

研究用

Takara
Cycleave ICAN™
キクवाई化病原因ウイルス
(CSVd) 検出キット

説明書

ウィロイドは、低分子の核酸 (RNA) 病原体であり、植物に寄生して、わい化・葉巻・奇形などの症状を引き起こすことが知られています。ウィロイドは、約 250 ～ 400 ヌクレオチドの一本鎖の環状 RNA だけからなり、構造タンパク質を欠き、独自のタンパク質情報もコードしていません。キクわい化ウィロイド (CSVd) はキクの重要病害の一つで、感染したキクは次第に生育が抑制され背丈が不揃いとなり、品種によっては葉の小型化や花の着色不良が発生します。

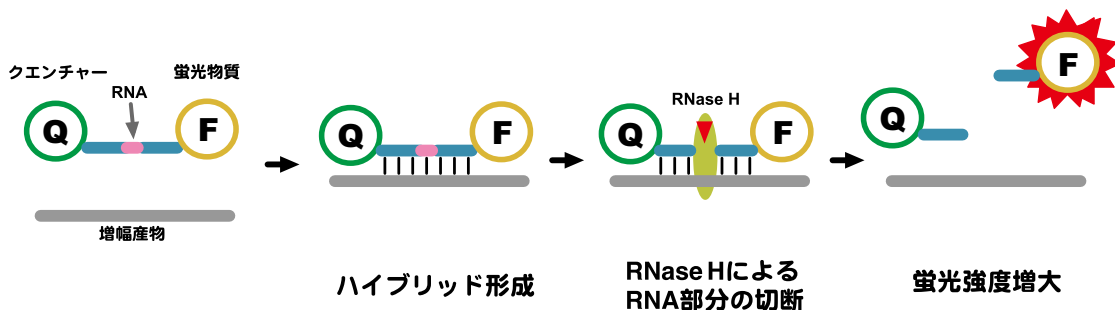
感染拡大を防止するためには原因ウィロイドの早期発見、感染株の除去が必要となります。本キットは、キクわい化病の病原体の本体であるウィロイド (環状 RNA) を、RT-Cycleave ICAN 法により簡便に検出するためのキットです。

Cycleave ICAN 法とは、検出特異性の非常に高いサイクリングプローブ法ならびに等温核酸増幅法である ICAN 法を用いた方法です。判定は反応後のチューブに UV を照射することにより、増幅されたキクわい化病ウィロイド (CSVd) の有無を蛍光で目視確認するだけです。目的産物が増幅された場合、反応液はピンク色を呈します。

【反応の原理】

1. サイクリングプローブ法

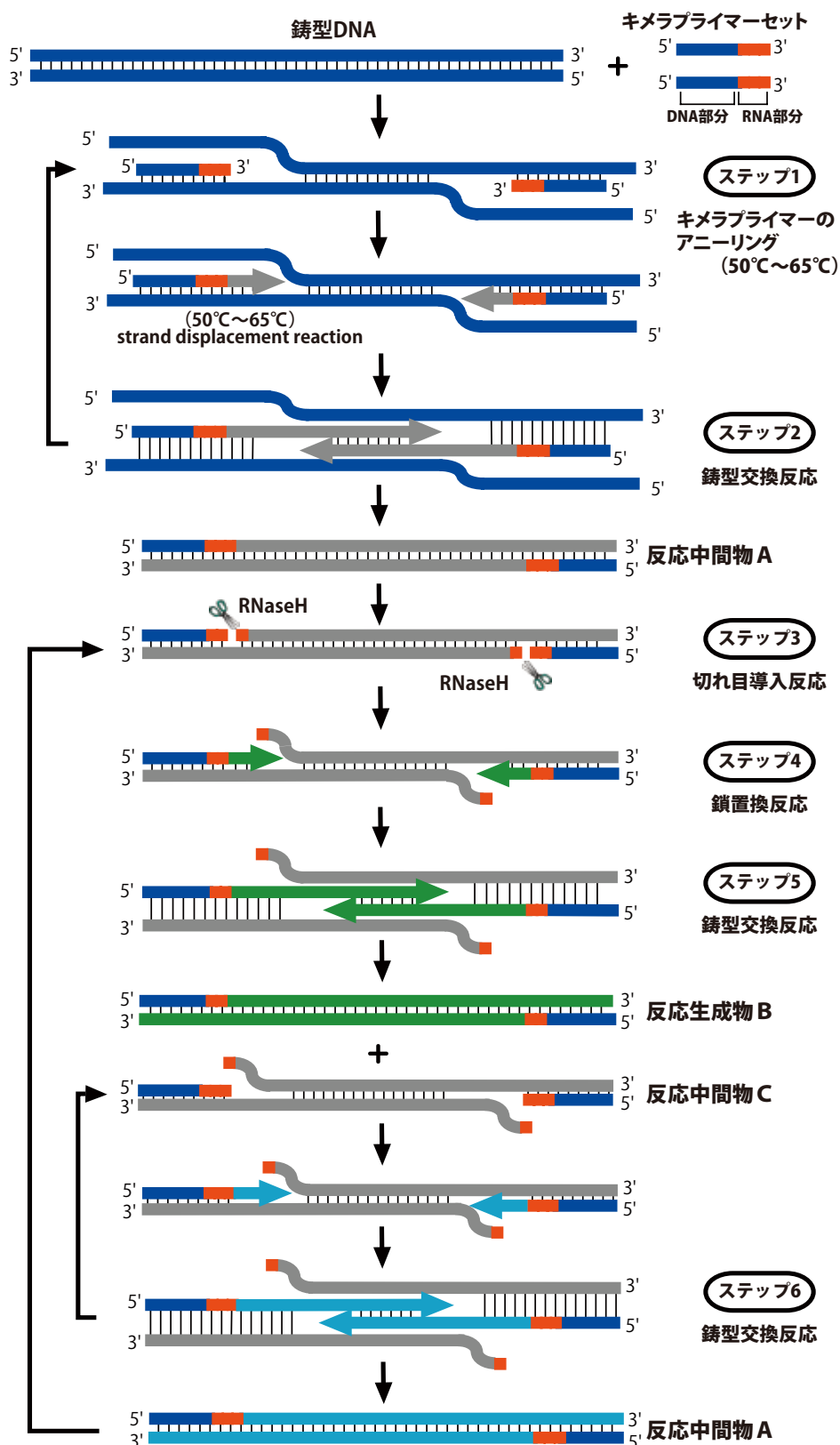
サイクリングプローブ法は、RNA と DNA からなるキメラプローブと RNase H の組み合わせによる高感度な検出法で、増幅中や増幅後の遺伝子断片の特定配列を効率良く検出することができます。プローブは RNA 部分を挟んで片方は蛍光物質で、もう一方はその蛍光物質の発する蛍光を消光する物質 (クエンチャー) で標識されています。このプローブは、インタクトな状態ではクエンチングにより蛍光を発することはありませんが、増幅産物中の相補的な配列とハイブリッドを形成した後に RNase H により RNA 部分で切断されることにより、強い蛍光を発するようになります。この蛍光強度を測定することで、増幅産物量をモニターすることができます。プローブの RNA 部分がミスマッチであれば RNase H により切断されることはないで、一塩基の違いも認識できる非常に特異性の高い検出方法です。



2. ICAN (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids) 法

- (1) RNA (3' 側) と DNA (5' 側) からなるキメラプライマー
- (2) 鎖置換型 DNA 合成酵素 (*BcaBEST*[™] DNA ポリメラーゼ)
- (3) DNA-RNA ハイブリッド部位を切断するリボヌクレアーゼ (RNase H)
- (4) 基質のデオキシヌクレオシドリン酸

を用い、DNA の任意の領域を、50 ～ 65℃ の一定温度で増幅する方法です。



I. 内容 (25 μ l 反応、100 反応分)

1. RT Reaction Mix	875 μ l
2. PrimeScript™ RTase (200 U/ μ l)	25 μ l
3. ICAN Enzyme Mix	750 μ l
4. CSVd Primer/Probe Mix*	750 μ l
5. Positive Control RNA	50 μ l
6. Dilution Buffer	1,000 μ l

*：遮光保存に留意する。

II. 保存

－20℃

1、3、4 は融解後 4℃ 保存可能 (少なくとも 6 ヶ月は安定です。)

III. キット以外に必要なもの (主なもの)

【器具】

1. マイクロピペット
2. マイクロピペット用チップ (疎水性フィルター付)
3. マイクロチューブ (0.2 ml、1.5 ml、2 ml など)
4. ベンチトップクーラー
5. ディスポーザブルグローブ (パウダーフリーがよい)
6. UV 防護用具類

【機器】

1. サーマルサイクラー、ヒートブロック等の保温器
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350) など
2. 卓上型遠心機 (室温でよい)
3. UV トランスイルミネーター (254 ～ 365 nm)

IV. 使用に際して

設計した Primer/Probe の配列内に遺伝子の変異や欠損／挿入が生じた際には、検出できない場合があります。

(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。)

V. 操作上の注意

1. 試薬の分注を行うときは、必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを防止してください。
2. 万一、サンプルやプローブ、プライマーが核酸分解酵素（ヌクレアーゼ）の混入により分解されると、正確な検出ができません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、作業過程ごとにディスポーザブルの手袋着脱およびマスク着用など、操作には細心の注意を払ってください。
3. 反応液の調製から検体サンプルの添加まで、次の3つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します（IX. 補足：エリア分けについてを参照）。どのエリアにおいても、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：反応液の調製、分注を行います。
 - エリア 2：検体の調製を行います。
 - エリア 3：反応液へ検体の添加を行います。

本キットでは、ICAN 反応終了後のチューブに直接 UV 照射を行って判定を行うため、ICAN 反応終了後の増幅産物を電気泳動などに使用する必要はありません。実験室内の核酸のコンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。

4. PCR 装置の取扱いは、それぞれの装置の取扱説明書に従ってください。

VI. サンプル RNA の調製（エリア 2 で実施）

VI-1. 簡易法

被検植物の葉または茎をつまようじ、虫ピン、注射針等で3回程度突き刺す。
（サンプルが付着した先端部分を、そのまま逆転写反応液に浸漬する。）

VI-2. RNA 抽出試薬を使用する方法

市販の RNA 抽出試薬または核酸抽出試薬を用いて、ウイロイド RNA を調製する。
調製した RNA を希釈する場合は、Dilution Buffer を用いる。

VII. 操作方法

以下の操作を氷上にて行う。

- 1) RT Reaction Mix に必要量の PrimeScript RTase (200 U/ μ l) を添加し、ピペッティングにて混合して RT 反応のマスターミックスを調製する。(エリア 1 で実施)

試薬	1 反応	x 反応 + α
RT reaction Mix	8.75 μ l	$8.75 \times (x + \alpha)$ μ l
PrimeScript RTase (200 U/ μ l)	0.25 μ l	$0.25 \times (x + \alpha)$ μ l

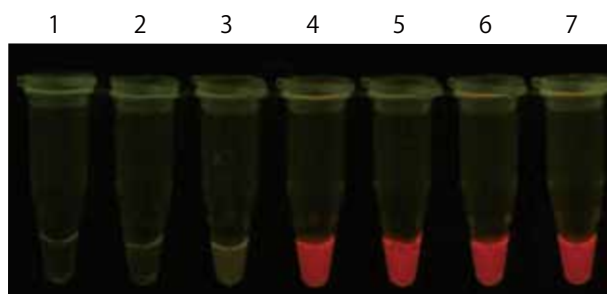
- 2) RT マスターミックスを 0.2 ml 反応チューブに 9 μ l ずつ分注する。
- 3) サンプル RNA または Positive Control RNA の 1 μ l を各チューブに添加し、45℃、10 分反応する。(RT 反応) (エリア 3 で実施)
- 4) CSVd Primer/Probe Mix に必要量の ICAN Enzyme Mix を添加し、ピペッティングにて混合して ICAN 反応のマスターミックスを調製する。(すぐに使用する場合は、チューブは遮光チューブでなくても良い。)(エリア 1 で実施)

試薬	1 反応	x 反応 + α
CSVd Primer/Probe Mix	7.5 μ l	$7.5 \times (x + \alpha)$ μ l
ICAN Enzyme Mix	7.5 μ l	$7.5 \times (x + \alpha)$ μ l

- 5) 3) の RT 反応液 10 μ l に 4) の ICAN 反応のマスターミックス 15 μ l を加え、55℃、60 分サーマルサイクラー等で反応を行う。(ICAN 反応) (エリア 3 で実施)
- 6) 反応終了後、直ちに反応チューブをトランスイルミネーター上で UV 照射し (254 nm ~ 365 nm)、ピンク蛍光を目視後写真撮影する。
- 【注意】蛍光を確認する際は、UV 防護用具 (めがね) を使用してください。

VIII. 反応例

非感染サンプル DNA とキクワイ化ウイルス (CSVd) 陽性サンプル RNA を Dilution Buffer で 10 倍ずつ段階希釈し、その 1 μ l を反応に供した。反応後 UV 照射し、写真撮影を行った。



1. Negative Control (滅菌精製水)
2. 非感染サンプル 10 倍希釈
3. 非感染サンプル原液
4. 陽性サンプル 10^3 倍希釈
5. 陽性サンプル 10^2 倍希釈
6. 陽性サンプル 10 倍希釈
7. 陽性サンプル原液

陽性サンプル (レーン 4、5、6、7)
レーン 3 はサンプルによる反応液の白濁によるもの

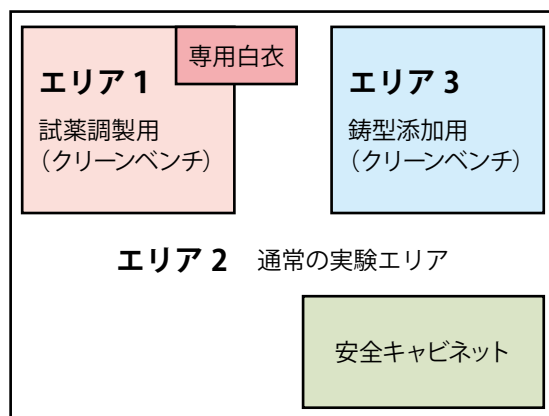
陽性の場合：反応液はピンク色の蛍光を発する。
陰性の場合：反応液は蛍光を発しない。

※白濁したサンプルを使用した場合、反応液が白濁することがありますが、蛍光での検出には影響ありません。

【反応における一般的な注意点】

ICAN 反応後のチューブは絶対に蓋を開けないでください。ICAN 産物は非常に反応性が高く、一旦、実験室に拡散すると、その後のすべての ICAN 反応が正確に判定できない場合があります。本キットは UV 照射により増幅の有無を確認できるため、反応後にチューブの蓋を開ける必要がありません。

IX. 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
リアルタイム 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。
標準サンプルの希釈もここで行う。

X. 参考文献

- 1) Hiroyuki Mukai, Takashi Uemori, Osamu Takeda, Eiji Kobayashi, Junko Yamamoto, Kazue Nishiwaki, Tatsuji Enoki, Hiroaki Sagawa, Kiyozo Asada, and Ikunoshin Kato : Highly Efficient Isothermal DNA Amplification System using Three Elements of 5'-DNA-RNA-3' Chimeric Primers, RNase H and Strand-displacing DNA Polymerase. *Journal of Biochemistry*. (2007) **142**(2): 273-281.
- 2) Takashi Uemori, Hiroyuki Mukai, Osamu Takeda, Mariko Moriyama, Yoshimi Sato, Shigekazu Hokazono, Nariaki Takatsu, Kiyozo Asada, and Ikunoshin Kato : Investigation of the Molecular Mechanism of ICAN, a Novel Gene Amplification Method. *Journal of Biochemistry*. (2007) **142**(2): 283-292.
- 3) Naoya Urasaki, Shinji Kawano, Hiroyuki Mukai, Takashi Uemori, Osamu Takeda and Teruo Sano : Rapid and sensitive detection of "Candidatus Liberibacter asiaticus" by cycleave isothermal and chimeric primer-initiated amplification of nucleic acids. *J Gen Plant Pathol*. (2008) **74**: 151-155.

XI. 関連製品

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (製品コード TP600)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Touch (製品コード TP350)
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap (製品コード NJ200)
0.2 ml Hi-8-Tube (製品コード NJ300)
0.2 ml Hi-8-Dome Cap (製品コード NJ301)
0.2 ml Hi-8-Flat Cap (製品コード NJ302)
Cycleave ICAN™ PSTVd/TCDVd 検出キット (製品コード CY113)

XII. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。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。
- ・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。
- ・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。
- ・Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。ICAN、PrimeScript、BcaBEST 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