

製品コード R074A

研究用

TAKARA

MightyAmp™ Genotyping Kit

説明書

v201805Da

MightyAmp Genotyping Kit は、マウス尾などの動物組織や植物組織等から、簡便に DNA を抽出して PCR 増幅を行うための製品です。

本製品に含まれる専用抽出バッファーと Proteinase K により、動植物組織等から直接 DNA 抽出が可能です。PCR にはクルードサンプルに対して強力な増幅性を示す MightyAmp DNA Polymerase を使用するため、通常の PCR 酵素では増幅が困難な PCR 阻害物質を多く含む粗抽出液から、GC リッチ、AT リッチを問わず、広範囲なターゲットの増幅が可能です。特に 2 kb 程度までの短鎖 DNA の増幅に威力を発揮し、少量の鋳型からでも良好な反応性を示します。さらに、混在する夾雑物の影響を軽減する専用 Loading Dye を用いて PCR 増幅産物をアガロースゲル電気泳動することにより、短時間に良好な検出が可能となり、遺伝子型判定にも最適です。

MightyAmp DNA Polymerase は、98℃までポリメラーゼ活性を抑制する強力なモノクローナル抗体を用いたホットスタート PCR 用の酵素であり、非特異的増幅を防ぐことができます。

I. 内容 (200 回用) *1

1. MightyAmp DNA Polymerase (1.25 U/ μ l)	200 μ l
2. 2 × MightyAmp Buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus)*2	1.25 ml × 4
3. 5 × Loading Dye	1 ml × 3
— Extraction Buffer	20 ml
5. Proteinase K	200 μ l

* 1 : 反応容量 50 μ l での回数です。

* 2 : Mg²⁺ 濃度は 4 mM (2 ×)、dNTP 濃度は各 800 μ M (2 ×) です。

II. 保存

−20℃

Extraction Buffer は開封後室温保存

III. プライマー設計について

プライマーは、OLIGO Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights 社) などのプライマー設計ソフトを利用して、最適な配列を選択することをお勧めします。

Tm 値 (下記の式で計算) が 60℃以上になるように設計することをお勧めします。

$$T_m \text{ 値 (}^\circ\text{C)} = [(A, T \text{ の数}) \times 2] + [(G, C \text{ の数}) \times 4] - 5$$

IV. 操作例

IV-1. 組織試料からの DNA 抽出

室温で操作を行ってください。
反応はサーマルサイクラーを利用して行うと便利です。

1. 組織試料*¹を 100 μ l の Extraction Buffer が入った PCR チューブに加える。
【注意】Extraction Buffer が沈殿物を形成している場合は、加温して (~ 60°C) 静かに攪拌し沈殿物を溶かしてください。
2. 1 μ l の Proteinase K をチューブに添加する。
3. 60°C で 5 分間インキュベートした後、98°C で 2 分間処理し、室温まで温度を下げる。*²
4. 室温で試料が落ちる程度に軽く遠心し、上清を Extraction Buffer 抽出液 (PCR の鑄型) とする。*³

* 1 : 持ち込む試料の目安量

- ・ マウス尾 ≤ 2 mm
- ・ マウス耳 ≤ 5 mm²
- ・ マウス臓器 ≤ 30 mm³
- ・ 植物の葉 ≤ 5 mm²

* 2 : 4°C にすると沈殿物を形成するため、操作中は室温 (25°C) を保ってください。

* 3 : 保存する場合は、上清を別のチューブに移して -20°C で保存してください。
PCR に使用する前には室温に戻し沈殿物がないことを確認してください。

IV-2. 一般的な PCR 反応液組成

試薬	使用量	最終濃度
2 × MightyAmp Buffer	25 μ l	1 ×
Primer 1	15 pmol	0.3 μ M
Primer 2	15 pmol	0.3 μ M
Extraction Buffer 抽出液*	≤ 2.5 μ l	
MightyAmp DNA Polymerase	1 μ l	1.25 U/50 μ l
滅菌水	up to 50 μ l	
Total	50 μ l	

* : 抽出液は必ず室温にしてからご使用ください。また、抽出液の PCR 反応液への持ち込み量は反応液の 1/20 量以下を推奨します。その他の試薬は氷上で取り扱ってください。

IV-3. PCR 条件

伸長温度を 68°C に設定した 3 step PCR が標準条件です。

[3 step PCR]

98°C	2 min. *	
↓		
98°C	10 sec.] 30 ~ 40 cycles
60°C	15 sec.	
68°C	1 min./kb	

[オプション：2 step PCR]

98°C	2 min. *	
↓		
98°C	10 sec.] 30 ~ 40 cycles
68°C	1 min./kb	

*：強力なホットスタート抗体を使用しているため、必ず 98°C 2 min. の初期変性を行い、抗体を熱変性させてください。

IV-4. 増幅産物の電気泳動

添付の 5 × Loading Dye と PCR 反応液を 1：4 の割合で混合後、電気泳動ゲルにアプライしてください。

MightyAmp DNA Polymerase を用いて増幅した PCR 産物を電気泳動する場合は、TAE Buffer の使用を推奨します。TBE Buffer を使用すると、泳動パターンが裾広がりになり、きれいな泳動結果が得られない場合があります。

V. 増幅産物の末端形状

MightyAmp DNA Polymerase を用いて増幅した PCR 産物のほとんどは 3' 末端に A が 1 塩基付加されています。そのため、PCR 産物を直接 T-Vector (pMD20：製品コード 3270、pMD19 (Simple)：製品コード 3271 など) にクローニングすることができます。また、Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (製品コード 6027) で平滑末端化およびリン酸化を行って、平滑末端のベクターにクローニングすることも可能です。

VI. 実施例

以下に、各種生体試料から DNA を抽出し、PCR 増幅を行った例を示します。

VI-1. マウス尾からの DNA 抽出および PCR 増幅

【方法】マウス尾の先端約 2 mm から [IV-1. 組織試料からの DNA 抽出] にしたがって DNA を抽出した。遠心後の上清の一部を 50 μ l PCR 反応系に添加し、マウス *Ywhaz* 遺伝子の PCR 増幅 (約 1 kb) を行った。各 PCR 反応液 4 μ l を添付の 5 \times Loading Dye と混合し電気泳動に供した。

【結果】MightyAmp Genotyping Kit を用いて、マウス尾の試料から、目的遺伝子を良好に増幅できました。

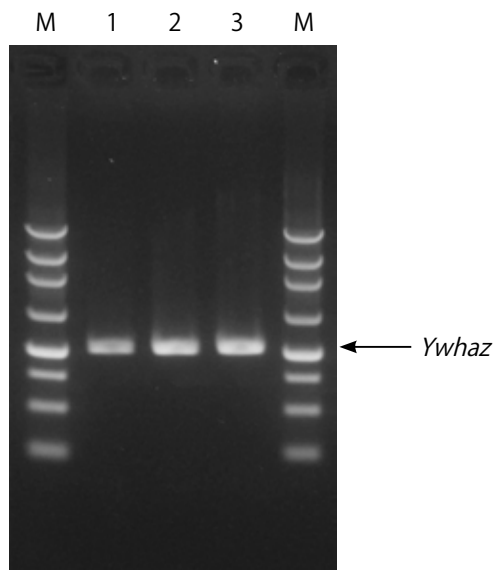


図 1. マウス尾からの PCR 増幅

PCR 条件：

98°C 2 min.

↓

98°C 10 sec.]
60°C 15 sec.] 30 Cycles
68°C 1 min.]

PCR 反応液中の抽出液量

- レーン 1：抽出液 1 μ l (PCR 反応液の 1/50 量)
- 2：抽出液 2.5 μ l (PCR 反応液の 1/20 量)
- 3：抽出液 5 μ l (PCR 反応液の 1/10 量)*
- M：250 bp DNA Ladder

*：抽出液の PCR 反応液への持ち込み量は反応液の 1/20 量以下を推奨します。

VI-2. 植物葉からの DNA 抽出および PCR 増幅

【方法】直径 2 mm のパンチでカットしたトマト葉から [IV-1. 組織試料からの DNA 抽出] にしたがって DNA を抽出した。遠心後の上清の一部を 50 μ l PCR 反応系に添加し、トマト *cox1* 遺伝子の PCR 増幅 (約 1 kb) を行った。各 PCR 反応液 4 μ l を添付の 5 \times Loading Dye と混合し電気泳動に供した。

【結果】MightyAmp Genotyping Kit を用いて、トマトの葉片試料から、目的遺伝子を良好に増幅できました。

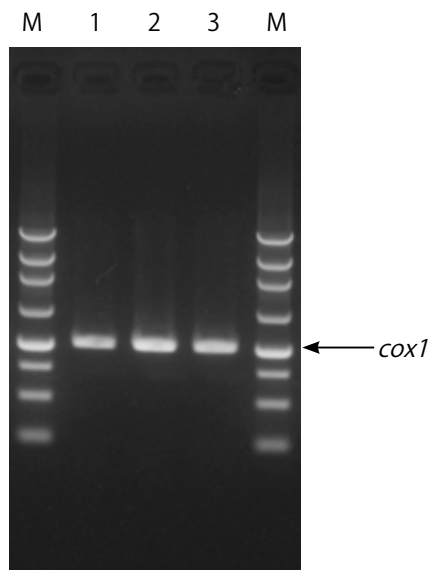


図 2. トマト葉片からの PCR 増幅

PCR 条件：

98°C 2 min.

↓

98°C 10 sec.]
60°C 15 sec.] 30 Cycles
68°C 1 min.]

PCR 反応液中の抽出液量

- レーン 1：抽出液 1 μ l (PCR 反応液の 1/50 量)
- 2：抽出液 2.5 μ l (PCR 反応液の 1/20 量)
- 3：抽出液 5 μ l (PCR 反応液の 1/10 量)*
- M：250 bp DNA Ladder

*：抽出液の PCR 反応液への持ち込み量は反応液の 1/20 量以下を推奨します。

VII. トラブルシューティング

現象	問題点	対策
増幅しない 増幅効率が悪い	プライマーの Tm 値	III. を参考にプライマー設計する
	2 step PCR	3 step PCR を試す
	3 step PCR	2 step PCR を試す (3 step PCR で増幅しないものが 2 step で増幅する場合があります)
	アニーリング温度	2℃ずつ下げてみる
	サイクル数	サイクル数を最大 40 cycles まで増やす
	サンプルの量・調製法	・ PCR 反応液に持ち込む抽出液の使用量を減らす、または増やす ・ 抽出液へ持ち込む試料の量を減らす、または増やす
非特異的増幅が著しい	プライマーの Tm 値	III. を参考にプライマー設計する
	3 step PCR	2 step PCR を試す
	サイクル数	サイクル数を 25 ~ 30 cycles に設定

VIII. 関連製品

MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3 (製品コード R076A/B)
MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.2 (製品コード R071A/B)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Gradient* (製品コード TP600)
Agarose L03「TAKARA」(製品コード 5003/B)
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
T-Vector pMD20 (製品コード 3270)
T-Vector pMD19 (Simple) (製品コード 3271)
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (製品コード 6027)

IV. 注意

- ・ 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・ タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・ Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。MightyAmp、PrimeGel はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社