



Application

## 培養上清を用いたnested-PCRによる細菌感染の検出

製品名

KAPATaqEXtra HotStart ReadyMix with Dye (KK3606)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは、国内のお客様のご厚意により掲載させて頂きました。

### 実験条件

培養したヒト由来細胞が細菌に感染していないことを確認するため、細胞培養上清を用いたnested-PCRによる細菌のDNA検出を実施した。得られるPCR産物は、1st PCRにより810bp、2nd PCRにより590bpとなる。

- サンプル：1st PCR では培養に使用した培地 0.5 $\mu$ l をそのまま使用  
2nd PCR では 1st PCR の反応液 0.5 $\mu$ l を使用

#### ● PCR 反応組成

##### a) KAPA Taq EXtra HotStart ReadyMix with dye

Template	0.5 $\mu$ l
KAPA ReadyMix	12.5 $\mu$ l
Forward Primer(50 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
Reverse Primer(50 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
Water	11.5 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ l

##### b) 他社製品 (ホットスタート仕様)

Template	0.5 $\mu$ l
10 $\times$ Buffer (20mM MgCl <sub>2</sub> )	2.5 $\mu$ l
酵素 (5u/ $\mu$ l)	0.1 $\mu$ l
dNTP (2.5mM each)	2 $\mu$ l
Primer1 (50 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
Primer2 (50 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
Water	19.4 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ l

#### ● PCR プログラム (両製品共通)

94 °C	30sec	} 35 cycle
94 °C	30sec	
55 °C	2min	
72 °C	1min	
72 °C	7min	

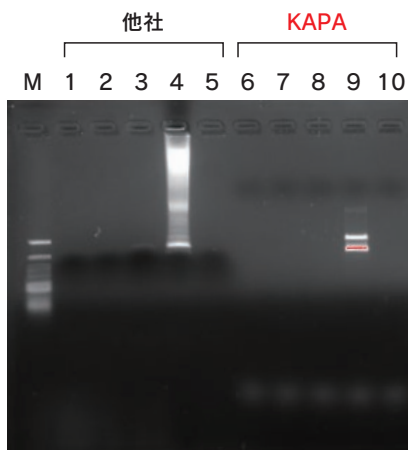
※1st PCR、2nd PCR と同じプログラムを使用

- PCR 装置：ABI GeneAmp 9700
- 増幅サイズ：810bp (1st PCR) , 590bp (2nd PCR)

#### <ターゲット配列について>

1st PCR では 16S と 23S の rRNA コード領域特異的なプライマーセットを用い、2nd PCR では 16S と 23S 間のスペーサー領域と 23S コード領域特異的なプライマーセットを用いて nested PCR を実施することで、菌種特異的で、かつ、低コピーの検出を可能としている実験系

### 結果



M : マーカー  
 レーン 1~3 } サンプル  
 レーン 6~8 }  
 レーン 4, 9 : ポジティブコントロール (細菌 DNA)  
 レーン 5, 10 : ネガティブコントロール (NTC)

いずれのサンプル (レーン1 ~ 3, 6 ~ 8) でもバンドは検出されなかった。一方、ポジティブコントロールであるレーン4とレーン9については、810bpと590bpの増幅産物が得られるべきレーンであるが、レーン4 (他社酵素) では590bpのバンドが得られず、非特異的バンドが多かった。レーン9のKAPA TaqEXtra HotStart ReadyMix with Dyeを用いた結果では、目的のサイズのバンドが得られた。



#### お客様のコメント

ルーチンで用いる安価なPCR酵素を探していて、キャンペーン情報を見つけたため評価を実施した。安価だが、目的のサイズのバンドのみ得られ、他社酵素より良い結果が得られた。