

Product Information

Enhanced Avian HS RT-PCR Kit

製品番号 HSRT-20 および HSRT-100

TECHNICAL BULLETIN (使用説明書)

製品概要

Enhanced Avian HS RT-PCR[†] Kit は、2つの非常に有効で広く使われている技術を組み合わせ、mRNA 転写産物を cDNA に変換し、この cDNA を増幅するために使用されます。この手法は、mRNA 転写産物の有無の検出と、クローニングやシーケンシングおよびその他多くの用途における特異的な RNA シークエンスの増幅に最も多く使用されています。

Sigma の Enhanced Avian HS RT-PCR Kit は、多用途に柔軟に適應できるようにデザインされており、個別の実験によって異なるさまざまな用途にご使用いただけます。本システムは、標準的な AMV-RT や Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RT) よりパフォーマンスが優れている enhanced avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (eAMV-RT) を使用しています。JumpStart™ AccuTaq™ LA DNA polymerase mix は、正確性の高い特異的な二本鎖 cDNA を合成と、その後の PCR 増幅に使用されます。この 2種類の酵素を組み合わせることにより、ごくわずかな細胞から非常に少量の mRNA を検出することができます。本説明書には、1段階 RT-PCR 反応と、2段階 RT-PCR 反応の手順が示されています。この 2つの手法があることにより、実験計画を作成する際の柔軟性が非常に高くなります。1段階 RT-PCR 反応は、eAMV-RT と JumpStart AccuTaq LA を組み合わせて行います。1本のチューブの中で、cDNA を合成する転写が行われ、その後直ちに PCR により増幅されます。この手法により、迅速で高感度な RNA 分析が行えます。2段階反応では、最高の結果を得るために各反応が最適化され、正確性が高く収量の多い PCR が行えます¹。Sigma の eAMV-RT は高温 (最高 65 °C)² 条件下でも複雑な二次構造を転写することができます。したがって、複雑な二次構造を持つ total RNA または poly(A)⁺ RNA から質の高い完全長 cDNA を合成するための理想的な酵素と言えます。また、eAMV-RT は長さ 9 kb までのターゲットの転写において非常に効果的です³。

JumpStart AccuTaq LA DNA Polymerase Mix は、堅実で正確性の高い LA (long and accurate) PCR のために特別に調合された酵素混合液です。Sigma の Taq DNA polymerase と少量のプルーフリーディング DNA ポリメラーゼに、ホットスタート用の JumpStart Taq antibody を加えた最適な調合です。この調合により、増幅産物の特異性、精度、長さおよび収量が向上します。JumpStart AccuTaq LA は長さが 0.5~ 15 kb の一本鎖 cDNA の増幅に適した理想的な酵素です¹。正確性が高まる (標準的な Taq DNA polymerase に比べて最高で 6.5 倍) ことにより、非常に質の高い増幅産物が確実に得られます。

配列情報が不完全または不明な場合、または特異的なプライマーが有効でない場合などには、本キットに含まれる random nonamers (9-mers) と anchored oligo (dT)₂₃ のいずれか一方または両方をご使用いただけます。anchored oligo には 23 個のチミジン残基と 1 つの G、C、または A 残基 (アンカー) があります。このアンカーがあるため、oligo (dT) プライマーは情報の一番最初の部分に確実に結合し、不必要な配列の長い領域がありません。したがって、お客様には、プライマーの選択と、RT-PCR 実験計画の作成を非常に柔軟に行っていただけます。

注意: コントロールテンプレート RNA とプライマーは、以前は Enhanced Avian HS RT-PCR Kit に付属していました。このテンプレート RNA は現在市販されておらず、生産が中止されています。試験とともにコントロール反応を実施されるお客様は、以下に示すプライマー配列を用いるヒトβ-アクチンのポジティブコントロール反応を行うことができます。

フォワードプライマー

5'- TGC GTG ACA TTA AGG AGA AG-3'

リバースプライマー

5'- CTG CAT CCT GTC GGC AAT G-3'

予想される増幅産物のサイズは 316 bp です。

試薬	製品番号	HSRT-20 20 反応分	HSRT-100 100 反応分
Deoxynucleotide Mix (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP)	D7295	50 µL	200 µL
Random Nonamers, 50 µM (水溶液)	R7647	100 µL	100 µL
Anchored Oligo (dT) ₂₃ , 0.5 µg/µL (水溶液)	O4387	100 µL	100 µL
RNase Inhibitor, 20 U/µL	R1274	25 µL	100 µL
Enhanced AMV Reverse Transcriptase, 20 U/µL (200 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.2, 2 mM DTT, 0.2% Triton, 50% glycerol の混合液中)	A4714	400 U	2 x 1,000 U
10x Buffer for AMV RTAMV RT, 500 mM Tris-HCl, pH 8.3, 400 mM KCl, 80 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT	B1175	1.5 mL	1.5 mL
JumpStart AccuTaq LA DNA Polymerase, 2.5 U/µL (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% Tween 20, 0.5% Igepal CA-630, 50% glycerol の混合液中)	D5559	50 U	2 x 125 U
10x AccuTaq Buffer, 50 mM Tris-HCl, 150 mM ammonium sulfate, pH 9.3, 25 mM MgCl ₂ , 1% Tween 20	B0174	0.5 mL	3 x 0.5 mL
10x PCR Buffer, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ , 0.01% gelatin	P2192	1.5 mL	1.5 mL
25 mM MgCl ₂	M8787	1.5 mL	1.5 mL
PCR Reagent Water	W1754	1.5 mL	4 x 1.5 mL

Enhanced Avian RT Unit の定義: ポリアデニル酸をテンプレート、oligo (dT)₁₂₋₁₈ をプライマーとして用いた場合、1 unit で、10 分間に TMP 1 nmol を TCA 沈殿性物質に取り込ませます。

JumpStart AccuTaq LA Unit の定義: 74 °C の条件下において、1 unit で、30 分間に dNTPs の合計 10 nmol を酸不溶性 DNA に取り込ませます。

本キットに含まれていない必要な機器および試薬

- 転写用および増幅用 RNA
- RT および PCR に特異的なプライマー
- 専用ピペット
- エアロゾルバリアピペットチップ
- 0.5 mL または 0.2 mL の薄壁 PCR チューブ、製品番号 P3114 および P3364
- サーマルサイクラー
- ジメチルスルホキシド、製品番号 D8418 (オプション)

注意事項と免責事項

Sigma の Enhanced Avian HS RT-PCR Kit は試験研究用製品です。医薬品、家庭での使用など試験研究用以外の用途には使用できません。危険性と安全な取り扱いについては安全性データシート (MSDS) をご覧ください。

保存/安定性

全ての試薬は -20 °C で保管してください。

使用前の準備

RNA の調整

RT-PCR を成功させるための最も重要なステップは、質の高い RNA の調整です。テンプレート RNA の完全性および高純度が不可欠です。逆転写反応のテンプレートとして、total RNA、poly(A)⁺ RNA のいずれも使用できます。生成産物が RNA 由来であることを確実にするため、RNA 調整の全過程は、DNA フリーで行って下さい。一本鎖合成反応前の RNA 調整段階で、コンタミした DNA を分解するため、Amplification Grade DNase I (製品番号: AMP-D1) の使用をお勧めします。増幅可能な RNA の最小量は、プライマーとテンプレートの両方によって異なります。total RNA または poly(A)⁺ RNA については、出発材料がわずかに 10 ~ 100 pg (存在するコピー数によって異なります) あれば、増幅産物が得られます。

プライマー設計

Sigma の Enhanced Avian HS RT-PCR kit をご使用になる際には、実験計画またはお客様の好みによってご希望のプライマーを選択していただけます。RT 反応には、特異的なプライマー (お客様が決定する)、anchored oligo d(T)₂₃ primer、または random nonamer がご使用いただけます。

リバーズ PCR プライマーは RT 反応の特異的なプライマーとして一般的に使用されています。このプライマーは、相同の特異的な配列のみを転写します。random nonamer と anchored oligo (dT)₂₃ は、一本鎖合成、cDNA ライブラリーの構築、およびその他の用途に対応するため、本キットに付属しています。RT および PCR に特異的なプライマーは、プライマーダイマーや二次構造によるトラブルを防ぐため、プライマー設計ソフトウェアを用いて設計してください。イントロンをはさむプライマーを選択すると、ゲノム DNA からの増幅の可能性が大幅に減少します。また、イントロンをはさむプライマーを使用した場合、ゲノム DNA からの増幅産物はサイズが大きくなるため検出できます。

1 段階反応と 2 段階反応の比較

1 段階方法は、特異的なプライマーを使用する場合に推奨されます。random nonamers や oligo (dT) を追加すると、cDNA の収量を増量できる場合があります。random nonamer は、温度上昇 (65 °C) によりプライミング能力が低下するため PCR に影響しません。コンタミネーションの可能性が低く、迅速に結果が得られます。

2 段階方法は、RT 反応と PCR 反応は別々に最適化できるため、明確に特定されていない配列、まれな配列、問題のあるテンプレートの増幅に適しています。**2 段階方法の RT 反応には、特異的なプライマー、random nonamer、および oligo (dT) が、別々または組み合わせてご使用いただけます。**2 段階方法の RT 反応では、RNA サンプルのプライミングは非特異的で多様なため、random nonamer および oligo (dT) を組み合わせてお使いいただけます。

バッファの調整

10× buffer for AccuTaq LA DNA polymerase mix は、比較的 pH が高く、マグネシウムが Mg(OH)₂ として沈殿することがあります。ご使用前に、室温でこのバッファを融解し、ボルテックスして水酸化マグネシウムの沈殿を溶かしてください。また、このバッファを 37 °C で 3~5 分加熱し、ボルテックスすることもできます。

手順

enhanced AMV Reverse Transcriptase、JumpStart AccuTaq LA DNA polymerase、MgCl₂、テンプレート RNA およびプライマーの濃度と増幅パラメーターの最適条

件は、ご使用になるシステムによって異なりますので、経験的に決定してください。

1 段階 RT-PCR 反応

- 以下の試薬を氷上で 200 μL または 500 μL の薄壁 PCR マイクロ遠心チューブに入れてください。

量	試薬	最終濃度
--- μL	水、PCR 用	適量
5 μL	10X PCR buffer (注意: 10X AccuTaq buffer を使用しないでください。)	1x
3 μL	25 mM MgCl ₂	3.0 mM (PCR buffer 中に MgCl ₂ が含まれています*)
1 μL	Deoxynucleotide mix	各 dNTP を 200 μM**
1 μL	RNase inhibitor	0.4 units/μL
1 μL	RNA テンプレート	total RNA 2 pg/μL ~ 20 ng/μL または 必要量の poly (A) ⁺ RNA
1 μL	特異的なプライマー	各プライマー 0.4~1 μM
1 μL	eAMV-RT	0.4 units/μL***
1 μL	JumpStart AccuTaq LA DNA polymerase	0.05 units/μL

50 μL 合計量

*注意: 1 段階 RT-PCR コントロール反応において推奨される塩化マグネシウム濃度は 3 mM です。1 段階 RT-PCR 反応における塩化マグネシウム濃度は実験的に最適化する必要がある場合があります。

**注意: 1 段階 RT-PCR 産物が 1 kb 未満の場合には、デオキシヌクレオシド濃度を、各 dNTP について 200 μM から 400 μM に上げることで、収量を増加できます。

*** 注意: 少量のテンプレート RNA を使用する場合、eAMV-RT を 1x PCR buffer を用いて 10 倍に希釈し、1 回の反応当たり 0.04 units/μL をご使用ください。

- ボルテックスにかけて穏やかに混合し、短時間遠心してチューブの底に全成分を集めてください。

3. 増幅パラメーターは、ご使用になるプライマーとサーマルサイクラーによって異なります。個々のプライマー、テンプレートおよびサーマルサイクラーごとにシステムを最適化する必要があります。

ヒト total RNA (HeLa S-3 細胞株) から転写した β -アクトチンの 316 bp 断片について最適化されたサイクリングパラメーターは下記の通りです:

一本鎖合成	42~50 °C	50 分
変性/RT 不活性化	94 °C	2 分
1~35 サイクル:		
変性	94 °C	15 秒
アニーリング	55 °C	30 秒
伸長	68 °C	1 分
最後の伸長	68 °C	5 分
ホールド	4 °C	

注意: これらのサイクリングパラメーターは PE9700 サーマルサイクラーを用いて最適化したものです。温度変化時間のない Stratagene's RoboCycler を使用する場合は、各温度につき 45 秒以上のインキュベーション時間が必要となります。伸長時間は増幅産物の長さによって異なる場合があります。時間は 1 kb あたり 1 分として推定できます。収量が予想を下回る場合には、1 kb あたり伸長時間を 1 分追加してください。また、1 段階 RT-PCR 産物が 1 kb 以下の場合、伸長温度を 72 °C に上げると増量できることがあります。

4. 塩基配列決定またはアガロースゲル電気泳動と臭化エチジウム染色を行って、PCR 産物を評価してください。

2 段階 RT-PCR コントロール反応

2 段階反応においては、収量と全長について、転写が最適化されます。この過程は、本キットに含まれる最適化された RT buffer の使用により完了します。サンプルの一部を JumpStart AccuTaq LA DNA polymerase mix を用いて増幅できます。一本鎖 cDNA の再増幅が必要な場合、初回の RT 反応分からサンプルの一部を取って使用することができます。プライマーの選択は、お客様の好みや過去のパフォーマンスに基づいて決定できます。

1. 2 段階 RT-PCR における Enhanced Avian Reverse Transcription 反応

1. 以下の試薬を氷上で 200 μ L または 500 μ L の PCR マイクロ遠心チューブに入れてください:

量	試薬	最終濃度
--- μ L x μ L	水、PCR 用 RNA テンプレート	適量 total RNA 0.005~ 0.25 μ g/ μ L または必 要量の poly (A) ⁺ RNA
1 μ L	Deoxynucleotide mix	各 dNTP 500 μ M
1 μ L	Random nonamer -または- 特異的 3'側アンチ センスプライマー -または- Anchored oligo (dT) ₂₃	2.5 μ M (一般的に 1 ~4 μ M) 1 μ M (一般的に 0.5 ~1 μ M) 3.5 μ M (一般的に 1 ~3.5 μ M)
10 μ L	合計量	

2. 穏やかに混合し、短時間遠心してチューブの底に全成分を集めてください。
3. このチューブを 70 °C で 10 分間サーマルサイクラーにかけてください。

注意: この逆転写反応前の 70 °C のインキュベーションはオプションです。このステップにより RNA の二次構造が変性する可能性があり、より効果的な逆転写が行えます。random primer を使用しない場合には、逆転写に必要な全ての反応液を 1 本のチューブに入れ、直ちに最適な逆転写温度にセットしてください。random nonamer を使用する場合は、25 °C で 15 分間のインキュベーションが必要となります (ステップ 5 参照)。

4. チューブを取り出して氷上に置き、遠心後に以下の反応液を入れてください:

量	試薬	最終濃度
6 μ L	水、PCR 用	-----
2 μ L	10x buffer for AMV-RT	1x
1 μ L	RNase inhibitor	1 U/ μ L
1 μ L	Enhanced avian RT	1 U/ μ L

合計量 20 μ L

注意: 長いテンプレートをを用いる場合は、deoxy-nucleotide (デオキシヌクレオチド) 濃度を、各 dNTP について 500 μ M から 1 mM に上げることにより収量を増加できる可能性があります。

5. random nonamer を使用する場合には、この反応チューブを 25 °C で 15 分間インキュベートしてください。oligo (dT)₂₃ または特異的なプライマーを使用する場合には、このステップは必要ありません。42~50 °C でインキュベートする前にこのプレインキュベーションを行うと、enhanced avian RT の作用でこれらのプライマーを伸長させることができます。

6. 反応チューブを 42~50 °C で 50 分間インキュベートしてください。

注意: 最適反応温度は経験的に決定してください。複雑な二次構造を持つテンプレートの逆転写を行う場合には、逆転写反応温度を段階的に上げる (最高 65 °C) ことをお勧めします。逆転写反応を高温で行うと、収量が低下することがあります。

7. PCR 増幅、クローニング、ライブラリー構築などに用いられる一本鎖 cDNA が完成します。

II. 2 段階 RT-PCR における JumpStart AccuTaq LA DNA Polymerase を用いたターゲット cDNA の PCR 増幅

増幅パラメーターは、ご使用になるプライマーとサーマルサイクラーによって異なります。個々のプライマー、テンプレートおよびサーマルサイクラーごとにシステムを最適化する必要があります。

1. 以下の試薬を氷上で 200 μ L または 500 μ L の薄壁 PCR マイクロ遠心チューブに入れてください:

量	試薬	最終濃度
適量	水、PCR 用	----
5 μ L	10x AccuTaq buffer	1x
1 μ L	DMSO (オプション)	2% (v/v)
1 μ L	Deoxynucleotide mix	各 dNTP 200 μ M
1 μ L	PCR プライマー	各約 0.4 μ M
2-5 μ L	RT 反応で得られたテンプレート DNA (cDNA)	-----
1 μ L	JumpStart AccuTaq LA DNA polymerase mix	0.05 units/ μ L

50 μ L 合計量

注意: DMSO を添加することにより、伸長段階で 1 本鎖の状態をより長く維持することができます。この操作は、GC 含有率が 65% を超える DNA の増幅に必要になります。DMSO は GC 含有率がこれより低い DNA には使用する必要はありません。

2. ボルテックスにかけて穏やかに混合し、短時間遠心してチューブの底に全成分を集めてください。
3. 増幅パラメーターは、ご使用になるプライマーとサーマルサイクラーによって異なります。個々のプライマー、テンプレートおよびサーマルサイクラーごとにシステムを最適化する必要があります。

ヒト total RNA (HeLa S-3 細胞株) から転写した β -アクチンの 316 bp 断片について最適化されたサイクリングパラメーターは下記の通りです:

変性/ RT 不活性化	94 °C	2 分間
1~35 サイクル:		
変性	94 °C	15 秒
アニーリング	55 °C	30 秒
伸長	68 °C	1 分
最後の伸長	68 °C	5 分
ホールド	4 °C	

注意：伸長時間は増幅産物の長さによって異なる場合があります。時間は 1 kb あたり 1 分として推定できます。これらのサイクリングパラメーターは PE9700 サーマルサイクラーを用いて最適化しました。温度変化時間のない Stratagene's RoboCycler を使用する場合は、各温度につき 45 秒以上のインキュベーション時間が必要です。

4. 塩基配列決定またはアガロースゲル電気泳動と臭化エチジウム染色を行って、PCR 産物を評価してください。

†PCR 法は、Hoffman-LaRoche, Inc. が所有する特許によって保護されています。

参考文献

1. Eastlund, E., and Mueller, E., Hot start RT-PCR results in improved performance of the enhanced avian RT-PCR system, *Sigma-Aldrich Corporation's Life Science Quarterly*, **2**, 2-5 (2001).
2. Eastlund, E., and Song, K., Sigma's new enhanced avian RT-PCR Kit, *Sigma-Aldrich Corporation's Life Science Quarterly*, **1**, 15-17 (2000).
3. Brooks, E. M., et al., Secondary structure in the 3' UTR of EGF and the choice of reverse transcriptases affect the detection of message diversity by RT-PCR, *Biotechniques* **19**, 806-812 (1995).
4. Don, R.H., et al., 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification, *Nucleic Acids Res.*, **19**, 4008 (1991).

RT-PCRトラブルシューティングガイド

問題	考えられる原因	対策
一本鎖が合成されない。	RNA が分解している。	変性アガロースゲル電気泳動を行って RNA をチェックしてください。Poly (A) ⁺ RNA は、0.5 kb と 2 kb の間にスミア状に現れます。total RNA には著しい分解がなく、2 本の明確なリボソーム RNA のバンドが現れます。RNA の精製については、RNA isolation kits (関連製品のセクション参照) または TRI Reagent (製品番号 T9424, T3809, T3934) をご使用ください。
	eAMV-RT が熱失活した。	eAMV-RT は、最初のプライマー-テンプレートの変性/アニーリングステップ後の反応混合液に添加してください。
	RNA 単離操作中のグアニジン除去が不完全である。	グアニジンベースの溶解液を使用する全ての操作において、最初の沈殿後、可能な限り残存する液体を除去し、70% アルコールで 1 回洗浄してください。
	RNA 単離操作中に使用したタンパク質分解酵素 (Proteinase K など) の除去が不完全である。	RNA 単離中に使用したタンパク質分解酵素は、フェノール/クロロホルム抽出とアルコール沈殿によって除去できる可能性があります。
	一本鎖プライマーの設計が最適でない。	適切なプライマー設計の検証を行ってください。random oligonucleotide primer を使用することにより一本鎖の収量を最大にできることが多いので、ご検討ください。
	誤った一本鎖プライマーを使用した。	anchored oligo (dT) primer を使用する場合、テンプレート RNA の末端がポリアデニル化されていることを確認してください。特異的なプライマーを使用している場合、一本鎖合成に 3' 側アンチセンスプライマーを使用していることを確認してください。
PCR 産物の収量が少ないか検出できない。	PCR 反応液が欠落または失活している。	ポジティブコントロール反応を常に行い、各反応液が使用可能かどうか確認してください。また、反応液を作る際にチェックリストの作成をお勧めします。
	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 3~5 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 ずつ下げてください。

RT-PCRトラブルシューティングガイド (続き)

問題	考えられる原因	対策
PCR産物の収量が少ないか検出できない (続き)。	プライマー設計が最適でない。	正確な配列情報と、ターゲット配列以外の配列に対するプライマー配列の特異性を確認してください。
	テンプレートの量が十分でない。	サイクル数を増やしても成功しない場合には、テンプレート濃度を上げて反応を繰り返してください。
	テンプレートの質が悪い。	アガロースゲル電気泳動を行って、テンプレートの完全性を評価してください。
	変性温度が高すぎるか低すぎる。	変性温度を最適化するため、温度を1°Cずつ上げるか、または下げてください。
	変性時間が長すぎるか短すぎる。	変性時間を最適化するため、10秒ずつ時間を延長するか、または短縮してください。
	伸長時間が短すぎる。	特に長いテンプレートを使用する場合には、伸長時間を2分ずつ延長してください。
	反応に対する酵素量が十分でない。	多くの場合、2.5 units で十分です。酵素濃度を上げる前に、サイクリングパラメータを最適化することをお勧めします。まれに、酵素濃度を上げることにより収量が増加することがあります。しかし、酵素濃度が5 units を超えると、バックグラウンドが高くなる可能性があります。
	Mg ⁺⁺ 濃度が最適以下である。	実験的にマグネシウム濃度を最適化してください。
	デオキシヌクレオチドが分解している。	凍結/融解を繰り返さないでください。ヌクレオチドを一度融解した後は、氷上に置いてください。
	目的とするテンプレートが複雑である。	多くの場合、複雑なテンプレートには、GC含有量が非常に高い、二次構造を持つといった特徴があります。1~4% DMSO を添加することにより、問題が解決する可能性があります。
	(1段階方法) eAMV-RT濃度が過剰でPCRが阻害される。	1段階方法においてeAMV-RT濃度が過剰な場合、PCR増幅が阻害される可能性があります。1x PCR bufferを用いてeAMV-RTを最小で10倍希釈し、1回の反応につき、指定ユニットの10分の1量を使用してください。
複数の増幅産物が検出される。	サイクル数が多すぎる。	サイクル数を減らすことにより、非特異的なバンドが除去できます。
	アニーリング温度が低すぎる。	アニーリング/伸長温度を2~3°Cずつ上げてください。
	プライマー設計が最適でない。	正確な配列情報と、ターゲット配列以外の配列に対するプライマー配列の特異性を確認してください。
	タッチダウンPCRの必要性がある ⁴ 。	「タッチダウン」PCRはさまざまな用途における多くのPCR反応の特異性を顕著に向上させます。タッチダウンPCRでは、PCRの最初のサイクルで、アニーリング/伸長温度をプライマーのT _m 値より高く設定します。残りのPCRサイクルで、アニーリング/伸長温度をプライマーのT _m 値に下げていきます。この温度の低下は一段階で行うか、または数回に分けて行ってください。
PCR産物のサイズが誤っている。	逆転写反応において、テンプレートRNAにゲノムDNAがコンタミしている。	RNase-free DNaseを用いてこのRNAを分解してください (製品番号AMP-D1)。
	プライマー設計が最適でない。	正確な配列情報と、ターゲット配列以外の配列に対するプライマー配列の特異性を確認してください。
	伸長時間が短すぎる。	伸長時間を2分ずつ延長するか、タッチダウンPCRを行ってください。

関連製品

RNA 単離

GenElute™ Mammalian Total RNA Purification Kit、組織または細胞から total RNA を単離する目的で使用、製品番号 RTN10、RTN70、RTN350

GenElute Direct mRNA Miniprep Kit、細胞または組織から mRNA を単離する目的で使用、製品番号 DMN10、DMN70

GenElute mRNA Miniprep Kit、total RNA から mRNA を単離する目的で使用、製品番号 MRN10、MRN70

TRI Reagent®、組織から total RNA を単離する目的で使用、製品番号 T9424

TRI Reagent® BD、全血から total RNA を単離する目的で使用、製品番号 T3809

TRI Reagent® LS、液体サンプルから total RNA を単離する目的で使用、製品番号 T3934

RNaseZAP®、実験器具の表面から RNase を除去するための洗浄製品、製品番号 R2020

Deoxyribonuclease I, amplification grade、RNA 調整時に DNA を除去する目的で使用、製品番号 AMP-DI

RNAlater™、RNA を長期保存する目的で使用、製品番号 R0901

PCR 製品

製品番号 D5809、JumpStart AccuTaq LA DNA Polymerase Mix with 10× reaction buffer containing MgCl₂

製品番号 NA1020、GenElute PCR Clean-Up Kit、PCR 産物を精製する目的で使用

製品番号 OPT-2、PCR Optimization Kit II

TRI Reagent は Molecular Research Center, Inc. の登録商標です。TRI Reagent および single-step method は米国特許 4,843,155 号、5,346,994 号、および国際特許により保護されています。

RNaseZAP は Ambion, Inc. の登録商標であり、

RNAlater は Ambion, Inc. の商標です。

AccuTaq、GenElute、JumpStart は Sigma-Aldrich Co. の商標です。

ご購入者への通知: 限定ライセンス

Roche Molecular Systems, Inc. および Hoffmann-La Roche Ltd. (「Roche」) が所有する米国特許 4,683,202 号、4,683,195 号、4,965,188 号、および 5,075,216 号、またはそれぞれに対応する外国特許のライセンスには、前払い金部分とロイヤリティー部分が含まれています。本製品を前払い金部分によって使用が保護されているサーマルサイクラーと同時にご使用になる場合、本製品の購入価格には、本製品を、購入者の試験研究活動のみを対象とした Polymerase Chain Reaction (「PCR」) および前述した特許に記載される PCR 関連手法の実施のみを目的として使用するための、ロイヤリティー部分のもとに生じる限定的な譲渡禁止権利が含まれます。前払い金事項に対する権利は、PCR 工程でこの製品を使用するための完全なライセンスを持つために、エンドユーザーによって入手される必要があります。前払い金部分のもとに生じるこれらの権利は、Applied Biosystems から購入するか、または、許可された Thermal cycler の購入によって取得することができます。購入者による利益またはその他の商業的動機を目的とした試験結果の制限のない報告等、PCR を用いたあらゆる種類の商業サービスを実施する、または申し出る権利がないことを、言外の意味または禁反言にかかわらず、本契約により許諾します。本 PCR 手法を実施するライセンスの購入に関する詳細な情報については、Director of Licensing (Applied Biosystems、850 Lincoln Centre Drive、Foster City、California 94404) または Licensing Department (Roche Molecular Systems, Inc.、1145 Atlantic Avenue、Alameda、California 94501) までお問い合わせください。

TaKaRa Shuzo Co., Ltd. が所有する米国特許 5,436,149 号のライセンスを取得 5,436,149 owned by TaKaRa Shuzo Co., Ltd.

JumpStart および JumpStart Taq 抗体は、米国特許番号 5,338,671 および 5,587,287、ならびに外国の当該特許の下で、in vitro での研究使用のためにライセンスを受けています。

JWM 02/05-1

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。