

nCoV

2019 新型コロナウイルス検出試薬キット
2019 Novel Coronavirus Detection Kit

P/N:241-09560-91

研究用試薬

取扱説明書

この文書をよく読んで正しくご使用ください。
いつでも使用できるように大切に保管してください。

特長

- 1step RT-PCR 法で新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)の N 遺伝子(Nucleocapsid)の 2 か所(N1、N2)を検出することができます。
 - ・ 米国 CDC の「2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes」に記載の「2019-nCoV_N1」および「2019-nCoV_N2」のプライマー・プローブ配列を使用しています。
 - ・ 国立感染症研究所の陽性コントロール RNA を本試薬キットでは使用することが出来ません。
- 検体からの RNA 抽出操作が不要で、1 本のチューブで検体処理から RT-PCR までの操作が行えます。
- 検体は処理液と混合して熱処理するだけで使用できます。
- 偽陰性対策として内部コントロール DNA (IC) を含んでいます。

試薬キット構成

No.	試薬名称	本数	液量
①	Sample Treatment Reagent	1 本	500 μ L
②	nCoV Reagent A	1 本	650 μ L
③	nCoV Reagent B	1 本	650 μ L
④	nCoV Reagent C	1 本	200 μ L

使用回数：100 tests

使用期限：包装袋のラベルに記載

保存温度：-20℃

キット以外に必要な機器・消耗品

- リアルタイム PCR 装置：
FAM、ROX および Cy5 蛍光フィルター対応
- 恒温装置：90℃に設定可能なもの
- マイクロピペットおよびフィルター付チップ
- 小型遠心機(スピンドウン用)
- ボルテックスミキサー
- クラッシュアイスや市販の保冷材などの冷媒
- チューブ冷却用アルミブロック
- リアルタイム PCR 用反応チューブ
- 反応液調製用チューブ (0.5 mL~2 mL)

操作方法

使用上の注意

- ・ 本試薬キットは**冷凍(-20℃)**で保存してください。
- ・ 操作は全て氷冷下(クラッシュアイスなどの冷媒で冷却したアルミブロック上)で実施してください。
- ・ ①Sample Treatment Reagent、②nCoV Reagent A、③nCoV Reagent B を室温にて解凍後、**ボルテックスミキサーで 5 秒間しっかり混合して、スピンドウンの後、使用時まで氷冷下で保存してください。**
- ・ ④nCoV Reagent C は**使用時まで冷凍保存(-20℃)**してください。

1 検体処理

- (1) ウイルス輸送液^{※1}をボルテックスミキサーで 5 秒間しっかり攪拌します。

※1：コロナウイルスの感染を防止するための適切な対策を行った上で取り扱ってください。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」を参照してください。

- (2) PCR 反応チューブに① Sample Treatment Reagent 5 μ L と検体 5 μ L を添加し、ボルテックスミキサーで 5 秒間しっかり混合して、スピンドウンします。
- (3) 90℃の恒温装置で、5 分間の加熱処理を行います。
- (4) スピンドウンした後、氷冷します。

2 反応試薬調製

- (1) 反応液調製用チューブでリアルタイム RT-PCR 反応液を調製します^{※2}。

【RT-PCR 反応液 1テスト分】

必要な反応数を掛けて使用量を計算してください。

② nCoV Reagent A	6.5 μ L
③ nCoV Reagent B	6.5 μ L
④ nCoV Reagent C	2 μ L
Total	15 μ L

※2：nCoV Reagent C は微量のため取り扱いに注意してください。

各試薬を混ぜた後は、ボルテックスミキサーで 5 秒間しっかり混合してください。

- (2) 前処理した検体 10 μ L の入った PCR 反応チューブに、(1)の RT-PCR 反応液 15 μ L を添加します。
- (3) ボルテックスミキサーで 5 秒間しっかり混合して、スピンドウンの後、PCR 反応チューブをリアルタイム PCR 装置にセットして直ちに反応を開始します。

3 リアルタイム RT-PCR 反応

- (1) リアルタイム RT-PCR の設定条件は以下のとおりです^{※3}。

【設定条件】

●Thermo Fisher Scientific社製 QuantStudio 5 使用の場合

温度	時間
42℃	10 分
	↓
95℃	1 分
	↓
[95℃ 5 秒 ⇒ 60℃ 30 秒 ^{※4} (測光)]	×45 サイクル

●BioRad 社製 CFX96 Touch Deep Well 使用の場合

温度	時間
42℃	10 分
	↓
95℃	1 分
	↓
[95℃ 5 秒 ⇒ 60℃ 15 秒 ^{※4} (測光)]	×45 サイクル

※3：使用する装置によって RT-PCR 増幅条件の最適化が必要な場合があります。十分な検証を行ってからご使用ください。装置は製品に付属する取扱説明書に従って、正しくご使用ください。

※4：60℃のステップは Cy5、ROX および FAM 蛍光フィルターで測光します。このステップは測光する時間を含めて 30 秒にする必要があります。使用する装置によって、30 秒になるように設定してください。上記、BioRad 社製 CFX96 Touch Deep Well は設定した 15 秒の後に測光するため、合計 30 秒になる装置の一例です。

- (2) Cy5、ROX および FAM 蛍光フィルターによる増幅曲線（Cq 値の検出の有無）から判定します。なお、リアルタイム PCR 装置は、増幅曲線の形状により誤った Cq 値を算出する可能性がありますので、必ず増幅曲線の形状を確認してください。

【判定方法】

- 内部コントロール(Cy5)の増幅曲線の立ち上がり が 40 サイクル以内であることを確認してください。但し、N1(ROX)またはN2(FAM)の立ち上がり が早い場合に内部コントロールが立ち上がらないことがあります。
- ROX の増幅曲線が反応時間以内に立ち上がった場合は、N1 が陽性と判断します。
- FAM の増幅曲線が反応時間以内に立ち上がった場合は、N2 が陽性と判断します。

判定	ROX: N1 (≤45 サイクル)	FAM: N2 (≤45 サイクル)	Cy5: IC (≤40 サイクル)
陽性	+	+	+または-
	+	-	+または-
	-	+	+または-
検出感度以下	-	-	+
不成立	-	-	-

+ : 増幅曲線の立ち上がり 有り

- : 増幅曲線の立ち上がり 無し

注意事項

1. 試薬に関する注意事項

- 本製品は研究用です。**医薬品医療機器法に基づく体外診断用医薬品あるいは医療機器として承認・認証等を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。
- 本取扱説明書および SDS に従って正しくご使用ください。SDS の入手は当社までお問合せください。
- 本試薬キットはコロナウイルスの完全な検出を保証するものではありません。検体中のウイルス量や夾雑物の多寡などや、変異株によっては、検出されない場合があります。

2. 廃棄に関する注意事項

- 増幅産物による汚染を防ぐため、PCR 後の反応チューブはふたを開けずに廃棄してください。廃棄の際にオートクレーブは行わないでください。DNA はオートクレーブでは分解されません。エアロゾルが発生して汚染原因となる可能性があります。
- 廃棄物は法令や自治体等の条例・規制等に従って適切に廃棄してください。

3. その他

- 本取扱説明書の著作権は(株)島津製作所が保有します。当社の許可無く内容の一部または全部を転載・複製することはできません。
- 本取扱説明書に記載の会社名・商品名は各社の商標の場合があります。本文中では®・TM を省略しています。

保証について

1. 保証内容

- 使用期限は包装袋のラベルに記載しています。使用期限内にご使用ください。
- 使用期限内に品質に異常が生じた場合は、無償で製品を代替します。
- 使用期限は未開封の場合の期限です。開封後は速やかにご使用ください。

2. 責任の制限

- どのような場合にも、お客様の逸失利益、間接的損害、二次派生的な損害について、当社は一切責任を負いません。第三者からお客様に対してなされた損害賠償に基づく損害についても、当社は一切責任を負いません。
- 当社の損害賠償責任は、どのような場合にも、本試薬製品の代金相当額をもってその上限とします。

3. 保証除外事項


- 使用期限内に品質に異常が生じた場合でも、以下の場合は保証対象から除外します。

(1) 誤って使用された場合

(2) お客様の操作方法に起因して測定結果が不正確となった場合

(3) 保存方法が適切でなかった場合

(4) 本製品に因らない理由で異常が生じた場合

島津コールセンター（操作・分析に関する電話相談窓口）  0120-567-168

<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

nCoV

2019 Novel Coronavirus Detection Kit

Research Use Only

P/N:241-09560-91

Instruction Manual

Please read this document carefully and use it correctly. Please store this manual carefully so that it can be used at any time.

Features

- Detection of the N1 and N2 regions on N gene (Nucleocapsid) of the novel coronavirus (SARS-CoV-2) by 1step Reverse Transcription PCR (RT-PCR).
 - This kit uses primers and probe sequences of "2019 - nCoV _ N1" and "2019 - nCoV _ N2" described in "2019 Novel Coronavirus (2019 - nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes" by CDC of U.S.
- From sample treatment to RT-PCR in a single tube without RNA extraction.
- Simply mix sample and sample treatment reagent and heat before RT-PCR.
- Contains internal control DNA (IC) to prevent false negative.

Kit contents

No.	Item	Quantity	Volume
①	Sample Treatment Reagent	1	500 μ L
②	nCoV Reagent A	1	650 μ L
③	nCoV Reagent B	1	650 μ L
④	nCoV Reagent C	1	200 μ L

Usage of one kit : 100 tests

Expiry : On the packaging bag label

Storage temperature : -20°C

Other necessities (equipment and materials)

- 1) Real-time PCR system: FAM, ROX and Cy5 detection
- 2) Heat block (adjustable up to 90°C)
- 3) Micropipette and tip with filter
- 4) Small centrifuge for spin down
- 5) Vortex mixer
- 6) Crushed ice or refrigerant
- 7) Aluminum block for tube cooling
- 8) Reaction tube for real-time PCR
- 9) Microcentrifuge tube for reaction mixture (1.5 mL~2 mL)

Procedure

Precautions for use

- Store this kit in a **freezer (-20°C)**.
- All operations should be performed in an ice-cold condition (on aluminum blocks cooled with coolant such as crushed ice).
- Thaw ①Sample Treatment Reagent, ②nCoV Reagent A, ③ nCoV Reagent B to room temperature, mix well with a vortex mixer for 5 seconds, spin down, and store in ice until use.
- ④**Keep** nCoV Reagent C in the freezer **until use (-20°C)**.

1 Sample treatment

- (1) Stir the virus transport medium^{※1} with a vortex mixer for 5 seconds.
 - ※1 Take appropriate measures to prevent coronavirus infection before handling.
- (2) Add 5 μ L of ① Sample Treatment Reagent and 5 μ L of the sample to the PCR reaction tube, mix with a vortex mixer for 5 seconds, and spin down.
- (3) Perform heat treatment for 5 minutes at 90°C.
- (4) Spin down and put on ice.

2 Preparation of reaction mixture

- (1) Prepare solution of RT-PCR in a preparation tube^{※2}.

[RT-PCR solution for one test]

Multiply the required number of reactions to calculate the usage.

② nCoV Reagent A	6.5 μ L
③ nCoV Reagent B	6.5 μ L
④ nCoV Reagent C	2 μ L
Total	15 μL

※2 : Since nCoV Reagent C is a very small amount, be careful when handling it.

After mixing each reagent, mix well with a vortex mixer for 5 seconds.

- (2) Add 15 μ L of the RT-PCR solution "(1)" into a tube containing 10 μ L of the treated sample.
- (3) Mix well with a vortex mixer for 5 seconds, spin down, set the PCR reaction tube in the real-time PCR system, and start the reaction immediately.

3 RT-PCR conditions

- (1) The conditions for RT-PCR are as follows^{※3}.

[Condition]

- Using Thermo Fisher Scientific QuantStudio 5

Temperature	Time
42°C	10min
	↓
95°C	1min
	↓
[95°C	5sec \Rightarrow 60°C 30sec ^{※4} (Detection)]
	×45 cycle

- Using BioRad CFX96 Touch Deep Well

Temperature	Time
42°C	10min
	↓
95°C	1min
	↓
[95°C	5sec \Rightarrow 60°C 15sec ^{※4} (Detection)]
	×45 cycle

※3: Optimization of RT-PCR amplification conditions may be required depending on the Real-time PCR system used. Please validate the results before use. Use the Real-time PCR system in accordance with its operating instructions.

※4: 60°C steps are metered with Cy5, ROX and FAM fluorescent filters. This step should be 30 seconds including the detection time. Set it to 30 seconds depending on the system you use. For example, BioRad CFX96 Touch Deep Well detects after 15 seconds of set time, and total setting time should be 30sec.

- (2) Check the amplification curve (Detection of Cq value) by Cy5, ROX and FAM fluorescent filters. The real-time PCR system may calculate an incorrect Cq value depending on the shape of the amplification curve. Be sure to check the shape of the amplification curve.

【Judgment】

- Confirm that the increase of the amplification curve of the internal control (Cy5) is within 40 cycles. However, if N1 (ROX) or N2 (FAM) increases quickly, internal control may not increase due to lack of PCR substrate.
- If the ROX amplification curve increases within 45 cycles, N1 is judged positive.
- If the FAM amplification curve increases within 45 cycles, N2 is judged positive.

Judgment	ROX: N1 (≤45 cycles)	FAM: N2 (≤45 cycles)	Cy5: IC (≤40 cycles)
Positive	+	+	+ or -
	+	-	+ or -
	-	+	+ or -
Less than detection sensitivity	-	-	+
RT-PCR Fail	-	-	-

+: Increase in amplification curve

-: No increase in amplification curve

Notes

1. Notes on Reagents

- **This kit is for research use only.** It cannot be used for the purpose of diagnosis or for the procedure.
- Follow the instructions in this manual and in Safety Data Sheets.
- This reagent kit does not guarantee complete detection of coronavirus. It may not be detected depending on the amount of virus, amount of contaminants in the sample, or variant virus strains.

2. Notes on Disposal

- To prevent contamination by amplification products, discard the reaction tube after PCR without opening the lid. Do not autoclave before disposal. DNA is not degraded in an autoclave. Aerosols may generate and cause pollution.
- Please dispose of the waste appropriately in accordance with the laws and regulations of the local government.

3. Others

- This manual is copyrighted by Shimadzu Corporation. No part or all of the contents may be reproduced or copied without the permission of Shimadzu Corp.
- The company and product names described in this manual may be trademarks of their respective companies. In this text "®" and "™" is omitted.

About Warranty

1. Warranty

- The expiration date is written on the label of the packaging bag. Please use before the expiration date.
- If there is any problem with the quality before the expiration

date, we will replace the product free of charge.

- The expiration date is valid when the package is unopened. Use promptly after opening.

2. limitation of liability

- In no event shall our company be liable for your lost profits, indirect, or consequential damages. Our company will not be liable for any damages caused to you by third parties.
- In any event, our company's liability for damages shall be limited to the amount equivalent to the cost of the Reagent Product.

3. Exclusions from Warranty

- Abnormalities in quality within the expiration date are excluded from the warranty in the following cases.

(1) If misused

(2) Measurement results become inaccurate due to the customer's operation method.

(3) If the storage method was not appropriate

(4) Abnormalities caused by reasons not related to this product.

Importer in EU:

Shimadzu Europa GmbH
Albert-Hahn-Strasse 6-1047269 Duisburg, F.R. Germany
TEL +49(203)7687-0

Importer in North America:

Shimadzu Scientific Instruments, Inc.
7102 Riverwood Drive Columbia, MD 21046 U.S.A.
TEL +1-800-477-1227

Importer in South and South East Asia:

Shimadzu (Asia Pacific) Pte Ltd.
79 Science Park Drive #02-01/08, Cintech IV
Science Park I Singapore - 118264
TEL (+65) 6778 6280

Manufacturer:

Shimadzu Corporation
1, Nishinokyo Kuwabara-cho, Nakagyo-ku, Kyoto 604-8511, Japan
<https://www.shimadzu.com/>