



2023 年 7 月吉日

修正日：2023 年 8 月 3 日

一般社団法人 日本バイオテクノロジー認証機構

PCR 技能試験事務局

## JBCO 技能試験 2023

### リアルタイム定量 PCR 技能試験 試験概要

JBCO（一般社団法人日本バイオテクノロジー認証機構）では、食品分析技能試験に加え、新たにリアルタイム定量 PCR 技能試験を開始することとなりました。初年度の今年は、パイロット試験として先着 50 名様に限定して実施いたします。

下記に試験概要を記載いたします。皆さまのご参加を心よりお待ちしております。

－ 記 －

#### 1. 試験項目

リアルタイムPCR法による試料のターゲット配列コピー数濃度 (copies/ $\mu$ L) 測定

#### 2. 送付する技能試験キットの内容

- |   |               |
|---|---------------|
| ① 検量線調製用DNA溶液（ターゲット配列コピー濃度：1000K copies/ $\mu$ L） | ： 30 $\mu$ L  |
| ② 検量線調製用希釈液（ColE1/TE）                             | ： 500 $\mu$ L |
| ③ 測定試料  | ： 20 $\mu$ L  |
| ④ プライマーミックス                                       |               |

選択された方法に応じて以下いずれかを配付します。

<プローブ法選択の場合>

- |  |              |
|--|--------------|
| ④-P ×10プライマー・5'-FAM/3'-TAMRA標識プローブミックス | ： 75 $\mu$ L |
|--|--------------|

<インターカレータ法選択時>

- |                  |              |
|------------------|--------------|
| ④-I ×10プライマーミックス | ： 75 $\mu$ L |
|------------------|--------------|

#### 【注意事項】

- ・プローブ法用およびインターカレータ法用の二種類のキットがあります。参加申込時の選択に基づいてキットが送付されます。
- ・各試薬は10%程度多めに入っています。

### 3. 試験の実施手順

通常使用している酵素マスターミックス、ピペット、プラスチック製品、リアルタイムPCR機器などを用いて、プローブ法もしくはインターカレータ法によるリアルタイムPCR法で試験を実施してください。

#### 【注意事項】

- ・キットは試験実施まで冷凍保管し、試験時に溶解、スピンドウンしたあとに、速やかに試験を実施してください。
- ・キットの試薬の追加配付は行いませんので、ご注意ください。  
配付キットの液量範囲ですべての測定ができるよう、試験方法を計画してください。
- ・測定試料のターゲット配列濃度は**100～100万 copies/ $\mu$ L**の範囲に入っています。  
この範囲の濃度が決定できるように「① 検量線調製用DNA」を段階希釈して検量線を調製してください。

注記 段階希釈方法、測定点は指定しません。

試薬量を考慮のうえ、自由に検量線を調製してください。

- ・検量線調製時の希釈は、必ずキット付属の「② 検量線調製用希釈液 (ColE1/TE)」を使用してください。
- ・「④-P プライマー・プローブミックス」あるいは「④-I プライマーミックス」は10倍濃度溶液になっています。測定時には反応液量の1/10量を添加してください。
- ・プローブ法用の「④-P プライマー・プローブミックス」中のプローブは5'-FAM/3'-TAMRA標識です。PCR機器の検出波長設定を間違えないようにしてください。
- ・反応液量、試験併行回数は指定しません。  
配付したキットの液量の範囲ですべての測定を行ってください。
- ・PCRサイクル条件は、使用するリアルタイムPCR試薬や測定機器の説明書に従い、以下の推奨条件を参考に設定してください。
  - プローブ法、インターカレータ法ともに2-stepの40サイクルを推奨。
  - 熱変性ステップは使用試薬の特性を考慮し、温度、時間の設定を推奨。
  - Annealing-Extension 温度はプローブ法が60°C、インターカレータ法が64°Cを推奨。
  - Annealing-Extension 時間は増幅長（プローブ法が72 bp、インターカレータが76 bp）、使用試薬と測定機器の特性を考慮した設定を推奨。