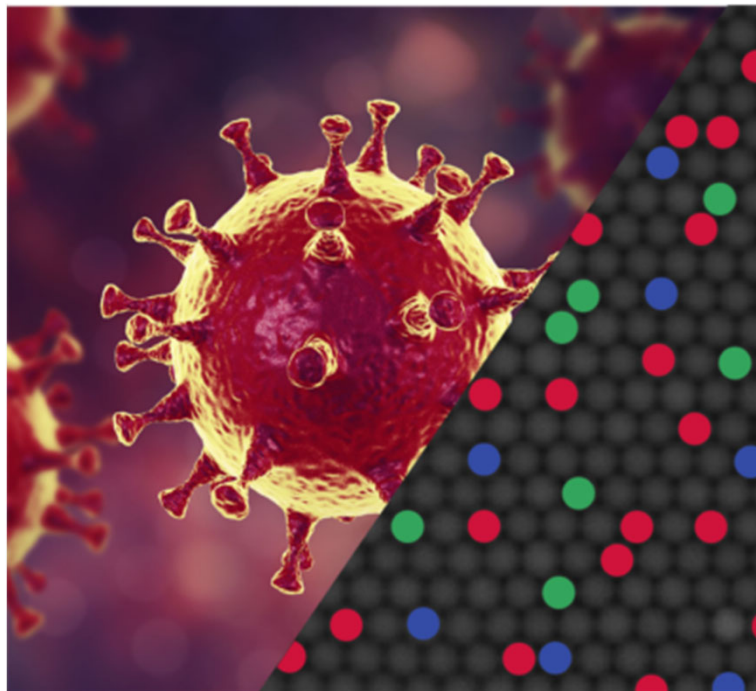




COVID-19を検出するための 3-color Crystal Digital PCR™ キット



富士フイルム 和光純薬株式会社

COVID-19検出のための 1-step RT-dPCRモデルの開発

中国湖北省武漢で最初に報告されたSARS-CoV-2ウイルスによる2019年から2020年のCOVID-19の発生は、世界保健機関によりパンデミックと宣言されました。保健当局の働きを促進するためには、安定な臨床検査の開発が最も重要です。多くの公に入手可能なSARS-CoV-2およびSARS関連配列を使用して、SARS-CoV-2に特異的なPCRベースのアッセイがいくつか設計されています(Chan et al., 2020)。ApexBio(Hsinchu 科学工業団地)によって開発されたNaicaと互換性のある3-color Crystal Digital PCR™ キット(図1)には、SARS-CoV-2 一本鎖プラスRNAゲノムの2つの異なる領域(ORF1abおよびNucleocapside(N) 遺伝子)に固有のプライマーおよびFAMおよびHEX標識プローブが含まれています。Naicaシステムの3番目の蛍光チャンネルは、Cy5標識プローブによるヒトハウスキーピング遺伝子を検出するための内因性PCRリファレンスとして使用されています。このシングルアッセイ設計により、2つの独立したSARS-CoV-2保存領域を検出しながら、3番目の検出を使用してPCRの有効性を同時にモニタリングできます(図2)。



図1: ApexBioが開発したすぐに使用できるキット(研究用)には、Naicaシステムで 1-step 3カラー RT Crystal Digital PCR™ を実行するために必要なすべての試薬が含まれています。

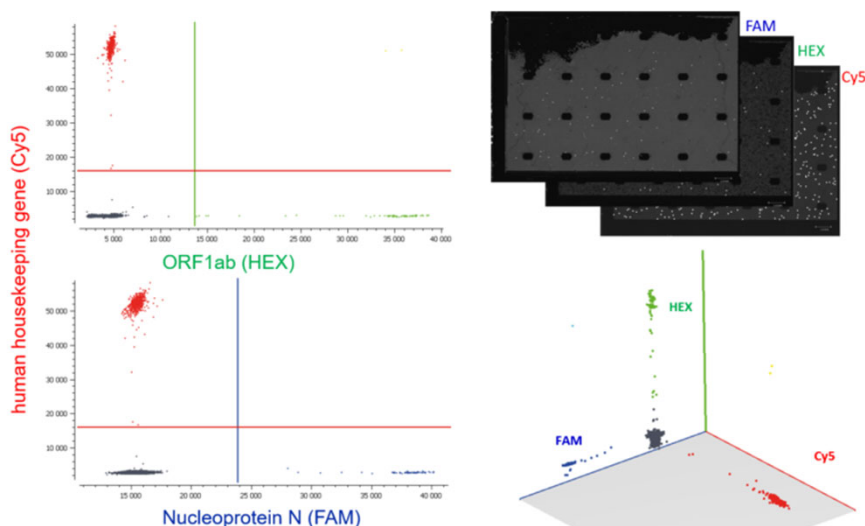


図2: クリスタルマイナーで生成された2D(左)および3Dドットプロット(右)と、RT-dPCR SARS-CoV-2検出キット(研究用)でのヒトRNAコントロールとターゲットシーケンスから得られたクリスタルドロップレットイメージ(右上)。

Chan JF, Yip CC, To KK, Tang TH, Wong SC, Leung KH, Fung AY, Ng AC, Zou Z, Tsoi HW, Choi GK, Tam AR, Cheng VC, Chan KH, Tsang OT, Yuen KY. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/HeI real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay validated in vitro and with clinical specimens. J Clin Microbiol. 2020 Mar 4.

COVID-19の高感度かつ特異的な検出

SARS-CoV-2検出キットがターゲットとする合成配列を含む実験モデルを連続希釈し、7つの希釈点を3回評価しました。合計1ngのヒトRNAを各測定に追加しました。結果は、ヌクレオキャプシド(N)遺伝子陽性コントロールで0.6 copies/ μ L (25 μ L 反応液あたり5コピー)、およびORF1ab遺伝子の陽性コントロールで0.9 copies/ μ L (25 μ L 反応液あたり7コピー)までのSARS-CoV-2配列の安定かつ特異的な検出ができました。さらに希釈すると、両方の遺伝子について、0.25 copies/ μ L (25 μ L 反応液あたり2コピー)まで、確率論的ですが非常に高感度な検出が示されました(図3)。並行して、ヒトRNAのみを含む合計15の陰性コントロールがテストされ、偽陽性は観察されませんでした。

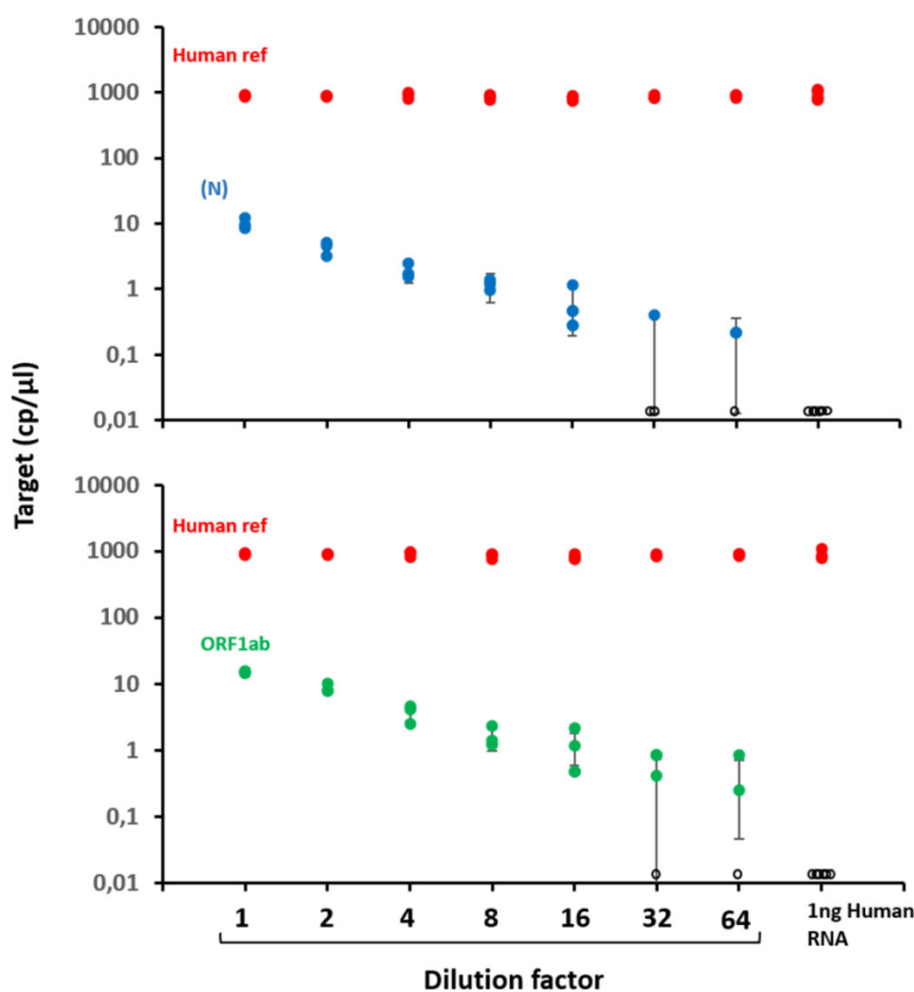






図3: SARS-CoV-2検出用の3カラーRT Crystal Digital PCR™ キット(研究用)の感度。SARS-CoV-2合成ターゲットの連続希釈液を、1ngのヒトRNAのバックグラウンドで3回アッセイしました。合計8 μ Lの陽性コントロールを各25 μ Lの反応液に加えました。垂直バーは、3回繰り返しの理論上の95%ポアソン信頼区間を表します。空の円(O)は、SARS-CoV-2配列が検出されなかったことを表します。

アプリケーションノートハイライト

-  SARS-CoV-2検出キットは、1回の反応で2つのSARS-CoV-2特異的配列と内部ヒトコントロールを同時に定量化する、すぐに使用できる3カラー-RT Crystal Digital PCR™ キット(研究用)です。
-  Naica システムを使用した安定かつ高感度な検出は、それぞれSARS-CoV-2 Nucleocapside (N) およびORF1ab遺伝子について0.6 copies/μL、および0.9 copies/μL まで観察されました。
-  さらに希釈すると、2つのSARS-CoV-2陽性コントロールは0.25 copies/μL までの、確率論的ですが非常に高感度な検出が示されました。
-  25μL 反応液あたり1ng のヒトRNAを含む15のネガティブコントロールで偽陽性は観察されませんでした。



デジタルPCRの詳細については、StillaのデジタルPCRラーニングセンターを参照ください。
www.gene-pi.com

富士フイルム 和光純薬株式会社

本 社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号
TEL: 06-6203-2759 (機器システム部)
東 京 本 店 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号
TEL: 03-3270-8124 (機器システム部)

●九州営業所 TEL: 092-622-1005 (代) ●中国営業所 TEL: 082-569-8095 (代)
●東海営業所 TEL: 052-772-0788 (代) ●筑波営業所 TEL: 029-858-2278 (代)
●東北営業所 TEL: 022-222-3072 (代) ●北海道営業所 TEL: 011-271-0285 (代)
●横浜営業所 TEL: 045-225-8041 (代)

URL : <http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/kiki/index.htm>

