

#### Real-time PCR 法に含まれる不確かさ推定を目的とした共同試験について

概要：現在、CODEX 等の場においても改めて議論されるなど、食品分析の分野において「測定の不確かさ；measurement uncertainty」を推定することの重要性が増してきている。測定の不確かさに関する議論は、1993 年、国際標準化機構 (ISO) が、国際電気標準会議 (IEC)、国際度量衡委員会 (CIPM)、国際法定計量機関 (OIML)、国際純正応用化学連合 (IUPAC)、国際純粋応用物理学連合 (IUPAP) 及び国際臨床化学連合 (IFCC) と共同して「計測における不確かさの表現のガイド (GUM)」を発行したことにより実質化した。GUM の序文には、「ある物理量の測定結果を報告するにあたって、その結果を利用する人がその信頼性を評価できるように、結果の質についての定量的な指標を与えることが義務づけられる。このような指標がないと、測定結果は、それら同士でも、また仕様書や規格に与えられている参考値とも比較することができない。このため、測定結果の質を特徴づけるために、すなわち、その不確かさを評価し、表現するために、手軽に実行可能かつ容易に理解可能であり、そして一般に受け入れられるような手順が必要となる。」と不確かさを推定することの意義が示されている。近年 EU から発出される regulation 等においては、必ずといってよいほどに分析性能基準の一つとして不確かさが示されるようになってきている。その推定法には複数の方法が提案されており、いずれを選択するかについての統一的な見解は得られていないが、いずれにせよ、推定の方法を有することと推定するために分析の原理原則を明らかにすることが不可欠となる。

農薬等の低分子化合物を測定対象物質とする理化学分析法は、物理化学的な測定量の計測を基本原理とし、これまでも長い歴史を有する。そのため、不確かさの推定も比較的容易である。しかしながら、本研究で取りあげる real-time PCR 法を含む生化学反応を基本原理とする分析法 (生化学分析法) は、開発ならびに運用の歴史が浅いことから原理原則の解明が不十分であり、不確かさを推定することが容易ではない。言い換えれば、不確かさが正しく推定されていないために分析法の要件の一部が曖昧となり、必要に応じて改善することの妨げになっているともいえる。

本研究では、real-time PCR 法の一例として、遺伝子組換えダイズ (Roundup Ready Soy: RRS) を対象とした定量 PCR 法 (厚生労働省通知分析法; 最新は食安発第 0618001 号別添 3.1.2 項、以降、通知法とする) を取り上げ、標準物質 (検量線用標準プラスミド) の測定を実施し、

得られた測定値を解析することにより、不確かさの推定およびそれに影響を与える因子の特定を試みることを目的とする。

なお、先に研究協力依頼として連絡の通り、本研究は各試験者の技能評価等を目的としたものではありません。

## I. 送付内容

1. プロトコル(報告内容の規定を含む) 本資料

### 2. 試薬\*

2-1. GM サイズ(RRS)プラスミドセット-ColE1/TE(ニッポンジーン社製 Code:316-05971) : 1 セット

2-2. サイズ内在性 DNA LeI オリゴヌクレオチドセット(ニッポンジーン社製 Code:319-05601) : 1 セット

2-3. GM サイズ(RRS)プラスミド Soy-ColE1/TE-1.5k (600  $\mu$ L) : 1 本

2-4. TaqMan® Universal PCR Master Mix : 1 本

\*2-1 から 2-3 までの試薬は、受領後、試験開始までの期間、-20℃で冷凍保管してください。また、2-4 の試薬は、同期間、4℃で冷蔵保管してください。また、共同試験に供する試薬はすべて同一ロット品としておりますので、送付されてきた試薬以外の試薬を試験に用いないでください。また、ABI PRISM 7900HT-384 well にて実施の機関当てには、必要試薬量の増加に応じた数の試薬を送付させていただきますので受領後ご確認ください。

## II. 各機関においてご用意頂く器具並びに機器

1. 可能であれば 8 連ピペッターおよびマルチチャンネルピペッター用リザーバー\*
2. 試薬混合用の微量遠沈用チューブ(1.5 mL、2.0 mL 容)およびポリプロピレン製 50 mL 容チューブ(等)
3. PCR 用プレート(MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate)ならびにシール、adhesive covers
4. Real-time PCR 機器
5. 水(蒸留滅菌水 DW)
6. その他、消耗品

\*8 連ピペッターは、下記の試験内容中、試験 2 として詳述された試験 (real-time PCR 機器の不確かさ推定)において使用します。また、分取される液量の精度が管理されていることを前提とします。このような 8 連ピペッターの持ち合わせがない場合には、通常のシングルチャンネルのピペッターで実行してください。その場合、試薬調製手順として規定され

ているマルチチャンネルピペッター用リザーバーに混合溶液を移す操作を行わず、直接 50 mL チューブ(等)から繰り返し分注することになります。なお、いずれを用いる場合にも、操作による誤差がないよう十分に注意してください。

### III. 試験内容

本共同試験は2つの試験から構成されております。以下、real-time PCRの機種ごとに「試験1」と「試験2」として示しますので、正しく実行してください。

ABI PRISM 7700

### III-1 ABI PRISM 7700

#### 試験 1 (検量線に伴う不確かさの推定)

試験 1 では、real-time PCR に供する 1 枚のプレートに、通知法で規定されている検量線を決められた配置で都合 5 本作成します。本試験の手順は基本的に通知法を遵守していますが、機関間で不統一となることを避けるための変更が加えられています。注釈も含めてよく確認していただき、その上で試験をおこなってください。

注釈にもありますが、手順は 1 本の検量線を作成することを基本として記載されています。これを 5 併行することにより 5 本の検量線を作成してください。(試薬は一括して調製せず、1 本の検量線を作成するための操作を 5 回繰り返してください。全操作を完了するまでには時間を要するかと思いますので、プレートに分注する前の混合溶液、分注したプレート等は氷上に静置してください。)

#### 試験手順

##### III-1-1-1 PCR 用反応液の調製とプレートへの分注 (ABI PRISM 7700)

PCR 用反応液は 25  $\mu\text{L}/\text{well}$  として調製する。その組成は以下のとおりである。Universal PCR Master Mix<sup>\*1</sup> 12.5  $\mu\text{L}$ 、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25  $\mu\text{M}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ 、対象プローブ溶液 (10  $\mu\text{M}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ 、水 9  $\mu\text{L}$ 、検量線用標準プラスミド DNA 溶液 2.5  $\mu\text{L}$ 、或いは 5 ng /  $\mu\text{L}$  ColE1/TE 溶液 (ブランク試料液: NTC) 2.5  $\mu\text{L}$ 。試験は、1 つの DNA 溶液あたり 3 well 並行で行うものとし、PCR 用反応液は 3 well 分を同時に調製する<sup>\*2</sup>。

実際の調製は、調製及び PCR で生じる人的誤差を減少させるため、以下の手順に従って行う。まず、あらかじめ Universal PCR Master Mix (UMM) に対象プライマー対、対象プローブを加えた溶液 (マスターミックス) を調製する。この際、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液 (P.P mix)<sup>\*3</sup> を先に調製しておき、これと UMM を 1 : 1.25 の比率で混合させる。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1 DNA 試料液 (3 well 分) あたり、81  $\mu\text{L}$  が適当である<sup>\*4</sup>。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し (約 5 秒間)、攪拌後には軽く遠心 (スピンドアウン) する。次いで、マスターミックスを必要数<sup>\*5</sup> の微量遠沈管 (1.5 mL 容) に 78.75  $\mu\text{L}$  ずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応する DNA 溶液を 8.75

μL 加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後(約 5 秒間)、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を 25 μL/well として 96 well プレート上の well に分注する。

プレート配置は図 1 (page 40)に従う。

#### \*1 Universal PCR Master Mix(UMM)

本試薬は粘性が高いため、操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意を要する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて 5 秒間程度混合した後、軽く手で降る等して溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

#### \*2 定量 PCR 用反応液の調製

冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。氷上で保存した試薬につき、同一のチップを用い連続分注すると、ピペット内の空気が冷却されるため、2 回目以降、通常のピペット操作では正確に分注されないので注意する。ピペットの説明書に書かれた、低温試料を扱う場合の操作法(通常、ふきとめと呼ばれる操作)を理解して使用すること。

#### \*3 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液(P.P mix)の調製

対象プライマー対濃度が 1.25 μM、対象プローブ濃度が 0.5 μM となるよう水で希釈し、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合することで調製する。また、本混合液は凍結保存が可能であるが、凍結融解を繰り返すことは避ける。本試験においては以下の通り調製することとする。

2 mL 容微量遠沈管に、対象プライマー溶液(25 μM)のそれぞれを 60 μL、対象プローブ溶液(10 μM)を 60 μL 分注し、ここに水 1020 μL を加えてボルテックスミキサーを用いて十分に混合する(10 秒間ほど)。

#### \*4 マスターミックスの調製

本試験においては以下の通り調製することとする。1 つの DNA 溶液あたり、P.P mix 36 μL と UMM 45 μL を混合する。1 本の検量線作成のために規定されている検量点は、NTC も含めると 6 点であるため、P.P mix 216 μL(36 μL x 6)と UMM 270 μL(45 μL x 6)を混合し、486 μL のマスターミックスを一括して調製し、その後 DNA 溶液数にあわせて分注する。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に混合する(10 秒間ほど)。

なお、ここに記載されたマスターミックスは検量線 1 本あたりの調製法となります。  
(本試験に必要な 5 本の検量線を作成するためには、試薬は一括して調製せず、上記の 1 本の検量線を作成するのに要する操作を独立して 5 回繰り返してください。)

#### \*5 分注必要数

上記の通り 1 本の検量線作成のために規定されている検量点の数。具体的には以下のとおり。検量線用標準プラスミド DNA 溶液 (5 点)、並びに NTC (1 点)、この計 6 点。

III-1-1-2 PCR 用反応プレートのシーリングおよび real-time PCR 機器の設定と測定 (ABI PRISM 7700)

PCR 用プレートのシーリングおよび real-time PCR 機器の設定と測定条件は、通知法による。以下、ABI PRISM 7700 に関する通知法の該当箇所を抜粋して示します。また、反応終了後得られる SDS ファイルは解析せずそのままご報告ください。

下記の手順は通知法の抜粋となるため、UNKN を設定することが規定されていますが、本試験では未知試料の測定はありませんので、STND (standard) と NTC の設定のみとなります。なお、Standard の各検量点コピー数は 20、150、1500、20000、250000 となります。

#### 3.1.2.1. ABI PRISM™ 7700 及び ABI PRISM™ 5700 を用いた定量 PCR

##### 3.1.2.1.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM™ 7700 及び ABI PRISM™ 5700)

〜前略〜分注操作終了後、真上からプレートの蓋\*5をする。このとき、片側にゆがみがたまらないよう両側のウェルから交互に閉める。次いで専用ローラーを用いて完全にウェルを密閉する。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。

#### \*5 96 ウェルプレートおよびプレートの蓋

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems 社) 及び MicroAmp Optical Caps, Scaps/strips (Flat) (Applied Biosystems 社) を使用する。

##### 3.1.2.1.2. プレート情報の設定 (ABI PRISM™ 7700 及び ABI PRISM™ 5700)

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置と種類及び、プローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類 (「STND」: 検量線用標準プラスミド DNA 溶液\*1、「NTC」: ブランク試料液、「UNKN」: DNA 試料液) の設定を行う。この際、同

一の溶液が分注された 3 ウェルを Replicate として指定する\*<sup>2</sup>。またプローブ特性に関しては、「STND」、「NTC」、「UNKN」のそれぞれについて Reporter が「FAM」、Reference が「ROX」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する。

**\*<sup>1</sup> 検量線用標準プラスミド DNA 溶液の設定**

検体の種類の設定に加えて、コピー数を設定する。同一の検量線用標準プラスミド DNA 溶液を分注したウェルを選択した状態で、Quantity 欄にコピー数を入力する。

**\*<sup>2</sup> Replicate としての指定**

同一の溶液を分注したウェルに付けた名称 (name 欄に入力) と同一の名称を、replicate 欄に入力する。

**3.1.2.1.3. PCR (ABI PRISM™ 7700 及び ABI PRISM™ 5700)**

装置にプレートセットし、装置の蓋の温度 (Cover temperature) が 105℃付近になったことを確認した後、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50℃、2 分間の条件で保持した後、95℃で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95℃ 30 秒、59℃ 1 分を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行う。Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

**試験 2 (real-time PCR 機器の不確かさ推定)**

試験 2 では、real-time PCR に供する 1 枚のプレートの全面を用いて 1 濃度の検量線用標準プラスミド DNA 溶液 (1.5 k 相当) を測定します。本試験では、プレート上の well の位置や real-time PCR の保守管理状態の差によって、得られる計測値のばらつきが大きさがどの程度であるかを明らかにすることを目的としています。従いまして、できる限り手技による人的誤差を含めないように注意して測定していただければと思います。そのための手順として、試薬の一括調製と液量の精度が管理されている 8 連のマルチチャネルピペッターを用いた分注操作を規定させていただいております。

また、本マルチチャネルピペッターにより分取される液量の精度が管理されていることを前提とします。このような 8 連ピペッターの持ち合わせがない場合には、通常のシングルチャネルのピペッターで実行してください。その場合、試薬調製手順として規定されているマルチチャネルピペッター用リザーバーに混合溶液を移す操作を行わず、直接 50 mL チューブ (等) から繰り返し分注してください。また、分注操作に時間を要することが想像されますので、分注前の混合溶液とプレートは氷上に静置した上で操作を行ってください。



## 試験手順

### III-1-2-1 PCR用反応液の調製とプレートへの分注 (ABI PRISM 7700)

PCR用反応液は25  $\mu\text{L}/\text{well}$ として調製する。その組成は以下のとおりである。Universal PCR Master Mix\*1 12.5  $\mu\text{L}$ 、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25  $\mu\text{M}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ 、対象プローブ溶液 (10  $\mu\text{M}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ 、水9  $\mu\text{L}$ 、検量線用標準プラスミドDNA溶液(1.5k)2.5  $\mu\text{L}$ 。試験は、プレート全面 96well 並行で行うものとし、PCR用反応液は96 well分を同時に調製する\*2。

実際の調製は、調製及びPCRで生じる人的誤差を減少させるため、以下の手順に従って行う。まず、あらかじめUniversal PCR Master Mix(UMM)に対象プライマー対、対象プローブを加えた溶液(マスターミックス)を調製する。この際、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液(P.P mix)\*3を先に調製しておき、これとUMMを1:1.25の比率で混合させる。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1プレートあたり、2673  $\mu\text{L}$ が適当である\*4。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し(約10秒間)、攪拌後には軽く遠心(スピンドアウン)する。次いで、マスターミックス2599  $\mu\text{L}$ を分取し、これに検量線用標準プラスミドDNA溶液(プラスミドセットの他に送付された1.5kの標準プラスミド)を289  $\mu\text{L}$ 加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後(約10秒間)、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液全量をマルチチャンネルピペット用リザーバーに移し、8連マイクロピペッターを用いて25  $\mu\text{L}/\text{well}$ として96wellプレート上の全wellに分注する。

プレート配置は図3(Page42)に従う。

#### \*1 Universal PCR Master Mix(UMM)

本試薬は粘性が高いため、操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意を要する。不十分な場合には、PCRがうまくいかない場合がある。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて5秒間程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

#### \*2 定量PCR用反応液の調製

冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。氷上で保存した試薬につき、同一のチップを用い連続分注すると、ピペット内の空気が冷却されるため、2回目以降、通常のピペット操作では正確に分注されないので注意する。ピペットの説明書に書かれた、低温試料を扱う場合の操作法(通常、ふきとめと呼ばれる操作)を

理解して使用すること。

#### \*3 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液(P.P mix)の調製

対象プライマー対濃度が  $1.25 \mu\text{M}$ 、対象プローブ濃度が  $0.5 \mu\text{M}$  となるよう水で希釈し、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合することで調製する。また、本混合液は凍結保存が可能であるが、凍結融解を繰り返すことは避ける。本試験においては以下の通り調製することとする。

2 mL 容微量遠沈管に、対象プライマー溶液 ( $25 \mu\text{M}$ ) のそれぞれを  $65 \mu\text{L}$ 、対象プローブ溶液 ( $10 \mu\text{M}$ ) を  $65 \mu\text{L}$  分注し、ここに水  $1105 \mu\text{L}$  を加えてボルテックスミキサーを用いて十分に混合する (10 秒間ほど)。

#### \*4 マスターミックスの調製

本試験においては以下の通り調製することとする。P.P mix  $1188 \mu\text{L}$  と UMM  $1485 \mu\text{L}$  を 50 mL 容 (あるいは適切な容量の) ポリプロピレン製遠沈管に分取し、混合する。調製されたマスターミックスのうち、 $2599 \mu\text{L}$  を新たな 50 mL 容 (あるいは適切な容量の) ポリプロピレン性遠沈管に分取し、これに検量線用標準プラスミド DNA 溶液を  $289 \mu\text{L}$  加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後 (約 10 秒間)、軽く遠心する。

混合溶液は、1 プレート分を一括調製してください。

#### III-1-2-2 PCR 用反応プレートのシーリングおよび real-time PCR 機器の設定と測定 (ABI PRISM 7700)

PCR 用プレートのシーリングおよび real-time PCR 機器の設定と測定条件は、通知法による。本プロトコル III-1-1-2 (Page 8~9) を参照のこと。また、well の特性設定においてすべての well を unknown とする。

# ABI PRISM 7900HT 96 well

## III-2 ABI PRISM 7900HT (96 well)

### 試験1 (検量線に伴う不確かさの推定)

試験1では、real-time PCR に供する1枚のプレートに、通知法で規定されている検量線を決められた配置で都合5本作成します。本試験の手順は基本的に通知法を遵守していますが、機関間で不統一となることを避けるための変更が加えられています。注釈も含めてよく確認していただき、その上で試験をおこなってください。

注釈にもありますが、手順は1本の検量線を作成することを基本として記載されています。これを5併行することにより5本の検量線を作成してください。(試薬は一括して調製せず、1本の検量線を作成するための操作を5回繰り返してください。全操作を完了するまでには時間を要するかと思いますので、プレートに分注する前の混合溶液、分注したプレート等は氷上に静置してください。)

## 試験手順

### III-2-1-1 PCR用反応液の調製とプレートへの分注 (ABI PRISM 7900HT 96 well)

PCR用反応液は25  $\mu\text{L}/\text{well}$  として調製する。その組成は以下のとおりである。Universal PCR Master Mix<sup>\*1</sup> 12.5  $\mu\text{L}$ 、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25  $\mu\text{M}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ 、対象プローブ溶液 (10  $\mu\text{M}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ 、水 9  $\mu\text{L}$ 、検量線用標準プラスミドDNA溶液 2.5  $\mu\text{L}$ 、或いは 5 ng /  $\mu\text{L}$  ColE1/TE 溶液 (ブランク試料液: NTC) 2.5  $\mu\text{L}$ 。試験は、1つのDNA溶液あたり3 well 並行で行うものとし、PCR用反応液は3 well 分を同時に調製する<sup>\*2</sup>。

実際の調製は、調製及びPCRで生じる人的誤差を減少させるため、以下の手順に従って行う。まず、あらかじめUniversal PCR Master Mix (UMM)に対象プライマー対、対象プローブを加えた溶液 (マスターミックス) を調製する。この際、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液 (P.P mix)<sup>\*3</sup> を先に調製しておき、これとUMMを1:1.25の比率で混合させる。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1 DNA 試料液 (3 well 分) あたり、81  $\mu\text{L}$  が適当である<sup>\*4</sup>。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し (約5秒間)、攪拌後には軽く遠心 (スピンドアウン) する。次いで、マスターミックスを必要数<sup>\*5</sup> の微量遠沈管 (1.5 mL 容) に 78.75  $\mu\text{L}$  ずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応するDNA溶液を 8.75  $\mu\text{L}$  加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後 (約5秒間)、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を 25  $\mu\text{L}/\text{well}$  として 96 well プレート上の well に分注する。

プレート配置は図1 (page 40) に従う。

#### \*1 Universal PCR Master Mix (UMM)

本試薬は粘性が高いため、操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意を要する。不十分な場合には、PCRがうまくいかない場合がある。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて5秒間程度混合した後、軽く手で降る等して溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

#### \*2 定量PCR用反応液の調製

冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。氷上で保存した試薬につき、同一のチップを用い連続分注すると、ピペット内の空気が冷却されるため、2回目以降、通常のピペット操作では正確に分注されないので注意する。ピペットの説明書に書かれた、低温試料を扱う場合の操作法（通常、ふきとめと呼ばれる操作）を理解して使用すること。

#### \*3 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液(P.P mix)の調製

対象プライマー対濃度が  $1.25 \mu\text{M}$ 、対象プローブ濃度が  $0.5 \mu\text{M}$  となるよう水で希釈し、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合することで調製する。また、本混合液は凍結保存が可能であるが、凍結融解を繰り返すことは避ける。本試験においては以下の通り調製することとする。

2 mL 容微量遠沈管に、対象プライマー溶液 ( $25 \mu\text{M}$ ) のそれぞれを  $60 \mu\text{L}$ 、対象プローブ溶液 ( $10 \mu\text{M}$ ) を  $60 \mu\text{L}$  分注し、ここに水  $1020 \mu\text{L}$  を加えてボルテックスミキサーを用いて十分に混合する (10 秒間ほど)。

#### \*4 マスターミックスの調製

本試験においては以下の通り調製することとする。1つのDNA溶液あたり、P.P mix  $36 \mu\text{L}$  と UMM  $45 \mu\text{L}$  を混合する。1本の検量線作成のために規定されている検量点は、NTC も含めると6点であるため、P.P mix  $216 \mu\text{L}$  ( $36 \mu\text{L} \times 6$ ) と UMM  $270 \mu\text{L}$  ( $45 \mu\text{L} \times 6$ ) を混合し、 $486 \mu\text{L}$  のマスターミックスを一括して調製し、その後DNA溶液数にあわせて分注する。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に混合する (10 秒間ほど)。

なお、ここに記載されたマスターミックスは検量線1本あたりの調製法となります。(本試験に必要な5本の検量線を作成するためには、試薬は一括して調製せず、上記の1本の検量線を作成するのに要する操作を独立して5回繰り返してください。)

#### \*5 分注必要数

上記の通り1本の検量線作成のために規定されている検量点の数。具体的には以下のとおり。検量線用標準プラスミドDNA溶液 (5点)、並びにNTC (1点)、この計6点。

### III-2-1-2 PCR用反応プレートのシーリングおよびreal-time PCR機器の設定と測定(ABI PRISM 7900HT 96 well)

PCR用プレートのシーリングおよびreal-time PCR機器の設定と測定条件は、通知法によ

る。以下、ABI PRISM 7900HT 96 well に関する通知法の該当箇所を抜粋して示します。また、反応終了後得られる SDS ファイルは解析せずそのままご報告ください。

下記の手順は通知法の抜粋となるため、Unknown を設定することが規定されていますが、本試験では未知試料の測定はありませんので、Standard と NTC の設定のみとなります。なお、Standard の各検量点コピー数は 20、150、1500、20000、250000 となります。

### 3.1.2.2.1. PCR 用反応液の調製 (ABI PRISM™ 7900HT 96well)

～～～前略～～～注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリーケーターを用いて行う\*5。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad\*6 を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

\*5 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリーケーター

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems 社) 及び ABI PRISM Optical Adhesive Cover (Applied Biosystems 社) を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

\*6 ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Applied Biosystems 社) を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、定量結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

### 3.1.2.2.3. プレート情報の設定 (ABI PRISM™ 7900HT 96well 及び 384well)

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置と種類及び、プローブ特性である。まず、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する\*1。設定した Detector を Set up タブに登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェルすべてを指定する。次に検体の配置と種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類 (「Standard」: 検量線用標準プラスミド DNA 溶液\*2、「NTC」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液) を Task 欄において指定する。この際、同一の溶液が分注された 3 ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。また Passive Reference を「ROX」と設定する。

\*1 Detector の設定

Detector は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくが良い。

#### \*2 検量線用標準プラスミド DNA 溶液の設定

検体の種類の設定に加えて、コピー数を設定する。同一の検量線用標準プラスミド DNA 溶液を分注したウェルを選択した状態で、Quantity 欄にコピー数を入力する(3.1.2.2.2. 項に記載したように、96 ウェルを使用する場合と、384 ウェルを使用する場合は、液量の違いから、コピー数が異なるため注意する。)

#### 3.1.2.2.4. PCR (ABI PRISM™ 7900HT 96well 及び 384well)

装置にプレートセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50℃、2 分間の条件で保持した後、95℃で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95℃ 30 秒、59℃ 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。なお、反応条件の設定において、9600 emulation モードのチェックを入れておく。また、96 ウェルと 384 ウェルでは反応液量が異なることから、それぞれにあった液量での設定を行う。Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

#### 試験 2 (real-time PCR 機器の不確かさ推定)

試験 2 では、real-time PCR に供する 1 枚のプレートの全面を用いて 1 濃度の検量線用標準プラスミド DNA 溶液(1.5 k 相当)を測定します。本試験では、プレート上の well の位置や real-time PCR の保守管理状態の差によって、得られる計測値のばらつきが大きさがどの程度であるかを明らかにすることを目的にしています。従いまして、できる限り手技による人的誤差を含めないように注意して測定していただければと思います。そのための手順として、試薬の一括調製と液量の精度が管理されている 8 連のマルチチャンネルピペッターを用いた分注操作を規定させていただいております。

また、本マルチチャンネルピペッターにより分取される液量の精度が管理されていることを前提とします。このような 8 連ピペッターの持ち合わせがない場合には、通常のシングルチャンネルのピペッターで実行してください。その場合、試薬調製手順として規定されているマルチチャンネルピペッター用リザーバーに混合溶液を移す操作を行わず、直接 50 mL チューブ(等)から繰り返し分注してください。また、分注操作に時間を要することが想像されますので、分注前の混合溶液とプレートは氷上に静置した上で操作を行ってください。

#### 試験手順

##### III-2-2-1 PCR 用反応液の調製とプレートへの分注 (7900HT 96 well)

PCR 用反応液は 25  $\mu$ L/well として調製する。その組成は以下のとおりである。Universal

PCR Master Mix\*<sup>1</sup> 12.5  $\mu$ L、対象プライマー対溶液（各プライマー、25  $\mu$ M）0.5  $\mu$ L、対象プローブ溶液（10  $\mu$ M）0.5  $\mu$ L、水 9  $\mu$ L、検量線用標準プラスミド DNA 溶液（1.5 k）2.5  $\mu$ L。試験は、プレート全面 96well 並行で行うものとし、PCR 用反応液は 96 well 分を同時に調製する\*<sup>2</sup>。

実際の調製は、調製及び PCR で生じる人的誤差を減少させるため、以下の手順に従って行う。まず、あらかじめ Universal PCR Master Mix (UMM) に対象プライマー対、対象プローブを加えた溶液（マスターミックス）を調製する。この際、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液 (P.P mix)\*<sup>3</sup> を先に調製しておき、これと UMM を 1 : 1.25 の比率で混合させる。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1 プレートあたり、2673  $\mu$ L が適当である\*<sup>4</sup>。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し（約 10 秒間）、攪拌後には軽く遠心（スピンドアウン）する。次いで、マスターミックス 2599  $\mu$ L を分取し、これに検量線用標準プラスミド DNA 溶液（プラスミドセットの他に送付された 1.5k の標準プラスミド）を 289  $\mu$ L 加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後（約 10 秒間）、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液全量をマルチチャンネルピペット用リザーバーに移し、8 連マイクロピペッターを用いて 25  $\mu$ L/well として 96 well プレート上の全 well に分注する。

プレート配置は図 3 (Page 42) に従う。

#### \*1 Universal PCR Master Mix (UMM)

本試薬は粘性が高いため、操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意を要する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて 5 秒間程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

#### \*2 定量 PCR 用反応液の調製

冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。氷上で保存した試薬につき、同一のチップを用い連続分注すると、ピペット内の空気が冷却されるため、2 回目以降、通常のピペット操作では正確に分注されないので注意する。ピペットの説明書に書かれた、低温試料を扱う場合の操作法（通常、ふきとめと呼ばれる操作）を理解して使用すること。

#### \*3 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液 (P.P mix) の調製

対象プライマー対濃度が 1.25  $\mu$ M、対象プローブ濃度が 0.5  $\mu$ M となるよう水で希釈し、



ボルテックスミキサーを用いて十分に混合することで調製する。また、本混合液は凍結保存が可能であるが、凍結融解を繰り返すことは避ける。本試験においては以下の通り調製することとする。

2 mL 容微量遠沈管に、対象プライマー溶液 (25  $\mu$ M) のそれぞれを 65  $\mu$ L、対象プローブ溶液 (10  $\mu$ M) を 65  $\mu$ L 分注し、ここに水 1105  $\mu$ L を加えてボルテックスミキサーを用いて十分に混合する (10 秒間ほど)。

#### \*4 マスターミックスの調製

本試験においては以下の通り調製することとする。P.P mix 1188  $\mu$ L と UMM 1485  $\mu$ L を 50 mL 容 (あるいは適切な容量の) ポリプロピレン製遠沈管に分取し、混合する。調製されたマスターミックスのうち、2599  $\mu$ L を新たな 50 mL 容 (あるいは適切な容量の) ポリプロピレン性遠沈管に分取し、これに検量線用標準プラスミド DNA 溶液を 289  $\mu$ L 加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後 (約 10 秒間)、軽く遠心する。

混合溶液は、1 プレート分を一括調製してください。

### III-2-2-2 PCR 用反応プレートのシーリングおよび real-time PCR 機器の設定と測定 (ABI PRISM 7900HT 96 well)

PCR 用プレートのシーリングおよび real-time PCR 機器の設定と測定条件は、通知法による。本プロトコル III-2-1-2 (Page 15~16) を参照のこと。また、well の特性設定においてすべての well を unknown とする。

ABI PRISM 7000

### III-3 ABI PRISM 7000

#### 試験 1 (検量線に伴う不確かさの推定)

試験 1 では、real-time PCR に供する 1 枚のプレートに、通知法で規定されている検量線を決められた配置で都合 5 本作成します。本試験の手順は基本的に通知法を遵守していますが、機関間で不統一となることを避けるための変更が加えられています。注釈も含めてよく確認していただき、その上で試験をおこなってください。

注釈にもありますが、手順は 1 本の検量線を作成することを基本として記載されています。これを 5 併行することにより 5 本の検量線を作成してください。(試薬は一括して調製せず、1 本の検量線を作成するための操作を 5 回繰り返してください。全操作を完了するまでには時間を要するかと思いますので、プレートに分注する前の混合溶液、分注したプレート等は氷上に静置してください。)

#### 試験手順

##### III-3-1-1 PCR 用反応液の調製とプレートへの分注 (ABI PRISM 7000)

PCR 用反応液は 25  $\mu$ L/well として調製する。その組成は以下のとおりである。Universal

PCR Master Mix\*<sup>1</sup> 12.5  $\mu$ L、対象プライマー対溶液（各プライマー、25  $\mu$ M）0.5  $\mu$ L、対象プローブ溶液（10  $\mu$ M）0.5  $\mu$ L、水 9  $\mu$ L、検量線用標準プラスミド DNA 溶液 2.5  $\mu$ L、  
或いは 5 ng /  $\mu$ L ColE1/TE 溶液（ブランク試料液：NTC）2.5  $\mu$ L。試験は、1つの DNA 溶液あたり 3 well 並行で行うものとし、PCR 用反応液は 3 well 分を同時に調製する\*<sup>2</sup>。

実際の調製は、調製及び PCR で生じる人的誤差を減少させるため、以下の手順に従って行う。まず、あらかじめ Universal PCR Master Mix (UMM) に対象プライマー対、対象プローブを加えた溶液（マスターミックス）を調製する。この際、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液 (P.P mix)\*<sup>3</sup> を先に調製しておき、これと UMM を 1 : 1.25 の比率で混合させる。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1 DNA 試料液（3 well 分）あたり、81  $\mu$ L が適当である\*<sup>4</sup>。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に攪拌し（約 5 秒間）、攪拌後には軽く遠心（スピンドウン）する。次いで、マスターミックスを必要数\*<sup>5</sup> の微量遠沈管（1.5 mL 容）に 78.75  $\mu$ L ずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応する DNA 溶液を 8.75  $\mu$ L 加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後（約 5 秒間）、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を 25  $\mu$ L/well として 96 well プレート上の well に分注する。

プレート配置は図 1 (page 40) に従う。

#### \*1 Universal PCR Master Mix (UMM)

本試薬は粘性が高いため、操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意を要する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて 5 秒間程度混合した後、軽く手で降る等して溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

#### \*2 定量 PCR 用反応液の調製

冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。氷上で保存した試薬につき、同一のチップを用い連続分注すると、ピペット内の空気が冷却されるため、2 回目以降、通常のピペット操作では正確に分注されないので注意する。ピペットの説明書に書かれた、低温試料を扱う場合の操作法（通常、ふきとめと呼ばれる操作）を理解して使用すること。

#### \*3 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液 (P.P mix) の調製

対象プライマー対濃度が 1.25  $\mu$ M、対象プローブ濃度が 0.5  $\mu$ M となるよう水で希釈し、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合することで調製する。また、本混合液は凍結保