

遺伝子研究用

 α 1-Antitrypsin Gene Mutation Detection Kit

本製品は、 α -1 アンチトリプシン遺伝子の PiS 及び PiZ 遺伝子変異をインターカレーターを用いたリアルタイム PCR 法で検出するキットです。PiS 及び PiZ 遺伝子変異は、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の重症化の原因と予想されています。本製品は、当社独自の点変異検出法で、PiS 及び PiZ 遺伝子変異を高感度に検出できるキットです。

【貯法】

冷凍 (-20°C) 保存

【ご使用前に】

- キットの各試薬は小分けをして冷凍 (-20°C) 保管し、なるべく凍結融解の回数を減らしてください。
- 実験施設の取り決めに従い、安全性に留意して実験を行ってください。
- 実験中は手袋や保護メガネなど保護具を着用してください。
- 操作中はヌクレアーゼの混入に注意してください。
- 試薬調製は氷上で行ってください。
- TE バッファーなど EDTA が含まれるバッファーを使用しないでください。

【別途必要な試薬および器具】

- qPCR(Real-Time PCR) 装置
- マイクロチューブ遠心機
- Nuclease フリー滅菌水 (例:コード No. 316-90101, ニッポンジーン)
- マイクロピペットおよび Nuclease フリーピペットチップ
- Nuclease フリー1.5mL チューブ (DNA/RNA 低吸着品が望ましい。例 : Micro tube 1.5ml DNA LowBind, Sarstedt)
- qPCR(Real-Time PCR) プレートとプレートシール、もしくは qPCR(Real-Time PCR) チューブとキャップ
- 氷もしくは保冷剤

【キット構成】

試薬名	容量
1st PCR PiS primer set	100 μ L \times 1
1st PCR PiZ primer set	100 μ L \times 1
qPCR PiS wild type primer set	100 μ L \times 1
qPCR PiS mutant type primer set	100 μ L \times 1
qPCR PiZ wild type primer set	100 μ L \times 1
qPCR PiZ mutant type primer set	100 μ L \times 1
2 \times PCR master mix	1,500 μ L \times 2
20 \times Intercalator *	200 μ L \times 1

*Biotium, Inc.から商用ライセンスを得て、研究用試薬として販売しています (US 7803943 B2, US 7776567 B2)。

【使用方法】

<試薬の準備>

1. キットに含まれる試薬を融解後、氷上に置きます。
2. 各試薬をボルテックスミキサーでよく混合した後、遠心機でスピンドウンします。

1. 鋳型 DNA サンプルの調製

下記のいずれかの方法で鋳型 DNA サンプルを調製します。

- ① 血液などからすでに抽出したゲノム DNA がある場合は 5ng から 50ng を使用します。
- ② 拭い液又は唾液より、DNase 処理又は DNA 除去をしていないウイルス RNA 抽出 kit など（例：NIPPONGENE ISOSPIN RNA Virus～For coronavirus RNA extraction～(318-08971)）ですでに抽出したサンプルを所持している場合は、このサンプルを 2 μ L 使用します。
- ③抽出したゲノム DNA を所持していない場合は 拭い液又は唾液を 90 $^{\circ}$ C、6 分熱処理後氷冷したサンプルを 2 μ L 使用します。

2.1st PCR 反応

① PiS 遺伝子変異型測定

鋳型 DNA サンプル*	8 μ L
1st PCR PiS primer set	2 μ L
2 \times PCR master mix	10 μ L
<hr/>	
	Total 20 μ L

*上記①の場合は蒸留水で 8 μ L、②及び③の場合は蒸留水を 6 μ L 加えて 8 μ L に調製してください。

② PiZ 遺伝子変異型測定

鋳型 DNA サンプル	8 μ L
1st PCR PiZ primer set	2 μ L
2 \times PCR master mix	10 μ L
<hr/>	
	Total 20 μ L

*上記①の場合は蒸留水で 8 μ L、②及び③の場合は蒸留水を 6 μ L 加えて 8 μ L に調製してください。

<PCR 反応条件>

98 $^{\circ}$ C 20 秒

↓

98 $^{\circ}$ C 8 秒	} 36 サイクル
68 $^{\circ}$ C 10 秒	

PCR 反応終了後、PCR 増幅産物は氷冷します。

3. qPCR 反応

① PiS 遺伝子変異型測定

下記 PCR 反応液をそれぞれ調製します。

PiS 1st PCR 増幅産物	2 μ L
qPCR PiS wild type primer set	2 μ L
20 \times Intercalator	1 μ L
蒸留水	5 μ L
<u>2\timesPCR master mix</u>	<u>10μL</u>
	Total 20 μ L

PiS 1st PCR 増幅産物	2 μ L
qPCR PiS mutant type primer set	2 μ L
20 \times Intercalator	1 μ L
蒸留水	5 μ L
<u>2\timesPCR master mix</u>	<u>10μL</u>
	Total 20 μ L

② PiZ 遺伝子変異型測定

下記 PCR 反応液をそれぞれ調製します。

PiZ 1st PCR 増幅産物	2 μ L
qPCR PiZ wild type primer set	2 μ L
20 \times Intercalator	1 μ L
蒸留水	5 μ L
<u>2\timesPCR master mix</u>	<u>10μL</u>
	Total 20 μ L

PiZ 1st PCR 増幅産物	2 μ L
qPCR PiZ mutant type primer set	2 μ L
20 \times Intercalator	1 μ L
蒸留水	5 μ L
<u>2\timesPCR master mix</u>	<u>10μL</u>
	Total 20 μ L

PCR 反応条件

FAM / SYBER Green の波長領域で測定します。

98°C 20 秒

↓

98°C 5 秒

68°C 5 秒 (測定)

} 30 サイクル

↓

融解曲線反応

68°C

↓

↓

95°C

} 5 秒、0.5°C/サイクル

