製品コード RC250A

研究用

TaKaRa

BRDC Virus Direct Detection RT-qPCR Kit

説明書

v202406Da

牛呼吸器病症候群（Bovine Respiratory Disease Complex: BRDC）は、様々なウイルスと細菌の複合感染によって引き起こされる呼吸器疾患です。
本製品は、蛍光検出プローブを用いたリアルタイム PCR 法により、BRDC の主要な原因ウイルスである牛パラインフルエンザウイルス 3 型（BPIV3）、牛 RS ウイルス（BRSV）、牛伝染性鼻気管炎ウイルス（IBRV）、牛アデノウイルス 4 ～ 7 型（BAdV）、牛コロナウイルス（BCoV）、牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）の各遺伝子を検出するためのキットです。また、インターナルコントロール（IC）として牛 *RPPH1* 遺伝子をマルチプレックス PCR で同時に検出します。

※ 本製品は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門との共同研究を通じて製品化しました。

【 特長 】

- 牛鼻腔スワブ懸濁液と前処理液を混合し、熱処理を行うだけで核酸の簡易抽出が可能です。精製した核酸を使用することもできます。
- 牛呼吸器病症候群に関わる主要なウイルス 6 種の各遺伝子を、2 反応のマルチプレックスで同時に検出可能です。
- インターナルコントロール（IC）として検体サンプル由来の牛 *RPPH1* 遺伝子を同時に検出することで、検体サンプルの良否や PCR 阻害の有無を確認することができます。
- リアルタイム PCR の所要時間は約 50 分で、迅速に結果が得られます。
- Uracil-*N*-glycosylase（UNG）を採用しており、PCR 産物のキャリーオーバーによる偽陽性を防止できます。

【 検出対象遺伝子とプローブ標識 】

検出系（1）

検出対象遺伝子	プローブ標識
BPIV3 遺伝子	FAM / Dark Quencher
BRSV 遺伝子	HEX / Dark Quencher
IBRV 遺伝子	Cyanine5 / Dark Quencher

検出系（2）

検出対象遺伝子	プローブ標識
BAdV 遺伝子	FAM / Dark Quencher
BCoV 遺伝子	HEX / Dark Quencher
BVDV 遺伝子	Cyanine5 / Dark Quencher
牛ゲノム DNA *RPPH1* 遺伝子（IC）	ROX / Dark Quencher

I. 内容（各 50 回）

Solution Q	5×	200 μl
Probe RT-qPCR Mix (BRDC-V)＊1	2×	625 μl×2
Primer/Probe Mix 1 (BRDC-V)＊2	10×	125 μl
Primer/Probe Mix 2 (BRDC-V)＊2	10×	125 μl
H_2O		1 ml
Positive Control DNA 1 (BRDC-V)		30 μl
Positive Control DNA 2 (BRDC-V)		30 μl

＊1：反応に必要な dNTP Mixture、Mg^{2+}、酵素等を含みます。
＊2：遮光に留意してください。

II. 保存　－20℃

III. 本製品以外に必要な器具、機器（主なもの）

【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】
- リアルタイム PCR 装置
  - Thermal Cycler Dice® Real Time System IV with PC（製品コード TP1010）
  - CFX96 Real-Time PCR Detection System（Bio-Rad 社）
  - LightCycler 96 System（Roche Diagnostics 社）
  - Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific 社）
  - QuantStudio 5 Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific 社）　等

［注意］本製品は以下のリアルタイム PCR 装置には対応しておりません。
Thermal Cycler Dice Real Time System III（製品コード TP950/TP970/TP980/TP990）

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： 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、試料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 分間以上加熱滅菌処理、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 RT-qPCR Mix (BRDC-V) 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. Probe RT-qPCR Mix (BRDC-V) 以外の各試薬は、溶解後よく混合し、軽くスピンダウンしてからご使用ください。

3. Primer/Probe Mix 1 (BRDC-V) および Primer/Probe Mix 2 (BRDC-V) 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、検体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. 検体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。

6. 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（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：検体サンプルの調製を行います。
   ○ エリア 3：反応液へ検体サンプルの添加を行います。

   本製品は増幅反応と検出をリアルタイムで行うため、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。

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でない場合、誤判定の原因になります。リアルタイム PCR 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. 検体サンプルの調製（エリア 2 で実施）

1）牛鼻腔スワブを適切な溶液中で懸濁し、牛鼻腔スワブ懸濁液を調製する。＊1

＊ 1：FBS 含有の溶液で懸濁した場合、FBS 由来の BVDV が検出される可能性があります。

2）牛鼻腔スワブ懸濁液と 🟢 Solution Q を以下の容量で混合する。ピペッティングまたはタッピングで混合した後、軽くスピンダウンする。

[1 反応分の混合液]	使用量
牛鼻腔スワブ懸濁液	16 μl
🟢 Solution Q	4 μl
Total	20 μl

3）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。

95℃ 5 分（→ 4 ～ 10℃＊2）

＊ 2：前処理後は、速やかにリアルタイム RT-PCR 反応液に添加し、反応を開始してください。前処理後の溶液を一時保存する場合は、氷上または 4℃で保存してください。

4） 前処理後の溶液のうち、2 μl をリアルタイム PCR の鋳型として使用する。

※ 市販の DNA 抽出試薬等を使用して調製した精製核酸を使用することも可能です。

2. リアルタイム PCR 反応液の調製と反応開始

【 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 PCR 反応の鋳型として添加します。

陰性コントロール
・ 本製品の ○ H_2O 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
・ 本製品の 🔴 Positive Control DNA 1 (BRDC-V) を**検出系（1）（BPIV3/BRSV/IBRV 検出系）**の「陽性コントロール」として使用します。
・ 本製品の 🔵 Positive Control DNA 2 (BRDC-V) を**検出系（2）（BAdV/BCoV/BVDV/IC 検出系）**の「陽性コントロール」として使用します。

1）以下の両方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 用チューブまたはプレートに 23 μl ずつ分注する。必要本数は、検体サンプル数＋ 2 本（陽性コントロール、陰性コントロール）と設定する。

[検出系（1）の反応液]

試薬	使用量
● Probe RT-qPCR Mix (BRDC-V)	12.5 μl
● Primer/Probe Mix 1 (BRDC-V)	2.5 μl
○ H_2O	8.0 μl
Total	23.0 μl

[検出系（2）の反応液]

試薬	使用量
● Probe RT-qPCR Mix (BRDC-V)	12.5 μl
● Primer/Probe Mix 2 (BRDC-V)	2.5 μl
○ H_2O	8.0 μl
Total	23.0 μl

2）検体サンプル、「陽性コントロール」および「陰性コントロール」のいずれかを 2 μl 添加する。（エリア 3 で実施）

[検出系（1）]
検体サンプル　　：前処理後の溶液または精製核酸
陰性コントロール：○ H_2O
陽性コントロール：● Positive Control DNA 1 (BRDC-V)

[検出系（2）]
検体サンプル　　：前処理後の溶液または精製核酸
陰性コントロール：○ H_2O
陽性コントロール：● Positive Control DNA 2 (BRDC-V)

※ 反応液の調製および鋳型の添加は室温で実施可能ですが、鋳型添加後は速やかに反応を開始してください。

3）以下の条件で反応を実施する。

＜ Hold ＞
（25℃　10 分）＊3
52℃　5 分
95℃　10 秒
＜ PCR：45 サイクル＞
95℃　5 秒
56℃　30 秒（蛍光検出：FAM/ROX/HEX/Cy5）

＊ 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℃ 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。

※ Thermal Cycler Dice Real Time System IV では、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。正規化補正の設定変更方法は、弊社ウェブサイトをご参照ください（https://catalog.takara-bio.co.jp）。

※ Thermo Fisher Scientific 社の装置を使用する場合は、Passive Reference を None に設定してください。また、Run mode/Ramp speed を Fast に設定してください。

VII. 判定

陽性コントロールおよび陰性コントロールが正しく反応していることを確認し、必要に応じ適切な位置に閾値を設定した上で、測定対象の判定を行ってください。

【 検出対象遺伝子と蛍光検出フィルター 】

＜検出系（1）＞

検出対象遺伝子	蛍光検出フィルター
BPIV3 遺伝子	FAM
BRSV 遺伝子	HEX
IBRV 遺伝子	Cy5

＜検出系（2）＞

検出対象遺伝子	蛍光検出フィルター
BAdV 遺伝子	FAM
BCoV 遺伝子	HEX
BVDV 遺伝子	Cy5
RPPH1 遺伝子（IC）	ROX

【 コントロール反応の正しい結果 】

＜検出系（1）＞

	BPIV3	BRSV	IBRV
陽性コントロール	＋	＋	＋
陰性コントロール	－	－	－

＜検出系（2）＞

	BAdV	BCoV	BVDV	IC
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各検出対象および 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。再反応を行う。
- 陰性コントロールで各検出対象および 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うえで再反応を行う。

【 測定対象の判定 】

＜陽性判定の例＞

検出対象	IC	判定
＋	＋ / －	検出対象ウイルス陽性

- 対象となるウイルスが検出された場合は、IC の結果に関わらず陽性判定となる。

＜陰性判定の例＞

検出対象	IC	判定
－	＋	検出限界以下
－	－	判定不能

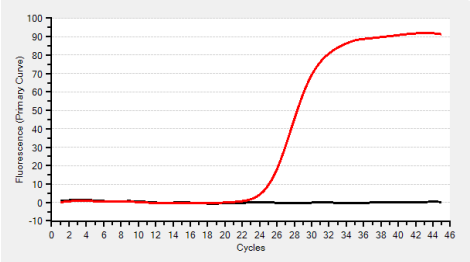
- 対象となるウイルスが検出されなかった場合には、IC の結果を確認する。
- IC が検出されていれば、検出限界以下となる。
- IC が不検出の場合は、核酸抽出が適切に行われていないか、PCR 阻害が生じている可能性がある。核酸の簡易抽出液を用いた場合は、改めて市販の DNA 抽出試薬等を用いて核酸を精製してから反応に供する。

VIII. コントロール反応の例

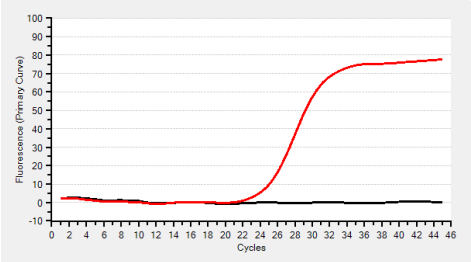
＜使用機種＞　Thermal Cycler Dice Real Time System IV
※ 陽性コントロールの反応例を赤線、陰性コントロールを黒線で示します。

検出系(1)

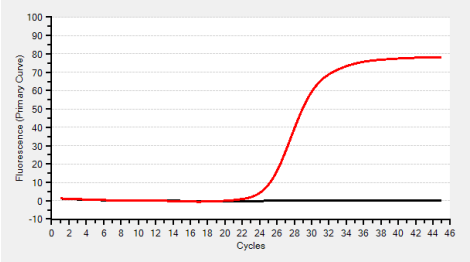
BPIV3（FAM）



BRSV（HEX）

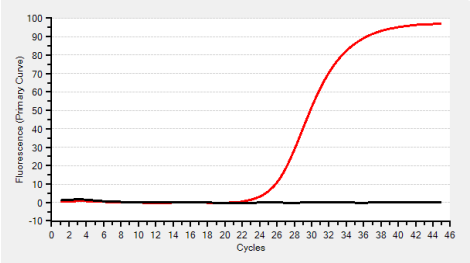


IBRV（Cy5）

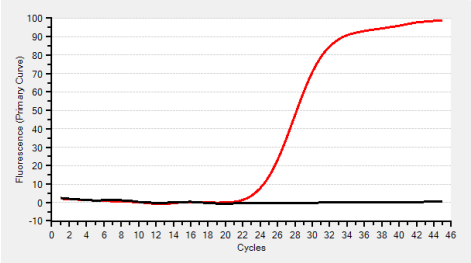


検出系(2)

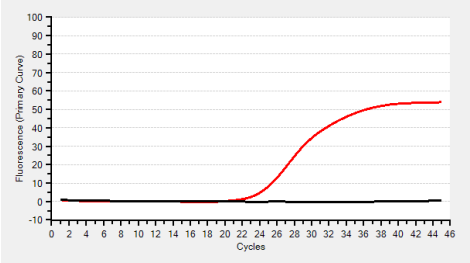
BAdV（FAM）



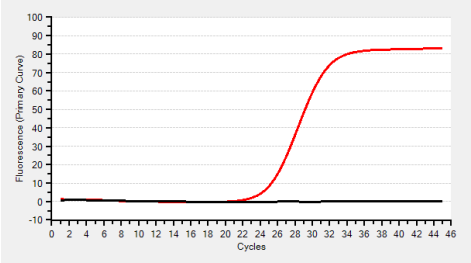
BCoV（HEX）



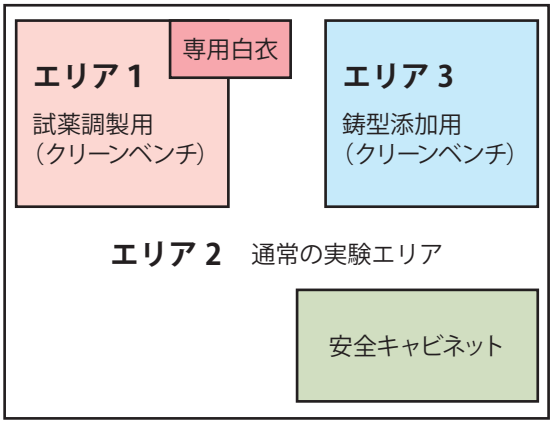
BVDV（Cy5）



IC（ROX）



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
検体サンプルの調製を行う。
必要に応じて安全キャビネットを設置する。

● エリア 3：高濃度核酸を扱うエリア
分注済みの反応液への鋳型の添加を行う。

X. 関連製品

Thermal Cycler Dice® Real Time System IV with PC（製品コード TP1010）

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。
- 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

v202406Da