

新型コロナウイルス検出キット
(SUDx-SARS-CoV-2 detection kit)

Ver. 2.2

取扱説明書

株式会社スティックスバイオテック

目次

| | | |
|-------------------|-----|---|
| 1. はじめに | --- | 3 |
| 2. 製品内容 | --- | 3 |
| 3. 保存方法 | --- | 5 |
| 4. プロトコール | --- | 5 |
| (1) 前処理 | | |
| (2) RT-PCR 反応液の調整 | | |
| (3) RT-PCR サイクル条件 | | |
| 5. 判定例 | --- | 6 |
| 6. 陽性コントロールの検出例 | --- | 8 |

ご注意

- 実験施設の取り決めに従い、安全性に留意して実験を行ってください。
- 実験中は手袋や保護メガネなど保護具を着用してください。
- 実験中はヌクレアーゼの混入に注意してください。
- 試料および使用器具は、感染性を有するものとして各施設の安全規定に従って、使用および破棄を行ってください。
- 製品の特性上、乳製品を食べた直後やひどい虫歯の検体はウイルスが検出されにくくなる可能性がありますのでご注意ください。
- 起床直後の検体が唾液中のウイルス量が多いことが先行研究^{※1}にて解明されています。

※1 Yasuhisa Tajima, Yasuo Suda, Kunio Yano, A case report of SARS-CoV-2 confirmed in saliva specimens up to 37 days after onset: Proposal of saliva specimens for COVID-19 diagnosis and virus monitoring. Journal of Infection and Chemotherapy, 2020, in press (2020年6月23日現在)

1. はじめに

本製品は、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）検出のためのリアルタイム 1-step RT-qPCR キットです。糖鎖固定化金ナノ粒子を用い、磁性分離を行うため、1 検体から 3 分間ほどでウイルス RNA の濃縮・精製ができます。また、検体採取時の暴露リスクの少ない唾液検体での検出ができます。

検出のためのプライマーとプローブは、アメリカ疾病予防管理センター（CDC）の「2019–Novel Coronavirus (2019–nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes」(Effective: 24 Jan 2020) に記載された 2019–nCoV_N1 セットを改変^{※1}したもの（mCDC セット）および、国立感染症研究所の「病原体検出マニュアル 2019–nCoV Ver2.9.1」に記載されている、N2 セットを改変^{※1}したもの（mNIID セット）を採用しています。

※1 本製品のプライマー、プローブセットにつきましては、鹿児島大学 隅田泰生教授に監修いただきました。

【本製品の特徴】

- ウイルス RNA の濃縮・精製（PCR 反応の前処理）は 3 分間（1 検体あたり）で完了できます。
- 唾液検体を 300～600 μ L（Boom 法^{※2}と比較し約 2～4 倍）利用し、さらに 25～50 倍（Boom 法は約 2 倍）に濃縮できるため、ウイルス濃度の低い唾液検体を用いた測定が可能です。
- 蛍光プローブを用いてプライマーの配列を検討した結果、より高い特異性と高感度を達成しています。1 反応あたり 10 コピーのウイルスが検出できます。

※2 国立感染症研究所の「病原体検出マニュアル 2019–nCoV Ver2.9.1」に記載されている QIAamp Viral RNA Mini キットによる RNA の抽出法 [R. Boom, *et al.*, Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids, J. Clin. Microbiol., 28(3), 495–503 (1990)]

2. 製品内容

本製品は以下のように、キット I とキット II で構成されており、検体の前処理から RNA の検出までを行うことができます。本キット以外に以下の機器と器具が必要です。

1. リアルタイム PCR 測定機
2. 専用反応チューブあるいはプレート
3. マイクロピペットおよびチップ
4. 卓上ミニ遠心分離機

1) キット I (前処理用キット)

1キット (5検体分に小分けしたものが10セット) には、以下の①-1が50本、①-2が50本、②~④-4が密封されているアルミ小袋が50個、⑤が10個入っています。

- ①-1 スポイト (1 mL) 検体採取用
- ①-2 スポイト (1mL) 反応溶液混合用
- ② サンプル希釈用バッファー (DTT と PS 含 PBS 0.5 mL) 入りプラスチックチューブ (透明シール蓋) 1本
- ③ サンプルチューブの蓋 1個
- ④-1 糖鎖固定化ナノ粒子 (DS-SMGNP) 入りプラスチックチューブ (透明シール蓋) 1本
- ④-2 磁性マイクロ粒子入りプラスチックチューブ (透明シール蓋) 1本
- ④-3 洗浄用バッファー (PS 含 PBS) 入りプラスチックチューブ (透明シール蓋) 1本
- ④-4 ウイルス溶解用バッファー (SDS 入り RNase free water) 入りプラスチックチューブ (透明シール蓋) 1本
- ⑤ 分離用磁石

2) キット II (RT-PCR 試薬と、PCR プライマーおよびプローブ)

2-1) RT-PCR 試薬:

プローブ検出法 (5'-ヌクレアーゼ法) によるリアルタイム RT-PCR 専用の試薬を使用します。RT-PCR を 1 チューブ内で連続的に行えるため、操作が簡便でコンタミネーションの心配がありません。また、増幅産物をリアルタイムで検出でき、PCR 後に電気泳動などで確認する必要がありません。

内容 (100 回分 (50 検体分) ; 16 μ L 反応系)

※ スピンドウンしてから、チューブのふたを開け、ピペッティングにより攪拌してください。使用後は速やかに -20°C で保存してください。

1. 反応液 1280 μ L x1本 (注1)
2. 酵素液 66 μ L x1本 (注2)

注 1: dNTP 混合物と Mg^{2+} を含む。

注 2: RNA 分解酵素の阻害剤 を含む。

2-2) PCR プライマー・プローブセット

※ スピンドウンしてから、チューブのふたを開け、ピペッティングにより攪拌してください。使用後は速やかに -20°C で保存してください。

2-2A) mCDC セット 95 μ L (チューブ 1 本)

Forward primer: 5'-GACCCCAAATCAGCGAAATG-3'

Reverse primer: 5'-ATGTTGAGTGAGAGCGGTG-3'

Probe (mCDC) : FAM-5'-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-3'-MGB

2-2B) mNIID セット 95 μ L (チューブ 1 本)

Forward primer: 5'-ATTTTGGGGACCAGGAACTAATC-3'

Reverse primer: 5'-CGTTCCCGAAGGTGTGACTT-3'

Probe (mNIID) : FAM-5'-ATGTCGCGCATTGGCATGG-3'-MGB

3) 陽性コントロール

※ スピンドアウンしてから、チューブのふたを開け、ピペッティングにより攪拌してください。使用後は速やかに -20°C で保存してください。

2-2A) および 2-2B) のプライマーで PCR 反応を行った際に増幅できる塩基配列を含む DNA 2 種類の混合物 100,000 コピー/ μL (20 μL 入りチューブ 1 本)

3. 保存

キット I : $4\sim 24^{\circ}\text{C}$ 保存

キット II : 冷凍 (-20°C) 保存

4. プロトコール

(1) 前処理 (キット I を使用します。)

- ①-1 のスポイトを使用し、検体 (唾液または鼻咽頭スワブ液) を約 0.3~0.6 mL 採取します。
- バッファー入りの②のシールをはがし、唾液検体の全量を②に入れ、そのまま①-1 のスポイトで混合し、サンプルチューブの蓋③をつけ、1500rpm 以上で約 10 秒間遠心分離し、不溶物を沈殿させます。(一般には簡易型の遠心機 (チビタン) を使用します。)
- ①-2 のスポイトを用いて沈殿物をすわないように上澄みを 0.5mL とり、糖鎖固定化ナノ粒子入りの④-1 のシールをはがして④-1 へ加え、数回出し入れして溶液を混合します。そして、全量を吸い取り、磁性マイクロ粒子入りの④-2 のシールをはがして④-2 に入れます。
- 同じスポイトで混合します (黒色の磁性マイクロ粒子がよく混ざるように、5 回ほどそっと出し入れします。)
- ④-2 のチューブの外から磁石をあて、磁気分離します (キット付属の磁石を用いてもよいです)。約 10 秒後、スポイトで上澄みを吸い取り、④-1 のチューブにいれチュ

ーブごと廃棄します。

6. 残った黒色の粒子に、バッファー入りの④-3のシールをはがし、④-3の溶液を同じスポイトで全量を吸い取って加え、そのまま同じスポイトで混合します（黒色の粒子がよく混ざるように5回ほどそっと出し入れします）。
7. ④-2のチューブの外から磁石をあて、磁気分離します（キット付属の磁石を用いてもよいです）。約10秒後、スポイトで上澄みを吸い取り④-3のチューブにこれチューブごと廃棄します。この際、できるだけ上澄みを捨てるようにしてください。
8. ④-2の残った黒色の粒子に、バッファー入りの④-4のシールをはがして④-4の溶液を全量（20 μ L）加え、混合します（黒色の粒子がよく混ざるように軽くタッピングするか、ピペッティングします）。④-2のチューブの外から磁石（キットの付属品を用いてもよい）をあて、上澄みを1 μ Lずつとり、それらを以下のようにRT-PCR反応溶液に入れてRT-PCRを行います。

(2) RT-PCR 反応液の調製（氷上で調製してください）

使用するPCR測定機が、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う必要が無い場合の反応溶液の調製法です。1反応液の総量は16 μ Lを推奨します。補正を行う必要がある機器を使用される場合は、別途試薬を購入してください。

1 反応（総量16 μ L）あたり

| 試薬 | 使用量 | 最終濃度 |
|---------------------|--------------|---|
| 反応液 | 12.7 μ L | |
| 酵素液 | 0.6 μ L | |
| mCDCセット、またはmNIIDセット | 1.7 μ L | プライマー濃度は0.27 μ M プローブ濃度は0.52 μ M |
| 検体液（前処理（8）の液体） | 1 μ L | |

(3) RT-PCR サイクル条件

下記の温度サイクルで反応します。

Thermal Cycler Dice Real Time System II または III を使用するときの推奨条件です。（ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う必要のない機器のため、内部標準は必要ありません）

| | | |
|-------|---------------------|----------|
| 逆転写反応 | 42 $^{\circ}$ C 5分 | |
| プレ変性 | 95 $^{\circ}$ C 10秒 | |
| 変性 | 95 $^{\circ}$ C 5秒 | |
| 会合・伸長 | 60 $^{\circ}$ C 30秒 | ×45 サイクル |

5. 判定例 (Ct 値による判定^{※1})

PCR 測定にはタカラバイオ社の Thermal Cycler Dice Real Time System II または III を使用し、付属のソフトで Ct 値は自動測定されています。

| mCDCセット | mNIIDセット | 判定 |
|------------------|------------------|-------------------|
| Ct <41 | Ct <41 | 陽性 |
| Ct <41、または検出されない | Ct <41 | 陽性 |
| Ct <41 | Ct ≥41、または検出されない | 陽性 |
| 検出されない | 検出されない | 陰性 |
| Ct ≥41 | Ct ≥41 | 再測定 ^{※2} |
| 検出されない | Ct ≥41 | 再測定 ^{※2} |
| Ct ≥41 | 検出されない | 再測定 ^{※2} |

※1 陽性コントロールで Ct ≤41 の立ち上がりが認められない場合や陰性コントロールで立ち上がりが認められる場合は、再測定してください。

※2 Ct 値 41~45 で立ち上がりが見られた場合は ± とし、mCDC セット、mNIID セット共に ± または、どちらか一方が ± でどちらか一方が検出されない場合は、反応溶液を2倍 (32 μL) にして再測定してください。なお、再測定しても同様の結果になった場合は、陽性の可能性がありますので、検体を採取し直し、再度測定してください。

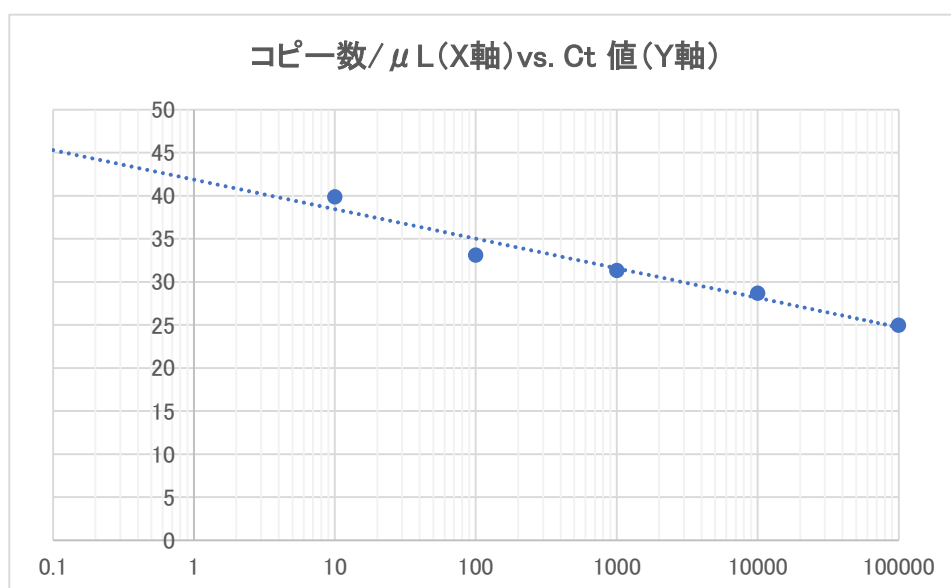
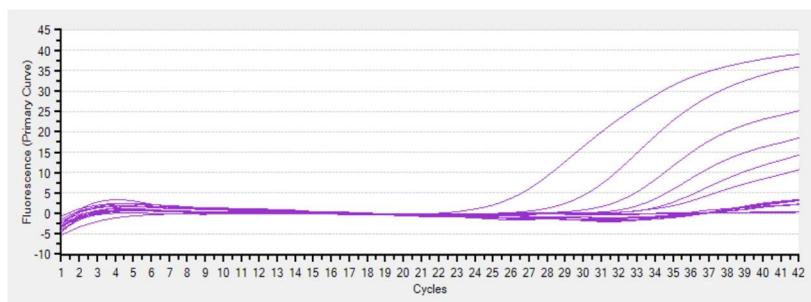
6. 陽性コントロールの検出例

mCDC セットまたはmNIID セットが増幅できる遺伝子配列の DNA を 100,000、10,000、1,000、100、10 コピー/ μ L に希釈し、それを反応液に 1 μ L 加え、前述のプロトコールで RT-PCR を測定し、Ct 値を測定し、下に示すようにそれぞれキャリブレーションカーブを作製しました。陰性コントロール (RNase Free 水) では、いずれも Ct 値は観測されていません。なお、PCR 測定にはタカラバイオ社の Thermal Cycler Dice Real Time System II または III を使用し、付属のソフトで Ct 値は自動測定されています。なお、ウェル間の補正が必要ない機器のため、内部標準は使用しません。

以下のように、上記 PCR 測定機を用いた場合、1 時間以内に逆転写および遺伝子増幅が達成され、検出限界は数コピー/ μ L でした。従って、国立感染症研究所の性能評価マニュアルにある 3 つのカテゴリーのうち「15 分～1 時間未満、検出限界 100 ウイルスゲノムコピー/反応以下」にあたります。

mCDC セットの例

| コピー数 | Ct 値 |
|--------|-------|
| 100000 | 24.96 |
| 10000 | 28.69 |
| 1000 | 31.32 |
| 100 | 33.11 |
| 10 | 39.89 |



mNIID セットの例

| コピー数 | Ct |
|--------|-------|
| 100000 | 23.96 |
| 10000 | 26.91 |
| 1000 | 29.41 |
| 100 | 32.16 |
| 10 | 40.04 |

