## 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。

Advanced Setup

Design Waard From Template Ctrl+N

- 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 】

an anner para fo aluarret : 🖬 (per. 🖬	jart & Der & menne	name and a firm at harris	termenen (@fart - Gree		
spectrum Manage of State	waters (Desired )	Tale Standard Cores	Rangerer Offen	Energian (	
Set.p	Nerret Prosites				
	the dryin wat is motify t	lati engleritment f			
ner teta	farmentational				
Rectanded .	International				
terestant data	Corrected Stationals			3	
-	Walt between an year	dag to tax die angesterment			
Run 🗸	1 Martin Starter		and Manager .		
Anatysie	StepOnePlus Instrument (96 wells)				
	which have 10 property do	who want to bed sent			Í
	a destinant frances		Alternational Constant	100 - 200 - 10 - 10 - 10 - 10 - 10 - 10	
	Quantitat	ion Standard (	Curve	famile bases	
		in a solution of the part is that and and an advanced in large	2 Per A		
	Which ranges in the processor	to one to delet the larged sequence	14		
	Control Second	int in		S of Items	> Oth
	The PCM partner schedule work	lenging to any the length sectories and the	regrade enclosusception for Products	ALCOM STRANGED THE	
	Crown and love				
	Which Cartal Speed do you a	net is one in the Assessment card			
	2 Married - 2 married for	And A store			
	East	t = 10 minut	es to complete	a run)	
- Illinoenar - S	1 43	St ( ~ 40 minute		s a run)	
				( Jestinge	
•					
	opetione ec	ntaii			
he PCR r	eatuons tt				
he PCR r					
he PCR r	e Melt Curve	Check は	水す		

【 StepOnePlus Real-Time PCR System の場合】

- 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℃、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℃、5秒の設定にする。
    - 2.2.3 セグメント2は、60℃、30秒の設定にする
    - 2.2.4 Reaction Volume は 25µ I 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。

BLV 感染率(%) = [pol 遺伝子定量値÷(RPPH1 遺伝子定量値/2)]×100