

取扱説明書

KANEKA RT-PCR Kit "CT/NG"

基本的注意事項

- 本製品を使用する際、保護具（保護着、手袋、保護メガネ、マスク等）を着用の上、試薬が目や口、皮膚、粘膜に触れないように注意してください。万が一、試薬に触れてしまった場合は、大量の水で十分に洗い流し、必要に応じて医師の診察を受けてください。
- 本取扱説明書に記載された操作手順に従って使用してください。本取扱説明書に記載のない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。
- 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。

1. 本製品の概要

本製品は、蛍光プローブを組み合わせた Reverse Transcription PCR (RT-PCR) 法により、主要な性感染症病原微生物である、*Chlamydia trachomatis* (以下、CT) 及び *Neisseria gonorrhoeae* (以下、NG) の核酸を同時に検出・判別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 (CT 検出用: Cyanine 5、NG 検出用: Chloro fluorescein) で修飾されており、4 種類のデオキシヌクレオシ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、各蛍光の増幅曲線の立ち上がりから CT 及び NG に由来する核酸の有無を判定します。また、内部標準系を備えるため、試料に含まれる妨害物質による PCR 阻害等を確認できます。

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}	500 µL×1 本	- 10°C以下	製造後 2 年
Primer & Probe Mix [CT/NG] ^{※2}	500 µL×1 本		
RNase Free Water	1 mL×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. 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 (Cyanine 5 チャンネル、HEX/TET チャンネル、ROX/Texas Red チャンネルを備

える装置)

- ・ PCR チューブ (0.2 mL)
- ・ 卓上遠心機
- ・ KANEKA Positive Control [CT/NG] (別売)

3.2. 試料の調製（検体からの核酸精製）

培養液や生体試料等から精製した核酸を本製品の試料として用います。精製の際には市販の核酸精製キットを使用し、使用するキットに付属する説明書に従って操作してください。以下の装置、キットを用いて精製した核酸は、本製品に供試可能であることを確認しております。その他のキットを使用する際には、お客様の方で検証を行ってください。

使用可能な核酸精製装置・キットの例

メーカー	装置	キット
バイオライフサイエンスジャパン社	GenePurePro (NPA-32P)	MagaBio plus Virus DNA/RNA Purification Kit II
プレジジョン・システム・サイエンス社	magLEAD™ 6gC、12gC	MagDEA™ Dx SV、MagDEA™ Dx MV

3.3. マスターミックスの調製

- ① 使用する前に各試薬を完全に解凍してください。解凍後は転倒混和等によりしっかりと混合し、蓋を開ける前にスピンドウンしてください。
- 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してください。

1 反応分のマスターミックス

試薬名	添加量
Primer & Probe Mix [CT/NG]	5 μ L
RNase Free Water	5 μ L
RT-PCR Enzyme Mix	5 μ L
Total	15 μ L

3.4. RT-PCR 反応液の調製

<検体>

3.2で調製した試料 5 μ L を PCR チューブ (0.2 mL) に加えてください。その後、マスターミックスを 15 μ L 添加し、よく混合してください^{※3}。混合後、スピンドウンしてください。

※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、陽性コントロールを添加した反応液を調製してください（測定毎に少なくとも各々1反応分ずつ調製してください）。

- 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、別売の **KANEKA Positive Control [CT/NG]** を使用してください。
- ② 陰性または陽性コントロール **5 μ L** を添加した **PCR チューブ (0.2 mL)** に、マスターミックスを **15 μ L** 添加し、よく混合してください。混合後、スピンドウンしてください。

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 チューブをセットして、下表の条件にて RT-PCR 反応を行ってください。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してください。

Cyanine 5 : 極大吸収波長=646 nm、極大蛍光波長=662 nm

Chloro fluorescein : 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

RT-PCR 条件

ステップ	温度	反応時間	サイクル数	蛍光検出
1	52°C	30 分	1	OFF
2	95°C	20 秒	1	OFF
3	95°C	5 秒	45	OFF
	60°C	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してください。以下に示す基準に従い、結果を判定してください。

各検出の判定

反応時間内に増幅曲線の立ち上がりが見られた場合は「+ (検出)」、反応時間内に増幅曲線の立ち上がりが見られない場合は「- (不検出)」

コントロール反応の測定結果

コントロール	CT 検出 (Cyanine 5 チャンネル)	NG 検出 (HEX/TET チャンネル)	内部標準検出 (ROX/Texas Red チャンネル)
陰性コントロール ^{※4}	-	-	+
陽性コントロール ^{※5}	+	+	+

※4. 陰性コントロールの測定結果が **CT 不検出 (-)**、**NG 不検出 (-)**、内部標準検出 (+) であることを確認してください。**CT**、**NG** にて立ち上がりが見られた場合は、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。

※5. 陽性コントロールの測定結果について、全ての項目で増幅曲線の立ち上がりが見られることを確認して

ください。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 検出 (Cyanine 5 チャンネル)	NG 検出 (HEX/TET チャンネル)	内部標準検出 (ROX/Texas Red チャンネル)	判定 ^{※6}
－	－	＋	陰性 ^{※7}
＋	－	＋	CT 陽性
－	＋	＋	NG 陽性
＋	＋	＋	CT/NG 陽性
上記以外			無効

※6. 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に自動判定されない場合があります。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。

※7. 陰性と判定された場合でも、本製品の検出下限未満の CT、NG 由来核酸が存在する可能性があります。

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使用してください。
- 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、核酸精製、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、増幅後の反応チューブを開けないようにしてください。
- 内容物の飛散を避けるため、試薬や核酸精製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。
- 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、核酸精製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。
- PCR 反応後は、反応容器の蓋を開けず廃棄してください。PCR 増幅産物による汚染を防ぐため、オートクレーブ処理は行わないでください。
- 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) (タカラバイオ社)

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

本誌上に記載されている他社の商品名および製品名は、それぞれ他社の商標または登録商標です。

<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/>