

遺伝子研究用

SARS-CoV-2 N del31-33 Mutation Detection Kit

本製品は、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）のオミクロン株（B.1.1.529）^{※1}の N 領域に存在する欠損変異である del31-33^{※2}を 1-step RT-qPCR 法で検出するキットです。当社が独自開発したプライマー及びプローブで N del31-33 変異を迅速かつ高感度に検出することが可能です。

※1 オミクロン株（B.1.1.529）：南アフリカで最初に検出された変異株

※2 N 領域の 31～33 番目の 3 アミノ酸 E、R、S が欠損した変異

【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 |
|---|-----------|
| RT Enzyme Mix (20×) | 20μL×1 本 |
| One-Step Reaction Mix (2×) | 200μL×1 本 |
| Wild Type Primer & Probe Mixture | 10μL×1 本 |
| N del31-33 Mutant Type Primer & Probe Mixture | 10μL×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 |
|---|----------|
| Wild Type Primer & Probe Mixture | FAM |
| N del31-33 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 を調製します。

| | |
|----------------------------------|------------|
| 精製 RNA 溶液 | 8μL |
| Wild Type Primer / Probe Mixture | 1μL |
| One-Step Reaction Mix (2×) | 10μL |
| RT Enzyme Mix (20×) | 1μL |
| <hr/> | |
| | Total 20μL |

| | |
|---|------------|
| 精製 RNA 溶液 | 8μL |
| N del31-33 Mutant Type Primer & Probe Mixture | 1μL |
| One-Step Reaction Mix (2×) | 10μL |
| RT Enzyme Mix (20×) | 1μL |
| <hr/> | |
| | Total 20μL |

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. 実験例

国立感染症研究所より分与された変異株（オミクロン株、アルファ株、ベータ株、ガンマ株）、ATCC より入手した従来株、及び当社で合成したオミクロン株のコントロール ssRNA を本キットで測定した結果を示します。

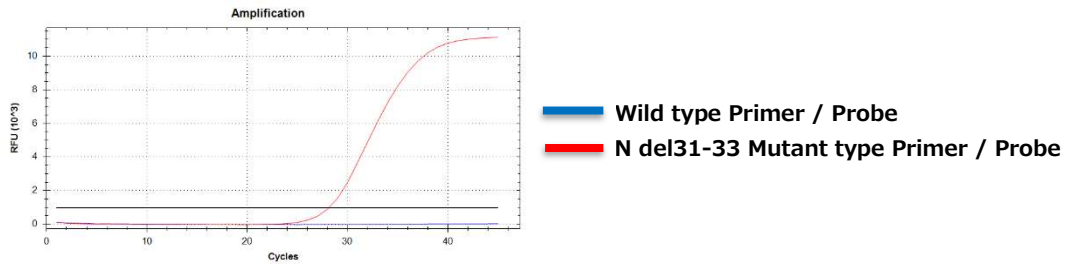
本例を参考に変異の有無を判定して下さい。

① オミクロン株の測定データ（国立感染症研究所より分与）

測定サンプル：オミクロン株の精製 RNA（TY38-873P1）

サンプルコピー数：5,000 コピー / Well

サイクル数：45 サイクル



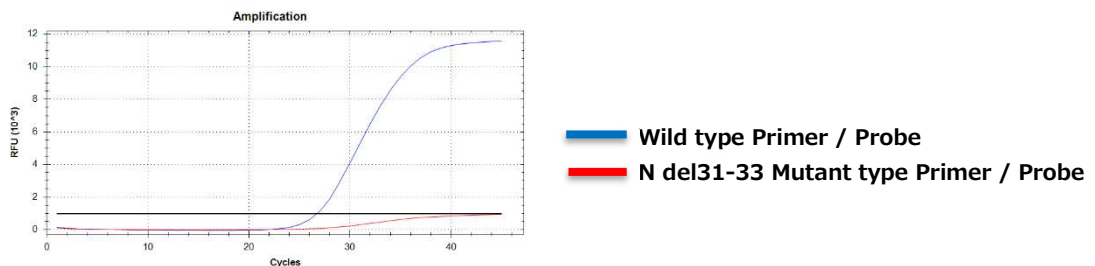
オミクロン株は N 領域に del31-33 変異を持つため、N del31-33 Mutant type Primer / Probe の増幅曲線（赤）が Wild type Primer / Probe の増幅曲線（青）より早期に立ち上がります。

② アルファ株の測定データ（国立感染症研究所より分与）

測定サンプル：アルファ株の精製 RNA（QHN001）

サンプルコピー数：5,000 コピー / Well

サイクル数：45 サイクル



アルファ株は N 領域に del31-33 変異を持たないため、Wild type Primer / Probe の増幅曲線（青）が N del31-33 Mutant type Primer / Probe の増幅曲線（赤）より早期に立ち上がります。

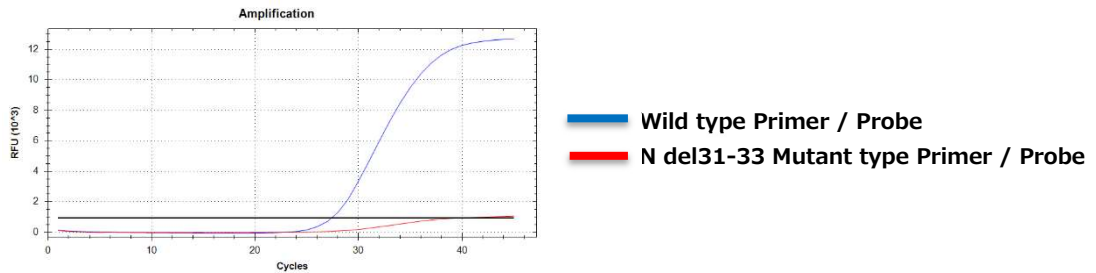
アルファ株とオミクロン株はともに N501Y 変異を持ちますが、本品はアルファ株には反応しないことが確認されました。

③ ベータ株の測定データ（国立感染症研究所より分与）

測定サンプル：ベータ株の精製 RNA（TY8-612）

サンプルコピー数：5,000 コピー / Well

サイクル数：45 サイクル



ベータ株は N 領域に del31-33 変異を持たないため、Wild type Primer / Probe の増幅曲線（青）が N del31-33 Mutant type Primer / Probe の増幅曲線（赤）より早期に立ち上がります。

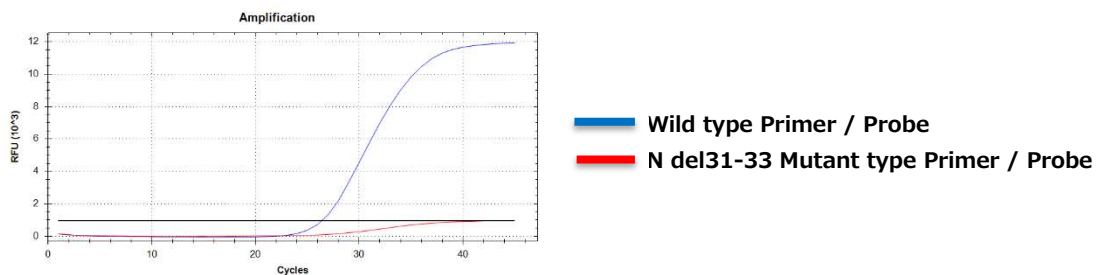
ベータ株とオミクロン株はともに N501Y 変異を持ちますが、本品はベータ株には反応しないことが確認されました。

④ ガンマ株の測定データ（国立感染症研究所より分与）

測定サンプル：ガンマ株の精製 RNA（TY7-501）

サンプルコピー数：5,000 コピー / Well

サイクル数：45 サイクル



ガンマ株は N 領域に del31-33 変異を持たないため、Wild type Primer / Probe の増幅曲線（青）が N del31-33 Mutant type Primer / Probe の増幅曲線（赤）より早期に立ち上がります。

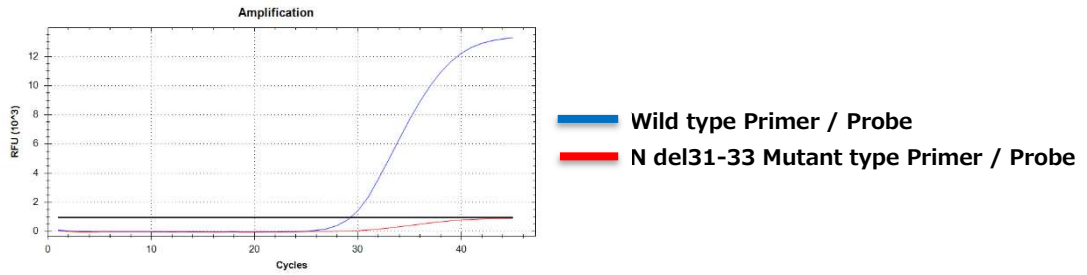
ガンマ株とオミクロン株はともに N501Y 変異を持ちますが、本品はガンマ株には反応しないことが確認されました。

⑤従来株の測定データ (ATCC より入手)

測定サンプル : VR-1986HK (熱不活性化新型コロナウイルス株)

サンプルコピー数 : 5,000 コピー / Well

サイクル数 : 45 サイクル



従来株はN領域に del31-33 変異を持たないため、Wild type Primer / Probe の増幅曲線 (青) が N del31-33 Mutant type Primer / Probe の増幅曲線 (赤) より早期に立ち上がります。

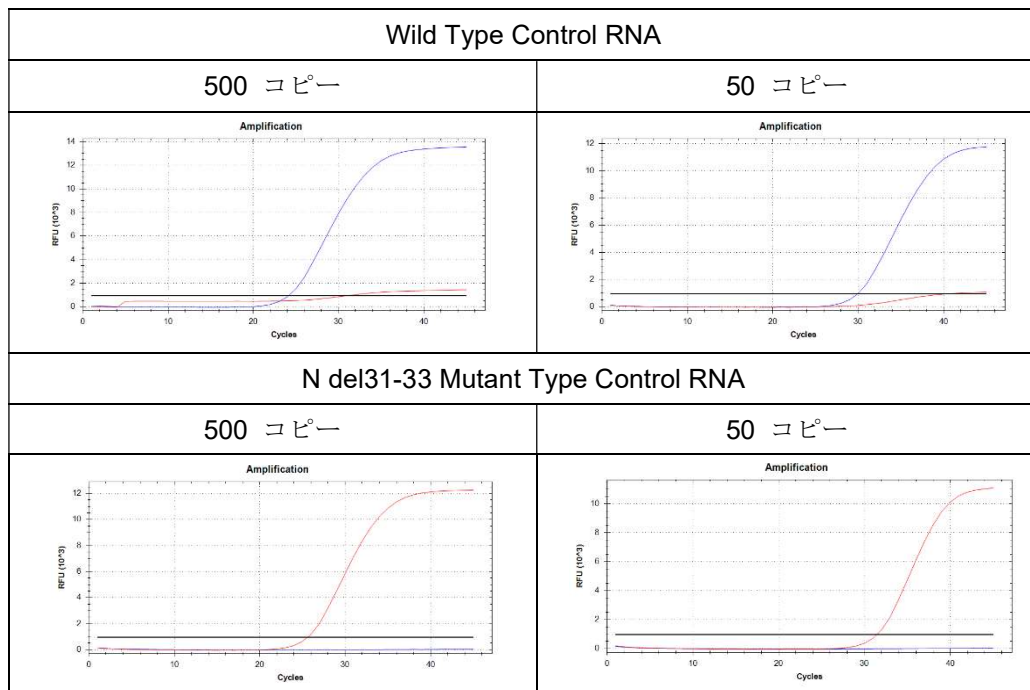
⑥コントロール ssRNA の測定データ (自社で合成)

測定サンプル : Wild Type Control RNA (N del31-33 変異なし)

: N del31-33 Mutant Type Control RNA (N del31-33 変異あり)

サンプルコピー数 : 500, 50 コピー / Well

サイクル数 : 45 サイクル



— Wild type Primer / Probe
— N del31-33 Mutant type Primer / Probe

N del31-33 変異を持たないコントロール ssRNA (Wild Type Control RNA) では、Wild type Primer / Probe の増幅曲線 (青) が N del31-33 Mutant type Primer / Probe の増幅曲線 (赤) より早期に立ち上がります。

N del31-33 変異を持つコントロール ssRNA (N del31-33 Mutant Type Control RNA) では、N del31-33 Mutant type Primer / Probe の増幅曲線 (赤) が Wild type Primer / Probe の増幅曲線 (青) より早期に立ち上がります。

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.

| Wild | N del31-33 Mutant | 判定 |
|--------------------|--------------------|-----------------|
| 不検出または Ct 値 $>$ 40 | Ct 値 \leq 40 | N del31-33 変異あり |
| Ct 値 \leq 40 | 不検出または Ct 値 $>$ 40 | N del31-33 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 | N del31-33 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 | N del31-33 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 N del31-33 変異あり

例 2) 野生型 22.1、変異型 26.1

26.1-22.1=4.0 \rightarrow N del31-33 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.

| Wild | N del31-33 | 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 **N del31-33** 以外の変異を持っている
標的とする変異部位の近傍（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

製造発売元

富士フイルム 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

