

研究用

TaKaRa

CycleavePCR™

呼吸器系感染症起因ウイルス 検出キット Ver.3

説明書

呼吸器系感染症は、様々な病原菌やウイルスによって引き起こされます。呼吸器系感染症に対して適切な治療を行うためには、原因となる病原菌、ウイルスを特定する必要がありますが、ウイルスに関しては臨床症状だけで同定することは困難です。また、同定のためのウイルス分離や血清学的検査は時間がかかるため、早急な対応には対処できません。

本キットは、慶應義塾大学医学部感染症学教室 生方公子先生監修の元、呼吸器系感染症の原因となるウイルス 11 種－ Human respiratory syncytial virus subtype A、Human respiratory syncytial virus subtype B、Human parainfluenza virus 1、Human parainfluenza virus 2、Human parainfluenza virus 3、Human metapneumovirus、Influenza A virus、Influenza B virus、Human adenovirus、Human bocavirus、Human rhinovirus－を、リアルタイム PCR 装置を用いて迅速に検出するためのキットとして開発されました。

本キットでは、逆転写反応に PrimeScript™ RTase を使用しています。本酵素は伸長性能に優れ、短時間の反応で効率よくリアルタイム PCR 用の鋳型 cDNA を合成することができます。

増幅反応に用いる TaKaRa Ex Taq® HS は Hot Start PCR 用酵素であり、反応調製時などサイクル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、高感度の検出が可能となります。

検出にはサイクリングプローブ法を使用しています。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 の組み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出来ます。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、増幅産物量をリアルタイムにモニターすることができます。

なお、逆転写反応を行った反応液は 6 つに分け、それを鋳型として PCR 増幅からリアルタイム検出までを同一のチューブ内で行います。PCR 産物を確認するための電気泳動が不要で迅速に結果を得ることができ、増幅産物による汚染、他のサンプルへのコンタミネーションリスクを低減することができます。

また、キットには各ターゲットの Positive Control も含まれており、より確実に判定を行うことが可能です（Ver.3 では、プライマーをより最適化した配列に変更しました）。

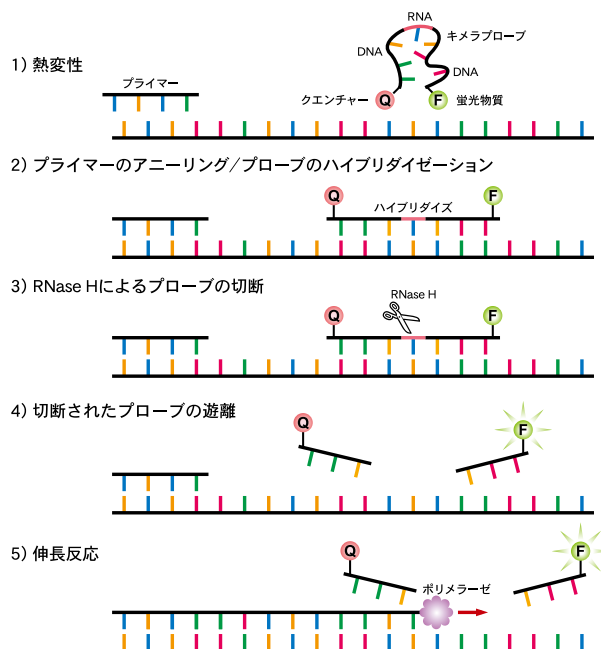


図 1. サイクリングプローブによる検出原理

I. 内容 [逆転写反応 ; 20 µl × 10 反応、リアルタイム PCR ; 25 µl × 10 反応 × 6 種類]

1.	2 × RT Buffer Mix* ¹	100 µl (10 反応分)
2.	PrimeScript RT Enzyme Mix I* ²	10 µl (10 反応分)
3.	2 × CycleavePCR Reaction Mix* ³	750 µl (60 反応分)
4.	Probe/Primer Mix-1* ⁴	20 µl (10 反応分)
5.	Probe/Primer Mix-2* ⁴	20 µl (10 反応分)
6.	Probe/Primer Mix-3* ⁴	20 µl (10 反応分)
7.	Probe/Primer Mix-4* ⁴	20 µl (10 反応分)
8.	Probe/Primer Mix-5* ⁴	20 µl (10 反応分)
9.	Probe/Primer Mix-6* ⁴	20 µl (10 反応分)
10.	RNase free dH ₂ O	1 ml
11.	Positive Control 1-FAM	10 µl
12.	Positive Control 1-ROX	10 µl
13.	Positive Control 2-FAM	10 µl
14.	Positive Control 2-ROX	10 µl
15.	Positive Control 3-FAM	10 µl
16.	Positive Control 3-ROX	10 µl
17.	Positive Control 4-FAM	10 µl
18.	Positive Control 4-ROX	10 µl
19.	Positive Control 5-FAM	10 µl
20.	Positive Control 5-ROX	10 µl
21.	Positive Control 6-FAM	10 µl

* 1 : 逆転写反応に必要なバッファー、dNTP Mixture、ランダムプライマーを含む。

* 2 : PrimeScript RTase、RNase Inhibitor を含む。

* 3 : 反応に必要なバッファー、dNTP Mixture、酵素を含む。

融解させる際、vortex は使用しないこと。

* 4 : 蛍光標識プローブが含まれているため、遮光に留意すること。

	ターゲットウイルス	ウイルスの種類	Probe (検出 Filter)
Probe/Primer Mix-1	RS ウイルス A 型 Human respiratory syncytial virus subtype A	RNA ウィルス	FAM
	RS ウイルス B 型 Human respiratory syncytial virus subtype B	RNA ウィルス	ROX
Probe/Primer Mix-2	パラインフルエンザウイルス 1 Human parainfluenza virus 1	RNA ウィルス	FAM
	パラインフルエンザウイルス 2 Human parainfluenza virus 2	RNA ウィルス	ROX
Probe/Primer Mix-3	メタニューモウイルス Human metapneumovirus	RNA ウィルス	FAM
	パラインフルエンザウイルス 3 Human parainfluenza virus 3	RNA ウィルス	ROX
Probe/Primer Mix-4	インフルエンザウイルス A Influenza A virus	RNA ウィルス	FAM
	インフルエンザウイルス B Influenza B virus	RNA ウィルス	ROX
Probe/Primer Mix-5	アデノウイルス Human adenovirus	DNA ウィルス	FAM
	ボカウイルス Human bocavirus	DNA ウィルス	ROX
Probe/Primer Mix-6	ライノウイルス Human rhinovirus	RNA ウィルス	FAM

II. 保存

－ 20℃

コンポーネント 3. には酵素が含まれるため、一度融解した後はいくつかのチューブに分注して保存することをお勧めします。長期保存するのでなければ、融解後は 4℃ で保存しておくことも可能です。開封後は、Positive Control による試薬の汚染を避けるため、コンポーネント 1. ～ 2.、4. ～ 10. とコンポーネント 11. ～ 21. を別々の箱に入れ、それぞれ－ 20℃ で保存してください。

III. キット以外に必要なもの（主なもの）

【試薬】

核酸抽出試薬 (EXTRAGEN II (東ソー (株)) など)

【器具】

1. 200 μ l、20 μ l、10 μ l 各マイクロピペット
2. 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*

Thermal Cycler Dice® Real Time System II (製品コード TP900/TP960：終売)

Thermal Cycler Dice Real Time System Lite (製品コード TP700/TP760：終売)

コンタミネーション回避のため、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 チューブをお勧めします。

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

*：Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) をご使用の場合、Baseline がフラットになるように、必要に応じて Auto 設定を解除し、Threshold を Manual で設定していただく必要があります。StepOnePlus Real-Time PCR System 用のプロトコール (Threshold の設定方法も含む) は、弊社ウェブサイトよりダウンロードしてください。

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 Probe/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。)

V. 操作上の注意

- (1) PrimeScript RT Enzyme Mix I は、使用前に軽く遠心して、試薬をチューブの底に落としてください。酵素は 50%グリセロール溶液で粘度が高いため、注意深くゆっくりとピペティングを行ってください。
- (2) 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。
- (3) 2 × CycleavePCR Reaction Mix には、反応のための酵素が含まれています。融解の際には vortex は使用しないでください。融解後はゆっくりとチューブの上下を反転させた後卓上遠心機で軽く遠心する、あるいは穏やかにピペティングを行って全体を均一に混合してからお使いください。
- (4) 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。
- (5) 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。
- (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。

本キットで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。

VI. 操作

VI-1. サンプルの調製 (エリア 2 で実施)

本キットで検出可能な 11 種のウイルスのうち、9 種は RNA ウィルス、2 種は DNA ウィルスです。従って、サンプルの調製には、検体から RNA および DNA を同時に調製するように設計された全核酸調製キットを使用することをお勧めします [EXTRAGEN II (東ソー(株)) など]。

核酸調製にあたっては、実験者の汗や唾液に含まれる RNase の混入を防ぐため作業中は不必要に話さず、清潔なディスポーザブルグローブを着用し RNA 調製専用の実験台を設けるなどの細心の注意を払ってください。

実験器具に関しては、可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用するようにし、実験台、実験器具、チューブなどの RNase 除去には RNase-OFF® (RNase コンタミネーション除去溶液) (製品コード 9037) の使用をお勧めします。また、RNA 実験に用いる器具 (プラスチックおよびガラス) は、他の器具と区別して RNA 専用として使用してください。

ウイルスによる感染症の場合、発症から 5 日以降になるとウイルスの粒子数が減少し、陽性率が低下しますので、検体の採取の時期も重要になります。

以下に、EXTRAGEN II (東ソー(株)) を用いた検体 (上咽頭拭い液など) からの鋳型核酸調製例を示します。

< EXTRAGEN II (東ソー(株)) を用いた調製方法例 >

- (1) 検体スワブを 0.5 ml のプロスに混釈し、5,000 rpm で 5 分間、遠心する。
- (2) 沈渣 100 μ l を、8 μ l の試薬 1 (共沈剤) を分注した 1.5 ml チューブに加え、ボルテックスにより 10 秒間攪拌後、12,000 rpm で 3 秒間、遠心する。
- (3) 試薬 2 (タンパク質変性剤、2- プロパノール) を 500 μ l 加え、ボルテックスにより 10 秒間攪拌する。
- (4) 12,000 rpm で 3 分間遠心後、上清を廃棄する。
(上清を完全に除去するため、再度スピンドウンしてチップで上清を廃棄する。)
- (5) 試薬 3 (塩化カリウム、2- プロパノール) を 200 μ l 加え、ボルテックスにより 10 秒間攪拌する。
- (6) 12,000 rpm で 3 分間遠心後、上清を廃棄する。
(上清を完全に除去するため、再度スピンドウンしてチップで上清を廃棄する。)
- (7) 40 μ l の RNase free dH₂O を氷上で加え、沈殿を溶解し、DNA/RNA 抽出液とする。

注：全工程、フィルター付チップを使用する。

RNase free dH₂O は、必ず小分けにし一回で使い切ること。

VI-2. 逆転写反応

- (1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)

サンプル核酸溶液以外のコンポーネントを必要本数 + α 分調製し、0.2 ml のマイクロチューブに分注後、サンプル核酸溶液を添加すると良い。

試薬	液量 (1 反応)
2 × RT Buffer Mix	10 μ l
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1 μ l
サンプル核酸溶液	1 ~ 9 μ l
RNase free dH ₂ O	up to 20 μ l*

* : 添加するサンプル核酸溶液の量にあわせて、最終反応液量が 20 μ l となるように RNase free dH₂O の量を調節する。

- (2) サンプル核酸溶液を添加する。(エリア 3 で実施)

- (3) 以下の条件で逆転写反応を行う。サーマルサイクラーを使用すると便利である。

37℃ 15 min. (逆転写反応)
85℃ 5 sec. (逆転写酵素を熱失活させる)
4℃

反応終了後、反応液は - 20℃ で保存できる。

VI-3. CycleavePCR 反応液の調製と反応

正しい検出結果を得るために、陽性コントロール反応および陰性コントロール反応を同時に行ってください。

- (1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)

それぞれの Probe/Primer Mixture について反応液を調製する。

逆転写反応液等の鋳型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 23 μ l 分注し軽くふたをする。その内の 1 本に陰性コントロールとして、RNase free dH₂O を 2 μ l 加えしっかりとふたをする。

必要本数は、Probe/Primer Mix-1 ~ Probe/Primer Mix-5 はサンプル数 + 3 本 (陰性コントロール 1 反応、陽性コントロール 2 反応)、Probe/Primer Mix-6 はサンプル数 + 2 本 (陰性コントロール 1 反応、陽性コントロール 1 反応) と設定する。

試薬	液量 (1 反応)	最終濃度
2 × CycleavePCR Reaction Mix	12.5 μ l	1 ×
Probe/Primer Mix	2 μ l	1 ×
(逆転写反応液* ^{1,2} または Positive Control* ² または RNase free dH ₂ O)	2 μ l	
RNase free dH ₂ O	8.5 μ l	
Total	25 μ l	

* 1 : 逆転写反応液を用いて 1 検体につき 6 種の Probe/Primer Mix で反応を行うので、逆転写反応液は 20 μ l のうち 12 μ l を使用する。残りの逆転写反応液は - 20℃ で保存しておく。逆転写反応液を増減する場合は、その量にあわせて、最終反応液量が 25 μ l となるように RNase free dH₂O の量を調節する。

* 2 : 逆転写反応液、Positive Control はステップ (2) で加えるためここでは加えない。

【注意】蛍光ノイズの原因になりますので、チューブやふたには素手で触れないようご注意ください。

(2) 逆転写反応液を添加する。(エリア 3 で実施)

陰性コントロール以外の各チューブに、逆転写反応液または反応液に対応する Positive Control*を 2 μ l 添加し、しっかりとふたをする。0.2 ml チューブ用の卓上遠心機で軽く遠心を行い、リアルタイム PCR 装置にセットする。

*： Probe/Primer Mix-1 ～Probe/Primer Mix-5 は、それぞれPositive Control-FAMと Positive Control-ROX の 2 種類がある。必ず別々のチューブに添加して陽性コントロール反応を行う。

【注意】反応液調製後、なるべく 1 時間以内に反応を開始してください。

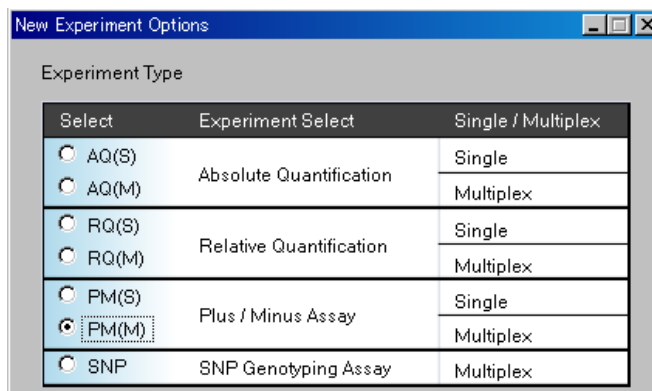
(3) リアルタイム PCR 装置による増幅および検出

【Thermal Cycler Dice Real Time System II を使用する場合】

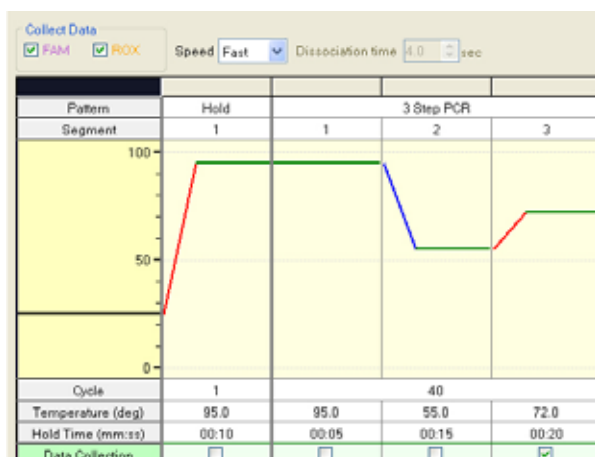
(Thermal Cycler Dice Real Time System Software)

Thermal Cycler Dice Real Time System II の取扱説明書をご確認ください。

- 1) Run File を新規作成し、“New Experiment Options” 画面において Experiment Type < PM(M) Plus/Minus Assay Multiplex > を選択する。
食品環境検査用ソフトウェアをご使用の場合は、< + / - 判定 > を使用します。



- 2) “Thermal Profile Setup” 画面で PCR 条件を設定する。
Collect Data の FAM と ROX の両方に☑が入っていること。



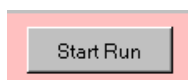
初期変性 (Hold)

Cycle : 1
95°C 10 sec.

3 step PCR

Cycle : 40
95°C 5 sec.
55°C 15 sec.
72°C 20 sec. (collect data)

- 3) 画面右下の“Start Run” ボタンをクリックして反応を開始する。



- 4) “Plate Setup” 画面でウェル情報を設定する。
Target & Sample Setting 画面で、Target List、Sample List を作成する。

4)-1. Target List

Dye : Dye of Internal Control は none

Target List : 各 Probe/Primer Mix で検出フィルターとターゲット名を設定する。

1. Add ボタンをクリックして、必要なだけ Target List に行を追加する。

(行を削除するには、Delete ボタンをクリックします。)

2. Dye は必要に応じて変更可能。ドロップダウンメニューから選択する。

3. Name に Target Name を入力する。

4. Color は必要に応じて変更する。

4)-2. Sample List : サンプル、NC、各 PC を設定する。

1. Type のドロップダウンメニューから Type を選択する。

UNKN (Unknown) : 測定対象である未知サンプル

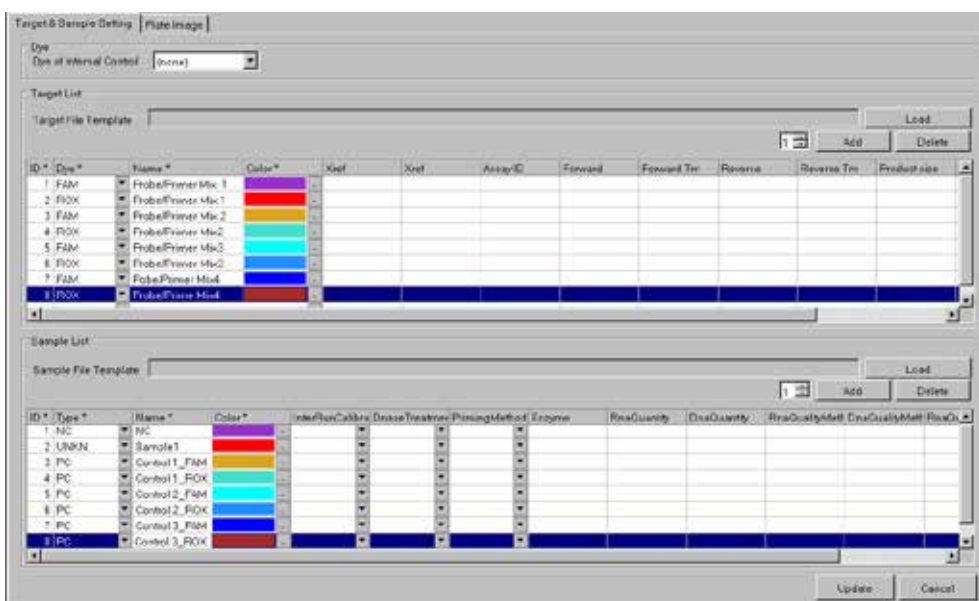
PC (Positive Control) : 陽性コントロール

NC (Negative Control) : 陰性コントロール

2. Name に Sample Name を入力する。

3. Color は必要に応じて変更する。

4)-3. Target List と Sample List の作成が完了したら、画面右下の Update ボタンをクリックする。

The image shows a software window titled "Target & Sample Setting" with a "Plate Image" tab. It contains two main sections: "Target List" and "Sample List".

The "Target List" section has a "Dye of Internal Control" dropdown menu set to "none". Below it is a "Target File Template" field. A table lists targets with columns: ID#, Dye, Name, Color, Xref, Xref, Assay ID, Forward, Forward Tm, Reverse, Reverse Tm, Product size. The table contains 8 rows of probe/primer mix data with different colors. To the right of the table are "Load", "Add", and "Delete" buttons.

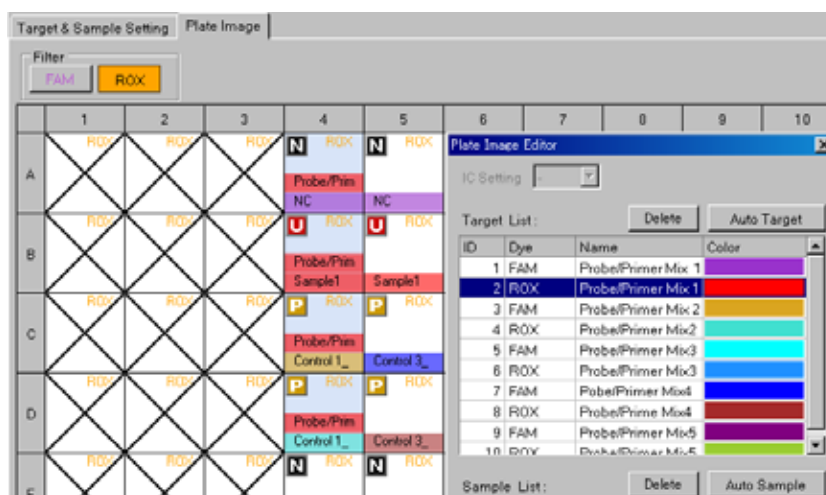
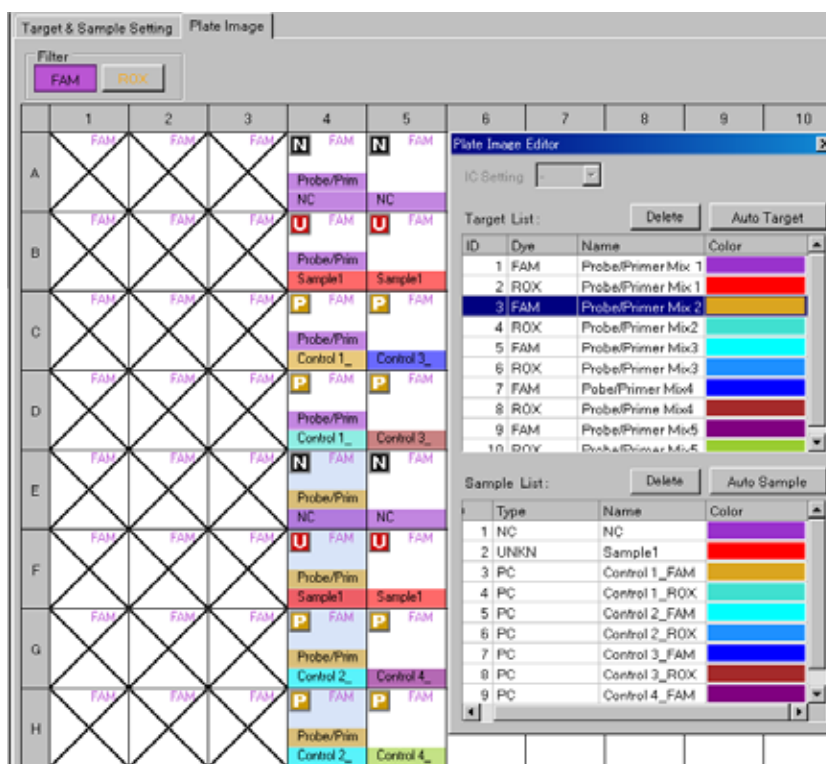
The "Sample List" section has a "Sample File Template" field. A table lists samples with columns: ID#, Type, Name, Color, InterPlan Culture, Droze Treatment, Priming Method, Enzyme, ReaQuantity, CnaQuantity, RnaQualityMett, CnaQualityMett, ReaQu. The table contains 8 rows of sample data (NC, UNKN, PC, and controls) with different colors. To the right of the table are "Load", "Add", and "Delete" buttons.

At the bottom right of the window are "Update" and "Cancel" buttons.

Plate Image の作成

Filter FAM を選択したときは、FAM 検出する Target を設定し、Filter ROX を選択したときは ROX 検出する Target を設定する。

1. Plate Image 上で該当するウェルを選択し、Plate Image Editor で Target を選択する。
2. Plate Image 上で該当するウェルを選択し、Plate Image Editor で Sample を選択する。



反応に使用しないウェルは Omit 設定する。

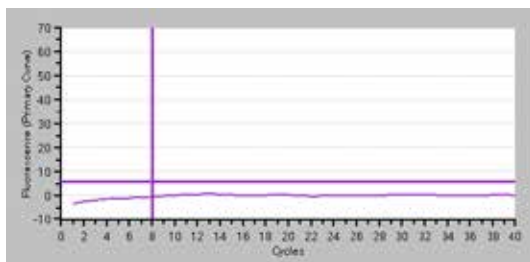
5) 結果解析

反応終了後、“Result/Analysis” ボタンをクリックする。

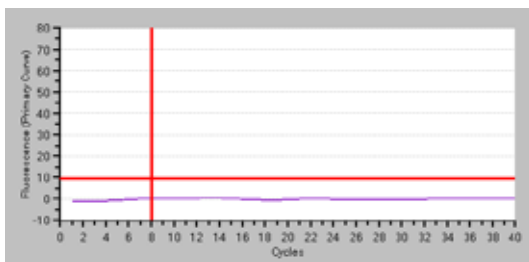
NC (陰性コントロール)、PC (陽性コントロール) の増幅曲線を確認する。

1. NC の増幅曲線の表示：Selector で < N > を選択

Filter FAM



Filter ROX

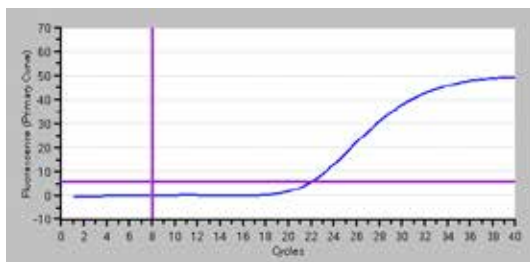


Filter FAM および Filter ROX のいずれにおいても、閾値を超えていないことを確認する。

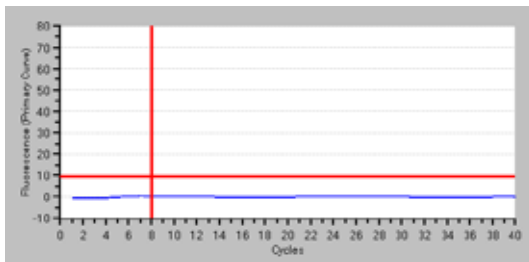
2. PC の増幅曲線の表示：Selector で < P > を選択

○ Positive Control-FAM を用いた場合

Filter FAM



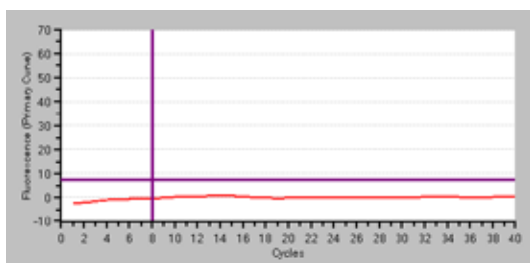
Filter ROX



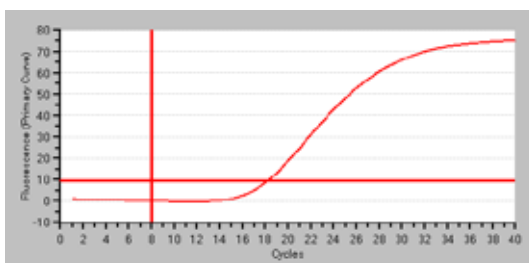
Filter FAM において増幅曲線が描かれ閾値を超えていること、Filter ROX において閾値を超えていないことを確認する。

○ Positive Control-ROX を用いた場合

Filter FAM



Filter ROX



Filter ROX において増幅曲線が描かれ閾値を超えていること、Filter FAM において閾値を超えていないことを確認する。

3. サンプルの増幅曲線は、Selector で < U > を選択して確認する。

6) 結果の表示

Text の結果表示について説明します。

その他、Plate Format、Scatter Plot で結果表示が可能です。

6)-1. Analysis Data < Text Report >を選択する。

6)-2. Column より表示したい項目に☑を入れる。

Result の表示について

Sample Type が NC、PC

OK : コントロール反応が正常 (反応系に問題がない。)

OUT : コントロール反応が異常 (反応系に問題がある。)

Sample Type が UNKN

Posi. : ターゲット遺伝子の検出が陽性

Nega. : ターゲット遺伝子が検出限界以下

Error : 同一レプリケート番号の判定が異なる。

結果例)

Filter		FAM	ROX										
Sample Type	Target Name	Sample Name	Filter	Ct(CP)	Ct(SDM)	Detected(F)	P/M Result (F)	Detected(CP)	P/M Result (CP)	Detected(SDM)	P/M Result (SDM)		
NC	Mix1	NC	ROX	-	-	-	OK	-	OK	-	OK		
NC	Mix1	NC	FAM	-	-	-	OK	-	OK	-	OK		
UNKN	Mix1	Mix PC	ROX	34.72	34.67	+	Posi.	+	Posi.	+	Posi.		
UNKN	Mix1	Mix PC	FAM	34.42	34.35	+	Posi.	+	Posi.	+	Posi.		
PC	Mix1	1_FAM PC	ROX	-	-	-	OUT	-	OUT	-	OUT		
PC	Mix1	1_FAM PC	FAM	22.07	21.99	+	OK	+	OK	+	OK		
PC	Mix1	1_ROX PC	ROX	18.39	17.29	+	OK	+	OK	+	OK		
PC	Mix1	1_ROX PC	FAM	-	-	-	OUT	-	OUT	-	OUT		

Positive Control 1-FAM (表中、Sample Name : 1_FAM PC) は、Filter FAM の検出ができ Result が OK となるが、Filter ROX の検出ができないため Result は OUT となる。同様に、Positive Control 1-ROX (表中、Sample Name : 1_ROX PC) は、Filter FAM の検出ができないため Result は OUT となるが、Filter ROX の検出ができるため Result が OK となる。

Detected(F) : Primary Curve Final により求めた Filter ごとのプラスマイナス判定

Detected(CP) : Primary Curve Ct により求めた Filter ごとのプラスマイナス判定

Detected(SDM) : 2nd Derivative Ct により求めた Filter ごとのプラスマイナス判定

P/M Result (F) : Primary Curve Final により求めた判定結果

P/M Result (CP) : Primary Curve Ct により求めた判定結果

P/M Result (SDM) : 2nd Derivative Ct により求めた判定結果

VI-4. 結果表示および判定

各菌種の検出系で、陽性の場合には 40 サイクルのリアルタイム PCR で蛍光シグナルの増幅が認められます。*

- Thermal Cycler Dice Real Time System の場合、Result/Analysis の表示画面上において、Text Report を選んだ時、2nd Derivative 法で得られる Ct 値 [Ct (SDM)] に数値が得られている場合を陽性と判断します。検出限界以下の場合には、Ct 値の数値ではなく、“－”が表示されます。

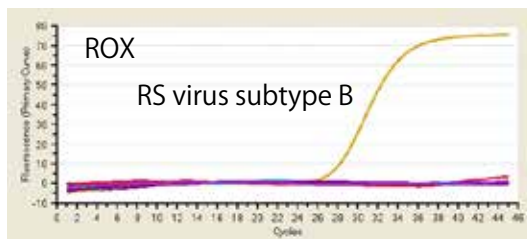
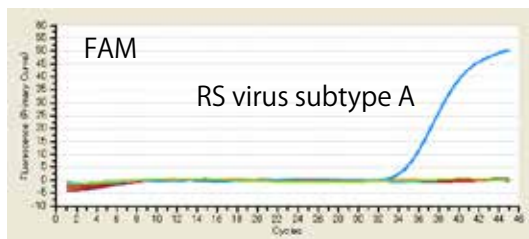
なお、結果の判定は、同時に反応・検出を行った陽性コントロールならびに陰性コントロールの結果と合わせて行ってください。

*：33 サイクル以降で増幅曲線が立ち上がる場合には、電気泳動による目的遺伝子増幅の確認と、再現性を確認するための再反応を行うことを推奨する。電気泳動を行う際には、PCR 産物のコンタミネーションに注意すること。

	ターゲットウィルス	Probe (検出 Filter)	増幅鎖長	
			サンプル 由来	各 Positive Control 由来
Probe/Primer Mix-1	RS ウィルス A 型 Human respiratory syncytial virus subtype A	FAM	84 bp	77 bp
	RS ウィルス B 型 Human respiratory syncytial virus subtype B	ROX	84 bp	77 bp
Probe/Primer Mix-2	パラインフルエンザウィルス 1 Human parainfluenza virus 1	FAM	129 bp	111 bp
	パラインフルエンザウィルス 2 Human parainfluenza virus 2	ROX	116 bp	93 bp
Probe/Primer Mix-3	メタニューモウィルス Human metapneumovirus	FAM	212 bp	147 bp
	パラインフルエンザウィルス 3 Human parainfluenza virus 3	ROX	158 bp	124 bp
Probe/Primer Mix-4	インフルエンザウィルス A Influenza A virus	FAM	104 bp	86 bp
	インフルエンザウィルス B Influenza B virus	ROX	145 bp	120 bp
Probe/Primer Mix-5	アデノウィルス Human adenovirus	FAM	122 bp	98 bp
	ボカウィルス Human bocavirus	ROX	230 bp	182 bp
Probe/Primer Mix-6	ライノウィルス Human rhinovirus	FAM	142 bp	115 bp

VII. 反応例

各種既知ウイルス核酸サンプルを用いて Probe/Primer Mix-1 (RS virus subtype A : FAM 標識 /RS virus subtype B : ROX 標識) でリアルタイム PCR を行った。

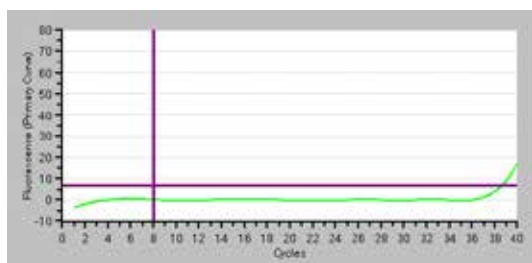


Sample Name	Probe/Primer Name	Filter	Ct (CP)	Ct (SDM)
Adenovirus	Mix-1	FAM	—	—
		ROX	—	—
Parainfluenza virus 1	Mix-1	FAM	—	—
		ROX	—	—
Parainfluenza virus 3	Mix-1	FAM	—	—
		ROX	—	—
Rhinovirus	Mix-1	FAM	—	—
		ROX	—	—
Influenza A virus	Mix-1	FAM	—	—
		ROX	—	—
Influenza B virus	Mix-1	FAM	—	—
		ROX	—	—
Bocavirus	Mix-1	FAM	—	—
		ROX	—	—
Metapneumo Virus	Mix-1	FAM	—	—
		ROX	—	—
RSV subtype A	Mix-1	FAM	34.82	34.77
		ROX	—	—
RSV subtype B	Mix-1	FAM	—	—
		ROX	28.58	28.53

RS virus subtype A は Mix-1 の FAM フィルターで、RS virus subtype B は Mix-1 の ROX フィルターで検出され、他の既知ウイルス核酸サンプルではシグナルは認められなかった。

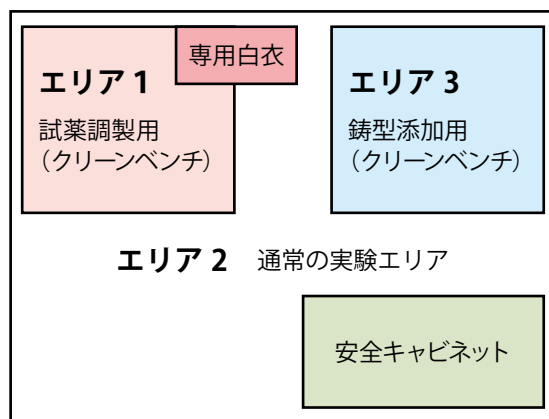
VIII. トラブルシューティング

1. シグナルが得られない。
 - (1) 調製したサンプル中の RNA または DNA が検出限界以下である。
→ 必要があれば、サンプルの調製を再度試みる。
 - (2) 調製したサンプル中に PCR 反応を阻害する物質が含まれている。
→ 陽性であることがわかっているサンプル (Positive Control など) を添加して反応を行い、シグナルが得られない場合は、PCR 反応が阻害されていると考えられる。
サンプルを再調製、あるいはサンプルを希釈して使用する。
2. Thermal Cycler Dice Real Time System で Primary curve でシグナルが得られているが、Ct (SDM) に数値が得られていない。
→ サンプルによっては、Primary curve がきれいにシグモイドカーブにならない場合があり、その場合、Ct (SDM) が算出されない可能性がある。
陰性コントロールの増幅曲線と比較を行い、明確にシグナルが確認されていれば陽性と判断する。
3. シグナルが 33 以降に微妙な立ち上がりを示した。



→ 目的ターゲットと異なる可能性があるので、電気泳動にて増幅サイズを確認する。

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。
(鋳型となる 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 DNA 調製を行う。
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鋳型 DNA の添加を行う。
標準サンプルの希釈もここで行う。

X. 参考文献

Keiko Hasegawa, Miyuki Morozumi, Eiichi Nakayama, Naoko Chiba, Somay Y Murayama, Reiko Takayanagi, Satoshi Iwata, and Kimiko Ubukata. Comprehensive detection of causative pathogens using real-time PCR to diagnose pediatric community-acquired pneumonia. *J Infect Chemother.* (2008) Dec; **14** (6): 424-432.

XI. 関連製品

RNase-OFF® (RNase コンタミネーション除去溶液) (製品コード 9037)
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ600)
CycleavePCR™ 呼吸器系感染症起因菌検出キット Ver.2 (製品コード CY214)

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。
- *TaKaRa Ex Taq*、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の、RNase-OFF は PureBiotech, LLC 社の登録商標です。CycleavePCR、PrimeScript 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 <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社