2018 年 9 月制定 1 版

商品コード：F112－1K

「虫異物同定用プライマーセット」

取扱説明書

【特徴】

虫異物の同定は主に形態観察により行なわれます。一方、加工等により虫が原形をとどめない場合、虫種の違いを反映する塩基配列を指標とした同定法が有用です。従来法には cytochrome c oxidase subunit I (COI) 遺伝子の塩基配列を指標とした方法があります。しかし、これらには同定できない虫種が存在し、加熱加工を受けた虫を同定できない等の課題がありました。

本製品は、PCR 法により虫に由来する異物の DNA を増幅する試薬です。cytochrome c oxidase subunit I (COI) 遺伝子、または 16S リボソーム RNA (16S) 遺伝子の塩基配列中に存在する「虫種の違いを反映する短い塩基配列」を指標としています。シーケンサーを用い PCR 増幅産物の塩基配列を決定後、公共のデータベース等で検索を行うことで虫由来の異物を同定することが出来ます。

【内容】

① 虫異物同定用プライマー COI-A (F-primer、R-primer)・・・40μL (30 反応分、濃度：10μM) ×各 1 本
② 虫異物同定用プライマー COI-B (F-primer、R-primer)・・・40μL (30 反応分、濃度：10μM) ×各 1 本
③ 虫異物同定用プライマー 16S (F-primer、R-primer)・・・40μL (30 反応分、濃度：10μM) ×各 1 本
※ 本試験は、①～③のプライマーを個別に PCR して下さい。

【保存方法】

－ 20℃で保存

【使用期限】

外装に記載

【本製品以外に必要な試薬および機器類 (PCR に関する部分)】

試薬 HotStarTaq Master Mix Kit [QIAGEN 社製] または同等の結果が得られるものを用いる
アガロースゲル
ゲルローディングバッファー
電気泳動用バッファー
DNA サイズマーカー
DNA 染色試薬

機器類 PCR 増幅反応装置 GeneAmp PCR System 9700、Veriti サーマルサイクラー [Thermo Fisher Scientific 社製] または同等の結果が得られるものを用いる
電気泳動装置
画像解析装置
マイクロピペット
ボルテックスミキサー
卓上遠心機

【実施例】

<u>試薬調製および PCR 増幅反応</u>

1. 酵素以外の PCR 反応試薬を解凍した後、ボルテックスミキサー等で撹拌し卓上遠心機等でスピンダウンする。
2. 酵素は冷凍庫で保存し、使用直前に卓上遠心機等でスピンダウンする。
3. 反応液組成表に従い、DNA 試料液以外の試薬を必要量調製し、ボルテックスミキサー等で混合し、卓上遠心機等でスピンダウンする。
4. 調製した溶液から 22.5μL ずつを PCR 用反応チューブに分注する。
5. DNA 試料液を PCR 用反応チューブに 2.5μL ずつ加えた後、PCR 増幅反応装置にセットする。
6. PCR 反応条件に従って、PCR を開始する。

※ 反応系へのコンタミネーションがないことを確認するためには、DNA 液を加えないものを陰性コントロールとし、DNA 試料液と同時に PCR を行う。

反応液組成表・PCR 反応条件

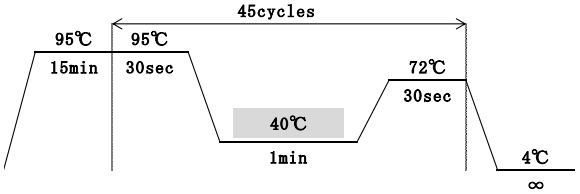
(HotStarTaq Master Mix Kit[QIAGEN 社製]を使用した例)

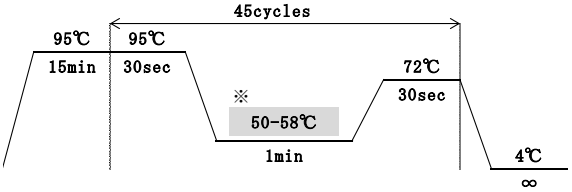
●プライマーCOI-A および COI-B

試薬	終濃度	添加量 (μL/tube)
滅菌水	-	9μL
HotStarTaq Master Mix Kit	1×	12.5μL
F-primer (10μM)	0.2μM	0.5μL
R-primer (10μM)	0.2μM	0.5μL
Template DNA	適当濃度	2.5μL
Total		25μL

●プライマー16S

試薬	終濃度	添加量 (μL/tube)
滅菌水	-	9μL
HotStarTaq Master Mix Kit	1×	12.5μL
F-primer (10μM)	0.2μM	0.5μL
R-primer (10μM)	0.2μM	0.5μL
Template DNA	適当濃度	2.5μL
Total		25μL





※ 推奨は 50℃。非特異的な PCR 増幅産物が生じた場合、アニーリング温度を 4℃上昇（58℃まで）させることで特異性が高まる場合があります。

電気泳動例

1. TAE バッファーを満たした電気泳動槽に約 3%のアガロースゲルをセットし、PCR 増幅反応溶液 7.5μL と適当量のゲルローディングバッファーを混合しウェルに全量注入する。
2. 電気泳動を行う。

増幅産物の確認

電気泳動後、プライマーA 約 180bp、プライマーB 約 135bp、プライマーC 約 130～200bp の PCR 増幅産物の有無を確認する。

※ プライマーA および B は COI 遺伝子、プライマーC は 16S リボソーム RNA（16S）遺伝子の塩基配列中に存在する「虫種の違いを反映する短い塩基配列」を指標としています。

増幅産物の精製

増幅産物を電気泳動で確認した後、シーケンス解析を行うために PCR 反応液を精製する。

※ 非特異的バンドが認められた場合は、電気泳動後、アガロースゲルから目的バンドを切り出し、精製する。

塩基配列の決定と虫種の同定

1. シーケンサーを用い PCR 増幅産物の塩基配列を決定する。
2. NCBI BLAST サービスを用いて検索し、相同性の高い塩基配列を有する虫種を同定する。
   また、プライマーCOI-A および COI-B は、Barcode of Life Data(BOLD) Systems を用いる事も可能。

【使用上または取扱上の注意】

※ 判定については本製品の結果だけでなく、原材料や製造記録の確認等、他の情報とあわせて、総合的に判断して下さい。
※ サンプルが虫由来の混合物の場合や動物由来原料が含まれる場合、波形データが重なり同定が出来ない場合がございます。
※ 本製品は研究用の試薬です。それ以外の目的には使用しないで下さい。
※ 作業環境、使用機器、操作上のコンタミネーションには十分注意して下さい。
※ 本製品は、ハウス食品グループ本社株式会社の技術(特許出願中)のライセンスを受けて、株式会社ファスマックが製造販売しています。

【関連製品】

商品コード：F111-1K　　植物異物同定用プライマーセット

【製造販売元・問い合わせ先】
〒243-0041　神奈川県厚木市緑ヶ丘 5-1-3
株式会社ファスマック　遺伝子検査事業部
TEL 046-295-8787　FAX 046-294-3738
http://www.fasmac.co.jp

【開発元】
〒284-0033 千葉県四街道市鷹の台 1-4
ハウス食品グループ本社株式会社　研究開発本部