

CronoSTAR™ Portable Real-Time PCR Systemシリーズ

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)検査のための操作マニュアル

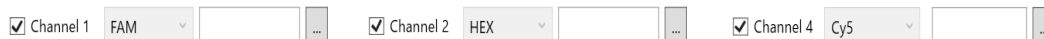
—SARS-CoV-2 (N501Y/E484K) Direct Detection RT-qPCR Kit (製品コードRC340A) 専用—

このマニュアルでは、SARS-CoV-2 (N501Y/E484K) Direct Detection RT-qPCR Kit (製品コード RC340A) を用いてリアルタイム PCR を実施する際の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 1 の FAM と Channel 2 の HEX と Channel 4 の Cy5 にチェック✓を入れる。

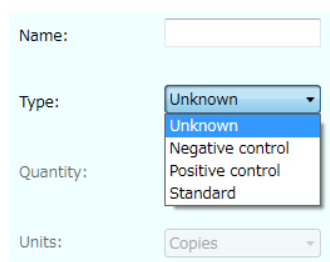


- ウェルをクリックしてサンプル名、タイプを入力する (ラン終了後に行っても良い)。

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、58°C、30 秒に設定する。
 - Cycle Period の Num Cycles は、45 に設定する。

結果の解析

1. Analysis 画面で増幅曲線を確認する。

① Analysis画面を表示

Clontech Setup Run **Analysis** Report HID Device Not Found

Amplification Melting Curve Standard Curve

Curve Fit Start: 3 Ct Low limit: 13 Ct Threshold(%): 8.0 Refresh Normalize

Fluorescence (RFU) vs Cycles

②増幅曲線を確認

③Ct値を確認

	Channel 1	Channel 2	Channel 3	Channel 4
A	1	2	3	4
Chan 1				
Chan 2				
Chan 3				
Chan 4				
B	1	2	3	4
Chan 1				
Chan 2				
Chan 3				
Chan 4				

Designed for Takara Bio, Inc.

2. Analysis 画面の結果のテーブルで Channel1(FAM) 、Channel2(HEX) 、Channel4(Cy5)の Ct 値を確認する。

	Channel 1	Channel 2	Channel 3	Channel 4
A	1	2	3	4
Chan 1				
Chan 2				
Chan 3				
Chan 4				

3. Run 画面に表示される検査対象サンプルの増幅曲線と 2 の結果テーブルに表示される Ct 値に食い違いがないことを確認する。

① Run画面を表示

Clontech Setup Run **Analysis** Report HID Device Not Found

Run Control

Current Cycle : 0 Total : 0 Cycles Time Remain : Current State Refresh

Lid Temperature (°C) vs Time (sec)

Reaction Well Temperature (°C) vs Time (sec)

Fluorescence (RFU) or -d(RFU)/Temp for Melt

②増幅曲線を確認

③Ct値を確認

	Channel 1	Channel 2	Channel 3	Channel 4
A	1	2	3	4
Chan 1				
Chan 2				
Chan 3				
Chan 4				
B	1	2	3	4
Chan 1				
Chan 2				
Chan 3				
Chan 4				

Force Stop

Designed for Takara Bio, Inc.

結果の判定方法（詳細はキットの説明書を参照）

【コントロール反応の判定】

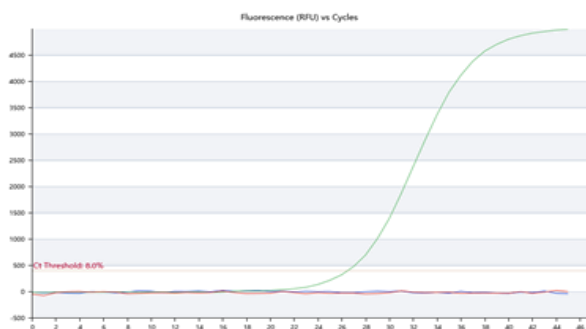
結果が以下の条件を満たすことを確認する。条件を満たさない場合は再測定を推奨する。

	FAM (N501Y)	Cy5 (E484K)	HEX (N 遺伝子)
Negative Control	不検出※1	不検出※1	不検出※1
N1/N2 Template	不検出※1	不検出※1	Ct ≤ 30
N501Y Template	Ct ≤ 30	不検出※1	不検出※1
E484K Template	不検出※1	Ct ≤ 30	不検出※1

- **Negative Control** は、不検出であることを確認する。
Ct 値が算出された場合は、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。
- **N1/N2 Template** では HEX で、**N501Y Template** では FAM で、**E484K Template** では Cy5
で検出され、他の波長では検出されないことを確認する。
正しい波長で検出されない場合、何らかの原因でリアルタイム RT-PCR が正常に行われて
いない。再反応を行う。

下図は N1/N2 Template を鋳型として使用した場合の例

N501Y Template、E484K Template についても同様の方法で確認する。



(Analysis 画面の増幅曲線)

【サンプルの測定結果の判定】

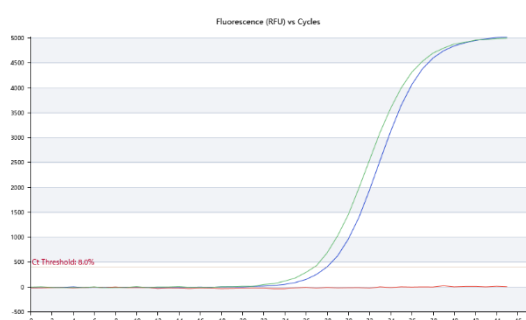
FAM (N501Y)	Cy5 (E484K)	HEX (N 遺伝子)	判定結果	
			N501Y	E484K
—	—	+	なし	なし
+	—	+ / —	あり	なし
—	+	+ / —	なし	あり
+	+	+ / —	あり	あり
—	—	—	判定不能	

- ・ 「+」はCt \leq 40、「—」はCt $>$ 40または不検出※1であることを示す。
- ・ すべての検出系がCt $>$ 40または不検出であった場合は判定不能となり、SARS-CoV-2のコピー数が検出限界以下である可能性がある。

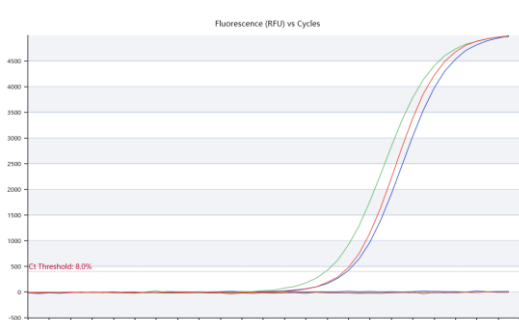
※1 あらかじめ設定された偽陽性検出感度の閾値（デフォルトの閾値設定）を使用の場合、
 <結果の解析、2>で得られる解析結果の表記が、「Neg」あるいは「[Neg]」の何れの場合
 であっても「不検出」として判定してください。

測定結果例（Analysis画面の増幅曲線）

N501Yの変異あり / E484Kの変異なし



N501Yの変異あり / E484Kの変異あり



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

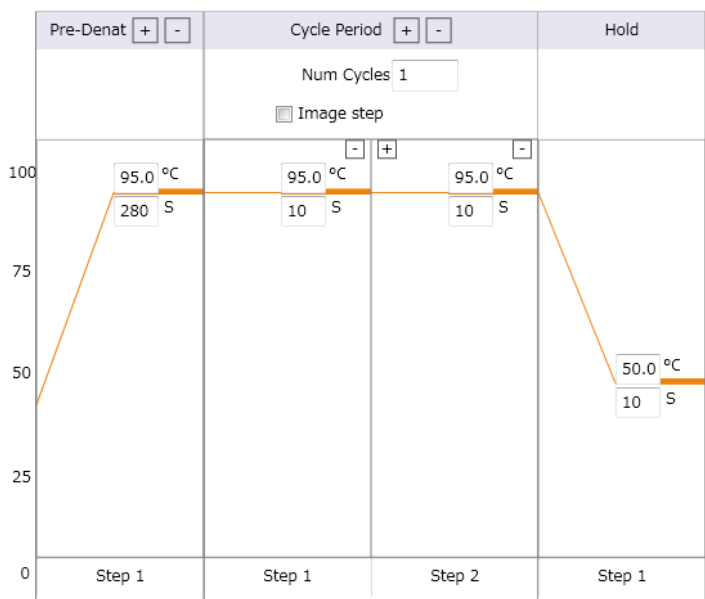
ソフトウェアと装置の終了

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。