

CronoSTAR™ Portable Real-Time PCR System シリーズ

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 遺伝子検出のための操作マニュアル

—SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (RC300A/RC30JW) 専用—

このマニュアルでは、SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (製品コード RC300A/RC30JW) を用いてリアルタイム PCR を実施する際の設定および操作方法を説明します。実験操作に関しては、本キットの取扱説明書に従ってください。

また、本装置は研究用機器であり、医薬品医療機器等法に定められる医療機器ではありません。

CronoSTAR™ Portable リアルタイムPCR装置の起動とラン

- リアルタイム PCR 装置本体の電源を ON にする。
- コンピューターを起動してソフトウェアを立ち上げる。
- Sample Setup をクリックしサンプル情報を入力する。
 - Experiment Name に試験名を入力する (ラン終了後に行っても良い)。
 - Channel 4 の Cy5 にチェック✓を入れる。

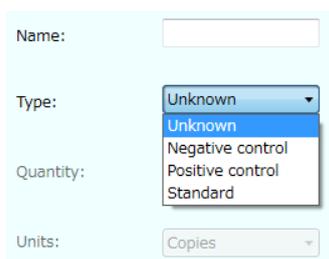


- ウェルをクリックしてサンプル名、タイプを入力する (ラン終了後に行っても良い)。

Negative Control : 陰性コントロール

Positive Control : 陽性コントロール

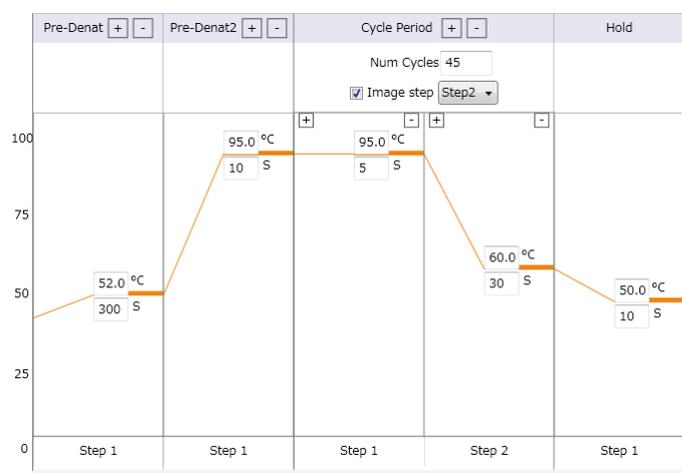
Unknown : 検査対象サンプル



- Cycler Setup を選択してサーマル条件を入力する。
 - Pre-Denat1 は、52°C、300 秒に設定する。
 - Pre-Denat2 は、95°C、10 秒に設定する。
 - Cycle Period Step1 は、95°C、5 秒に設定する。
 - Cycle Period Step2 は、60°C、30 秒に設定する。
 - Cycle Period の Num Cycles は、45 に設定する。

4.6. Cycle Period の Image step は チェック✓を入れ Step2 に設定する。

4.7. Hold は、 50℃、 10 秒に設定する。



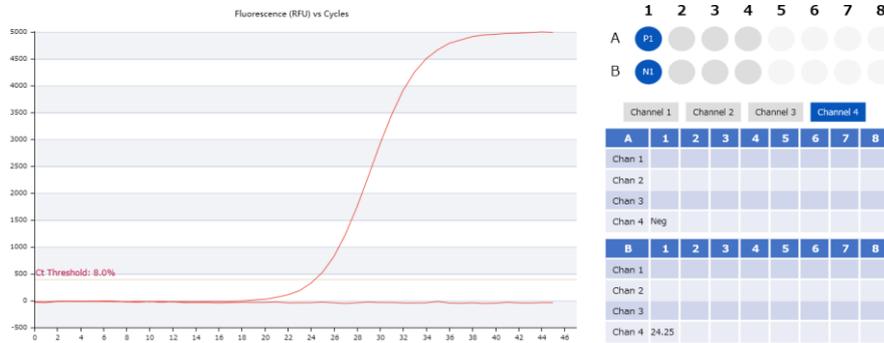
5. 装置にサンプルをセットする。



6. Start ボタンを押しランを開始する。

結果の解析

1. Analysis 画面で増幅曲線を確認する。

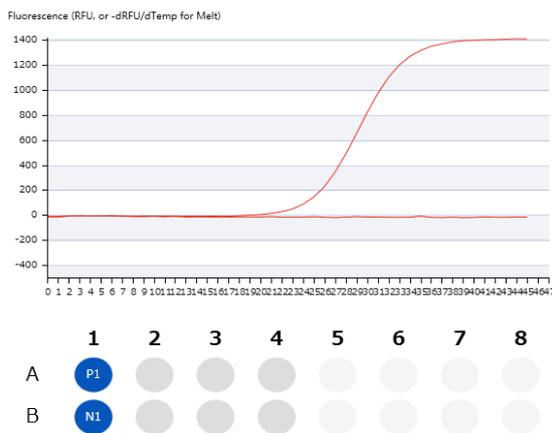


(Analysis 画面の増幅曲線)

2. Analysis 画面の結果のテーブルで Channel4(Cy5)の Ct 値を確認する。

	Channel 1	Channel 2	Channel 3	Channel 4				
A	1	2	3	4	5	6	7	8
Chan 1								
Chan 2								
Chan 3								
Chan 4	Neg							
B	1	2	3	4	5	6	7	8
Chan 1								
Chan 2								
Chan 3								
Chan 4	24.25							

3. Run 画面で増幅曲線を確認する。



(Run 画面の増幅曲線)

結果の判定方法（詳細はキット（RC300A）の説明書を参照）

コントロール反応の判定

- ・陰性コントロールは、不検出であることを確認する。
- ・陽性コントロールは、Ct 値が30 以下であることを確認する。

検体の測定結果の判定

- ・Ct 値が40 以下、かつRun画面で指数関数的増幅が確認される場合は、陽性と判定する。

(※)

- ・Ct 値が40 より大きい場合、または不検出の場合*は検出限界以下と判定する。

*検出限界以下と判定された場合でも、40 サイクルより後で増幅曲線の立ち上がりが認められた場合は、低コピーの新型コロナウイルス遺伝子が存在する可能性があります。

※判定の際の注意（重要）

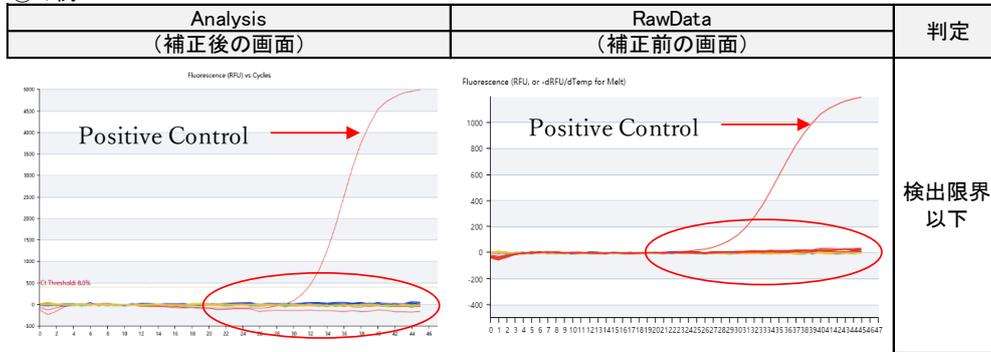
本機器には、シグナルを自動補正する機能があります。これは、シグナルの絶対値が低い場合でも、シグナル強度を自動補正して、フルスケールが揃った増幅曲線として描くための機能です。この機能のために、まれに、ほとんどシグナルが出ていないにもかかわらず、シグナルのわずかな変化をとらえて、あたかも増幅したような曲線に補正し、Ct 値を算出する事例が見られます。

そのため、判定の際には、以下の手順にしたがって、上述の自動補正による影響の有無を必ずご確認ください。

判定例

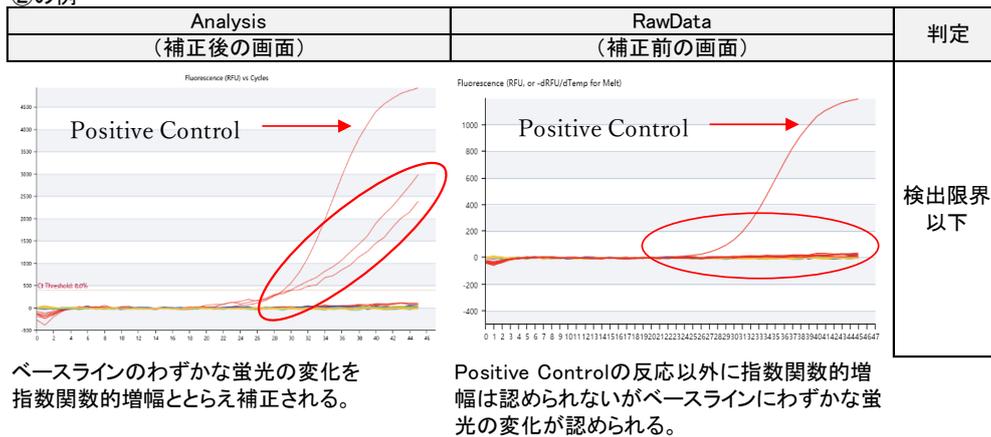
- ① Analysis、RawData の画面でともにシグナルの上昇が見られない場合
検出限界以下と判断します。

①の例



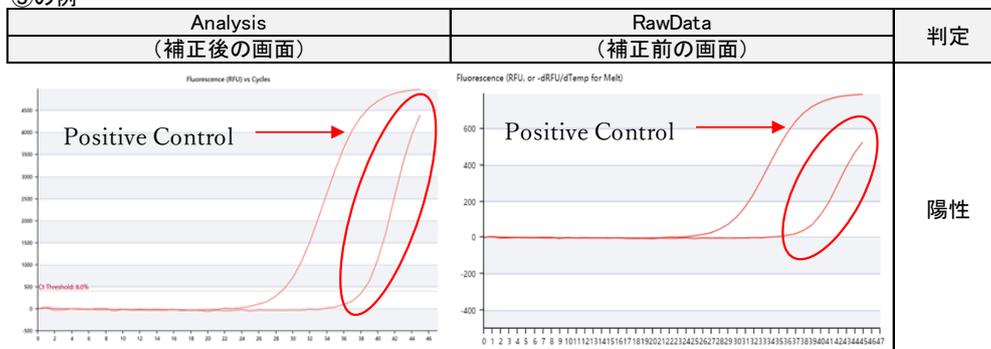
- ② Analysis の画面でシグナルの上昇が見られるが、RawData では上昇が見られない場合
自動補正の影響によるものですので、検出限界以下と判断します。

②の例



- ③ Analysis、RawData の画面でともにシグナルの上昇が見られる場合
陽性と判断します。

③の例



結果の保存と解析結果の出力

1. Report画面をクリックする。
2. Print Reportをクリックし、結果を保存場所とファイル名を指定してCSV形式で保存する。

Print Report (.CSV)

3. Save Experimentをクリックし、保存場所とファイル名を指定して保存する。Save as templateにチェック✓をいれるとテンプレートとして保存する。

Save Experiment

Save as template

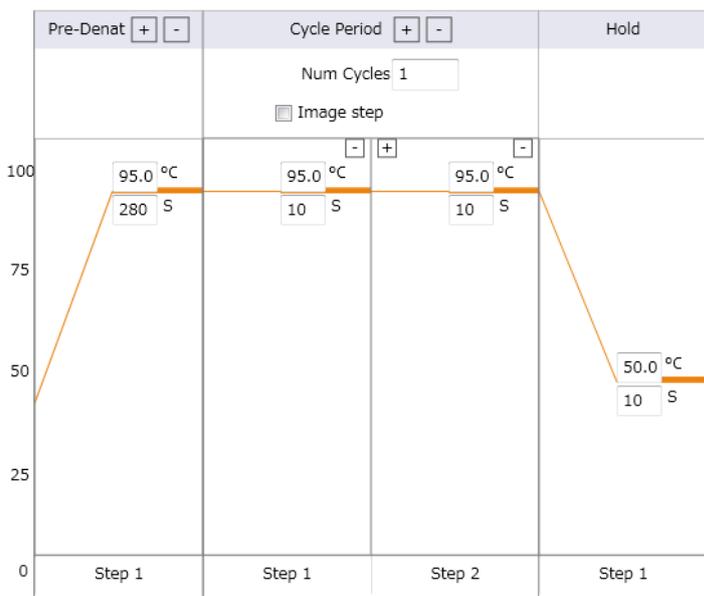
ソフトウェアと装置の終了

1. ソフトウェアを終了する。
2. コンピューターを終了させて、電源を切る。
3. 本体の電源を切る。

【補足】

前処理（核酸の簡易抽出）をリアルタイムPCR装置で実施する場合

1. リアルタイムPCR装置本体の電源をONにする。
2. コンピューターを起動してソフトウェアを立ち上げる。
3. Sample Setupをクリックする。
4. Cyclor Setupを選択してサーマル条件を入力する。
 - 4.1. Pre-Denat1は、95°C、280秒に設定する。
 - 4.3. Cycle Period Step1は、95°C、10秒に設定する。
 - 4.4. Cycle Period Step2は、95°C、10秒に設定する。
 - 4.5. Cycle Period のNum Cyclesは、1に設定する。
 - 4.6. Cycle Period のImage stepは チェック✓を外す。
 - 4.7. Holdは、50°C、10秒に設定する。



5. 装置にサンプルをセットする
6. Start ボタンを押しランを開始する。
7. 測定終了したあとチューブを取り出し氷上で保存する。