のアッセイパフォーマンスを比較しました。

図 3 は、光合成酵素の中間体として豊富に発現しているホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPCK) に特異的なプライマー・プローブの組み合わせを使用した実験例です。UPL アッセイはどちらのシステムにおいても効率よくワークしましたが、Cp 値は LightCycler® システムの方がわずかに低く、検出感度が高い場合があります。



◀ 図 3 : 2 種類の異なる機器を使用した PEPCK に対する UPL アッセイの比較。

- A : LightCycler® システムを使用した PEPCK の増幅曲線 (ディスプレイモード: F1/F3)
- B : 他社のリアルタイム PCR システムを使用した PEPCK の増幅曲線

データは、Christoph Peterhänsen, RWTH Aachen, Institute for Biology I, Aachen, Germany 提供。

LightCycler® 480 を使用した市販のデザイン済み加水分解プローブと UPL アッセイの比較

GAPDH 遺伝子を、qPCR human reference cDNA (BD Biosciences) を段階希釈したものをテンプレートとして使用して測定しました。UPL アッセイは #60 とそれに対応するプライマーを使用し、市販のデザイン済み加水分解プローブアッセイのパフォーマンスと比較しました。

UPL アッセイは、プライマーとプローブの濃度を市販のアッセイと揃えました (プライマーは各 900nM、プローブは 250 nM)。マスターミックスは、どちらも **LightCycler® 480 Probe Master** を使用しました。両方のアッセイで PCR 効率は約 $E = 2$ でしたが、UPL アッセイの方がわずかに低い C_p 値が得られました

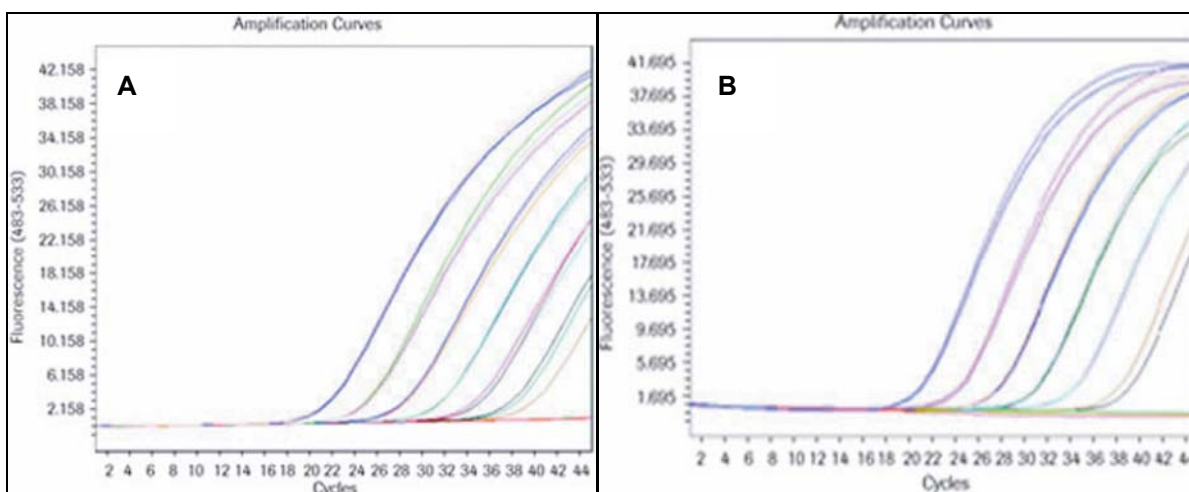


図 4 : LightCycler® 480 を使用した GAPDH に対するリアルタイム PCR アッセイ。

- A : 市販のデザイン済み加水分解プローブアッセイセットの増幅曲線 (プライマー 900nM、プローブ 250nM)
- B : UPL デザインアッセイの増幅曲線 (プライマー 900nM、プローブ 250nM)

インターネット www.universalprobelibrary.com 上にもデータが掲載されています。ご覧ください。

Universal ProbeLibrary ユニバーサル・プローブライブラリーアッセイリスト

インターネット www.universalprobeLibrary.com 上で成功例をリスト化し常時更新しています。
このリストは他の研究者の推薦するデザインをご覧いただけます。また、推奨する UPL アッセイをご自身でアップすることもできます。

Organism	Locus	Target	Acc no.	Probe no.	Primer forw. (5' -> 3')	Primer rev. (5' -> 3')
Human	B2M	beta 2-microglobulin	AB021288.1	42	ttctggcctggaggctatc	tcaggaaatttgacttccattc
Human	PBGD	Non-erythropoietic porphobilinogen deaminase (hydroxymethylbilane synthase)	X04808.1	37	cctgtttaccaaggagcttga	ggagtgaacaaccagggtcca
Human	HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)	M31642.1	73	tgaccttgattattttgcatacc	cgagcaagacgttcagtcct
Human	G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)	X03674.1	82	gcaaacagagtgagcccttc	gggcaagaagtccctccag
Human	ALAS	Delta-aminolevulinatase synthase	X56351.1	64	ccctctcaccctggctaa	aggccatggtcccagaatc
Human	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	M33197.1	60	agccacatcgctcagacac	gccaatcagccaaatcc

Universal ProbeLibrary Assay Design -アッセイデザインの手順ガイド

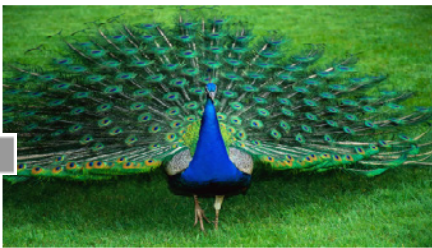
はじめに、ProbeFinder ソフトウェアのあるアッセイデザインセンターへアクセスします。
www.universalprobelibrary.com

Home Products Special Interest Sites Support & Resources News

Home > Special Interest Sites > Genomic Systems > Real-Time PCR Systems > **Universal ProbeLibrary System**

Universal ProbeLibrary

- ▼ Real-Time PCR Systems
 - ▶ LightCycler® Carousel-Based System
 - ▶ LightCycler® 480 System
 - ▼ **Universal ProbeLibrary System**
 - ▶ System Description
 - ▶ Technology
 - ▶ **Assay Design Center**
 - ▶ User Statements and Application
 - ▶ Assay List
 - ▶ Performance
 - ▶ Product List
 - ▶ Support
 - ▶ Literature and References
 - ▶ Multimedia Presentations
 - ▶ Product Information and Pack Inserts



Gene Expression Quantification with Real-Time PCR - Simple and Fast

- ◆ Design real-time qPCR assays online in seconds.
- ◆ Rely on just **165 prevalidated probes** for over five million qPCR assays for a large variety of organisms.
- ◆ Reduce the cost of gene expression analysis by performing **multiplex qPCR assays** with Universal ProbeLibrary Reference Gene Assays.
- ◆ Perform real-time PCR on any real-time PCR instrument with standard protocols.

✉ [Sign up](#) for E-Mail Services to stay updated on "Real-Time PCR Systems"

Ⓜ [View](#) Universal ProbeLibrary Multi Media Presentation

※最初に国名の選択画面が表示されることがありますが、選択して進んでください。

アッセイデザインの手順 -つづき-

① 生物種を選択する

アッセイデザインセンターからドロップダウンメニューより検索したい遺伝子の生物種を選択します。目的の生物種がドロップダウンメニューのリストにない場合は“Other Organism”を選択してください。“Other Organism”を選択すると、目的遺伝子(転写産物)の配列を入力することになります。詳しくは次項“オプション II : 配列をペーストする”をご参照ください。

The screenshot shows the 'Universal ProbeLibrary Assay Design Center' page from Roche Applied Science. On the left is a navigation menu with 'Assay Design Center' selected. The main content area includes a description of the ProbeFinder software and instructions to select an organism. A dropdown menu is open, listing various organisms such as Homo sapiens (Human), Mus musculus (Mouse), Rattus norvegicus (Rat), Anopheles gambiae (Mosquito), Caenorhabditis elegans (C. elegans), Danio rerio (Zebrafish), Drosophila melanogaster (Fruitfly), Pan troglodytes (Primates), Arabidopsis thaliana, Oryza sativa (Rice), Zea mays (Maize), Saccharomyces cerevisiae (Baker's yeast), and 'Other organism (paste sequence only)'.

② 目的遺伝子を指定する

The screenshot shows the 'Universal ProbeLibrary for Human' target specification form. It asks the user to 'Specify your target(s):' and provides two options: 'By sequence ID, gene name or keyword' and 'By sequence'. The 'By sequence ID, gene name or keyword' option includes an example: 'e.g. ENST00000331789, NM_001101 or X00351 or beta-actin'. The 'By sequence' option includes an example: 'e.g. >part of X00351 Human mRNA for beta-actin' followed by a long DNA sequence: 'CACGGCATCGTCACCAACTGGGACGACATGGAGAAAAATCTGGCACCACACCTTCTACAAT GAGCTGCGTGTGGCTCCCGAGGAGCACCCCGTGCTGCTGACCGAGGCCCCCTGAACCCC AAGGCCAACCCGAGAGATGACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCCAGCCATG TACGTTGCTATCCAGGCTGTGCTATCCCTGTACGCCCTCTGGCCGTACCACTGGCATCGTG ATGGACTCCGGTGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTACGAGGGGTATGCCCTCCCC'.

アッセイデザインの手順 -つづき-

目的遺伝子を指定するために、以下の3通りの方法があります。

▶ オプション I : 配列 ID を入力する

入力ウィンドウには次のデータベースの ID やキーワードを入力することが可能です :

Ensemble (例; ENST00000158302)、**RefSeq** (例; NM_001101)、**GenBank/EMBL** (例; AB062273)

遺伝子名またはそのキーワードも入力が可能です。(オプション III)

注 : 遺伝子名/キーワード入力では、その語を含む全候補が検索されるため、目的の遺伝子以外も検索結果として表示されます。確実に目的遺伝子を指定するためには、遺伝子配列 ID の入力をお勧めします。

By sequence ID, gene name or keyword
e.g. ENST00000331789, NM_001101 or X00351 or beta-actin

▶ オプション II : 配列 をペーストする

入力ウィンドウには **FASTA およびテキスト形式の配列**を入力することが可能です。標準 IUPAC 塩基配列記号 (acgtuACGTU) が入力可能です。スペースや遺伝子配列記号でない文字 (数字など) は無視されます。

イントロンを介在したアッセイデザインを行いたい場合は、エクソン-エクソン の境界に半角括弧([])を挿入してください。半角括弧の間には何も記入しない()か、イントロンのサイズを入力し([93])、塩基記号は入力しないでください。また、">" 記号から始めて遺伝子名を入力し、"Enter" で改行してから配列入力を開始すると、先頭行の">"以下の文字が候補の名称として表示されます(表示の例をご参照ください)。

By sequence
e.g.
>part of X00351 Human mRNA for beta-actin
CACGGCATCGTCACCAACTGGGACGACATGGAGAAAATCTGGCACCACACCTTCTACAAT
GAGCTGCGTGTGGCTCCCGAGGAGCACCCCGTGTGCTGACCGAGGCCCCCTGAACCCC
AAGGCCAACCGGAGAAAGATGACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCAGCCATG
TACGTTGCTATCCAGGCTGTGCTATCCCTGTACGCCCTCTGGCCGTACCACTGGCATCGT
ATGGACTCCGGTGACGGGGTACCCACACTGTGCCATCTACGAGGGGTATGCCCTCCCC

Automatically select an intron spanning assay. Design multiplex PCR with reference gene.

▶ オプション III : 遺伝子名を入力する

塩基配列そのものや ID が分からない場合は、遺伝子名 (例; tubulin) を入力すると候補が表示されます。テキストを入力し、"Design" ボタンをクリックします。入力された文字が含まれるすべてのテキスト検索候補が表示されますので目的遺伝子にチェックを入れます。一度に 10 個まで選択することが可能です。

Universal Probelibrary for Human Roche Applied

Multiple sequences were identified based on your submission.
Please choose the sequence(s) you would like to continue with. You can select up to 10 sequences.
Displaying number 1 to 30 of the 399 genes matched by your query.

Name	Length	Description
<input type="checkbox"/> ENST00000117192.2	1840	TBBE_HUMAN Uniprot@SWISSPROT Tubulin beta-6 chain [Source: Uniprot@SWISSPROT; Acc: G9BUJ5]
<input type="checkbox"/> ENST00000134295.3	2064	TP052_HUMAN Uniprot@SWISSPROT Tubulin polyglutamylase complex subunit 2 (P042). [Source: Uniprot@SWISSPROT; Acc: G66CL5]
<input type="checkbox"/> ENST00000183058.1	1935	TP052_HUMAN Uniprot@SWISSPROT Tubulin polyglutamylase complex subunit 2 (P042). [Source: Uniprot@SWISSPROT; Acc: G66CL5]
<input type="checkbox"/> ENST00000171025.4	2123	G550V5_HUMAN Uniprot@SPTREMBL tubulin, beta 8 [Source: RefSeq_peptide; Acc: NP_817124]
<input checked="" type="checkbox"/> ENST00000109812.2	1436	NP_817124.1 RefSeq_peptide tubulin, beta 8 [Source: RefSeq_peptide; Acc: NP_817124]
<input type="checkbox"/> ENST00000128874.2	1440	NP_817124.1 RefSeq_peptide tubulin, beta 8 [Source: RefSeq_peptide; Acc: NP_817124]
<input type="checkbox"/> ENST00000132108.5	820	NP_817124.1 RefSeq_peptide tubulin, beta 8 [Source: RefSeq_peptide; Acc: NP_817124]
<input type="checkbox"/> ENST00000108418.1	1798	NP_879078.1 RefSeq_peptide tubulin, alpha-like 3 [Source: RefSeq_peptide; Acc: NP_879078]
<input type="checkbox"/> ENST00000115811.3	1381	NP_879078.1 RefSeq_peptide tubulin, alpha-like 3 [Source: RefSeq_peptide; Acc: NP_879078]
<input type="checkbox"/> ENST00000175939.1	2629	NP_001008409.1 RefSeq_peptide tubulin bromine igase-like family, member 9 [Source: RefSeq_peptide; Acc: NP_001008409]
<input type="checkbox"/> ENST00000175934.1	3261	NP_001008409.1 RefSeq_peptide tubulin bromine igase-like family, member 9 [Source: RefSeq_peptide; Acc: NP_001008409]
<input type="checkbox"/> ENST00000175934.1	2967	NP_001008409.1 RefSeq_peptide tubulin bromine igase-like family, member 9 [Source: RefSeq_peptide; Acc: NP_001008409]
<input type="checkbox"/> ENST00000175932.1	3038	NP_001008409.1 RefSeq_peptide tubulin bromine igase-like family, member 9 [Source: RefSeq_peptide; Acc: NP_001008409]

アッセイデザインの手順 -つづき-

オプション III のつづき

“Design” ボタンをクリックする前に、つぎのオプションの選択をすることが可能です。

▶ a) リファレンス遺伝子アッセイ

UPL リファレンス遺伝子アッセイを使用してマルチプレックス反応のデザインが可能です。“Any” を選択すると、ProbeFinder ソフトウェアが、選択可能なアッセイの中からもっともスコアの高い遺伝子を表示します。この機能は UPL リファレンス遺伝子アッセイが提供されているヒト、マウス、ラットのみで選択が可能です。



The screenshot shows a software interface with two checked options: "Automatically select an intron spanning assay." and "Design multiplex PCR with reference gene." Below these is a dropdown menu for "Preferred Reference Gene:" with "Any" selected. The dropdown list includes "Any", "ACTB", "HPRT", "PBGD", and "PGK1". A "Design" button is visible to the left of the dropdown. At the bottom left, the text "ProbeFinder Version: 2.40" is displayed.

▶ b) イントロンスパニング アッセイ

イントロンスパニング アッセイ(イントロンを介在したデザイン)のオプションにはデフォルト設定でチェックが入っています。イントロンを介在したデザインを望まない場合や、遺伝子配列を直接入力し、マニュアル指定でイントロン箇所を指定していない場合は、チェックを外してから “Design” ボタンをクリックしてください。

上記のオプションを確認してから “Design” ボタンをクリックすると、ProbeFinderソフトウェアが要求に合うUPLプローブを選択し、プライマーをデザインし、もっともスコアのよいデザインを表示します。

③ 検索結果の確認

もっともスコアの高いアッセイの結果が1つ画面上に表示されます。

結果の画面は、「アッセイの詳細 (Assay details)」、「転写産物全体の概観 (Transcript overview)」、「詳細 (Detailed view)」から成ります。マルチプレックスアッセイを選択している場合は、「マルチプレックスアッセイの詳細 (Multiplex details)」も表示されます。

▶ Assay Details (アッセイの詳細)

アッセイの詳細(下図)には、検索された UPL プローブの番号(#XX)とその製品番号(Cat.no.)、Left(Forward) / Right(Reverse) の各プライマー配列、増幅産物(Amplicon)の配列と長さが表示されます。

ProbeFinder has designed the optimal real-time PCR assay for:

[ENST00000265986.3|ENSG00000119912.4|IDE_HUMAN](#) Uniprot/SWISSPROT Insulin-degrading enzyme (EC 3.4.24.56) (Insulysin) (Insulinase) (Insulin protease).
[Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P14735]

Assay details:

Use Universal ProbeLibrary probe: #24, cat.no. 04686985001




Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left Primer	21	2324 - 2344	59	52	aacctctcttccaagtcagc
Right Primer	22	2380 - 2401	59	41	tctgctgataaacaaccatcc

Amplicon (78 nt)

aacctctcttccaagtcagctgggttcgggtatagagaagttcagctccctgacagaggat
ggtttggttatcagcaga

[Download pack insert](#) [PDF report](#) [Text report](#) [Order probes or set](#)

Multiplex details:

[Run in multiplex PCR with](#)
ACTB , PBGD  or PGK1 

アッセイの詳細は、“Text report”や“PDF report”をクリックすると各ファイル形式のダウンロードが可能です。

▶ Multiplex details (マルチプレックスアッセイの詳細)

マルチプレックスアッセイのオプションを選択した場合は、その結果と情報が表示されます。

インフォメーションアイコン“i”をクリックすると各 UPL リファレンス遺伝子アッセイの詳細が表示されます。

▶ Transcript overview (転写産物全体の概観)

目的とする転写産物の全体が表示されます。

緑色または灰色の領域は UPL プローブがハイブリダイズする領域を表しています。Ensembl データベースの遺伝子 ID を入力して検索した場合は、そのデータベースに登録されている SNP 情報が赤線で表されます。

Transcript overview:



Detailed view:

SNP
Reference ID: rs8611
Position: 1419
Allele: T/C

アッセイデザインの手順 -つづき-

▶ Detailed view (詳細)

目的の転写産物の領域の拡大図が表示されます。



マウスで選択すれば、さらに拡大/縮小したり周辺領域を表示させたりできます。“Zoom In” ボタンをクリックすると拡大され “Zoom out” をクリックすると縮小します。“Left” や “Right” をクリックすると表示されている領域の上流や下流を表示することができます。

▶ Figure legend? (各図の説明)

“Figure legend?” ボタンをクリックすると画面上のその他の説明が表示されます。

Real-Time PCR Systems Roche Applied Science

Figure legend

Score (mouse over for details)	
All criteria met	
All criteria met	Scoring details for probe no. 9
All criteria met	Amplicon length (76 nt):
All criteria met	Insilico PCR:
All criteria met	

Sequence The light-purple bar illustrates the input sequence and the numbers refer to the nucleotide positions in the input sequence.

Amplicons The length and positions of the PCR amplicons are depicted as bars along the sequence. Enlarged views also show the positions of probes and primers in the amplicons. The numbers refer to the ProbeLibrary probe matching the individual amplicons.

Introns The wedges indicate the exon-exon splice junctions with the intron sizes depicted in the enlarged view. Mouse over an intron to see information about the position.

SNP The magenta color illustrates that SNP (Single Nucleotide Polymorphism) is found at the marked position. Run the mouse over magenta box for more details on this SNP. Mouse over a SNP to see extra information.

Overview The example shows multiple PCR amplicons spanning a 110 nucleotide intron and their positions relative to the input sequence. Mouse over each amplicon to see scoring information.

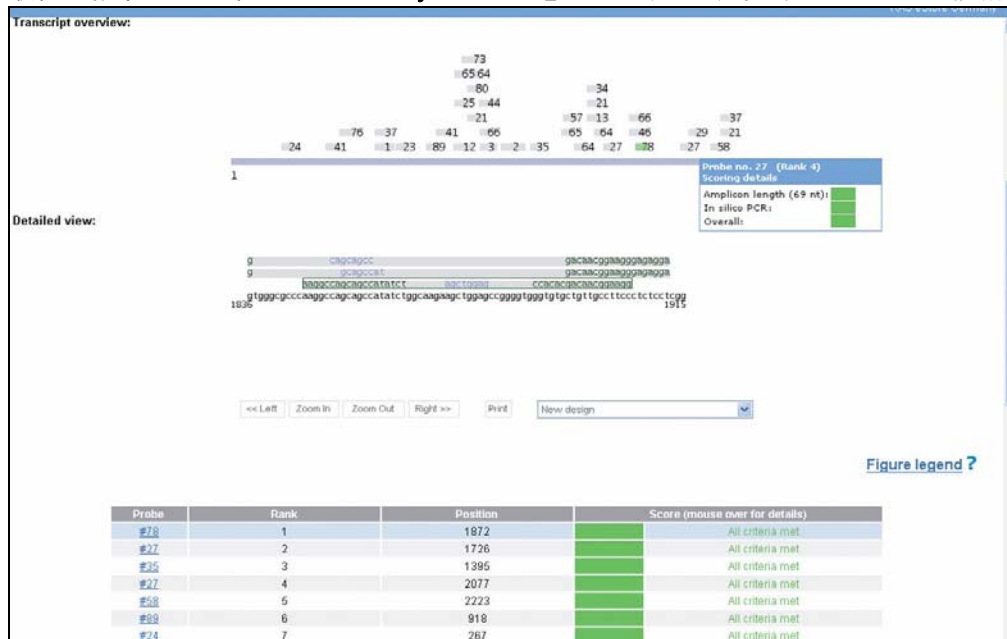
Scoring The example shows the mouse over the scoring column. This provides additional information about the scoring.

Input Page | Back | Print

④ その他の候補の表示

ProbeFinder ソフトウェアは、1 つの目的転写産物に対して複数のリアルタイム PCR アッセイをデザインします。検索された 1 つの転写産物に対する複数のリアルタイム PCR アッセイは、それぞれクロスバリデートされています。もっともランクの高いアッセイが最初の画面上に表示されますが、ランクにかかわらずその他のアッセイを選択することも可能です。

最初の結果画面下部の “More assays” ボタンをクリックすると、その他のアッセイの候補が表示されます。



“転写産物全体の概観 (Transcript Overview)” の表に その他の候補の UPL プローブとハイブリするポジションが表示されます。その他のアッセイの候補は、クライテリアを満たす割合によってランク付けされ表示されます。設定されている場合は、それぞれのアッセイについてマルチプレックスアッセイも表示されます。表にマウスをあてると、スコアの詳細が表示されどの暗いテリアの項目を満たしていないかなどを確認することができます。

アッセイデザインの手順 -つづき-

⑤ すべての候補の表示

▶ “see all assays”をクリックすると、ソフトウェアが検索したすべての候補を表示することができます。

これらは、アンプリコンサイズ、イントロンの介在の有無、*in silico* PCR、プライマーやプローブが SNP 箇所を含まない(Ensemble データベースのヒト遺伝子 ID を入力した場合でデータベースに SNP 登録がある場合のみ)などのクライテリアを満たしていないものも表示されます。基準を満たしていない項目はブラウンで表示されます。クライテリアを満たしていないアッセイを採用する場合はその項目にご注意ください。

Probe	Rank	Position	Score (mouse over for details)
#78	1	205	All criteria met
#44	2	320	All criteria met
#77	3	611	Not all criteria met
#22	4	613	Not all criteria met
#4	5	1256	Not all criteria met
#17	6	1201	Not all criteria met
#70	7	495	Not all criteria met
#22	8	652	Not all criteria met
#81	9	259	Not all criteria met
#69	10	1376	Not all criteria met
#72	11	963	Not all criteria met
#71	12	907	Not all criteria met
#38	13	707	Not all criteria met
#28	14	898	Not all criteria met
#12	15	439	Not all criteria met
#39	16	1169	Not all criteria met
#10	17	1049	Not all criteria met

Probe no. 77 scoring details	
Amplicon length (71 nt):	Green
Intron spanning:	Orange
In silico PCR:	Green
SNP:	Green
Overall:	Orange

⑥ 複数配列の入力 (Batch/Differentiation/Common Assay)

ProbeFinder ソフトウェアは 10 個まで入力ボックスへ入力して同時に検索することが可能です。入力する情報は、同じフォーマット(配列のペーストや遺伝子 ID)である必要はありません。ただし入力する情報は入力可能なアクセッション番号(RefSeq、GenBank/EMBL、Ensembl)で揃えてある必要があります。

Ensembl Gene ID (transcript ID が望ましい)を入力した場合、ソフトウェアは Ensembl データベースからその遺伝子の登録されている転写バリエーション(transcript variant)を参照します。転写バリエーションが見つかった場合、その候補が表示されデザインに考慮したい(区別したい)ものを選択することが可能です。

対象を複数入力するバッチアッセイ(Batch Assay)では、デフォルト設定の「**バッチアッセイ(Batch Assay)**」の後で、「**区別アッセイ(Differentiating Assay)**」、「**共通アッセイ(Common Assay)**」を選択して進むことが可能です。

最初の検索結果画面が表示された後、次の各オプションを選択ください。

▶ Batch Assay (バッチアッセイ)

バッチアッセイ(Batch Assay)モードでは、複数入力された検索対象について、個々に検索したときと同じように検索されます(特にチェックを入れるボタンなどはありません)。デフォルト設定で、自動で検索が行われます。入力された複数の対象に対して、それぞれ検索されるため相互関係については考慮されません。数多くの遺伝子について検索をする場合に便利な機能です。

- ・ 入力ウィンドウへ同時に 10 個までの配列 ID、遺伝子名、配列のペーストを入力することができます。それぞれの配列 ID や遺伝子名はコンマで区切って入力ください(半角コンマ + スペース)。
 - ・ 配列をペーストして配列入力ウィンドウへ入力する場合は、各配列のはじめに「>(半角)」記号を加え、「Enter」で区切って入力ください。「AND」、「OR」、「NOT」などのコマンドを使用することはできません。
-

アッセイデザインの手順 -つづき-

Batch Assay のつづき

次の画面で、候補となる配列 ID が表示されます。検索したい配列を確認しチェックを入れてください①。または“Select All” ですべてを選択することもできます②。

Universal ProbeLibrary for Human *Roche Applied Science*

Please choose the sequence(s) you would like to continue with.

	Name	Length	Description
❑	NM_002751.4	2222	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 11 (MAPK11), transcript variant 1, mRNA.
❑	NM_138993.1	1530	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 11 (MAPK11), transcript variant 2, mRNA.

結果画面では、最もスコアの高い候補が表示されます。目的遺伝子が複数の場合は個々に表示されます。

ProbeFinder has designed the optimal real-time PCR assays for the 2 genes :

[NM_002751.5](#) Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 11 (MAPK11), transcript variant 1, mRNA.
[NM_138993.2](#) Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 11 (MAPK11), transcript variant 2, mRNA.

Assay details:

Use Universal ProbeLibrary probes: #1(Human#01) and #2(Human#02)

Input	Probe ID	Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
NM_002751.5	#1 cat.no. 04684974001	Left	21	647 - 667	59	38	tggatgcattacaaccaaca
		Right	21	731 - 751	59	52	ctggtcaatgtagtgcgttcc
		Amplicon (105 nt) tggatgcattacaaccaacagtggatctctggtccgtgggctgcatcatggctgagctg ctccagggaagccctctcccggaagcgactacattgaccag					
NM_138993.2	#2 cat.no. 04684982001	Left	20	1241 - 1260	59	55	cccacactcctatgggtcaca
		Right	20	1313 - 1332	60	55	tccgaggttactggatcagc
		Amplicon (92 nt) cccacactcctatgggtcagactctggcctaggaccctcgcttcaggagaatctac acgcatgatggagctgatccagtaacctcgga					

注意! : Batch Assay モードでは、ソフトウェアは“All or Nothing”で検索を行います。複数入力したうちの 1 つでも検索が不可能なものが含まれるとすべてについての結果を表示することができません。ただし、検索不可能(No Assay)な候補でも単独で Intron Spanning 等の条件を変えてデザインを行うとデザイン可能な場合があります。

結果画面の下部に “ Differentiation Assay(区別アッセイ)” と “ Common Assay(同時アッセイ)” が表示されます。クリックすると以下のアッセイが行われます。

Differentiating Assay : 入力されたすべての配列がスプライスバリエーションとみなされ、各バリエーションを特異的に検出するアッセイが検索されます。

Common Assay : 入力されたすべての配列がスプライスバリエーションとみなされ、すべてのバリエーションを同時に検出するアッセイが検索されます。

▶ **Differentiating Assay (区別アッセイ)**

区別アッセイ(Differentiating Assay)モードでは、入力された複数の遺伝子をそれぞれ完全に区別して検出するデザインを行います。この“区別アッセイ(Differentiating Assay)”は特に目的遺伝子の特定のスプライシングバリエーションのみをターゲットとしたい場合に便利な機能です。このオプションを選択すると、ProbeFinder ソフトウェアは入力された遺伝子のファミリーやスプライスバリエーションなどを厳しい基準に基づいてアッセイデザインを行います。適したアッセイデザインが不可能な場合、候補を示しません。

区別アッセイ(Differentiating assay)では、*in silico* PCR を行うのと同様に、入力された複数の配列について検証を行います。ただし、通常の個々の検索を行う場合とは異なり、データベースへの BLAST検索は行いません。検索範囲を制限することで、必要以上の時間をかけずに厳しい条件を満たす検索を行うことが可能です。また入力した塩基配列同士のクロスハイブリを効率よく最小限に抑えることとなります。

このアッセイの検索結果は通常の個々の検索結果と異なるカラーで画面に表示されます。

ProbeFinder has designed real-time PCR assays **differentiating** between the 2 input sequences :

[NM_002751.5](#) Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 11 (MAPK11), transcript variant 1, mRNA.
[NM_138993.2](#) Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 11 (MAPK11), transcript variant 2, mRNA.

Use Universal ProbeLibrary probe(s): **#27(Human#27)** and **#2(Human#02)**

Input	Probe ID	Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
NM_002751.5	#27 cat.no. 04687582001	Left	19	1988 - 2006	60	53	aggggctttctccttgat
		Right	20	2093 - 2112	59	55	gtccgagtccaagtccacat
Amplicon (125 nt) aggggctttctccttgatgtgggaccacagcagcttctgaggctgggggtgggtggg tgggtggtttggccttgaggacgctagggcaggcagcacacctggatgtggacttggact cggac							
NM_138993.2	#2 cat.no. 04684982001	Left	20	1241 - 1260	59	55	cccacactcctatggtcaca
		Right	20	1313 - 1332	60	55	tccgaggttactggatcagc
Amplicon (92 nt) cccacactcctatggtcacagacttctggcctaggaccctcgcttcaggagaatctac acgcatgatggagctgatccagttaacctcgga							

▶ **Common Assay (共通アッセイ)**

共通アッセイ(Common Assay)モードでは、ProbeFinder ソフトウェアは、候補として検索された入力された対象に対するすべてのアッセイについて検証し、目的領域のみを増幅するアッセイを 1 つだけ特定します。

この“共通アッセイ(Common Assay)”は特に目的遺伝子ファミリーなどをすべてターゲットとしたい場合に便利な機能です(例;特定のスプライシングバリエーションのみでなくすべてをターゲットとしたい場合)。このオプションを選択すると、ProbeFinder ソフトウェアは入力された遺伝子配列すべてを増幅・検出するような 1 つの UPL プローブとプライマーのペアを検索します。

このアッセイの検索結果は個々の検索結果や区別アッセイ(Differentiating Assay)と異なるカラーで画面に表示されます。

ProbeFinder has designed real-time PCR assays that are **common** for the 2 genes :

[NM_002751.5](#) Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 11 (MAPK11), transcript variant 1, mRNA.
[NM_138993.2](#) Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 11 (MAPK11), transcript variant 2, mRNA.

Use Universal ProbeLibrary probe: #1(cat.no.04684974001)
(Formerly Exiqon ProbeLibrary Probe: Human#01)

Input	Probe ID	Primer	Length	Position	Tm	% GC	Sequence
NM_002751.5	#1 cat.no. 04684974001	Left	21	647 - 667	59	38	tggatgcattacaaccaaca
		Right	21	731 - 751	59	52	ctggtcaatgtagtcgcttcc
Amplicon (105 nt) tggatgcattacaaccaaacagtggatctctggtccgctggctgcatcatggctgagctg ctccagggcaaggccctcttcccgggaagcgactacattgaccag							

⑦ アッセイの候補が決まったら

アッセイの候補が決まったら、オリゴ合成会社へプライマーをご注文ください。
プライマーが届いたら、使用する UPL プローブをセットから用意し、リアルタイム PCR アッセイの準備をします。

下記のマスターミックス(試薬キット)を使用すると、より良い結果を得ることができます。

リアルタイム PCR 機器	推奨マスターミックス(試薬キット)	リファレンス色素	備考
LightCycler® 480	LightCycler® 480 Probes Master	必要なし	
LightCycler® 2.0(DX400)	LightCycler® TaqMan Master	必要なし	
LightCycler® 1.5(ST300) およびそれ以前のキャピラ タイプ ^o の機器	LightCycler® TaqMan Master	必要なし	注意: UPL リファレンスアッセイセッ ト(LightCycler® Yellow 555 でラベルされたもの)はデュ アルカラー検出ができません。
リファレンス色素を必要と する他社の機器(例;ABI 社、StrataGene 社)	FastStart Universal Probe Master (ROX)	左記試薬に含ま れます	
リファレンス色素を必要と しない他社の機器(例;バ イオラッド、タカラ)	FastStart TaqMan® Probe Master		別売りの ROX リファレンス色 素を加えて使用することも可 能です。

キャリーオーバーコンタミネーション防止用試薬(オプション/上記試薬に添加して使用します)

- LightCycler® Uracil-DNA Glycosylase
- Uracil-DNA Glycosylase, heat-labile

製品についての詳細は、オーダー情報の章を参照ください。

各試薬を用いた反応液の調製方法は、Universal ProbeLibrary 各製品の使用説明書をご参照ください。

用語解説

Assay Design Center (アッセイ・デザイン・センター)

Assay Design Center (www.universalprobelibrary.com) は、イントロンを介在したアッセイのデザインができる ProbeFinder ソフトウェアから成るアクセス無料のサイトです。ProbeFinder ソフトウェアでは、スプライスバリエーションや遺伝子転写産物のファミリーを考慮してデザインすることもできます。遺伝子 ID や配列を、ProbeFinder ソフトウェアへ入力するだけで、遺伝子特異的なアッセイをデザインすることができます。各アッセイは、UPL プローブと最適なプライマーペアを組み合わせて行われます。

ProbeFinder ソフトウェアは、可能な限り特異的なアッセイのデザインを行うために、いくつかの機能を有しています。その機能とは、プライマーデザインの最適化、*in silico* PCR、イントロンの予測、イントロンを介在したアッセイを優先的にデザインすることです。ProbeFinder ソフトウェアによるアッセイデザインの計算上の成功率は、約 96% です。

Coverage (カバー率)

Coverage (カバー率) は、与えられたデータベース内において、少なくとも1つの UPL プローブがハイブリダイズできる遺伝子転写産物の数の確率を表しています。

UPL プローブセットは、トランスクリプトームに特異的なように注意深くプローブが選出されているので、トランスクリプトームへのカバー率はとて高くなっています。しかしながら、正確なカバー率は、UPL プローブセットごとに異なります。例えば、Human のトランスクリプトームにおいて、転写産物の 99% は、Human の UPL セット内の少なくとも1つのプローブがハイブリダイズすることができます。また、データベース ([Ensembl](#)、[RefSeq](#)、[EMBL](#)) は、さまざまなゲノム配列と完全に一致しているわけではないため、カバー率は、使用されたデータベースによっても異なります。例えば、Human UPL セット内の各プローブでは、RefSeqHum データベースに登録されている約 7,000 の転写産物をターゲットとしているので、約 99% のトランスクリプトームをカバーしているということになります。また、Ensembl データベース内の 99% の mRNA は、イントロンを介在したアッセイ (intron-spanning assay) をカバーしています。

計算上、各 UPL プローブセットは、各トランスクリプトーム全般をカバーし、各生物種 ([Organism](#)) ごとに、ほぼすべての転写産物のデザインを行うことができます。

EMBL Sequence Identifier

EMBL Nucleotide Sequence Database (EMBL-GeneBank; <http://www.ebi.ac.uk/embl/>) は、EBI によって管理されている、International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSD) というヨーロッパのデータベースです。データベース内のすべての情報は、NCBI GenBank (北アメリカ) および DNA Database of Japan (DDBJ・日本) と同調しています。この3つのグループは、世界中から報告される配列情報から新しい情報を登録し、データベース間で交換を行っています。

EMBL-Bank の DNA や RNA 配列の主な情報源は、個々の研究者やゲノムシーケンスプロジェクト、特許出願者による直接の登録です。そのため、EMBL-Bank は、非常に高いリダンダンシーを持つデータベースです。

検索時間を短くするために ProbeFinder ソフトウェアでは、EMBL データベースの情報の一部の、関連の生物種において、注釈がつけられた、100~20,000nt の長さの情報のみを検索します。

Ensembl Sequence Identifier

Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) は、EMBL-EBI と Sanger センターの共同プロジェクトです。

これは、ヒトゲノムのすべての配列断片を、自動的に記録し、それらを大きな1つの断片へアセンブルし、そのアセンブルされた DNA からバイオ研究者や医学研究者の研究対象となるような、遺伝子や他の機能を発見するというシステムです。

他のデータベース (RrefSeq や EMBL) と異なり、Ensembl に登録されている転写産物には、Ensembl によって予測されたエクソン-エクソン・スプライスサイトの情報があります。Ensembl のイントロン/エクソンの予測方法は、EMBL に登録された cDNA と同様に、UniProt/Swiss-Prot や UniProt/TrEMBL、NCBI RefSeq の実験データに基づいた方法に基づいています。

Ensembl のデータベースはイントロン情報を含んでいるため、Ensembl ID は ProbeFinder ソフトウェアに入力するのに最も適したフォーマットです。Ensembl ID が入力されると、ProbeFinder ソフトウェアは、Ensembl データベースのイントロン/エクソンの位置情報を使用して、イントロンを介在したアッセイをデザインします。

FASTA

FASTA は、多くの配列アライメントとホモロジー検索プログラムで使用されている、とても有名なファイルフォーマットです。FASTA フォーマットの配列では、最初の一行目に説明書きがあり、その後ろに配列データが続いています。説明書きの行は、配列データの行と ">" 記号で区切られています。配列は、IUB/IUPAC 規格の塩基配列記号でのみ構成されていなければなりません。小文字は受け入れられます (しかし、データベースソフトウェアにインポートする際に大文字に変換されます)。

```
>AB000263 |acc=AB000263|descr=Homo sapiens mRNA for prepro cortistatin like peptide,
complete cds.|len=368
ACAAGATGCCATTGTCCCCCGGCCTCCTGCTGCTGCTGCTCTCCGGGGCCACGGCCACCGCTGCCCTGCC
CCTGGAGGGTGGCCCCACCGGCCGAGACAGCAGCATATGCAGGAAGCGGCAGGAATAAGGAAAAGCAGC
CTCCTGACTTTCTCGCTTGGTGGTTTGGTGGACCTCCCAGGCCAGTGCCGGGGCCCTCATAGGAGAGG
AAGCTCGGGAGGTGGCCAGCGGCAGGAAGGCGCACCCCCCAGCAATCCGCGCGCCGGGACAGAATGCC
CTGCAGGAACCTTCTTCTGGAAGACCTTCTCCTCCTGCAAATAAACCTCACCCATGAATGCTCACGCAAG
TTTAATTACAGACCTGAA
```

In silico PCR

(*In silico* : コンピュータシミュレーションの意味) ProbeFinder ソフトウェア (Primer3 を用いている) でデザインされたすべてのプライマーペアは、独自に開発された、*in silico* PCR アルゴリズムでチェックされます。そのアルゴリズムでは、関連のゲノムとトランスクリプトームを検索して、プライマーのミスプライミングサイトを可能な限り検索します。非特異産物を生じる可能性のあるミスプライミングサイトが見つかった場合、これらのプライマーのランクは下がり、*in silico* PCR チェックが失敗したというフラグが表示されます。介在するイントロンが短い (0.5kb 以下) 場合も、同様にランクが下がります。*in silico* PCR チェックは、アッセイがターゲット特異的なものかを完全に保障するものではありませんが、問題が起こる可能性を排除するという、1 つのフィルターにはなりません。

● **ゲノムと反応してしまう主な理由は、偽遺伝子 (pseudo gene) です。** 偽遺伝子は、ゲノムの非転写領域に存在し、転写されスプライスされたターゲット mRNA の配列と相同性を有しています。また、非常に短い、または誤った予測によるイントロン情報に基づいてデザインをされた場合もゲノムと反応してしまう原因になります。多くのコピー数のゲノムと反応してしまう場合は、ゲノム DNA の混入を防ぐレベルが低い可能性があります。しかし、十分に精製された RNA のみを使用したイントロンを介在したアッセイ (intron-spanning assay) でも多少のゲノムを検出してしまいう場合がありますが、結果に影響するほどではありません。

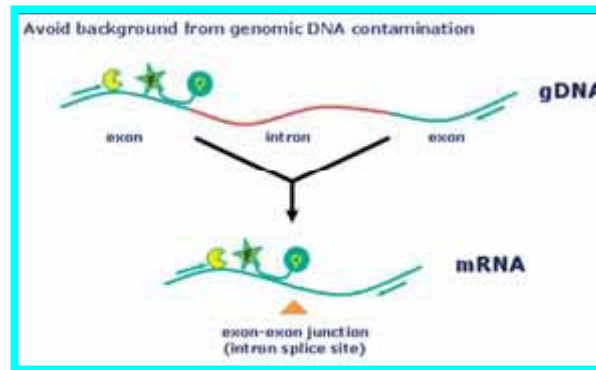
● **トランスクリプトームと反応する主な原因は、入力した遺伝子と似た遺伝子や、その遺伝子ファミリー内のスプライスバリエーションであることが、主な原因です。** ほとんどのスプライスバリエーションは、組織や発生ステージにおいて特異的です。それゆえに、同じファミリーの少ない数のトランスクリプトームと反応している場合でも、必ずしもそのアッセイを破棄してしまう必要はありません。

in silico PCR の特徴をまとめると以下ようになります

- RNA サンプル中に存在するゲノム DNA 由来のシグナルを検出するリスクを最小限にする。
- スプライスバリエーションや相同配列をもつ遺伝子ファミリーによる、ターゲットと関係のない転写産物由来のシグナルのリスクを最小限にする。
- 偽遺伝子の検出を防ぐ。
- ターゲットの検出に影響する短すぎるイントロンを介在したアッセイを防ぐ。

Intron-Spanning Assay (イントロンを介在したアッセイ)

cDNA を増幅することを目的としたリアルタイム PCR アッセイをデザインする場合、イントロンを介在するようにアンプリコンをデザインすると、混入したゲノム DNA 由来の偽陽性シグナルを検出してしまう可能性が低くなります。イントロンを介在したアッセイの場合、ゲノム DNA 由来のアンプリコンは、目的とする cDNA 由来の増幅産物よりもはるかに長くなるため、ゲノム DNA 由来のアンプリコンの生成を防ぐことができます。



混入したゲノムDNA由来のバックグラウンドの防止

デフォルト設定では、入力された配列は mRNA と見なされ、イントロンを介在したアッセイのデザインが試みられます。ソフトウェアは、次の 3 つの方法で入力された配列のイントロンの位置情報を得ます。

- Ensembl ID を入力した場合、Ensembl データベース上のイントロン/エクソンの位置情報が使用されます。
- 他の配列 ID (RefSeq や EMBL) や、配列そのものをペーストして入力した場合、独自に開発されたアルゴリズムによってイントロンを予測します。

イントロン予測アルゴリズムでは、入力された配列が mRNA であると想定して、関連のゲノムに対して BLAST 検索を行います。入力された配列は、その配列がゲノム上で発見された配列と相溶性が高く (95% 以上)、40 塩基以上の長さがある場合、エクソンとみなされます。ゲノム上で、2 つのフランキングエクソンを持ち、30 塩基以上の長さがある場合、イントロンとみなされます。ゲノム配列中に 1 つしかフランキングエクソンが見つからなかった場合は、イントロンが 200 塩基以上の長さで、エクソンが 100 塩基以上で、入力された配列と 100% 一致する場合にのみ、その領域が受け入れられます。最後に、5' と 3' のスプライスサイト (GT と AG) とコンセンサスを取り、イントロンサイトが補正されます。

- エクソン-エクソンのジャンクションの位置が正確に分かっている場合、入力した配列に角括弧 [] を直接入力することで指定することができます。

(例)

```
CACGGCATCGTCACCAACTGGGACGACATGGAGAAAATCTGGCACCCACACCTTCTACAAT  
GAGCTGCGTGTGGCTCCCGAGGAGCACCCCGTGCTGCTGACCGAGGCCCCCTGAACCCC  
AAGGCCAACCGCGAGAAGATGACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCAGCCATG  
TACGTTGCTATCCAGGCTGT[GCTATCCCTGTACGCCTCTGGCCG]TACCACTGGCATCG  
TGATGGACTCCGGTGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTACGAGGGGTATGCCCTCC
```

IUPAC

International Union of Pure and Applied Chemistry (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/naabb.html>、一文字記号の説明がある)のこと。

Organism (生物種)

生物種特異的な UPL セットは、現在、ヒト (Human)、マウス (Mouse)、ラット (Rat) の 3 種類があります。ソフトウェアのデータベース検索対応生物種は、これらに加えて霊長類 (Primates)、ショウジョウバエ (Drosophila)、ゼブラフィッシュ (Zebrafish)、線虫 (C.elegans)、シロイヌナズナ (Arabidopsis)、コメ (Rice)、トウモロコシ (Maize)、酵母 (Yeast) の全 11 種類です。対象となる生物種が選択肢にない場合でも、ProbeFinder ソフトウェアを使用することができます。このような場合は その他の生物 (Other Organism) を選択してください。つまり、どのような生物種であっても (自然界に存在しないものであっても)、プローブの結合サイトがあり、プライマーのデザインの余地があれば、アッセイのデザインをすることが可能です。“By sequence” のウィンドウ内に、手動で配列をペーストするだけの簡単操作です。

選択した生物種以外の生物種の配列をペーストした場合、ソフトウェアは、“間違った” ゲノムデータベースを使用することに注意ください (例: ターゲットにしたい生物種以外の生物種の場合など)。その場合、通常の検索で使用できる ProbeFinder ソフトウェアの機能の一部を使用できなくなります (例: ProbeFinder ソフトウェアによるイントロン-エクソンのジャンクション位置の予測機能など)。その場合は、配列入力画面の下部にある、“Automatically select an intron spanning assay” のチェックボックスのチェックを外してください。また、結果画面で、“All assays” をクリックしないと、結果が表示されないことがあります。セットにない生物種のデザインを行う場合は、検索する生物種がデータベースの生物種と一致するような通常の検索を行う場合よりもより注意が必要です。

PCR プライマー

ProbeFinder ソフトウェアでは、各 UPL プローブがターゲットとする、入力された配列が増幅されるのに最適な PCR プライマーのペアがデザインされます。プローブとプライマーを組み合わせることで、配列に特異的なリアルタイム PCR アッセイを行うことができます。プライマーは UPL セットに含まれていないので、別途オリゴ合成会社へオーダーする必要があります。プライマーの配列は、ProbeFinder ソフトウェアの結果画面から直接コピーし、オリゴ合成会社のオンラインオーダーの画面に直接ペーストすることができます。

ProbeFinder ソフトウェアは、プライマーをデザインするために Whitehead Institute for Biomedical Research の Primer3 というアルゴリズムを使用しています。ProbeFinder ソフトウェアでの Primer3 の設定は、UPL プローブを使用するためのリアルタイム PCR アッセイに最適な設定になっています。上級のユーザーは Primer3 の設定 (下図参照) を変更し、“Update” をクリックして適用することもできます。よりよい結果を得るために、デフォルト設定のまま使用することを推奨します。

Primer3 の設定値

項目	デフォルト値	説明
PRIMER_MIN_SIZE	18	プライマーの最小、最適、最大の長さ (塩基) の設定。 MIN 以上、MAX 以下で、OPT に近い長さでデザインされます。 MIN は、1 よりも小さくすることはできず、MAX は 36 よりも長くすることはできません。 (この設定は、計算される T _m 値が妥当な最大のオリゴを意味しています)。
PRIMER_MAX_SIZE	27	
PRIMER_OPT_SIZE	20	
PRIMER_MIN_TM	59	プライマーの最低、最適、最高の T _m 値 (°C) の設定。 MIN 以上、MAX 以下の T _m 値で、OPT に近い T _m 値でデザインされます。 Primer3 では、T _m 値の計算には、Rychlik, Spencer and Rhoads, Nucleic Acids Research, 18: 6409-6412; および Breslauer, Frank, Bloeker and Marky, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 3746-3750 を用いています。 公式についての詳細は、上記の参考文献を参照してください。
PRIMER_MAX_TM	61	
PRIMER_OPT_TM	60	

PRIMER_SELF_ANY	8.00	<p>1つのプライマーにおける自己相補性チェックのローカルアラインメントの最大許容スコア、および左右のプライマーにおける相補性チェックのアラインメントの最大許容スコア。</p> <p>PCR中に自己プライミングを起こさないように、プライマー同士のアニーリングの傾向を予測する自己相補性チェックを行いデザインされます。</p> <p>スコアリングシステムでは、相補的な塩基の場合は、1.00。N-Nの場合は-0.25。ミスマッチの場合は-1.00。ギャップの場合は-2.00として、算出されます。</p> <p>1塩基のみのギャップは受け入れられます。例として、</p> <pre> 5' ATCGNA 3' 3' TA -CGT 5' </pre> <p>は、受け入れられ(得られるスコアは 1.75) ますが、</p> <pre> 5' ATCCGNA 3' 3' TA—CGT 5' </pre> <p>は、受け入れられません。</p> <p>スコアは、マイナスになることはなく、0.00の場合、2つのオリゴの間でアラインメントが取れないということを意味します。</p>
PRIMER_SELF_END	3.00	<p>1つのプライマーにおける3'末端の自己相補性チェックのアラインメントの最大許容スコア、および左右のプライマーにおける相補性チェックのアラインメントの最大許容スコア。</p> <p>PCR中にプライマーダイマーを形成しないように予測し、3'末端のグローバルアラインメントの相補チェックを行いデザインされます。たとえば、</p> <pre> 5' ATGCCCTAGCTTCCGGATG 3' 3' AAGTCCTACATTTAGCCTAGT 5' </pre> <p>または、</p> <pre> 5' AGGCTATGGGCCTCGCGA 3' 3' AGCGCTCCGGGTATCGGA 5' </pre> <p>スコアリングシステムは、最大許容スコアの計算と同じ方法でチェックが行われます。</p> <p>上記の例では、スコアはそれぞれ7.00と6.00となります。</p> <p>スコア上は、ネガティブではないですが、2つのオリゴ間での3'末端のグローバルアラインメントが適していないため、スコアは、0.00とみなされます。</p> <p>候補のプライマーの3'末端のグローバルアラインメントを計算するために、入力された配列は5'→3'とみなされます。</p> <p>ローカルスコアは、グローバルスコアよりも同じか大きいので、このパラメータに、最大許容スコアよりも大きな値を入力しても意味がありません。</p>
PRIMER_GC_CLAM	0	<p>左右のプライマーの3'末端に指定数以上の連続したGやCを結果に求めます。</p>

RefSeq Sequence ID

Reference Sequence (RefSeq; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>) は、一部分 GenBank で登録され維持されている、NCBI の提供するデータベースです。GenBank は、すべての配列のアーカイブの蓄積場所であるのに対し、RefSeq データベースは、重複のないリファレンススタンダードのセットで、染色体、コンプリートゲノム（オルガネラゲノム、ウイルス、プラスミド）、アセンブルされたコンティグ中間体、キュレート (curate) されたゲノム領域、mRNA、RNA、タンパクが登録されています。ProbeFinder ソフトウェアは、その関連している生物種について mRNA としてアノテートされ、登録された情報のみの RefSeq のデータベースを使用します。RefSeq に登録されている遺伝子名（例: ACTB）は、ProbeFinder ソフトウェアへ入力することができます。入力された遺伝子名が曖昧な場合、ソフトウェアは、データベースとマッチするリストを表示します。

Sequence ID

入力された配列を検索するために使用する、Ensembl や EMBL のデータベースの配列番号。

(例: ENST00000158302, NM_001101, AB062273 など)

Publications List - 文献リスト

Zhihua Xie, Susan Westmoreland, Mary E Bahn, Guo-Lin Chen, Hong Yang, Eric Vallender, Wei-Dong Yao, Bertha K Madras, and Gregory M. Miller (2007). Rhesus monkey trace amine-associated receptor 1 signaling: enhancement by monoamine transporters and attenuation by the D2 autoreceptor *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther.* 321(1):116-27.

Christoph Leucht and Laure Bally-Cuif (2007). The Universal ProbeLibrary – A versatile Tool for Quantitative Expression Analysis in the Zebrafish. *Biochemica.2*, 16-16

Ina Horst and Christoph Peterhänsel (2007). Quantification of Zea mays mRNAs by Real-Time PCR Using the Universal ProbeLibrary. *Biochemica 1*, 8-10

Li-Hui Wang, Seok-Hyung Kim, Jung Hyun Lee, Yoon-La Choi, Young Chul Kim, Tae Sung Park, Yun-Chul Hong, Chun-Fu Wu and Young Kee Shin (2007). Inactivation of SMAD4 Tumor Suppressor Gene During Gastric Carcinoma Progression. *Clinical Cancer Research 13*: 102-110

Nien-Yi Lin, Chung-Tien Lin, Yu-Ling Chen, Ching-Jin Chang (2007). Regulation of tristetraprolin during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *FEBS Journal 274 (3)*, 867-878

Maldonado-Saldivia J, van den Bergen J, Krouskos M, Gilchrist M, Lee C, Li R, Sinclair AH, Surani MA, Western PS (2007). Dppa2 and Dppa4 are closely linked SAP motif genes restricted to pluripotent cells and the germ line. *Stem Cells 25*: 19-28

Aguilar-Martínez JA, Poza-Carrión C, Cubas P. Arabidopsis BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds. *Plant Cell. (2007) ;19(2):458-72.*

Kimberly Johung, Edward C. Goodwin, and Daniel DiMaio (2007). Human Papillomavirus E7 Repression in Cervical Carcinoma Cells Initiates a Transcriptional Cascade Driven by the Retinoblastoma Family, Resulting in Senescence. *Journal of Virology 81, No. 5*, 2102-2116

Seyed H. Hosseini, James J. Kohler, Chad P. Haase, Nina Tioleco, Tami Stuart, Erin Keebaugh, Tomika Ludaway, Rodney Russ, Elgin Green, Robert Long, Liya Wang, Staffan Eriksson and William Lewis (2007). Targeted Transgenic Over-expression of Mitochondrial Thymidine Kinase (TK2) Alters Mitochondrial DNA (mtDNA) and Mitochondrial Polypeptide Abundance. *American Journal of Pathology 170:865-874.*

Rong-Mei Wu, Marion Wood, Anthony Thrush, Eric F. Walton, and Erika Varkonyi-Gasic (2007). Real-time PCR quantification of plant miRNAs using Universal ProbeLibrary technology. *Biochemica 2*, 12-15

Esther Carrera, Tara Holman, Anne Medhurst, Wendy Peer, Heike Schmutz, Steven Footitt, Frederica L. Theodoulou, and Michael J. Holdsworth (2007). Gene Expression Profiling Reveals Defined Functions of the ATP-Binding Cassette Transporter COMATOSE Late in Phase II of Germination. *Plant Physiol.* 143(4): 1669–1679.

M. Julieta Del Prete, Rolando Vernal, Helmut Dolznig, Ernst W. Müllner, and Jose A. Garcia-Sanz (2007). Isolation of polysome-bound mRNA from solid tissues amenable for RT-PCR and profiling experiments. *RNA* 13: 414–421.

Sahin O, Löbke C, Korf U, Appelhans H, Sülthmann H, Poustka A, Wiemann S, Artl D (2007). Combinatorial RNAi for quantitative protein network analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(16):6579–84.

Kuo, W.P., et. al. (2006). A sequence-oriented comparison of gene expression measurements across different hybridization-based technologies. *Nature Biotechnology* 24 (7): 832–840.

Ulrike Bichelmeier, Thorsten Schmidt, Jeannette Hübener, Jana Boy, Lukas Rüttiger, Karina Häbig, Sven Poths, Michael Bonin, Marlies Knipper, Werner J. Schmidt, Johannes Wilbertz, Hartwig Wolburg, Franco Laccone, and Olaf Riess. Nuclear Localization of Ataxin-3 Is Required for the Manifestation of Symptoms in SCA3: *In Vivo* Evidence *The Journal of Neuroscience* (2007) 27(28), 7418 –7428

Nabanita Nag, Katherine Peterson, Keith Wyatt, Sonja Hess, Sugata Ray, Jack Favor, Debora Bogani, Mary Lyon, and Graeme Wistow. Endogenous retroviral insertion in Cryge in the mouse No3 cataract mutant *Genomics* (2007) 89, 512–520.

Liping Qiao, Paul S. MacLean, Hanning You, Jerome Schaack, and Jianhua Shao
Knocking Down Liver CCAAT/Enhancer-Binding Protein alpha by Adenovirus-Transduced Silent Interfering Ribonucleic Acid Improves Hepatic Gluconeogenesis and Lipid Homeostasis in db/db Mice. *Endocrinology* (2006) 147(6), 3060–3069.

Annemiek Beverdam and Peter Koopman (2006). Expression profiling of purified mouse gonadal somatic cells during the critical time window of sex determination reveals novel candidate genes for human sexual dysgenesis syndromes. *Human Molecular Genetics* 15(3):417–431.

Jalila Chagraoui, Sherry L. Niessen, Julie Lessard, Simon Girard, Philippe Coulombe, Martin Sauvageau, Sylvain Meloche and Guy Sauvageau (2007). E4F1: a novel candidate factor for mediating BMI1 function in primitive hematopoietic cells. *Genes & Dev.* 20: 2110–2120.

Amy K. Jassen, Hong Yang, Gregory M. Miller, Elizabeth Calder, and Bertha K. Madras (2006). Receptor Regulation of Gene Expression of Axon Guidance Molecules: Implications for Adaptation. *Mol Pharmacol.* 70(1):71–7.

Lind K, Ståhlberg A, Zoric N, Kubista M.(2006). Combining sequence-specific probes and DNA binding dyes in real-time PCR for specific nucleic acid quantification and melting curve analysis. *Biotechniques* 40(3): 315-9

Guccione, E., Martinato, F., Finocchiaro, G., Luzi, L., Tizzoni, L., Dall' Olio, V., Zardo, G., Bernard, L., Amati, B. (2006). Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nature Cell Biology* 8(7): 764-70

Ann M. O'Hara, Padraig O'Regan, Áine Fanning, Caitlin O'Mahony, John MacSharry, Anne Lyons, John Bienenstock, Liam O'Mahony, and Fergus Shanahan
Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*.
Immunology (2006) 118(2), 202-215

Rein, R.S., Mauritz, R.P. and Geyer M. (2006). Universal ProbelLibrary: a new concept for streamlining gene expression analysis with qPCR. *Nature Methods Application Notes*

Onno Bakker (2006). Comparison of qPCR Assays Using the LightCycler® 2.0 Instrument and either SYBR Green I Intercalation or the Universal ProbelLibrary as Detection Format. *Biochemica* 3, 8-10.

Granado, M., Priego, T., Martin, A.I., Villanua, M.A., Lopez-Calderon, A.(2005). Ghrelin receptor agonist GHRP-2 prevents arthritis-induced increase in E3 ubiquitin-ligating enzymes MuRF1 and MAFbx gene expression in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 289(6).

Taranger, C.K., Agate Noer, Sørensen, A.L., Håkelién, AM., Boquest, A.C., Collas, P.(2005). Induction of Dedifferentiation, Genome-wide Transcriptional Programming and Epigenetic Reprogramming by Extracts of Carcinoma and Embryonic Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell* 16: 5719 - 5735.

Viola Gesellchen, David Kuttenkeuler, Michael Steckel, Nadège Pelte & Michael Boutros (2005). An RNA interference screen identifies Inhibitor of Apoptosis Protein 2 as a regulator of innate immune signalling in *Drosophila*. *EMBO Rep.* 6(10):979-84.

Kruhøffer, M, Jensen, J.L., Laiho, P., Dyrskjot, L., Salovaara, R., Arango, D., Birkenkamp-Demtroder, K., Sorensen, F.B., Christensen, L.L., Buhl, L., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Thykjaer, T., Wikman, F.P., Bech-Knudsen, F., Juhola, M., Nupponen, N.N., Laurberg, S., Andersen, C.L., Aaltonen, L.A., Ørntoft, T.F. (2005). Gene expression signatures for colorectal cancer microsatellite status and HNPCC. *Br J Cancer.* 20;92(12):2240-8.

Mouritzen, P., Noerholm, M., Nielsen, P.S., Jacobsen, N., Lomholt, C., Pfundheller H.M. and Tolstrup N.(2005). ProbelLibrary: A new method for faster design and execution of quantitative real-time PCR. *Nature Methods* 2: 313-17

Magnusson, N.E., Larsen, A., Rungby, J., Kruhøffer, M., Ørntoft, T.F., Stoltenberg, M.(2005). Gene expression changes induced by bismuth in a macrophage cell line. *Cell Tissue Res* 321: 195210.

Mauritz, R.P., Mouritzen, P., Pfundheller, H.M., Tolstrup, N., and Lomholt, C. (2005). Universal ProbeLibrary Set: One Transcriptome – One Kit. *Biochemica* 2, 22-24.

Effi Rees, Bianca Horeis, Nadja Gernold, Oliver Heil, and Bernhard Korn (2005). Gene Silencing Using esiRNA – Efficient, Robust and Not Influenced by Positional Effects. *Biochemica*.3, 26–29.

Michael Steckel and Michael Boutros (2005). Rapid Development of Real-Time RT-PCR Assays Using Universal ProbeLibrary: Applications for Dissecting Signaling Pathways by RNA Interference. *Biochemica* .3, 17–19.

Mouritzen, P., Nielsen, P.S, Jacobsen, N., Noerholm, M., Lomholt, C., Pfundheller, H.M., Ramsing, N.B., Kauppinen, S., and Tolstrup, N. (2004). The ProbeLibrary™ – Expression profiling 99% of all human genes using only 90 dual-labeled real-time PCR Probes. *Biotechniques* (2004) 37:492–495.

オーダー情報

製品名	製品番号	包装
Universal ProbeLibrary セット		
Universal ProbeLibrary Set, Human	4 683 633	各 90 種類のプローブ(10 μM) 各 625 回/20 μl 反応, 250 回/50 μl 反応)
Universal ProbeLibrary Set, Mouse	4 683 641	
Universal ProbeLibrary Set, Rat	4 683 650	
Universal ProbeLibrary Extension Set, Probes #91 - #165	4 869 877	#91-165 の 75 種類のプローブ Universal ProbeLibrary Set, Human と合わせると #1-165 の完全セットになります。
Universal ProbeLibrary Reference Gene Assay セット		
Universal ProbeLibrary Set, Human Reference Gene Assays	5 046 114	10 遺伝子のプライマーとプローブ 各遺伝子について 100 回/50 μl 反応 (250 回/20 μl 反応)
Human PBGD Gene Assay	5 046 149	各 1 遺伝子のプライマーとプローブ 200 回/50 μl 反応 (500 回/20 μl 反応)
Human HPRT Gene Assay	5 046 157	
Human ACTB Gene Assay	5 046 165	
Human PGK1 Gene Assay	5 046 173	
Human G6PD Gene Assay	5 046 246	
Human PPIA Gene Assay	5 189 268	
Human TBP Gene Assay	5 189 284	
Human B2M Gene Assay	5 189 390	
Human GUSB Gene Assay	5 190 525	
Human GAPD Gene Assay	5 190 541	
Mouse ACTB Gene Assay	5 046 190	
Mouse GAPD Gene Assay	5 046 211	
Rat ACTB Gene Assay	5 046 220	
Rat GAPD Gene Assay	5 046 203	
リアルタイム PCR 試薬		
LightCycler® TaqMan® Master	4 535 286	96 回反応
	4 735 536	480 回反応
LightCycler® 480 Probes Master	4 707 494	5 x 1 ml (約 500 回反応)
	4 887 301	10 x 5 ml (約 5,000 回反応)
	4 902 343	1 x 50 ml (約 5,000 回反応)
FastStart Universal Probe Master (Rox)	4 913 949	2 x 1.25ml (約 100 回反応)
	4 913 957	10 x 1.25ml (約 500 回反応)
	4 914 058	10 x 5 ml (約 2000 回反応)
	4 914 066	1 x 50 ml (約 2000 回反応)
FastStart TaqMan® Probe Master	4 673 409	2 x 1.25ml (約 100 回反応)
	4 673 417	10 x 1.25ml (約 500 回反応)
	4 673 433	10 x 5 ml (約 2000 回反応)
LightCycler® Uracil-DNA Glycosylase	3 539 806	100 U (50 μl)
Uracil-DNA Glycosylase, heat-labile	1 775 367	100 U
Rox Reference Dye	4 673 549	50 μl
リアルタイム PCR 機器		
LightCycler® 480 Instrument System II	5 015 278	96well
	5 015 243	384well
LightCycler 2.0 Instrument (DX400)	3 351 414	一式
LightCycler 1.5 Instrument (ST300)	4 484 495	一式

価格については、弊社オンラインカタログまたは弊社までお問合せください。

Disclaimer of License

A license to perform the patented 5' Nuclease Process for research is obtained by the purchase of (i) both Licensed Probe and Authorized 5' Nuclease Core Kit, (ii) a Licensed 5' Nuclease Kit, or (iii) license rights from Applied Biosystems.

This product contains Licensed Probe. Its purchase price includes a limited, non-transferable immunity from suit under U.S.

Patents Nos. 6,214,979 and 5,804,375 (claims 1-12 only) and corresponding patent claims outside the United States. The

purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using

only this amount of product for the purchaser's own internal research. The right to use this product in the 5' Nuclease

Process under the applicable claims of US Patents Nos. 5,210,015 and 5,487,972, and corresponding patent claims outside the

United States, can be obtained through purchase of an Authorized 5' Nuclease Core Kit. Except under separate license

rights available from Applied Biosystems, no right under any other patent claim, or to perform commercial services of any kind,

including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, or to

sublicense, repackage with other products, or resell in any form, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product

is for research use only. Diagnostic uses under Roche patents require a separate license from Roche. Further information on

purchasing licenses may be obtained from the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City,

California 94404, USA.

The technology used for the LightCycler® System is licensed from Idaho Technology Inc., Salt Lake City, UT, USA.

ProbeLibrary is covered by US and other patent applications owned by Exiqon A/S. Locked Nucleic Acids (LNA) are covered by

U.S. Patents No US 6,794,499, US 6,670,461, US 6,268,490 & US 6,770,748 and other patents and patent applications owned

by Exiqon A/S and Prof. Takeshi Imanishi. The quencher used in the probes is covered by patent applications owned by Exiqon

A/S.

Trademarks

LIGHTCYCLER, LC, FASTSTART, TAQMAN, MAGNA PURE, and HIGH PURE are trademarks of Roche.

PROBELIBRARY and LNA are registered trademarks of Exiqon A/S, Vedbaek, Denmark.

FAM, TAMRA, and ROX are trademarks of Applied Biosystems Corporation, Norwalk, CT, USA.

Other brand or product names are trademarks of their respective holders.

ロシュ・アプライドサイエンスでは、幅広い研究用試薬や機器をご提供しています。

関連製品のマニュアルや詳細については、ウェブサイトをご参考ください。

日本語ホームページ : <http://www.roche-biochem.jp>

Global ホームページ : www.roche-applied-science.com

- Universal ProbeLibrary については… <http://www.roche-biochem.jp/UPL>
- LightCycler システム (リアルタイム PCR) については… <http://www.roche-biochem.jp/sis/rtPCR/>
- MagNA Pure システム (自動核酸抽出機) については… <http://www.roche-biochem.jp/sis/automated/>
- PCR については… <http://www.roche-biochem.jp/sis/2010/07/post-8.html>
- DNA & RNA の抽出については… <http://www.roche-biochem.jp/products/2010/08/napi-1.html>



製品についてのお問合せは・・・



ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

AS 事業部

電話：03-5443-5287

FAX：03-5443-7098

メール：tokyo.as-support@roche.com

ホームページ・オンラインカタログ：

<http://www.roche-biochem.jp>