

製品コード RC170A

検便検査用

TaKaRa

TaKaRa ノロウイルス
GI/GII 検出キット (4 波長) 1 液タイプ Ver.2

説明書

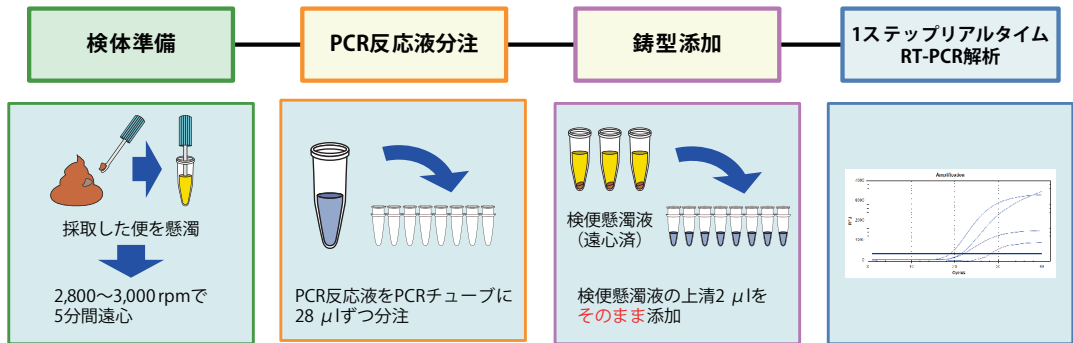
v202605w

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*¹ に則った検査が可能です。また、上記 NoV に加えて、ヒト腸管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。

* 1: 「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 10⁵ 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】

- ・ 検便検体を付属の Suspension Buffer (黄色) で懸濁することで、反応液への検体の添加有無を視覚的に確認でき、作業ミス防止に役立ちます。
- ・ 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、外因性コントロール、内在性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。
- ・ 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、検体の添加有無を客観的に判別可能です。

検出対象遺伝子	プローブ標識
GI 遺伝子	ROX (レポーター) / ダーククエンチャー
GII 遺伝子	Cyanine5 (レポーター) / ダーククエンチャー
外因性コントロール (IC)	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)	Yakima Yellow* ² (レポーター) / ダーククエンチャー

* 2: Yakima Yellow は HEX および VIC の代替色素であり、検出には HEX または VIC 蛍光検出フィルターをご使用ください。

- ・ 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。

※ 内在性コントロールの検出結果を参照せずに使用することも可能です。

【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*3 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。

* 3 : 「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の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)

TaKaRa ノロウイルス GI/GII 検出 qPCR 試薬 (4 波長) 1 液タイプ Ver.2 (製品コード RC171A)

- NV RT-PCR Perfect Mix 4*1 950 μ l \times 3
- NV Positive Control DNA 6 75 μ l

Suspension Buffer NV (製品コード 9184)

Suspension Buffer NV*2 100 ml

- * 1 : 酵素、基質、プライマー、蛍光標識プローブを含みます。遮光に留意してください。
- * 2 : 色素を含んでいるため、遮光に留意してください。

II. 保存 - 20°C

※ NV RT-PCR Perfect Mix 4 と Suspension Buffer NV は、短期間であれば 4°C 保存が可能です。

4°C 保存の場合

NV RT-PCR Perfect Mix 4 は、1 ヶ月以内に使用してください。
Suspension Buffer NV は、6 ヶ月以内に使用してください。

III. 本製品以外に必要な器具、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
 - CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
 - CFX96 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)
 - Applied Biosystems 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： 本製品は検便検査に使用する製品です。
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* 属菌が腸管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. NV RT-PCR Perfect Mix 4 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. NV Positive Control DNA 6 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. Suspension Buffer NV は、4℃または室温で融解後、よく混合してからご使用ください。
4. NV RT-PCR Perfect Mix 4、Suspension Buffer NV 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. 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。
7. 反応液の調製から検体の添加まで、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。

本製品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。
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。
9. 本製品はリアルタイム 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った場合、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 Suspension Buffer NV に 5 ～ 10% 濃度となるように懸濁する。
- 2) 2,800 ～ 3,000 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。

※ 便検体の性状によっては、遠心操作の省略や軽いスピンドアウンへの変更も可能です。ただし、検体によっては蛍光検出に影響が生じる場合がありますので、事前に実際の検体でお試しく下さい。

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

本製品の Suspension Buffer NV 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 6 を「陽性コントロール」として使用します。

1) NV RT-PCR Perfect Mix 4 の溶解、分注（エリア 1 で実施）

○ NV RT-PCR Perfect Mix 4 を溶解させ、泡立てないよう緩やかに転倒混合し、試薬組成を均一にする。軽くスピンドアウンし、リアルタイム PCR 用チューブに 28 μ l ずつ分注する。

[注意]

- ・ 溶解済みの ○ NV RT-PCR Perfect Mix 4 は、使用中は氷上または 4℃ で保存してください。
- ・ 使用した残りを保存する場合は、1 ヶ月以内なら 4℃ で、長期間なら -20℃ で保存してください。

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陽性コントロール）を 2 μ l 添加する。鑄型の添加後、チューブの蓋を閉め、軽くスピンドアウンする。

※ ○ NV RT-PCR Perfect Mix 4 の分注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。

[注意]

- ・ 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℃ 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。
- ・ EC 検出結果を参照される場合は、HEX または VIC 蛍光検出フィルターを設定してください (EC 検出確認が不要の場合は設定不要です)。

【Applied Biosystems QuantStudio 5 Real-Time PCR System、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℃ 10 分)	<u>94℃</u> 5 秒	<u>94℃</u> 5 秒
90℃ 3 分	56℃ 30 秒	56℃ <u>25 秒</u>
58℃ 5 分		(蛍光検出 : ROX or Red610/Cy5/FAM/ HEX or VIC)
94℃ 30 秒		

※ Applied Biosystems QuantStudio 5 Real-Time PCR System を使用する場合は、Passive Reference を None に設定してください。また、Run mode/Ramp speed を Fast に設定してください。

【CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System、CFX96 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℃ 10 分)	<u>96℃</u> 5 秒	<u>96℃</u> 5 秒
90℃ 3 分	56℃ 30 秒	56℃ <u>15 秒</u>
58℃ 5 分		(蛍光検出 : ROX/Cy5/FAM/(HEX))
94℃ 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℃ 10 分)	<u>96℃</u> 5 秒	<u>96℃</u> 5 秒
90℃ 3 分	56℃ 30 秒	56℃ <u>25 秒</u>
58℃ 5 分		(蛍光検出 : ROX/Cy5/FAM/(VIC))
94℃ 30 秒		

※ Expert Mode で Filter-1, 2, 4, 5 を選択してください。また、Passive Reference を None に、Run mode/Ramp speed を Fast に設定してください。

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上で、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	ROX (Red610)
GII 遺伝子	Cy5
外因性コントロール (IC)	FAM
内在性コントロール (EC)	HEX/VIC

※ EC 検出確認が不要の場合は、HEX または VIC 蛍光検出フィルターの設定は不要です。

【コントロール反応の正しい結果】

	GI	GII	IC	EC
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各検出対象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 IC 以外の検出対象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】

<陽性判定の例>

GI	GII	IC	EC	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 (および EC) の検出の有無に関わらず、陽性判定となる。

<その他の判定の例>

GI	GII	IC	EC	判定
-	-	+	+	検出限界以下
-	-	+	-	検体添加操作不備等の可能性
-	-	-	+/-	判定不能

- ・ GI、GII 共に検出されなかった場合には、IC (および EC) の結果を確認する。

[IC と EC 両方の結果を参照する場合]

- ・ IC および EC が検出されていれば、検出限界以下となる。
- ・ IC は検出され、EC が不検出の場合は、以下の可能性が考えられる。
 1. 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
 2. *Bacteroides* 属菌の存在比が低い乳児由来の試料であった 等
- ・ 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。

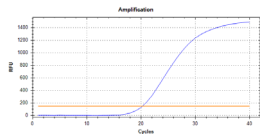
[IC のみの結果を参照する場合]

- ・ 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。

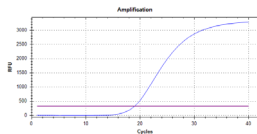
VIII. 反応例

陽性コントロールの反応例

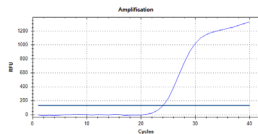
GI (ROX)



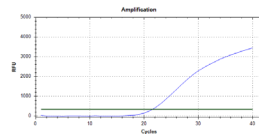
GII (Cy5)



IC (FAM)

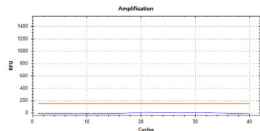


EC (HEX)

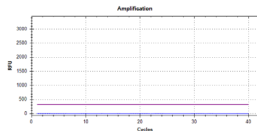


陰性コントロールの反応例

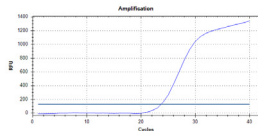
GI (ROX)



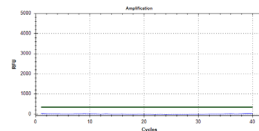
GII (Cy5)



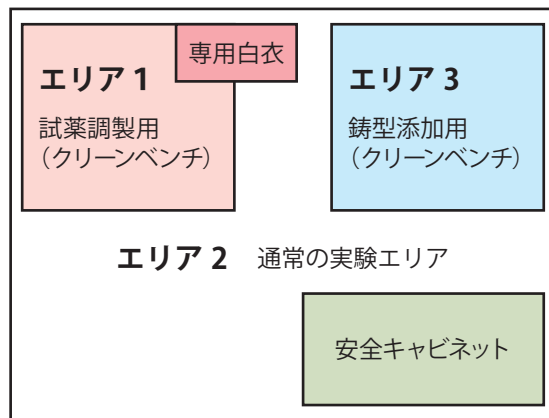
IC (FAM)



EC (HEX)



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：高濃度核酸を扱うエリア
分注済みの反応液への鋳型の添加を行う。

X. 関連製品

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)

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。
- ・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