

# CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR Systemシリーズ

## 新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)検査のための操作マニュアル

### —SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit Ver.2 ( XA0203, XA0191 ) 専用—

このマニュアルでは、SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit Ver.2（製品コードXA0203, XA0191）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。

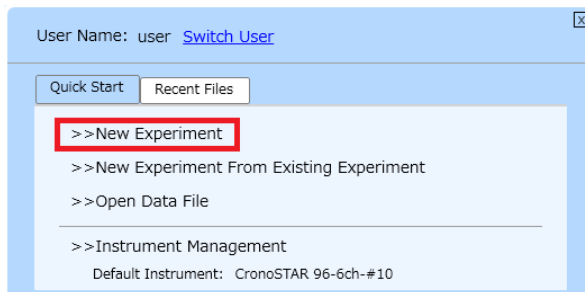
また、本装置は研究用機器であり、医薬品医療機器等法に定められる医療機器ではありません。

### CronoSTAR 96 リアルタイムPCR装置とソフトウェアの起動

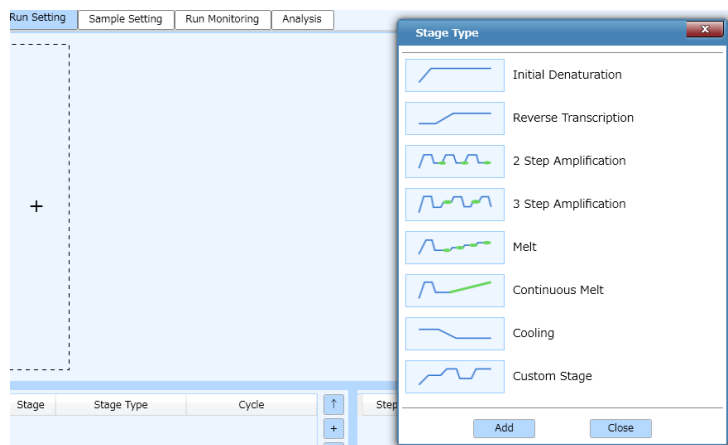
1. リアルタイムPCR装置本体の電源をONにする。
2. コンピューターの電源をONにする。
3. CronoSTAR 96ソフトウェアを起動する。

### 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

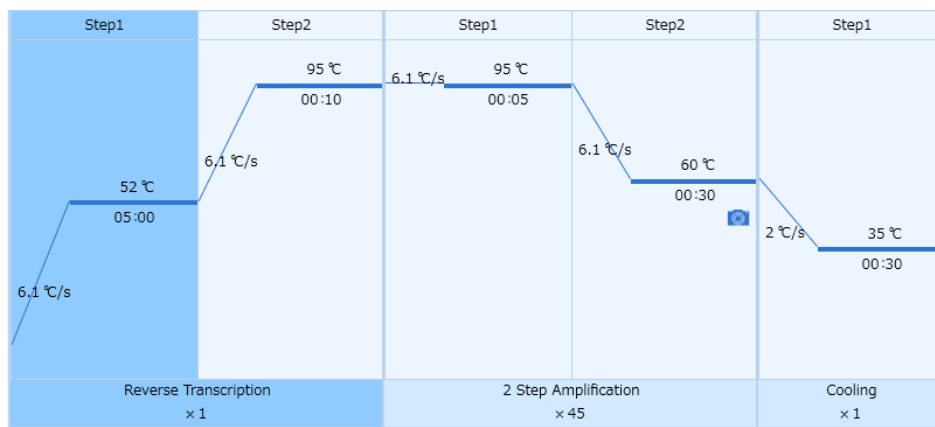
2.2.1. Step1は、95°C、5秒、Ramp 6.1°C/sの設定にする。

2.2.2. Step2は、60°C、30秒、Ramp 6.1°C/sの設定にする。

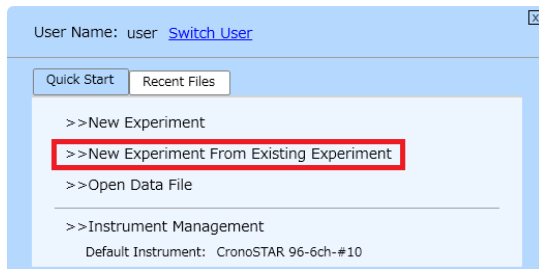
2.2.3. サイクル数を×40から×45に変更する。

## 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。

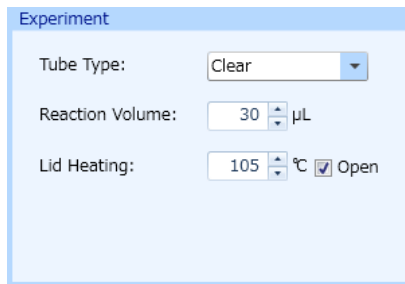


※ 他のランファイルからの設定を読み込む場合



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。

3. ExperimentのTube Type [Clear]、Reaction Volume [30 $\mu$ L]、Lid Heating[105 $^{\circ}$ C]に設定する。



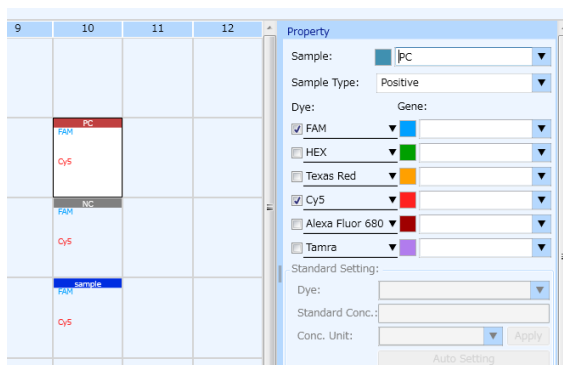
4. Sample Setting タブでサンプルの情報を入力する（後で入力可）。

5.1 該当するウェルを選択し、サンプル名、タイプを選択する。Dyeは FAM Cy5にチェック✓をいれる。

Negative : 陰性コントロール

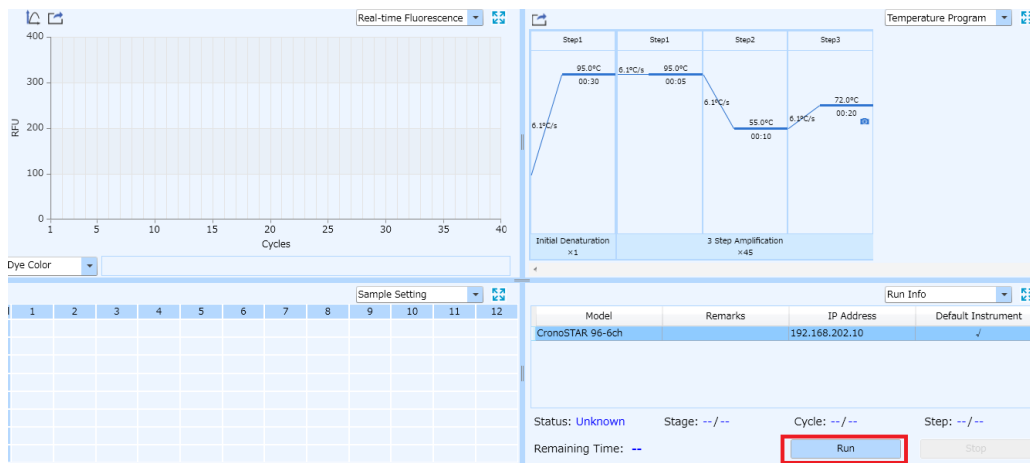
Positive : 陽性コントロール

Unknown : 検査対象サンプル



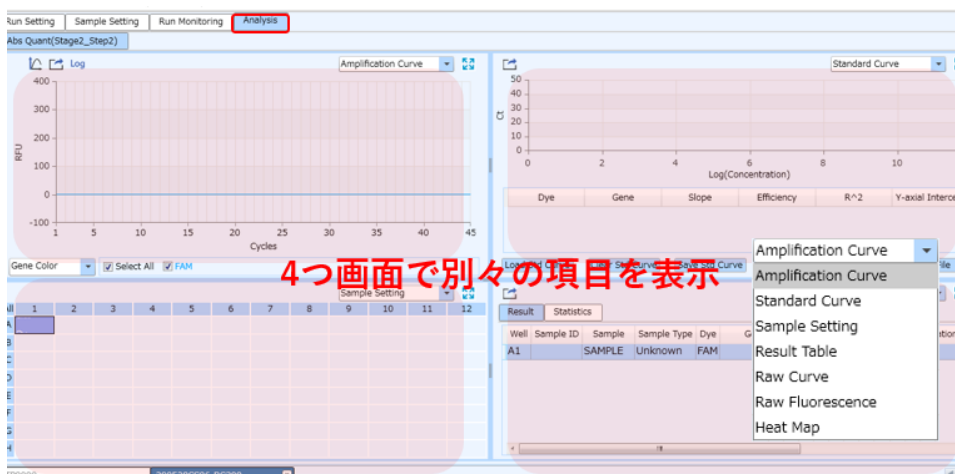
5. 装置のサンプルをセットする。

6. Run MonitoringタブのRunをクリックしてランを開始する。

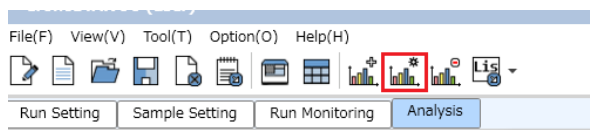


## 結果の解析

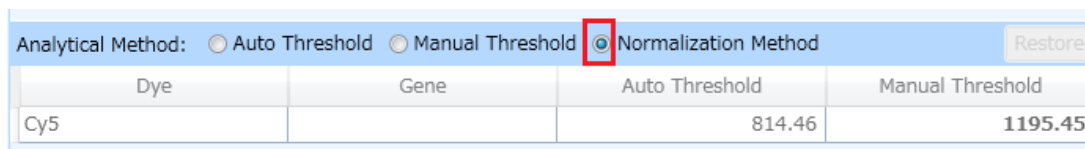
1. Analysisタブで測定結果を確認する。



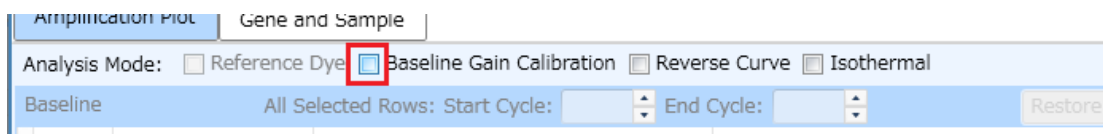
2. Analysis settingボタンを押すとウィンドウが表示される。



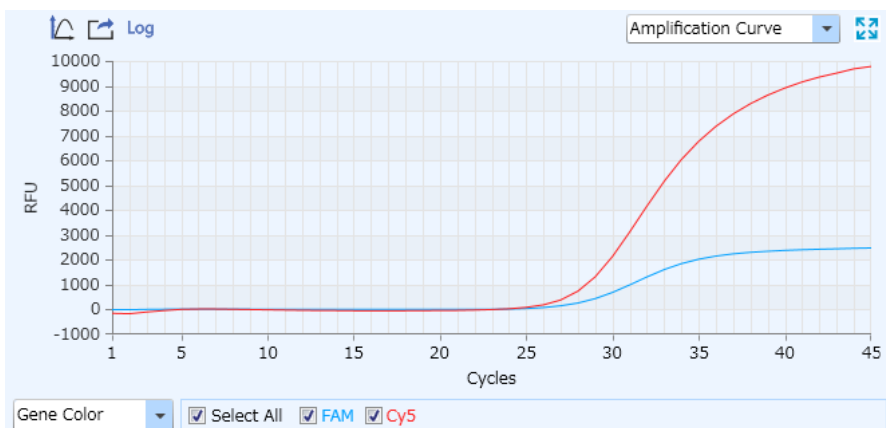
3. Analysis settingウィンドウのNormalization Methodを選択する。



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



5. Amplification Curve画面で増幅曲線を確認する。FAMとCy5にチェック✓が入っていることを確認。



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。

6. Result Table 画面の Ct 値を確認する。

Well	Sample ID	Sample	Sample Type	Dye	Gene	Ct	Concentration
B6		PC	Positive	FAM		29.314	-
B6		PC	Positive	Cy5		29.471	-

結果の判定方法（詳細はキット（XA0203）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。

	SARS-CoV-2 (Cy5)	IC (FAM)
陰性コントロール	不検出	不検出
陽性コントロール	Ct ≤ 30	Ct ≤ 30

・ 陰性コントロールは、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。

・ 陽性コントロールは、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。

【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。

		SARS-CoV-2 (Cy5)	
		Ct ≤ 40	Ct > 40 または不検出
IC (FAM)	Ct ≤ 40	陽性	陰性
	Ct > 40 または不検出	陽性	別法での 再測定を推奨*

\* : 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。国立感染症研究所「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver. 2.9.1」に記載された RNA 精製を行う手法等の別法での再測定により判定することを推奨します。

## 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。

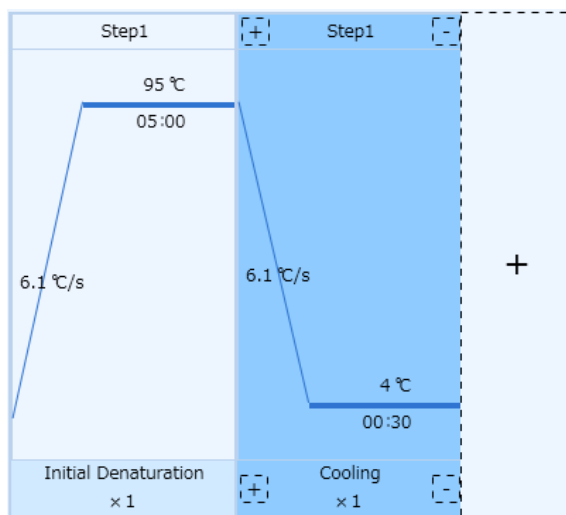
Well	Sample ID	Sample	Sample Type	Dye	Gene	Ct	Concentration	Concentration Unit	Standard
F8			Unknown	Cy5		25.454	-	IU/ml	-
G8			Unknown	Cy5		-	-	IU/ml	-
H8			Unknown	Cy5		-	-	IU/ml	-
A9			Unknown	Cy5		-	-	IU/ml	-
B9			Unknown	Cy5		-	-	IU/ml	-
C9			Unknown	Cy5		-	-	IU/ml	-
D9			Unknown	Cy5		-	-	IU/ml	-
E9			Unknown	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。



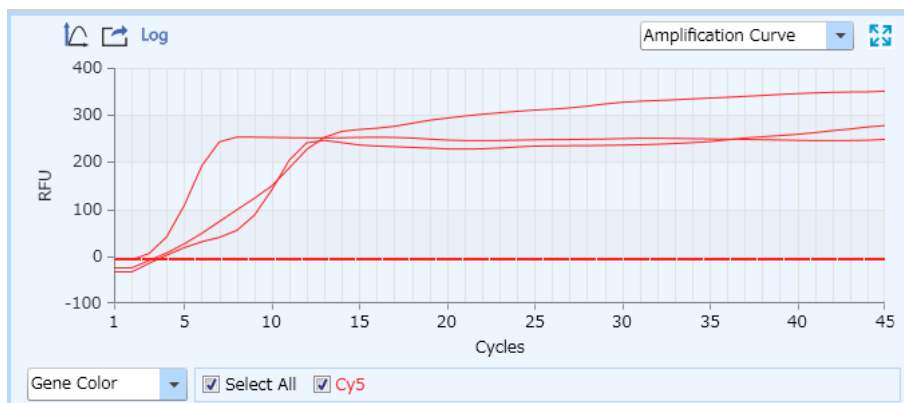
5. 装置にサンプルをセットする。
6. Start ボタンを押しランを開始する。

## 【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。

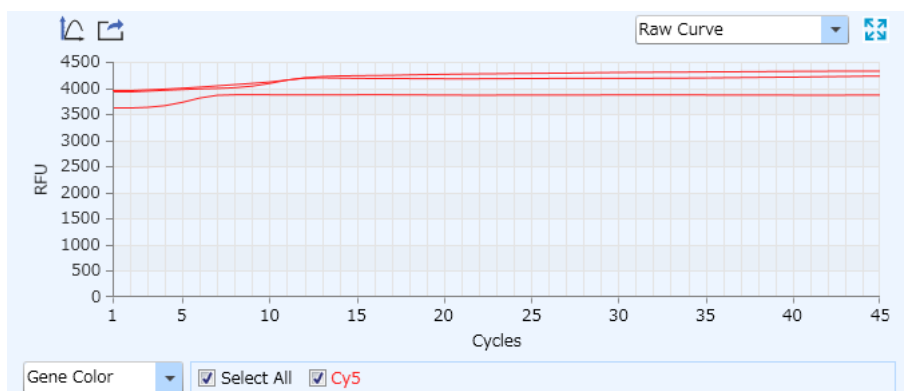
そのため、判定の際には、以下の手順にしたがって、上述の自動補正による影響の有無を必ずご確認ください。

### 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

The screenshot shows the 'Analysis Setting' dialog box with the following data table:

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

The screenshot shows the 'Analysis Setting' dialog box with the following data table:

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。