

カネカ核酸クロマト [大麻草 DNA 検出キット]

注意

- 本キットの各種試薬は、本取扱説明書に記載する保存条件を厳守して保存ください。保存にあたってはコンタミネーションに注意してください。
- 本キットは保護具（保護手袋や保護メガネ、マスク等）を着用の上、ご使用ください。
- 本キットの仕様は予告なく変更になる場合があります。
- PCR 反応溶液の調製等に使用する器具や機器、試薬類については、各々の製造元・販売元が指定する使用方法に従ってください。
- 本キットで得られた結果の判断や利用については、お客様の責任のもと実施してください。結果の判断や利用によって生じた損害や損失について、当社は直接・間接を問わず一切の責任を負いません。
- 本取扱説明書に記載のない操作手順や各々の検体における検出結果の妥当性についてはお客様にて検証してください。

1. 本キット概要

本キットは、マルチプレックス PCR と核酸クロマト型テストストリップを用いて、大麻草由来の DNA を迅速・簡便に検出するキットです。

2. 原理・特長

本キットは核酸クロマト法を原理としております。ゲノム上に存在する緑色植物に共通の領域と、葉緑体ゲノム上に存在する大麻草に特異的な 2 領域を標的として核酸増幅を行います。その増幅産物をテストストリップに展開し、ラインの着色パターンから検体中に大麻草 DNA が含まれるか判定します。

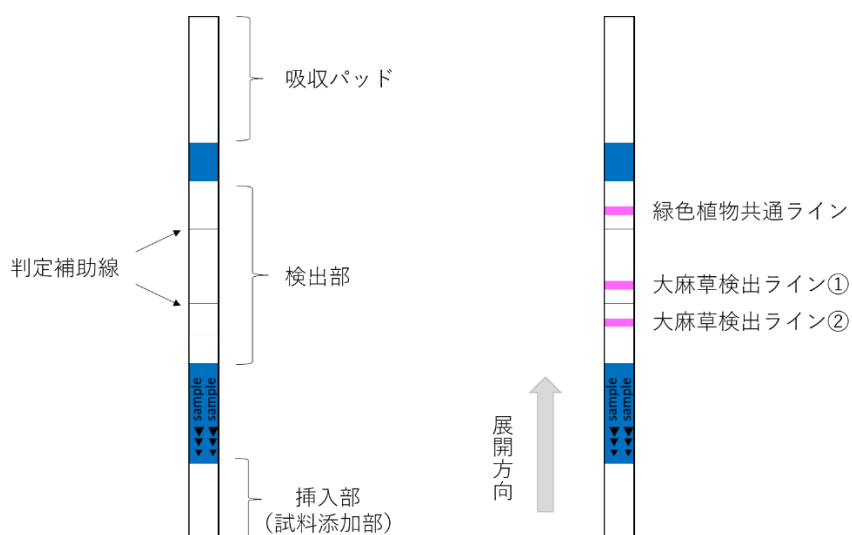
【本キットの特長】

- ・ 大麻草に特徴的な形態（剛毛等）を有さない試料（大麻樹脂、根等）から大麻陽性判定が可能
- ・ 結果判定に装置（ゲル撮像装置、リアルタイム PCR 装置等）が不要で、目視にて検出可能。
- ・ DNA 抽出から結果判定まで 3 時間以内で実施することが可能。

3. 本キット構成/保存条件

構成部材	容量 (20 テスト)	容量 (100 テスト)	保管温度
テストストリップ	20 本	100 本	室温
展開バッファー	3.2 mL	16 mL	
DNA 抽出試薬 Solution A	1 mL	5 mL	
DNA 抽出試薬 Solution B	20 mL	100 mL	
PCR ミックス	200 μ L	1,000 μ L	冷凍 (-20°C以下)
プライマーミックス	100 μ L	500 μ L	
陽性コントロール DNA	40 μ L	200 μ L	

テストストリップの各部の名称



【注意事項】

- ・ テストストリップは湿気を含む状態で長時間放置すると検出性能が低下する恐れがありますので、開封後は容器の蓋をしっかりと閉じて保管し、吸湿には十分ご注意ください。
- ・ 適切な結果が得られない恐れがあるため、異なるロットの部材を組み合わせでの使用や、本キット付属の試薬以外を使用して検査を行わないでください。

4. 使用期限

各内容物のラベルに記載しております。

5. 使用方法

5.1. 本キット以外に検査に必要な器具・機器等

- ・ マイクロピペット
- ・ マイクロピペット用チップ
- ・ サーマルサイクラー（推奨機器：LifeECO Thermal Cycler（Bioer Technology 社））
- ・ 1.5 mL チューブ
- ・ 0.2 mL チューブ（PCR 用）
- ・ 小型インキュベーター（1.5 mL 用、95°C以上の加熱が可能）
- ・ 低速遠心機

5.2. 試料

大麻草の各部位に加え、大麻草を含有する加工品が本キットの試料として使用できます。

適	<ul style="list-style-type: none">・ 大麻草の葉、花穂、茎、種子、根（乾燥、生の状態を問わず、幼若個体も可）・ 大麻樹脂・ 大麻オイル（植物片を含むもの）・ 大麻と他の植物の混合試料・ 含有成分検査後の抽出残渣（溶媒留去後に乾燥させて使用）
状態によっては適	<ul style="list-style-type: none">・ 燃焼残渣物・ 食品（大麻クッキー等）
不適	<ul style="list-style-type: none">・ 燃焼残渣物（灰化したもの）・ 大麻オイル（植物片を含まないもの）・ その他状態の悪い試料（腐敗物等）

5.3. 試料の秤量

本キットによる検査に適した試料量（概ね1~2mg）を1.5 mL チューブに秤量する。

- ・ 種子以外の部位：乾燥状態の試料の場合、1~2 mg を使用します。
（未乾燥状態の場合は、単位重量あたりの DNA 回収量が少なくなる傾向があります）
- ・ 種子：1 粒を粉碎して全量使用することを推奨します。
- ・ 大麻樹脂：PCR 阻害物質を含むため、出発量を 1mg 以下にすることを推奨します。
- ・ 大麻オイル：遠心分離を行い、上清を除去して得られた沈殿物のみを使用することを推奨します。

5.4. DNA 抽出

- 1) 小型インキュベーター（サーマルサイクラーでの代用可）を事前に 98°C に設定し加温しておく。
- 2) 秤量した試料が入った 1.5 mL チューブに、抽出試薬 Solution A を 50µL 添加する。
- 3) 試料が入った 1.5 mL チューブを 98°C で 8 分間加熱する。
- 4) 加熱終了後、室温下で 1.5 mL チューブに抽出試薬 Solution B を 1mL 添加し、混合する。
- 5) 上清を DNA 抽出液として使用する※。

※DNA 抽出液を 10 倍~50 倍程度希釈することで、結果が改善することがあります。

5.5. PCR 反応液の調製

- 1) PCR ミックスとプライマーミックスを予め解凍する。
- 2) マスターミックス調製用の 0.2 mL チューブに PCR ミックス※10 μ L とプライマーミックス※5 μ L の割合で、必要数 + 3 検体分を分注・混合し、マスターミックスを調製する。

※ PCR ミックスおよびプライマーミックスは、分注前にピペティングにて十分に混合してください。特に、PCR ミックスは解凍後に白沈を生じている場合、完全に溶解してご使用ください。

PCR ミックス	10 μ L
プライマーミックス	5 μ L

例) 5 検体の場合

必要数量 = 5 + 3 = 8 検体

PCR ミックス 80 μ L とプライマーミックス 40 μ L を混合しマスターミックスとする。

- 3) 新しい 0.2 mL チューブに、DNA 抽出液 5 μ L を添加する。
- 4) 陽性対照として、本キット付属の陽性コントロール DNA 5 μ L を添加した 0.2 mL チューブを準備する。
- 5) 陰性対照として、滅菌蒸留水または、ブランクに対して DNA 抽出を行った抽出液 5 μ L を添加した PCR チューブを準備する。
- 6) 各検体および陽性・陰性対照の 0.2 mL チューブに、マスターミックス 15 μ L を添加し、ピペティングにより混合する。
- 7) 調整後、酵素の失活や非特異的な増幅反応を防ぐため、氷上等においてください。

5.6. PCR 反応

- 1) サーマルサイクラーを起動し、0.2 mL チューブをセットした後、以下のプログラムで増幅反応を行う。

<PCR のプログラム>

温度 ($^{\circ}$ C)	時間 (秒)	サイクル
25	300	1
95	180	1
94	10	35
62	10	
72	40	
72	300	1
10	∞	1

5.7. テストストリップによる検出

- 1) 反応終了後の 0.2 mL チューブを取り出し、0.2 mL チューブの蓋を開け、展開バッファー160 μ L を添加する。
- 2) テストストリップの挿入部を 0.2 mL チューブに差し込む。
- 3) 10 分後、テストストリップのライン着色を確認する。

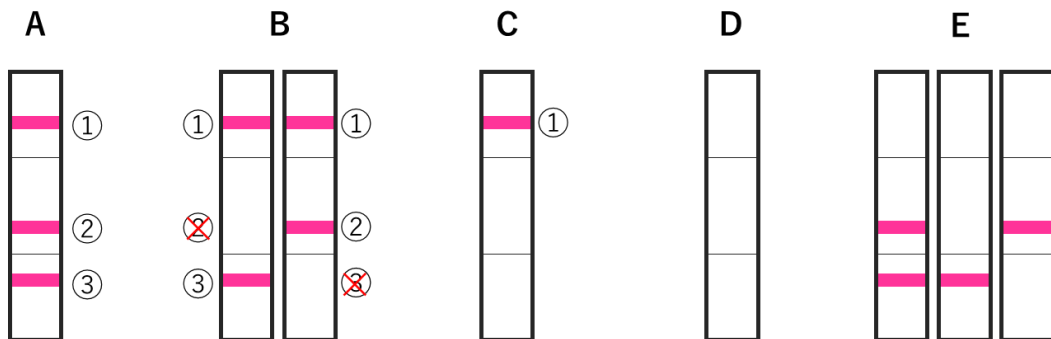
【注意事項】

- ・ 判定は挿入後 10 分時点でのライン着色で行ってください。
- ・ テストストリップを扱う際は、手袋等を着用し、必ず上部の吸収パッドを持つようにしてください。テストストリップの挿入部（試料添加部）や検出部には直接手を触れることが無いように十分ご注意ください。
- ・ テストストリップをチューブに挿入する際、試料添加部が 0.2 mL チューブの底に当たるまでしっかりと挿入ください。
- ・ テストストリップを挿入する際は、反応液の飛散による汚染に十分ご注意ください。

5.8. 結果判定

- 1) 下記の判定基準に従って結果判定を行う。

①：緑色植物共通ライン ②③：大麻草検出ライン



大麻	大麻の疑い	その他植物	植物DNAなし	異常
大麻陽性	大麻陰性			判定不可

パターン A：3 本の検出ライン（①～③）が全て着色

パターン B：緑色植物共通ライン（①）に加え、大麻検出ラインのどちらか一方のみが着色

パターン C：緑色植物共通ライン（①）のみが着色

パターン D：着色なし

パターン E：大麻検出ラインのみが着色し、緑色植物共通ラインが着色しない

【注意事項】

- ・ 陽性対照でパターン A（大麻陽性）を示さない場合は、試薬の劣化等が疑われますので結果は無効です。
- ・ 陰性対照でパターン D（植物 DNA なし）以外を示す場合は、コンタミネーションが疑われます。器具や実験台の除染を行い、再検査してください。
- ・ サンプルがパターン E（異常）を示した場合は、DNA 量の不足や不純物による PCR 増幅の阻害が疑われます。判定を行わず、検査をやり直してください。
- ・ 最終的な判定は、本キットの結果のみでは行わず、他の鑑定法の結果と併せて総合的に判断してください。

6. 本キット使用上の注意事項

<コンタミネーション対策>

- ・ コンタミネーションによる誤判定を防ぐため、使用した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。また、マイクロピペット用チップはフィルター付きのものを使用してください。
- ・ DNA 抽出、PCR 反応液の調製、テストストリップによる検出の各ステップは、別々の実験室で実施することを推奨しております。別々の実験室での実施が難しい場合、同一実験室内で作業台を分離する、または、作業エリアを分離してください。
- ・ 試薬や抽出 DNA 等チューブを開ける前に、低速遠心機等でスピンドウンを行ってください。（内容物の飛散や、蓋についた試薬等が手指に付着するのを避けるため）
- ・ マイクロピペット等、使用する器具・装置等は、定期的に 0.1%次亜塩素酸ナトリウムや市販の DNA 除去剤で清浄してください。
- ・ コンタミネーションが発生した場合は、0.55%次亜塩素酸ナトリウム（又は市販の DNA 除去剤）もしくは UV 照射等で除染を行ってください。

<廃棄上の注意>

- ・ 使用後のテストストリップならびに増幅反応液を廃棄する際は、検出部等に触れないように注意し、ビニール袋等に入れて廃棄ください。
- ・ DNA 抽出後の試料を廃棄する場合は、当該地域の廃棄物に関する規定、および、当該施設の規則に従い、衛生面、環境面に配慮し廃棄してください。

<その他>

- ・ 本キットは Bioer Technology 社 LifeECO Thermal Cycler において最適化されております。他機種をご利用の場合には、結果が不鮮明になる可能性があります。
- ・ 検査に使用する器具や装置は、メーカーのマニュアル等に従い点検を行い、正常に動作するものをご使用ください。

7. 参考文献

- 1) Tadashi Yamamuro *et. al*, Development of simple and accurate detection systems for Cannabis sativa using DNA chromatography, *Forensic Science International*, Volume 291, 2018, 68-75

【お問い合わせ】

株式会社カネカ Medical Devices Solutions Vehicle

事業統括グループ 新規事業チーム

〒676-8688 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8

TEL 079-445-2406 FAX 079-445-2756

お問い合わせ受付時間：平日 10:00～17:00

URL <http://www.kaneka-labtest.com>