

研究用試薬

22-05



新型コロナウイルス変異株プライマー・プローブ
N501Y
(SARS-CoV-2 Variant Primer・Probe (N501Y))

[Code No : VPM-501](#)

取扱説明書
(2022年5月9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	2
[3]	保存温度	2
[4]	製品のほかに用意するもの	3
[5]	実験の前に	4
[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	9
[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。

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。

プライマー・プローブの配列内に遺伝子の欠損や挿入が生じた際、検出できない場合があります。

* スプタザイム®は極東製薬工業株式会社、AMPLIRUN®は VIRCELL,S.L.の登録商標です。

[1] はじめに

本製品は、リアルタイム RT-PCR 法により新型コロナウイルスのスパイクタンパク質における N501Y 変異を検出するプライマー・プローブです。

別売りの新型コロナウイルス検出 PCR コアキット (SARS-CoV-2 Detection PCR Core Kit) と組み合わせて使用することで、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、RNA 抽出精製作業を行うことなく、ウイルス RNA の変異を検出します。

◆本製品の特長◆

新型コロナウイルス検出 PCR コアキット (SARS-CoV-2 Detection PCR Core Kit) と組み合わせて使用することで以下の特長を示します。

- ・ 簡単な前処理を実施することで、核酸の精製作業なしで、変異の有無を検出できます。
- ・ 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。

[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。

別売りの新型コロナウイルス検出 PCR コアキット (SARS-CoV-2 Detection PCR Core Kit) と組み合わせて使用ください。また、陽性コントロール、陰性コントロールは含みません。詳細は「[4] 製品の他に用意するもの」(p.3)を参照ください。

試薬名	容量
プライマー・プローブ液 (N501Y)	550 μ L

10×の組成になっています。野生株を FAM、N501Y をもつ変異株を Cy5 で検出します。

[3] 保存温度

本製品に含まれる試薬は-20℃保存です

[4] 製品のほかに用意するもの

- ・新型コロナウイルス検出 PCR コアキット

SARS-CoV-2 Detection PCR Core Kit(Code No. VCK-101)

- ・リアルタイム PCR 装置 (FAM、Cy5 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

- ・スピンドウン用遠心機

- ・陽性コントロール

以下の市販品について、野生株の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 No. COV019)
(Bio-Rad)

- ii) AMPLIRUN® SARS-CoV-2 RNA CONTROL (Vircell, Code No. MBC137-R)

- iii) AcroMetrix Coronavirus 2019(COVID-19) RNA Control (Thermo Fisher Scientific, Code No. 954519)

- iv) Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control1 (MT007544.1) (Twist Bioscience, Code No. 102019)

- v) Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 2 (MN908947.3) (Twist Bioscience, Code No. 102024)

② 陽性標準物質

- i) NATtrol SARS-CoV-2 (recombinant) Stock (ZeptoMetrix, Code No. 0831042)

- ii) AccuPlex SARS-CoV-2 Reference Material Kit (SeraCare, Code No. 0505-0126)

また N501Y の変異を持つ変異株のコントロールとしては、以下の市販品が使用できることを確認しています。

Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 15 (B.1.1.7_601443)

(Twist Bioscience, Code No. 103909)

・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。キャリア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) (Thermo Fisher Scientific, Code No. 10977-015)

滅菌水(ナカライテスク、Code No. 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、陽性コントロールとして野生株コントロールと変異株コントロール、陰性コントロールを各 1 ウェル以上実施することを推奨いたします。「[6] プロトコル (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) 本試薬は新型コロナウイルスの完全な検出を保証するものではありません。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されない場合があります。また検体中のウイルス量や夾雑物の多寡など、条件によっては検出されない場合があります。
- (5) コンタミネーション対策
- ・組み合わせて使用する SARS-CoV-2 Detection PCR Core Kit 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、遮光に留意し、使用後は速やかに-20℃で保存してください。

[6] プロトコール

別売りの新型コロナウイルス検出 PCR コアキット (SARS-CoV-2 Detection PCR Core Kit) と組み合わせて使用してください。以下に、SARS-CoV-2 Detection PCR Core Kit と組み合わせて使用する際の操作法を示します。

(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® (極東製薬工業株式会社) 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 反応容器に精製 RNA 10µL/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。
- ・SARS-CoV-2 Detection PCR Core Kit に添付の「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 µL
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 µL
合計	11 µL

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

- ② 95℃、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℃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 RNA 1μL 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 10μL

- 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。

- ・SARS-CoV-2 Detection PCR Core Kit に添付の「②反応液」、本製品の「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。
- ・SARS-CoV-2 Detection PCR Core Kit に添付の「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」は氷上に置いて使用するか、または使用する直前に-20℃から取り出し、使用後は直ぐに-20℃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
プライマー・プローブ液	5 μ L
合計	40 μ L

* 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)の陽性コントロール、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、スピンドウンしてください。
- 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(FAM/Cy5)	×45サイクル

* Thermo Fisher Scientific の装置では、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

FAM の増幅曲線が反応時間内に立ち上がった場合、変異なしと判定します。
Cy5 の増幅曲線が反応時間内に立ち上がった場合、変異ありと判定します。

FAMとCy5共に増幅が認められる場合があります。その場合、FAMとCy5の蛍光強度を確認し、FAMの蛍光強度が高い場合、変異なし。Cy5の蛍光強度が高い場合、変異ありと判定します。

FAM 野生株検出	Cy5 変異株検出	判定
≤45	>45、または検出されず	変異なし
>45、または検出されず	≤45	変異あり
>45、または検出されず	>45、または検出されず	判定不能 検出感度以下

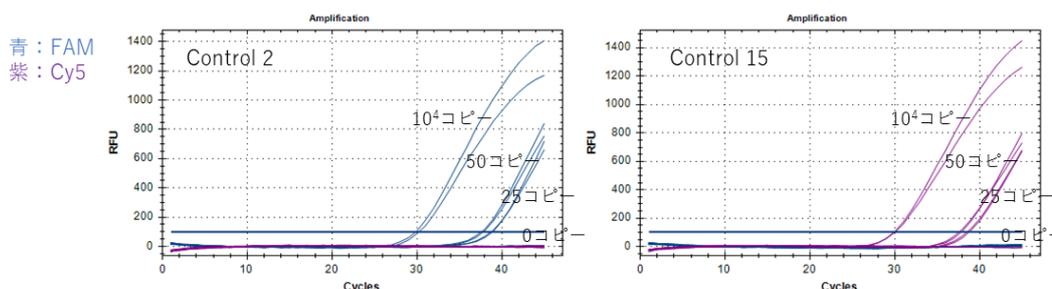
- * 陽性コントロール(1,000~2,000 コピーを使用した場合)で Ct≤40 の立ち上がりが認められない場合や陰性コントロールで立ち上がりが認められる場合は、再測定することを推奨します。
- * FAMとCy5共に立ち上がりが見られ、野生株、変異株の判定が難しい場合、RT-PCR サイクル条件の伸長温度を 1~2℃ 上げることで、改善することがあります。
- * FAMとCy5共に立ち上がりが見られない場合、RT-PCR サイクル条件の伸長温度を 1~2℃ 下げることで、検出感度が改善することがあります。

[8] 実施例

リアルタイム装置に CFX96 Touch Deep Well(Bio-Rad)を用い、閾値 100 で解析した実施例を紹介いたします。閾値については機種、機台により調整が必要です。

・N501Y 変異検出例

SARS-CoV-2 Variant Primer・Probe (N501Y) (Code No. VPM-501) を用いて、Twist Bioscience の Control 2 (MN908947.3) (野生株) と Control 15 (B.1.1.7_601443) (N501Y 変異株)、それぞれ 10⁴、50、25、0 コピーを鋳型として使用した場合の反応例を示します。



[9] 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。(増幅曲線でFAM、Cy5どちらも立ち上がりが見られない。)	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。
	前処理の熱処理が不足している(温度が低い)。	熱処理の温度を上げてください。
	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。
	試料が劣化している。	試料を再採取してください。
	RT-PCR サイクル条件が測定機器に適していない。	伸長温度を 1~2°C 下げてください。検出感度が向上する場合があります。
野生株・変異株の判定ができない。(FAM、Cy5 どちらも立ち上がりが見られる。)	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。
	RT-PCR サイクル条件が測定機器に適していない。	伸長温度を 1~2°C 上げてください。 FAM、Cy5 の分離が改善する場合があります。
陽性コントロールが陰性になる。	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。
	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。
陰性コントロールが陽性になる。	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/>