

2020年3月6日

病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.8 におけるタカラバイオ試薬 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit(Perfect Real Time) (製品コード RR064A/B) での実施例 (Ver. 1.3)

タカラバイオ株式会社

タカラバイオ試薬 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR064A/B) を用いて国立感染症研究所発行の病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.8 (以下、マニュアルとする) の「4.3. リアルタイム one-step RT-PCR (TaqMan プローブ法) 反応」を弊社にて実施しましたので、情報提供いたします。

本文書では、マニュアルの「反応プレートの準備と解析」に関して方法を補足します。特に指定の無い箇所については、マニュアルに従って操作を行ってください。マニュアルに関する詳細は国立感染症研究所ホームページをご覧ください。

国立感染症研究所 病原体検出マニュアル <https://www.niid.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>

(使用試薬)

タカラバイオ試薬 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR064A/B)

(使用装置)

タカラバイオ

Thermal Cycler Dice® Real Time System III

サーモフィッシャーサイエンティフィック社

Applied Biosystems® 7500 Fast リアルタイム PCR システム

ロシュ・ダイアグノスティックス社

LightCycler®480 System II

(方法)

1)~2)はマニュアル通りに行った。

3) 国立感染症研究所提供の陽性コントロール RNA を用いて、下記の表に示した反応液を調製した。プライマー及びプローブは、マニュアルに記載されているもの（プローブは FAM-BHQ 修飾）を株式会社日本遺伝子研究所から購入して使用した。

●LightCycler 480 System II および Thermal Cycler Dice® Real Time System III を使用する場合

	N セット	N2 セット
2 × One Step RT-PCR Buffer III	10.0 μ l	10.0 μ l
<i>Takara Ex Taq HS</i>	0.4 μ l	0.4 μ l
PrimeScript RT enzyme Mix II	0.4 μ l	0.4 μ l
Forward primer (10 μ M)	1.2 μ l	1.0 μ l
Reverse primer (10 μ M)	1.6 μ l	1.4 μ l
TaqMan probe (5 μ M)	0.8 μ l	0.8 μ l
RNase Free H ₂ O	0.6 μ l	1.0 μ l
Template RNA	5 μ l	5 μ l
Total	20 μ l	20 μ l

●Applied Biosystems® 7500 Fast リアルタイム PCR システムを使用する場合

	N セット	N セット No.2 (N2 セット)
2 × One Step RT-PCR Buffer III	10.0 μ l	10.0 μ l
<i>Takara Ex Taq HS</i>	0.4 μ l	0.4 μ l
PrimeScript RT enzyme Mix II	0.4 μ l	0.4 μ l
Forward primer (10 μ M)	1.2 μ l	1.0 μ l
Reverse primer (10 μ M)	1.6 μ l	1.4 μ l
TaqMan probe (5 μ M)	0.8 μ l	0.8 μ l
ROX Reference Dye II (50×)	0.4 μ l	0.4 μ l
RNase Free H ₂ O	0.2 μ l	0.6 μ l
Template RNA	5 μ l	5 μ l
Total	20 μ l	20 μ l

4) ~ 6) マニュアルの通り。

7) 反応条件を以下のように設定して反応を開始した。

<反応条件>

使用するリアルタイム PCR 装置、試薬および反応容器等によって、最適な反応条件は異なるため、必ず事前に検出感度等の確認をしておく。以下に、各社リアルタイム PCR 装置を使用する場合の反応条件を示した。

●Thermal Cycler Dice® Real Time System III を使用する場合
機器の設定は以下の通り (**Fast** モードで使用)。

Experiment Type	Absolute Quantification Single
Speed	Fast
Collect Data	FAM

42°C 5min.

↓

95°C 10sec.

↓

95°C 5sec.

60°C 30sec. (Data Collection)

45 cycles

●Applied Biosystems® 7500 Fast リアルタイム PCR システムを使用する場合
機器の設定は以下の通り (**Fast** モードで使用)。

Assay	Absolute Quantification (Standard Curve)
Run Mode	Fast 7500
Reporter	FAM
Quencher	None

42°C 5min.

↓

95°C 10sec.

↓

95°C 5sec.

60°C 30sec. (Data Collection)

45 cycles

●LightCycler® 480 System II を使用する場合

反応条件の設定は以下の通り。

	Analysis Mode	Cycle	Temperature (°C)	Time	Ramp Rate (°C/sec)	Acquisition Mode
RT	None	1	42	5 min.	4.4	None
Denature	None	1	95	10 sec.	4.4	None
PCR	Quantification	45	95	5 sec.	4.4	None
			60	30 sec.	2.2	Single
Cooling	None		40	30 sec.	4.4	None

8) 以降はマニュアルの通り。

(結果)

●Thermal Cycler Dice® Real Time System III を使用する場合

Nセットに関しては、陽性コントロール（5コピー）の2ウェルのうち1つの反応以外は、すべての陽性コントロールの反応において増幅曲線の立ち上がりが40サイクル以内にみられ、かつ陰性コントロールの増幅曲線の立ち上がりが見られなかった（図1）。また、陽性コントロール（5コピー）の1つを除き、その他すべての反応の閾値(Threshold=5)のCt値は40以内であった（図1）。

N2セットに関しては、陽性コントロールのすべての反応において増幅曲線の立ち上がりが40サイクル以内にみられ、かつ陰性コントロールの増幅曲線の立ち上がりが見られなかった（図1）。また、すべての反応において、閾値(Threshold=5)のCt値は40以内であった（表1）。

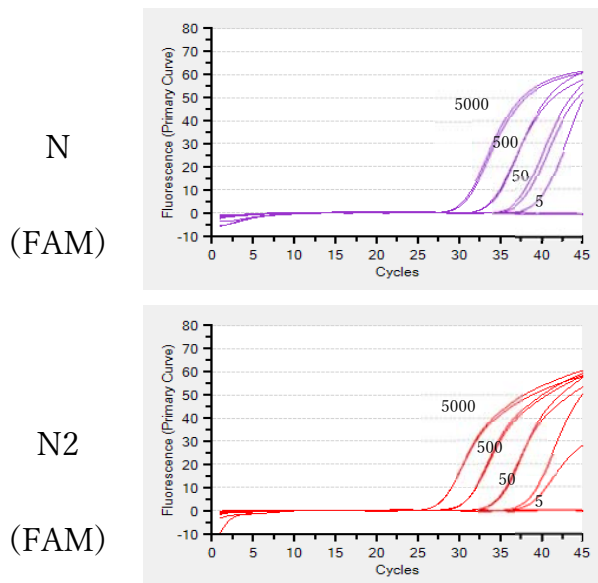


図1. 本試薬と Thermal Cycler Dice® Real Time System III を用いて2ウェル測定した場合の増幅曲線

表1. 本試薬と Thermal Cycler Dice® Real Time System III を用いて2ウェル測定した場合のCt値

Copies	Ct(CP) Threshold : 5	
	N (FAM)	N2 (FAM)
陰性 コントロール	--	--
5	39.5	39.4
	--	38.5
50	37.5	34.8
	37.0	34.7
500	33.9	31.1
	34.1	31.1
5000	30.8	28.1
	30.5	28.1

●Applied Biosystems® 7500 Fast リアルタイム PCR システムを使用する場合

N セット、N2 セット共に陽性コントロールのすべての反応において増幅曲線の立ち上がりが 40 サイクル以内にみられ、かつ陰性コントロールの増幅曲線の立ち上がりが見られなかった (図 2)。また、N セットの陽性コントロール (5 コピー) の 2 つを除く、その他の反応の閾値(Threshold=Auto)の Ct 値は 40 以内であった (表 2)。

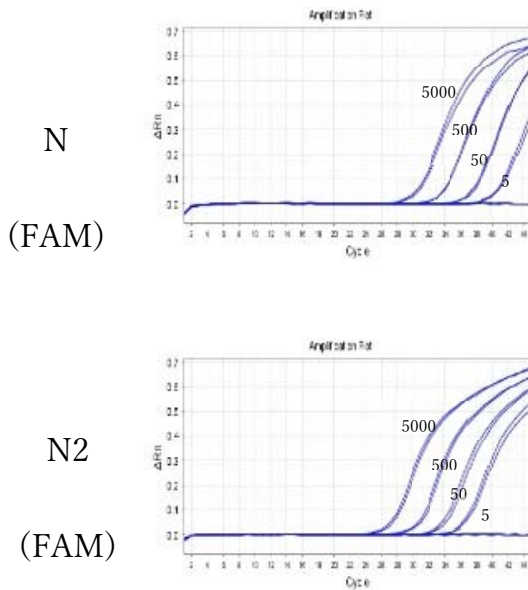


図 2. 本試薬と Applied Biosystems® 7500 Fast リアルタイム PCR システムを用いて 2 ウェル測定した場合の増幅曲線

表 2. 本試薬と Applied Biosystems® 7500 Fast リアルタイム PCR システムを用いて 2 ウェル測定した場合の Ct(Cp)値

Copies	Ct(CP) Threshold : Auto	
	N (FAM)	N2 (FAM)
陰性 コントロール	--	--
5	40.9	37.5
	41.1	37.1
50	38.0	34.5
	37.7	34.9
500	34.1	31.2
	34.0	31.6
5000	30.6	27.8
	30.9	28.0

●LightCycler 480 System II を使用する場合

N セット、N2 セット共に陽性コントロールのすべての反応において増幅曲線の立ち上がりが 40 サイクル以内にみられ、かつ陰性コントロールの増幅曲線の立ち上がりが見られなかった。また、N セットの陽性コントロール（5 コピー）の 2 つを除く、その他の反応の Cp 値は 40 以内であった（表 2）。

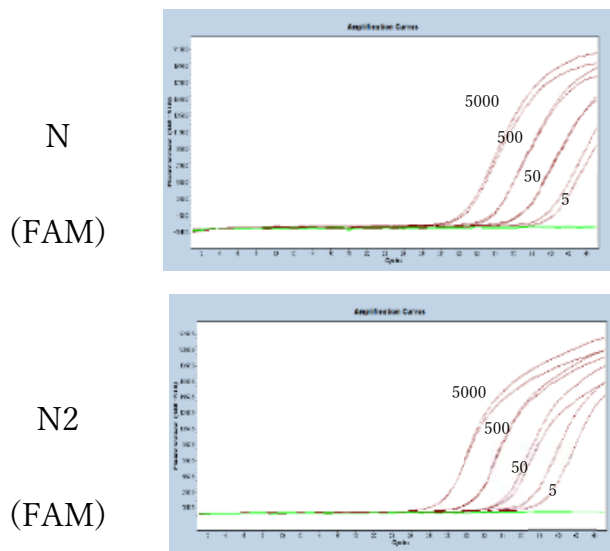


図 3. 本試薬と LightCycler 480 System II を用いて 2 ウェル測定した場合の増幅曲線

表 3. 本試薬と LightCycler 480 System II を用いて 2 ウェル測定した場合の Cp 値

Copies	Cp(SDM)	
	N (FAM)	N2 (FAM)
陰性 コントロール	--	--
5	40<	36.8
	40<	38.5
50	37.0	34.1
	36.7	33.9
500	33.7	30.7
	33.9	30.5
5000	30.6	27.2
	30.6	27.1

免責事項

この情報は 2020 年 3 月 6 日現在のものです。

本ウェブサイト内のコンテンツ(情報・資料・映像・音声等)につきましては、正確な情報を提供できるよう最善を尽くしておりますが、保証の限りではありません。掲載情報またはご利用によって生じたあらゆる不利益またはトラブル、損害に対して弊社は一切責任を負いません。本ウェブサイト内のコンテンツにつきまして予告または通知なしに更新または中止する場合があります。営利、非営利、イントラネットを問わず、本ウェブサイト内のコンテンツの無断転載については認めておりません。

以上

変更履歴

Ver. 1.0 -> 1.1 (2020 年 2 月 18 日) 文言の追加・修正を行いました。実験方法に変更はありません。

Ver. 1.1 -> 1.2 (2020 年 2 月 19 日) 結果に図表を追加しました。実験方法に変更はありません。

Ver. 1.2 -> 1.3 (2020 年 3 月 6 日) 文言の追加・修正を行いました。実験方法に変更はありません。