

製品コード RR250A

食品・環境分析用

TaKaRa

TaKaRa qPCR *Norovirus* (GI/GII) Typing Kit

説明書

ノロウイルス (NoV) は、急性胃腸炎の主要な原因ウイルスです。感染源は、感染者の排泄物（便あるいは吐物）や NoV を保有する二枚貝（カキなど）と推定されています。感染すると数日の潜伏期間後に、主に嘔吐、下痢、腹痛、発熱（37～38℃）などの症状が現れます。

NoV は、構造的に表面をカップ状の窪みをもつタンパク質で覆われ、内部にプラス 1 本鎖 RNA の遺伝子を有しています。今のところ、組織培養法などを用いて、NoV の分離・検出が困難なため、逆転写 PCR 法やリアルタイム PCR 法などによって、ウイルスの検査診断が行われています。Genogroup I～V の 5 つの遺伝子群に分類され、ヒトは Genogroup I (GI) と II (GII) に感染することが示唆されています。

本製品は、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 日付け食安監発第 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) (以下「公定法」と記載する) 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たリアルタイム PCR 法による NoV 検出キットです。

蛍光物質を使用して PCR 増幅産物をリアルタイムで解析するリアルタイム PCR 法は、簡便性、迅速性、反応特異性の高さから、近年、食品などの NoV の検出を含め、種々の病原体の検査診断法に用いられています。

増幅反応に用いる *Premix Ex Taq™* は、抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq® HS* とリアルタイム PCR 用に最適化されたバッファの組み合わせにより、非特異的増幅を抑制し、高い増幅効率、高い検出感度でリアルタイム PCR を行うことができます。また、反応時間が極めて短い高速 PCR に適しており、幅広いダイナミックレンジで正確なターゲットの検出、定量ができ、さらに再現性よく信頼性の高いリアルタイム PCR 解析が可能です。

増幅産物の検出には、公定法と同じ FAM (レポーター)/TAMRA (クエンチャー) で標識されたプローブを採用しています。5' 側を蛍光物質 (FAM)、3' 側をクエンチャー物質 (TAMRA) で修飾したオリゴヌクレオチドであるプローブは、アニール条件下では鋳型 DNA に特異的にハイブリダイズしますが、蛍光はクエンチャーによって抑制されています。伸長反応時、*Taq* DNA ポリメラーゼの持つ 5' → 3' exonuclease 活性により、鋳型 DNA にハイブリダイズしたプローブが分解され、クエンチャーによる抑制が解除されることで蛍光を発します。(図 1 参照)。この蛍光強度を測定することで増幅産物をモニターすることができます。

なお、本製品は、群馬県衛生環境研究所との共同研究の成果に基づき製品化しました。

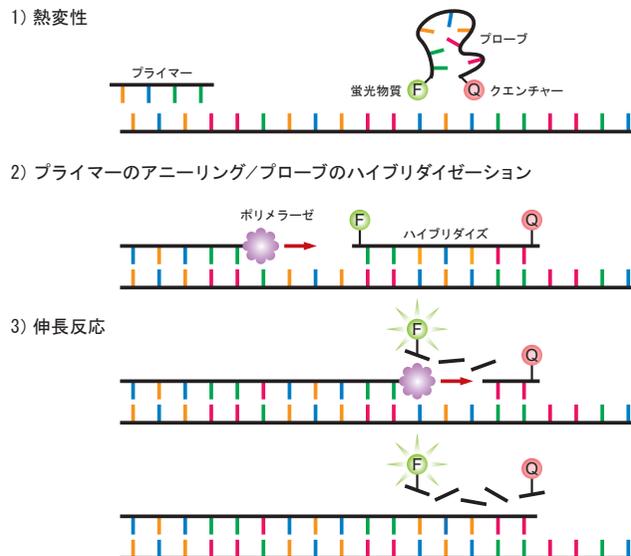


図 1. プローブ法の原理

I. 内容 (RT 50 回分、GI 反応 50 回分*1、GII 反応 50 回分*1)

1.	5 × PrimeScript™ Buffer (NV)*2,3		200 μl
2.	PrimeScript RT Enzyme Mix (NV)*2,4		50 μl
3.	Random 6 mers (100 μM)*2		50 μl
4.	Premix Ex Taq (NV) (2 × conc.)*5		625 μl × 2
5.	GI Primer Mix*6		50 μl
6.	GII Primer Mix*6		50 μl
7.	GI Probe Mix*6,7		50 μl
8.	GII Probe Mix*6,7		50 μl
9.	ROX Reference Dye (50 × conc.)*8		50 μl
10.	ROX Reference Dye II (50 × conc.)*8		50 μl
11.	RNase Free dH ₂ O		1 ml
12.	GI Positive Control DNA*9	4 × 10 ⁶ copies/μl	20 μl
13.	GII Positive Control DNA*9	4 × 10 ⁶ copies/μl	20 μl
14.	EASY Dilution (for Real Time PCR)*10		700 μl

* 1 : 8 段階濃度、n=3 で検量線の作成を行い、検体サンプル、陰性コントロールについて n=2 で検出を行う場合、本キットでは 12 検体の測定が可能である。

* 2 : 逆転写反応用試薬

* 3 : dNTP Mixture および Mg²⁺ を含む。

* 4 : RNase Inhibitor を含む。

* 5 : TaKaRa Ex Taq HS、dNTP Mixture、Mg²⁺ を含む。

* 6 : 公定法と同じ塩基配列を採用

* 7 : 蛍光標識プローブを含んでいるため、遮光に留意すること

* 8 : Applied Biosystems のリアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用する。

◆ ROX Reference Dye を添加する機種

• Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

◆ ROX Reference Dye II を添加する機種

• Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

◆ 添加の必要がない機種

• Thermal Cycler Dice® Real Time System III with PC (製品コード TP970)

• Thermal Cycler Dice Real Time System II (製品コード TP900/TP960 : 終売)

• Thermal Cycler Dice Real Time System Lite (製品コード TP700/TP760 : 終売)

* 9 : 検量線作成用のスタンダードとして使用する。DNA タイプの Control Plasmid であるため逆転写反応は不要。公定法で用いられている G1、G2 コントロールプラスミド DNA と同様の使用法が可能である。凍結融解を繰り返すことにより、定量に影響を及ぼす恐れがあるため、注意すること。

* 10 : Positive Control DNA を段階希釈する際に、希釈溶液として使用する。

II. 保存

− 20℃

Premix Ex Taq (NV) (2 × conc.) は、いったん融解したものは 4℃ 保存し、6 ヶ月を目途にご使用ください。長期保存の場合、− 20℃ で凍結保存することが可能です。

開封後は、Positive Control DNA による他の試薬の汚染を避けるため、コンポーネント 12、13 は、他のコンポーネントと別に保存してください。

III. キット以外に必要な機器、試薬（主なもの）

【試薬】

RNA 抽出試薬

【器具】

- ・ 200 μ l、20 μ l、10 μ l 各マイクロピペット
- ・ マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）

【機器】

リアルタイム PCR 装置

- ・ Thermal Cycler Dice Real Time System III with PC（製品コード TP970）*
- Thermal Cycler Dice Real Time System II（製品コード TP900/TP960：終売）*
- Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760：終売）*
- ＊：チューブ1本ごとにフラットキャップが付いているキャップ付き8連チューブを Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ専用として販売しています。チューブ間のコンタミネーションの危険性が軽減できるので特にお勧めします。
 - 0.1 ml 8-strip tube, individual Flat Caps（製品コード NJ902）
 - 0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps（製品コード NJ600）
- ・ Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System
- Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific 社）など

IV. 使用に際して

本キットを使用する際の注意事項です。**使用前に必ずお読みください。**

1. 使用目的：本キットは環境分析や食品分析に使用する製品です。
2. 測定結果：本キットは遺伝子検出であるため、不活化されたウイルスも検出されます。また、設計した Primer/Probe の配列内に遺伝子の変異や欠損／挿入が生じた際には、検出できない場合があります。（検査結果判定により発生する問題に関して、タカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。）
3. 廃棄：試料は感染性を有するものとして、各施設の安全規定に従って廃棄してください。作業区域は常に清潔に保ち、検体または検査に用いた器具等は高圧蒸気滅菌器を用いて 121℃で 20 分間以上加熱滅菌処理、または次亜塩素酸ナトリウム液で処理を行った上、各施設の感染性廃棄処理マニュアルに従って処理してください。試薬を廃棄する際は多量の水で流してください。プラスチックなどの試薬容器ならびに器具は、廃棄物の処理および清掃に関する法律に従って処理してください。

V. 操作上の注意

1. PrimeScript RT Enzyme Mix (NV) は、使用前に軽く遠心して、試薬をチューブの底に落としてください。酵素は 50%グリセロール溶液で粘度が高いため、注意深くゆっくりとピペティングを行ってください。
2. 試薬の分注を行うときは、必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを防止してください。
3. 万一、サンプルやプローブやプライマーが核酸分解酵素（ヌクレアーゼ）の混入により分解されると、正確な検出ができません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、作業過程ごとにディスポーザブルの手袋着脱およびマスク着用など、操作には細心の注意を払ってください。
4. *Premix Ex Taq* (NV) には、反応のための酵素が含まれています。使用時には、泡立たないように穏やかに転倒混合し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬が完全に混合されていない場合、十分な反応性が得られなくなります。ボルテックスによる混合は行わないでください。
なお、*Premix Ex Taq* (NV) を -20℃で凍結保存した場合、保存中に沈殿を生じることがあります。軽く手で暖めるか室温にしばらく置いた後、転倒混合することで完全に溶解します。必ず均一に混合してからご使用ください。
5. 反応液の調製から検体サンプルの添加まで、次の 3 エリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します (IX. 補足：エリア分けについてを参照)。各エリアにおいては、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。
 - エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
 - エリア 2：検体の調製を行います。
 - エリア 3：反応液へ検体の添加を行います。

本キットでは増幅反応と検出をリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などで解析する必要はありません。実験室内の核酸のコンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。
6. リアルタイム PCR 装置の取扱いは、それぞれの装置の取扱説明書に従ってください。
7. 本キットはリアルタイム PCR 装置での解析によって結果判定を行います。リアルタイム PCR 補正機能などが適正に作動しない場合、誤判定の原因になります。必要に応じてリアルタイム PCR 装置の取扱説明書に従い、Manual 設定を行ってください。

VI. GI Positive Control DNA および GII Positive Control DNA を用いる定量解析について

本製品に含まれる GI Positive Control DNA および GII Positive Control DNA は、タカラバイオで合成した NoV の配列をもったプラスミド DNA です。公定法で用いられている G1、G2 コントロールプラスミド DNA と同じ定量結果が得られるように濃度を調整していますので、公定法と同様の使用法が可能です。EASY Dilution (for Real Time PCR) を用いて、GI Positive Control DNA および GII Positive Control DNA の 10 倍希釈系列を作製し、検量線を作成することで定量解析を行うことができます。定量可能な範囲は、得られたデータに基づいてご判断ください。Positive Control DNA は、凍結融解を繰り返すことで定量性に影響を及ぼす恐れがあります。

VII. 操作

< Positive Control DNA を用いる定量解析 >

操作の概要

1. サンプルの調製
2. 逆転写反応
3. リアルタイム PCR 装置のセッティング
4. 反応液の調製と反応開始
GI Positive Control DNA および GII Positive Control DNA を段階希釈して検量線作成用スタンダードサンプルを調製する。
↓
反応液を調製する。
↓
反応液を反応チューブに分注し、陰性コントロール（滅菌精製水）、または検量線作成用スタンダードサンプル、または検体サンプルを添加する。
↓
反応チューブをリアルタイム PCR 装置にセットし反応を開始する。
↓
5. 結果表示
画面上にリアルタイムで増幅曲線が表示される。
↓
反応終了
↓
検量線から検体サンプルの NoV のコピー数を求める。

VII-1. サンプルの調製（エリア 2 で実施）

感染性を有する試料を取り扱う時には安全キャビネット内で行い、感染防止にご注意ください。

核酸調製にあたっては、実験者の汗や唾液に含まれるヌクレアーゼの混入を防ぐため作業中は可能であればマスクを着用し、清潔なディスポーザブルグローブを着用し RNA 調製専用の実験台を設けるなどの細心の注意を払ってください。

実験器具に関しては、可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用するようにし、実験台、実験器具、チューブなどの RNase 除去には RNase-OFF®（製品コード 9037）の使用をお勧めします。また、RNA 実験に用いる器具（プラスチックおよびガラス）は、他の器具と区別して RNA 専用として使用してください。

公定法に記載された方法に従い、検体からサンプル RNA を調製してください。

VII-2. 逆転写反応

- (1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)
サンプル RNA 以外のコンポーネントを必要本数 + a 分調製し、0.2 ml のマイクロチューブに 10 μ l ずつ分注する。

試薬	液量 (1 反応)
5 × PrimeScript Buffer (NV)	4 μ l
PrimeScript RT Enzyme Mix (NV)	1 μ l
Random 6 mers (100 μ M)	1 μ l
サンプル RNA	10 μ l
RNase Free dH ₂ O	4 μ l
Total	20 μ l

- (2) サンプル RNA 溶液を添加する。(エリア 3 で実施)
- (3) 以下の条件で逆転写反応を行う。Thermal Cycler を使用すると便利である。

37°C 15 min. (逆転写反応)
85°C 5 sec. (逆転写酵素を熱失活させる)
4°C

反応終了後、反応液は -20°C で保存できる。

VII-3. 検量線作成用スタンダードサンプルの調製 (エリア 3 で実施)

GI 反応および GII 反応のそれぞれについて調製してください。

- (1) EASY Dilution を、1.5 ml チューブに 45 μ l ずつそれぞれ 7 本分注する。
- (2) GI および GII Positive Control DNA 20 μ l をそれぞれ 0.2 ml チューブにうつす。
- (3) (2) を 98°C、5 分間熱処理後、氷中にチューブを入れて急冷する。
- (4) 熱処理した Positive Control DNA (4×10^6 copies/ μ l) 5 μ l を、(1) のチューブに添加し 4×10^5 copies/ μ l を調製する。
- (5) 希釈操作を繰り返し、 4×10^{-1} copies/ μ l までの段階希釈液を調製する。
 4×10^{-1} copies/ μ l ~ 4×10^6 copies/ μ l の濃度となる。

1.	4×10^6 copies/ μ l	(GI or GII Positive Control DNA 原液)
2.	4×10^5 copies/ μ l	(GI or GII Positive Control DNA 原液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)
3.	4×10^4 copies/ μ l	(2. の 4×10^5 copies/ μ l 溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)
4.	4×10^3 copies/ μ l	(3. の 4×10^4 copies/ μ l 溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)
5.	4×10^2 copies/ μ l	(4. の 4×10^3 copies/ μ l 溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)
6.	4×10^1 copies/ μ l	(5. の 4×10^2 copies/ μ l 溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)
7.	4×10^0 copies/ μ l	(6. の 4×10^1 copies/ μ l 溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)
8.	4×10^{-1} copies/ μ l	(7. の 4×10^0 copies/ μ l 溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)

- ※ 上記の 8 段階の溶液を用いて検量線を作成する。
(1 反応にはそれぞれ 2.5 μ l を使用。n=3 の反応を推奨)

VII-4. リアルタイム PCR 反応液の調製と反応開始

※ 本キットでは、Positive Control DNA を用いた検量線の作成と、検体サンプルでの反応、滅菌精製水を用いた陰性コントロール反応を同時に行います。

- (1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)
GI 反応および GII 反応について、それぞれ反応液を調製する。

サンプル等の鋳型以外のコンポーネントを必要本数 + α 分調製し、各反応チューブに 22.5 μ l ずつ分注し、軽くふたをする。必要本数は、サンプル数 + 検量線作成用スタンダードサンプル数 + 陰性コントロール反応数と設定する。(検体サンプルおよび陰性コントロールは $n=2$ 以上、検量線作成用スタンダードサンプル [8 段階] は $n=3$ の反応を推奨)

陰性コントロールのチューブには、滅菌精製水 2.5 μ l を加え、反応チューブのふたをしっかりと閉める。

試薬	液量 (1 反応)	最終濃度
<i>Premix Ex Taq</i> (NV) (2 × conc.)	12.5 μ l	1 ×
GI or GII Primer Mix	1 μ l	
GI or GII Probe Mix	1 μ l	
ROX Reference Dye* ¹ or ROX Reference Dye II* ¹ or 滅菌精製水	0.5 μ l	
cDNA サンプル* ² or 検量線作成用スタンダードサンプル* ² or 滅菌精製水 (陰性コントロール)	2.5 μ l	
滅菌精製水	7.5 μ l	
Total	25 μ l	

* 1 : StepOnePlus Real-Time PCR System には ROX Reference Dye を、7500 Fast Real-Time PCR System には ROX Reference Dye II を用いる。

Thermal Cycler Dice Real Time System では滅菌精製水を加える。

* 2 : cDNA サンプル、検量線作成用スタンダードサンプルは、ステップ (2) で加えるためここでは加えない。

【注意】蛍光ノイズの原因になりますので、チューブを扱うときは手袋を着用してください。

- (2) サンプル (鋳型) の添加 (エリア 3 で実施)
陰性コントロール以外の各チューブに、cDNA サンプルまたは検量線作成用スタンダードサンプルを、(1) で分注した調製液に 2.5 μ l 添加し、しっかりとふたをする。0.2 ml チューブ用の卓上遠心機で軽く遠心を行い、リアルタイム PCR 装置にセットする。

【注意】反応液調製後、なるべく 1 時間以内に反応を開始してください。

VII-5. リアルタイム PCR 装置による増幅および検出、定量解析

操作の手順は、それぞれのリアルタイム PCR 装置で異なります。詳しい操作方法は、それぞれの機器に添付されている説明書をご確認ください。

ここでは、Thermal Cycler Dice Real Time System を使用した場合の簡単な操作方法と定量解析について示します。

Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System を使用する場合は、15 ページをご参照ください。

【 Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズを使用する場合 】

(Thermal Cycler Dice Real Time System 食品環境検査用ソフトウェア)

絶対定量 実施例

公定法に従って、それぞれ以下のサンプルで GI 反応、GII 反応を実施する。

検量線作成用スタンダード：1 copy ~ 1×10^7 copies (n=3)

検体サンプルおよび陰性コントロール (n=2)

検量線作成用スタンダードはそれぞれ対応する反応系で、検体サンプルおよび陰性コントロールについては GI、GII 両反応系で検出を行う。

- (1) ランファイルを新規作成し、“新規測定”画面において解析タイプ ≪絶対定量≫を選択し、OK ボタンをクリックする。



※ ≪絶対定量≫は、食品環境検査用ソフトウェアに搭載された機能です。Thermal Cycler Dice Real Time System Software をご使用の場合は、<Absolute Quantification> を使用します。

- (2) “反応条件設定”画面で、PCR 条件を設定する。



初期変性 (Hold)

Cycle : 1

95°C 10 sec.

2 Step PCR

Cycle : 45

95°C 5 sec.

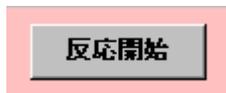
56°C 30 sec. (検出)

検出フィルターの ROX をはずす。

注：Thermal Cycler Dice Real Time System III (製品コード TP970) の場合、Speed は Normal を選択してください (デフォルト設定から変更不要)。

Thermal Cycler Dice Real Time System II (製品コード TP900：終売) や Lite (製品コード TP700：終売) では、Speed は Fast を選択してください (デフォルト設定から変更不要)。

- (3) 画面右下の“反応開始”ボタンをクリックして反応を開始する。



- (4) “サンプル設定”画面で、ウェル情報入力ボタンをクリックし、ウェル設定する。

1) サンプルタイプ設定

設定するウェルを選択し、サンプルタイプをドロップダウンメニューから選択する。

- UNKN [Unknown] : 測定対象である未知サンプル
- STD [Standard] : 検量線作成用の標準サンプル
- NTC [No Template Control] : 鋳型なしのコントロール反応

2) ターゲット設定

1. GI および GII を測定する場合は、複数に☑を入れる。
2. 同一遺伝子を測定するウェルを選択し、“マーク”ドロップダウンメニューから A、B を設定する。
3. 検出に使用する蛍光物質 FAM を “Dye” プルダウンメニューから選択する。

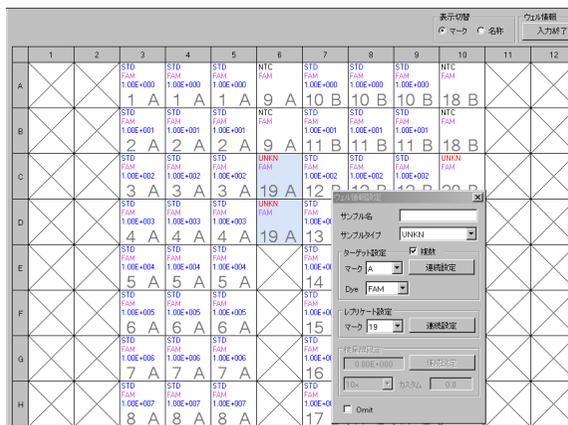
3) レプリケート設定

同一の反応を行うウェルを選択して、レプリケート マーク 1、2、3、4・・・を指定する。連続設定機能により、連続入力が可能です。

1. 最初のレプリケートのウェルを選択し、“マーク”ドロップダウンメニューから番号を選択。
2. “連続設定”ボタンをクリックする。
3. 次のレプリケートのウェルを選択すると、次の数字が繰り上げ入力できる。
4. 設定を解除するには、再度“連続設定”ボタンをクリックする。

4) 検量線設定

1. 最小または最大の初期鋳型量のウェルを選択し、ボックス内に初期鋳型量を入力。
2. “連続設定”ボタンをクリックする。
3. ドロップダウンメニューから、希釈倍率を選択する。
4. 次の濃度のウェルをクリックすると、最初の数値に倍率を掛けた数値が入力される。
5. 設定を解除するには、再度“連続設定”ボタンをクリックする。



反応に使用しないウェルは、Omit 設定する。

- 5) ターゲット名、レプリケート名の入力
 ウェル情報、補助ボタンをクリックし、ターゲット名、サンプル名を入力する。
1. ターゲット タブで該当するマークにターゲット名を入力する。
 2. 色は、ドロップダウンメニューより変更が可能。



3. レプリケート タブで、必要に応じてレプリケート名を入力する。

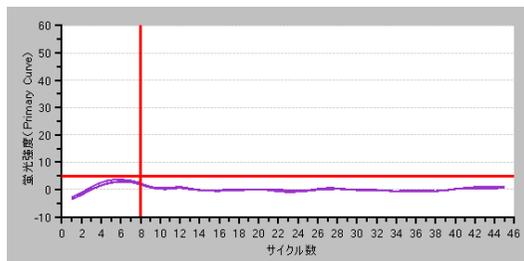
- (5) 結果解析
 反応終了後、“結果／解析” ボタンをクリックする。

1) 増幅曲線の確認

検出フィルター FAM を選択し、NTC (陰性コントロール)、STD (Positive Control DNA を用いた検量線) の増幅曲線を確認する。
 GI または GII それぞれについて確認を行う。
 GI または GII それぞれを表示するには、表示セレクトより直接ウェルを選択、またはターゲット／タイプで表示したいターゲットを選択する。



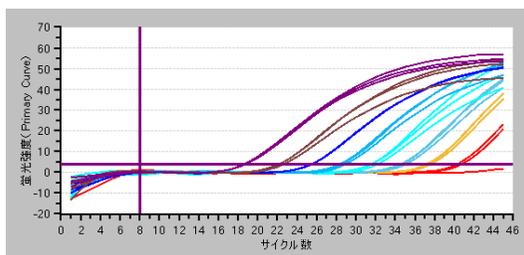
1. NTC の増幅曲線の表示：表示セレクトで < NTC > を選択



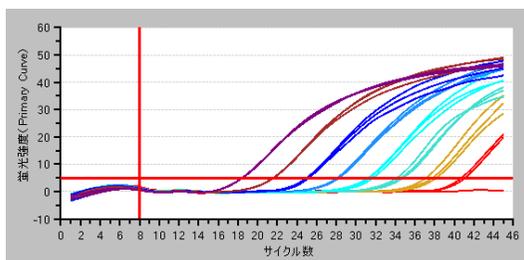
FAM フィルターにおいて、閾値を超えていないことを確認する。

2. 検量線の増幅曲線の表示：表示セレクトで< STD >を選択

GI 反応



GII 反応



それぞれの反応で FAM フィルターにおいて、増幅曲線が描かれ閾値を超えていることを確認する。

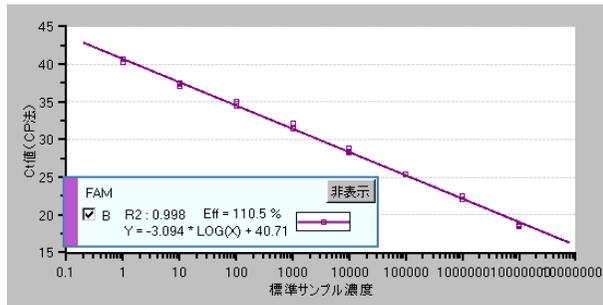
注意：1 copy の増幅曲線は、閾値を超えない場合があります。

3. サンプルの結果を、表示セレクトで< UNKN >を選択し増幅曲線を確認する。

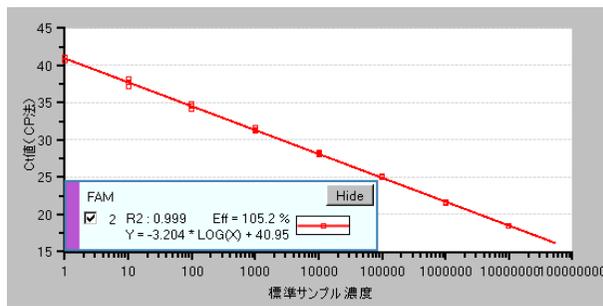
2) 検量線の確認

データ解析のドロップダウンメニューから検量線を選択する。
GI または GII のそれぞれについて確認する。

GI 検量線



GII 検量線



必要に応じて、検量線より外れている測定値は Omit 設定を行う。

1. 表示セレクトで Omit したいウェルを選択する。
2. 右クリックし、Omit、Set を選択すると、選択したウェルが解析より除外される。
Omit、Reset を選択すると、再度解析に用いることが可能である。

(6) 結果の表示

テキストレポート表示

- 1) データ解析からテキストレポートを選択すると、グラフ表示領域にテキストレポートが表示される。
- 2) 表示セレクトで表示させるウェルを選択する。
- 3) 表示形式で、表示させるデータセットを選択する。
ウェル : 個々のウェルに関する解析結果
レプリケート : レプリケート (ターゲットとサンプルの組合せが同一のグループ) ごとの解析結果 (平均値や標準偏差など)
全選択 : すべての解析結果を表示
- 4) 表示項目のチェックボックスでその下の詳細項目リストに表示させる項目を選択する。
解析条件 : 解析パラメータに関する項目
CP 法データ : Crossing Point 法による解析結果の項目
SDM 法データ : 2nd Derivative Maximum 法による解析結果の項目
- 5) 詳細項目リストの各項目のチェックボックスによりテキストレポートへの表示/非表示の変更ができる。
- 6) テキストレポートの項目名をクリックすると、クリックした項目でソートできる。

表示例) GI 反応の検量線用スタンダードとサンプル

サンプル名	サンプルタイプ	ターゲット名	レプリケートマーク ▲	Ct値(CP)	平均Ct値(CP)	標準サンプル濃度	定量値(CP)	定量平均値(CP)
	STD	GI	1	40.21	40.45	1.000E+000	1.451E+000	1.237E+000
	STD	GI	1	—	40.45	1.000E+000	—	1.237E+000
	STD	GI	1	40.68	40.45	1.000E+000	1.023E+000	1.237E+000
	STD	GI	2	37.07	37.30	1.000E+001	1.501E+001	1.275E+001
	STD	GI	2	37.55	37.30	1.000E+001	1.050E+001	1.275E+001
	STD	GI	2	37.29	37.30	1.000E+001	1.275E+001	1.275E+001
	STD	GI	3	34.70	34.71	1.000E+002	8.759E+001	8.817E+001
	STD	GI	3	35.02	34.71	1.000E+002	6.903E+001	8.817E+001
	STD	GI	3	34.42	34.71	1.000E+002	1.079E+002	8.817E+001
	STD	GI	4	31.47	31.68	1.000E+003	9.692E+002	8.492E+002
	STD	GI	4	32.11	31.68	1.000E+003	6.020E+002	8.492E+002
	STD	GI	4	31.46	31.68	1.000E+003	9.765E+002	8.492E+002
	STD	GI	5	28.45	28.53	1.000E+004	9.173E+003	8.765E+003
	STD	GI	5	28.87	28.53	1.000E+004	6.711E+003	8.765E+003
	STD	GI	5	28.28	28.53	1.000E+004	1.041E+004	8.765E+003
	STD	GI	6	25.43	25.41	1.000E+005	8.681E+004	8.792E+004
	STD	GI	6	25.44	25.41	1.000E+005	8.617E+004	8.792E+004
	STD	GI	6	25.37	25.41	1.000E+005	9.078E+004	8.792E+004
	STD	GI	7	22.06	22.25	1.000E+006	1.066E+006	9.409E+005
	STD	GI	7	22.57	22.25	1.000E+006	7.294E+005	9.409E+005
	STD	GI	7	22.11	22.25	1.000E+006	1.027E+006	9.409E+005
	STD	GI	8	18.59	18.60	1.000E+007	1.410E+007	1.398E+007
	STD	GI	8	18.69	18.60	1.000E+007	1.309E+007	1.398E+007
	STD	GI	8	18.53	18.60	1.000E+007	1.475E+007	1.398E+007
	NTC	GI	9	—	—	—	—	—
	NTC	GI	9	—	—	—	—	—
Sample1	UNKN	GI	19	25.04	25.04	—	1.160E+005	1.160E+005
Sample1	UNKN	GI	19	25.04	25.04	—	1.160E+005	1.160E+005

実施例の GI 検出では、1 copy の検量線作成用スタンダードの n=3 の反応で、2 系列で検出できた。

GI 検量線の R2=0.998 と相関が良いことから、すべてのスタンダードサンプルの Ct 値を採用した検量線を用いて、サンプルのコピー数を求めたところ、Sample 1 の平均 Ct 値 (CP) 25.04 (n=2) は、定量平均値 (CP) 1.16×10^5 copies に換算されることが分かった。

【 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System を使用する場合 】

StepOnePlus Real-Time PCR System をご使用の場合は、7500 Fast Real-Time PCR System と同じ設定で反応が可能です。

絶対定量 実施例

GI 反応および GII 反応についてそれぞれ以下のサンプルで行う。

検量線作成用スタンダード： 1 copy ~ 1×10^7 copies (n=3)

検体サンプルおよび陰性コントロール (n=2)

(1) Experiment Properties 設定

Instrument*¹ : 7500 Fast (96 Wells)

Type of Experiment : Quantification-Standard Curve

Reagent : TaqMan Reagents

Ramp Speed*² : Fast (~ 40 minutes to complete a run) を選択する

* 1 : StepOnePlus をご使用の場合は、StepOnePlus Instrument (96 Wells) を選択してください。

* 2 : Ramp Speed は Standard (~ 2 hours to complete a run) での測定も可能です。

Experiment Properties

Enter an experiment name, select the instrument type, select the type of experiment to set up, then select materials and methods for the PCR reactions and instrument run.

How do you want to identify this experiment?

Experiment Name: Untitled

Barcode (Optional):

User Name (Optional):

Comments (Optional):

Which instrument are you using to run the experiment?

7500 (96 Wells) 7500 Fast (96 Wells)

Set up, run, and analyze an experiment using a fast cycling 5-color, 96-well system.

What type of experiment do you want to set up?

Quantification - Standard Curve Quantitation - Relative Standard Curve

Melt Curve Genotyping

Use standards to determine the absolute quantity of target nucleic acid sequence in samples.

Which reagents do you want to use to detect the target sequence?

TaqMan® Reagents SYBR® Green Reagents

The PCR reactions contain primers designed to amplify the target sequence and a TaqMan® probe designed to detect amplification of the target sequence.

Which ramp speed do you want to use in the instrument run?

Standard (~ 2 hours to complete a run) Fast (~ 40 minutes to complete a run)

For optimal results with the Fast ramp speed, Applied Biosystems recommends using Fast reagents for your PCR reactions.

(2) Plate Setup 設定

1) Define Targets and Samples タブを選択し、Target Name、Reporter、Quencher を設定する。

1. Add New Target をクリックし、カラムを追加する。

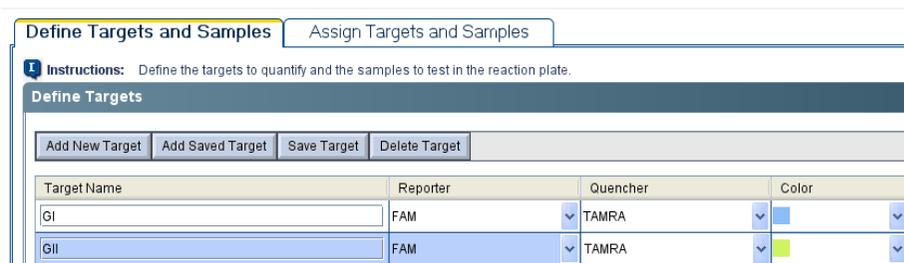
2. 項目の入力

Target Name : GI および GII を入力する。

Reporter : FAM を選択する。(デフォルト設定)

Quencher : TAMRA をドロップダウンメニューから選択する。

Color : ドロップダウンメニューから変更が可能。



3. Define Samples の入力

サンプル数のカラムを、Add New Sample をクリックし追加する。

サンプル名を入力する。

必要に応じて Color を変更することが可能。

2) Assign Targets and Sample タブを選択し、Plate Layout 設定、passive reference 設定をする。

1. View Plate Layout でウェルを選択し、Target の Assign により設定する。

2. Task で、サンプル、Standard、Negative Control を選択する。

U [Unkown] : サンプル

S [Standard] : 検量線

N [Negative Control] : 陰性コントロール

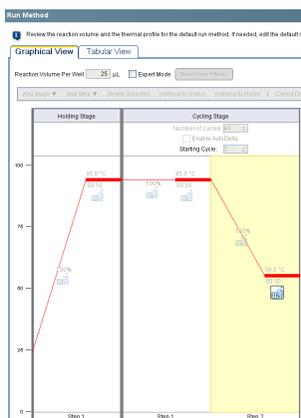
3. サンプルのウェルには、Assign sample (s) よりサンプル名を選択する。

4. 検量線のウェルは、Quantity に濃度を直接入力または Define and Set Up Standards を用いて濃度を入力する。

5. passive reference は、ROX を選択する。(デフォルト設定)



(3) Run Method 設定



初期変性 (Holding Stage)

Cycle : 1

95°C 10 sec.

2 step PCR (Cycling Stage)

Cycle : 45

95°C 5 sec.

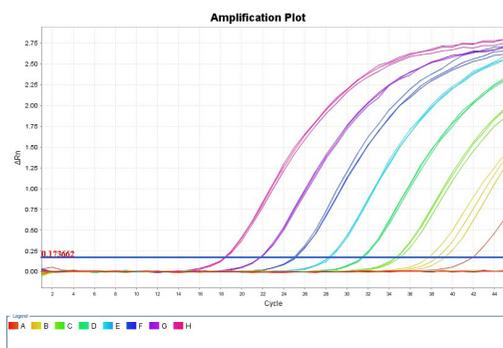
56°C 30 sec. (検出)

Reaction Volume : 25 μ l

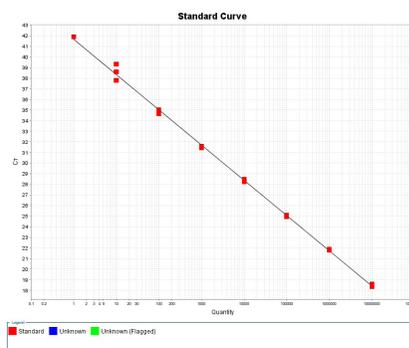
- (4) Start ボタンをクリックして反応を開始する。
- (5) 反応終了後、GI および GII のそれぞれについて増幅曲線を確認し検量線を作成する。
検量線作成用スタンダード：1 copy ~ 1×10^7 copies (n=3)

GI 反応

Amplification Plot

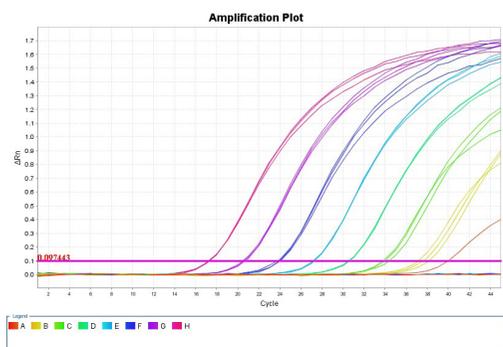


Standard Curve

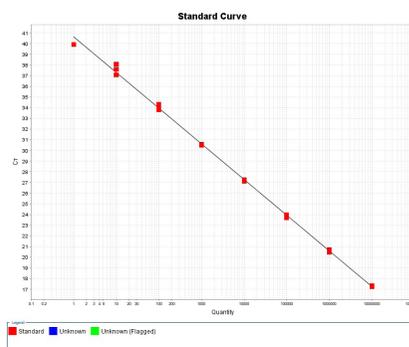


GII 反応

Amplification Plot



Standard Curve



注意：1 copy の増幅曲線は、閾値を超えない場合があります。

View Well Table で Ct 値ならびにサンプルのコピー数を確認できる。
また、エクセルにエクスポートが可能である。

表示例) GI 反応の検量線用スタンダードとサンプル

View Plate Layout View Well Table

Select Wells With: - Select Item - - Select Item -

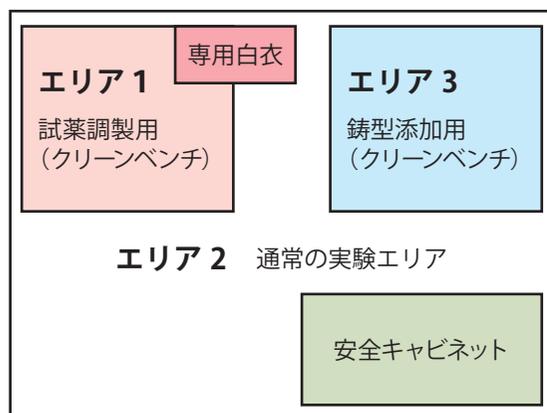
Show in Table Group By

#	Well	Omit	Flag	Sample Na...	Target Name	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity ...	Quantity ...	HL
67	H11	<input type="checkbox"/>												
68	H12	<input type="checkbox"/>												
69	A3	<input type="checkbox"/>			GI	NTC	FAM-TAMRA	Undetermi...						
70	B3	<input type="checkbox"/>			GI	NTC	FAM-TAMRA	Undetermi...						
71	A4	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	41.636	41.221	0.588	1			
72	A5	<input type="checkbox"/>	▲		GI	STANDARD	FAM-TAMRA	Undetermi...	41.221	0.588	1			
73	A6	<input type="checkbox"/>	▲		GI	STANDARD	FAM-TAMRA	40.805	41.221	0.588	1			
74	B4	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	39.205	39.115	0.129	10			
75	B5	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	39.173	39.115	0.129	10			
76	B6	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	38.968	39.115	0.129	10			
77	C4	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	35.615	35.58	0.171	100			
78	C5	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	35.732	35.58	0.171	100			
79	C6	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	35.394	35.58	0.171	100			
80	D4	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	32.078	32.113	0.095	1,000			
81	D5	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	32.041	32.113	0.095	1,000			
82	D6	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	32.220	32.113	0.095	1,000			
83	E4	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	28.629	28.706	0.067	10,000			
84	E5	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	28.739	28.706	0.067	10,000			
85	E6	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	28.750	28.706	0.067	10,000			
86	F4	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	25.446	25.496	0.061	100,000			
87	F5	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	25.563	25.496	0.061	100,000			
88	F6	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	25.478	25.496	0.061	100,000			
89	G4	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	22.173	22.218	0.046	1,000,000			
90	G5	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	22.265	22.218	0.046	1,000,000			
91	G6	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	22.217	22.218	0.046	1,000,000			
92	H4	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	18.838	18.92	0.072	10,000,000			
93	H5	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	18.951	18.92	0.072	10,000,000			
94	H6	<input type="checkbox"/>			GI	STANDARD	FAM-TAMRA	18.971	18.92	0.072	10,000,000			
95	F7	<input type="checkbox"/>		Sample 1	GI	UNKNOWN	FAM-TAMRA	24.932	24.934	0.003	151,414.531	151,211.266	287.461	
96	F8	<input type="checkbox"/>		Sample 1	GI	UNKNOWN	FAM-TAMRA	24.936	24.934	0.003	151,008	151,211.266	287.461	

VIII. 判定結果についての注意事項

- ・ 陰性コントロール反応で、FAM フィルター／増幅曲線 (Primary Curve) の設定で増幅が認められた場合
→ コンタミネーションの疑いがあるため、反応液の調製場所および使用する機器を除染したうえで再反応を行う。
- ・ スタンダードサンプル (1 コピーの反応を除く) の反応で、増幅が認められなかった場合
→ 何らかの原因で PCR 反応、またはプローブ検出が正常に行われていない。再反応を行う。
- ・ 検体サンプルの反応で、増幅が認められなかった場合
→ NoV が検出限界以下である他に、サンプル中に反応阻害物質が含まれている可能性もあるので、サンプルを希釈して再度逆転写反応から反応を行う、または検体サンプルの再調製を行い、再反応を行う。

IX. 補足：エリア分けについて



- エリア 1：反応試薬のみを扱うエリア
リアルタイム PCR 反応液の調製、分注を行う。
(鋳型となる DNA は一切持ち込まない)
- エリア 2：通常の実験エリア
検体の取扱いや DNA 調製を行う。
必要に応じて安全キャビネットを設置する。
- エリア 3：高濃度 DNA を扱うエリア
分注済みの反応液への鋳型 DNA の添加を行う。
標準サンプルの希釈もここで行う。

X. 参考文献

- 1) Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalica, A. R., and Chanock, R. M. *J Virol.* (1972) **10**: 1075-1081.
- 2) Siebenga, J. J., Vennema, H., Duizer, E., and Koopmans, M. P. *Emerg Infect Dis.* (2007) **13**: 144-146.
- 3) Oogane, T., Hirata, A., Funatogawa, K., Kobayashi, K., Sato, T., and Kimura, H. *Jpn J Infect Dis.* (2008) **61**: 423-424.
- 4) Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Shinohara, M., Uchida, K., Natori, K., Takeda, N., and Katayama, K. *J Virol Methods.* (2002) **100**: 107-114.
- 5) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部監視安全課長：ノロウイルス検出法について。平成 15 年 11 月 5 日付け食安監発第 1105001 号別添、平成 25 年 10 月 22 日付け食安監発 1022 第 1 号
- 6) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部長：大量調理施設衛生管理マニュアル。平成 9 年 3 月 24 日衛食第 85 号別添、平成 20 年 6 月 18 日食安発第 0618005 号 (2008)
- 7) アプライドバイオシステムズジャパン株式会社：リアルタイム PCR 法によるノロウイルスの病原診断の有用性と課題ー FAST PCR 及び One-Step RT-PCR への対応ー
- 8) タカラバイオ株式会社：リアルタイム RT-PCR 法によるノロウイルス (NV) 検査の現状について
- 9) リアルタイム RT-PCR 法によるノロウイルスの定量的迅速検出 藤井聖士他 *Jpn J Food Microbiol.* (2011) **28**(2): 139-142.

XI. 関連製品

Thermal Cycler Dice® Real Time System III with PC (製品コード TP970)
0.1 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ902)
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ600)
EASY Dilution (for Real Time PCR) (製品コード 9160)
RNase-OFF® (RNase コンタミネーション除去溶液) (製品コード 9037)

XII. 注意

- ・本製品は食品分析および環境分析用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。検査結果判定により発生する問題に関してタカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・*TaKaRa Ex Taq*、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の、RNase-OFF は PureBiotech, LLC 社の登録商標です。PrimeScript、*Premix Ex Taq* はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社