

Rapid Indel Detection Kit

Code No. 313-08921

マニュアル(第1版)202003sa

I 製品説明

「Rapid Indel Detection Kit」は、ゲノム編集技術による変異導入を迅速に確認できるキットです。本品は、簡易 DNA 抽出試薬、高正確性 PCR 酵素、変異（挿入または欠失：Indel）の検出に使用する T7 Endonuclease I reaction Mix で構成されています。

<特長>

- ・細胞から約 15 分間で迅速に DNA を抽出可能。
- ・PCR と電気泳動で簡単に変異の有無を検出可能。
- ・変異導入クローンのスクリーニングが可能。

II 製品内容

構成品名	容量 (50 回用)
Template Prepper A	1.3 ml × 2 本
Template Prepper B	1.3 ml × 2 本
2 × Go-to PCR Mix	625 μl × 1 本
T7 Endonuclease I reaction Mix	50 μl × 1 本

保存温度：-20℃保存

(キット構成品のうち、「Template Prepper A/B」のみ、4℃または室温保存も可能です。)

III プロトコール

<キット以外に用意するもの>

- ・マイクロピペットおよびピペットチップ
- ・1.5 ml マイクロチューブ
- ・ボルテックスミキサー
- ・簡易遠心機
- ・遠心分離機
- ・ヒートブロック (95℃~100℃)
- ・氷
- ・PCR チューブおよび PCR 装置
- ・標的部位を増幅する PCR プライマー
- ・ddWater (DNase free)
- ・アガロースゲル電気泳動用試薬および装置一式

1) ゲノム DNA 抽出

- ・ヒートブロックを 95℃~100℃に設定しておく。
 - ・「Template Prepper A/B」が凍結している場合は、使用前に室温で融解し、混合して均一にしておく。
- ① 試料^{*1)}に Template Prepper A を 50 μl 加え、ボルテックスで 5 秒間攪拌する。
 - ② スピンドアウンして、室温で 5 分間静置。^{*2)}
 - ③ Template Prepper B を 50 μl 加え、ボルテックスで 5 秒間攪拌する。
 - ④ スピンドアウンして、95℃~100℃で 5 分間加熱。^{*2)}
 - ⑤ 氷上で 2 分間静置。
 - ⑥ 15,000 × g で 5 分間遠心。
 - ⑦ 不溶物を取らないように上清を新しいチューブに分取し、DNA 溶液とする。

*1) 試料量の目安：

- ・培養細胞 5 × 10⁴ – 1 × 10⁶ cells
- ・マウス尾 1–2 mm

*2) スピンドアウン後、試料が完全に試薬の中に浸っていることを確認してから、加熱する。

2) PCR 増幅

- ① PCR チューブに以下の組成で反応液を調製する。

2 × Go-to PCR Mix	12.5 μl
Primer Mix (10 μM each)	1 μl
1)で抽出した DNA 溶液	1 μl
ddWater (DNase free)	10.5 μl
Total	25 μl

- ② 下記の条件で PCR を行う。

95℃	2 分間	× 1 サイクル
↓		
95℃	20 秒間	} × 35 サイクル
X℃ ^{*3)}	20 秒間	
72℃	15 秒間	
↓		
72℃	5 分間	× 1 サイクル

③ アガロースゲル電気泳動を行い、目的産物が増幅していることを確認する。^{*4), *5)}

*3) 使用するプライマーに合わせてアニーリング温度を決定する。

*4) PCR産物が得られない、または少ない場合：

- ・ Primer の設計を見直す。
- ・ 鋳型 DNA の添加量を増やす。
- ・ PCR 条件を検討する。
- ・ DNA を抽出する際の試料量を増やす。

*5) 非特異的産物が見られる場合：

- ・ PCR 条件（アニーリング温度）を検討する。
- ・ 鋳型 DNA を希釈する。

*7) 電気泳動の結果、切断が見られない場合：

- ・ 3)-②の37°Cの反応時間を30分～60分に延ばしてみる。
- ・ ゲノム DNA に変異が入っていない。
- ・ 標的切断部位から100 bp以上離れた位置にPCRプライマーを設計する。

*8) 非特異的切断が見られる場合：

- ・ 3)-②の反応温度を25°Cに下げ、反応時間を30分～60分に延ばしてみる。
- ・ スピнкаラムなどを用いて2)で増幅したPCR産物を精製した後、終濃度100 mMになるようNaClを添加してから、変性、アニーリングを行ってから変異の検出を行う。アニーリング方法は3)-①及び*6)を参照。

3) 変異の検出

① サーマルサイクラーを用いて2)で増幅したPCR産物の変性とアニーリングを行う。^{*6)}

2)で増幅した PCR 産物	100-250 ng
ddWater (DNase free)	up to 9 µl
↓	
95°C	5 分間
95°C → 85°C	2°C/秒
85°C → 25°C	0.1°C/秒
↓	
基質 DNA 断片	

② 酵素反応を行う。

基質 DNA 断片	9 µl
T7 Endonuclease I reaction Mix	1 µl
Total	10 µl
↓	
37°C	15 分間

③ アガロースゲル電気泳動を行い、変異の検出を行う。^{*7), *8)}

*6) PCR産物を精製してから使用する場合は、終濃度100 mMになるようNaClを添加してから、PCR産物の変性とアニーリングを行う。

例) PCR 産物	100-250 ng
10×アニーリング Buffer※	1 µl
ddWater (DNase free)	up to 9 µl

※100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 M NaCl

IV 関連製品

製品名	Code No.
Cas9 Nuclease protein NLS (3 µg/µl)	319-08641
Cas9 Nuclease protein NLS (15 µg/µl)	316-08651
CUGA [®] 7 gRNA Synthesis Kit	314-08691
Template Prepper for DNA	316-08911
Go-to DNA Polymerase	319-08663
Distilled Water, Deionized, Sterile	318-90105
ISOSPIN PCR Product	315-08001
T7 Endonuclease I reaction Mix	313-08801
Agarose S	312-01193
50× TAE	313-90035
6× Loading Buffer Orange G	317-90251
Gene Ladder 100 (0.1-2 kbp)	316-06951
EtBr Solution	315-90051

製品安全データシートや、実験例などは、ニッポンジーン Web サイトをご覧ください。

本品は、試薬(試験研究用)として販売しているものです。
医薬品の用途には使用しないでください。