

製品コード 6601

研究用

TaKaRa

TaKaRa PCR Mycoplasma Detection Set

説明書

v201703Da

本セットは、培養細胞等のバイオ材料に夾雑するマイコプラズマを PCR 法を用いて検出するための Primer セットです。マイコプラズマを検出する際、従来の培養法では 1 週間を要していましたが、本セットを用いて PCR を行い、増幅バンドを電気泳動で確認することにより、数時間で判定結果を得ることができます。

本セットは、培養細胞によく見い出されるものをはじめとして、少なくとも *Mycoplasma* 属中の 11 種 (*M. fermentans*, *M. hyorhinis*, *M. arginini*, *M. orale*, *M. salivarium*, *M. hominis*, *M. pulmonis*, *M. arthritidis*, *M. neurolyticum*, *M. hyopneumoniae*, *M. capricolum*) および *Ureaplasma* 属中の 1 種 (*U. urealyticum*) を感度よく検出することができるようデザインされています。

なお、本セット中には PCR に必要な DNA Polymerase、dNTP は含まれておりません。別売りの *TaKaRa Taq*[™] (dNTP Mixture, 10 × PCR Buffer 添付) や *TaKaRa Ex Taq*[®] (dNTP Mixture, 10 × *Ex Taq*[™] Buffer 添付) との使用により最高の効率が得られるようにデザインされています。

I. 内容 (100 反応分 ; 50 μl 反応系)

- | | |
|--------------------------------|-------|
| 1. MCGp F1 Primer (20 pmol/μl) | 50 μl |
| 2. MCGp R1 Primer (20 pmol/μl) | 50 μl |
| 3. MCGp F2 Primer (20 pmol/μl) | 50 μl |
| 4. MCGp R2 Primer (20 pmol/μl) | 50 μl |
| 5. Control Template (1 ng/μl) | 50 μl |

【関連製品】 *TaKaRa Taq* (製品コード R001A/B/C)
TaKaRa Taq Hot Start Version (製品コード R007A/B)
(dNTP Mixture, 10 × PCR Buffer 添付)
TaKaRa Ex Taq (製品コード RR001A/B/C)
TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (製品コード RR006A/B)
(dNTP Mixture, 10 × *Ex Taq* Buffer 添付)

II. 保存 — 20°C

III. 原理

rRNA の塩基配列は、マイコプラズマを含め原核生物の間で非常によく保存されている。これに対して rRNA オペロン上の rRNA をコードする DNA 間のスペーサー領域、例えば 16S と 23S 間の領域の長さおよび配列は、生物種によって大きく異なっている。このスペーサー領域は、マイコプラズマのそれぞれの種間でもかなり異なる部分もあるがよく保存されている配列も存在する^{1,2)}。本セットを用いた PCR 法による検出システムでは、このスペーサー領域を、16S と 23S の rRNA をコードする DNA 上の 2 つのプライマー F1 と R1 を用いて増幅した後、この保存配列に基づいてデザインされたプライマー (図 1 の F2) と 23S DNA 上のプライマー R2 を用いて Nested PCR で増幅する。この系を用いれば PCR 反応系に混入してくる培養細胞等の他の生物種由来の DNA に影響されずにマイコプラズマの DNA のみを特異的に増幅することができるので、マイコプラズマ検出の感度及び特異性を上げることができる。表 1 に本セットの中に含まれている 4 つのプライマー配列と、これに対応する 12 種のマイコプラズマの 16S-Spacer-23S 領域中の配列を示す。

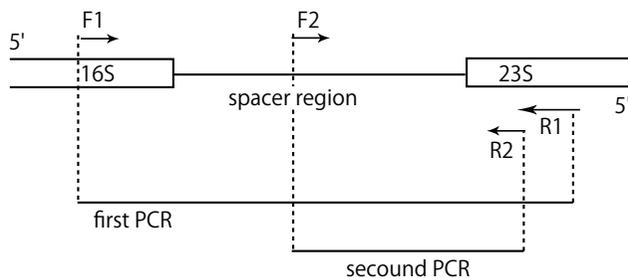


図 1. PCR 法によるマイコプラズマの検出原理

表 1. プライマー配列と、それに対応するマイコプラズマ DNA 上の配列

	F1 5'ACACCATGGGAGCTGGTAAT3'	R1 5'CTTCATCGACTTTCAGA-CCCAAGGCAT3' T C
<i>M. fermentans</i>A.....T.....
<i>M. hyorhinis</i>T.....	...A.....T.....
<i>M. orale</i>T.....T.....
<i>M. hominis</i>T.....T.....
<i>M. salivarium</i>T.....T.....
<i>M. arginini</i>A.....C.....
<i>M. capricolum</i>A...T.....	...T...G...C...TTTT.....
<i>M. arthritis</i>A.....C.....
<i>M. neurolyticum</i>T.....	...A.....C.....
<i>M. pulmonis</i>T.....C.....
<i>M. hyopneumoniae</i>T.....	...C...A.....T.....
<i>U. urealyticum</i>	...A...T.....	...A...C...GTTT...T.....
<i>E. coli</i>TG...TGC	...A...C...CTG...CT-G...G.....
<i>B. subtilis</i>C...A...T...T...C	...A...G...CCT...T-G.....

	F2 5'GTTCTTTGAAAAGTGAAT3'	R2 5'GCATCCACCAAAAAGTCT3' T T
<i>M. fermentans</i>C.A.....
<i>M. hyorhinis</i>A.T.....
<i>M. orale</i>	A.....A.A.....
<i>M. hominis</i>A.A.....
<i>M. salivarium</i>A.A.....
<i>M. arginini</i>A.A.....
<i>M. capricolum</i>T...T.TG.....
<i>M. arthritis</i>A.A.....
<i>M. neurolyticum</i>	A.....T.T.T.....
<i>M. pulmonis</i>A.....T.C.A.....
<i>M. hyopneumoniae</i>	...C...C.....A.T.....
<i>U. urealyticum</i>	...A.....	...T...T.AG.....
<i>E. coli</i>	-----GTGT...G...
<i>B. subtilis</i>AG...GTGCG.C...

ドット (・) はプライマー配列と同じ塩基であることを示す。

(-) はプライマー配列の塩基がないことを示す。

IV. 使用に際して

本製品は遺伝子検出であるため、不活化された細菌も検出し、生菌のみを検出対象とするものではありません。

また、設計した Primer の配列内に遺伝子の変異や欠損／挿入が生じた際には、検出できない場合があります。

(検査結果判定により発生する問題に関して、タカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。)

V. 操作上の注意

本製品で行う Nested PCR は非常に感度の高い検出方法です。1st PCR 産物を 2nd PCR 反応に用いる際などにクロスコンタミネーションを起こさないよう、十分ご注意ください。Control Template が、Primer や PCR 酵素などの試薬に誤って混入すると、正しい検出を行うことができなくなりますので、Control Template の取扱いには特にご注意ください。また、反応液の調製を行う場所と増幅産物の電気泳動を行う場所を物理的に分けるなど、コンタミネーション防止を心がけてください。

VI. 操作

マイコプラズマ検出用のサンプルには、継代後、3～6 日間細胞培養を行った培養上清を用いてください。Eagle 等、通常の細胞培養用培地を用いた場合、培養上清を直接 PCR の反応系に加えマイコプラズマの DNA を増幅させることが出来ます。添加する培養上清の量は反応系の 1/10 までとしてください。細胞懸濁液をサンプルとする場合は、いったん DNA を抽出回収し、PCR 反応に使用してください。サンプル中に PCR 反応の阻害物質が含まれている場合は、マイコプラズマの検出が正確に行われず可能性があります。阻害物質が含まれているかどうかを確認するためには、サンプルに Control Template を加えたものを用いて Control 実験を行ってください。もし、バンドの増幅が見られない場合には、サンプルから DNA を抽出し PCR 反応に使用してください。(D.Control 実験 参照)

A. 1st PCR

1. 以下の手順で試薬を加えて混合し、反応液を準備する。

滅菌精製水	34.75 ~ 39.25 μ l
10 \times PCR Buffer (or 10 \times Ex Taq Buffer)	5 μ l
dNTP Mixture	4 μ l
MCGp F1 Primer	0.5 μ l
MCGp R1 Primer	0.5 μ l
TaKaRa Taq (or TaKaRa Ex Taq)	0.25 μ l

2. 1. の反応液を混合する。
3. クロスコンタミネーションを起こさないように注意しながら PCR 反応液量が 50 μ l になるようにサンプル (5 μ l 以下) を反応系に加える。
4. サーマルサイクラーを以下の条件に設定し、PCR を行う。

94°C	30 sec.	} 30 ~ 35 cycles
	↓	
94°C	30 sec.	
55°C	2 min.	
72°C	1 min.	

B. 2nd PCR

1. 以下の手順で反応液を調製する。

滅菌精製水	39.25 μ l
10 \times PCR Buffer (or 10 \times Ex Taq Buffer)	5 μ l
dNTP Mixture	4 μ l
MCGp F2 Primer	0.5 μ l
MCGp R2 Primer	0.5 μ l
TaKaRa Taq (or TaKaRa Ex Taq)	0.25 μ l

2. 1. の反応液を混合する。
3. クロスコンタミネーションを起こさないように注意して、1st PCR の反応産物を 0.5 μ l* 加える。

* : 鮮明な PCR 産物を得るためには、1st PCR の反応産物原液の他に、10 倍希釈、100 倍希釈した反応産物を、それぞれ 0.5 μ l 加えて PCR を行うとよい。

4. サーマルサイクラーを以下の条件に設定し、PCR を行う。

94°C	30 sec.	} 30 ~ 35 cycles
↓		
94°C	30 sec.	
55°C	2 min.	
72°C	1 min.	

C. 増幅産物の電気泳動による解析

1. 反応終了後 1st PCR、および 2nd PCR の反応産物より各 10 μ l とり、電気泳動に供する。
2. アガロースゲル電気泳動により増幅断片の有無、およびその大きさ* をチェックする。1st PCR の反応産物は、例えば 1% アガロースゲル [Agarose L03 「TAKARA」(製品コード 5003) など] を用いて解析を行う。2nd PCR の反応産物は、2 ~ 4% のアガロースゲル [PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A) など] を用いて解析を行う。

* : 表 2 に 12 種のマイコプラズマの DNA をそれぞれ鋳型とし、2 種のプライマー対を用いて増幅を行った場合の増幅断片の大きさを示す。

表 2. 12 種類のマイコプラズマ属における増幅断片の大きさ

	F1 and R1 (bp)	F2 and R2 (bp)
<i>M. hyopneumoniae</i>	681	237
<i>M. neurolyticum</i>	501	196
<i>M. fermentans</i>	491	195
<i>M. pulmonis</i>	477	189
<i>M. hyorhinis</i>	448	211
<i>M. orale</i>	423	179
<i>M. capricolum</i>	415	179
<i>M. arthritidis</i>	408	157
<i>M. salivarium</i>	403	151
<i>M. hominis</i>	370, 369	147, 148
<i>M. arginini</i>	369	145
<i>U. urealyticum</i>	482, 481	154

D. Control 実験

Control Template (0.5 μ l) をサンプル中に加えれば PCR がうまく働いていること、すなわち PCR の反応阻害が起きていないことをチェックすることができる。Control Template を用いた場合には、F1 と R1 のプライマーで 810 bp、F2 と R2 のプライマーで 590 bp の DNA 断片が増幅する。

- 注意
- 1) Control Template 由来のバンドが検出できない場合は、サンプル中に PCR の阻害物質が含まれていると考えられるため、サンプルより DNA を抽出し、それを Template として用いてください。
 - 2) Control Template は PCR 反応自体をチェックするためのものです。Control Template を加えた場合、サンプル中にマイコプラズマが含まれていてもマイコプラズマ由来のバンドが検出できないことがありますので、判定には使用しないでください。
 - 3) サンプル中に多量のマイコプラズマが含まれている場合には、マイコプラズマ由来のバンドのみが検出され、Control Template 由来のバンドが検出できない場合があります。
 - 4) Control Template は人工的に作成したもので、内部配列にマイコプラズマの配列は含んでいません。

VII. Application (*Mycoplasma* と *Ureaplasma* の PCR による検出)

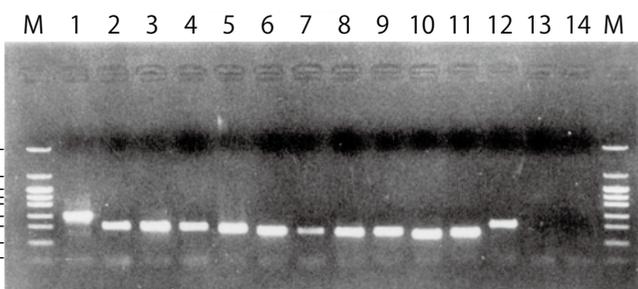
11 種類のマイコプラズマと 1 種類のウレアプラズマを培養して、DNA を調製し、PCR 反応を行った (100 μ l 反応系で実施)。ブランクとしてヒト DNA とマウス DNA をそれぞれ鋳型とした PCR 反応も同時に行った。

【結果】

1st PCR

(bp)

4870
2016
1360
1107
926
658
489
267
80



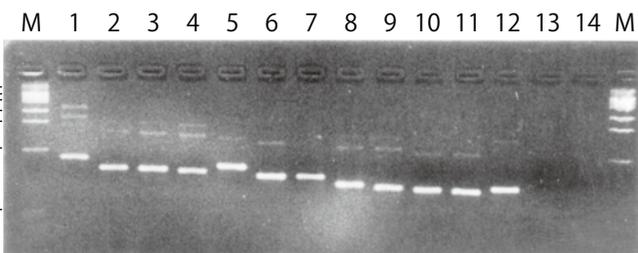
Lane M : pHY Marker

- 1 : *M. hyopneumoniae*
- 2 : *M. neurolyticum*
- 3 : *M. fermentans*
- 4 : *M. pulmonis*
- 5 : *M. hyorhinis*
- 6 : *M. orale*
- 7 : *M. capricolum*
- 8 : *M. arthritis*
- 9 : *M. salivarium*
- 10 : *M. hominis*
- 11 : *M. arginini*
- 12 : *U. urealyticum*
- 13 : human DNA
- 14 : mouse DNA

2nd PCR

(bp)

1360
1107
926
658
489
267
80



1st PCR だけのマイコプラズマの検出限界は、*M. capricolum* で 1 ng、*M. hyopneumoniae* と *U. urealyticum* で 100 pg、その他のマイコプラズマで 10 pg であった。ただし、ヒト・マウス DNA 100 ng を用いると、非特異的バンドが現われた。

2nd PCR を行った場合のマイコプラズマの検出限界は、*M. capricolum* と *M. hyopneumoniae* で 100 fg、その他のマイコプラズマで 10 fg であった。一方、ヒト・マウス DNA 100 ng を鋳型にしても、非特異的バンドは認められなかった。

VIII. Q & A

Q1. 培養上清をサンプルとして使用したいのですが、どのような培地が使用可能ですか？

A1. タカラバイオでは、*TaKaRa Ex Taq*、*TaKaRa Taq* を使用して以下のような結果を得ています。

1. 10% FCS 含有の DMEM、RPMI 培地を用いて、継代後、3～6 日間細胞培養を行った培養上清について、培養上清を直接 PCR の反応系に 1/10 量加えマイコプラズマの DNA を増幅させることが可能でした。
2. FCS 原液を直接 PCR 反応系に 1/10 量加えて反応阻害を起こらないことを確認しました。

Q2. ヒト肺炎のマイコプラズマ (*M. pneumoniae*) は検出できますか？

A2. できません。

IX. 参考文献

- 1) Uemori, T., Asada, K., Kato, I., and Harasawa, R. *System Appl Microbiol.* (1992) **15**: 181-186.
- 2) 上森 隆司、浅田 起代蔵、加藤 郁之進、原澤 亮 マイコプラズマ研究 第 18 回日本マイコプラズマ学会記録 (1991) 29-31.

X. 関連製品

TaKaRa Taq[™] (製品コード R001A/B/C)
TaKaRa Taq[™] Hot Start Version (製品コード R007A/B)
TaKaRa Ex Taq[®] (製品コード RR001A/B/C)
TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version (製品コード RR006A/B)
CycleavePCR[®] Mycoplasma Detection Kit (製品コード CY232)

Spore-EX Spray (製品コード PK-CC91-5053)
Spore-EX Wipes (製品コード PK-CC91-5053-W120)
PromoCidal Spray (製品コード PK-CC91-5052)
Mycoplasma-ExS Spray (製品コード PK-CC91-5051)
AquaGuard-1 (incubator) (製品コード PK-CC01-867-1B)
AquaGuard-2 (water bath) (製品コード PK-CC01-916-500)

XI. 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*、CycleavePCR はタカラバイオ株式会社の登録商標です。*TaKaRa Taq*、*Ex 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