

# DNA断片化測定キット (植物用)

# FRED Assay Kit for Plant DNA

Code No.	品名	包装単位	希望納入価格 (税別)
310-08671	FRED Assay Kit for Plant DNA	1 kit	54,000円

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、植物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。

FRED法と呼ばれる分析技術を採用しており、DirectAce qPCR Mix plus ROX Tube (Code No. 318-07751)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。

## 特長

- リアルタイムPCRのCt値から断片化の程度を定量的に評価
- 算出した断片化指数は、DNAの品質指標として利用できる

## 利用例

GMO検査や品種判別、アレルゲン検査など、加工食品を対象とする遺伝子検査の品質管理への利用。

<その他>

- ・ 植物性食品の加熱殺菌の有無や、加熱調理時間の推定などへの応用が期待。
- ・ 次世代シーケンサー用DNA試料の品質評価などへの利用が期待。

## 構成

	15サンプル分 <sup>※2</sup>
No Fragmentation Control <sup>※1</sup>	300 μl
P100 Primer & Probe Mix	900 μl
P200 Primer & Probe Mix	900 μl
P400 Primer & Probe Mix	900 μl

※1. コントロール用プラスミドDNA溶液

※2. 1サンプルずつプレミックスを調製する場合は15サンプル、10サンプル分をまとめて調製する場合は30サンプルに相当。

## FRED法によるDNA断片化測定の原理

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。

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。

### DNA断片化指数の算出

DNA断片化指数 (DFI) は、ゲノムDNAに切断が生じている割合を100塩基単位で算出した理論値です (0以上1以下)。

① P100とP400のCt値の差を「t」で示すと、

$$DFI = 1 - (1/2)^{t/3}$$

② P100とP200のCt値の差を「t」で示すと、

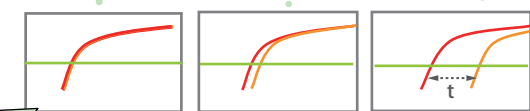
$$DFI = 1 - (1/2)^t$$

### 加工食品などから抽出した DNA

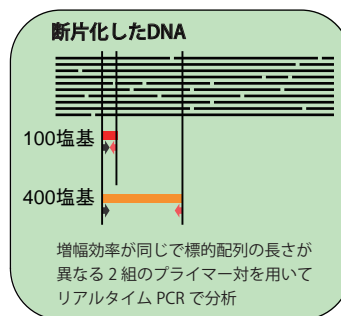


### リアルタイム PCR 法による測定結果

(断片化に応じて増幅曲線の差が大きくなる)



測定結果を「DNA断片化指数」として数値化



【注意事項】 ・ 本製品では、リアルタイムPCR装置のUp Ramp Rate および Down Ramp Rate を「1.6℃ / sec」に設定する必要があります。ご利用の前に、お手持ちのリアルタイムPCR装置で設定できるかご確認ください。(ABI Prism® 7900 および ABI Prism® 7500 の場合、Ramp Rate を変更せず、Standard Mode を使用します。)  
 ・ 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」をお買い求め下さい。

【License】 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代6120279号のライセンスを受けて製造・販売しています。

## 実験例1：味噌DNAの断片化評価

味噌から、加工食品用DNA抽出キット「GM quicker4」を用いてDNAを抽出し、得られたDNA溶液を鋳型に「DirectAce qPCR Mix plus ROX Tube」を用いてリアルタイムPCRを行った。本品のPrimer & Probe Mix P100とP400の組合せで、味噌DNA溶液 (Sample) とコントロール用プラスミドDNA溶液 (NFC) の解析を行い、各ウェルのCt値が算出されていることを確認した (使用機種:ABI 7500)。

	Ct 値 (P400)	Ct 値 (P100)
コントロール用プラスミドDNA溶液 (NFC)	22.86	23.19
味噌DNA溶液 (Sample)	36.74	27.34

### DNA断片化指数 (DFI) の算出

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)」を求めた。

$$\Delta Ct (NFC) = Ct (P400) - Ct (P100) = 22.86 - 23.19 = -0.33$$

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)」を求めた。

$$\Delta Ct (Sample) = Ct (P400) - Ct (P100) = 36.74 - 27.34 = 9.4$$

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

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct (Sample) - \Delta Ct (NFC) = 9.4 - (-0.33) = 9.73$$

4. 得られた  $\Delta \Delta Ct$  から「DNA断片化指数 (DFI)」を求めた (右式)。

$$DFI = 0.894$$

P100とP400を使用した場合:

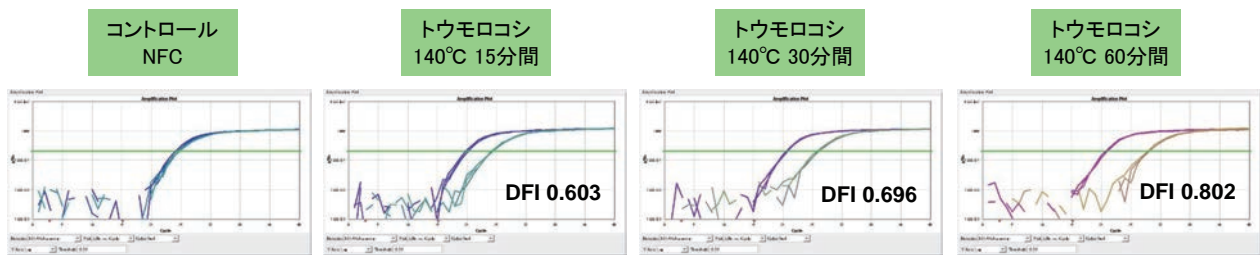
$$DFI = 1 - (1/2)^{\Delta \Delta Ct/3}$$

**結果** 味噌DNA (1サンプル) の断片化指数DFIは「0.894」だった。

DFIは0~1の値で算出される。「DFI = 0.894」と算出された場合、理論上、鋳型DNA溶液中に含まれる100 bpの標的DNAのうち、約9割のDNAが断片化してPCRの鋳型にならない状態であることを示している。

## 実験例2：加熱処理したトウモロコシDNAの断片化評価

加熱処理したトウモロコシから、「GM quicker 4」を用いてDNAを抽出し、得られたDNA溶液を鋳型に「DirectAce qPCR Mix plus ROX Tube」を用いてリアルタイムPCRを行った。本品のPrimer & Probe Mix P100とP400の組み合わせでそれぞれDFIを算出した (下図のDFIは2回測定の前平均)。



トウモロコシの加熱時間と連動したDNA断片化指数 (Primer & Probe Mix P100, P400)

**結果** サンプルの加熱時間と連動してDFI値が増加した。

### Q & A Q どのPrimer & Probeの組合せで評価したらよいですか。

**A** Primer & Probe Mixの組合せは、まずP100とP400を選択して下さい。対象のDNAが高度に断片化しており、P400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、P100とP200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、P100とP200の組合せを使用して評価を行って下さい。

### Q 植物種によって測定できないことはありますか。

**A** 植物種に依存しないことを確認しております。トウモロコシ、コムギ、イネ、ダイズ、ナタネ、テンサイから抽出したDNA溶液を本キットで評価したときには、植物種によらず測定することができました。

## 関連製品

Code No.	品名	包装単位	希望納入価格(税別)	備考
318-07751	DirectAce qPCR Mix plus ROX Tube	200反応用	67,500円	リアルタイムPCR用試薬
316-07791	GM quicker 4	50回用	56,000円	加工食品からのDNA抽出キット

製造元 **株式会社ニッポンジーン**

〒930-0834 富山市問屋町二丁目7番18号  
TEL: 076-451-6548 FAX: 076-451-6547  
URL: <http://www.nippongene.com>

販売元 **富士フイルム 和光純薬株式会社**

本社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号 TEL: 06-6203-3741 (代表)  
東京本店 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号 TEL: 03-3270-8571 (代表)  
フリーダイヤル 0120-052-099 フリーファックス 0120-052-806