

Code No. 287-35603(20 反応用)

281-35601(200 反応用)

遺伝子研究用

**SARS-CoV-2 E484K Mutation Detection Kit**

本製品は、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) のベータ型 (B.1.351) 及びガンマ型 (P.1) 等に共通の変異である E484K 遺伝子変異を 1-step RT-qPCR 法で検出するキットです。

SARS-CoV-2 由来 RNA の S 遺伝子を標的とした独自のプライマーとプローブを採用することにより、E484K 変異を持つ SARS-CoV-2 由来 RNA の高感度検出を実現しました。

※ベータ型 (B.1.351) : 南アフリカで最初に検出された変異株

ガンマ型 (P.1) : ブラジルで最初に検出された変異株

**【貯法】**

冷凍 (−20℃) 保存

**【ご使用前に】**

- キットの各試薬は小分けをして保管し、なるべく凍結融解の回数を減らしてください。
- 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。
- クリーンな環境で実験を行ってください。また、RNA やヌクレアーゼの混入に注意してください。偽陽性もしくは偽陰性の原因になります。

<クリーンベンチ清掃例>

実験器具類用 RNase 不活化剤 (例 : RNase Knockout, コード No. 181-03381) をクリーンベンチ内に噴霧し、5 分間以上経過した後にふき取ります。次に 80%エタノールを噴霧し、15 分間以上経過した後にふき取ります。その後、UV 照射を 30 分以上行います。

- 試薬調製は氷上で行ってください。
- 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
- ボルテックスミキサー
- 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)
- 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
- 氷もしくは保冷剤

【キット構成】

試薬名	20 反应用	200 反应用
RT Enzyme Mix (20×)	20μL×1 本	200μL×1 本
One-Step Reaction Mix (2×)	200μL×1 本	1mL×2 本
484E Wild Type Primer & Probe Mixture	10μL×1 本	100μL×1 本
E484K Mutant Type Primer & Probe Mixture	10μL×1 本	100μL×1 本

陽性コントロールに関しては弊社までお問合せください。

※本品には補正用ダイが含まれているため、ROX 試薬の添加は不要です。ROX と同等のダイ (色素) が使用されているため、ROX フィルターで検出できます。  
 ※青色トラッキング・ダイが含まれていますが、qPCR 反応やシグナルに影響を及ぼすことはありません。

【プローブの標識】

試薬名	Probe 標識
484E Wild Type Primer & Probe Mixture	FAM
E484K Mutant Type Primer & Probe Mixture	FAM

## 【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. RNA サンプルの調整

陽性検体の拭い液又は唾液などから RNA を精製します。

[RNA 精製キットの例]

NIPPONGENE ISOSPIN RNA Virus ~ For coronavirus RNA extraction ~ [コード No. 318-08971]

ISOSPIN Viral RNA [コード No. 310-08931]

QuickGene AutoS RNA Virus Kit [コード No. 633-50801]

QuickGene RNA blood cell kit S [コード No.637-23571]

### 2. PCR 反応液の調整

1 検体について、それぞれ下記の 2well を調整します。

精製 RNA 溶液	8 $\mu$ L
484E Primer / Probe Set	1 $\mu$ L
One-Step Reaction Mix (2 $\times$ )	10 $\mu$ L
RT Enzyme Mix (20 $\times$ )	1 $\mu$ L
<hr/>	
	Total 20 $\mu$ L

精製 RNA 溶液	8 $\mu$ L
E484K Mutation Primer / Probe Set	1 $\mu$ L
One-Step Reaction Mix (2 $\times$ )	10 $\mu$ L
RT Enzyme Mix (20 $\times$ )	1 $\mu$ L
<hr/>	
	Total 20 $\mu$ L

### 3. RT-qPCR 反応

qPCR(Real-Time PCR) 装置にプレートをセットし、以下のプログラムを設定します。プログラムを設定後、反応をスタートさせます。

反応条件	
Reverse transcription	55°C, 10 min.
Pre-denaturation	95°C, 1 min.
Denature	95°C, 10 sec.
Annealing & Extension (測定)	60°C, 30 sec.

} 45 cycles

装置のプロトコルに従い、結果を確認します。

#### 4. 結果の解釈

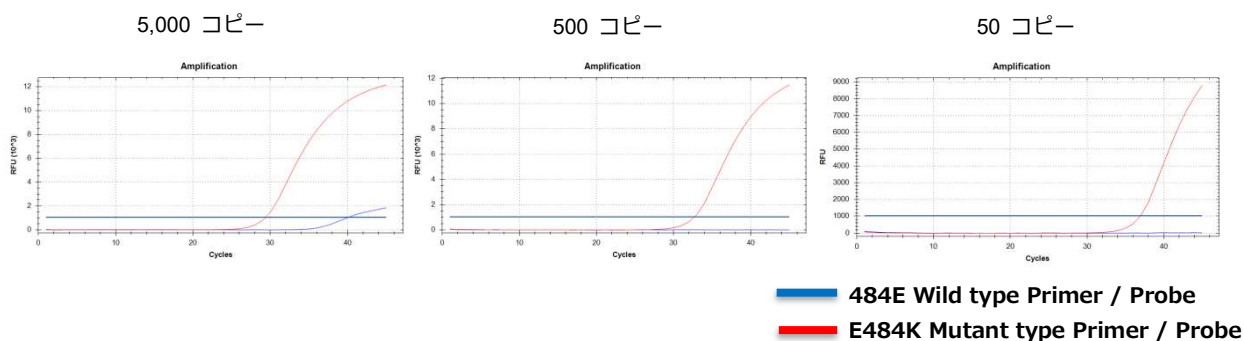
国立感染症研究所より譲渡された変異株を本キットで測定した結果を示します。  
本例を参考に変異の有無を判定して下さい。

##### <E484K 変異を持つサンプルの測定結果①>

測定サンプル：国立感染症研究所より譲渡されたベータ型の変異株 (TY8-612：

E484K 変異、N501Y 変異を持つ)

サンプルコピー数：5,000, 500, 50 コピー / Well で測定



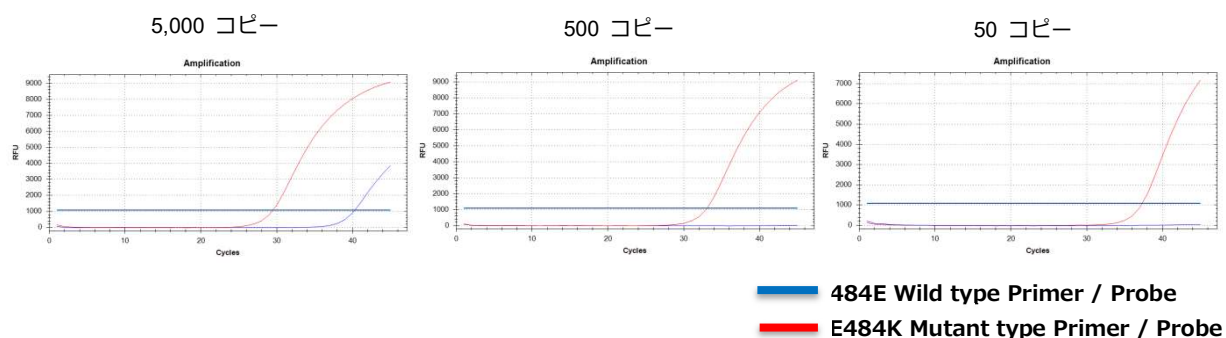
ベータ型の変異株は、E484K 変異を持つため、E484K Mutant type Primer / Probe の増幅曲線（赤）が 484E Wild type Primer / Probe の増幅曲線（青）より早期に立ち上がります。  
484E Wild type Primer / Probe について、5,000 コピー条件ではわずかに増幅シグナルが見られましたが、変異型の方がより低い Ct 値で検出されたため、E484K 変異株と判断できません。

##### <E484K 変異を持つサンプルの測定結果②>

測定サンプル：国立感染症研究所より譲渡されたガンマ型の変異株 (TY7-501：

E484K 変異、N501Y 変異を持つ)

サンプルコピー数：5,000, 500, 50 コピー / Well で測定



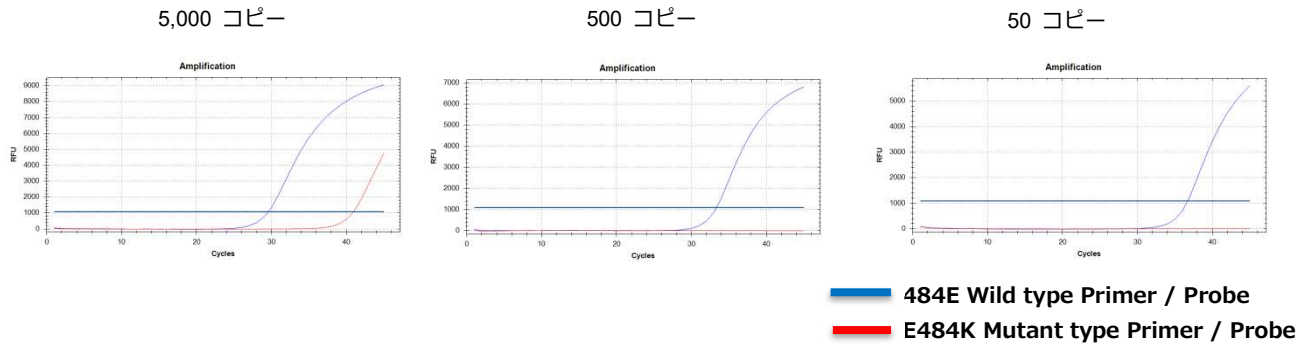
ガンマ型の変異株は、E484K 変異を持つため、E484K Mutant type Primer / Probe の増幅曲線（赤）が 484E Wild type Primer / Probe の増幅曲線（青）より早期に立ち上がります。  
484E Wild type Primer / Probe について、5,000 コピー条件では増幅シグナルが見られましたが、変異型の方がより低い Ct 値で検出されたため、E484K 変異株と判断できます。

### <E484K 変異を持たないサンプルの測定結果①>

測定サンプル：国立感染症研究所より譲渡されたアルファ型の変異株（QHN001：

E484K 変異なし、N501Y 変異を持つ）

サンプルコピー数：5,000, 500, 50 コピー / Well で測定



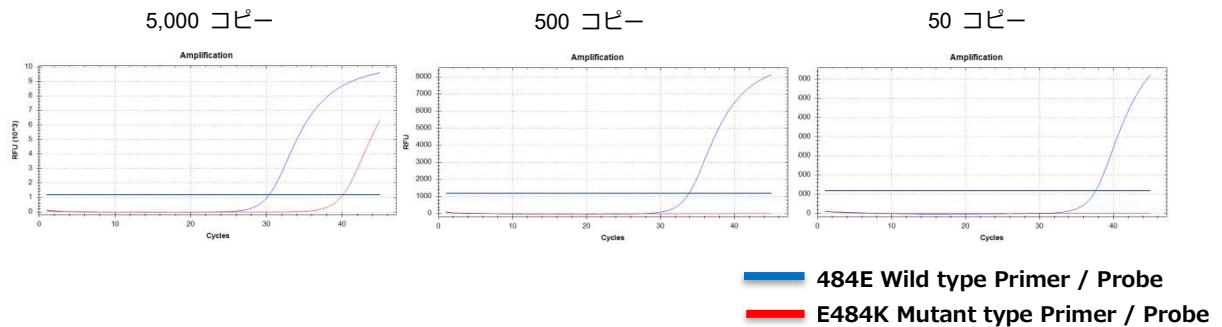
アルファ型の変異株は、E484K 変異を持たないため、484E Wild type Primer / Probe の増幅曲線（青）が E484K Mutant type Primer / Probe の増幅曲線（赤）より早期に立ち上がります。

E484K Mutant type Primer / Probe について、5,000 コピー条件では増幅シグナルが見られましたが、従来型の方がより低い Ct 値で検出されたため、従来型の変異株であると判断できます。

### <E484K 変異を持たないサンプルの測定結果②>

測定サンプル：VR-1986HK (熱不活性化新型コロナウイルス株，ATCC より購入)

サンプルコピー数：5,000, 500, 50 コピー / Well で測定



E484K 変異を持たない VR-1986HK では、484E Wild type Primer / Probe の増幅曲線（青）が E484K Mutant type Primer / Probe の増幅曲線（赤）より早期に立ち上がります。

E484K Mutant type Primer / Probe について、5,000 コピー条件では増幅シグナルが見られましたが、従来型の方がより低い Ct 値で検出されたため、従来型の変異株であると判断できます。

## 5. 判定方法

野生型あるいは変異型いずれかの増幅曲線のみ立ち上がりが見られた場合 (Ct 値 $\leq$ 40)

立ち上がりが見られた方を採用し、変異の有無を判定する。

なお、Ct 値 $>$ 40 で立ち上がりが見られた場合は、立ち上がりが見られなかった場合と同様に不検出と判断する (表 1 参照)。

表 1.

484E Wild	E484K Mutant	判定
不検出または Ct 値 $>$ 40	Ct 値 $\leq$ 40	E484K 変異あり
Ct 値 $\leq$ 40	不検出または Ct 値 $>$ 40	E484K 変異なし

野生型及び変異型両方の増幅曲線で立ち上がりが見られた場合 (Ct 値 $\leq$ 40)

Ct 値の差で変異の有無を判定する。

野生型と変異型の Ct 値の差が 4.0 以上あれば、Ct 値が低い方を採用し、差が 4.0 未満であれば、判定不能とする (表 2 参照)。

表 2.

Ct 値	判定方法	判定
Wild $>$ Mutant	Wild Ct 値 - Mutant Ct 値 $\geq$ 4.0	E484K 変異あり
	Wild Ct 値 - Mutant Ct 値 $<$ 4.0	判定不能
Mutant $>$ Wild	Mutant Ct 値 - Wild Ct 値 $\geq$ 4.0	E484K 変異なし
	Mutant Ct 値 - Wild Ct 値 $<$ 4.0	判定不能

例 1) 野生型 24.9、変異型 20.1

24.9-20.1=4.8 $\rightarrow$ E484K 変異あり

例 2) 野生型 22.1、変異型 26.1

26.1-22.1=4.0 $\rightarrow$ E484K 変異なし

例 3) 野生型 22.6、変異型 25.1

25.1-22.6=2.5 $\rightarrow$ 判定不能

野生型及び変異型両方の増幅曲線が立ち上がらなかった、もしくは Ct 値 $>$ 40 で立ち上がりが見られた場合は、判定不能とする (表 3 参照)。

表 3.

484E Wild	E484K Mutant	判定
不検出または Ct 値 $>$ 40	不検出または Ct 値 $>$ 40	判定不能

[注意]

表に従って判定不能とした **SARS-CoV-2** 陽性検体は、検出限界以下あるいは他の変異の可能性があるため、**NGS** による配列確認を推奨する。

判定不能となりうる要因

- ・ 検出限界以下  
検体中に検出に十分な **SARS-CoV-2** 由来 **RNA** が存在せず、検出限界以下となった可能性
- ・ 精製 **RNA** の純度が低い  
検体からの **RNA** 抽出・精製過程に問題があった可能性
- ・ 逆転写酵素の活性低下  
過度な凍結融解により、逆転写酵素活性が低下した可能性
- ・ 検体中の **SARS-CoV-2** が **E484K** 以外の変異を持っている  
**484E** 近傍（1～5bp）に変異がある場合や、**Primer** 及び **Probe** 設計領域に変異が存在し、**PCR** 効率の低下または増幅しない可能性。

<改訂履歴>

- 2021年4月8日 キット構成の注釈に補正用ダイはROXフィルターで検出できることを追記。
- 2021年5月10日 20反応用の容量追加。
- 2021年5月31日 陽性コントロールについて追記。
- 2021年6月10日 変異株の呼称をギリシャ文字に変更。
- 2021年7月29日 判定方法について追記。

製造発売元

**富士フィルム 和光純薬株式会社**  
大阪市中央区道修町三丁目1番2号  
Tel : 06-6203-3741