

牛伝染性リンパ腫ウイルス核酸キット

Dual CoCoMo™-BLV qPCR Mix

マニュアル（第1版）

品番 A002

株式会社ニッポンジーン

I 製品説明

Dual CoCoMo™-BLV qPCR Mix は牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) の LTR 領域をターゲットにし、プロウイルスとして組み込まれた BLV と標的遺伝子 (BoLA-DRA) を Dual-target でリアルタイム PCR により増幅・検出する試薬です。

全血から抽出した牛ゲノム DNA を検体として使用します。

Coordination of Common Motifs (CoCoMo™) アルゴリズムを用いて設計した縮重プライマーセットにより、未知を含めたほぼすべての BLV 株の増幅が可能となっており、BoLA-DRA の増幅・検出により、検体の品質も同時に確認することが出来ます。

本製品は東京大学大学院農学生命科学研究科 特任教授間陽子先生の研究グループの研究成果をもとに株式会社ニッポンジーンで開発・製造したものです。

II 製品内容

Dual CoCoMo™-BLV qPCR Mix (品番 A002)

キット構成	容量 (50 反応用)	備考
BLV・DRA Primer / Probe Mix	300 μ L \times 1 本	蛍光標識プローブを含む
CoCoMo 2 \times qPCR Mix	600 μ L \times 1 本	酵素、基質、パッシブリアレンス色素等を含む

III 保存

輸送・保管温度： -20℃、遮光 (キット開封後は必ず遮光して保存ください)

IV 使用上又は取扱い上の注意

- ・ 本品は、動物用研究用試薬ですので、その他の目的にはご使用になれません。
- ・ 試薬についての基本的な知識のある方以外は使用しないでください。
- ・ 本品の取扱いは、マニュアル記載内容通りに行ってください。
- ・ マニュアル記載内容と異なった使用方法によるトラブルにつきましては、弊社では責任を負いかねます。
- ・ 製品安全データシート (SDS) は、ニッポンジーン Web サイト (www.nippongene.com) よりご覧になれます。

V プロトコール

<キット以外に必要な器具、機器など>

器 具： ・ マイクロピペット
・ ピペットチップ
・ マイクロチューブ
・ PCR チューブ、プレート、シール

機 器： ・ 遠心分離機
・ ボルテックスミキサー
・ リアルタイム PCR 装置 (FAM および VIC チャンネルを検出可能な機種)

<操作>

V-1. 検体 DNA の調製

牛全血より市販の DNA 抽出キット (推奨: CoCoMo-BLV™ DNA Pure SPIN (A001)) を使用してゲノム DNA を抽出します。

抽出したゲノム DNA は濃度を測定し、30 ng/μL に希釈調製します。検体 DNA の必要量は 1 反応あたり 5 μL です。

V-2. リアルタイム PCR 反応液の調製

下記の表に従い PCR 反応液を調製します。検体 DNA 以外の試薬を必要量+1 反応分をまとめて調製後、分注し Total Volume が 20 μL となるように検体 DNA を添加します。

【1 反応あたりの組成】

BLV・DRA Primer / Probe Mix	5 μL
CoCoMo 2× qPCR Mix	10 μL
検体 DNA (30 ng/μL)	5 μL
<hr/>	
Total Volume	20 μL

反応液および検体 DNA を添加後、PCR チューブ/プレートにしっかりと蓋/シールをして、遠心分離を行い、下記 V-3 の条件に従ってリアルタイム PCR 装置で反応を開始します。

V-3. リアルタイム PCR 条件

下記のリアルタイム PCR 条件で反応を開始します。操作手順、反応条件の設定方法は、リアルタイム PCR システムにより異なります。事前に使用機器の取扱説明書等をご確認の上、設定してください。

PCR サイクルは下表を遵守ください。

【リアルタイム PCR 条件 (Run mode : Standard)】

ステップ	サイクル数	温度	反応時間	蛍光検出
1	1	95°C	10 分	OFF
2	45	95°C	15 秒	OFF
3		60°C	60 秒	ON

*ROX 補正が必要な機種の場合、ROX 補正を ON にしてご利用ください。

【Run 設定の例 (QuantStudio™ Design & analysis Software v1.5.2 (Thermo Fisher 社) の場合)】

1. 起動後、「Create New Experiment」を選択ください。
2. Experiment Properties では Instrument type、Block type はご使用の機器に応じた設定をしてください。
3. Experiment type は「Standard Curve」を、Chemistry は「TaqMan® Reagents」を、Run mode は「Standard」を選択してください。選択後、「Next」を選択ください。
4. Experiment Method では Volume を「20 µL」、PCR サイクルは上表を参考に設定してください。設定後は「Next」を選択ください。
5. Assign Targets and Samples では Passive Reference が「ROX」であることを確認してください。
6. Advanced Setup タブで Targets の「+Add」をクリックして入力欄を追加した後、下記を参考に「Name」、「Reporter」、「Quencher」を設定してください。

Name	Reporter	Quencher
BLV LTR	FAM	NFQ-MGB
BoLA-DRA	VIC	NFQ-MGB

7. 画面右側で測定するウェルを選択してください。
8. Targets の FAM および VIC のチェックボックスにチェックを入れ、Task を設定してください。検量線を作成される場合は Quantity に Standard の初期量を入力してください。
9. 未知サンプル (Unknown) を設定するウェルを選択し、Samples のチェックボックスにチェックを入れ、必要に応じて Sample Name を入力し、Sample を設定してください。設定後は「Next」を選択ください。
10. START RUN をクリックし、使用する装置のシリアルナンバーを選択、Save 画面で任意のファイル名を入力し、Save をクリックして Run を開始してください。

V-4. 解析

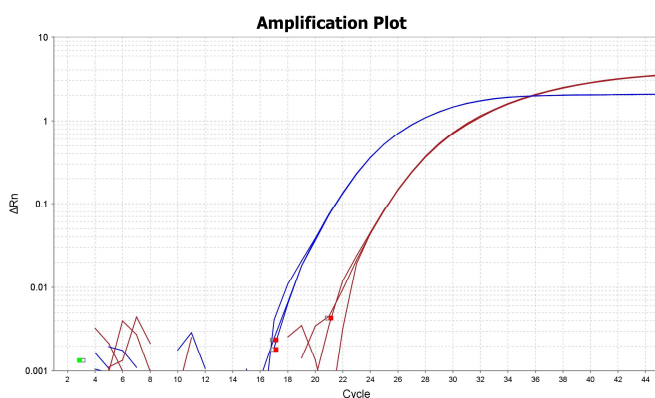
1. Run 終了後、Result タブの Analyze を選択し、解析を行ってください。
2. Amplification Plot および解析データを確認し、「Next」を選択ください。
※ QuantStudio™ Design & analysis Software v1.5.2 は BLV および BoLA-DRA の閾値をそれぞれの指数関数的増幅領域に自動で設定できます。使用機器およびソフトウェアによっては自動で決定されない場合もありますので、機器の取扱説明書に従って閾値決定を行ってください。
3. File Name 任意のファイル名を入力し、File type から目的のデータ形式を選択してください。
4. Content から出力するデータの種類の種類を選択し、Browse を選択してデータの出力先を指定してください。
5. Export をクリックし、データを出力してください。

V-5. 判定

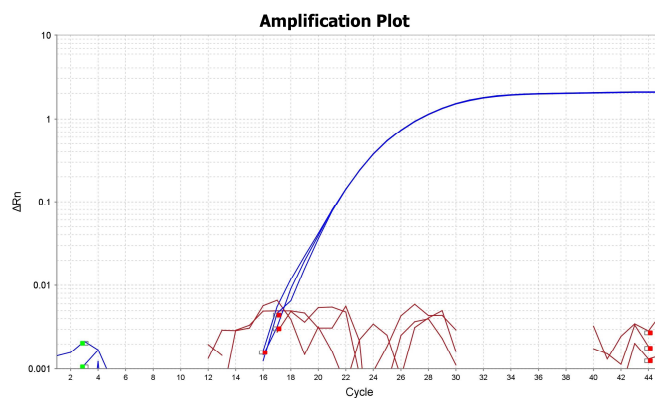
BLV LTR	BoLA-DRA	CoCoMo qPCR
+	+	陽性
-	+	陰性

- FAM (BLV LTR)
- VIC (BoLA-DRA)

CoCoMo qPCR : 陽性



CoCoMo qPCR : 陰性



VII トラブルシューティング

トラブル	予想される原因	対 策
検体 DNA を添加しているが反応しない（VIC の蛍光強度の増加が確認されない）。	牛全血からの DNA 抽出量が不足している。	吸光度法、蛍光法などにより検体 DNA に含まれる DNA 量を確認してください。検体 DNA の濃度が規定値になっていない場合、正しく測定ができない可能性がございます。検体 DNA の濃度が規定未満の場合はご使用の DNA 抽出キットのマニュアル等に従い、再度牛全血からゲノム DNA の抽出を行ってください。
	抽出した検体 DNA に阻害物質が残存している。	吸光度法により検体 DNA の品質を確認することを推奨します。
	試薬の調製方法を間違っている。	本マニュアル 2 ページ目に記載した”<操作>”の手順通りに調製ください。
ネガティブコントロールのウェルに増幅が見られる。	検体 DNA もしくは Positive Control がコンタミネーションしている。	コンタミネーションを起こさないように注意して操作してください。検体 DNA および Positive Control の添加前にネガティブウェルを調製し、蓋をしておくことでコンタミネーションを防止できます。
通常の指数関数的な増幅曲線とは異なる線が確認された。	ベースラインが正しく設定されていない。	対象サンプルを除外して再解析を行うか、サンプルに応じたベースラインの再設定を行ってください。

VIII 関連製品

Code No.	製品名	包装単位
A001	CoCoMo™-BLV DNA Pure SPIN	100 回用
A804	BLV PlasmidDNA/DilutionSolution	20 回用
A805	BLV Positive Control/Negative Control	20 反応用

IX 参考文献

M. Jimb, S. N. Takeshima, K. Matoba, D. Endoh, Y. Aida, BLV-CoCoMo-qPCR: Quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm *Retrovirology* 7 (2010) 91.

◎お問い合わせ先

株式会社ニッポンジーン

診断試薬部 動物用研究用試薬 販売窓口

〒930-0982 富山県富山市荒川 1 丁目 1 番 25 号

TEL 076-442-3611

E-Mail info-dd@nippongene.com

受付時間： 平日 9:00—12:00、13:00—17:00

・マニュアル記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なしに変更する場合があります。

Dual CoCoMo™-BLV qPCR Mix マニュアル (第 1 版)