

PCRFast® 標準タイプ (PCRFast® Realtime (SYBR®Green) und Gel)**アレルギー・動物種鑑別・遺伝子組換え作物用キット (08-07-21)**

抄訳:株式会社プラクティカル 2009/02

はじめに

「PCRFast®シリーズ標準タイプ」は食品飼料医薬製品などにおける特異な DNA フラグメントを、SYBR®Green リアルタイム法やゲル電気泳動法により検出するための使い易い PCR 試験法試薬です。

反応バイアル 96 本すべてに特異プライマー対がふくまれています。

そのうち赤バイアル 48 本は、PTC(陽性コントロール)および ITC(阻害コントロール)としてのコントロール DNA も含まれています。

試料調製

CTAB 抽出法(ISO 21571, Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Methods for nucleic acid extraction)をお勧めします。場合によっては、シリカカラムによる追加的な分離精製が必要になります。また、その他の抽出精製方法がより良い結果をもたらすこともあります。

およその所要時間

抽出	1 時間
PCR セットアップ	15 分
PCR	2 時間
電気泳動	15~30 分

PCRFast® は Institut für Produktqualität GmbH (ifp 社)の登録商標です。

1. テスト原理

「PCRFast®シリーズ」は食品飼料医薬製品などにおける特異な DNA フラグメントを検出するための使い易い PCR 試験法試薬です。国際的な PCR 規格(ISO)にも準拠しています。

全バイアルには特異プライマー対が最適含量含まれています。

透明バイアルは、試料からの抽出 DNA の検知、および抽出系のコンタミコントロールに用います。

赤色バイアルは、特異プライマー対に加えて、コントロール DNA が含まれており、PTC:陽性コントロール(マスターミックスの機能確認として)、ITC:阻害コントロール(阻害物の確認)、融解温度曲線解析の結果検証に用います。

各反応バイアルにマスターミックス(2倍量)12.5μL、ついで抽出 DNA 試料 12.5μL を添加します。(マスターミックスはポリメラーゼ、核酸、塩化マグネシウムを(あるいは SYBR® Green 試薬も)含む)

PCR サーマルサイクラーでターゲット配列を増幅します。

増幅された DNA は SYBR® Green リアルタイム法やエチジウムブロマイドによるゲル電気泳動法により視認検知されます。

SYBR® Green リアルタイム法による陽性は融解温度曲線により解析確認し、可能ならエチジウムブロマイドによるゲル電気泳動法により確認してください。ITC コントロールの融解温度曲線との比較も必要です。

2. 内容物

透明: 0.2mL バイアル 8 連ストリップ 6 本 総計 48 本

特異プライマー対を含む

SAMPLE: 抽出試料中の DNA の検知

NTC: 陰性コントロール

ETC: 抽出系コンタミコントロール

赤色: 0.2mL バイアル 8 連ストリップ 6 本 総計 48 本

特異プライマー対およびコントロール DNA を含む

PTC: 陽性コントロール

ITC: 阻害コントロール

3・キット以外に必要な資器材試薬

資器材

- ボルテックスミキサー
- 振とうインキュベーター 60~65°C
- マイクロチューブ遠心機 14,000G 以上 (1.5~2.0 mL マイクロチューブ用)
- 遠心機 > 2,500G 以上 (15~50 mL 遠心管用)
- PCR サーマルサイクラー
ゲル電気泳動: ABI 7500, Eppendorf MasterCycler, 0.2 mL ヒートブロック付きなど
リアルタイム法: Applied Biosystems 7500, STRATAGENE Mx 3005 P など、いずれも融解温度
曲線解析ソフトつき
- 電気泳動器材一式
- フィルター付きマイクロピペット 2~20、20~200、100~1000µL
- 50 mL 遠心チューブ
- 1.5~2.0 mL マイクロチューブ

試薬

DNA 抽出

- CTAB バッファー(CTAB 2 %, NaCl 1.4 mol / l, Tris 0.1 mol / l, EDTA 0.02 mol / l, pH = 8.0)
- クロロホルム (あるいは Ready Red か Fa. Q-Biogene)
- プロテナーゼ K
- イソプロパノール(無水)
- グリコーゲン
- 70%エタノール (denatured)
- 0.1 x TE バッファー (Tris 1 mmol / l, EDTA 0.1 mmol / L)
- DNA シリカ精製キット(PCRFast DNA 精製キットなど)
- 脱イオン水

PCR 試薬

ゲル電気泳動の場合のみ

2倍濃度マスターミックス (Hotstart 推奨)

AmpliTaq Gold® PCR MasterMix, Applied Biosystems No. 4318739;
Qiagen HotStarTaq MasterMix Kit Qiagen No. 203443;
Brilliant II QPCR MasterMix, Stratagene No. 600804 など

ゲル電気泳動 あるいは SYBR®Green リアルタイム法の場合

2倍濃度マスターミックス (Hotstart 推奨)

Power SYBR® Green PCR MasterMix, Applied Biosystems No.
4367659; QuantiTect SYBR®Green PCR Kit Qiagen No. 204143;
Brilliant II SYBR® Green MasterMix Stratagene No. 600548 など

検出

- アガロース
- エチジウムブロマイド
- バッファー(ランニング、保護、調製用)
1 x TAE buffer (Tris 40 mmol / L, acetic acid 20 mmol / L, EDTA 1 mmol / L)など
- バッファー(ローディング)
5 x (sucrose 5 %, orange G 0.25 %)など
- 分子量マーカー, 50 - 1000 bp

4. 注意

- あらゆる試験および PCR 操作は ISO 規格準拠などの安全な機器を用いてください。
- 相互汚染のリスクを軽減するよう、フィルター付きチップやグローブを用いて操作してください。
- 試料抽出、試料添加、PCR 試験はすべて異なる隔離された部屋で行ってください。
- エチジウムブロマイドは DNA 損傷など有害な試薬ですので注意して取り扱ってください。
- 紫外線は DNA 損傷のおそれがありますので注意して取り扱ってください。

5. 保管方法

キットは 2~8°C で輸送・保管してください。

6. 試料抽出(DNA 精製)

PCR 試験においては、個々の試料について複数の抽出をすること、および個々の分析操作について一つの ETC(抽出コントロール)を用いることが推奨されています。(ISO 21571, Foodstuffs - methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - methods for nucleic acid extraction).

以下の最適化された CTAB 抽出法はさまざまなマトリックスにおいて優れた結果をもたらしますが、マトリックスによってはその他の方法が優れている場合もあります。野菜や動物脂肪、レシチンのようなマトリックスの場合にはヘキサン抽出が必要です。

6.1 DNA 抽出

各試験ごとに、試料なし・試薬のみの ETC(抽出コントロール)のための PCR セットアップが必要です。各試料ごとに2個を秤量し、2重の検知解析を行います。

(1) ホモジナイズ試料 2g を 50mL 遠心管にとり、CTAB バッファー10mL とプロテナーゼ K(20mg/mL)溶液 30 μ L を加え、しっかりと混合する。(スターチなど膨潤試料の場合には CTAB バッファーを 20mL とする) 単一試料の種別鑑定などの場合には試料 200mg を 2mL 遠心管にとり、CTAB バッファー1mL とプロテナーゼ K(20mg/mL)溶液 30 μ L を加え、しっかりと混合する。

(2) インキュベート=60°C、振とうしながら 90 分間(あるいは一晩)。
その後、室温(30°C未満)までさます。

(3) 遠心分離=2,500G 以上 5 分間

(4) 2.0mL マイクロチューブ(耐性)を用意し、クロロホルム(あるいは ReadyRed)500 μ L、次いで(3)の上清 700 μ L を加えて、ボルテックス 15 秒間。

(5) 遠心分離=14,000G 以上 15 分間。(クリアでない場合さらに 5 分間)

(6) 2.0mL マイクロチューブを用意し、イソプロパノール 500 μ L、次いで(5)の上清 500 μ L を加えて、混合。
(DNA が少ない試料の場合はグリコーゲン(20mg/mL)溶液 2 μ L も加える)

- (7) インキュベート＝室温、30 分間
- (8) 遠心分離＝14,000G 以上 15 分間。
- (9) 注意深く上清を取り除き、ペレットに 70%エタノール 500 μ L を加えて混合。(DNA が少なくペレットが見えない場合には洗浄を繰り返す)
- (10) 遠心分離＝14,000G 以上 5 分間。
- (11) 注意深く上清を取り除き、手短に遠心分離＝14,000G 以上 15 秒間し、残りのエタノールも除去。さらに 50°C 15 分間加温してエタノールを蒸発させる。(室温なら 1 時間)
- (12) TE バッファー100 μ L を加えてペレットを再溶解する。(溶解できない場合、超音波バスを用いるか、4°C で一晩静置してボルテックスする)
- 註: 再溶解液が濁る場合、100 μ L 全部を 6.2 の手順のカラムにとってください。大豆製品(大豆粉や大豆)、チョコレート、ココアを含む製品など、場合によっては、シリカカラムによる洗浄ステップが必要で、(12)の DNA 溶液 100 μ L 全部をカラムにとってください。

6.2. 場合により、シリカカラムを用いた DNA 洗浄(たとえば、PCRFast® DNA Purification など)

操作についてはカラム添付の説明書によってください。DNA 精製の最終では溶出バッファー100 μ L を用いて DNA を溶出することをお勧めします。

註: エタノール残さは PCR 反応を阻害します。溶出ステップ(DNA 精製の最終)の前に例えば 37°C加温 10 分間でカラムを乾燥させてください。

6.3. DNA 濃度の評価

PCR セットアップ(260nmUV 測定やアガロースによる推定など)にあたり、全 DNA 量が 100ng を超えないようにしてください。すなわち DNA 量が多い試料(大豆粉、コーン粉、ソーセージなど)などの場合、通常は DNA 抽出液を 0.1x TE バッファーで希釈します。

ココアやチョコレート製品など阻害物を含む DNA 抽出液も同様に 0.1x TE バッファーで希釈します。

例: 6.1(12)の再溶解 DNA 溶液 100 μ L あるいは 6.2 の溶出 DNA 溶液 100 μ L を以下の割合で希釈

トウモロコシ粉・ダイズ粉	1:20	レシチン・スターチ	直接
チョコレート	1:10~20	飼料	1:10~20
ソーセージ	1:40~80		

7. PCR セットアップ

7.1. 準備

- 袋から必要な数だけバイアルをとりだす
- 使用しない分は乾燥材とともに袋に戻し 2~8°Cで保管する
- 1バイアルあたり 12.5μL のマスターミックスを用意する

7.2. セットアップ

下表のとおり各バイアルに滴下する。

	バイアル	マスターミックス	試料抽出 DNA 溶液	ETC 抽出コントロール※	脱イオン水
各抽出試料ごとに					
SAMPLE 試料	透明	12.5μL	12.5μL	—	—
ITC 阻害コントロール	赤	12.5μL	12.5μL	—	—
各試験ごとに					
PTC 陽性コントロール	赤	12.5μL	—	—	12.5μL
NTC 陰性コントロール	透明	12.5μL	—	—	12.5μL
ETC ※ 抽出コントロール	透明	12.5μL	—	12.5μL	—

Table 1: PCRFast® pipetting steps ※は任意・推奨

- 反応バイアルのふたをしめ(遠心処理: 推奨)、PCR サーマルサイクラーにセットする
- キット添付の QS データシートにあるサイクラープロファイルに基づいて設定する

註: 検証済みのマスターミックス・サーマルサイクラー

AmpliTaqGold® PCR MasterMix, Power SYBR® Green MasterMix (Applied Biosystems)

Brilliant® II QPCR MasterMix, Brilliant® II SYBR® Green QPCR MasterMix (Stratagene)

ABI 7500, Stratagene Mx3000P and Mx3005P, TECHNE Personal – Cyclor TC – 3000

Eppendorf Mastercycler

その他については異なる設定が必要となる場合があります

7.3. 検出

7.3.1. アガロースゲル 電気泳動

- 2.0 ~ 2.5 % アガロース、エチジウムブロマイド染色推奨
- 電気泳動については製造者の推奨にも従ってください

例:

- 2.0 ~ 2.5 % アガロースゲル(アガロース 1.0~1.25g、エチジウムブロマイド(10 mg/mL)溶液 2~4μL を 1 x TAE バッファー50mL に加えて温溶解)を調製し、キャストする
- 1 x TAE バッファーでゲルをカバーする
- ローディングバッファーを PCR 増幅産物に加え(バイアル内 25μL にローディングバッファー6μL)した後、10μL をゲルに注入する
- 分子量マーカーを注入する
- 3~6 V / cm で 15~30 分間、泳動する(システムによる)
- 転写・記録保存する

7.3.2. リアルタイム法(SYBR®Green)

- リアルタイム法(SYBR®Green)の反応評価は増幅曲線と融解温度曲線解析によって行います。
- 蛍光による増幅が確認された場合、融解温度曲線解析によって確認します。すなわち ITC: 阻害コントロールの融解曲線と比較し、差が 0.5°C以内であることを確認します。
- さらに電気泳動により確認することをお勧めします。

8. 評価

8.1. ゲル電気泳動

評価の概要を以下に記します。陽性は PTC: 陽性コントロールと同じ位置のバンドであることが必要です。

8.1.1. 評価の概要

SAMPLE 試料	ITC 阻害コントロール	PTC 陽性コントロール	NTC 陰性コントロール	ETC 抽出コントロール	結果
■■■■	■■■■	■■■■	no band	no band	試料: 陽性
no band	■■■■	■■■■	no band	no band	試料: 陰性
no band	no band	■■■■	no band	no band	阻害あり※1
			■■■■		コンタミあり※2
				■■■■	コンタミあり※3
		no band			マスターミックス不機能

■■■■: バンド有り

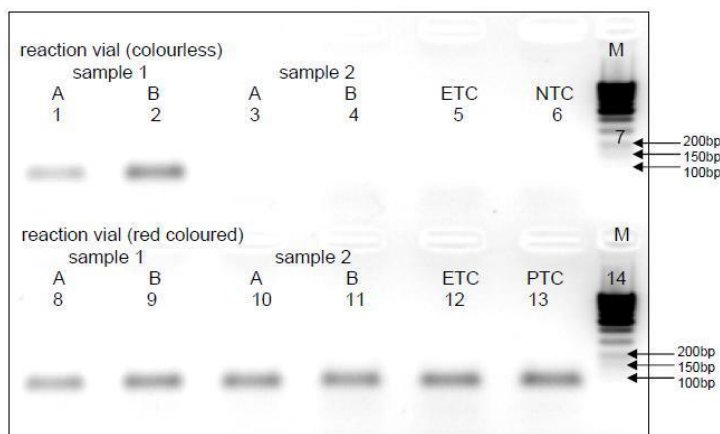
※1: 阻害ありの場合は試料抽出から再試行

※2: マスターミックスないし水にコンタミの可能性あり

※3: 試料抽出液あるいは抽出時にコンタミの可能性あり

8.1.2. ゲル電気泳動の典型パターン

Fig. 1: PCRFast® Hazelnut



上段 1 ~ 7 (透明バイアル: 含む特異プライマー対)

track 1: 試料 1 抽出 A: 陽性
 track 2: 試料 1 抽出 B: 陽性
 track 3: 試料 2 抽出 A: 陰性
 track 4: 試料 2 抽出 B: 陰性
 track 5: ETC 抽出コントロール: バンド無=コンタミなし
 track 6: NTC 陰性コントロール: バンド無=コンタミなし
 track 7: DNA length marker

下段 8 ~ 14 (赤色バイアル: 含む特異プライマー対および特異 DNA)

track 8: 試料 1 抽出 A: 阻害コントロール: バンド有り=阻害なし
 track 9: 試料 1 抽出 B: 阻害コントロール: バンド有り=阻害なし
 track 10: 試料 2 抽出 A: 阻害コントロール: バンド有り=阻害なし
 track 11: 試料 2 抽出 B: 阻害コントロール: バンド有り=阻害なし
 track 12: ETC 抽出コントロール: バンド有り=阻害なし(参考)
 track 13: PTC: 陽性コントロール: バンド有り=マスターミックス機能正常
 track 14: DNA length marker

8.1.3.反応コントロール

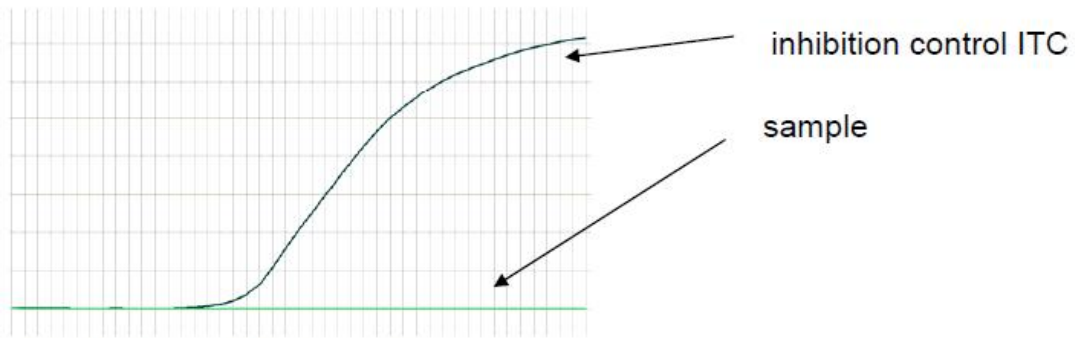
増幅 DNA の配列確認は制限解析で行うことができます。制限酵素により二つのフラグメントに分解されます。フラグメント長と制限酵素の情報はキット添付の QS データシートにあります。

8.2 SYBR®Green リアルタイム法

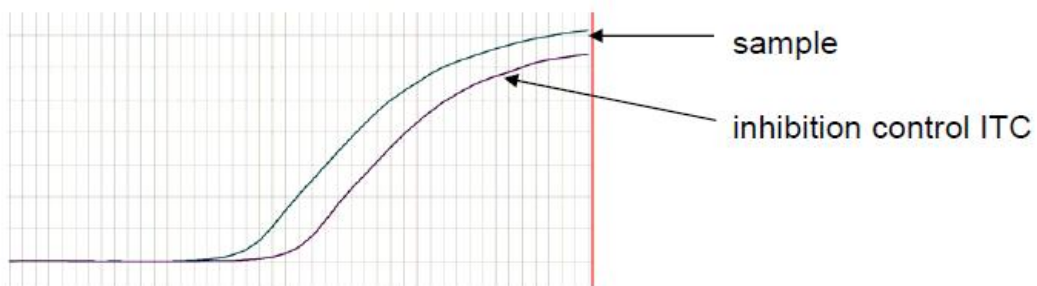
8.2.1. SYBR®Green リアルタイム法による評価

SAMPLE 試料	ITC 阻害コントロール	結果
増幅プロット無し	増幅プロットあり 融解曲線	試料: 陰性
増幅プロットあり 融解曲線あるが、 ITC と 0.5°C 以上の差異	増幅プロットあり 融解曲線	試料: 陰性
増幅プロットあり 融解曲線あり、 ITC と 0.5°C 未満の差異	増幅プロットあり 融解曲線	試料: 陽性
増幅プロット無し	増幅プロット無し	阻害あり ⇒希釈して再増幅

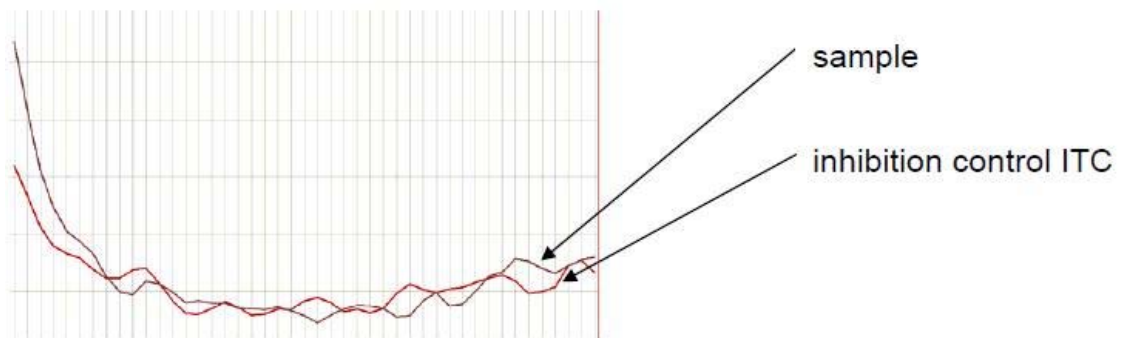
8.2.2 増幅パターン



Result: Sample is negative

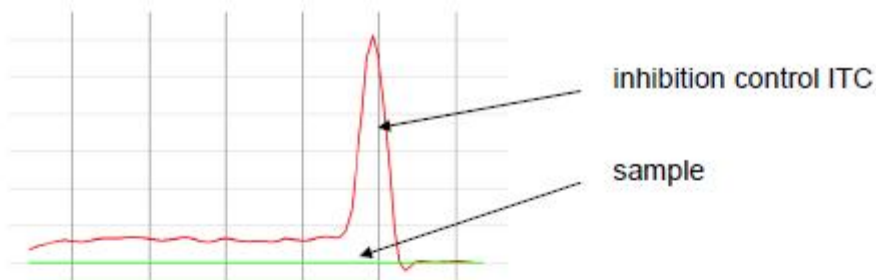


Result: Sample is positive, but verification of the positive result has to be done by means of melting curve analysis (in comparison to the melting curve of the inhibition control ITC)

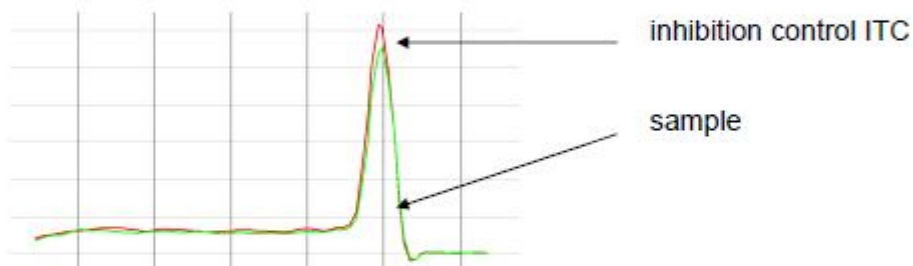


Result: Inhibition of the reaction

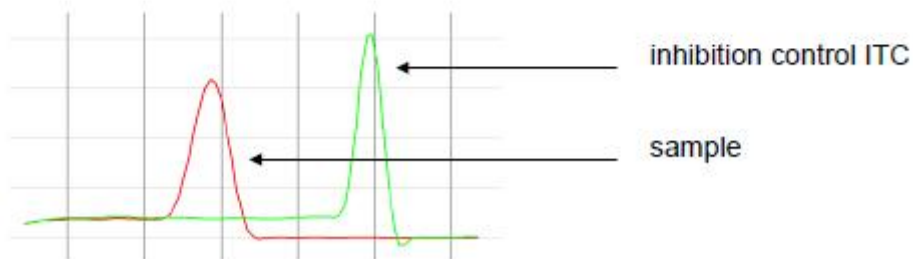
8.2.3 融解曲線パターン



Result: Sample is negative



Result: Sample is positive



Result: Sample is negative

9. 感度

QS データシート参照

10. 特異性

QS データシート参照

11. 文献

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.: "Molecular cloning. A laboratory manual", (3rd ed.), New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Arnheim N., Erlich H. "Polymerase Chain Reaction Strategy", Annual Review of Biochemistry (1992), 61 XIV:131-156.

注意！

- 吸飲したり、皮膚と接触したりすると有害である試薬類が含まれていることがあります。
- 使用前に、取扱説明書等をよくお読みいただき、注意事項をお守りください。
- 責任ある管理者の指導のもとに、保護手袋、保護メガネ等を着用して取り扱ってください
- 開封後は、各容器を密閉し、取扱説明書とともに保管してください。
- 廃棄する場合には、衛生面、環境面に十分配慮し、法規を遵守してください。
- 身体に異常を感じた場合は、ただちに医師の手当を受けてください。
- テスト結果の判断と運用はすべてお客様自身の責任で行ってください。

ご注文とお問合せは 株式会社プラクティカル
〒260-0032 千葉市中央区登戸 1-18-10 千葉 OS ビル
Tel 043-242-0425 Fax 043-242-0445 www.practical.jp mail@practical.jp

保証について

製造者および株式会社プラクティカルは、製造販売後1年以内あるいは記載有効期限のいずれか短い期間内に、キット添付の取扱説明書に基づき使用された場合において、製造・物流・保管等作業の不具合等による部材等の瑕疵に対してのみ保証いたします。

取扱説明書、ユーザーガイド、検査手順およびアプリケーションは、購入者のためのガイドラインとしてのみを目的として作成されておりませんので、購入者の皆様には、各検査手順やそれぞれのアプリケーションにおいての妥当性を、自ら検証していただくようお願いいたします。テスト結果の判断と運用はすべてお客様自身の責任によるもので、この商品の使用によるすべての直接的および間接的な結果としての経済的損失や精神的な損害などあらゆる損害に対し、明示的にもあるいは暗示的にも、一切補償するものではありません。保証に関する唯一の義務は、有効期限内において作業の不具合等による部材等の瑕疵が証明され弊社にすみやかに告知された場合のみであり、購入品あるいはその一部に対し、交換か返金がなされます。