

食物アレルギー検出PCR

商品コード：F923-1S, 2S

「定性リアルタイムPCR 落花生検出用プライマー&プローブセット」

取扱説明書

【特徴】

本製品は、定性リアルタイムPCR法を用いて食品中の「落花生」のDNAを検出する試薬です。ITS領域をターゲットとしており、10 ppm (w/w) 全タンパク質相当の落花生を添加した、様々なモデル食品で検出することを確認しています。また、基準プラスミドを用いたカットオフ値を設定し、本製品を取り扱う環境由来の偽陽性リスクを低減させています。

【内容】

定性リアルタイムPCR 落花生検出用プライマー (濃度：フォワード、リバース各 25 μM)

定性リアルタイムPCR 落花生検出用プローブ (濃度：10 μM)

F923-1S …… 50 反応分 プライマー (20.0 μL)、プローブ (12.5 μL) ×各 1 本

F923-2S …… 250 反応分 プライマー (20.0 μL)、プローブ (12.5 μL) ×各 5 本

【保存方法】

- 20°C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】

試薬 QuantiTect Probe PCR Master Mix [QIAGEN 社製]または同等の結果が得られるものを用いる

機器類 リアルタイムPCR装置 機種は指定はないものの、分析実績のある装置は、7500、7900HT、QuantStudio™ 12k Flex [いずれも Thermo Fisher Scientific 社製]、LightCycler® 96、LightCycler® Nano [Roche Diagnostics 社製]、TP-800 [タカラバイオ社製] である
マイクロピペット
ボルテックスミキサー
遠心機

【実施例】

反応液調製およびPCR

1. PCR試薬を室温に戻した後、ボルテックスミキサーで混合し、遠心機でスピンドウンする。
2. 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で混合し、遠心機でスピンドウンする。
3. 調製した溶液から22.5 μLずつをPCR用反応チューブに分注する。
4. DNA試料液をPCR用反応チューブに2.5 μLずつ加えた後、リアルタイムPCR装置にセットする。
5. PCR温度条件に従って、PCRを開始する。Reporter、Quencherの設定が必要な場合は、Reporter ⇒ FAM、Quencher ⇒ None またはNFQ-MGBとする。

※ 1試料より2点並行でDNAの抽出を行い、DNA試料液当たり1ウエルでリアルタイムPCRを行う。同時に、ネガティブコントロールとしてDNA試料液の代わりに10 mM Tris- 1 mM EDTA (pH8.0)を2.5 μL加えたもの及び陽性・陰性判定用として別売りの基準プラスミド溶液を2.5 μL加えたもの、高濃度プラスミド溶液を2.5 μL加えたものについて、それぞれ2ウエル並行でリアルタイムPCRを行う。

※ DNA試料液の濃度は20 ng/μLに調製する。しかし、濃度が20 ng/μLの濃度で調製できない場合には、最も20 ng/μLに近い濃度で調製し、DNA試料液とする。

反応液組成表

| 試薬 | 終濃度 | 添加量 (μL/tube) |
|---------------------------------------|----------|---------------|
| 滅菌水 | — | 9.35 |
| 2×QuantiTect Probe PCR Master Mix | 1× | 12.5 |
| 定性リアルタイムPCR 落花生検出用 プライマー (各 25 μM) | 各 0.4 μM | 0.4 |
| 定性リアルタイムPCR 落花生検出用 プローブ (10 μM) | 0.1 μM | 0.25 |
| 20 ng/μL DNA 試料液 | 50 ng | 2.5 |
| Total | | 25 |

PCR 温度条件

| | 温度 | 時間 | サイクル数 |
|-----------------|-------|------|----------------|
| 変性 | 95 °C | 15 分 | 1 |
| アニーリング・ 伸長反応 | 95 °C | 30 秒 | 42 または 38 ※ |
| | 68 °C | 1 分 | |

※ Thermo Fisher Scientific 社製のリアルタイムPCR装置を使用の場合は、サイクル数を38に設定してください。

解析および判定

1. Cq 値を算出する。
 - 《 例：7500、7900HT、QuantStudio™ 12k Flex の場合 》
 - ・Threshold Line 値 ⇒ 高濃度プラスミド溶液の結果のみを用いて Auto 解析して算出
 - ・全試料の Cq 値 ⇒ 高濃度プラスミド溶液から算出した Threshold Line 値を入力して値を算出
 - ※ Baseline は Auto 設定にして下さい。
 - 《 例：LightCycler® 96、LightCycler® Nano、TP-800 の場合 》
 - ・デフォルトの解析条件（LightCycler® Nano、TP-800 は二次微分を用いた解析条件）で、全試料の Cq 値を算出
2. DNA 試料液の Cq 値が基準プラスミド溶液の平均 Cq 値以上の場合は陰性、平均 Cq 値より小さい場合は陽性と判定する。
 - ※ 基準プラスミド溶液の平均 Cq 値と高濃度プラスミド溶液の平均 Cq 値を比較し、Cq 値差が 4.6-6.6 から外れないことを確認して下さい（Cq 値差が範囲外だった場合は基準プラスミドの Cq 値データが妥当ではない可能性があります）。

【使用上または取扱上の注意】

- ※ DNA 試料液について、植物又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いて植物由来 DNA 又は動物由来 DNA が検出される事を確認して下さい。（【関連製品】参照）
- ※ 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。
- ※ 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。
- ※ 本製品を使用する際は、遠心機でスピンドウンし、蓋に付着した試薬を完全に落として下さい。
- ※ 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。
- ※ 基準プラスミド溶液、高濃度プラスミド溶液をご使用される際は、DNA 試料液および PCR 試薬にコンタミネーションすると偽陽性になりますので、取扱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。
- ※ 本プライマー、プローブは、ハウス食品グループ本社株式会社の特許です。

【関連製品】

1. 商品コード：F921-1S, 2S 定性リアルタイム PCR 小麦検出用プライマー&プローブセット (50 反応分, 250 反応分)
2. 商品コード：F922-1S, 2S 定性リアルタイム PCR そば検出用プライマー&プローブセット (50 反応分, 250 反応分)
3. 商品コード：F925-1S, 2S 定性リアルタイム PCR くるみ検出用プライマー&プローブセット (50 反応分, 250 反応分)
4. 商品コード：F926-1S 定性リアルタイム PCR 小麦、そば、落花生、くるみ検出用プラスミドセット (20 反応分)
5. 商品コード：F905-0K, 1K, 2K 植物 DNA 検出用プライマー (25 反応分, 50 反応分, 250 反応分)

【参考文献】

- (1) Miyazaki A, Watanabe S, Ogata K, Nagatomi Y, Kokutani R, Minegishi Y, Tamehiro N, Sakai S, Adachi R, Hirao T. Real-time PCR Detection Methods for Food Allergens (Wheat, Buckwheat, and Peanuts) Using Reference Plasmids. J. Agric. Food Chem., 67, 5680-5686 (2019)

【問い合わせ先】

製造販売元 株式会社ファスマック 遺伝子検査事業部
 〒243-0041 神奈川県厚木市緑ヶ丘 5-1-3 TEL 046-295-8787 / FAX 046-294-3738 <https://fasmac.co.jp>