

製品コード RC330A

研究用

Takara

SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Core Kit

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。

v202104Da

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) の検出を行うためのコアキットです。別売りの検出用 Primer/Probe と組み合わせて使用します。
なお、本製品の試薬組成は、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) と同一です。

【本製品と組み合わせて使用する Primer/Probe】

Primer/Probe N501Y (SARS-CoV-2) (製品コード RC344A)

Primer/Probe E484K (SARS-CoV-2) (製品コード RC345A)

I. 内容

● Solution A		800 μ l
○ RT-qPCR Mix	2 ×	750 μ l × 2
⊕ _{H₂O} RNase Free H ₂ O		1 ml
● ROX Reference Dye II	50 ×	60 μ l

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】

- ・ Primer/Probe (以下のいずれか)
 - Primer/Probe N501Y (SARS-CoV-2) (製品コード RC344A)
 - Primer/Probe E484K (SARS-CoV-2) (製品コード RC345A)

【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

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. RT-qPCR Mix を使用する際には、泡立てないよう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. 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。
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して、物理的に隔離することを推奨します。「VIII. 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。
7. リアルタイム PCR 装置の取り扱い、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。

VI. サンプルの採取について

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、本製品をご使用ください。

VII. 操作

Primer/Probe Mix (10 ×) と組み合わせて使用する場合の一般的な操作法を以下に示します。操作方法の詳細は、使用する Primer/Probe Mix の取扱説明書をご参照ください。

VII-1. 前処理 (核酸の簡易抽出) (BSL2 実験室内で実施)

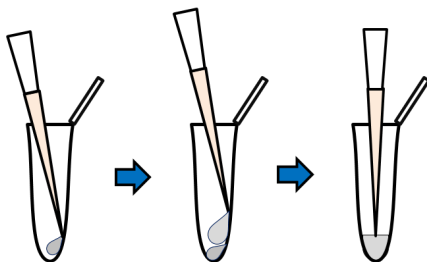
- 1) サンプルと前処理試薬の混合 (安全キャビネット内で実施)
 - (1) サンプル数分の qPCR 用チューブを用意する。
 - (2) qPCR 用チューブに ● Solution A を 4 μ l ずつ分注する。
 - (3) (2) の qPCR 用チューブにサンプルを 16 μ l 添加し、数回のピペッティングで混合する (または、チューブの蓋をした後にタッピングで混合し、スピンドアウンする)。

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

※前処理の反応液量は、40 μ 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 (NC)、Positive Control (PC) のコントロール反応を行ってください。

- 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する。

【ROX Reference Dye を使用しない場合】

[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 Mix (10 \times)	3.0 μ l
⊕ RNase Free H ₂ O	6.0 μ l
Total	24.0 μ l

【ROX Reference Dye を使用する場合】

[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 Mix (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

[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。

- 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。
- 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、PC 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℃ 5分

95℃ 10秒

(2) PCR：45 サイクル

95℃ 5秒

60℃ 30秒 (蛍光検出：FAM/Cy5(/ROX))

※ 上記は Primer/Probe N501Y (SARS-CoV-2) (製品コード RC344A) の条件を例示しています。

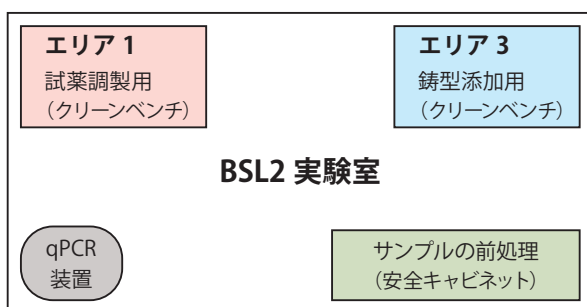
反応温度・時間は、使用する Primer/Probe Mix の取扱説明書に従って設定してください。

VIII. 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。

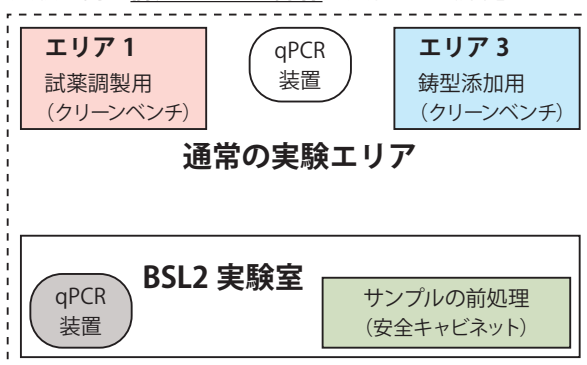
- エリア 1：PCR 反応試薬のみを扱うエリア（鋳型核酸の持ち込み禁止）
- エリア 3：主に鋳型核酸を扱うエリア

【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。

IX. 関連製品

Primer/Probe N501Y (SARS-CoV-2) (製品コード RC344A)
Primer/Probe E484K (SARS-CoV-2) (製品コード RC345A)
Positive Control RNA Set (N501Y) (製品コード RC371A)
Positive Control RNA Set (E484K) (製品コード RC372A)
Thermal Cycler Dice® Real Time System III (Cy5) with PC (製品コード TP990)

X. 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。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