

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 —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—

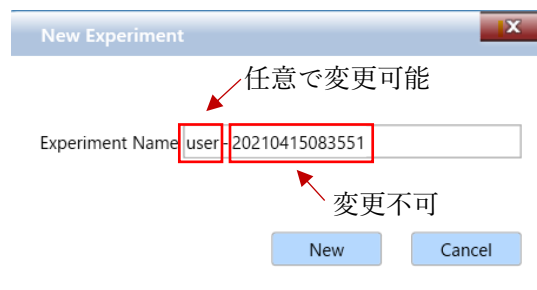
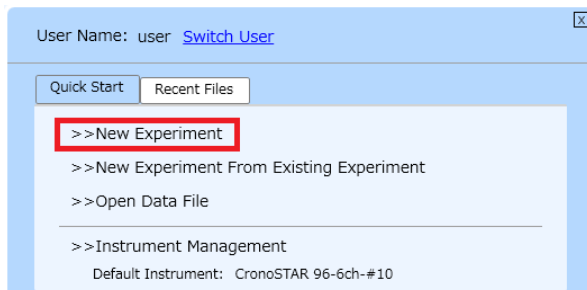
このマニュアルでは、SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Core Kit(製品コードRC330A)、Primer/Probe N501Y(SARS-CoV-2) (製品コードRC344A)、Positive Control RNA Set (N501Y) (製品コードRC371A)を用いてリアルタイムPCRを実施する際の操作方法を説明します。実験操作に関しては、本キットの取扱説明書に従ってください。また、本装置は研究用機器であり、医薬品医療機器等法に定められる医療機器ではありません。

CronoSTAR 96 リアルタイムPCR装置とソフトウェアの起動

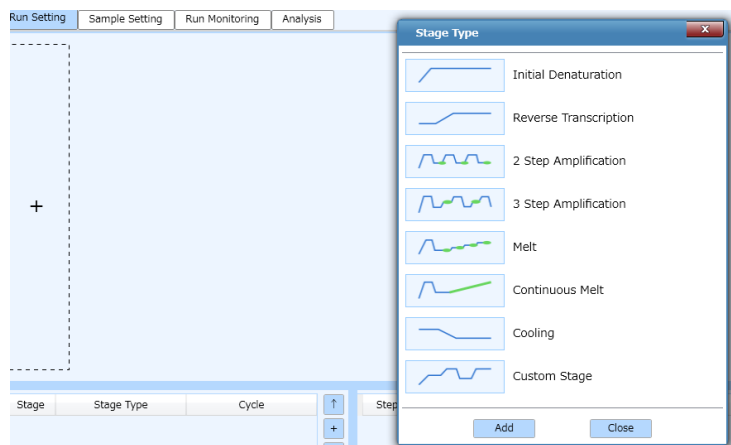
1. リアルタイムPCR装置本体の電源をONにする。
2. コンピューターの電源をONにする。
3. CronoSTAR 96ソフトウェアを起動する。

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

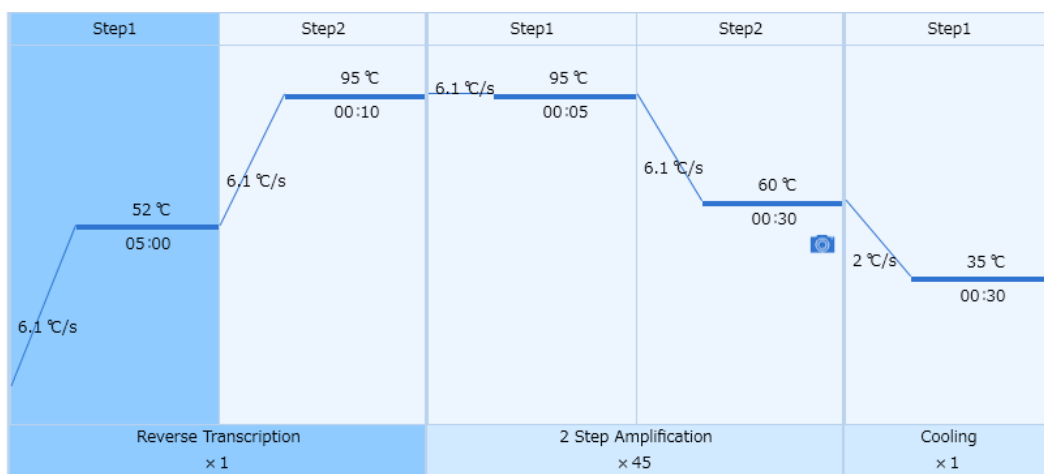
2.2.1. Step1は、95°C、5秒、Ramp 6.1°C/sの設定にする。

2.2.2. Step2は、60°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。

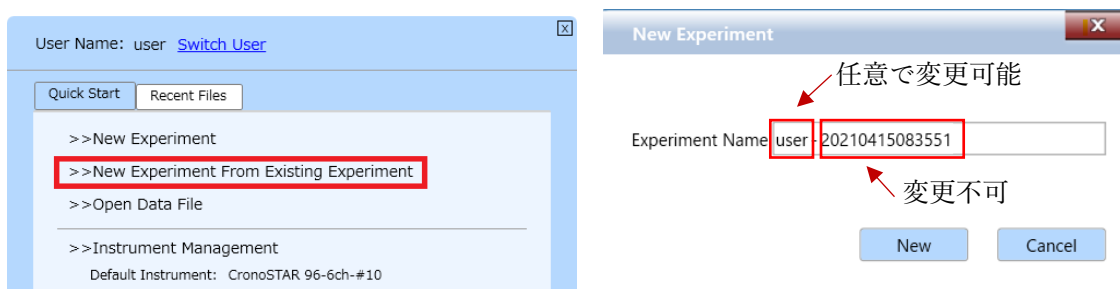
Experiment

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。

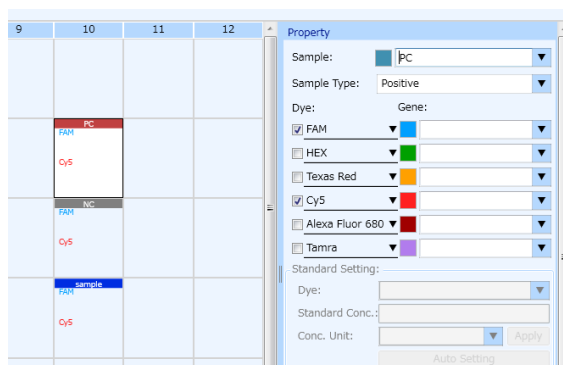
4. Sample Setting タブでサンプルの情報を入力する（後で入力可）。

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「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 ⇒ 501N Wild
- ・ Cy5 ⇒ N501Y Mutant

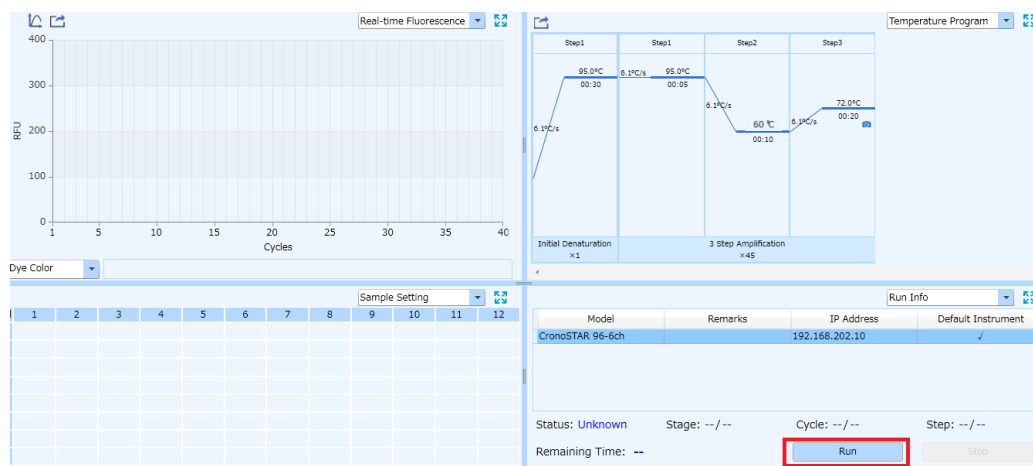


※ 自動解析の機能を有効に活用するため、陰性コントロール、陽性コントロール、検査対象サンプルのすべてのサンプルでFAM、Cy5の「Gene」の名称をそれぞれ共通のものに必ず設定してください。

※ 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・判定の際の注意点

本機器は Run が終了すると、自動解析により算出された Ct 値が Result Table に表示されますが、明らかに低いレベルの増幅曲線の上昇にもかかわらず Ct 値が算出される場合があります。特に、陽性コントロールや検査対象で FAM と Cy5 の両方で Ct 値が得られた場合、下記の「結果の解析」の操作に従って、閾値のマニュアル設定を行ったのちに判定に進んでください。

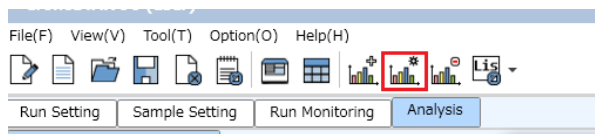
結果の解析

※ 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)を鋳型として使用した場合の結果を示す。

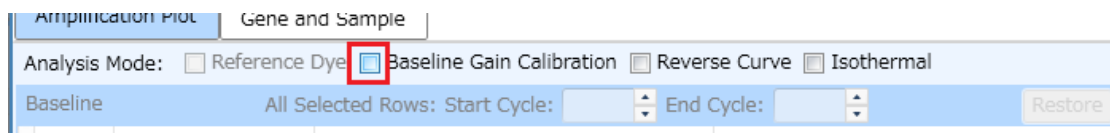
1. Analysisタブで測定結果を確認する。



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



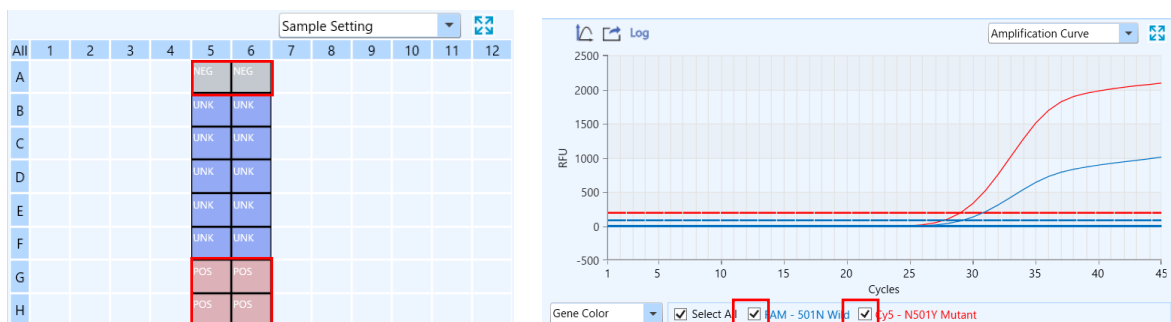
3. Analysis settingウィンドウのBaseline Gain Calibrationのチェックを外す。



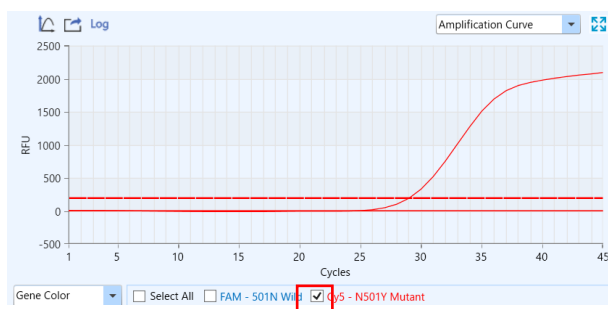
4. [OK]をクリックし「Analysis Setting」のウィンドウを閉じる。

5. 陰性、陽性コントロールのウェルを選択し、Amplification CurveおよびRaw Curve画面でFAMとCy5増幅曲線を表示し（画面下部のFAMとCy5にチェック✓を入れる）、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野生型、N501Y変異型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。



6. 陽性コントロールのウェルを選択し、増幅曲線で一方の蛍光を選択する。



7. Analysis setting ウィンドウのManual Thresholdを選択し、Manual Thresholdの値をWild TemplateとMutant Templateを明確に識別できる値に変更する。

Analytical Method: <input type="radio"/> Auto Threshold <input checked="" type="radio"/> Manual Threshold <input type="radio"/> Normalization Method Restore				
Dye	Gene	Test Name	Auto Threshold	Manual Threshold
FAM	501N Wild		90.65	90.65
Cy5	N501Y Mutant		200.92	200.92

8. [OK]をクリックし「Analysis Setting」のウィンドウを閉じる。
9. もう一方の蛍光についても同様にManual Thresholdの値を変更する。

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

※ 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。

- Negative Controlは、不検出であることを確認する。[*1]
 - *1: Cy5またはFAMで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。
- 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。[*2]
 - *2: Cy5でCt値が得られた場合、「結果の解析」に従い、閾値を再設定する。
- 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。[*3]
 - *3: FAMでCt値が得られた場合、「結果の解析」に従い、閾値を再設定する。
- 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。

【検体の測定結果の判定】

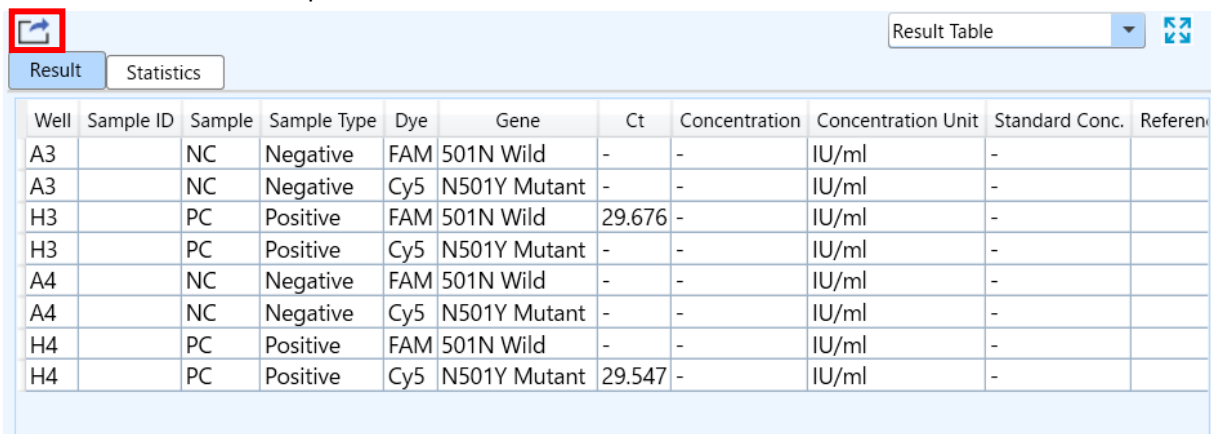
算出された Ct 値を用いて以下の判定表に従って陽性／陰性を判定する。

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

※FAMとCy5両方ともCt≤40の場合は「ランファイルの作成とランの開始」ステップ4.に従い陰性コントロール、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、Cy5の「Gene」の名称をそれぞれ共通のものに設定されていることを確認してください。

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。



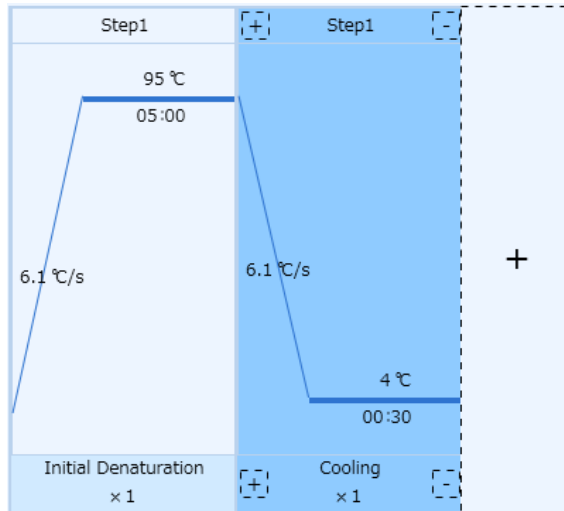
Well	Sample ID	Sample	Sample Type	Dye	Gene	Ct	Concentration	Concentration Unit	Standard Conc.	Referen
A3		NC	Negative	FAM	501N Wild	-	-	IU/ml	-	
A3		NC	Negative	Cy5	N501Y Mutant	-	-	IU/ml	-	
H3		PC	Positive	FAM	501N Wild	29.676	-	IU/ml	-	
H3		PC	Positive	Cy5	N501Y Mutant	-	-	IU/ml	-	
A4		NC	Negative	FAM	501N Wild	-	-	IU/ml	-	
A4		NC	Negative	Cy5	N501Y Mutant	-	-	IU/ml	-	
H4		PC	Positive	FAM	501N Wild	-	-	IU/ml	-	
H4		PC	Positive	Cy5	N501Y Mutant	29.547	-	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。



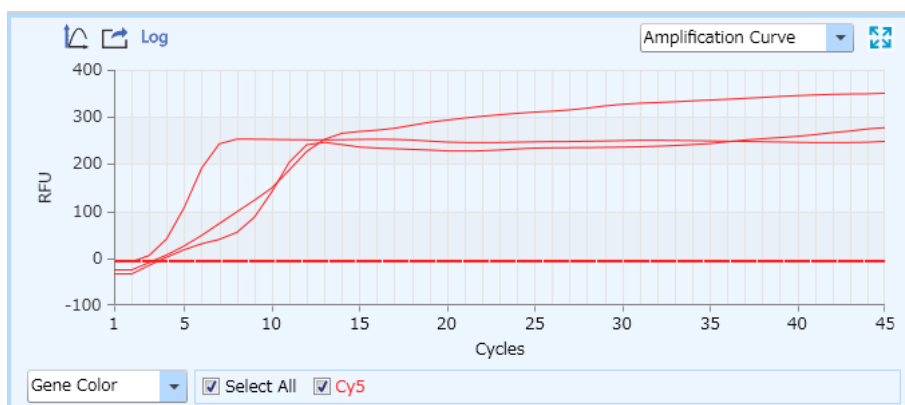
5. 装置にサンプルをセットする。
6. Start ボタンを押しランを開始する。

【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。

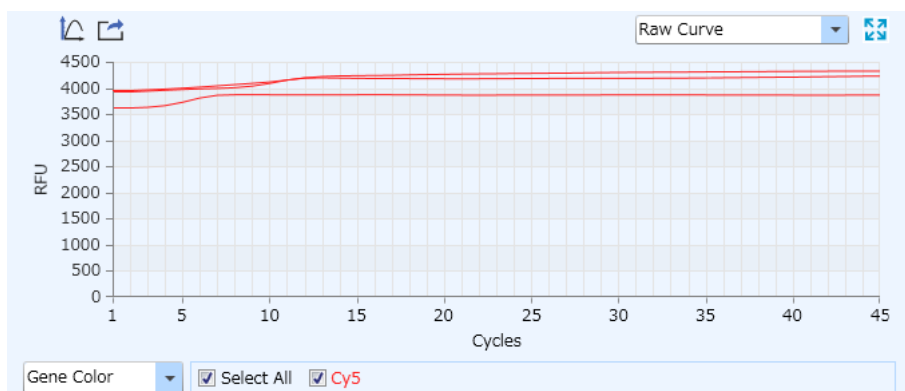
そのため、判定の際には、以下の手順にしたがって、上述の自動補正による影響の有無を必ずご確認ください。

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

End Cycle を 3 から 10 に変更すると Ct 値が算出されなくなる。

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 3 から 10 に変更すると Ct 値が算出されなくなる。