

ウシ β-カゼイン A1A2 遺伝子多型キット

アルファベット
α lphaVET™

ウシ A1A2 ジェノタイピング qPCR Kit -RUO-

マニュアル (第 1 版)

品番 D001

株式会社ニッポンジーン

I 製品説明

アルファベット

α lphaVET™ ウシ A1A2 ジェノタイピング qPCR Kit -RUO-は、加水分解プローブ法を利用して、ウシ β -カゼイン遺伝子 (CSN2) の A1A2 型判定を行うためのキットです。増幅試薬、Primer/Probe、Positive Control、ddWater を含むオールインワンのキットであり、検体 DNA を準備するだけで Genotyping 実験が可能です。本品はパッシブリファレンス色素が予め混合されているため、ROX 補正が必要な機種においても追加で添加いただく必要はございません。

II 製品内容

アルファベット

α lphaVET™ ウシ A1A2 ジェノタイピング qPCR Kit -RUO- (品番 D001)

キット構成成分	容量 (50 反応用)	備考
2X Genotyping Mix	500 μ L \times 1 本	酵素、基質、パッシブリファレンス色素等を含む
10X Primer/Probe Mix	100 μ L \times 1 本	蛍光標識プローブを含む
Positive Control A1	50 μ L \times 1 本	
Positive Control A2	50 μ L \times 1 本	
Positive Control A1A2	50 μ L \times 1 本	
ddWater	500 μ L \times 1 本	脱イオン蒸留水 (ヌクレアーゼフリー)

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、本マニュアル記載内容通りに行ってください。
- ・ 本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) よりご覧いただけます。

本キット構成成分の「2X Genotyping Mix」は危険有害性のあるアセトアミドを含んでおります。使用後は必ず付属のアルミ袋に入れて保管ください。

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

血液や組織等より市販の DNA 抽出キットを使用して検体 DNA を抽出します。血液より DNA 抽出を実施する場合、CoCoMo-BLV™ DNA Pure SPIN (A001) を推奨します。CoCoMo-BLV™ DNA Pure SPIN (A001) を使用して新鮮なウシ全血から検体 DNA を抽出した場合、約 100 - 200 ng/μL の濃度で検体 DNA を抽出できます。

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 を添加することを推奨します。

1 反応あたりの組成

2X Genotyping Mix	10 μL
10X Primer/Probe Mix	2 μL
検体 DNA (1 μg 以下) *	_ μL
ddWater	_ μL
Total Volume	20 μL

* 検体 DNA は 5 - 500 ng の範囲で添加することを推奨しております。Positive Control を添加する場合は、2 μL を添加します。

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。Run mode は Standard で実施し、ジェノタイピング用の設定がある機種はジェノタイピング用設定で Run することを推奨します（PCR サイクルは下記を遵守ください）。

【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℃	10 分	OFF
2	45	95℃	15 秒	OFF
3		62℃	40 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. 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「Genotyping」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. Volume を「20 µL」に設定してください。
5. 「Genotyping」のモードでは、Pre-Read Stage と Post-Read Stage がありますので、そのまま PCR サイクルを設定ください。実際のサイクルは下記のようになります。ステップ 1 と 5 が Pre-Read Stage と Post-Read Stage になります。設定後は「Next」を選択ください。

ステップ	サイクル数	温度	反応時間	蛍光検出
1	1	60℃	30 秒	ON
2	1	95℃	10 分	OFF
3	45	95℃	15 秒	OFF
4		62℃	40 秒	ON
5	1	60℃	30 秒	ON

6. Passive Reference は「ROX」を設定ください。
Reporter は「VIC」と「FAM」をご選択ください。Quencher は「NFQ-MGB」をご選択ください。サンプル設定後は「Next」を選択ください。
7. Run を開始してください。

V-4. 判定

【検出チャンネル】

検出対象遺伝子	蛍光フィルター	クエンチャー
β-カゼイン (CSN2) _A1 型	VIC	Dark Quencher
β-カゼイン (CSN2) _A2 型	FAM	Dark Quencher

【判定】

増幅色素	判定
VIC のみ	A1 型
FAM のみ	A2 型
VIC および FAM	A1A2 型

VI 検出領域について

下記にウシ β-カゼイン遺伝子 (CSN2) の配列を示します (一部抜粋)。

Chromosome 6, exon 7

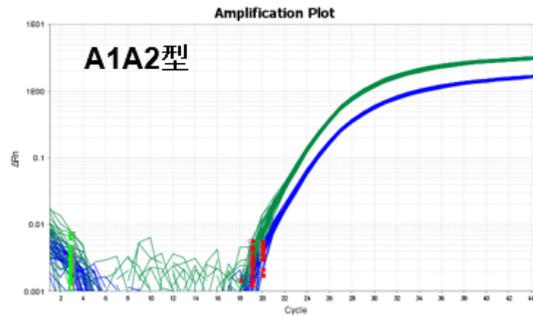
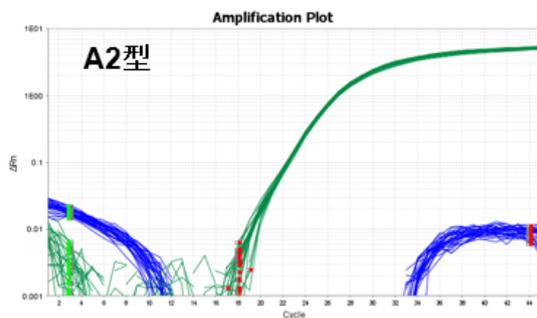
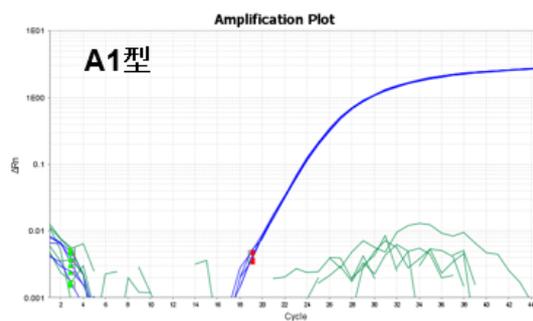
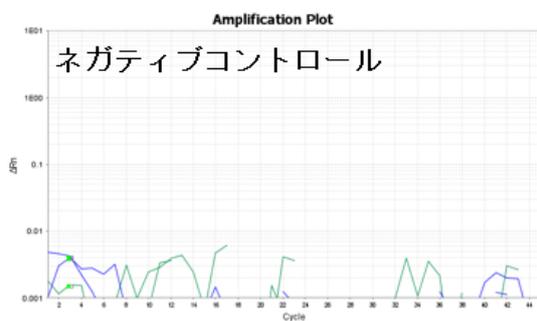
-TCTCTAGTCTATCCCTTCCCTGGGCCCATCC (A/C) TAACAGCCTCCCACAAAACATCCCTCCT-

上記の配列に赤字で記載の箇所が本キットで検出可能な一塩基多型の箇所になります。遺伝子配列が C**A**T の場合、67 番目のアミノ酸がヒスチジンをコードする配列となり、β-カゼインは A1 型と判定されます。遺伝子配列が C**C**T の場合、67 番目のアミノ酸がプロリンをコードする配列となり、β-カゼインは A2 型と判定されます。

VII 反応例

CoCoMo-BLV™ DNA Pure SPIN (A001) を使用して、65 検体のウシ全血より検体 DNA を抽出した。抽出プロトコールはキットの取扱い説明書の通りに行った。1 反応あたり 100 ng の検体 DNA を使用して、本キットを用いて β -カゼイン遺伝子のジェノタイピングを実施した。その結果、遺伝子型特異的な結果が得られた。

— VIC (A1型)
— FAM (A2型)



VIII トラブルシューティング

トラブル	予想される原因	対 策
FAM チャンネル増幅時にVICチャンネルで微弱なシグナルがある。もしくは、VIC チャンネル増幅時に FAM チャンネルで微弱なシグナルがある。	qPCR 反応中の蛍光ノイズ。	正常な反応ですのでそのままご利用ください。本キットは加水分解プローブを利用して Allele 特異的に検出する反応系です。高感度な検出機器を使用した場合、蛍光ノイズとして微弱な蛍光シグナルが観察される場合がありますが、品質に問題はございません。
検体 DNA を添加しているが反応しない。	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。	本マニュアルに記載した方法で調製し、再度試験してください。
	検体 DNA の添加量が過剰もしくは不足している。	吸光度法、蛍光法などにより検体 DNA に含まれる DNA 量を確認することを推奨します。一般的な DNA 抽出キットのプロトコールに従って抽出した DNA をそのまま添加可能ですが、検体 DNA 量の目安としては1反応あたり5–500 ng 添加することを推奨します。
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。	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。

IX 関連製品

Code No.	製品名	包装単位
A001	CoCoMo™-BLV DNA Pure SPIN	100 回用

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。

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