

製品コード RR213A

食品・環境分析用

Takara

コメ判別用 PCR Kit II

説明書

v201611Da

本キットでは、4種のプライマー対によるマルチプレックス PCRを行います。
 コシヒカリ（コシヒカリ BL は除く）以外の他の主要品種^{注)}の場合、4種類のプライマー対による4種類の増幅産物（0.8、1.2、1.6、1.8 kb）のうち、少なくとも1種類は増幅産物が得られます。一方、コシヒカリ（コシヒカリ BL は除く）では、いずれの増幅産物も得られません。
 本キットを用いることで、特にコシヒカリ（コシヒカリ BL は除く）について、遺伝子レベルでの種別の管理や精米・米飯の選定が可能となります。

注) コシヒカリ以外の48品種（表1）につき、4種のプライマー対による4種の増幅産物のいずれかが得られることを確認しています。なお、表1に記載のない品種については、確認していません。
 一方、全国33都道府県のコシヒカリ原種（コシヒカリ BL は除く）について、4種の増幅産物がいずれも得られないことを確認しています。なお、コシヒカリ BL については前記コシヒカリと異なる結果を示す場合があります。

表1. コシヒカリ以外の48品種

1	ひとめぼれ	18	あきほ	35	黄金錦
2	ヒノヒカリ	19	ゆきまる	36	コガネマサリ
3	あきたこまち	20	むつかおり	37	レイホウ
4	きらら397	21	まなむすめ	38	ミネアサヒ
5	キヌヒカリ	22	かけはし	39	ふさおとめ
6	ほしのゆめ	23	キヨニシキ	40	かりの舞
7	はえぬき	24	どまんなか	41	どんとこい
8	むつほまれ	25	越路早生	42	アキニシキ
9	日本晴	26	ゆきの精	43	ながのほまれ
10	ササニシキ	27	ほほほの穂	44	フクヒカリ
11	つがるロマン	28	ゆめあかり	45	ゴロピカリ
12	ハナエチゼン	29	能登ひかり	46	初星
13	夢つくし	30	アキツホ	47	中生新千本
14	朝の光	31	アケボノ	48	森のくまさん
15	月の光	32	朝日		
16	あいちのかおり	33	ヤマホウシ		
17	祭り晴	34	ヤマヒカリ		

I. 内容 (100 反応分)

1. TaKaRa Taq™ (5 U/μl)	50 μl (250 U)
2. 10 × PCR Buffer (Mg ²⁺ free)	1 ml
3. MgCl ₂ (25 mM)	1 ml
4. dNTP Mixture (2.5 mM each)	800 μl
5. Primer Mixture	240 μl
6. Loading Buffer	700 μl
7. DNA Marker Solution	100 μl

II. 保存

– 20℃

III. キット以外に必要な試薬、機器（主なもの）

本キットを用いた判別には、さらに次のような試薬、機器が必要です。

【試薬】

1. アガロース
Agarose L03「TAKARA」(製品コード 5003/5003B)
PrimeGel™ Agarose LE 1-20K (製品コード 5800A) など
2. 電気泳動用 Buffer
Tris-Acetate-EDTA Buffer (TAE) 50x Powder, pH8.3 (製品コード T9131)
3. DNA マーカー
pHY Marker (製品コード 3404A/B)
φX174 *Hae* III digest (製品コード 3405A/B)
100 bp DNA Ladder (製品コード 3407A/B) など
4. DNA 染色剤
エチジウムブロマイド
5. DNA 抽出用試薬類*1

【機器】

1. PCR 装置*2
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (製品コード TP600)
2. 卓上遠心機
3. 電気泳動装置
Mupid-2plus (製品コード M-2P) など
4. UV トランスイルミネーター (波長 300 nm 前後のもの)
5. 電気泳動用ゲル撮影用装置

【その他】

各種チューブ、各種ピペットなど

* 1：PCRの結果は、サンプル DNA 量・純度に影響されます。

* 2：PCRの結果は、使用する PCR 装置により影響を受けます。

本キットは、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice により至適化されています。
他機種をご使用の場合、結果が異なる場合があります。

IV. 操作上の注意

1. PCR 装置の取扱いは各装置の取扱説明書に従ってください。
2. 反応液の調製から検出まで、次の 4 エリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します (X. 補足：エリア分けについてを参照)。コンタミネーション発生の原因となりますので、エリア 4 以外では増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。
 - エリア 1：PCR 反応液の調製、分注を行います。
 - エリア 2：検体の調製 (DNA 抽出等) を行います。
 - エリア 3：PCR 反応液へ鋳型 DNA の添加を行います。
 - エリア 4：電気泳動等で PCR 増幅産物の解析を行います。
3. 試薬汚染 (コンタミネーション) による誤った判定を防ぐために、使用するマイクロピペット用チップは 1 回毎に交換してください。
4. エチジウムブロマイドなど DNA 染色剤を扱う場合、および DNA 染色剤で染色したゲルを取り扱う場合は、必ず手袋を着用し、直接液が触れないようご注意ください。

V. コメゲノム DNA の調製例 (エリア 2 で実施)

V-1. CTAB 法による精米粉からの DNA 抽出 (0.4 g)

注意：精製スタートから手袋を着用し、検体のクロスコンタミネーションを起こさないようにしてください。すべての操作において、ボルテックスミキサーでの攪拌はしないでください。

1. コメ 20 粒をコーヒーミルで粉碎する。(数秒ずつ様子を見ながら数回行う。)
2. ロックつき 2.0 ml チューブ (エッペンドルフ社) に精米粉 0.4 g をとり、あらかじめ混合し 65°C に保温した 2 × CTAB*¹ 0.6 ml ・ 精製水 0.2 ml の混合液を加え混和する。
3. 65°C の湯浴中で 30 分間振とうする。(10 分おきに転倒混和)
4. CIA*² を 0.8 ml 加え、転倒混和する。
5. ローテーター (15 回転 / 分) で 15 分間混和する。
6. 遠心分離を行う (15,000 rpm、4°C、15 分間)。
7. 液が 3 層に分離後、最上層を新しいロックつき 2.0 ml チューブに速やかに移す。
8. 65°C の 10% CTAB*³ を上清に対し 1/10 量加える。
9. 等量の CIA を加え、転倒混和を行う。
10. ローテーター (15 回転 / 分) で 15 分間混和する。
11. 遠心分離を行う (15,000 rpm、4°C、15 分間)。
12. 上層を新しいロックつき 2.0 ml チューブに速やかに移す。
13. 65°C に加温した沈殿用 Buffer*⁴ をチューブ目盛り 2 ml まで加え (前操作で得られた上層の 3 ~ 4 倍量)、ゆっくり転倒混和する。
14. 4°C で 30 ~ 60 分間 (-20°C の場合 5 分、あるいは氷上で 10 分間程度) 放置する。
15. 遠心分離を行う (15,000 rpm、4°C、20 分間)。
16. 上清を除去し、1M NaCl/TE*⁵ を 200 μl 加え、沈殿物を溶解する。
17. 等量のイソプロピルアルコール 200 μl を重層し、ゆっくり転倒混和する。
18. ローテーター (15 回転 / 分) で 15 分間混和する。
19. 遠心分離を行う (15,000 rpm、4°C、15 分間)。
20. 上清を除去し、冷却 70% エタノール*⁶ を 50 μl 加え、洗浄する。
21. 遠心分離を行う (15,000 rpm、4°C、10 分間)。
22. 上清を除去し、エタノール臭が無くなるまで沈殿物を自然乾燥する。
23. TE*⁷ を 200 μl 加え、沈殿物を溶解する。(手で軽く叩く程度)
24. RNase A (10 mg/ml、QIAGEN 社など) を 1 μl 加え、55°C で 30 ~ 60 分間放置する。
25. 中性フェノール*⁸ を 200 μl 加え、転倒混和を行う。
26. ローテーター (15 回転 / 分) で 15 分間混和する。
27. 遠心分離を行う (15,000 rpm、4°C、15 分間)。
28. 上層を新しいロックつき 2.0 ml チューブに移す。
29. 等量の PCI*⁹ を加え、転倒混和を行う。
30. ローテーター (15 回転 / 分) で 15 分間混和する。
31. 遠心分離を行う (15,000 rpm、4°C、15 分間)。
32. 上層を新しいロックつき 2.0 ml チューブに移し、氷中に入れる。
33. 液量を量り、上清の 1/25 倍量 5M NaCl*¹⁰ を加え 2 ~ 2.5 倍量冷却エタノール*¹¹ を静かに重層し、ゆっくり転倒混和後、氷上に 30 分間静置する。
34. 遠心分離を行う (15,000 rpm、4°C、15 分間)。
35. 上清を除去し、冷却 70% エタノールを 50 μl 加え、洗浄する。
36. 遠心分離を行う (15,000 rpm、4°C、5 分間)。
37. 上清を除去し、エタノール臭がなくなるまで 30 分間、蓋を開けた状態で沈殿物を自然乾燥する。
38. 沈殿に 1/10 TE*¹² を 30 μl 加え、静置にて overnight で溶解後、静かにピペッティングを行い、均質化する。
39. 得られた溶液を 50 ~ 100 倍に希釈して、吸光度計にて 260 nm、および 280 nm における吸光度を測定する。(可能なら、220 nm ~ 320 nm の吸収スペクトルを測定する。)
40. 4°C で保存する。

41. OD₂₆₀ = 1 の場合を 50 μg/ml として、操作 39. で得られた測定値から DNA 濃度を計算する。なお、OD₂₆₀/OD₂₈₀ の値が 1.8 以上であれば、タンパク質はほぼ除かれていると考えられる。

<試薬調製>

* 1 : 2 × CTAB

┌	0.1 M Tris-HCl (pH8.0)
	20 mM EDTA (pH8.0)
	1.4 M NaCl
	2% Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)

調製法：4 g の CTAB を精製水 100 ml で加温しながら溶解

↓

1 M Tris-HCl (pH8.0)*¹³ を 20 ml 添加

0.5 M EDTA (pH8.0)*¹⁴ を 8 ml 添加

5 M NaCl*¹⁰ を 56 ml 添加

↓

精製水で 200 ml に fill up し、オートクレーブ後室温保存

* 2 : CIA クロロホルム／イソアミルアルコール (24/1, v/v)

調製法：クロロホルム 288 ml

イソアミルアルコール 12 ml

↓

よく混合 (遮光、4°C 保存)

* 3 : 10% CTAB

┌	0.7 M NaCl
	10% Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)

調製法：2 g の CTAB を精製水 15 ml で加温しながら溶解

5 M NaCl*¹⁰ を 2.8 ml 添加

↓

精製水で 20 ml に fill up し、オートクレーブ後室温保存

* 4 : 沈殿用 Buffer

┌	50 mM Tris-HCl (pH8.0)
	10 mM EDTA (pH8.0)
	1% Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)

調製法：1 g の CTAB を精製水 70 ml で加温しながら溶解

↓

1 M Tris-HCl (pH8.0)*¹³ を 5 ml 添加

0.5 M EDTA (pH8.0)*¹⁴ を 2 ml 添加

↓

精製水で 100 ml に fill up し、オートクレーブ後室温保存

* 5 : 1 M NaCl/TE

┌	10 mM Tris-HCl (pH8.0)
	1 mM EDTA (pH8.0)
	1 M NaCl

調製法：1 M Tris-HCl (pH8.0)*¹³ 1 ml

0.5 M EDTA (pH8.0)*¹⁴ 0.2 ml

5 M NaCl*¹⁰ 20 ml

↓

精製水で 100 ml に fill up し、オートクレーブ後室温保存

-
- * 6 : 冷却 70%エタノール
調製法：エタノール (99.5 V%、特級) 70 ml
↓
精製水にて 100 ml に fill up 後、- 20°Cフリーザー保存
- * 7 : TE

┌	10 mM Tris-HCl (pH8.0)	
	1 mM EDTA (pH8.0)	

調製法：1 M Tris-HCl (pH8.0)*13 10 ml
0.5 M EDTA (pH8.0)*14 2 ml
↓
精製水で 1,000 ml に fill up し、オートクレーブ後室温保存
- * 8 : 中性フェノール
調製法：市販フェノール (特級) を 65°Cで融解
↓
8-ヒドロキシキノリンを 0.05 ~ 0.1% (w/w) 程度の濃度になるよう添加後、等量の 1 M Tris-HCl (pH8.0)*13 を加え激しく混合。水層 (上層) を除去し、水層の pH が 7.5 以上になるまでこの操作を繰り返す。
↓
等量の 0.1 M Tris-HCl (pH8.0)*13 を加え混合。2,000 rpm、5 分間遠心後冷暗所に保存し、酸化して赤みを帯びたものは使用しない。
- * 9 : PCI フェノール / クロロホルム / イソアミルアルコール (25/24/1, v/v/v)
調製法：中性フェノール 50 ml
クロロホルム 48 ml
イソアミルアルコール 2 ml
↓
良く混合し、遮光、4°C保存 (水層が分離するまで静置)
- * 10 : 5 M NaCl
調製法：29.22 g の NaCl を精製水にて溶解後、100 ml に fill up し、オートクレーブ後室温保存
- * 11 : 冷却エタノール
調製法：エタノール (99.5 V%、特級) を - 20°Cフリーザーにて保存
- * 12 : 1/10 TE

┌	1 mM Tris-HCl (pH8.0)	
	0.1 mM EDTA (pH8.0)	

* 7 の TE を精製水にて 10 倍希釈する。
- * 13 : 1 M Tris-HCl (pH8.0)
調製法：121.14 g の Tris (hydroxymethyl) aminomethane を 500 ml の精製水にて溶解
↓
25°Cにおいて pH8.0 になるまで HCl を添加
↓
精製水で 1,000 ml に fill up し、オートクレーブ後室温保存

* 14 : 0.5 M EDTA (pH8.0)

調製法 : 372.2 g の Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate
を精製水 700 ml にて懸濁

↓

25°Cにおいて pH8.0 になるまで NaOH を添加

↓

1,000 ml に fill up し、オートクレーブ後室温保存

精米 20 粒からの DNA 調製にはコメ DNA 抽出キット (精米 20 粒スケール) (コメ判別用 PCR Kit 用) (製品コード 9103) もご使用いただけます。

V-2. コメ 1 粒からの DNA 調製方法 (酵素法)

注意 : すべての操作において、ボルテックスミキサーでの攪拌はしないでください。操作 3. における処理時間は種々の条件で異なってきますので、予備実験により処理時間の目安をつけておいてください。

1. 精米試料 1 粒を 1.5 ml 容量のプラスチックチューブに採り、精製水 50 μ l を加え、スタンドに立てて、室温で 1 時間浸漬する。
2. チューブの蓋に注射針 23 G \times 1 にて中心に一点穴を開ける。
3. 適当なラックにチューブを立て、電子レンジのあたためモードにて 6 ~ 12 分間加熱する。(まず 2 分 \times 2 回加熱し、その後軽く遠心して蓋に付着した水滴を一旦落とし更に 2 分加熱する。米粒に芯が残っていれば、さらに 2 分ずつ加熱を続ける。)
4. 抽出 Buffer*¹ を 300 μ l 加え、米飯をチップの先で細かく潰す。
5. 15 mg/ml となるよう精製水で溶解した耐熱性 α - アミラーゼ (*Bacillus licheniformis* 由来、Sigma 社製) 10 μ l を加え、80°C で 1 時間放置する。
6. 33 μ l の 2% SDS*²、および、20 μ l の Proteinase K (製品コード 9034 など) を加え 55°C で 1 時間放置する。
7. 遠心分離 (15,000 rpm、1 分間) を行う。
8. 沈殿物を吸い上げないように上清を新しいロック付き 2 ml チューブ (エッペンドルフ社製) に移し、2 ~ 2.5 倍量の冷却エタノール*³ を加えて手でゆっくり転倒混和し、氷上に 15 分間静置する。
9. 遠心分離 (15,000 rpm、4°C、15 分間) し、沈殿を 300 μ l の TE*⁴ で溶解する。
10. 1 μ l の RNase A (10 mg/ml, QIAGEN 社など) を加え、55°C で 1 時間放置する。
11. PCI*⁵ を 300 μ l 加え、ローテーター (15 回転 / 分) で 15 分間攪拌する。
12. 遠心分離 (15,000 rpm、4°C、15 分間) し、上清を新しいロック付き 2 ml チューブに移す。
13. 等量の PCI*⁵ を加え、ローテーター (15 回転 / 分) で 15 分間攪拌する。
14. 遠心分離 (15,000 rpm、4°C、15 分間) し、上層を新しいロック付き 2 ml チューブに移しすぐに氷に漬ける。
15. その後、上清に 2 ~ 2.5 倍の冷却エタノール*³ を加えて手でゆっくりと転倒混和し、氷上に 10 分間静置する。
16. 遠心分離 (15,000 rpm、4°C、15 分間) し、沈殿を 50 μ l の冷却 70% エタノール*⁶ で洗浄する。(このとき、沈殿を失わないように注意する。)
17. 遠心分離 (15,000 rpm、4°C、15 分間) を行う。
18. 上清を除去しエタノール臭がなくなるまで自然乾燥する。(このとき、沈殿を失わないように注意する。)
19. 沈殿に 1/10 TE*⁷ を 30 μ l 加え、静置にて overnight で溶解後、静かにピペティングを行い、均質化する。
20. 操作 19. で得られた溶液を 50 ~ 100 倍に希釈後、吸光度計にて 260 nm、および 280 nm における吸光度を測定する。(可能なら 220 nm ~ 320 nm の吸収スペクトルを測定する。)
21. 4°C で保存する。

22. OD₂₆₀ = 1 の場合を 50 μg/ml として、操作 20. で得られた測定値から DNA 濃度を計算する。なお、OD₂₆₀/OD₂₈₀ の値が 1.8 以上であれば、タンパク質はほぼ除かれていると考えられる。

※ 本方法は、炊飯米からでも DNA 抽出が可能です。炊飯米の場合は、試料検体 1 粒を 1.5 ml 容量のプラスチックチューブに採り、操作 4. から始めてください。

<試薬調製>

* 1 : 抽出 Buffer [100 mM Tris-HCl (pH8.0)
100 mM NaCl

調製法 : 1 M Tris-HCl (pH8.0) 10 ml
5 M NaCl 2 ml

↓
精製水で 100 ml に fill up し、オートクレーブ後室温保存

* 2 : 2% SDS (2% (W/V) Sodium Dodecyl Sulfate)

調製法 : Dodecyl sulfate sodium salt 2 g

↓
精製水にて溶解し、100 ml に fill up

↓
0.22 μm フィルターにて濾過滅菌後、室温保存

* 3 : 冷却エタノール V-1 項 * 11 参照

* 4 : TE V-1 項 * 7 参照

* 5 : PCI V-1 項 * 9 参照

* 6 : 冷却 70% エタノール V-1 項 * 6 参照

* 7 : 1/10 TE V-1 項 * 12 参照

未加熱の精米 1 粒からの DNA 調製には前記酵素法その他、コメ DNA 抽出キット (製品コード 9197) もご使用いただけます。

VI. PCR 反応

1. 以下の 2 × Master Mixture を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)
必要数 + α 分の 2 × Master Mixture をまとめて調製し、各反応チューブに 10 μl ずつ分注し、軽くふたをする。

[2 × Master Mixture (1 反応分)]

試薬	使用量
10 × PCR Buffer (Mg ²⁺ free)	2 μl
MgCl ₂ (25 mM)	2 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	2 μl
Primer Mixture	2.38 μl
TaKaRa Taq (5 U/μl)	0.15 μl*
滅菌精製水	1.47 μl*
Total	10 μl

* : 識別バンドが薄い場合、TaKaRa Taq (5 U/μl) を 0.2 μl に増やし、滅菌精製水を 1.42 μl にする。

2. DNA 溶液を添加する。(エリア 3 で実施)

10 μ l ずつ分注した 2 \times Master Mixture に DNA 溶液を添加後、最終反応液量を 20 μ l とし、しっかりふたをする。反応チューブを卓上遠心機で軽く遠心を行い、サーマルサイクラーにセットする。

試薬	使用量
2 \times Master Mixture	10 μ l
DNA 溶液	X μ l
滅菌精製水	
Total	20 μ l

用いる DNA 溶液量は、純度などによって異なります。V 項記載のプロトコールにより調製した DNA 溶液の場合、吸光度値を元に算出した DNA 量で約 100 ng \sim 400 ng 相当となる液量を目安にして用いてください。コメ DNA 抽出キット (製品コード 9197、9103) により調製した DNA 溶液の場合、吸光度値を元に算出した DNA 量で約 10 ng 相当となる液量を目安にして用いてください。

3. 以下の条件で反応を実施する。

[PCR 条件]	96 $^{\circ}$ C	2 分	} 35 サイクル
	94 $^{\circ}$ C	1 分	
	62 $^{\circ}$ C	1 分	
	72 $^{\circ}$ C	2 分	

※ 市販の加工米飯などから V-2. の酵素法で抽出精製した DNA を鋳型とする場合には、「62 $^{\circ}$ C、1 分」の工程を「58 \sim 60 $^{\circ}$ C、1 分」にすることで増幅 DNA バンドが明瞭に出現することがあります。

VII. アガロースゲル電気泳動 (エリア 4 で実施)

電気泳動用緩衝液には 1 \times TAE Buffer* を使用してください。

1. アガロースゲルを作製する場合は、2% (W/V) になるよう Agarose を電気泳動用緩衝液で溶解し、ゲルを作製する。(エチジウムブロマイド先染めの場合は、ゲルを加熱溶解後、50 \sim 60 $^{\circ}$ C に冷却した時点で最終濃度 0.5 μ g/ml になるようエチジウムブロマイド水溶液を加え、均一になるまで穏やかに攪拌する。)
2. ゲル調製に用いた緩衝液で満たした電気泳動槽に、アガロースゲルを設置する。
3. 各 PCR 反応液に 5 μ l の Loading Buffer を添加し、1 ウェル当たり 10 μ l 分の各 PCR 反応液を注入する。
4. 3 \sim 5 V/cm の定電圧をかけ、色素がウェルから 3 \sim 5 cm に移動するまで電気泳動を行う。

* : 1 \times TAE Buffer : 50 \times TAE Buffer を 50 倍希釈する。

[50 \times TAE Buffer 調製法]

Tris-Acetate-EDTA Buffer (TAE) 50x Powder, pH8.3 (製品コード T9131) を用いて調製する。

VIII. PCR 増幅産物の確認 (エリア 4 で実施)

1. 1 μ g/ml のエチジウムブロマイド水溶液によりゲルを染色する。(エチジウムブロマイドによる先染めの場合、本工程は不要。)
2. UV トランスイルミネーターにゲルをセットし、写真を撮影する。

IX. 判別

検体がコシヒカリ（コシヒカリ BL は除く）の場合、約 0.8 kb、約 1.2 kb、約 1.6 kb、約 1.8 kb の大きさの PCR 増幅物がいずれも得られません。しかし、鋳型 DNA が存在しない、或いは阻害物質等によって PCR 反応が進行しない場合にも、PCR 増幅物が得られないという結果になるため、コシヒカリと誤判定する恐れがあります。したがって、確実な判定結果を得るには、必ず下記のようなコントロール実験を行ってください。

<コントロール実験例（増幅物が得られなかった鋳型 DNA の検定）>

本キットに用いたものと等量の検体鋳型 DNA を、コメ判別用 PCR Kit I（製品コード RR211A）を用いて検査します。電気泳動の結果、コシヒカリのパターンを示せば、鋳型 DNA は存在し、検体 DNA サンプル中に PCR 反応も阻害されていないことが証明されます。

<コントロール実験例（キット内容物の検定）>

本キットで増幅物が得られる品種既知のサンプル（例：あきたこまち、きらら 397 など、表 1 参照）を Positive Control として、検体と同時に DNA 抽出処理を行い、本キットによる PCR で増幅産物が確認できれば、本キット内容物（酵素・バッファー類）は正常に働いていると判断できます。また、検体 DNA 溶解に用いた溶液を No Template Control として PCR を行い、No Template Control では本キットによる PCR で増幅物が検出されなければ PCR 反応液にコンタミネーションがないことが確認できます。電気泳動パターンは図 1 をご参照ください。

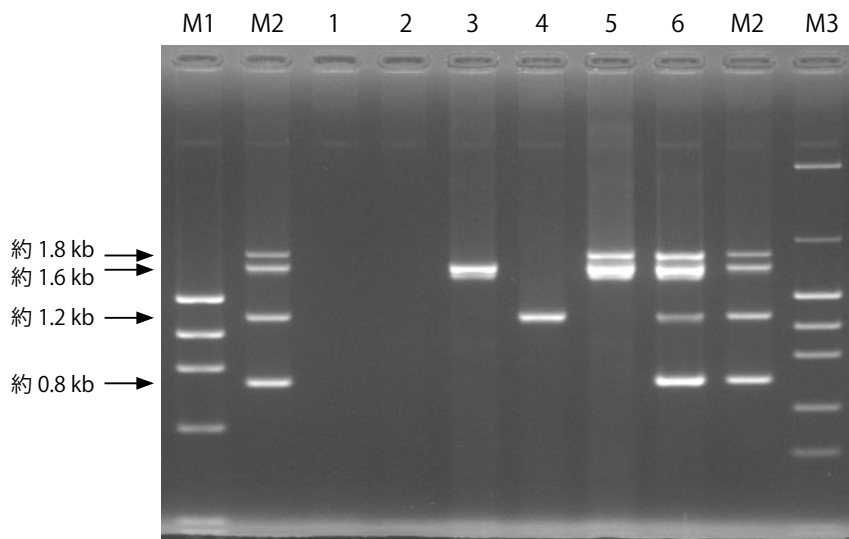


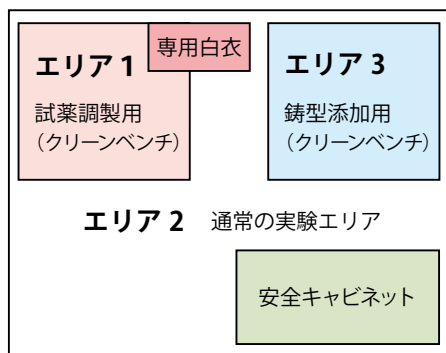
図 1. アガロースゲル電気泳動例（2% Agarose、1 × TAE Buffer）

- M1 : ϕ X174 *Hae* III digest (100 ng/lane)
- M2 : DNA Marker Solution (10 μ l/lane)
- M3 : pHY Marker (100 ng/lane)
- 1 : No Template Control (1/10 TE)
- 2 : コシヒカリ
- 3 : 米検体 A
- 4 : 米検体 B
- 5 : 米検体 C
- 6 : 米検体 D

※ DNA Marker Solution を構成する 4 つのフラグメント DNA が、本キットに使用した 4 種のプライマー対で得られる増幅物の大きさを表します。

※ 図 1 では、約 1.6 kb と約 1.8 kb の増幅物を分離するために、Loading Buffer の色素がウェルより約 5 cm 移動するまで泳動しています。

X. 補足：エリア分けについて



- エリア 1：反応試薬のみを扱うエリア
PCR 反応液の調製、分注を行う。
(鋳型となる DNA は一切持ち込まない)
- エリア 2：通常の実験エリア
検体の取扱いや DNA 調製を行う。
必要に応じて安全キャビネットを設置する。
- エリア 3：高濃度 DNA を扱うエリア
分注済みの反応液への鋳型 DNA の添加を行う。
- エリア 4：PCR 産物を取扱うエリア
PCR 後の増幅産物を電気泳動する場合は、エ
リア 1、2、3 とは異なる別室で行う。

XI. 関連製品

Agarose L03「TAKARA」(製品コード 5003/5003B)
PrimeGel™ Agarose LE 1-20K (製品コード 5800A)
Tris-Acetate-EDTA Buffer (TAE) 50x Powder, pH8.3 (製品コード T9131)
pHY Marker (製品コード 3404A/B)
 ϕ X174 *Hae* III digest (製品コード 3405A/B)
100 bp DNA Ladder (製品コード 3407A/B)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Gradient* (製品コード TP600)
Mupid-2plus (製品コード M-2P)
Proteinase K (製品コード 9034)
コメ DNA 抽出キット (精米 20 粒スケール) (コメ判別用 PCR Kit 用) (製品コード 9103)
コメ DNA 抽出キット (製品コード 9197)
コメ判別用 PCR Kit I (製品コード RR211A)

XII. 参考文献

米 PCR 品種判別におけるコシヒカリ用判別プライマーセットの開発
(大坪研一、中村澄子、今村太郎 日本農芸化学会誌 (2002) Vol.76, No.4, 388-397)

XIII. 注意

1. 検査結果判定により発生する問題に関して、タカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。
2. コメ品種判別を行う場合には、本キットによる検定結果とともに、他法による検定結果をあわせて、総合的に判断されることをお勧めします。
3. 本キットは、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所のライセンスを受けて（特許出願番号 特願 2002-240084）、タカラバイオ（株）が製造販売しています。
4. 本製品は食品分析および環境分析用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
5. タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
6. ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
7. Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。TaKaRa Taq、PrimeGel はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社