Code No. 6088

研究用

TaKaRa

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit

说明书

v201702Da

目　　录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保　　存	1
● 试剂盒外必备的试剂及仪器	1
● 注意事项	1
● 操作方法	2
● 实验例	2
● 关联产品	4

● 制品说明

PCR 是一种非常敏感的 DNA 扩增技术，易受污染影响，PCR 扩增产物的污染会产生假阳性结果。PCR 扩增产物的污染是 End-point PCR 方法，特别在食品、环境检测中是令人头痛的问题。

本制品是一种可防止假阳性产生的试剂盒。使用本制品是在 PCR 反应时以 dUTP 取代 dTTP，并同时使用对含有 dU 的 DNA 具有降解作用的 UNG 酶（Uracil-*N*-glycosylase）。在 PCR 反应前加入 UNG 可降解含有尿嘧啶的 PCR 产物，而对不含尿嘧啶的模板无任何影响，可选择性水解含有尿嘧啶的 PCR 产物。UNG 的作用原理：在 PCR 反应前 25℃、10 分钟反应中，UNG 酶可水解 PCR 反应液中含有尿嘧啶的 PCR 产物的尿嘧啶碱基和糖磷酸骨架的 N-糖苷键，释放游离尿嘧啶。随后进行 95℃、2 分钟热处理，在 UNG 酶失活的同时进一步对磷酸骨架水解，从而消除含有尿嘧啶的 PCR 产物的污染。

UNG 酶可以作用于单链或双链 DNA，对 RNA 无活性。本试剂盒除含有 UNG 酶外还附带含有 dUTP 的 dNTP Mixture 以及 $MgCl_2$ 溶液。使用本试剂盒时请与 *TaKaRa Taq* Hot Start Version（Code No.R007A/B）等 Pol I 型 PCR 酶组合使用。

● 制品内容（50 μl 反应×200 次）

1. UNG	2 U/μl	100 μl
2. dU plus dNTP Mixture *	12.5×	800 μl
3. $MgCl_2$	25 mM	1 ml

* dU plus dNTP Mixture 的 Na 盐溶液组成如下：

dUTP 7.5 mM
dATP 2.5 mM
dGTP 2.5 mM
dCTP 2.5 mM

● 保　存：　-20℃。

● 试剂盒外必备的试剂及仪器

PCR 酶：

TaKaRa Taq Hot start Version（Code No. R007A/B）、*TaKaRa Taq*（Code No. R001A/B）等 Pol I 型 PCR 酶。

【注】具有校正活性的α型酶同含有尿嘧啶的模板结合后产生 PCR 阻害作用，因此不建议使用α型 PCR 酶及含有α型酶的混合酶与本制品组合使用。

微量移液枪

PCR 扩增仪

配套于微量移液枪的 tips

● 注意事项

从反应液的配制到 PCR 产物的检出应分别在 4 个区域操作，操作区域建议进行物理性隔离。

〇操作区 1：反应液的配制及分装。

〇操作区 2：样品的制备。

〇操作区 3：将样品添加到反应液中。

〇操作区 4：PCR 反应及凝胶电泳对 PCR 产物进行检测。

为防止污染，除在操作区 4 外请避免对 PCR 扩增产物 tube 进行开闭。

● 操作方法

使用 *TaKaRa Taq* Hot Start Version（Code No. R007A/B）时操作方法如下：

1．在冰上按下列组份配制反应液（在操作区 1 操作）。除模板（检测样品）外，将下列组份根据反应所需份数配制混合液，分装到反应管中，盖上反应管盖。

TaKaRa Taq Hot Start Version(5 units/μl)	0.25 μl	
10×PCR Buffer（Mg^{2+} plus)*1	5 μl	
dU plus dNTP Mixture*2	4 μl	
$MgCl_2$*2,3	1.5 μl	
UNG*2,4	0.5 μl	
Template	＜ 500 ng	
Primer 1	10～50 pmol	（终浓度 0.2～1.0 μM）
Primer 2	10～50 pmol	（终浓度 0.2～1.0 μM）
dH_2O	Up to 50 μl	

*1 *TaKaRa Taq* Hot Start Version（Code No. R007A/B）中的附带试剂。

*2 本试剂盒中的试剂。

*3 因 dUTP 的浓度设定是 dTTP 的 3 倍，所以总体 dNTP 的浓度变高，虽然 PCR Buffer 中含有 $MgCl_2$，但为了保持 $MgCl_2$ 与 dNTP 量的平衡，要增加 $MgCl_2$ 浓度。使用 10 × PCR Buffer（Mg^{2+} free）时请添加 4.5 μl $MgCl_2$。

*4 标准使用量：50 μl 反应体系中添加 1 U。

2．模板（样品）的添加（在操作区 3 操作）。

向 1.的分装后反应液中添加模板（样品），盖紧反应管盖。

3．轻微离心，将反应管放置到 PCR 扩增仪中。

4．UNG 处理及 PCR 扩增。

先进行 UNG 处理，然后使 UNG 失活。随后按照 PCR 反应条件进行 PCR 扩增。根据扩增片段大小设定 PCR 反应条件。

<例如扩增 1 kb DNA 片段时>

25℃	10 分钟（UNG 处理）*1	
95℃	2 分钟（UNG 的热失活）*1	
98℃	10 秒*2	30 Cycles
55℃	30 秒	
72℃	1 分钟*3	

*1 UNG 酶处理条件不变，与扩增片段大小无关。

*2 PCR 变性条件请根据 PCR 扩增仪种类及反应管种类进行设定。一般设定为 98℃ 5～10 秒或 94℃ 20～30 秒。

*3 使用 dUTP 替代 dTTP，有时 PCR 扩增效率会有所下降，当扩增效率不良时，请延长延伸时间。

5．将 PCR 扩增产物进行凝胶电泳等分析（在操作区 4 操作）。

● 实验例

1. 与普通 PCR 扩增效率的比较。

【方法】

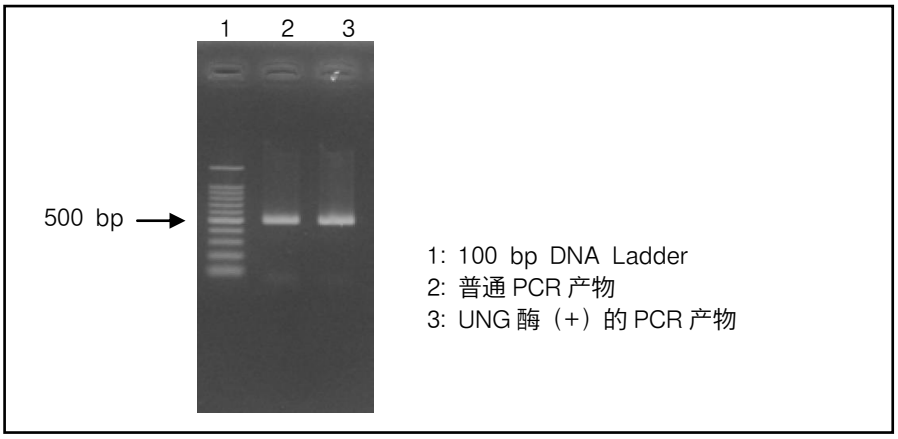
使用 *TaKaRa Taq* Hot Start Version 和本制品，对普通组成的 PCR 反应和添加了 UNG 酶的 PCR 反应进行扩增效率的比较。

模板：50 ng 人基因组 DNA

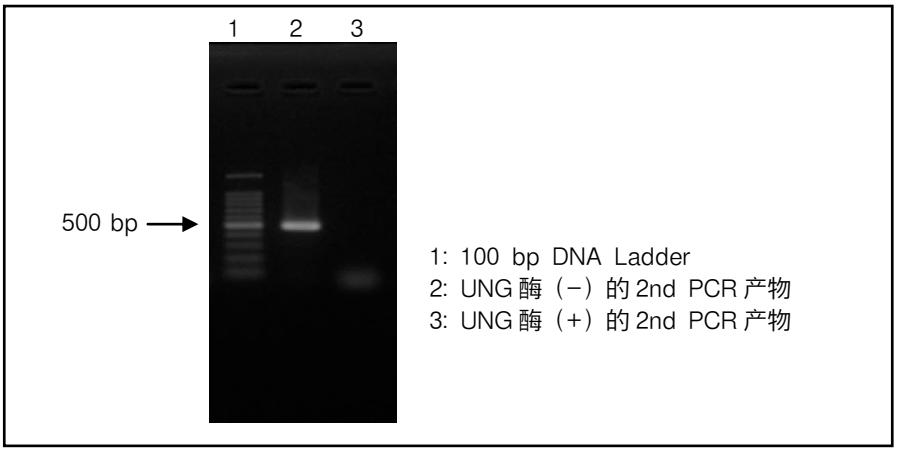
扩增片段大小：500 bp

＜普通 PCR 组成＞
・使用 *TaKaRa Taq* Hot Start Version 推荐的反应条件。
・UNG 酶（−）、使用含有 dTTP 的 dNTP Mixture。
＜使用 UNG 酶的 PCR 组成＞
・使用本制品推荐的反应条件。
・UNG 酶（+）、使用含有 dUTP 的 dUTP plus dNTP Mixture。

【结果】UNG 酶（+）PCR 和普通 PCR 均可很好地进行扩增且两者扩增效率相同。



2 扩增产物污染的消除效果确认。
【方法】按照本制品的操作方法，以 10 ng 人基因组 DNA 为模板，扩增 500 bp 的 DNA 片段（1st PCR）。再以 2 μl 1st PCR 产物为模板进行 UNG 酶（+）及 UNG 酶（−）处理，然后使用 1st PCR 的反应条件进行 PCR 扩增（2nd PCR），确认扩增产物污染的消除效果。



【结果】进行 UNG 酶（+）及 UNG 酶（−）处理 PCR 反应均以 2 μl 的 10 ng 人基因组 DNA 扩增的 500 bp DNA 片段为模板，2 个反应的结果差异证实了扩增产物污染的消除效果。

● 关联产品

Uracil DNA Glycosylase （UNG），heat-labile（Code No. 2820）
dU plus dNTP Mixture（12.5×）（Code No. 4035）
dUTP（Code No. 4020）
TaKaRa Taq™（Code No. R001A/B）
TaKaRa Taq™ Hot Start Version（Code No. R007A/B）
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Gradient（Code No. TP600）
Mupid®-2plus（Code No. M-2P）
Mupid®-exU（Code No. EXU-1）
20× TAE Buffer（Code No. 28354）
TBE（Tris-borate-EDTA）powder（Code No. T905）
100 bp DNA Ladder（Code No. 3407A/B）

注意
本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。
未经TAKARA BIO INC.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。
如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。
您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。
所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 TAKARA BIO INC.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685，87641686
4006518761，4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: http://www.takara.com.cn

v201702Da