

製品コード RC160A

研究用

Takara

***Norovirus* (GI/GII) Typing Kit
(Endogenous Control)**

説明書

v202311Da

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、内部にプラス一本鎖 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た NoV の分離・検出は困難なため、RT-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。また、NoV は Genogroup I～X の 10 の遺伝子群に分類され、ヒトの疾患には主に Genogroup I (GI) と II (GII) が関与することが示唆されています。

本製品では、NoV の GI と GII を検出対象とし、それに加えてヒト腸内で優勢な菌種である *Bacteroides* 属の 16S rRNA を内在性コントロール (Endogenous Control: EC) として検出します。これにより、ヒト糞便検体の添加有無を客観的に判別することが可能です。なお、NoV の GI と GII の検出には、国立感染症研究所より発行された「病原体検出マニュアルノロウイルス (第 1 版)」(令和元年 6 月、以下、病原体検出マニュアル) に記載された配列のプライマーならびにプローブを使用しています。

【特長】

- ・ 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 遺伝子または GII 遺伝子と内在性コントロールを同時に検出し、内在性コントロールにより検体サンプルの添加有無を客観的に判別可能です。
- ・ 内在性コントロールの検出対象には、ヒト腸管内で優勢な *Bacteroides* 属の 16S rRNA 領域を採用しています。
- ・ リアルタイム PCR の所要時間は約 50 分で、迅速に結果が得られます。
- ・ Uracil-N-glycosylase (UNG) を採用しており、PCR 産物のキャリーオーバーによる偽陽性を防止できます。

【検出対象とプローブ標識】

GI 検出系

検出対象	プローブ標識
GI 遺伝子	FAM (レポーター) / ダーククエンチャー
内在性コントロール (EC)	Cyanine5 (レポーター) / ダーククエンチャー

GII 検出系

検出対象	プローブ標識
GII 遺伝子	FAM (レポーター) / ダーククエンチャー
内在性コントロール (EC)	Cyanine5 (レポーター) / ダーククエンチャー

※ GI 遺伝子と GII 遺伝子は異なる反応で検出します。

I. 内容 (RT 100 回分、GI 反応 100 回分、GII 反応 100 回分)

● RT Enzyme Mix NV-EC*1,2	5 ×	400 μl
● Probe qPCR Mix NV-EC*2	2 ×	835 μl × 3
● Primer/Probe Mix GI-EC*3,4	10 ×	250 μl
● Primer/Probe Mix GII-EC*3,4	10 ×	250 μl
● ROX Reference Dye II*4	50 ×	100 μl
○ H ₂ O		1 ml × 3

* 1 : 逆転写反応用試薬です。

* 2 : 反応に必要な酵素、基質等を含みます。

* 3 : 病原体検出マニュアルと同じ NoV 検出用プライマー・プローブ配列を採用しています。

* 4 : 遮光に留意してください。

II. 保存

− 20℃

III. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器 (主なもの)

【試薬】

- ・ RNA 抽出試薬
- ・ *Norovirus* (GI/GII) Positive Control DNA (製品コード RR251A)
- ・ Endogenous Control DNA for stool (製品コード RC166A)

【器具】

- ・ 200 μl、20 μl、10 μl 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 IV with PC (製品コード TP1010)
 - 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 : 終売)
 - Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (製品コード TP700/TP760 : 終売)
- ※ 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 : お問合せください)
- 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)
- QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

IV. 使用に際して

本製品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： 本製品は研究用試薬です。
2. 測定結果： 本製品はウイルス遺伝子を検出する試薬であるため、感染性のない不活化されたウイルスを検出する可能性があります。また、*Bacteroides* 属菌が腸内で優勢になる以前の乳児由来の試料では、内在性コントロールの検出が不安定になる場合があります。さらに、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、検出できない可能性があります。
(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、試料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 Enzyme Mix NV-EC 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. Probe qPCR Mix NV-EC は、使用前に泡立てないよう穏やかに転倒混合して均一に混合した後、軽くスピンドウンしてからご使用ください。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、保存中に沈殿が生じた場合には、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。
3. 上記以外の各試薬は、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。
4. Primer/Probe Mix GI-EC、Primer/Probe Mix GII-EC および ROX Reference Dye II は、遮光に留意してください。
5. 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。
6. 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。
7. 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：検体サンプルの調製を行います。
 - エリア 3：反応液へ検体サンプルの添加を行います。

本製品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。
8. 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。解析ソフトウェアの補正機能などが適切に設定されていない場合、誤判定の原因になります。装置の取扱説明書に従い、必要に応じて解析パラメーターの設定を確認してください。

VI. 操作

<GI/GII 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 反応

GI Positive Control DNA および GII Positive Control DNA を段階希釈して、NoV 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）、NoV 検量線作成用スタンダードサンプル、EC 陽性コントロール、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。



4. 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



EC 測定結果により検体サンプルの調製可否と反応ウェルへの添加有無を確認するとともに、NoV 検量線から検体サンプル中の NoV のコピー数を求める。

1. サンプルの調製（エリア 2 で実施）

病原体検出マニュアルに記載された方法に従い、試料からサンプル RNA を調製してください。

【注意】

- ・ 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。

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 + α 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。

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
● RT Enzyme Mix NV-EC	4.0 μ l
○ H ₂ O	6.0 μ l
サンプル RNA	10.0 μ l
Total	20.0 μ l

- 2) サンプル RNA 溶液を添加する。(エリア 3 で実施)
- 3) 反応液を軽く攪拌して均一にした後、以下の条件で逆転写反応を行う。

37°C 15 分 (逆転写反応)
85°C 5 秒 (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。

3. NoV 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)

Norovirus (GI/GII) Positive Control DNA (製品コード RR251A) を使用して、GI 用と GII 用の検量線作成用スタンダードサンプルをそれぞれ調製します。

[RR251A のコンポーネント]

● GI Positive Control DNA、● GII Positive Control DNA、○ PC Dilution Buffer

- 1) 以下の通り、○ PC Dilution Buffer を 1.5 ml チューブに分注する。
[1] 10 μ l 分注 : 2 本 (GI 用 1 本 + GII 用 1 本)
[2] 45 μ l 分注 : 14 本 (GI 用 7 本 + GII 用 7 本)
- 2) ● GI Positive Control DNA 原液 10 μ l を [1] のチューブに添加し、 5×10^6 copies/ μ l を調製する。同様に、● GII Positive Control DNA 原液 10 μ l をもう 1 本の [1] のチューブに添加し、 5×10^6 copies/ μ l を調製する。
- 3) 2) で調製した 5×10^6 copies/ μ l の溶液 5 μ l を [2] のチューブに添加し、 5×10^5 copies/ μ l を調製する。
- 4) 希釈操作を繰り返し、 5×10^{-1} copies/ μ l までの段階希釈液を調製する。

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

※ 上記の 8 段階の溶液を鋳型として反応を実施してください。
(1 反応にはそれぞれ 2 μ l を使用。n=3 の反応を推奨)

4. リアルタイム PCR 反応

※ リアルタイム PCR 反応には以下の鑄型を使用します。

鑄型の種類	反応数	説明
陰性コントロール	N=2	○ H ₂ O
NoV 検量線作成用スタンダード	N=3	VI.>3. で段階希釈したもの
EC 陽性コントロール	N=2	● Endogenous Control DNA 1*1
cDNA サンプル (測定対象)	N=2	VI.>2. で逆転写したもの

* 1 : Endogenous Control DNA for stool (製品コード RC166A) のコンポーネントです。

1) 以下の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 反応のそれぞれについて、必要数 + α 分の反応液をまとめて調製し、リアルタイム PCR 用チューブまたはプレートに 23 μ l ずつ分注する。

【ROX Reference Dye を使用しない場合*2】

[GI 検出系の反応液]

試薬	使用量
● Probe qPCR Mix NV-EC	12.5 μ l
● Primer/Probe Mix GI-EC	2.5 μ l
○ H ₂ O	8.0 μ l
Total	23.0 μ l

[GII 検出系の反応液]

試薬	使用量
● Probe qPCR Mix NV-EC	12.5 μ l
● Primer/Probe Mix GII-EC	2.5 μ l
○ H ₂ O	8.0 μ l
Total	23.0 μ l

* 2 : 対象機種

- Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ (製品コード TP1010/TP990 等)
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
- LightCycler 96 System (Roche Diagnostics 社)

【ROX Reference Dye を使用する場合*3】

[GI 検出系の反応液]

試薬	使用量
● Probe qPCR Mix NV-EC	12.5 μ l
● Primer/Probe Mix GI-EC	2.5 μ l
● ROX Reference Dye II	0.5 μ l
○ H ₂ O	7.5 μ l
Total	23.0 μ l

[GII 検出系の反応液]

試薬	使用量
● Probe qPCR Mix NV-EC	12.5 μ l
● Primer/Probe Mix GII-EC	2.5 μ l
● ROX Reference Dye II	0.5 μ l
○ H ₂ O	7.5 μ l
Total	23.0 μ l

* 3：対象機種

- Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System
- QuantStudio 5 Real-Time PCR System
(ともに Thermo Fisher Scientific 社)

2) 各ウェルに鑄型を 2 μ l 添加する。(エリア 3 で実施)

3) 以下の条件で反応を実施する。

<初期変性>

(25°C 10分)*4

95°C 10秒

< PCR：45 サイクル>

95°C 5秒

56°C 30秒 (蛍光検出：Cy5/FAM/(ROX))

検出対象	蛍光検出波長
GI or GII 遺伝子	FAM
内在性コントロール (EC)	Cy5

* 4：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 IV/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。正規化補正の設定変更方法は、弊社ウェブサイトをご参照ください (<https://catalog.takara-bio.co.jp>)。

※ Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System および QuantStudio 5 Real-Time PCR System では、Run mode/Ramp speed を Fast に設定してください。

VII. 判定

反応終了後、増幅曲線および解析パラメーターが適切であることを確認し*1、Ct 値を算出する。

* 1：解析方法は、各装置の取扱説明書をご参照ください。

【検出対象と蛍光検出フィルター】

検出対象	蛍光検出フィルター
GI 遺伝子	FAM
GII 遺伝子	FAM
内在性コントロール (EC)	Cy5

【コントロール反応の正しい結果】

	GI (FAM)	GII (FAM)	EC (Cy5)
NoV 検量線作成用スタンダード	+	+	-
EC 陽性コントロール	-	-	+
陰性コントロール	-	-	-

- 各陽性コントロールで GI または GII、EC 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、EC 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上で再試験を行う。

【測定対象サンプルの判定】

- NoV 検量線作成用スタンダードサンプルの Ct 値を基に、NoV の検量線を作成する。cDNA サンプルを添加した各ウェルの Ct 値と、作成した検量線から定量値を算出する。さらに、サンプル調製時の濃縮率やリアルタイム PCR 反応への持ち込み量などを考慮し、初発試料中の NoV コピー数へ換算する。
- EC が検出され、NoV が検出されなかった場合は、検出限界以下となる。
- EC が不検出の場合は以下の可能性が考えられる。
 - (1) 試料からの核酸抽出・精製操作が不適切であった。*2
 - (2) cDNA 合成がうまくいかなかった。*2
 - (3) 検体サンプルの添加量が不十分または添加操作に不備があった。
 - (4) 阻害物質により PCR 反応が阻害された。*2
 - (5) *Bacteroides* 属菌の存在比が低い乳児由来の試料であった。等

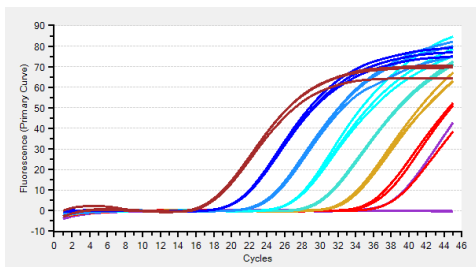
* 2：検体サンプルの再調製を行ってください。

VIII. コントロール反応の例

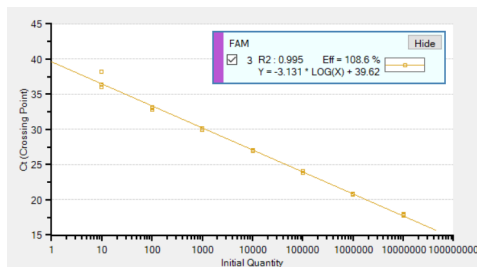
G1 or G11 Positive Control DNA $1 \sim 10^7$ コピーを鋳型として $n=3$ で反応を実施し、 $10 \sim 10^7$ コピーの範囲で検量線を作成した例、および Endogenous Control DNA 1 を鋳型として使用した場合の反応例を以下に示す。
(qPCR 装置は Thermal Cycler Dice Real Time System IV を使用)

G1 検出系

増幅曲線

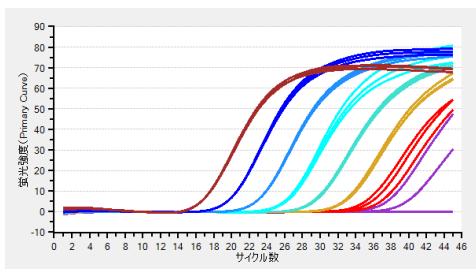


検量線

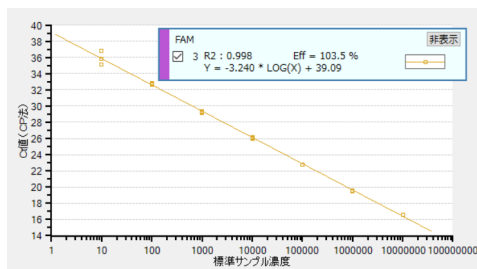


G11 検出系

増幅曲線

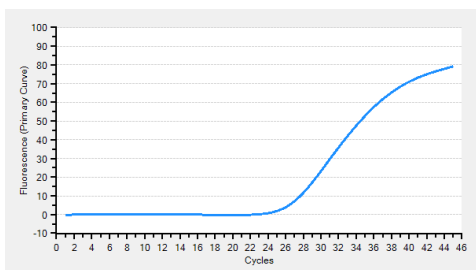


検量線

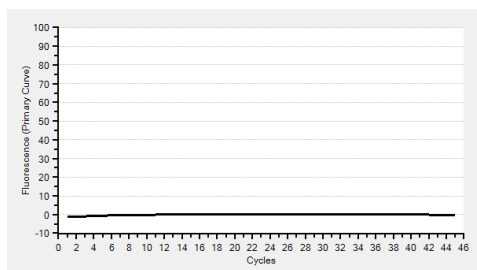


EC 検出系

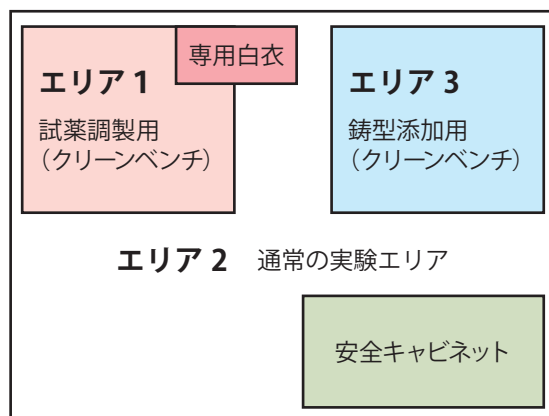
陽性コントロール



陰性コントロール



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。
(鋳型となる核酸は一切持ち込まない)
- エリア 2：通常の実験エリア
検体サンプルの調製を行う。
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

国立感染症研究所発行「病原体検出マニュアル ノロウイルス (第 1 版)」(令和元年 6 月)

XI. 関連製品

Thermal Cycler Dice® Real Time System IV with PC (製品コード TP1010)
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)
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)
0.2 ml Hi-8-Tube (製品コード NJ300)
0.2 ml Hi-8-Flat Cap (製品コード NJ302)
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ600)
Endogenous Control qPCR Kit for stool (製品コード RC165A)
Endogenous Control DNA for stool (製品コード RC166A)
RNase-OFF® (RNase コンタミネーション除去溶液) (製品コード 9037)

[食品環境検査用]

TaKaRa qPCR *Norovirus* (GI/GII) Typing Kit Ver.2 (製品コード RR265A/B)
TaKaRa qPCR *Norovirus* (GI/GII) Typing Kit (1 Step) Ver.2 (製品コード RR266A)
Norovirus (GI/GII) Positive Control DNA (製品コード RR251A)
TaKaRa ノロウイルス拭き取り検査用キット (製品コード RR242A)

[検便検査用]

TaKaRa ノロウイルス GI/GII 検出キット (1 液タイプ) Ver.2 (製品コード RR204A)
TaKaRa ノロウイルス GI/GII 検出キット Ver.4 (製品コード RC130A)

*：詳細は弊社までお問い合わせください。

XII. 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。
- 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、RNase-OFF は PureBiotech, LLC 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 <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社