

製品コード RC231A

研究用

TAKARA

**BLV Resistant Marker Gene Detection Kit
(with ROX Reference Dye)**

説明書

v202311Da

牛伝染性リンパ腫ウイルス (bovine leukemia virus; BLV) は、血液や乳汁中のリンパ球等に感染し、宿主細胞の染色体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。この BLV 感染症において、牛主要組織適合遺伝子複合体 (bovine MHC: BoLA) クラス II *DRB3*009:02* 遺伝子 (*BoLA-DRB3*009:02*) を保有する牛は、極めて低いプロウイルス量を維持し、BLV に対する抵抗性を持つことが明らかとなっています。¹⁾

本製品は、蛍光検出プローブを用いたリアルタイム PCR 法により牛ゲノム DNA 中の BLV 抵抗性マーカー遺伝子 (*BoLA-DRB3*009:02*) をタイピングするためのキットです。また、インターナルコントロールとして牛 *RPPH1* 遺伝子をマルチプレックス PCR で同時に検出します。

※ 本製品は、宮崎大学 産業動物防疫リサーチセンターとの共同研究を通じて製品化いたしました。

【特長】

- ・ 特異性の高いプローブを用いたリアルタイム PCR 法により、BLV 抵抗性マーカー遺伝子をタイピングすることができます。
- ・ インターナルコントロールとしてサンプル由来の牛 *RPPH1* 遺伝子を同時に検出することで、試料の良否や PCR 阻害の有無を確認可能です。
- ・ Lysis Buffer R (製品コード 9818) を併用することで、牛血液 (全血) から簡易抽出により牛ゲノム DNA を取得可能です。精製した核酸を検出に利用することもできます。
- ・ リアルタイム PCR の所要時間は約 50 分で、迅速に結果が得られます。
- ・ Uracil-*N*-glycosylase (UNG) を採用しており、PCR 産物のキャリーオーバーによる偽陽性を防止できます。

【検出対象遺伝子とプローブ標識】

検出対象	検出対象遺伝子	プローブ標識
BLV 抵抗性マーカー遺伝子	<i>BoLA-DRB3*009:02</i> 遺伝子	FAM / Dark Quencher
牛ゲノム DNA	<i>RPPH1</i> 遺伝子	HEX / Dark Quencher

※ 本製品は、Applied Biosystems のリアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置での解析に必要な ROX Reference Dye を添付しています。

I. 内容 (50 回)

● Probe qPCR Mix (RMG)* ¹	2 ×	625 μl
● Primer/Probe Mix 2 (RMG)* ²	10 ×	125 μl
● ROX Reference Dye * ²	50 ×	30 μl
● ROX Reference Dye II* ²	50 ×	30 μl
○ H ₂ O		1 ml
● Positive Control DNA (RMG)* ³		50 μl

* 1 : 反応に必要な dNTP Mixture、Mg²⁺、酵素等を含みます。

* 2 : 遮光に留意してください。

* 3 : *BoLA-DRB3*009:02* 遺伝子および *RPPH1* 遺伝子検出系の増幅領域を含む Positive Control DNA です。他の試薬へのコンタミネーションに留意してください。

II. 保存

− 20℃

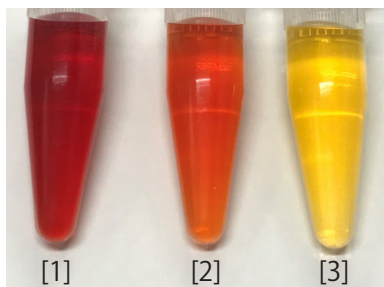
III. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器（主なもの）

【簡易抽出試薬】

- Lysis Buffer R（製品コード 9818）

● Lysis Buffer R* 1 ml × 2

*：Lysis Buffer R は、以下写真の [2] や [3] のように、保存条件により赤色から橙色または黄色に変色する場合があります。融解後に橙色または黄色を呈する試薬は、核酸の抽出性能が低下している可能性があるため、使用しないでください。また、小分け分注することや、チューブの蓋を開けたまま保管することは避けてください。



[1]：通常の Lysis Buffer R（赤色）
[2]：橙色に変色した Lysis Buffer R
[3]：黄色に変色した Lysis Buffer R

※ 市販の DNA 抽出試薬等を使用して調製した検体サンプルを使用することも可能です。

【器具】

- 200 μ l、20 μ l、10 μ l 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）

【機器】

- リアルタイム PCR 装置
 - Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
 - QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
 - StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) 等

※ 以下のリアルタイム PCR 装置をご使用の場合は、BLV Resistant Marker Gene Detection Kit（製品コード RC230A）をお使いください。

- Thermal Cycler Dice® Real Time System IV（製品コード TP1000/TP1010/TP1030）
- Thermal Cycler Dice Real Time System III（製品コード TP950/TP970/TP980）
- Thermal Cycler Dice Real Time System II（製品コード TP900/TP960：終売）
- CFX96 Real-Time PCR Detection System（Bio-Rad 社）
- LightCycler 96 System（Roche Diagnostics 社）
- LightCycler 480 II System（Roche Diagnostics 社）

IV. 使用に際して

本製品を使用する際の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

1. 使用目的： 本製品は研究用試薬です。
2. 測定結果： Primer および Probe 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。)
3. 廃棄： 試料は感染性を有するものとして、各施設の安全規定に従って廃棄してください。作業区域は常に清潔に保ち、検体または検査に用いた器具等は高圧蒸気滅菌器を用いて 121℃で 20 分間以上加熱滅菌処理、または次亜塩素酸ナトリウム液で処理を行った上、各施設の感染性廃棄処理マニュアルに従って処理してください。試薬を廃棄する際は多量の水で流してください。プラスチックなどの試薬容器ならびに器具は、廃棄物の処理および清掃に関する法律に従って処理してください。

V. 操作上の注意

1. Probe qPCR Mix (RMG) を使用する際には、泡立てないように穏やかに転倒混和し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬が完全に混和されていない場合、十分な反応性が得られなくなります。ボルテックスによる混合は行わないでください。なお、保存中に沈殿を生じた場合には、軽く手で温めるか室温にしばらく置いた後、転倒混和することで完全に溶解します。必ず均一に混合してからご使用ください。
2. Probe qPCR Mix (RMG) 以外の各試薬は、溶解後よく混合し、軽くスピンドウンしてからご使用ください。
3. Primer/Probe Mix 2 (RMG)、ROX Reference Dye および ROX Reference Dye II は、蛍光色素の劣化を避けるため遮光に留意してください。
4. 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。
5. サンプルや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。
6. 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、増幅産物が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。

本製品は増幅反応と検出を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で解析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。

7. リアルタイム 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。解析ソフトウェアの補正機能などが適切でない場合、誤判定の原因になります。リアルタイム PCR 装置の取扱説明書に従い、必要に応じて解析パラメーターの設定を確認してください。

VI. 操作

1. 検体サンプルの調製 (エリア 2 で実施)

牛全血試料より、Lysis Buffer R (製品コード 9818) を使用して 検体サンプルを調製します。Lysis Buffer R を用いた検体サンプルの調製方法を以下に示します。

- 1) 全血試料と ● Lysis Buffer R を以下の容量で混合する。ピペッティングまたはタッピングで混合した後、軽くスピンドウンする。

[1 反応分の混合液]	使用量
全血試料	2 μ l
● Lysis Buffer R	38 μ l
Total	40 μ l

- 2) 室温で 5 分間静置する。
- 3) 前処理後の粗抽出液のうち、2 μ l をリアルタイム PCR の鋳型として使用する。

※ 静置時間は 5 分間より長くなっても問題ありません。前処理の翌日までは PCR 結果への影響がないことを確認済みです。

※ 市販の DNA 抽出試薬等を使用して調製した核酸精製サンプルを使用することも可能です。

2. リアルタイム PCR 反応液の調製と反応開始

【コントロール反応について】

結果の判定を正しく行うため、以下のコントロール反応を行ってください。
それぞれ、以下の溶液をリアルタイム PCR 反応の鑄型として添加します。

陰性コントロール (NC)

本製品の ○ H₂O を「陰性コントロール」として使用します。

陽性コントロール (PC)

本製品の ● Positive Control DNA (RMG) を「陽性コントロール」として使用します。

1) 以下の反応液を調製する。(エリア 1 で実施)

必要数 + α 分の反応液をまとめて調製し、リアルタイム PCR 用チューブまたはプレートに 23 μ l ずつ分注する。必要本数は、サンプル数 + 2 本 (陽性コントロール、陰性コントロール) と設定する。

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
● Probe qPCR Mix (RMG)	12.5 μ l
● Primer/Probe Mix 2 (RMG)	2.5 μ l
● ROX Reference Dye or ● Dye II* ¹	0.5 μ l
○ H ₂ O	7.5 μ l
Total	23.0 μ l

* 1 : Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System および QuantStudio 5 Real-Time PCR System では、● ROX Reference Dye II を使用します。
StepOnePlus Real-Time PCR System では、● ROX Reference Dye を使用します。

2) 検体サンプル、「陽性コントロール」および「陰性コントロール」を添加する。(エリア 3 で実施)

[1 反応分の添加量]

検体サンプル	
前処理後の粗抽出液または核酸精製サンプル	2 μ l
陽性コントロール	
● Positive Control DNA (RMG)	2 μ l
陰性コントロール	
○ H ₂ O	2 μ l

3) 以下の条件で反応を実施する

< Hold >
(25°C 10分)*²
95°C 30秒
< PCR : 45 サイクル >
95°C 5秒
60°C 30秒 (蛍光検出 : FAM/HEX (VIC)/ROX)

* 2 : PCR 産物によるコンタミネーションが疑われる場合には、(25°C、10分) のステップを実施してください。UNG の作用により PCR 産物が分解されます。

※ Run mode/Ramp speed を Fast に設定してください。

VII. 判定

陽性コントロールおよび陰性コントロールが正しく反応していることを確認した上で、測定対象サンプルの判定を行ってください。

【検出対象遺伝子と蛍光検出フィルター】

検出対象	検出対象遺伝子	蛍光検出フィルター
BLV 抵抗性マーカー遺伝子	<i>BoLA-DRB3*009:02</i> 遺伝子	FAM
牛ゲノム DNA	<i>RPPH1</i> 遺伝子	HEX (VIC)

【コントロール反応の正しい結果】

	<i>BoLA-DRB3*009:02</i> 遺伝子	<i>RPPH1</i> 遺伝子
陽性コントロール	+	+
陰性コントロール	-	-

- ・ 陽性コントロールで *BoLA-DRB3*009:02* 遺伝子、*RPPH1* 遺伝子が検出されない場合は、何らかの原因で PCR 反応や検出が正常に行われていない。再反応を行う。
- ・ 陰性コントロールで *BoLA-DRB3*009:02* 遺伝子、*RPPH1* 遺伝子が検出された場合は、コンタミネーションの疑いがある。反応液の調製場所や器具類を除染したうえで再反応を行う。

【測定対象サンプルの判定】

<陽性判定の例>

<i>BoLA-DRB3*009:02</i> 遺伝子	<i>RPPH1</i> 遺伝子	判定
+	+	<i>BoLA-DRB3*009:02</i> 遺伝子陽性

- ・ *BoLA-DRB3*009:02* 遺伝子が検出された場合は、陽性判定となる。
- ・ *BoLA-DRB3*009:02* 遺伝子が正常に検出された場合、通常は *RPPH1* 遺伝子も検出される。*RPPH1* 遺伝子のみ不検出となった場合は、何らかの異常が疑われるので操作方法を再確認する。
- ・ 両遺伝子が検出された場合でも、*BoLA-DRB3*009:02* 遺伝子の Ct 値が *RPPH1* 遺伝子と比べて 5 以上大きい場合は、*BoLA-DRB3*009:02* 遺伝子陰性の可能性がある。シーケンシングにより詳細な配列解析を行う。

<陰性判定の例>

<i>BoLA-DRB3*009:02</i> 遺伝子	<i>RPPH1</i> 遺伝子	判定
-	+	検出限界以下
-	-	判定不能

- ・ *BoLA-DRB3*009:02* 遺伝子が検出されなかった場合には、*RPPH1* 遺伝子の結果を確認する。
- ・ *RPPH1* 遺伝子が検出されていれば、検出限界以下となる。
- ・ *RPPH1* 遺伝子が不検出の場合は、DNA 抽出が適切に行われていないか、PCR 阻害が生じている可能性がある。核酸の粗抽出液を用いた場合は、改めて市販の DNA 抽出試薬等を用いて核酸を精製してから反応に供する。

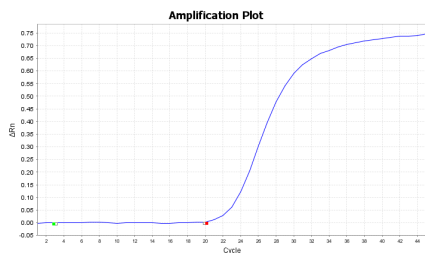
VIII. 参考データ

1. コントロール反応の例

<使用機種> QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

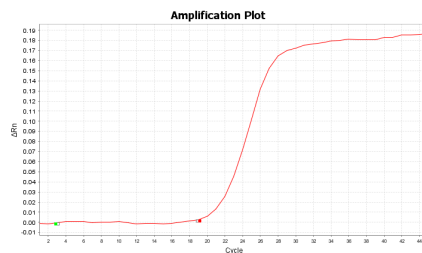
陽性コントロールの反応例

*BoLA-DRB3*009:02* 遺伝子 (FAM)



■ *BoLA-DRB3*009:02*

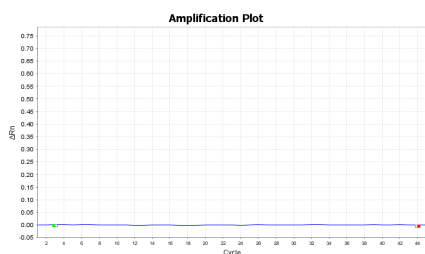
RPPH1 遺伝子 (HEX)



■ *RPPH1*

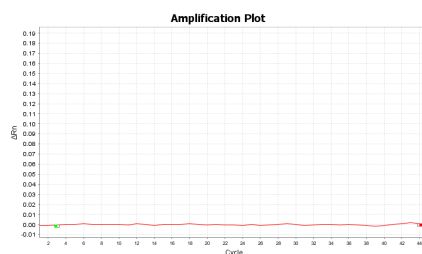
陰性コントロールの反応例

*BoLA-DRB3*009:02* 遺伝子 (FAM)



■ *BoLA-DRB3*009:02*

RPPH1 遺伝子 (HEX)



■ *RPPH1*

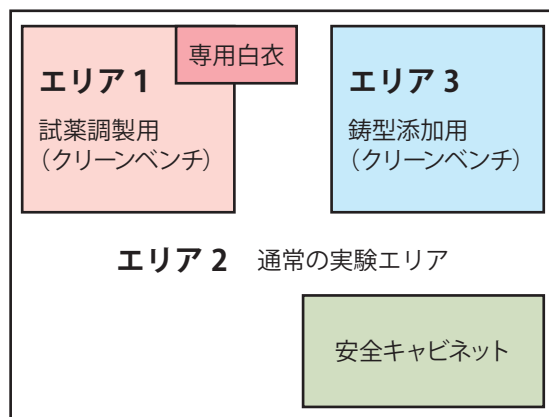
2. BLV 抵抗性マーカー遺伝子 (BoLA-DRB3*009:02) 以外の DRB3 アリルに対する特異性の確認

Takeshima ら²⁾により報告された国内の DRB3 アリル 38 種のうち、BLV 抵抗性マーカー遺伝子 (BoLA-DRB3*009:02) 以外の 37 種のアリルについて、本製品の特異性を調べた結果、対象アリル以外はすべて陰性となり、高い特異性を示した。

アリル名	配列特異性の確認方法	検出結果
BoLA-DRB3*009:02	実検体による評価*	+
BoLA-DRB3*001:01	実検体による評価*	-
BoLA-DRB3*002:01	人工合成遺伝子による評価	-
BoLA-DRB3*003:01	<i>in silico</i> 調査	-
BoLA-DRB3*005:01	人工合成遺伝子による評価	-
BoLA-DRB3*005:02	実検体による評価*	-
BoLA-DRB3*005:03	<i>in silico</i> 調査	-
BoLA-DRB3*005:04	<i>in silico</i> 調査	-
BoLA-DRB3*006:01	<i>in silico</i> 調査	-
BoLA-DRB3*007:01	実検体による評価*	-
BoLA-DRB3*008:01	<i>in silico</i> 調査	-
BoLA-DRB3*009:01	実検体による評価*	-
BoLA-DRB3*010:01	実検体による評価*	-
BoLA-DRB3*011:01	実検体による評価*	-
BoLA-DRB3*011:03	<i>in silico</i> 調査	-
BoLA-DRB3*012:01	実検体による評価*	-
BoLA-DRB3*013:01	<i>in silico</i> 調査	-
BoLA-DRB3*013:02	<i>in silico</i> 調査	-
BoLA-DRB3*014:01:01	実検体による評価*	-
BoLA-DRB3*015:01	実検体による評価*	-
BoLA-DRB3*016:01	実検体による評価*	-
BoLA-DRB3*017:01	<i>in silico</i> 調査	-
BoLA-DRB3*018:01	実検体による評価*	-
BoLA-DRB3*020:01:02	<i>in silico</i> 調査	-
BoLA-DRB3*020:02	<i>in silico</i> 調査	-
BoLA-DRB3*020:06	<i>in silico</i> 調査	-
BoLA-DRB3*022:01	人工合成遺伝子による評価	-
BoLA-DRB3*025:02	<i>in silico</i> 調査	-
BoLA-DRB3*026:01	<i>in silico</i> 調査	-
BoLA-DRB3*027:03	実検体による評価*	-
BoLA-DRB3*027:10	<i>in silico</i> 調査	-
BoLA-DRB3*028:01	実検体による評価*	-
BoLA-DRB3*032:02	<i>in silico</i> 調査	-
BoLA-DRB3*034:01	<i>in silico</i> 調査	-
BoLA-DRB3*037:01	実検体による評価*	-
BoLA-DRB3*040:02	<i>in silico</i> 調査	-
BoLA-DRB3*044:01	実検体による評価*	-
BoLA-DRB3*045:01	<i>in silico</i> 調査	-
合計	38	1

*：実検体による評価では、市販の DNA 抽出試薬により精製した核酸を使用しました。

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。
(鑄型となる DNA は一切持ち込まない)
- エリア 2：通常の実験エリア
検体の取扱いや核酸抽出を行う。
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鑄型の添加を行う。

X. 参考文献

- 1) Notsu, K., El Daous, H., Mitoma, S., Wu, X., Norimine, J., and Sekiguchi, S. Identifying Pathogen and Allele Type Simultaneously in a Single Well Using Droplet Digital PCR. *mSphere*. (2023) **8**(1), e00493-22.
- 2) Takeshima, S., Saitou, N., Morita, M., Inoko, H., and Aida, Y. The diversity of bovine MHC class II DRB3 genes in Japanese Black, Japanese Shorthorn, Jersey and Holstein cattle in Japan. *Gene*. (2003) **316**: 111-118.

XI. 関連製品

Lysis Buffer R (製品コード 9818)
BLV Resistant Marker Gene Detection Kit (製品コード RC230A)

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。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 <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社