

検便検査用

TaKaRa

TaKaRa ノロウイルス GI/GII 検出キット Ver.3

説明書

反応液調製の一層の簡便化のため、Lot. AJ70824A から以下の仕様を変更しました。

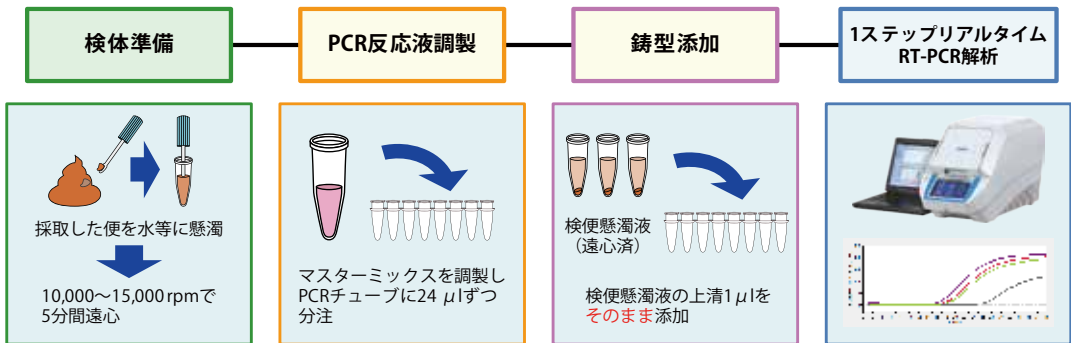
- RT-PCR Reaction Mix と NV Primer/Probe Mix 7 の容量
- RT-PCR Reaction Mix のチューブ形状

ノロウイルス (NoV) は急性胃腸炎の主要な原因ウイルスであり、組織培養法などを用いた分離・検出が困難なため、RT-PCR法やリアルタイム RT-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。本製品は、リアルタイム RT-PCR法により検便検体からノロウイルス (GI および GII) 遺伝子を検出するためのキットであり、大量調理施設衛生管理マニュアル*に則った検査が可能です。

*：「大量調理施設衛生管理マニュアル」(平成9年3月24日付け衛食第85号別添 最終改正：平成29年6月16日付け生食発0616第1号)に記載された「概ね便1g当たり 10^5 オーダーのノロウイルスを検出できる検査法」に対応しています。

【特長】

- 反応液に検便上清を直接添加するだけで、ノロウイルスの溶解から RT-PCR までをワンステップで行うことができます。検体の前処理は必要ありません。



- プローブによるマルチプレックス検出を行います。1反応でGI遺伝子、GII遺伝子、インターナルコントロールを同時に検出し、GIとGIIを明確に区別できます。

検出対象遺伝子	プローブ標識
GI 遺伝子	Cy5 (レポーター) / ダーククエンチャー
GII 遺伝子	ROX (レポーター) / ダーククエンチャー
インターナルコントロール	FAM (レポーター) / ダーククエンチャー

- ウラシル-N-グリコシラーゼ (UNG) を反応系に添加しており、PCR増幅産物のキャリーオーバーによる偽陽性を防止できます。
- リアルタイム RT-PCRの所要時間は約50分で迅速に結果が得られます。

【プライマー・プローブ配列について】



GI および GII 遺伝子の検出には、厚生労働省通知法*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 検出系に関しては、一部のプライマーを増幅領域の内側にずらしたもの (GII 改良プライマー) を採用しています。本製品では、この変更により GII 低コピー検体の検出感度が向上します。

*：「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 最終改正：平成25年10月22日付け食安監発1022第1号)

また、GII 検出系のプライマー改良による検出性能への効果については、各種検証試験および配列情報網羅的解析により確認し、群馬パース大学大学院 木村博一教授に監修して頂きました。

「リアルタイム RT-PCR法によるノロウイルス検査には、高感度・特異的ならびに高い再現性が要求されるのは言うまでもありません。これらの点において、今回開発された本キットは、既報と同等あるいはそれ以上の感度で NoV GI および GII 遺伝子を極めて効率的かつ迅速に検出することが、種々の試験により明らかになったと思われます。」(群馬パース大学大学院 保健科学研究科 木村博一教授)

I. 内容 (100 回分)

- | | |
|--|------------------------|
| 1. RT-PCR Reaction Mix* ¹ | 900 μ l \times 2 |
|  2. NV Primer/Probe Mix 7* ² | 1 ml |
|  3. NV Positive Control DNA 4 | 75 μ l |

* 1 : 酵素、基質等を含みます。

* 2 : 蛍光標識プローブを含んでいるため、遮光に留意してください。

II. 保存

− 20℃

III. キット以外に必要な器具、機器 (主なもの)

【器具】

- ・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】

- ・微量高速遠心機
 - ・リアルタイム PCR 装置 (FAM、ROX、Cy5 を検出可能なもの)
 - Thermal Cycler Dice® Real Time System III (Cy5) with PC (製品コード TP990)
 - Thermal Cycler Dice Real Time System II (製品コード TP900/TP960)
 - Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (製品コード TP700/TP760)
- ※ TP900/TP960/TP700/TP760 は、Cy5 オプションフィルターの追加が必要です。
Filter Unit (Cy5) for Thermal Cycler Dice Real Time System (製品コード TP803)
Filter Unit (Cy5) for LED (製品コード TP703)
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
LightCycler 96 System (Roche Diagnostics 社)
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

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：本キットは検便検査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. RT-PCR Reaction Mix を使用する際には、泡立てないよう穏やかに転倒混和し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬が完全に混和されていない場合、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、保存中に沈殿を生じた場合には、軽く手で温めるか室温にしばらく置いた後、転倒混和することで完全に溶解します。必ず均一に混合し、軽くスピンドウンしてからご使用ください。
2. RT-PCR Reaction Mix 以外の各試薬は、溶解後よく混合し、軽くスピンドウンしてからご使用ください。
3. NV Primer/Probe Mix 7 は、遮光に留意してください。
4. 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。
5. 万一、サンプルやプローブ、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。
6. 反応液の調製から検体サンプルの添加まで、次の3つのエリアを設定し、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)。どのエリアにおいても、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。

7. 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。
8. 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 装置の各種 Auto 機能が適正に働かなかつた場合、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. 操作

1. 便検体懸濁液の調製 (エリア 2 で実施)

- 1) 便検体を生理食塩水や PBS、蒸留水等に 5 ~ 10% 濃度となるように懸濁する。
- 2) 10,000 ~ 15,000 rpm で 5 分間遠心する。上清をサンプル(便検体懸濁液)として用いる。

2. リアルタイム RT-PCR 反応

【コントロール反応について】

結果の判定を正しく行うため、以下のコントロール反応を行ってください。

陰性コントロール

便検体の懸濁液に使用する溶液 (生理食塩水や PBS、蒸留水等) を「陰性コントロール」として使用します。

陽性コントロール

本製品の ● NV Positive Control DNA 4 を「陽性コントロール」として使用します。

- 1) リアルタイム RT-PCR 反応液のマスターミックスの調製 (エリア 1 で実施)
マスターミックスの調製には、必要分だけを用時調製する方法と、約 50 反応分をまとめて調製する方法があります。

【必要分のマスターミックスを用時調製する場合】

必要数 + α のマスターミックスを調製し、リアルタイム PCR 用チューブに 24 μ l ずつ分注する。

[1 反応分のマスターミックス]

試薬	使用量
RT-PCR Reaction Mix	16 μ l
● NV Primer/Probe Mix 7	8 μ l
Total	24 μ l

【約 50 反応分のマスターミックスをまとめて調製する場合】

NV Primer/Probe Mix 7 を 450 μ l 分取し、RT-PCR Reaction Mix のチューブに添加し、混合する。すぐに使用する分はリアルタイム PCR 用チューブに 24 μ l ずつ分注し、残りは短期間 (数日以内) なら 4°C で、長期間なら - 20°C で保存する。

[約 50 反応分のマスターミックス]

試薬	使用量
RT-PCR Reaction Mix	900 μ l
● NV Primer/Probe Mix 7	450 μ l
Total	1350 μ l

- 2) 鑄型の添加 (エリア 3 で実施)

便検体懸濁液 (または陰性コントロールか ● NV Positive Control DNA 4) を 1 μ l 添加する。鑄型添加後、チューブの蓋をし、軽くスピンドアウンする。

※ マスターミックスの調製および鑄型の添加は、室温で実施可能ですが、反応液調製後は速やかに反応を開始してください。

3) リアルタイム RT-PCR 反応の実施

以下の条件で反応を実施する。

※ PCR 産物によるコンタミネーションが疑われる場合には、(25°C 10 分) のステップを実施してください。UNG の作用により PCR 産物が分解されます。

【Thermal Cycler Dice Real Time System III/II/Lite、LightCycler 96 System の場合】

(1) 熱処理、逆転写反応	(2) PCR : 5 サイクル	(3) PCR : 40 サイクル
(25°C 10 分)	94°C 5 秒	<u>90°C</u> 5 秒
90°C 3 分	56°C 30 秒	56°C <u>21 秒</u>
58°C 5 分		(蛍光検出 : Cy5, ROX (Red610), FAM)
94°C 30 秒		

※ Thermal Cycler Dice Real Time System III/II/Lite では、Speed は Fast を選択し、解析する際に正規化補正を OFF にしてください。

【CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System の場合】

(1) 熱処理、逆転写反応	(2) PCR : 5 サイクル	(3) PCR : 40 サイクル
(25°C 10 分)	94°C 5 秒	<u>92°C</u> 5 秒
90°C 3 分	56°C 30 秒	56°C <u>10 秒</u>
58°C 5 分		(蛍光検出 : Cy5, ROX, FAM)
94°C 30 秒		

【Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System の場合】

(1) 熱処理、逆転写反応	(2) PCR : 5 サイクル	(3) PCR : 40 サイクル
(25°C 10 分)	94°C 5 秒	<u>92°C</u> 5 秒
90°C 3 分	56°C 30 秒	56°C <u>21 秒</u>
58°C 5 分		(蛍光検出 : Cy5, ROX, FAM)
94°C 30 秒		

※ Expert Mode で Filter-1, 4, 5 を選択してください。

VII. 判定

陽性コントロールおよび陰性コントロールが正しく反応していることを確認したうえで、測定対象サンプルの判定を行ってください。

【検出対象遺伝子と確認するデータ】

検出対象遺伝子	確認する蛍光検出フィルター
GI 遺伝子	Cy5
GII 遺伝子	ROX (Red610)
インターナルコントロール (IC)	FAM

【コントロール反応の正しい結果】

	GI(Cy5)	GII(ROX)	IC(FAM)
陽性コントロール	+	+	+/-
陰性コントロール	-	-	+

- ・ 陽性コントロールで GI または GII が検出されない場合は、何らかの原因で PCR 反応や検出が正常に行われていない。再反応を行う。
- ・ 陰性コントロールで GI または GII が検出された場合は、コンタミネーションの疑いがある。反応液の調製場所や器具類を除染したうえで再反応を行う。

【測定対象サンプルの判定】

<陽性判定の例>

GI(Cy5)	GII(ROX)	IC(FAM)	判定
+	-	+/-	GI 陽性
-	+	+/-	GII 陽性
+	+	+/-	GI/GII 陽性

- ・ GI または GII が検出された場合は、IC の検出の有無に関わらず、陽性判定となる。

<陰性判定および判定不能の例>

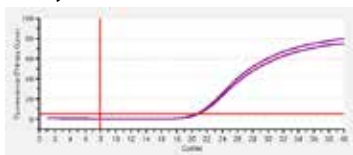
GI(Cy5)	GII(ROX)	IC(FAM)	判定
-	-	+	検出限界以下
-	-	-	判定不能

- ・ GI、GII 共に検出されなかった場合には、IC の結果を確認する。
- ・ IC が検出されていれば、検出限界以下となる。
- ・ IC が不検出の場合は、PCR 阻害の疑いがある。サンプルを希釈するか、RNA 精製を行って再測定する。

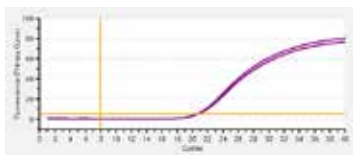
VIII. 反応例

陽性コントロールの反応例

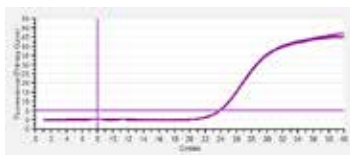
G1 (Cy5)



GII (ROX)

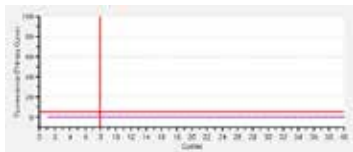


IC (FAM)

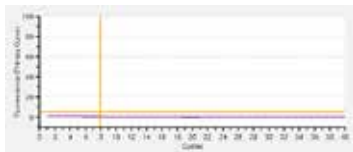


陰性コントロールの反応例

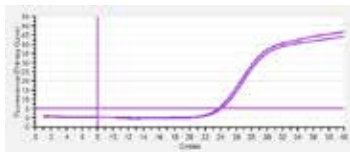
G1 (Cy5)



GII (ROX)

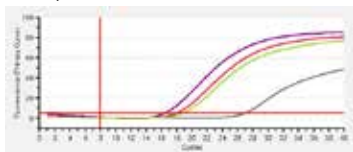


IC (FAM)

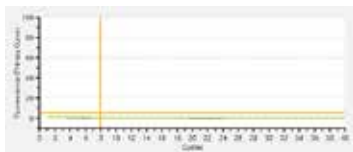


G1 陽性検体の反応例

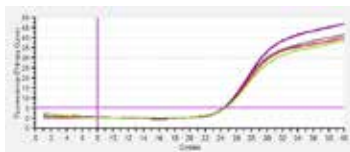
G1 (Cy5)



GII (ROX)

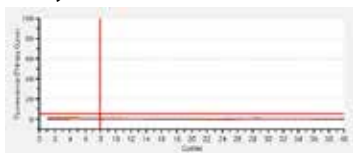


IC (FAM)

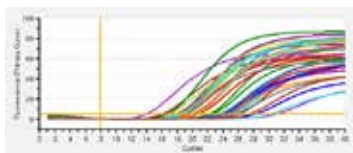


GII 陽性検体の反応例

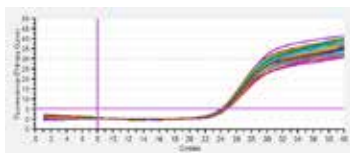
G1 (Cy5)



GII (ROX)

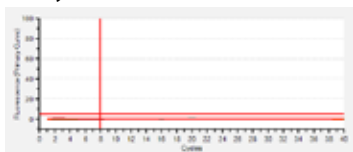


IC (FAM)

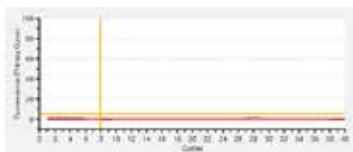


陰性検体の反応例

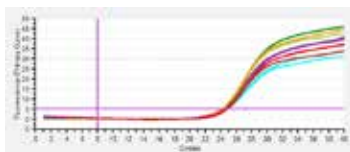
G1 (Cy5)



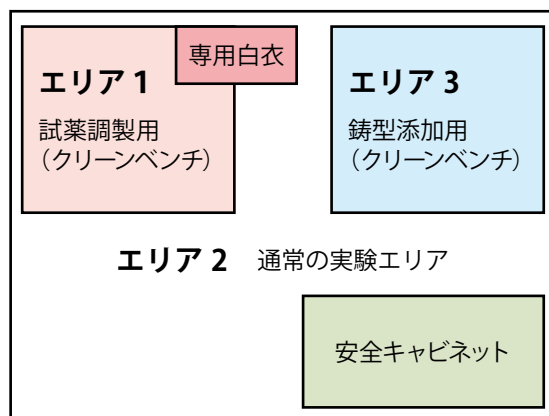
GII (ROX)



IC (FAM)



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. 関連製品

Thermal Cycler Dice® Real Time System III (Cy5) with PC (製品コード TP990)
0.1 ml 8-strip -neo- tube & cap Set (製品コード NJ907)
Thermal Cycler Dice® Real Time System II (製品コード TP900/TP960)
Filter Unit(Cy5) for Thermal Cycler Dice® Real Time System (製品コード TP803)
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite* (製品コード TP700/TP760)
Filter Unit(Cy5) for LED (製品コード TP703)
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ600)
TaKaRa qPCR *Norovirus* (GI/GII) Typing Kit (製品コード RR250A/B)
TaKaRa qPCR *Norovirus* (GI/GII) Typing Kit (1 Step) (製品コード RR262A)
TaKaRa ノロウイルス拭き取り検査用キット (製品コード RR242A)

XI. 注意

- ・本製品は検便検査用試薬です。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。
- ・Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。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 <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社