

製品コード RC214A

研究用

Takara

**CSFV/ASFV
Direct RT-qPCR Mix & Primer/Probe
(with ROX Reference Dye) Ver.2**

説明書

v202307Da

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、本製品に関してもリアルタイム PCR 検査への適用が可能です。

※ 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
- 血液 (全血)、血清、臓器乳剤からの検出に対応
- 精製済み核酸を用いた検出にも利用可能
- CSFV および ASFV 由来の遺伝子を 1 反応で同時に検出可能
- インターナルコントロール (IC) としてサンプル由来のブタ GAPDH 遺伝子を同時に検出することで、試料の良否や反応阻害の有無を確認可能
- Uracil-*N*-glycosylase (UNG) 酵素の採用により、PCR 産物のキャリアオーバーによる偽陽性反応を抑制

【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

※ 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。

I. 内容 (100 反応分)

○ RT-qPCR Mix*1	2 ×	625 μl × 2
● Primer/Probe Mix (CSF/ASF) 3*2	10 ×	250 μl
● Primer/Probe Mix (GAPDH) 3*2	10 ×	250 μl
● ROX Reference Dye II*2	50 ×	50 μl
⊕ RNase Free H ₂ O		1 ml

* 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。

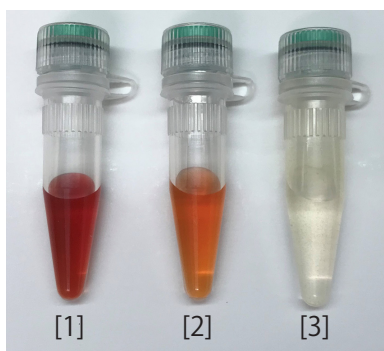
II. 保存 - 20℃

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 Ver.2（製品コード 9812）
 - Lysis Buffer S 2*¹ 2 × 500 μl
- Solution N（製品コード 9815）*²
 - Ⓝ Solution N 300 μl
 - Saline（生理食塩水） 1 ml × 3

* 1：Lysis Buffer S 2 は、以下写真の [2] や [3] のように、保存条件により赤色から橙色または黄色に変色する場合があります。融解後に橙色または黄色を呈する試薬は、核酸の抽出性能が低下している可能性があるため、使用しないでください。また、小分け分注することや、チューブの蓋を開けたまま保管することは避けてください。



- [1]：通常の Lysis Buffer S 2（赤色）
- [2]：橙色に変色した Lysis Buffer S 2
- [3]：黄色に変色した Lysis Buffer S 2

* 2：特許出願中です（2023年6月末時点）。

※ 被検試料の種類に応じた簡易抽出試薬の使い分けについては、「VI. 操作 1. 試料の種類と核酸抽出方法について」をご参照ください。

【ポジティブコントロール DNA】

- CSFV/ASFV Positive Control DNA Ver.2（製品コード RC216A）
 - EASY Dilution (for Real Time PCR) 1 ml × 4
 - Positive Control DNA (CSF/ASF) 2*³ 1 × 10⁶ copies/μl 25 μl
 - Positive Control DNA (GAPDH)*³ 1 × 10⁶ copies/μl 25 μl

* 3：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)
 - LightCycler 480 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 Ver.2 (製品コード RC213A) をお使いください。

- Thermal Cycler Dice® Real Time System IV (製品コード TP1000/TP1010/TP1030)
- 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)*4
- CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (製品コード 640231/640232)
- CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
- LightCycler 96 System (Roche Diagnostics 社)

* 4：TP900/TP960 は、Cy5 オプションフィルター搭載機のみです。

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 分間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 は使用前に泡立て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) 3、Primer/Probe Mix (GAPDH) 3 および ROX Reference Dye II は、蛍光色素の劣化を避けるため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. 試料の種類と核酸抽出方法について

1-1. 適用可能な試料の種類と保管方法

- 1) 全血 (抗凝固剤を含有するもの)
抗凝固剤としては EDTA を推奨 (ヘパリンも可)。検査時まで凍結保管する。
- 2) 全血 (抗凝固剤を使用せずに採取した血液)
採取後に凍結保管し、検査前に融解する。融解後は凝固していない液相を分取して使用する (融解時に攪拌や遠心分離操作は不要)。
- 3) 血清
検査時まで凍結保管する。
- 4) 臓器乳剤
扁桃、脾臓または腎臓の採取片を 9 倍量の培養液または PBS 中で破碎した 10% 乳剤を調製し、遠心分離後、上清を回収する。回収した上清は、検査時まで凍結保管する。

1-2. 各種試料に適した核酸抽出方法

- 1) 全血 (抗凝固剤を含有するもの) および 2) 全血 (抗凝固剤を使用せずに採取した血液)
・「2-1. Solution N による前処理」の方法に従い、核酸の粗抽出を行う。
- 3) 血清 および 4) 臓器乳剤
・溶血による着色や濁りが少ない試料は、「2-1. Solution N による前処理」または「2-2. Lysis Buffer S Ver.2 による前処理」の方法に従い、核酸の粗抽出を行う。
・着色や濁りが認められる試料は、「2-1. Solution N による前処理」または弊社ウェブサイトの本試薬の補足資料「Lysis Buffer S Ver.2 を用いた溶血試料の前処理方法について」を参照する。

表 1. 試料の種類と核酸の粗抽出法のとまとめ

試料の種類	試料の状態	Solution N	Lysis Buffer S Ver.2
1)および 2) 全血		○	×
3)血清 および 4)臓器乳剤	着色 (薄い)	○	○
	着色 (中程度)	○	△*1
	着色 (濃い)・濁りあり	○	×

* 1: 弊社ウェブサイトの本試薬の補足資料「Lysis Buffer S Ver.2 を用いた溶血試料の前処理方法について」をご参照ください。

※ PCR 阻害が生じた場合や、より高感度に検出する必要がある場合には、精製核酸を用いることも可能です。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の補足資料「核酸精製について」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 ウィルスです。「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。「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)

2-1. Solution N による前処理

1) 前処理試薬と試料の混合

- (1) PCR 用チューブ*2 に ㊟ Solution N を 2 μ l、㊿ Saline (生理食塩水) を 18 μ l 添加する。または、予め別の 1.5 ml チューブ等に必要数 + α 分の ㊟ Solution N と ㊿ Saline をまとめて調製 (用時調製) し、よく混合後、PCR 用チューブに 20 μ l ずつ分注してもよい。
- (2) (1) の PCR 用チューブに試料を 20 μ l 添加し、速やかに 15 回以上ピペッティング*3 して十分混合する。混合時に泡立たないように注意すること。
- (3) 軽くスピンドウンする。

[1 反応分の混合液]	使用量
㊟ Solution N	2 μ l
㊿ Saline	18 μ l
試料	20 μ l
Total	40 μ l

<注> 試料は必ず最後に添加してください。試料に ㊟ Solution N 原液を添加するとゲル化することがあります。

- * 2 : リアルタイム PCR 装置またはサーマルサイクラーに適合するチューブをご使用ください。形が適合していないと、熱処理時の温度不足により前処理が失敗することがあります (次頁* 6 : <前処理失敗例 (全血)>参照)。
- * 3 : タッピングやボルテックスで混合すると、スピンドウン後もチューブ壁面に試料が付着したままとなり、熱処理後に上清が取りにくくなることがあります。また、試料を添加する際にはチップをチューブの底付近に密着させ、ゆっくりとピペッティングすることで泡立てずに混和することができます。

2) リアルタイム PCR 装置またはサーマルサイクラーにて以下の熱処理を行う。

- (1) ブロック温度を 98℃まで上昇させ、保温状態にする。*4
- (2) 混合液の入った PCR 用チューブをセットし、98℃、3 分間の熱処理を行う。*4
- (3) 熱処理後、温度を 40℃以下に下げたから PCR 用チューブを取り出す。*5

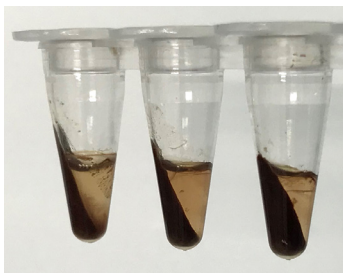
- * 4 : 全血等着色のある試料の場合、急速に加熱することが重要です。加熱に時間を要し 50℃~90℃で長く保持すると、前処理が失敗することがあります (次頁* 6 : <前処理失敗例 (全血)>参照)。ブロックを 98℃の保温状態にしておくことができない場合は、昇温速度が約 2℃/秒以上の装置を使用してください。
- * 5 : 98℃の熱処理完了直後にチューブを取り出すとチューブのフタが勢いよく開き、内容物が飛び出すことがありますのでご注意ください。

- 3) 卓上遠心機 ($\geq 1,200 \times g$ 、簡易型の卓上遠心機でも良い) にて 2 分間遠心する。遠心後、沈殿成分と透明な液体上清に分離していることを確認し*6、使用するまで氷上で静置する。

* 6：下記の<前処理成功例(全血)>の写真のように、上清に若干色味(黄または赤色)が残っていても、透明感があれば検査に支障はありません。

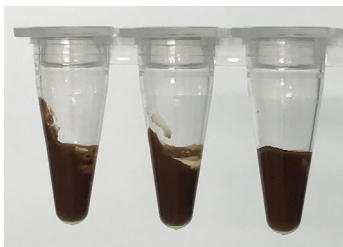
<前処理失敗例(全血)>の写真のように、全体が固形化して上清が分取できない場合や上清が黒色で透明感がない場合は、熱処理時の加熱不足等の原因が考えられます。

<前処理成功例(全血)>

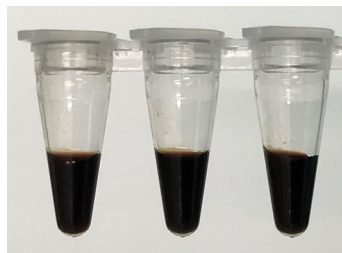


沈殿成分と透明な液体上清に分離

<前処理失敗例(全血)>



全体が固形化して、
上清がほとんど回収不能な事例



上清が黒色で透明度が低い事例

- 4) 沈殿成分を分取しないよう注意し、上清 2 μ l をリアルタイム RT-PCR の鋳型として使用する。*7

* 7：遠心操作後に上清が少ない場合には、以下の方法をお試しください。

- ・遠心力や遠心時間を変更する (e.g., $10,000 \times g$ 、5 分)。
- ・Solution N : Saline : 試料の混合比を 1 : 9 : 10 のまま、全体の量を増やす (e.g., Solution N 2.5 μ l + Saline 22.5 μ l + 試料 25 μ l)。

2-2. Lysis Buffer S Ver.2 による前処理

- 1) 試料と● Lysis Buffer S 2 を以下の容量または 1 : 1 で混合する。ピペッ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
血清および臓器乳剤 (上清)	5 μ l
● Lysis Buffer S 2	5 μ l
Total	10 μ l

- 2) 室温で 5 分間静置する。
- 3) 前処理後の溶液のうち、2 μ l をリアルタイム RT-PCR の鋳型として使用する。

※ 5 分経過後は氷上で保管し、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。

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 $\text{RNase Free H}_2\text{O}$ 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 Ver.2 (製品コード RC216A) の、● Positive Control DNA (CSF/ASF) 2 および ● Positive Control DNA (GAPDH) を「陽性コントロール」として使用します。*8

* 8 : 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。

※ 反応液の調製は氷上で行ってください。

【ROX Reference Dye を使用する場合*9】

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
○ RT-qPCR Mix	12.5 μl
● Primer/Probe Mix (CSF/ASF) 3	2.5 μl
● Primer/Probe Mix (GAPDH) 3	2.5 μl
● ROX Reference Dye II	0.5 μl
● RNase Free H ₂ O	5 μl
Total	23 μl

* 9 : 対象機種

- QuantStudio 5 Real-Time PCR System
- Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System
(ともに Thermo Fisher Scientific 社)

【ROX Reference Dye を使用しない場合*10】

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
○ RT-qPCR Mix	12.5 μl
● Primer/Probe Mix (CSF/ASF) 3	2.5 μl
● Primer/Probe Mix (GAPDH) 3	2.5 μl
● RNase Free H ₂ O	5.5 μl
Total	23 μl

* 10 : 対象機種

- LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics 社)

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) 2 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)*11

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))*12)

* 11 : 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。

* 12 : LightCycler 480 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

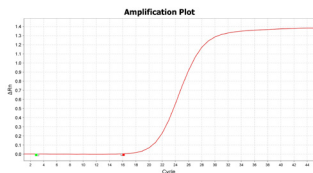
- ・ CSFV、ASFV 共に検出されなかった場合には、IC の結果を確認する。
- ・ IC が検出されていれば、検出限界以下となる。
- ・ IC が不検出の場合は、反応を開始する時点で試料中の核酸が分解されているか、夾雑物等により PCR 反応が阻害されている（もしくは核酸を精製した場合の抽出・精製操作が不適切である）可能性がある。核酸の粗抽出液を用いている場合は、改めて市販のキット等を用いて核酸を精製してから反応に供する。

VIII. コントロール反応の例

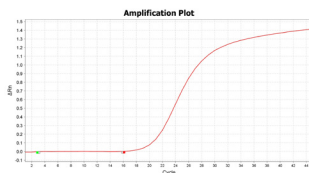
<使用機種> QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

陽性コントロールの反応例

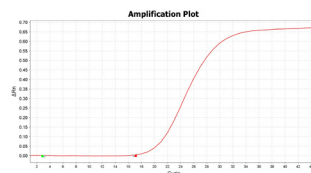
CSFV (Cy5)



ASFV (FAM)

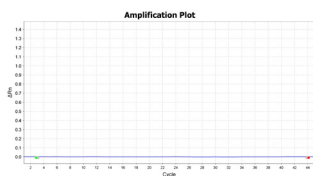


IC (VIC)

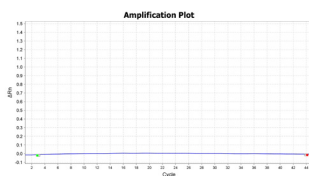


陰性コントロールの反応例

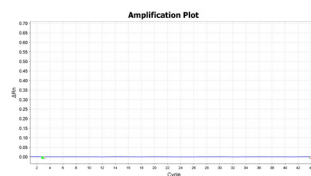
CSFV (Cy5)



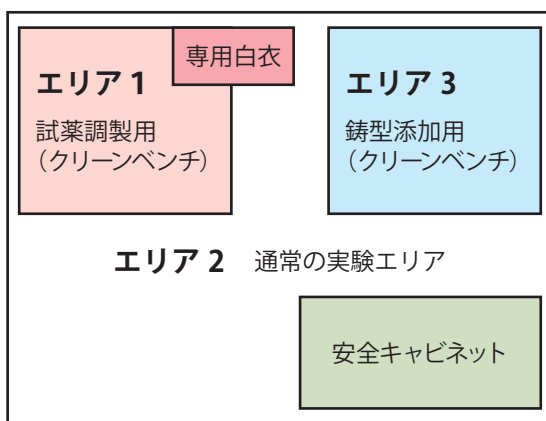
ASFV (FAM)



IC (VIC)



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 RT-PCR 反応液の調製、分注を行う。(鋳型となる核酸は一切持ち込まない)
- エリア 2：通常の実験エリア
検体の取扱いや核酸抽出を行う。
必要に応じて安全キャビネットを設置する。
- エリア 3：高濃度鋳型を扱うエリア
分注済みの反応液への鋳型の添加を行う。
鋳型を希釈する場合もここで行う。

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 Ver.2 (製品コード RC213A)
Lysis Buffer S Ver.2 (製品コード 9812)
Solution N (製品コード 9815)
CSFV/ASFV Positive Control DNA Ver.2 (製品コード RC216A)
CSFV (Genotype 1) Direct RT-qPCR Mix & Primer/Probe (製品コード RC221A)
CSFV (Genotype 1) Positive Control DNA (製品コード RC225A)

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。CronoSTAR 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