



Technical Data

## PCRに対するPCR阻害剤EDTAの影響評価

評価製品

リアルタイムPCR装置 LightCycler®96 System  
(ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社, Cat.No. 05 815 916 001)

目的

PCRでのEDTAの阻害効果について検証する

評価方法

実験①: EDTAのPCR阻害効果測定  
実験②: TEを想定したEDTAの影響

### 概要

EDTAはPCRを阻害する効果を持つことが知られている。  
本テクニカルノートでは、その阻害効果がどのようなレベルでPCRに影響を与えるかを明らかにするために、実験を行った。  
その結果、普段の実験でPCR反応液に混入が想定されるEDTA濃度で、Cq値を有意に変化させることがわかった。

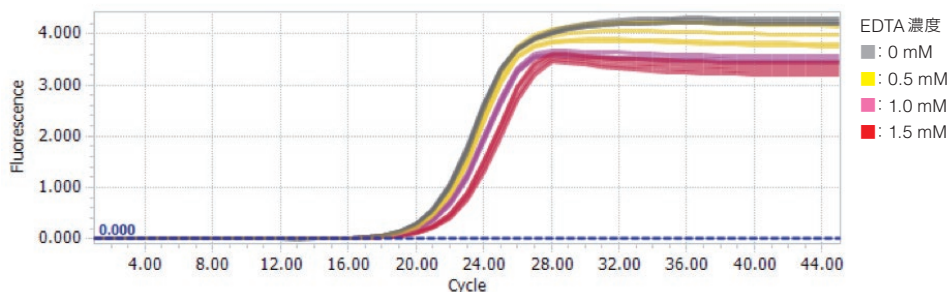
### 実験①: EDTAのPCR阻害効果測定

目的: 阻害効果がどのようなレベルでPCRに影響を与えるかを明らかにする。

方法: PCR溶液中のEDTA含有量を変化させ、Cq値の変化を調べた。

### 結果

#### 増幅曲線

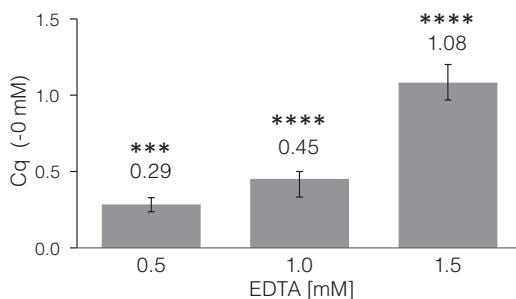


#### Cq値

EDTA[mM]	hgDNA 10.0 [ng]
0	Ave 19.63
	S.D. 0.04
	C.V. 0.002
0.5	Ave 19.92
	S.D. 0.05
	C.V. 0.002
1.0	Ave 20.08
	S.D. 0.12
	C.V. 0.006
1.5	Ave 20.71
	S.D. 0.11
	C.V. 0.006

(各 n=4)

#### 比較Cq値 (EDTA 0 mM)



有意差検定: 比0 mM  
Student T-test, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001

PCR溶液中に0.5 mM EDTAが含まれるとCq値で有意なPCR阻害効果が認められた。

## 実験②：TEを想定したEDTAの影響

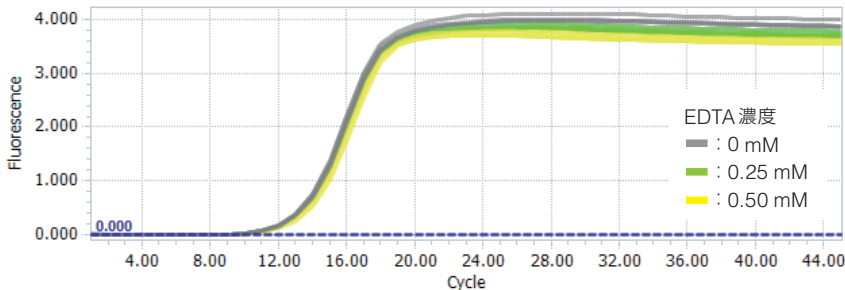
DNA保存に用いられる一般的な1×TE bufferには、EDTAが1 mM含まれる。このため、テンプレートDNAやPCRプライマーをTE bufferで保存し、これらをPCR反応に用いた場合、0.5 mM程度のEDTAがPCR反応液に含まれる可能性は十分に考えられる（<例>参照）。そこで、TE buffer使用を想定し、追試として0.5 mM、0.25 mMにおいて、EDTAによる阻害の影響を検証した。

<例>：反応液（1 well）

2x KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix	10.0 μL
10 μM Forward primer (1 mM EDTA 含有)	1.0 μL
10 μM Reverse primer (1 mM EDTA 含有)	1.0 μL
テンプレートDNA (1 mM EDTA 含有)	5.0 μL
PCR grade water	3.0 μL
Total	20.0 μL → EDTAの終濃度：0.35 mM

## 結果

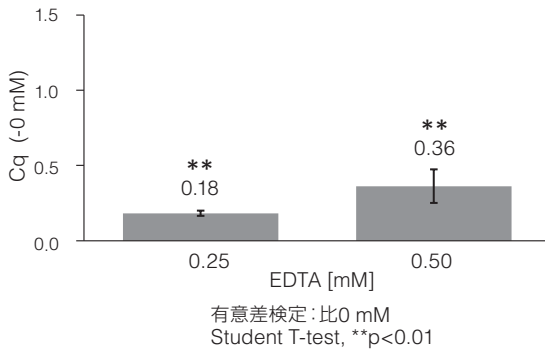
### 増幅曲線



希釈倍率	EDTA[mM]	T-test	
1	0	Ave. 12.23 S.D. 0.07 C.V. 0.006	
	0.25	Ave. 12.42 S.D. 0.02 C.V. 0.001	0.002 **
	0.50	Ave. 12.60 S.D. 0.11 C.V. 0.009	0.002 **

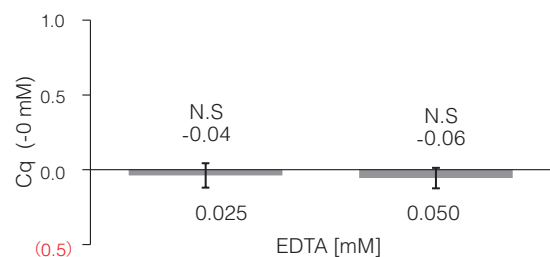
(各 n=4)

### 比較Cq値 (EDTA 0 mM)



有意差検定：比0 mM  
Student T-test, \*\*p<0.01

### 補足結果



0.05 mM程度では、Cq値に有意な差を生じなかった。

TE buffer使用を仮定したEDTA濃度でもCq値に有意な差を生じた。

## 結論

EDTAは、TE bufferの使用など、実験作業工程の中で想定される範囲内の持ち込み量で、PCR結果に影響を与えるPCR阻害剤であることを確認した。

## 実験条件等

## 実験①

- |                                   |              |   |
|-----------------------------------|--------------|---|
| • PCR反応液 (1 well)                 |              | • PCR cycle                                   |
| 2x KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix | 10.0 $\mu$ L | Preincubation 95°C, 600 sec                   |
| 10 $\mu$ M Forward primer         | 0.4 $\mu$ L  | ↓   |
| 10 $\mu$ M Reverse primer         | 0.4 $\mu$ L  | PCR (95°C, 3 sec→60°C, 20 sec) ×45 cycle      |
| Human genomic DNA                 | 5.0 $\mu$ L  | ↓   |
| EDTA solution                     | 2.0 $\mu$ L  | Melting 95°C, 10 sec→65°C, 60 sec→97°C, 1 sec |
| 終濃度 (mM)①0.0 ②0.5 ③1.0 ④1.5       |              |   |
| PCR grade water                   | 2.2 $\mu$ L  | • リアルタイムPCR装置                                 |
| Total                             | 20.0 $\mu$ L | LightCycler®96 System                         |
|                                   |              | (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社, Cat.No. 05 815 916 001) |
|                                   |              | • 実験回数 : 4                                    |

- 2x KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社, Cat.No. KK4601, Lot No. 0000103958)
- Human genomic DNA 10.0 [ng] (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社, Cat.No. 11691112001, Lot No. 10009523)
- 0.5 M EDTA (pH 8.0) (ニッポン・ジーン, Cat.No. 311-90075)
- PCR primer (Gene: ACTB)
  - Forward : TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA
  - Reverse : CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG

## 実験②

テンプレートDNA : PCR 増幅産物希釈溶液を使用  
その他実験条件 : 実験①に準じた。