

# ウシ白血病ウイルス検査のための操作マニュアル

## ーウシ白血病ウイルス検出キット(with ROX Reference Dye)

(製品コード RC202A) 専用ー

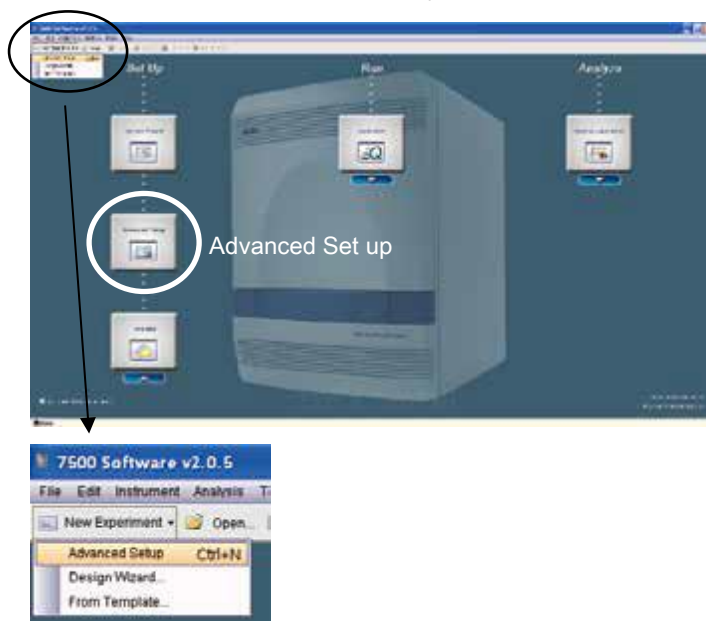
このマニュアルでは、ウシ白血病ウイルス検出キット(with ROX Reference Dye) (製品コード RC202A) を用いて Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System または StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) でリアルタイム PCR を実施する際の操作方法を説明します。

### ランファイルの作成とランの開始

1 ランファイルを新規作成する。

1.1 New Experiment もしくは Home で Advanced Set up を選択

【 7500 Fast Real-Time PCR System の場合 】

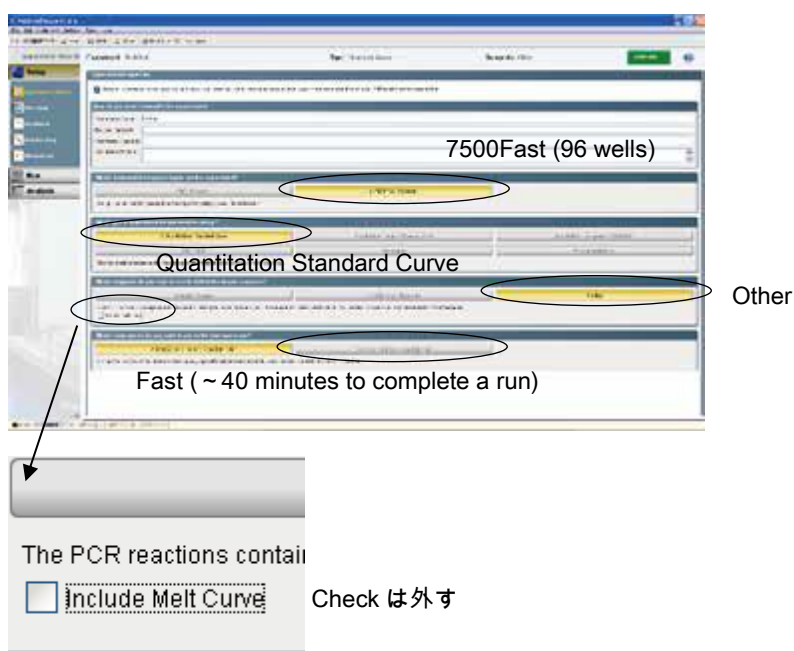


【 StepOnePlus Real-Time PCR System の場合 】



- 1.2 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」「Fast (~ 40 minutes to complete a run)」を選択したものを作成する。

【 7500 Fast Real-Time PCR System の場合 】



【 StepOnePlus Real-Time PCR System の場合 】

StepOnePlus Instrument (96 wells)

Quantitation Standard Curve

Other

Fast (~40 minutes to complete a run)

The PCR reactions contain  
 include Melt Curve Check は外す

2 Setup のタブの「Run Method」にて、反応条件を入力する。(以降、7500 Fast Real-Time PCR System、StepOnePlus で共通)

2.1 Holding Stage は、95°C、30 秒の設定にする。

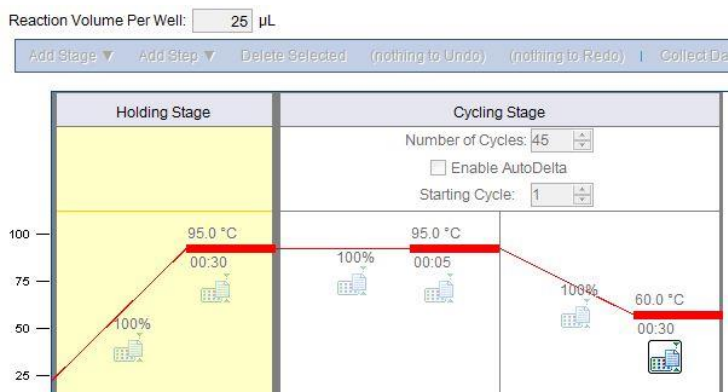
2.2 Cycling Stage は 2 Step PCR のパターンを設定する。

2.2.1 サイクル数は、45 にする。

2.2.2 セグメント 1 は、95°C、5 秒の設定にする。

2.2.3 セグメント 2 は、60°C、30 秒の設定にする

2.2.4 Reaction Volume は 25 $\mu$ l にする。



- 3 Setup のタブの Plate Setup の「Define Targets and Samples」にて以下の情報を入力する。(ラン終了後に行っても良い)

Target Name	Reporter	Quencher
pol	FAM	None
RPPH1	VIC (HEX)	None

- 4 Setup のタブの Plate Setup の「Assign Targets and Samples」にて以下の情報を入力する。(ラン終了後に行っても良い)

4.1 Passive Reference : ROX

4.2 サンプルのウェル位置

4.3 サンプルタイプを **STD** としたウェルについては、鋳型量を設定する。

- 5 反応条件設定画面でランを開始する。

5.1 反応用のチューブ (またはプレート) を本体にセットする。

5.2 **Start Run** ボタンをクリックしてランを開始する。

## 結果の解析

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。BLV 遺伝子 (pol 遺伝子) 陽性の場合、FAM シグナルの増大が認められる。

定量解析を行う場合は、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 pol 遺伝子、RPPH1 遺伝子それぞれについて検量線が作成される。

### <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。

ウシゲノム RPPH1 遺伝子に対する BLV 遺伝子の相対量 (BLV 感染率) を算出する場合は、各サンプルで得られた定量値から、数式により相対定量値を求める。

$$\text{BLV 感染率 (\%)} = [\text{pol 遺伝子定量値} \div (\text{RPPH1 遺伝子定量値} / 2)] \times 100$$