

DNA検査に最適なPPチューブの選択方法

ーリアルタイムPCRによる評価ー

技術の特徴

PCRの鑄型となるプラスミドDNA溶液を特定のポリプロピレン(PP)製マイクロチューブ(チューブ)に分注後、リアルタイムPCR法で定量を行ったところ、鑄型DNA溶液のコピー数が50%以上も減少する事例が確認された。

このように、PCR等のDNAに関する分析技術全般において不適切なチューブを選択した場合には、検査時の測定結果に影響する可能性があるため、チューブの選択にあたっては十分に留意する必要がある。

そこで、PCR検査の精度管理を目的として、PCR等のDNA分析に最適なチューブを選択可能とするための手法を見出した。

研究の内容

材料

- ・チューブは表「本検討に用いたチューブ」に示す10種類を用いた。
- ・吸着を確認するためのDNAはTE buffer で50 ng/μLに希釈したColE1 (共にニッポンジーン社製)を用いた。
- ・リアルタイムPCRによるCt値測定試験では、GMダイズ(RRS)プラスミドセット-ColE1/TE-(ニッポンジーン社製)のうちウェル間のCt値が比較的安定に測定可能な1,500、20,000、250,000コピー/2.5 μLのプラスミド溶液を使用した。

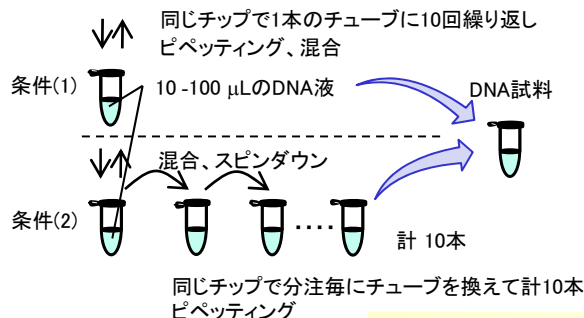
方法

- ・測定用試料は図「DNA試料の調製」に示す方法で調製した。
- ・Ct値測定用機器はABI Prism 7900HT(アプライドバイオシステムズ社製)を使用した。
- ・DNAの吸着を確認およびCt値測定試験に用いたDNAの量は、0.2 mL チューブ が10 μL, 0.5 mL~0.65 mL チューブは50 μL、1.5 mL~2.0 mL チューブ は100 μLとした。

本検討に用いたチューブ

チューブ	容量(mL)
A	0.65
B	0.50
C	1.5
D	1.5
E	1.7
F	2.0
G	1.7
H	0.20
I	0.20
J	0.20

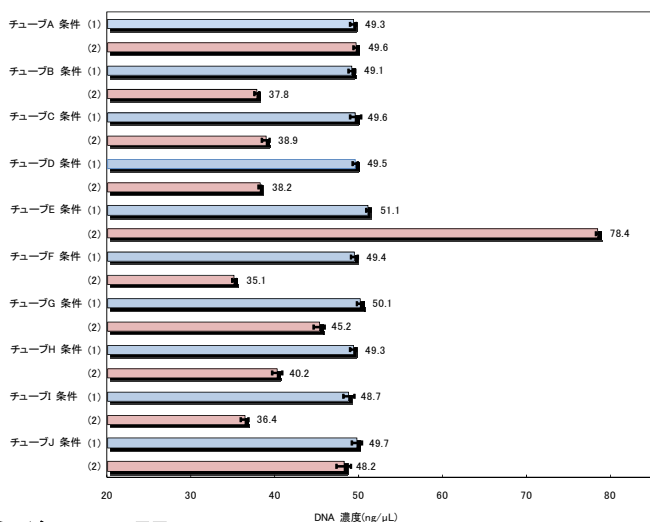
DNA試料の調製



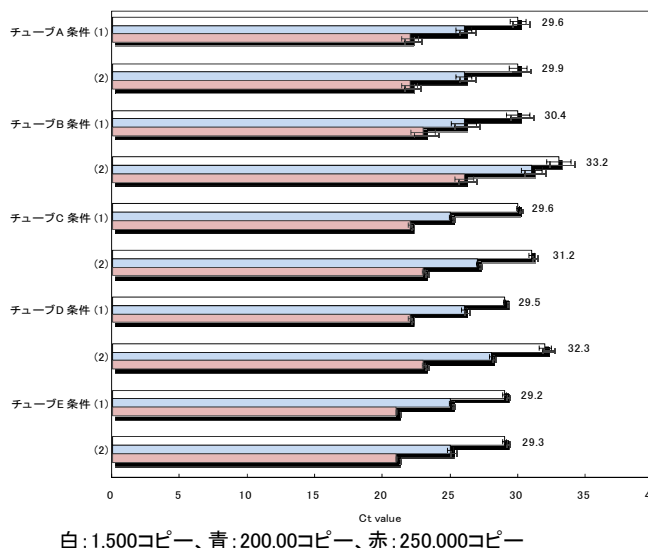
インターカラー法によるColE1の濃度比較

	DNA 濃度 (ng/μL)	
	条件 (1)	条件 (2)
チューブ A	30.7	30.0
チューブ B	30.5	23.4
チューブ E	30.7	30.7

ColE1によるチューブへのDNAの吸着比較



RRSプラスミドセットによるCt値の変動比較



今後の展開

JAS分析試験ハンドブック、厚労通知等への掲載を提案する

本試験に供したチューブA~Eのうち、チューブAがPCRに最も好適と判断された。



農研機構
食品総合研究所

代表研究者: 古井 聡
所 属: 食品分析研究領域
GMO検知解析ユニット

問合わせ先: 029-838-8079 satfurui@affrc.go.jp