

製品コード RC400A

研究用

---

**TAKARA**

**Adenovirus Primer Mix**

---

説明書

v202208Da

本製品は、リアルタイム PCR 法により、検体由来の精製 DNA からアデノウイルス (Adenovirus) を検出するためのプライマーセットです。国立感染症研究所「病原体検出・検査マニュアル 腸管アデノウイルス (感染性胃腸炎) 令和 4 (2022) 年 5 月 Ver.2 (以下、病原体検出マニュアル)」に記載されているプライマー配列を採用しています。

本製品と弊社のリアルタイム PCR 試薬 TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B) を組み合わせることにより、病原体検出マニュアルの内容に沿ったリアルタイム PCR 法によるアデノウイルスの検出が可能です。

#### 【本製品のプライマー配列について】

病原体検出マニュアルに記載されているものと同じ配列のプライマーを使用しています。

名称	配列 (5' to 3')
Hexon3-Ad40-41	GACATGACTTTTGAGGTSGAYCCCATGGA
Hexon4-Ad40-41	CGGCCGAGAACGGCGTACGSAGGTA

#### 【検出対象遺伝子】

- ・アデノウイルス Hexon 遺伝子

### I. 内容 (100 回分)

● Ad Primer Mix                      10 ×                      250 μl

### II. 保存                      - 20°C

### III. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器 (主なもの)

#### 【試薬】

- ・核酸抽出キット\*
- ・リアルタイム PCR 試薬\*
  - TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B)
- ・コントロール DNA
  - Adenovirus Positive Control DNA (製品コード RC405A)

\* : 詳細は病原体検出マニュアルをご参照ください。

#### 【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)
- ・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 III with PC (製品コード TP970)
  - CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
  - LightCycler 96 System/LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics 社)
  - Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
  - QuantStudio 5 Real-Time PCR System (96-well, 0.2 mL block) (Thermo Fisher Scientific 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

本製品はウイルス遺伝子を検出する試薬であるため、感染性のない不活化されたウイルスを検出する可能性があります。また、Primerの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。  
(反応結果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、サンプル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物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. Ad Primer Mix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。使用後は-20℃に保存してください。

2. 融解した試薬はただちに氷上に置いてください。

3. 反応液の調製、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極力防止してください。

4. 万一、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着脱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。

5. 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(VIII. 補足: エリア分けについてを参照)。どのエリアにおいても、増幅産物の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: 検体の調製を行います。

○ エリア3: 反応液へ検体の添加を行います。

本製品では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。

6. 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。必要に応じてリアルタイムPCR装置の取扱説明書に従い、解析パラメーターのManual設定を行ってください。

---

## VI. 操作

### VI-1. ウイルスゲノム DNA の抽出

検査材料の採取および取り扱い、ウイルスゲノム DNA の抽出方法等の詳細につきましては、病原体検出マニュアルをご参照ください。

### VI-2. リアルタイム PCR 反応

TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B) および Adenovirus Positive Control DNA (製品コード RC405A) を組み合わせて使用する場合の操作法を以下に示します。結果の判定を正しく行うため、サンプル DNA の測定に加えて、陽性コントロール反応と陰性コントロール反応を同時に行います。

【注意】以下の操作は氷上で実施してください。また、調製後は速やかに反応を開始してください。

- リアルタイム PCR 反応液のマスターミックスの調製（エリア 1 で実施）  
以下の組成で、必要数 +  $\alpha$  分のマスターミックスを調製する。

【ROX Reference Dye II を使用しない場合\*1】

[ 1 反応分のマスターミックス ]

試薬	使用量
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> II (Tli RNaseH Plus) (2×)	12.5 $\mu$ l
● Ad Primer Mix (10×)	2.5 $\mu$ l
滅菌精製水	8 $\mu$ l
Total	23 $\mu$ l

\* 1 : 対象機種

- Thermal Cycler Dice Real Time System III with PC (製品コード TP970)
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
- LightCycler 96 System/LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics 社)

【ROX Reference Dye II を使用する場合\*2】

[ 1 反応分のマスターミックス ]

試薬	使用量
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> II (Tli RNaseH Plus) (2×)	12.5 $\mu$ l
● Ad Primer Mix (10×)	2.5 $\mu$ l
ROX Reference Dye II (50×)	0.5 $\mu$ l
滅菌精製水	7.5 $\mu$ l
Total	23 $\mu$ l

\* 2 : 対象機種

- Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System
- QuantStudio 5 Real-Time PCR System (96-well, 0.2 mL block)  
(ともに Thermo Fisher Scientific 社)

- 
- 2) マスターミックスの分注 (エリア 1 で実施)  
リアルタイム PCR 用のチューブにマスターミックスを 23  $\mu$ l ずつ分注する。
  - 3) 鑄型の添加 (エリア 3 で実施)  
サンプル DNA、陰性コントロール (滅菌精製水)、陽性コントロール (Ad Positive Control DNA) を 2) で分注したマスターミックスに 2  $\mu$ l 添加し、しっかりと蓋をする。
  - 4) リアルタイム PCR 反応の実施  
以下の条件で反応を実施する。

[注意] 反応前に必ずチューブやプレートをスピンドウンし、内壁への反応液の付着や気泡がないことを確認してください。気泡があると、蛍光検出に影響を及ぼす場合があります。

<反応条件>

初期変性

94°C 1分30秒

95°C 30秒

PCR: 45 サイクル

95°C 5秒

60°C 30秒 (蛍光検出: FAM (/ROX)\*)

融解曲線分析

\* : ROX Reference Dye II を使用した場合に設定する。

※ Thermal Cycler Dice Real Time System III 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。

※ Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System、QuantStudio 5 Real-Time PCR System では、Run mode/Ramp speed の設定は Fast にしてください。

## VII. 判定

反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、解析パラメータが適切であることを確認したのち\*1、Tm 値および Ct 値を算出する。

\* 1: 解析方法は、ご使用のリアルタイム PCR 装置の取扱説明書をご参照ください。

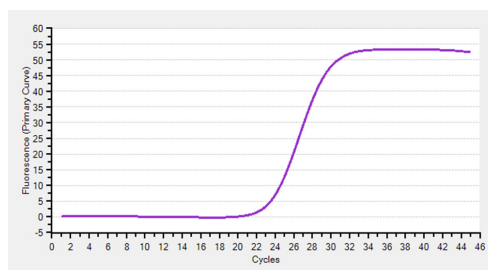
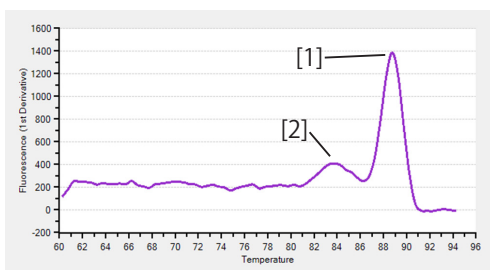
### 【検出対象遺伝子と Tm 値】

検出対象遺伝子	Tm 値*2
Hexon 遺伝子	88.7°C

\* 2: Ad Positive Control DNA を鑄型として Thermal Cycler Dice Real Time System III with PC (製品コード TP970) で測定した場合の参考値です。アデノウイルスの種類やリアルタイム PCR 装置の機種、PCR 産物の増幅量等により、Tm 値が前後する場合があります。

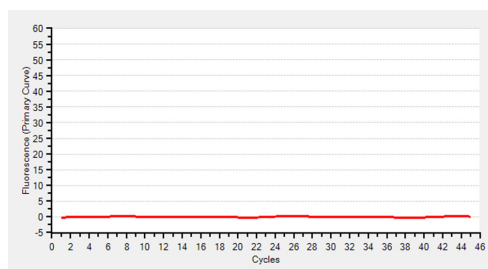
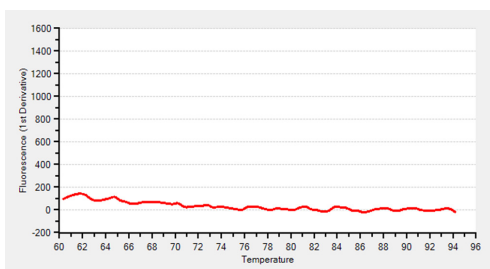
## 【コントロール反応の確認】

### <陽性コントロールの反応例>



- [1] 88℃付近に明確なピークがあることを確認する。  
 [2] 85℃以下に低いピークが認められる場合がある。

### <陰性コントロールの反応例>



- 88℃付近にピークがないことを確認する。

### <正しい反応結果とトラブルシューティング>

	FAM (Hexon 遺伝子)
陰性コントロール (滅菌精製水)	—
陽性コントロール (Ad Positive Control DNA)	+

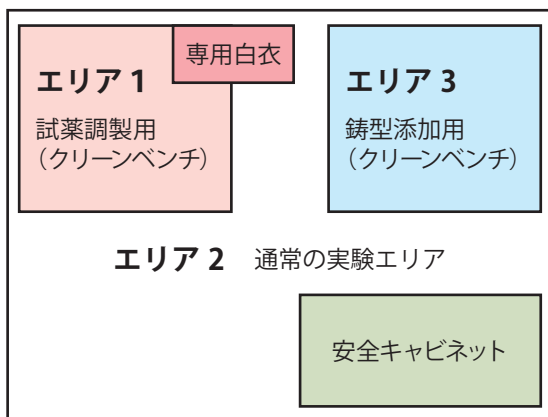
- 陰性コントロールは、不検出であることを確認する。検出された場合は、コンタミネーションの疑いがある。反応液の調製場所や器具類を消毒したうえで再反応を行う。
- 陽性コントロールについては、FAM で検出されることを確認する。検出されない場合、何らかの原因でリアルタイム PCR が正常に行われていない。再反応を行う。

### 【サンプルの測定結果の判定】

FAM (Hexon 遺伝子)	判定
+ *3	陽性
—	検出限界以下

\* 3：アデノウイルスの種類により、Tm 値や Ct 値に差が生じる場合があります。

## VIII. 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。

## IX. 参考文献

国立感染症研究所「病原体検出・検査マニュアル 腸管アデノウイルス (感染性胃腸炎) 令和 4 (2022) 年 5 月 Ver.2」

## X. 関連製品

TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B)  
Adenovirus Positive Control DNA (製品コード RC405A)  
Adenovirus 40/41 qPCR Typing Kit (製品コード RC410A)  
Adenovirus 40/41 Positive Control DNA (製品コード RC415A)  
Thermal Cycler Dice® Real Time System III with PC (製品コード TP970)

## 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。
- ・TB Green、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。*Premix Ex Taq* 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**