

研究用

TAKARA

Bovine Leukemia Virus qPCR Detection Kit (with ROX Reference Dye)

説明書

2023年10月出荷分 (Lot: AN61266A) より製品名を変更しました。
(旧製品名: ウシ白血病ウイルス検出キット (with ROX Reference Dye))

2022年12月出荷分 (Lot: AME0754A) より製品仕様を一部変更しました。

<変更内容>

キットに含まれるコンポーネント、Primer/Probe Mix および Positive Control DNA の改良に伴い、コンポーネント名の一部を変更しました。

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 (疾病「牛白血病」の呼称は「牛伝染性リンパ腫」へ変更されました)。

本製品は、プロウイルスとして組み込まれた牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) の逆転写酵素遺伝子である *pol* 遺伝子をターゲットとして、リアルタイム PCR により BLV 遺伝子を検出するためのキットです。また、BLV 遺伝子と共にウシゲノム DNA をマルチプレックス PCR で同時に検出 (および定量) することが可能で、測定結果は以下の通り結果の判定および解析に利用します。

定性判定の場合

ウシゲノム DNA の検出は、1. ウシ血液からの DNA 抽出が問題なく行われたことの確認、2. PCR 阻害の有無の確認に利用します。

定量解析の場合

上記に加えて、ウシゲノム DNA をリファレンスとした相対定量解析により、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) を算出します。なお、相対定量解析の場合、予めウシゲノム DNA 量を定量しておく必要がありません。

※ ウシゲノム DNA 量当たりの BLV コピー数を算出することも可能です (例えば、ウシゲノム 100 ng 当たりの BLV コピー数等)。その場合には、予め、ウシゲノム DNA 濃度を測定しておき、一定量を PCR の鋳型として使用します。

【検出対象遺伝子】

検出対象	検出対象遺伝子	プローブ標識
BLV 遺伝子	<i>pol</i> 遺伝子	FAM / Dark Quencher
ウシゲノム 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。

※ 本キットは、岩手大学農学部共同獣医学科 村上賢二教授の研究成果に基づき、当社と同大学との共同研究によって開発されました。

I. 内容 (50 回分)

PCR 反応試薬

● 1. Probe qPCR Mix-UNG* ¹	2 ×	625 μl
● 2. Primer/Probe Mix 4 (BLV)* ²	5 ×	250 μl
● 3. ROX Reference Dye* ²	50 ×	30 μl
● 4. ROX Reference Dye II* ²	50 ×	30 μl
○ 5. H ₂ O		1 ml

陽性コントロールおよび希釈用バッファー

● 6. Positive Control DNA 2* ³	2 × 10 ⁵ copies/μl	100 μl
○ 7. PC Dilution Buffer		1 ml × 2

- * 1：反応に必要な dNTP Mixture、Mg²⁺、酵素等を含みます。
ウラシル-N-グリコシラーゼ (UNG) を反応系に添加しており、PCR 増幅産物のキャリーオーバーによる偽陽性を防止できます。
- * 2：遮光に留意してください。
- * 3：*pol* 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)

【試薬】

- DNA 調製キット
全血から DNA を抽出する場合は、NucleoSpin Blood QuickPure (製品コード 740569.10/.50/.250) などをお勧めします。

【器具】

- 200 μl、20 μl、10 μl 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】

- 微量高速遠心機
- ヒートブロック (DNA 抽出に使用)
- 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 (96-well, 0.2 mL block)
(Thermo Fisher Scientific 社)
 - StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) 等

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：本製品は研究用の製品です。
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-UNG 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. 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. 万一、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。
4. 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 (VII. 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。

本製品では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。

5. 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。必要に応じてリアルタイム PCR 装置の取扱説明書に従い、解析パラメーターの Manual 設定を行ってください。

VI. 操作

VI-1. 検体サンプルの調製 (エリア 2 で実施)

血液等より、市販の DNA 調製キットを使用して DNA (検体サンプル) を調製します。血液からの DNA 調製の場合は、NucleoSpin Blood QuickPure の使用を推奨します。

【NucleoSpin Blood QuickPure を用いた検体サンプルの調製方法】

NucleoSpin Blood QuickPure の取扱説明書に従って操作してください。

1. 200 μ l の血液と 25 μ l の Proteinase K 溶液*1 を 1.5 ml マイクロチューブに加える。Buffer BQ1 を 200 μ l 加えて激しくボルテックス (10 ~ 20 秒) 後、70°C で 15 分間、インキュベートする。
2. エタノール (96 ~ 100%) を 200 μ l 添加し、よく混合する。
3. NucleoSpin Blood QuickPure Column を Collection Tube にセットする。2. の溶液をカラムに添加し、11,000 $\times g$ 、1 分間遠心する。ろ液とコレクションチューブを捨てる。
4. NucleoSpin Blood QuickPure Column を新しい Collection Tube (2 ml) にセットする。カラムに Buffer BQ2*2 を 350 μ l 添加し、11,000 $\times g$ で 3 分間遠心する。ろ液とコレクションチューブを捨てる。
5. NucleoSpin Blood QuickPure Column を 1.5 ml マイクロチューブにセットする。70°C に温めた 50 μ l の Buffer BE をシリカメンブレンの中央へ添加し、室温で 1 分間インキュベートした後、11,000 $\times g$ で 1 分間遠心する。得られたろ液を検体サンプルとする。

* 1 : [Proteinase K (製品コード 740569.10 の場合)]

Proteinase K (凍結乾燥品) 6 mg のチューブに Proteinase Buffer を 260 μ l 加えて溶解する。

* 2 : [Buffer BQ2]

Wash Buffer BQ2 (concentrate) 3 ml あたり、12 ml のエタノール (96 ~ 100%) を加える。

VI-2. リアルタイム PCR 反応液の調製と反応開始

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 用チューブに 20 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）*1 と設定する。

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
● Probe qPCR Mix-UNG	12.5 μ l
● Primer/Probe Mix 4 (BLV)	5 μ l
● ROX Reference Dye or ● Dye II*2	0.5 μ l
○ H ₂ O	2.0 μ l
Total	20 μ l

* 1 : 定量解析を行う場合は、スタンダードの反応数を加算します。

* 2 : Applied Biosystems 7500 Fast 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. サンプル（鋳型）を添加する（エリア 3 で実施）

1. で分注した反応液に以下のサンプル（鋳型）5 μ l を添加し、しっかりふたをする。次に、反応チューブを卓上遠心機で軽く遠心し、リアルタイム PCR 装置にセットする。

定性判定の場合

陰性コントロール : ○ H₂O
陽性コントロール : ● Positive Control DNA 2
サンプル : DNA 抽出溶液

定量解析の場合

陰性コントロール : ○ H₂O
スタンダード*3 : Positive Control DNA 2 (2 copies/ μ l)
Positive Control DNA 2 (20 copies/ μ l)
Positive Control DNA 2 (2×10^2 copies/ μ l)
Positive Control DNA 2 (2×10^3 copies/ μ l)
Positive Control DNA 2 (2×10^4 copies/ μ l)
● Positive Control DNA 2 (2×10^5 copies/ μ l)
サンプル : DNA 抽出溶液

* 3 : 検量線作成のための Positive Control DNA 希釈系列の作製手順（エリア 3 で実施）
定量解析を行う場合は、以下の手順で ● Positive Control DNA 2 を ○ PC Dilution Buffer で段階希釈し、スタンダードとして使用します。

- (1) 1.5 ml チューブを 5 本用意する。
(2×10^4 、 2×10^3 、 2×10^2 、20、2 copies/ μ l 用)
- (2) それぞれの 1.5 ml チューブに ○ PC Dilution Buffer を 45 μ l ずつ分注する。
- (3) ● Positive Control DNA 2 (2×10^5 copies/ μ l) を 5 μ l 分取し、 2×10^4 copies/ μ l のチューブに加え、均一に混和する。
- (4) 以降、順次 (3) の操作を繰り返し、希釈系列とする。
- (5) 各 5 μ l をリアルタイム PCR の鋳型として使用する。

3. 以下の条件で反応を実施する

注：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℃、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。

<Hold>

(25℃ 10分)

95℃ 30秒

<PCR: 45 サイクル>

95℃ 5秒

60℃ 30秒 (蛍光検出：FAM, HEX (VIC), ROX)

VI-3. 判定

【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 遺伝子	<i>pol</i> 遺伝子	FAM
ウシゲノム DNA	<i>RPPH1</i> 遺伝子	HEX (VIC)

【コントロール反応の確認】

	PCR の鋳型	<i>pol</i> 遺伝子	<i>RPPH1</i> 遺伝子
陽性コントロール	Positive Control DNA 2	+	+
陰性コントロール	H ₂ O	-	-

- ・ 陽性コントロールで *pol*、*RPPH1* 各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 *pol*、*RPPH1* 各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定性判定】

<陽性判定の例>

<i>pol</i> 遺伝子	<i>RPPH1</i> 遺伝子	判定
+	+	BLV 陽性

- ・ *pol* 遺伝子が検出された場合は、陽性判定となる。
- ・ *pol* 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。

<陰性判定の例>

<i>pol</i> 遺伝子	<i>RPPH1</i> 遺伝子	判定
-	+	検出限界以下
-	-	判定不能

- ・ *pol* 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、検出限界以下判定となる。
- ・ *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 阻害が生じている疑いがある。操作方法を再確認する。

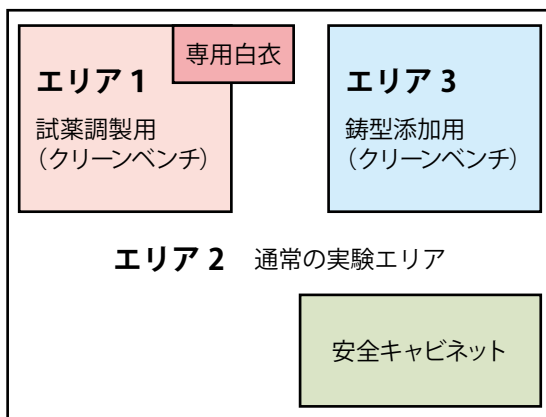
【測定対象サンプルの相対定量解析】

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、以下の手順で解析を行う。

1. *pol* 遺伝子検出系および *RPPH1* 遺伝子検出系の検量線を作成する。
2. 1. の検量線により、各測定対象サンプルの Ct 値から定量値を求める。
3. 以下の数式により相対定量値を求める。

$$\text{BLV 感染率 (\%)} = [\textit{pol} \text{ 遺伝子定量値} \div (\textit{RPPH1} \text{ 遺伝子定量値} / 2)] \times 100$$

VII. 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。

VIII. 関連製品

NucleoSpin Blood QuickPure (製品コード 740569.10/.50/.250)

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。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。
- ・ 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。
- ・ 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