

반복적인 PCR 실험의 False Positive 검출 방지

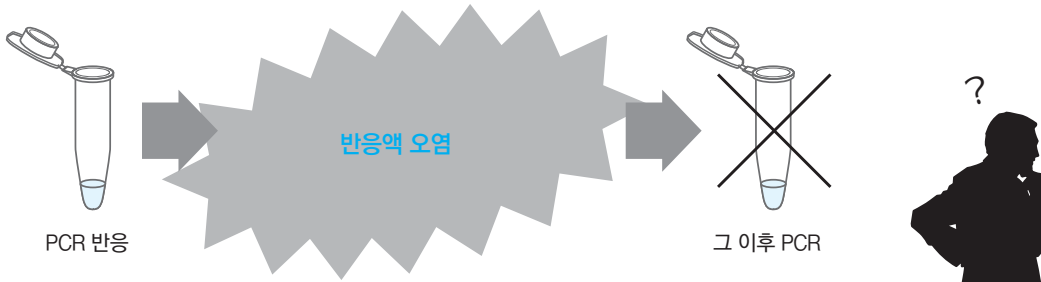
UNG를 이용한 PCR Carryover Contamination 방지

PCR은 매우 높은 감도의 검출 방법이므로, 앞서 진행한 PCR 증폭산물의 carryover contamination에 의해 위양성(false positive)이 생기는 경우가 있다. End-point PCR을 이용하는 식품·환경 검사 등은 동일한 PCR 반응을 반복적으로 실시하므로 오염의 위험성이 높아 결과에 큰 영향을 미칠 우려가 있다.

TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus(Code R013S)를 지속적으로 사용하면, 이러한 오염(carryover)에 의한 위양성 반응을 방지할 수 있어 유전자 검사의 신뢰성을 올릴 수 있다. TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus는 dTTP 대신에 dUTP를 포함한 dNTP mixture를 기질로 사용하여, 티민 thymine대신 우라실uracil을 포함한 증폭산물을 만들어낸다. 만약 이 증폭산물이 carryover 오염이 되었다고 할지라도, 다음 반응 전에 Uracil-N-glycosylase(UNG)로 처리한 후 PCR 반응을 하게 되면, 오염된 증폭산물은 분해되고 우라실을 포함하지 않는 검체 유래의 DNA만 남아 PCR 반응의 주형이 된다. 따라서, 반복적인 PCR에 의한 carryover 오염을 방지할 수 있게 된다.

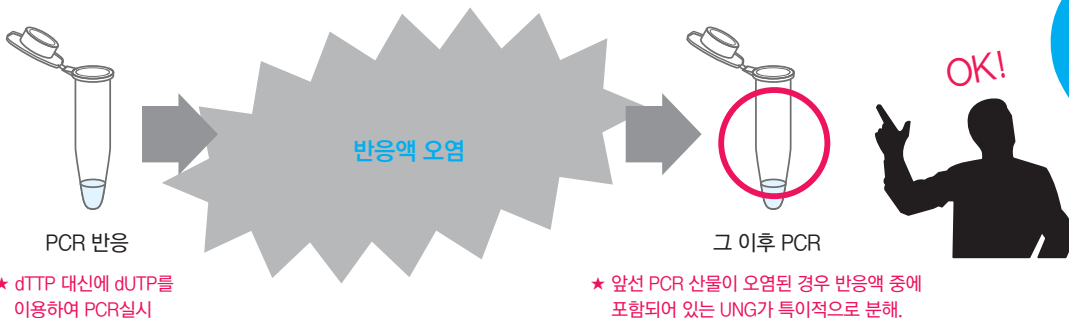
일반적인 PCR 반응을 하는 경우

증폭산물이 장갑, 피펫 등에 묻어 오염이 된다면



TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus를 사용했을 경우

증폭산물이 장갑, 피펫 등에 묻어 오염이 된다면



Heat-labile UNG, dUTP를 포함한 dNTP mixture가 포함된

TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus (Code R013S)

TaKaRa Taq HS PCR Kit, UNG plus (50회; PCR 50 µl 반응시)

- TaKaRa Taq HS(5 U/µl) 12.5 µl
- 10 × PCR Buffer for UNG plus¹ 250 µl
- dU plus dNTP Mixture(12.5×)^{2,3} 200 µl
- UNG(2 U/µl)^{4,5} 25 µl

¹ : Mg²⁺ 농도 : 22.5 mM(10 ×)

본 제품은 일반적인 TaKaRa Taq Hot Start Version(Code R007A)의 10 × PCR Buffer(Mg²⁺ plus) 내에 포함되어 있는 Mg²⁺ 농도보다 높다.

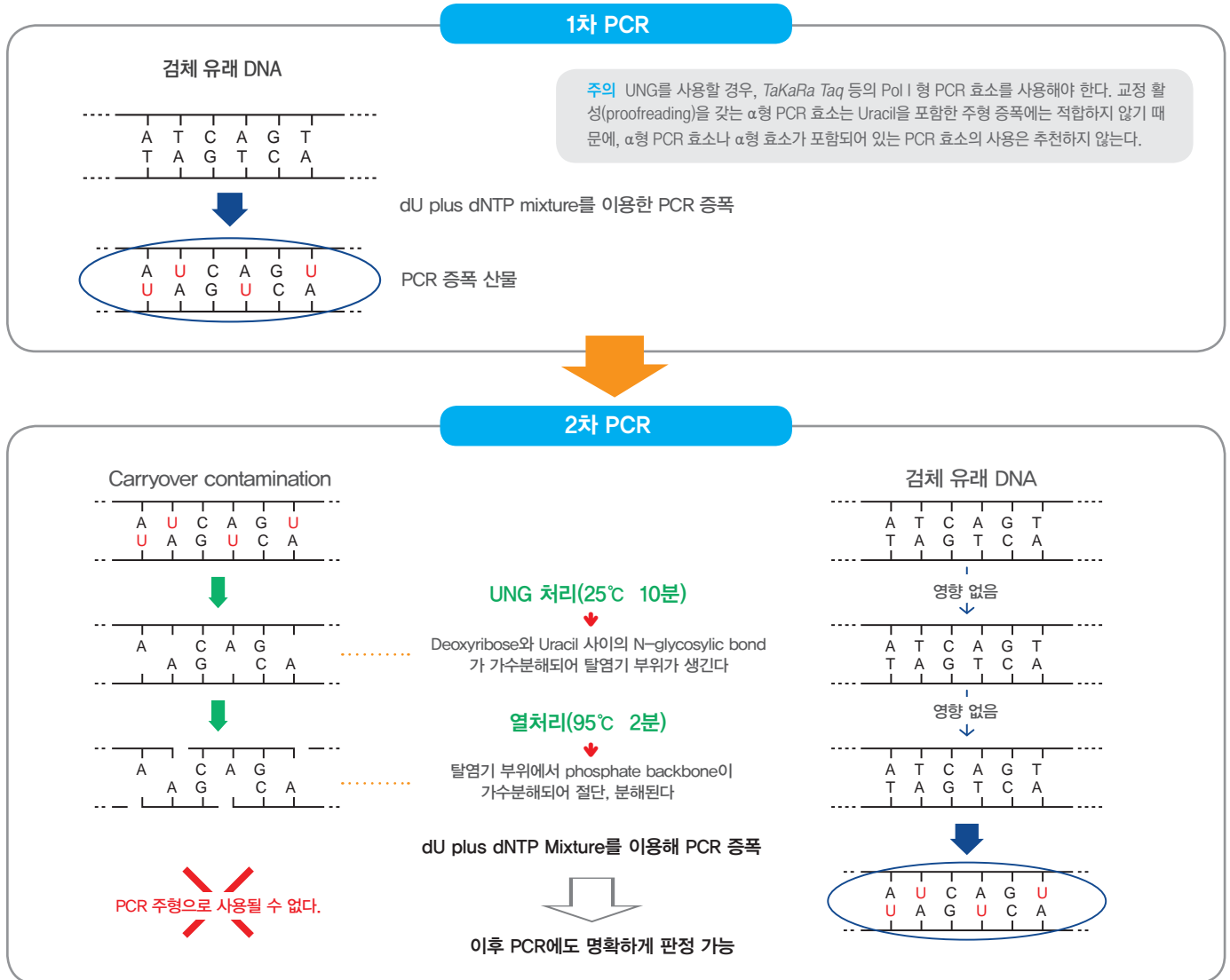
² : 7.5 mM dUTP, 2.5 mM dATP, 2.5 mM dGTP, 2.5 mM dCTP를 포함한 수용액(sodium salt)

³ : 별도 단품 구매 가능(Code 4035)

⁴ : Heat-labile UNG

⁵ : 별도 단품 구매 가능 (Code 2820)

UNG를 이용한 carryover 오염 방지 원리



실험예 1 : UNG에 의한 Carryover Contamination 방지 효과 확인

반응액 조제

- 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
- 주형, 프라이머, 멸균증류수를 넣어 50 μl로 맞춤.

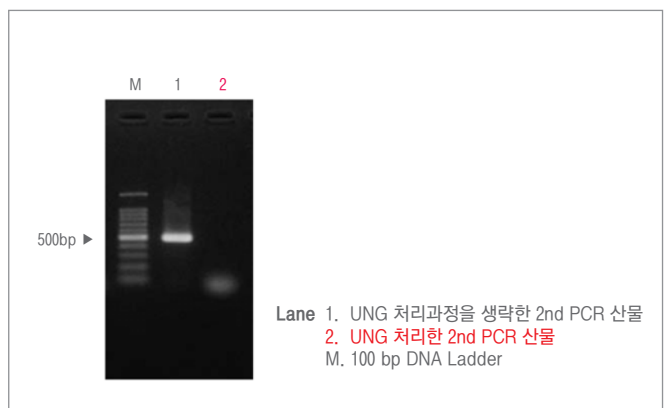
Thermal cycler를 이용하여 아래 반응조건으로 반응한다.

- 25°C 10분 (UNG 처리*)
 - 95°C 2분 (UNG의 실행)
 - 98°C 10초
 - 55°C 30초
 - 72°C 1분
- } 30 cycles

방법 본 제품의 사용법에 따라 인간 게놈 DNA 10 ng를 주형으로 약 500 bp의 PCR 증폭을 실시했다(1차 PCR). 이 PCR 증폭 산물 2 μl를 주형으로 UNG로 처리하거나 또는 처리하지 않고 1차 PCR과 같은 조건으로 증폭하여(2차 PCR) carryover 오염에 대한 효과를 판정하였다.

결과

UNG 처리과정에서 1차 PCR 증폭 산물이 UNG에 의해 분해되었기 때문에, 2차 PCR에서는 증폭 산물이 검출되지 않았다.

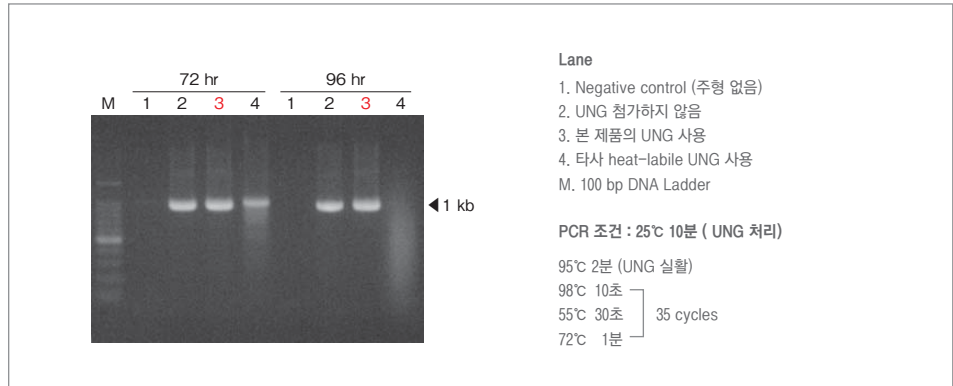


실험예 2 : PCR 산물 안정성

UNG를 이용하여 carryover 오염을 방지하는 PCR 반응에서는, UNG의 불완전한 실활(heat inactivation)에 의해 증폭 산물이 분해되어 잘못된 PCR 검사 결과를 초래하는 경우가 있다. 특히, 타겟량이 부족하여 증폭 산물이 적은 경우엔 더욱 주의가 필요하다. 본 제품에서 사용하고 있는 heat-labile UNG는 50°C에서 10분만 열처리를 해도 완전히 비가역적으로 실활된다. Carryover 오염을 확실하게 막기 위해 UNG의 양을 늘려도, PCR cycle 전의 95°C, 2분의 변성과정에서 완전하게 실활시킬 수 있다.

방법 인간 계놈 DNA를 이용하여 약 1 kb의 유전자 단편을 PCR 증폭했다. 제품 비교를 위해 타사의 heat-labile UNG를 첨가한 실험도 추가하였다. PCR 후 반응액을 25°C로 72시간, 96시간 인큐베이션하여, 잔존하는 UNG 활성에 의한 PCR 산물에 대한 영향을 비교했다.

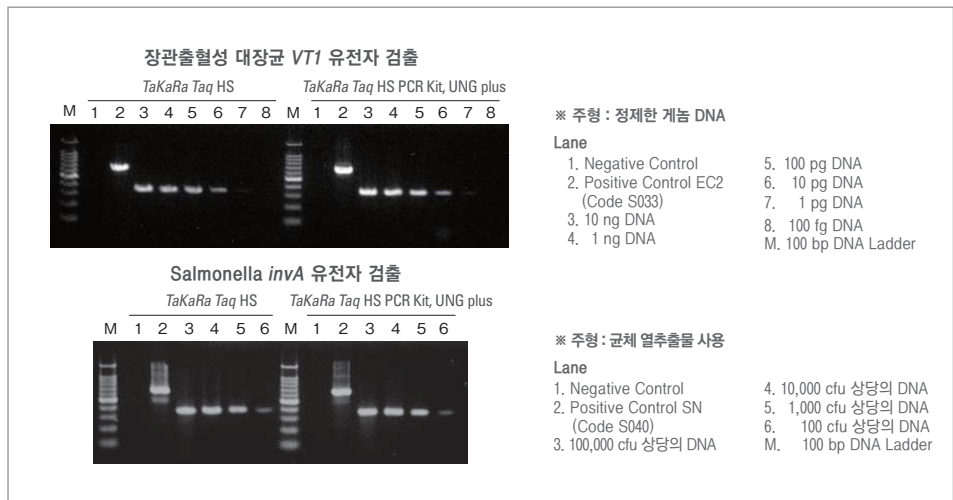
결과 본 제품의 UNG(Uracil DNA Glycosylase, heat-labile)를 첨가한 PCR 반응에서는 실온에서 96시간 인큐베이션 한 후에도 증폭산물의 분해는 볼 수 없었다.



실험예 3 : 일반적인 PCR 반응과 증폭 효율 비교

방법 장관출혈성 대장균 *VT1* 유전자 검출용 Primer Set EVT-1&2 (Code S006)과 Salmonella균 *invA* 유전자 검출용 Primer Set SIN-1&2 (Code S018)을 이용해 본 제품과 TaKaRa Taq HS(일반적인 PCR 반응)와의 증폭 효율을 비교하였다.

결과 본 제품을 이용한 UNG 처리가 포함된 반응과 TaKaRa Taq HS를 이용한 일반적인 PCR 반응 효율이 동등 수준임을 확인할 수 있었다.



기존 PCR 효소를 그대로 사용하면서, Carryover 오염 방지

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit (Code 6088)

Heat-labile UNG, dUTP를 포함한 dNTP mixture를 이용하면, 기존에 사용하고 있는 PCR 반응 시스템을 carryover의 영향을 방지하는 시스템으로 변경할 수 있다. 이때 PCR 효소는 TaKaRa Taq Hot Start Version(Code R007A) 등의 Pol I 형 효소를 사용해야 한다. α형 PCR 효소 또는 α형 PCR 효소를 일부 포함한 효소와 본 제품을 조합해 사용하는 것은 추천하지 않는다.

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit (200회 ; PCR 50 μl 반응)

- UNG(2 U/μl)¹⁾ 100 μl
- dU plus dNTP Mixture²⁾(12.5×) 800 μl
- MgCl₂ (25 mM) 1 ml

¹⁾ : Heat-labile UNG
²⁾ : dUTP가 포함된 기질



For Food Safety

Hunter Accelerated-PCR[®]

Integrated design

- Compact, portable controller, thermocycler, detection optics
- Chemistry-ready cartridges with lyophilized reagents
- Built-in bar-code reader and analysis software

Efficient

- Sample capture and processing in hours versus days

Portable, point-of-need use

- Lightweight, minimal bench space needed

Easy to operate and interpret results

- Touch screen-driven operation

Accurate

- Reliable gold-standard test results

State-of-the art network and wireless communication features

- Capable of decentralized data capture and secure centralized monitoring



Food Safety Assays :

- *E. coli* eae-gamma
- *E. coli* STEC 1
- *E. coli* STEC 2
- *Listeria monocytogenes*
- *Salmonella* species
- *Salmonella enteritidis*
- *Salmonella typhimurium*
- Porcine (verification)

