23-12

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＞

(Code No. FIW-201)

取扱説明書

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

A5793K

—目次—

[1] はじめに・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2
[2] 製品内容・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3
[3] 保存温度・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4
[4] 製品のほかに用意するもの・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4
[5] プロトコール・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5
(1) 検体の採取・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5
(2) ふき取り検体の回収・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5
(3) ノロウイルスの濃縮・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6
(4) RNA 抽出・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6
(5) コントロール DNA(G1/G2)の添加・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6
(6) RT-PCR 反応液の調製・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7
(7) RT-PCR サイクル条件・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9
[6] 判定・・・ 10
[7] トラブルシューティング・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 11
[8] 関連製品・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 13

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、ノロウイルスのふき取り検査用試薬です。床やドアノブ、トイレの便座などをふき取り検査用綿棒でふき取り(以下、ふき取り検体と記す)、ふき取り検体に含まれるノロウイルスを濃縮し、簡便な前処理後、RT-PCR 法で検出するキットです。

◆本製品の特長◆

本製品は、ふき取り検体に含まれるノロウイルスを短時間で高感度に検出することができます。

- ふき取り検体に濃縮液を添加し、冷却高速遠心分離を行うことにより、迅速にウイルスを濃縮することができます。

- 逆転写反応から PCR 反応までを 1 ステップで行うため、反応途中で試薬を添加する必要はありません。

- 厚生労働省　医薬食品局　食品安全部　監視安全課より通知された「ノロウイルスの検出法について」(平成 15 年 11 月 5 日付け食安監発 1105001 号別添)(最終改正:平成 25 年 10 月 22 日付け食安監発 1022 第 1 号)と同じ塩基配列の ＧⅠ検出用および ＧⅡ検出用プライマーならびにプローブを使用しております。

- ノロウイルス ＧⅠ、ＧⅡ、およびインターナルコントロール(IC)をマルチプレックス PCR 反応により検出します。インターナルコントロール DNA の増幅を確認することにより、PCR の阻害による偽陰性を判別することができます。

- PCR の増幅産物が次回以降の PCR 反応液に混入してしまうことをキャリーオーバー汚染といい、混入した増幅産物を鋳型として増幅が起こるため、偽陽性の原因となります。本製品では、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、キャリーオーバー汚染による偽陽性を防止します。

- 陽性コントロールとして、ノロウイルス ＧⅠおよび ＧⅡの配列を有する DNA 断片の混合液を添付しています。PCR の陽性コントロールとしてご使用ください。

[2] 製品内容

本製品には、以下の試薬が含まれており、50 回用としてご使用になれます。

試薬名	容量
① 濃縮液	30mL
② 前処理液	250μL
③ 反応液	750μL×2
④ 酵素液	250μL
⑤ プライマー液(G1/G2)*1	250μL
⑥ プローブ液(G1/G2)*1	250μL
⑦ HEX プローブ液	15μL
⑧ コントロール DNA(G1/G2)	100μL

①濃縮液
ふき取り検体に含まれるノロウイルスを濃縮する試薬です。

②前処理液
濃縮したノロウイルスを熱処理する際に用いる試薬です。前処理液を添加し、熱処理することでウイルスのキャプシドが破砕され、RNA を抽出することができます。

③反応液・④酵素液・⑤プライマー液(G1/G2)・⑥プローブ液(G1/G2)
RT-PCR に用いる試薬です。ノロウイルス RNA を添加し、1 ステップ RT-PCR によりターゲット配列を検出します。

⑥プローブ液(G1/G2)を単独で用いる場合、ＧＩおよび ＧⅡを FAM チャネル、インターナルコントロールを ROX チャネルで検出します。

測定機器に StepOnePlus™ （サーモフィッシャーサイエンティフィック）をご使用の場合、⑥プローブ液(G1/G2)と⑦HEX プローブ液を混合し、ＧＩおよび ＧⅡを FAM チャネル、インターナルコントロールを VIC チャネルで検出します。

⑦コントロール DNA(G1/G2)(20 回用)*2
ノロウイルス ＧＩおよび ＧⅡの配列を有する DNA 断片の混合液です。PCR の陽性コントロールとして用いることができます。

*1 ＧＩおよび ＧⅡ遺伝子の検出には、厚生労働省通知（「ノロウイルスの検出法について」厚生労働省 医薬食品局 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））に収載されたプライマー、プローブ配列を使用しています。
*2 偽陽性の原因となりますので、取扱いには細心の注意を払ってください。

[3] 保存温度

本製品に含まれる試薬は、全て冷凍保存(-20℃)です。

[4] 製品のほかに用意するもの

本製品の他に、以下の機器・消耗品・試薬をご用意ください。

【機器】
・リアルタイム PCR 装置(FAM、ROX 蛍光フィルター対応)
・冷却高速遠心機(回転数が 12,000rpm 程度のもの)
・恒温装置(ヒートブロックまたはサーマルサイクラー)
・マイクロピペット
・ボルテックスミキサー

【消耗品】
・ふき取り器具
ふき取り器具は食品関連施設や医療施設でのふき取り検査用に市販されている下表の製品を推奨します。下表の製品以外を使用する場合は、弊社テクニカルラインにお問い合わせください。

メーカー	製品名(製品コード)	内容液
株式会社 エルメックス	(ST-25PBS)	リン酸緩衝生理食塩水
	(ST-26PBS)	
栄研化学株式会社	ふきふきチェックⅡ (PF2002)	リン酸緩衝生理食塩水
	ふきふきチェックⅢ (PF2030)	
日本ベクトン・ディッキンソン株式会社	BD ラスパーチェック ™ ふき取り検査用スワブ (251811)	リン酸緩衝生理食塩水
有限会社 佐藤化成工業所*1,	ワイプチェック (TE-311N)	リン酸緩衝生理食塩水
	ワイプチェック (TE-321N)	精製水

・0.2mL 8 連チューブ(恒温装置がサーマルサイクラーの場合)
・リアルタイム PCR 用反応チューブ
・マイクロピペット用チップ

*1 佐藤化成工業所製「ワイプチェック (TE-311N、321N)」は容器の材質が固く、後述の「[5]プロトコール (1)検体の採取 ①株式会社 エルメックス、栄研化学株式会社、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社のふき取り器具を用いる場合」を実施することができません。これらのふき取り器具を使用する場合は、「[5]プロトコール (1)検体の採取 ②有限会社佐藤化成工業所のふき取り器具を用いる場合」に従って実施してください。
※ ラスパーチェック ™ は、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社の商標です。

[5] プロトコール

(1) 検体の採取

ふき取り器具を用いて、検査対象箇所から検体を採取します。検体の採取方法は各メーカーのふき取り器具により異なります。使用するふき取り器具に合わせて、①または②の方法を選択してください。

①株式会社　エルメックス、栄研化学株式会社、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社のふき取り器具を用いる場合

1) 綿棒を抜き、回収容器中の溶液(リン酸緩衝生理食塩水や精製水など)を全量廃棄する。
2) 綿棒を用いて10cm×10cm(100cm^2)の検査対象箇所をふき取る。
3) 綿棒を器具本体に戻し、容器の側面を指でつまみ、壁面に綿球を押しつけるようにして絞る。
4) 3)の湿り気がとれた綿棒で再度検査対象箇所をふき取り、綿球を容器内で絞る。
5) 綿棒を器具本体に戻し、検査室に持ち帰る。

②有限会社　佐藤化成工業所のふき取り器具を用いる場合

1) 綿棒を用いて 10cm×10cm(100cm^2)の検査対象箇所をふき取る。
2) 綿棒を器具本体に戻し、検査室に持ち帰る。

(2) ふき取り検体の回収

ふき取り検体を回収します。ふき取り検体の回収方法は、各メーカーのふき取り器具により異なります。使用するふき取り器具に合わせて、①または②の方法を選択してください。

①株式会社　エルメックス、栄研化学株式会社、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社のふき取り器具を用いる場合

1) 綿球を絞って回収した(1)-①の溶液をふき取り検体とし、(3)ノロウイルスの濃縮に進む。液量が少ない場合は、容器の側面を指でつまみ、壁面に綿球を押しつけるようにして絞り、溶液を回収する。回収したふき取り検体を、1.5mLチューブに300μL[*1]抜き取る。

②有限会社　佐藤化成工業所のふき取り器具を用いる場合

1) ふき取り器具をボルテックスミキサーで10秒間混合する。
2) ふき取り検体を、1.5mL チューブに 600μL[*1] 抜き取る。

*1 ふき取り検体は最少で 200μL、最大で 600μL を持ち込むことが可能です。回収可能な最大量のふき取り検体を持ち込むことで、より高感度で検出することができます。①株式会社　エルメックス、栄研化学株式会社、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社のふき取り器具を用いる場合は300μL、②有限会社　佐藤化成工業所のふき取り器具を用いる場合は 600μL を推奨していますが、回収したふき取り検体の液量に応じて適宜増減してください。

(3) ノロウイルスの濃縮

回収したふき取り検体からノロウイルスを濃縮します。

1) 濃縮液を使用する前にボルテックスミキサーでよく混合する。
2) (2)のふき取り検体と等量の濃縮液を添加し、ボルテックスミキサーで 5 秒間混合する。
3) 冷却高速遠心機で、4℃・15,000rpm・5 分間もしくは 4℃・12,000rpm・20 分間の遠心分離を行う。遠心分離後、白色沈殿がチューブの底に形成されていることを確認してください。
4) マイクロピペットで沈殿に触れないように注意して、上清を全て除去する。

(4) RNA 抽出

前処理液を添加し、熱処理による RNA 抽出を行います。

1) (3)のチューブに前処理液を 5μL 添加後、ボルテックスミキサーで 5 秒間混合し、スピンダウンする。
2) 85℃で 1 分間の熱処理を行う。恒温装置としてヒートブロックを用いる場合は、1)のチューブをそのまま熱処理する。サーマルサイクラーを用いる場合は、1)の溶液を 8 連チューブに全量移し替えて熱処理する。
3) 再度ボルテックスミキサーで 5 秒間混合し、スピンダウンする。

(5) コントロール DNA(G1/G2)の使用

コントロール DNA(G1/G2)は PCR の陽性コントロールとして用いることで、PCR が正確に実施できていることを確認することができます。陽性コントロールとして用いる場合は、次に調製する RT-PCR 反応液に、コントロール DNA(G1/G2)を 5μL 添加してください。

(6) RT-PCR 反応液の調製

RT-PCR 反応液を調製します。[*2]

ご使用の前に

検出機器にStepOnePlus™をご使用の場合は、ご使用の前に⑦HEXプローブ液の全液量を⑥プローブ液(G1/G2)に混合します。

混合した後はStepOnePlus™以外での検出機器では使用できなくなります。混合の際はご使用の測定機器に十分ご注意ください。

StepOnePlus™ 、Thermal Cycler Dice® Real Time System以外の機器をご使用の場合は、弊社テクニカルラインまでお問い合わせください。

1) 使用測定機器を確認する。

検出機器にStepOnePlus™ を使用する場合は、⑦HEXプローブ液の全液量を⑥プローブ液(G1/G2)に混合する。

StepOnePlus™ 以外を使用する場合は、誤使用を防ぐため⑦HEX プローブ液を廃棄する。

混合した後はStepOnePlus™以外での検出機器では使用できなくなるため、混合の際は使用する測定機器に十分ご注意ください。

2) ③反応液、⑤プライマー液(G1/G2)、⑥プローブ液(G1/G2)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、スピンダウンする。

3) 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℃に戻す。

4) 1 反応あたり下記の分量を調製する。必要分の 1 割増し程度で PCR 反応液を調製する。

試薬	使用量（1 反応分）
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)[*3] もしくは 1)で調製した⑥プローブ液(G1/G2)と ⑦HEX プローブ液の混合液[*3]	5 μL
合計	45 μL

5) PCR 反応液を 45μL ずつ、リアルタイム PCR 反応プレートまたはチューブに分注する。

6) (4)の熱処理後の検体を 5μL 添加する。[*4]

*2 (5)のコントロール DNA(G1/G2)が RT-PCR 反応液に混入すると偽陽性の原因となりますので、ご注意ください。

*3 検出にご使用の機器によって異なります。StepOnePlus™ をご使用の場合は、1)で調製する⑥プローブ液(G1/G2)と⑦HEX プローブ液の混合液を使用してください。

*4 陽性コントロールを検出する場合は、検体の代わりにコントロール DNA(G1/G2)を 5μL 添加してください。また、陰性コントロールを検出する場合は、検体の代わりに滅菌水を 5μL 添加してください。

(7) RT-PCR サイクル条件

主要なリアルタイム PCR 装置での温度サイクル条件は以下のとおりです。記載されていない機器につきましては弊社テクニカルラインまでお問い合わせください。

StepOnePlus™（サーモフィッシャーサイエンティフィック）

逆転写反応	42℃	4分		
プレ変性	95℃	10秒		
変性	98℃	1秒		
会合・伸長	52℃	20秒		×10サイクル
変性	98℃	1秒		
会合・伸長	52℃	30秒	（検出）	×35サイクル

測定チャネルはFAM, VICを指定し、クエンチャーはNoneを指定してください。パッシブリファレンス色素はNoneを指定してください。

測定チャネルに ROX など他のチャネルを含まないよう設定してください。
設定に ROX を含んでいると測定結果に影響を与える場合があります。

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

逆転写反応	42℃	4分		
プレ変性	95℃	10秒		
変性	98℃	10秒		
会合・伸長	52℃	30秒		×10サイクル
変性	98℃	10秒		
会合・伸長	52℃	25秒	（検出）	×30サイクル

・Speed:fast

・0.1ml 8-strip tubeのご使用をお勧めします。

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

逆転写反応	42℃	4分		
プレ変性	95℃	10秒		
変性	98℃	5秒		
会合・伸長	52℃	10秒		×10サイクル
変性	98℃	5秒		
会合・伸長	52℃	20秒	（検出）	×30サイクル

・Speed:fast

※StepOnePlus™ は、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社の商標です。
※Thermal Cycler Dice®は、タカラバイオ株式会社の登録商標です。

[6] 判定

測定対象遺伝子と確認するチャネル、および判定方法は以下のとおりです。

(1) 測定対象遺伝子と確認するチャネル

StepOnePlus™をご使用の場合

測定対象遺伝子	測定チャネル
ＧⅠ遺伝子	FAM
ＧⅡ遺伝子	FAM
インターナルコンロトール（IC）	VIC

測定チャネルに ROX など他のチャネルを含まないよう設定してください。
ROX を含んでいると測定結果に影響を与える場合があります。

Thermal Cycler Dice® Real Time System をご使用の場合

測定対象遺伝子	測定チャネル
ＧⅠ遺伝子	FAM
ＧⅡ遺伝子	FAM
インターナルコンロトール（IC）	ROX

(2) 判定方法

StepOnePlus™をご使用の場合

	ＧⅠおよびＧⅡ（FAM チャネル）	IC（VIC チャネル）	判定
1	<35*1	<35*1	陽性
2	検出されず	<35*1	検出限界以下
3	検出されず	検出されず	判定不能

*1 <35 は Cq 値（又は Ct 値）が 35 未満を意味します。

Thermal Cycler Dice® Real Time System をご使用の場合

	ＧⅠおよびＧⅡ（FAM チャネル）	IC（ROX チャネル）	判定
1	<30*1	<30*2	陽性
2	検出されず	<30*2	検出限界以下
3	検出されず	検出されず	判定不能

*2 <30 は Cq 値（又は Ct 値）が 30 未満を意味します。

[7] トラブルシューティング

現象	原因	対策
ふき取り検体の回収量が少ない。	ふき取り器具の綿棒が乾燥している。	綿棒をふき取り器具付属の溶液(リン酸緩衝生理食塩水や精製水など)に浸し、湿り気のある状態にしてご使用ください。
	綿棒を充分に絞ることができていない。	容器の側面を指でつまみ、壁面に綿球を押しつけるようにして絞る作業を繰り返し実施してください。
遠心分離後の沈殿が確認できない。	濃縮液が均一に混ざっていない。	濃縮液をボルテックスミキサーで混合してください。
	濃縮液が劣化している。	濃縮液を新しいものに交換してください。
	ノロウイルスの濃縮を正確に実施できていない。	濃縮液量を確認してください。 ふき取り検体と等量の濃縮液を添加してください。
	遠心分離の際に冷却ができていない。	冷却高速遠心機の温度は 4℃に設定してください。
	遠心分離後に長時間放置している。	遠心分離後はすみやかに上清を除去してください。
	上清の除去の際に沈殿を一緒に除去している。	上清の除去の際はマイクロピペットで沈殿に触れないようにしてください。沈殿は遠心分離の際、外側の壁面下部に生じます。反対の内側の下部から除去してください。

インターナルコントロールが増幅しない。	RT-PCR 反応液を正確に調製できていない。	RT-PCR 反応液を再調製してください。各試薬の入れ忘れがない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してください。
	StepOnePlus™ の場合⑦HEX プローブ液の混合を忘れている	⑥プローブ液(G1/G2)に⑦HEX プローブ液を混合してください。
陰性コントロールが陽性になる。	キャリーオーバー汚染・コンタミネーションが発生している。	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。
		試薬中にキット添付のコントロール DNA(G1/G2)が混入した場合、除去は不可能です。 試薬を新しいものに交換してください。
	Thermal Cycler Dice® Real Time System の場合誤って⑥プローブ液に⑦HEX プローブ液を混合した。	誤って⑥プローブ液に⑦HEX プローブ液を混合した場合、StepOnePlus™ 以外の機器では使用できなくなります。混合してしまった場合は、試薬を新しいものに交換してください。
陽性コントロールが陰性になる。(コントロール DNA(G1/G2)が増幅しない。)	RT-PCR 反応液を正確に調製できていない。	RT-PCR 反応液を再調製してください。各試薬の入れ忘れがないことを確認してください。
	温度サイクル条件が適切でない。	各リアルタイム PCR 装置の温度サイクル条件を設定してください。温度サイクル条件が記載されていない機種については弊社までお問い合わせください。
	コントロール DNA(G1/G2)が劣化している。	コントロール DNA(G1/G2)を新しいものに交換してください。
	試薬が劣化している。	試薬を新しいものに交換してください。

[8] 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
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
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- サルモネラ検出用	200 回用	FIK-361
腸内細菌遺伝子検出キット -シングル検出- 腸管出血性大腸菌検出用	200 回用	FIK-362
腸内細菌遺伝子検出キット -シングル検出- 赤痢菌検出用	200 回用	FIK-363
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

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】

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

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