

製品コード 6603

研究用

TaKaRa

TaKaRa PCR Human Papillomavirus Typing Set

説明書

v202002Da

本製品は、さまざまなタイプの Human Papillomavirus (HPV) において塩基配列の相同性の高い領域に設定したプライマーを consensus primer として用いることにより、HPV の E6 と E7 を含む領域 (228 ~ 268 bp) を共通に PCR 増幅できるセットです。HPVpU-1M/HPVpU-2R のプライマー対により悪性型 HPV 16, 18, 31, 33, 35, 52b および 58 型を、HPVpU-31B/HPVpU-2R のプライマー対により良性型 HPV 6 および 11 型を増幅することができます。増幅された DNA フラグメントの HPV 型は、Enzyme Set A (製品コード 6604) を用いた *AccI*、*AfaI*、*BmeT110I* (*AvaI*)、*VpaK11B1* (*AvaII*)、*BglII* での制限酵素処理とその後の電気泳動パターンにより判別することができます。

本製品には PCR による増幅がうまくいっていることを確認するために、悪性型および良性型 HPV の Control Template が含まれています。それぞれ以下のプライマー対により増幅を確認することができます。(Control Template を用いた場合の PCR 産物は約 60 bp で HPV 由来の増幅産物とサイズが異なります。) また、これらの増幅 DNA 中には *VpaK11B1* (*AvaII*)、*AfaI*、*BglII*、*AccI*、*BmeT110I* (*AvaI*) の制限酵素部位が存在するので、制限酵素で消化すると、増幅 DNA のサイズが小さくなり、制限酵素による消化を確認することもできます。(消化の確認は、サイズが小さいためにアガロースゲルでは困難です。)

Control Template	HPV-TM	HPV-TB
Primers	pU-1M/pU-2R	pU-31B/pU-2R
増幅鎖長 (bp)	63	61

I. 内容 (100 回分 : 50 μ l 反応)

1. HPVpU-1M Primer (悪性型 forward primer)	25 pmol/ μ l	50 μ l
2. HPVpU-31B Primer (良性型 forward primer)	25 pmol/ μ l	50 μ l
3. HPVpU-2R Primer (共通 reverse primer)	25 pmol/ μ l	100 μ l
4. Control Template HPV-TB (良性型)	1 ng/ μ l	50 μ l
5. Control Template HPV-TM (悪性型)	1 ng/ μ l	50 μ l

本製品以外に必要な試薬 (主なもの)

TakaRa Taq[™] (製品コード R001A/B/C ; 10 × PCR Buffer、dNTP Mixture 添付)
Enzyme Set A (製品コード 6604)
PrimeGel[™] Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
Proteinase K

II. 保存

− 20°C

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 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

プライマーの位置と配列 (表 1) に記載。

表 1. コンセンサスプライマーと各 HPV 型の塩基配列の相同性

		5' 末端 塩基番号	ミスマッチ数	増幅
HPVpU-1M	5'-TGTCAAAAACCGTTGTGTCC-3'			
HPV6	-----C-----C-----GA	420	4	×
HPV11	-----C---G-----GA	420	4	×
HPV16	-----G--AC-----	419	3	○
HPV18	--C---G-----AA----	426	4	○
HPV31	-----G-----	423	1	○
HPV33	-----G---T-----	424	2	○
HPV35	-----C-----	425	1	○
HPV52b	-----CG---A--A-----	418	4	○
HPV58	-----G---A-----	425	2	○
HPVpU-31B	5'-TGCTAATTCGGTGCTACCTG-3'			
HPV6	-----	400	0	○
HPV11	---T-----T---T-----	400	3	○
HPV16	---T-----A-----TATTAAC	399	9	×
HPV18	--AT-----AA-----CTG--G-	406	8	×
HPV31	---T-----A-----TATAAC-	403	8	×
HPV33	--AT-----A-----TATTA-A	404	9	×
HPV35	--AT-----A-----TATTACA	405	10	×
HPV52b	---AACT----A--A----TATAA--T	398	12	×
HPV58	--AT-----A--A----TATTA--T	405	10	×
HPVpU-2R	5'-GAGCTGTCGCTTAATTGCTC-3'			
HPV6	-----ATC-----	627	3	○
HPV11	-----TTC-----	627	3	○
HPV16	-----AT-----	656	2	○
HPV18	TCTGA-----	693	5	○
HPV31	-----GG-----	654	2	○
HPV33	-----A-----	667	1	○
HPV35	-----A--AC-----	656	3	○
HPV52b	-----A--C-----	648	2	○
HPV58	-----A--A-----	668	2	○

V. 操作

A. ゲノム DNA の調製

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 分間遠心して沈殿を回収する。
5. 沈殿を 80% エタノールでリンスし、乾燥させた後、ゲノム DNA を滅菌精製水に溶解する。

B. PCR

1. *TaKaRa Taq* を用いて反応液を調製する。Control Template の場合は 1 μ l 使用する。

<悪性型 HPV DNA の増幅>

試薬	使用量
10 × PCR Buffer*1	5 μ l
dNTP Mixture*1 (各 2.5 mM)	4 μ l
HPVpU-1M	0.5 μ l
HPVpU-2R	0.5 μ l
<i>TaKaRa Taq</i> (5 U/ μ l)	0.25 μ l
試料ゲノム DNA	0.5 μ g
滅菌精製水	up to 50 μ l

<良性型 HPV DNA の増幅>

試薬	使用量
10 × PCR Buffer*1	5 μ l
dNTP Mixture*1 (各 2.5 mM)	4 μ l
HPVpU-31B	0.5 μ l
HPVpU-2R	0.5 μ l
<i>TaKaRa Taq</i> (5 U/ μ l)	0.25 μ l
試料ゲノム DNA	0.5 μ g
滅菌精製水	up to 50 μ l

* 1 : *TaKaRa Taq* に付属

2. 以下の条件で PCR を行う。

94°C	30 秒	┌	30 cycles
55°C	2 分*		
72°C	30 秒		

* : 同一サンプルでの反応において、31B/2R (良性型) および 1M/2R (悪性型) のどちらのプライマーの組み合わせにおいても、増幅産物が認められる場合には、アニーリング時間を 1 分または 0.5 分に変更する。ただしこの場合、ターゲットの増幅が低下する場合がある。

3. 反応終了後、反応液を 10 μ l を取り、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 (228 ~ 268 bp の増幅 DNA が得られる)。
4. 3. で増幅が確認されたサンプルについては、反応液をフェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、増幅 DNA を精製する。DNA は、10 μ l の TE buffer (約 0.1 ~ 0.2 μ g/ μ l) に溶解する。

VI. Enzyme Set A を用いた HPV 型の判別

本製品を用いて PCR により増幅された DNA フラグメントは Enzyme Set A を用いて制限酵素処理し、その後の電気泳動パターンにより HPV 型を判別することができる。

Enzyme Set A (製品コード 6604)

1. Restriction Endonuclease
VpaK11B I (*Ava II*), *Afa I*, *Bgl II*, *Acc I*, *BmeT110 I* (*Ava I*) (各 10 U/ μ l)
2. 10 \times Universal Buffer K, M, H, T
0.1% BSA
10 \times *VpaK11B I* Buffer

< Universal Buffer の組成 >

10 \times K (*BmeT110 I* に用いる)

200 mM Tris-HCl (pH8.5), 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1,000 mM KCl

10 \times M (*Acc I* に用いる)

100 mM Tris-HCl (pH7.5), 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 500 mM NaCl

10 \times H (*Bgl II* に用いる)

500 mM Tris-HCl (pH7.5), 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1,000 mM NaCl

10 \times T (*Afa I* に用いる)

330 mM Tris-acetate (pH7.9), 100 mM Mg-acetate, 5 mM DTT, 660 mM K-acetate

0.1% BSA (*Afa I* に用いる)

10 \times *VpaK11B I* Buffer (*VpaK11B I* に用いる)

200 mM Tris-HCl (pH7.5), 70 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 2,000 mM KCl

A. 悪性型 HPV のタイピング

1. V-B-3. で HPVpU-1M/HPVpU-2R のプライマー対により増幅が確認されたサンプルについては、Enzyme Set A を用いて、悪性型 HPV のタイピングを行う。まず、以下の反応液を調製し、増幅 DNA に対して 30°C で 1 時間 *VpaK11B I* (*Ava II*) を作用させる。反応終了後、4% PrimeGel Agarose PCR-Sieve を用いてアガロースゲル電気泳動を行い、フラグメントの切断パターンを確認する。*VpaK11B I* 消化により HPV 16、18、33 の型を決定することができる (表 2-a)。

試薬	使用量
増幅 DNA	1 μ l (0.1 ~ 0.2 μ g)
10 \times <i>VpaK11B I</i> Buffer	2 μ l
<i>VpaK11B I</i>	0.5 μ l (5 U)
H ₂ O	16.5 μ l
Total	20 μ l

2. *VpaK11B I* で消化されない場合は、*Bgl II*, *Afa I*, *Acc I*, *BmeT110 I* (*Ava I*) のいずれかを用いて 1. と同様に反応を行い、HPV 型を決定する (表 2-a)。各制限酵素に適した Universal Buffer、反応温度は以下のとおりである。

<i>Bgl II</i>	Universal Buffer H、37°C
<i>Afa I</i>	Universal Buffer T + 0.01% BSA (反応液最終濃度)、37°C
<i>Acc I</i>	Universal Buffer M、37°C
<i>BmeT110 I</i>	Universal Buffer K、37°C

B. 良性型 HPV のタイピング

V-B-3. で HPVpU-31B/HPVpU-2R のプライマー対により増幅が確認されたサンプルについては、Enzyme Set A 中の *Afa* I を用いて、良性型 HPV のタイピングを行う。A と同様の方法で、*Afa* I (T + 0.01% BSA Buffer を用いる) を作用させ、HPV 6 と HPV 11 を判別する (表 2-b)。

表 2. コンセンサスプライマーによる増幅産物の制限酵素切断パターン
数字は制限酵素消化後の各フラグメント長を示す。
NC; 切断されない

a) HPVpU-1M/HPVpU-2R

HPV 型	HPV 16	HPV 18	HPV 31	HPV 33	HPV 35	HPV 52b	HPV 58
増幅全鎖長 (bp)	238	268	232	244	232	231	244
制限酵素							
<i>Vpa</i> K11B I (<i>Ava</i> II)	158/81	172/96	NC	136/108	NC	NC	NC
<i>Afa</i> I	NC	NC	117/118	NC	NC	NC	NC
<i>Bgl</i> II	NC	NC	NC	NC	NC	176/55	NC
<i>Acc</i> I	NC	NC	NC	NC	NC	NC	126/118
<i>Bme</i> T110 I (<i>Ava</i> I)	NC	NC	NC	NC	186/46	NC	NC

b) HPVpU-31B/HPVpU-2R

HPV 型	HPV 6	HPV 11
増幅全鎖長 (bp)	228	228
制限酵素		
<i>Afa</i> I	132/96	166/62
<i>Vpa</i> K11B I (<i>Ava</i> II)	NC	NC
<i>Bgl</i> II	NC	NC
<i>Acc</i> I	NC	NC
<i>Bme</i> T110 I (<i>Ava</i> I)	NC	NC

VII. 参考文献

Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, Fukushima M, Kato I, and Fujinaga K.
Journal of General Virology. (1991) **72**: 1039-1044.

VIII. 関連製品

TaKaRa Taq™ (製品コード R001A/B/C)
Enzyme Set A (製品コード 6604)
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
TaKaRa PCR Human Papillomavirus Detection Set (製品コード 6602)

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 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