Code No. FIK-203
保存温度　-20℃

ノロウイルス検出キット G1&G2
―融解曲線解析―

(Code No. FIK-203)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD.

Bioproducts Sales and Marketing Department

OSAKA JAPAN

A4997K

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）バイオプロダクト営業部　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 (土日祝日、休日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] https://lifescience.toyobo.co.jp/

本製品は、糞便検体からノロウイルス genogroup GI 、genogroup GII 遺伝子を RT-PCR 法で検出するキットです。

特長

- マルチプレックス PCR により GI、GIIいずれのタイプも検出可能です。
- 逆転写反応から PCR までを1ステップで行います。反応途中で試薬を添加する必要はありません。
- EvaGreen®を用いた融解曲線解析による判定を行います。電気泳動の必要はありません。
- サンプルの処理は、専用の懸濁液による処理(15 分)、および前処理液による熱処理(1 分)のみです。核酸の抽出精製は必要ありません。
- 弊社姉妹品 ノロウイルス検出キット G1(コード No.FIK-201)、ノロウイルス検出キット G2(コード No.FIK-202)、と同じプロトコールです。1 台のサーマルサイクラーでこれらのキットを同時に反応することができます。
- 内部標準コントロール DNA を含んでいます。PCR の阻害による偽陰性を回避します。
- キャリーオーバー汚染防止のため、ウラシルグリコシダーゼによる増幅産物の分解を行います。
- ステップダウン反応により高い特異性で高感度を達成しています。最小検出感度は 1 反応当たり 50 コピーです。

1. 安全上の注意
   - 本製品に含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。
   - **本製品は臨床診断薬ではありません。診断および臨床検査には使用しないでください。**
   - 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。

2. 本製品に含まれる物

試薬名	ラベルの色	容量
①懸濁液	茶色	20mL
②前処理液	橙色	400μL
③反応液	青色	3mL
④酵素液	灰色	500μL
⑤プライマー液(G1/G2)	赤色	500μL
⑥EvaGreen®液	緑色	500μL

- EvaGreen®は米国 Biotium Inc.の製品です。東洋紡は Biotium Inc.との契約のもと本製品を販売しています。

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酵素液以外は使用する直前に解凍し、**室温まで戻してボルテックスミキサーでよく攪拌して**ください。その後、スピンダウンしてからチューブのふたを開けてください。
   - 使用後は速やかに-20℃で保存してください。

4. 使用に必要な機器
   - リアルタイム PCR 装置
   - 遠心機 12,000rpm 以上
   - ピペットなど
   - チップ、チューブなど消耗品

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）バイオプロダクト営業部　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 (土日祝日、休日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] https://lifescience.toyobo.co.jp/

5. 使用する便検体

・生便検体、凍結便検体、冷蔵便検体

※ノロウイルスの保存安定性を保証するものではありません。

6. プロトコール

(1) 懸濁

・①懸濁液を使用する直前に解凍し、**室温まで戻してボルテックスミキサーでよく攪拌して**ください。その後、スピンダウンしてからチューブのふたを開けてください。

・マイクロチューブに①懸濁液を 200μL 分注します。

※懸濁液は添付のものを必ずお使いください。

・便検体を①懸濁液に **5~10%**となるように懸濁します。検体量は耳かき一杯分くらいが目安です。

・室温で 15 分間静置します。

・**12,000rpm で 5 分間**、遠心分離を行います。この後、懸濁液の上清を使用します。

・直ちに次の工程にはいります。(懸濁液は保存できません)

(2) 前処理

・下記の量を PCR チューブに調製してください。

・②前処理液を使用する直前に解凍し、**室温まで戻してボルテックスミキサーでよく攪拌して**ください。その後、スピンダウンしてからチューブのふたを開けてください。

	1 反応あたりの調製量
(1)の懸濁液上清	1μL
②前処理液	4μL
合計	5μL

・サーマルサイクラーで **85℃ 1 分間**、熱処理します。

・直ちに次の工程にはいります。(熱処理後の液は保存できません)

(3) RT-PCR 反応液の調製、添加

・1反応あたり下記の量を必要反応数分マスターミックスとして調製します。

・③反応液、⑤プライマー液、⑥EvaGreen®液は使用する直前に解凍し、**室温まで戻してボルテックスミキサーでよく攪拌して**ください。その後、スピンダウンしてからチューブのふたを開けてください。

・④酵素液は氷上に置いてください。

	1 反応あたりの調製量
③反応液	30 μL
④酵素液	5 μL
⑤プライマー液(G1/G2)	5 μL
⑥EvaGreen®液	5 μL
合計	45μL

・1 反応あたり 45μL を(2)の前処理済み懸濁液に添加します。

・新しいチューブキャップでふたをします。(2)の前処理で使用したチューブキャップは使用しないでください。気密性が保たれずに反応液が蒸発することがあります。

・直ちに次の温度サイクル反応を行います。

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）バイオプロダクト営業部　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 (土日祝日、休日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] https://lifescience.toyobo.co.jp/

(4) RT-PCR サイクル、融解曲線解析条件

・下記の温度サイクルで反応します。

CFX96 Touch Deep Well™

			Lamp Rate
UNG反応	20℃, 5分		
逆転写反応	42℃, 5分		
プレ変性	95℃, 5分		
変性 会合 伸長	95℃,10秒 56℃, 30秒 60℃, 20秒	20サイクル	2.0℃/sec.（上昇） 1.2℃/sec.（上昇）
変性 会合 伸長	95℃,10秒 54℃, 30秒 60℃, 20秒	25サイクル	2.0℃/sec.（上昇） 1.2℃/sec.（上昇）
変性 融解曲線解析	95℃,10秒 68℃, 30秒→88℃	0.5℃/ステップ*	

・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。

* 融解曲線解析のデータ収集ポイント

使用する機器によっては、融解曲線にガタツキが見られることがあります。その場合は、データ収集ポイントを0.3℃/ステップに変更すると改善することがあります。融解曲線解析のみ再度行ってください。

7. 判定

・融解曲線のピークの温度とベースラインの比較から下記の表により判定を行います。

【ベースラインの設定】

融解曲線の 73.0℃と 81.5℃の点を結んだ直線がベースラインになります。

【陽性ピークの判定】

下記表の温度帯でベースラインよりも上に融解曲線のピークがある場合、ピークありと判定します。

【内部標準の判定】

次の 2 点を満たした場合、内部標準のピークありと判定します。

・融解曲線の 82.0℃と 87.0℃の間にピークがあること。

・融解曲線の 82.0℃と 87.0℃の点を結んだ直線とピークのシグナル強度の比が 1.5 以上であること。

ピーク位置			判定
GⅠ 74.5～78.0℃※	GⅡ 78.0～81.0℃※	内部標準 82.0～87.0℃※	
あり	なし	ありまたはなし	**GⅠ陽性**
なし	あり	ありまたはなし	**GⅡ陽性**
なし	なし	あり	**陰性**
なし	なし	なし	**判定不能**

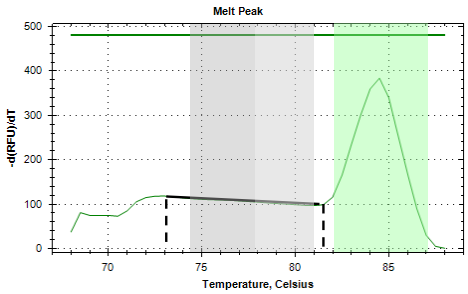
※温度値は CFX96 Touch Deep Well™（Bio-Rad 社）での測定値です。機種によっては値が前後する場合があります。

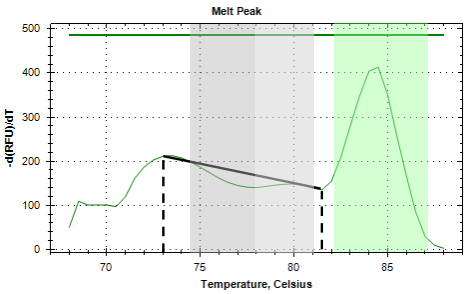
＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）バイオプロダクト営業部　テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土日祝日、休日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] https://lifescience.toyobo.co.jp/

- ✧ 78.0℃にピークが現れた場合は陽性と判定します。この場合、GI,GII の判別はつきません。
- ✧ GI または GII 由来の増幅が優勢になった場合、内部標準のピークが観察されないことがありますが、反応は成立しており陽性と判定します。
- ✧ **本製品では GI 陽性または GII 陽性となった場合でも、GI、GII の混合感染の可能性は否定されません。タイプ別の判定が必要な場合は、それぞれの検出キットをご利用ください。**
- ✧ 上記のいずれの箇所にもピークが認められない場合、反応が阻害されており判定不能となります。
- ✧ 検体によっては、74.5℃以下にピークやシグナルが観察されることがありますが、これは判定には影響しません。
- ✧ これらの判定をパソコンで行うソフトウェアをご用意しております。詳細は下記の弊社テクニカルラインまでお問い合わせください。

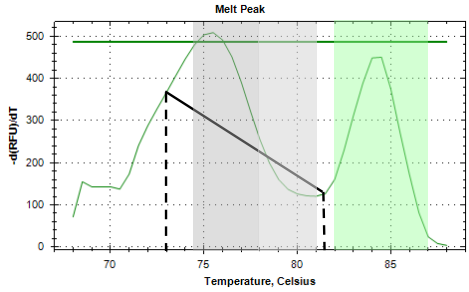
融解曲線の例

陰性

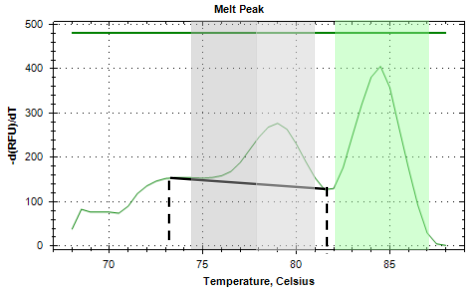




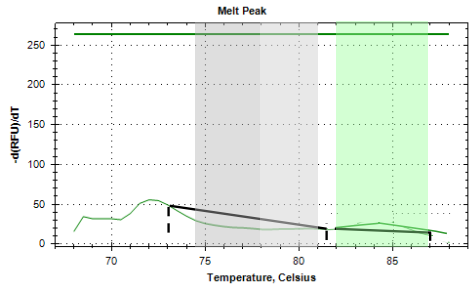
GI 陽性



GII 陽性



判定不能



＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）バイオプロダクト営業部　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 (土日祝日、休日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] https://lifescience.toyobo.co.jp/

8. トラブルシューティング

問題	対策	具体例･目安
判定不能になる。 ピークが出ない。	便の懸濁量を少なくして再検査する。	遠心後の上清の色調は黄色くなる程度が適当です。赤茶色い場合は便量が過剰です。
	各工程終了後直ちに次工程へ進む。	最大でも1時間以内に次工程へ進んでください。
	反応容器を 8 連チューブに変更する。	一部の機器と96ウェルPCRプレートの組み合わせでは、熱伝導効率の影響でシグナルが十分でない場合があります。
	試薬を新しいものに交換する。	キャリーオーバー汚染が疑われます。
	器具類をオートクレーブする。	
融解曲線の波形がいびつである。	融解曲線解析のデータ収集ポイントの間隔を狭める。	0.3℃/ステップとする。
陰性コントロールが陽性になる。 すべての検体が陽性になる。	試薬を新しいものに交換する。	キャリーオーバー汚染が疑われます。
	器具類をオートクレーブする。	

9. 関連商品

品　名	包装	Code.No.
ノロウイルス検出キット G1/G2 -高速プローブ検出 Quick Step-	100 回用	FIK-273
ノロウイルス定量キット G1/G2	50 回用	FIT-101
ノロウイルス検出キット G1/G2 -ふき取り- <3 色プローブ検出>	50 回用	FIW-101
ノロウイルス検出キット G1/G2 -ふき取り- <2 色プローブ検出>	50 回用	FIW-201
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-	200 回用	FIK-361, 362, 363

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）バイオプロダクト営業部　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 (土日祝日、休日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] https://lifescience.toyobo.co.jp/

Label License Statement

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

This product is provided under an Agreement between Biotium and TOYOBO. The manufacture, use, sale, offer for sale, or import of this product is subject to one or more patents or pending applications owned or licensed by Biotium, Inc. (U.S. Patent Nos. US7,803,943 B2, US7,776, 567 B2, Japan Patent No. 5249013). The purchase price of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under U.S. Patent Nos. US7,803,943 B2, US7,776, 567 B2, Japan Patent No. 5249013 and corresponding patent claims outside of the United States, to use only the purchased amount of the product and components of the product solely for the buyer's own internal research (whether the buyer is an academic or for-profit entity), in a manner consistent with the accompanying product literature. No right to use, sell or otherwise transfer (a) this product (b) its components or (c) materials made using this product or its components to a third party, or otherwise use this product or its components or materials made using this product or its components for any other purpose or a Commercial Purpose, is hereby granted expressly, by implication or by estoppel. Commercial Purpose means any activity by a party for consideration and include, but is not limited to: (1) use of the product or its components in manufacturing; (2) use of the product or its components to provide a service including without limitation, reporting information or data resulting from use of the product or a its components for a fee or other commercial consideration; (3) use of the product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product or its components, whether or not such product or its components are resold for use in research. For products that are subject to multiple limited use label licenses, the most restrictive terms apply. This product is for research use only. Diagnostic uses require a separate license from Biotium, Inc. For information on purchasing a license to this product including for purposes other than research, contact Director of Licensing, Biotium, Inc., 3159 Corporate Place, Hayward, CA 94545, Tel: +1-(510) 265-1027. Fax: +1-(510) 265-1352. Email: btinfo@biotium.com. All names containing the designation® are trademarks of Biotium.

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）バイオプロダクト営業部　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 (土日祝日、休日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] https://lifescience.toyobo.co.jp/

【製造･販売元】

ー価格・在庫に関するお問い合わせー

東洋紡株式会社　バイオプロダクト営業部　(大阪)

〒530-0001 大阪府大阪市北区梅田一丁目 13 番 1 号
大阪梅田ツインタワーズ・サウス
TEL 06-6348-3786　FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社　バイオプロダクト営業部　(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