

## 新型コロナウイルス (Novel Coronavirus : nCoV) 検出用アッセイについて

この度、国立感染症研究所で検証された新型コロナウイルス (nCoV) 検出 PCR 用のプライマー & プローブについての情報をお知らせいたします。

国立感染症研究所では、リアルタイム 1 ステップ RT-PCR で RUN 可能な、合成コントロールを用いた方法による感度確認がとれたとして、以下の 2 つプライマー・プローブの組み合わせを用いることを推奨しております。両方の組み合わせを用いて PCR 反応を実施し、どちらか一方でも陽性ならば陽性とのことです。国立感染症研究所では PCR 反応系 20 $\mu$ L で検証されています。詳細は国立感染症研究所ホームページをご覧ください。

nCoV 検出用プライマー・プローブにつきまして、日本遺伝子研究所で提供しております。お問い合わせください。(TEL:022-388-9748、e-mail:oligo@nrgl.co.jp)  
セット合成、単品カスタム合成、いずれも提供しております。

### (1) N gene set

プライマー・プローブと 1 反応 PCR 系終濃度

N_Sarbeco_F1	CACATTGGCACCCGCAATC	600nM=0.6pmol/uL
N_Sarbeco_R1	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	800nM=0.8pmol/uL
N_Sarbeco_P1	FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BHQ	200nM=0.2pmol/uL

20 $\mu$ L の PCR 系 1 反応あたりの反応組成の例

(◆国立感染症研究所では QuantiTect Probe RT-PCR kit を用いて検証)

N_Sarbeco_F1 (10pmol/ $\mu$ L)	: 1.2 $\mu$ L
N_Sarbeco_R1 (10pmol/ $\mu$ L)	: 1.6 $\mu$ L
N_Sarbeco_P1 (10pmol/ $\mu$ L)	: 0.4 $\mu$ L
2 × Master Mix	: 10 $\mu$ L
RT Mix	: 0.2 $\mu$ L
DDW	: 1.6 $\mu$ L
抽出 RNA	: 5 $\mu$ L

### (2) N gene set No.2

プライマー・プローブと 1 反応 PCR 系終濃度

NIID_2019-nCoV_N_F2	AAATTTTGGGGACCAGGAAC	500nM=0.5pmol/uL
NIID_2019-nCoV_N_R2	TGGCAGCTGTGTAGGTCAAC	700nM=0.7pmol/uL
NIID_2019-nCoV_N_P2	FAM-ATGTCGCGCATTGGCATGGA-BHQ	200nM=0.2pmol/uL

20 $\mu$ L の PCR 系 1 反応あたりの反応組成の例

(◆国立感染症研究所では QuantiTect Probe RT-PCR kit を用いて検証)

NIID_2019-nCoV_N_F2 (10pmol/ $\mu$ L)	: 1.0 $\mu$ L
NIID_2019-nCoV_N_R2 (10pmol/ $\mu$ L)	: 1.4 $\mu$ L
NIID_2019-nCoV_N_P2 (10pmol/ $\mu$ L)	: 0.4 $\mu$ L
2 × Master Mix	: 10 $\mu$ L
RT Mix	: 0.2 $\mu$ L
DDW	: 2 $\mu$ L
抽出 RNA	: 5 $\mu$ L

### 共通 PCR 反応プログラム

(◆前述の 2 つの組み合わせに共通の反応プログラムです。)

Applied Biosystems 7500 Fast の場合

50 $^{\circ}$ C : 30min (逆転写(RT))

↓

95 $^{\circ}$ C : 15min

↓

95 $^{\circ}$ C : 15sec  
60 $^{\circ}$ C : 1min } 45 サイクル

◆ LightCycler480 または LightCycler96 では  
同じプログラム、あるいは逆転写(RT)を 55 $^{\circ}$ C とします。