

2020年3月27日  
タカラバイオ株式会社

**病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1 に基づいた弊社試薬での反応実施例 (Ver. 1.0)**  
**< Roche Diagnostics 社 LightCycler®480 System II 使用 >**

弊社試薬 One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix (製品コード RR600A/B) および One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix, with UNG (製品コード RR601A/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.2.9.1 (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)

One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix (製品コード RR600A/B)

One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix, with UNG (製品コード RR601A/B)

(使用装置)

LightCycler®480 System II (以下、LC480)

(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配列（プローブは FAM-BHQ 修飾）を自社合成して使用した。

● One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix を使用の場合

	N セット	N セット No.2(N2 セット)
One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (2×)	10.0 $\mu$ l	10.0 $\mu$ l
Forward primer (10 $\mu$ M)	1.2 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l
Reverse primer (10 $\mu$ M)	1.6 $\mu$ l	1.4 $\mu$ l
TaqMan probe (5 $\mu$ M)	0.8 $\mu$ l	0.8 $\mu$ l
RNase Free H <sub>2</sub> O	1.4 $\mu$ l	1.8 $\mu$ l
Template RNA	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l

● One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix, with UNG を使用の場合

	N セット	N2セット
One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix , with UNG (2×)	10.0 $\mu$ l	10.0 $\mu$ l
Forward primer (10 $\mu$ M)	1.2 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l
Reverse primer (10 $\mu$ M)	1.6 $\mu$ l	1.4 $\mu$ l
TaqMan probe (5 $\mu$ M)	0.8 $\mu$ l	0.8 $\mu$ l
RNase Free H <sub>2</sub> O	1.4 $\mu$ l	1.8 $\mu$ l
Template RNA	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l

4) ~ 6) マニュアルの通り。

7) LC480 の反応条件を以下のように設定して反応を開始した。

※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。

機器の設定は以下の通り。

	Analysis Mode	Cycle	Temperature (°C)	Time	Ramp Rate (°C/sec)	Acquisition Mode
RT	None	1	52	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

反応条件の設定は以下の通り。

52°C 5min.

↓

95°C 10sec.

↓

95°C 5sec.

60°C 30sec. (Data Collection)

} 45 cycles

● One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix, with UNG を使用の場合

(25°C 10min) \*

↓

52°C 5min.

↓

95°C 10sec.

↓

95°C 5sec.

60°C 30sec. (Data Collection)

} 45 cycles

\* : PCR 産物によるコンタミネーションが疑われる場合には、25°C 10 分のステップを実施する。UNG の作用により前回の実験からキャリーオーバーした PCR 産物が分解する。

8) マニュアルに従って陽性コントロールの立ち上がりを確認した。

(結果)

● One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix を使用の場合

Nセットに関しては、陽性コントロール（5コピー）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。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=Auto)において Ct 値は 40 以内であった。

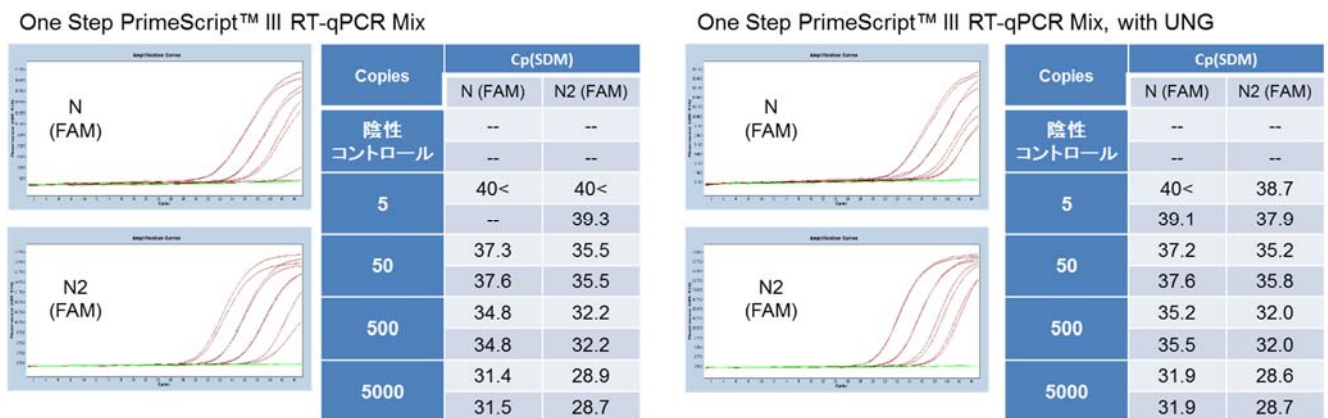
N2セットに関しては、陽性コントロールのすべての反応において増幅曲線の立ち上がりが40サイクル以内にみられ、かつ陰性コントロールの増幅曲線の立ち上がりが見られなかった。また、すべての反応の閾値(Threshold=Auto)において Ct 値は 40 以内であった (図 1A)。

● One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix, with UNG を使用の場合

Nセットに関しては、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。また、陽性コントロール（50コピー）以上のすべての反応の閾値(Threshold=Auto)において Ct 値は 40 以内であった。

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。また、すべての反応の閾値(Threshold=Auto)において Ct 値は 40 以内であった (図 1B)。

図 1 各濃度 2 ウェル測定した場合の増幅曲線および Ct 値



免責事項

この情報は 2020 年 3 月 27 日現在のものです。

本資料につきましては、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