

## 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 Direct Detection RT-qPCR Core Kit (RC330A) 専用—

—Primer/Probe N501Y(SARS-CoV-2) (RC344A) 専用—

—Positive Control RNA Set (N501Y) (RC371A) 専用—

このマニュアルでは、SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Core Kit (製品コード RC330A)、Primer/Probe N501Y(SARS-CoV-2) (製品コード RC344A)、Positive Control RNA Set (N501Y) (製品コード RC371A) を用いてリアルタイム PCR を実施する際の操作方を説明します。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 4 の Cy5 にチェック✓を入れる。

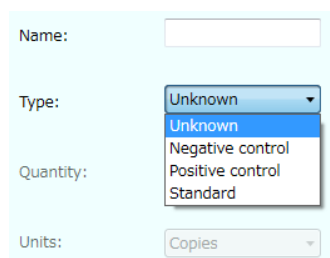


- ウェルをクリックしてサンプル名、タイプを入力する (ラン終了後に行っても良い)。

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。

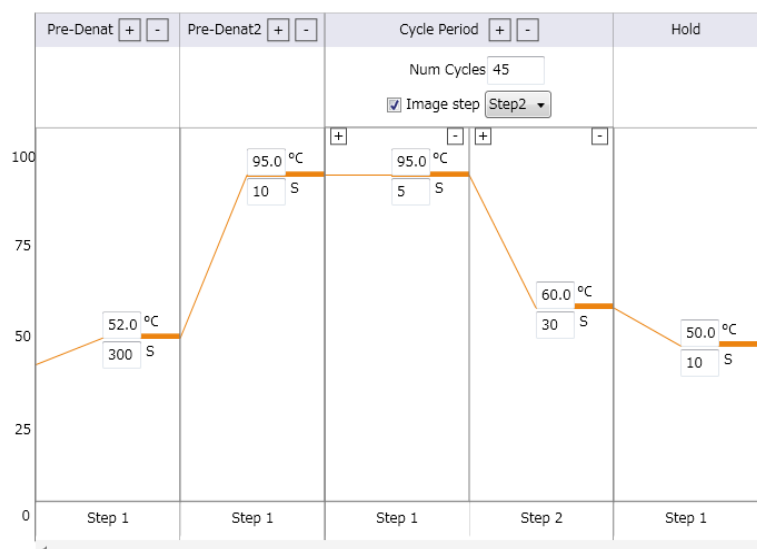
4.3. Cycle Period Step1 は、95°C、5 秒に設定する。

4.4. Cycle Period Step2 は、60°C、30 秒に設定する。

4.5. 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°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。

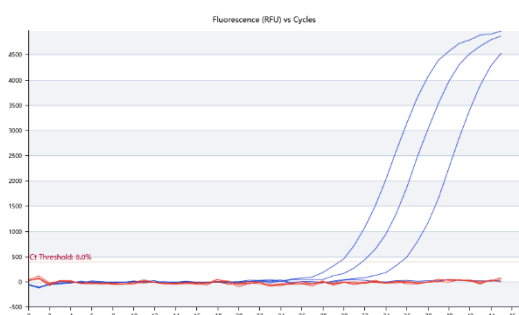
## 結果の解析

反応例として、Twist Bioscience 社の Control 2 (MN908947.3、501N Wild) および Control 16 (B.1.351, EPI\_ISL\_678597、N501Y Mutant)を、1 反応当たり 0 (陰性コントロール) 、50、500、5,000 コピー鑄型として使用した場合の結果を示す。

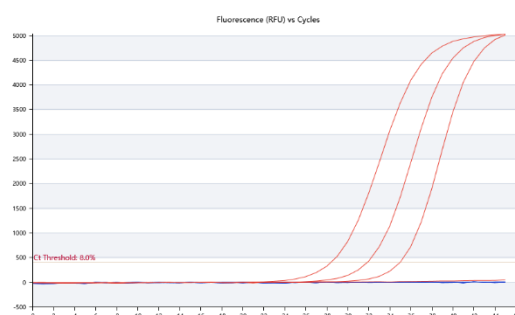
1. Analysis 画面に表示される増幅曲線にて、下記の点を確認する。

- ・ 陰性コントロールで明らかな増幅が得られてないこと。
- ・ 501N Wild、N501Y Mutant の陽性コントロールにて、それぞれ、FAM、Cy5 の何れかのみで増幅が得られ、他方の蛍光色素で明らかな増幅が無いこと。

501N Wild 検出系 (FAM)



N501Y Mutant 検出系 (Cy5)



(Analysis 画面の増幅曲線)

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

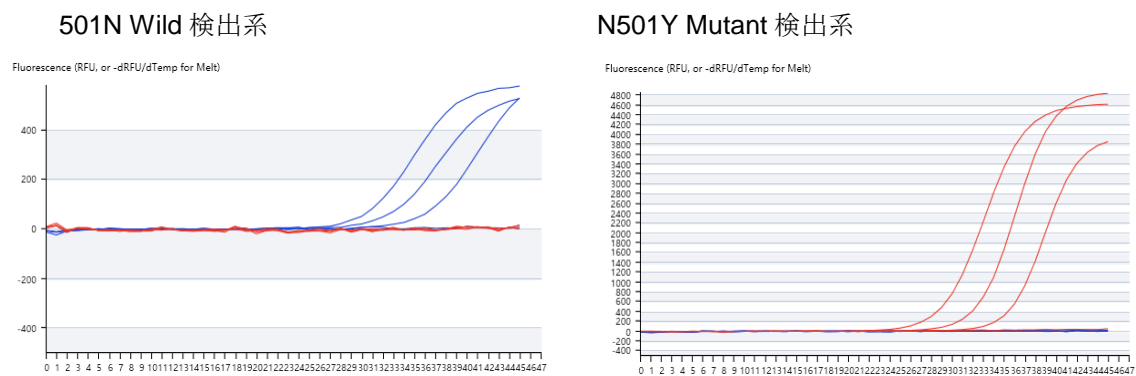
501N Wild 検出系

	Channel 1	Channel 2	Channel 3	Channel 4				
A	1	2	3	4	5	6	7	8
Chan 1	Neg	35.46	31.84	29.55				
Chan 2								
Chan 3								
Chan 4	Neg	Neg	Neg	Neg				

N501Y Mutant 検出系

	Channel 1	Channel 2	Channel 3	Channel 4				
A	1	2	3	4	5	6	7	8
Chan 1	Neg	Neg	Neg	Neg				
Chan 2								
Chan 3								
Chan 4	[Neg]	35.00	31.90	28.41				

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。



(Run 画面の増幅曲線)

## 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 (501N Wild 検出系)	Cy5 (N501Y Mutant 検出系)
Negative Control	不検出※1	不検出※1
501N Wild Template	Ct ≤ 30※2	不検出※1
N501Y Mutant Template	不検出※1	Ct ≤ 30※2

- 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。
- 501N Wild Template は、FAM で検出され、Cy5 で検出されないことを確認する。
- N501Y Mutant Template は、Cy5 で検出され、FAM で検出されないことを確認する。  
501N Wild Template や N501Y Mutant Template が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。

### 【サンプルの測定結果の判定】

FAM (501N Wild 検出系)	Cy5 (N501Y Mutant 検出系)	判定
Ct > 40 または不検出※1	Ct ≤ 40	N501Y 変異あり
Ct ≤ 40	Ct > 40 または不検出※1	N501Y 変異なし
Ct > 40 または不検出※1	Ct > 40 または不検出※1	判定不能

- 501N Wild 検出系、N501Y Mutant 検出系共に Ct > 40 または不検出であった場合は、  
判定不能となる。予めPCR 検査でSARS-CoV-2 陽性であることを確認したサンプル  
を使用した場合は、検出限界以下あるいは他の変異の可能性はある。SARS-CoV-2  
の有無が未確認のサンプルを使用した場合は、SARS-CoV-2 陰性の可能性がある。

※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。

※2 コントロール反応にPositive Control RNA Set (N501Y)（製品コードRC371A）を使用した  
場合の判定基準です。

### 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

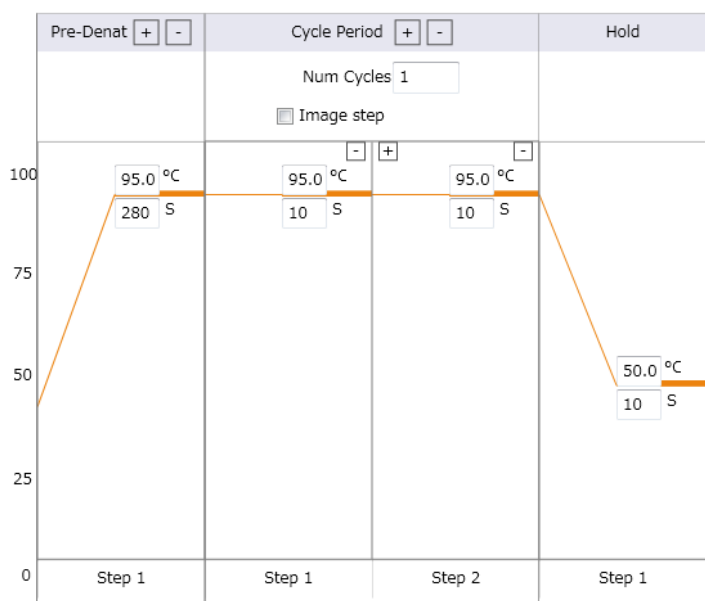
### ソフトウェアと装置の終了

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。