

Product Information

REExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit

製品番号 XNATS、XNAT、XNATR

TECHNICAL BULLETIN(使用説明書)

製品概要

REExtract-N-Amp™ Tissue PCR はマウスの尾やその他の動物組織、口腔粘膜細胞、毛幹、唾液からのゲノム 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。まずサンプルに Extraction Solution と Tissue Preparation Solution の混合物を加えて、室温で 10 分間インキュベートし、DNA を抽出します。機械的な破碎や有機溶媒抽出、カラム精製、DNA の沈殿といった処理の必要はありません。

Neutralization Solution B を加えると、PCR に使用できる抽出物が得られます。中和後の抽出物の一部をとって、

REExtract-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。REExtract-N-Amp PCR Reaction Mix 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。また、特異性を向上させるためのホットスタート用 JumpStart™ Taq 抗体と、PCR 産物をそのままアガロースゲルで電気泳動することを可能にする REDTaq™ 色素も含んでいます。

キットに含まれている試薬	製品番号	XNATS 10 回抽出、 10 回 PCR	XNAT 100 回抽出、 100 回 PCR	XNATR 1000 回抽出、 1000 回 PCR
Extraction Solution	E7526	2.5 mL	24 mL	240 mL
Tissue Preparation Solution	T3073	0.3 mL	3 mL	30 mL
Neutralization Solution B	N3910	2.5 mL	24 mL	240 mL
REExtract-N-Amp PCR Reaction Mix 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、REDTaq 色素、 JumpStart Taq 抗体を含みます。	R4775	0.15 mL	1.2 mL	12 mL

本製品以外にご用意いただく試薬および器具

- 抽出用のマイクロ遠心チューブ(1.5 mL または 2 mL)またはマルチウェルプレート(ウェル容積は 200 µL 以上)
- 小型の解剖用はさみ
- ピンセット(小～中型)
- 口腔細胞採取用スワブ(滅菌されたスポンジ付きアプリーケーター、製品番号 A9601)
- サンプル採取用カード(血液カード、製品番号 C2613)
- PCR 用のチューブまたはプレート
- 95 °C のヒートブロックまたはサーマルサイクラー
- PCR プライマー
- サーマルサイクラー
- PCR グレードの水(製品番号 W1754)

注意事項と免責事項

REExtract-N-Amp Tissue PCR Kitは試験研究用のみを目的として販売されています。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。本キットに含まれる試薬を取り扱う際は、手袋、安全眼鏡、適切な保護服を着用してください。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

REExtract-N-Amp Tissue PCR Kitは 2～8 °Cで 3 週間は保存できます。3 週間以上の長期保存には -20 °Cでの保存を推奨します。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. マウスの尾、動物組織、体毛、唾液からのDNA抽出

- 100 μL の Extraction Solution をマイクロ遠心チューブまたはマルチウェルプレートのウェルにとりまします。ここに 25 μL の Tissue Preparation Solution を加え、ピペティングして混合します。

注：複数の抽出操作を並行して行う場合は、Extraction Solution と Tissue Preparation Solution の 4:1 混合液を適量作っておくことができます（混合液は 2 時間以内に使用してください）。

- 2a. **新鮮もしくは凍結したマウスの尾の場合：**使用前および異なるサンプルを扱う際には、はさみおよびピンセットを 70%エタノールですすぎます。0.5~1 cm 長さのマウス尾断片を上記の混合液に加えます（切断面を下にしてください）。ボルテックスまたはピペティングでよく混合します。マウス尾サンプルが溶液に浸るようにしてください。

注：新鮮なマウス尾を使用する場合は、切断してから 30 分以内に抽出してください。

- 2b. **動物組織の場合：**使用前および異なるサンプルを扱う際には、はさみ（またはメス）およびピンセットを 70%エタノールですすぎます。2~10 mg の組織片を上記の混合液に加えます。ボルテックスまたはピペティングでよく混合します。組織サンプルが溶液に浸るようにしてください。

- 2c. **毛幹の場合：**使用前および異なるサンプルを扱う際には、はさみおよびピンセットを 70%エタノールですすぎます。毛根を残して余分な毛幹を切り落としたサンプルを上記の混合液に加えます（毛根側を下にしてください）。1 本の毛幹（毛根付きのもの）だけで充分抽出できます。

- 2d. **唾液の場合：**10 μL の唾液を上記の混合液に加えます。ボルテックスまたはピペティングでよく混合します。

- 2e. **カードで乾燥させた唾液の場合：**50 μL の唾液を採取用カードに染みこませて乾燥させます。使用前および異なるサンプルを扱う際には、穴開け用パンチを 70%エタノールですすぎます。パンチを用いて、カードの乾燥唾液サンプルが染みこんでいる部分をディスク型（直径は 1/8 インチまたは 3 mm 程度が望ましい）に 1 枚切り抜きます。このデ

ィスクを上記の混合液に加えます。チューブを軽くたたかか硬い表面に軽く打ち付けて、ディスクが溶液に浸るようにしてください。

3. サンプルを室温で 10 分間静置します。
4. 95 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分間インキュベートします。
注：インキュベート終了後も組織は完全に消化されたようには見えません。これは普通であり、性能に影響することはありません。
5. 100 μL の Neutralization Solution B をサンプルに加え、ボルテックスして混合します。
6. 中和後の組織抽出物は 4 $^{\circ}\text{C}$ で保存するか、またはただちに PCR に利用します。その場合はセクション C のステップ 1 に進みます。

注：長期保存する場合は、未消化の組織を除去するか、抽出液を新しいチューブまたはウェルに移します。多くの場合、抽出物は顕著な劣化なしに 4 $^{\circ}\text{C}$ で 6 か月は保存可能です。

B. 口腔スワブからのDNA抽出

1. スワブで口腔粘膜細胞を採取し、スワブを乾燥させます。乾燥時間は約 10~15 分です。

注：DNA抽出に用いる溶液量が少ないため、スポンジ付きスワブを使用してください。繊維性のチップ（綿やダクロン綿製のもの）が付いたスワブは溶液を効率よく回収できないので使用しないでください。

2. 1.5 mL マイクロ遠心チューブに 200 μL の Extraction Solution をとりまします。ここに 25 μL の Tissue Preparation Solution を加え、ピペティングして混合します。
注：複数の抽出操作を並行して行う場合は、Extraction Solution と Tissue Preparation Solution の 8:1 混合液を適量作っておくことができます（混合液は 2 時間以内に使用してください）。
3. 乾燥させた口腔スワブをこの混合液に浸し、室温で 1 分間静置します。
4. スワブで溶液を 10 回かき混ぜてから、スワブをチューブ内壁に強く押しつけて余分な溶液を絞り出します。スワブを捨てます。フタを閉めて短時間ボルテックスします。

5. サンプルを室温で 10 分間静置します。
6. 95 °C で 3 分間インキュベートします。
7. 200 μ L の Neutralization Solution B をサンプルに加え、ボルテックスして混合します。
8. 中和後の抽出物は 4 °C で保存するか、またはただちに PCR に利用します。その場合はセクション C のステップ 1 に進みます。
注: 多くの場合、抽出物は顕著な劣化なしに 4 °C で 6 か月は保存可能です。

C. PCR増幅

REExtract-N-Amp PCR Reaction Mix 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。

1. 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
REExtract-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
組織抽出物	4 μ L*
合計	20 μ L

*注: REExtract-N-Amp PCR Reaction Mixは、Extraction Solution、Tissue Preparation Solution、Neutralization 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組織抽出物の量が 4 μ L未満の場合は、Extraction Solutionと Neutralization B Solutionの 1:1 混合液を加えて組織抽出物の液量を 4 μ Lに調節してください。

2. 静かに混合します。
3. 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内の混合物に重層して蒸発を防ぎます。

4. サーマルサイクルを実行します。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 °C	3 分	1
変性	94 °C	0.5~1 分	30~35
アニーリング	45~68 °C	0.5~1 分	
伸長	72 °C	1~2 分 (約 1 kb/分)	
最後の伸長	72 °C	10 分	1
保持	4 °C	無期限	

5. PCR 終了後、増幅された DNA はそのままアガロースゲルで電気泳動することができます。別途ローディングバッファー/トラッキングダイを加える必要はありません。
注: PCR産物をシーケンシングに用いる場合などは、必要に応じてGenElute™ PCR Clean-Up Kitで精製できます。

参考文献

1. 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)
2. Don, R.H. et al., 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Res., **19**, 4008 (1991).
3. Erlich, H.A. (Ed.), PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, Stockton Press, New York (1989). (製品番号 P3551)
4. Griffin, H.G., and Griffin, A.M. (Eds.), PCR Technology: Current Innovations, CRC Press, Boca Raton, FL (1994). (製品番号 Z704318)
5. Innis, M.A., et al., (Eds.), PCR Strategies, Academic Press, New York (1995). (製品番号 Z36,445-2)
6. Innis, M., et al., (Eds.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, California (1990). (製品番号 P8177)

7. 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)
8. Newton, C.R. (Ed.), PCR: Essential Data, John Wiley & Sons, New York (1995).
(製品番号 Z36,491-6)
9. Roux, K.H. Optimization and troubleshooting in PCR. PCR Methods Appl., 4, 5185-5194 (1995).
10. Saiki, R., PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, Stockton, New York (1989).

関連製品	製品番号
PCR 用マルチウェルプレート	CLS6551; Z37,490-3
シーリングマットおよびテープ	CLS6555; Z37,493-8; A2350
PCR 用マイクロチューブ	Z37,487-3; Z37,496-2; Z37,488-1
はさみ、顕微解剖用	Z26,598-5
ピンセット、顕微解剖用	F4267
血液採取カード	C2613
滅菌スポンジ付きアプリーケーター	A9601
1/8 インチ径のパンチ	P9742(製造中止)
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
GenElute™ PCR Clean-Up Kit	NA1020
TBE バッファー	T4415; T6400; T9525
水(PCR グレード)	W1754
エタノール	E7148; E7023; 45,983-6

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	組織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Neutralization Solutionの 1:1 混合物で組織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、組織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。
	抽出が不十分である	サンプルを室温ではなく 55 °C で 10 分間インキュベートしてください。
	PCR成分に欠けている、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	REExtract-N-Amp PCR Reaction Mix.は DMSO やホルムアミドと一緒に使用しないでください。これらの試薬は酵素-抗体複合体に悪影響を及ぼします。その他の共存溶媒、溶質(塩など)、極端な pH 値、その他の反応条件によっても、Taq ポリメラーゼに対する JumpStart Taq 抗体の親和性が低下し、効力が損なわれることがあります。
	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場合もありますし、数回のサイクルに分けて行う場合もあります。

トラブルシューティングガイド(前頁からの続き)

ネガティブコントロールで PCR 産物、つまり「偽陽性」の結果が生じる	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鑄型で汚染されていないかどうかを調べるために、鑄型 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。
インキュベーション後も組織が消化されていない	組織が完全に消化されるとは期待できない	Extract-N-Amp Tissue PCR Kit では組織が完全に消化される必要はありません。組織が完全には消化されていなくても PCR には充分な量の DNA が遊離します。
口腔スワブが溶液をすべて吸収してしまった	推奨されるスワブを使用しなかった	DNA 抽出に要する溶液量が少ないため、スポンジ付きスワブを使用してください。繊維性のチップ(綿やダクロン綿製のもの)が付いたスワブは溶液を効率よく回収できないので使用しないでください。

SAW/DKD/MAM 3/03

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。

特許出願中

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。