

製品コード RR273A

研究用

Takara

Virus Test Kit
(HIV, HTLV, HCV, HBV, ParvoB19)
Ver.2

説明書

v202207Da

本製品は、6種類のウイルス [HIV1 (pol, LTR)、HIV2、HBV、HCV、HTLV1&2、parvovirus B19] をリアルタイム RT-PCR により検出するためのキットです。本製品では、操作が簡便で高感度なワンステップのリアルタイム RT-PCR 法を採用しており、検出にはプローブを使用しています。

※本製品の開発には、東京医科歯科大学 再生医療研究センターの清水則夫先生にご協力頂きました。

プローブ法 (5' ヌクレアーゼ法) の原理

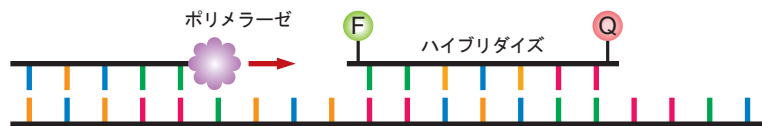
検出に用いるプローブは、5' 末端を蛍光物質で、3' 末端をクエンチャー物質で修飾したオリゴヌクレオチドです。

このプローブはアニーリングステップで鋳型 DNA に特異的にハイブリダイズするように設計されていますが、ハイブリダイズした段階ではプローブ上にクエンチャーが存在するため、励起光を照射しても蛍光の発生は抑制されています。その後の伸長反応ステップで、*Taq* DNA ポリメラーゼのもつ 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性により鋳型にハイブリダイズしたプローブが分解されて蛍光色素がプローブから遊離し、クエンチャーによる抑制が解除されて蛍光を発するようになります。

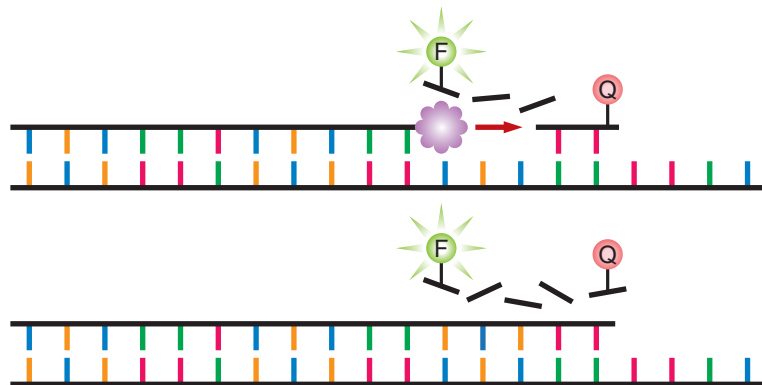
1) 熱変性



2) プライマーのアニーリング/プローブのハイブリダイゼーション



3) 伸長反応



I. 内容 (25 テスト)

○	1.	4 × One Step RT-PCR Buffer-5		625 μl × 2
●	2.	Enzyme Mix-6		500 μl
●	3.	ROX Reference Dye*1	50 ×	100 μl
●	4.	ROX Reference Dye II*1	50 ×	100 μl
⊕ _{H₂O}	5.	H ₂ O		1.1 ml × 2
⑥	6.	HIV1 pol Primer/Probe Mix-2*2	25 ×	25 μl
⑦	7.	HIV1 LTR Primer/Probe Mix*2	25 ×	25 μl
⑧	8.	HIV2 Primer/Probe Mix*2	25 ×	25 μl
⑨	9.	HBV Primer/Probe Mix*2	25 ×	25 μl
⑩	10.	HCV Primer/Probe Mix*2	25 ×	25 μl
⑪	11.	HTLV Primer/Probe Mix*2	25 ×	25 μl
⑫	12.	pB19 Primer/Probe Mix-2*2	25 ×	25 μl
⑬	13.	HPRT1 Pimer/Probe Mix*2,3	25 ×	25 μl
●	14.	Positive Control Mix (7)-2		200 μl

* 1 : Applied Biosystems のリアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用します。最終濃度 1 × でご使用ください。

◆ ROX Reference Dye (50 ×) を添加する機種

• StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

◆ ROX Reference Dye II (50 ×) を添加する機種

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

◆ 添加の必要がない機種

• Thermal Cycler Dice® Real Time System III with PC (製品コード TP970)

• Thermal Cycler Dice Real Time System II (製品コード TP900/TP960 : 終売)

• Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (製品コード TP700/TP760 : 終売)

• LightCycler 96/LightCycler 480 システム (Roche Diagnostics 社)

• CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)

* 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 : Reference として使用します。

II. 保存

− 20°C

III. キット以外に必要な試薬、器具、機器など (主なもの)

【試薬】

- ・核酸抽出キット
NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250) * など
* : 別売りの Proteinase K (凍結乾燥品) (製品コード 740506) が必要です。

【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】

- ・微量高速遠心機
- ・ヒートブロック
- ・リアルタイム PCR 装置
Thermal Cycler Dice Real Time System III with PC (製品コード TP970)
Thermal Cycler Dice Real Time System II (製品コード TP900/TP960 : 終売)
Thermal Cycler Dice Real Time System Lite (製品コード TP700/TP760 : 終売)
Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
LightCycler 96/LightCycler 480 システム (Roche Diagnostics 社)
CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)

※ 本キットは、Thermal Cycler Dice Real Time System III with PC (製品コード TP970) を用いてバリデーションを行っています。

IV. 使用に際して

本キットは遺伝子検出であるため、不活化されたウイルスも検出されます。
また、設計した 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。
(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。)

V. 操作上の注意

1. リアルタイム PCR 装置の取扱いは各装置の取扱説明書に従ってください。
2. 万一、プローブやプライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出が出来ません。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、操作は細心の注意を払ってください。
3. 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)。各エリアにおいては、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。

本キットで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。

4. 本キットはリアルタイム PCR 装置での解析によって結果判定を行います。
リアルタイム PCR 装置の各種 Auto 機能が適正に働かなかった場合は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、Manual 設定を行ってください。

VI. 操作

VI-1. サンプルの調製 (エリア 2 で実施)

検体から核酸 (RNA および DNA) を抽出します。以下に、例として NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/50/.250) および Proteinase K (製品コード 740506) を用いた場合の操作方法を紹介します。

このキットで検出可能なウイルスには、DNA ウイルスと RNA ウイルスの両方が含まれますので、DNase 処理は行わず、DNA と RNA をまとめて抽出します。また、HBV などは Proteinase K 処理を行うと DNA の収率が向上するため、Proteinase K 処理を行います。

1. サンプルの準備
1 × 10⁶ 個の細胞を遠心等で回収する。
2. サンプルの溶解
350 μl の Buffer RA1 (1% Triton X-100 および 1 M DTT を 3.5 μl 添加) を細胞に添加し、均一にホモジナイズする。
3. Proteinase K 処理
 - 1) 590 μl の RNase-free water と 10 μl の Proteinase K*1 を添加し、ピペッティングでよく混合する。
 - 2) 室温で 10 分静置後、55°C で 10 分インキュベートする。
 - 3) 10,000 × g で 3 分間遠心し、上清 (約 950 μl) を新しいチューブに回収する。
4. エタノールの添加
回収した上清の 0.5 × 容量 (約 475 μl) のエタノール (>96%) を添加し、ボルテックスで混合する。
5. カラムへの吸着
 4. の溶液を NucleoSpin RNA Column (水色リング) に添加し、11,000 × g で 30 秒間遠心する。ろ液を捨て、再度、残りの溶液をカラムに添加し、11,000 × g で 30 秒間遠心する。カラムを新しい Collection Tube (2 ml) にセットする。
6. メンブレンの洗浄
 - 1 回目の洗浄
200 μl の Buffer RAW2 をカラムに添加し、11,000 × g で 30 秒間遠心する。カラムを新しい Collection Tube (2 ml) にセットする。
 - 2 回目の洗浄
700 μl の Buffer RA3*2 をカラムに添加し、11,000 × g で 30 秒間遠心する。ろ液を捨てた後、再び同じ Collection Tube にセットする。
 - 3 回目の洗浄
250 μl の Buffer RA3 をカラムに添加し、11,000 × g で 2 分間遠心する。カラムを新しい Collection Tube (1.5 ml) にセットする。
7. 核酸の溶出
50 μl の RNase-free H₂O をカラムに加え、11,000 × g で 1 分間遠心する。溶出された核酸溶液を再度カラムにアプライし、11,000 × g で 1 分間遠心する。溶出した核酸溶液 (約 50 μl) は、-20°C または -70°C で保存する。

* 1 : Proteinase K : 凍結乾燥品 (50 mg/vial) に Proteinase Buffer を 2.5 ml 加えて完全に溶解します。

* 2 : Buffer RA3 : Wash Buffer RA3 (Concentrate) に 4 倍量のエタノール (>96%) を添加します。

VI-2. リアルタイム PCR 反応液の調製

VI-1. で調製した核酸溶液と本製品のリアルタイム PCR 試薬を用いて反応液を調製します。

反応液調製の手順には、以下の 2 種類の方法があります。

<方法 A：検体数が多い場合>

- (1) Primer/Probe Mix を含むマスターミックスを調製する。
- (2) リアルタイム PCR 用のチューブ(またはプレート)にマスターミックスを分注する。
- (3) 個々の核酸溶液を添加する。

<方法 B：検体数が少ない場合>

- (1) 核酸溶液を含むマスターミックスを調製する。
- (2) リアルタイム PCR 用のチューブ(またはプレート)にマスターミックスを分注する。
- (3) 各種 Primer/Probe Mix を添加する。

各方法の操作法の詳細は、以下をご参照ください。

【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同時に行ってください。

陰性コントロール：PCR 反応の際に、本製品の H₂O を鋳型とした反応を「陰性コントロール」として実施します。

陽性コントロール：PCR 反応の際に、本製品の Positive Control Mix (7)-2 を鋳型とした反応を「陽性コントロール」として実施します。

<方法 A >

- (1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)
各種 Primer/Probe Mix ごとに必要数 + α 分のマスターミックスを調製する。
必要本数は、検体数 + 2 本 (陽性コントロール、陰性コントロール) と設定する。

試薬	液量 (1 反応)
○ 4 × One Step RT-PCR Buffer-5	6.25 μ l
● Enzyme Mix-6	2.5 μ l
○ 各種 Primer/Probe Mix	1 μ l
⊕ H ₂ O	10.25 μ l
Total	20 μ l

- (2) リアルタイム PCR 用のチューブ (またはプレート) にマスターミックスを 20 μ l ずつ分注する。(エリア 1 で実施)
- (3) (2) に核酸溶液を 5 μ l 添加する。(エリア 3 で実施)
陽性コントロールとしては ● Positive Control Mix (7)-2 を、陰性コントロールとしては ⊕ H₂O を、同様に 5 μ l 添加する。
- (4) チューブ (またはプレート) を卓上遠心機等でスピンドウンする。

<方法 B >

- (1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。
本キットには、8 種類の Primer/Probe Mix が含まれるので、9 反応分のマスターミックスを調製する。陽性コントロールとして ● Positive Control Mix (7)-2 を含むマスターミックス、陰性コントロールとして ⊕ H₂O を含むマスターミックスも同様に調製する。

試薬	液量 (1 反応)	(9 反応)
○ 4 × One Step RT-PCR Buffer-5	6.25 μl	56.25 μl
● Enzyme Mix-6	2.5 μl	22.5 μl
核酸溶液	5 μl	45 μl
⊕ H ₂ O	10.25 μl	92.25 μl
Total	24 μl	216 μl

- (2) リアルタイム PCR 用のチューブ (またはプレート) にマスターミックスを 24 μl ずつ分注する。
- (3) (2) に各種 Primer/Probe Mix を 1 μl 添加する。
- (4) チューブ (またはプレート) を卓上遠心機等でスピンドウンする。

VI-3. リアルタイム PCR の開始

以下の反応条件でリアルタイム PCR を実施します。
詳しい操作方法は、リアルタイム PCR 装置の取扱説明書をご確認ください。

RT-qPCR 条件

逆転写反応

Cycle : 1

42°C 5 分

95°C 30 秒

2 step PCR

Cycles : 45

95°C 5 秒

56°C 30 秒 (検出)

検出フィルター

FAM

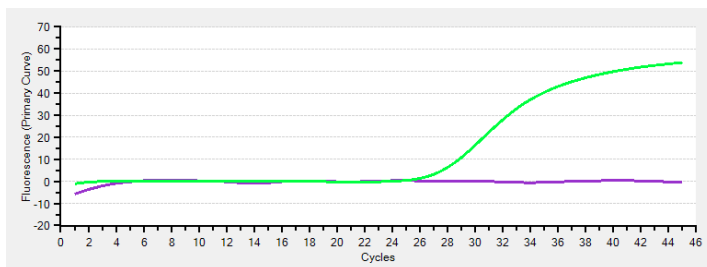
- ※ Thermal Cycler Dice Real Time System III / II / Lite では Speed は Fast を選択してください。

VII. 反応例

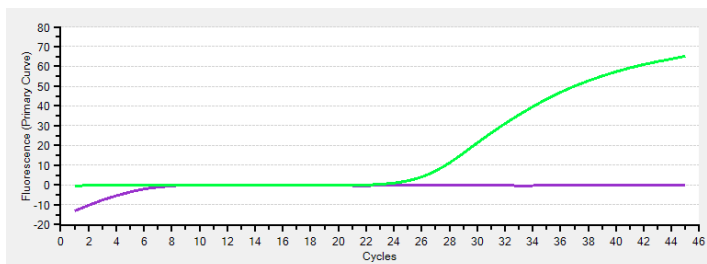
Thermal Cycler Dice Real Time System III with PC を使用した場合の反応例を以下にご紹介します。

- (—) 陽性コントロール：● Positive Control Mix (7)-2 を鋳型として使用
- (—) 陰性コントロール：⊕ H₂O を鋳型の代わりに添加

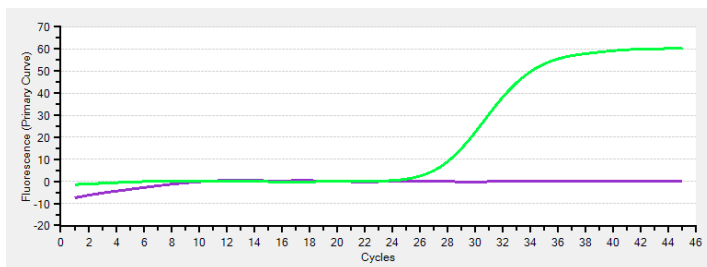
HIV1 pol



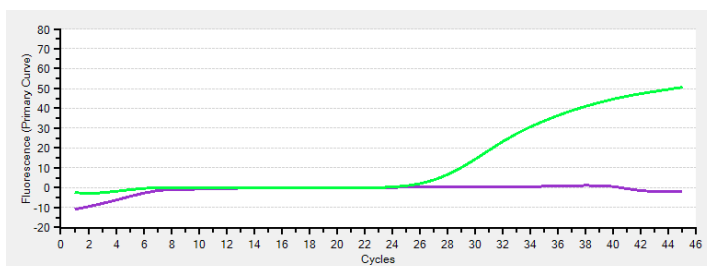
HIV1 LTR



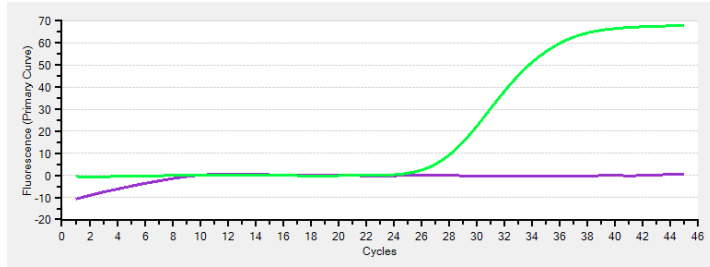
HIV2



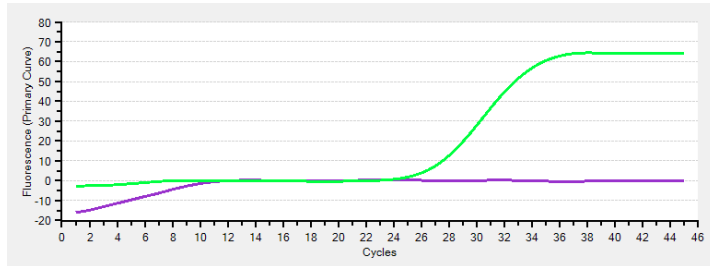
HBV



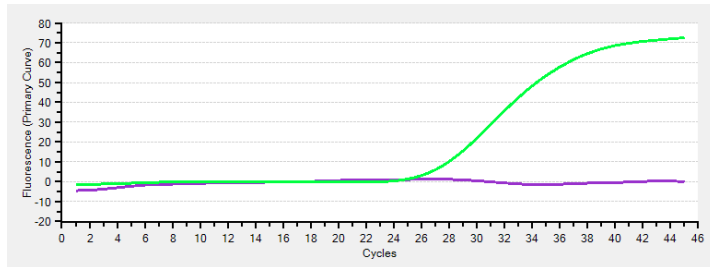
HCV



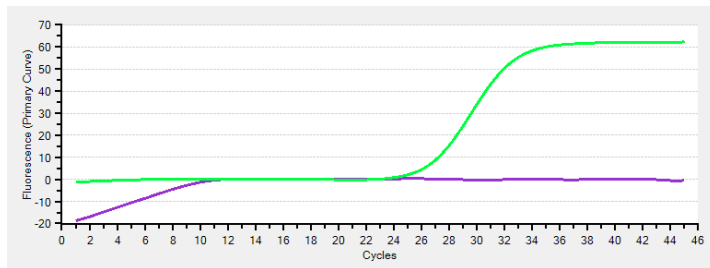
HTLV



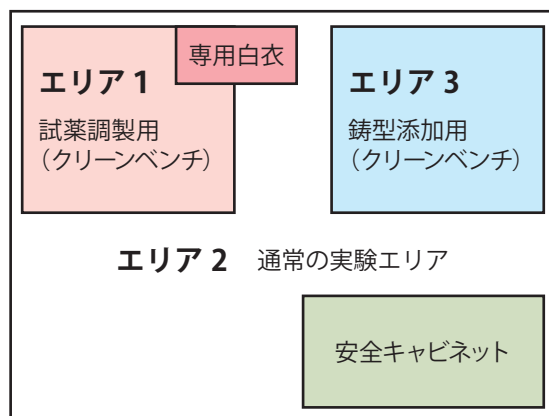
pB19



HPRT1



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。
標準サンプルの希釈もここで行う。

IX. 関連製品

Virus Test Kit (EBV, CMV, WNV) Ver.2 (製品コード RR274A)
Thermal Cycler Dice® Real Time System III with PC (製品コード TP970)
0.1 ml 8-strip -neo- tube & cap Set (製品コード NJ907)
FrameStar® 0.1ml 96 well qPCR plate (製品コード NJ904)
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ600)
NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250)
Proteinase K (凍結乾燥品) (製品コード 740506)

X. 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、FrameStar は Azenta Life Sciences. 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