

研究用

TaKaRa

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit

説明書

PCRは非常に高感度な検出方法であるため、以前に行ったPCR増幅産物のキャリーオーバーによる偽陽性が生じる場合があります。エンドポイントPCRにおいて、特に食品・環境検査に利用する場合などにおいて非常に重大な問題となります。本製品は、PCRの基質としてdTTPの代わりにdUTPを使用し、ウラシルを含むDNAを分解する酵素であるUNG(Uracil-N-glycosylase)を利用して、このようなキャリーオーバーによる偽陽性を防止するための製品です。PCR前にUNGを作用させると、ウラシルを含む前段階におけるPCR産物はUNGにより分解されますが、通常の鋳型は分解されないため、PCR産物のみを選択的に除去することができます。

UNGによる分解は次のように起こります。PCR前の25℃、10分の反応で、UNGによりPCR反応液に混入したウラシルを含むPCR増幅産物中のデオキシリボースとウラシル塩基の間のN-グリコシド結合が加水分解され、脱ピリミジン部位が生じます。続いて95℃、2分の熱処理により、UNGが失活すると同時に混入DNA断片は脱塩基部位でリン酸バックボーンの加水分解により切断、分解されます。UNGは、一本鎖と二本鎖のウラシルを含むDNAを加水分解しますが、RNAに対しては作用しません。本製品には、UNGの他、dUTPを含むdNTP MixtureとMgCl₂溶液が添付されています。TaKaRa Taq™ Hot Start Version (製品コードR007A/B)などのPol I型PCR酵素と組み合わせて使用してください。

I. 内容 (200回反応分：PCR 50 μl反応系)

1. UNG (2 U/μl)	100 μl
2. dU plus dNTP Mixture* (12.5 ×)	800 μl
3. MgCl ₂ (25 mM)	1 ml

*：dU plus dNTP Mixture：以下の組成の水溶液（ナトリウム塩）です。

dUTP	7.5 mM
dATP	2.5 mM
dGTP	2.5 mM
dCTP	2.5 mM

II. 保存

－20℃

III. 本製品以外に必要な試薬、機器 (主なもの)

PCR用酵素

- ・TaKaRa Taq Hot Start Version (製品コードR007A/B)、TaKaRa Taq (製品コードR001A/B)などのPol I型のPCR酵素

【注】校正活性を有するα型酵素はウラシルを含有する鋳型に結合しPCR阻害を引き起こす場合があるため、α型PCR酵素およびα型PCR酵素を含有するブレンド酵素と本製品を組み合わせることは推奨しません。

マイクロピペット

マイクロピペット用チップ

サーマルサイクラー

IV. 操作上の注意

反応液の調製から検出まで、次の4つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します。コンタミネーション発生の原因となりますので、エリア4以外では増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。

- エリア1：PCR反応液の調製、分注を行います。
- エリア2：検体の調製を行います。
- エリア3：PCR反応液へ鋳型の添加を行います。
- エリア4：電気泳動等でPCR増幅産物の解析を行います。

V. 操作

TaKaRa Taq Hot Start Version (製品コード R007A/B) を使用する場合

1. 下記に示す反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)
鋳型(検体サンプル等)以外のコンポーネントを必要本数 + α 分調製し、反応チューブに分注後、軽くふたをする。

試薬	使用量	最終濃度
TaKaRa Taq Hot Start Version (5 U/ μ l)	0.25 μ l	
10 \times PCR Buffer (Mg ²⁺ plus)* ¹	5 μ l	
dU plus dNTP Mixture* ²	4 μ l	
MgCl ₂ * ^{2,3}	1.5 μ l	
UNG* ^{2,4}	0.5 μ l	
Template	< 500 ng	
Primer 1	10 ~ 50 pmol	0.2 ~ 1.0 μ M
Primer 2	10 ~ 50 pmol	0.2 ~ 1.0 μ M
滅菌精製水	up to 50 μ l	

*1: TaKaRa Taq Hot Start Version (製品コード R007A/B) に添付されています。

*2: 本製品の試薬です。

*3: dUTP は dTTP の 3 倍濃度に設定されているため、全体的に dNTP 濃度が高くなります。PCR Buffer には MgCl₂ が含まれていますが、MgCl₂ と dNTP の量のバランスを保つため MgCl₂ を追加する必要があります。10 \times PCR Buffer (Mg²⁺ free) を使用する場合には、4.5 μ l 添加してください。

*4: 標準的な使用量は、50 μ l の反応液量の場合、1 反応あたり 1 U です。

2. サンプル(鋳型)を添加する。(エリア 3 で実施)
1. で分注した反応液にサンプル(鋳型)を添加し、しっかりふたをする。
3. 0.2 ml チューブ用の卓上遠心機で軽く遠心を行い、サーマルサイクラーにセットする。
4. UNG 処理と PCR 増幅を行う。
初めに UNG 処理を行い、次に UNG の熱失活を行う。続いて、通常の PCR 条件による増幅を行う。PCR 条件は増幅サイズ等に応じて設定する。

(例) 1 kb DNA を増幅する場合

25°C	10 分 (UNG 処理)* ¹	} 30 サイクル
95°C	2 分 (UNG の熱失活)* ¹	
98°C	10 秒* ²	
55°C	30 秒	
72°C	1 分* ³	

*1: UNG 処理の条件は、増幅鎖長に関係なく一定です。

*2: PCR の変性の条件は、サーマルサイクラーの使用機種と反応チューブの種類に合わせて設定してください。設定の目安としては、98°C の場合は 5 ~ 10 秒、94°C の場合は 20 ~ 30 秒です。

*3: 本製品では、dTTP の代わりに dUTP を使用するため、やや増幅効率が低下する場合があります。増幅効率が悪い場合は、伸長反応時間を延長してください。

5. PCR 反応液を電気泳動等で分析する。(エリア 4 で実施)

VI. 実験例

1. 通常の PCR との増幅効率の比較

【方法】*TaKaRa Taq* Hot Start Version と本製品を用いて、通常の PCR 組成と UNG を使用する場合の PCR 組成での増幅効率の比較を行った。鋳型にはヒトゲノム DNA を 50 ng 使用し、約 500 bp の領域の増幅を行った。

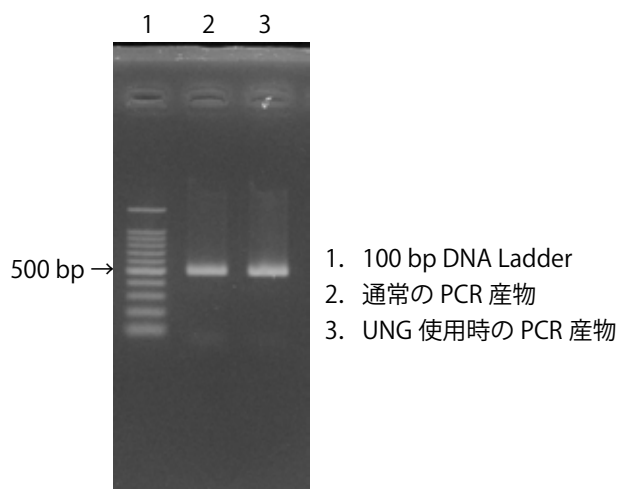
<通常の PCR 組成>

- ・ *TaKaRa Taq* Hot Start Version の推奨条件
- ・ UNG 添加なし、dTTP を含む dNTP Mixture を使用

<UNG を使用する場合の PCR 組成>

- ・ 本製品の推奨条件
- ・ UNG 添加あり、dUTP を含む dU plus dNTP Mixture 使用

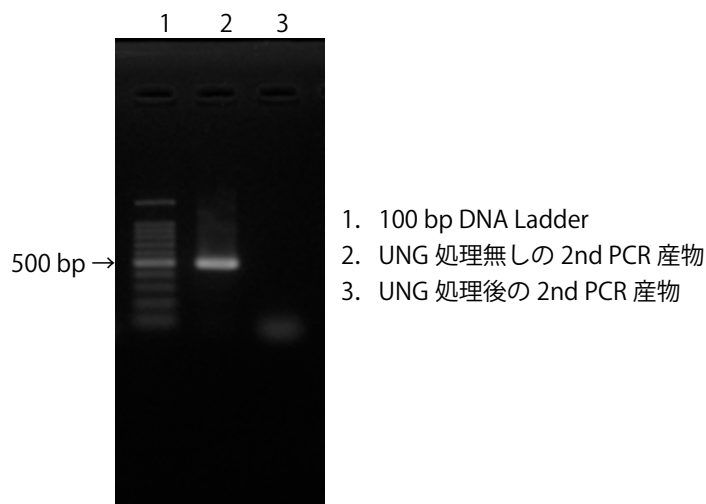
【結果】UNG を使用する場合の PCR 組成でも通常の PCR 組成と同等の効率で良好に増幅できることを確認しました。



2. 増幅産物のキャリーオーバーに対する効果の確認

【方法】本製品の操作法に従い、10 ng のヒトゲノム DNA を鋳型として約 500 bp の PCR 増幅を行った (PCR 1 回目)。次に、この PCR 増幅産物 2 μ l を鋳型として UNG 処理有り、無しの方で 1 回目と同様の PCR 増幅を行い (PCR 2 回目)、キャリーオーバーに対する効果を確認した。

【結果】2 回目の PCR で UNG を添加しなかった場合には、1 回目の PCR 産物を鋳型とした PCR 増幅が認められましたが、2 回目の PCR で UNG を添加した場合には、PCR 増幅は認められず、キャリーオーバーに対する抑制効果を確認できました。



VII. 関連製品

Uracil DNA Glycosylase (UNG), heat-labile (製品コード 2820)
dU plus dNTP Mixture (12.5 ×) (製品コード 4035)
dUTP (製品コード 4020)
TaKaRa Taq[™] (製品コード R001A/B)
TaKaRa Taq[™] Hot Start Version (製品コード R007A/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)
Mupid-2plus (製品コード M-2P)
Mupid-exU (製品コード EXU-1)
PrimeGel[™] Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
Tris-Acetate-EDTA Buffer (TAE) 50x Powder, pH8.3 (製品コード T9131)
TBE (Tris-borate-EDTA) powder (製品コード T905)
100 bp DNA Ladder (製品コード 3407A/B)

VIII. 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。*TaKaRa Taq*、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