

**新型コロナウイルス COVID-19(2019-nCoV)検出への
THUNDERBIRD[®] Probe One-step qRT-PCR Kit(Code: QRZ-101)使用例のご紹介**

本情報は、国内の医療機関にお勤めの医療関係者および研究者に対する情報提供を目的としたものです。一般の方および国外の医療関係者に対する情報提供を目的としたものではありませんのでご了承ください。

新型コロナウイルス(2019-nCoV)の同定方法として、国立感染症研究所発行の「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.7」(以下、マニュアル)¹⁾には、2-step RT-PCR 法による定性的検出法と TaqMan[®]プローブを用いたリアルタイム one-step RT-PCR 法の2法が設定されています。

1) 国立感染症研究所 病原体検出マニュアル

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/labo-manual.html#class0>

今回、国立感染症研究所より陽性コントロール RNA をご提供いただき、マニュアルの「4.3. リアルタイム one-step RT-PCR(TaqMan[®] プローブ法)反応 反応プレートの準備と解析」について、弊社 THUNDERBIRD[®] Probe One-step qRT-PCR Kit(Code: QRZ-101)を用いた実施例を取得し、国立感染症研究所と情報を共有しております。

本文章では、ABI StepOnePlus[™]を用いた実施例をご紹介します。尚、本文書は、マニュアルの「4.3 リアルタイム one-step RT-PCR (TaqMan[®]プローブ法)反応」の反応プレートの準備を補足するもので、その他の操作は、マニュアルに従って行っております。

—ご注意—

本実施例は国立感染症研究所よりご提供をいただいた陽性コントロール RNA を用いた実施例です。本実施例のご使用をご検討される際は、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りますので、必ず事前に検出感度等の確認をしてください。

THUNDERBIRD[®] Probe One-step qRT-PCR Kit(Code: QRZ-101)に含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。本キットの使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

1. 使用試薬

THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit (Code: QRZ-101)

プライマー及びプローブ

マニュアル「4.2 リアルタイム RT-PCR 用プライマー及びプローブについて」に記載されている N セット、N2 セットを日本遺伝子研究所より購入（プローブは FAM-BHQ 修飾）。

2. リアルタイム PCR 装置

サーモフィッシャーサイエンティフィック社

(1) 「Applied Biosystems® StepOnePlus™ リアルタイム PCR システム」

3. 方法

マニュアル記載の 1)~7)の方法において、リアルタイム RT-PCR 反応液を THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit (Code: QRZ-101)に変更して実施した。

1)~2)の陽性コントロール RNA の希釈は、マニュアルに従い、実施した。

3) 陽性コントロール RNA を用いて、表に示した反応液を調製した。反応液は、Template RNA 以外の試薬を必要反応数+α 分をまとめて調製し、4)以降を実施した。

●Applied Biosystems® StepOnePlus™ リアルタイム PCR システムを使用する場合

	N セット	N2 セット
2 × Reaction Buffer	10.0 μL	10.0 μL
DNA Polymerase	0.5 μL	0.5 μL
RT Enzyme Mix	0.5 μL	0.5 μL
Forward primer (10μM)	1.2 μL	1.0 μL
Reverse primer (10μM)	1.6 μL	1.4 μL
TaqMan® probe (5μM)	0.8 μL	0.8 μL
50 × ROX Reference dye	0.4 μL	0.4 μL
RNase free water	- μL	0.4 μL
Template RNA	5 μL	5 μL
Total	20 μL	20 μL

4) ~ 6) に従い、反応液の分注、RNA の添加を行った。

7) 反応条件を以下のように設定して反応を開始した。

<反応条件>

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ので、必ず事前に検出感度等の確認をしておく。今回、Applied Biosystems® StepOnePlus™ リアルタイム PCR システムを使用する場合の反応条件を示した。

- Applied Biosystems® StepOnePlus™ リアルタイム PCR システムを使用する場合
機器の設定は以下の通り(Standard モードで使用)

Assay : Absolute Quantification (Standard Curve)
Run Mode : StepOne Plus
Reporter : FAM
Quencher : None

【サイクル条件】

50°C 10min.

↓

95°C 1min.

↓

95°C 15sec.

60°C 45sec. (Data Collection) } 45Cycles

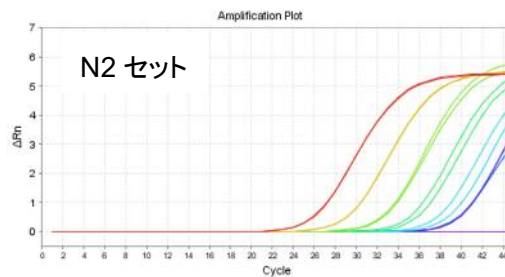
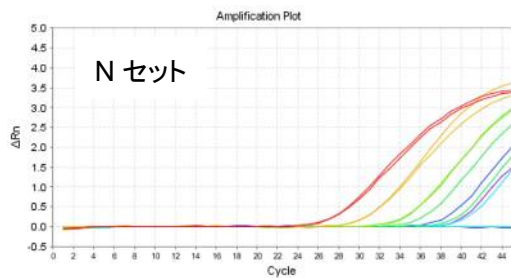
- 8) マニュアルに従い、増幅曲線の立ち上がりを確認した。

4. 結果

N セット、N2 セット共に、50 コピー以上の陽性コントロールのすべての反応において、増幅曲線の立ち上がりが 40 サイクル以内に認められました。5 コピーについては n=6 で実施し、N セットが 3/6、N2 セットが 5/6 でありました。一方、陰性コントロールの増幅曲線の立ち上がりは見られませんでした。

* Threshold = 0.1 で Ct 値を算出

コピー数	N セット		N2 セット	
50000	25.9	26.1	23.5	23.4
5000	29.3	29.3	26.7	26.6
500	33.2	32.9	29.9	30.1
50	38.4	34.8	32.5	33.4
5	N/A	39.3	35.2	36.3
5	N/A	37.1	37.4	37.3
5	N/A	39.1	N/A	37.2
陰性コントロール	N/A	N/A	N/A	N/A



免責事項

この情報は2020年3月4日現在のものです。

本情報について、細心の注意を払っておりますが、その内容に関して、いかなる保証もするものではありません。また、本情報のご利用になったことにより生じたあらゆる損害・トラブルについても、当社は一切責任を負いません。

本情報は、予告なく更新・修正・削除する場合があります。

=== 製品内容・技術に関するお問い合わせ ===

東洋紡(株)ライフサイエンス事業部 テクニカルライン

TEL 06-6348-3888(開設時間 9:00~12:00 13:00~17:00 土日祝日、休日を除く)

FAX 06-6348-3833

e-mail tech_osaka@toyobo.jp