



# Instruction Manual for HCV Genotype Primer Kit

HCV Genotype Determination Kit for Research Purpose

**Thoroughly read this instruction manual before use of this kit**

## Background

Study of nucleotide sequence of hepatitis C virus (HCV) has brought to light many of its variants, and reports on its grouping in 5 major genotypes as determined by respective genomic sequences in a fairly well conserved portion as well as geographic locality of each subtype have subsequently been made<sup>1,2)</sup>.

Genotyping of HCV is now considered to be clinically helpful in pinning and tracking down the source and route of its infection and will be instrumental in further elucidation of the virus.

Recent report also suggests difference in resistance against therapy and course of the disease of each viral subtype predicting the therapeutic significance of its genotyping<sup>3)</sup>.

This kit is developed for genotyping HCV in 5 groups, types I (1a), II (1b), III (2a), IV (2b), and V (3a), determined by Okamoto, et al according to genomic sequences in its core region<sup>4)</sup>.

## Feature

This kit determines HCV genotypes by simply electrophoresing HCV core region genes of type-specific sequence length amplified by Reverse-Transcription Polymerase Reaction (RT-PCR) and features accurate and simple determination of HCV genotypes.

## Kit Configuration

This kit contains the following components.

Label Color	Label Description	Component	Quantity	Volume
Red	RT Primer Solution	Primer for reverse transcription	5 vials	15 $\mu$ L / vial
Green	1st Primer Solution	Primer for 1st amplification	5 vials	60 $\mu$ L / vial
Yellow	2nd Primer Solution	Primer for 2nd amplification	5 vials	60 $\mu$ L / vial
White	10x dNTPs	dNTPs	5 vials	100 $\mu$ L / vial
Blue	Sterilized Water	Sterilized water	5 vials	1 mL / vial
Purple	Marker	Type-specific marker	5 vials	110 $\mu$ L / vial
Brown	Gel Loading Buffer	Buffer for applying samples	5 vials	100 $\mu$ L / vial

## Application

Determination of HCV genotypes according to its RNA nucleotide sequence.

## Principle of Determination

This kit is for determination of HCV-RNA genotypes by comparison in sizes of the products amplified by RT-PCR using HCV genotype-specific primers, and then subjecting the product to electrophoresis (Fig. 1).

Portion (272 bp) of the core region is first amplified by RT-PCR with primers common to all 5 genotypes. The product is then amplified in second PCR with 5 genotype-specific primers and is electrophoresed for determination of HCV-RNA genotype by its size.

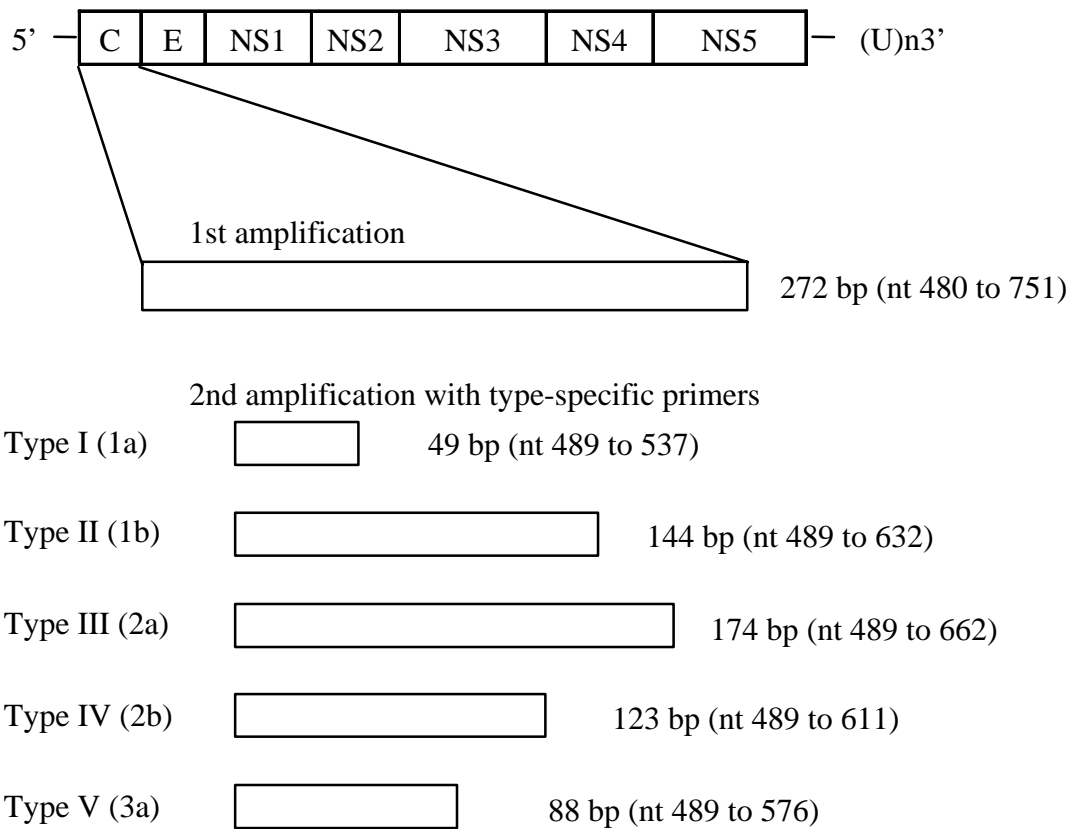


Fig. 1 Principle of HCV Genotype Determination

Reference) Okamoto, et al: Journal of General Virology, **74**: 2385-2390, 1993.

## Operational Procedures

- Note: (1) For preparation of the solution before PCR amplification, it is essential to use a variable-volume single channel pipetter or pipettors. Pipetter tips must be provided with filter and must be replaced for every reagent and sample.
- (2) To prevent inactivation of enzyme or non-specific reaction, the reaction solution must be prepared in crushed ice.
- (3) Do not handle the PCR products with a variable-volume single channel pipetter or pipettors exclusive for preparation of the solution before PCR amplification.
- (4) Contamination of the solution before PCR amplification with PCR products may result in pseudo positive reaction and false determination. It is recommended that area, tools, and instruments for handling of PCR products should be separated before and after PCR amplification.

### 1. Materials required for the assay but not supplied with the kit

#### 1-1 Reagents, tools and equipments required but not supplied with this kit (For RT-PCR amplification.)

- Variable-volume single channel pipetter
- Micro pipetter tips (with filter and sterilized in an autoclave)
- Plastic tubes for PCR (0.5 mL, sterilized in an autoclave, thin walled tube)
- Vortex mixer
- Microtube centrifuge
- Thermal cycler
- Temperature stable DNA polymerase (AmpliTaq<sup>®</sup>)
- Reverse transcriptase (SuperScript<sup>®</sup> II by BRL)
- RNase inhibitor (Promega)
- Mineral oil (DNase/RNase free light white oil)

#### 1-2 Reagents, tools and equipments required but not supplied with this kit (For electrophoresis)

- Electrophoresis unit
- Electrophoresis gel marker
- Variable-volume single channel pipetter
- Trans UV illuminator
- Instant camera (with orange-red color filter)
- Film for instant camera (ISO 3000)
- UV protective equipment
- NuSieve<sup>®</sup> GTG agarose
- SeaKam<sup>®</sup> GTG agarose
- Tris hydroxymethyl aminomethane (Tris base)
- Glacial acetic acid
- EDTA
- Ethidium bromide (Carcinogenic chemical. Handle with absolute care)

## 2. Preparation of reagents

- 50× TAE buffer: (To be stored at room temperature.)  
Composition: Add sterilized water to mixture of Tris base 242 g, glacial acetic acid 57.1 mL and 0.5M EDTA (pH 8.0) 100 mL to make 1000 mL solution. (Dilute 50 folds with deionized water to make working solution.)
- Ethidium bromide staining solution. (To be stored at room temperature.)  
Dissolve in distilled water to make 1 µg/mL concentration.
- 4% agarose gel (NuSieve<sup>®</sup> : SeaKam<sup>®</sup> = 3 : 1)  
Assemble a gel frame according to the instruction manual provided to the electrophoresis unit.  
Add 4% agarose gel (NuSieve<sup>®</sup> : SeaKam<sup>®</sup> = 3 : 1) to 1× TAE buffer and thoroughly dissolve in an autoclave (121°C, 3 ~ 5 min.). Thoroughly mix the solution at room temperature. When temperature of the agarose gel solution goes down to about 60°C, carefully pour it in the gel frame forming no bubble on the gel surface. Carefully set a comb and allow the solution thoroughly to cure at room temperature. Apply sparse 1× TAE buffer to the comb and carefully extract it from the gel. This gel can be stored in the 1× TAE buffer for several days.

## 3. Operation protocol

### 3-1 Synthesis of cDNA

- (1) Heat the RNA solution to 70 °C for 2 min to destruct the tertiary structure. (This is optional and not essentially required.)
- (2) Prepare the following RT reaction solution in a micro tube for PCR (0.5 mL, thin walled sterilized tube).

Composition of the RT reaction solution (for 1 test)

RNA solution	5.00 µL	(Isolated from 100 µL of serum)
5× RT buffer	2.00 µL	(Provided to SuperScript <sup>®</sup> II)
20 mM dNTP mix	0.25 µL	
0.1 M DTT	1.00 µL	(Provided to Super Script <sup>®</sup> II)
RT primer solution	1.00 µL	(A component of this kit)
RNase inhibitor	0.25 µL	(RNasein <sup>®</sup> by Promega, 40 u/µL)
Reverse transcriptase	0.50 µL	(SuperScript <sup>®</sup> II by BRL, 200 u/µL)
	10.00 µL	

- (3) Add to the above tube 25µL of mineral oil (DNase/RNase free light white oil).

- (4) Through mix the reaction solution and allow reaction according to the following cycle.

Reverse transcription reaction	42 °C, 60 min
	↓
Inactivation of enzyme	95 °C, 15 min
	↓
Storage	4 °C

### 3-2 1st PCR Reaction

- (1) Prepare the following 1st PCR reaction solution.

Composition of the 1st PCR reaction solution (for 1 test)

1st PCR primer solution	5.00 µL	(A component of this kit)
10× dNTPs	4.00 µL	(A component of this kit)
AmpliTaq <sup>®</sup>	0.25 µL	(by Roche Molecular Systems)
10×PCR buffer	3.00 µL	(A component of AmpliTaq <sup>®</sup> containing MgCl <sub>2</sub> )
Sterilized water	27.75 µL	(A component of this kit)
	40.00 µL	

- (2) Dispense the above 1st PCR reaction solution in a tube (0.5 mL, sterilized thin walled tube) and cover the top of the solution with 25 µL of mineral oil (DNase/RNase free light white oil).
- (3) Add to the tube 10 µL of synthesized cDNA in the above step.
- (4) After mixing on a vortex mixer, spin by a microtube centrifuge at 1000 ~ 3000 rpm for 10 ~ 30 sec to clear the tube inner wall of the mixed solution.
- (5) Set the program controller of a PCR thermal cycler according to the following conditions to amplify DNA.

DNA denaturation	94°C, 30 sec	} 35 cycles
Annealing	55°C, 30 sec	
DNA amplification	72°C, 60 sec	
	↓	
After completion of cycles	72°C, 7 min	
	↓	
Storage	4°C	

Note: Depending upon the instrument, above conditions may have to be changed. Adjust the conditions as required.

## 3-3 2nd PCR Reaction

- (1) Prepare the following 2nd PCR reaction solution.

Composition of the 2nd PCR reaction solution (for 1 test)

2nd PCR primer solution	5.00 $\mu$ L	(A component of this kit)
10 $\times$ dNTPs	5.00 $\mu$ L	(A component of this kit)
AmpliTaq <sup>®</sup>	0.25 $\mu$ L	(by Roche Molecular Systems)
10 $\times$ PCR buffer	5.00 $\mu$ L	(A component of AmpliTaq <sup>®</sup> containing MgCl <sub>2</sub> )
Sterilized water	33.75 $\mu$ L	(A component of this kit)
	49.00 $\mu$ L	

- (2) Dispense the above 2nd PCR reaction solution in a tube (0.5 mL, sterilized thin walled tube) and cover the top of the solution with 25  $\mu$ L of mineral oil (DNase/RNase free light white oil).
- (3) Add to the tube 1  $\mu$ L of the 1st PCR product.
- (4) After mixing on a vortex mixer, spin by a microtube centrifuge at 1000 ~ 3000 rpm for 10 ~ 30 sec to clear the tube inner wall of the mixed solution.
- (5) Set the program controller of a PCR thermal cycler according to the following conditions to amplify DNA.

DNA denaturation	94°C, 30 sec	} 25 cycles
Annealing	60°C, 30 sec	
DNA amplification	72°C, 30 sec	
After completion of cycles	72°C, 7 min	
Storage	4°C	

## 3-4 Electrophoresis

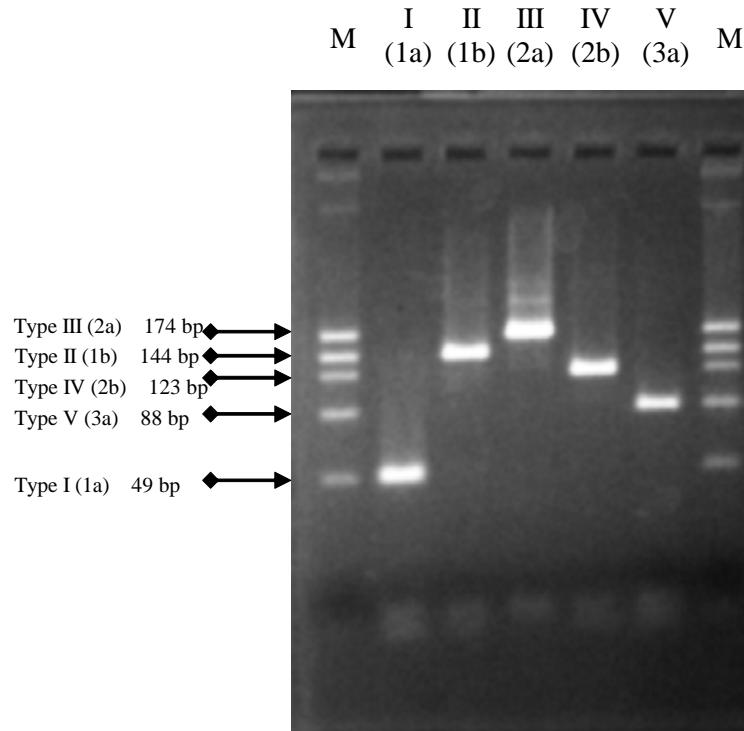
- (1) Dispense gel and the buffer (1 $\times$  TAE) in the electrophoresis bath.
- (2) Add 2  $\mu$ L of the gel loading buffer to 10  $\mu$ L of the 2nd PCR product and mix them. Load this mixture to the well. Dispense 10  $\mu$ L of the type-specific marker in the well.
- (3) Apply 100V for 40 min and electrophorese.
- (4) Immerse the gel in ethidium bromide and rock for approximately 15 min.
- (5) Take a picture of the electrophoresed pattern using a trans UV illuminator.

## Determination

### Determination by HCV-RNA genotype-specific amplification

HCV-RNA genotypes are determined by the electrophoresis patterns.

As shown in the picture below, the amplified bands of type I (1a), II (1b), III (2a), IV (2b), and V (3a) appear at the positions of 49 bp, 144 bp, 174 bp and 123 bp, and 88 bp, respectively. Determine genotypes from the positions of the band. When concentration of HCV-RNA is high, the amplified band of the 1st PCR product may appear at 272 bp.



#### Pattern of HCV-RNA genotypes

M : Type-specific marker

I (1a): Type I (1a)

II (1b): Type II (1b)

III (2a): Type III (2a)

IV (2b): Type IV (2b)

V (3a): Type V (3a)

## Cautions for specimen handling

### (1) Samples

Fresh serum samples should be used for this test.

### (2) Contamination

Samples contaminated with the PCR product may cause incorrect results. Carefully handle them.

## Cautions for handling and operation

(1) Return the kit and samples to room temperature before use and thoroughly and carefully mix each component so as not to form bubbles.

(2) Do not mix components of different lot numbers.

- (3) Store the kit under conditions as instructed and use up before expire date.
- (4) Avoid contamination of kit components with microorganisms.
- (5) Store the kit avoiding direct, strong light.
- (6) Handle samples carefully to avoid infection with viruses.
- (7) Do not use the kit and kit components for other purposes than HCV-RNA genotyping.
- (8) Before discarding samples, reagents, components and tools (tubes, tips, etc.), disinfect them by either of the followings.
  - Immerse in 1% formalin for 1 hr or longer.
  - Immerse in 2% glutaraldehyde for 1 hr or longer.
  - Immerse in 0.1% sodium azide for 1 hr or longer.
  - Autoclave at 121°C for 1 hr or longer.

#### Package, storage conditions, shelf life and product code

Name of Kit	Package	Storage	Shelf life	Product Code
HCV Genotype Primer Kit	50 tests	-20°C, in the dark	Shown on the package	8C01

#### References

- 1) Okamoto H, et al: Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *Journal of General Virology* **73**: 673-679, 1992.
- 2) Okamoto H, et al, Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes. *Virology* **188**: 331-341, 1992.
- 3) Kanai K, et al, HCV genotypes in chronic hepatitis C and response to interferon. *Lancet* **339**: 1543, 1992.
- 4) Okamoto H, et al, Characterization of the genomic sequence of type V (or 3a) hepatitis C virus isolates and PCR primers for specific detection. *Journal of General Virology* **74**: 2385-2390, 1993.

#### Others

NuSieve<sup>®</sup>, SeaKam<sup>®</sup>, and SuperScript<sup>®</sup> are trade marks of FMC, and AmpliTaq<sup>®</sup> is trade mark of Roche Molecular Systems, respectively.

Distributor  **COSMO BIO Co., LTD.**  
 Inspiration for Life Science

TOYO 2CHOME, KOTO-KU, TOKYO, 135-0016, JAPAN

<http://www.cosmobio.co.jp> e-mail : [export@cosmobio.co.jp](mailto:export@cosmobio.co.jp)  
 Phone : +81-3-5632-9617 FAX : +81-3-5632-9618

RM015002309E



## 【操作上の留意事項】

- (1) 測定試料の性質  
検体は新鮮な血清を用いて下さい。
- (2) コンタミネーション  
PCR産物が検体にコンタミネーションすると結果が異なります。じゅうぶん注意して下さい。

## 【使用上又は取扱い上の注意】

- (1) キット中の各試薬及び検体は、使用前に室温に戻して泡立てないように混和し、液を均一にしてから用いて下さい。
- (2) ロット番号の異なる試薬を混合して使用しないで下さい。
- (3) キットは表示されている条件に保存し、有効期限内に使用して下さい。
- (4) 試薬は細菌汚染されないように注意して下さい。
- (5) 保存中強い光を避けて下さい。
- (6) ウイルス感染の危険性を避けるために、検体はじゅうぶんに注意して取り扱うようにして下さい。
- (7) 検体及びキット中の各試薬並びに検査に使用したすべての器具（チューブ、チップ）は、次のいずれかの方法で処理を行って下さい。
  - 1%ホルマリン溶液に1時間以上浸すこと。
  - 2%グルタルアルデヒド溶液に1時間以上浸すこと。
  - 0.1%以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液に1時間以上浸すこと。
  - 121℃で1時間以上オートクレーブにかけること。

## 【包装単位・貯法・有効期限・製品コード】

製品名	HCV GENOTYPEプライマーキット
包装単位	50テスト
貯法	-20
有効期限	外箱に記載
製品コード	8C01

## 【主要文献】

- (1) Okamoto, H. et al., (1992) " Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources", Journal of General Virology, 73, 673-679
- (2) Okamoto, H. et al., (1992) " Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates : comparative study of four distinct genotypes ", Virology, 188, 331-341
- (3) Kanai, K. et al., (1992) " HCV genotypes in chronic hepatitis C and response to interferon ", Lancet, 339,1543
- (4) Okamoto, H. et al., (1993) " Characterization of the genomic sequence of type V (or 3a) hepatitis C virus isolates and PCR primers for specific detection", Journal of General Virology, 74, 2385-2390

## 【製造・販売元】

〒112-0004 東京都文京区後楽1-1-10  
株式会社 特殊免疫研究所  
TEL 03-3814-4081 FAX 03-3814-5957

## 【その他】

AmpliQaq®は、Roche Molecular Systems社の、又、NuSieve®とSeakem®はFMC社の登録商標です。

販売元:



## コスモ・バイオ株式会社

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル  
TEL: (03) 5632-9610 FAX: (03) 5632-9619  
e-mail: mail@cosmobio.co.jp  
URL: http://www.cosmobio.co.jp/

## 研究用試薬

コスモ・バイオ株式会社

2000年6月作成  
2000年7月改訂

# HCV GENOTYPE プライマーキット (50回分) 取り扱い説明書

## 【開発の経緯】

C型肝炎ウイルス (HCV) の核酸塩基配列の解析の研究により、本ウイルスは変異に富むウイルスであるが、比較的保存された領域の遺伝子配列の種類から少なくとも5つのジェノタイプに分類できること、又それぞれのジェノタイプの分布に地域的な偏りがあることが報告されています。<sup>1) 2)</sup>  
HCVのジェノタイプを型判定することは、臨床的には感染源の同定、並びに感染ルートの解明に有用であると言われ、今後のHCVの研究に役に立つものと考えられています。<sup>3)</sup>  
又、肝炎の病態や治療に対する抵抗性がジェノタイプの型により異なるとも言われ、治療面からも注目されています。<sup>3)</sup>  
本製品は、HCVをコア領域の遺伝子配列の種類により、(1a)、(1b)、(2a)、(2b)、並びに (3a)型に分類する岡本ら<sup>4)</sup>により開発された方法を用いたHCV GENOTYPE プライマーキットです。

## 【特徴】

本製品の特徴としては、逆転写反応により得られたcDNAを各ジェノタイプに特異的なプライマーにより増幅し、増幅されたHCVコア領域遺伝子を電気泳動し、鎖長の異なる各タイプの増幅バンドを検出するだけで、型判定できることが挙げられます。従って、本製品を使用することにより簡単かつ正確なHCVジェノタイプ判定が可能になります。

## 【本質 (キットの構成)】

本キットには次の試薬が含まれています。

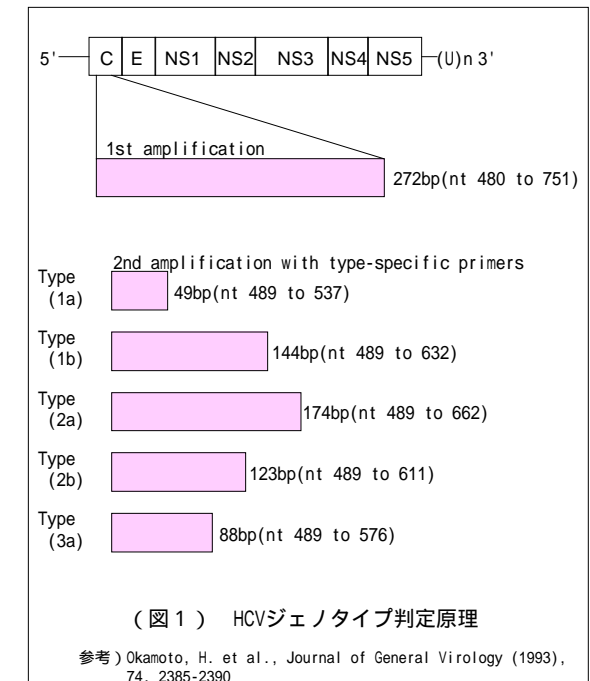
品名	内容	数量	内容量
(赤) RTプライマー溶液	逆転写用プライマー	5本	15 µL
(緑) 1stプライマー溶液	1st用プライマー	5本	60 µL
(黄) 2ndプライマー溶液	2nd用プライマー	5本	60 µL
(白) 10×dNTPs	dNTPs	5本	100 µL
(青) 滅菌水	滅菌水	5本	1 mL
(紫) マーカー	タイプスペシフィックマーカー	5本	110 µL
(茶) ゲルローディングバッファー	サンプルアプライ用	5本	100 µL

## 【効能・効果 (使用目的)】

C型肝炎ウイルスRNA塩基配列のジェノタイプ検出

## 【測定方法 (測定原理)】

本法は、HCVタイプ特異的プライマーを用いて、DNA増幅を行い、増幅産物を電気泳動し、その大きさを比較することにより、HCV-RNAのタイピングを行うものです (図1)。  
HCV陽性血清から抽出したHCV-RNAを用い、各ジェノタイプ共通のコア領域の一部 (272bp) を逆転写反応し、増幅します。得られた増幅DNAを鋳型とし、各ジェノタイプ特異的プライマーを用い、DNA増幅を行い、電気泳動によってその大きさを測定し、HCV-RNAのジェノタイプを決定します。



## 【用法・容量（操作法）】

### 注意

溶液の調製には、必ず、PCR増幅前の溶液の取扱い専用の容量可変シングルチャンネルピペットを使用して下さい。又、フィルター付きのピペットチップを使用して試薬毎・検体毎にチップを取り替えて下さい。  
酵素の失活や非特異反応を抑えるために、反応液の調製は氷浴上にて行って下さい。  
PCR増幅前の溶液の取扱い専用の容量可変シングルチャンネルピペットではPCR産物を取扱わないで下さい。  
PCR産物のPCR増幅前の溶液への汚染は、擬陽性増幅反応を生じ判定を誤る危険がありますので、PCR増幅の前・後で操作エリアと器具・機材を分離区分することをお薦めします。

### 1 - 1. キット以外に必要な器具・器材・試薬（RT～PCR）

容量連続可変シングルチャンネルピペット（各種容量）  
ピペットチップ（滅菌済、フィルター付）  
PCR用微量チューブ（0.5mL容量、滅菌済、thin walled）  
回転式ミキサー（ボルテックスミキサー）  
微量遠心機（PCR用微量チューブ用）  
自動温度制御装置（Perkin Elmer社製サーマルサイクラーPJ2000、あるいは同等品）  
耐熱性DNAポリメラーゼ（Roche Molecular Systems社製AmpliTaQ®）  
逆転写酵素（BRL社製 Super Script™ [RNaseH<sup>-</sup> Reverse Transcriptase]、あるいは同等品）  
RNaseインヒビター（Promega社製 RNasin® [Ribonuclease Inhibitor]、あるいは同等品）  
ミネラルオイル（light white oil、DNase/RNaseフリー）

### 1 - 2. 必要な器具・器材・試薬（電気泳動）

電気泳動装置（アドバンス社製ミュールビッド電気泳動システム、あるいは同等品）  
電気泳動ゲル作成装置（アドバンス社製ミュールビッドゲルメーカーセット、あるいは同等品）  
容量連続可変シングルチャンネルピペット（各種容量）  
紫外線照射装置（トランスイルミネーター）  
撮影装置（インスタントカメラ、橙色・赤色フィルターを着用）  
インスタントカメラ用フィルム（ISO3000程度のもの）  
紫外線保護用具  
NuSieve® GTGアガロース  
SeaKem® GTGアガロース  
トリスヒドロキシメチルアミノメタン（Tris base）  
氷酢酸  
EDTA（エチレンジアミン四酢酸）  
臭化エチジウム（発ガン性、取扱い注意）

### 2. 試薬の調製

50×TAEバッファー：（室温保存）  
組成：Tris base 242g、氷酢酸 57.1mL、0.5M EDTA (pH8.0) 100mLを加え蒸留水で全量を1000mLにします（要時、蒸留水で50倍に希釈する）。  
臭化エチジウム染色液：（室温保存）  
蒸留水に1μg/mLの濃度になるように臭化エチジウムを溶かします。  
臭化エチジウムは強力な発癌物質です。取扱い時にはビニール手袋を必ず着用し、皮膚に付着しないようにして下さい。  
4%アガロースゲル（NuSieve®：SeaKem®=3：1）  
ミュールビッド電気泳動装置の説明書に従いゲルの枠を組み立てます。  
1×TAEバッファーに4%のアガロース（NuSieve®：SeaKem®=3：1）を加え、オートクレーブ処理（121℃3～5分間）して完全に溶解させます。  
室温下、均一になるようにじゅうぶん混和します。  
アガロース溶液の温度が約60℃まで下がったら、ゲル枠に注ぎ入れます（大ゲルには約30mL、小ゲルには約15mL）。この時、ゲル表面に気泡が残らないよう注

意して下さい。次に、コームを静かにセットし室温でじゅうぶんに固化させます。コームをゲルから抜く際には、少量の1×TAEバッファーをコーム付近に注いでから注意深く抜くようにします。ゲルは1×TAEバッファー中で数日間保存できます。

### 3. 操作手順プロトコール

#### 3 - 1. cDNAの合成

- (1) RNA溶液を、HCV-RNAの3次構造を崩す目的で、70℃にて2分間、加温します。（この操作は、オプションのため、必須の操作ではありません。）
- (2) 次のRT反応液をPCR用微量チューブ（0.5mL容量、滅菌済、thin walled）に調製します。

RNA溶液	5.00 μL	（血清100μLから抽出）
5×RTバッファー	2.00 μL	（SuperScript™ 添付）
20mM dNTP mix	0.25 μL	
0.1M DTT	1.00 μL	（SuperScript™ 添付）
RTプライマー溶液	1.00 μL	（本キット）
RNaseインヒビター	0.25 μL	（Promega社製 RNasin®, 40u/μL）
逆転写酵素	0.50 μL	（BRL社製 SuperScript™、200u/μL）
	10.00 μL	

- (3) 上記のチューブにミネラルオイル（light white oil、DNase/RNaseフリー）25μLを添加します。
- (4) 反応液をよく混合後、次の温度プログラムにて反応を行います。

逆転写反応	42	60分
酵素失活	95	15分
保持	4	over

#### 3 - 2. 1st PCR 反応

- (1) 次の 1st PCR 反応液を調製します。

1st PCRプライマー溶液	5.00 μL	（本キット）
10×dNTPs	4.00 μL	（本キット）
AmpliTaQ®	0.25 μL	（Roche Molecular Systems社製）
10×PCR Buffer	3.00 μL	（AmpliTaQ®添付品15mM MgCl2含有）
滅菌水	27.75 μL	（本キット）
	40.00 μL	

- (2) 上記のPCR反応液をPCR用微量チューブ（0.5mL容量、滅菌済、thin walled）に入れ、その上にミネラルオイル（light white oil、DNase/RNaseフリー）25μLを添加します。
- (3) 合成cDNA 10μLを上記のチューブに加えます。
- (4) ボルテックスでミキシングした後、微量遠心機を用いて1000～3000rpmで10～30秒間遠心し、壁面に残った液を落とします。
- (5) 次の条件をプログラムしたサーマルサイクラーを用いて、DNAを増幅します。

DNA熱変性	94	30秒	} サイクル数 35回
アニーリング	55	30秒	
DNA伸長	72	60秒	
サイクル終了後	72	7分	
保持	4	over	

注意：上記温度条件については使用機器の特性により変更が必要になることがあります。必要に応じて微調整して下さい。

### 3 - 3. 2nd PCR 反応

- (1) 次の 2nd PCR 反応液を調製します。

2nd PCRプライマー溶液	5.00 μL	（本キット）
10×dNTPs	5.00 μL	（本キット）
AmpliTaQ®	0.25 μL	（Roche Molecular Systems社製）
10×PCR Buffer	5.00 μL	（AmpliTaQ®添付品15mM MgCl2含有）
滅菌水	33.75 μL	（本キット）
	49.00 μL	

- (2) 上記のPCR反応液をPCR用微量チューブ（0.5mL容量、滅菌済、thin walled）に入れ、その上にミネラルオイル（light white oil、DNase/RNaseフリー）25μLを添加します。
- (3) 1st PCR 産物のうち1μLを上記のチューブに加えます。
- (4) ボルテックスでミキシングした後、微量遠心機を用いて1000～3000rpmで10～30秒間遠心し、壁面に残った液を落とします。
- (5) 次の条件をプログラムしたサーマルサイクラーを用いて、DNAを増幅します。

DNA熱変性	94	30秒	} サイクル数 25回
アニーリング	60	30秒	
DNA伸長	72	30秒	
サイクル終了後	72	7分	
保持	4	over	

注意：上記温度条件については使用機器の特性により変更が必要になることがあります。必要に応じて微調整して下さい。

### 3 - 4. 電気泳動

- (1) 泳動槽にゲルとバッファー（1×TAE）を入れます。
- (2) 2nd PCR 産物10μLにゲルローディングバッファー2μLを混ぜ、ウェルに注入します。次に、マーカー（タイプベシフィックマーカー）10μLをウェルに注入します。
- (3) 電圧100Vで40分間泳動します。
- (4) ゲルを臭化エチジウム染色液に浸し、約15分間振盪します。
- (5) トランスイルミネーターを用い、泳動像を撮影します。

## 【測定結果の判定】

得られた電気泳動のパターンからHCV-RNAのジェノタイプの判定を行います。  
下図のように、Type (1a)は49bp、Type (1b)は144bp、Type (2a)は174bp、Type (2b)は123bp、Type (3a)は88bpの位置に増幅バンドがあらわれます。  
観察されるバンドの位置から5つのジェノタイプに分類します。  
なお、HCV-RNA濃度が高い場合、1stPCR産物の増幅バンド（272bp）があらわれます。

