

Product Information

REExtract-N-Amp™ Blood PCR Kits

製品番号 XNABS、XNAB、XNABE、XNABR、XNABRE、P8240

TECHNICAL BULLETIN(使用説明書)

製品概要

REExtract-N-Amp™ Blood PCR Kit は、各種サンプル（全血、乾燥血液カード、哺乳類培養細胞）からのゲノム DNA の迅速な抽出と増幅に必要なすべての試薬を揃えたキットです。概要として、まずサンプルを Lysis Solution に加えてインキュベート（全血の場合は室温で 5 分間、血液カードは 55 °C で 15 分間、単層培養細胞は 75 °C で 5~10 分間）することで DNA を遊離させます。Neutralization Solution 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 Blood PCR ReadyMix™（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（お客様にてご用意下さい。）と混合します。REExtract-N-Amp Blood 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。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™ 色素も含まれています。

キットに含まれている試薬	製品番号	XNABS 10 回抽出、 10 回 PCR	XNAB 100 回抽出、 100 回 PCR	XNABE 100 回抽出、 500 回 PCR	XNABR 1,000 回抽出、 1,000 回 PCR	XNABRE 1,000 回抽出、 5,000 回 PCR
Lysis Solution for Blood	L3289	0.3 mL	2.5 mL	2.5 mL	25 mL	25 mL
Neutralization Solution for Blood	N9784	2 x 1.5 mL	25 mL	25 mL	250 mL	250 mL
REExtract-N-Amp Blood PCR ReadyMix 2x PCR 反応混合液 （バッファー、塩、 dNTPs、Taq ポリメ ラーゼ、REDTaq 色素、 JumpStart Taq 抗体が 含まれています）	P8240	0.15 mL	1.2 mL	5 x 1.2 mL	12 mL	5 x 12 mL

保存

REExtract-N-Amp Blood PCR Kit は 2~8 °C で 3 週間までは保存可能です。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下さい。

本製品以外にご用意いただく試薬および器具

- 抽出に使用するマイクロ遠心チューブまたはマルチウェルプレート（最小 200 µL）
- 乾燥血液用のパンチおよびカード
- インキュベーターまたはオープン（血液カードの場合は 55 °C、単層培養細胞の場合は 75 °C）
- PCR 用のチューブまたはプレート
- サーマルサイクラー
- 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

REExtract-N-Amp Blood 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。Lysis Solution は腐食性です。皮膚との接触を避けて下さい。本試薬および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下さい。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。

手順

別途指示のない限り、すべてのステップは室温で行います。

A. 全血からの DNA 抽出

- 1a. EDTA、クエン酸ナトリウム、ヘパリンナトリウムのいずれかを含むチューブに血液を採取します。EDTA またはクエン酸ナトリウムを使用するとより良い結果が得られます。転倒混和または振盪して内容物をよく混合します。
注: ヒト以外の血液を採取する場合は、凝血を防止するため、EDTA 三カリウム (製品番号 E0270) を最終濃度が 5 mM となるよう添加します。
- 2a. マイクロ遠心チューブまたはマルチウェルプレートに、1 サンプルあたり 20 μ L の Lysis Solution for Blood を入れます。
- 3a. ここに 10 μ L の血液を加えます。ボルテックスまたはピペッティングでよく混合します。
- 4a. 室温で 5 分間静置します。
- 5a. 180 μ L の Neutralization Solution for Blood を加えます。ボルテックスまたはピペッティングでよく混合します。
- 6a. 中和後の血液抽出物は 4 $^{\circ}$ C で保存するか、または 2 μ L を使用してそのまま PCR に利用します。その場合はステップ 7 に進んで下さい。
注: 抽出物中の DNA は 4 $^{\circ}$ C で 6 ヶ月は安定です。

B. 血液カードからの DNA 抽出

- 1b. 採血用カード (製品番号 C2613 など) に血液サンプルを採取します。完全に乾燥させます。
- 2b. パンチを用いて血液カードからディスク (直径は 1/8 インチまたは 3 mm 程度) を切り出し、マイクロ遠心チューブに入れます。血液の染みこんだ場所をなるべく多く切り出すようにして下さい。
- 3b. 血液カードのディスクに 20 μ L の Lysis Solution for Blood を加えます。数秒間遠心して、溶液をディスクに染みこませます。
- 4b. 55 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベーションします。
- 5b. 180 μ L の Neutralization Solution for Blood を加えます。ボルテックスまたはピペッティングでよく混合します。
- 6b. 中和後の血液抽出物は 4 $^{\circ}$ C で保存するか、または 2 μ L を使用してそのまま PCR に利用します。その場合はステップ 7 に進んで下さい。
注: 抽出物中の DNA は 4 $^{\circ}$ C で 6 ヶ月は安定です。

C. 培養哺乳類細胞からの DNA 抽出

- 1c. マルチウェルプレートを用いて、単層細胞を 90~95% コンフルエントまで培養します。
- 2c. アスピレーターに接続したピペットチップを用いて、ウェルから培地を除去します。培地は完全に除去して下さい。
- 3c. 各ウェルに 20 μ L の Lysis Solution for Blood を加えます。
注: ステップ 4c でインキュベーション中に溶液が蒸発しないよう、この時点でプレートを AlumaSeal™ II (製品番号 A2350) でシールすることをお勧めします。ステップ 5c で Neutralization Solution for Blood を加える際、AlumaSeal はピペットチップで突き破ることができます。保存する際は、この上にもう 1 枚の AlumaSeal を貼ってフタとすることができます。
- 4c. プレートを 75 $^{\circ}$ C で 5~10 分間インキュベーションします (24 ウェルプレートの場合はサンプルの過剰乾燥を避けるため、5 分間とすることを推奨します)。
- 5c. 各ウェルに 180 μ L の Neutralization Solution for Blood を加えます。ピペッティングによりサンプルを混合します。
- 6c. 中和後の細胞抽出物は 4 $^{\circ}$ C で保存するか、または 2 μ L を使用してそのまま PCR に利用します。その場合はステップ 7 に進んで下さい。
注: 抽出物中の DNA は 4 $^{\circ}$ C で 6 ヶ月は安定です。

PCR 増幅

REExtract-N-Amp Blood 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。

7. 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 Blood PCR ReadyMix	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
中和した血液抽出物	2 μ L
合計	20 μ L

注: 中和後の血液抽出物は 2 kb より長い配列の PCR 増幅を阻害することがあります。Neutralization

Solution B(製品番号 N3910)を用いると、このような阻害を起こさずに長い配列を PCR 増幅することができます。その場合は、1 µL の Neutralization Solution B を反応混合物に加えます。Neutralization Solution B は本キットに含まれていないため、別途お買い求め下さい。

8. 静かに混合します。
9. サーマルサイクラー内にフタがない場合は、20 µL 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。
10. 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、鑄型、サーマルサイクラーに合わせて最適化して下さい。(最適化の方法については参考文献を参照)。

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	94~96 °C	3 分	1
変性	94~96 °C	0.5~1 分	30~40
アニーリング	45~68 °C	0.5~1 分	
伸長	72 °C	1~2 分 (約 1 kb/分)	1
最後の伸長	72 °C	10 分	
保持	4 °C	無期限	

11. PCR 完了後、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(製品番号 NA1020)で精製できます。

関連製品	製品番号
PCR 用 96 ウェルプレート	Z374903
PCR 用 384 ウェルプレート	Z374911
シール用のマットまたはテープ	Z374938
AlumaSeal II	A2350
EDTA, tripotassium salt dihydrate	E0270
採血用カード	C2613
PCR 用マイクロチューブ	Z374873; Z374962; Z374881
Neutralization Solution B	N3910
ミネラルオイル	M8662

PCR マーカー	P9577
プレキャストアガロースゲル	P6097
TBE バッファー	T4415; T6400; T9525
GenElute PCR Clean-Up Kit	NA1020

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 Z364118)
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).
4. Griffin, H.G., and Griffin, A.M. (Eds.), PCR Technology: Current Innovations, CRC Press, Boca Raton, FL (1994). (製品番号 Z357499)
5. Innis, M.A., et al., (Eds.), PCR Strategies, Academic Press, New York (1995). (製品番号 Z364452)
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).
8. Newton, C.R. (Ed.), PCR: Essential Data, John Wiley & Sons, New York (1995).
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).

Label License Statement

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,789,224, 5,618,711, 6,127,155 and claims outside the US corresponding to expired US Patent No. 5,079,352. 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. No right under any other patent claim, no right to perform any patented method, and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, 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 by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

JumpStart and JumpStart Antibody are licensed under U.S. Patent No. 5,338,671 and 5,587,287 and corresponding patents in other countries.

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	血液抽出物中の夾雑物によって PCR 反応が阻害されている	抽出物の使用量を減らすか抽出物を水で希釈してから再度 PCR を行って下さい。阻害が起きているかどうかを調べるには、DNA コントロールの使用や、血液抽出物とともに既知量の鑄型(100~500 コピー)を PCR 反応混合物に添加するなどご確認下さい。
	PCR の組成が欠けている、または劣化している	ポジティブコントロールを試し、各成分が正しく機能していることを確認して下さい。反応混合物を準備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下さい。(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 刻みで下げして下さい。
	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下さい。プライマーが 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下さい。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下さい。
	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下さい。
	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下さい。
	伸長時間が短すぎる	特に鑄型が長い場合は、伸長時間を 1 分刻みで延長して下さい。
	標的の鑄型が複雑である	多くの場合、もともと複雑な標的というものは、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 含量の鑄型に 1.0~1.7 M のベタイン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	REDExtract-N-Amp PCR ReadyMix は DMSO やホルムアミドと一緒に使用しないで下さい。これらの試薬は酵素-抗体複合体に悪影響を及ぼします。その他の溶媒、塩類、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ことも、数回のサイクルに分けて行うことも可能です。
ネガティブコントロールで PCR 産物が生じている、または「偽陽性」の結果が得られる	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。

AlumaSeal は Excel Scientific, Inc.の商標です。

GenElute、JumpStart、RedExtract-N-Amp および ReadyMix は Sigma-Aldrich Biotechnology LP および Sigma-Aldrich Co.の商標です。

REDTaq は Sigma-Aldrich Biotechnology LP および Sigma-Aldrich Co.の登録商標です。

AF,CR,PHC,MAM 09/10-2

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。