

# ノロウイルス検出キット G1/G2 -高速プローブ検出-

(Code No. FIK-253)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department  
OSAKA JAPAN

## —目次—

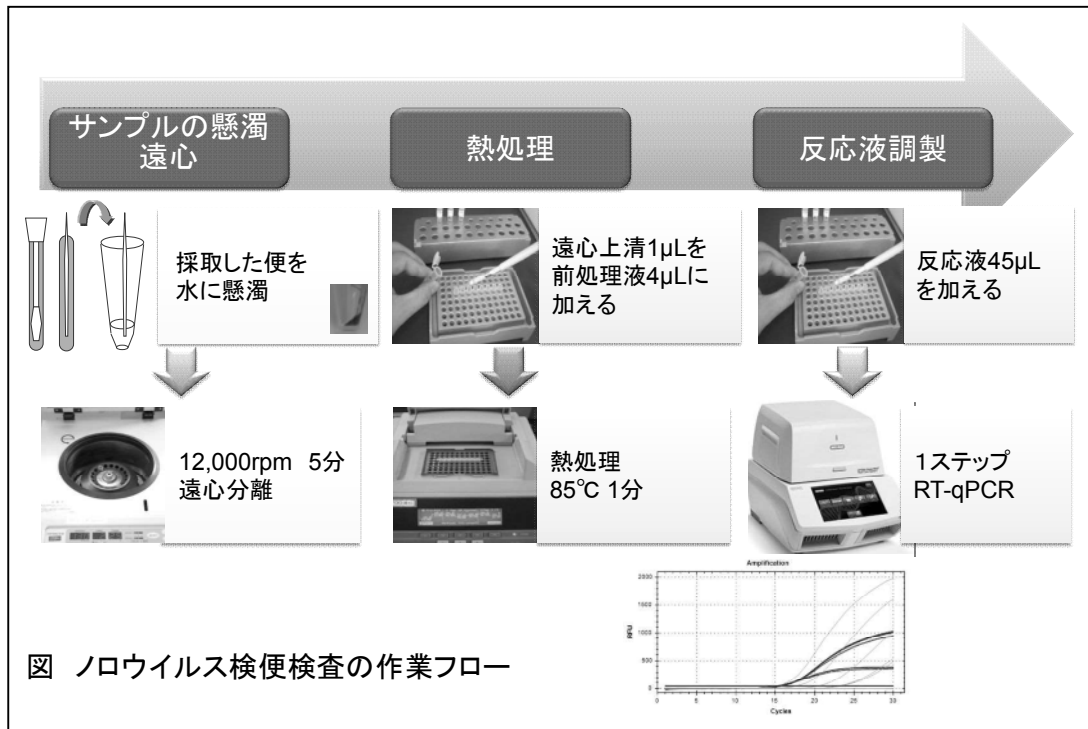
[1]	はじめに	2
[2]	製品内容	3
[3]	保存温度	3
[4]	製品のほかに用意するもの	3
[5]	本製品で使用できる便検体	4
[6]	プロトコール	5
	(1) 便検体の懸濁	5
	(2) 熱処理	5
	(3) RT-PCR 反応液の調製、添加	5
	(4) RT-PCR サイクル条件	6
[7]	判定	7
[8]	トラブルシューティング	8
[9]	関連製品	9

## 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、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。逆転写反応から PCR までを約 1 時間で行えます。



### ◆本製品の特長◆

- ・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、便の水懸濁液の遠心上清に、前処理液を添加して熱処理する(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。
- ・キャリア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。

## [2] 製品内容

本製品には、以下の試薬が含まれており、100 回用としてご使用いただけます。

試薬名	容量
① 前処理液	440 $\mu$ L
② 反応液	1,100 $\mu$ L x 3
③ 酵素液	550 $\mu$ L
④ プライマー液(G1/G2) <sup>*1,</sup>	550 $\mu$ L
⑤ プローブ液(G1/G2) <sup>*1,*2</sup>	550 $\mu$ L

\*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))に記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 Cy 5 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。
- ・使用後は速やかに-20℃で保存してください。

## [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

- ・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(最大回転数、12,000rpm 以上のもの)
- ・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] 本製品で使用できる便検体

- ・ 生便検体、凍結便検体、冷蔵便検体、キャリブリア入り便検体
- ※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) 便検体の懸濁

- ・ マイクロチューブに滅菌水を 200~1,000 $\mu$ L 分注します。
- ・ 便検体を 5~10%となるように懸濁します。検体量は 200 $\mu$ L に対し耳かき一杯分くらいが目安です。
- ・ 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。

### (2) 熱処理

- ・ 下記の量を PCR チューブに調製してください。
- ・ 「①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 $\mu$ L
①前処理液	4 $\mu$ L
合計	5 $\mu$ L

- ・ サーマルサイクラーで 85°C で 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マスターミックスとして必要反応数分調製します。
- ・ 「②反応液」、「④プライマー液」、「⑤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。
- ・ 「③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°Cから取り出し、使用後は直ぐに-20°Cに戻してください。

1 反応あたりの調製量	
②反応液	30 $\mu$ L
③酵素液	5 $\mu$ L
④プライマー液(G1/G2)	5 $\mu$ L
⑤プローブ液(G1/G2)	5 $\mu$ L
合計	45 $\mu$ L

\*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 45 $\mu$ L を(2)の熱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)の熱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で反応を行います。

#### (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)

逆転写反応	42°C	5分		
プレ変性	95°C	10秒		
変性	97°C	1秒		
会合・伸長	54°C	22秒		X10サイクル
変性	95°C	1秒		
会合・伸長	54°C	22秒	(検出)	X30サイクル

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

逆転写反応	42°C	5分			・Speed:fast
プレ変性	95°C	15秒			
変性	97°C	2秒			
会合・伸長	54°C	40秒		X10サイクル	・0.1ml 8-strip tubeのご使用をお薦めします。
変性	97°C	2秒			
会合・伸長	54°C	40秒	(検出)	X30サイクル	

- ・ 反応終了後反応液が白濁しておりますが、検査結果には影響しません。
- ・ 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
内部コントロール(IC)	FAM

### (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

現象	原因	対策
判定不能になる。	便の懸濁量が多すぎる。	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。
	キャリア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。	キャリア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。

## [9] 関連製品

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 回用	FIK-201
ノロウイルス検出キット G2 -融解曲線解析-	100 回用	FIK-202
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 -プローブ検出-	100 回用	FIK-213
腸内細菌遺伝子検出キット -マルチ PCR-	500 回用	FIK-101
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

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】**

ー納期・注文に関するお問い合わせー

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

ー製品の内容・技術に関するお問い合わせー

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/>