

研究用試薬

22-05



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

[Code : NCV-403](#)

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] 実験の前に	5
[6] プロトコール	6
(1) 前処理	6
(2) 陽性コントロール、陰性コントロールの準備	7
(3) RT-PCR 反応液の調製、添加	7
(4) RT-PCR サイクル条件	8
[7] 判定例	8
[8] 実施例	9
[9] 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、タンパク質分解酵素を含みます。保護具（保護メガネ、マスク、保護手袋など）を着用し、吸入を避けてください。

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)、AMPLIRUN は VIRCELL,S.L.の登録商標です。

[1] はじめに

本製品は、唾液、咽頭/鼻咽頭ぬぐい液、ウイルス培養液などの試料から、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2)を検出する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、熱処理を行い、RT-PCR 反応に供することで、RNA 抽出精製作業を行うことなく、ウイルス RNA を検出します。

本製品では、SARS-CoV-2 RNA の N 遺伝子に由来する 2 領域を同時に検出します。さらに、PCR の検出不良による偽陰性の低減のため、内部コントロールを含みます。

◆本製品の特長◆

- ・ 核酸の精製作業がなく、簡便です。
- ・ 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がなく、迅速な測定が可能です。
- ・ 蛍光プローブを用いたリアルタイム PCR による検出のため、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。
- ・ 偽陰性低減のため、内部コントロールを含みます。

[2] 製品内容

本製品には、以下の試薬が含まれ、100回用としてご使用になれます。
陽性コントロールを含みません。「[4] 製品の他に用意するもの」(p.4)を参照ください。

試薬名	容量
① 前処理液	660 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	550 μ L

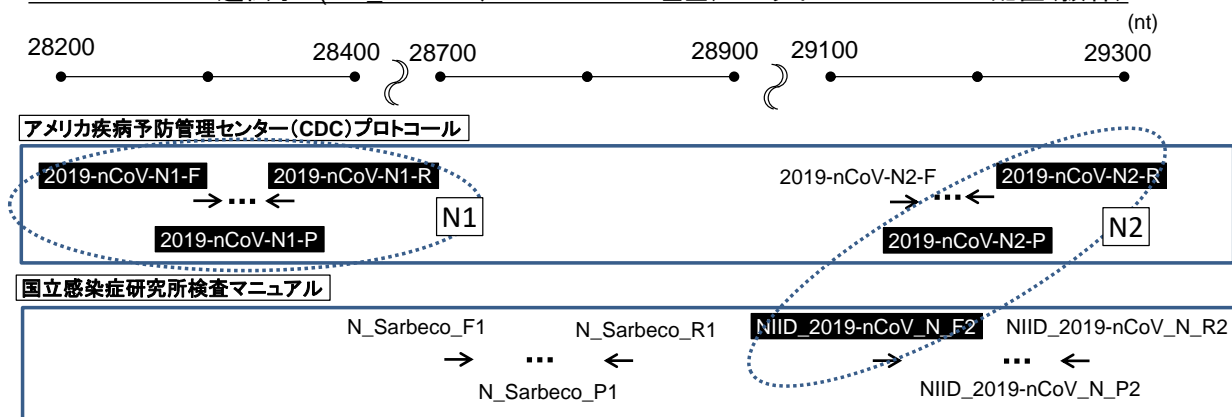
・プライマー、プローブ液

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)、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)に設定された配列から、以下のものを採用しています(下図の白抜き文字)。

N1領域を Cy5、N2領域を ROX、内部コントロールを FAM チャネルで検出します。

	Name	Sequence (5' to 3')
N1	プライマー	2019-nCoV_N1-F 2019-nCoV_N1-R
	プローブ	2019-nCoV_N1-P
	プライマー	NIID_2019-nCoV_N_F2 2019-nCoV_N2-R
N2	プライマー	NIID_2019-nCoV_N_F2 2019-nCoV_N2-R
	プローブ	2019-nCoV_N2-P
	プライマー	2019-nCoV_N2-P

SARS-CoV-2 N遺伝子 (NC_045512、28274-29533塩基) プライマー／プローブ配置(抜粋)



[3] 保存温度

本製品に含まれる試薬はすべて-20℃保存です

[4] 製品のほかに用意するもの

- ・リアルタイム PCR 装置 (FAM、ROX、Cy5 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
- ・陽性コントロール

SARS-CoV-2 抽出 RNA、N 遺伝子を含む合成 RNA、その他標準物質などがご利用いただけます。以下の市販品について、本キットで陽性コントロールとして使用できることを確認しています。

① RNA

- i) EDX SARS-CoV-2 Standard (Exact Diagnostics, Code. COV019) (Bio-Rad 社)
- ii) AMPLIRUN SARS-CoV-2 RNA CONTROL (Vircell, Code.MBC137-R)
- iii) AcroMetrix Coronavirus 2019(COVID-19) RNA Control (Thermo scientific, Code. 954519)
- iv) Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control1 (MT007544.1) (Twist Bioscience, Code. 102019)

② 陽性標準物質

- i) NATtrol SARS-CoV-2 (recombinant) Stock (ZeptoMetrix, Code. 0831042)
- ii) AccuPlex SARS-CoV-2 Reference Material Kit (SeraCare, Code.0505-0126)

- ・Nuclease-free グレードの滅菌蒸留水

陰性コントロールや陽性コントロールの希釈液として使用します。キャリーオーバー汚染防止のため、小分け分注してご使用ください。

例) UltraPure Distilled Water (DNase/RNase Free)

(ThermoFisher, Code. 10977-015)

滅菌水 (ナカライテスク, Code. 06442-95)

[5] 実験の前に

- (1) 試料採取と保存は、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」をご参照ください。
- (2) スパイク試験
 - ・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。
 - ・スパイク試験の陽性コントロールとして RNA を使用する場合、前処理前の試料に RNA を直接スパイクすると、RNA が分解されます。RNA のスパイク試験を実施する際は、あらかじめ前処理液と試料を混合して加熱処理を行い、この前処理済み試料に RNA をスパイクしてください。
 - ・スパイク試験の陽性コントロールとしてウイルス様の陽性標準物質を使用する場合、RNA は分解を受けませんので、未処理の試料に陽性標準物質をスパイクして試験を行うことが可能です。
- (3) 陽性コントロール、陰性コントロール
 - ・実験毎に、陽性コントロール、陰性コントロールを各 1 ウェル以上、実施してください。「[6] プロトコール (2) 陽性コントロール、陰性コントロールの準備」(p.7)を参照ください。
- (4) 本試薬では、検出効率の維持のため、SARS-CoV-2 ウイルスゲノム内の 2 つの領域を検出するように設計しておりますが、プライマー、プローブの配列内に変異が生じた際には検出できない場合があります。
- (5) コンタミネーション対策
 - ・本試薬では、UTP/UNG による増幅産物に対するコンタミネーション対策をしておりますが、試薬調製、試料調製、PCR 増幅のためのエリアを区分けして実験を実施いただくことで、さらに適切なコンタミネーションの防止ができます。
- (6) 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。
- (7) 本試薬は、使用后、速やかに-20℃で保存してください。

[6] プロトコール

(1) 前処理

- ・試料は、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」に従って採取します。
- ・試料が粘性の高い唾液などについては、次のいずれかの処理を行った後に、①のように前処理液に添加するか、RNAの精製を行ってください。DTT処理はリアルタイムPCR検出に影響しますので、実施しないでください。
 - i) 唾液に対して容量で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し、遠心後の上清を用いる。
 - ii) 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する。
- ・精製したRNAを検出する場合、前処理が不要です。リアルタイムPCR反応容器に10 μ L/反応ずつ分取し、「(2)陽性コントロール、陰性コントロールの準備」後、「(3)RT-PCR反応液の調製、添加」にお進みください。
- ・「①前処理液」を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。

① 下記の量をPCRチューブに調製し、5分程度、室温で放置します。

- ・調製の際は、「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 (または陽性、陰性標準物質をスパイクした試料など)	8 μ L
合計	11 μ L

- * 前処理液6 μ L、試料16 μ Lを混合し、この処理液の11 μ Lを、次工程のPCRに使用いただくことも可能です。

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。前処理済み試料を次の反応まで一時的に保存する場合は、氷上または4 $^{\circ}$ Cで保存してください。

- ・前処理液中のタンパク質分解酵素の失活のため、必ず熱処理を実施してください。
- ・前処理後の液は保存できません。
- ・RNAのスパイク試験では、加熱処理後の上記試料にRNA1 μL をスパイクして反応に使用します。

(2) 陽性コントロール、陰性コントロールの準備

結果を判定する際に検出が適切に行えたかを確認するため、陽性コントロール、陰性コントロールの反応を行います。

以下の溶液をリアルタイム PCR を行う反応容器に準備します。

① 陰性コントロール 滅菌水 10 μL

② 陽性コントロール RNA

陽性コントロール RNA	x μL
滅菌水	10-x μL
合計	10 μL

- ・陽性コントロール RNA は 1,000~2,000 コピー／反応を目安に調製します。
- ・希釈の際は低吸着チューブ(シリコナイズチューブなど)をご使用ください。
- ・陽性コントロール RNA の希釈品は用時調製とし、凍結融解は避けてください。

(3) RT-PCR 反応液の調製、添加

① 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ます。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°Cから取り出し、使用後は直ぐに-20°Cに戻してください。
- ・「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。

1 反応あたりの調製量	
②反応液	30 μL
③酵素液	5 μL
④プライマー・プローブ液	5 μL
合計	40 μL

* 複数の反応を行う場合は、反応数+10%程度を目安にマスターミックスを調製してください。

- ② 1 反応あたり 40 μ L を、(1)の前処理済み試料、(2)の陽性、陰性コントロールに添加します。
- ③ チューブキャップでふたをします。
- ④ 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。
- ⑤ 直ちに次の温度サイクルで反応を行います。

(4) RT-PCR サイクル条件

下記の温度サイクルで反応します。

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	60°C	30秒	検出	×45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。

* 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。

[7] 判定例

N1(Cy5)	N2(ROX)	IC(FAM)	判定
≤ 40	≤ 40	≤ 40	陽性
≤ 40	>40、または検出されず	≤ 40	陽性
>40、または検出されず	≤ 40	≤ 40	陽性
>40、または検出されず	>40、または検出されず	≤ 40	陰性(検出感度以下)
検出されず	検出されず	検出されず	判定不能

* 陽性コントロールで $Ct \leq 40$ (1,000~2,000 コピーを使用した場合 $Ct \leq 35$)の立ち上がりが見られなかった場合や陰性コントロールで立ち上がりが見られる場合は、再測定とします。

* 試料測定において $Ct > 40$ の立ち上がりが見られる場合は、再測定することを推奨します。

[8] 実施例

市販の陽性コントロール RNA から希釈系列を作成し、本キットで検出しました。

<N1 (Cy5 チャンネル) Ct 値>

コピー数	AMPLIRUN SARS-CoV-2 RNA CONTROL	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control1 (MT007544.1)	AcroMetrix Coronavirus 2019(COVID-19) RNA Control	EDX SARS-CoV-2 Standard
	Vircell	Twist Bioscience,	Thermo scientific	Exact Diagnostics
500	30.6	31.7	31.7	30.6
50	33.8	35.0	35.2	33.2
	33.6	34.7	35.1	32.5
25	34.5	35.9	35.3	34.1
	35.4	35.7	35.8	33.5
5	36.1	N/A	37.3	35.4
	35.9	37.3	36.6	36.7
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A

<N2 (ROX チャンネル) Ct 値>

コピー数	AMPLIRUN SARS-CoV-2 RNA CONTROL	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control1 (MT007544.1)	AcroMetrix Coronavirus 2019(COVID-19) RNA Control	EDX SARS-CoV-2 Standard
	Vircell	Twist Bioscience,	Thermo scientific	Exact Diagnostics
500	30.9	31.7	31.9	30.2
50	34.0	35.1	35.1	33.1
	33.9	34.9	34.6	33.0
25	34.6	35.6	34.8	33.4
	34.8	35.4	36.2	33.8
5	35.8	38.4	N/A	35.6
	36.2	37.8	37.8	36.5
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A

<IC (FAM チャンネル) Ct 値>

コピー数	AMPLIRUN SARS-CoV-2 RNA CONTROL	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control1 (MT007544.1)	AcroMetrix Coronavirus 2019(COVID-19) RNA Control	EDX SARS-CoV-2 Standard
	Vircell	Twist Bioscience,	Thermo scientific	Exact Diagnostics
500	25.8	25.8	25.7	25.8
50	25.6	25.9	25.6	25.7
	25.9	25.5	25.9	25.3
25	25.8	25.5	26.0	25.8
	25.5	25.7	25.9	25.7
5	25.4	25.5	25.7	26.0
	25.5	25.5	26.0	26.8
NTC	25.5	25.4	25.4	25.9

リアルタイム PCR 装置: CFX96 Touch Deep Well (Bio-Rad) (閾値 100*)

*閾値については、機種、機台により調整が必要です。

[9] トラブルシューティング

現象	原因	対策
内部コントロールが検出できない。	試料により反応が阻害される。	試料を PBS で希釈する、または試料を少なくして再検査してください。
	前処理後の 95℃、5 分の加熱処理の温度が低い。	ご使用のヒートブロックが 95℃まで上昇しているか、温度計で確認してください。
陽性試料が検出できない。	試料の粘性が高い。	試料を PBS で希釈して激しく攪拌し、遠心上清を用いて試験を実施してください。 または試料をスプタザイム処理するか、RNA 抽出を行ってください。
	試料が多すぎる。	試料を少なくして再検査してください。
	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。
	陽性コントロールが劣化している。	陽性コントロールを新しいものに交換してください。 凍結融解を避け、小分け分注して保管し、希釈した陽性コントロールは使用しないでください。
	キャリア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してください。
検出感度が低い。	PCR 機台間差の影響で最適な条件から外れている。	変性温度を 95~92℃の範囲で、伸長温度を 60~55℃の範囲で下げて検討ください。
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。	キャリア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。 試薬調製、試料調製、PCR 増幅のためのエリアを区別して実験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/>