

製品コード RR242A

食品・環境分析用

TaKaRa

TaKaRa ノロウイルス拭き取り 検査用キット

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、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、拭き取り検体からノロウイルスを濃縮し、リアルタイム RT-PCRにより GI および GII 遺伝子を検出するためのキットです。

特長

- 専用濃縮液 (NV Concentration Reagent*¹) を使用することで、簡便、迅速に拭き取り検体からノロウイルスを濃縮することができます。濃縮の所要時間は約 20 分で、濃縮物はそのまま PCR 反応液に添加できます (熱処理不要)。
- PCR 阻害物質に対し、高い耐性を示します。特に阻害が強い検体では、濃縮前に阻害物質を除去するためのオプションプロトコールもご用意しています。
- 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。

* 1：本製品のコンポーネント「NV Concentration Reagent」は、神戸常盤大学・保健科学部の研究成果に基づきます。

【検出対象遺伝子とプローブの標識】

検出対象遺伝子	プローブの標識
GI 遺伝子	Cy5 / Dark Quencher
GII 遺伝子	ROX / Dark Quencher
インターナルコントロール	FAM / Dark Quencher

- 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。

【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*² 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。

GII 改良プライマーによる検出性能への効果については、TaKaRa ノロウイルス GI/GII 検出キット Ver.3 (製品コード RR298A) の取扱説明書をご参照ください。

* 2：「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)

I. 内容 (50 回分)

●	1. RT-PCR Reaction Mix 2* ¹	700 μ l
●	2. NV Primer/Probe Mix 8* ²	300 μ l
●	3. NV Positive Control DNA 5	100 μ l
⊕ _{H₂O}	4. H ₂ O	1 ml
	5. NV Concentration Reagent	10 ml \times 2

* 1 : 酵素および基質等を含みます。

* 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. 本製品以外に必要な器具、機器 (主なもの)

【器具】

- ・市販の拭き取り用スワブ
- ・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 (Cy5、ROX、FAM 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 // (製品コード TP900/TP960 : 終売)
 - Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (製品コード TP700/TP760)
 - 注: 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)
 - LightCycler96 System (Roche Diagnostics 社)
 - Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

* : 詳細は弊社までお問い合わせください。

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：本製品は食品環境検査に使用する製品です。
2. 測定結果：本製品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. 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。
3. 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。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。

4. 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。
5. 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. 操作

1. 検体の採取

市販スワブを用いて、検査対象箇所の拭き取りを行います。

メーカー	製品名	製品コード
株式会社エルメックス	Pro.media ST-25 PBS	ST-25-PBS
栄研化学株式会社	ふきふきチェック II	PF2002
日本ベクトン・ディッキンソン株式会社	BD ラスパーチェック ふき取り検査用スワブ	251811
株式会社セントラル科学貿易	フキトレール (PBS)	FK0101
有限会社 佐藤化成工業所	ワイプチェック	TE-302
	ワイプチェック	TE-311N

【A. 有限会社 佐藤化成工業所のワイプチェック (TE-311N) 以外を用いる場合】

- 1) 綿棒を抜き、容器中の希釈液 (リン酸緩衝生理食塩水や精製水など) を全量廃棄する。
- 2) 綿棒を用いて 10 cm × 10 cm (100 cm²) の検査対象箇所を拭き取る。
- 3) 綿棒を容器に戻し、容器の壁面に綿球を押しつけるようにして絞る。
- 4) 絞った後の綿棒で再度 A-2) と同じ検査対象箇所を拭き取り、A-3) と同様に絞る。
- 5) 絞った溶液のうち 400 μl を濃縮用に 1.5 ml (または 2 ml) チューブに分取する。

【B. 有限会社 佐藤化成工業所のワイプチェック (TE-311N) を用いる場合】

- 1) 綿棒を用いて 10 cm × 10 cm (100 cm²) の検査対象箇所を拭き取る。
- 2) 綿棒を容器に戻し、ボルテックスで混合する。
- 3) 容器中の溶液のうち 400 μl を濃縮用に 1.5 ml (または 2 ml) チューブに分取する。

※ 強い PCR 阻害が生じると予想される検体では、「VII. オプションプロトコール」を実施することで PCR 阻害を抑えることができます。

2. ウイルス濃縮 (エリア 2 で実施)

- 1) NV Concentration Reagent は溶解後、使用前に均一になるようによく混合する。
- 2) 拭き取り液に NV Concentration Reagent を等量添加し、ボルテックスで混合する。

試薬	使用量
拭き取り液	400 μ l
NV Concentration Reagent	400 μ l
Total	800 μ l

※ 拭き取り液の液量は多少前後しても問題ありません (1.5 ml チューブで操作する場合、600 μ l 程度まで可能)。等量の NV Concentration Reagent を添加してください。

スワブから絞り出した拭き取り液が 300 μ l 以下など、400 μ l に大幅に満たない場合は、その分検出感度が低下しますので、スワブの絞り方などを再確認してください (スワブを容器越しに押しつぶす感覚でしっかり絞る)。

- 3) 室温で 10 分間静置する。
- 4) 14,000 $\times g$ で 5 分間遠心する。
- 5) チューブの底の白色ペレットを除去しないように注意して、上清をピペットマンで除去する。
- 6) 軽くスピンドウンし、残りの上清をピペットマンで除去する。
- 7) H_2O を 5 μ l 添加し、白色ペレットが形成されている場所を中心に 6 ~ 8 回程度洗い流すようにピペッティングしてペレットを溶解する。

3. 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 H_2O 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 \bullet NV Positive Control DNA 5 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)
必要反応数 + α 分の反応液をまとめて調製し、リアルタイム PCR 用チューブに 20 μ l ずつ分注する。

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
\bullet RT-PCR Reaction Mix 2	14 μ l
\bullet NV Primer/Probe Mix 8	6 μ l
Total	20 μ l

- 2) サンプル (鋳型) の添加 (エリア 3 で実施)

2-6) で調製したウイルス濃縮液 (または H_2O 、 \bullet NV Positive Control DNA 5) を 5 μ l 添加する。鋳型添加後、チューブの蓋をし、軽くスピンドウンする。

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。

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

<熱処理、逆転写反応>

(25℃ 10分)

90℃ 3分

58℃ 5分

94℃ 30秒

< PCR : 5 サイクル >

94℃ 5秒

56℃ 30秒

< PCR : 40 サイクル >

90℃ 5秒

56℃ 21秒 (蛍光検出 : Cy5, ROX(Red610), FAM)

※ 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】

<熱処理、逆転写反応>

(25℃ 10分)

90℃ 3分

58℃ 5分

94℃ 30秒

< PCR : 5 サイクル >

94℃ 5秒

56℃ 30秒

< PCR : 40 サイクル >

92℃ 5秒

56℃ 10秒 (蛍光検出 : Cy5, ROX, FAM)

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

<熱処理、逆転写反応>

(25℃ 10分)

90℃ 3分

58℃ 5分

94℃ 30秒

< PCR : 5 サイクル >

94℃ 5秒

56℃ 30秒

< PCR : 40 サイクル >

92℃ 5秒

56℃ 21秒 (蛍光検出 : Cy5, ROX, FAM)

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

VII. オプションプロトコール

強い PCR 阻害が生じると予想される検体では、「VI-2. ウイルス濃縮」の前に以下の操作を行うことにより、阻害物質を減少させることができます。

【本製品以外に必要なもの】

NucleoSpin Filters (製品コード 740606)

【操作】

- 1) NucleoSpin Filter を 1.5 ml チューブにセットする。
- 2) 拭き取り液 400 μ l を NucleoSpin Filter に添加する。
- 3) 11,000 $\times g$ 、1 分間、遠心する。
- 4) ろ液を試料液として VI-2. ウイルス濃縮に使用する。

VIII. 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	蛍光検出フィルター
GI 遺伝子	Cy5
GII 遺伝子	ROX
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

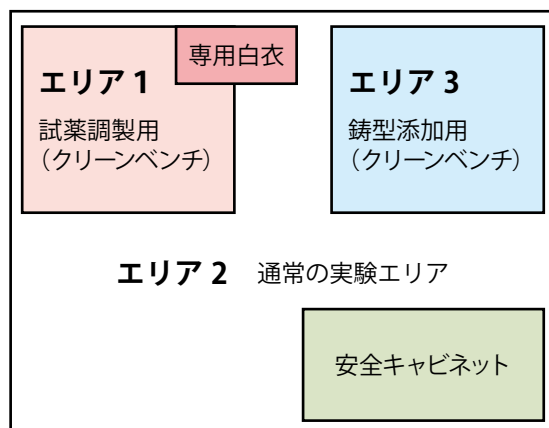
- ・ GI または GII が検出された場合は、IC の検出の有無に関わらず、陽性判定となる。

<陰性検体の例>

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。

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

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)
NucleoSpin Filters (製品コード 740606)
TaKaRa ノロウイルス GI/GII 検出キット Ver.3 (製品コード RR298A)
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) *
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)

*：詳細は弊社までお問い合わせください。

XI. 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。
- ・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 <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社