



Code: FIK-213
保存温度 -20℃

ノロウイルス検出キット G1/G2 -プローブ検出-

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A5203K



<製品の内容・技術に関するお問合せ>
東洋紡（株）ライフサイエンス事業部 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、祝日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <http://www.toyobo.co.jp/bio>

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。
- ・ 蛍光プローブを用いた測定を行います。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。
- ・ 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 DNA グリコシダーゼによる増幅産物の分解を行います。
- ・ 蛍光プローブを用いた測定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. 本製品に含まれるもの

試薬名	容量
①懸濁液	22mL
②前処理液	440μL
③反応液	3,300μL
④酵素液	550μL
⑤プライマー液(G1/G2)	550μL
⑥プローブ液(G1/G2)	550μL

*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、スピンドウンしてからチューブのふたを開けてください。懸濁液、反応液については、試薬瓶の上部を持って、できるだけ試薬を振り落としてからふたを開けてください。
- ・ 懸濁液は容量が多いため、解凍に時間がかかります。小分けして冷凍保存することをお勧めいたします。(冷蔵で長期間保存するとカビや微生物が増殖し濁りを生じることがあります。)
- ・ 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 (FAM/ROX/Cy5 チャンネル対応)
- ・サーマルサイクラー (熱処理をリアルタイム PCR 装置で実施する場合は不要)
- ・遠心機 12,000rpm 以上
- ・ボルテックスミキサー
- ・ピペットなど
- ・チップ、チューブなど消耗品

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、スピンド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 200 μ L 分注します。
- ※ 懸濁液は必ず添付のものをお使いください。
- ・ 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、スピンド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	1 μ L
②前処理液	4 μ L
合計	5 μ L

- ・ サーマルサイクラーで **85 $^{\circ}$ C 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、⑥プローブ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、スピンド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℃に戻してください。

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
⑥プローブ液(G1/G2)	5 μL
合計	45 μL

*複数検体の反応を行う場合は、反応数+10%程度を目安に反応液を調製してください。

- ・ 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。

(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)、LightCycler® 96 (Roche)

逆転写反応	42℃, 5分		
プレ変性	95℃, 30秒		
変性	95℃, 5秒		
会合・伸長	56℃, 60秒	X10サイクル	
変性	95℃, 5秒		
会合・伸長	56℃, 60秒	(検出) X30サイクル	

*LightCycler® 96では、ramp速度を以下のように設定してください。
上昇2℃/sec、下降2℃/sec

Thermal Cycler Dice® Real Time System II (タカラバイオ) (Cy5 フィルターを追加)

逆転写反応	42℃, 5分		
プレ変性	95℃, 30秒		
変性	95℃, 5秒		
会合・伸長	56℃, 60秒	X10サイクル	
変性	95℃, 5秒		
会合・伸長	56℃, 45秒	(検出) X30サイクル	

Speed: Fast

- ・ 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。

7. 判定

(1) 測定対象遺伝子と確認するチャンネル

測定対象遺伝子	測定チャンネル
GI 遺伝子	Cy5
GII 遺伝子	ROX (Red610*)
内部コントロール(IC)	FAM

* LightCycler[®] 96 (Roche) を使用の場合

(2) 判定例

	GI (Cy5 チャンネル)	GII (ROX チャンネル)	IC (FAM チャンネル)	判定
1	<30	検出されず	<30	GI 陽性
2	検出されず	<30	<30	GII 陽性
3	<30	<30	<30	GI/GII 陽性
4	検出されず	検出されず	<30	検出限界以下
5	検出されず	検出されず	検出されず	判定不能

* <30 は Cq 値(又は Ct 値)が 30 未満を意味します。この Cq 値は 2 段階 PCR の後段反応におけるサイクル数を示します。

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。	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。
	試薬を新しいものに交換する。	キャリア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。	
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。	キャリア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 -融解曲線解析-	100 反応	FIK-201
ノロウイルス検出キット G2 -融解曲線解析-	100 反応	FIK-202
ノロウイルス検出キット G1/G2 -融解曲線解析-	100 反応	FIK-203
腸内細菌遺伝子検出キット -マルチ PCR-	500 反応	FIK-101
腸内細菌遺伝子検出キット -蛍光検出-	480 反応	FIK-301

【製造・販売元】

—納期・注文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