

## ヨーネ菌 DNA 検出キット

## ヨーネ・プライマーセット RL

商品コード:D021-N

## 取扱説明書

## I 製品説明

本製品は、糞便から抽出・精製した DNA 溶液中のヨーネ菌 (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) DNA を特異的に検出するための試薬です。本製品には、PCR 阻害物質等の影響による偽陰性を避けるため、あらかじめ適切な濃度に調製されたインターナルコントロール(3-32IC)が含まれています。3-32IC を反応液に添加し、それを検出することで、PCR 阻害物質の影響による偽陰性を識別することが可能です。

3-32IC を鋳型として増幅した PCR 産物と、ヨーネ菌 DNA の標的配列を増幅した PCR 産物の Tm 値は大きく異なり、融解曲線解析によってそれぞれ増幅の有無を確認することが可能です。また、本製品には濃度の異なる 2 種類の陽性コントロール(3-32SPC および 3-32WPC)と、陰性コントロールが含まれており、信頼性の高い検査結果を得ることが可能です。

## 【ヨーネ・プライマーセット RL の特徴】

- ① ヨーネ菌 DNA を特異的に検出することができます。
- ② 適切な濃度に調製されたインターナルコントロールによって、PCR 阻害による偽陰性を識別することが可能です。
- ③ 2 種類の陽性コントロールおよび陰性コントロールによって、信頼性の高い検査を実施することが可能です。

## II キット内容

包装単位：200 反応分

	名 称	濃 度	容 量	数 量
I	3-32IC (インターナルコントロール)	0.3 fg/ $\mu$ L	200 $\mu$ L	1 本
II	3-32SPC (強陽性コントロール)	0.02 pg/ $\mu$ L	300 $\mu$ L	1 本
III	3-32WPC (弱陽性コントロール)	0.02 fg/ $\mu$ L	300 $\mu$ L	1 本
IV	IS900-3 primer	25 $\mu$ M	200 $\mu$ L	1 本
V	IS900-32 primer	25 $\mu$ M	200 $\mu$ L	1 本
VI	Negative Control (陰性コントロール)		300 $\mu$ L	1 本
VII	取扱説明書		—	1 部

## III 保存

- ・ 冷凍(−20°C)保存してください。
- 3-32IC、3-32SPC および 3-32WPC は、厳密に濃度を調製していますので小分け分注による保存は控えてください。

#### IV 本キット以外に必要な機器など

- ・ マイクロピペット
- ・ ピペットチップ
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ 糞便からの DNA 抽出キット（ヨーネ・ピュアスピン、商品コード：D011-N 等）
- ・ リアルタイム PCR 試薬（GeneAce RL qPCR Mix with UNG、ニッポンジーン社製）
- ・ リアルタイム PCR 装置に対応した PCR 用プレートもしくは PCR 用チューブ
- ・ 卓上遠心機
- ・ リアルタイム PCR 装置
- ・ 1.5 mL マイクロチューブ

#### V プロトコール（スクリーニング PCR 検査）

##### (1) 反応液の調製

① 1 サンプルあたり以下のように反応液を調製する。

2×GeneAce RL qPCR Mix(核酸増幅試薬)*	25.0 μL
IS900-3 primer(プライマー)	1.0 μL
IS900-32 primer(プライマー)	1.0 μL
3-32IC(インターナルコントロール)	1.0 μL
UNG(Uracil-DNA Glycosylase)*	0.5 μL
リボヌクレアーゼフリー水*	16.5 μL
合計	45.0 μL

\*別売リアルタイム PCR 試薬キット(GeneAce RL qPCR Mix with UNG)に添付

- ② 反応液を 1 ウェルあたり 45 μL ずつ分注し、そこへ「ヨーネ・ピュアスピン」(別売)等で抽出・精製した DNA 溶液 5.0 μL を添加してマイクロピペットで良く攪拌する。
- ③ Negative Control(陰性コントロール)および 2 種類の陽性コントロール(3-32SPC、3-32WPC)を各 5.0 μL、反応液に添加してマイクロピペットで良く攪拌する。
- ④ キャップ或いはシールを用いて密封した後、ヨーネ菌遺伝子の増幅を行う。

##### (2) 反応条件

リアルタイム PCR 装置を用いて、PCR 条件を以下のように設定する。蛍光色素は ResoLight Dye を選択する。装置に ResoLight Dye の設定がない場合は、SYBR<sup>®</sup> Green I を選択する。融解曲線解析は使用機種種の自動設定とする。

50 °C	2 分	
↓		
95 °C	10 分	
↓		
95 °C	30 秒	} 45 サイクル
↓↑		
68 °C	1 分	
↓		
60 °C		
↓		
融解曲線解析		
↓		
98 °C		

## VI 結果の判定

### (1) 試験成立の条件

- ① 3-32SPC (強陽性コントロール) : 反応液の蛍光強度が上昇し、融解曲線解析において陽性の解離温度の範囲内にピークを認める。
- ② 3-32WPC (弱陽性コントロール) : 反応液の蛍光強度が上昇し、融解曲線解析において陽性および3-32IC (インターナルコントロール) の解離温度の範囲内に二峰性のピークを認める。
- ③ Negative Control (陰性コントロール) : 反応液の蛍光強度が上昇し、融解曲線解析において3-32IC (インターナルコントロール) の解離温度の範囲内にピークを認め、かつ陽性のピークを認めない。

リアルタイム PCR 終了後の解析は、基本にご使用の機種種の自動設定で行ってください。Life Technologies 社製のリアルタイム PCR 装置を使用する場合は、パッシブリファレンスダイを (none) に設定し、ROX による補正を行わないで解析してください。また、リアルタイム PCR の機種によっては複数の解離温度を自動検出出来ないものがあり、手動での解析が必要となる場合があります。各リアルタイム PCR 装置における解離温度については、以下の表を参照してください。

各リアルタイム PCR 装置における解離温度 (参考値)

メーカー名	機種名	3-32IC の解離温度	陽性の解離温度
アジレントテクノロジー	Mx3000p	84.5°C±1.5°C	90.0°C±1.5°C
	ABI7300	83.0°C±1.5°C	89.0°C±1.5°C
Life Technologies	ABI7500/7500Fast	83.0°C±1.5°C	88.5°C±1.5°C
	StepOnePlus	83.0°C±1.5°C	89.0°C±1.5°C
	QuantStudio 3/5	83.0°C±1.5°C	89.5°C±1.5°C
タカラバイオ	Dice TP800	83.0°C±1.5°C	89.0°C±1.5°C
	iQ5	83.0°C±1.5°C	89.0°C±1.5°C
バイオラッドラボラトリーズ	Chromo4	82.0°C±1.5°C	88.0°C±1.5°C
	CFX96	82.0°C±1.5°C	88.0°C±1.5°C
	LightCycler 480	85.5°C±1.5°C	91.5°C±1.5°C
ロシュ ダイアグノスティック	LightCycler 96	85.5°C±1.5°C	91.0°C±1.5°C
	LightCycler nano	83.5°C±1.5°C	89.0°C±1.5°C

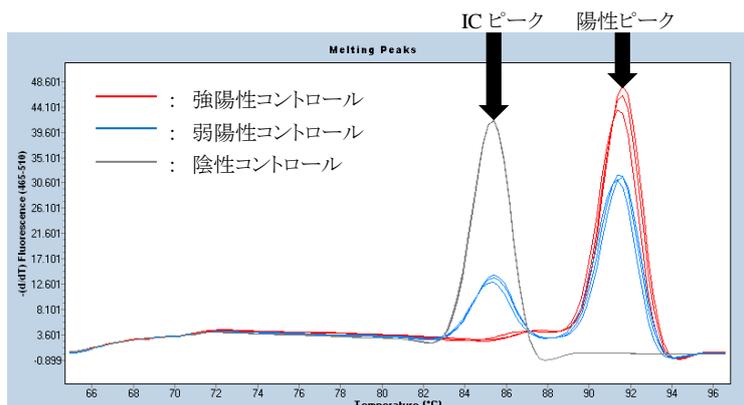
上記以外のリアルタイム PCR 装置を使用する場合、3-32SPC (強陽性コントロール) 及び Negative Control (陰性コントロール) を用いて、陽性およびインターナルコントロールの解離温度を確認すること。

### (2) 判定方法

**陽性:** 反応液の蛍光強度が上昇し、融解曲線解析において陽性の解離温度の範囲内にピークを認める。

**陰性:** 反応液の蛍光強度が上昇し、融解曲線解析において 3-32IC の解離温度の範囲内にピークを認め、かつ陽性のピークを認めない。

**判定不能:** 蛍光強度の上昇を認めない。蛍光強度の上昇が認められた場合も、融解曲線解析におけるピークが所定の解離温度の範囲外である検体は判定不能とする。



判定	IC ピーク	陽性ピーク
陽性	—	+
陽性	+	+
陰性	+	—
判定不能	—	—

## VII 使用上の注意

- (1) 本製品はヨーネ菌の DNA を検出するためのキットです。その他の目的にはご使用になれません。
- (2) 試薬についての基礎的な知識のある方以外は、取り扱わないでください。
- (3) 本製品の使用にあたっては、取扱説明書の記載内容どおりに行ってください。
- (4) 取扱説明書記載内容と異なったお取り扱い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。
- (5) 本製品外箱には使用期限が表示されております。使用期限を守ってご使用ください。
- (6) 廃棄方法は、国または地方自治体の条例に従ってください。

※ 素材：チューブ(PP)、ラベル(PET)、外箱(紙)、取扱説明書(紙)

- (7) **MSDS** の記載内容をご一読の上、ご使用ください。なお、**MSDS** につきましては、弊社 **HP** (<http://www.fasmac.co.jp/>) よりダウンロードして入手願います。

## VIII 参考文献

- 1) ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門

<https://www.naro.affrc.go.jp/niah/disease/paratuberculosis/index.html>

本製品は国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構、独立行政法人 家畜改良センター、株式会社ニッポンジーンが所有する特許のライセンスを受けて製造販売しています。

発売元：**FASMAC** 株式会社ファスマック

お問い合わせ先：株式会社ファスマック 遺伝子検査事業部

〒243-0041 神奈川県厚木市緑ヶ丘 5-1-3 TEL:046-295-8787 FAX:046-294-3738