

製品コード RR266A

食品・環境分析用

TaKaRa

TaKaRa qPCR *Norovirus* (GI/GII) Typing Kit (1 Step) Ver.2

説明書

v202108Da

本製品は、リアルタイム RT-PCR により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す。

GI および GII 遺伝子の検出には、厚生労働省 医薬食品局 食品安全部 監視安全課より通知された「ノロウイルスの検出法について」(食安監発第 1105001 号、最終改正：平成 25 年 10 月 22 日付け食安監発 1022 第 1 号) に記載されたものと同じプライマー、プローブを使用しています。

※ 本製品の製品化にあたっては、群馬パース大学大学院 木村博一教授に監修いただきました。

特長

- ワンステップリアルタイム RT-PCR により、1 本のチューブ内で逆転写反応とリアルタイム PCR を連続的に行います。
- 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、インターナショ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。
- リアルタイム RT-PCR の所要時間は約 1 時間で迅速に結果が得られます。
- 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 増幅産物のキャリアオーバーによる偽陽性を防止できます。

【検出対象遺伝子とプローブ標識】

検出対象遺伝子	プローブ標識
GI 遺伝子	Cyanine5 (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
インターナショナルコントロール	FAM (レポーター) / ダーククエンチャー

I. 内容 (50 回分)

- | | | |
|------------------|--------------------------|--------|
| ○ | 1. PCR Buffer (NV)*1 | 500 μl |
| ● | 2. Enzyme Mix (NV) | 100 μl |
| ● | 3. NV Primer/Probe Mix*2 | 100 μl |
| ⊕ _{H2O} | 4. H ₂ O | 1 ml |

* 1：反応に必要な dNTP Mixture、Mg²⁺ 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)

【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】

- ・ リアルタイム PCR 装置
 - 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)*
 - 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：本キットは環境分析や食品分析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、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. Enzyme Mix (NV) は、使用前に軽く遠心して、試薬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. Enzyme Mix (NV) 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 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、増幅産物が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. サンプル RNA の調製（エリア 2 で実施）

公定法に記載された方法に従い、検体から RNA を調製してください。

注意事項

- 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. 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、検量線作成用スタンダードサンプルを調製します。

[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] 30 μ l 分注 : 1 本

[2] 45 μ l 分注 : 7 本

(2) ● GI Positive Control DNA 原液 10 μ l および ● GII Positive Control DNA 原液 10 μ l を [1] のチューブに添加し NV Positive Control DNA 2×10^6 copies/ μ l を調製する。

(3) (2) で調製した 2×10^6 copies/ μ l の溶液 5 μ l を [2] のチューブに添加し 2×10^5 copies/ μ l を調製する。

(4) 希釈操作を繰り返し、 2×10^{-1} copies/ μ l までの段階希釈液を調製する。

- | |
|---|
| 1. 2×10^6 copies/ μ l (GI Positive Control DNA 原液 10 μ l + GII Positive Control DNA 原液 10 μ l + PC Dilution Buffer 30 μ l) |
| 2. 2×10^5 copies/ μ l (1. の 2×10^6 copies/ μ l 溶液 5 μ l + PC Dilution Buffer 45 μ l) |
| 3. 2×10^4 copies/ μ l (2. の 2×10^5 copies/ μ l 溶液 5 μ l + PC Dilution Buffer 45 μ l) |
| 4. 2×10^3 copies/ μ l (3. の 2×10^4 copies/ μ l 溶液 5 μ l + PC Dilution Buffer 45 μ l) |
| 5. 2×10^2 copies/ μ l (4. の 2×10^3 copies/ μ l 溶液 5 μ l + PC Dilution Buffer 45 μ l) |
| 6. 2×10^1 copies/ μ l (5. の 2×10^2 copies/ μ l 溶液 5 μ l + PC Dilution Buffer 45 μ l) |
| 7. 2×10^0 copies/ μ l (6. の 2×10^1 copies/ μ l 溶液 5 μ l + PC Dilution Buffer 45 μ l) |
| 8. 2×10^{-1} copies/ μ l (7. の 2×10^0 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する。

(1 反応にはそれぞれ 5 μ l を使用。n=3 の反応を推奨)

3. リアルタイム RT-PCR

※ 本キットでは、NV Positive Control DNA を用いた検量線の作成と、サンプル RNA での反応、本キット添付の H₂O を用いた陰性コントロール反応を同時に行います。

- (1) 反応液の調製 (エリア 1 で実施)
必要数 + α 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
○ PCR Buffer (NV)	10 μ l
● NV Primer/Probe Mix	2 μ l
● Enzyme Mix (NV)	2 μ l
⊕ H ₂ O	6 μ l
Total	20 μ l

注：以下の反応数で実施することを推奨します。

サンプル RNA： n=2 以上
陰性コントロール： n=2 以上
検量線作成用スタンダードサンプル： 8 段階濃度 × 各 n=3

- (2) サンプル (鋳型) の添加 (エリア 3 で実施)
H₂O (陰性コントロール)、サンプル RNA、検量線作成用スタンダードサンプルを (1) で分注した反応液に 5 μ l 添加し、しっかりとふたをする。
軽くスピンドウンしてリアルタイム PCR 装置にセットする。
- (3) リアルタイム RT-PCR の実施
以下の条件で反応を実施する。
- 注：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 *の場合】

<逆転写反応>

(25°C 10分)

42°C 5分

94°C 30秒

<PCR：5サイクル>

94°C 5秒

56°C 40秒

<PCR：40サイクル>

90°C 5秒

56°C 40秒 (蛍光検出：Cy5, ROX, FAM)

*：Speed は、Fast を選択

【Thermal Cycler Dice Real Time System II/Lite *、LightCycler96 System の場合】

<逆転写反応>

(25°C 10分)

42°C 5分

94°C 30秒

<PCR：5サイクル>

94°C 5秒

56°C 30秒

<PCR：40サイクル>

90°C 5秒

56°C 30秒 (蛍光検出：Cy5, ROX, FAM)

*：Thermal Cycler Dice Real Time System II/Lite の Speed は、Fast を選択

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

<逆転写反応>

(25°C 10分)

42°C 5分

94°C 30秒

<PCR：5サイクル>

94°C 5秒

56°C 20秒

<PCR：40サイクル>

92°C 5秒

56°C 20秒 (蛍光検出：Cy5, ROX, FAM)

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

<逆転写反応>

(25°C 10分)

42°C 5分

94°C 30秒

<PCR：5サイクル>

94°C 5秒

56°C 30秒

<PCR：40サイクル>

92°C 5秒

56°C 30秒 (蛍光検出：Cy5, ROX, FAM)

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、検体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 蛍光検出フィルター
GII 遺伝子	ROX 蛍光検出フィルター
インターナルコントロール (IC)	FAM 蛍光検出フィルター

【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 (NV Positive Control DNA 10^7 コピー)	+	+	+/-
陰性コントロール (H ₂ O)	-	-	+

- ・ 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。

【検量線の確認】

GI および GII 検出系につき、 $10 \sim 10^7$ コピーの範囲で検量線を作成し、 R^2 値が 0.990 以上であることを確認する。

【検体サンプルの判定】

各検体サンプルの Ct 値を検量線に当てはめて算出された定量値を確認する。複数ウェルで 10 コピー以上の場合に陽性と判定する。

<陽性判定の例>

GI (Cy5)	GII (ROX)	IC (FAM)	判定
10 コピー以上	10 コピー未満	+/-	GI 陽性
10 コピー未満	10 コピー以上	+/-	GII 陽性
10 コピー以上	10 コピー以上	+/-	GI/GII 陽性

- ・ GI または GII が複数ウェルで 10 コピー以上の場合は、IC の検出の有無に関わらず、陽性判定となる。

<陰性判定の例>

GI (Cy5)	GII (ROX)	IC (FAM)	判定
10 コピー未満	10 コピー未満	+	検出限界以下
10 コピー未満	10 コピー未満	-	判定不能

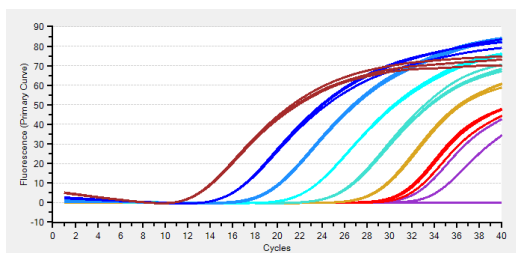
- ・ GI、GII 共に 10 コピー未満の場合には、IC の結果を確認する。
- ・ IC が検出されていれば、検出限界以下となる。
- ・ IC が不検出の場合は、PCR 阻害の疑いがある。サンプルを希釈するか、再度、RNA 精製を行って再測定する。

VIII. 反応例

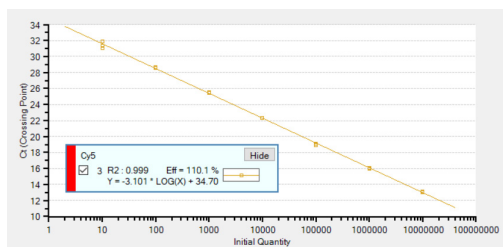
GI or GII Positive Control DNA $1 \sim 10^7$ コピーを鋳型として $n=3$ で反応を実施し、 $10 \sim 10^7$ コピーの範囲で検量線を作成した例を以下に示します。

< GI 検出系 >

増幅曲線

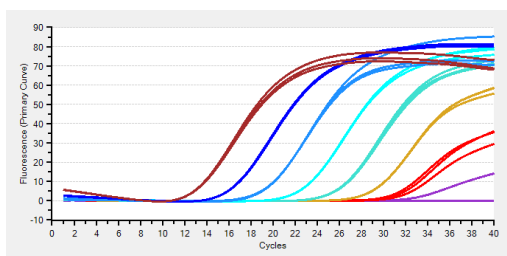


検量線

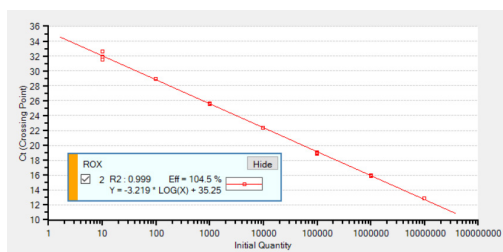


< GII 検出系 >

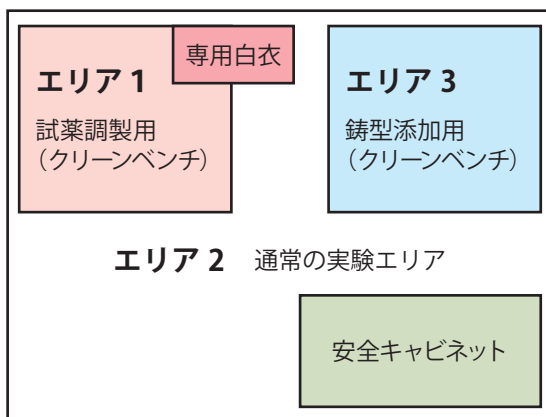
増幅曲線



検量線



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. 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 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 LED (製品コード TP703)
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ600)
Norovirus (GI/GII) Positive Control DNA (製品コード RR251A)
TaKaRa qPCR *Norovirus* (GI/GII) Typing Kit Ver.2 (製品コード RR265A/B)
RNase-OFF® (RNase コンタミネーション除去溶液) (製品コード 9037)

[検便検査用]

TaKaRa ノロウイルス GI/GII 検出キット Ver.4 (製品コード RC130A)

XII. 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、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