

製品コード RC421A

研究用

Takara

**Monkeypox virus
qPCR Detection Kit (WA/CB)**

説明書

v202209Da

本製品は、プローブを用いるリアルタイム PCR 法により、検体由来の精製 DNA からサル痘ウイルス (Monkeypox virus) の西アフリカ型 (WA) およびコンゴ盆地型 (CB) を個別に検出するためのキットです。プライマー・プローブは、2010 年に Yu Li ら* によって報告された MPXV West African specific (G2R_WA) assay および MPXV Congo Basin specific (C3L) assay の配列を使用しています。

* : *J Virol Methods*. 2010 Oct; **169**(1): 223-227.

【特長】

- プローブによる検出法を採用しており、西アフリカ型およびコンゴ盆地型を明確に判別可能です。
- 反応時間は最短で約 50 分。迅速に結果が得られます。
- ウラシル-N-グリコシラーゼ (UNG) を反応系に添加しており、PCR 増幅産物のキャリアオーバーによる偽陽性を防止できます。

【検出対象とプローブ標識】

検出対象	プローブ標識
西アフリカ型 G2R 遺伝子	FAM / Dark Quencher
コンゴ盆地型 C3L 遺伝子	FAM / Dark Quencher

I. 内容 (100 回分 (各 50 回))

● qPCR Premix* ¹	2 ×	625 μl × 2
● MPXV Primer/Probe Mix (WA)* ²	10 ×	125 μl
● MPXV Primer/Probe Mix (CB)* ²	10 ×	125 μl
● ROX Reference Dye II* ³	50 ×	50 μl
⊕ H ₂ O		1.0 ml

* 1 : 酵素、基質等を含みます。

* 2 : 蛍光標識プローブを含んでいるため、遮光に留意してください。

* 3 : 蛍光物質を含んでいるため、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）

【試薬】

- ・核酸抽出キット*
- ・コントロール DNA
 - Monkeypox virus Positive Control DNA (WA/CB) (製品コード RC426A)

*：詳細は国立感染症研究所「病原体検出マニュアル サル痘ウイルス 第2版 令和4年8月（以下、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/Probe 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

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. 使用時には、泡立てないよう穏やかに転倒混合し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬が完全に混合されていない場合、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、qPCR Premix の保存中に沈殿することがあります。軽く手で暖めるか室温にしばらく置いた後、転倒混合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. 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 (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

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 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)

Monkeypox virus Positive Control DNA (WA/CB) (製品コード RC426A) のうち、西アフリカ型 (WA) 検出系には ● MPXV Positive Control DNA (WA) を、コンゴ盆地型 (CB) 検出系には ● MPXV Positive Control DNA (CB) を「陽性コントロール」として使用します。

[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 + α 分のマスターミックスを調製する。

【西アフリカ型 (WA) 検出系】

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
● qPCR Premix (2×)	12.5 μl
● MPXV Primer/Probe Mix (WA) (10×)	2.5 μl
H_2O	8 μl
Total	23 μl

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
● qPCR Premix (2×)	12.5 μl
● MPXV Primer/Probe Mix (WA) (10×)	2.5 μl
● ROX Reference Dye II (50×)	0.5 μl
H_2O	7.5 μl
Total	23 μl

【コンゴ盆地型 (CB) 検出系】

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
● qPCR Premix (2×)	12.5 μl
● MPXV Primer/Probe Mix (CB) (10×)	2.5 μl
⊕ H ₂ O	8 μl
Total	23 μl

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
● qPCR Premix (2×)	12.5 μl
● MPXV Primer/Probe Mix (CB) (10×)	2.5 μl
● ROX Reference Dye II (50×)	0.5 μl
⊕ H ₂ O	7.5 μl
Total	23 μl

* 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)

* 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 μl ずつ分注する。

3) 鑄型の添加 (エリア 3 で実施)

以下の鑄型を 2) で分注したマスターミックスに添加し、しっかりとふたをする。

【西アフリカ型 (WA) 検出系】

検体から抽出した DNA 溶液	2 μl
● MPXV Positive Control DNA (WA) (陽性コントロール)	2 μl
⊕ H ₂ O (陰性コントロール)	2 μl

【コンゴ盆地型 (CB) 検出系】

検体から抽出した DNA 溶液	2 μl
● MPXV Positive Control DNA (CB) (陽性コントロール)	2 μl
⊕ H ₂ O (陰性コントロール)	2 μl

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

95℃ 30 秒

PCR：45 サイクル

95℃ 5 秒

60℃ 30 秒 (蛍光検出：FAM(/ROX)*3)

* 3：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 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

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た上で、測定対象サンプルの判定を行ってください。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。

1. コントロール反応の確認

【西アフリカ型 (WA) 検出系】

	FAM (西アフリカ型)
陽性コントロール (MPXV Positive Control DNA (WA))	+
陰性コントロール (H ₂ O)	-

【コンゴ盆地型 (CB) 検出系】

	FAM (コンゴ盆地型)
陽性コントロール (MPXV Positive Control DNA (CB))	+
陰性コントロール (H ₂ O)	-

- ・ 陽性コントロールは、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。
- ・ 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除染したうえで再反応を行う。

2. サンプルの測定結果の判定

【西アフリカ型 (WA) 検出系】

FAM (西アフリカ型)	判定
+	西アフリカ型陽性
-	検出限界以下

【コンゴ盆地型 (CB) 検出系】

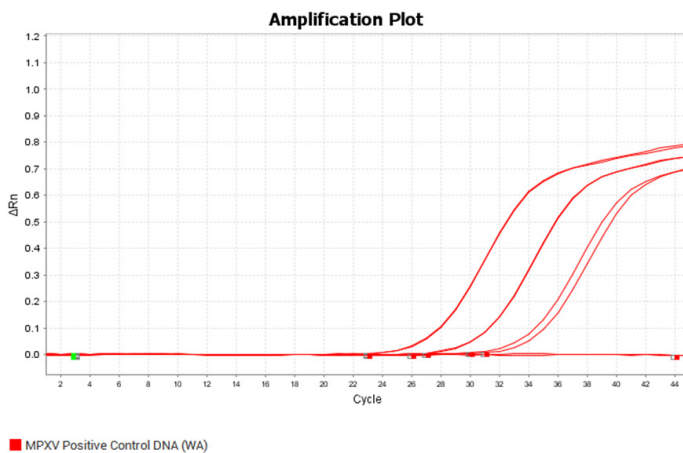
FAM (コンゴ盆地型)	判定
+	コンゴ盆地型陽性
-	検出限界以下

VIII. 実験例

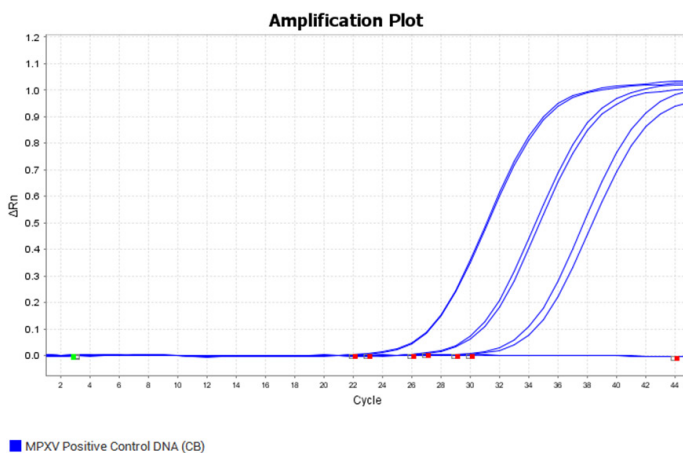
MPXV Positive Control DNA (WA) または MPXV Positive Control DNA (CB) を適宜希釈し、1 反応当たり 0 (Negative Control)、50、500、5,000 コピーを鋳型として使用した場合の反応例を以下に示す。

(qPCR 装置は QuantStudio 5 Real-Time PCR System を使用)

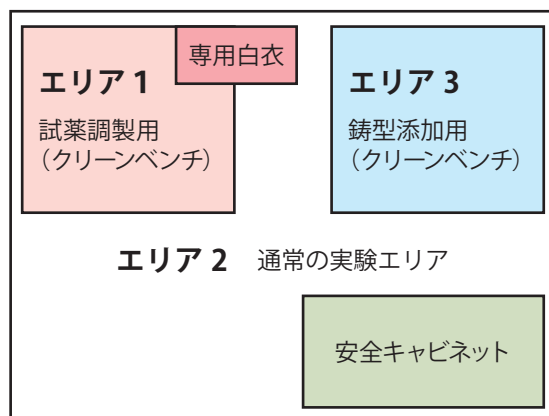
【西アフリカ型 (WA) 検出系】



【コンゴ盆地型 (CB) 検出系】



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。

X. 参考文献

- 1) Li, Yu, *et al.* "Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA."
Journal of virological methods. (2010) **169**(1): 223-227.
- 2) 国立感染症研究所「病原体検出マニュアル サル痘ウイルス 第 2 版 令和 4 年 8 月」

XI. 関連製品

Monkeypox virus qPCR Detection Kit (Generic) (製品コード RC420A)
Monkeypox virus Positive Control DNA (Generic) (製品コード RC425A)
Monkeypox virus Positive Control DNA (WA/CB) (製品コード RC426A)
Thermal Cycler Dice® Real Time System III with PC (製品コード TP970)

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。
- ・ 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