

製品コード XD0008

研究用

TAKARA

**Primer/Probe N2
(2019-nCoV)**

説明書

v202010Da

本製品は、リアルタイム RT-PCR 法により精製核酸検体から新型コロナウイルス (2019-nCoV) の N 遺伝子領域を検出するためのプライマー・プローブです。国立感染症研究所「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1」に記載されているプライマー・プローブ N セット No. 2 (N2 セット) の配列を使用しています。検出に必要なプライマー・プローブをプレミックス化しており、反応液調製が簡便です。本製品と弊社リアルタイム PCR 試薬 One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix (製品コード RR600A/B) あるいは One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix, with UNG (製品コード RR601A/B) を組み合わせることにより、「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1」の内容に沿ったプローブ検出法 (5'-ヌクレアーゼ法) を用いたリアルタイム one-step RT-PCR 法による 2019-nCoV 検出が可能です。

※ リアルタイム one-step RT-PCR 法の原理については上記リアルタイム PCR 試薬の取扱説明書をご参照ください。

【本製品のプライマー・プローブ配列について】

国立感染症研究所「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1」に記載されているものと同じ配列のプライマー・プローブを使用しています。

名称	配列 (5' to 3')	1 反応における濃度
NIID_2019-nCoV_N_F2	AAATTTTGGGGACCAGGAAC	0.5 μ M
NIID_2019-nCoV_N_R2	TGGCAGCTGTGTAGGTCAAC	0.7 μ M
NIID_2019-nCoV_N_P2	FAM-ATGTCGCGCATTGGCATGGA-BHQ	0.2 μ M

I. 内容 (250 回分、20 μ l 反応)

5 × NIID_2019-nCoV_N_Primer/Probe mix 1,000 μ l

II. 保存 - 20°C

III. 本製品以外に必要な試薬、機器（主なもの）

【試薬】

- 国立感染症研究所提供 陽性コントロール RNA (N プライマー・プローブセット用 Ver.2 および N2 プライマー・プローブセット用 Ver.2)
または Positive Control RNA Mix (2019-nCoV) (製品コード XA0142)
- One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (製品コード RR600A/B)
または One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix, with UNG (製品コード RR601A/B)

【機器】

- 微量高速冷却遠心機
- リアルタイム PCR 装置
 - Thermal Cycler Dice® Real Time System シリーズ
(製品コード TP900 : 終売 /TP950/TP970/TP980/TP990/TP700)
 - CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System シリーズ (製品コード 640231/640232)
 - Applied Biosystems 7500/7500Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
 - StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
 - QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
 - LightCycler 96/LightCycler 480 System (Roche Diagnostics 社)
 - CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
 - CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)

【器具】

- 専用反応チューブあるいはプレート
- マイクロピペットおよびマイクロピペット用チップ

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： 本製品は遺伝子検出であるため、不活化されたウイルスも検出されます。
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、検体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. 5×NIID_2019-nCOV_N_Primer/Probe mix 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. 反応液の調製から検体サンプルの添加まで、次の3つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します (VII. 補足：エリア分けについて を参照)。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。
 - エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
 - エリア 2：検体の調製を行います。
 - エリア 3：反応液へ検体の添加を行います。

本製品および One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix（製品コード RR600A/B）または One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix, with UNG（製品コード RR601A/B）を使用した検出では増幅反応と検出をリアルタイムで行うため、反応終了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. 本製品および One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix（製品コード RR600A/B）または One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix, with UNG（製品コード RR601A/B）を使用した検出においては、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. 操作

1. 検体の採取と保存

「新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 病原体検査の指針」(厚生労働省ホームページ) 最新版をご参照ください。

喀痰検体の取扱いについては、「病原体検出マニュアル 2019-nCoV」最新版をご参照ください。

2. RNA の抽出

「病原体検出マニュアル 2019-nCoV」最新版をご参照ください。

3. リアルタイム one-step RT-PCR 法による 2019-nCoV の検出

【注意】

- 操作手順については、「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1」の『4. TaqMan プローブを用いたリアルタイム one-step RT-PCR 法による 2019-nCoV の検出』をご参照ください。
- 各リアルタイム PCR 装置の取扱説明書に従って操作してください。
- 以下の説明は、One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (製品コード RR600A/B) を使用する形で記載しております。基本操作は One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix, with UNG (製品コード RR601A/B) 使用時も同じです。
- 結果の判定を正しく行うために、陰性コントロール反応および陽性コントロール反応を行ってください。

3-1. 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、陰性・陽性コントロール反応を行ってください。

それぞれ、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。

陰性・陽性コントロール反応は N=2 で用意し、鋳型添加後、チューブ/プレートの蓋をし、軽くスピンドウンしてください。

陰性コントロール (NC)

RNase Free H₂O 5 μ l

陽性コントロール (PC)

希釈液 (1 \times 10³ copies/ μ l から 1 \times 10⁰ copies/ μ l まで) 5 μ l

※ 国立感染症研究所提供 陽性コントロール RNA (N プライマー・プローブセット用 Ver.2 および N2 プライマー・プローブセット用 Ver.2) の希釈操作については、「病原体検出マニュアル 2019-nCoV」最新版をご参照ください。

※ Positive Control RNA Mix (2019-nCoV) (製品コード XA0142) を使用する場合は、以下のように段階希釈液を調製します (用時調製)。

- 1 \times 10⁶ copies/ μ l : Positive Control RNA Mix (2019-nCoV) 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l
- 1 \times 10⁵ copies/ μ l : 上記 (1) 希釈液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l
- 1 \times 10⁴ copies/ μ l : 上記 (2) 希釈液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l
- 1 \times 10³ copies/ μ l : 上記 (3) 希釈液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l
- 1 \times 10² copies/ μ l : 上記 (4) 希釈液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l
- 1 \times 10¹ copies/ μ l : 上記 (5) 希釈液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l
- 1 \times 10⁰ copies/ μ l : 上記 (6) 希釈液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l

* 上記 (4) から (7) の希釈液 5 μ l を反応液に添加します。

3-2. リアルタイム one-step RT-PCR 反応液の調製

必要数 + α のマスターミックスを調製し、リアルタイム PCR 用チューブまたはプレートに 15 μ l ずつ分注する。

【ROX Reference Dye を使用しない場合*1】

試薬	使用量	最終濃度
One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (2 \times)	10.0 μ l	1 \times
5 \times NIID_2019-nCOV_N_ Primer/Probe mix	4.0 μ l	1 \times
RNase Free H ₂ O	1.0 μ l	
Total	15.0 μ l	

* 1：対象機種

- Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ
- CronoSTAR 96 Real-Time PCR System シリーズ
- LightCycler 96 System/LightCycler 480 System II
- CFX96 Real-Time PCR Detection System
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System

【ROX Reference Dye を使用する場合*2】

試薬	使用量	最終濃度
One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (2 \times)	10.0 μ l	1 \times
5 \times NIID_2019-nCOV_N_ Primer/Probe mix	4.0 μ l	1 \times
ROX Reference Dye or Dye II* (50 \times)	0.4 μ l	1 \times
RNase Free H ₂ O	0.6 μ l	
Total	15.0 μ l	

* 2：対応機種

- ROX Reference Dye (50 \times) を添加する機種
 - StepOnePlus Real-Time PCR System
- ROX Reference Dye II (50 \times) を添加する機種
 - Applied Biosystems 7500/7500Fast Real-Time PCR System
 - QuantStudio 5 Real-Time PCR System

3-3. 鋳型の添加

陰性コントロール、検体 RNA、その後あらかじめ希釈した陽性コントロール RNA を 5 μ l 添加する。それぞれ N=2 で用意する。

鋳型添加後、チューブ/プレートの蓋をし、軽くスピンドウンする。

3-4. 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。

※ 反応条件は一例です。使用するリアルタイム PCR 装置、試薬および反応容器等によって最適な反応条件は異なるため、必ず事前に検出感度等の確認をしてください。

【Thermal Cycler Dice Real Time System III を使用する場合】

機器の設定は以下の通り（Fast モードで使用）。

Experiment Type	Absolute Quantification Single
Speed	Fast
Collect Data	FAM

Holding Stage : UNG 処理反応*
(25°C 10分)

↓

Holding Stage : 逆転写反応
52°C 5分

↓

95°C 10秒

↓

Cycling Stage : PCR

95°C 5秒

60°C 30秒 (Data Collection) } 45 cycles

* : One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix, with UNG (製品コード RR601A/B) 使用の場合に、必要に応じて追加してください。UNG の作用によりキャリアオーバーした PCR 産物が分解されます。

【Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System を使用する場合】

機器の設定は以下の通り（Fast モードで使用）。

Assay	Absolute Quantification (Standard Curve)
Run Mode	Fast 7500
Reporter	FAM
Quencher	None

Holding Stage : UNG 処理反応*
(25°C 10分)

↓

Holding Stage : 逆転写反応
52°C 5分

↓

95°C 10秒

↓

Cycling Stage : PCR

95°C 5秒

60°C 30秒 (Data Collection) } 45 cycles

* : One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix, with UNG (製品コード RR601A/B) 使用の場合に、必要に応じて追加してください。UNG の作用によりキャリアオーバーした PCR 産物が分解されます。

【 LightCycler 480 System II を使用する場合 】

機器の設定は以下の通り。

	Analysis Mode	Cycle	Temperature	Time	Ramp Rate (°C/sec.)	Acquisition Mode
RT	None	1	52°C	5 min.	4.4	None
Denature	None	1	95°C	10 sec.	4.4	None
PCR	Quantification	45	95°C	5 sec.	4.4	None
			60°C	30 sec.	2.2	Single
Cooling	None		40°C	30 sec.	4.4	None

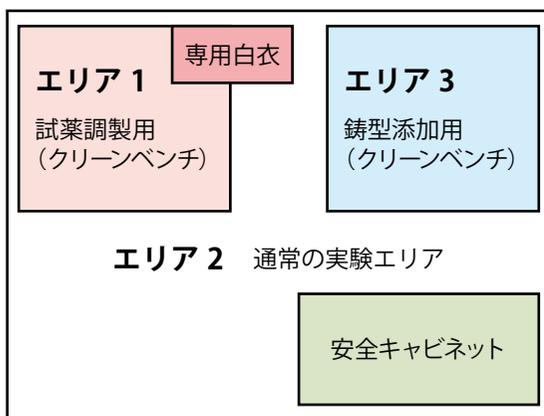
※ One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix, with UNG (製品コード RR601A/B) 使用の場合、必要に応じて反応前に室温 (25°C) で 10 分間のインキュベーションの工程を実施してください。

3-5. 判定

反応終了後、増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。
解析方法は、使用リアルタイム PCR 装置の取扱説明書をご参照ください。

※ 試験の成立および検体の判定については、「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.8」の『4. TaqMan プローブを用いたリアルタイム one-step RT-PCR 法による 2019-nCoV の検出』をご参照ください。

VII. 補足：エリア分けについて



- エリア 1：反応試薬のみを扱うエリア
リアルタイム PCR 反応液の調製、分注を行う。
(鋳型となる DNA は一切持ち込まない)
- エリア 2：通常の実験エリア
検体の取扱いや DNA 調製を行う。
必要に応じて安全キャビネットを設置する。
- エリア 3：高濃度 DNA を扱うエリア
分注済みの反応液への鋳型 DNA の添加を行う。
標準サンプルの希釈もここで行う。

VIII. 参考文献

国立感染症研究所「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1」

IX. 関連製品

RNase-free Water (製品コード 9012)
One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix (製品コード RR600A/B)
One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix, with UNG (製品コード RR601A/B)
Primer/Probe Set (2019-nCoV) (製品コード XD0007)
Positive Control RNA Mix (2019-nCoV) (製品コード XA0142)
Thermal Cycler Dice® Real Time System III (製品コード TP950 など)
CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System シリーズ (製品コード 640231/640232)

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。PrimeScript、CronoSTAR 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