



ノロウイルス検出キット G1/G2 -高速プローブ検出 Quick Step-

([Code No. FIK-273](#))

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD.
Bioproducts Sales and Marketing Department
OSAKA JAPAN

TOYOBO

—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) 前処理	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。

本製品に含まれる前処理液は、消防法上の”危険物第四類 第三石油類 危険等級Ⅲ 水溶性”に該当します。周囲に火気および高温物がない事を確認し、使用してください。また、SDS を参考に、適切な廃棄方法にて廃棄を行ってください。

[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。サンプルの熱処理が不要なため、作業途中においてチューブの開閉を行う必要がありません。また、逆転写反応から PCR までを約 50 分で行うことができます。

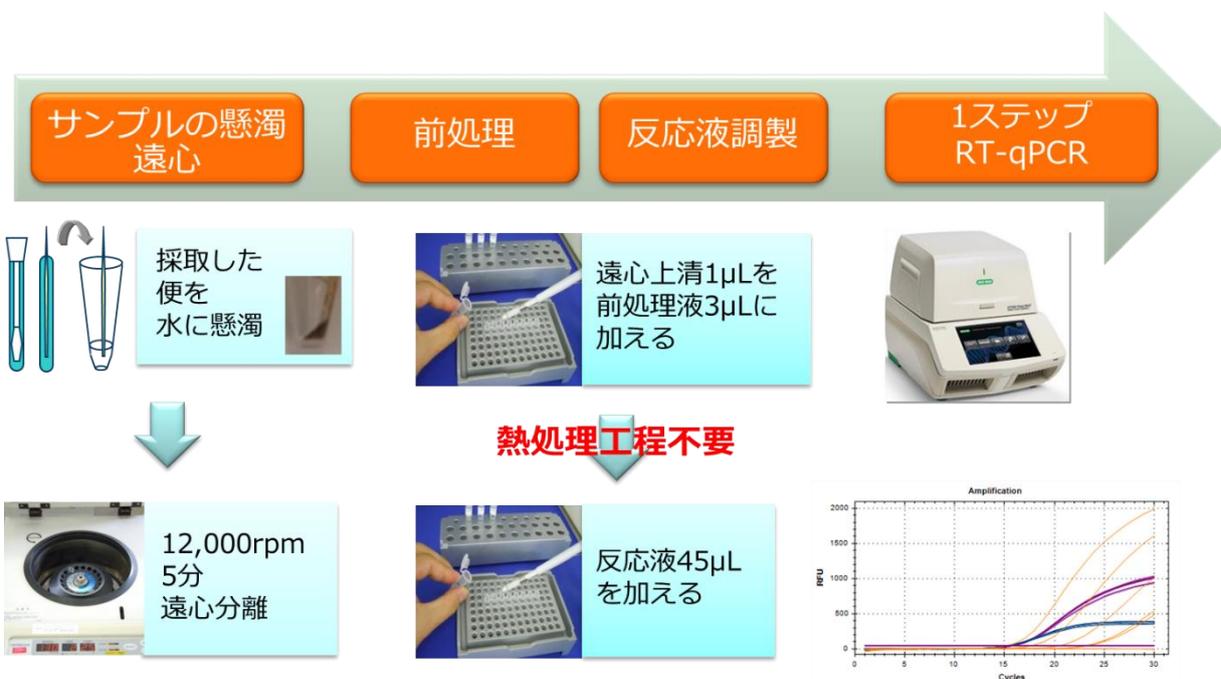


図 ノロウイルス検便検査の作業フロー

◆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を、前処理液に添加するのみです。核酸の抽出精製は必要ありません。
- ・サンプルの熱処理が不要なため、作業途中においてチューブの開閉をする必要がなく、サンプルの飛散リスクを低減できます。
- ・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 回用としてご使用になれます。

試薬名	容量
① 前処理液	330μL
② 反応液	1,100μL x 3
③ 酵素液	550μL
④ プライマー液(G1/G2) ^{*1}	550μL
⑤ プローブ液(G1/G2) ^{*1,*2}	550μL

*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」は転倒混和により攪拌し、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」以外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。
- ・「①前処理液」は室温でも保存可能です。

[3] 保存温度

- ・本製品に含まれる試薬はすべて-20℃保存です。
- ・「①前処理液」は解凍後、室温保存も可能です。

[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)
- ・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 μ 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 μ 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) 前処理

- ・ 「①前処理液」は、消防法上の危険物第四類 第三石油類に該当しますので、周囲に火気および高温物がない事を確認し使用してください。
- ・ 「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前処理液」は氷上において、凝固しますので、室温にてご使用ください。
- ・ 下記の量を PCR チューブに調製してください。
調製する際は、「①前処理液」が PCR チューブの底に完全に落ちきったことを確認し、懸濁液上清を PCR チューブの底に添加してください。

	1 反応あたりの調製量
①前処理液	3 μ L
(1)の懸濁液上清	1 μ L
合計	4 μ L

- ・ 直ちに次の工程にはいります。(前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、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 $^{\circ}$ Cから取り出し、使用後は直ぐに-20 $^{\circ}$ Cに戻してください。

1 反応あたりの調製量	
②反応液	30 μ L
③酵素液	5 μ L
④プライマー液(G1/G2)	5 μ L
⑤プローブ液(G1/G2)	5 μ L
合計	45 μ 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 μ L を(2)の前処理済み懸濁液に添加します。
- ・ チューブキャップでふたをします。
- ・ チューブキャップでふたをした後、タッピングまたはボルテックスミキサーを用いて反応液を混合した後、スピンドウンして下さい。
- ・ 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	4分	
プレ変性	95°C	10秒	
変性	98°C	1秒	
会合・伸長	52°C	10秒	X2サイクル
変性	95°C	1秒	
会合・伸長	52°C	10秒	X8サイクル
変性	95°C	1秒	
会合・伸長	52°C	10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テクニカルライン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(または Ct 値)が 30 未満を意味します。この Cq 値は 3 段階 PCR の 3 段階目の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。赤茶色または茶色になっている場合は便量が過剰です。
	前処理液と懸濁液上清が混合されていない。	前処理液および懸濁液上清が PCR チューブの底にて混合されていることを確認してください。
	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&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 -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

より詳細な情報は、弊社ウェブサイトをご覧ください

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

TOYOBO

【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 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

— 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 (土日祝日、休日を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <https://lifescience.toyobo.co.jp/>