



ノロウイルス検出キット G1/G2 -Master Mix-

(Code No. FIK-298)

取扱説明書

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

TOYOBO

—目次—

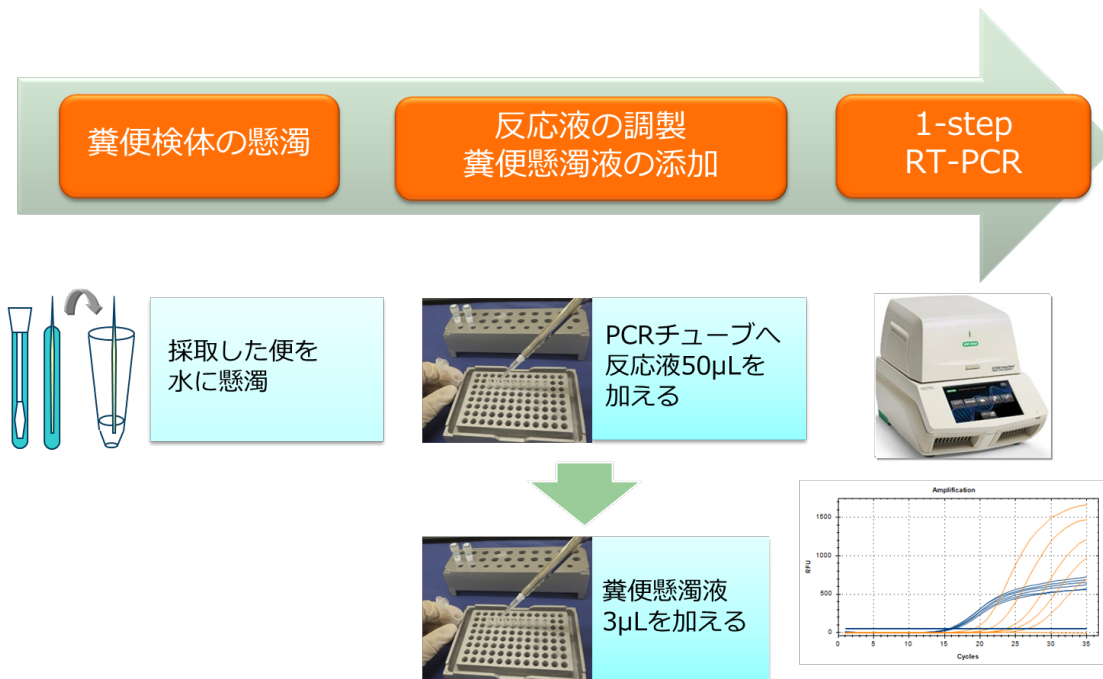
| | | |
|-----|-----------------------|---|
| [1] | はじめに | 1 |
| [2] | 製品内容 | 2 |
| [3] | 保存温度 | 2 |
| [4] | 製品のほかに用意するもの | 2 |
| [5] | 本製品で使用できる糞便検体 | 2 |
| [6] | プロトコール | 3 |
| | (1) 糞便検体の懸濁 | 3 |
| | (2) 反応液の調製、添加 | 3 |
| | (3) RT-PCR サイクル条件 | 4 |
| [7] | 判定 | 4 |
| | (1) 測定対象遺伝子と確認するチャンネル | 4 |
| | (2) 判定例 | 4 |
| [8] | トラブルシューティング | 5 |
| [9] | 関連製品 | 5 |

ご注意

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。

[1] はじめに

本製品は、糞便検体からノロウイルスの genogroup GI、genogroup GII 遺伝子を RT-PCR 法で検出するキットです。糞便検体懸濁液の遠心分離工程が不要なため、反応液に糞便懸濁液を添加して、RT-PCR 反応を実施するだけでノロウイルスを検出することができます。



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 の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。
- ・反応液がマスターミックスになっているため事前に調製する必要はありません。
- ・反応液が着色されているため、PCR チューブへの分注の有無の確認が容易です。
- ・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。
- ・糞便の水懸濁液を反応液に添加するのみで、直接 1 ステップ RT-PCR を実施できます。糞便懸濁液の遠心分離作業や、核酸の抽出精製を含む前処理は必要ありません。
- ・糞便懸濁液の前処理が不要なため、作業途中においてチューブの開閉をする必要がなく、糞便検体の飛散リスクを低減できます。
- ・内部コントロール (IC) 用の DNA を含みます。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(100 検体分)としてご使用いただけます。

| 試薬名 | 容量 |
|-----------------------------------|------------------------|
| ノロウイルス検出キット G1/G2 -Master Mix- | 1,200 μ L × 5 本 |

- ・ GI および GII 遺伝子の検出には、厚生労働省通知法(平成 15 年 11 月 5 日付食安監発第 1105001 号「ノロウイルスの検出法について」通知 別添)に記載されたものと同様な配列のプライマー、プローブを使用していますが、GII プライマーに関しては、検出感度向上のため、一部のプライマーを数塩基ずらした改良プライマーを使用しています。
- ・ 本製品は、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(IC)を FAM チャンネルで検出します。
- ・ 「ノロウイルス検出キット G1/G2 -Master Mix-」は使用する直前に解凍し、転倒混和により攪拌してください。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。
- ・ 反応液調製後の残った「ノロウイルス検出キット G1/G2 -Master Mix-」は、速やかに -20°C で保存してください。なお、短期間(3 日以内)であれば 4°C 保管可能です。

[3] 保存温度

- ・ 本製品に含まれる試薬はすべて -20°C 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)
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ ピペットなど
- ・ スピンドウン用卓上遠心機
- ・ チップ、チューブなど消耗品

[5] 本製品で利用できる糞便検体

- ・ 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) 糞便検体の懸濁

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

(2) 反応液の調製、添加

- ・ 「ノロウイルス検出キット G1/G2 -Master Mix-」を、各 PCR チューブに 50 μL ずつ分注してください。
- ・ 「ノロウイルス検出キット G1/G2 -Master Mix-」は、使用する直前に解凍して、転倒混和によって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。使用後は直ぐに -20°C に戻してください。短期間(3 日以内)であれば 4°C 保管可能です。
- ・ 「ノロウイルス検出キット G1/G2 -Master Mix-」を分注した PCR チューブに、(1)で調製した懸濁液 3 μL を添加します。
- ・ 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、スピンドウンしてください。
- ・ 直ちに次の温度サイクルで反応を行います。

(3) 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 リアルタイム PCR 解析システム (Bio-Rad 社)

| | | | |
|-------|-------|-----|--------------|
| 熱処理 | 90°C | 1分 | |
| 逆転写反応 | ※54°C | 5分 | |
| 変性 | 98°C | 1秒 | |
| 会合・伸長 | 56°C | 10秒 | ×5サイクル |
| 変性 | 98°C | 1秒 | |
| 会合・伸長 | 54°C | 10秒 | ×5サイクル |
| 変性 | 95°C | 1秒 | |
| 会合・伸長 | 52°C | 10秒 | (検出) ×35サイクル |

※蛍光値が低い場合は、56°Cにすることで改善する場合があります。

- ・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 | <35 | 検出されず | <35 | GI 陽性 |
| 2 | 検出されず | <35 | <35 | GII 陽性 |
| 3 | <35 | <35 | <35 | GI/GII 陽性 |
| 4 | 検出されず | 検出されず | <35 | 陰性 (検出感度以下) |
| 5 | 検出されず | 検出されず | 検出されず | 判定不能 |

*<35 は Cq 値(または Ct 値)が 35 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。 | 糞便の懸濁量が多すぎる。 | 糞便の懸濁量を少なくして再検査を実施してください。糞便検体懸濁後の色調は黄色くなる程度が適当です。赤茶色または茶色の場合は便量が過剰です。 |
| | 反応液と糞便検体懸濁液が混合されていない。 | 反応液および糞便検体懸濁液がPCR チューブの底で混合されていることを確認してください。 |
| | キャリーオーバー汚染が発生している。 | 試薬・水を廃棄し、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。 | 新しい試薬に交換してください。 |
| 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。 | キャリーオーバー汚染が発生している。 | 試薬・水を廃棄し、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 |

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/>