

Product Information

Extract-N-Amp™ Plant PCR Kits

製品番号 XNAP2、XNAP2E、XNAR

TECHNICAL BULLETIN(使用説明書)

製品概要

Extract-N-Amp™ Plant PCR Kitは植物の葉からのゲノムDNAの迅速抽出と増幅に必要なすべての試薬を揃えたキットです。プロセスの概要は次のとおりです。まず通常の紙用パンチで直径0.5~0.7 cmのディスク型に切り抜いた植物の葉組織片をExtraction Solutionに浸して95 °Cで10分間インキュベーションし、DNAを抽出します。葉組織の液体窒素による凍結や機械的な破碎、有機溶媒抽出、カラム精製、DNAの沈殿といった処理の必要はありません。抽出物に等量のDilution Solutionを加えて阻害性物質を中和した後は、この抽出物をそのままPCRに使用できます。希釈後の抽出物の一部をとって、Extract-N-Amp PCR Reaction Mix(本キットに付属します)および標的DNAを増幅する

PCRプライマーセット(お客様にてご用意ください)と混合します。

Extract-N-Amp PCR ReadyMix™ は2倍濃度のPCR反応混合液で、バッファー、塩、dNTPs、Taqポリメラーゼを含みます。この試薬は上記の抽出用試薬に対して最適化されています。この試薬は特異性の高いホットスタート用JumpStart™ Taq抗体を含みますが、REExtract-N-Amp PCR ReadyMixとは異なり、不活性の赤色色素は配合されていないため、赤色色素が影響するようなPCR産物検出方法にもご利用いただけます。

キットに含まれている試薬	製品番号	XNAP2 100回抽出、100回増幅	XNAP2E 100回抽出、500回増幅	XNAR 1,000回抽出、1,000回増幅
Extraction Solution	E7526	12 mL	12 mL	120 mL
Dilution Solution	D5688	12 mL	12 mL	120 mL
Extract-N-Amp PCR ReadyMix 2倍濃度のPCR反応混合液で、バッファー、塩、dNTPs、Taqポリメラーゼ、JumpStart Taq抗体を含みます。	E3004	1.2 mL	5 x 1.2 mL	12 mL
Collection Tubes, 2 mL	T7813	2×50個	2×50個	含まれていません

本製品以外にご用意いただく試薬および器具

- 紙用パンチ
- ピンセット(小~中型)
- 95 °Cのヒートブロックまたはウォーターバス
- PCRプライマー
- PCRグレードの水(製品番号 W1754)

注意事項と免責事項

Extract-N-Amp Plant PCR Kitは試験研究用製品です。医薬品、家庭用その他試験研究以外の用途には使用できません。危険性や安全な取り扱いに関しては化学物質安全データシート(MSDS)をご覧ください。

保存

Extraction Solution、Dilution Solution、Extract-N-Amp PCR ReadyMixは、2~8 °Cで短期間の保存が可能ですが、長期の保存には-20 °Cを推奨します。自動霜取り装置付きのフリーザーは使用しないでください。

手順

別途指示のない限り、すべてのステップは室温で実施します。

A. DNAの抽出

1. 使用前および異なるサンプルを扱う際には、紙用パンチおよびピンセットを70%エタノールですすぎます。

- 一般的な一穴紙用パンチを用いて、葉組織を直径0.5~0.7 cmのディスク型に1枚切り抜き、2 mL回収用チューブまたは適切な容器に入れます。冷凍した植物組織を使用する場合は、切り抜き作業の間、葉は氷上においてください。
- 100 μ LのExtraction Solutionをチューブに加え、フタを閉めて短時間ボルテックスします。ディスクが完全にExtraction Solutionに浸っていることを確認してください。
- 95 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベーションします。この処理後も葉組織は分解されたようには見えないことが普通です。
- 100 μ LのDilution Solutionを加え、ボルテックスして混合します。
- 希釈後の葉抽出物は2~8 $^{\circ}$ Cで保存します。保存前に葉のディスクを取り除く必要はありません。

B. PCR増幅

Extract-N-Amp PCR ReadyMixには特異性の高いホットスタート増幅を行うためのJumpStart Taq抗体が含まれています。そのため、室温でTaq DNAポリメラーゼ活性が作用することなくPCR反応混合物を調製することができます。

プライマーの一般的な最終濃度はそれぞれ約0.4 μ Mです。最適なプライマー濃度およびサーマルサイクルの条件はお使いのシステムによって異なります。

- PCR用のマイクロ遠心チューブまたはプレートに下記の試薬を加えます。

試薬	液量
水(PCRグレード)	x μ L
Extract-N-Amp PCR reaction mix	10 μ L
フォワードプライマー	y μ L
リバースプライマー	y μ L
葉ディスク抽出物	4 μ L*
合計	20 μ L

*注: Extract-N-Amp PCR ReadyMixは、Extraction SolutionおよびDilution Solutionの成分を補うように調製されています。PCR反応混合物に加える葉抽出物の量が4 μ L未満の場合は、Extraction SolutionとDilution Solutionの1:1混合液を加えて葉抽出物の液量を4 μ Lに調節してください。

- 静かに混合してから短時間遠心分離して内容物をチューブの底に集めます。
- サーマルサイクラー内にフタがない場合は20 μ Lのミネラルオイルを各チューブに重層して蒸発を防ぎます。
- 増幅条件はそれぞれのプライマー、鋳型、サーマルサイクラーに合わせて最適化してください。

一般的なサイクルの条件

ステップ	温度	時間	サイクル数
1回目の変性	94 $^{\circ}$ C	3分	1
変性	94 $^{\circ}$ C	0.5~1分	30~35
アニーリング	45~68 $^{\circ}$ C	0.5~1分	
伸長	72 $^{\circ}$ C	1~2分 (約1 kb/分)	
最後の伸長	72 $^{\circ}$ C	10分	1
保持	4 $^{\circ}$ C	無期限	

参考文献

- Dieffenbach, C. W. and Dveksler, G. S. (Eds.) *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1995). (製品番号 Z701270)
- Don, R. H. et al. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 4008 (1991)
- Erich, H. A. (Ed.) *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification* (Stockton Press, New York, 1989). (製品番号 P3551製造中止)
- Griffin, H. G. and Griffin, A. M. (Eds.) *PCR Technology: Current Innovations*, (CRC Press, Boca Raton, FL, 1994)(製品番号 Z704318)
- Innis, M.A., et al. (Eds.) *PCR Strategies* (Academic Press, New York, 1995)(製品番号 Z36,445-2)
- Innis, M., et al. (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, San Diego, California, 1990)(製品番号 P8177)
- McPherson, M.J. et al. (Eds.) *PCR 2: A Practical Approach* (IRL Press, New York, 1995)(製品番号 Z36,238-7製造中止)
- Newton, C.R. (Ed.) *PCR: Essential Data*, (John Wiley & Sons, New York, 1995)(製品番号 Z36,491-6)
- Roux, K.H. Optimization and troubleshooting in PCR. *PCR Methods Appl.*, **4**, 5185-5194 (1995).
- Saiki, R., *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification* (Stockton, New York, 1989)

トラブルシューティングガイド

問題	原因	対策
PCR産物が少ない、または検出されない	植物抽出物中の夾雑物によってPCR反応が阻害されている	Extraction SolutionとDilution Solutionの1:1混合物で植物抽出物を希釈してください。阻害が起きているかどうかを調べるには、DNAコントロールを使用したり、植物抽出物とともに既知量の鋳型(100~500コピー)をPCR反応液に添加したりしてください。
	PCR成分が欠けている、または劣化している	ポジティブコントロールをおいて、各成分が正しく機能していることを確認してください。反応混合物を調製する際はチェックリストの使用をお勧めします。
	サイクル数が少なすぎる	サイクル数を増やしてください(1回につき5~10サイクル追加)。
	アニーリング温度が高すぎる	アニーリング温度を2~4 °C刻みで下げてください。
	プライマーの設計が最適でない	配列情報が正確かどうか確認してください。プライマー長が22ヌクレオチド未満の場合は、25~30ヌクレオチドとなるよう設計し直してみてください。プライマーのGC含量が45%未満の場合は、GC含量が45~60%となるように設計し直してみてください。
	変性温度が高すぎる(または低すぎる)	変性温度を1 °C刻みで上昇(または低下)させて最適化してください。
	変性時間が長すぎる(または短すぎる)	変性時間を10秒刻みで延長(または短縮)して最適化してください。
	伸長時間が短すぎる	特に鋳型が長い場合は、伸長時間を1分刻みで延長してみてください。
	標的の鋳型が増幅されにくい	多くの場合、もともと増幅されにくい標的というものは、著しく高いGC含量と二次構造の一方または両方が原因です。高GC含量の鋳型に1.0~1.7 Mのベタイン(製品番号 B0300)を添加すると増幅が改善されることが報告されています。
	複数の産物が認められる	JumpStart Taq抗体が正しく作用していない
タッチダウンPCRが必要である		「タッチダウン」PCR法は、さまざまな用途で多くのPCR反応の特異性を有意に向上させます。タッチダウンPCRでは、初期のPCRサイクルの間、プライマーの T_m よりも高いアニーリング/伸長温度を使用します。その後、アニーリング/伸長温度をプライマーの T_m まで下げて残りのPCRサイクルを行います。温度の切替は1回のステップで行うことも、数回のサイクルに分けて行うことも可能です。
コンタミネーション	試薬がコンタミしている	Sigmaでは、抽出またはPCRに使用した試薬が以前の反応で使用した鋳型で汚染されていないかどうかを調べるために、鋳型DNAを加えない試薬だけのブランクをPCRの実施ごとにコントロールとして使用することを推奨しています。

関連製品 製品番号

PCR用チューブ Z37,487-3、Z37,496-2、Z37,488-1
Thermowell PCR Plate CLS6551
96ウェルプレート用シールマット(再利用可能) 製品番号
CLS6555
PCRマーカー P9577
プレキャストアガロースゲル P5597(製造中止)、P5847
(製造中止)、P6097
TBEバッファー T4415、T6400、T9525
エタノール E7148、E7023、45,983-6

ご購入者へのお知らせ:制限つき使用許諾

Roche Molecular Systems, Inc.およびF. Hoffmann-La Roche Ltd(以下「Roche」)が保有する米国特許4,683,202、4,683,195、4,965,188、5,075,216、およびこれらに対応する外国特許の使用許諾権には、前払い方式の要素とランニング・ロイヤリティー方式の要素とがあります。本製品の購入対価には、本製品を前払い方式の要素の対象であるサーマルサイクラーと組み合わせて使用する場合に、ポリメラーゼ連鎖反応(以下「PCR」)および上記の特許に記載された類似プロセスを、購入者がもっぱら研究開発目的で実施するためだけに本製品を使用することに関する、ランニング・ロイヤリティー方式の要素の対象である限定された譲渡不可能な権利の料金が含まれています。本製品をPCRプロセスで使用するための完全な使用許諾権を保有するには、エンドユーザーが前払い方式の要素の対象である権利を取得しなければなりません。そのような前払い方式の要素の対象である権利は、Applied Biosystemsから購入するか、または認可されたサーマルサイクラーを購入することで取得できます。本文書によって、料金またはその他の商業的報酬のために行われる購入者の行為の結果を報告することなどを含む、PCRを利用したいかなる種類の商業的サービスも実施または提供する権利が含意または禁反言によって許諾されることはありません。PCRプロセス実施のための使用許諾権の購入に関する詳しい情報については、Applied Biosystemsのライセンス部門(850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404)、またはRoche Molecular Systems, Inc.のライセンス部門(1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501)までお問い合わせください。

JumpStartおよびJumpStart Taq Antibodyは米国特許番号5,338,671および5,587,287、ならびに対応する外国特許の使用許諾を得ています。

JWM 5/29/03

Sigma ブランド製品は Sigma-Aldrich, Inc.を通じて販売されています。

Sigma-Aldrich, Inc.は同社製品がこの文書およびその他の Sigma-Aldrich 発行文書に含まれる情報に合致していることを保証します。お客様の個別の用途と製品の適合性についてはお客様にてご判断ください。掲載の品目、製品情報、価格などは予告なく変更される場合がございます。納品伝票または同梱の内容明細書の裏面をご覧ください。