

製品コード RC303A

研究用

Takara

SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (ORF1b)

説明書

本製品は研究用試薬です。生体試料を用いた SARS-CoV-2 感染の診断補助には、体外診断用医薬品 Takara SARS-CoV-2 ダイレクト PCR 検出キット（製品コード RD001/RD003）をご使用ください。

v202212Da

本製品は、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) および内在性コントロール (IC : Internal Control、ヒト RNaseP 遺伝子) を検出するためのリアルタイム RT-PCR キットです。SARS-CoV-2 は ORF1b 遺伝子をターゲットとしています。

【本製品のプライマー・プローブ配列について】

SARS-CoV-2 の ORF1b 遺伝子の検出系は、*Sci Rep.* 2021 Jun 15;11(1):12565. に記載されたプライマー・プローブ配列を参考にしています。

| 遺伝子領域 | プライマー・プローブ名 | プライマー・プローブ配列 (5' → 3') |
|-------|-------------|----------------------------|
| ORF1b | UFRN_7_F | CTTCACGACATTGGTAACCCT |
| | UFRN_7_R | GTCACTACAAGGCTGTGCAT |
| | UFRN_7_P | GTGTACCTCAAGCTGATGTAGAATGG |

【検出対象とプローブ標識】

| 検出対象 | プローブ標識 |
|------------------|------------------------------|
| ORF1b | Cyanine5 (レポーター) / ダーククエンチャー |
| Internal Control | FAM (レポーター) / ダーククエンチャー |

【特長】

- RNA 精製は不要
サンプルと前処理試薬の混合液を熱処理するだけの簡単な前処理でリアルタイム RT-PCR への添加溶液を調製できます。
- 2 領域同時検出でより高感度かつ特異的に検出
2 ヶ所の遺伝子領域をターゲットとして同時検出するため、高感度で特異性の高い検出が可能と考えられます。
- 鋳型持ち込み量が多く高感度に検出
リアルタイム RT-PCR の鋳型として初発サンプル 4.8 μ l 相当を持ち込むため、精製 RNA を用いた場合と同等の高感度検出が可能です。
- 前処理から検出まで 1 時間以内、迅速に判定可能
所要時間は、前処理が約 10 分、リアルタイム RT-PCR が約 50 分の迅速な検査法です。

I. 内容 (100 回分)

簡易抽出試薬

● Solution A 800 μ l

RT-qPCR 試薬

| | | |
|---|------|-----------------|
| ○ RT-qPCR Mix* ¹ | 2 × | 750 μ l × 2 |
| ● Primer/Probe Mix ORF1b (SARS-CoV-2)* ² | 10 × | 300 μ l |
| ⊕ RNase Free H ₂ O | | 1 ml |
| ● ROX Reference Dye II* ³ | 50 × | 60 μ l |

* 1 : 酵素、基質等を含みます。

* 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。

* 3 : 蛍光物質を含んでいるため、遮光に留意してください。

II. 保存 - 20°C

III. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器 (主なもの)

【試薬】

- ・コントロール RNA
 - [ORF1b の Template として使用]
 - Control 2 (MN908947.3) (Twist Bioscience 社 Code. 102024)
 - [インターナルコントロールの Template として使用]
 - Takara SARS-CoV-2 Positive Control (RNA) (製品コード RC351A : 別売)

【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)
- ・リアルタイム PCR 用のチューブ 等

【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)
 - CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System シリーズ (製品コード 640231/640232)
 - CronoSTAR Portable Real-Time PCR System シリーズ (製品コード 640247/640249)
 - CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
 - CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
 - LightCycler 96 System/ LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics 社)
 - Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
 - QuantStudio 5 Real-Time PCR System (96-well, 0.2 mL block) (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

本製品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
本製品は研究用試薬です。
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、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。
(反応結果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、サンプル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. RT-qPCR Mix を使用する際には、泡立てないように穏やかに転倒混和し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬が完全に混和されていない場合、十分な反応性が得られなくなります。ボルテックスによる混合は行わないでください。なお、保存中に沈殿を生じた場合には、軽く手で温めるか室温にしばらく置いた後、転倒混和することで完全に溶解します。必ず均一に混合し、軽くスピンドウンしてからご使用ください。
2. RT-qPCR Mix 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. Primer/Probe Mix および ROX Reference Dye II 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場合がありますので、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. コンタミネーション防止のため、リアルタイム RT-PCR 反応液の調製は操作毎にエリア分けをして、物理的に隔離することを推奨します。「VII. 補足：エリア分けについて」をご参照ください。どのエリアにおいても、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。
 - エリア 1：反応液の調製を行います。
 - エリア 3：反応液と鋳型の混合を行います。本製品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. 本製品はリアルタイム 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つた場合、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

サンプルの採取と保存

本製品では核酸精製を行いませんので、タンパク質変性剤やエタノール等を含む溶液にサンプルを懸濁した場合、PCR 反応に影響を及ぼす可能性があります。必要に応じて、本製品との適合性（PCR 阻害の有無など）を事前に確認した上でご使用ください。

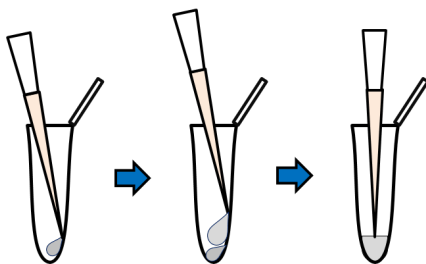
VI-1. 前処理（核酸の簡易抽出）（BSL2 実験室内で実施）

- 1) サンプルと前処理試薬の混合（安全キャビネット内で実施）
 - (1) サンプル数分のチューブを用意する。
 - (2) ● Solution A を 4 μl ずつ分注する。
 - (3) (2) にサンプルを 16 μl 添加し、数回のピペッティングで混合する（または、チューブの蓋をした後にタッピングで混合し、スピンドウンする）。

| [1 反応分の混合液] | 使用量 |
|---------------|------------------|
| ● Solution A | 4 μl |
| サンプル | 16 μl |
| Total | 20 μl |

[操作上の注意点]

液量が少ないので、(2) のステップで ● Solution A は、チューブ壁の下の方に分注してください。その後、(3) のステップでサンプルを ● Solution A と同じところに添加し、そのまま数回ピペッティングして溶液を混合（または、チューブの蓋をした後にタッピングで混合）します。



- 2) サーマルサイクラーまたはヒートブロック（リッドヒーター付きのもの）で以下の熱処理を行う。

95°C 5 分 (→ 4 ~ 10°C *)

* : 加熱処理後は、速やかにリアルタイム RT-PCR 反応液に添加し、反応を開始してください。前処理済の溶液を一時保存する場合は、氷上または 4°C で保存してください。

VI-2. リアルタイム RT-PCR 反応

【コントロール反応について】

結果の判定を正しく行うため、陰性・陽性コントロール反応を行ってください。それぞれ、以下の溶液をリアルタイム RT-PCR 反応の鑄型として添加します。

陰性コントロール (NC)

Takara SARS-CoV-2 Positive Control (RNA) に含まれる Negative Control を「陰性コントロール (NC)」として使用します。

陽性コントロール (ORF1b)

Control 2 (MN908947.3) (Twist Bioscience 社 Code. 102024) を 1×10^4 copies/ μ l に希釈した溶液を「陽性コントロール (ORF1b)」として使用します。

陽性コントロール (IC)

Takara SARS-CoV-2 Positive Control (RNA) に含まれる Positive Control RNA Mix を EASY Dilution (for Real Time PCR) で 100 倍希釈*した溶液を「陽性コントロール (IC)」として使用します。

* : 2 μ l の Positive Control RNA Mix に 198 μ l の EASY Dilution (for Real Time PCR) を加えて調製した 1/100 希釈溶液を使用します (用時調製)。

1) リアルタイム RT-PCR 反応液のマスターミックスの調製 (エリア 1 で実施)

以下の組成で、必要数 (サンプル数 + NC、PC) + α のマスターミックスを氷上で調製し、リアルタイム PCR 用チューブに 24 μ l ずつ分注する。

[注意] 分注操作は室温で行ってください。氷上で行うと、リアルタイム RT-PCR 反応実施時の温度変化により蛍光検出に影響を及ぼす場合があります。調製後は速やかに反応を開始してください。

【ROX Reference Dye を使用しない場合*1】

[1 反応分のマスターミックス]

| 試薬 | 使用量 |
|--|------------|
| ○ RT-qPCR Mix (2 \times) | 15 μ l |
| ● Primer/Probe Mix ORF1b (SARS-CoV-2) (10 \times) | 3 μ l |
| ⊕ RNase Free H ₂ O | 6 μ l |
| Total | 24 μ l |

* 1 : 対象機種

- 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)
- CronoSTAR 96 Real-Time PCR System シリーズ (製品コード 640231/640232)
- CronoSTAR Portable Real-Time PCR System シリーズ (製品コード 640247/640249)
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
- CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
- LightCycler 96 System/ LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics 社)

【 ROX Reference Dye を使用する場合*2】

[1 反応分のマスターミックス]

| 試薬 | 使用量 |
|---|-------------|
| ○ RT-qPCR Mix (2×) | 15 μ l |
| ● Primer/Probe Mix ORF1b (SARS-CoV-2) (10×) | 3 μ l |
| ● ROX Reference Dye II (50×) | 0.6 μ l |
| Ⓜ RNase Free H ₂ O | 5.4 μ l |
| Total | 24 μ l |

* 2 : 対象機種

- Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System
- QuantStudio 5 Real-Time PCR System (96-well, 0.2 mL block)
(ともに Thermo Fisher Scientific 社)

2) 鑄型の添加 (エリア 3 で実施)

「VI-1. 前処理 (核酸の簡易抽出)」を実施した測定試料 (または陰性コントロール (NC)、陽性コントロール (ORF1b)、陽性コントロール (IC)) を 6 μ l 分取し、分注済のマスターミックスに添加する。

3) リアルタイム RT-PCR 反応の実施

以下の条件で反応を実施する。

[注意] 反応前に必ずチューブやプレートをスピンドウンし、内壁への反応液の付着や気泡がないことを確認してください。気泡があると、蛍光検出に影響を及ぼす場合があります。

<反応条件>

(1) 逆転写反応

52°C 5分

95°C 10秒

(2) PCR : 45 サイクル

95°C 5秒

60°C 30秒 (蛍光検出 : Cy5/FAM(/ROX))

※ Thermal Cycler Dice Real Time System III では、Speed は Fast を選択し、解析する際に正規化補正を OFF にしてください。

※ Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System、QuantStudio 5 Real-Time PCR System では Run mode/Ramp speed を Fast に設定してください。

VI-3. 判定

反応終了後、増幅曲線を確認し、解析パラメータが適切であることを確認し*、Ct 値を算出する。

*：解析方法は、ご使用のリアルタイム PCR 装置の取扱説明書をご参照ください。

【検出対象と蛍光検出フィルター】

| 検出対象 | 蛍光検出フィルター |
|------------------|-----------|
| ORF1b | Cy5 |
| Internal Control | FAM |

【コントロール反応の判定】

データ解析後、コントロール反応の結果が以下の条件を満たすことを確認する。

| | SARS-CoV-2 (Cy5) | IC (FAM) |
|------------------|------------------|--------------|
| 陰性コントロール (NC) | 不検出 | 不検出 |
| 陽性コントロール (ORF1b) | $Ct \leq 30$ | 不検出 |
| 陽性コントロール (IC) | 不検出 | $Ct \leq 30$ |

- ・ 陰性コントロール (NC) 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。
- ・ 陽性コントロール (ORF1b) は、SARS-CoV-2 (Cy5) で、陽性コントロール (IC) は、IC (FAM) で Ct 値が 30 以下であることを確認する。Ct 値が 30 より大きい場合、または不検出となる場合は、何らかの原因でリアルタイム RT-PCR 反応や検出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】

算出された Ct 値を用いて、以下の判定表に従って判定します。

| | | SARS-CoV-2 (Cy5) | |
|----------|----------------|------------------|----------------|
| | | ≤ 40 | > 40 または 不検出 |
| IC (FAM) | ≤ 40 | 陽性 | 検出限界以下*1 |
| | > 40 または 不検出 | 陽性 | 別法での再測定を推奨*2 |

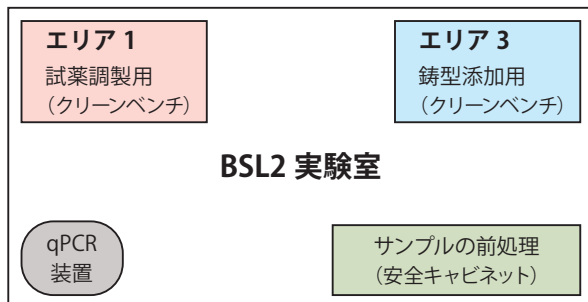
- *1：検出限界以下と判定された場合でも、40 サイクルより後で増幅曲線の立ち上りが認められた場合には、低コピーの新型コロナウイルス遺伝子が存在する可能性があります。
- *2：IC (FAM) の Ct 値が 40 より大きい場合、検体量の不足や劣化または PCR 阻害の疑いがあります。RNA 精製を行う手法での再測定により判定することを推奨します。例えば、国立感染症研究所の「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver. 2.9.1」3) に記載された方法で RNA 精製を行った後、本品で「VI-1. 前処理 (核酸の簡易抽出)」を実施せず、「VI-2. リアルタイム RT-PCR 反応」の 2) において、精製 RNA を 6 μ l 分取し、分注済のマスターミックスに添加します。

VII. 補足：エリア分けについて

サンプルの取り扱い、BSL2 実験室の安全キャビネット内で行います。また、前処理が完了するまでは感染性を有する場合がありますので、BSL2 実験室内で実施してください。リアルタイム RT-PCR 反応液の調製は、BSL2 実験室内で行う必要はありませんが、試薬へのコンタミネーション防止のため、エリア 1 とエリア 3 の区分けをすることをお勧めします。

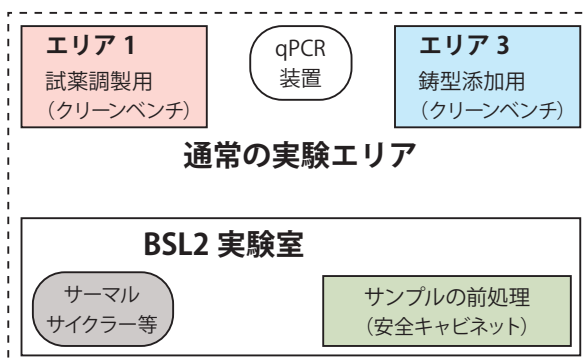
- エリア 1：PCR 反応試薬のみを扱うエリア（鋳型核酸の持ち込み禁止）
- エリア 3：主に鋳型核酸を扱うエリア

【BSL2 実験室内ですべての操作を実施する場合】



1. 安全キャビネットですンプルと前処理試薬を混合する。
2. 前処理液の熱処理を行う。
3. エリア 1 のクリーンベンチでリアルタイム RT-PCR 反応のマスターミックスを調製する。
4. エリア 3 のクリーンベンチで前処理後の溶液をマスターミックスに添加する。
5. NC、PC の添加もエリア 3 のクリーンベンチで行う。
6. qPCR 装置でリアルタイム RT-PCR を実施する。

【BSL2 実験室内で前処理までの操作を実施する場合】



< BSL 実験室内で >

1. BSL2 実験室内の安全キャビネットですンプルと前処理試薬を混合する。
2. BSL2 実験室内のサーマルサイクラー等で前処理液の熱処理を行う。

< 通常の実験エリアで >

3. エリア 1 のクリーンベンチでリアルタイム RT-PCR 反応のマスターミックスを調製する。
4. エリア 3 のクリーンベンチで前処理後の溶液をマスターミックスに添加する。
5. NC、PC の添加もエリア 3 のクリーンベンチで行う。
6. qPCR 装置でリアルタイム RT-PCR を実施する。

VIII. 関連製品

Takara SARS-CoV-2 Positive Control (RNA) (製品コード RC351A)
SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (製品コード RC300A/RC30JW)
SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (ORF1a) (製品コード RC302A)
Thermal Cycler Dice® Real Time System III (Cy5) with PC (製品コード TP990)
CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System シリーズ (製品コード 640231/640232)
CronoSTAR™ Portable Real-Time PCR System シリーズ (製品コード 640247/640249)
RNase-free Water (製品コード 9012)
EASY Dilution (for Real Time PCR) (製品コード 9160)
0.1 ml 8-strip -neo- tube & cap Set (製品コード NJ907)
0.2 ml Hi-8-Tube (製品コード NJ300)
0.2 ml Hi-8-Flat Cap (製品コード NJ302)

IX. 注意

- 本製品は研究用試薬です。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。
- 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登録商標です。CronoSTAR はタカラバイオ株式会社の商標です。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