

研究用試薬

2205



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

- N1 set-

Code : NCV-301

- N2 set-

Code : NCV-302

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	4
(1) 前処理	4
(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] トラブルシューティング	7

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。

* スプタザイムは極東製薬工業(株)の登録商標です。

[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、熱処理を行うことで 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、アメリカ疾病予防管理センター(CDC)発行「2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-PCR Panel Primers and Probes」(Effective: 24 Jan 2020) に記載されている N1 セット(Code : NCV-301)、N2 セット(Code : NCV-302)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。
- ・ 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。

[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 \times 3
③ 酵素液	550 μ L
④ プライマー・プローブ液*1 (N1 セットまたは N2 セット)	550 μ L

N1 セット検出用 Code : NCV-301、N2 セット検出用 Code : NCV-302

*1 プライマー、プローブは、アメリカ疾病予防管理センター（CDC）発行「2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes」(Effective: 24 Jan 2020) に記載の配列を使用しています。

		Name	Sequence (5' to 3')
N1 セット (NCV-301)	プライマー	2019-nCoV_N1-F	GACCCCAAATCAGCGAAAT
		2019-nCoV_N1-R	TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG
	プローブ*2	2019-nCoV_N1-P	ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC
N2 セット (NCV-302)	プライマー	2019-nCoV_N2-F	TTACAAACATTGGCCGCAAA
		2019-nCoV_N2-R	GCGCGACATTCCGAAGAA
	プローブ*2	2019-nCoV_N2-P	ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG

*2 本プローブは FAM チャンネルで検出します。

- ・「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
- ・スピンドウン用遠心機

[5] プロトコール

(1) 前処理

- ・試料の採取、保管は、厚生労働省より公表されている「新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 病原体検査の指針」を参照してください。
 - ・粘性の高い唾液などについては、試料に対して容量で 1～3 倍量の PBS を加えボルテックスミキサーおよび激しい転倒混和により懸濁、遠心後の上清を使用するか、試料をスプタザイム(極東製薬工業(株))などの喀痰溶解酵素で処理した上、①の前処理液との混合を実施してください。
 - ・「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。

1 反応あたりの調製量	
① 前処理液	3 μ L
試料	6 μ L
/陽性または陰性コントロール	
合計	9 μ L

- * 前処理液 9 μ L、試料 18 μ L を混合し、この処理液の 9 μ L を、次工程の PCR に使用いただくことも可能です。
- * 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に添加してください。
- * 試料や陽性または陰性コントロールを加えていない前処理液については、次の 95 $^{\circ}$ C、5 分間の加熱を行わないでください。

- ② 95 $^{\circ}$ C、5 分間加熱した後、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 $^{\circ}$ Cから取り出し、使用後は直ぐに-20 $^{\circ}$ 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 (N1 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)の熱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
StepOne Plus*(standard mode)

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	×45~50サイクル

*Thermo Fisher Scientific 社装置では、Quencher は"NFQ-MGB"を選択してください。

*ROX 補正をはずして解析を実施してください。

7500Fast**(standard mode)

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	30秒	検出	×45~50サイクル

**ROX 補正をはずして解析を実施してください。装置の反応容量は 30 μ L に設定してください(試薬調製は 50 μ L 系で行います)。

QuantStudio 5*** (standard mode)

逆転写反応	42°C	5分		
プレ変性	95°C	10秒		
変性	95°C	5秒		
伸長	55°C	25秒	検出	×45~50サイクル

***ROX 補正をはずして解析を実施してください。

※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

N1 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 $Ct > 40$ の立ち上がり認められる場合は、再測定することを推奨します。

[7] 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	試料の粘性が高い。	試料をスパタザイム処理する。
	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。
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。	試薬が劣化している。	試薬を新しいものに交換する。
	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/>