
TaKaRa

UNG 処理による キャリアオーバーコンタミネーションの防止 ～ 参考データ集 (PCR 増幅効率への影響) ～

特殊細菌検出用 Primer Set 各種 (製品コード S001 ～ S028)
+
TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit (製品コード 6088)
または
TaKaRa Taq[™] HS PCR Kit, UNG plus (製品コード R013S/A)

Application 1

腸炎ビブリオ病原因子遺伝子の検出

～ TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit を用いた実験例～

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit (製品コード 6088) による UNG 処理を併用して、腸炎ビブリオ病原因子遺伝子検出用 Primer Set (製品コード S001/S002/S028)、腸炎ビブリオ病原因子遺伝子検出用 Positive Control Template (製品コード S031/S046) および *TaKaRa Taq* (製品コード R001A/B/C) を用いた PCR 増幅反応を行いました。

UNG 処理を行った場合と行わなかった場合の増幅効率と比較することで、UNG 処理が PCR 増幅効率に影響を及ぼさないことを確認しました。

1. Primer

本実験で用いた Primer と鋳型 (Positive Control Template) を表 1 に示します。

表 1. Primer Set と Positive Control Template (PC) の組み合わせ

Primer Set	検出対象遺伝子	鋳型 (PC)	PC を鋳型とした場合の増幅サイズ
VPD-1/2 (S001)	<i>tdh</i> 遺伝子	VP1 (S031)	688 bp
VPS-1/2 (S002)	<i>trh1</i> 遺伝子	VP1 (S031)	688 bp
VPR-1/2 (S028)	<i>trh1&trh2</i> 遺伝子	VP2 (S046)	666 bp

※ () 内に、製品コードを示す。

2. 方法

PCR 反応液および温度条件は、以下に示すとおりです。

通常の PCR (UNG 処理を行わない場合)

<反応液組成>

<i>TaKaRa Taq</i> (5 U/ μ l)	0.25 μ l
10 × Buffer for PCR Pathogenic primer set	5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μ l
Primer-1 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Primer-2 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Positive Control Template	1 μ l
滅菌精製水	38.75 μ l
Total	50 μ l

< PCR 条件 >

94°C	1 min.	} 35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit を使用し UNG 処理を行った場合

<反応液組成>

TaKaRa Taq (5 U/μl)	0.25 μl
10 × PCR Buffer (Mg ²⁺ plus)	5 μl
dU plus dNTP Mixture	4 μl
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 μl
UNG (2 U/μl)	0.5 μl
Primer-1 (19 pmol/μl)	0.5 μl
Primer-2 (19 pmol/μl)	0.5 μl
Positive Control Template	1 μl
滅菌精製水	36.75 μl
Total	50 μl

<反応条件>

25°C	10 min.	(UNG 処理)
95°C	2 min.	(UNG の熱処理)
↓		
94°C	1 min.	35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

3. 結果

PCR 増幅産物を 3% アガロースゲルを用いて電気泳動で解析したところ、目的サイズのバンドが検出されました。1～6 レーンは UNG 処理を行わない通常の PCR、7～12 レーンは UNG 処理を行った場合の結果です。いずれの場合も目的のバンドのみが検出され、増幅量は UNG 処理に影響されずほぼ同等でした。従って、TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit による UNG 処理は、本実験に用いた条件下では PCR 反応およびその増幅効率に影響を与えないことが確認できました。

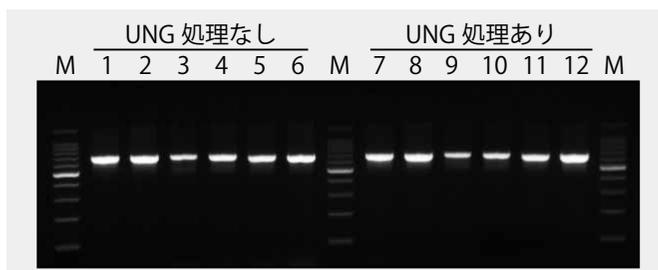


図 1. 腸炎ビブリオ病原因子遺伝子検出用 Positive Control Template の増幅

レーン	Primer	Template	
1, 7 :	VPD (S001)	VP1 (S031)	0.2 pg
2, 8 :	VPD (S001)	VP1 (S031)	1.0 pg
3, 9 :	VPS (S002)	VP1 (S031)	0.2 pg
4, 10 :	VPS (S002)	VP1 (S031)	1.0 pg
5, 11 :	VPR (S028)	VP2 (S046)	0.2 pg
6, 12 :	VPR (S028)	VP2 (S046)	1.0 pg
M :	100 bp DNA Ladder		

Application 2

毒素原性大腸菌エンテロトキシン遺伝子の検出

～ TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit を用いた実験例～

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit (製品コード 6088) による UNG 処理を併用して、毒素原性大腸菌エンテロトキシン遺伝子検出用 Primer Set (製品コード S003/S004/S005)、毒素原性大腸菌エンテロトキシン遺伝子検出用 Positive Control Template (製品コード S032/S033) および *TaKaRa Taq* (製品コード R001A/B/C) を用いた PCR 増幅反応を行いました。

UNG 処理を行った場合と行わなかった場合の増幅効率と比較することで、UNG 処理が PCR 増幅効率に影響を及ぼさないことを確認しました。

1. Primer

本実験で用いた Primer と鋳型 (Positive Control Template) を表 2 に示します。

表 2. Primer Set と Positive Control Template (PC) の組み合わせ

Primer Set	検出対象遺伝子	鋳型 (PC)	PC を鋳型とした場合の増幅サイズ
ELT-1/2 (S003)	LT 遺伝子	EC1 (S032)	690 bp
ESH-1/2 (S004)	STh 遺伝子	EC1 (S032)	691 bp
ESP-1/2 (S005)	STp 遺伝子	EC2 (S033)	689 bp

※ () 内に、製品コードを示す。

2. 方法

PCR 反応液および温度条件は、以下に示すとおりです。

通常の PCR (UNG 処理を行わない場合)

<反応液組成>

<i>TaKaRa Taq</i> (5 U/ μ l)	0.25 μ l
10 × Buffer for PCR Pathogenic primer set	5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μ l
Primer-1 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Primer-2 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Positive Control Template	1 μ l
滅菌精製水	38.75 μ l
Total	50 μ l

< PCR 条件 >

94°C	1 min.	35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit を使用し UNG 処理を行った場合

<反応液組成>

TaKaRa Taq (5 U/ μ l)	0.25 μ l
10 × PCR Buffer (Mg ²⁺ plus)	5 μ l
dU plus dNTP Mixture	4 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 μ l
UNG (2 U/ μ l)	0.5 μ l
Primer-1 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Primer-2 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Positive Control Template	1 μ l
滅菌精製水	36.75 μ l
Total	50 μl

<反応条件>

25°C	10 min.	(UNG 処理)
95°C	2 min.	(UNG の熱処理)
↓		
94°C	1 min.	} 35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

3. 結果

PCR 増幅産物を 3% アガロースゲルを用いて電気泳動で解析したところ、目的サイズのバンドが検出されました。1～6 レーンは UNG 処理を行わない通常の PCR、7～12 レーンは UNG 処理を行った場合の結果です。いずれの場合も目的のバンドのみが検出され、増幅量は UNG 処理に影響されずほぼ同等でした。従って、TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit による UNG 処理は、本実験に用いた条件下では PCR 反応およびその増幅効率に影響を与えないことが確認できました。

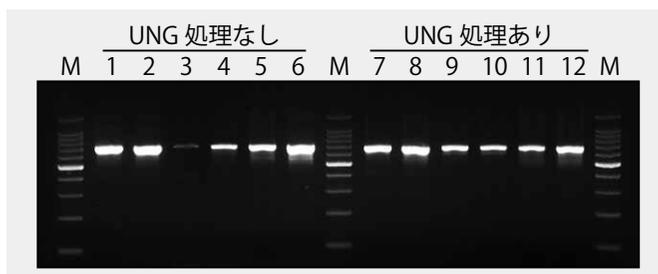


図 2. 毒素原性大腸菌エンテロトキシン遺伝子検出用 Positive Control Template の増幅

レーン	Primer	Template	
1, 7 :	ELT (S003)	EC1 (S032)	0.2 pg
2, 8 :	ELT (S003)	EC1 (S032)	1.0 pg
3, 9 :	ESH (S004)	EC1 (S032)	0.2 pg
4, 10 :	ESH (S004)	EC1 (S032)	1.0 pg
5, 11 :	ESP (S005)	EC2 (S033)	0.2 pg
6, 12 :	ESP (S005)	EC2 (S033)	1.0 pg
M :	100 bp DNA Ladder		

Application 3-1

腸管出血性大腸菌ベロ毒素遺伝子の検出

～ TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit を用いた実験例～

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit (製品コード 6088) による UNG 処理を併用して、腸管出血性大腸菌ベロ毒素遺伝子検出用 Primer Set (製品コード S006/S007/S008)、腸管出血性大腸菌ベロ毒素遺伝子検出用 Positive Control Template (製品コード S033/S034) および *TaKaRa Taq* (製品コード R001A/B/C) を用いた PCR 増幅反応を行いました。

UNG 処理を行った場合と行わなかった場合の増幅効率と比較することで、UNG 処理が PCR 増幅効率に影響を及ぼさないことを確認しました。

1. Primer

本実験で用いた Primer と鋳型 (Positive Control Template) を表 3-1 に示します。

表 3-1. Primer Set と Positive Control Template (PC) の組み合わせ

Primer Set	検出対象遺伝子	鋳型 (PC)	PC を鋳型とした場合の増幅サイズ
EVT-1/2 (S006)	VT1	EC2 (S033)	686 bp
EVS-1/2 (S007)	VT2, VT2vha, VT2vha, VT2vp1	EC3 (S034)	686 bp
EVC-1/2 (S008)	VT1, VT2, VT2vha, VT2vha, VT2vp1	EC3 (S034)	685 bp

※ () 内に、製品コードを示す。

2. 方法

PCR 反応液および温度条件は、以下に示すとおりです。

通常の PCR (UNG 処理を行わない場合)

<反応液組成>

<i>TaKaRa Taq</i> (5 U/μl)	0.25 μl
10 × Buffer for PCR Pathogenic primer set	5 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μl
Primer-1 (19 pmol/μl)	0.5 μl
Primer-2 (19 pmol/μl)	0.5 μl
Positive Control Template	1 μl
滅菌精製水	38.75 μl
Total	50 μl

< PCR 条件 >

94°C	1 min.	} 35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit を使用し UNG 処理を行った場合

<反応液組成>

TaKaRa Taq (5 U/ μ l)	0.25 μ l
10 × PCR Buffer (Mg ²⁺ plus)	5 μ l
dU plus dNTP Mixture	4 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 μ l
UNG (2 U/ μ l)	0.5 μ l
Primer-1 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Primer-2 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Positive Control Template	1 μ l
滅菌精製水	36.75 μ l
Total	50 μ l

<反応条件>

25°C	10 min.	(UNG 処理)
95°C	2 min.	(UNG の熱処理)
↓		
94°C	1 min.	} 35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

3. 結果

PCR 増幅産物を 3% アガロースゲルを用いて電気泳動で解析したところ、目的サイズのバンドが検出されました。1～6 レーンは UNG 処理を行わない通常の PCR、7～12 レーンは UNG 処理を行った場合の結果です。いずれの場合も、目的のバンドのみが検出され、増幅量は UNG 処理に影響されずほぼ同等でした。従って、TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit による UNG 処理は、本実験に用いた条件下では PCR 反応およびその増幅効率に影響を与えないことが確認できました。

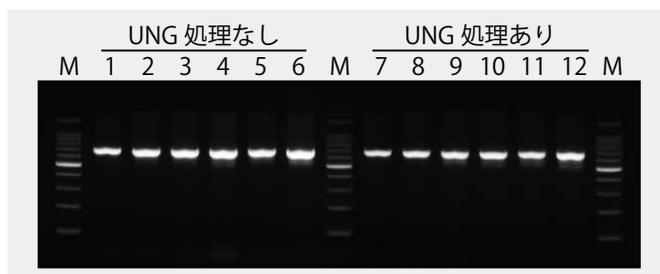


図 3-1. 腸管出血性大腸菌ベロ毒素遺伝子検出用 Positive Control Template の増幅

レーン	Primer	Template	
1,7 :	EVT (S006)	EC2 (S033)	0.2 pg
2,8 :	EVT (S006)	EC2 (S033)	1.0 pg
3,9 :	EVS (S007)	EC3 (S034)	0.2 pg
4,10 :	EVS (S007)	EC3 (S034)	1.0 pg
5,11 :	EVC (S008)	EC3 (S034)	0.2 pg
6,12 :	EVC (S008)	EC3 (S034)	1.0 pg
M :	100 bp DNA Ladder		

Application 3-2

腸管出血性大腸菌ベロ毒素遺伝子の検出

～ TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus を用いた実験例～

腸管出血性大腸菌ゲノム DNA を鋳型に、腸管出血性大腸菌ベロ毒素遺伝子検出用 Primer Set (製品コード S006/S007/S008) を用いて行う PCR 検出において、TaKaRa Taq Hot Start Version (製品コード R007A/B) と TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus (製品コード R013S/A) による PCR 増幅効率を比較し、UNG 処理が PCR 反応に影響を及ぼさないことを確認しました。

1. Primer

本実験で用いた Primer を表 3-2 に示します。

表 3-2. Primer Set と増幅サイズ

Primer Set	検出対象遺伝子	増幅サイズ
EVT-1/2 (S006)	VT1	349 bp
EVS-1/2 (S007)	VT2, VT2vha, VT2vhb, VT2vp1	404 bp
EVC-1/2 (S008)	VT1, VT2, VT2vha, VT2vhb, VT2vp1	171 bp

※ () 内に、製品コードを示す。

2. 方法

PCR 反応液および温度条件は、以下に示すとおりです。

TaKaRa Taq HS 使用の場合

<反応液組成>

TaKaRa Taq HS (5 U/μl)	0.25 μl
10 × PCR Buffer (Mg ²⁺ plus)	5 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μl
Primer-1 (19 pmol/μl)	0.5 μl
Primer-2 (19 pmol/μl)	0.5 μl
Template or dH ₂ O	1 μl
滅菌精製水	38.75 μl
Total	50 μl

< PCR 条件 >

94°C	1 min.	} 35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus 使用の場合

<反応液組成>

TaKaRa Taq HS (5 U/μl)	0.25 μl
10 × PCR Buffer for UNG plus	5 μl
dU plus dNTP Mixture	4 μl
UNG (2 U/μl)	0.5 μl
Primer-1 (19 pmol/μl)	0.5 μl
Primer-2 (19 pmol/μl)	0.5 μl
Template or dH ₂ O	1 μl
滅菌精製水	38.25 μl
Total	50 μl

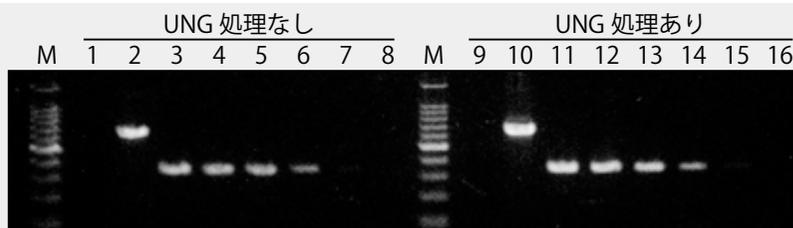
<反応条件>

25°C	10 min.	(UNG 処理)
95°C	2 min.	(UNG の熱処理)
↓		
94°C	1 min.	35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

3. 結果

PCR 増幅産物を、3% アガロースゲルを用いて電気泳動で解析したところ、目的サイズのバンドが検出されました。1～8 レーンは TaKaRa Taq HS での PCR 反応、9～16 レーンは TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus での PCR 反応の結果です。いずれの場合も、目的のバンドのみが検出され、増幅量は UNG 処理に影響されずほぼ同等でした。従って、TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus による UNG 処理は、本実験に用いた条件下では、PCR 反応およびその増幅効率に影響を与えないことが確認できました。

VT1 遺伝子検出



VT2 遺伝子検出

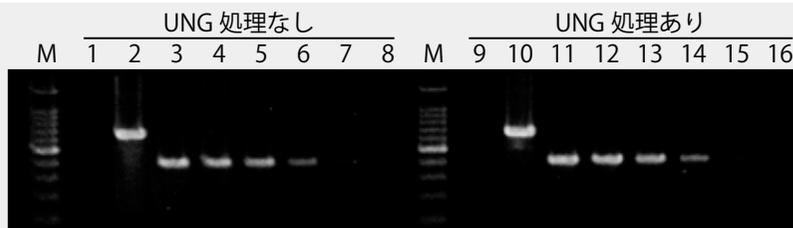


図 3-2. 腸管出血性大腸菌ベロ毒素遺伝子の検出

レーン 1, 9: 鋳型なし	6, 14: 腸管出血性大腸菌ゲノム DNA	10 pg
2, 10: Positive Control Template (製品コード S033/S034)	7, 15: 腸管出血性大腸菌ゲノム DNA	1 pg
3, 11: 腸管出血性大腸菌ゲノム DNA	8, 16: 腸管出血性大腸菌ゲノム DNA	100 fg
4, 12: 腸管出血性大腸菌ゲノム DNA		
5, 13: 腸管出血性大腸菌ゲノム DNA	M: 100 bp DNA Ladder	

Application 4

黄色ブドウ球菌エンテロトキシン遺伝子の検出

～ TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit を用いた実験例～

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit (製品コード 6088) による UNG 処理を併用して、黄色ブドウ球菌エンテロトキシン遺伝子検出用 Primer Set (製品コード S009/S010/S011/S012/S013)、黄色ブドウ球菌エンテロトキシン遺伝子検出用 Positive Control Template (製品コード S035/S036/S037) および *TaKaRa Taq* (製品コード R001A/B/C) を用いた PCR 増幅反応を行いました。

UNG 処理を行った場合と行わなかった場合の増幅効率と比較することで、UNG 処理が PCR 増幅効率に影響を及ぼさないことを確認しました。

1. Primer

本実験で用いた Primer と鋳型 (Positive Control Template) を表 4 に示します。

表 4. Primer Set と Positive Control Template (PC) の組み合わせ

Primer Set	検出対象遺伝子	鋳型 (PC)	PC を鋳型とした場合の増幅サイズ
SEA-1/2 (S009)	エンテロトキシン A 遺伝子	SE1 (S035)	695 bp
SEB-1/2 (S010)	エンテロトキシン B 遺伝子	SE1 (S035)	694 bp
SEZ-1/2 (S011)	エンテロトキシン C 遺伝子	SE2 (S036)	697 bp
SED-1/2 (S012)	エンテロトキシン D 遺伝子	SE2 (S036)	695 bp
SEE-1/2 (S013)	エンテロトキシン E 遺伝子	ST (S037)	695 bp

※ () 内に、製品コードを示す。

2. 方法

PCR 反応液および温度条件は、以下に示すとおりです。

通常の PCR (UNG 処理を行わない場合)

<反応液組成>

<i>TaKaRa Taq</i> (5 U/ μ l)	0.25 μ l
10 × Buffer for PCR Pathogenic primer set	5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μ l
Primer-1 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Primer-2 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Positive Control Template	1 μ l
滅菌精製水	38.75 μ l
Total	50 μ l

<PCR 条件>

94°C	1 min.	} 35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit を使用し UNG 処理を行った場合

<反応液組成>

TaKaRa Taq (5 U/ μ l)	0.25 μ l
10 × PCR Buffer (Mg ²⁺ plus)	5 μ l
dU plus dNTP Mixture	4 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 μ l
UNG (2 U/ μ l)	0.5 μ l
Primer-1 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Primer-2 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Positive Control Template	1 μ l
滅菌精製水	36.75 μ l
Total	50 μl

<反応条件>

25°C	10 min.	(UNG 処理)
95°C	2 min.	(UNG の熱処理)
↓		
94°C	1 min.	35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

3. 結果

PCR 増幅産物を 3% アガロースゲルを用いて電気泳動で解析したところ、目的サイズのバンドが検出されました。1～10 レーンは UNG 処理を行わない通常の PCR、11～20 レーンは UNG 処理を行った場合の結果です。いずれの場合も、目的のバンドのみが検出され、増幅量は UNG 処理に影響されずほぼ同等でした。従って、TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit による UNG 処理は、本実験で用いた条件下では PCR 反応およびその増幅効率に影響を与えないことが確認できました。

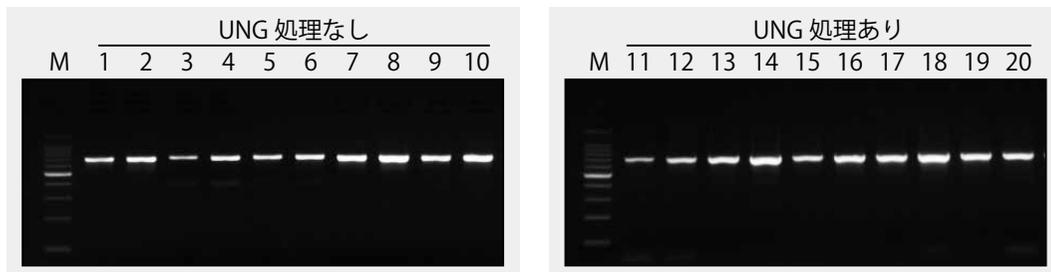


図 4. 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン遺伝子検出用 Positive Control Template の増幅

レーン	Primer	Template	
1, 11 :	SEA (S009)	SE1 (S035)	0.2 pg
2, 12 :	SEA (S009)	SE1 (S035)	1.0 pg
3, 13 :	SEB (S010)	SE1 (S035)	0.2 pg
4, 14 :	SEB (S010)	SE1 (S035)	1.0 pg
5, 15 :	SEZ (S011)	SE2 (S036)	0.2 pg
6, 16 :	SEZ (S011)	SE2 (S036)	1.0 pg
7, 17 :	SED (S012)	SE2 (S036)	0.2 pg
8, 18 :	SED (S012)	SE2 (S036)	1.0 pg
9, 19 :	SEE (S013)	ST (S037)	0.2 pg
10, 20 :	SEE (S013)	ST (S037)	1.0 pg
M :	100 bp DNA Ladder		

Application 5

黄色ブドウ球菌毒素性ショック症候群毒素遺伝子の検出

～ TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit を用いた実験例～

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit (製品コード 6088) による UNG 処理を併用して、黄色ブドウ球菌毒素ショック症候群毒素遺伝子検出用 Primer Set (製品コード S015)、黄色ブドウ球菌毒素ショック症候群毒素遺伝子検出用 Positive Control Template (製品コード S037) および *TaKaRa Taq* (製品コード R001A/B/C) を用いた PCR 増幅反応を行いました。

UNG 処理を行った場合と行わなかった場合の増幅効率と比較することで、UNG 処理が PCR 増幅効率に影響を及ぼさないことを確認しました。

1. Primer

本実験で用いた Primer と鋳型 (Positive Control Template) を表 5 に示します。

表 5. Primer Set と Positive Control Template (PC) の組み合わせ

Primer Set	検出対象遺伝子	鋳型 (PC)	PC を鋳型とした場合の増幅サイズ
TST-1/2 (S015)	TSST-1 遺伝子	ST (S037)	694 bp

※ () 内に、製品コードを示す。

2. 方法

PCR 反応液および温度条件は、以下に示すとおりです。

通常の PCR (UNG 処理を行わない場合)

<反応液組成>

<i>TaKaRa Taq</i> (5 U/ μ l)	0.25 μ l
10 × Buffer for PCR Pathogenic primer set	5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μ l
Primer-1 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Primer-2 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Positive Control Template	1 μ l
滅菌精製水	38.75 μ l
Total	50 μ l

< PCR 条件 >

94°C	1 min.	} 35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit を使用し UNG 処理を行った場合

<反応液組成>

TaKaRa Taq (5 U/ μ l)	0.25 μ l
10 × PCR Buffer (Mg ²⁺ plus)	5 μ l
dU plus dNTP Mixture	4 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 μ l
UNG (2 U/ μ l)	0.5 μ l
Primer-1 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Primer-2 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Positive Control Template	1 μ l
滅菌精製水	36.75 μ l
Total	50 μl

<反応条件>

25°C	10 min.	(UNG 処理)
95°C	2 min.	(UNG の熱処理)
↓		
94°C	1 min.	35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

3. 結果

PCR 増幅産物を 3% アガロースゲルを用いて電気泳動で解析したところ、目的サイズのバンドが検出されました。1、2 レーンは UNG 処理を行わない通常の PCR、3、4 レーンは UNG 処理を行った場合の結果です。いずれの場合も目的のバンドのみが検出され、増幅量は UNG 処理に影響されずほぼ同等でした。従って、TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit による UNG 処理は、本実験で用いた条件下では PCR 反応およびその増幅効率に影響を与えないことが確認できました。

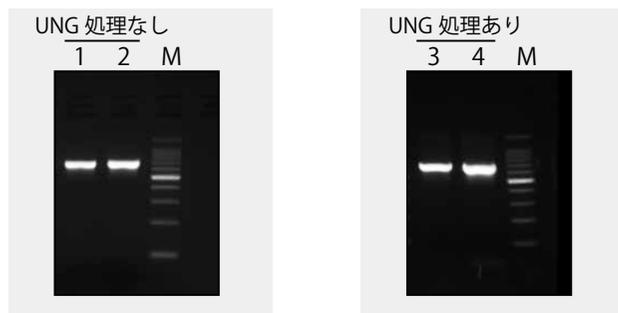


図 5. 黄色ブドウ球菌毒素性ショック症候群毒素遺伝子検出用 Positive Control Template の増幅

レーン	Primer	Template	
1,3 :	TST (S015)	ST (S037)	0.2 pg
2,4 :	TST (S015)	ST (S037)	1.0 pg
M :	100 bp DNA Ladder		

Application 6

コレラ毒素遺伝子の検出

～ TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit を用いた実験例～

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit (製品コード 6088) による UNG 処理を併用して、コレラ毒素遺伝子検出用 Primer Set (製品コード S014)、コレラ毒素遺伝子検出用 Positive Control Template (製品コード S039) および *TaKaRa Taq* (製品コード R001A/B/C) を用いた PCR 増幅反応を行いました。UNG 処理を行った場合と行わなかった場合の増幅効率と比較することで、UNG 処理が PCR 増幅効率に影響を及ぼさないことを確認しました。

1. Primer

本実験で用いた Primer と鋳型 (Positive Control Template) を表 6 に示します。

表 6. Primer Set と Positive Control Template (PC) の組み合わせ

Primer Set	検出対象遺伝子	鋳型 (PC)	PC を鋳型とした場合の増幅サイズ
VCT-1/2 (S014)	コレラ毒素遺伝子	VC (S039)	670 bp

※ () 内に、製品コードを示す。

2. 方法

PCR 反応液および温度条件は、以下に示すとおりです。

通常の PCR (UNG 処理を行わない場合)

<反応液組成>

<i>TaKaRa Taq</i> (5 U/ μ l)	0.25 μ l
10 × Buffer for PCR Pathogenic primer set	5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μ l
Primer-1 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Primer-2 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Positive Control Template	1 μ l
滅菌精製水	38.75 μ l
Total	50 μ l

< PCR 条件 >

94°C	1 min.	} 35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit を使用し UNG 処理を行った場合

<反応液組成>

TaKaRa Taq (5 U/ μ l)	0.25 μ l
10 × PCR Buffer (Mg ²⁺ plus)	5 μ l
dU plus dNTP Mixture	4 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 μ l
UNG (2 U/ μ l)	0.5 μ l
Primer-1 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Primer-2 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Positive Control Template	1 μ l
滅菌精製水	36.75 μ l
Total	50 μl

<反応条件>

25°C	10 min.	(UNG 処理)
95°C	2 min.	(UNG の熱処理)
↓		
94°C	1 min.	35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

3. 結果

PCR 増幅産物を 3% アガロースゲルを用いて電気泳動で解析したところ、目的サイズのバンドが検出されました。1、2 レーンは UNG 処理を行わない通常の PCR、3、4 レーンは UNG 処理を行った場合の結果です。いずれの場合も目的のバンドのみが検出され、増幅量は UNG 処理に影響されずほぼ同等でした。従って、TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit による UNG 処理は、本実験で用いた条件下では PCR 反応およびその増幅効率に影響を与えないことが確認できました。

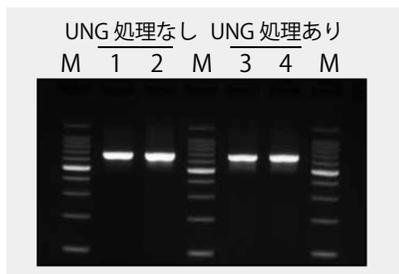


図 6. コレラ毒素遺伝子検出用 Positive Control Template の増幅

レーン	Primer	Template	
1, 3 :	VCT (S014)	VC (S039)	0.2 pg
2, 4 :	VCT (S014)	VC (S039)	1.0 pg
M :	100 bp DNA Ladder		

Application 7-1

赤痢菌および腸管侵入性大腸菌病原因子遺伝子の検出

～ TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit を用いた実験例～

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit (製品コード 6088) による UNG 処理を併用して、赤痢菌および腸管侵入性大腸菌病原因子毒素遺伝子検出用 Primer Set (製品コード S016/S017)、赤痢菌および腸管侵入性大腸菌病原因子毒素遺伝子検出用 Positive Control Template (製品コード S038) および *TaKaRa Taq* (製品コード R001A/B/C) を用いた PCR 増幅反応を行いました。

UNG 処理を行った場合と行わなかった場合の増幅効率と比較することで、UNG 処理が PCR 増幅効率に影響を及ぼさないことを確認しました。

1. Primer

本実験で用いた Primer と鋳型 (Positive Control Template) を表 7-1 に示します。

表 7-1. Primer Set と Positive Control Template (PC) の組み合わせ

Primer Set	検出対象遺伝子	鋳型 (PC)	PC を鋳型とした場合の増幅サイズ
INV-1/2 (S016)	<i>invE</i> 遺伝子	SS (S038)	691 bp
IPA-1/2 (S017)	<i>ipaH</i> 遺伝子	SS (S038)	689 bp

※ () 内に、製品コードを示す。

2. 方法

PCR 反応液および温度条件は、以下に示すとおりです。

通常の PCR (UNG 処理を行わない場合)

<反応液組成>

<i>TaKaRa Taq</i> (5 U/ μ l)	0.25 μ l
10 × Buffer for PCR Pathogenic primer set	5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μ l
Primer-1 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Primer-2 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Positive Control Template	1 μ l
滅菌精製水	38.75 μ l
Total	50 μ l

< PCR 条件 >

94°C	1 min.	} 35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit を使用し UNG 処理を行った場合

<反応液組成>

TaKaRa Taq (5 U/μl)	0.25 μl
10 × PCR Buffer (Mg ²⁺ plus)	5 μl
dU plus dNTP Mixture	4 μl
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 μl
UNG (2 U/μl)	0.5 μl
Primer-1 (19 pmol/μl)	0.5 μl
Primer-2 (19 pmol/μl)	0.5 μl
Positive Control Template	1 μl
滅菌精製水	36.75 μl
Total	50 μl

<反応条件>

25°C	10 min.	(UNG 処理)
95°C	2 min.	(UNG の熱処理)
↓		
94°C	1 min.	35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

3. 結果

PCR 増幅産物を 3% アガロースゲルを用いて電気泳動で解析したところ、目的サイズのバンドが検出されました。1～4 レーンは UNG 処理を行わない通常の PCR、5～8 レーンは UNG 処理を行った場合の結果です。いずれの場合も目的のバンドのみが検出され、増幅量は UNG 処理に影響されずほぼ同等でした。従って、TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit による UNG 処理は、本実験に用いた条件下では PCR 反応およびその増幅効率に影響を与えないことが確認できました。

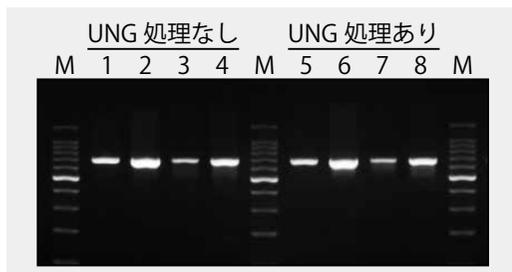


図 7-1. 赤痢菌および腸管侵入性大腸菌病原因子毒素遺伝子検出用 Positive Control Template の増幅

レーン	Primer	Template	
1, 5 :	INV (S016)	SS (S038)	0.2 pg
2, 6 :	INV (S016)	SS (S038)	1.0 pg
3, 7 :	IPA (S017)	SS (S038)	0.2 pg
4, 8 :	IPA (S017)	SS (S038)	1.0 pg
M :	100 bp DNA Ladder		

Application 7-2

赤痢菌および腸管侵入性大腸菌病原因子遺伝子の検出

～ TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus を用いた実験例～

腸管出血性大腸菌ゲノム DNA を鋳型に、赤痢菌および腸管侵入性大腸菌病原因子毒素遺伝子検出用 Primer Set (製品コード S016/S017) を用いて行う PCR 検出において、TaKaRa Taq Hot Start Version (製品コード R007A/B) と TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus (製品コード R013S/A) による PCR 増幅効率を比較し、UNG 処理が PCR 反応に影響を及ぼさないことを確認しました。

1. Primer

本実験で用いた Primer を表 7-2 に示します。

表 7-2. Primer Set と増幅サイズ

Primer Set	検出対象遺伝子	増幅サイズ
INV-1/2 (S016)	<i>invE</i> 遺伝子	293 bp
IPA-1/2 (S017)	<i>ipaH</i> 遺伝子	242 bp

※ () 内に、製品コードを示す。

2. 方法

PCR 反応液および温度条件は、以下に示すとおりです。

TaKaRa Taq HS 使用の場合

<反応液組成>

TaKaRa Taq HS (5 U/μl)	0.25 μl
10 × PCR Buffer (Mg ²⁺ plus)	5 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μl
Primer-1 (19 pmol/μl)	0.5 μl
Primer-2 (19 pmol/μl)	0.5 μl
Template or dH ₂ O	1 μl
滅菌精製水	38.75 μl
Total	50 μl

< PCR 条件 >

94°C	1 min.	} 35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus 使用の場合

<反応液組成>

TaKaRa Taq HS (5 U/μl)	0.25 μl
10 × PCR Buffer for UNG plus	5 μl
dU plus dNTP Mixture	4 μl
UNG (2 U/μl)	0.5 μl
Primer-1 (19 pmol/μl)	0.5 μl
Primer-2 (19 pmol/μl)	0.5 μl
Template or dH ₂ O	1 μl
滅菌精製水	38.25 μl
Total	50 μl

<反応条件>

25°C	10 min.	(UNG 処理)
95°C	2 min.	(UNG の熱処理)
↓		
94°C	1 min.	35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

3. 結果

PCR 増幅産物を 3% アガロースゲルを用いて電気泳動で解析したところ、目的サイズのバンドが検出されました。レーン 1～8 は TaKaRa Taq HS での PCR 反応、レーン 9～16 は TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus での PCR 反応の結果です。いずれの場合も目的のバンドのみが検出され、増幅量は UNG 処理に影響されずほぼ同等でした。従って、TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus による UNG 処理は、本実験に用いた条件下では PCR 反応およびその増幅効率に影響を与えないことが確認できました。

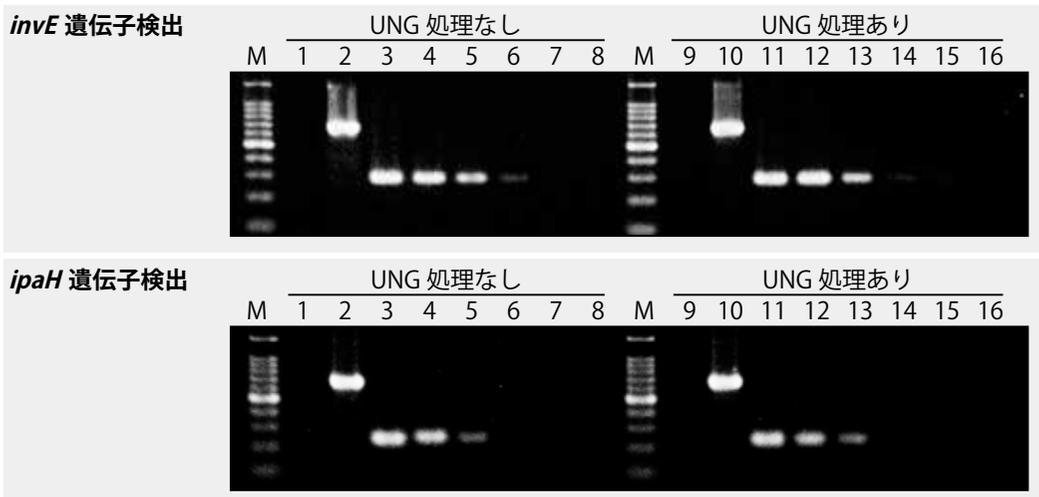


図 7-2. 腸管侵入性大腸菌病原因子毒素遺伝子の検出

レーン 1, 9: 鋳型なし	6, 14: 腸管侵入性大腸菌ゲノム DNA	10 pg
2, 10: Positive Control Template (製品コード S038)	7, 15: 腸管侵入性大腸菌ゲノム DNA	1 pg
3, 11: 腸管侵入性大腸菌ゲノム DNA	8, 16: 腸管侵入性大腸菌ゲノム DNA	100 fg
4, 12: 腸管侵入性大腸菌ゲノム DNA	M: 100 bp DNA Ladder	
5, 13: 腸管侵入性大腸菌ゲノム DNA		

Application 8-1

サルモネラ菌 *invA* 遺伝子およびエンテロトキシン遺伝子の検出 ～ TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit を用いた実験例～

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit (製品コード 6088) による UNG 処理を併用して、サルモネラ菌 *invA* 遺伝子およびエンテロトキシン遺伝子検出用 Primer Set (製品コード S018/S019)、サルモネラ菌 *invA* 遺伝子およびエンテロトキシン遺伝子検出用 Positive Control Template (製品コード S040) および TaKaRa Taq (製品コード R001A/B/C) を用いた PCR 増幅反応を行いました。UNG 処理を行った場合と行わなかった場合の増幅効率と比較することで、UNG 処理が PCR 増幅効率に影響を及ぼさないことを確認しました。

1. Primer

本実験で用いた Primer と鋳型 (Positive Control Template) を表 8-1 に示します。

表 8-1. Primer Set と Positive Control Template (PCR) の組み合わせ

Primer Set	検出対象遺伝子	鋳型 (PC)	PC を鋳型とした場合の増幅サイズ
SIN-1/2 (S018)	<i>invA</i> 遺伝子	SN (S040)	689 bp
STN-1/2 (S019)	エンテロトキシン遺伝子	SN (S040)	690 bp

※ () 内に、製品コードを示す。

2. 方法

PCR 反応液および温度条件は、以下に示すとおりです。

通常の PCR (UNG 処理を行わない場合)

<反応液組成>

TaKaRa Taq (5 U/ μ l)	0.25 μ l
10 × Buffer for PCR Pathogenic primer set	5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μ l
Primer-1 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Primer-2 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Positive Control Template	1 μ l
滅菌精製水	38.75 μ l
Total	50 μ l

< PCR 条件 >

94°C	1 min.	} 35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit を使用し UNG 処理を行った場合

<反応液組成>

TaKaRa Taq (5 U/μl)	0.25 μl
10 × PCR Buffer (Mg ²⁺ plus)	5 μl
dU plus dNTP Mixture	4 μl
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 μl
UNG (2 U/μl)	0.5 μl
Primer-1 (19 pmol/μl)	0.5 μl
Primer-2 (19 pmol/μl)	0.5 μl
Positive Control Template	1 μl
滅菌精製水	36.75 μl
Total	50 μl

<反応条件>

25°C	10 min.	(UNG 処理)
95°C	2 min.	(UNG の熱処理)
↓		
94°C	1 min.	35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

3. 結果

PCR 増幅産物を 3% アガロースゲルを用いて電気泳動で解析したところ、目的サイズのバンドが検出されました。1～4 レーンは UNG 処理を行わない通常の PCR、5～8 レーンは UNG 処理を行った場合の結果です。いずれの場合も目的のバンドのみが検出され、増幅量は UNG 処理に影響されずほぼ同等でした。従って、TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit による UNG 処理は、本実験に用いた条件下では PCR 反応およびその増幅効率に影響を与えないことが確認できました。

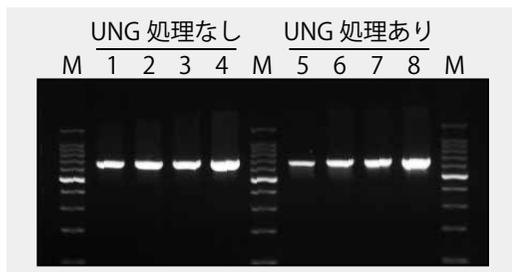


図 8-1. サルモネラ菌病原遺伝子検出用 Positive Control Template の増幅

レーン	Primer	Template	増幅量
1, 5 :	SIN (S018)	SN (S040)	0.2 pg
2, 6 :	SIN (S018)	SN (S040)	1.0 pg
3, 7 :	STN (S019)	SN (S040)	0.2 pg
4, 8 :	STN (S019)	SN (S040)	1.0 pg
M :	100 bp DNA Ladder		

Application 8-2

サルモネラ菌 *invA* 遺伝子およびエンテロトキシン遺伝子の検出 ～ *TaKaRa Taq* HS PCR Kit, UNG plus を用いた実験例～

サルモネラ菌ゲノム DNA を鋳型に、サルモネラ菌 *invA* 遺伝子およびエンテロトキシン遺伝子検出用 Primer Set (製品コード S018/S019) を用いて行う PCR 検出において、*TaKaRa Taq* Hot Start Version (製品コード R007A/B) と *TaKaRa Taq* HS PCR Kit, UNG plus (製品コード R013S/A) による PCR 増幅効率を比較し、UNG 処理が PCR 反応に影響を及ぼさないことを確認しました。

1. Primer

本実験で用いた Primer と鋳型 (Positive Control Template) を表 8-2 に示します。

表 8-2. Primer Set と増幅サイズ

Primer Set	検出対象遺伝子	増幅サイズ
SIN-1/2 (S018)	<i>invA</i> 遺伝子	378 bp
STN-1/2 (S019)	エンテロトキシン遺伝子	264 bp

※ () 内に、製品コードを示す。

2. 方法

PCR 反応液および温度条件は、以下に示すとおりです。

***TaKaRa Taq* HS 使用の場合**

<反応液組成>

<i>TaKaRa Taq</i> HS (5 U/μl)	0.25 μl
10 × PCR Buffer (Mg ²⁺ plus)	5 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μl
Primer-1 (19 pmol/μl)	0.5 μl
Primer-2 (19 pmol/μl)	0.5 μl
Template or dH ₂ O	1 μl
滅菌精製水	38.75 μl
Total	50 μl

< PCR 条件 >

94°C	1 min.	} 35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus 使用の場合

<反応液組成>

TaKaRa Taq HS (5 U/μl)	0.25 μl
10 × PCR Buffer for UNG plus	5 μl
dU plus dNTP Mixture	4 μl
UNG (2 U/ul)	0.5 μl
Primer-1 (19 pmol/μl)	0.5 μl
Primer-2 (19 pmol/μl)	0.5 μl
Template or dH ₂ O	1 μl
滅菌精製水	38.25 μl
<hr/>	
Total	50 μl

<反応条件>

25°C	10 min.	(UNG 処理)
95°C	2 min.	(UNG の熱処理)
	↓	
94°C	1 min.	35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

3. 結果

PCR 増幅産物を 3% アガロースゲルを用いて電気泳動法で解析したところ、目的サイズのバンドが検出されました。レーン 1～6 は TaKaRa Taq HS での PCR 反応、レーン 7～12 は TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus での PCR 反応の結果です。いずれの場合も目的のバンドのみが検出され、増幅量は UNG 処理に影響されずほぼ同等でした。従って、TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus による UNG 処理は、本実験に用いた条件下では PCR 反応およびその増幅効率に影響を与えないことが確認できました。

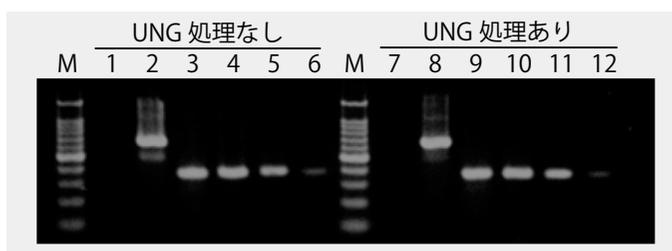


図 8-2. サルモネラ菌病原遺伝子の検出

レーン	1, 7 :	鋳型なし	
	2, 8 :	Positive Control Template (製品コード S040)	
	3, 9 :	サルモネラ菌由来 DNA (熱抽出物)	10 ⁵ cfu 相当
	4, 10 :	サルモネラ菌由来 DNA (熱抽出物)	10 ⁴ cfu 相当
	5, 11 :	サルモネラ菌由来 DNA (熱抽出物)	10 ³ cfu 相当
	6, 12 :	サルモネラ菌由来 DNA (熱抽出物)	10 ² cfu 相当
	M :	100 bp DNA Ladder	

Application 9-1

ウェルシュ菌毒素遺伝子の検出

～ TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit を用いた実験例～

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit (製品コード 6088) による UNG 処理を併用して、ウェルシュ菌毒素遺伝子検出用 Primer Set (製品コード S020)、ウェルシュ菌毒素遺伝子検出用 Positive Control Template (製品コード S041) および *TaKaRa Taq* (製品コード R001A/B/C) を用いた PCR 増幅反応を行いました。

UNG 処理を行った場合と行わなかった場合の増幅効率と比較することで、UNG 処理が PCR 増幅効率に影響を及ぼさないことを確認しました。

1. Primer

本実験で用いた Primer と鋳型 (Positive Control Template) を表 9-1 に示します。

表 9-1. Primer Set と Positive Control Template (PC) の組み合わせ

Primer Set	検出対象遺伝子	鋳型 (PC)	PC を鋳型とした場合の増幅サイズ
CPE-1/2 (S020)	ウェルシュ菌毒素遺伝子	CP (S041)	667 bp

※ () 内に、製品コードを示す。

2. 方法

PCR 反応液および温度条件は、以下に示すとおりです。

通常の PCR (UNG 処理を行わない場合)

<反応液組成>

<i>TaKaRa Taq</i> (5 U/ μ l)	0.25 μ l
10 × Buffer for PCR Pathogenic primer set	5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μ l
Primer-1 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Primer-2 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Positive Control Template	1 μ l
滅菌精製水	38.75 μ l
Total	50 μ l

< PCR 条件 >

94°C	1 min.	} 35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit を使用し UNG 処理を行った場合

<反応液組成>

TaKaRa Taq (5 U/ μ l)	0.25 μ l
10 × PCR Buffer (Mg ²⁺ plus)	5 μ l
dU plus dNTP Mixture	4 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 μ l
UNG (2 U/ μ l)	0.5 μ l
Primer-1 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Primer-2 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Positive Control Template	1 μ l
滅菌精製水	36.75 μ l
Total	50 μl

<反応条件>

25°C	10 min.	(UNG 処理)	
95°C	2 min.	(UNG の熱処理)	
	↓		
94°C	1 min.	} 35 cycles	
55°C	1 min.		
72°C	1 min.		

3. 結果

PCR 増幅産物を 3% アガロースゲルを用いて電気泳動で解析したところ、目的サイズのバンドが検出されました。1、2 レーンは UNG 処理を行わない通常の PCR、3、4 レーンは UNG 処理を行った場合の結果です。いずれの場合も目的のバンドのみが検出され、増幅量は UNG 処理に影響されずほぼ同等でした。従って、TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit による UNG 処理は、本実験に用いた条件下では PCR 反応およびその増幅効率に影響を与えないことが確認できました。

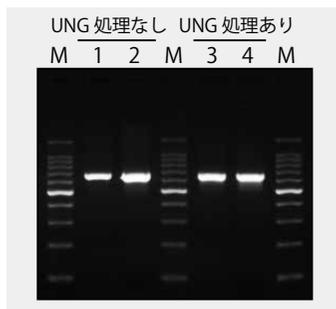


図 9-1. ウェルシュ菌毒素遺伝子検出用 Positive Control Template の増幅

レーン	Primer	Template	
1, 3 :	CPE (S020)	CP (S041)	0.2 pg
2, 4 :	CPE (S020)	CP (S041)	1.0 pg
M :	100 bp DNA Ladder		

Application 9-2

ウェルシュ菌毒素遺伝子の検出

～ TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus を用いた実験例～

ウェルシュ菌ゲノム DNA を鋳型に、ウェルシュ菌毒素遺伝子検出用 Primer Set (製品コード S020) を用いて行う PCR 検出において、TaKaRa Taq Hot Start Version (製品コード R007A/B) と TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus (製品コード R013S/A) による PCR 増幅効率を比較し、UNG 処理が PCR 反応に影響を及ぼさないことを確認しました。

1. Primer

本実験で用いた Primer を表 9-2 に示します。

表 9-2. Primer Set と増幅サイズ

Primer Set	検出対象遺伝子	増幅サイズ
CPE-1/2 (S020)	ウェルシュ菌毒素遺伝子	456 bp

※ () 内に、製品コードを示す。

2. 方法

PCR 反応液および温度条件は、以下に示すとおりです。

TaKaRa Taq HS 使用の場合

<反応液組成>

TaKaRa Taq HS (5 U/ μ l)	0.25 μ l
10 × PCR Buffer (Mg ²⁺ plus)	5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μ l
Primer-1 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Primer-2 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Template or dH ₂ O	1 μ l
滅菌精製水	38.75 μ l
Total	50 μ l

< PCR 条件 >

94°C	1 min.	} 35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus 使用の場合

<反応液組成>

TaKaRa Taq HS (5 U/ μ l)	0.25 μ l
10 \times PCR Buffer for UNG plus	5 μ l
dU plus dNTP Mixture	4 μ l
UNG (2 U/ μ l)	0.5 μ l
Primer-1 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Primer-2 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Template or dH ₂ O	1 μ l
滅菌精製水	38.25 μ l
Total	50 μ l

<反応条件>

25°C	10 min.	(UNG 処理)
95°C	2 min.	(UNG の熱処理)
	↓	
94°C	1 min.	35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

3. 結果

PCR 増幅産物を 3% アガロースゲルを用いて電気泳動法で解析したところ、目的サイズのバンドが検出されました。レーン 1～8 は TaKaRa Taq HS での PCR 反応、レーン 9～16 は TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus での PCR 反応の結果です。いずれの場合も目的のバンドのみが検出され、増幅量は UNG 処理に影響されずほぼ同等でした。従って、TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus による UNG 処理は、本実験に用いた条件下では PCR 反応およびその増幅効率に影響を与えないことが確認できました。

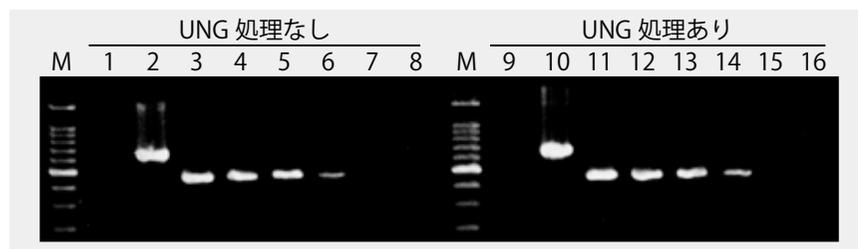


図 9-2. ウェルシュ菌毒素遺伝子の検出

レーン	1, 9:	鋳型なし	
	2, 10:	Positive Control Template (製品コード S041)	
	3, 11:	ウェルシュ菌ゲノム DNA	10 ng
	4, 12:	ウェルシュ菌ゲノム DNA	1 ng
	5, 13:	ウェルシュ菌ゲノム DNA	100 pg
	6, 14:	ウェルシュ菌ゲノム DNA	10 pg
	7, 15:	ウェルシュ菌ゲノム DNA	1 pg
	8, 16:	ウェルシュ菌ゲノム DNA	100 fg
	M:	100 bp DNA Ladder	

Application 10

ボツリヌス菌毒素遺伝子の検出

～ TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit を用いた実験例～

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit (製品コード 6088) による UNG 処理を併用して、ボツリヌス菌毒素遺伝子検出用 Primer Set (製品コード S021/S022/S023/S024/S025/S026/S027)、ボツリヌス菌毒素遺伝子検出用 Positive Control Template (製品コード S042/S043/S044/S045) および *TaKaRa Taq* (製品コード R001A/B/C) を用いた PCR 増幅反応を行いました。

UNG 処理を行った場合と行わなかった場合の増幅効率と比較することで、UNG 処理が PCR 増幅効率に影響を及ぼさないことを確認しました。

1. Primer

本実験で用いた Primer と鋳型 (Positive Control Template) を表 10 に示します。

表 10. Primer Set と Positive Control Template (PC) の組み合わせ

Primer Set	検出対象遺伝子	鋳型 (PC)	PC を鋳型とした場合の増幅サイズ
BAS-1/2 (S021)	ボツリヌス A 型遺伝子	BS1 (S042)	691 bp
BBS-1/2 (S022)	ボツリヌス B 型遺伝子	BS1 (S042)	691 bp
BCS-1/2 (S023)	ボツリヌス C 型遺伝子	BS2 (S043)	690 bp
BDS-1/2 (S024)	ボツリヌス D 型遺伝子	BS2 (S043)	690 bp
BES-1/2 (S025)	ボツリヌス E 型遺伝子	BS3 (S044)	691 bp
BFS-1/2 (S026)	ボツリヌス F 型遺伝子	BS3 (S044)	691 bp
BGS-1/2 (S027)	ボツリヌス G 型遺伝子	BS4 (S045)	668 bp

※ () 内に、製品コードを示す。

2. 方法

PCR 反応液および温度条件は、以下に示すとおりです。

通常の PCR (UNG 処理を行わない場合)

<反応液組成>

<i>TaKaRa Taq</i> (5 U/ μ l)	0.25 μ l
10 × Buffer for PCR Pathogenic primer set	5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μ l
Primer-1 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Primer-2 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Positive Control Template	1 μ l
滅菌精製水	38.75 μ l
Total	50 μ l

<PCR 条件>

94°C	1 min.	} 35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit を使用し UNG 処理を行った場合

<反応液組成>

TaKaRa Taq (5 U/ μ l)	0.25 μ l
10 × PCR Buffer (Mg ²⁺ plus)	5 μ l
dU plus dNTP Mixture	4 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 μ l
UNG (2 U/ μ l)	0.5 μ l
Primer-1 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Primer-2 (19 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Positive Control Template	1 μ l
滅菌精製水	36.75 μ l
Total	50 μl

<反応条件>

25°C	10 min.	(UNG 処理)
95°C	2 min.	(UNG の熱処理)
↓		
94°C	1 min.	35 cycles
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	

3. 結果

PCR 増幅産物を 3% アガロースゲルを用いて電気泳動で解析したところ、目的サイズのバンドが検出されました。1～14 レーンは UNG 処理を行わない通常の PCR、15～28 レーンは UNG 処理を行った場合の結果です。いずれの場合も目的のバンドのみが検出され、増幅量は UNG 処理に影響されずほぼ同等でした。従って、TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit による UNG 処理は、本実験に用いた条件下では PCR 反応およびその増幅効率に影響を与えないことが確認できました。

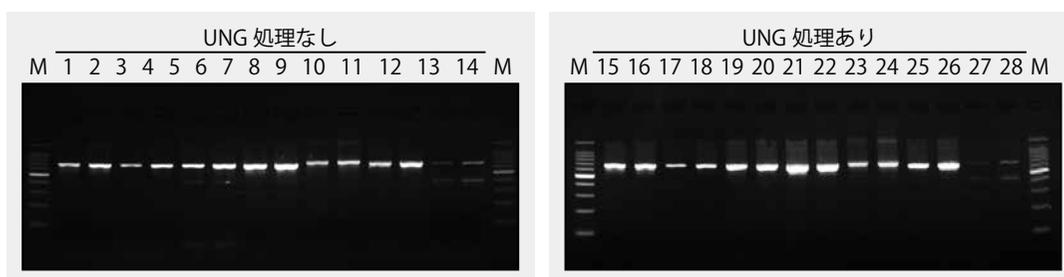


図 10. ボツリヌス菌ボツリヌス遺伝子検出用 Positive Control Template の増幅

レーン	Primer	Template		Primer	Template	
1, 15	BAS (S021)	BS1 (S042)	0.2 pg	10, 24	BES (S025)	BS3 (S044) 1.0 pg
2, 16	BAS (S021)	BS1 (S042)	1.0 pg	11, 25	BFS (S026)	BS3 (S044) 0.2 pg
3, 17	BBS (S022)	BS1 (S042)	0.2 pg	12, 26	BFS (S026)	BS3 (S044) 1.0 pg
4, 18	BBS (S022)	BS1 (S042)	1.0 pg	13, 27	BGS (S027)	BS4 (S045) 0.2 pg
5, 19	BCS (S023)	BS2 (S043)	0.2 pg	14, 28	BGS (S027)	BS4 (S045) 1.0 pg
6, 20	BCS (S023)	BS2 (S043)	1.0 pg	M	100 bp DNA Ladder	
7, 21	BDS (S024)	BS2 (S043)	0.2 pg			
8, 22	BDS (S024)	BS2 (S043)	1.0 pg			
9, 23	BES (S025)	BS3 (S044)	0.2 pg			

TaKaRa Taq はタカラバイオ株式会社の商標です。

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

v201608Da