製品コード CY415

研究用

TakaRa

ウシ白血病ウイルス検出用 Probe/Primer/Positive control

説明書

<製品コード CY224 をご利用いただいていたお客様へ>

本製品は CycleavePCR[™] ウシ白血病ウイルス (BLV) 検出キット (製品コード CY224) の後継品です。 酵素試薬には CycleavePCR Reaction Mix SP (製品コード CY510) が使用で きます。

なお、CY415 では PCR 反応条件が変わりましたので、ご注意ください。 [VI-4. リアルタイム PCR 用増幅装置による増幅および検出、判定]

v201904Da

ウシ白血病ウイルス (bovine leukemia virus; BLV) は、血液や乳汁の B リンパ球の DNA にプロウイル スとして組み込まれるレトロウイルスです。

本製品は、プロウイルスとして組み込まれたウシ白血病ウイルス (BLV)の tax 遺伝子をターゲットとし てリアルタイム PCR 装置を用いて検出するために必要な、Probe、Primer、Positive Control からなるキッ トです。リアルタイム PCR を行うためには、本製品の他に DNA polymerase や Tli RNase H 等の酵素が 必要ですので、これらの酵素と、これらの酵素に最適化されたバッファーが含まれたプレミックスタイ プ試薬 (CycleavePCR Reaction Mix SP:製品コード CY510)が使用できます。この製品では、PCR 反応 には Hot Start PCR 用酵素、TaKaRa Ex Taq® Hot Start Versionを使用していますので、反応液調製時など 増幅反応前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができます。 増幅産物の検出にはサイクリングプローブ法を採用しています。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 の組合わせによる高感度な検出方法で、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。プローブは片方の端が蛍光物質で、もう片方 の端が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、配列が相補的な増幅産物 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(図1参照)。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。

※本製品は国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所との共同研究および、 国立大学法人岩手大学村上賢二教授のご協力のもとにタカラバイオが製品化しました。



図 1. サイクリングプローブ法の原理

I. 内容 (25 μ Ι 反応 × 50 回分)

(

(1) Probe/Primer Mix for BLV $(5 \times) *1$	250 µl
(2) Positive Control $(2 \times 10^5 \text{ copies/} \mu \text{ I})^{*2}$	100 µl
(3) EASY Dilution (for Real Time PCR)	1 ml

- *1: 蛍光標識プローブを含んでいますので遮光に留意してください。
- *2:コンポーネント1に誤って混入すると正しい検出反応を行うことができなくなり ます。コンポーネント2、3は付属のキットケースに移し、別に保存してください。

【コンポーネントの説明】

Probe/Primer Mix for BLV :

ウシ白血病ウイルス (BLV)の tax 遺伝子を検出するためのプライマー・プローブの混合溶液です。プライマーを用いて tax 遺伝子 (ターゲット遺伝子)を増幅し、 増幅産物を蛍光標識プローブを用いて検出します。

Positive Control :

ウシ白血病ウイルス tax 遺伝子用陽性コントロールプラスミドです。コピー数は、 A260 の吸光度から換算した便宜上の指標です。

EASY Dilution (for Real Time PCR) :

検量線作成用のスタンダードを調製する際の鋳型 DNA の希釈溶液です。鋳型 DNA を滅菌水や TE で希釈すると、チューブへの吸着などにより正確な希釈ができない場合がありますが、本品を用いると低濃度までの正確な希釈が可能となります。また、本品は、キャリアーとして tRNA や rRNA などの核酸を使用していないので、それらの配列に起因する非特異的増幅の問題が生じることもありません。

II. 保存 – 20℃

Ⅲ. キット以外に必要な試薬、機器(主なもの)

【機器】

- リアルタイム PCR 装置および専用チューブ
 - Thermal Cycler Dice® Real Time System // (製品コード TP900/TP960)
 - Thermal Cycler Dice Real Time System Lite (製品コード TP700/TP760)

解析には食品環境検査用ソフトウェア(日本語表示)、または Thermal Cycler Dice Real Time System Software を用いてください。

Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System、StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) など

0.2 ml リアルタイム PCR 用チューブ

0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ600)

チューブ1本ごとにフラットキャップが付いているキャップ付き8連0.2 ml チューブをThermal Cycler Dice Real Time System 専用として販売しています。 チューブ間のコンタミの危険性が軽減できるので特にお勧めします。

【試薬】

CycleavePCR Reaction Mix SP (製品コード CY510)

- キットの内容
 - (1) $2 \times \text{CycleavePCR Reaction Mix SP}$ (2) RNase Free dH₂O (2) $625 \ \mu\text{I}$ (3) $625 \ \mu\text{I}$
 - (3) ROX Reference Dye 25μ I
 - (4) ROX Reference Dye II 25 μ I
- DNA 調製キット

全血から DNA を抽出する場合は、NucleoSpin Blood QuickPure (製品コード 740569.10/.50/.250) などをお勧めします。

【その他】

1.5 ml チューブ
 1,000 µl、200 µl、20 µl、10 µl 各マイクロピペット
 マイクロピペット用チップ(疎水性フィルター付)
 卓上遠心機、微量高速遠心機(4℃設定が可能なもの)

IV. 使用に際して

本キットは遺伝子検出であるため、不活化されたウイルスも検出されます。 また、設計したプライマー・プローブの配列内に遺伝子の変異や欠損/挿入が生じた際

よれ、設計したフライマー・フロークの配列内に度低于の変異や入損/ 挿入が主した際 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) リアルタイム 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) 万一、キメラプローブやプライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確 な検出が出来ません。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、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 (VII. 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。

サイクリングプローブ法では増幅反応と検出を同時にリアルタイムで行うため、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) サイクリングプローブ法ではリアルタイム PCR 装置での解析によって結果判定を 行います。リアルタイム PCR 装置の各種 Auto 機能が適正に働かなかった場合は誤 判定の原因になります。必要に応じてリアルタイム PCR 装置の取扱説明書に従い、 Manual 設定を行ってください。

4

VI. 操作

VI-1. 検体サンプルの調製 (エリア 2 で実施)

血液等より、市販の DNA 調製キットを使用して DNA (検体サンプル)を調製します。血液からの DNA 調製の場合は、NucleoSpin Blood QuickPure の使用を推奨します。

【NucleoSpin Blood QuickPure を用いた検体サンプルの調製方法】 NucleoSpin Blood QuickPure の取扱説明書に従って操作してください。

- (1) 200 µlの血液と 25 µlの Proteinase K 溶液*¹を 1.5 ml マイクロチューブに加える。 Buffer BQ1を 200 µl加えて激しくボルテックス (10~20秒)後、70℃で 15 分間、 インキュベートする。
- (2) エタノール (96~100%) を 200 µl 添加し、よく混合する。
- NucleoSpin Blood QuickPure Column を Collection Tube にセットする。(2)の溶液を カラムに添加し、11,000 × g、1分間遠心する。ろ液とコレクションチューブを捨てる。
- (4) NucleoSpin Blood QuickPure Column を新しい Collection Tube (2 ml) にセットする。 カラムに Buffer BQ2*2を 350 µl 添加し、11,000 × g で 3 分間遠心する。ろ液とコレクションチューブを捨てる。
- (5) NucleoSpin Blood QuickPure Column を 1.5 ml マイクロチューブにセットする。70℃ に温めた 50 µlの Buffer BE をシリカメンブレンの中央へ添加し、室温で1分間イン キュベートした後、11,000 × g で1分間遠心する。得られたろ液を検体サンプルと する。
- * 1:[Proteinase K (製品コード 740569.10 の場合)] Proteinase K (凍結乾燥品) 6 mg のチューブに Proteinase Buffer を 260 µ1加えて 溶解する。
- * 2:[Buffer BQ2] Wash Buffer BQ2 (concentrate) 3 ml あたり、12 ml のエタノール (96 ~ 100%) を 加える。

VI-2. 反応液の調製と反応開始

(1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。(エリア1で実施)

検体サンプル以外のコンポーネントを必要本数+α分調製し、各反応チューブに 20 μl ず つ分注して軽く蓋をする。必要本数は、サンプル数+2本 (Positive Control、ネガティ ブコントロールとして滅菌精製水を加えたもの)と設定する。

【Thermal Cycler Dice Real Time System の場合】

試薬	液量(1 反応)	最終濃度
$2 \times \text{CycleavePCR}$ Reaction Mix SP *1	12.5 µl	1 ×
Probe/Primer Mix for BLV $(5 \times)$	5 µl	1 ×
検体サンプル or Positive Control or 滅菌精製水	(5 µl) *2	
RNase Free dH ₂ O ^{*1}	2.5 µl	
Total	25 µl	

【Thermo Fisher Scientific 社製リアルタイム PCR 装置の場合】

	液量(1 反応)	最終濃度
2 × CycleavePCR Reaction Mix SP *1	12.5 µl	1 ×
Probe/Primer Mix for BLV $(5 \times)$	5 µl	1 ×
検体サンプル or Positive Control or 滅菌精製水	(5 μl) *2	
ROX Reference Dye or ROX Reference Dye II*1,3	0.5 µl	
RNase Free dH ₂ O ^{*1}	2 µI	
Total	25 µl	

* 1: CycleavePCR Reaction Mix SP (製品コード CY510) に含まれる。

- * 2:検体サンプル等の鋳型は、この段階では加えない。 添加する鋳型量は 100 ng 以下とする。
- * 3: StepOnePlus Real-Time PCR System には ROX Reference Dye を、7500 Fast Real-Time PCR System には ROX Reference Dye II を 1 反応あたり 0.5 µI を用いる。
- (2) ネガティブコントロールとして、滅菌精製水 5 µl を (1) で分注した反応液 1 本に添加し、 しっかり蓋をする。(エリア 3 へ移動)
- (3) 検体サンプル(鋳型) および Positive Control を添加する。(エリア 3 で実施) 検体サンプルや Positive Control を(1) で分注した反応液にそれぞれ添加し、しっかり蓋を する。
- (4) 反応チューブを卓上遠心機で軽く遠心して、リアルタイム PCR 装置にセットする。【注意】反応液調製後、すみやかに反応を開始する。

<使用上の注意>

検体サンプルの DNA 量が多すぎたり、不純物が含まれている場合、蛍光シグナルが反応 初期より徐々に上昇します。その結果、ベースラインによる補正が正しく行われず増幅 曲線の形がシグモイド型にならないため、正しい判定ができない場合があります。1本 の反応に使用する DNA 量は 100 ng 以下で行ってください。

もし増幅曲線の形がシグモイド型でない場合は、検体サンプルを希釈するか、または再 調製して再反応を行ってください。

VI-3. 検量線作成のための Positive Control 希釈系列の作製 (オプション)

コンポーネント (2) の Positive Control (2 × 10⁵ copies/ μ I) を (3) の EASY Dilution (for Real Time PCR) を用いて段階希釈します。作製した Positive Control の希釈系列を用いて VI-2. の 反応液調製と反応を行い、検量線を作成します。その際、Positive Control の希釈系列は、1 反応あたり 5 μ I 用います。

作成した検量線から反応に使用した検体サンプル中のコピー数(目安)を算出することができます。

【段階希釈系列の調製】(エリア3で実施)

- (1) Positive Control (2 × 10⁵ copies/µI) と EASY Dilution (for Real Time PCR) を融解し、 それぞれ均一に混和する。
- (2) 1.5 ml チューブを5本用意し、2×10⁴ copies/µl、2×10³ copies/µl、2×10² copies/µl、2×10¹ copies/µl、2×10⁰ copies/µlとラベルする。
- (3) それぞれの1.5 ml チューブに EASY Dilution (for Real Time PCR)を90µl ずつ分注する。
- (4) Positive Control (2 × 10⁵ copies/µl) より 10 µl を、2 × 10⁴ copies/µl とラベルし たチューブに加え、均一に混和する。
- (5) 2×10⁴ copies/µlより10µlを、2×10³ copies/µlとラベルしたチューブに加え、 均一に混和する。順次この操作を繰り返し、希釈系列とする。
- (6) 20℃にて保存する。

VI-4. リアルタイム PCR 装置による増幅および検出、判定

操作の手順は、それぞれのリアルタイム PCR 装置で異なります。詳しい操作方法は、それぞれの機器に添付されている説明書をご確認ください。

ここでは、Thermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ) および 7500 Fast Real-Time PCR System、StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) を使用した場合の簡単な操作方法について示します。

【Thermal Cycler Dice Real Time System の場合】

(1) ランファイルを新規作成し、"新規測定"ウィンドウにおいて解析タイプ≪絶対定量≫ を選択し、OK ボタンをクリックする。

新規測定		_ 🗆 X
解析タイプ	絶対定量	🗆 多波長検出
測定者名	<測定者の選択> ▼	編集
	OK キャンセル	J

- ※≪絶対定量≫は、食品環境検査用ソフトウェアに搭載された機能です。Thermal Cycler Dice Real Time System Software を ご 使 用 の 場 合 は、 < Absolute Quantification >を使用します。解析ソフトのバージョンアップが必要な場合は、 弊社ウェブサイトのお問い合わせ>ダウンロードサービスの「Thermal Cycler Dice Real Time System ソフトウェアバージョンアップのご案内」よりダウンロードし てください。
- (2)反応条件設定画面で、PCR条件および検出する蛍光フィルターの選択を画面左上の ≪検出フィルター≫で行う。本製品ではFAMを測定するので、FAMにチェックが入っ ていることを確認する。



初期変性 (Hold) Cycle:1 95℃ 10秒 2 step PCR Cycles:40 95℃ 5秒 64℃ 30秒(検出)

(3) 画面右下の反応開始ボタンをクリックして反応を開始する。



(4) サンプル設定画面でサンプル情報の設定を行う。

1005	6	7		9	10
NIC					en y
51D TAX 1.00E-001	EMICH Faile	9779755 サンプル名	(7.90.0 1 STD	-*	××
510 FAM 1.00E+002	FAM	5-Yota Dye FA		K91	×
STD FAM 1.00E+003	FAM	レカリカート マーク「い	ane I	aPlant	1×
STD FAM 1.00E+004	FAM	1.000	•001 (ANNE	_ ×
STD FAM 1.00E-005	UNICI FAM	F Omit			×

- ・サンプル名 :必要に応じてサンプル名などを入力する。
- ・サンプルタイプ :UNKN、STD、NTCから選択する。(必須)
- ・ターゲット設定 :"複数"をはずす。Dye を選択する。
- ・レプリケート設定:同じサンプルを2連(n = 2)以上で反応する場合は各々をレプ リケートとして設定する。(n = 2以上の設定では必須、n = 1 では任意)
- ・検量線設定 : サンプルタイプを STD としたウェルについて、鋳型量を設定 する。連続設定を使用すると入力が容易。
- ・Omit :反応に使用しないウェルは Omit 設定する。(必須)
- (5) 反応終了後、増幅曲線を確認する。ターゲット遺伝子(*tax* 遺伝子)陽性の場合、蛍光 シグナルの増大が認められる。
 - (オプション) 定量を行う場合、Positive Control を段階希釈して作製したスタンダード を用いた結果より検量線を作成する。



Positive Control を使用した増幅曲線、検量線の例

データ解析	テキストレポート
表示形式	ウェル 💌
表示項目	 □ 解析条件 ☑ CP法データ
詳細項目	■ SDM法データ
	2
■ サンプルタ	コ バブ
ロレプリケー	トマーク
🗌 レプリケー	1名
	レター
🗌 🗌 最終蛍光	í值(Raw)
🗌 🗌 最終蛍光	1值
☑ Ct(值(CP))
□ 平均Ct値	(CP)
□ Ct值SD(CP)
☑ Cté (SD	M)
□ 半均Ct值	(SDM)
	SDM)
■ 標準サン	フル濃度
定重半均	
正 定重103	
□ 定县平松	DDM/ N店/SDM)
	D(SDM)

<判定>

結果/解析画面において、"データ解析"を"テキ ストレポート"とし、詳細項目より必要な項目を選 択することでCt値などの情報を得ることができる。 このデータでCt値(CP)およびCt値(SDM)に数 値が得られている場合、ターゲット遺伝子陽性と判 断する。(Ct値(SDM)の数値は、サンプルにより 数値が得られない場合がある。そのような場合はCt 値(CP)の数値と増幅曲線より判断する。)サンプル と同時に反応を行った Positive Control でCt値に数 値の表示があり、ネガティブコントロールでCt値 に数値の表示なしであることを確認する。Positive Control およびネガティブコントロールで上記以外 の結果が得られた場合は、検出系に問題がある、ま たはコンタミネーションの疑いがあるので、再反応 を行う。

(オプション) 定量を行った場合は、検量線のデー タをもとにして、コピー数が表示される。

サンプルタ	検出	Ct 值	Ct 值	標準	定量値	定量値	
リノノル名	フィルター	(CP)	(SDM)	サンプル濃度	(CP)	(SDM)	
NTC	FAM	—	—	—	—	—]
std-10	FAM	37.16	37.88	1 × 10	1.12 × 10	8.83]]
std-10 ²	FAM	34.16	34.11	1×10^{2}	9.12 × 10	1.12×10^{2}	
std-10 ³	FAM	30.79	30.73	1×10^{3}	9.60 × 10 ²	1.10 × 10 ³	
std-10 ⁴	FAM	27.57	27.55	1×10^{4}	9.11 × 10 ³	9.37 × 10 ³	
std-10 ⁵	FAM	24.03	23.99	1 × 10 ⁵	1.08 × 10 ⁵	1.03 × 10 ⁵	
std-10 ⁶	FAM	20.8	20.7	1 × 10 ⁶	1.03 × 10 ⁶	9.51 × 10 ⁵	
Sample 1	FAM	26.31	26.28	—	2.20 × 10 ⁴	2.21 × 10 ⁴]
Sample 2	FAM	32.93	32.94	—	2.15 × 10 ²	2.47 × 10 ²	
Sample 3	FAM	—	_	—	—	—	サンプル
Sample 4	FAM	29.97	29.92	—	1.70 × 10 ³	1.90 × 10 ³]
Sample 5	FAM	—	—	—	—	—]

【7500 Fast Real-Time PCR System の場合】

(7500 Software for 7500 Fast Real-Time PCR System)

および

【StepOnePlus Real-Time PCR System の場合】

(StepOne Software for StepOne and StepOnePlus Real-Time PCR System)

増幅反応は以下の手順で行う。

(1) New Experiment もしくは Home で Advanced Set up を選択

7500 Software



StepOne Software



(2) SetupのタブのExperiment Propertiesを開く。Experiment nameにファイル名を入力し、 7500 Fast Real-Time PCR System の場合は「7500 Fast (96 Well)」、StepOnePlus の場 合は「StepOnePlus Instrument (96 wells)」、どちらも共通に「Quantitation Standard Curve」「Other」「Standard (~ 2 hours to complete a run)」を選択したものを作成する。

7500 Software



StepOne Software



(3) Setup のタブの Plate Setup の「Define Targets and Samples」にて Target name を記入し、Reporter を FAM、Quencher を None に設定する。その後「Assign Targets and Samples」にて Passive Reference を ROX に設定する。 また、サンプルのウェルの位置を選択する。

(以降、7500 Fast Real-Time PCR System、StepOnePlus 共通)

1 7500 Software v2 0 5 File - Edit Hillichert - Avanual	Tools Hele			
📄 NewEsperiment • 🥩 Open	. 🔒 Sara + 🗳 Close 🦽 Ersot	ArtRepot.		
Experiment Menu 40	Experiment: CY224DD 1200	101		Ту
Setup	Define Targets and Sample	s Assign Targets and Sampl	05	
Ergentammer Phases Bars	Bestractions: Defrei Tal Separa to Define Tangeta	(LAMIN and the surgices is less in the way	tun jinau	
The Set	Add New Target Acd Saved Targe	t Gave Target Deleta Target		
Con Noticed	TargetName	Reporter	Question	Cal
Concerns Salar	Nox	744	- None	
 A second s	1 Description	1.444		12 44



(4) Setupのタブの「Run Method」にて、反応条件を入力する。



Stage 1:初期変性 (Hold) Reps:1 95℃ 10 秒

Stage 2: 2step PCR Reps: 40 95℃ 5秒 64℃ 30秒(検出)

Sample Volume 25 μ l

- (5) Start run にて反応を行う。
- (6) 反応終了後、「Analysis」の「Amplification Plot」より右上の「Analyze」ボタンをクリックし、増幅曲線を確認する。ターゲット遺伝子(*tax* 遺伝子)陽性の場合、蛍光シグナルの増大が認められる。

この時、Threshold、Baseline を Auto 設定で解析すると、14 ページの図 (Auto での 補正)のように検体での増幅曲線の Baseline が適切に補正されず、正しく値を得られ ない場合がある。

この場合は、Amplification Plot 画面の下部にある Option から Auto での解析を外す。 Option でThreshold の Auto にチェックが入っていると Auto Baseline のチェックボッ クスがグレーアウトになっているため、まず Threshold の Auto のチェックを外す。 すると、Auto Baseline のチェックボックスにアクセス可能になるので、このチェッ クも外し、Analyze ボタンをクリックして再解析を行う。これによって Baseline が適 切に補正される。



Options Auto にチェックが入っている時、Auto Bas	eline はグレーアウトになる。
Target: BLV Threshold: Uto 0.333035	✓ Auto Baseline
Show: 📝 Threshold — 🥅 Baseline Start: Well 🔳 Target 🛆	Baseline End: Well 🔳 Target 🔺
· •	۱.

Auto チェックを外すと Auto Baseline のチェックボックスにアクセス出来るようになる。

Target: BLV Threshold: Auto 0.333035
Show: 📝 Threshold — 🔲 Baseline Start: Well 💶 Target 🔺 Baseline End: Well 🔳 Target 🔺
۲

Opt	tions Auto Baseline のチェックも外して Analyze ボタンをクリックする。
Tan	rget: BLV Threshold: Auto 0.333035
Sho	w. 📝 Threshold — 📄 Baseline Start: Well 🖬 Target 🔺 Baseline End: Well 🔳 Target 🔺
•	III.

Autoでの 補正

Options



サンプルのベースラインが適切に補正される

ĝ

前述の操作を行っても Baseline の補正が十分にできない場合は、各 well ごとにさら に以下の操作を行う。

Analysis Setting ボタンより出現する下図のウィンドウより、Advanced Setting タブ を選ぶ。



Baseline Setting for well で well を 選び、Baseline Setting to use □ Use Ct Setting for Target のチェックを外すことで、各 well ごとに個別にマニュアルで Baseline の補正 のための Start Cycle と End Cycle を設定することができる。

Daview of	aluais patterns for	the weat to this experi	ment To use different	allogs selecting up	alial from the table, desciont "Line Pre Californi Parised for the Transf "then
change the	settings that are	displayed.	index. TO USE developments	retarilys, seriect are w	ents nom bie save, desents, one of Settings connection are range, and
Select a Well	and Target				Baseline Settings for Well AS, BLV
Well	Target	Baseline	Baseline Start	Baseline End	Baseline Settings to Use: Use Cr Settings Defined for Target
A1	11 I				Automatic Baseline
A2				1	Baseline Start Cycle: 310 End Cycle: 1610
A3	n f				
A4	-			1	
NG	BLV	Manual	3	15	
BS	BLV	Manual	9	15	
C5	BLV	Manual	3	16	
E1	BLV	Manual	3	15	
62	BLV	Manual	3	16	
E3	BLV	Manual	3	15	
E4	BLV	Manual	3	15	
E6	BLV	Manual	3	16	
E6	BLV	Manual	3	15	
and a second	100.00		D.,		-

※ これらの操作を行っても Baseline が適切に補正されない場合は、SetUp タブ→ Plate SetUp の Define Targets で Quencher を TAMRA に変更して再解析を行ってください。

(オプション) 定量を行う場合、Positive Control を段階希釈して作製したスタンダードを 用いた結果より検量線を作成する。



Positive Control を使用した増幅曲線、検量線の例

K	\bigcap	iew Pl	ate Layout	View Well T	able					
>	Select Wells With: - Select Item - V - Select Item - V Show in Table V Group By V Exp									
										Expa
	#	Well	Sample Na	Target Name	Task 🔺	Ст	Ст Mean	Quantity	Quantity	Qu
	53	A5		BLV	NTC	Undetermi				
	54	C5		BLV	STANDARD	36.922	36.922	10		
	55	D5		BLV	STANDARD	33.054	33.054	100		
	56	E5		BLV	STANDARD	29.569	29.569	1,000		
	57	F5		BLV	STANDARD	26.313	26.313	10,000		
	- 58	G5		BLV	STANDARD	23.021	23.021	100,000		
	59	H5		BLV	STANDARD	19.590	19.59	1,000,000		
	60	A6	Sample 1	BLV	UNKNOWN	Undetermi				
	61	C6	Sample 2	BLV	UNKNOWN	26.991	26.991	6,562.78	6,562.78	
	62	D6	Sample 3	BLV	UNKNOWN	31.651	31.651	287.072	287.072	

<判定>

Analysis タブ→ Amplification タブを選び、右側の View Well Table タブより Ct 値な どの情報を得る。このデータで Ct に数値が得られている場合、ターゲット遺伝子陽 性である。サンプルと同時に反応を行った Positive Control で Ct 値に数値の表示が あり、ネガティブコントロールで Ct 値に数値の表示がないことを確認する。Positive Control およびネガティブコントロールで上記以外の結果が得られた場合は、検出系 に問題がある、またはコンタミネーションの疑いがあるので、再反応を行う。 (オプション) 定量を行った場合は、検量線のデータをもとにして、コピー数が表示さ れる。 VII. 補足:エリア分けについて



VIII. 関連製品

CycleavePCR[™] Reaction Mix SP (製品コード CY510) NucleoSpin Blood QuickPure (製品コード 740569.10/.50/.250) Thermal Cycler Dice[®] Real Time System // (製品コード TP900/TP960) Thermal Cycler Dice[®] Real Time System *Lite* (製品コード TP700/TP760) 96well Hi-Plate for Real Time (製品コード NJ400) Sealing Film for Real Time (製品コード NJ500) Plate Sealing Pads (製品コード 9090) 48 well snap plate (製品コード NJ700) Flat cap for snap plate (製品コード NJ700) Flat cap for snap plate (製品コード NJ700) 0.2 ml Hi-8-Tube (製品コード NJ300) 0.2 ml Hi-8-Flat Cap (製品コード NJ302) 0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ600)

IX. 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。
- TaKaRa Ex Taq、Thermal Cycler Dice は タ カ ラ バイオ株式会社の登録商標です。 CycleavePCR 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