

FRED Assay Kit for Eukaryotic DNA

マニュアル第 1 版 1911

I 製品説明

本製品は、標的配列の長さが異なる 2 種類の Primer & Probe を用いてリアルタイム PCR を行い、得られた Ct 値を比較することで、真核生物 DNA の断片化の程度を定量的に評価するためのキットです。本製品は、FRED (Fragmentation analysis using multiple Real-time PCR with Equivalent amplification efficiency and Different amplicon sizes) 法と呼ばれる分析技術を採用しており、「DirectAce qPCR Mix Plus ROX Tube」との組合せで、断片化の程度を示す DNA 断片化指数を算出することが可能です。加工食品等、DNA が断片化した試料を対象とした遺伝子検査を行う際に、断片化指数は DNA の品質の指標として利用することができます。

II 保存

-20℃(遮光)

III 製品内容

No Fragmentation Control 300 μ l x 1 本(以下、「NFC」)
 E100 Primer & Probe Mix 900 μ l x 1 本(約 100 bp 増幅)
 E200 Primer & Probe Mix 900 μ l x 1 本(約 200 bp 増幅)
 E350 Primer & Probe Mix 900 μ l x 1 本(約 350 bp 増幅)

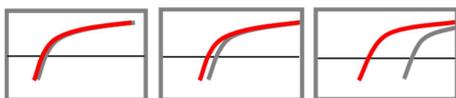
IV 注意

本製品は「DirectAce qPCR Mix Plus ROX Tube」と組合せて使用することを前提として設計されたキットです。他のリアルタイム PCR 試薬ではご使用になれません。

本製品をご使用される際は別途「DirectAce qPCR Mix Plus ROX Tube」(Code No. 318-07751)をお買い求め下さい。

V 分析法の原理

標的配列の長さが異なる 2 種類の Primer & Probe を用いてリアルタイム PCR を行うと、鋳型 DNA の断片化の程度に応じて、標的配列の長い増幅曲線の立ち上がりが遅れ、2 つの増幅曲線の Ct 値に差が生じます(下図)。



断片化なし

高度に断片化

2 つの増幅曲線の Ct 値の差から、100 bp の標的 DNA のうち、断片化して鋳型にならない DNA の割合を示す理論値である DNA 断片化指数【DFI: DNA Fragmentation Index】を算出し、鋳型 DNA の断片化の程度を数値化します。

VI プロトコール

① 2 種類の Primer & Probe Mix は、「E100」と「E350」の組合せを通常選択する。DNA が高度に断片化していると予想される場合は、「E100」と「E200」を選択して使用する。

② 2 種類の Primer & Probe Mix で、それぞれプレミックスを調製する。以下の通り、DNA 溶液数[N 個=サンプル数 + No Fragmentation Control(以下、「NFC」)]に応じる。

2 x DirectAce qPCR Mix No ROX	50 x N μ l
Primer & Probe Mix	20 x N μ l
50 x ROX Passive Reference ^{*1)}	(0 μ l)
(ABI Prism [®] 7500 の場合:	0.2 x N μ l)
(ABI Prism [®] 7000/7700/7900 の場合:	2 x N μ l)
d.d.H2O	up to 90 x N μ l

*1) ROX 補正を必要としない装置の場合、添加する必要はありません。使用装置に応じて濃度調整して下さい (DirectAce qPCR Mix Plus ROX Tube の取扱説明書 参照)。

③ 各プレミックスを、N 個のチューブに 81 μ l ずつ分注し、DNA 溶液と混合する。

プレミックス	81 μ l
DNA 溶液	9 μ l
Total	90 μ l

④ 調製した各反応液を 96 ウェルの PCR プレート^{*2)} へ、25 μ l x 3 ウェルずつ分注する。

サンプル配置の例 ^{*3)}

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	NFC	サンプル 1	NFC	サンプル 1								
C	サンプル 2	サンプル 3	サンプル 2	サンプル 3								
D	サンプル 4	サンプル 5	サンプル 4	サンプル 5								
E	サンプル 6	サンプル 7	サンプル 6	サンプル 7								
F	サンプル 8	サンプル 9	サンプル 8	サンプル 9								
G	サンプル 10	サンプル 11	サンプル 10	サンプル 11								
H												
	E100						E350					

*2) 8 連チューブなどは使用せず、必ず 96 ウェル PCR プレートを使用する。

*3) 96 ウェル PCR プレートの A 行と H 行は、可能な限り使用しない。

⑤ 96 ウェル PCR プレートに蓋をし、下記の条件でリアルタイム PCR を行う。レポーターは FAM、クエンチャーは TAMRA に設定する。

- ・Up Ramp Rate および Down Ramp Rate を 1.6 °C/sec に設定する。
- ・ABI Prism® 7900 および ABI Prism® 7500 では Ramp Rate を変更せず、Standard mode でリアルタイム PCR を行う。

95°C	10 min.) 45 cycles
95°C	30 sec.	
58°C	10 sec.	
72°C	2 min.	

⑥ 反応終了後、解析を行い、各ウェルの Ct 値が算出されていることを確認する(Auto 解析でも、Threshold を設定して解析しても良い)。

VII DNA 断片化指数 (DFI) の算出方法

① NFC を 2 種類の Primer & Probe Mix で増幅させた際の Ct 値の差「 $\Delta Ct(NFC)$ 」を求める。

$$\Delta Ct(NFC) = Ct_{E350} - Ct_{E100}$$

② サンプルを 2 種類の Primer & Probe Mix で増幅させた際の Ct 値の差「 $\Delta Ct(Sample)$ 」を求める。

$$\Delta Ct(Sample) = Ct_{E350} - Ct_{E100}$$

③ $\Delta Ct(Sample)$ から $\Delta Ct(NFC)$ を引いた「 $\Delta \Delta Ct$ 」を求める。

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct(Sample) - \Delta Ct(NFC)$$

④ 得られた $\Delta \Delta Ct$ から「DNA 断片化指数 (DFI)」を求める。2 種類の Primer & Probe Mix の組合せによって算出方法は異なる。

E100 と E350 を使用した場合:

$$DFI = 1 - \left(\frac{1}{2} \right)^{\frac{\Delta \Delta Ct}{2.5}}$$

E100 と E200 を使用した場合:

$$DFI = 1 - \left(\frac{1}{2} \right)^{\frac{\Delta \Delta Ct}{1}}$$

DFI < 0 の場合は DFI = 0 に補正する。

VIII 分析法の注意事項

○ 算出される DFI について

DFI は 0~1 の値で算出されます。「DFI = 0.5」と算出された場合、理論上、鑄型 DNA 溶液中に含まれる 100 bp の標的 DNA のうち、約半数の DNA が断片化して PCR の鑄型にならない状態であることを示しています。

○ Primer & Probe Mix の選択について

Primer & Probe Mix の組合せは、まず E100 と E350 を選択して下さい。対象の DNA が高度に断片化しており、E350 で増幅が認められない場合や、0.99 など極端に高い DFI が算出された場合は、E100 と E200 の Primer & Probe の組合せを使用して再度評価を行って下さい。

長時間加熱された食品由来の DNA など、高度に断片化していることが予想される DNA の場合も、E100 と E200 の組合せを使用して評価を行って下さい。

○ 鑄型 DNA について

鑄型 DNA は、DNA 抽出キットで精製された DNA を使用して下さい。加工食品からの DNA 抽出には「GM quicker 4」(Code No. 318-07751)の使用を推奨します。

○ Primer & Probe の組合せと DFI について

同じ DNA サンプルを評価した場合でも、E100 と E350 の組合せで得られた DFI と、E100 と E200 の組合せで得られた DFI は完全には一致しません。DNA サンプル間で DFI を比較する際は、同じ Primer & Probe Mix の組合せを使用して下さい。

○ リアルタイム PCR 装置と DFI について

機種異なるリアルタイム PCR 装置を使用した場合、同じ DNA サンプルでも、算出される DFI は完全には一致しません。DFI を比較する際は、同一機種を使用し、一定のデータ解析方法で評価を行って下さい。

IX 参考文献

- 1) Mano J, Nishitsuji Y, Kikuchi Y, Fukudome SI, Hayashida T, Kawakami H, Kurimoto Y, Noguchi A, Kondo K, Teshima R, Takabatake R, Kitita K: Quantification of DNA fragmentation in processed foods using real-time PCR. *Food Chem.*, **226**, 149-155 (2017)

X 備考

本製品は、農研機構、株式会社日清製粉グループ本社、日本製粉株式会社が所有する特許第 6120279 号のライセンスを受けて製造・販売しています。