

ノロウイルス定量キット G1/G2

(Code No. FIT-101)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

—目次—

[1]	はじめに	2
[2]	製品内容	3
[3]	保存温度	3
[4]	製品のほかに用意するもの	3
[5]	プロトコール	4
	(1)サンプルの調製	4
	(2)コントロール DNA の調製	4
	(3)RT-PCR 反応液の調製	5
	(4)RT-PCR サイクル条件	6
	(5)定量解析	6
[6]	トラブルシューティング	12
[7]	関連製品	13

ご注意

本製品に含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。診断および臨床検査には使用しないでください。本製品は臨床診断薬ではありません。本製品の使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

[1] はじめに

本製品は、ノロウイルス GI、GII 遺伝子を RT-PCR 法で検出するキットです。付属の定量用コントロール DNA を使用することで、ノロウイルス GI、GII 遺伝子の定量が可能です。

◆本製品の特長◆

- ・ 厚生労働省 医薬食品局 食品安全部 監視安全課より通知された「ノロウイルスの検出法について」(平成 15 年 11 月 5 日付け食安監発 1105001 号別添)(最終改正:平成 25 年 10 月 22 日付け食安監発 1022 第 1 号)(以下「公定法」と記載する)と同じ塩基配列の GI 検出用および GII 検出用プライマーならびにプローブを使用しております。
- ・ ノロウイルス GI および GII、インターナルコントロール(IC)を混合したマルチプレックス PCR 反応のため、遺伝子型のタイピングと定量が同時に可能です。また、逆転写反応から PCR 反応までを 1 ステップで行うため、反応途中で試薬を添加する必要はありません。
- ・ 本製品では G1 コントロール DNA と G2 コントロール DNA としてノロウイルス GI および GII の配列を有する DNA 断片を使用しています。公定法で用いられている GI、GII コントロールプラスミドと同じ定量結果が得られるように濃度を調整していますので、公定法と同様の使用法にて精度の高い定量が可能です。
- ・ PCR の増幅産物を次回以降の PCR 反応液に混入してしまうことをキャリーオーバー汚染といい、混入した増幅産物を鋳型として増幅が起こるため、偽陽性の原因となります。本製品では、ウラシル DNA グリコシダーゼによる増幅産物の分解を行い、キャリーオーバー汚染による偽陽性を防止します。

[2] 製品内容

本製品には、以下の試薬が含まれており、50 回用としてご使用になれます。

試薬名	容量
① 反応液	550μL
② 酵素液	270μL
③ プライマー液 ^{*1}	130μL
④ プローブ液 ^{*1,*2}	130μL
⑤ G1 コントロール DNA	27μL
⑥ G2 コントロール DNA	27μL
⑦ コントロール希釈液	1,500μL

*1 GI および GII 遺伝子の検出には、厚生労働省通知法(「ノロウイルスの検出法について」厚生労働省医薬食品安全部監視安全課(平成 15 年 11 月 5 日付け食安監発第 1105001 号別添))に収載されたプライマー、プローブ配列を使用しています。

*2 本プローブ液は、GI を Cy5 チャンネル、GII を ROX チャンネル、内部コントロールを FAM チャンネルで検出します。

[3] 保存温度

本製品に含まれる試薬はすべて-20℃保存です。

[4] 製品のほかに用意するもの

- ・ RNA 抽出試薬
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ スピンドアウン用小型遠心機
- ・ ピペットなど
- ・ チップ、チューブ、プレートなどの消耗品
- ・ リアルタイム PCR 装置(FAM、Cy5、ROX チャンネルの検出が可能な機種)

[5] プロトコール

(1) サンプルの調製

各サンプルに合わせた前処理によって RNA を調製してください。

(2) コントロール DNA の調製

G1 および G2 コントロール DNA を段階希釈して検量線用コントロール DNA を調製します。

- 1) G1 および G2 コントロール DNA を完全に融解後、ボルテックスにてよく混合し、スピンドウンする。
- 2) コントロール希釈液を、1.5mL チューブに 27 μ L 分注する。
- 3) G1 および G2 コントロール DNA (2.0×10^6 copies/ μ L) 3 μ L を、分注したコントロール希釈液に添加し、ボルテックスにてよく混合後、スピンドウンする。
- 4) 同様の希釈操作を繰り返し、 $2.0 \times 10^6 \sim 0.2$ copies/ μ L の 8 段階希釈液を調製する。

1	2×10^6 copies/ μ L	(G1 or G2 コントロール DNA 原液)
2	2×10^5 copies/ μ L	(G1 or G2 コントロール DNA 原液 3 μ L+ コントロール希釈液 27 μ L)
3	2×10^4 copies/ μ L	(2×10^5 copies/ μ L 溶液 3 μ L+ コントロール希釈液 27 μ L)
4	2×10^3 copies/ μ L	(2×10^4 copies/ μ L 溶液 3 μ L+ コントロール希釈液 27 μ L)
5	2×10^2 copies/ μ L	(2×10^3 copies/ μ L 溶液 3 μ L+ コントロール希釈液 27 μ L)
6	2×10^1 copies/ μ L	(2×10^2 copies/ μ L 溶液 3 μ L+ コントロール希釈液 27 μ L)
7	2×10^0 copies/ μ L	(2×10^1 copies/ μ L 溶液 3 μ L+ コントロール希釈液 27 μ L)
8	2×10^{-1} copies/ μ L	(2×10^0 copies/ μ L 溶液 3 μ L+ コントロール希釈液 27 μ L)

* 希釈したコントロール DNA は冷蔵にて保管の上、当日中にお使いください。

(3) RT-PCR 反応液の調製

※ (2)で調製したコントロール DNA が PCR 反応液に混入しないようご注意ください。混入しますと偽陽性の原因となります。混入防止のため、(2)のコントロール DNA の希釈と別の区画での作業を推奨します。

- 1) 「①反応液」、「③プライマー液」、「④プローブ液」は使用する直前に解凍し、ボルテックスミキサーでよく攪拌し、スピンドウンする。
- 2) 「②酵素液」は氷上に置いて使用するか、または使用する直前に-20℃から取り出し、使用後は直ぐに-20℃に戻す。
- 3) 1 反応あたり下記の分量を調製する。必要分の 1 割増し程度で PCR 反応液を調製する。

試薬	使用量(1 反応分)
①反応液	10 μ L
②酵素液	5 μ L
③プライマー液	2.5 μ L
④プローブ液	2.5 μ L
合計	20 μ L

- 4) PCR 反応液を 20 μ L ずつ、リアルタイム PCR 反応プレートまたはチューブに分注する。
- 5) (2)で希釈したコントロール DNA を 5 μ L ずつ添加する。各反応あたり下記の定量値となる。
- 6) 陰性コントロールに 5 μ L の滅菌水を添加する。
- 7) RNA 抽出液を 5 μ L 添加する。

	希釈系列	定量値
1	2×10^6 copies/ μ L	1×10^7 copies
2	2×10^5 copies/ μ L	1×10^6 copies
3	2×10^4 copies/ μ L	1×10^5 copies
4	2×10^3 copies/ μ L	1×10^4 copies
5	2×10^2 copies/ μ L	1×10^3 copies
6	2×10^1 copies/ μ L	1×10^2 copies
7	2×10^0 copies/ μ L	1×10^1 copies
8	2×10^{-1} copies/ μ L	1×10^0 copies

(4) RT-PCR サイクル条件

- ・下記の温度サイクルで反応します。

CFX96 Touch™ Deep Well (Bio-Rad)

逆転写反応	50°C	5分		
プレ変性	95°C	30秒		
変性	95°C	5秒		
会合・伸長	54°C	30秒	(検出)	X40サイクル

Thermal Cycler Dice® Real Time System III (タカラバイオ)

逆転写反応	50°C	5分		
プレ変性	95°C	30秒		
変性	95°C	5秒		
会合・伸長	54°C	45秒	(検出)	X45サイクル

・Speed:fast

・0.1ml 8-strip tubeのご使用をお勧めします。

- ・その他の機種については弊社までお問い合わせください。

※CFX96 Touch™ は、Bio-Rad Laboratories, Inc.の商標です。

※Thermal Cycler Dice® は、タカラバイオ株式会社の商標です。

(5) 定量解析

操作の手順は、それぞれのリアルタイム PCR 装置で異なります。詳しい操作方法はそれぞれの機器に添付されている説明書をご確認ください。

ここでは、CFX96 Touch™ Deep Well (Bio-Rad)を使用した場合の簡単な操作方法と定量解析について示します。

1) サンプル設定

[Plate Setup]から[View/Edit Plate]を選択する。

サンプルが入っていないウェルは[Clear Wells]にて消去する。

設定したいウェルを選択し、Sample Type を選択する。

Unknown	:	測定対象サンプル
Standard	:	検量線作成用のコントロール DNA
NTC	:	鋳型なしの陰性コントロール

2) レプリケート設定

同一の測定対象サンプルを添加したウェルを全て選択し、Replicate#から 1,2,3・・・(任意のサンプル番号)を選択し、Load にチェックを入れる。

3) 蛍光設定

G1 コントロール DNA を添加したウェルに Cy5 のチェックを入れる。

G2 コントロール DNA を添加したウェルに ROX のチェックを入れる。

測定対象サンプルおよび陰性コントロールを添加したウェルに FAM / ROX / Cy5 のチェックを入れる。

4) 検量線設定

G1 コントロール DNA を添加したウェルを選択し、コントロール DNA 添加量 (1.00E+07~1.00E+00)を入力し、Load をチェックする。

G2 コントロール DNA を添加したウェルを選択し、コントロール DNA 添加量 (1.00E+07~1.00E+00)を入力し、Load をチェックする。

* 設定例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			Std 1.00E+07	Std 1.00E+07	Std 1.00E+07	Std 1.00E+07	Std 1.00E+07	Std 1.00E+07	NTC FAM ROX Cy5	NTC FAM ROX Cy5		
B			Std 1.00E+06	Std 1.00E+06	Std 1.00E+06	Std 1.00E+06	Std 1.00E+06	Std 1.00E+06	Unk-1 FAM ROX Cy5	Unk-1 FAM ROX Cy5		
C			Std 1.00E+05	Std 1.00E+05	Std 1.00E+05	Std 1.00E+05	Std 1.00E+05	Std 1.00E+05	Unk-2 FAM ROX Cy5	Unk-2 FAM ROX Cy5		
D			Std 1.00E+04	Std 1.00E+04	Std 1.00E+04	Std 1.00E+04	Std 1.00E+04	Std 1.00E+04	Unk-3 FAM ROX Cy5	Unk-3 FAM ROX Cy5		
E			Std 1.00E+03	Std 1.00E+03	Std 1.00E+03	Std 1.00E+03	Std 1.00E+03	Std 1.00E+03	Unk-4 FAM ROX Cy5	Unk-4 FAM ROX Cy5		
F			Std 1.00E+02	Std 1.00E+02	Std 1.00E+02	Std 1.00E+02	Std 1.00E+02	Std 1.00E+02	Unk-5 FAM ROX Cy5	Unk-5 FAM ROX Cy5		
G			Std 1.00E+01	Std 1.00E+01	Std 1.00E+01	Std 1.00E+01	Std 1.00E+01	Std 1.00E+01				
H			Std 1.00E+00	Std 1.00E+00	Std 1.00E+00	Std 1.00E+00	Std 1.00E+00	Std 1.00E+00				

5) Threshold line の設定

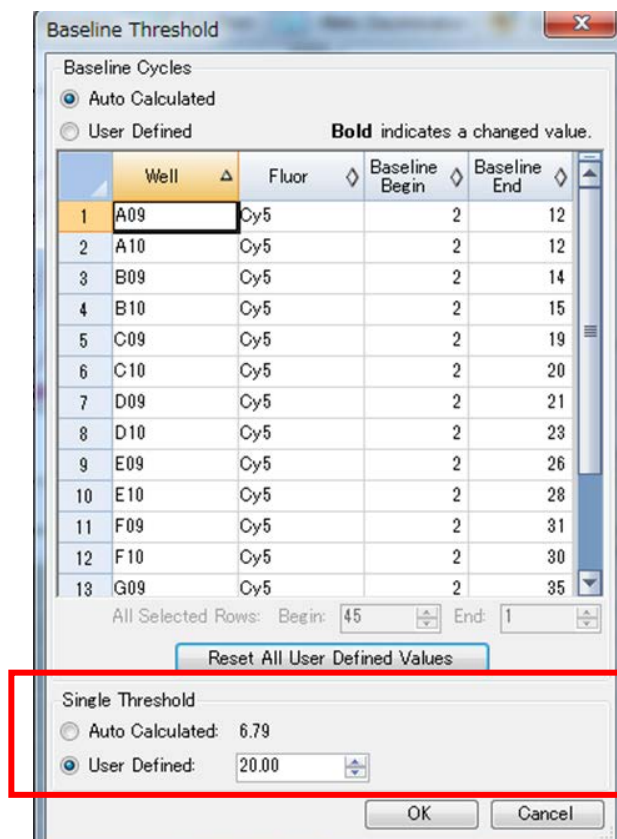
反応終了後、[Quantification]タブをクリックする。

検出フィルターCy5 を選択する。

[Amplification]の画面で右クリックし、[Baseline Threshold]を選択する、

[User Defined]にて 20.0 に設定し、OK をクリックする。

同様の手順で ROX,FAM についても 20.0 に設定する。

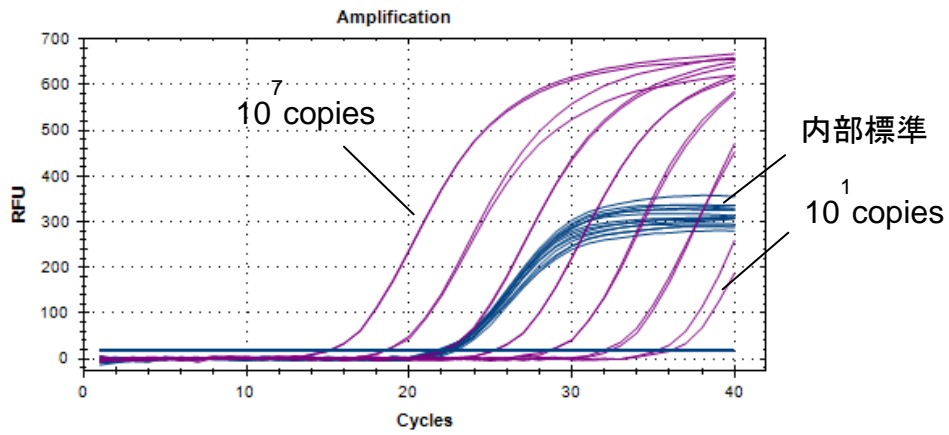


6) 増幅曲線の確認

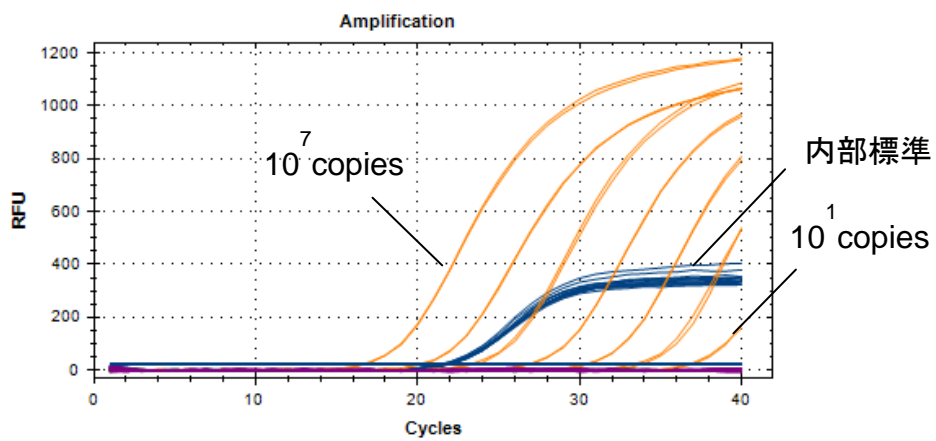
検出フィルターFAM を選択し、陰性コントロールおよび測定対象サンプルにて内部標準 (FAM チャンネル) が検出されていることを確認する。

検出フィルターCy5 / ROX を選択し増幅曲線を確認する。

GI 反応(Cy5 チャンネル)



GII 反応(ROX チャンネル)



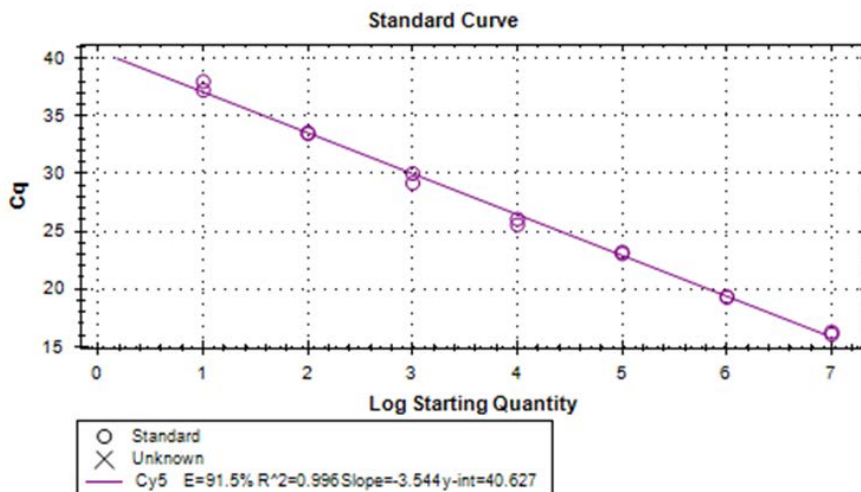
7) 検量線の確認

[Quantification]タブから検量線を確認する。

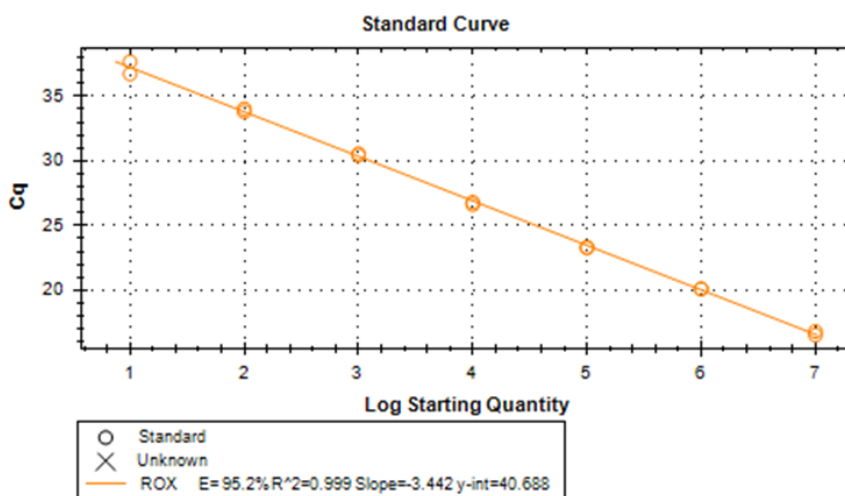
必要に応じて、検量線から外れている測定値を消去する。

1. 消去したいウェル上で右クリックし、Well XX > Exclude from Analysisをクリックする。
2. 除外ウェルを再び解析に含める場合は Include Well XX in Analysisを選択する。

GI 反応(Cy5 チャンネル)



GII 反応(ROX チャンネル)



8) 結果の表示

[Quantification Data]タブから測定結果を確認する。

(測定例)GI 陽性検体の定量例

GIコントロール DNA を用いて、 10^7 copies から 10^1 copies まで検量線を作成した。

測定対象サンプル(Unkn-1)を n=3 で測定しコピー数を求めたところ、サンプルの平均値 (n=3)は 2.52×10^2 copies に換算されることが分かった。

Well	Fluor	Target	Content	Cq	Cq Mean	Starting Quantity (SQ)	SQ Mean
A03	Cy5		Std	15.59	15.59	1.000E+07	1.00E+07
A04	Cy5		Std	15.59	15.59	1.000E+07	1.00E+07
A05	Cy5		Std	16.00	16.00	1.000E+07	1.00E+07
B03	Cy5		Std	19.32	19.32	1.000E+06	1.00E+06
B04	Cy5		Std	19.60	19.60	1.000E+06	1.00E+06
B05	Cy5		Std	19.24	19.24	1.000E+06	1.00E+06
C03	Cy5		Std	22.94	22.94	1.000E+05	1.00E+05
C04	Cy5		Std	22.98	22.98	1.000E+05	1.00E+05
C05	Cy5		Std	22.89	22.89	1.000E+05	1.00E+05
D03	Cy5		Std	26.73	26.73	1.000E+04	1.00E+04
D04	Cy5		Std	26.41	26.41	1.000E+04	1.00E+04
D05	Cy5		Std	26.46	26.46	1.000E+04	1.00E+04
E03	Cy5		Std	29.92	29.92	1.000E+03	1.00E+03
E04	Cy5		Std	30.46	30.46	1.000E+03	1.00E+03
E05	Cy5		Std	30.50	30.50	1.000E+03	1.00E+03
F03	Cy5		Std	34.30	34.30	1.000E+02	1.00E+02
F04	Cy5		Std	34.35	34.35	1.000E+02	1.00E+02
F05	Cy5		Std	34.21	34.21	1.000E+02	1.00E+02
G03	Cy5		Std	37.19	37.19	1.000E+01	1.00E+01
G04	Cy5		Std	37.99	37.99	1.000E+01	1.00E+01
G05	Cy5		Std	36.63	36.63	1.000E+01	1.00E+01
A06	Cy5	G1	Unkn-1	32.38	32.46	2.619E+02	2.52E+02
B06	Cy5	G1	Unkn-1	32.76	32.46	2.070E+02	2.52E+02
C06	Cy5	G1	Unkn-1	32.24	32.46	2.861E+02	2.52E+02
A06	FAM	IC	Unkn-1	23.78	23.81	N/A	N/A
B06	FAM	IC	Unkn-1	23.71	23.81	N/A	N/A
C06	FAM	IC	Unkn-1	23.94	23.81	N/A	N/A

[6] トラブルシューティング

現象	原因	対策
内部標準やコントロール DNA の増幅が見られない。	キャリーオーバー汚染が発生している。	試薬・水を廃棄後、汚染除去作業(拭き取り、UV 照射等)を実施してください。
	試薬が劣化している。	試薬を新しいものに交換してください。
	検体に不純物が多量に含まれる。	検体に濁りなどが確認される場合は、RNA 抽出等を実施してください。
陰性コントロールが陽性になる。	キャリーオーバー汚染・コンタミネーションが発生している。	試薬・水を廃棄後、汚染除去作業(拭き取り、UV 照射等)を実施してください。
		試薬中にキット添付のコントロール DNA が混入した場合、除去は不可能です。試薬を新しいものに交換してください。
検量線の相関が低い。	コントロール DNA が劣化している。	コントロール DNA 原液 (2.0×10^6 copies/ μ L) から再度希釈操作を実施ください。
	キャリーオーバー汚染が発生している。	

[7] 関連製品

品 名	包装	Code.No.
ノロウイルス検出キット G1&G2 -融解曲線解析-	100 回用	FIK-203
ノロウイルス検出キット G1/G2 -高速プローブ検出-	100 回用	FIK-253
腸内細菌遺伝子検出キット -蛍光検出-	480 回用	FIK-301
腸内細菌遺伝子検出キット -高速蛍光検出-	480 回用	FIK-311
腸内細菌遺伝子検出キット -プローブ検出-	480 回用	FIK-351
腸内細菌遺伝子検出キット - シングル検出- サルモネラ検出用	200 回用	FIK-361
腸内細菌遺伝子検出キット - シングル検出- 腸管出血性大腸菌検出用	200 回用	FIK-362
腸内細菌遺伝子検出キット - シングル検出- 赤痢菌検出用	200 回用	FIK-363

より詳細な情報は、弊社ウェブサイトをご覧ください

◆東洋紡ライフサイエンス事業部ウェブサイト◆

<http://lifescience.toyobo.co.jp/>



【製造・販売元】

—価格・在庫に関するお問い合わせ—

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (大阪)
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (東京)
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目17番10号 住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

—製品の内容・技術に関するお問い合わせ—

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00 (土、日、祝を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <http://lifescience.toyobo.co.jp/>