

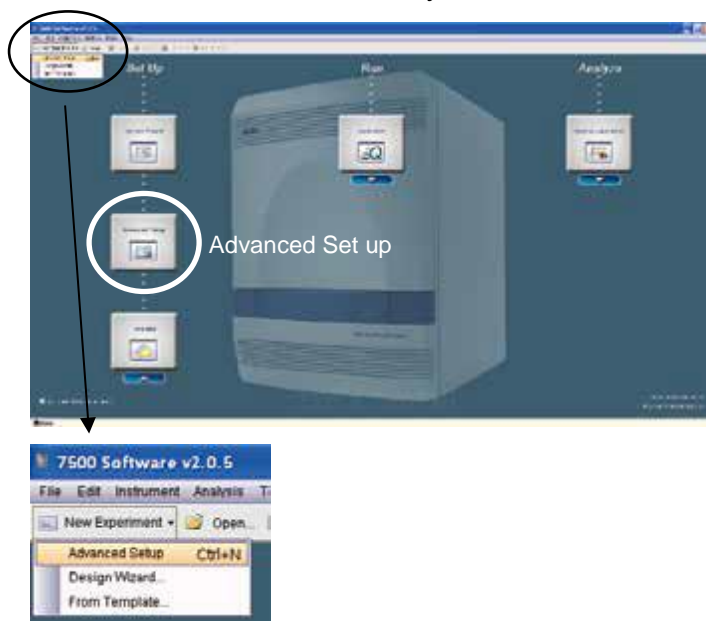
牛伝染性リンパ腫ウイルス検査のための操作マニュアル

—Bovine Leukemia Virus qPCR Detection Kit (with ROX Reference Dye) (製品コード RC202A) 専用—

このマニュアルでは、Bovine Leukemia Virus qPCR Detection Kit (with ROX Reference Dye) (製品コード RC202A) を用いて Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System または StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) でリアルタイム PCR を実施する際の操作方法を説明します。

ランファイルの作成とランの開始

- 1 ランファイルを新規作成する。
 - 1.1 New Experiment もしくは Home で Advanced Set up を選択
【 7500 Fast Real-Time PCR System の場合 】

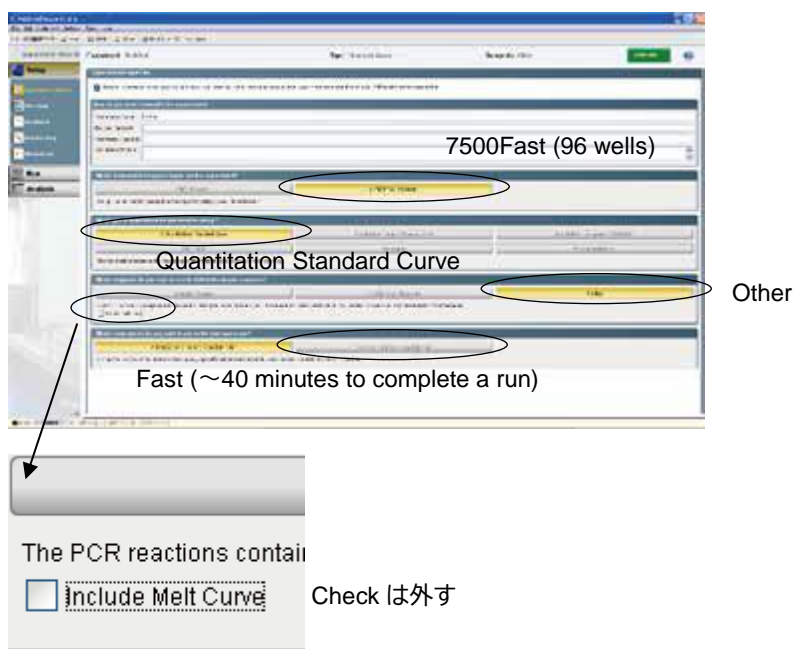


【 StepOnePlus Real-Time PCR System の場合 】



- 1.2 Setup のタブの Experiment Properties を開く。Experiment name にファイル名を入力し、7500 Fast Real-Time PCR System の場合は「7500 Fast (96 Well)」、StepOnePlus の場合は「StepOnePlus Instrument (96 wells)」、どちらも共通に「Quantitation Standard Curve」「Other」「Fast (~ 40 minutes to complete a run)」を選択したものを作成する。

【 7500 Fast Real-Time PCR System の場合 】



【 StepOnePlus Real-Time PCR System の場合 】

StepOnePlus Instrument (96 wells)

Quantitation Standard Curve

Other

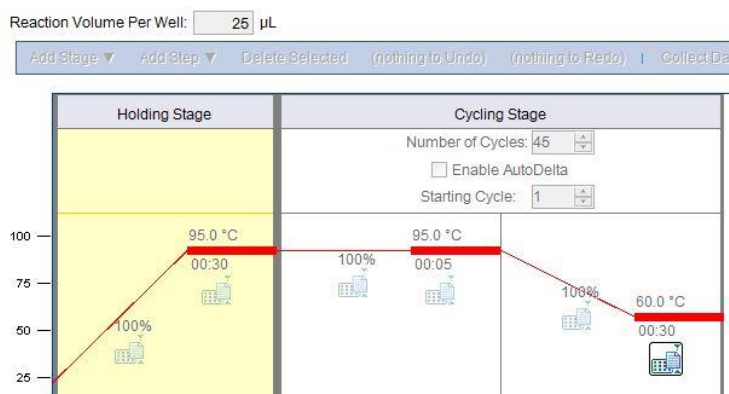
Fast (~40 minutes to complete a run)

The PCR reactions contain

Include Melt Curve Check は外す

2 Setup のタブの「Run Method」にて、反応条件を入力する。(以降、7500 Fast Real-Time PCR System、StepOnePlus で共通)

- 2.1 Holding Stage は、95°C、30 秒の設定にする。
- 2.2 Cycling Stage は 2 Step PCR のパターンを設定する。
 - 2.2.1 サイクル数は、45 にする。
 - 2.2.2 セグメント 1 は、95°C、5 秒の設定にする。
 - 2.2.3 セグメント 2 は、60°C、30 秒の設定にする
 - 2.2.4 Reaction Volume は 25 μ l にする。



- 3 Setup のタブの Plate Setup の「Define Targets and Samples」にて以下の情報を入力する。(ラン終了後に行っても良い)

Target Name	Reporter	Quencher
pol	FAM	None
RPPH1	VIC (HEX)	None

- 4 Setup のタブの Plate Setup の「Assign Targets and Samples」にて以下の情報を入力する。(ラン終了後に行っても良い)

4.1 Passive Reference : ROX

4.2 サンプルのウェル位置

4.3 サンプルタイプを **STD** としたウェルについては、鋳型量を設定する。

- 5 反応条件設定画面でランを開始する。

5.1 反応用のチューブ (またはプレート) を本体にセットする。

5.2 Start Run ボタンをクリックしてランを開始する。

結果の解析

反応終了後、「Analysis」の「Amplification Plot」より右上の「Analyze」ボタンをクリックし、増幅曲線を確認する。BLV 遺伝子 (*pol* 遺伝子) 陽性の場合、FAM シグナルの増大が認められる。

定量解析を行う場合は、Positive Control を段階希釈して作製したスタンダードを用いた結果より *pol* 遺伝子、RPPH1 遺伝子それぞれについて検量線が作成される。

<判定>

Analysis タブ→ Amplification タブを選び、右側の View Well Table タブより Ct 値などの情報を得る。このデータで Ct に数値が得られている場合、ターゲット遺伝子陽性である。サンプルと同時に反応を行った Positive Control で Ct 値に数値の表示があり、ネガティブコントロールで Ct 値に数値の表示がないことを確認する。Positive Control およびネガティブコントロールで上記以外の結果が得られた場合は、検出系に問題がある、またはコンタミネーションの疑いがあるので、再反応を行う。

(オプション) 定量を行った場合は、検量線のデータをもとにして、コピー数が表示される。

ウシゲノム RPPH1 遺伝子に対する BLV 遺伝子の相対量 (BLV 感染率) を算出する場合は、各サンプルで得られた定量値から、数式により相対定量値を求める。

$$\text{BLV 感染率 (\%)} = [\textit{pol} \text{ 遺伝子定量値} \div (\text{RPPH1 遺伝子定量値} / 2)] \times 100$$