

N501Y

新型コロナウイルス変異検出
プライマー/プローブセット
Primer/Probe Mix
For SARS-CoV-2 Mutation Assay

研究用試薬

P/N: 227-20553-91

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

- 新型コロナウイルス変異検出コアキットと合わせて使用することで、1step RT-PCR 法で新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)のスパイクタンパク質における N501Y 変異を検出することができます。
- 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。

試薬キット構成

試薬名称	本数	液量
N501Y SC2M B	1本	650 μL

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

- 1) 新型コロナウイルス変異検出コアキット
SARS-CoV-2 Mutation Assay Core Kit (別売)
- 2) リアルタイム PCR 装置：
FAM、VIC および Cy5 蛍光フィルター対応
- 3) 恒温装置：90℃に設定可能なもの
- 4) マイクロピペットおよびフィルター付チップ
- 4) 小型遠心機(スピンドウン用)
- 6) ボルテックスミキサー
- 7) クラッシュアイスや市販の保冷材などの冷媒
- 8) チューブ冷却用アルミブロック
- 9) リアルタイム PCR 用反応チューブ
- 10) 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。
- ・Sample Treatment Reagent^{※2}、nCoV Reagent A^{※2}、N501Y SC2M B を室温にて解冻後、**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。
- ・nCoV Reagent C^{※2} は**使用時まで冷凍保存(-20℃)**してください。
※2：新型コロナウイルス変異検出コアキット(別売)の構成品です。

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：新型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 μL と検体 5 μL 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^{※3}。

【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。

nCoV Reagent A ^{※2}	6.5 μL
N501Y SC2M B	6.5 μL
nCoV Reagent C ^{※2}	2 μL
Total	15 μL

※2：新型コロナウイルス変異検出コアキット(別売)の構成品です。

※3：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 10μL の入った PCR 反応チューブに、(1)の RT-PCR 反応液 15 μL 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^{※4}

【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 ^{※5} (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 ^{※5} (測光)]	×45 サイクル

※4：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。
製品や設定条件を含む操作方法についての最新情報は、当社製品情報サイト (<https://www.an.shimadzu.co.jp/bio/reagents/covid-19/variant/index.htm>)よりご確認ください。クリックすることで製品情報サイトにアクセス頂けます。

※5：60℃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。使用装置によって、30 秒になるよう設定してください。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、VIC 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、N501Y Mutant type(VIC)または 501N Wild type(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。
- ・ VIC の増幅曲線が反応時間以内に立ち上がった場合は、N501Y 変異ありと判断します。
- ・ FAM の増幅曲線が反応時間以内に立ち上がった場合は、N501Y 変異なしと判断します。

VIC と FAM の増幅曲線がともに反応時間以内に立ち上がる場合があります*6。

下記【検出例】の増幅曲線を参考に、VIC と FAM の Ct 値と蛍光強度を比較してください。VIC の Ct 値が小さく蛍光強度が高ければ、N501Y 変異ありと判断します。

判定	VIC: N501Y Mutant type (≤45 サイクル)	FAM: 501N Wild type (≤45 サイクル)	Cy5: IC (≤40 サイクル)
N501Y 変異あり	+	- ※6	+ ※7 または -
N501Y 変異なし	- ※6	+	+ ※7 または -
検出感度以下	-	-	+
不成立 ※8	-	-	-

+ : 増幅曲線の立ち上がり 有り

- : 増幅曲線の立ち上がり 無し

※6: 変異株において従来株 (501N Wild type) 検出用のプライマー/プローブで増幅が認められる場合、または従来株において変異 (N501Y Mutant type) 検出用のプライマー/プローブで増幅が認められる場合があります。その場合、VIC と FAM の Ct 値と蛍光強度を確認し、VIC の Ct 値が小さく蛍光強度が高ければ N501Y 変異ありと判断します。

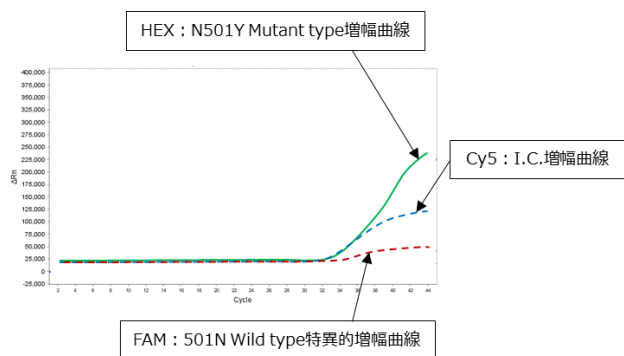
※7: コロナウイルスが高濃度の場合、I.C.増幅が抑えられる場合があります。

※8: いずれの増幅曲線も確認できない時は、再解析が必要です。

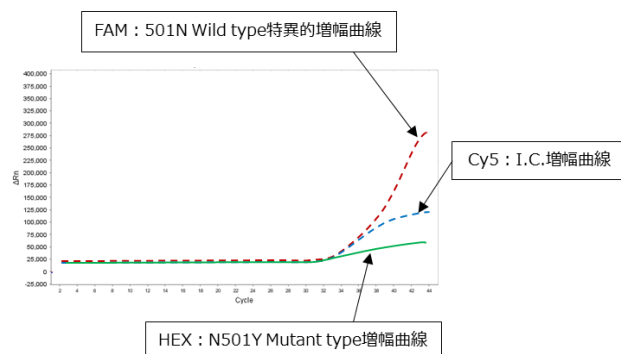
【検出例】

Thermo Fisher Scientific社製 QuantStudio 5 使用の場合

- N501Y 変異ありの場合



- N501Y 変異なしの場合



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ないで廃棄してください。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/>

© 2020 Shimadzu Corporation. All rights reserved.