

製品コード RC260A

研究用

TAKARA

**AIV RT-qPCR Mix & Primer/Probe
(H5/H7eu/M/H7am/IC)**

説明書

v202409Da

高病原性鳥インフルエンザ (High pathogenicity avian influenza: HPAI) は、鳥インフルエンザウイルス (Avian influenza virus: AIV) の一種である HPAI ウイルスの感染によって引き起こされる鳥類の疾病です。HPAI ウイルスが有するヘマグルチニンの亜型は H5 亜型または H7 亜型であることが知られています。本製品は、リアルタイム RT-PCR 法により H5 亜型 (H5)、H7 亜型ユーラシアタイプ (H7eu)、H7 亜型アメリカタイプ (H7am)、および AIV 全般に共通する Matrix (M) 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。インターナルコントロール (IC) により PCR 阻害の有無も同時に確認することができます。なお、H5 亜型および H7 亜型の遺伝子が検出された際には、関連法規に従って届出等の必要な措置を講じてください。

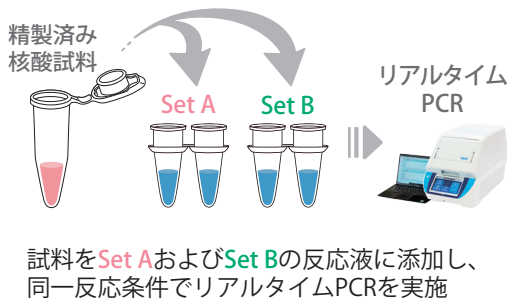
本製品は、令和 6 年 9 月 30 日付で発出された「高病原性鳥インフルエンザ及び低病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針に基づく遺伝子検査の方法について」(令和 6 年 9 月 30 日付 6 消安第 3679 号農林水産省消費・安全局動物衛生課長通知) に示された手法の一つとして国や都道府県が実施する病性鑑定時の遺伝子検査に利用可能です。

- ※ 特定家畜伝染病防疫指針に則った遺伝子検査を行う場合、検査方法に関する詳細は、農林水産省消費・安全局動物衛生課長通知に従ってください。
- ※ 本製品は、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「新たな感染症の出現に対してレジリエントな畜産業を実現するための家畜感染症対策技術の開発」における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の成果が活用されています。
- ※ 本取扱説明書では、便宜上、H5/H7eu/M を対象とする検出セットを Set A と記載し、H7am/IC を対象とする検出セットを Set B と記載します。

【特長】

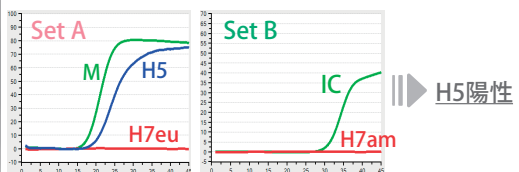
- ・ 精製済み核酸試料を用いたリアルタイム RT-PCR 法による遺伝子検査に利用可能
- ・ H5 亜型、H7 亜型の遺伝子を 2 セットのマルチプレックス反応で検出可能
- ・ インターナルコントロール (IC) を同時に検出することで、PCR 反応阻害の有無を確認可能
- ・ Uracil-N-glycosylase (UNG) 酵素により、PCR 産物のキャリーオーバーによる偽陽性反応を抑制

鋳型添加とリアルタイムPCR



結果判定

解析例 (詳細は「VII. 解析方法および判定」をご確認ください)



マルチプレックス反応により H5 亜型、H7 亜型の同時判定が可能

【検出対象遺伝子】

検出対象遺伝子	プローブ標識	検出セット
H5	Cyanine5 (レポーター) / ダーククエンチャー	Set A (製品コード RC261A)
H7eu	ROX (レポーター) / ダーククエンチャー	
M	FAM (レポーター) / ダーククエンチャー	
H7am	ROX (レポーター) / ダーククエンチャー	Set B (製品コード RC262A)
IC	FAM (レポーター) / ダーククエンチャー	

I. 内容 (各 100 反応分)

AIV RT-qPCR Mix & Primer/Probe (H5/H7eu/M) (製品コード RC261A)

● RT-qPCR Mix* ¹	2 ×	625 μl × 2
● Primer/Probe Mix Set A (H5/H7eu/M)* ²	10 ×	125 μl × 2
⊕ RNase Free H ₂ O		1 ml

AIV RT-qPCR Mix & Primer/Probe (H7am/IC) (製品コード RC262A)

● RT-qPCR Mix* ¹	2 ×	625 μl × 2
● Primer/Probe Mix Set B (H7am/IC)* ²	10 ×	125 μl × 2
⊕ 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. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器 (主なもの)

【ポジティブコントロール DNA】

- ・ AIV Positive Control DNA (製品コード RC266A)

● Positive Control DNA (H5/H7eu/M/H7am)*¹ 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 with PC (製品コード TP1010)
 - 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)
 - 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対応です。

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置を行ってから、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気をつけて十分に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。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 Set A (H5/H7eu/M) および Primer/Probe Mix Set B (H7am/IC) 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、マスクを着用したりするなど、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. 試料の調製

核酸精製を行った RNA 試料を使用してください。

2. 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。

陰性コントロール (NC)

本製品の H_2O RNase Free 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 (PC)

AIV Positive Control DNA (製品コード RC266A) の、 \bullet Positive Control DNA (H5/H7eu/M/H7am) を「陽性コントロール」として使用します。

1) 以下の反応液を調製する。(エリア 1 で実施)

必要数*1 + 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。

◆ Set A (H5/H7eu/M 検出用) (製品コード RC261A)

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
\bullet RT-qPCR Mix	12.5 μl
\bullet Primer/Probe Mix Set A (H5/H7eu/M)	2.5 μl
H_2O RNase Free H_2O	8.0 μl
Total	23.0 μl

◆ Set B (H7am/IC 検出用) (製品コード RC262A)

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
\bullet RT-qPCR Mix	12.5 μl
\bullet Primer/Probe Mix Set B (H7am/IC)	2.5 μl
H_2O RNase Free H_2O	8.0 μl
Total	23.0 μl

* 1: 基本的に 1 試料につき、Set A および Set B それぞれ duplicate (N=2) で検査してください。

※ 反応液の調製は氷上で行ってください。

※ ROX は対象遺伝子の検出に使用するため、以下のリアルタイム PCR 装置を用いる場合でも ROX Reference は添加しないでください。

- QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

- Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

※ Set B を使用せず Set A のみによる反応を行った場合、試料由来の PCR 阻害の有無を確認することができませんのでご注意ください。

- 2) Set A および Set B それぞれに対して、試料、「陽性コントロール」および「陰性コントロール」を以下のように添加する。(エリア 3 で実施)

[1 反応分の添加量] (Set A および Set B の反応液に対してそれぞれ添加を行う)

試料	
核酸精製サンプル	2 μ l
陽性コントロール	
● Positive Control DNA (H5/H7eu/M/H7am)	2 μ l
陰性コントロール	
Ⓞ RNase Free H ₂ O	2 μ l

- 3) チューブまたはプレートを軽くスピンドウンし、以下の条件で反応を実施する。

<逆転写反応>

(25°C 10分)*2
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*3/ROX/FAM)

* 2: 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。

* 3: Set B の反応のみを実施する場合、Cy5 の設定は不要です。

※ Run speed が設定できる場合は、Fast に設定してください。

VII. 解析方法および判定

【検出セットと検出対象遺伝子、蛍光検出フィルターの関係】

検出セット	検出対象遺伝子	蛍光検出フィルター
Set A (製品コード RC261A)	H5	Cy5
	H7eu	ROX
	M	FAM
Set B (製品コード RC262A)	H7am	ROX
	IC	FAM

【Ct 値の算出方法について】

Ct 値は、各検出対象遺伝子 (H5/H7eu/M/H7am/IC) ごとに、陽性コントロールの最終蛍光値の約 10% で Threshold (閾値) を設定し、Crossing Point 法 (閾値と増幅曲線の交点を Ct 値とする方法) で算出すること。ただし、各陽性コントロールを duplicate (N=2) 以上で反応した場合は、その中で最も高い最終蛍光値を採用すること。

以下に Threshold の設定値例を示す。

例	Set A			Set B	
	H5 (Cy5)	H7eu (ROX)	M (FAM)	H7am (ROX)	IC (FAM)
陽性コントロールの最終蛍光値	80	80	100	70	60
Threshold の設定値	8	8	10	7	6

※ ベースラインの乱れが原因の偽陽性判定に注意してください。

※ 機器によって Ct 値は Cq 値と表されることがあります。その場合、Ct を Cq と読み替えてください。

【機器ごとの解析方法】

◆ Thermal Cycler Dice Real Time System IV / III / II の場合

1. 画面の左枠「Plate Setup」より Target List および Sample List の設定を行う。Target List は蛍光検出フィルター／検出対象遺伝子ごとに設定すること。

Target List の設定例

ID *	Dye *	Name *	Color *
1	Cy5	SetA_H5	Blue
2	ROX	SetA_H7eu	Red
3	FAM	SetA_M	Green
4	ROX	SetB_H7am	Red
5	FAM	SetB_IC	Green

2. 画面上部の Tool Bar 「Analysis」より Analysis Settings を選択し、Normalization Amplification Plots を OFF (□) にする。
3. 反応後、画面の左枠より「Result/Analysis」を選択し、グラフ表示エリアの上部にある Filter (画面の左上) を選択して増幅曲線を確認する。
4. ベースラインが乱れる等、通常増幅曲線と異なるウェルは、「Selector」で対象ウェルを選択し Baseline を Manual で再設定する。

Baseline の Manual 設定方法

「Baseline」タブで Manual を選択し、Start 値は 8 以降に、End 値は増幅曲線が立ち上がる前の値を入力し、Apply ボタンをクリックする。立ち上がりがない場合は End 値を 30 とする。

5. 「Analysis Data」は Amplification Plots、「Fluorescence」は Primary Curve、「Analysis Setting」は To each target にチェックを入れた状態にて、以下のように Threshold の設定を行う。
 - 5.1) 「Selector」(上下各画面の右下) より Set A または Set B の陽性コントロールを選択する。
 - 5.2) グラフ表示エリアの上部にある Filter をいずれか (FAM or ROX or Cy5) 選択する。
 - 5.3) 「Threshold」タブで Manual を選択し、Fluorescence に陽性コントロールの最終蛍光値の約 10% の Fluorescence 値を入力し、Apply ボタンをクリックする。
 - 5.4) 上記 5.1) ~ 5.3.) を、Set A および Set B の各 Filter 計 5 種類で設定する。
6. 上下画面のいずれかで「Analysis Data」を「Text Report」にし、2 ウェルの平均 Ct (CP) 値を確認する。

◆ CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社) の場合

※ CFX Maestro ver1.1 の解析方法です。ソフトウェアの version 変更等により、解析方法が変更になる可能性がありますのでご注意ください。

1. Plate Setup より Target Names や well groups、Sample Names 等の設定を行う。Target Names は蛍光検出フィルター／検出対象遺伝子ごとに設定すること。また、Set A および Set B ごとに well group に分けて分析すること。
2. Cq Determination Mode を Single Threshold に設定する。
3. Cycle to Analyze で解析対象サイクル数を 5 から 45 に設定する。
4. Baseline Setting で Apply Fluorescence Drift Correction にチェックを入れる。
5. Quantification タブより増幅曲線を確認する。
6. ベースラインが乱れる等、通常増幅曲線と異なるウェルは、該当の蛍光 (FAM or ROX or Cy5) のみを選択したうえで、Settings > Baseline Threshold の Baseline Cycles より Baseline を Manual で再設定する。
7. Quantification タブにて、以下のように Threshold の設定を行う。
 - 7.1) Select Well Group (画面の右上) より Set A または Set B の well group を選択する。
 - 7.2) いずれかの蛍光 (FAM or ROX or Cy5) のみを選択する。
 - 7.3) Settings > Baseline Threshold の Single Threshold より User Defined を選択し、陽性コントロールの最終蛍光値の約 10% の RFU 値を入力し、OK ボタンをクリックする。
 - 7.4) 上記 7.1)～7.3) を、Set A および Set B の各蛍光の計 5 種類で設定する。
8. Quantification Data タブの Mean Cq 欄にて 2 ウェルの平均 Cq 値を確認する。

◆ QuantStudio 5 Real-Time PCR System および Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) の場合

※ QuantStudio Design & Analysis Software v1.5.1 および 7500 Software v2.3 の解析方法です。ソフトウェアの version 変更等により、解析方法が変更になる可能性がありますのでご注意ください。

1. Plate の Setup を行う。Target は蛍光検出フィルター／検出対象遺伝子ごとに設定し、Passive Reference は None を選択すること。
2. Amplification Plot 画面より波形が適切かを確認する。
3. ベースラインが乱れる等、通常増幅曲線と異なるウェルは、Analysis > Analysis Settings > Advanced Settings より Baseline を Manual で再設定する。
4. Amplification Plot 画面にて、以下のように Threshold の設定を行う。
 - 4.1) タブからいずれかの Target を選択する。
 - 4.2) Threshold の Auto のチェックを外し、陽性コントロールの最終蛍光値の約 10% の ΔRn 値を入力する。確認しづらい場合は必要に応じて「Graph Type」を Linear に変更すること。
 - 4.3) 上記 4.1)～4.2) を、計 5 種類の Target で設定する。Threshold 設定完了後は Analyze (Reanalyze) ボタンをクリックし、解析を行う。
5. 2 ウェルの平均 Ct 値を確認する。

【コントロール反応の正しい結果】

	Set A			Set B	
	H5 (Cy5)	H7eu (ROX)	M (FAM)	H7am (ROX)	IC (FAM)
陽性コントロール	+	+	+	+	+
陰性コントロール	Ct > 38	-	-	-	+

- ・ 陽性コントロールでいずれかの対象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。再試験を行う。
- ・ 陰性コントロールで表記以外の結果が出た場合は、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】

算出された Ct 値 (duplicate では平均値) を以下の表に当てはめて判定を行う。

Set A			Set B		判定
H5 (Cy5)	H7eu (ROX)	M (FAM)	H7am (ROX)	IC (FAM)	
$9 \leq Ct \leq 35$	- *1	$Ct \leq 40$	- *1	+	H5 亜型 AIV 陽性
- *1	$9 \leq Ct \leq 40$	$Ct \leq 40$	+ / -	+	H7 亜型 AIV 陽性 *2
- *1	+ / -	$Ct \leq 40$	$9 \leq Ct \leq 40$	+	
$Ct > 35$	$Ct > 40$	$Ct \leq 40$	$Ct > 40$	+	AIV 陽性
$Ct > 35$	$Ct > 40$	$Ct > 40$	$Ct > 40$	+	AIV 陰性
+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	-	判定不能

* 1 : 鋳型の濃度や配列類似性等によっては、異なるヘマグルチニンの型で弱い立ち上がりが見られる可能性があります。特に、高濃度の分離ウイルスを用いる場合には、核酸精製後に 100 ~ 1,000 倍に希釈したサンプルも合わせて遺伝子検査に供してください。

* 2 : H7 亜型 AIV 陽性の試料では、H7eu および H7am のどちらも $9 \leq Ct \leq 40$ となる場合があります。

例	H5 (Cy5)	H7eu (ROX)	M (FAM)	H7am (ROX)	IC (FAM)	判定
試料 1	Ct=20	Ct=42	Ct=19	Ct=42	+	H5 亜型 AIV 陽性
試料 2	Ct=39	Ct=20	Ct=18	Ct=37	+	H7 亜型 AIV 陽性

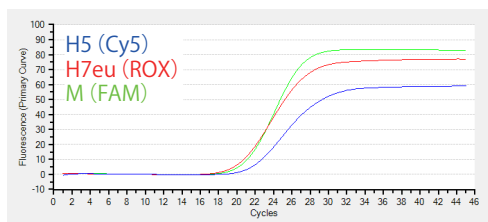
- ・ H5/H7eu/H7am において Ct 値が 9 未満の場合は、試料を RNase Free H₂O で 10 倍希釈し、再検査を実施する。
- ・ H5/H7eu/H7am において明瞭な蛍光増幅が duplicate の両方のウェルで認められ、Ct 値が陽性判定値上限を超える場合、再検査を行う。
- ・ IC が不検出 (-) の場合は、夾雑物等により PCR 反応が阻害されているか、核酸精製時の操作が不適切である可能性がある。改めて核酸を精製してから反応に供する。
- ・ H5/H7eu/H7am において duplicate の一方のウェルのみで、明瞭な蛍光増幅が認められた場合は、Ct 値の如何に関わらず、再検査を実施する。

VIII. コントロール反応の例

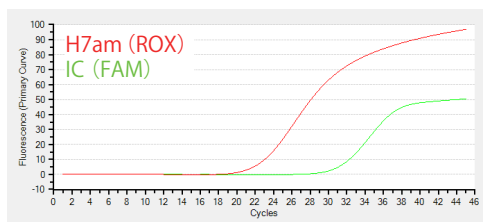
<使用機種> Thermal Cycler Dice Real Time System III

陽性コントロールの反応例

Set A (製品コード RC261A)

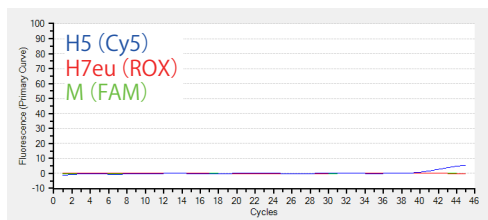


Set B (製品コード RC262A)

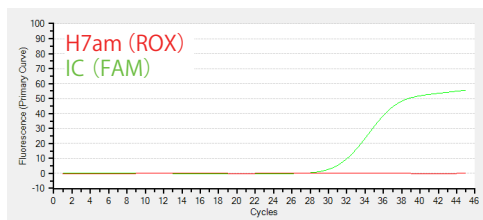


陰性コントロールの反応例

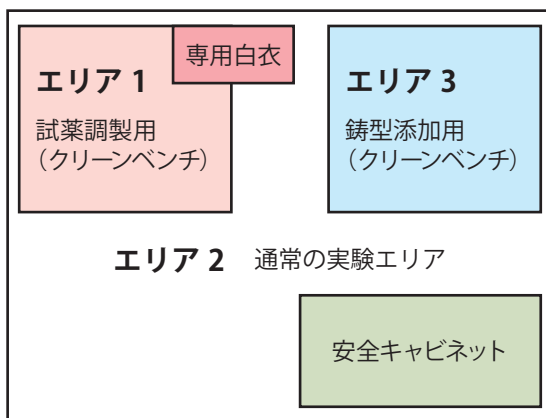
Set A (製品コード RC261A)



Set B (製品コード RC262A)



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. 関連製品

Thermal Cycler Dice® Real Time System IV with PC (製品コード TP1010)
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。
- ・本説明書に記載されたリアルタイム PCR 装置は、タカラバイオ株式会社が本製品の反応性を独自に確認しているものです。本製品は、タカラバイオ株式会社が独自に製造・販売する製品であり、タカラバイオ株式会社以外のリアルタイム PCR 装置のメーカーが、本製品での反応性や測定結果を保証するものではありません。

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