

製品コード R013S/A

研究用

TaKaRa

***TaKaRa Taq*[™] HS PCR Kit,
UNG plus**

説明書

v201608Da

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。本製品は、継続的に使用することにより、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。

本製品では、dTTPの代わりにdUTPを基質として用いて、ホットスタートPCR酵素 *TaKaRa Taq HS* による増幅を行います。PCR反応液調製後、ウラシルを含むDNAを分解する酵素であるUNG (Uracil-N-glycosylase) 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、キャリーオーバーの影響を受けずにPCR増幅を行うことができます。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。

I. キットの内容

R013S (50回分、PCR 50 µl反応系)

1. <i>TaKaRa Taq HS</i>	5 U/µl	12.5 µl
2. 10 × PCR Buffer for UNG plus* ¹	10 ×	250 µl
3. dU plus dNTP Mixture* ²	12.5 ×	200 µl
4. UNG	2 U/µl	25 µl

R013A (200回分、PCR 50 µl反応系)

1. <i>TaKaRa Taq HS</i>	5 U/µl	50 µl
2. 10 × PCR Buffer for UNG plus* ¹	10 ×	1 ml
3. dU plus dNTP Mixture* ²	12.5 ×	800 µl
4. UNG	2 U/µl	100 µl

* 1 : Mg²⁺ 濃度 : 22.5 mM (10 ×)

本製品は、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 : 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器具、機器 (主なもの)

- ・ 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。

- エリア 1：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：検体の反応液への添加と反応を行います。
- エリア 4：電気泳動による検出を行います。

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しないでください。

V. 操作

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 HS (5 units/ μ l)	0.25 μ l	
10 \times PCR Buffer for UNG plus	5 μ l	
dU plus dNTP Mixture	4 μ l	
UNG	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	

2. サンプル（鋳型）の添加（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】 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 50 ng を使用し、約 500 bp の領域の増幅を行った。

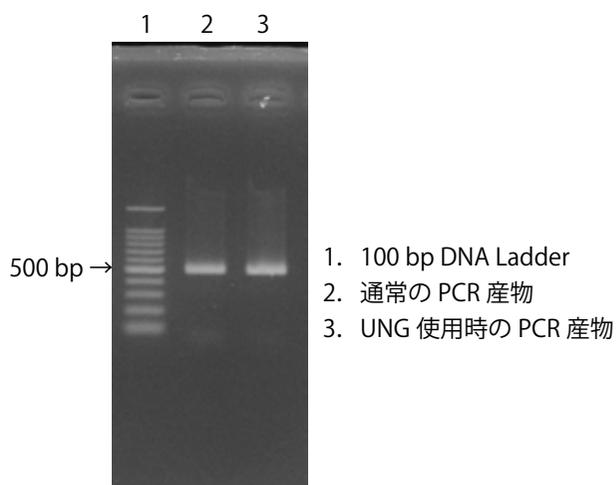
＜通常の PCR 組成＞

- *TaKaRa Taq* Hot Start Version (製品コード R007A) の推奨条件 (伸長時間は 1 分に設定)
- 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 (伸長時間は 1 分に設定)
- UNG 添加あり、dUTP を含む dU plus dNTP Mixture 使用

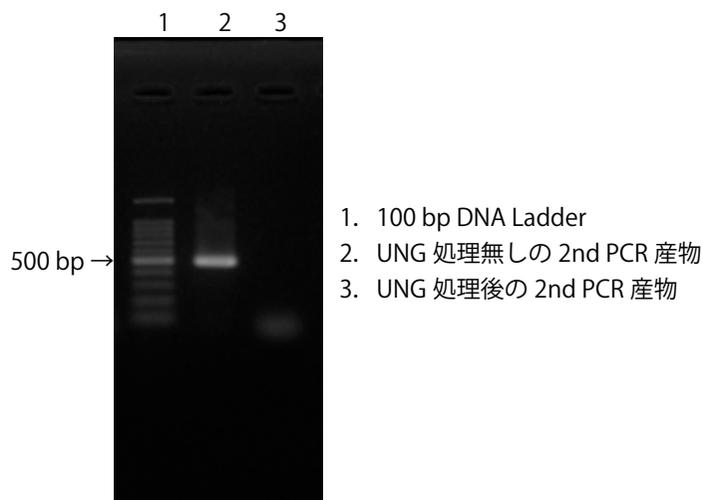
【結果】 UNG を使用する場合の PCR 組成でも通常の PCR 組成と同等の効率で良好に増幅できることを確認しました。



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、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)。次に、この PCR 増幅産物 2 μ l を鋳型として UNG 処理有り、無しの両方で 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 PCR Carryover Prevention Kit (製品コード 6088)
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[®] Gradient (製品コード TP600)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice[®] *Touch* (製品コード TP350)
Mupid-2plus (製品コード M-2P)
Mupid-exU (製品コード EXU-1)
Mupid-One (製品コード O1-01)
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