

遺伝子検査の基礎知識

遺伝子検査では、DNA や PCR 等、さまざまな専門用語が用いられます。この文書では、これから遺伝子検査を始める方を対象として、これらの専門用語や解析技術の原理について分かりやすく解説します。

—目次—

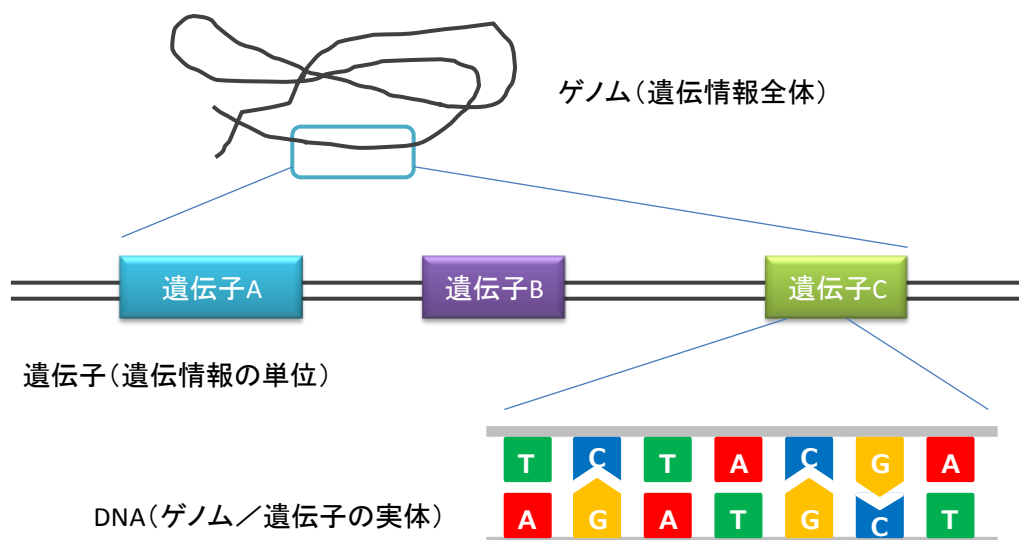
- 1 遺伝子とは？
- 2 PCR とは？
- 3 リアルタイム PCR とは？
- 付録 RNA および RT-PCR について

1 遺伝子とは？

ゲノム・遺伝子・DNA

ゲノムは、ある生物が持つ遺伝情報全体を表す用語です。ゲノムの中には、多数の遺伝情報が書き込まれており、その最小単位を遺伝子と呼びます。例えば、生体内で働く酵素には、それぞれ対応する遺伝子が存在します。

「ゲノム」や「遺伝子」は概念的な用語であるのに対し、「DNA」はそれらを形作る物質であり実体を表す用語と言えます。

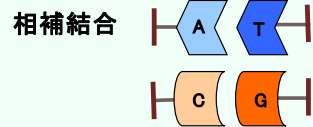


DNA の構造

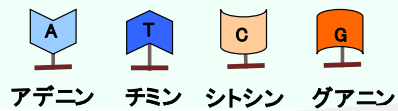
ゲノムは、DNA（デオキシリボ核酸）という物質で構成されています。DNA は、二本の鎖がからまった二重らせん構造となっており、それぞれの鎖は A、G、C、T の 4 種類の物質（塩基と呼ぶ）が連なった重合体で構成されています。この 4 種類の物質の並び方（塩基配列）は生物種によって異なっており、生物種毎に固有の配列の領域が存在することが知られています。例えば、細菌の毒素遺伝子に該当する DNA 配列は、その細菌に固有のものです。遺伝子検査では、このことを利用して、特定の生物種に固有の DNA 配列を対象とし、特異的な検出を行います。

DNA が二本鎖を形成する際、対合できる塩基の組み合わせは決まっており、A と T、G と C が必ずペアになります。細胞分裂前に DNA が複製される際には、このような性質を利用して、間違いなく相補的な DNA が合成されていきます。

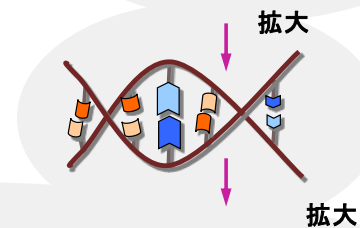
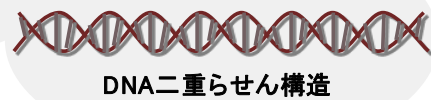
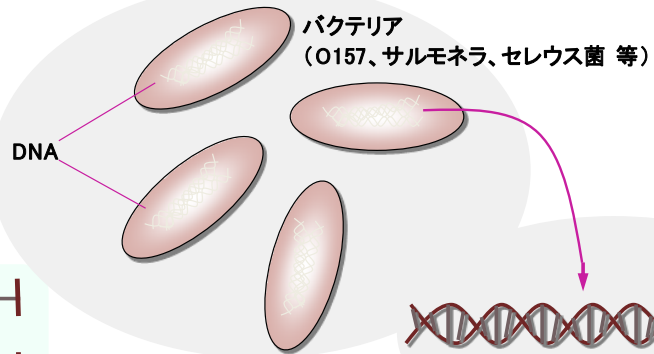
DNA: デオキシリボ核酸
||
遺伝子



4種の物質



細菌ゲノムや毒素遺伝子は、4種物質の並び配列が異なり、固有配列をもつ領域がある。その固有配列を検出することで特定の微生物検出ができる。



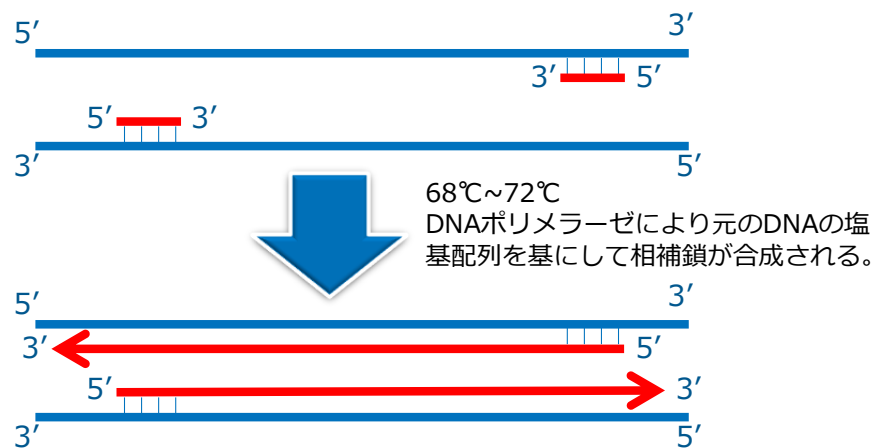
4種の物質からなるポリマー(重合体)



2 PCR とは？

PCR とは？

PCR (Polymerase Chain Reaction)法とは、DNA鎖の熱変性、プライマーのアニーリング、ポリメラーゼによる相補鎖の合成を繰り返し行うことにより DNA を増幅する方法です。1 サイクルごとに DNA が 2 倍、4 倍、8 倍・・・と指数関数的に増幅し、やがてプラトーに達します。この方法を用いると、DNA を数時間で 100 万倍に増幅できます。



電気泳動法

PCR で増幅した DNA は、アガロースゲル電気泳動により増幅サイズに応じて分離した後、エチジウムブロマイド等で染色してバンドとして可視化します。

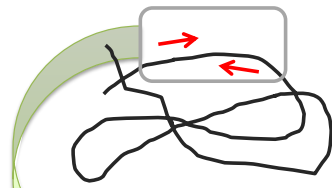
アガロースゲルによる分離

DNA は負の電荷を帯びており、電圧をかけるとプラス極の方向へアガロースゲル中を移動します。その際、アガロースゲルは細かい網目状の構造となっているので、小さい DNA 程速く移動し、DNA のサイズによって分離することができます。

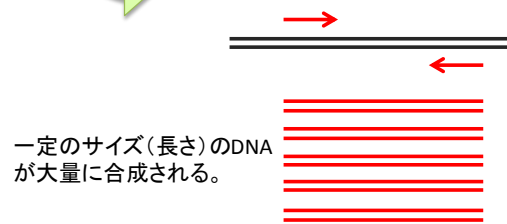
エチジウムブロマイドによる検出

エチジウムブロマイドは、二本鎖の DNA に結合して、紫外線照射により強い蛍光を発するインターカレーター的一种です。電気泳動後のアガロースゲルをエチジウムブロマイドで染色すると、紫外線照射により DNA をバンドとして可視化することができます。

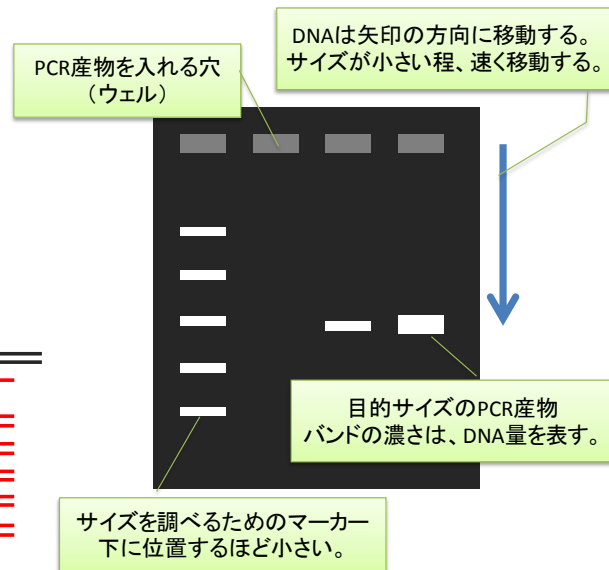
① 検出対象の微生物のDNA



② PCR増幅



③ PCR産物を電気泳動で検出



3 リアルタイム PCR とは？

リアルタイム PCR (qPCR) とは？

リアルタイム PCR 法は、PCR 法に基づいた簡便で迅速な遺伝子検出方法です。反応液中にあらかじめ蛍光プローブあるいは蛍光色素を添加し、リアルタイムで目的遺伝子の増幅をモニタリングします。リアルタイム PCR 法を用いることにより、PCR 法で必須であった電気泳動が不要となり、よりスピーディーで、コンタミネーションによるリスクの低い遺伝子検出を実施できます。

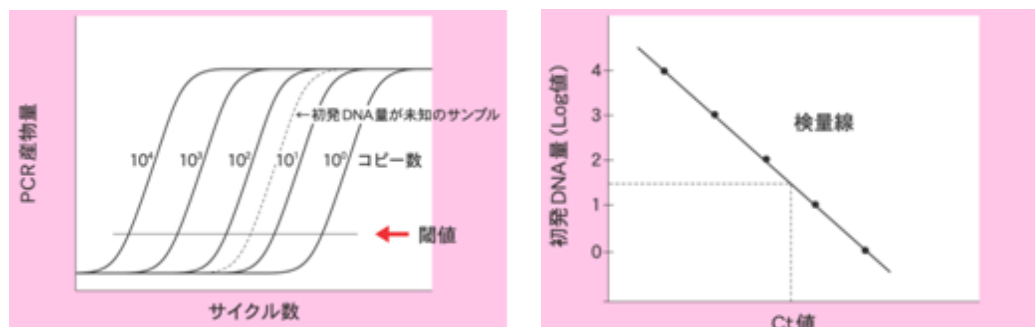
また、リアルタイム PCR は定量的な解析が可能なため、Quantitative PCR (qPCR) とも呼ばれます。実際に、リアルタイム PCR による定量解析は、ノロウイルスやレジオネラ属菌の遺伝子検査に応用されています。

リアルタイム PCR の原理

PCR では、1 サイクルごとに DNA が 2 倍、4 倍、8 倍・・・と指数関数的に増幅し、やがてプラトーに達します。この増幅の様子を蛍光物質を用いてモニタリングし、横軸にサイクル数、縦軸に蛍光強度を取ってグラフ化した図が増幅曲線です。

初発の DNA 量が多いほど、増幅産物量は早く検出可能な量に達するので、増幅曲線が早いサイクルで立ち上がります。したがって、段階希釈したスタンダードサンプルを用いてリアルタイム PCR を行くと、初発 DNA 量が多い順番に等間隔で並んだ増幅曲線が得られます。ここで、適当なところに閾値 (Threshold) を設定すると、閾値と増幅曲線が交わる点：Ct 値 (Threshold Cycle) が算出されます。

Ct 値と初期鋳型量の間には相関関係があり、検量線を作成することができます。未知サンプルについてもスタンダードサンプルと同様に Ct 値を算出し、この検量線に当てはめれば、初期鋳型量を求めることができます。



蛍光検出法

リアルタイム PCR では、PCR 増幅産物を蛍光物質を用いて検出します。蛍光検出法には、インターカレーター（蛍光物質）を用いる方法と蛍光標識プローブを用いる方法の 2 種

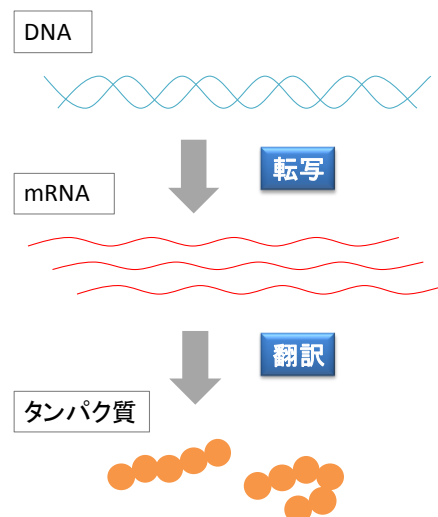
類があります。

タカラバイオでは、インターカレーターとしては **TB Green** を用いており、PCR 産物の増加に伴い蛍光強度が上昇します。蛍光標識プローブには多くの種類がありますが、タカラバイオの独自技術であるサイクリングプローブ法は、その中でも非常に特異性の高い検出法です。

付録 RNA および RT-PCR について

セントラルドグマ

セントラルドグマは、分子生物学において提唱されている遺伝情報の読み出しに関する考え方です。ゲノム DNA に書き込まれた遺伝情報は、まず、mRNA という物質に写し取られて（転写）、次に、mRNA を元に生物体を構成するタンパク質が合成されます（翻訳）。



TOPICS : RNA ウイルス

ウイルスの中には、ゲノムが RNA で構成されているものが存在します。ノロウイルスは RNA ウイルスの一種で、ノロウイルスの遺伝子検査では RNA を対象として検出を行います。

ウイルスは、宿主の細胞内で、宿主の転写・翻訳機構を使用してタンパク質等を合成します。その際、宿主と同じように DNA からスタートするために、RNA ウイルスの中には、RNA から DNA を合成する逆転写酵素を持っているものが存在します。遺伝子工学において、逆転写酵素は、後述の RT-PCR 法で非常に重要な役割を果たしています。

RNA の種類

RNA には、セントラルドグマにおいて遺伝情報の伝達を担う mRNA (messenger RNA) の他、rRNA (ribosomal RNA) や tRNA (transfer RNA) と呼ばれるものが存在します。rRNA は、タンパク質の合成の場であるリボソームに含まれる RNA で、細胞内に非常に多コピー存在しています。遺伝子検査においては、DNA よりコピー数が多く高感度検出に有利なため検出の標的とされることがあります。

TOPICS : 微生物推定解析

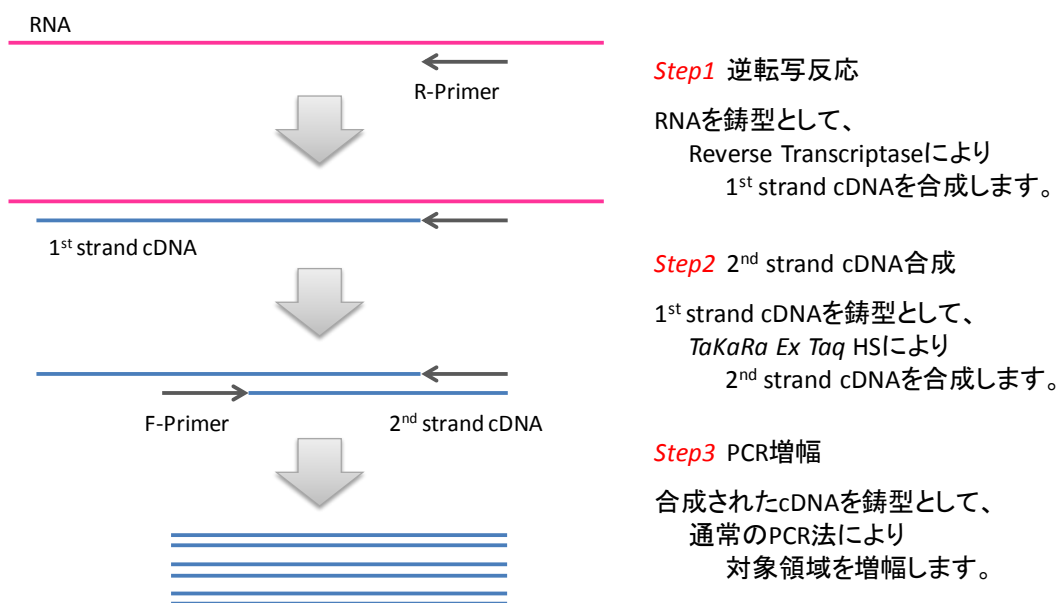
rRNA の一種である 16S rRNA や 18S rRNA は、多様な生物種で配列情報の解析がなされており、それらの配列を集めたデータベースが構築されています。現在では、細菌等からゲノム DNA を調製して、16S rRNA に該当する領域の塩基配列を解析すれば、このデータベースを利用して種を推定することが可能となっています。

RNA の構造

RNA は、DNA とは異なり、一本の鎖で構成されており、RNA を構成する塩基は A、G、C、U の 4 種類です。DNA を構成する塩基は A、G、C、T の 4 種類ですので、T の代わりに U が入っていることが分かります。DNA から RNA が転写される際には、DNA の塩基の並びに相補的な RNA が合成されていきます。

RT-PCR 法

RNA は DNA Polymerase の鋳型とはならないため、PCR で増幅するには、まず RNA を DNA に変換する必要があります。セントラルドグマにおいて DNA から RNA への変換を転写と呼ぶのに対し、RNA から DNA への変換は逆転写と呼ばれます。逆転写酵素により RNA から変換された DNA は cDNA (c は complementary、相補的の意味) と呼ばれ、PCR の鋳型となり得ます。逆転写反応 (RT; Reverse Transcription) に続いて PCR を行う方法が RT-PCR であり、RNA を PCR 増幅する手法です。



遺伝子検査の準備と注意事項

PCR はわずか 1 分子の鋳型 DNA でも検出可能であるため、反応液調製時に鋳型となりうる核酸等が混入しないように細心の注意が必要です。この文書では、正確な遺伝子検査を行うために必要な実験器具類やコンタミネーション防止のための注意事項について解説します。

— 目次 —

- 1 実験環境の整備
- 2 必要な実験器具と装置

1 実験環境の整備

コンタミネーションの原因

PCR は非常に高感度な検出法であるため、混入したのが微量の DNA であっても、それが増幅され判定結果に大きな影響を及ぼすことがあり、コンタミネーションに十分注意する必要があります。

DNA が混入するケース

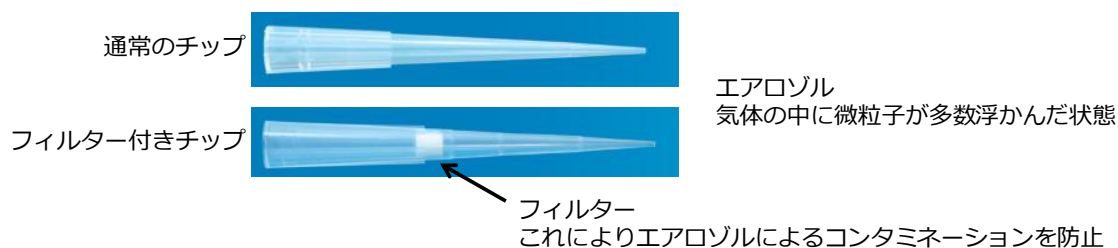
- ① 外から入り込む DNA (ヒトの皮膚、髪の毛、微生物(常在菌))
- ② 抽出した DNA サンプル間のクロスコンタミネーション
- ③ 前回行った PCR 等の DNA 実験で残存している DNA (増幅産物等)

混入した DNA の由来

- ① 実験台、ピペッター、チップ、チューブ立てなど、日常で使用する器具
- ② 使用する試薬、酵素
- ③ サンプル DNA 溶液

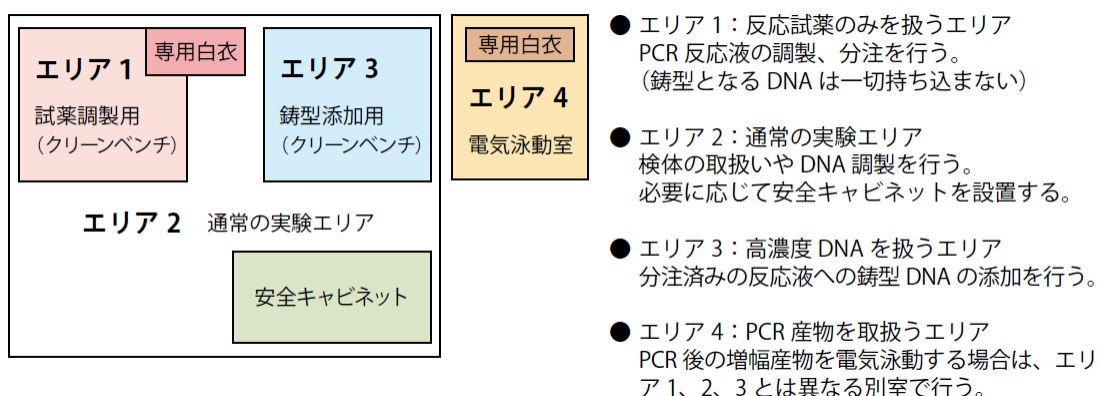
コンタミネーションの防止対策

- ① PCR のサンプル調製時、反応液調製時はグローブをつけて操作する。
- ② ピペッターからの混入を防ぐため、エアロゾル防止チップを用いる。



- ③ 溶液の入ったチューブ類は、開ける前に簡単に遠心する。
- ④ チューブのふたを開けるときは、内ぶた等に触れないように、また飛沫が発生しないように注意する。

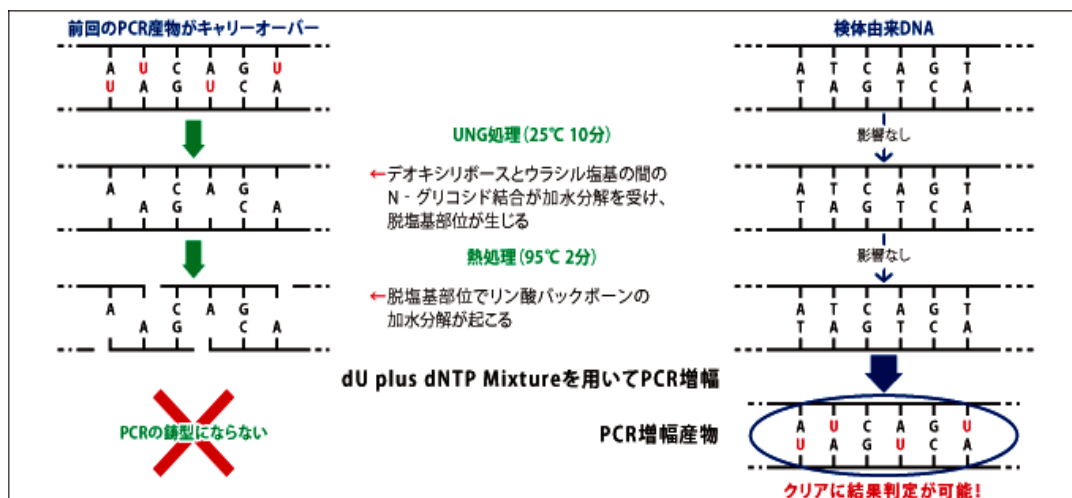
- ⑤ 反応液調製の際は、サンプル DNA をいちばん最後に加える。
- ⑥ PCR 反応液調製、検体からの鋳型 DNA 調製、PCR 反応液への鋳型の添加、電気泳動のための場所をそれぞれ別にし、機器、器具等も部屋ごとに用意する。実験設備内で試料の流れを一方通行にすることで、反応液への増幅産物の混入を防ぐことができる。



1～3 のエリアは、別々の実験室を設けることができれば理想的ですが、上図のように一部屋の中にクリーンベンチを設置してエリア分けすることも可能です。エリア 4 は、必ずエリア 1～3 とは別の実験室にしてください。

各エリアで使用するマイクロピペットやチップ、白衣や手袋は、エリア専用とし、共通での使用を避けてください。特にエリア 1 には、鋳型となる DNA が存在することのないよう、細心の注意を払います。

- ⑦ 必ずポジティブコントロール、ネガティブコントロールを用意し、反応を行う。これにより、毎回の PCR の評価を行うことができ、コンタミネーションやその他の異常に気が付き、時間や費用のロスを少なくすることができる。
- ⑧ **Uracil - N - glycosylase(UNG)**の使用
使用可能な酵素は限られるが、TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit(code : 6088)などを使用することで、以前行った PCR 増幅産物のキャリーオーバーによる偽陽性を抑制することができる。



dTTP の代わりに dUTP を含む基質を用いて PCR を行い、増幅産物にウラシル塩基を取り込ませる。

↓

この増幅産物のキャリーオーバーに対して UNG 処理して PCR を行うことで、キャリーオーバーした増幅産物は分解され、鑄型とはならず、ウラシルを含まない検体由来の DNA のみが鑄型となる。

コンタミネーションが発生したら

万が一、コンタミネーションが発生した場合は、考えられる原因につきひとつひとつ対処してください。試薬へのコンタミネーションが疑われるときは、新しいものに取り替える必要があります。実験台や器具類は十分洗浄をして滅菌を徹底するようにしてください。

RNA 実験について

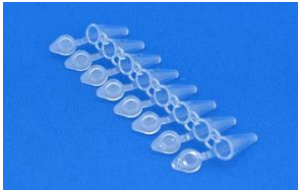
核酸（特に RNA）の調製にあたっては、実験者の汗や唾液に含まれる RNase の混入を防ぐため作業中は清潔なマスクおよびディスポーザブルグローブを着用し RNA 調製専用の実験台を設けるなどの細心の注意を払ってください。

実験器具に関しては、可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用するようにし、実験台、実験器具などの RNase 除去には RNase-OFF™（RNase コンタミネーション除去溶液）（製品コード 9037）の使用をお勧めします。

また、RNA 実験に用いる器具（プラスチックおよびガラス）は、他の器具と区別して RNA 専用としてください。DNA 除去には、DNA-OFF™（DNA コンタミネーション除去溶液）（製品コード 9036）による拭き取りや、2.5%次亜塩酸ナトリウムの使用、UV 照射、乾熱滅菌（180°C、2 時間）が効果的です。

2 必要な実験器具と装置

試薬の混合や分注に必要な器具

器具名称		用途	
①	マイクロピペット	少量の液体の分取等使用する器具です。扱う液量に応じて、適切なサイズのものを使用します(20 μ l用、200 μ l用、1000 μ l用等)。	
②	マイクロピペット用チップ	マイクロピペットの先端に取り付けて使用する消耗品です。エアロゾルによるコンタミネーション防止のため、疎水性フィルター付きチップの使用をお勧めします。	
③	1.5 mlチューブ	DNA抽出やPCR反応液の調製等を使用します。 DNase、RNaseフリーの製品を使用します。	
④	0.2 mlチューブ	逆転写反応やPCR反応に使用します。 DNase、RNaseフリーの製品を使用します。	
⑤	リアルタイムPCR専用 0.1 mlチューブ	独立型フラットキャップ付き8連チューブをお勧めします。ひとつひとつふたの開閉ができ、コンタミネーション回避に役立ちます。 切り離せばシングルチューブとしても利用が可能です。	 0.1 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コードNJ902)

⑥	攪拌機 (Vortex)	試薬の混合等に使います。	
⑦	パーソナル卓上微量 遠心機 (1.5 ml用)	反応液をチューブに分注後、 チューブ壁などに飛散した反 応液をスピンドアウンする ときに使います。	
⑧	パーソナル卓上微量 遠心機 (8連用)	0.2 mlチューブやリアルタイムPCR専用の8連チューブを スピンドアウンする際に使 います。	
⑨	アルミラック (1.5 ml用、0.2 ml用)	1.5 mlと0.2 mlのPCRチュー ブに対応したのがあると、 便利です。 氷上にセットして冷却しな がら反応液を調製できる金 属タイプがおすすめです。	
⑩	アイスボックス	発泡スチロール製などのアイ スボックスにクラッシュアイ スを入れて使います。 反応液調製時に試薬や反応 液のチューブを立てて冷却 し、試薬の劣化を防ぎま す。	

その他の備品類

器具名称		用途など	
①	ディスポーザブルグローブ	手袋を着用することで、手の汚 れや汗などによるコンタミ ネーションを防止します。 (パウダーフリータイプ)	

②	白衣、スリッパ、マスク	実験エリアごとに専用のものを用意することで、コンタミネーション防止に役立ちます。	
---	-------------	--	---

装置

器具名称		用途など	
①	ヒートブロック	酵素処理(56℃、70℃等)やアルカリ熱抽出(95℃)に使用します。	
②	PCR装置	逆転写反応やPCR反応に使用します。	
③	電気泳動装置一式 (リアルタイムPCRでは不要)	電気泳動槽(右図)の他、ゲル撮影装置が必要です。	
④	リアルタイムPCR用装置	リアルタイムPCR反応に使用します。結果の解析は、付属のソフトウェアで行います。	 Thermal Cycler Dice® Real Time System III with PC(製品コードTP970)

DNA/RNA 調製法 実験ガイド

PCR の鋳型となる DNA を調製するにはいくつかの方法があり、検体の種類や実験目的に応じて適切な方法を選択します。この文書では、これらの方法について実際の操作方法を具体的に解説します。また、RNA 調製の際の注意事項や RNA 調製用のキット等をご紹介します。

—目次—

- 1 実験に必要なもの
- 2 コロニーからの DNA 調製
- 3 増菌培養液からの DNA 調製
- 4 DNA 精製キットについて
- 5 RNA 調製について

1 実験に必要なもの

一般的な実験器具類

マイクロピペット（20, 200, 1000 μ l）およびチップ

1.5 ml チューブおよびチューブラック

攪拌機（Vortex）

小型遠心機（1.5 ml チューブ用）

ヒートブロック（熱処理や酵素処理に使用、ウォーターバスでも代用可）

サーマルサイクラー（熱処理や酵素処理に使用）など

* 詳細は、別冊の「遺伝子検査の準備と注意事項」をご参照ください。

その他

器具名称		用途など	
①	微量高速遠心機	1.5 mlチューブを冷却しながら遠心する装置。	

2 コロニーからの DNA 調製

熱抽出法

【注意】 熱抽出法は、主にグラム陰性菌から簡便に DNA を抽出するための方法です。真菌やグラム陽性菌では、十分な量の DNA が得られないことが多いため、お勧めしません。また、グラム陰性菌でも他の手法に比べると DNA 収量が少なくなることがあります。

- ① プレート上のコロニーから滅菌済のマイクロピペット用チップや白金耳で微量の菌体を取り、適当量（100～500 μ l）の滅菌水あるいは TE バッファー（10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0）に懸濁する。
- ② 95℃以上で 10 分間熱処理をする。
- ③ 12,000 ～15,000 rpm で 1 分間遠心し、上清を回収して DNA サンプルとする。

アルカリ熱抽出法

- ① プレート上のコロニーから滅菌済のマイクロピペット用チップや白金耳で微量の菌体を取り、50 μ l の滅菌水に懸濁する。

- ② 100 mM NaOH を 50 μ l 添加し、混合する。
- ③ 95°C以上で 10 分間熱処理する。
- ④ 1M Tris-HCl (pH7.0)を 11 μ l 添加し、混合する。
- ⑤ 12,000～15,000 rpm で 1 分間遠心し、上清を回収して DNA サンプルとする。

SimplePrep™ reagent for DNA（製品コード 9180）による精製

- ① プレート上のコロニーから滅菌済のマイクロピペット用チップや白金耳で微量の菌体を取り、100 μ l の滅菌水に懸濁する。
- ② 0.2 ml の PCR チューブに、SimplePrep™ reagent for DNA の Reagent A 20 μ l と Reagent B 4 μ l を混合し、①の懸濁液 20 μ l を加えて混合する。
- ③ サーマルサイ클ラーを用いて、37°Cで 6 分、さらに 95°Cで 3 分の処理を行う。
- ④ 滅菌精製水 80 μ l を加え、ピペッティングで混和したものを DNA サンプルとする。

3 増菌培養液からの DNA 調製

熱抽出法

- ① 培養液 1.3 ml を 1,000 rpm で 1 分間遠心し、上清 1.0～1.2 ml を新しいチューブに回収する。
- ② 12,000～15,000 rpm で 3 分間遠心し、上清を除去する。
- ③ 沈殿を適当量（100～500 μ l）の滅菌水あるいは TE バッファー（10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0）に懸濁する。
- ④ 95°C以上で 10 分間熱処理をする。
- ⑤ 12,000～15,000 rpm 以上で 1 分間遠心し、上清を回収して DNA サンプルとする。

増菌培養液には検体由来の夾雑物が存在し、PCR 阻害を引き起こすことがあります。その場合には、熱抽出物を滅菌水で希釈して PCR に使用してください。あるいは、以下の方法を用いると DNA の純度や収量が向上し、PCR 反応性が改善することがあります。

熱抽出法のアプション 1：沈殿の洗浄

- A) 沈殿の再懸濁液（前述の③）を再度、12,000～15,000 rpm で 3 分間遠心する。
- B) 上清を除去し、沈殿を適当量（100～500 μ l）の滅菌水あるいは TE バッファー（10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0）に懸濁する。
- C) 以降、前述の④～⑤と同様な操作を行う。

熱抽出法のオプション 2 : Chelex の利用

- A) 前述の①～②の操作で得られた沈殿に、200 μ l の 10% Chelex を添加し、混合する。
- B) 95 $^{\circ}$ C以上で 10 分間熱処理をする。
- C) 攪拌機 (Vortex) で混合する。
- D) 12,000～15,000 rpm 以上で 1 分間遠心し、上清を回収して DNA サンプルとする。

* Chelex[®] 100 キレート樹脂 (Bio-Rad, #142-1253) を滅菌水に懸濁して 10% Chelex を調製する。ピペットマンで分取する際には、樹脂が詰まるのを防ぐため、先の太いチップか、先端を切ったチップを使用する。

熱抽出法のオプション 3 : アクロモペプチダーゼの利用 (グラム陽性菌に)

- A) 前述の①～②の操作で得られた沈殿を 100 μ l のアクロモペプチダーゼ液 (250 U/ml, in TE buffer) に懸濁する。*
- B) 37～55 $^{\circ}$ Cで 10～15 分間インキュベートする。
- C) 100 μ l の 10% Chelex を添加し、混合する。
- D) 95 $^{\circ}$ C以上で 10 分間熱処理をする。
- E) 攪拌機 (Vortex) で混合する。
- F) 12,000～15,000 rpm 以上で 1 分間遠心し、上清を回収して DNA サンプルとする。

* アクロモペプチダーゼ, 粗製品, 溶菌酵素 (富士フィルム和光純薬(株)、#014-09661)。
グラム陽性菌の細胞壁が分解されて、DNA の回収量が増加する。腸内細菌科やビブリオ科の細菌群の場合には必要ないが、処理による検出感度の低下は生じない。

アルカリ熱抽出法

* 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知 (平成 26 年 11 月 20 日)

「腸管出血性大腸菌 O26、O103、O111、O121、O145 及び O157 の検査法について」(食安監発 1120 第 1 号) より引用

- ① 培養液 0.1 ml をマイクロチューブにとり、10,000 $\times$ g、10 分間遠心する。
- ② 上清を取り除いた沈渣に 50 mM NaOH 85 μ l を添加する。
- ③ 100 $^{\circ}$ Cで 10 分間加熱処理する。
- ④ 1M Tris-HCl (pH7.0) 15 μ l を加えて中和する。
- ⑤ 2,000～10,000 $\times$ g、10 分間遠心し、上清を回収して DNA サンプルとする。

なお、CycleavePCR[™] O-157(VT gene) Screening Kit Ver.2.0 (製品コード CY217A/B) には、アルカリ熱抽出試薬が添付されております。

4 DNA 精製キットについて

高純度な DNA を調製する必要がある場合には、DNA 精製キットを使用します。タカラバイオでは、マッハライ・ナーゲル社の各種核酸精製キットを取り扱っており、検体の種類や量に応じた幅広いラインナップとなっています。以下に主な製品をご紹介します。

製品名称		用途など	
①	NucleoSpin® Tissue (製品コード 740952.50等)	動物組織、細胞、バクテリア、酵母などから効率よくゲノムDNAを精製	
②	NucleoSpin® Tissue XS (製品コード 740901.50等)	少量の動物組織、細胞、バクテリア、酵母などからのゲノムDNAを精製	
③	NucleoSpin® Soil (製品コード 740780.50 等)	さまざまな土壌からのDNA抽出 PCR阻害物質の除去に効果的	

5 RNA 調製について

RNA 調製の際の注意事項

RNA は DNA に比べて分解されやすいので、実験者の汗や唾液に含まれる RNase の混入を防ぐため作業中は清潔なマスクおよびディスポーザブルグローブを着用し RNA 調製専用の実験台を設けるなどの細心の注意を払ってください。

実験器具に関しては、可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用するようにし、実験台、実験器具などの RNase 除去には RNase-OFF™ (RNase コンタミネーション除去溶液) (製品コード 9037) の使用をお勧めします。また、RNA 実験に用いる器具 (プラスチックおよびガラス) は、他の器具と区別して RNA 専用としてください。

RNA 精製キットについて

高純度な RNA を調製する必要がある場合には、RNA 精製キットを使用します。タカラバイオでは、マッハライ・ナーゲル社の各種核酸精製キットを取り扱っており、検体の種類や量に応じた幅広いラインナップとなっています。以下に主な製品をご紹介します。

なお、検出系や検出目的によっては、簡易的な方法で RNA を調製する場合があります。詳しくは、関連製品の取扱説明書をご参照ください。

製品名称		用途など	
①	NucleoSpin® RNA (製品コード 740955.50等)	動物組織、細胞、バクテリア、酵母などからのtotal RNA調製	
②	NucleoSpin® RNA XS (製品コード 740902.50等)	微量・少量サンプルからのtotal RNA調製	
③	NucleoSpin® RNA Plant (製品コード 740949.50 等)	植物細胞や組織からの高純度total RNA精製	

※ノロウイルスの RNA の精製には、「NucleoSpin® Virus (製品コード 740983.10/50/250)」を推奨します。

PCR 実験ガイド

この文書では、PCR 法の原理や実験操作の流れなどの概要を解説します。実際の実験操作の詳細については、各製品の取扱説明書をご参照ください。

—目次—

- 1 PCR の原理
- 2 実験に必要なもの
- 3 実験操作法
- 4 結果の解析

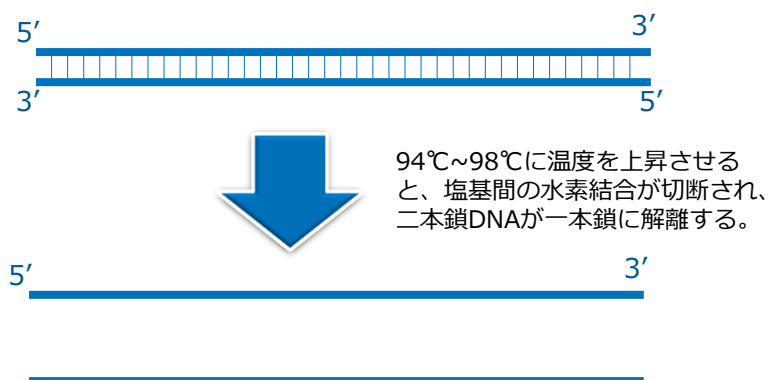
1 PCR の原理

PCR とは？

PCR は、**Polymerase Chain Reaction**（ポリメラーゼ連鎖反応）の略語で、ごく微量の DNA を出発材料として、高感度の検出を短時間で行うことができる技術です。この方法を用いることにより、DNA の特定の領域を数時間で **100 万倍**に増幅することが可能です。

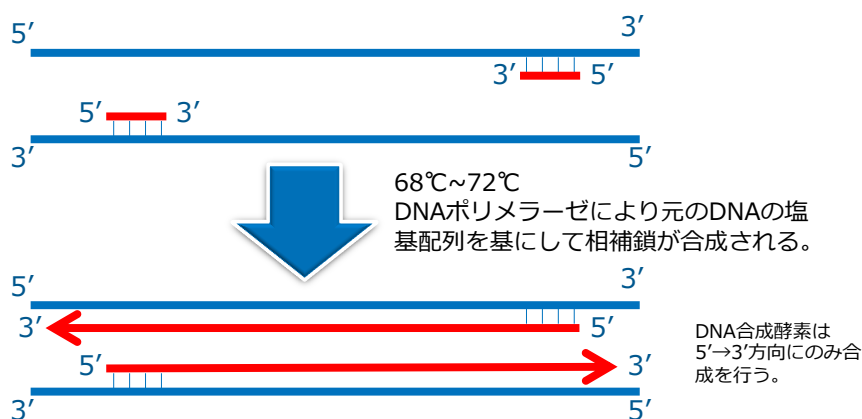
PCR の原理

ステップ 1：鋳型となる二本鎖 DNA を熱変性させて一本鎖 DNA に解離させます。



ステップ 2：一本鎖になった DNA にプライマーを結合させます。

ステップ 3：DNA ポリメラーゼによって元の DNA の相補鎖が合成されます。



以上の3ステップの反応を繰り返すを行うことにより、理論的には **n 回で 2 の n 乗倍**に目的の領域が増幅されます。こうして DNA が数時間で **100 万倍**に増幅されます。

2 実験に必要なもの

一般的な実験器具類

マイクロピペット（20, 200, 1000 μ l）およびチップ（フィルター付き）

1.5 ml チューブおよびチューブラック

攪拌機（Vortex）

小型遠心機（1.5 ml チューブ用、8 連 0.2 ml チューブ用）など

* 詳細は、別冊の「遺伝子検査の準備と注意事項」をご参照ください。

装置類

器具名称		用途など	
①	PCR装置	逆転写反応やPCR反応に使用します。	
②	電気泳動装置一式	電気泳動槽(右図)の他、ゲル撮影装置が必要です。	

PCR 試薬

タカラバイオでは、公定法収載の O-157 検出用 PCR キットを始めとして、各種食中毒菌検出用 PCR キットの他、あらかじめ 1 反応分の試薬が PCR チューブに分注されている便利な One Shot PCR キットシリーズなど、幅広い製品を取りそろえています。

3 実験操作法

(1) サンプルの調製（エリア 2 で実施）

検体の種類や実験目的に適した方法でサンプルの調製を行います。簡易的な抽出を行う方法としては、熱抽出法やアルカリ熱抽出法があります。高純度な DNA が必要な場合は、DNA 精製キットを使用して調製します。

- * DNA 調製法に関しては、別冊の「DNA/RNA 調製法 実験ガイド」をご参照ください。
- * 実験エリアに関しては、別冊の「遺伝子検査の準備と注意事項」をご参照ください。

(2) PCR 用装置のセッティング

使用する PCR 装置に PCR 条件を入力しておきます。

(3) 反応液の調製（エリア 1→3 で実施）

- * 操作方法の詳細は、各製品の取扱説明書をご参照ください。

① 反応液の調製（エリア 1 で実施）

サンプル以外の試薬のマスターミックスを氷上で調製し、PCR 専用チューブに分注し、キャップを軽く閉めます。

12 反応分のマスターミックス調製例

（EHEC (VT gene) PCR Screening Set（製品コード RR120）の場合）

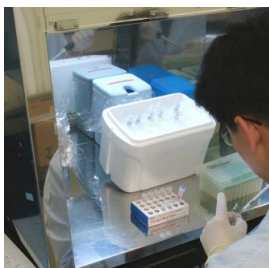
試薬	1 反応当り	12 反応分
10× <i>Ex Taq</i> Buffer	5.0μl	60μl
dNTP Mixture (各 2.5mM)	4.0μl	48μl
EVC-1/2(VT) Primer Mix	0.5μl	6μl
Control Template EC3	5μl	60μl
<i>TaKaRa Ex Taq</i> HS	0.25μl	3μl
滅菌精製水	30.25μl	363μl

② 陰性コントロールの添加（エリア 1 で実施）

陰性コントロールのチューブに滅菌精製水を 5μl 添加し、チューブのキャップをしっかりと閉めます。

③ サンプルおよび陽性コントロールの添加（エリア 3 で実施）

エリア 3 に移動し、(1)で調製したサンプルおよび陽性コントロールを各 5μl 添加し、チューブのキャップをしっかりと閉めます。



PCR 反応液は、コンタミネーション防止のため、クリーンベンチ内で調製します。試薬は、酵素の失活を避けるため、アイスボックス内で氷上で取り扱ってください。

(4) PCR の開始

PCR 反応液が入ったチューブを軽くスピンドウンし、PCR 装置にセットし、反応を開始します。



(5) 電気泳動(エリア 4 で実施)

① アガロースゲルの作製 (1%ゲル、150 ml 作製の場合)

1. アガロース粉末を 1.5 g 量り取る。
2. 適切な大きさの容器中に室温または冷却したバッファー150 ml を用意し、バッファーを攪拌しながらアガロース粉末を加える。
3. ラップで覆った後、蒸気抜き穴を開け、電子レンジにセットし加熱する。時々止めて攪拌し、完全に溶解する。
4. 加熱終了後、電子レンジから出し、静かに攪拌して均一にし泡を取り除く。
5. 溶液を室温において 50~60℃まで冷却し、コームをセットしたゲルトレイに流し入れる。ピペットチップなどで泡を取り除き。冷やし固める。
6. 適量のバッファーを重層後、コームを外し、泳動槽に移す。

② 電気泳動サンプルの準備

泳動サンプル溶液に 1/6 量の 6×Loading Buffer を加えてよく混合する。DNA 分子量マーカーも同様に準備する。

③ サンプル溶液のアプライ

ゲルのウェルに②のサンプル溶液をアプライする。

④ 電気泳動

泳動装置（パワーサプライ）のスイッチを入れて電気泳動を開始する。電流の向きに注意する（泳動上流側に陰極、下流側に陽極をセットする）。適度に分離した時点でスイッチを切る。

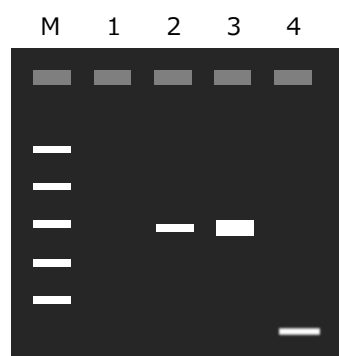
⑤ ゲルの染色

泳動後のゲルをエチジウムブロマイド（EtBr）などの染色液に浸す。

4 結果の解析

電気泳動結果の確認

電気泳動の結果が得られたら PCR 増幅産物の有無と増幅サイズを確認します。PCR 増幅産物のバンドが検出されても、目的のサイズと異なる場合は、陰性の判定となります。また、バンドの濃さは PCR 増幅産物の量を反映していますので、ある程度、初期鋳型量の目安となります。



M	サイズマーカー
1	反応液1のPCR産物
2	反応液2のPCR産物
3	反応液3のPCR産物
4	反応液4のPCR産物

1. 増幅産物が得られていない。
2. 想定されるサイズの増幅産物が得られている
3. 同上
4. 増幅産物は得られているが、想定されるサイズの増幅産物ではない

リアルタイム PCR（インターカレーター法）実験ガイド

この文書では、インターカレーター法（TB Green 検出）によるリアルタイム PCR について、蛍光検出の原理や実験操作の流れなどを解説します。実際の実験操作の詳細については、各製品の取扱説明書をご参照ください。

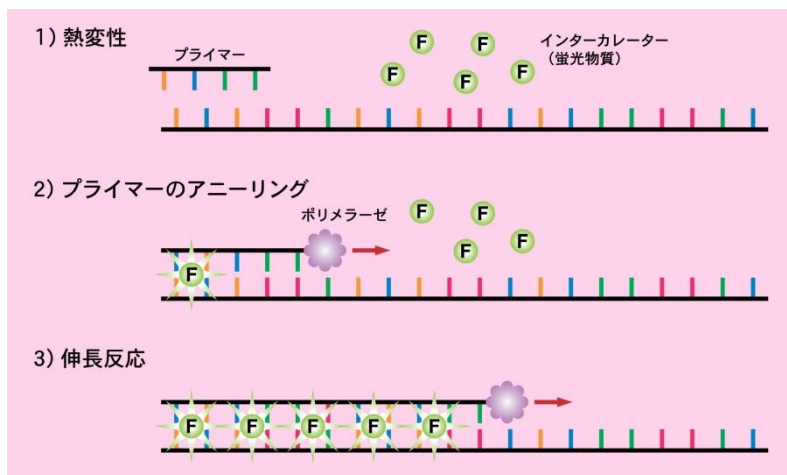
— 目次 —

- 1 蛍光検出の原理
- 2 実験に必要なもの
- 3 実験操作法
- 4 結果の解析

1 蛍光検出の原理

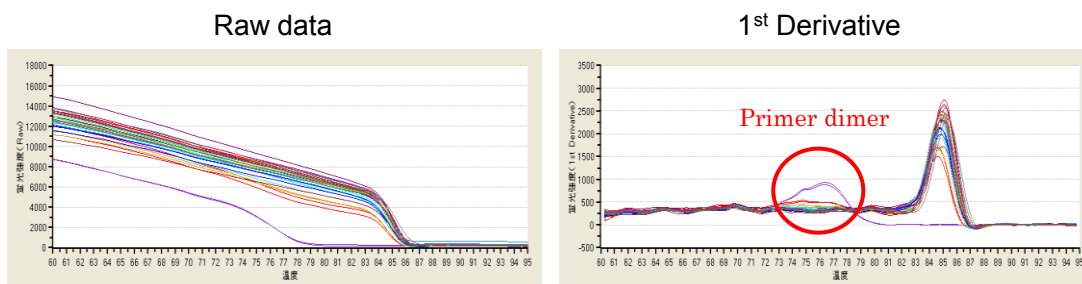
インターカレーターによる蛍光検出の原理

TB Green は、DNA に結合するインターカレーターの種類で、PCR によって合成された二本鎖 DNA に結合し、励起光の照射により蛍光を発します。この蛍光強度を測定することにより、PCR 増幅産物の生成量をモニターできます。さらに後述の融解曲線分析を行うことで適切な増幅産物が得られたかどうかを確認できます。



融解曲線分析による PCR 増幅産物の確認

融解曲線分析では、PCR 反応後、反応液の温度を 60℃から 95℃まで徐々に上昇させ蛍光値をモニタリングします。PCR 産物が二本鎖を形成している状態では強い蛍光が検出されますが、ある一定の温度 (Tm 値) に達すると一本鎖に解離し蛍光値が急激に低下します。Tm 値は PCR 産物の長さや GC 含量により異なるので、目的の増幅産物と Primer dimer のような短い増幅産物を区別することができます。



Raw data が蛍光値をモニタリングした元データで、1st Derivative は元データを一次微分してプラスマイナスを反転させたグラフです。このピーク位置を Tm 値として算出します。

2 実験に必要なもの

一般的な実験器具類

マイクロピペット（20, 200, 1000 μ l）およびチップ（フィルター付き）

1.5 ml チューブおよびチューブラック

攪拌機（Vortex）

小型遠心機（1.5 ml チューブ用、8 連 0.2 ml チューブ用）など

* 詳細は、別冊の「遺伝子検査の準備と注意事項」をご参照ください。

リアルタイム PCR 装置

Thermal Cycler Dice® Real Time System シリーズは、日本語仕様の食品環境検査用ソフトウェアを標準搭載しており、遺伝子検査にお勧めの機種です。TB Green の蛍光は、FAM フィルターで検出します。

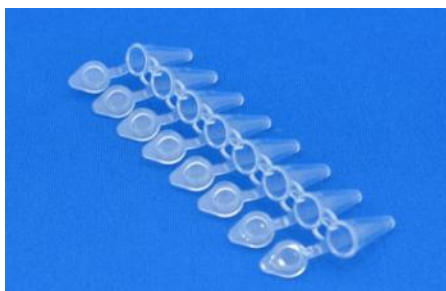
器具名称		用途など	
①	Thermal Cycler Dice® Real Time System Lite (製品コードTP700)	48ウェル対応のコンパクトタイプです。	
②	Thermal Cycler Dice® Real Time System III with PC (製品コードTP970)	96ウェルタイプのスタンダードタイプです。	

リアルタイム PCR 専用消耗品

Thermal Cycler Dice® Real Time System シリーズでは専用の反応チューブおよび反応プレートをご用意しております。下記以外のチューブやプレートを使用すると、正常な PCR 反応が行われない他、装置故障の原因となりますので、ご注意ください。その他、反応液のマスターミックス調製や鋳型の希釈に使用するチューブ類は、通常の PCR/RT-PCR 実験と同様のものをご利用いただけます。

【Thermal Cycler Dice® Real Time System III with PC(製品コード TP970)向け】

独立型フラットキャップ付き 8 連反応チューブ

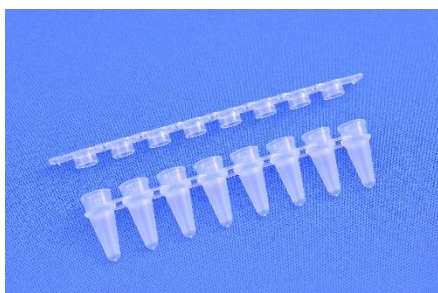


- ・0.1 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ902)

※コンタミネーション防止のためには、

独立型フラットキャップ付き 8 連チューブをお勧めします。

チューブおよびキャップがそれぞれ連結した 8 連反応チューブ



- ・0.1 ml 8-strip -neo- tube & cap Set(製品コード NJ907)

96 穴反応用プレート & 密着シール



- ・ FrameStar® 0.1ml 96 well qPCR plate (製品コード NJ904)
- ・ Sealing Film for Real Time (Adhesive) Ver.2 (製品コード NJ502)
- ・ Sealing Film for Real Time (製品コード NJ500)
- ・ Plate Sealing Pads* (製品コード 9090)

* 96 ウェルプレートに、シールをしっかりと貼り付けるために使用する専用パッド

リアルタイム PCR 試薬

インターカレーター法 (TB Green 検出) による微生物遺伝子検査には、QuickPrimer (Real Time) シリーズをお使い頂けます。以下のようにプライマーと試薬を組み合わせで使用します。なお、反応確認用の陽性コントロールも別売りしています。

リアルタイム PCR 用プライマー

- ・ QuickPrimer (Real Time) シリーズ (製品コード MR101 等)

リアルタイム PCR 用試薬

- ・ TB Green™ Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B)

陽性コントロール DNA

- ・ QuickPrimer (Real Time) シリーズ用 Positive Control DNA (製品コード MR401 等)

3 実験操作法

(1) サンプルの調製 (エリア 2 で実施)

検体の種類や実験目的に適した方法でサンプルの調製を行います。簡易的な抽出を行う方法としては、熱抽出法やアルカリ熱抽出法があります。高純度な DNA が必要な場合は、DNA 精製キットを使用して調製します。

- * DNA 調製法に関しては、別冊の「DNA/RNA 調製法 実験ガイド」をご参照ください。
- * 実験エリアに関しては、別冊の「遺伝子検査の準備と注意事項」をご参照ください。

(2) リアルタイム PCR 用装置のセッティング

- * Thermal Cycler Dice® Real Time シリーズを使用する場合は、別冊の「Thermal Cycler Dice® Real Time Quick Manual」をご参照ください。

(3) 反応液の調製 (エリア 1→3 で実施)

- * 操作方法の詳細は、各製品の取扱説明書をご参照ください。

④ 反応液の調製 (エリア 1 で実施)

サンプル以外の試薬のマスターミックスを氷上で調製し、リアルタイム PCR 専用チューブに分注し、キャップを軽く閉めます。

12 反応分のマスターミックス調製例

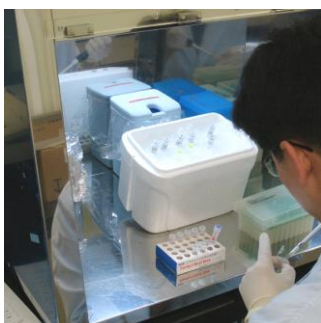
試薬	1 反応当り	12 反応分
2× TB Green Premix Ex Taq	10μl	120μl
5× Primer mix	4μl	48μl
滅菌精製水	3μl	36μl

⑤ 陰性コントロールの添加（エリア 1 で実施）

陰性コントロールのチューブに滅菌精製水を $3\mu\text{l}$ 添加し、チューブのキャップをしっかりと閉めます。

⑥ サンプルおよび陽性コントロールの添加（エリア 3 で実施）

エリア 3 に移動し、(1)で調製したサンプルおよび陽性コントロール DNA（10 倍希釈液）を各 $3\mu\text{l}$ 添加し、チューブのキャップをしっかりと閉めます。



リアルタイム PCR 反応液は、コンタミネーション防止のため、クリーンベンチ内で調製します。試薬は、酵素の失活を避けるため、アイスボックス内で氷上で取り扱ってください。

(4) リアルタイム PCR の開始

リアルタイム PCR 反応液が入ったチューブを軽くスピンドウンし、リアルタイム PCR 装置にセットし、反応を開始します。



4 結果の解析

増幅曲線と Ct 値

PCR 増幅の有無は、増幅曲線で確認します。

コントロール反応の結果が適切であることを確認した上で、測定対象サンプルの増幅の有無を判定します。増幅が認められない場合には、陰性と判定されます。ただし、PCR 阻害物質による偽陰性の可能性がありますので、注意してください。増幅が認められた場合は、次の融解曲線の結果と合わせて判定を行います。

増幅曲線が閾値に達した時のサイクル数を Ct 値と呼び、Ct 値は初期鋳型量の目安となります。Ct 値が小さい場合は鋳型量が多く、Ct 値が大きい場合は鋳型量が少なかったと推測

されます。

融解曲線と Tm 値

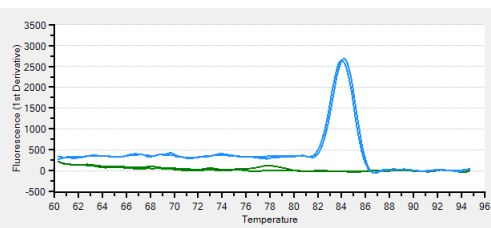
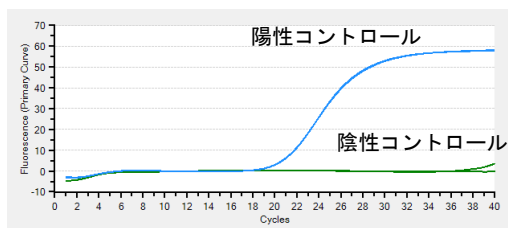
PCR 増幅産物の特異性は、融解曲線で確認します。

陽性コントロールの Tm 値と測定対象サンプルの Tm 値が一致していれば、目的の PCR 産物が得られていると推測され、陽性と判定されます。Tm 値が異なる場合は、非特異的増幅と推測され、陰性と判定されます。

(解析例)

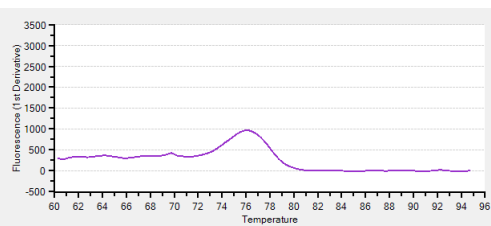
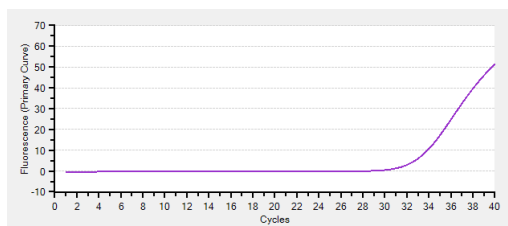
コントロール反応の例

陽性コントロールは増幅し、陰性コントロールは増幅しないのが正しい結果です。TB Green 検出の場合、反応系によっては、陰性コントロールでわずかに増幅が認められることがありますが、陽性コントロールと同じ Tm 値の産物でなければ、非特異的増幅産物と推測され問題ありません。



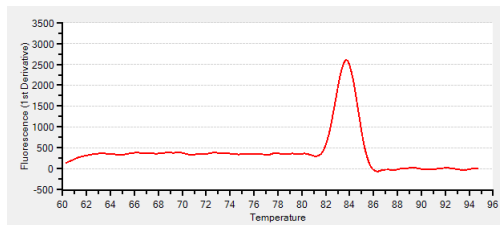
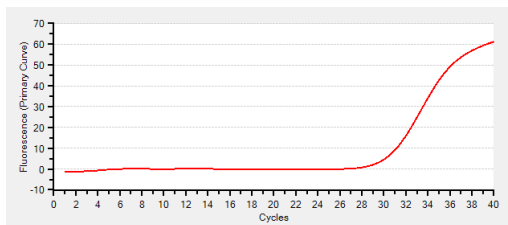
陰性判定の例

増幅曲線で増幅が認められても、融解曲線の Tm 値が陽性コントロールと一致しない場合は、陰性と判定されます。このような結果になる原因としては、プライマー由来の非特異的増幅が生じたこと等が考えられます。



陽性判定の例

増幅曲線で増幅が認められ、融解曲線の T_m 値が陽性コントロールと一致した場合は、陽性と判定されます。



リアルタイム PCR（Probe 法）実験ガイド

この文書では、Probe 法によるリアルタイム PCR について、蛍光検出の原理や実験操作の流れなどを解説します。実際の実験操作の詳細については、各製品の取扱説明書をご参照ください。

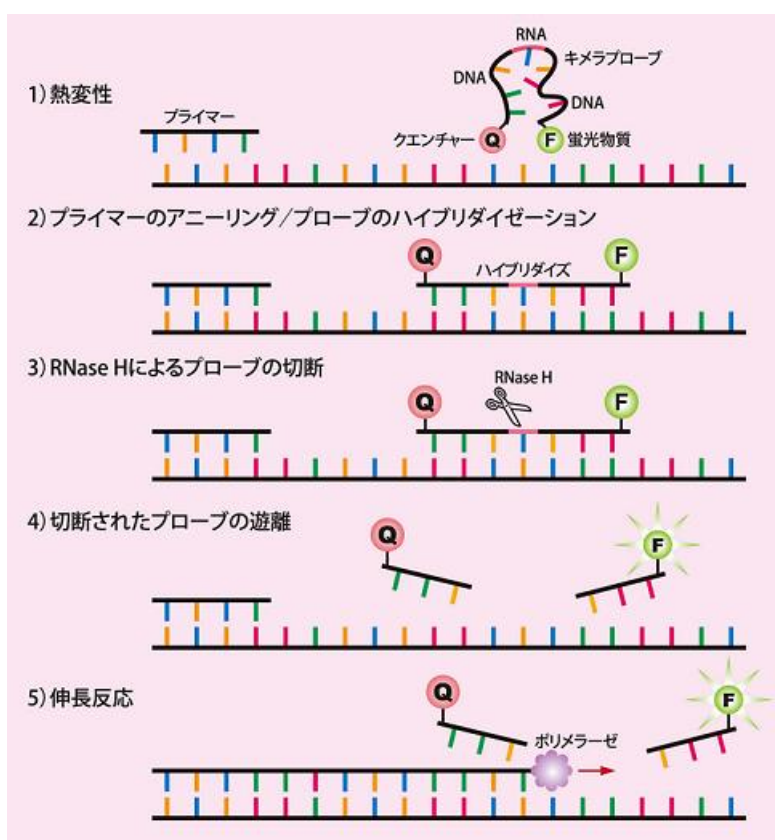
—目次—

- 1 蛍光検出の原理
- 2 実験に必要なもの
- 3 実験操作法
- 4 結果の解析

1 蛍光検出の原理

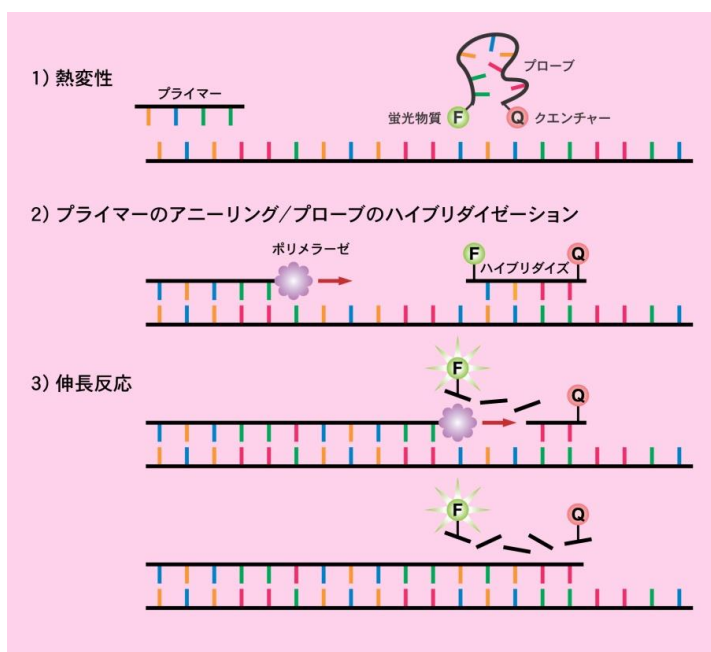
サイクリングプローブによる検出系（CyclecleavePCR 法）

サイクリングプローブは、RNA と DNA からなるキメラオリゴヌクレオチドで、片方の末端が蛍光物質で、もう一方の末端がクエンチャー物質で修飾されています。インタクトな状態では蛍光を発しませんが、PCR 増幅産物とハイブリッドを形成すると、反応液中に含まれる RNase H により RNA 部分が切断されて蛍光を発します。サイクリングプローブの RNA 付近にミスマッチが存在すると RNase H による切断は起こらないので、非常に配列特異性の高い検出が可能であり、SNPs タイピングなどに最適です。



プローブ検出系（5'ヌクレアーゼ法）

5'末端を蛍光物質で、3'末端をクエンチャー物質で修飾したオリゴヌクレオチドであるプローブは、アニーリングステップで鋳型 DNA に特異的にハイブリダイズするように設計されていますが、ハイブリダイズした段階ではプローブ上にクエンチャーが存在するために、励起光を照射しても蛍光の発生は抑制されています。その後の伸長反応ステップで、*Taq* DNA ポリメラーゼのもつ 5' → 3'エキソヌクレアーゼ活性により、鋳型にハイブリダイズしたプローブが分解されることにより、蛍光色素がプローブから遊離し、クエンチャーによる抑制が解除されて蛍光を発するようになります。



2 実験に必要なもの

一般的な実験器具類

マイクロピペット (20, 200, 1000μl) およびチップ (フィルター付き)

1.5 ml チューブおよびチューブラック

攪拌機 (Vortex)

小型遠心機 (1.5 ml チューブ用、8 連 0.2 ml チューブ用) など

* 詳細は、別冊の「遺伝子検査の準備と注意事項」をご参照ください。

リアルタイム PCR 装置

Thermal Cycler Dice® Real Time System シリーズは、日本語仕様の食品環境検査用ソフトウェアを標準搭載しており、遺伝子検査にお勧めの機種です。

器具名称	用途など	
① Thermal Cycler Dice® Real Time System Lite (製品コードTP700)	48ウェル対応のコンパクトタイプです。	

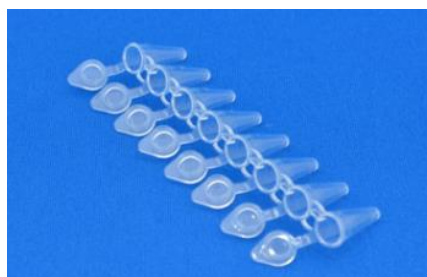
②	Thermal Cycler Dice® Real Time System III with PC (製品コードTP970)	96ウェルタイプのスタンダードタイプです。	
---	---	-----------------------	--

リアルタイム PCR 専用消耗品

Thermal Cycler Dice® Real Time System シリーズでは専用の反応チューブおよび反応プレートをご用意しております。下記以外のチューブやプレートを使用すると、正常な PCR 反応が行われないうち、装置故障の原因となりますので、ご注意ください。その他、反応液のマスターミックス調製や鋳型の希釈に使用するチューブ類は、通常の PCR/RT-PCR 実験と同様のものをご利用いただけます。

【Thermal Cycler Dice® Real Time System III with PC (製品コード TP970) 向け】

独立型フラットキャップ付き 8 連反応チューブ

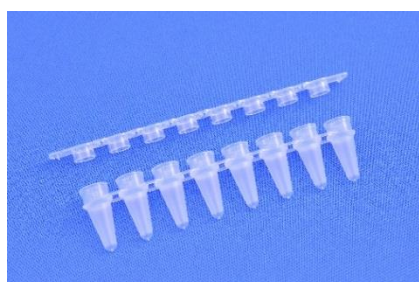


- ・0.1 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ902)

※コンタミネーション防止のためには、

独立型フラットキャップ付き 8 連チューブをお勧めします。

チューブおよびキャップがそれぞれ連結した 8 連反応チューブ



- ・0.1 ml 8-strip -neo- tube & cap Set (製品コード NJ907)

96 穴反応用プレート & 密着シール



- ・FrameStar® 0.1ml 96 well qPCR plate (製品コード NJ904)
- ・Sealing Film for Real Time (Adhesive) Ver.2 (製品コード NJ502)
- ・Sealing Film for Real Time (製品コード NJ500)
- ・Plate Sealing Pads* (製品コード 9090)

* 96 ウェルプレートに、シールをしっかりと貼り付けるために使用する専用パッド

リアルタイム PCR 試薬

タカラバイオでは、食品検査や環境検査用の遺伝子検査キットを幅広くラインナップしています。

サイクリングプローブ検出系の試薬

検 出 対 象		製 品 名	製品コード
食中毒検査に			
腸 管 出 血 性大腸菌	ベロ毒素 遺伝子	CycleavePCR™ O-157 (VT gene) Screening Kit Ver.2.0	CY217A
			CY217B
		CycleavePCR™ O-157 (VT1/VT2) Typing Kit	CY222
	O 抗原型 遺伝子	CycleavePCR™ EHEC (O157 / O26) Typing Kit	CY237
		CycleavePCR™ EHEC (O111 / O121) Typing Kit	CY238
		CycleavePCR™ EHEC (O103 / O145) Typing Kit	CY239
		CycleavePCR™ EHEC (O165) Typing Kit	CY241
サルモネラ		CycleavePCR™ <i>Salmonella</i> Detection Kit Ver.2.0	CY205
腸炎ビブリオ		CycleavePCR™ <i>Vibrio</i> (<i>tdh</i> gene) Detection Kit	CY220
セレウス		CycleavePCR™ <i>Bacillus cereus</i> (CRS gene) Detection Kit	CY221
リステリア モノサイトゲネス		CycleavePCR™ <i>Listeria monocytogenes</i> (<i>inlA</i> gene) Detection Kit	CY223
カンピロバクター		CycleavePCR™ <i>Campylobacter</i> (<i>jejuni</i> / <i>coli</i>) Typing Kit	CY225
黄色ブドウ球菌		CycleavePCR™ <i>Staphylococcus aureus</i> (DnaJ gene) Detection Kit	CY228
品種判別に			
肉種判別		CycleavePCR™ 肉種判別キット（6種）	CY218
水質検査に			
レジオネラ属菌		CycleavePCR™ <i>Legionella</i> (16S rRNA) Detection Kit	CY240
			CY240S
クリプトスポリジウム		Cycleave RT-PCR <i>Cryptosporidium</i> (18S rRNA) Detection Kit	CY230
ジアルジア		Cycleave RT-PCR <i>Giardia</i> (18S rRNA) Detection Kit	CY231

プローブ検出系の試薬

食中毒検査に		
ノロウイルス	TaKaRa qPCR <i>Norovirus</i> (GI/GII) Typing Kit	RR250A / RR250B
	TaKaRa qPCR <i>Norovirus</i> (GI/GII) Typing Kit (1Step)	RR262A
検便検査に		
ノロウイルス	TaKaRa ノロウイルス GI/GII 検出キット Ver.3	RR298A

3 実験操作法

(1) サンプルの調製（エリア 2 で実施）

検体の種類や実験目的に適した方法でサンプルの調製を行います。簡易的な抽出を行う方法としては、熱抽出法やアルカリ熱抽出法があります。高純度な DNA が必要な場合は、DNA 精製キットを使用して調製します。

- * DNA 調製法に関しては、別冊の「DNA/RNA 調製法 実験ガイド」をご参照ください。
- * 実験エリアに関しては、別冊の「遺伝子検査の準備と注意事項」をご参照ください。
- * クリプトスポリジウムやノロウイルス等、RNA を検出対象とする製品の核酸調製方法に関しては、各製品の取扱説明書をご参照ください。

(2) リアルタイム PCR 用装置のセッティング

- * Thermal Cycler Dice® Real Time シリーズを使用する場合は、別冊の「Thermal Cycler Dice® Real Time Quick Manual」をご参照ください。

(3) 反応液の調製（エリア 1→3 で実施）

- * 操作方法の詳細は、各製品の取扱説明書をご参照ください。

⑦ 反応液の調製（エリア 1 で実施）

サンプル以外の試薬のマスターミックスを氷上で調製し、リアルタイム PCR 専用チューブに分注し、キャップを軽く閉めます。

12 反応分のマスターミックス調製例

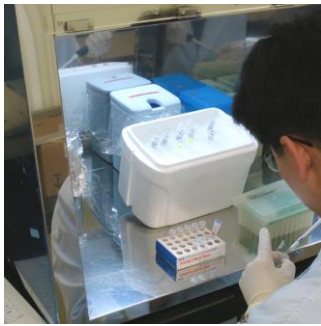
試薬	1 反応当り	12 反応分
2× Cycleave Reaction Mixture	12.5μl	150μl
5× Primer/Probe mix	5μl	60μl
滅菌精製水	2.5μl	30μl

⑧ 陰性コントロールの添加（エリア 1 で実施）

陰性コントロールのチューブに滅菌精製水を 5μl 添加し、チューブのキャップをしっかりと閉めます。

⑨ サンプルおよび陽性コントロールの添加（エリア 3 で実施）

エリア 3 に移動し、(1)で調製したサンプルおよび陽性コントロールを各 5μl 添加し、チューブのキャップをしっかりと閉めます。



リアルタイム PCR 反応液は、コンタミネーション防止のため、クリーンベンチ内で調製します。試薬は、酵素の失活を避けるため、アイスボックス内で氷上で取り扱ってください。

(4) リアルタイム PCR の開始

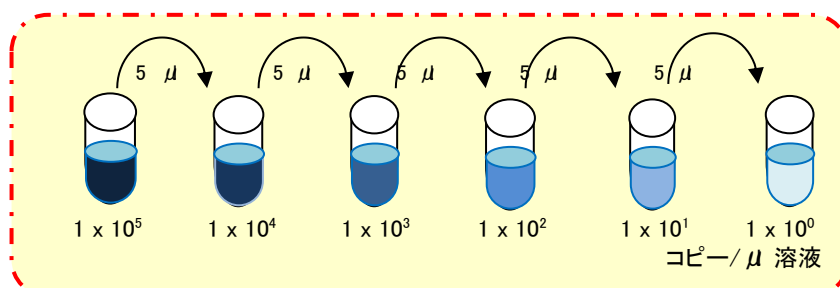
リアルタイム PCR 反応液が入ったチューブを軽くスピンドウンし、リアルタイム PCR 装置にセットし、反応を開始します。



補足：検量線作成用のスタンダードサンプルの調製

定量解析が可能なキットには、検量線作成用に陽性コントロール (Positive Control Plasmid) および段階希釈用の EASY Dilution が添付されています。段階希釈は、以下のような要領で行います。

1. 1×10^5 copies/ μ l (Positive Control 原液)
2. 1×10^4 copies/ μ l (Positive Control 原液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)
3. 1×10^3 copies/ μ l (2. の 1×10^4 copies/ μ l 溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)
4. 1×10^2 copies/ μ l (3. の 1×10^3 copies/ μ l 溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)
5. 10 copies/ μ l (4. の 1×10^2 copies/ μ l 溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)
6. 1 copy/ μ l (5. の 10 copies/ μ l 溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)



4 結果の解析

増幅曲線と Ct 値

PCR 増幅の有無は、増幅曲線で確認します。

コントロール反応の結果が適切であることを確認した上で、測定対象サンプルの増幅の有無を判定します。増幅が認められた場合には、陽性と判定されます。増幅が認められない場合には、陰性と推定されますが、PCR 阻害物質による偽陰性の可能性がありますので、後述のインターナルコントロールの結果と合わせて判定します。

増幅曲線が閾値に達した時のサイクル数を Ct 値と呼び、Ct 値は初期鋳型量の目安となります。Ct 値が小さい場合は鋳型量が多く、Ct 値が大きい場合は鋳型量が少なかったと推測されます。

インターナルコントロールによる PCR 阻害の有無の確認

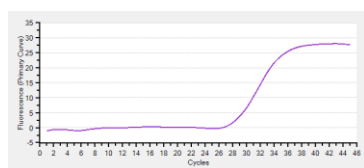
試薬にインターナルコントロールが添加されているキットでは、PCR 阻害の有無を確認することができます。インターナルコントロールの増幅が認められた場合には、PCR 阻害はなかったと判断されます。ターゲット、インターナルコントロールともに増幅が認められなかった場合には、偽陰性の疑いがあります。

ターゲット遺伝子の検出

測定対象のサンプル



PCR産物をFAMで検出

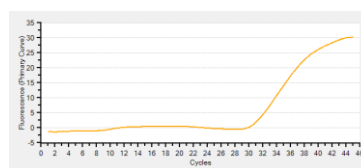


ICによる偽陰性のチェック

Internal Control



PCR産物をROXで検出



陽性コントロールによる定量解析

定量解析が可能なキットでは、キットに添付されている陽性コントロール（Positive Control Plasmid）を段階希釈したものを用いて検量線を作成し、測定対象サンプルの定量を行うことができます。リアルタイム PCR の結果として算出される定量値は、Positive Control Plasmid のコピー数相当量なので、実際の菌数として表すには、その検出系に適した方法で換算する必要があります。

例えば、レジオネラ属菌の検出キット(製品コード **CY240**)では、**Positive Control Plasmid** および既知数のレジオネラ属菌を用いて検量線を作成し、その切片の差から **Positive Control Plasmid 15 コピー=1 cfu** という換算値が求められています。詳しくは、各製品の取扱説明書をご参照ください。