

取扱説明書

KANEKA RT-PCR Kit "SARS-CoV-2 (L452R/E484Q/E484K/N501Y)"

使用上の注意事項

- 本製品は保護具（ゴム手袋や保護メガネ、マスク等）を着用の上、ご使用ください。
- 本製品で得られた結果の判断・利用については、お客様の責任のもと実施してください。結果の判断・利用によって生じた損害や損失について、当社は直接・間接を問わず一切の責任を負いません。
- 本取扱説明書に記載のない操作手順で実施して得られた検出結果の妥当性はお客様にて検証してください。
- 本製品は研究用試薬であり、疾病の診断またはその補助の目的で使用することはできません。

1. 本製品の概要

本製品は、蛍光プローブを組み合わせた 1 step RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction 法)により、SARS-CoV-2 のスパイク蛋白質にみられる変異のうち、L452R 変異、E484Q 変異、E484K 変異、N501Y 変異を検出するための試薬です。

反応液中に含まれる蛍光プローブは 3'末端側をクエンチャーで、5'末端側を蛍光物質 (L452R 検出用：FAM、E484Q 検出用：Yakima Yellow™[※]、E484K 検出用：ROX、N501Y 検出用：Cyanine 5) で修飾されており、4 種類のデオキシヌクレオチド三リン酸を取り込みながら DNA を伸長する過程で蛍光プローブは分解し、それまでクエンチャーによって消光されていた蛍光物質が遊離し、蛍光を発します。PCR の各サイクルにおける蛍光をリアルタイム PCR 装置で測定し、各蛍光の Ct 値から SARS-CoV-2 のスパイク蛋白質遺伝子の変異の有無を判定します。

※「Yakima Yellow」は Elitech Group 社の商標です。

2. 製品構成/保存条件

| 内容物 | 容量 (100 テスト) | 保管温度 | 使用期限 |
|---|-----------------|-------------|---------|
| RT-PCR Enzyme Mix ^{※1} | 600 μ Lx1 本 | -10°C~-30°C | 製造後 1 年 |
| L452R/E484Q/E484K/N501Y Primer & Probe Mix ^{※2} | 500 μ Lx1 本 | | |
| RNase Free Water | 1 mLx1 本 | | |

※1. 酵素、基質等を含みます。

※2. 蛍光標識プローブを含んでいるため、遮光して保管してください。

3. 使用方法

3.1. 本製品以外に必要な器具・機器等

- ・ マイクロピペットおよびマイクロピペット用フィルター付きチップ
- ・ リアルタイム PCR 装置（FAM/Yakima Yellow™/ROX/Cyanine 5 を検出可能な装置）
- ・ PCR 用チューブ（0.2 mL）
- ・ 卓上遠心機
- ・ 陽性コントロール（別売）

3.2. 試料の調製（検体からの RNA 精製）

検体から抽出した RNA を本製品の試料として用います。試料の調製については、国立感染症研究所の「病原体検出マニュアル 2019-nCoV」に従ってください。

3.3. マスターミックスの調製

- ① RT-PCR Enzyme Mix を氷冷下にて静置し、完全に解凍する。RT-PCR Enzyme Mix 以外の各試薬は室温（0°C以上）にて完全に解凍する。解凍後は転倒混和やピペティングにより、しっかりと混合し、蓋を開ける前にスピンドウンする。
- ② 下表の組成に従い、必要反応数+ α のマスターミックスを調製する。

1 反応分のマスターミックス

| 試薬名 | 添加量 |
|-------------------------|------------|
| RT-PCR Enzyme Mix | 6 μ L |
| L452R/E484Q/E484K/N501Y | 5 μ L |
| Primer & Probe Mix | |
| RNase Free Water | 9 μ L |
| (全量) | 20 μ L |

3.4. RT-PCR 反応液の調製

<検体>

3.2 で調製した試料が入ったチューブに、マスターミックスを 20 μ L 添加し、ピペティングによりよく混合する^{※3}。

※3. 反応液調製後は、速やかに RT-PCR 反応を実施してください。

<コントロール反応液>

結果判定を適切に行うため、陰性コントロール、陽性コントロール 1（N501Y/E484K）^{※4}、陽性コントロール 2（L452R/E484Q）^{※5} を添加した反応液を調製する（測定毎に少なくとも各々1 反応分ずつ調製する）。

- ① 陰性コントロールとしては、キット付属の RNase Free Water を、陽性コントロール 1 および 2 としては、市販の合成 RNA を 10³ copies/ μ L に調製したものを使用する。
- ② 陰性または陽性コントロール 5 μ L を添加したチューブに、マスターミックスを 20 μ L 添加し、ピペティングによりよく混合する。

※4. 陽性コントロール1（N501Y/E484K）として以下の製品が使用できることを確認しています。

- ・ SARS-CoV-2 ガンマ株陽性コントロール RNA（株式会社日本遺伝子研究所）
- ・ Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 16（B.1.351）（Twist Bioscience 社）

※5. 陽性コントロール2（L452R/E484Q）として以下の製品が使用できることを確認しています。

- ・ Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 18（B.1.617.1）（Twist Bioscience 社）

3.5. RT-PCR 反応

リアルタイム PCR 装置に 3.4.で調製した反応液入りの PCR 用チューブをセットして、下表の条件にて RT-PCR 反応を行う。

蛍光検出には、使用するリアルタイム PCR 装置の取扱説明書を確認し、以下の蛍光を測定可能なチャンネルを選択する。

FAM : 極大吸収波長=495 nm、極大蛍光波長=520 nm

Yakima Yellow™ : 極大吸収波長=525 nm、極大蛍光波長=549 nm

ROX : 極大吸収波長=576 nm、極大蛍光波長=602 nm

Cyanine5 : 極大吸収波長=649 nm、極大蛍光波長=666 nm

| ステップ | 温度 | 反応時間 | サイクル数 | 蛍光検出 |
|------|-----|-------|-------|------|
| 1 | 52℃ | 300 秒 | 1 | OFF |
| 2 | 95℃ | 20 秒 | 1 | OFF |
| 3 | 95℃ | 5 秒 | 45 | OFF |
| | 60℃ | 30 秒 | | ON |

4. 判定方法

RT-PCR 反応終了後は、増幅曲線を確認し、使用するリアルタイム PCR 装置の取扱説明書等の指示に従い解析パラメータが適切であることを確認後、Ct 値を算出する。下表の基準に従い、結果を判定する。

コントロール反応の測定結果

| | FAM (L452R 検出系) | Yakima Yellow™ (E484Q 検出系) | ROX (E484K 検出系) | Cyanine5 (N501Y 検出系) |
|-----------------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|-------------------------|
| 陰性コントロール※6 | 不検出 | 不検出 | 不検出 | 不検出 |
| 陽性コントロール 1 (N501Y/E484K) | 不検出 | 不検出 | Ct ≤ 35※7 | Ct ≤ 35※7 |
| 陽性コントロール 2 (L452R/E484Q) | Ct ≤ 35※7 | Ct ≤ 35※7 | 不検出 | 不検出 |

※6. 陰性コントロールが不検出であることを確認する。Ct 値が算出された場合は、コンタミネーションの疑いがあるため、器具や作業環境を除染して再測定を行ってください。

※7. 陽性コントロールの Ct 値が 35 以下であることを確認する。Ct 値が 35 より大きい場合や、不検出の場合は、機器の設定を確認して再測定を行ってください。

検体の測定結果

| Ct 値 ^{※8} | 判定 |
|--------------------|----------------------------|
| 不検出 | 陰性もしくは検出限界以下 ^{※9} |
| <42 | 陽性 |
| ≥42 | 再測定を推奨 ^{※10} |

※8. リアルタイム PCR 装置の機種によっては、増幅曲線の形状により適切な Ct 値が算出されない場合がございます。必ず増幅曲線の形状を確認し、必要に応じてリアルタイム PCR 装置の取扱説明書に従い **Manual** 設定を行ってください。

※9. 検出限界以下と判定された場合でも、低コピーの新型コロナウイルス遺伝子が存在する可能性があります。

※10. Ct 値 ≥42 となった場合は、再測定を推奨します。再測定でも同様の結果が得られる場合は、陽性と判定することを推奨します。

測定結果と判定例

| L452R (FAM) | E484Q (Yakima Yellow TM) | E484K (ROX) | N501Y (Cyanine5) | 判定 | |
|----------------|---|----------------|---------------------|----|-----------|
| - | - | - | + | | アルファ株 |
| - | - | + | + | | ベータ株、ガンマ株 |
| + | - | - | - | | デルタ株 |
| + | + | - | - | | カッパ株 |

(陽性：+、陰性：-)

5. 使用上の注意事項

- 本取扱説明書に記載する保存条件や使用期限を厳守してください。
- 本製品の仕様は予告なく変更される場合があります。
- 使用する器具や機器類について、製造・販売元が指定する使用方法に従ってください。
- マイクロピペット用チップは使用毎に交換し、コンタミネーションに注意してください。また、マイクロピペット用チップはフィルター付きのものを推奨しております。
- 本製品の使用前後に、0.55%次亜塩素酸ナトリウム水溶液や DNA 除去剤、紫外線 (UV) 等を用いて実験台等をクリーニングしてください。
- コンタミネーションによる誤判定を防ぐため、RNA 抽出、RT-PCR 反応液の調製、リアルタイム PCR 装置による増幅・検出の各ステップは、別々の区域で実施することを推奨しております。また、増幅後は反応チューブを開閉しないでください。
- 試薬や RNA 抽出液等の入ったチューブを開ける前に、卓上遠心機等でスピンドウンを行ってください (内容物の飛散を避けるため)。

- コンタミネーションが確認された場合、使用する器具や機器類について、製造・販売元が指定する方法でクリーニングしてください。
- 試薬の凍結融解は15回までとしてください。
- 本製品や RT-PCR 反応液、RNA 抽出液等を廃棄する場合は、当該地域の廃棄物に関する規則、および、当該施設の規則に従い、衛生面、環境面に配慮し廃棄してください。
- 本製品は以下のリアルタイム PCR 装置で性能を確認しております。他機種をご利用の場合、検出結果の妥当性はお客様にて検証してください。

CronoSTAR® 96 Real-Time PCR System(4ch) (Takara Bio USA 社)

LightCycler® 96 System (ロシュ・ダイアグノスティックス社)

LightCycler® 480 System II (ロシュ・ダイアグノスティックス社)

※「CronoSTAR」はタカラバイオ社の登録商標です。

※「LightCycler」はロシュ・ダイアグノスティックス社の登録商標です。

<問い合わせ先>

株式会社カネカ Medical Solutions Vehicle

〒530-8288 大阪市北区中之島 2-3-18

URL <https://www.kaneka-labtest.com/contact-us/>