

製品コード 9180

研究用

---

**Takara**

**SimplePrep™ reagent  
for DNA**

---

説明書

v201706

---

SimplePrep reagent for DNA は、組織などの生体試料から PCR やリアルタイム PCR に適した鋳型 DNA を簡易調製するための試薬です。本試薬を試料に添加し、インキュベーションするだけの簡単な操作で、短時間に DNA 抽出液を調製できます。調製した DNA 抽出液は、そのまま PCR やリアルタイム PCR のテンプレートに使用できます。

調製方法として、標準プロトコールの他に、多検体処理に適した簡易プロトコールもご用意していますので、目的にあわせた方法を選んでいただくことが可能です。

※ PCR に用いる場合、Tks Gflex™ DNA Polymerase (製品コード R060A/B)、MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.2 (製品コード R071A/B)、*TaKaRa Ex Taq*® Hot Start Version (製品コード RR006A/B)、または PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (製品コード R050A/B) をご使用ください。*rTaq* では増幅効率が悪い場合があります。

リアルタイム PCR では、インターカレーター法およびサイクリンググローブ法による検出を確認しています。

## I. 内容 (150 回用)

Reagent A	1.5 ml × 2
Reagent B	0.6 ml

### 本製品以外に必要な試薬・装置 (主なもの)

- ・滅菌精製水 (DNase free water)
- ・サーマルサイクラー
  - TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)
  - TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (製品コード TP600) など
- またはインキュベーター
  - 標準プロトコールの場合：37°C および 95°C の設定が可能なもの
  - 簡易プロトコールの場合：50°C および 95°C の設定が可能なもの
- ・0.2 ml マイクロチューブ

## II. 保存

4°C

### III. 操作

#### III-1. 標準プロトコール

1. 使用前に Reagent A ならびに Reagent B を静かに転倒混和し、1 試料あたり Reagent A を 20  $\mu$ l、Reagent B を 4  $\mu$ l、滅菌精製水を 20  $\mu$ l 混合し、試薬 Mix を調製する。<sup>\*1</sup>  
(Reagent A : Reagent B : 滅菌精製水 = 5 : 1 : 5)
2. 試料 1 ~ 10 mg<sup>\*2</sup> を 0.2 ml マイクロチューブに採取する。
3. 1. で調製した試薬 Mix を 44  $\mu$ l 添加し、試料を浸す。<sup>\*3</sup>
4. 37°C で 6 分、続けて 95°C で 3 分間のインキュベーションを行う。<sup>\*4</sup>
5. 滅菌精製水を 80  $\mu$ l 加え、ピペッティングで緩やかに混和する。
6. 上清 (DNA 抽出液)<sup>\*5</sup> を PCR<sup>\*6</sup> のテンプレートとして使用する。  
(PCR 反応液に対し、1/10 量まで DNA 抽出液を添加可能です。<sup>\*7</sup>)
7. 不溶物 (組織) がチューブ内に残っている場合、上清を別のチューブに移して保存する。<sup>\*8</sup>

\* 1 : 処理する試料の体積は、最大で抽出液の 1/2 (試料と試薬 Mix が目視で等量) 以下を目安とし、採取量に応じて試薬 Mix の量を増減してください。この場合、試薬 Mix の混合比率を変更しないようにご注意ください。

\* 2 : 試料により最適処理量が異なります。V. Q & A の Q2 をご参照ください。

\* 3 : 試料は、試薬 Mix に浸るようにチップの先などでチューブの底に入れてください。

\* 4 : インキュベーション後、チューブのふたに抽出液が付着している場合は、卓上遠心機などを利用して軽く遠心したのちに、チューブのふたを開けるようにしてください。

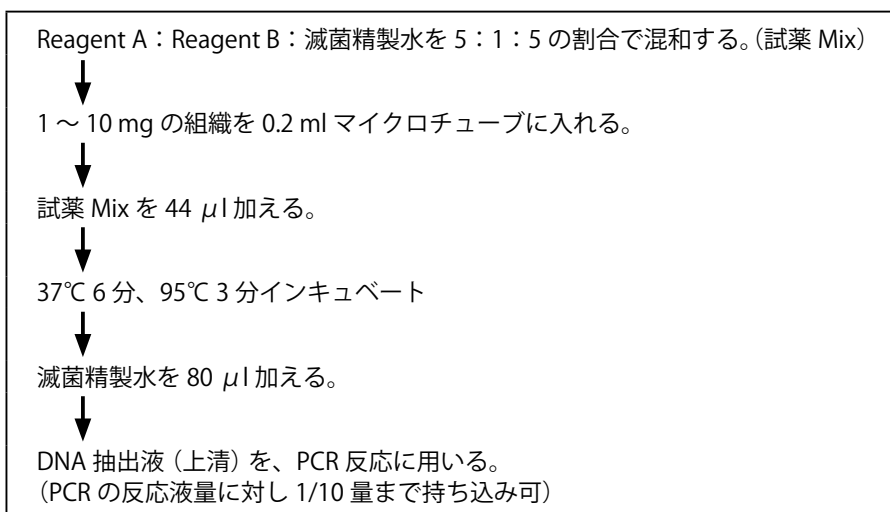
\* 5 : 抽出液に不溶物が混在している場合は、軽く遠心分離を行ったのち上清をご使用ください。

\* 6 : PCR に使用する酵素は Tks Gflex DNA Polymerase (製品コード R060A)、MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 (製品コード R071A)、*TaKaRa Ex Taq* Hot Start Version (製品コード RR006A)、または PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (製品コード R050A) をご使用ください。*rTaq* では増幅効率が悪い場合があります。

\* 7 : 試薬 Mix に対して試料が過剰の場合、得られた抽出液により PCR 反応が阻害される場合があります。この場合、抽出液を滅菌精製水で希釈したものを用いることで、PCR 反応が改善される場合があります。あらかじめ、使用する PCR 条件で、最適な DNA 抽出液の量を予備検討していただくことをお勧めします。

\* 8 : DNA 抽出液は使用まで 4°C で保存し、早めにご使用ください。直ちに使用されない場合は、-20°C で保存してください。

#### 【標準プロトコール】



## III-2. 簡易プロトコール (オプション)

簡易プロトコールは、標準プロトコールよりさらに操作を簡略化し、多検体処理などに適しています。ただし、PCR 反応液に持ち込める DNA 抽出液の量は、標準プロトコールとは異なりますのでご注意ください。

1. 使用前に Reagent A ならびに Reagent B を静かに転倒混和し、1 試料あたり Reagent A を 20  $\mu$ l、Reagent B を 4  $\mu$ l、滅菌精製水を 40  $\mu$ l 混合し、試薬 Mix を調製する。<sup>\*1</sup>  
(Reagent A : Reagent B : 滅菌精製水 = 5 : 1 : 10)
2. 試料 1 ~ 10 mg<sup>\*2</sup> を 0.2 ml マイクロチューブに採取する。
3. 1. で調製した試薬 Mix を 64  $\mu$ l 添加し、試料を浸す。<sup>\*3</sup>
4. 50°C で 3 分、続けて 95°C で 3 分間のインキュベーションを行う。<sup>\*4</sup>
5. 上清 (DNA 抽出液)<sup>\*5</sup> を PCR<sup>\*6</sup> のテンプレートとして使用する。(通常の PCR の場合、PCR 反応液に対する抽出液の添加量は、1/25 量までとしてください。添加量が多すぎると、PCR 阻害がかかる場合がありますのでご注意ください。<sup>\*7</sup>)
6. 不溶物 (組織) がチューブ内に残っている場合、上清を別のチューブに移して保存する。<sup>\*8</sup>

\* 1 : 処理する試料の体積は、最大で抽出液の 1/2 (試料と試薬 Mix が目視で等量) 以下を目安とし、採取量に応じて試薬 Mix の量を増減してください。この場合、試薬 Mix の混合比率を変更しないようにご注意ください。

\* 2 : 試料により最適処理量が異なります。V. Q & A の Q2 をご参照ください。

\* 3 : 試料は、試薬 Mix に浸るようにチップの先などでチューブの底に入れてください。

\* 4 : インキュベーション後、チューブのふたに抽出液が付着している場合は、卓上遠心機などを利用して軽く遠心したのちに、チューブのふたを開けるようにしてください。

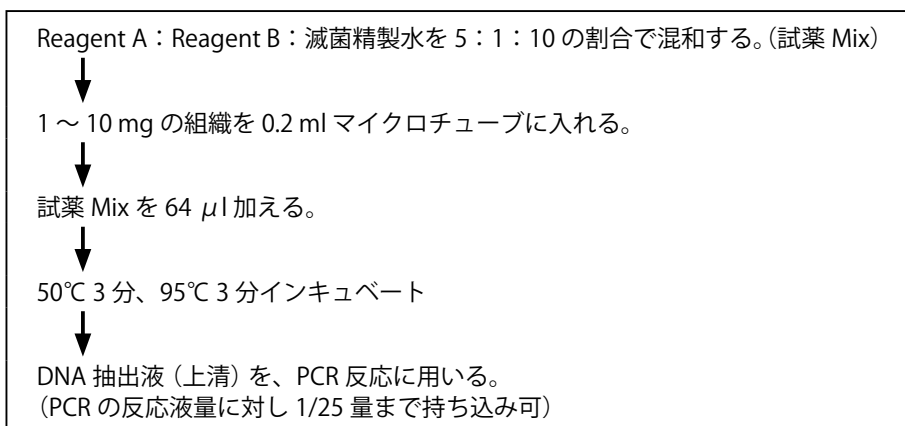
\* 5 : 抽出液に不溶物 (組織) が混在している場合は、軽く遠心分離を行ったのち上清をご使用ください。

\* 6 : PCR に使用する酵素は Tks Gflex DNA Polymerase (製品コード R060A)、MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 (製品コード R071A)、*TaKaRa Ex Taq* Hot Start Version (製品コード RR006A)、または PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (製品コード R050A) をご使用ください。*rTaq* では増幅効率が悪い場合があります。

\* 7 : 試薬 Mix に対して試料が過剰の場合、得られた抽出液により PCR 反応が阻害される場合があります。この場合、抽出液を滅菌精製水で希釈したものを用いることで、PCR 反応が改善される場合があります。あらかじめ、使用する PCR 条件で、最適の DNA 抽出液の量を予備検討していただくことをお勧めします。

\* 8 : DNA 抽出液は使用まで 4°C で保存し、早めにご使用ください。直ちに使用されない場合は、-20°C で保存してください。

### 【簡易プロトコール】

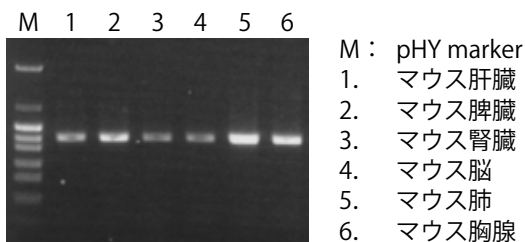


## IV. 使用例

### A. PCR による解析

#### A-1. マウス臓器から調製した DNA 抽出液による PCR

マウス各種臓器（約 2 mg）から標準プロトコールを用いて調製した DNA 抽出液を使用し、1 kb の増幅を確認した。



1 % L03 Agarose gel

PCR 試薬： *TaKaRa Ex Taq* Hot Start Version

DNA 抽出液使用量： 1  $\mu$ l

total volume： 25  $\mu$ l

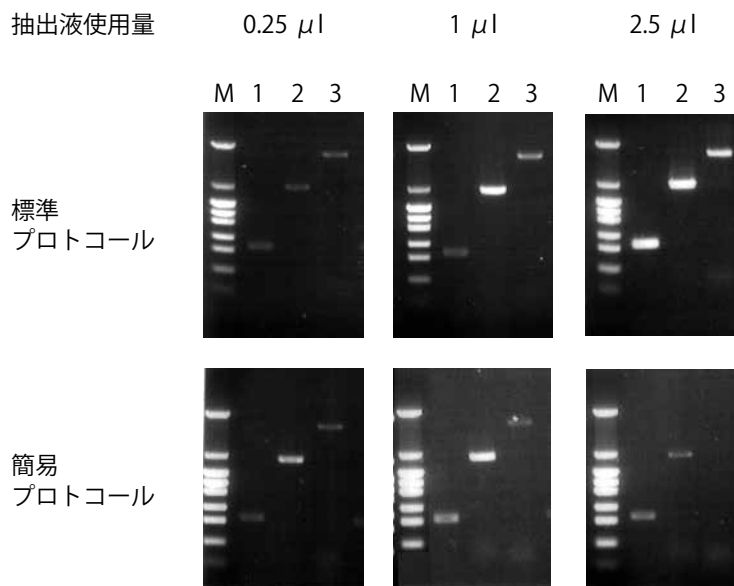
ターゲット： *Raver2* (1,100 bp)

PCR 条件：	98°C	10 sec.	} 30 cycles
	60°C	30 sec.	
	72°C	1 min.	

## A-2. マウス尾から調製した DNA 抽出液による PCR

マウス尻尾 (約 5 mg) から標準プロトコールおよび簡易プロトコールを用いて調製した DNA 抽出液を使用し、約 0.5 ~ 4 kb の増幅を行った。

25  $\mu$ l の PCR 反応系に対し、0.25  $\mu$ l (1/100 量) から 2.5  $\mu$ l (1/10 量) の DNA 抽出液を使用して反応を行った結果、標準プロトコールはすべての使用量で増幅を確認できたが、簡易プロトコールでは使用量が 2.5  $\mu$ l (1/10 量) の場合、4 kb の増幅を確認できなかった。



1% L03 Agarose gel

PCR 試薬 : TaKaRa Ex Taq Hot Start Version

DNA 抽出液使用量 : 0.25、1、2.5  $\mu$ l

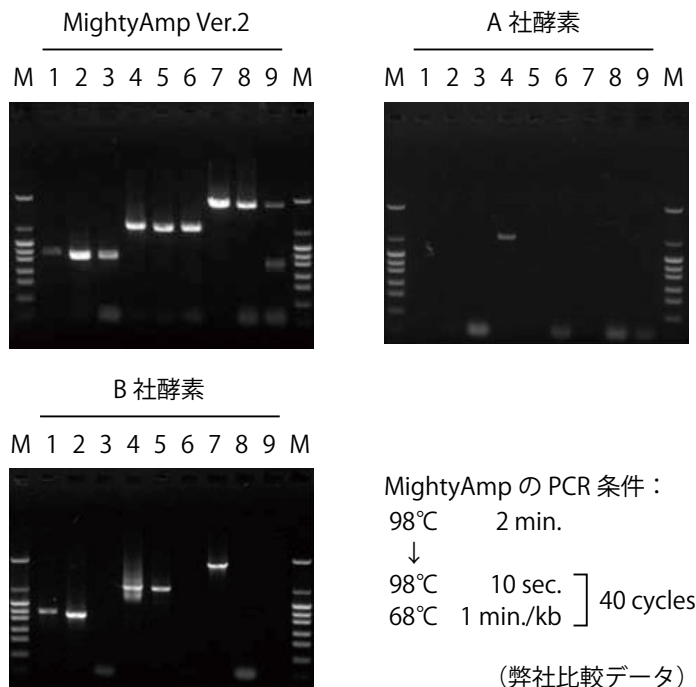
total volume : 25  $\mu$ l

PCR 条件 : 98°C 10 sec. }  
60°C 30 sec. } 30 cycles  
72°C 1 min./kb }

鎖長	ターゲット
M. pHY Marker	
1. 542 bp	<i>Hbb-b1</i>
2. 1,965 bp	<i>Tfr</i>
3. 3,985 bp	<i>Ccnd2</i>

### A-3. ヒト爪から調製した DNA 抽出液による PCR

ヒト爪 5 mg に SimplePrep reagent for DNA を 44  $\mu$ l 添加し、標準プロトコールに従って 37°C 6 分、95°C 3 分インキュベートした後、滅菌精製水を 80  $\mu$ l 添加し混合した。上清 (抽出液) 2.5  $\mu$ l を鋳型として (25  $\mu$ l 反応系)、1 kb (GC 含量 26%、50% および 72%)、2 kb (GC 含量 27%、50% および 69%)、4 kb (GC 含量 33%、44% および 63%) の領域をターゲットに、MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 と A 社および B 社阻害物質耐性酵素を用いてそれぞれ推奨条件で PCR 増幅を行った。各反応液 3  $\mu$ l を電気泳動に供し、反応性を比較した。



[ ターゲット遺伝子	増幅サイズ (GC 含量) ]
1 : UCRchr9*1	1.1 kb (26%)
2 : EGFR	1.0 kb (50%)
3 : TGFB1	1.0 kb (72%)
4 : UCRchr11*2	2.2 kb (27%)
5 : IGF2R	2.0 kb (50%)
6 : IGF1	2.0 kb (69%)
7 : FMR1	4.0 kb (33%)
8 : EGFR	3.8 kb (44%)
9 : TGFB1	4.0 kb (63%)
M : pHY Marker	

- \* 1 : UCRchr9 : 9 番染色体 AT リッチな uncoding region
- \* 2 : UCRchr11 : 11 番染色体 AT リッチな uncoding region

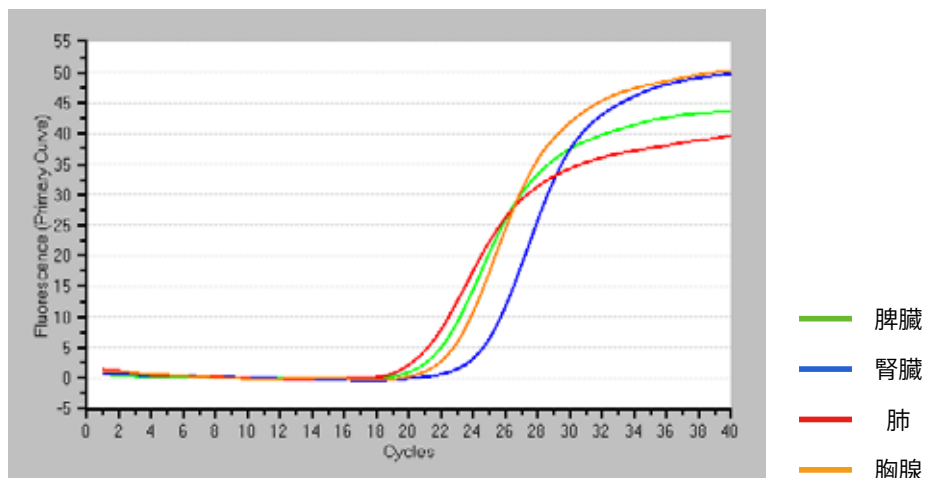
#### 【結果】

A 社および B 社阻害物質耐性酵素ではターゲットの鎖長や GC 含量によっては増幅不可や増幅不良の結果となったが、MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 ではすべてのターゲットに対し目的サイズの増幅結果を得ることができた。DNA 抽出が難しいヒト爪から簡便な操作で調製した抽出液が鋳型の場合でも、MightyAmp を用いることで、特異的増幅が難しい GC リッチや AT リッチなターゲットであっても効率よく PCR 増幅することができた。

## B. リアルタイム PCR による解析

### B-1. マウス臓器から調製したDNA抽出液によるリアルタイムPCR(インターカレーター法)

マウス各種臓器(約2 mg)から標準プロトコールを用いて調製したDNA抽出液を使用し、インターカレーター法によるリアルタイムPCRを行った。その結果、マウス脾臓、腎臓、肺、胸腺由来のDNA抽出液で、検出が可能であった。



DNA 抽出液使用量： 2  $\mu$ l  
total volume： 25  $\mu$ l  
ターゲット： *Hbb-b1*  
装置： Thermal Cycler Dice Real Time System

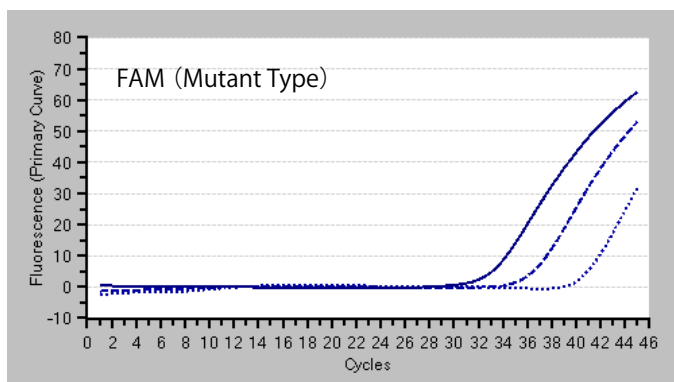
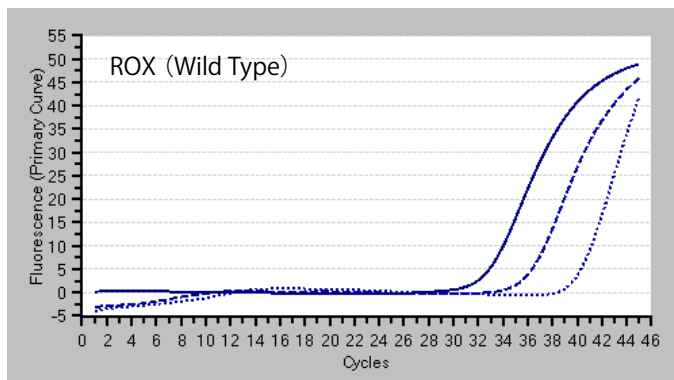
PCR 条件： 95°C 30 sec.  
↓  
95°C 5 sec. } 40 cycles  
60°C 30 sec. }  
↓  
融解曲線分析

※ 上記のほか、マウス脳、肝臓、尾由来のDNA抽出液でも検出が可能であった。



## B-2. ヒト口腔粘膜細胞から調製した DNA 抽出液によるリアルタイム PCR (サイクリングプローブ法)

ヒト口腔粘膜細胞より標準プロトコルを用いて調製した抽出液を使用し、Cycleave Human ALDH2 Typing Probe/Primer Set Ver.2 (製品コード CY403) により ALDH2 のタイピングを行った。抽出液の原液から 100 倍希釈液まで正確な判定が行えた。下图の結果より、今回はヘテロと判定された。



実線：抽出液原液、破線：10 倍希釈液、点線：100 倍希釈液

### ヒト口腔粘膜細胞回収方法

- (1) 口腔内を滅菌済み綿棒で数回拭う。
- (2) 綿棒を PBS 入りのチューブ内で洗い、細胞を懸濁する。
- (3) 3,500 rpm、5 分間の遠心により細胞を回収する。

リアルタイム PCR 試薬：Cycleave Human ALDH2 Typing Probe/Primer Set Ver.2  
(製品コード CY403)

CycleavePCR® Reaction Mix (製品コード CY505A)

DNA 抽出液使用量：2  $\mu$ l

ターゲット：ALDH のタイピング

装置：Thermal Cycler Dice Real Time System

PCR 条件：95°C 10 sec.

↓

95°C 5 sec. }  
53°C 15 sec. } 45 cycles  
72°C 15 sec. }

## V. Q & A

- Q1. リアルタイム PCR 用のテンプレートとして使用できますか。  
A1. 本試薬を用いた DNA 抽出液で、インターカレーター法およびサイクリングプロンプ法での検出を確認しています。ただし、本キットで調製した DNA 抽出液を用いた定量実験は行えません。定性目的の実験にご使用ください。リアルタイム PCR には、標準プロトコールならびに簡易プロトコールで調製した抽出液共に、反応系に対し 1/10 量まで添加可能です。

- Q2. 試料の最適処理量を教えてください。

- A2. 以下の表に示します。

試料	推奨量	使用可能量
マウス肝臓	10 mg まで	1 ~ 20 mg
マウス腎臓	10 mg まで	1 ~ 20 mg
マウス尻尾	3 mm (約 5 mg)	2 ~ 4 mm (約 2 ~ 10 mg)
ヒト爪	5 mg	1 ~ 5 mg
(EDTA 血)	(2 $\mu$ l)	(1 ~ 5 $\mu$ l)

- Q3. 増幅鎖長はどのくらいまで可能ですか。

- A3. *TaKaRa Ex Taq* Hot Start Version (製品コード RR006A)、または PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (製品コード R050A) を用いて、4 kb までの増幅を確認しています。(サンプル：マウスの尾由来 DNA 抽出液、ターゲット：ヘモグロビン) サンプルの種類および増幅ターゲットなどにより増幅可能なサイズは異なりますので、ご注意ください。

- Q4. 血液より DNA 抽出液を調製できますか？

- A4. 下記の方法により、EDTA 血からの調製が可能でした。

1. 試薬 Mix (標準プロトコール 44  $\mu$ l、簡易プロトコール 64  $\mu$ l) に EDTA 血を 2  $\mu$ l 添加し、混和後に熱処理を行う。
2. 標準プロトコールの場合は、インキュベート後に滅菌精製水を 80  $\mu$ l 加え、ピペットで緩やかに混和する。
3. 遠心操作を行わずに、そのまま PCR の鋳型として使用する。  
※ 血液からの DNA 抽出液の PCR には、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (製品コード R050A) の使用をお勧めします。

- Q5. 爪から DNA 抽出液を調製できますか？

- A5. 爪は個体差が大きく、サンプルにより抽出効率もかなり異なります。調製時に爪を細かく切ったものを使用いただくことで、抽出量が上がることがあります。

通常、爪から調製した抽出液に含まれる DNA は微量であるため、リアルタイム PCR では増幅が確認できますが、通常の PCR では増幅が確認できない場合があります。通常の PCR の場合は、Cycle 数を 40 cycles 程度に増やしてお試しください。

爪から調製した抽出液による PCR には、MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 (製品コード R071A) の使用をお勧めします。

## VI. 関連製品

Tks Gflex™ DNA Polymerase (製品コード R060A/B)  
MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.2 (製品コード R071A/B)  
*TaKaRa Ex Taq*® Hot Start Version (製品コード RR006A/B)  
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (製品コード R050A/B)

## VII. 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。
- *TaKaRa Ex Taq*、PrimeSTAR、Thermal Cycler Dice、CycleavePCR はタカラバイオ株式会社の登録商標です。SimplePrep、Tks Gflex、MightyAmp、*Premix Ex Taq* 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**