

製品コード RR278A

研究用

TaKaRa

TaKaRa Mycoplasma qPCR Detection Kit
(タカラバイオ社装置用)

説明書

v202207Da

本製品は、細胞溶液から抽出した DNA を用いて、リアルタイム PCR によりマイコプラズマを検出するためのキットです。マイコプラズマの 16S rRNA から 23S rRNA の遺伝子領域を対象として、広範な種を検出できるようにプライマー・プローブを設計しています。また、キットに添付している Spike-in Control DNA により DNA 抽出操作の確認が可能です。

本製品は、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が、国立研究開発法人 科学技術振興機構 (JST) および国立研究開発法人 日本医療研究開発機構 (AMED) 再生医療実現拠点ネットワークプログラムの公的支援の下で得た研究成果に基づくものであり、清水先生とタカラバイオ株式会社との共同研究によって開発されました。

I. 内容 (96 テスト)

【package 1】

●	1. Probe qPCR Mix	2.5 ×	960 μl × 3
⊕ _{H₂O}	4. H ₂ O		1 ml × 2
●	5. Positive Control (Myco) (1 × 10 ⁴ copies/μl)		300 μl
●	6. PC Dilution Buffer*1		1 ml × 2
●	7. Spike-in Control DNA		1 ml

【package 2】

	Primer/Probe Strip (Myco)*2	8 連	24 本
	Primer/Probe Strip (Spike-in)*2	8 連	12 本
	Tube Cap	8 連	36 本

* 1 : Positive Control (Myco) を希釈し感度コントロールとして使用する場合等に使用します。

* 2 : 固相化タイプの試薬です。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

package 1 : - 20℃

package 2 : 4℃

III. キット以外に必要な試薬、機器など (主なもの)

- ・核酸抽出キット
NucleoSpin Virus (製品コード 740983.10/.50/.250) など
- ・リアルタイム PCR 装置
Thermal Cycler Dice® Real Time System // (製品コード TP900/TP960 : 終売)
- ・ヒートブロック
- ・微量高速遠心機
- ・マイクロピペットおよびチップ

IV. 使用に際して

本キットは遺伝子検出であるため、不活化された細菌も検出されます。

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

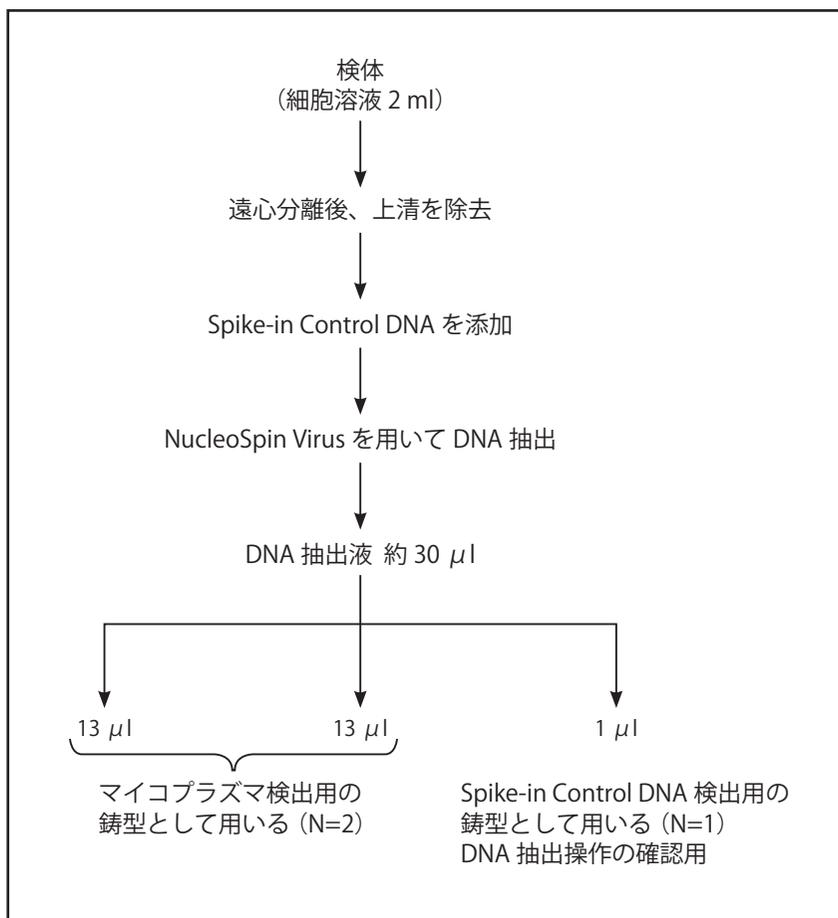
1. リアルタイム PCR 装置の取扱いは装置の取扱説明書に従ってください。
2. 万一、プローブやプライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出が出来ません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、操作は細心の注意を払ってください。
3. 反応液の調製から検体サンプルの添加まで、次の3つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します (VII. 補足：エリア分けについてを参照)。どのエリアにおいても、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。
 - エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
 - エリア 2：検体の調製を行います。
 - エリア 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

2 ml の細胞溶液を初発検体として、遠心分離による濃縮後、DNA 抽出を行います。リアルタイム PCR では、得られた DNA 溶液を鋳型として、マイコプラズマ検出用の反応を 2 連で、Spike-in Control DNA 検出用の反応を 1 連で行います。



VI-1. DNA の抽出 (エリア 2 で実施)

検体から DNA を抽出します。抽出操作の途中で、抽出操作を確認するための Spike-in Control DNA を添加します。以下に、例として NucleoSpin Virus (製品コード 740983.10/.50/.250) を用いた場合の操作方法を紹介します。

1. 細胞の回収

細胞溶液 2 ml (2×10^6 個程度) を 15,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清 1,810 μ l を除去する (190 μ l 残す)。

2. Spike-in Control DNA の添加

Spike-in Control DNA を 10 μ l 添加する。

3. サンプルの溶解

Proteinase K 溶液を 5 μ l 添加する。

Buffer VL を 200 μ l 添加し、ボルテックスで 10 ~ 15 秒混合する。

Carrier RNA Stock 溶液*1 を 5.6 μ l 添加し、穏やかに混合する。

室温で 3 分間放置する。

* 1 : Carrier RNA Stock 溶液の調製法

[製品コード 740983.10 の場合]

300 μ g の凍結乾燥品の Carrier RNA に RNase free 水を 300 μ l 加えて溶解させる。溶解後は -20°C で保存する。

4. エタノールの添加

エタノール (96 ~ 100%) を 200 μ l 添加し、ボルテックスで 10 ~ 15 秒混合する。室温で 5 分間放置する。

5. カラムへの吸着

NucleoSpin Virus Column を Collection Tube (2 ml) にセットする。

4. の溶液をカラムに添加し、4,000 $\times g$ 、3 分間遠心する。*2

ろ液を捨てた後、新しい 2 ml の Collection Tube にカラムをセットする。

* 2 : この遠心操作ですべての溶液がカラムを通過しなかった場合は、高速遠心 (15,000 ~ 20,800 $\times g$) を 1 分間行う。それでも溶液がカラム上部に残っている場合には、新しい試料でやり直す方が望ましい。

6. メンブレンの洗浄

1 回目の洗浄

Buffer VW1 をカラムに 400 μ l 添加し、11,000 $\times g$ 、30 秒間遠心する。

ろ液を捨てた後、新しい 2 ml の Collection Tube にカラムをセットする。

2 回目の洗浄

Buffer VW2*3 をカラムに 400 μ l 添加し、11,000 $\times g$ 、30 秒間遠心する。

ろ液を捨てた後、新しい 2 ml の Collection Tube にカラムをセットする。

3 回目の洗浄

Buffer VW2 をカラムに 200 μ l 添加し、最高速 (最大 20,000 $\times g$) で 5 分間遠心する。

ろ液を捨てた後、新しい 1.5 ml の Collection Tube にカラムをセットする。

* 3 : Buffer VW2 の調製法

[製品コード 740983.10 の場合]

Wash Buffer VW2 (Concentrate) 6 ml に 96 ~ 100% エタノールを 24 ml 添加する。

7. メンブレンの乾燥

カラムの蓋を開けて 56°C で 5 分間乾燥させる。

8. DNA の溶出

70°Cで予温したRNase free水を34 μ l*⁴添加し、室温で3分間インキュベートする。
20,000 $\times g$ 、3分間遠心し、DNAを溶出させる。
溶出されたDNA溶液(約30 μ l)*⁵をすぐに使用しない場合は、-20°Cで保存する。

* 4: マイクロピペットで吸引する前に、チップを数回プレリンスしてください。

* 5: リアルタイムPCRの鋳型DNA溶液として、27 μ lを使用します。溶出DNA溶液が27 μ lに満たない場合は、H₂Oで30 μ l程度にFill upしてください。

VI-2. リアルタイムPCR反応液の調製

マイコプラズマ検出用とSpike-in Control DNA検出用の2種類の反応液を調製し、VI-1.で抽出したDNAを鋳型としてリアルタイムPCRを行います。

1. 以下の反応液を氷上で調製する。(エリア1で実施)
必要数 + α 分の反応液をまとめて調製する。

<マイコプラズマ検出用>

※ (検体数 \times 2) + 2 本分 (Positive Control、Negative Control (H₂O)) を調製する。

[1 反応あたり]

試薬	使用量
● Probe qPCR Mix	10 μ l
⊕ H ₂ O	2 μ l
Total	12 μ l

<Spike-in Control DNA 検出用>

※ 検体数 + 1 本分 (Negative Control (H₂O)) を調製する。

[1 反応あたり]

試薬	使用量
● Probe qPCR Mix	10 μ l
⊕ H ₂ O	14 μ l
Total	24 μ l

2. Primer/Probe Strip への分注

- (1) Primer/Probe Stripのチューブ底に青色のペレットが存在することを確認する。

※ チューブ底に青色のペレットがない場合は、チューブ壁や蓋に付着している場合があります。スピンドウン等により、青色のペレットをチューブ底に落としてから使用してください。

- (2) Primer/Probe Stripのチューブの蓋を外す。

- (3) Primer/Probe Stripに1.で調製した反応液を分注する。

マイコプラズマ検出用: 12 μ l ずつ
(Primer/Probe Strip (Myco) に分注)

Spike-in Control DNA 検出用: 24 μ l ずつ
(Primer/Probe Strip (Spike-in) に分注)

- (4) 新しいTube Capで軽くチューブの蓋をする。

※ 鋳型を添加してからチューブの蓋をしっかり閉めます。ここでは軽く押さえる程度にしてください。

3. DNA 抽出液の添加 (エリア 3 で実施)

(1) DNA 抽出液 (または Positive Control または H₂O) を添加する。

マイコプラズマ検出用 : 13 μ l ずつ

Spike-in Control DNA 検出用 : 1 μ l ずつ

(2) チューブの蓋をしっかりと閉める。

(3) 軽くタッピングし、Primer/Probe が溶解したことを確認する。

※ Primer/Probe は青く着色されています。反応液がほぼ均一な青色になることを確認してください。

(4) 卓上遠心機で軽く遠心を行い、リアルタイム PCR 装置にセットする。

4. 以下の条件で反応を実施する。

初期変性

95°C 30 秒

PCR : 5 サイクル

95°C 5 秒

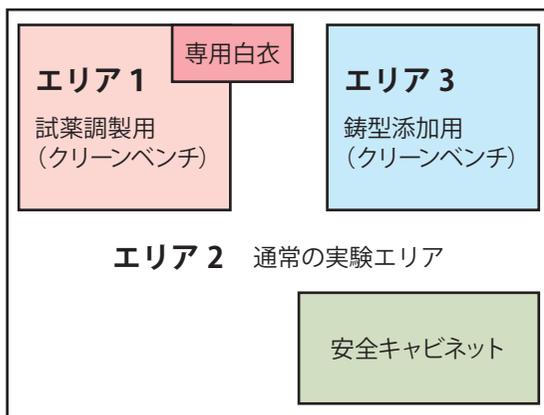
60°C 1 分

PCR : 40 サイクル

90°C 1 秒

60°C 1 分 (FAM 検出)

VII. 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。

VIII. 関連製品

TaKaRa Mycoplasma qPCR Detection Kit (製品コード RR277A)
Virus Test Kit (HIV, HTLV, HCV, HBV, ParvoB19) Ver.2 (製品コード RR273A)
Virus Test Kit (EBV, CMV, WNV) Ver.2 (製品コード RR274A)
NucleoSpin Virus (製品コード 740983.10/50/.250)

IX. 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