

CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR Systemシリーズ

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)変異検出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。

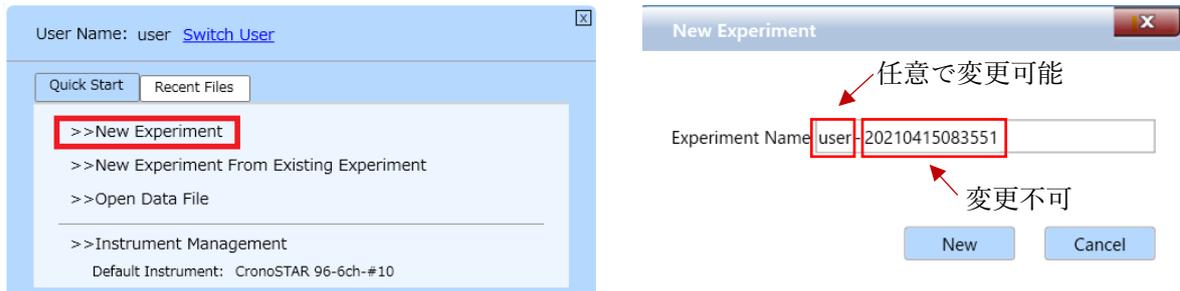
また、本装置は研究用機器であり、医薬品医療機器等法に定められる医療機器ではありません。

CronoSTAR 96 リアルタイムPCR装置とソフトウェアの起動

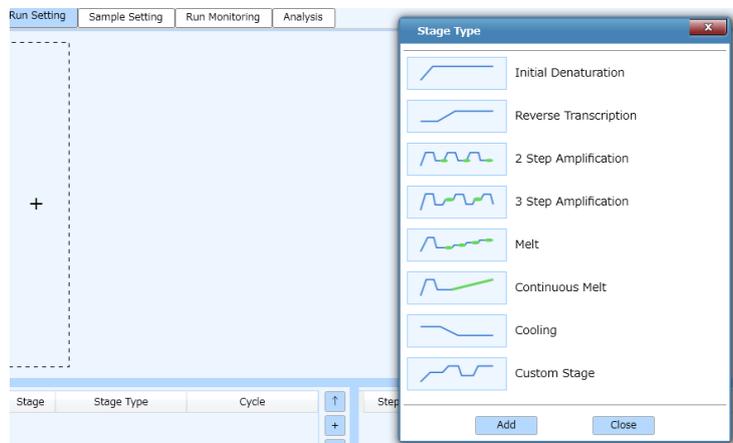
1. リアルタイムPCR装置本体の電源をONにする。
2. コンピューターの電源をONにする。
3. CronoSTAR 96ソフトウェアを起動する。

ランファイルの作成とランの開始

1. New Experimentをクリックし名前を入力してランファイルを作成する。



2. Run Settingタブの[+]を押し[Reverse Transcription],[2 Step Amplification],[Cooling]を追加する。



2.1. [Reverse Transcription]の設定

2.1.1. Step1は、52°C、5分、Ramp 6.1°C/sの設定にする。

2.1.2. Step2は、95°C、10秒、Ramp 6.1°C/sの設定にする。

2.2. [2 Step Amplification]の設定

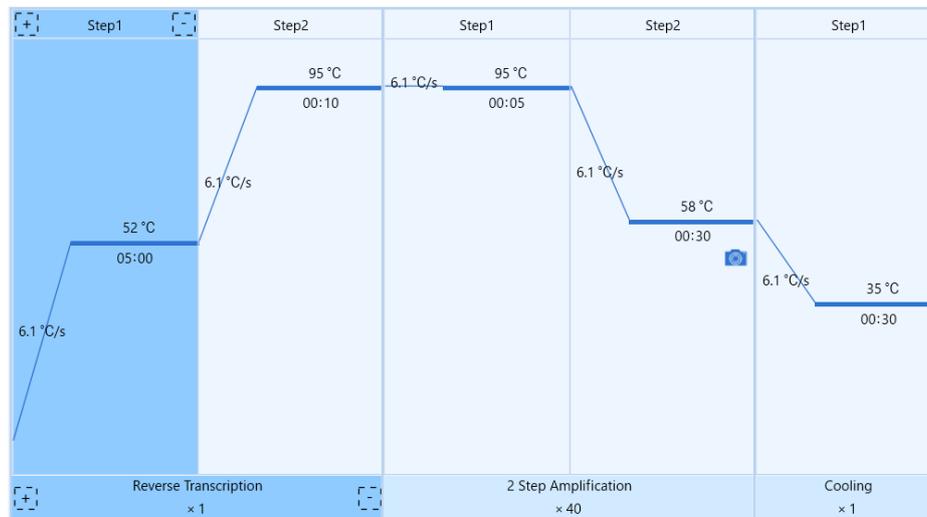
2.2.1. Step1は、95°C、5秒、Ramp 6.1°C/sの設定にする。

2.2.2. Step2は、58°C、30秒、Ramp 6.1°C/sの設定にする。

2.2.3. サイクル数を×40から×45に変更する。

2.3. [Cooling]の設定

2.3.1 Step1は、35°C、30秒、Ramp 6.1°C/sの設定にする。



3. ExperimentのTube Type [Clear]、Reaction Volume [30μL]、Lid Heating[105°C]に設定する。

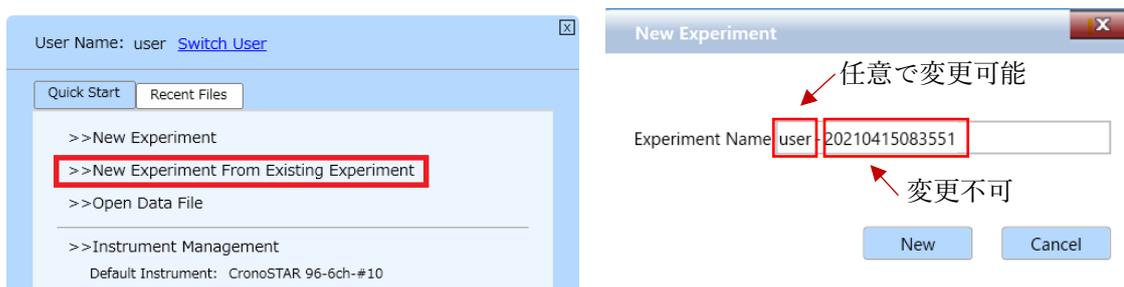
Experiment

Tube Type:

Reaction Volume: μL

Lid Heating: °C Open

※ 他のランファイルからの設定を読み込む場合



以前と同じPCR条件でランを行う場合には、**New Experiment From Existing Experiment**をクリックし参照したいファイルを選択、名前を入力してランファイルを作成する。

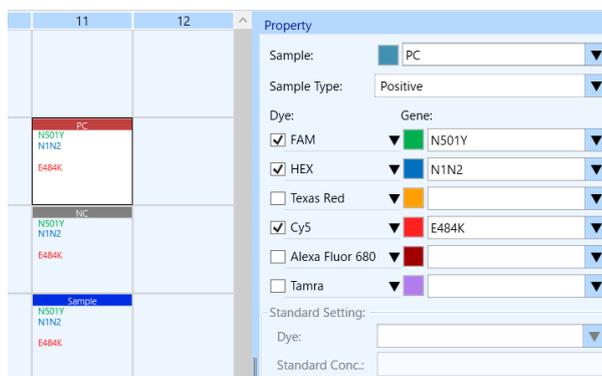
4. Sample Setting タブでサンプルの情報を入力する（後で入力可）。

該当するウェルを選択し、「Sample」にサンプル名、「Sample Type」を下記より選択する。

- ・ 陰性コントロール ⇒ 「Negative」
- ・ 陽性コントロール ⇒ 「Positive」
- ・ 検査対象サンプル ⇒ 「Unknown」

また、「Dye」については、「FAM」と「HEX」と「Cy5」にチェック✓をいれ、対応する「Gene」の名称を下記の通り設定する。

- ・ FAM ⇒ N501Y
- ・ HEX ⇒ N1N2
- ・ Cy5 ⇒ E484K



※ 自動解析の機能を有効に活用するため、陰性コントロール、陽性コントロール、検査対象サンプルのすべてのサンプルでFAM、HEX、Cy5の「Gene」の名称をそれぞれ共通のものに必ず設定してください。

※ コントロールキーを押しながら複数のウェルを選択することで、複数ウェルで共通の項目を同時に選択／入力することが可能です。

5. 装置にサンプルをセットする。

6. Run MonitoringタブのRunをクリックしてランを開始する

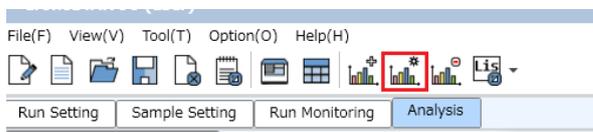


結果の解析

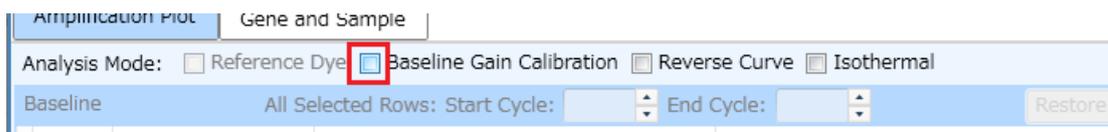
1. Analysisタブで測定結果を確認する。



2. Analysis settingボタンを押すとウィンドウが表示される。



3. Analysis setting ウィンドウのBaseline Gain Calibrationのチェックを外す。



4. [OK]をクリックし「Analysis Setting」のウィンドウを閉じる。

5. Amplification CurveおよびRaw Curve画面でFAM、HEX、Cy5の増幅曲線を表示する。

自動判定では曲線が見られなくとも陽性と判断される場合があるのでRaw Curveで必ず増幅曲線、曲線の立ち上がりについてコントロールと比較して確認する。

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】

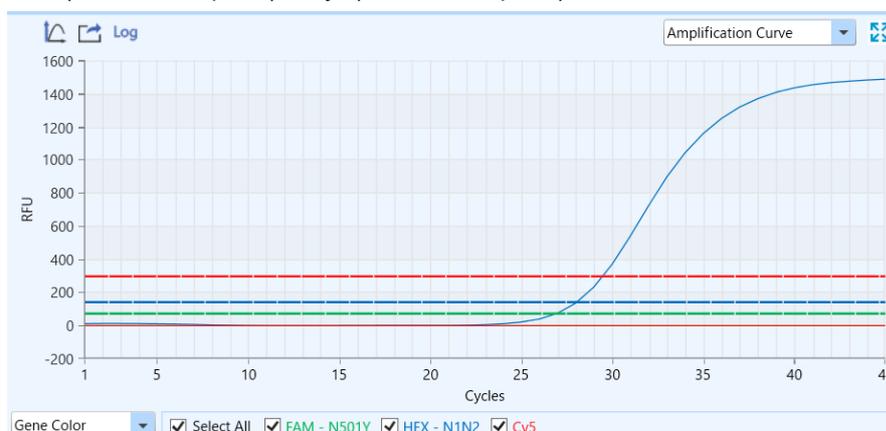
結果が以下の条件を満たすことを確認する。条件を満たさない場合は再測定を推奨する。

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

- Negative Controlは、Ct値が不検出であることを確認する。
Ct値が算出された場合には、「補足②」に従いCt値算出の原因を確認する。また、Ct値算出の原因としてコンタミネーションの疑いがある場合は、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。
- 陽性コントロールにて、N1/N2 TemplateではHEXで、N501Y TemplateではFAMで、E484K TemplateではCy5でCt値が検出され、他のフィルターでは検出されないことを各増幅曲線にて確認する。
- 正しい波長でCt値が検出されない場合は、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 (HEX)を鋳型として使用した場合の例

FAM(N501Y Template)とCy5(E484K Template)についても同様の方法で確認する。



【サンプルの測定結果の判定】

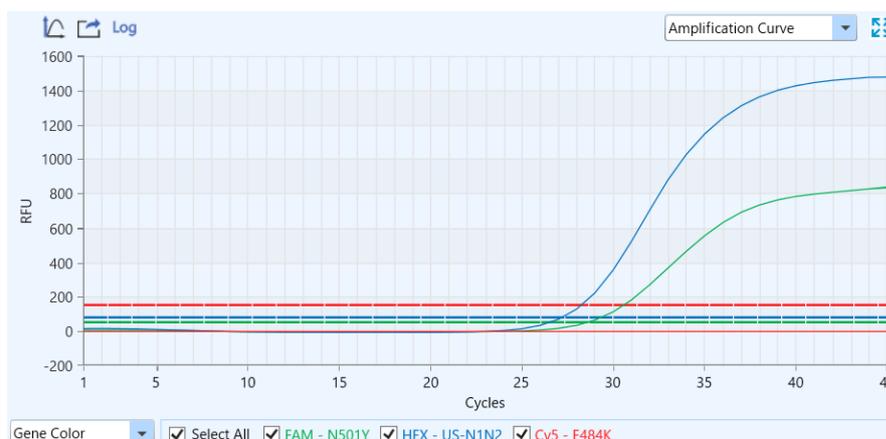
算出された Ct 値を用いて以下の判定表に従って陽性／陰性を判定する。

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	

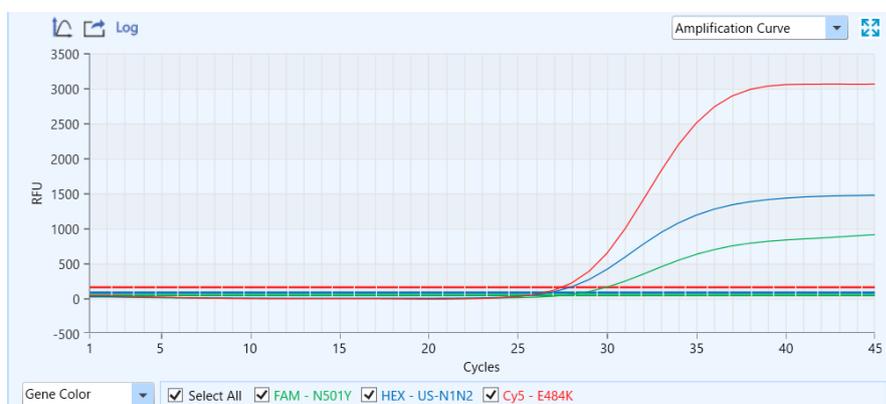
- ・ 「+」は Ct ≤ 40、「—」は Ct > 40 または不検出であることを示す。
- ・ すべての検出系が Ct > 40 または不検出であった場合は判定不能となり、SARS-CoV-2 のコピー数が検出限界以下である可能性がある。

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



解析結果の出力

1. Result Table 画面の Export Excel をクリックして名前を付けて保存する。



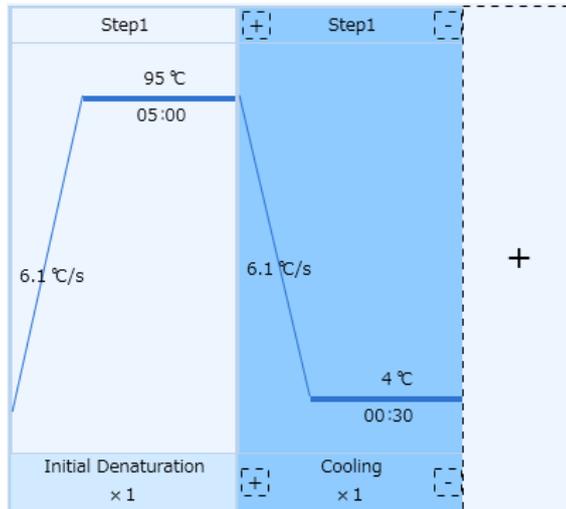
Well	Sample ID	Sample	Sample Type	Dye	Gene	Ct	Concentration	Concentration Unit	Standard Conc.	Referen
A7			Positive	FAM	N501Y	-	-	IU/ml	-	
A7			Positive	HEX	N1N2	28.027	-	IU/ml	-	
A7			Positive	Cy5		-	-	IU/ml	-	
H7		NC	Negative	FAM	N501Y	-	-	IU/ml	-	
H7		NC	Negative	HEX	N1N2	-	-	IU/ml	-	
H7		NC	Negative	Cy5		-	-	IU/ml	-	
A8			Positive	FAM	N501Y	29.230	-	IU/ml	-	
A8			Positive	HEX	N1N2	28.059	-	IU/ml	-	
A8			Positive	Cy5		-	-	IU/ml	-	

ソフトウェアと装置の終了

1. ソフトウェアを終了させる。
2. コンピューターを終了させて電源を切る。
3. 本体画面上でシャットダウンを押す。
4. 本体の電源を切る。

【補足①】 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. New Experimentをクリックし名前を入力してランファイルを作成する。
2. Run Settingタブの[+]を押し[Initial Denaturation],[Cooling]を追加する。
3. Initial Denaturation Step1は、95°C、5分、Ramp 6.1°C/sの設定にする。
4. Cooling Step1は、4°C、30秒、Ramp 6.1°C/sの設定にする。



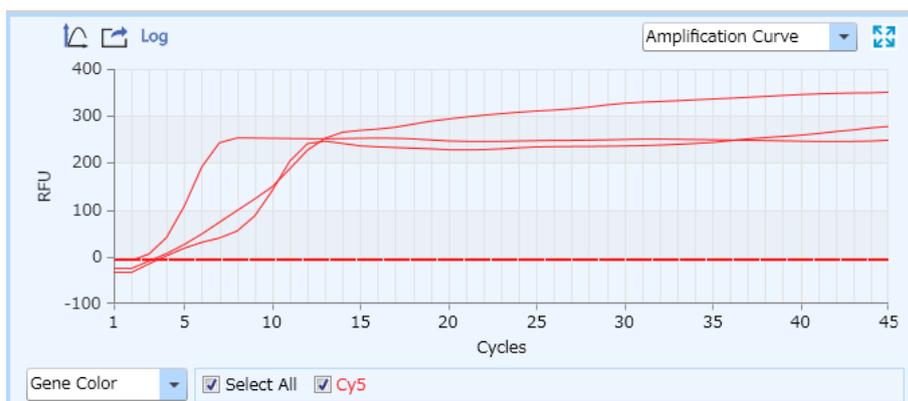
5. 装置にサンプルをセットする。
6. Start ボタンを押しランを開始する。

【補足②】判定の際の注意

本機器はRunが終了すると、自動解析によりベースライン補正を行います。サイクル初期は蛍光値が揺らぎやすく、自動解析によりこの区間がベースライン範囲に指定されてしまうと、不適切な補正により増幅していない反応があたかも増幅したような曲線に補正されCt値が算出される場合があります。

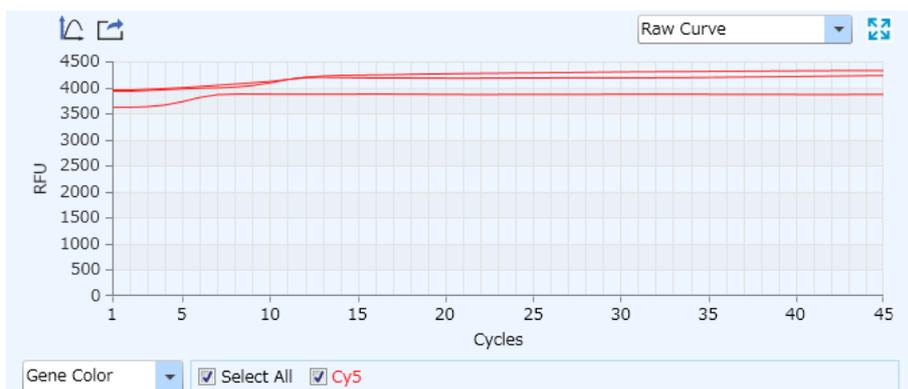
そのため、判定の際には、以下の手順にしたがって、上述の自動補正による影響の有無を必ずご確認ください。

Amplification Curve の結果



サイクル初期で Ct 値が算出されている事例。Raw Curve でも増幅が見られるか確認する。

Raw Curve の結果



サイクル初期 10 サイクル目くらいまでは蛍光値が揺らぎやすいため、どの区間をベースライン範囲として認識しているか確認する。

ベースラインの確認と変更方法

① Analysis Setting アイコンをクリックする。

② Analysis Setting の変更したい Well と Manual Baseline を選択する。

③ Start Cycle と End Cycle の数値を変更して OK をクリックする。

Well	Dye	Automatic Baseline		Manual Baseline	
		Start Cycle	End Cycle	Start Cycle	End Cycle
F9	Cy5	3	44	3	44
F10	Cy5	3	44	3	44
F11	Cy5	3	44	3	44
F12	Cy5	3	44	3	44
G1	Cy5	3	44	3	44
G2	Cy5	1	2	1	2
G3	Cy5	1	4	1	4
G4	Cy5	3	44	3	44

- ① Analysis Setting アイコンをクリックする。
- ② Analysis Setting の変更したい Well と Manual Baseline を選択する。
- ③ Start Cycle と End Cycle の数値を変更して OK をクリックする。

ベースラインの変更後

① Analysis Setting アイコンをクリックする。

② Analysis Setting の変更したい Well と Manual Baseline を選択する。

③ Start Cycle と End Cycle の数値を変更して OK をクリックする。

Well	Dye	Automatic Baseline		Manual Baseline	
		Start Cycle	End Cycle	Start Cycle	End Cycle
F9	Cy5	3	44	3	44
F10	Cy5	3	44	3	44
F11	Cy5	3	44	3	44
F12	Cy5	3	44	3	44
G1	Cy5	3	44	3	44
G2	Cy5	1	2	1	2
G3	Cy5	1	4	1	10
G4	Cy5	3	44	3	44

End Cycle を 4 から 10 に変更すると Ct 値が算出されなくなる。