

製品コード RC323A

研究用

Takara

**Primer/Probe G339D
(SARS-CoV-2)**

説明書

本製品は研究用試薬です。環境調査や疫学調査などに使用します。

v202112Da

本製品は、リアルタイム RT-PCR 法により新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) のスパイクタンパク質にみられる変異のうち、G339D 変異と野生型株の 339G を識別するためのプライマー・プローブです。リアルタイム RT-PCR 試薬 SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Core Kit (製品コード RC330A) との組み合わせにより、ダイレクト検出が可能です。

G339D 変異は、新型コロナウイルスのスパイクタンパク質遺伝子に起きた塩基置換によるアミノ酸変異です。G339D 変異を持つ変異株としては、オミクロン株 (EPI_ISL_6913953.2) などが知られています。

※ 本製品の製品化にあたっては、群馬パース大学大学院 木村博一教授に監修いただきました。

【特長】

- 新型コロナウイルス検出キット (Direct) (SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit : 製品コード RC300A/RC30JW) と同じ反応系を採用しています。
- 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。
- 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 5 分、リアルタイム RT-PCR が約 50 分の迅速な検査法です。

【検出対象とプローブ標識】

検出対象	プローブ標識
339G Wild	FAM (レポーター) / ダーククエンチャー
G339D Mutant	Cyanine5 (レポーター) / ダーククエンチャー

I. 内容

Primer/Probe G339D 10 × 300 μl

※ 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。

II. 保存

− 20℃

III. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器（主なもの）

【試薬】

- ・リアルタイム RT-PCR 試薬
 - SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Core Kit（製品コード RC330A）
- ・コントロール RNA
 - Positive Control RNA Set (Omicron)（製品コード RC379A）

【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）
 - CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System シリーズ（製品コード 640231/640232）*1
 - CFX96 Touch Deep Well 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）等*2

* 1：操作方法の詳細は、「CronoSTAR 96 Real-Time PCR System シリーズ操作マニュアル－新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）変異検出用プライマー・プローブ各種専用－」（タカラバイオのオンラインカタログで公開）をご参照ください。

* 2：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 分間以上加熱滅菌処理、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. Primer/Probe G339D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。使用後は-20℃に保存してください。
2. 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。
3. 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可能性がありますので、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。
4. 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して、物理的に隔離することを推奨します。「X. 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。
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。
5. リアルタイム PCR 装置の取り扱いは、それぞれの装置の取扱説明書に従ってください。
6. 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った場合、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。
7. リアルタイム PCR 装置の機種によっては、波長ごとの最終蛍光強度に差が生じる場合があります。全 target を同時に表示すると特定の増幅曲線が小さく表示される場合は、各波長で target を別々に表示させて解析してください。

VI. サンプルの採取について

SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Core Kit（製品コード RC330A）と組み合わせた Direct 法で実施する場合は、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、本製品をご使用ください。

[備考]

- 本製品 Primer/Probe G339D (SARS-CoV-2) は精製 RNA サンプルからの検出でも使用可能です。RNA 精製を行った後、次頁の「VII-1. 前処理 (核酸の簡易抽出)」を実施せず、「VII-2. リアルタイム RT-PCR 反応 3) 鋳型の添加」において、6 μ l の精製 RNA を分注済のマスターミックスに添加します。
- Primer/Probe G339D (SARS-CoV-2) を One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix（製品コード RR600A/B）と組み合わせて RNA 精製法で実施することも可能です。

VII. 操作

SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Core Kit (製品コード RC330A)、Positive Control RNA Set (Omicron) (製品コード RC379A) と組み合わせて使用する場合の操作法を以下に示します。

VII-1. 前処理 (核酸の簡易抽出) (BSL2 実験室内で実施)

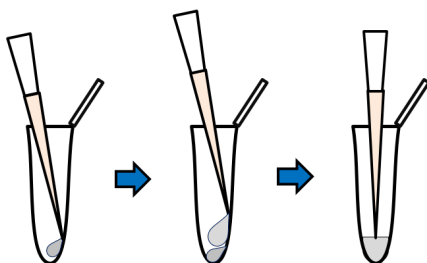
- 1) サンプルと前処理試薬の混合 (安全キャビネット内で実施)
 - (1) サンプル数分の qPCR 用チューブを用意する。
 - (2) qPCR 用チューブに Solution A を $4 \mu\text{l}$ ずつ分注する。
 - (3) (2) の qPCR 用チューブにサンプルを $16 \mu\text{l}$ 添加し、数回のピペッティングで混合する (または、チューブの蓋をした後にタッピングで混合し、スピンドウンする)。

[1 反応分の混合液]	使用量
Solution A	$4 \mu\text{l}$
サンプル	$16 \mu\text{l}$
Total	$20 \mu\text{l}$

※前処理の反応液量は、 $40 \mu\text{l}$ までスケールアップ可能です。

[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) qPCR 装置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。

VII-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、Negative Control、339G Wild Template、G339D Mutant Template の3種類のコントロール反応を行ってください。

Positive Control RNA Set (Omicron) (製品コード RC379A) のうち、以下の溶液をリアルタイム RT-PCR 反応の鋳型として添加します。

<u>Negative Control (NC)</u>	
Negative Control	6 μ l
<u>339G Wild Template (Wild)</u>	
Positive Control RNA (wild) (1/100 希釈) *	6 μ l
<u>G339D Mutant Template (Mutant)</u>	
Positive Control RNA (Omicron) (1/100 希釈) *	6 μ l

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

- 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、Wild、Mutant) + α のマスターミックスを氷上で調製する。

【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	15.0 μ l
Primer/Probe G339D (10 \times)	3.0 μ l
RNase Free H ₂ O	6.0 μ l
Total	24.0 μ l

* 1 : 対象機種

- 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)
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
- LightCycler 96 System/LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics 社) 等

【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	15.0 μ l
Primer/Probe G339D (10 \times)	3.0 μ l
ROX Reference Dye II (50 \times)	0.6 μ l
RNase Free H ₂ O	5.4 μ l
Total	24.0 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) 等

[注意] 以下 2)、3) の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。

2) マスターミックスの分注 (エリア 1 で実施)

qPCR 用のチューブにマスターミックスを 24 μ l ずつ分注する。

3) 鑄型の添加 (エリア 3 で実施)

サンプル : 前処理済の溶液を 6 μ l 分取し、添加する。

コントロール : NC、Wild、Mutant の溶液を 6 μ l 添加する。

4) 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 $^{\circ}$ C 5 分

95 $^{\circ}$ C 10 秒

(2) PCR : 45 サイクル

95 $^{\circ}$ C 5 秒

60 $^{\circ}$ C 30 秒 (蛍光検出 : FAM/Cy5/(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。

VIII. 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*1、2、Ct 値を算出する。

* 1：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。

* 2：本検出系では、わずかにクロス反応が生じることがあります。必ず、コントロール反応の結果を参考に適切な位置に閾値を設定してください。

【コントロール反応の判定】

	FAM (339G Wild 検出系)	Cy5 (G339D Mutant 検出系)
Negative Control	不検出	不検出
339G Wild Template	$Ct \leq 30$	不検出
G339D Mutant Template	不検出	$Ct \leq 30$

- 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。
- 339G Wild Template は FAM で検出され、Cy5 で検出されないことを確認する。
- G339D Mutant Template は Cy5 で検出され、FAM で検出されないことを確認する。
339G Wild Template や G339D 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】

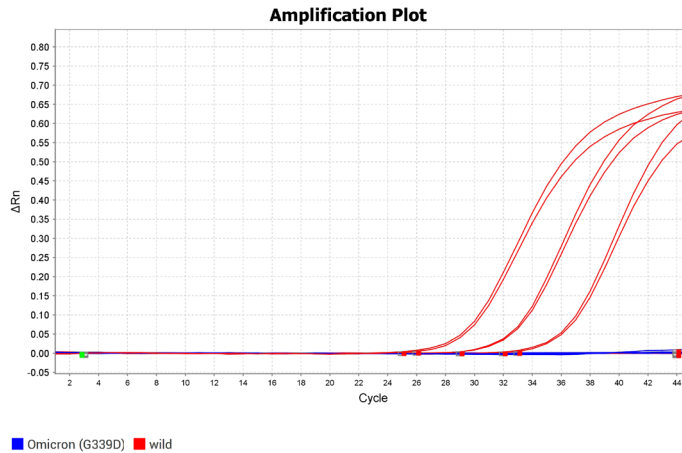
FAM (339G Wild 検出系)	Cy5 (G339D Mutant 検出系)	判定
$Ct > 40$ または不検出	$Ct \leq 40$	G339D 変異あり
$Ct \leq 40$	$Ct > 40$ または不検出	G339D 変異なし (Wild Type(339G))
$Ct > 40$ または不検出	$Ct > 40$ または不検出	判定不能

- 339G Wild 検出系、G339D 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がある。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。

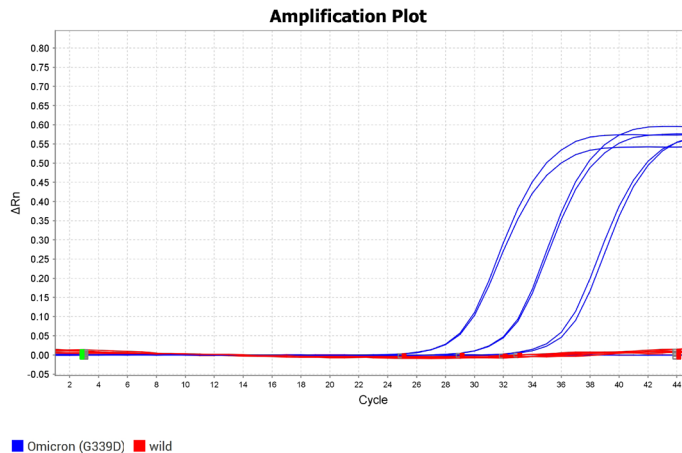
IX. 実験例

Positive Control RNA Set (Omicron) の Positive Control RNA (wild) および Positive Control RNA (Omicron) を適宜希釈し、1 反応当り 0 (Negative Control)、50、500、5,000 コピーを鑄型として使用した場合の反応例を以下に示す。
(qPCR 装置は QuantStudio 5 Real-Time PCR System を使用)

<鑄型> Positive Control RNA (wild)



<鑄型> Positive Control RNA (Omicron)

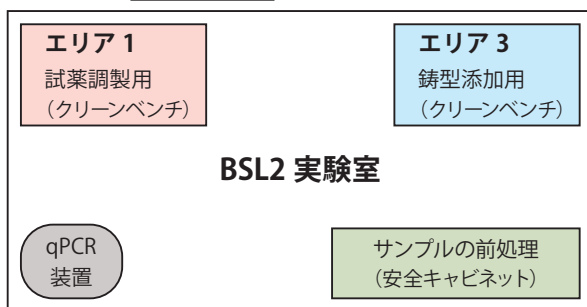


X. 補足：エリア分けについて

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。

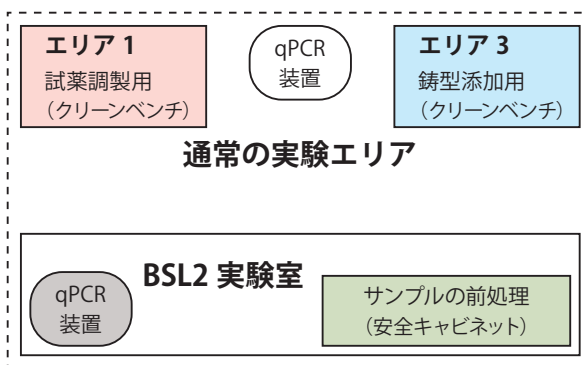
- エリア 1：PCR 反応試薬のみを扱うエリア（鋳型核酸の持ち込み禁止）
- エリア 3：主に鋳型核酸を扱うエリア

【BSL2 実験室内ですべての操作を実施する場合】



1. 安全キャビネット内でサンプルと前処理試薬を混合する。
2. qPCR 装置で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し、リアルタイム PCR 用のチューブまたはプレートに分注する。
4. エリア 3 のクリーンベンチで分注したマスターミックスに前処理後の溶液を添加する。
5. Control Template 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】



< BSL2 実験室内で >

1. BSL2 実験室内の安全キャビネット内でサンプルと前処理試薬を混合する。
2. BSL2 実験室内の qPCR 装置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し、リアルタイム PCR 用のチューブまたはプレートに分注する。
4. エリア 3 のクリーンベンチで分注したマスターミックスに前処理後の溶液を添加する。
5. Control Template 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。

XI. 関連製品

SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Core Kit (製品コード RC330A)
Positive Control RNA Set (Omicron) (製品コード RC379A)
SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (製品コード RC300A/RC30JW)
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)

XII. 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、PrimeScript 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