

PCRキャリアオーバーによる 偽陽性を防止!

キャリアオーバーコンタミネーションリスクをゼロに!

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増幅産物のキャリア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・環境検査など同じPCR反応を繰り返し行う場合に危険性が高く、結果に重大な影響を及ぼす恐れがあります。

TaKaRa Taq™ HS PCR Kit, UNG plusは、継続的に使用することで、このようなキャリアオーバーによる偽陽性を防止することができ、遺伝子検査の信頼性がアップします。

dTTPの代わりに**dUTP**を含む基質を用いてPCRを行い、増幅産物にウラシル塩基を取り込ませる。

この増幅産物のコンタミネーション(キャリアオーバー)に対して、**Uracil-N-glycosylase (UNG)**で処理してPCRを行うことで、コンタミネーションした増幅産物は分解され、ウラシルを含まない検体由来のDNAのみが鋳型となる。

偽陽性の発生を防止!

普通にPCRを行う場合



ネガティブコントロールでもバンドが出てしまった…
陽性の検体は本当に陽性といえるのかな…?

TaKaRa Taq™ HS PCR Kit, UNG plusを使用した場合



万一、1回目のPCR産物がコンタミ(キャリアオーバー)しても気にする必要がないので、自信をもって検査できる!

熱感受性UNG、dUTPを含む基質溶液、TaKaRa Taq™ HSをセットにした便利なキット

TaKaRa Taq™ HS PCR Kit, UNG plus NEW

製品コード R013S/A
容量 50回/200回

普段ご使用のTaq DNA Polymeraseをそのまま本キットに置き換えてご利用ください!

R013S (50回; PCR 50 μl反応系) の内容

• TaKaRa Taq™ HS (5 U/μl)	12.5 μl
• 10 × PCR Buffer for UNG plus ^{※1}	250 μl
• dU plus dNTP Mixture (12.5 ×) ^{※2, ※3}	200 μl
• UNG (2 U/μl) ^{※4, ※5}	25 μl

※1: Mg²⁺濃度: 22.5 mM (10 ×)

本キットは、dUTPが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。MgCl₂とdNTPの量のバランスを保つため、通常のTaKaRa Taq™ Hot Start Version (製品コード R007A)に添付の10 × PCR Buffer (Mg²⁺ plus)よりMg²⁺濃度が高くなっています。

※2: 7.5 mM dUTP、2.5 mM dATP、2.5 mM dGTP、2.5 mM dCTPを含む水溶液 (ナトリウム塩)

※3: 別途単品販売も行っています (製品コード 4035)。

※4: 熱感受性UNG: **実験例2をご覧ください。**

※5: 別途単品販売も行っています (製品コード 2820)。

UNGを利用してキャリアオーバーの影響を防止する原理

検体由来DNA

```

.....
A T C A G T
T A G T C A
.....
                
```

↓

```

A U C A G U
U A G U C A
                
```

1回目のPCR

dU plus dNTP Mixtureを用いてPCR増幅[※]

PCR増幅産物

※注意: UNGを利用する場合は、TaKaRa Taq™などのPol I型PCR酵素を使用してください。

校正活性をもつα型PCR酵素はウラシルを含む鋳型の増幅には適さないため、α型PCR酵素やα型酵素を含むブレンド酵素の使用は推奨しません。

キャリアオーバーコンタミネーション

```

.....
A U C A G U
U A G U C A
.....
                
```

↓

```

.....
A   C A G
  A G   C A
.....
                
```

↓

```

.....
A   C A G
  A G   C A
.....
                
```

2回目のPCR

UNG処理 (25°C 10分)

← 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を受け、脱塩基部位が生じる

熱処理 (95°C 2分)

← 脱塩基部位でリン酸バックボーンの加水分解が起こる

dU plus dNTP Mixtureを用いてPCR増幅

PCR増幅産物

```

A U C A G U
U A G U C A
                
```

✗

PCRの鋳型にならない

↓

```

A U C A G U
U A G U C A
                
```

2回目以降もクリアに結果判定が可能!

実験例1：UNGによるキャリーオーバー防止効果

反応液を調製

TaKaRa Taq™ HS (5 U/μl)	0.25 μl
10 × PCR Buffer for UNG plus	5 μl
dU plus dNTP Mixture (12.5 ×)	4 μl
UNG (2 U/μl)	0.5 μl

鋳型、プライマー、滅菌蒸留水を加えて50 μlとする

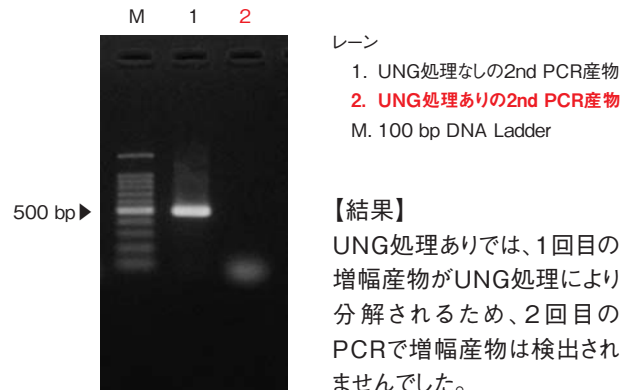
サーマルサイクラーにセットして以下の反応を行う

25°C	10分 (UNG処理)
95°C	2分 (UNGの熱失活)
98°C	10秒
55°C	30秒
72°C	1分

30サイクル

UNG処理はターゲットや増幅鎖長に係らず、この条件で行います。PCR条件はターゲットにあわせて変更してください。

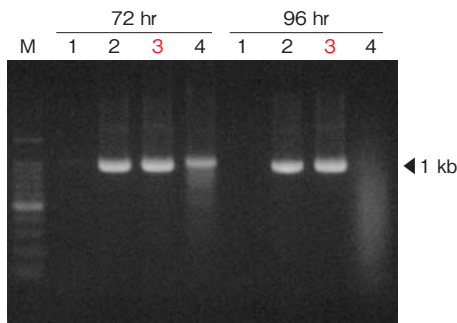
【方法】本キットの操作法に従い、ヒトゲノムDNA 10 ngを鋳型として約500 bpのPCR増幅を行った(PCR 1回目)。このPCR増幅産物2 μlを鋳型として、UNG処理有り、無しで1回目と同様のPCR増幅を行い(PCR 2回目)、キャリーオーバーに対するUNGの効果を確認した。



実験例2：PCR増幅産物の安定性

UNGを用いてキャリーオーバーの影響を防止するPCR反応系では、不完全なUNGの熱失活により、増幅産物が分解されて誤ったPCR検査結果を導く場合があります。特に、ターゲット量が微量で増幅産物が少ない場合に注意が必要です。

本キットに使用している熱感受性のUNGは、50°C 10分の熱処理により完全かつ不可逆的に失活します。キャリーオーバーを確実に不活性化できる量のUNGを加えても、PCRサイクル前の95°C 2分の変性工程で完全に失活させることができます。



【方法】ヒトゲノムDNAから約1 kbの遺伝子断片をPCR増幅した。比較のため、他社製熱感受性UNGを推奨量添加した系でも反応を行った。PCR後、反応液を25°Cで72時間または96時間保温放置して、残存するUNG活性によるPCR産物への影響を比較した。

レーン1. コントロール(鋳型なし)
2. UNG非添加
3. **本キットのUNGを使用**
4. 他社熱感受性UNGを使用
M. 100 bp DNA Ladder

PCR条件：25°C 10分 (UNG処理)
95°C 2分 (UNGの熱失活)
98°C 10秒
55°C 30秒
72°C 1分

35サイクル

【結果】本キットのUNG(Uracil DNA Glycosylase (UNG), heat-labile)を添加して行ったPCR反応系では、室温で96時間置いた後も増幅産物の分解は見られませんでした。

実験例3：通常のPCR反応系との増幅効率の比較

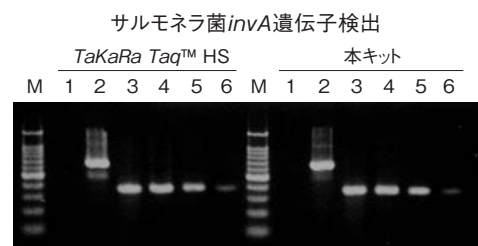
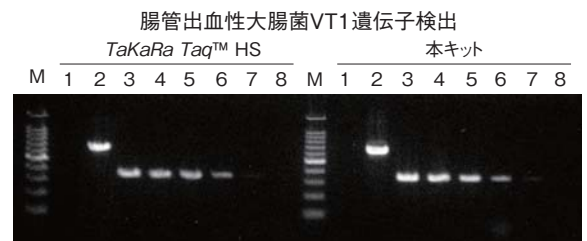
【方法】腸管出血性大腸菌VT1遺伝子検出用Primer Set(製品コードS006)およびサルモネラ菌*invA*遺伝子検出用Primer Set(製品コードS018)を用い、本キットとTaKaRa Taq™ HS(通常のPCR反応系)との増幅効率を比較した。

(右上図：腸管出血性大腸菌VT1)
※鋳型として精製ゲノムDNAを使用
レーン1. 鋳型なし

2. Positive Control EC2 (製品コード S033)
3. 10 ngゲノムDNA
4. 1 ngゲノムDNA
5. 100 pgゲノムDNA
6. 10 pgゲノムDNA
7. 1 pgゲノムDNA
8. 100 fgゲノムDNA
- M. 100 bp DNA Ladder

(右下図：サルモネラ菌*invA*)
※鋳型として菌体熱抽出物を使用
レーン1. 鋳型なし

2. Positive Control SN (製品コード S040)
3. 100,000 cfu 相当ゲノムDNA
4. 10,000 cfu 相当ゲノムDNA
5. 1,000 cfu 相当ゲノムDNA
6. 100 cfu 相当ゲノムDNA
- M. 100 bp DNA Ladder



【結果】本キットによるUNG処理用の反応系は、TaKaRa Taq™ HSを用いた通常のPCR反応系と同等の増幅効率であることが確認できました。

今ご使用のPCR酵素を変更したくない場合には、こちらをご利用ください

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit

製品コード 6088

熱感受性UNG、dUTPを含む基質溶液などからなり、お手持ちのPCR反応系をキャリーオーバーの影響を防止する系に変更できます。

【注意】PCR酵素はTaKaRa Taq™ Hot Start Version(製品コード R007A/B)などのPol I型の酵素を使用してください。
α型PCR酵素や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て使用することは推奨しません。

内容(200回; PCR 50 μl反応系)

- ・ UNG (2 U/μl) *1 100 μl
- ・ dU plus dNTP Mixture**2(12.5 ×) 800 μl
- ・ MgCl₂(25 mM) 1 ml

※1: 熱感受性のUNG
※2: dUTPを含む基質溶液

〈製品一覧〉

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
TaKaRa Taq™ HS PCR Kit, UNG plus	50回	R013S	¥18,000
	200回	R013A	¥58,000
TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit	200回	6088	¥42,000
Uracil DNA Glycosylase (UNG), heat-labile	200 U	2820	¥38,000
dU plus dNTP Mixture (12.5 ×)	800 μl	4035	¥9,800

関連製品	備考
特殊細菌検出用Primer Set & 特殊細菌検出用Positive Control Template	腸管出血性大腸菌などの各種病原菌を検出するためのプライマーセットをラインナップしています(※)。また、Positive Control Templateは、特殊細菌検出用Primer Setを用いて病原菌検出PCRを行う際に、PCR反応が正常に行われているかを確認するために陽性コントロールとしてご使用いただけます。病原菌由来の本来の増幅産物とはサイズが異なる増幅産物が得られるように設計されています。

※特殊細菌検出用Primer Setのラインナップ(一部)をご紹介します(詳しくはウェブカタログをご覧ください。)

- 腸炎ビブリオ
耐熱性溶血毒遺伝子検出用Primer Set VPD-1, -2
耐熱性溶血毒類似毒素遺伝子(*trh1*)検出用Primer Set VPS-1, -2 他
- 毒素原性大腸菌
LT遺伝子検出用Primer Set ELT-1, -2
STh遺伝子検出用Primer Set ESH-1, -2 他
- 腸管出血性大腸菌
VT1遺伝子検出用Primer Set EVT-1, -2
VT2遺伝子検出用Primer Set EVS-1, -2 他
- サルモネラ菌
*invA*遺伝子検出用Primer Set SIN-1, -2
エンテロトキシン遺伝子検出用Primer Set STN-1, -2
- 黄色ブドウ球菌
エンテロトキシンA遺伝子検出用Primer Set SEA-1, -2
エンテロトキシンB遺伝子検出用Primer Set SEB-1, -2
エンテロトキシンC遺伝子検出用Primer Set SEZ-1, -2
エンテロトキシンD遺伝子検出用Primer Set SED-1, -2 他
- ウェルシュ菌
毒素遺伝子検出用Primer Set CPE-1, -2
- 赤痢菌および腸管侵入性大腸菌(EIEC)
*invE*遺伝子検出用Primer Set INV-1, -2 他
- ボツリヌス菌
A型毒素遺伝子検出用Primer Set BAS-1, -2
B型毒素遺伝子検出用Primer Set BBS-1, -2 他

Hot Start PCR: Licensed under U.S. Patent No. 5,338,671 and 5,587,287 and corresponding patents in other countries.

その他のライセンス(最新のライセンス情報)に関しては弊社ウェブサイトにてご確認ください。

本パンフレットに記載されている商品名等は、特に記載はなくても各社の商標、または登録商標です。

・本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用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。

・本パンフレットに記載の価格は2012年1月31日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

タカラバイオ株式会社

東京支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282

関西支店 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995

テクニカルサポートライン

製品の技術的なご質問に専門の係がお応えします。

TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995

Website <http://www.takara-bio.co.jp>

取扱店