

# 技術資料集



定性リアルタイムPCRによる  
小麦、そば、落花生、くるみの検出法

株式会社 ファスマック

## I. 検出法の概要

- リアルタイムPCRの機器間差を補い、偽陽性のリスクを最小にする高感度な定性リアルタイムPCR方法

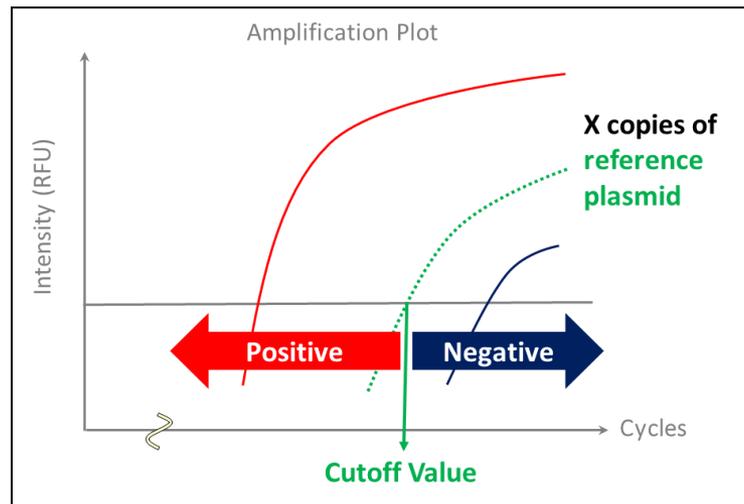
**基準プラスミド (reference plasmid) を用いたカットオフ値を設定**

✓ 10 ppm (w/w) の対象タンパク質を含む食品

⇒ 陽性 (Positive)

✓ 本製品を取り扱う環境からの微量のコンタミネーション

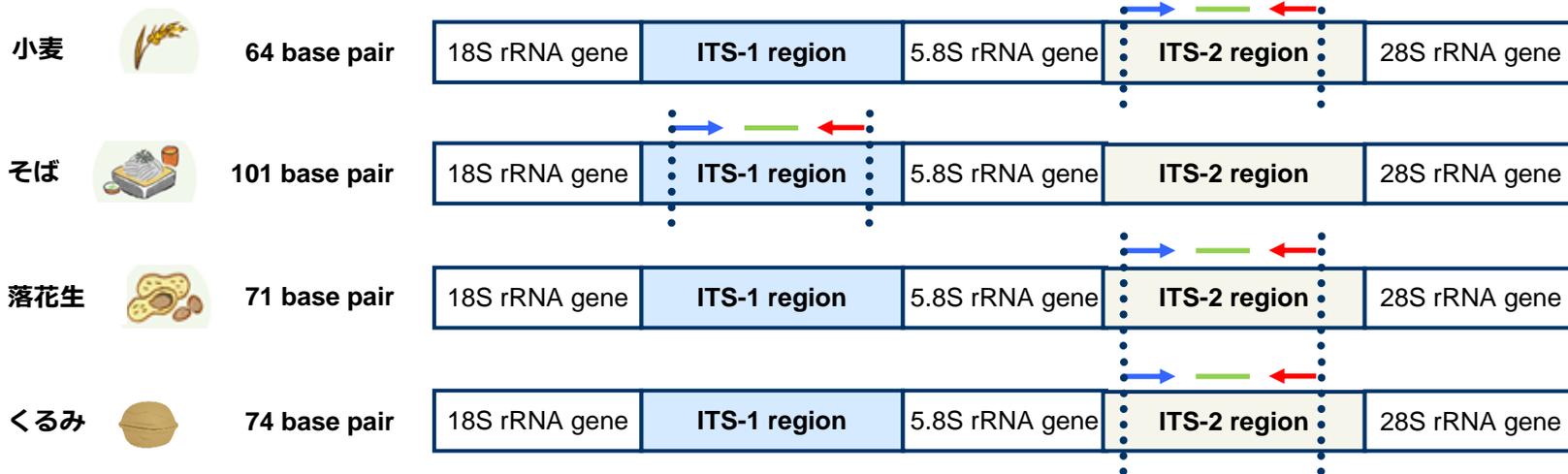
⇒ 陰性 (Negative)



## II. 検出法

- ITS領域をターゲットとしたプライマーおよびプローブを使用

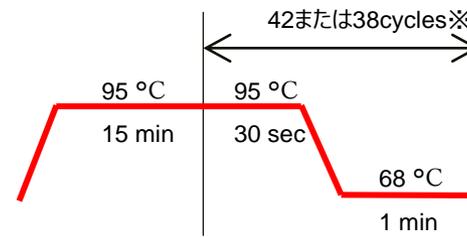
Forward Primer   
 Reverse Primer   
 TaqMan Probe 



### <反応液組成>

Reagent	Final Conc. in 25 $\mu$ L	
	そば、くるみ	小麦、落花生
QuantiTect Probe PCR Master Mix (QIAGEN)	1x	1x
Forward Primer	0.2 $\mu$ M	0.4 $\mu$ M
Reverse Primer	0.2 $\mu$ M	0.4 $\mu$ M
TaqMan Probe	0.1 $\mu$ M	0.1 $\mu$ M
Template DNA	50 ng	50 ng

### <PCR条件 (小麦、そば、落花生、くるみ共通) >



※ 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

## Ⅲ. 感度

Samples	index	50 ng DNA	500 fg DNA	50 fg DNA
<i>Triticum aestivum</i> 小麦	Cq 値	15.2 増幅あり	33.5 増幅あり	36.2 増幅あり
<i>Fagopyrum esculentum</i> そば	Cq 値	14.8 増幅あり	34.8 増幅あり	— 増幅なし
<i>Arachis hypogaea</i> 落花生	Cq 値	17.2 増幅あり	35.7 増幅あり	— 増幅なし
<i>Juglans regia</i> くるみ	Cq 値	16.4* 増幅あり *38 ng DNA	33.1 増幅あり	36.2 増幅あり

## ✓ 小麦の定性リアルタイムPCR

小麦50 fg DNAにおいて増幅シグナルが検出された。

## ✓ そばの定性リアルタイムPCR

そば500 fg DNAにおいて増幅シグナルが検出された。

## ✓ 落花生の定性リアルタイムPCR

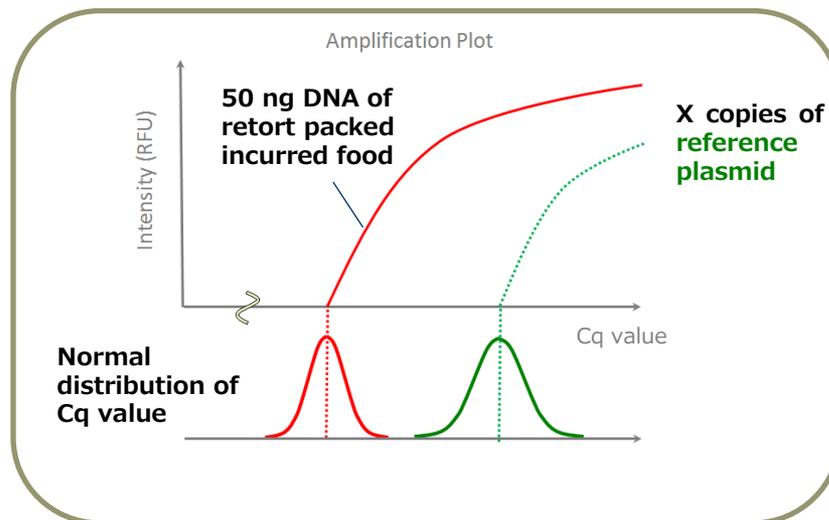
落花生500 fg DNAにおいて増幅シグナルが検出された。

## ✓ くるみの定性リアルタイムPCR

くるみ50 fg DNAにおいて増幅シグナルが検出された。

#### IV. カットオフ値

- 高度に加工された食品においても**10 ppm (w/w)**の対象タンパク質が検出できるようにカットオフ値として使用する**基準プラスミド (reference plasmid)**のコピー数を設定
- 基準プラスミドより小さいCq 値が得られた試料を陽性とする
- 高度に加工された食品
  - ・ 鶏団子と野菜の煮物（市販品と同等レベルのレトルト処理実施）  
を高い確率で陽性とするような、基準プラスミドのコピー数（X copies）を決定した



V. 10 ppm (w/w) の対象タンパク質を含む食品での検証



小麦



方法	index	白かゆ	ミックス ジュース	味噌汁	トマト pasta ソース	フリーズドライ 野菜スープ	鶏団子と野菜 の煮物	あさりの水煮	基準 プラスミド	
定性リアルタイム PCR	7900HT 	Cq	23.7	24.1	24.0	25.2	28.0	33.1	33.3	34.5
	判定	+	+	+	+	+	+	+		
LightCycler Nano 	Cq	23.7	23.7	22.5	23.7	26.7	31.7	32.0	32.9	
	判定	+	+	+	+	+	+	+		
ELISA	モリナガ FASPEK II	タンパク質 (μg/g)	10.8	9.2	11.6	14.1	10.8	9.3	10.9	

そば



定性リアルタイム PCR	7900HT 	Cq	24.4	25.0	24.7	26.8	28.7	33.1	33.7	35.1
	判定	+	+	+	+	+	+	+	+	
LightCycler Nano 	Cq	22.2	22.7	21.7	24.1	26.1	30.9	31.2	32.9	
	判定	+	+	+	+	+	+	+	+	
ELISA	モリナガ FASPEK II	タンパク質 (μg/g)	13.1	9.5	9.5	14.8	9.1	7.2	7.2	

落花生



定性リアルタイム PCR	7900HT 	Cq	25.4	23.3	25.7	28.4	29.4	31.9	33.5	33.8
	判定	+	+	+	+	+	+	+	+	
LightCycler Nano 	Cq	23.8	21.5	23.5	26.5	27.6	30.3	31.5	32.1	
	判定	+	+	+	+	+	+	+	+	
ELISA	モリナガ FASPEK II	タンパク質 (μg/g)	8.8	9.2	5.0	6.5	5.7	5.4	4.9	

※くるみ定性リアルタイムPCRの結果は、後日掲載する予定

## VI. DNA抽出およびPCR反応液調製の際の注意点

- コンタミネーション等を避けるために以下のことが有効です。

### ✓ 作業環境

- ・ 操作は隔離した部屋またはクリーンベンチ等清潔な環境で行う。可能であれば作業前にクリーンベンチ内に1～2時間のUV照射を行う。
- ・ 清潔な白衣等を着用し、作業前にはよく手を洗い、ディスポーザブル手袋を着用する。
- ・ 作業前に実験台を塩素系漂白剤または70%エタノールでよく拭く。

### ✓ 使用機器

- ・ 作業前にマイクロピペット等の使用する器具を塩素系漂白剤または70%エタノールでよく拭いた後、可能であれば1～2時間のUV照射を行う。
- ・ ピペットチップは市販の滅菌済み（RNase/DNase Free）のフィルター付きチップを使用する。
- ・ 使用するチューブは市販の滅菌済み（RNase/DNase Free）のものを使用する。
- ・ 使用する機器は正常に動作することを事前に確認する。

### ✓ 作業方法

- ・ コンタミネーション防止の観点から、DNA抽出、Master Mix（PCR試薬とPrimerおよびProbeの混合溶液）の調製、試料DNA溶液の添加、PCRはそれぞれ別の空間（クリーンベンチや別の部屋）で行う。
- ・ チューブの開閉は慎重に行い、飛沫やチューブの口への接触によるコンタミネーションに注意する。

## Ⅶ. 製品紹介

### 製品紹介

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）
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）
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（50反応分, 250反応分）
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）
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

- ✓ 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。
- ✓ 技術資料は、ハウス食品グループ本社株式会社から資料の提供を受けて、株式会社ファスマックが編集しています。

### 関連製品のご紹介

本製品の使用にあたり以下の関連製品を使用されることをお奨めいたします。

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）

#### 【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

2023.02.03 第2版