



新型コロナウイルス検出キット (SARS-CoV-2 Detection Kit)

– N set–

Code: NCV-101

– N2 set–

Code: NCV-102

取扱説明書

(2022年5月6日改訂)

TOYOBO CO., LTD.
Bioproducts Sales and Marketing Department
OSAKA JAPAN

TOYOBO

—目次—

[1]	はじめに	2
[2]	製品内容	3
[3]	保存温度	4
[4]	製品のほかに用意するもの	4
[5]	プロトコール	5
	(1) 前処理	5
	(2) RT-PCR 反応液の調製、添加	5
	(3) RT-PCR サイクル条件	6
[6]	判定例	7
[7]	陽性コントロールの検出例	8
[8]	トラブルシューティング	10

ご注意

本製品に含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。診断および臨床検査には使用しないでください。本製品は臨床診断薬ではありません。本製品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。

本製品に含まれる前処理液は、消防法上の”危険物第四類 第三石油類 危険等級Ⅲ 水溶性”に該当します。周囲に火気および高温物がない事を確認し、使用してください。また、SDS を参考に、適切な廃棄方法にて廃棄を行ってください。

試料および使用器具は、感染性を有するものとして各施設の安全規定に従って、使用および廃棄を行ってください。

ウイルス不活化成分を含む検体採取容器をご使用の場合、不活化成分により、PCR を阻害する可能性があります。ご使用になる検体採取容器に含む溶液を添加した反応液に対し、陽性コントロール RNA のスパイク試験を行い、検出感度を事前に確認してください。

[1] はじめに

本製品は、新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)検出のためのリアルタイム 1-step RT-PCR キットです。試料を前処理液と混合後、RNA 抽出精製作業を行うことなく、1-step RT-PCR 反応に供し、ウイルス RNA を検出します。

検出のためのプライマー、プローブは、国立感染症研究所発行の「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1」に記載されている、N セット(Code: NCV-101)、N2 セット(Code: NCV-102)を採用しています。

◆本製品の特長◆

- ・ 核酸の抽出精製は必要ありません。
- ・ 作業途中でチューブの開閉をする必要がなく、サンプルの飛散リスクを低減できます。
- ・ 逆転写反応から PCR までをワンステップで行います。反応途中で試薬を添加する必要はありません。
- ・ 蛍光プローブを用いた測定を行います。電気泳動の必要はありません。
- ・ キャリーオーバー汚染防止のため、Uracil-DNA Glycosylase (UNG)による増幅産物の分解を行います。
- ・ 蛍光プローブを用いた測定により高い特異性で高感度を達成しています。1 反応当たり 50 コピーの検出を確認しています。

*** グアニジンなど不活化成分を含む検体採取容器を使用する場合、不活化成分により PCR を阻害する場合があります。また、対象とする試料によっては検出に影響する可能性があります。ご使用になる試料に対し、陽性コントロールのスパイク試験を行い、事前に検出感度を確認ください。**

スパイク試験は、前処理液で処理したサンプルに陽性コントロール RNA を添加して行います。陽性コントロールとしては、(株)日本遺伝子研究所製「新型コロナウイルス(nCoV)陽性コントロール RNA」などがご使用になれます。

[2] 製品内容

本製品には、以下の試薬が含まれており、100 回用としてご使用になれます。

試薬名	容量
① 前処理液	1,000 μ L
② 反応液	1,100 μ L x 3
③ 酵素液	550 μ L
④ プライマー・プローブ液 (N セットまたは N2 セット)*1,	550 μ L

N セット検出用 Code : NCV-101、N2 セット検出用 Code:NCV-102

*1 プライマー、プローブは、国立感染症研究所発行「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1」(2020 年 3 月 19 日現在)記載の配列を使用しています。

		Name	Sequence (5' to 3')
N セット (Code: NCV-101)	プライマー	N_Sarbeco_F1	CACATTGGCACCCGCAATC
		N_Sarbeco_R1	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG
	プローブ*2	N_Sarbeco_P1	ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA
N2 セット (Code: NCV-102)	プライマー	NIID_2019-nCOV_N_F2	AAATTTTGGGGACCAGGAAC
		NIID_2019-nCOV_N_R2	TGGCAGCTGTGTAGGTCAAC
	プローブ*2	NIID_2019-nCOV_N_P2	ATGTCGCGCATTGGCATGGA

*2 本プローブは FAM チャネルで検出します。

- ・「③酵素液」は転倒混和により攪拌し、スピンドウンしてからチューブのふたを開けてください。
- ・「③酵素液」以外は使用する直前に解凍し、ボルテックスミキサーでよく攪拌してください。その後、スピンドウンしてからチューブのふたを開けてください。
- ・使用後は速やかに-20℃で保存してください。
- ・「①前処理液」は室温でも保存可能です。

[3] 保存温度

- ・本製品に含まれる試薬はすべて-20℃保存です。
- ・「①前処理液」は解凍後、室温保存も可能です。

[4] 製品のほかに用意するもの

- ・リアルタイム PCR 装置（FAM チャンネル対応）
- ・ボルテックスミキサー
- ・ピペットなど
- ・チップ、チューブなど消耗品

[5] プロトコール

(1) 前処理

- ・「①前処理液」は、消防法上の危険物第四類 第三石油類に該当しますので、周囲に火気および高温物がない事を確認し使用してください。
- ・「①前処理液」を使用する直前に解凍し、室温まで戻してボルテックスミキサーでよく攪拌してください。その後、スピンドウンしてからチューブのふたを開けてください。
- ・「①前処理液」は氷上において、凝固しますので、室温にてご使用ください。

① 下記の量を PCR チューブに調製してください。

- ・調製する際は、「①前処理液」がPCRチューブの底に完全に落ちきったことを確認し試料をPCRチューブの底に添加してください。
- ・試料は1～3 μL まで添加可能です。滅菌水等による添加する試料の量に応じた反応液量の調整は必要ありません。

	1 反応あたりの調製量
①前処理液	3 μL
試料	1～3 μL
／陽性または陰性コントロール	
合計	4～6 μL

* 前処理液 9 μL 、試料 3～9 μL を混合し、この処理液の 1/3 量(4～6 μL)を、次工程の PCR に使用いただくことも可能です。この場合、次工程の反応液に持ち込む①前処理液量は 3 μL 分になるようにしてください。

* 陽性または陰性コントロールを検出する際も必ず前処理液を添加してください。

② 直ちに次の工程にはいります。(前処理後の液は保存できません)

(2) RT-PCR 反応液の調製、添加

- ・1 反応あたり下記の量をマスターミックスとして必要反応数分調製します。
- ・「②反応液」、「④プライマー・プローブ液」は使用する直前に解凍し、ボルテックスミキサーでよく攪拌してください。その後、スピンドウンしてからチューブのふたを開けてください。
- ・「③酵素液」は氷上に置いて使用するか、または使用する直前に-20 $^{\circ}\text{C}$ から取り出し、使用後は直ぐに-20 $^{\circ}\text{C}$ に戻してください。

1 反応あたりの調製量	
②反応液	30 μ L
③酵素液	5 μ L
④プライマー・プローブ液 (N セットまたは N2 セット)	5 μ L
合計	40 μ L

*複数の試料の反応を行う場合は、反応数+10%程度を目安に反応液を調製してください。

- ・ 1 反応あたり 40 μ L を(1)の前処理済み懸濁液に添加します。
- ・ チューブキャップでふたをします。
- ・ チューブキャップでふたをした後、タッピングまたはボルテックスミキサーを用いて反応液を混合した後、スピンドウンして下さい。
- ・ 直ちに次の温度サイクルで反応を行います。

(3) RT-PCR サイクル条件

- ・ 下記の温度サイクルで反応します。

LightCycler®96, LightCycler480® Instrument II, CFX96 Touch Deep Well

逆転写反応	42°C	5分		
プレ変性	95°C	10秒		
変性	95°C	1秒		
会合	50°C	3秒		
伸長	55°C	10秒	検出	X45~50サイクル

* 反応終了後反応液が白濁しておりますが、検査結果には影響しません。

- ・ その他の機種については弊社テクニカルラインまでお問い合わせください。

[6] 判定例

(1) N セット(Code : NCV-101)と N2 セット(Code : NCV-102)をご使用の場合

N セット	N2 セット	判定
≤ 40	≤ 40	陽性
≤ 40	>40、または検出されず	陽性
>40、または検出されず	≤ 40	陽性
>40、または検出されず	>40、または検出されず	陰性(検出感度以下)

- * 陽性コントロールで $Ct \leq 40$ の立ち上がりが認められない場合や陰性コントロールで立ち上がりが認められる場合は、再測定とします。
- * 検体測定において $Ct > 40$ の立ち上がりが認められる場合は、再測定することを推奨します。

(2) N2 セット(Code : NCV-102)をご使用の場合

国立感染症研究所「病原体検出マニュアル」の「検査法の運用について(第3版)」に記載の通り、NCV-102のみを使用する場合は、以下のように判定します。

N2 セット	判定
≤ 40	陽性
>40、または検出されず	陰性(検出感度以下)

- * 陽性コントロールで $Ct \leq 40$ の立ち上がりが認められない場合や陰性コントロールで立ち上がりが認められる場合は、再測定とします。
- * 検体測定において $Ct > 40$ の立ち上がりが認められる場合は、再測定することを推奨します。

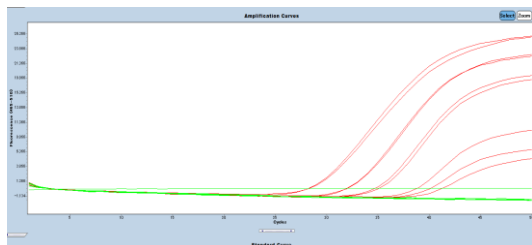
[7] 陽性コントロールの検出例

(1) LightCycler480® Instrument II

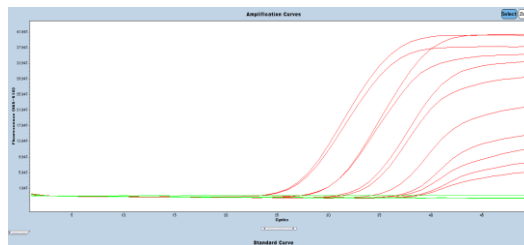
陽性コントロール RNA 50,000~50 コピー（10 倍希釈系列）を n=2、5 コピーを n=5、陰性コントロールを n=2 で検出し、Abs Quant/2nd Derivative Max for All Samples で解析しました。

コピー数	N セット Cq 値		N2 セット Cq 値	
50000	29.4	29.2	27.2	27.3
5000	32.9	32.6	30.8	30.6
500	35.5	35.1	33.8	34.0
50	37.9	38.6	37.6	36.1
5	N/A	39.3	38.4	37.8
5	N/A	N/A	38.1	N/A
5	N/A		N/A	
陰性コントロール	N/A	N/A	N/A	N/A

N セット



N2 セット

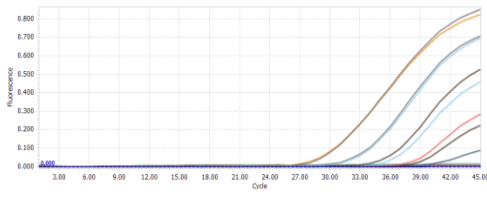


(2) LightCycler® 96

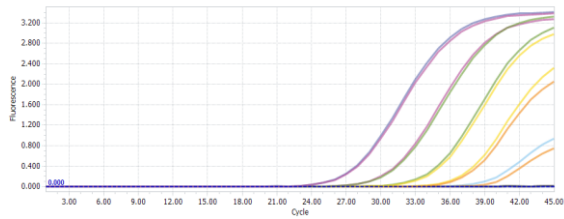
陽性コントロール RNA 50,000~50 コピー（10 倍希釈系列）を n=2、5 コピーを n=4、陰性コントロールを n=2 で検出しました。

コピー数	N セット Cq 値		N2 セット Cq 値	
50000	29.3	29.1	24.5	24.5
5000	32.7	32.4	27.9	27.8
500	35.7	36.6	31.7	31.4
50	39.1	40.0	35.2	34.9
5	N/A	N/A	39.2	38.1
5	N/A	N/A	N/A	N/A
陰性コントロール	N/A	N/A	N/A	N/A

N セット



N2 セット

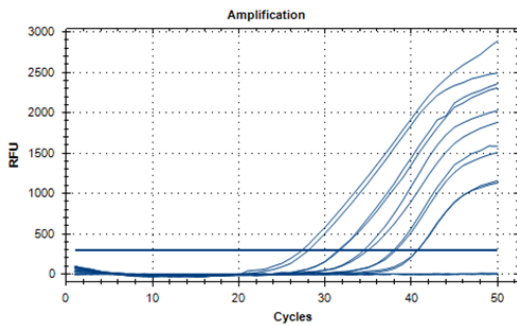


(3) CFX96 Touch Deep Well

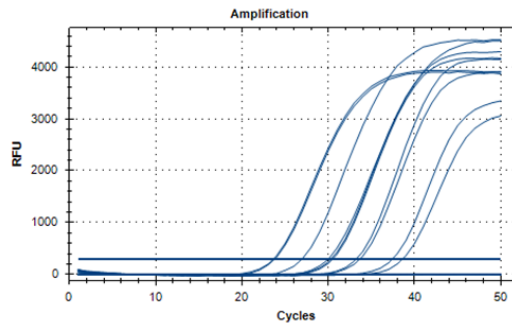
陽性コントロール RNA 50,000~5 コピー(10 倍希釈系列)を n=2、陰性コントロールを n=2 で検出しました。

コピー数	N セット Cq 値		N2 セット Cq 値	
50000	28.1	27.4	23.8	23.6
5000	31.6	31.7	27.0	30.0
500	34.5	35.0	30.3	30.5
50	38.0	38.2	33.7	33.2
5	40.8	40.7	38.6	37.4
陰性コントロール	N/A	N/A	N/A	N/A

N セット



N2 セット



[8] トラブルシューティング

現象	原因	対策
陽性試料が検出できない	試料が多すぎる。	試料を少なくして再検査する。
	前処理液と懸濁液上清が混合されていない。	前処理液および懸濁液上清が PCR チューブの底にて混合されていることを確認してください。
	キャリーオーバー汚染が発生している。	試薬・水を廃棄後、汚染除去作業(拭き取り、UV 照射等)を実施してください。
	試薬が劣化している。	試薬を新しいものに交換する。
陰性コントロールが陽性になる。すべての試料が陽性になる。	キャリーオーバー汚染が発生している。	試薬・水を廃棄後、汚染除去作業(拭き取り、UV 照射等)を実施してください。

より詳細な情報は、弊社ウェブサイトをご覧ください

<https://lifescience.toyobo.co.jp/>

TOYOBO

【製造・販売元】

— 価格・在庫に関するお問い合わせ —

東洋紡株式会社 バイオプロダクト営業部 (大阪)
〒530-0001 大阪府大阪市北区梅田一丁目13番1号
大阪梅田ツインタワーズ・サウス
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 バイオプロダクト営業部 (東京)
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目17番10号 住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

— 製品の内容・技術に関するお問い合わせ —

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00 (土日祝日、休日を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <https://lifescience.toyobo.co.jp/>