

製品コード RC121A

研究用

Takara

***Norovirus*(GII) RT-PCR Kit
for genotyping**

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あり、Genogroup I～X の 10 の遺伝子群に分類され、ヒトは Genogroup I (GI)、II (GII)、IV (GIV)、VIII (GVIII)、IX (GIX) に感染することが示唆されています。また、近年、RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) 領域の一部と Capsid 領域の一部 (VP1) の 2 つの領域間でゲノムの組換えが頻発し、さらにその組換えがウイルスの流行に影響することが示唆されました。これにより、従来の VP1 領域の判別だけでなく、キメラウイルスも確認できる RdRp 領域を含めた判別手法 (dual typing 法) が必要とされています。

本製品は、RT-PCR により NoV (GII) RdRp 領域の一部と VP1 領域の一部を含む遺伝子領域 (570 bp) を増幅するための試薬、および PCR により得られた増幅産物のシーケンスのためのプライマーから成るキットです。本キットを使用して得られた増幅産物に対して、キット添付のシーケンスプライマーを用いた塩基配列解析を行い、得られた塩基配列とデータベース上の配列との相同性検索により、NoV (GII) の遺伝子型判別を行います。

※ 本キットのプライマーを用いることで、「病原体検出マニュアル ノロウイルス (第 1 版)」(国立感染症研究所 (令和元年 6 月)) と同様の領域を解析できます。

【特長】

- ・ワンステップ RT-PCR 法で cDNA 合成と PCR 増幅が同一チューブ内で完了するため、簡便で同時に多検体を処理するのが容易です。
- ・PCR 増幅に必要な試薬とシーケンスプライマーをセットにしており、すぐにご利用いただけます。

<注意>

本キットは NoV (GII) 遺伝子を判別するためのキットです。NoV (GI) の遺伝子型判別には *Norovirus*(GI) RT-PCR Kit for genotyping (製品コード RC120A) をご利用ください。

I. 内容 (50 回分)

○ 1. RT-PCR Mix (NV)*1		800 μ l \times 2
● 2. Enzyme Mix (NV)*2		200 μ l
● 3. GII Primer Mix (NV)*3		100 μ l
⊕ _{H₂O} 4. H ₂ O		1 ml
● 5. GII Positive Control DNA (NV)		20 μ l
⑥ 6. Sequencing Primer F2 (NV)	7.5 pmol/ μ l	50 μ l
⑦ 7. Sequencing Primer R2 (NV)	7.5 pmol/ μ l	50 μ l

* 1：基質等を含みます。

* 2：酵素等を含みます。

* 3：GII Primer Mix (NV) に含まれるプライマーは、Sequencing Primer F2 (NV) および Sequencing Primer R2 (NV) と同じ配列です。

II. 保存

− 20°C

III. キット以外に必要な試薬、器具、機器（主なもの）

【試薬】

- RNA 抽出キット*1
- アガロースゲル
Agarose L03「TAKARA」（製品コード 5003/B）
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve（製品コード 5810A）など
- DNA 染色剤
SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain（製品コード 5760A/5761A）*2
エチジウムブロマイド
- 100 bp DNA Ladder (Dye Plus)（製品コード 3422A）
- PCR 産物精製キット
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up（製品コード 740609.10/.50/.250）など

* 1：詳細は前頁「病原体検出マニュアル」をご参照ください。

* 2：SYBR Green I を使用する場合は専用のフィルターが必要です。

【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）
- アガロースゲル電気泳動装置
Mupid-2plus（製品コード M-2P）など
- 0.2 ml Hi-Tube Dome Cap（製品コード NJ200）
- 0.2 ml Hi-8-Tube（製品コード NJ300）
- 0.2 ml Hi-8-Dome Cap（製品コード NJ301）
- 0.2 ml Hi-8-Flat Cap（製品コード NJ302）
- T-100 用純正 8 連チューブ（Bio-Rad 社）など

【機器】

- 微量高速遠心機
- サーマルサイクラー
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient（製品コード TP600）
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice *Touch*（製品コード TP350）
T-100 Thermal Cycler（Bio-Rad 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 NoV の遺伝子型判別のための PCR 増幅に使用する製品です。Primer の配列内に遺伝子の変異や欠損／挿入が生じた際には、増幅できない場合があります。
2. 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. 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。
2. 万一、サンプル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。
3. 反応液の調製から PCR 増幅産物の解析まで、次の 4 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 (VIII. 補足：エリア分けについてを参照)。コンタミネーション発生の原因となりますので、エリア 4 以外で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：PCR 反応液の調製、分注を行います。
 - エリア 2：検体の調製 (RNA 抽出等) を行います。
 - エリア 3：PCR 反応液へ鋳型 RNA の添加を行います。
 - エリア 4：電気泳動で PCR 増幅産物の解析を行います。
4. サーマルサイクラーの取扱いは、それぞれの装置の取扱説明書に従ってください。

VI. 操作

1. 検体からの RNA 抽出 (エリア 2 で実施)

RNA 抽出キットにより検体から RNA を抽出する。
(「病原体検出マニュアルノロウイルス (第 1 版)」5. RNA 抽出 参照)

2. RT-PCR 反応

- (1) RT-PCR 反応液のマスターミックスの調製 (エリア 1 で実施)
必要数 (検体数 + Negative Control, Positive Control) + α 分の反応液を氷上で調製し、PCR 用チューブに 48 μ l ずつ分注する。

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
④ H ₂ O	10 μ l
○ RT-PCR Mix (NV)	32 μ l
● Enzyme Mix (NV)	4 μ l
● GII Primer Mix (NV)	2 μ l
Total	48 μ l

- (2) 鋳型の添加 (エリア 3 で実施)
RNA 抽出液を 2 μ l 添加する。また、Negative Control として RNA 抽出液の代わりに H₂O を 2 μ l 加えたもの、Positive Control として GII Positive Control DNA (NV) を 2 μ l 加えたものを用意する。

鋳型添加後、チューブの蓋をし、軽くスピンドウンしてサーマルサイクラーにセットする。

- (3) RT-PCR 反応の実施
以下の条件で反応を実施する。反応終了後、増幅産物は - 20°C で保存する。

[PCR 条件]

42°C 20 分

94°C 1 分

↓

98°C 10 秒

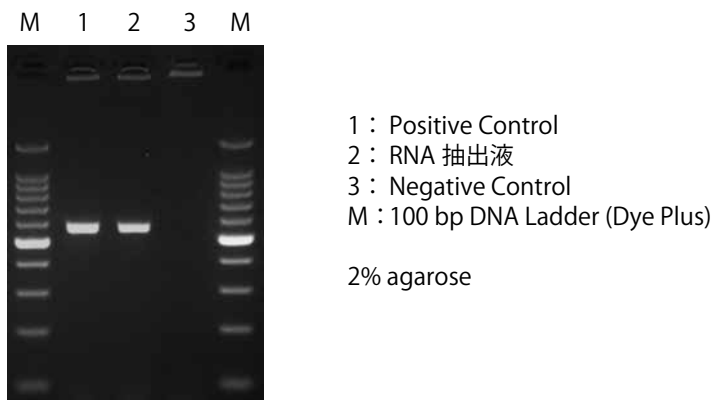
48°C 15 秒

68°C 30 秒

} 45 サイクル

3. PCR 増幅産物の確認 (エリア 4 で実施)

反応終了後、反応液の一部をアガロースゲル電気泳動に供する (2% agarose gel など)。Positive Control および RNA 抽出液を用いた場合に、570 bp の増幅産物が得られていることを確認する。



※ 増幅不良の場合は、RNA 抽出液を適宜希釈して、再度 PCR 増幅をお試しください。事前にリアルタイム RT-PCR 法で検体中のノロウイルスの有無を確認した場合には、目安として、その際の Ct 値が 20.0 未満であれば 4 倍希釈、Ct 値が 20.0 ~ 26.0 であれば 2 倍希釈した RNA 抽出液を本キットに供試すると増幅される可能性があります。

4. PCR 増幅産物の精製 (エリア 4 で実施)

電気泳動で確認した後、シーケンス解析を行うために増幅産物を精製する。

【目的サイズの単一バンドが得られた場合】

PCR 反応液の一部を用いて、アルカリホスファターゼ (SAP) とエキソヌクレアーゼ I (Exo I) 処理等の方法で簡易精製を行う。電気泳動での確認時に、おおよその増幅産物の濃度を見積もっておく。

【非特異的な増幅産物が認められた場合】

電気泳動後、アガロースゲルから目的バンドを回収し、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up などを使用して精製を行う。精製後、A₂₆₀ の吸光度を測定し、得られた精製増幅産物の濃度を算出する。

5. PCR 増幅産物のシーケンス解析

キットに含まれる Sequencing Primer F2 (NV) を使用して、得られた精製増幅産物のシーケンス解析 (片鎖解析) を行う。必要に応じて、Sequencing Primer R2 (NV) も使用し両鎖解析を行うと、精度の高いシーケンスデータが得られる。

※ シーケンス解析には、タカラバイオ受託サービス「プレミックスシーケンス解析」のご利用をお勧めします。

【プレミックスシーケンス解析を利用する場合】

以下の混合物を準備後、1つのウェルに分注する。

試薬	使用量
精製増幅産物	10 ~ 120 ng
Sequencing Primer F2 or R2 (NV) (7.5 pmol/ μ l)	1 μ l
H ₂ O	x μ l
Total	15 μ l

- ・ 精製増幅産物を 1 反応につき 10 ~ 120 ng ご用意ください。
(1 サンプルについて最大 2 反応となりますので、最大 20 ~ 240 ng の精製増幅産物が必要となります。)
- ・ 1 つの反応ウェルについて 1 つの Sequencing Primer (7.5 pmol/ μ l) を 1 μ l 加え、全量を 15 μ l/ウェルとなるように調製いただき、ご送付ください。

※ 詳細は弊社ウェブサイト「プレミックスシーケンス解析 (8 連チューブ / 96 ウェルプレート)」をご参照ください。

<注意> シーケンス解析をご自身で実施することも可能です。
その場合、キットのシーケンス用プライマーは 7.5 pmol/ μ l となっていますので、適宜使用量を調整してご使用ください。

6. 塩基配列情報の解析

得られた塩基配列情報とデータベース上の配列との相同性検索*を行い、NoV (GII) の遺伝子型を判別する。

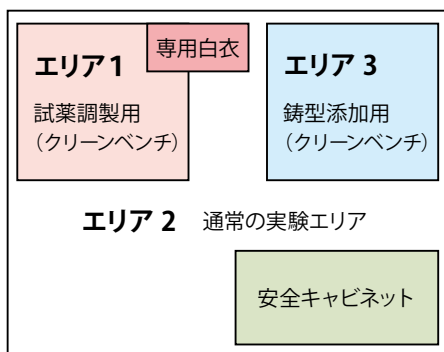
* : 下記のデータベースでは、最新の NoV 分類に基づいた遺伝子型判別が可能です。
Norovirus Typing Tool : <https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>

VII. トラブルシューティング

PCR 増幅産物が得られない。

- ・添加した RNA 抽出液中に反応阻害物質が含まれる。
 - RNA 抽出液を適宜希釈して、再度 PCR 増幅をお試しください。事前にリアルタイム RT-PCR 法で検体中のノロウイルスの有無を確認した場合には、目安として、その際の Ct 値が 20.0 未満であれば 4 倍希釈、Ct 値が 20.0 ~ 26.0 であれば 2 倍希釈した RNA 抽出液を本キットに供試すると増幅される可能性があります。
- ・検体中の NoV が GI である。
 - NoV (GI) の遺伝子型判別には *Norovirus*(GI) RT-PCR Kit for genotyping (製品コード RC120A) をご利用ください。

VIII. 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
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。
- エリア 4：PCR 増幅産物を取扱うエリア
PCR 後の増幅産物を電気泳動する場合は、エ
リア 1、2、3 とは異なる別室で行う。

IX. 関連製品

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (製品コード TP600)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Touch (製品コード TP350)
TaKaRa *Norovirus*(GI) RT-PCR Kit for genotyping (製品コード RC120A)
TaKaRa ノロウイルス GI/GII 検出キット Ver.3 (製品コード RR298A)
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)
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap (製品コード NJ200)
0.2 ml Hi-8-Tube (製品コード NJ300)
0.2 ml Hi-8-Dome Cap (製品コード NJ301)
0.2 ml Hi-8-Flat Cap (製品コード NJ302)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250)

X. 注意

- 本製品は研究用試薬です。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、SYBR は Life Technologies Corporation. の登録商標です。PrimeGel 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