

食物アレルギー検出PCR

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」

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「くるみ」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くるみを添加した、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 くるみ検出用プライマー (濃度：フォワード、リバース各 12.5 μM)
 定性リアルタイムPCR くるみ検出用プローブ (濃度：10 μM)
 F925-1S …… 50 反応分 プライマー (20.0 μL)、プローブ (12.5 μL) ×各1本
 F925-2S …… 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℃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 [Roche Diagnostics 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 くるみ検出用 プライマー (各12.5 μM)	各0.2 μM	0.4
定性リアルタイムPCR くるみ検出用 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 設定にしてください。
 - 《 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
- ※ 高感度 ROX 装置等の使用により ROX のレベルが高い場合は、ノーマライザーとしての ROX チャンネルの補正を解除し、Cq 値を算出して下さい。
2. DNA 試料液の Cq 値が基準プラスミド溶液の平均 Cq 値以上の場合には陰性、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、遠心機でスピンドダウンし、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：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)
4. 商品コード：F927-1S, 2S 定性リアルタイム PCR カシューナッツ検出用プライマー&プローブセット (50 反応分, 250 反応分)
5. 商品コード：F928-1S 定性リアルタイム PCR 小麦、そば、落花生、くるみ、カシューナッツ検出用プラスミドセット (20 反応分)
6. 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
 E-mail : gmo@fasmac.co.jp URL : https://fasmac.co.jp