

G1

Ampdirect® Technology

ノロウイルスG1検出試薬キット

Direct RT-PCR Kit for Norovirus G1 RNA Detection

保存温度：-20℃ 使用回数：48 テスト
有効期限：6 ヶ月 製品番号：P/N:241-08905-91

取扱説明書

© 2006-2010 Shimadzu Corporation.

⚠ 製品に関する注意

- ・本試薬キットは研究用試薬です。臨床診断の目的では使用しないでください。
- ・人、動物の診断・治療用として承認されていません。医薬品、化粧品、食品など他の用途で人、動物の身体に直接使用しないでください。
- ・本試薬キットはノロウイルス G1 (Genogroup) 遺伝子検出を目的とした試薬です。ノロウイルス G2 (Genogroup) 遺伝子検出を行う場合には別途、弊社製品「ノロウイルス G2 検出試薬キット (P/N: 241-08905-92)」を使用してください。
- ・本試薬キットに含まれる RT 用酵素には Invitrogen 製『M-MLV Reverse Transcriptase』、PCR 用酵素には Biorline 製『BIOTAQ™ HS DNA Polymerase』を採用しています。
- ・本試薬キットによるノロウイルス G1 RNA の検出限界はおおよそ 50 copies/reaction です。

技術的な内容に関するお問合せ窓口

株式会社島津製作所 分析計測事業部 パイオ・臨床ビジネスユニット
http://www.shimadzu-biotech.jp TEL: 075-823-1351 FAX: 075-823-1364

特長

- 1本のチューブで検体処理から RT-PCR までのトータルな操作ができます。
- 糞便検体に処理試薬を加えて加熱するだけで直接、Reverse Transcription(RT)-PCR ができます。
- 本試薬キットには偽陰性対策として内部コントロール DNA (I.C.) が含まれています。

使いかた

⚠ 使用上の注意

- ・本試薬キット付属の酵素は使用時以外でできるだけ冷凍 (-20) 保存してください。それ以外の各試薬は室温にて解凍後、転倒混和または vortex 等ですっきり混和してスピンドウン後、使用時までできるだけ氷冷下で保存してください。またすべての試薬は使用后、すみやかに冷凍 (-20) 保存してください。
- ・操作中にチューブ内で液が飛び散った場合は、スピンドウンしてから使用してください。

1 試薬 (5 本) を確認する

No.	試薬名称	キャップ	容量
①	検体処理試薬 [G1]	透明	1 mL × 1 tube
②	RT 用試薬 [G1]	緑	1.25 mL × 1 tube
③	RT 用酵素 [G1]	紫	12.5 μL × 1 tube
④	PCR 用試薬 [G1]	緑チップ、ループ付	240 μL × 1 tube
⑤	PCR 用酵素 [G1]	紫チップ、ループ付	12.5 μL × 1 tube

2 検出方法に合わせて、必要品を準備する

本試薬キット以外に次のものをご準備ください。

I 電気泳動検出

電気泳動により特異的増幅産物のバンド長を検出します。

I 用	1) PCR 装置	1 台
	2) 電気泳動槽、アガロースゲル※および分子量マーカー	
	3) 反応チューブ (PCR 装置に合ったチューブ)	1 本 /1 検体
	4) RT 反応液調製用チューブ (0.5 mL または 1.5 mL)	1 本
	5) PCR 反応液調製用チューブ (0.5 mL または 1.5 mL)	1 本
	6) 小型微量遠心機	1 台
	7) 恒温装置 (サーマルサイクラーでの代用も可)	1 台
	8) 氷 (クラッシュアイス) または冷却用アルミブロック	
	9) マイクロピペット	
	10) フィルター付チップ	

※ 特異産物が 86 bp と低分子なため、短い DNA フラグメントの分離に適したアガロースゲル (TaKaRa 製『NuSieve® 3:1 Agarose』(ゲル濃度: 4%) など) のご使用をお勧めします。

II 融解温度検出

SYBR® Green I (励起波長: 490 nm、蛍光波長: 530 nm) を用いて融解温度を検出します。

PCR 後の反応チューブのふたを開けずに検出できるので、コンタミネーションの危険性を低減できます。

II 用	1) リアルタイム PCR 装置	1 台
	2) 125 × SYBR® Green I 溶液※ ^{1, ※2}	
	3) 15 ~ 25 μM ROX レファレンス色素※ ^{3, ※4}	
	4) 反応チューブ (PCR 装置に合ったチューブ)	1 本 /1 検体
	5) RT 反応液調製用チューブ (0.5 mL または 1.5 mL)	1 本
	6) PCR 反応液調製用チューブ (0.5 mL または 1.5 mL)	1 本
	7) 小型微量遠心機	1 台
	8) 恒温装置 (サーマルサイクラーでの代用も可)	1 台
	9) 氷 (クラッシュアイス) または冷却用アルミブロック	
	10) マイクロピペット	
	11) フィルター付チップ	

1: SYBR® Green に関しては、Molecular Probes 社が特許を保有しています。SYBR® Green は正当権利者より購入してください。

2: 弊社では、Invitrogen 製『SYBR® Green nucleic acid gel stain』(10,000 ×) を TE にて 80 倍希釈 (125 ×) した溶液を使用しています。

3: Applied Biosystems 製のリアルタイム PCR 装置など、ROX の必要な装置を使用する場合のみ用意してください。

4: 弊社では Invitrogen 製『ROX Reference Dye』を使用しています。

3 前処理する

- 1 糞便検体を生理食塩水または水に 5 ~ 10% (W/V) 濃度で懸濁します。(0.1 mL ~ 1 mL 程度 /1 検体)
- 2 糞便懸濁液を小型微量遠心機で 5 分程度遠心します。
- 3 反応チューブに①検体処理試薬 [G1]: 19 μL と糞便遠心上清: 1 μL を添加し、ピペティングまたはタッピングでしっかり混合します。
- 4 恒温装置で 85℃、1 分の熱処理を行います。(Final 20 μL/tube)
- 5 氷冷します。

4 RT 反応液を調製し、RT 反応を行う

- 1 RT 反応液調製用チューブで RT 反応液を調製します。
(必要量の 1 割増程度で調製することをお勧めします)

RT 反応液 (1 反応分)

RT 用試薬 [G1]:	24.75 μ L
RT 用酵素 [G1]:	0.25 μ L
Total :	25 μ L

- 2 前処理したサンプル : 20 μ L に、RT 反応液 : 25 μ L を添加します。
ピペティングなどでしっかり混合し、恒温装置で RT 反応を行います。(Final 45 μ L/tube)

RT 反応温度条件

37、30 分 → 95、5 分 → 氷冷



反応液の調製はできるだけ氷冷下で行ってください。

5 PCR で増幅し、検出する



融解温度解析を行った後の PCR 産物を電気泳動すると、反応液中に含まれる SYBR® Green の影響で泳動が遅くなり、産物サイズが実際より長く検出されます。

I 電気泳動検出

- 1 PCR 反応液調製用チューブで PCR 反応液を調製します。
(必要量の 1 割増程度で調製することをお勧めします)

PCR 反応液 (1 反応分)

PCR 用試薬 [G1]:	4.75 μ L
PCR 用酵素 [G1]:	0.25 μ L
Total :	5 μ L

- 2 RT 反応後のチューブ : 45 μ L に、PCR 反応液 : 5 μ L を添加し、PCR を行います。(Final 50 μ L/tube)

PCR 温度条件

95、30 秒
95、10 分 → 56、30 秒
72、60 秒

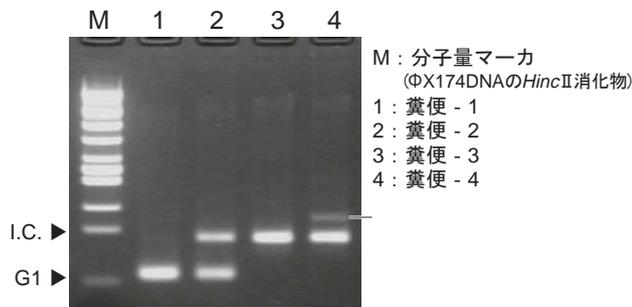
45 サイクル → 72、7 分

- 3 電気泳動にて PCR 産物を確認し、判定します。

G1	I.C.	特異的増幅産物長 : 142 bp	
		○	×
特異的増幅産物長 : 86 bp	○	陽性	陽性
	×	陰性	判定不能*

バンドが確認できない場合は、再実験を行います。RT-PCR 阻害が疑われる場合は、糞便上清を生理食塩水または水で 10 倍希釈して同様の反応・検出を行ってください。

【検出例】



I.C. の増幅産物として、このように 142 bp より大きいサイズのもの (上側のバンド) が生じる場合がありますが、異常ではありません。

アガロースゲル : TAE にて 4% 濃度にした
TaKaRa 製『Nusieve® 3:1 Agarose』ゲル
ゲルへの産物添加量 : 10 μ L/ コーム
泳動条件 : 100 V、30 分

判定結果

糞便 -1: ノロウイルス G1 陽性
糞便 -2: ノロウイルス G1 陽性
糞便 -3: ノロウイルス G1 陰性
糞便 -4: ノロウイルス G1 陰性

II 融解温度検出

- 1 PCR 反応液調製用チューブで PCR 反応液を調製します。
(必要量の 1 割増程度で調製することをお勧めします)

PCR 反応液 (1 反応分)

PCR 用試薬 [G1]:	4.75 μ L
PCR 用酵素 [G1]:	0.25 μ L
125 x SYBR® Green 溶液 :	1 μ L
15 ~ 25 μ M ROX レファレンス色素 :	1 μ L (必要な場合のみ)
Total :	6 μ L (ROX なし) 7 μ L (ROX あり)

- 2 RT 反応後のチューブ : 45 μ L に、PCR 反応液 : 6 μ L (ROX なし) または 7 μ L (ROX あり) を添加し、PCR を行います。
(Final ROX なし : 51 μ L/tube、ROX あり : 52 μ L/tube)

PCR 温度条件

95、30 秒
95、10 分 → 56、30 秒
72、60 秒

45 サイクル → 72、7 分

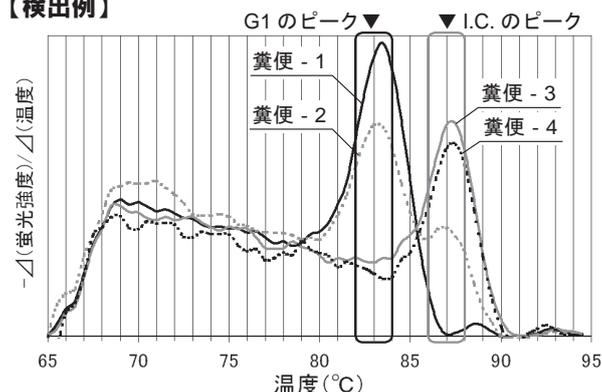
- 3 融解温度解析を行い、判定します。

弊社では、Bio-Rad 製 iCycler iQ リアルタイム PCR 装置を使用し、65 から 95 まで (0.5 /10 秒刻み) の融解温度解析データを取得しています。それ以外の装置を使用した場合には、弊社の結果と若干異なる場合がありますのでご了承ください。

G1	I.C.	ピーク検出温度 : 87°C ± 1°C	
		○	×
ピーク検出温度 : 83°C ± 1°C	○	陽性	陽性
	×	陰性	判定不能*

ピークが確認できない場合は、再実験を行います。RT-PCR 阻害が疑われる場合は、糞便上清を生理食塩水または水で 10 倍希釈して同様の反応・検出を行ってください。

【検出例】



判定結果

糞便 -1: ノロウイルス G1 陽性
糞便 -2: ノロウイルス G1 陽性
糞便 -3: ノロウイルス G1 陰性
糞便 -4: ノロウイルス G1 陰性