

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 検出用プライマー・プローブセット合成

国立感染症研究所のマニュアルに則ったリアルタイム RT-PCR 反応系 20 μ L の反応組成、および共通 PCR 反応プログラムの例は以下となります。

本セット合成の 500 反応分とは、以下の反応組成で 20 μ L 系の RT-PCR を実施する場合を想定しています。
異なる反応組成や反応系では、反応数が 500 回から変動する場合があります。

(1) N gene set (N セット)

プライマー・プローブと 1 反応 PCR 20 μ L 系終濃度

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

20 μ 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)

(例 1)

N_Sarbeco_F1 (10pmol/ μ L) :	1.2 μ L
N_Sarbeco_R1 (10pmol/ μ L) :	1.6 μ L
N_Sarbeco_P1 (5pmol/ μ L) :	0.8 μ L
2 × Master Mix :	10 μ L
RT Mix :	0.2 μ L
DDW :	1.2 μ L
抽出 RNA :	5 μ L
	<hr/>
	20 μ L

(例 2) プライマー・プローブ Mixture の場合

N_Sarbeco_F1/R1/P1	
10×Mixture :	2.0 μ L
2 × Master Mix :	10 μ L
RT Mix :	0.2 μ L
DDW :	2.8 μ L
抽出 RNA :	5.0 μ L
	<hr/>
	20 μ L

(2) N gene set No.2 (N2 セット)

プライマー・プローブと 1 反応 PCR 20 μ L 系終濃度

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

20 μ 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)

(例 1)

NIID_2019-nCoV_N_F2 (10pmol/ μ L) :	1.0 μ L
NIID_2019-nCoV_N_R2 (10pmol/ μ L) :	1.4 μ L
NIID_2019-nCoV_N_P2 (5pmol/ μ L) :	0.8 μ L
2 × Master Mix :	10 μ L
RT Mix :	0.2 μ L
DDW :	1.6 μ L
抽出 RNA :	5 μ L
	<hr/>
	20 μ L

(例 2) プライマー・プローブ Mixture の場合

NIID_2019-nCoV_N_F2/R2/P2	
10×Mixture :	2.0 μ L
2 × Master Mix :	10 μ L
RT Mix :	0.2 μ L
DDW :	2.8 μ L
抽出 RNA :	5.0 μ L
	<hr/>
	20 μ L

共通 PCR 反応プログラム

(◆前述のいずれの組合せにも共通の反応プログラムの例です。)

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 とする場合もあるようです。