

取扱説明書：KANEKA Direct RT-qPCR Kit "SARS-CoV-2"

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、アメリカ疾病予防管理センター（CDC）発行の「2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time rRT-PCR Panel Primer and probe (Effective: 24 Jan 2020)」に準拠したプライマーおよびプローブを使用した新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の検出試薬です。精製不要の簡易前処理法と One-step RT-qPCR 法を採用することで、鼻咽頭ぬぐい液と唾液から SARS-CoV-2 を約 1 時間で検出することができます。

尚、本製品は、株式会社 AVSS との共同開発品です。

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
RNA Extraction Reagent	250 μ L \times 1 本	冷凍 (-20 $^{\circ}$ C以下)	製造日より 1 年
RT-PCR Enzyme Mix ^{※1}	625 μ L \times 2 本		
SARS-CoV-2 Primer & Probe Mix ^{※2}	250 μ L \times 1 本		
RNase Free Water	1 mL \times 1 本		
ROX Reference (High) ^{※3}	250 μ L \times 1 本		
ROX Reference (Low) ^{※3}	250 μ L \times 1 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. 蛍光物質を含んでいるため、遮光して保管してください。

3. 検出方法

鼻咽頭ぬぐい液または唾液と RNA 抽出試薬を混合、熱処理して得られた検体前処理液に対して、SARS-CoV-2 の N 遺伝 (N1、N2) へ特異的に結合するプライマーを用いた RT-qPCR を行うことで、標的 RNA を増幅・検出します。但し、N1 と N2 は識別せず同じ項目として検出されます。

4. 使用方法

4.1. 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 を検出可能な装置)

- ・ ヒートブロック
- ・ qPCR 用チューブ (0.2 mL)
- ・ 卓上遠心機
- ・ 陽性コントロール (別売)

4.2. RNA 抽出液の調製

- ① 本製品に付属のRNA Extraction Reagentを室温にて完全に解凍する。解凍後は転倒混和やピペッ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 検体 (鼻咽頭ぬぐい液または唾液) 4 μ LとRNA Extraction Reagent 1 μ Lを混合する^{※4,5}。
 - ③ 85℃にて5分間加熱する^{※6}。
- ※4. 検体の採取・輸送に関しては、国立感染症研究所「2019-nCoV (新型コロナウイルス) 感染を疑う患者の検体採取・輸送マニュアル」の最新版を参照してください。
- ※5. 検体の取扱いは、必要なバイオハザード対策を施し、実施してください。
- ※6. 加熱処理後は、速やかにRT-PCR反応液の調製を実施してください。

4.3. 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^{※7}。RT-PCR Enzyme Mix 以外の各試薬は室温にて完全に解凍する。解凍後は転倒混和やピペッティングにより、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 (ROX Reference を使用しない場合)

試薬名	添加量
RT-PCR Enzyme Mix	12.5 μ L
SARS-CoV-2 Primer & Probe Mix	2.5 μ L
RNase Free Water	5 μ L
(全量)	20 μ L

1 反応分のマスターミックス (ROX Reference を使用する場合^{※8})

試薬名	添加量
RT-PCR Enzyme Mix	12.5 μ L
SARS-CoV-2 Primer & Probe Mix	2.5 μ L
ROX Reference (High) /(Low)	2.5 μ L
RNase Free Water	2.5 μ L
(全量)	20 μ L

※7. 解凍後に白沈を認める場合は、転倒混和等で完全に溶解するまで十分に混合してください。

※8. ROX 補正を必要とするリアルタイム PCR 装置の場合に ROX Reference を使用してください。

4.4. RT-PCR 反応液の調製

<検体>

4.2で調製したRNA抽出液が入ったチューブに、マスターミックスを20 μ L添加し、ピペッティングによりよく混合する^{※9}。

※9. 反応液調製後は、速やかに RT-qPCR 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、陰性コントロールおよび陽性コントロール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、陽性コントロールとしては、市販の合成RNAを 10^3 copies/ μ Lに調製したものを使用する※10。
- 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。

※10. 陽性コントロール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 1（Twist Bioscience 社）
- ・ 新型コロナウイルス陽性コントロール RNA（米国 CDC Real-time RT-PCR N1/N2 PC mix）（日本遺伝子研究所社）

4.5. RT-PCR 反応

リアルタイム PCR 装置に 4.4.で調製した反応液入りの qPCR 用チューブをセットして、下表の RT-qPCR 条件にて RT-qPCR 反応を行う（FAM チャンネル使用）。

	温度 (°C)	時間 (秒)	回数
STEP 1	52	300	1
STEP 2	95	10	1
STEP 3	95	5	45
	60	30 (蛍光検出：FAM)	

5. 判定方法

RT-qPCR 反応終了後は、増幅曲線を確認し、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

	Ct 値	判定
陰性コントロール	不検出	正常
	検出	異常※11
陽性コントロール	≤ 30	正常
	> 30 もしくは不検出	異常※12

※11. 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。

※12. 陽性コントロールの Ct 値が 30 以下であることを確認する。Ct 値が 30 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	判定
不検出	陰性もしくは検出限界以下 ^{※13}
<40	陽性
≥40	再測定を推奨 ^{※14}

※13. 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。

※14. Ct 値 ≥40 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。

6. 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。
- 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程、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。

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)

QuantStudio 3 Real-Time PCR System (96well,0.2 mL block) (Thermo Fisher Scientific 社)

<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/>