

製品コード RC901A

研究用

TAKARA

Ureaplasma (parvum/urealyticum)
Direct Detection qPCR Kit

説明書

v202502Da

Ureaplasma parvum (以下、*U. parvum*) および *Ureaplasma urealyticum* (以下、*U. urealyticum*) は、性的接触を介して尿道や膣、のどなどに感染し、非クラミジア性非淋菌性尿道炎等を引き起こすことが報告されています。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、*U. parvum* および *U. urealyticum* の遺伝子を検出するためのキットです。

【特長】

- 特異性の高いプローブを用いたマルチプレックスリアルタイム PCR 法により、*U. parvum* と *U. urealyticum* を 1 反応で同時に検出し、かつ判別することができます。
- 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 阻害の有無を確認可能です。
- Solution C (製品コード 9880) を併用することで、尿、うがい液、膣スワブ (膣擦過物) 懸濁液から簡易抽出した *U. parvum* および *U. urealyticum* のゲノム DNA を検体サンプルとして利用可能です。また、精製した核酸を検出に利用することもできます。
- Uracil-N-glycosylase (UNG) を採用しており、PCR 産物のキャリアオーバーによる偽陽性を防止できます。

【検出対象遺伝子とプローブ標識】

| 検出対象遺伝子 | プローブ標識 |
|---------------------------|------------------------------|
| <i>U. parvum</i> 遺伝子 | Cyanine5 (レポーター) / ダーククエンチャー |
| <i>U. urealyticum</i> 遺伝子 | FAM (レポーター) / ダーククエンチャー |
| インターナルコントロール (IC) | HEX (レポーター) / ダーククエンチャー |

※ 本製品は、Thermo Fisher Scientific 社のリアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナル補正を行う装置での解析に必要な ROX Reference Dye II を添付しています。

I. 内容 (100 回分)

| | | |
|--|------|------------|
| ● Probe qPCR Mix (<i>Ureaplasma</i>)* ¹ | 2 × | 625 μl × 2 |
| ● Primer/Probe Mix (<i>Ureaplasma</i>)* ² | 10 × | 250 μl |
| ○ H ₂ O | | 1 ml |
| ● ROX Reference Dye II* ² | 50 × | 200 μl |
| ● Positive Control DNA (<i>Ureaplasma</i>) | | 50 μl |

* 1: 反応に必要な dNTP Mixture、Mg²⁺、酵素等を含みます。

* 2: 遮光に留意してください。

II. 保存

— 20°C

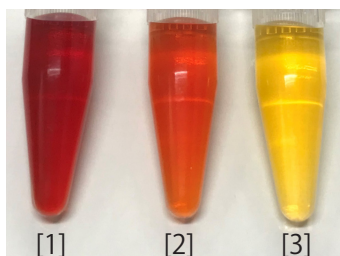
III. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器（主なもの）

【簡易抽出試薬】

- Solution C（製品コード 9880）

● Solution C* 1 ml × 5

*：Solution C は、以下写真の [2] や [3] のように、保存条件により赤色から橙色または黄色に変色する場合があります。融解後に橙色または黄色を呈する試薬は、核酸の抽出性能が低下している可能性があるため、使用しないでください。また、小分け分注することや、チューブの蓋を開けたまま保管することは避けてください。



[1]：通常の Solution C（赤色）
[2]：橙色に変色した Solution C
[3]：黄色に変色した Solution C

※ 市販の DNA 抽出試薬等により調製した検体サンプルを使用することも可能です。
(NucleoSpin Mycoplasma DNA（製品コード 740860.50）を推奨）

【器具】

- 200 μ l、20 μ l、10 μ l 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）
 - Thermal Cycler Dice Real Time System III (Cy5) with PC（製品コード TP990）
※ TP990 は、HEX オプションフィルターの追加が必要です。
FilterUnit Premium(HEX/VIC) for LED（製品コード TP704）
 - CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System（製品コード 640231/640232）
 - CFX96 Real-Time PCR Detection System（Bio-Rad 社）
 - CFX96 Deep Well Real-Time PCR Detection System（Bio-Rad 社）
 - LightCycler 96 System（Roche Diagnostics 社）
 - LightCycler 480 II System（Roche Diagnostics 社）
 - QuantStudio 5 Real-Time PCR System（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： 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、検体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 qPCR Mix (*Ureaplasma*) 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 qPCR Mix (*Ureaplasma*) 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 (*Ureaplasma*) および ROX Reference Dye II 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)

尿、うがい液、膣スワブ懸濁液より、Solution C (製品コード 9880) を使用して検体サンプルを調製します。Solution C を用いた検体サンプルの調製方法を以下に示します。

- 1) 1.5 ml の検体を 2 ml チューブに分取し、高速遠心機にて $15,000 \times g$ 、10 分間遠心する。
- 2) 上清をすべて除去する。*1
- 3) 得られた沈査に ● Solution C を 50 μ l 添加し、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。
- 4) 室温で 5 分間静置する。
- 5) 上記の簡易抽出液のうち、2 μ l をリアルタイム PCR の鋳型として使用する。

* 1 : 界面活性剤を含む検体輸送液を使用した場合、上清が除去しきれないと PCR 反応へ悪影響を及ぼす可能性があります。

※ 市販の DNA 抽出試薬等により調製した検体サンプルを使用することも可能です。
(NucleoSpin Mycoplasma DNA (製品コード 740860.50) を推奨)

※ NucleoSpin Mycoplasma DNA を用いて核酸精製を行う際は、上記 2) で得られた沈査を生理食塩水 200 μ l に懸濁し、当該製品の取扱説明書に従い操作した後、50 μ l 溶出してください (沈査の懸濁液に Spike-in Control DNA を添加する必要はありません)。

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 ○ 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

本製品の ● Positive Control DNA (*Ureaplasma*) 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 + 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 μ l 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。

【ROX Reference Dye II を使用しない場合*2】

[1 反応分の反応液]

| 試薬 | 使用量 |
|--|--------------|
| ● Probe qPCR Mix (<i>Ureaplasma</i>) | 12.5 μ l |
| ● Primer/Probe Mix (<i>Ureaplasma</i>) | 2.5 μ l |
| ○ H ₂ O | 8.0 μ l |
| Total | 23.0 μ l |

* 2 : 対象機種

- 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)
- CronoSTAR 96 Real-Time PCR System (製品コード 640231/640232)
- CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
- CFX96 Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
- LightCycler 96 System (Roche Diagnostics 社)
- LightCycler 480 II System (Roche Diagnostics 社)

【ROX Reference Dye II を使用する場合*3】

[1 反応分の反応液]

| 試薬 | 使用量 |
|--|--------------|
| ● Probe qPCR Mix (<i>Ureaplasma</i>) | 12.5 μ l |
| ● Primer/Probe Mix (<i>Ureaplasma</i>) | 2.5 μ l |
| ● ROX Reference Dye II | 0.5 μ l |
| ○ H ₂ O | 7.5 μ l |
| Total | 23.0 μ l |

* 3 : 対象機種

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

※ 反応液の調製は氷上で行ってください。

-
- 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」のいずれかを添加する。
(エリア 3 で実施)

[1 反応分の添加量]

| | |
|--|-----------|
| 検体サンプル | |
| 簡易抽出液または核酸精製サンプル | 2 μ l |
| 陽性コントロール | |
| ● Positive Control DNA (<i>Ureaplasma</i>) | 2 μ l |
| 陰性コントロール | |
| ○ H ₂ O | 2 μ l |

- 3) 以下の条件で反応を実施する。

<反応条件>

Hold
(25°C 10分)*4
95°C 30秒

PCR : 45 サイクル
95°C 5秒
56°C 30秒 (蛍光検出 : FAM/HEX/Cy5/(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 IV および 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。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>)。

※ QuantStudio 5 Real-Time PCR System を使用する場合は、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】

| 検出対象遺伝子 | 蛍光検出フィルター |
|---------------------------|-----------|
| <i>U. parvum</i> 遺伝子 | Cy5 |
| <i>U. urealyticum</i> 遺伝子 | FAM |
| IC | HEX |

【コントロール反応の正しい結果】

| | <i>U. parvum</i> | <i>U. urealyticum</i> | 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IC以外の検出対象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>

| <i>U. parvum</i> | <i>U. urealyticum</i> | IC | 判定 |
|------------------|-----------------------|-----|-----------------------------|
| + | - | +/- | <i>U. parvum</i> 遺伝子陽性 |
| - | + | +/- | <i>U. urealyticum</i> 遺伝子陽性 |
| + | + | +/- | 両遺伝子陽性 |

- ・対象となる遺伝子が検出された場合は、ICの結果にかかわらず陽性判定となる。

<陰性判定の例>

| <i>U. parvum</i> | <i>U. urealyticum</i> | IC | 判定 |
|------------------|-----------------------|----|--------|
| - | - | + | 検出限界以下 |
| - | - | - | 判定不能 |

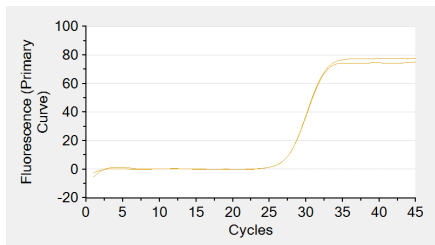
- ・対象となる遺伝子が検出されなかった場合には、ICの結果を確認する。
- ・ICが検出されていれば、検出限界以下判定となる。
- ・ICが不検出の場合は、DNA抽出が適切に行われていないか、PCR阻害が生じている可能性がある。簡易抽出液を用いた場合は、改めて市販のDNA抽出試薬等を用いて核酸を精製してから反応に供する。

VIII. コントロール反応の例

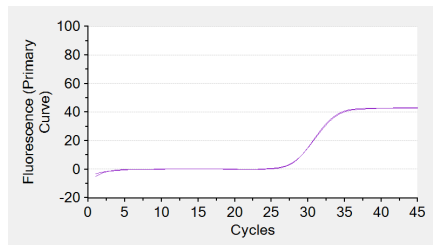
<使用機種> Thermal Cycler Dice Real Time System IV

陽性コントロールの反応例

U. parvum 遺伝子 (Cy5)

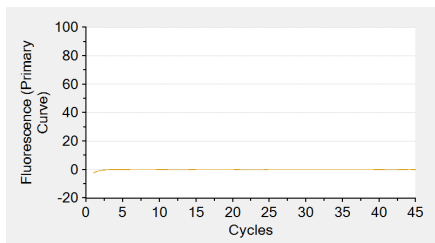


U. urealyticum 遺伝子 (FAM)

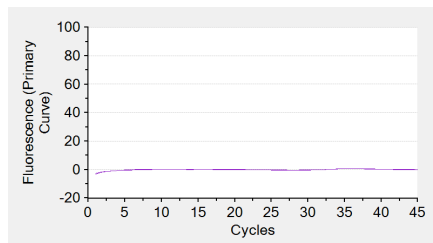


陰性コントロールの反応例

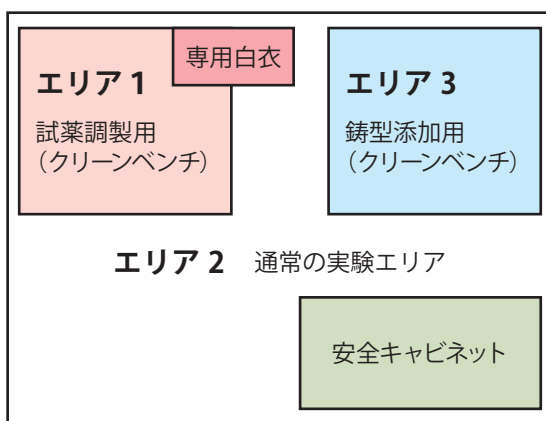
U. parvum 遺伝子 (Cy5)



U. urealyticum 遺伝子 (FAM)



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 DNA 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

Solution C (製品コード 9880)
Mycoplasma (genitalium/hominis) Direct Detection qPCR Kit (製品コード RC900A)
NucleoSpin Mycoplasma DNA (製品コード 740860.50)
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)
FilterUnit Premium(HEX/VIC) for LED (製品コード TP704)
CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (製品コード 640231/640232)

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。CronoSTAR 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