

超高速RT-PCRを用いたインフルエンザウイルスの型別検出

超高速1step RT-PCRにより、A型、新型(A/H1N1pdm)、B型インフルエンザウイルスの検出を行いました。

方法

A型、新型(A/H1N1pdm)、B型インフルエンザウイルス及び、コントロールとしてヒトmRNA検出用RT-PCR反応液を各well毎に作成し、インフルエンザ感染者の鼻腔ぬぐい液(検体A、B)をtemplateとして使用し各ウイルスの検出を行いました。

反応液組成

Reagent	Volume(uL)
2xRT-PCR master mix ¹	8
10uM Forward primer	0.8
10uM Reverse primer	0.8
SYBR Green (1/2000)	1.6
distilled water (D.W.)	4.3
template ²	0.5
Total	16

PCR条件

55 60s
95°C 60s
98°C 4.0sec
60 6.0sec } 30cycles
75°C 6.0sec } **反応時間:11分38秒**

ターゲット遺伝子

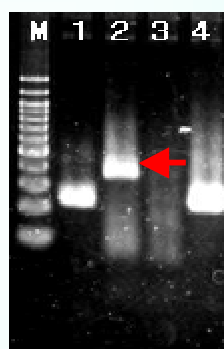
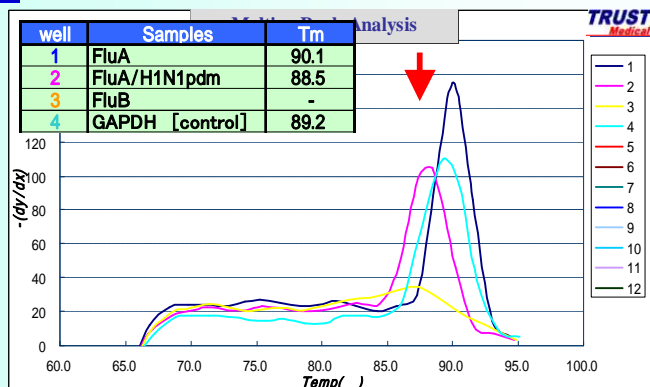
・Influenzavirus A M protein領域 234bp
・Influenzavirus A/H1N1pdm HA領域 349 bp
・Influenzavirus B M protein領域 233bp
・コントロール用ヒトmRNA GAPDH領域 226bp

1: RT-PCR master mixは弊社オリジナル試薬です。開発段階のため組成は明記しておりません。

2: 鑄型には検体A、B(イムノクマトキットでFluA、Bがそれぞれ検出された鼻腔ぬぐい液)をHigh Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche)で抽出したサンプルを使用

結果

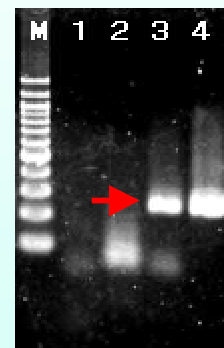
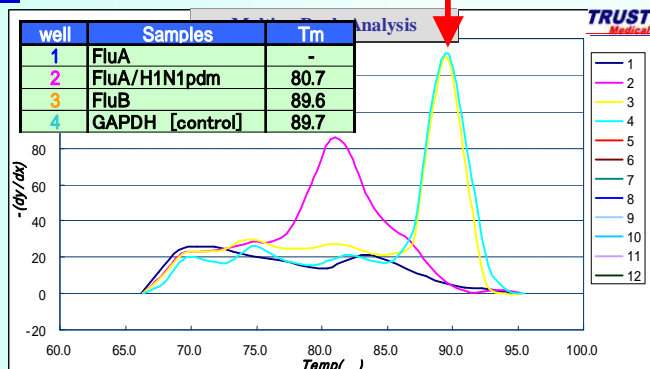
検体A (イムノクマトFluA陽性サンプル)



samples	
M	100bp DNA ladder
1	FluA
2	FluA/H1N1pdm
3	FluB
4	GAPDH [control]

融解曲線分析をいれて15分以内で、
検体Aから
新型インフルエンザウイルス
(A/H1N1pdm)、
検体Bから
B型インフルエンザウイルス
を検出しました。
超高速RT-PCRにて型別検査が可能
でした。

検体B (イムノクマトFluB陽性サンプル)



samples	
M	100bp DNA ladder
1	FluA
2	FluA/H1N1pdm
3	FluB
4	GAPDH [control]

●本書についてのお問い合わせ

トラストメディカル株式会社
バイオ開発部

〒679-0105 兵庫県加西市朝妻町1044番地
TEL:0790-47-9009 FAX:0790-47-9002
URL <http://www.trustmedical.jp>
e-mail info@trust.neatnet.jp

Influenza virus types and subtypes detection

We've realized a very short time Influenza virus types and subtypes (FluA ,FluA/H1N1pdm ,FluB) detection by 1step RT-PCR.

Method

We detect types and subtypes in nasal cavity swabs from Influenza-infected person. We use HyperPCR (UR104MK) and Influenza A virus, Influenza A/H1N1pdm virus, Influenza B virus specific primer set.

Composition of PCR mixture

Reagent	Volume(uL)
2xRT-PCR master mix ¹	8
10uM Forward primer	0.8
10uM Reverse primer	0.8
SYBR Green (1/2000)	1.6
distilled water (D.W.)	4.3
template ²	0.5
Total	16

Thermal cycling Condition

55 60s
 95°C 60s
 98°C 4.0sec } 30cycles
 60 6.0sec } **PCR Time : 11 ' 38 "**
 75°C 6.0sec }

Target gene

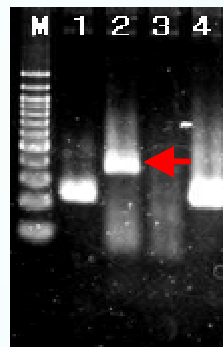
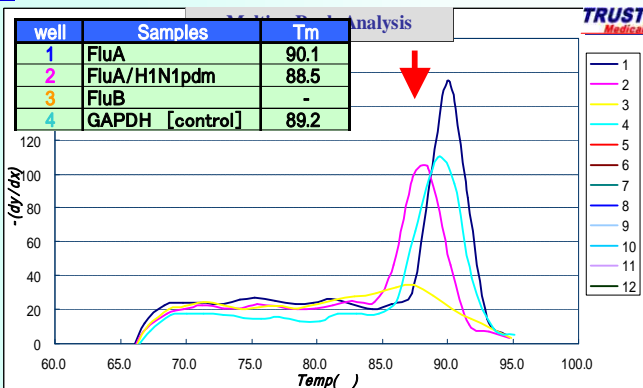
- Influzavirus A M protein gene 234bp
- Influzavirus A/H1N1pdm HA gene 349bp
- Influzavirus B M protein gene 233bp
- human mRNA(control) GAPDH gene 226bp

1: RT-PCR master mix is an our company's original reagent.

2: Viral RNA was extracted with High Pure Viral Nucleic Acid Kit(Roche) from sample A(Immunochromato kit FluA positive) and sample B(Immunochromato kit FluB positive)

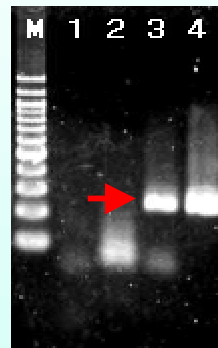
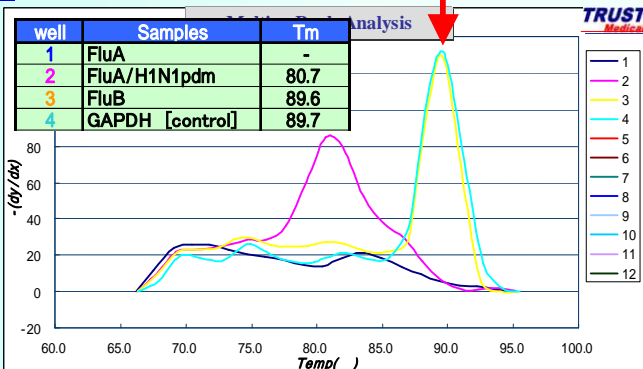
Result

Sample A (Immunochromato kit FluA positive)



	samples
M	100bp DNA ladder
1	FluA
2	FluA/H1N1pdm
3	FluB
4	GAPDH [control]

Sample B (Immunochromato kit FluB positive)



	samples
M	100bp DNA ladder
1	FluA
2	FluA/H1N1pdm
3	FluB
4	GAPDH [control]

Within 15 minutes (including the time for Melting Curve Analysis), UR104MK can detect Influenza A/H1N1pdm virus in sampleA, Influenza B virus in sampleB.