

製品コード 6602

研究用

TaKaRa

TaKaRa PCR Human Papillomavirus Detection Set

説明書

v201703Da

本製品は子宮頸癌において最も高頻度に検出される Human Papillomavirus (HPV) 16、18 および 33 型をそれぞれ特異的に増幅し、検出するセットです。HPV16、18 および 33 型の E6 を含む領域 (140 bp、ただし HPV33 型は 141 bp) を増幅することができるプライマーと、増幅後ハイブリダイゼーションを行うための HPV16、18 および 33 型の特異的プローブがセットになっています。

I. 内容 (50 回分)*

| | | | |
|-----|---------------------------------------|------------------|-------------|
| 1. | HPVpF Primer (共通 forward primer) | 25 pmol/ μ l | 100 μ l |
| 2. | HPVp16R Primer (HPV16 reverse primer) | 25 pmol/ μ l | 50 μ l |
| 3. | HPVp18R Primer (HPV18 reverse primer) | 25 pmol/ μ l | 50 μ l |
| 4. | HPVp33R Primer (HPV33 reverse primer) | 25 pmol/ μ l | 50 μ l |
| 5. | HPVb16 Probe (HPV16 probe) | 25 pmol/ μ l | 10 μ l |
| 6. | HPVb18 Probe (HPV18 probe) | 25 pmol/ μ l | 10 μ l |
| 7. | HPVb33 Probe (HPV33 probe) | 25 pmol/ μ l | 10 μ l |
| 8. | Control Template HPV T16 (HPV16) | 1 ng/ μ l | 50 μ l |
| 9. | Control Template HPV T18 (HPV18) | 1 ng/ μ l | 50 μ l |
| 10. | Control Template HPV T33 (HPV33) | 1 ng/ μ l | 50 μ l |

* : 100 μ l PCR 反応 50 回分。50 μ l PCR 反応の場合は 100 回分。

【関連製品】

TaKaRa Taq™ (製品コード R001A/B/C ; 10× PCR Buffer、dNTP Mixture添付)
DNA 5' 末端標識キット MEGALABEL™ (製品コード 6070)
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
Proteinase K (製品コード 9034)

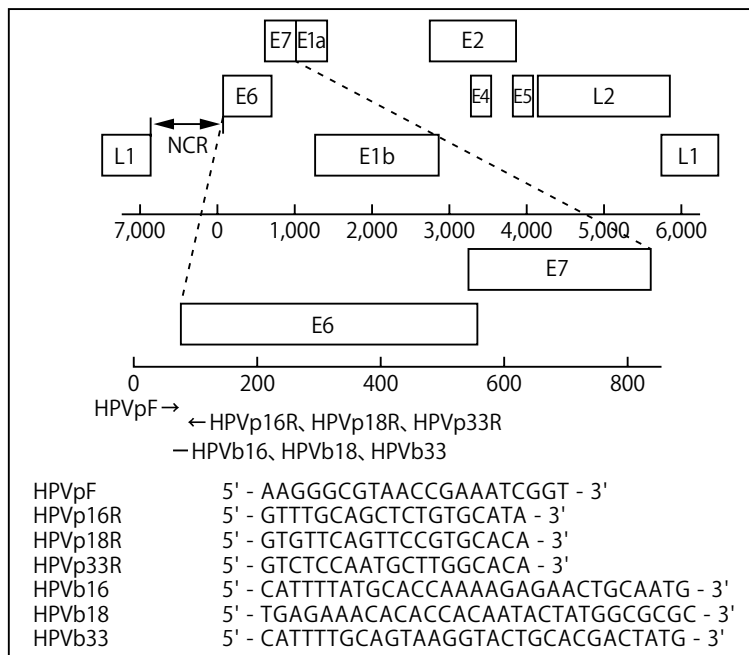
II. 保存

− 20℃

III. 使用に際して

本製品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 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。)

IV. 原理



V. Control Template について

本製品には、PCRによる増幅がうまくいっていることが確認できるように、Control Templateが含まれています。HPV T16、HPV T18、HPV T33をテンプレートとして、HPVpF/HPVp16R、HPVpF/HPVp18R、HPVpF/HPVp33Rのそれぞれのプライマー対を用いて増幅を行うと、それぞれ70 bpの増幅DNAが得られます。(Control Templateを用いたPCR産物はHPV由来の増幅産物とサイズが異なります。) また、これらのControl Templateには本製品に含まれるプローブに相補的な配列が含まれているので、ドットハイブリダイゼーションの際、それぞれのHPVタイプのPositive controlとしても用いることができます。

VI. 操作

A. ゲノム DNA 調製

1. 生検組織等を以下の反応組成 (Total 300 μ l) で、37°C で 12 時間 Proteinase K 処理する。

| | | |
|---|-----------|------------------|
| ┌ | 10 mM | Tris-HCl (pH8.0) |
| | 5 mM | EDTA |
| | 0.5% | SDS |
| | 0.2 mg/ml | Proteinase K |

2. Proteinase K 処理したサンプルに 300 μ l のフェノール/クロロホルム溶液を加えて混合し、12,000 rpm、10 分間遠心して水層 (上層) を別のチューブに移す。
3. 300 μ l のクロロホルム/イソアミルアルコール溶液を加えて混合し、12,000 rpm、10 分間遠心して水層 (上層) を別のチューブに移す。
4. 600 μ l のエタノールと 30 μ l の 3 M CH₃COONa を加え、-20°C で 1 時間 (または -70°C で 30 分間) 放置した後、12,000 rpm、10 分間遠心して沈澱を回収する。
5. 沈澱を 80% エタノールでリンスし、乾燥させた後、ゲノム DNA を滅菌水に溶解する。

B. PCR

1. TaKaRa Taq を用いて以下の反応液を調製する。

< HPV16、18、33 DNA を 1 本のチューブ内で同時に増幅する場合 >

| 試薬 | 100 μ l 反応の場合 | 50 μ l 反応の場合 |
|---------------------------|-------------------|------------------|
| 10× PCR Buffer*1 | 10 μ l | 5 μ l |
| dNTP Mixture*1 (各 2.5 mM) | 8 μ l | 4 μ l |
| HPVpF | 2 μ l | 1 μ l |
| HPVp16R | 1 μ l | 0.5 μ l |
| HPVp18R | 1 μ l | 0.5 μ l |
| HPVp33R | 1 μ l | 0.5 μ l |
| TaKaRa Taq (5 U/ μ l) | 0.5 μ l | 0.25 μ l |
| 試料ゲノム DNA | 1 μ g | 0.5 μ g |
| 滅菌精製水 | up to 100 μ l | up to 50 μ l |

< オプション：HPV16、18、33 DNA を別々のチューブ内で増幅する場合 >

| 試薬 | 100 μ l 反応の場合 | 50 μ l 反応の場合 |
|---------------------------|-------------------|------------------|
| 10× PCR Buffer*1 | 10 μ l | 5 μ l |
| dNTP Mixture*1 (各 2.5 mM) | 8 μ l | 4 μ l |
| HPVpF*2 | 1 μ l | 0.5 μ l |
| HPVp16R | 1 μ l | 0.5 μ l |
| または HPVp18R | | |
| または HPVp33R | | |
| TaKaRa Taq (5 U/ μ l) | 0.5 μ l | 0.25 μ l |
| 試料ゲノム DNA | 1 μ g | 0.5 μ g |
| 滅菌精製水 | up to 100 μ l | up to 50 μ l |

* 1 : TaKaRa Taq に付属

* 2 : オプションの方法では HPVpF Primer が不足します。

2. 必要があればミネラルオイル 50 μ l を重層し、以下の条件で PCR を行う。

| | | |
|------|------|-------------|
| 94°C | 30 秒 | } 30 cycles |
| 55°C | 2 分 | |
| 72°C | 30 秒 | |

3. 反応終了後、ミネラルオイルを除いて、反応液 10 μ l をとり、4% PrimeGel Agarose PCR-Sieve を用いてアガロースゲル電気泳動を行い、DNA の増幅を確認する（ターゲット DNA が存在すれば 140 bp（ただし、HPV33 は 141 bp）の増幅 DNA が得られる）。

C. ドットハイブリダイゼーションによる HPV DNA の検出

HPV16、18、33 DNA を 1 本のチューブ内で同時に増幅した後、HPV16、18、33 に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いたドットハイブリダイゼーションにより高感度に HPV DNA を検出することができる。オリゴヌクレオチドプローブは、DNA 5' 末端標識キット MEGALABEL™ を用いることにより効率よく ³²P で末端ラベルすることができる。

- 増幅 DNA のナイロンメンブランへの固定化
B. で得られた PCR 反応液を新たに 0.5 ml のチューブに移し（ミネラルオイルが入らないように注意する）、94°C、10 分間熱処理後、水中に 5 分間放置し変性させる。ナイロンメンブランを 3 枚準備し、1 μ l の PCR 反応液をそれぞれのナイロンメンブランにスポットする。ナイロンメンブランを乾燥後、5 分間 UV 照射して DNA を固定させる。
- Prehybridization
1. で調製したメンブランを、別々に以下の buffer 中で 37°C、2 時間 prehybridization を行う。

| |
|-----------------------------|
| prehybridization buffer |
| 5× Denhardt's |
| 5× SSC |
| 0.1% SDS |
| 0.1 mg/ml salmon testis DNA |

- プローブのラベル
MEGALABEL を用いてプローブをラベルする（37°C、30 分間）。

| 試薬 | 使用量 |
|---|---------------------|
| HPVb16、HPVb18 または HPVb33 | 1 μ l (25 pmol) |
| 10 × phosphorylation buffer | 1 μ l |
| T4 Polynucleotide Kinase | 1 μ l (10 U) |
| H ₂ O | 2 μ l |
| [γ - ³² P] ATP (370 MBq/ml) *2 | 5 μ l |

* 2 : [γ -³²P] ATP は MEGALABEL には含まれません。

- Hybridization
2. で行った Prehybridization の溶液に 3. でラベルしたそれぞれのプローブを加える（約 1×10^8 cpm）。37°C で 2 時間インキュベーションする。
- 以下の条件でメンブランの洗浄を行う。
洗浄 1 : 2 × SSC, 0.1% SDS
室温、10 分 × 2 回
洗浄 2 : 0.2 × SSC, 0.1% SDS
55°C、10 分 × 2 回
- メンブランを乾燥して、オートラジオグラフィーを行う。

VII. 参考文献

Shimada, M., Fukushima, M., Mukai, H., Kato, I., Nishikawa, A., and Fujinaga, K.
Jpn J Cancer Res. (1990) **81**: 1-5.

VIII. 関連製品

TaKaRa Taq[™] (製品コード R001A/B/C)
MEGALABEL[™] (製品コード 6070)
PrimeGel[™] Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
Proteinase K (製品コード 9034)
TaKaRa PCR Human Papillomavirus Typing Set (製品コード 6603)

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 Taq*、PrimeGel、MEGALABEL 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