

製品コード RC221A

研究用

Takara

**CSFV (Genotype 1)
Direct RT-qPCR Mix & Primer/Probe**

説明書

v202303Da

豚熱 (Classical swine fever, CSF) は、CSF ウイルス (以下 CSFV) 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 遺伝子型 1 (Genotype 1 (Gen1)) に特徴的な遺伝子を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、本試薬は、「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)」の下に定められる「野生イノシシの豚熱検査における野外株とワクチン株の鑑別について」(令和 4 年 3 月 31 日付け 3 消安第 6955 号動物衛生課長通知) (令和 4 年 9 月 26 日改定) に即したリアルタイム PCR 法として使用可能です。

本製品を CSFV・ASFV 同時検出試薬 (X. 関連製品 参照) と併用して使用することで、病性鑑定試料における CSF と ASF (アフリカ豚熱、African swine fever) の判定、および CSFV 陽性試料に対する遺伝子型 1 の識別に渡る全体的な検査が可能です (図 1)。

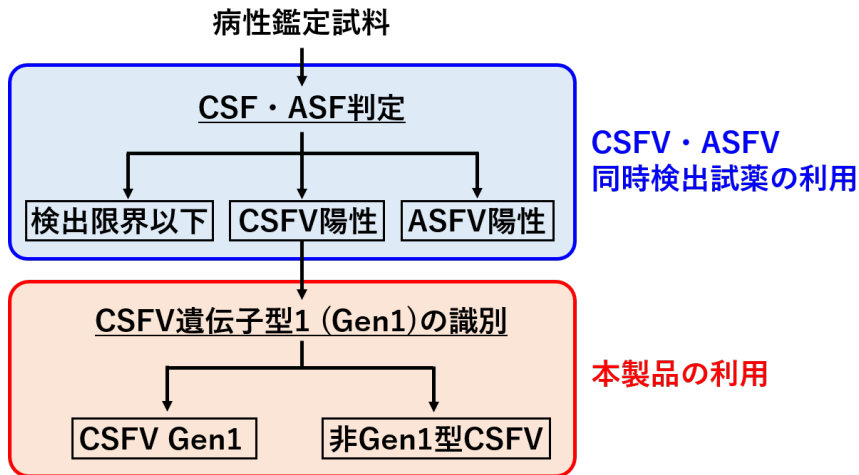


図 1. 病性鑑定試料の検査フロー例

※ 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
- ・ 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 遺伝子型 1 に特徴的な遺伝子 (CSFV Gen1 遺伝子) および CSFV 全般 (遺伝子型 1、2 および 3 型) に共通する遺伝子 (CSFV 遺伝子) を 1 反応で同時に検出可能
- ・ Uracil-N-glycosylase (UNG) 酵素の採用により、PCR 産物のキャリーオーバーによる偽陽性を防止

【検出対象遺伝子】

検出対象遺伝子	プローブ標識
CSFV Gen1 遺伝子	FAM (レポーター) / ダーククエンチャー
CSFV 遺伝子	Cyanine5 (レポーター) / ダーククエンチャー

I. 内容 (100 反応分)

○ RT-qPCR Mix* ¹	2 ×	625 μl × 2
● Primer/Probe Mix (CSF/Gen1)* 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°C

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 (Genotype 1) Positive Control DNA (製品コード RC225A)

EASY Dilution (for Real Time PCR) 1 ml × 4

● Positive Control DNA (CSF/Gen1)*¹ 1 × 10⁶ copies/μl 50 μl

* 1 : 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
 - 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*²)
 - CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
 - LightCycler 96 System (Roche Diagnostics 社)
 - LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics 社)
 - QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
 - Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

* 2 : 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/Gen1) 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) 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ってください。

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を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）

※ 核酸精製の操作方法は、弊社ウェブサイトの CSFV・ASFV 同時検出試薬に関する「補足資料」をご参照ください。

※ 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 μl をリアルタイム RT-PCR の鑄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 μl
● Lysis Buffer S	5 μl
Total	10 μl

2) 室温で 5 分間静置する。

※ 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。

※ 2 ページ図 1 で示した検査フローのように、CSFV・ASFV 同時検出試薬と本試薬を併用する場合、同じ前処理済みのサンプル（核酸の粗抽出試料）が使用できます。ただし、その際は、前処理後の粗抽出試料を -20℃ 以下で保存し、2 時間程度までを目安に使用するようになしてください。凍結した前処理済みの粗抽出試料は室温で融解させ、タッピングで混合した後、軽くスピンドウンしてから反応液に添加してください。添加前は氷上で保管し、できるだけ速やかにご使用ください。

※ 前処理後の溶液のうち、2 μl をリアルタイム RT-PCR の鑄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 (Genotype 1) Positive Control DNA (製品コード RC225A) の、 H_2O Positive Control DNA (CSF/Gen1) 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。

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
H_2O RT-qPCR Mix	12.5 μl
H_2O Primer/Probe Mix (CSF/Gen1)	2.5 μl
H_2O ROX Reference Dye II ^{*3}	0.5 μl
H_2O RNase Free H ₂ O	7.5 μl
Total	23 μl

* 3 : ROX で蛍光強度の補正を行うリアルタイム PCR 装置を使用する場合に添加します。添加しない場合は、代わりに RNase Free H₂O を 0.5 μl 添加してください。

※ 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 μl
陽性コントロール	
H_2O Positive Control DNA (CSF/Gen1)	2 μl
陰性コントロール	
H_2O RNase Free H ₂ O	2 μl

3) 以下の条件で反応を実施する。

注：Run speed が設定できる場合は、Fast に設定してください。

<逆転写反応>

(25°C 10分)*4

52°C 5分

95°C 10秒

< PCR : 45 サイクル >

95°C 5秒

60°C 30秒 (蛍光検出: Cy5/FAM (ROX*5))

* 4 : 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。

* 5 : ROX Reference Dye II を使用した場合に設定してください。

※ Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズの場合、Speed は Fast を選択し、解析する際に正規化補正を OFF にしてください。

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 Gen1 遺伝子	FAM
CSFV 遺伝子	Cy5

【コントロール反応の正しい結果】

	CSFV Gen1 (FAM)	CSFV (Cy5)
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 Gen1 または CSFV 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 Gen1 または CSFV 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】

まずは<判定 [1]>に従い判定を行い、判定結果に応じて<判定 [2]>に進むこと。

<判定 [1]>

CSFV Gen1 (FAM)	CSFV (Cy5)	判定
+	-*	CSFV 遺伝子型 1 (Gen1)
+	+	<判定 [2]>へ進む
-	+	非 Gen1 型 CSFV
-	-*	検出限界以下または判定不能

- ・ CSFV Gen1、CSFV ともに不検出の場合は、試料中の対象核酸量が検出限界以下であるか、または試料中の夾雑物等により 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。

*：CSFV・ASFV 同時検出試薬によって CSFV 陽性と判定された試料が、本試薬において CSFV (-) となった場合、試料中の対象核酸が分解している恐れがあります。

<判定 [2]>

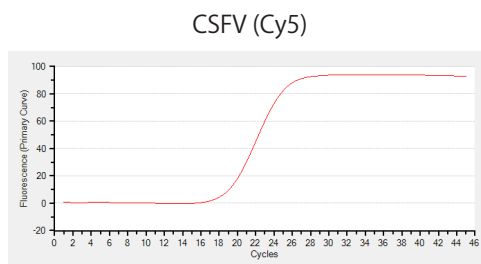
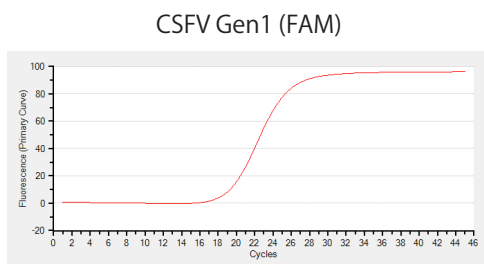
[CSFV Gen1 (FAM) の Ct 値] が [CSFV (Cy5) の Ct 値] より小さいまたは + 2.0 未満のとき
→ CSFV 遺伝子型 1 (Gen1)

[CSFV Gen1 (FAM) の Ct 値] が [CSFV (Cy5) の Ct 値] より 2.0 以上大きいとき
→ 非 Gen1 型 CSFV

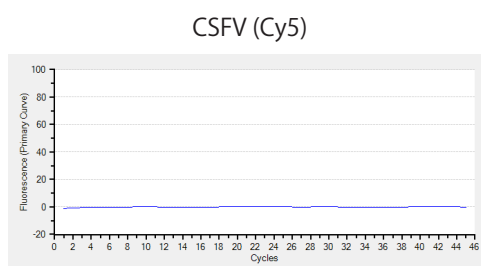
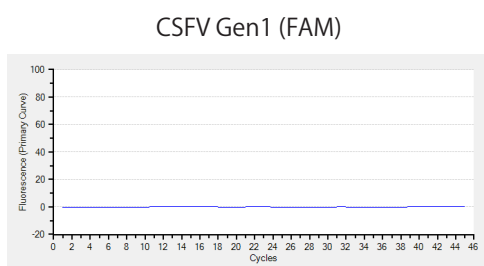
VIII. コントロール反応の例

<使用機種> Thermal Cycler Dice Real Time System III (Cy5) with PC

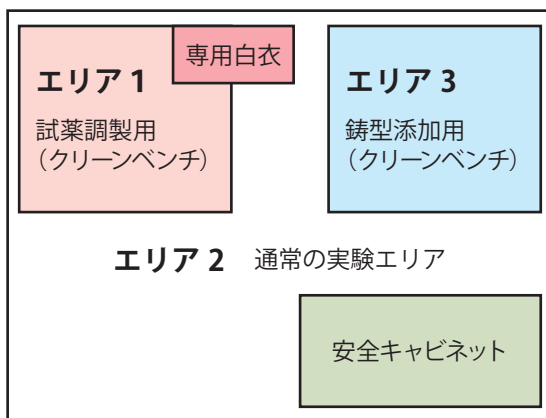
陽性コントロールの反応例



陰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. 関連製品

CSFV/ASFV Direct RT-qPCR Mix & Primer/Probe (製品コード RC211A)
CSFV/ASFV Direct RT-qPCR Mix & Primer/Probe (with ROX Reference Dye) (製品コード RC212A)
Lysis Buffer S (製品コード 9811)
CSFV (Genotype 1) Positive Control DNA (製品コード RC225A)
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)

XI. 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