

遺伝子研究用

SARS-CoV-2 RT-qPCR Detection Kit

本製品は、SARS-CoV-2 を TaqMan[®]プローブを用いた 1-step RT-qPCR 法で検出するキットです。高い活性を持つ Hot Start Reverse Transcription DNA Polymerase を用いた 1 酵素系 RT-qPCR 法を採用し、約 130 分かかる RT-qPCR 反応を約 45 分間で終わられます。

キットには、国立感染症研究所の病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1 に記載されているプライマーおよびプローブとポジティブコントロール RNA が含まれます。

【貯 法】

-20℃

【使用期限】

ラベルに記載

【ご使用の前に】

- 実験施設の取り決めに従い、安全性に留意して実験を行ってください。
- 実験中は手袋や保護メガネなど保護具を着用してください。
- 試薬の調製は安全キャビネットもしくはクリーンベンチ内で行ってください。
- 試薬調製は氷上で行ってください。
- 実験中はヌクレアーゼの混入に注意してください。
- TE バッファーなど EDTA が含まれるバッファーを使用しないでください。

【別途必要な試薬および器具】

- qPCR(Real-Time PCR) 装置
- マイクロチューブ遠心機
- Nuclease フリー滅菌水* (例:コード No. 316-90101, ニッポンジーン)

* Positive Control RNA の希釈に使用します。

- マイクロピペットおよび Nuclease フリーピペットチップ
- Nuclease フリー1.5mL チューブ (DNA/RNA 低吸着品が望ましい。例 : Micro tube 1.5ml DNA LowBind, Sarstedt)
- qPCR(Real-Time PCR) プレートとプレートシール、もしくは qPCR(Real-Time PCR) チューブとキャップ

【キット構成】

試薬番号	コード No.	試薬名	容量
1	283-32861	5×Reaction Buffer	1,200μL×2
2	280-32871	2mmol/L dNTPs	1,200μL×2
3	287-32881	50mmol/L Manganese(II) Acetate	600μL×1
4	284-32891	Hot Start Reverse Transcription DNA Polymerase	150μL×1
5	287-32901	Distilled Water, Nuclease-free	1,400μL×1
6	284-32911	Fw Primer N_Sarbeco_F1(10μmol/L)	360μL×1
7	281-32921	Rv Primer N_Sarbeco_R1(10μmol/L)	480μL×1
8	288-32931	TaqMan [®] Probe N_Sarbeco_P1(5μmol/L)	240μL×1
9	285-32941	Fw Primer NIID_2019-nCOV_N_F2(10μmol/L)	300μL×1
10	282-32951	Rv Primer NIID_2019-nCOV_N_R2(10μmol/L)	420μL×1
11	289-32961	TaqMan [®] Probe NIID_2019-nCOV_N_P2(5μmol/L)	240μL×1
12	286-32971	Positive Control RNA, N set No.1(1fg/μL)	1,500μL×1
13	283-32981	Positive Control RNA, N set No.2(N2)(1fg/μL)	1,500μL×1

TaqMan[®]は Roche Diagnostics K.K. の登録商標です。

【プライマーおよびプローブの配列】

試薬番号	セット名	試薬名	配列(5' to 3')
6	N セット	Fw Primer N_Sarbeco_F1(10μmol/L)	CACATTGGCACCCGCAATC
7		Rv Primer N_Sarbeco_R1(10μmol/L)	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG
8		TaqMan [®] Probe N_Sarbeco_P1(5μmol/L)	6-FAM -ACTTCCTCAAGGAACAACAT TGCCA- BHQ-1
9	N セット No.2 (N2 セット)	Fw Primer NIID_2019-nCOV_N_F2 (10μmol/L)	AAATTTTGGGGACCAGGAAC
10		Rv Primer NIID_2019-nCOV_N_R2 (10μmol/L)	TGGCACCTGTGTAGGTCAAC
11		TaqMan [®] Probe NIID_2019-nCOV_N_P2 (5μmol/L)	6-FAM -ATGTCGCGCATTGGCATGGA - BHQ-1

【Positive Control RNA のコピー数*】

試薬番号	コード No.	試薬名	RNA コピー数
12	286-32971	Positive Control RNA, N set No.1(1fg/μL)	箱左側面の
13	283-32981	Positive Control RNA, N set No.2(N2)(1fg/μL)	シールに記載

* Positive Control RNA の配列は [Shirato et al \(2020\)](#) の Fig.1 と同様である。

*コピー数は、デジタル PCR (Stilla Technologies 社 Naica™ System) による絶対定量で測定した。

【使用方法】

<試薬の準備>

1. キットに含まれる試薬を氷上で融解します。
2. 各試薬をピペティングあるいはボルテックスミキサーでよく混合した後、遠心機でスピンドウンします。

1. 陽性コントロールの希釈

Positive Control RNA, N set No.1(1fg/μL)および Positive Control RNA, N set No.2(N2)(1fg/μL)を Nuclease フリー滅菌水で希釈し、任意*のコピー数に調製します。作製には Nuclease フリー-1.5mL チューブを使用します。

希釈に TE バッファーなど EDTA が含まれるバッファーは使用しないでください。

*国立感染症研究所の病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1 では、50 コピー/5μL の陽性コントロールを検出できる測定系が推奨されている。

また、陽性コントロールの検出精度が確認されていれば、濃度は 1 点で構わないとされている。

2. PCR Master Mix (N セット) の作製

下表に従って必要量を作製します。

試薬番号	コード No.	部材名	1 ウェル分, μL	20 ウェル分, μL
1	283-32861	5×Reaction Buffer	4.00	80
2	280-32871	2mmol/L dNTPs	4.00	80
3	287-32881	50mmol/L Manganese(II) Acetate	1.00	20
4	284-32891	Hot Start Reverse Transcription DNA Polymerase	0.25	5
5	287-32901	Distilled Water, Nuclease-free	2.15	43
6	284-32911	Fw Primer N_Sarbeco_F1(10μmol/L)	1.20	24
7	281-32921	Rv Primer N_Sarbeco_R1(10μmol/L)	1.60	32
8	288-32931	TaqMan Probe N_Sarbeco_P1(5μmol/L)	0.80	16
		Total	15.0	300

3. PCR Master Mix (N セット 2) の作製

下表に従って必要量を作製します。

試薬番号	コード No.	試薬名	1 ウェル分, μL	20 ウェル分, μL
1	283-32861	5×Reaction Buffer	4.00	80
2	280-32871	2mmol/L dNTPs	4.00	80
3	287-32881	50mmol/L Manganese(II) Acetate	1.00	20
4	284-32891	Hot Start Reverse Transcription DNA Polymerase	0.25	5
5	287-32901	Distilled Water, Nuclease-free	2.55	51
9	285-32941	Fw Primer NIID_2019-nCOV_N_F2(10 $\mu\text{mol/L}$)	1.00	20
10	282-32951	Rv Primer NIID_2019-nCOV_N_R2(10 $\mu\text{mol/L}$)	1.40	28
11	289-32961	TaqMan Probe NIID_2019-nCOV_N_P2(5 $\mu\text{mol/L}$)	0.80	16
		Total	15.0	300

4. qPCR プレートへ PCR Master Mix の添加

プレートの各ウェルへ作製した PCR Master Mix (N セット) と PCR Master Mix (N セット 2) それぞれを 15 μL ずつ入れます。

5. 陰性コントロール、検体、陽性コントロールの添加

PCR Master Mix (N セット) もしくは PCR Master Mix (N セット 2) を添加した各ウェルへ以下を添加します。

- (1). 陰性コントロール (例:Nuclease フリー滅菌水) を 5 μL 加えます。
- (2). 検体の RNA を 5 μL に加えます。
- (3). 希釈した陽性コントロール RNA を 5 μL 加えます。
- (4). プレートシールでウェルを閉じます。

<続く>

<96 ウェルプレートのサンプル配置例>

検体 5 種類、陽性コントロール 1 種類、n=2 の例です。

Posi : 陽性コントロール, Nega : 陰性コントロール, S1-S5 : 検体

N : N セット条件, N2 : N2 セット条件

	1	2	3	4	5	6	7	8	9-12
A		posi(N)							
B		posi(N)		S1(N)	S2(N)	S3(N)	S4(N)	S5(N)	
C		posi(N2)		S1(N)	S2(N)	S3(N)	S4(N)	S5(N)	
D		posi(N2)		S1(N2)	S2(N2)	S3(N2)	S4(N2)	S5(N2)	
E		nega(N)		S1(N2)	S2(N2)	S3(N2)	S4(N2)	S5(N2)	
F		nega(N)							
G		nega(N2)							
H		nega(N2)							

6. RT-qPCR 反応

qPCR(Real-Time PCR) 装置にプレートを設定し、以下のプログラムを設定します。反応終了後は 4℃となるように設定します。プログラムを設定後、反応をスタートさせます。検出波長は FAM を選択します。

反応条件	
Pre-denaturation	90℃, 30 sec.
Reverse transcription	60℃, 5 min.
Pre-denaturation	95℃, 1 min.
Denature	95℃, 3 sec.*
Annealing & Extension	60℃, 5 sec.*
} 45 cycles	
4℃	

*装置によっては短い時間（3 秒間や 5 秒間）を設定できない場合があります。その場合は、装置の設定可能な最短時間をプログラムしてください。

7. 検出

装置のプロトコルに従い、検出します。

<参考文献>

[国立感染症研究所の病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1.](#)

[Shirato et al. \(2020\) Development of genetic diagnostic methods for novel coronavirus](#)

[2019 \(nCoV-2019\) in Japan. *Jpn J Infect Dis* doi: 10.7883/yoken.JJID.2020.061.](#)

<改訂履歴>

2020年4月15日 初版

2020年4月24日 文章表現を訂正。

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪府中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741