

コード No. 283-34201 (300 反応用)

遺伝子研究用

**N2 Primer/Probe/Control RNA for NIID 2019-nCoV**

本製品は、国立感染症研究所が発行する「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1」に掲載されている N セット No.2 (N2 セット) です。フォワードプライマー、リバースプライマー、TaqMan<sup>®</sup>プローブ (FAM 修飾)、ポジティブコントロール RNA の 4 点が含まれています。新型コロナウイルスのリアルタイム RT-PCR 検査にご使用ください。本キットに RT-PCR 試薬は含まれていません。

TaqMan<sup>®</sup>は Roche Diagnostics K.K. の登録商標です。**【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。

**【別途必要な試薬および器具】**

- リアルタイム PCR(Real-Time PCR) 装置
- リアルタイム RT-PCR 試薬
- 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)
- 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)

- リアルタイム PCR(Real-Time PCR)プレートとプレートシール、もしくはリアルタイム PCR(Real-Time PCR)チューブとキャップ

#### 【キット構成】

コード No.	試薬名	内容	濃度	容量
280-34211	NIID 2019-nCoV N F2	フォワードプライマー	10 $\mu$ mol/L	300 $\mu$ L $\times$ 1
287-34221	NIID 2019-nCoV N R2	リバースプライマー	10 $\mu$ mol/L	420 $\mu$ L $\times$ 1
284-34231	NIID 2019-nCoV N P2	TaqMan <sup>®</sup> プローブ	5 $\mu$ mol/L	240 $\mu$ L $\times$ 1
281-34241	Positive Control RNA, N2	ポジティブコントロール*	ラベルに記載	1,500 $\mu$ L $\times$ 1

TaqMan<sup>®</sup>は Roche Diagnostics K.K. の登録商標です。

\*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ています。

#### 【プライマーおよびプローブの配列と修飾】

試薬名	配列(5' to 3')	修飾
NIID 2019-nCoV N F2	AAATTTTGGGGACCAGGAAC	-
NIID 2019-nCoV N R2	TGGCACCTGTGTAGGTCAAC	-
NIID 2019-nCoV N P2	ATGTCGCGCATTGGCATGGA	FAM
Positive Control RNA, N2	<a href="#">Shirato et al (2020)</a> の Fig.1 と同様	-

## 【使用方法】

### <試薬の準備>

1. キットに含まれる試薬を融解します。
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均一になるよう混合します。ボルテックスミキサーで混合した場合は、混合後にマイクロチューブ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

キットに含まれる「Positive Control RNA, N2」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。

\*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/5 $\mu$ L 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 の作製 (20 $\mu$ L/well 反応系の例)

下表に従い、1 ウェルあたり 15 $\mu$ L の PCR Master Mix を調製します。使用するウェル数に応じて必要量を作

製します。

試薬名	1 ウェル分, $\mu\text{L}$	20 ウェル分, $\mu\text{L}$
2x 調整済み RT-PCR 試薬	10.0	200
NIID 2019-nCoV N F2	1.0	20
NIID 2019-nCoV N R2	1.4	28
NIID 2019-nCoV N P2	0.8	16
Distilled Water, Nuclease-free*	1.8	36
Total	15.0	300

\*本製品に「Distilled Water, Nuclease-free」は付属していません。また、ROX など他の試薬を PCR Master Mix に添加する場合、その分の「Distilled Water, Nuclease-free」の添加量を減らします。

### 3. リアルタイム PCR プレートへ PCR Master Mix の添加

PCR プレートの各ウェルもしくは PCR チューブへ作製した PCR Master Mix を 15 $\mu\text{L}$  ずつ添加します。

\*備考

予め別のチューブで PCR Master Mix と「陰性コントロール、検体の RNA、陽性コントロール」を混合し、最後に PCR プレートの各ウェルもしくは PCR チューブへ添加する方法でも問題ありません。

### 4. 陰性コントロール、検体、陽性コントロールの添加

PCR Master Mix を添加した PCR プレート/チューブ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 $\mu\text{L}$  加えます（陰性条件）。
- (2). 検体の RNA を 5 $\mu\text{L}$  加えます（検査検体）。
- (3). 陽性コントロール RNA を 5 $\mu\text{L}$  加えます（陽性条件）。

### 5. RT-qPCR 反応

リアルタイム PCR 装置に PCR プレートもしくは PCR チューブをセットします。蛍光波長は FAM を選択します。

反応条件はご使用の RT-PCR 試薬の推奨反応条件に従い設定します。

<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 11 月 29 日初版

製造発売元

**富士フィルム 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