

製品コード RC212A

研究用

Takara

**CSFV/ASFV
Direct RT-qPCR Mix & Primer/Probe
(with ROX Reference Dye)**

説明書

v202204Da_2

豚熱 (Classical swine fever, CSF) およびアフリカ豚熱 (African swine fever, ASF) は、それぞれ CSF ウィルス (以下 CSFV) および ASF ウィルス (以下 ASFV) が豚やイノシシに感染することで引き起こされる疾病です。

本製品は、リアルタイム RT-PCR 法により CSFV 遺伝子・ASFV 遺伝子およびインターナルコントロールとしてサンプル由来の swine GAPDH 遺伝子を同時に検出するためのプライマー、プローブ、RT-PCR 酵素からなる試薬 (研究用試薬) です。

なお、「豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針 令和 2 年 7 月 1 日農林水産大臣公表 (一部変更: 令和 3 年 10 月 1 日)」の「【参考】(別紙 1) 豚熱の診断マニュアル」、および「アフリカ豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針 令和 2 年 7 月 1 日農林水産大臣公表 (一部変更: 令和 3 年 10 月 1 日)」の「【参考】(別紙 1) アフリカ豚熱の診断マニュアル」では、リアルタイム PCR の実施に市販キットが利用できるとされており、本試薬はリアルタイム PCR 検査にも適用できます。

※ 本製品には、農林水産省委託研究事業「安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業」のうち課題解決型プロジェクト研究「官民・国際連携による ASF ワクチン開発の加速化」における国立研究開発法人農研機構との共同研究の成果が活用されています。

【特長】

- 核酸精製不要
前処理は Lysis Buffer S (製品コード 9811) とサンプルを混合するだけで完了します。
- 血清試料、臓器乳剤試料からの検出に対応
- 精製済み核酸を用いた検出も可能
- CSFV および ASFV 遺伝子を 1 反応で同時に検出可能
- インターナルコントロールとしてサンプル由来の swine GAPDH 遺伝子を同時に検出し、抽出の良否や反応阻害の有無を確認できます。
- Uracil-N-glycosylase (UNG) 酵素を採用しており、PCR 産物のキャリアオーバーによる偽陽性を防止できます。

【検出対象遺伝子】

検出対象遺伝子	プローブ標識
CSFV 遺伝子	Cyanine5 (レポーター) / ダーククエンチャー
ASFV 遺伝子	FAM (レポーター) / ダーククエンチャー
インターナルコントロール (IC)	HEX (レポーター) / ダーククエンチャー
(Reference Dye)	(ROX)

I. 内容 (100 反応分)

○ RT-qPCR Mix*1	2 ×	625 μl × 2
● Primer/Probe Mix (CSF/ASF) 1*2	10 ×	250 μl
● Primer/Probe Mix (GAPDH) 1*2	10 ×	250 μl
⊕ RNase Free H ₂ O		1.0 ml
● ROX Reference Dye II*2	50 ×	50 μl

* 1：反応に必要な酵素、基質等を含みます。

* 2：遮光に留意してください。

<注> Lot. AM11211A よりコンポーネントを変更し、● ROX Reference Dye を除きました。

II. 保存 - 20℃

III. キット以外に必要な試薬、器具、機器 (主なもの)

【簡易抽出試薬】

- ・ Lysis Buffer S (製品コード 9811)

● Lysis Buffer S	2 ×	500 μl
------------------	-----	--------

【ポジティブコントロール DNA】

- ・ CSFV/ASFV Positive Control DNA (製品コード RC215A)*1

EASY Dilution (for Real Time PCR) 1.0 ml × 4

● Positive Control DNA (CSF/ASF)*2	1 × 10 ⁶ copies/μl	25 μl
● Positive Control DNA (GAPDH)*2	1 × 10 ⁶ copies/μl	25 μl

* 1：大容量品 (CSFV/ASFV Positive Control DNA (製品コード RC215B)) も使用可能です。

* 2：他の試薬へのコンタミネーションに留意してください。

【器具】

- ・ 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のもの)
- ・ リアルタイム PCR 用のチューブ等

【機器】

- ・ リアルタイム PCR 装置
 - QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
 - Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
 - LightCycler480 System II (Roche Diagnostics 社)

※ 以下のリアルタイム PCR 装置をご使用の場合は、CSFV/ASFV Direct RT-qPCR Mix & Primer/Probe (製品コード RC211A) をお使いください。

- Thermal Cycler Dice® Real Time System III (Cy5) with PC (製品コード TP990)
- Thermal Cycler Dice Real Time System II (製品コード TP900/TP960：終売)

※ TP900/TP960 は、Cy5 オプションフィルターの追加が必要です。
Filter Unit (Cy5) for Thermal Cycler Dice Real Time System
(製品コード TP803：お問合せください)

- CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
- LightCycler 96 System (Roche Diagnostics 社)

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：本製品は研究用試薬です。
2. 測定結果：本製品は、試料中に含まれる標的遺伝子を増幅・検出することを目的に用いる試薬であり、不活化されたウイルスに由来する標的遺伝子も検出されます。また、Primer/Probe の配列内に遺伝子の変異や欠損／挿入が存在する場合には、標的遺伝子を検出できないことがあります。
(測定結果に起因する問題に関しては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、サンプルまたは検査に用いた器具等は 121℃、20 分以上の高圧蒸気滅菌を行うか次亜塩素酸ナトリウム等で消毒を行うなど、各施設の安全規定に従って適切な不活化処理を行ってください。
未使用の(あるいは余剰の)試薬を廃棄する際には大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必要に応じて適切な不活化処理を行ってから、廃棄物の処理および清掃に関する法律や条例等に従って処理してください。

V. 操作上の注意

1. RT-qPCR Mix は使用前に泡立っていないよう穏やかに転倒混和して均一に混合した後、軽くスピンドウンしてからご使用ください。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。
2. RT-qPCR Mix 以外の各試薬は、溶解後よく混合し、軽くスピンドウンしてからご使用ください。
3. Primer/Probe Mix (CSF/ASF) 1、Primer/Probe Mix (GAPDH) 1 および ROX Reference Dye II は、遮光に留意してください。
4. 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。
5. 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ヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、ディスポーザブル手袋を交換したり、マスクを着用するなど、操作時には細心の注意を払ってください。
6. 反応液の調製から試料の添加までの作業を行うにあたり、以下の 3 つのエリアを設定して、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、増幅反応後の産物が入ったチューブを開閉することは避けてください。
 - エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
 - エリア 2：試料の調製を行います。
 - エリア 3：反応液への試料の添加を行います。

本製品は反応終了後に電気泳動などで増幅産物を解析する必要はありません。実験室内でのコンタミネーション発生の原因となりますので、増幅反応後の産物をチューブから取り出すことはお勧めできません。

7. 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に設定されていない場合、誤判定の原因になります。装置の取扱説明書に従い、必要に応じて解析パラメーターの設定を確認してください。

VI. 操作

1. 試験に適した試料の種類とその核酸抽出方法について

- 1) 飼養豚および野生イノシシの血清試料および臓器乳剤（10%乳剤遠心上清）試料*1
新鮮かつ着色の少ない試料については、「2. 前処理」の方法に従い、核酸の粗抽出を行ってください。

* 1：扁桃、脾臓および腎臓（いずれも野生イノシシより採取）につき、培養液または PBS（リン酸緩衝生理食塩水）で調製した 10% 乳剤の遠心上清を試料として「2. 前処理」に記載の核酸の粗抽出を行い、検出に成功した実施例があります。

- 2) 溶血または濁りが認められる試料
別紙「溶血が確認された血清試料の取り扱いについて」をご参照ください。また、濁りが認められる試料については、核酸精製を実施することで結果が改善する場合があります。

核酸の精製には以下の製品がご利用いただけます。

【血清からの核酸精製】

NucleoSpin Virus（製品コード 740983.10/50/.250）

【臓器乳剤からの核酸精製】

NucleoSpin RNA（製品コード 740955.10/50/.250）

<注> 操作方法の詳細は、弊社ウェブサイトの本試薬「補足資料」をご参照ください。

- ・ NucleoSpin RNA の標準プロトコールにある「DNase 処理」工程は実施しないでください。ASFV は DNA ウイルスです。「DNase 処理」を行うと ASFV のゲノム DNA も分解されるため、本試薬で検出されなくなります。

※ 核酸精製サンプルを使用する場合には前処理は不要です。次頁の「3. リアルタイム RT-PCR 反応」から開始してください。核酸精製サンプル 2 μ l をリアルタイム RT-PCR の鋳型として添加します。

2. 前処理（核酸の粗抽出）（エリア 2 で実施）

- 1) 試料および ● Lysis Buffer S を以下の容量または 1：1 で混合する。ピペティングまたはタッピングで混合した後、軽くスピンドウンする。

[1 反応分の混合液]	使用量
試料	5 μ l
● Lysis Buffer S	5 μ l
Total	10 μ l

- 2) 室温で 5 分間静置する。

※ 5 分以上は放置せず、できるだけ速やかにリアルタイム RT-PCR 反応液に添加してください。5 分以上静置する場合は、氷上で保管してください。

※ 前処理後の溶液のうち、2 μ l をリアルタイム RT-PCR の鋳型として使用します。

3. リアルタイム RT-PCR 反応

【コントロール反応について】

結果の判定を正しく行うため、以下のコントロール反応を行ってください。
それぞれ、以下の溶液をリアルタイム RT-PCR 反応の鑄型として添加します。

陰性コントロール (NC)

本製品の H_2O RNase Free H₂O を「陰性コントロール」として使用します。

陽性コントロール (PC)

CSFV/ASFV Positive Control DNA (製品コード RC215A/B) の、● Positive Control DNA (CSF/ASF) および ● Positive Control DNA (GAPDH) を「陽性コントロール」として使用します。*2

* 2 : 定量解析を行う場合は、Positive Control DNA を添付の EASY Dilution (for Real Time PCR) で適宜段階希釈してください。

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 RT-PCR 用チューブまたはプレートに 23 μl 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) と設定する。

【QuantStudio 5 Real-Time PCR System および Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System の場合】

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
○ RT-qPCR Mix	12.5 μl
● Primer/Probe Mix (CSF/ASF) 1	2.5 μl
● Primer/Probe Mix (GAPDH) 1	2.5 μl
● ROX Reference Dye II	0.5 μl
H_2O RNase Free H ₂ O	5 μl
Total	23 μl

【LightCycler480 System II の場合】

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
○ RT-qPCR Mix	12.5 μl
● Primer/Probe Mix (CSF/ASF) 1	2.5 μl
● Primer/Probe Mix (GAPDH) 1	2.5 μl
H_2O RNase Free H ₂ O	5.5 μl
Total	23 μl

※ 反応液の調製は氷上で行ってください。

2) 試料、「陽性コントロール」および「陰性コントロール」を添加する。(エリア 3 で実施)

[1 反応分の添加量]

試料

前処理後の粗抽出液または核酸精製サンプル 2 μ l

陽性コントロール

● Positive Control DNA (CSF/ASF) 1 μ l

● Positive Control DNA (GAPDH) 1 μ l

陰性コントロール

⊕ RNase Free H₂O 2 μ l

3) 以下の条件で反応を実施する。

<逆転写反応>

(25°C 10分)*3

52°C 5分

95°C 10秒

< PCR : 45 サイクル >

95°C 5秒

56°C 30秒 (蛍光検出 : Cy5/FAM/VIC (ROX))*4)

* 3 : 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°C、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。

* 4 : LightCycler480 System II の場合は (Cy5/FAM/HEX) となります。

注 : QuantStudio 5 Real-Time PCR System、Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System を使用する場合は、Run mode を Fast に設定してください。

VII. 判定

【検出対象遺伝子と蛍光検出フィルター】

検出対象遺伝子	蛍光検出フィルター
CSFV 遺伝子	Cy5
ASFV 遺伝子	FAM
インターナルコントロール (IC)	VIC/HEX

【コントロール反応の正しい結果】

	CSFV (Cy5)	ASFV (FAM)	IC (VIC/HEX)
陽性コントロール	+	+	+
陰性コントロール	-	-	-

- ・ 陽性コントロールで CSFV、ASFV または IC 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。再試験を行う。
- ・ 陰性コントロールで CSFV、ASFV または IC 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上で再試験を行う。

【測定対象サンプルの判定】

<陽性判定の例>

CSFV (Cy5)	ASFV (FAM)	IC (VIC/HEX)	判定
+	-	+ / -	CSFV 陽性
-	+	+ / -	ASFV 陽性
+	+	+ / -	CSFV/ASFV 陽性

- ・ CSF または ASF が検出された場合は、IC の検出の有無に関わらず、陽性と判定する。

<陰性判定および判定不能の例>

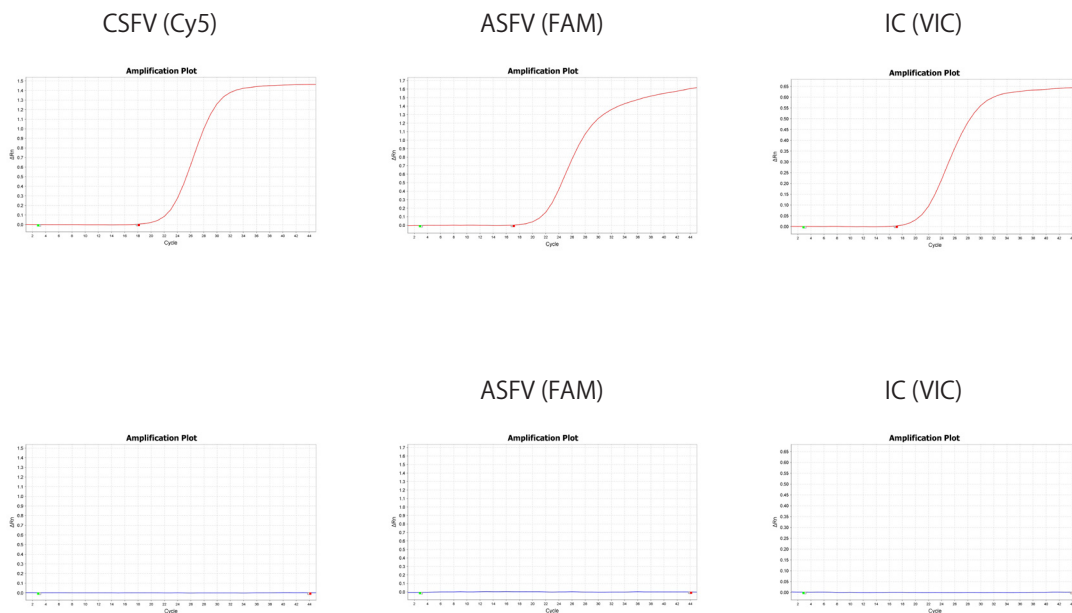
CSFV (Cy5)	ASFV (FAM)	IC (VIC/HEX)	判定
-	-	+	検出限界以下
-	-	-	判定不能

- ・ CSFV、ASFV 共に検出されなかった場合には、IC の結果を確認する。
- ・ IC が検出されていれば、検出限界以下となる。
- ・ IC が不検出の場合は、反応を開始する時点で試料中の核酸が分解されているか、夾雑物等により PCR 反応が阻害されている（もしくは核酸を精製した場合の抽出・精製操作が不適切である）可能性がある。核酸の粗抽出液を用いている場合は、改めて市販のキット等を用いて核酸を精製してから反応に供する。

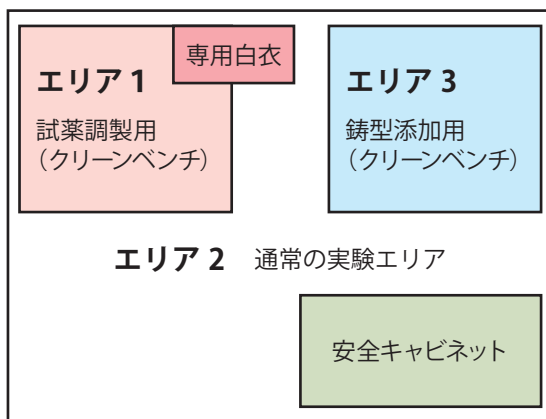
VIII. コントロール反応の例

<使用機種> QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

陽性コントロールの反応例



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。
標準試料の希釈もここで行う。

X. 参考文献

Nishi, T., Okadera, K., Fukai, K., Yoshizaki, M., Nakasuji, A., Yoneyama, S., and Kokuho, T. Establishment of a Direct PCR Assay for Simultaneous Differential Diagnosis of African Swine Fever and Classical Swine Fever Using Crude Tissue Samples. *Viruses*. (2022) **14**: 498.

XI. 関連製品

CSFV/ASFV Direct RT-qPCR Mix & Primer/Probe (製品コード RC211A)

Lysis Buffer S (製品コード 9811)

CSFV/ASFV Positive Control DNA (製品コード RC215A/B)

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。検査結果判定に起因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。
- Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。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