

牛白血病診断用リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応キット

平成 28 年 4 月 18 日 (告示第 1021 号) 新規追加

牛白血病ウイルスの遺伝子が保有する 2 つの LTR 領域を増幅することができるプライマーの組合せ及びプローブを用い、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（以下この項において「リアルタイム PCR」という。）により牛白血病プロウイルス DNA を検出するためのキットである。

1 小分製品の試験

1.1 特異性及び力価試験

1.1.1 試験材料

試験品、参照陽性対照（付記 1）及び参照陰性対照（付記 2）を用いる。

1.1.2 試験方法

試験品を用いて、1 枚のリアルタイム PCR 用プレートに、BLV プライマー $2 \mu \text{L}$ 及び BLV プローブ $3 \mu \text{L}$ を 4 ウェルずつ分注し、それらに核酸増幅試薬 $10 \mu \text{L}$ ずつ加える。その後、1 ウェルずつに、指示陽性対照を TE 緩衝液（付記 3）を用いて 1,000 倍希釈して調製した指示陽性対照希釈液、指示陰性対照、参照陽性対照を TE 緩衝液を用いて 10^9 倍希釈して調整した参照陽性対照希釈液又は参照陰性対照 $5 \mu \text{L}$ ずつを加え、 $20 \mu \text{L}$ の反応液としてよく混和する。リアルタイム PCR 装置（付記 4）を用いて、 50°C 2 分間のウラシル-N-グリコシラーゼ（以下この項において「UNG」という。）の活性化反応及び 95°C 10 分間の UNG 不活性化反応後、 95°C 15 秒間の熱変性並びに 60°C 1 分間のアニーリング及び伸長反応を 1 セットとして 40 回繰り返した後、指示陽性対照希釈液、指示陰性対照、参照陽性対照希釈液及び参照陰性対照における threshold cycle（以下この項において「Ct 値」という。）を解析する。

1.1.3 判定

指示陽性対照希釈液の Ct 値は、34.93 から 37.96 の範囲又は使用するリアルタイム PCR 装置毎に別に定める Ct 値の範囲内でなければならない。また、指示陰性対照の Ct 値は決定されてはならない。参照陽性対照希釈液の Ct 値は、35.24 から 38.04 の範囲又は使用するリアルタイム PCR 装置毎に別に定める Ct 値の範囲内でなければならない。また、参照陰性対照の Ct 値は、38.04 を超えるか又は決定されてはならない。

付記 1 参照陽性対照

牛白血病プロウイルスの LTR 領域を含む直線化プラスミド DNA で、 $2.0 \times 10^{10} \text{ copies}/\mu \text{L}$ に調製したもの。

付記 2 参照陰性対照

牛白血病プロウイルス陰性の母牛から生まれた直後に隔離した子牛の血液から抽出、精製したゲノム DNA を TE 緩衝液で $30 \text{ ng}/\mu \text{L}$ の濃度に調製したもの。

付記 3 TE 緩衝液

1,000mL 中

トリスヒドロキシアミノメタン	1.21 g
----------------	--------

エチレンジアミン四酢酸	0.29 g
-------------	--------

水	残量
---	----

pH を 8.0 に調整した後、121 ℃で 15 分間高压滅菌する。

付記4 リアルタイム PCR 装置

動物医薬品検査所が適當と認めたリアルタイム PCR 装置であつて、指示陽性対照希釈液及び指示陰性対照の Ct 値の範囲が、事前に確認されているもの。