

SARS-CoV-2 B.1.1.7およびB.1.351系統の サンガーシーケンスプロトコル

SARS-CoV-2感染の世界的な緊急事態は、経済的および個人的活動に重大な混乱を引き起こし、深刻な健康リスクをもたらしています。最近、感染性が増加したと思われる2つの新しい系統が同定されました。英国で最初に同定され、その後米国で同定されたB.1.1.7系統には、SARS-CoV-2ゲノムに散在する23の変異が含まれています[1]。もう一つの系統であるB.1.351は、南アフリカで初めて同定されたもので、SARS-CoV-2スパイク(S)遺伝子に一連の突然変異を含んでいます[2]。いずれの系統も他の系統に比べて感染性が高いと考えられているため、検体に2系統で同定された突然変異が含まれているかどうかを明らかにすることが重要です[2,3]。

我々は、サンガーシーケンスによりこれらの系統を検出するための、研究用途のプロトコルを開発しました。ここで用いるプライマー配列は、米国疾病管理予防センター(Centers for Disease Control and Prevention; CDC)が発表したものにに基づいています[4]。簡単に述べると、まずウイルスRNAを含む試料でcDNAを合成します。次に、新規の突然変異をカバーするように選択されたプライマーを用いcDNAの特異的な領域を増幅します。この時、Applied Biosystems™ BigDye™ Direct Cycle Sequencing KitおよびM13テイルドプライマーセットを用います。次に、増幅された配列について、BigDye Direct Cycle Sequencing Kitに含まれるM13-フォワードプライマーまたはM13-リバースプライマーのいずれか

を用いてサイクルシーケンス反応を行います。取り込まれていないヌクレオチドやプライマーは、Applied Biosystems™ BigDye™ Xterminator™ Purification Kitを用いて除去し、キャピラリー電気泳動(CE)システムで配列を読み取ります。得られた配列は、Sequencing AnalysisソフトウェアやGeneious™ ソフトウェアなど、あらゆるシーケンスプログラムで読むことができ、既知または予想されるSARS-CoV-2配列と比較することができます(図1)。

この方法で読まれる配列の中には、CEトレースの解釈が難しくなる可能性がある配列があります。CEトレースが配列決定に利用できるかを定めるために、Applied Biosystems™ Sequence Scannerソフトウェアv2.0によって生成される品質管理基準を用いました。これらの基準には、trace score (clear range内の塩基に対するquality valueの平均値)、連続読み取り長(CRL)、およびQV20+(quality value \geq 20であるトレース全体の塩基の合計数)が含まれます。これらの測定基準を品質管理に使用し、結果を分析するためのガイドラインは、プロトコル末尾に記載されています。一般的に、シーケンス法は新規の配列が存在するか否かを確認するのに十分に標準的な解析方法です。

注:このプロトコルとその中に記載されている試薬は研究用です。診断用には使用できません。



図1. サンガーシーケンスを用いたSARS-CoV-2系統検出のためのワークフロー

RNAは標準的な手法を用いて試料から精製します。RNAからcDNAを合成し、PCRによってM13配列を持ったアンプリコンを生成します。アンプリコンは、ユニバーサルM13プライマーおよびBigDye Direct Cycle Sequencing Kitを用いて、順方向と逆方向でそれぞれ配列決定します。シーケンス反応物は、BigDye Xterminatorキットを使用して精製し、CEシステムで解析します。得られた配列を分析し、リファレンスとなるSARS-CoV-2配列と比較して、系統が存在するか決定します。

重要:このプロトコルは非常に感度が高いため、ストック溶液の調製や、増幅反応液のセットアップは、アンプリコンを含まない環境で最大限の注意を払って実施する必要があります。

1 必要物品

1.1 機器

Product	Supplier	Cat. No.
Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler, ProFlex 96-Well PCR System, or similar thermal cycler	Thermo Fisher Scientific	4375305 or 4484075
MicroMixer E-36 for 96-well plates	Taitec	0027765-000
Single-channel and multichannel micropipettes of various sizes capable of pipetting volumes from 1.00 µL to 1,000.0 µL	MLS	Any
Cold block or ice	MLS	Any
Plate centrifuge	MLS	Any
Microcentrifuge or mini centrifuge	MLS	Any
Vortex mixer	MLS	Any

1.2 試薬、キット、消耗品

Product	Supplier	Cat. No.
SuperScript™ IV VIL0™ Master Mix	Thermo Fisher Scientific	11756050
Nuclease-Free Water	Thermo Fisher Scientific	AM9937 or equivalent
BigDye Direct Cycle Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific	4458688 or equivalent
BigDye XTerminator Purification Kit	Thermo Fisher Scientific	4376486 or equivalent
MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL	Thermo Fisher Scientific	4346906 or 4366932
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, 0.2 mL	Thermo Fisher Scientific	N8010560 or 4316813
MicroAmp Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific	4311971, 4313663, or 4360954
Nonstick, RNase-Free Microcentrifuge Tubes, 1.5 mL	Thermo Fisher Scientific	AM12450 or equivalent
5 mL tube, PCR clean	MLS	Any
Sterilized aerosol barrier (filter) pipette tips	MLS	Any

注意事項

MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plateをご使用の場合は、シーケンサの専用アクセサリが別途必要になります。

例) 3500 / 3500xL Fast 96-Well プレート用リテーナー& ベース (P/N 4409530)

SeqStudioは、0.1 mLプレートには対応していないためMicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, 0.2 mLをご使用ください。

1.3 プライマー

- プライマー配列を表1に示します。

表1: B.1.1.7系統に認められる突然変異を検出するためのM13テイルドプライマーの配列。

SARS-CoV-2ゲノムの特定の領域に焦点を当てたプライマーペアのサブセットを研究者のニーズに応じて選択することができます。ここではB.1.1.7および南アフリカ系統で突然変異を起こした全領域を網羅する完全なリストを示します。同義置換でアミノ酸変化を生じさせない変異には、「:syn」の接尾語(例、T26801C:syn)が付いています。南アフリカのB.1.351系統に関連する突然変異は(SA)と示されています。M13配列は赤色で強調されています。

Mutation covered by primer pair	Forward primer name	Forward primer sequence	Reverse primer name	Reverse primer sequence
C913T	SC2M1-3_LEFT_M13	TGTAAAACGACGGCCAGT AACA ACTTCTGTGGCCCTGATG	SC2M1-3_RIGHT_M13	CAGGAAACAGCTATGACCTCTGAATTGTGACATGCTGGACA
C3267T:T1001I	SC2M1-8_LEFT_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTACTTACACCACTGGGCATTGATT	SC2M1-8_RIGHT_M13	CAGGAAACAGCTATGACCTGCAACACCTCCTCCATGTTT
C5388A:A1708D	SC2M1-14_LEFT_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTACTTCTATTAATGGGCAGATAACA ACTGT	SC2M1-14_RIGHT_M13	CAGGAAACAGCTATGAC AGC ACCCTGTATGCAATACAAAGT
C5986T:syn	SC2M1-15_LEFT_M13	TGTAAAACGACGGCCAGT TGTT ATGATGTCAGCACCCCTG	SC2M1-15_RIGHT_M13	CAGGAAACAGCTATGAC AGC CACCACATCACCATTTAAGT
T6954C:I2230T	SC2M1-18_LEFT_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTAAACCGTGGTGTACTAATTATATGCCTT	SC2M1-18_RIGHT_M13	CAGGAAACAGCTATGAC CTG CCAAAAACCACTCTGCAACT
del11288-11296i:delISGF3675-3677	SC2M1-29_LEFT_M13	TGTAAAACGACGGCCAGT AGTCC AGAGTACTCAATGGTCTTTGT	SC2M1-29_RIGHT_M13	CAGGAAACAGCTATGAC ACA ATACCTCTGGCCAAAAACATGA
C14676T:syn	SC2M1-38_LEFT_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTACTTCAGAGAGCTAGGTGTTGTACA	SC2M1-38_RIGHT_M13	CAGGAAACAGCTATGAC CTG CGAAAAGTGCATCTTGATCCT
C15279T:syn	SC2M1-39_LEFT_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTACGATGGTGGCTGTATTAATGCT	SC2M1-39_RIGHT_M13	CAGGAAACAGCTATGAC CGG TGTGACAAGCTACAACACGT
C16176T:syn	SC2M1-42_LEFT_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTGGAGTATGCTGATGCTTTTCATTGTAC	SC2M1-42_RIGHT_M13	CAGGAAACAGCTATGAC CGG TTTCTGCTGCAAAAAGCTT
del21765-21770:delHV69-70	SC2M1-55_LEFT_M13	TGTAAAACGACGGCCAGT AGGGG TACTGCTTTATGCTTTAAA	SC2M1-55_RIGHT_M13	CAGGAAACAGCTATGAC CAAG TAGGGACTGGGTCTTCGAA
C21614T_S:L18F (SA)	SC2M1-56_LEFT_M13	TGTAAAACGACGGCCAGT TGGG ACCAATGGTACTAAGAGGT	SC2M1-56_RIGHT_M13	CAGGAAACAGCTATGAC CA CCAGCTGTCCAACCTGAAGAA
A21801C_S:D80A (SA)				
del21991-21993:delY144				
A22206G_S:D215G (SA)				
S:delL242_244L (SA)				
T22287A_S:L242H (SA)	SC2M1-59_LEFT_M13	TGTAAAACGACGGCCAGT CCGG TAGCACACCTTGTAAATGG	SC2M1-59_RIGHT_M13	CAGGAAACAGCTATGAC CC CCTATTAACAGCCTGCACG
G22299T_S:R2461 (SA)				
A23063T:N501Y				
C23271A:A570D				
G23012A_S:E484K (SA)	SC2M1-60_LEFT_M13	TGTAAAACGACGGCCAGT ACC AGGTGCTGTTCTTTATCAGG	SC2M1-60_RIGHT_M13	CAGGAAACAGCTATGAC CA GCTATTCCAGTTAAAGCACGGT
A23063T_S:N501Y (SA)				
C23604A:P681H				
C23709T:T716I	SC2M1-62_LEFT_M13	TGTAAAACGACGGCCAGT GCTG CTAGAGACCTCATTGTGC	SC2M1-62_RIGHT_M13	CAGGAAACAGCTATGAC CA AGCTCTGATTCTGCAGCTCT
C23664T_S:A701V (SA)				
T24506G:S982A	SC2M1-64_LEFT_M13	TGTAAAACGACGGCCAGT GCAC ACTGGTTGTAAACAAA	SC2M1-64_RIGHT_M13	CAGGAAACAGCTATGAC CTT GACTCCTTTGAGCACTGGC
G24914C:D1118H	SC2M1-68_LEFT_M13	TGTAAAACGACGGCCAGT TCCT GATCTTCTGGCTAAACGAACT	SC2M1-68_RIGHT_M13	CAGGAAACAGCTATGAC CA TGTCACAGCGTCTAGATGGT
G22813T_S:K417N (SA)				
T26801C:syn	SC2M1-71_LEFT_M13	TGTAAAACGACGGCCAGT TGTT CATCAGACAAGAGGAAGTTCA	SC2M1-71_RIGHT_M13	CAGGAAACAGCTATGAC CA CGAACAACGCACTACAAGACT
C27972T:Q27stop	SC2M1-72_LEFT_M13	TGTAAAACGACGGCCAGT TTG AATTGTGCGTGGATGAGGC	SC2M1-72_RIGHT_M13	CAGGAAACAGCTATGAC CTA GCACCATAGGGAAGTCCAGC
G28048T:R52I				
A28111G:Y73C				
GAT_CTA:D3L	SC2M1-74_LEFT_M13	TGTAAAACGACGGCCAGT TGAT GCTGCTTGTCTTTGCTG	SC2M1-74_RIGHT_M13	CAGGAAACAGCTATGAC CTC TGCAGCAGGAAGAAGAGTCA
C28977T:S235F				

本文書に記載されているプライマー配列の機能は検証中です。

- プライマーは、当社のカスタムオリゴウェブページからご注文いただけます。

(<https://www.thermofisher.com/order/custom-standard-oligo>)

- 25 nmolの乾燥および脱塩プライマーをご注文いただけますが、注文は必要に応じてスケールアップすることも可能です。

- 乾燥したプライマーをTEで最終濃度100μMに再懸濁します。

1.4. プライマーミックス

- ターゲットごとの増幅プライマーミックスを調製します:

- 各プライマーペア (例えば、SC2M1-3) について、清潔なマイクロチューブにラベルします。各チューブに490 μLのTEを加えます。
- ペアのフォワードとリバースに相当する左右両方のオリゴをそれぞれ適切なチューブに5μLずつ加えます (つまり、SC2M1-3_LEFT_M13とSC2M1-3_RIGHT_M13を1チューブに、別のチューブにはSC2M1-8_LEFT_M13とSC2M1-8_RIGHT_M13など)。
- これらは、ステップ3.1-3.2で使用される、10Xプライマーミックスです。各オリゴの濃度は1.0 μMです。

2. cDNA合成

2.1. 各サンプルと添加量:

Reagent	Final volume
	50 μL
5X SuperScript IV VILO Master Mix	10 μL
Sample	1-15 μL
Water	To final 50 μL

2.2. Vortexミキサーを2~3秒間かけた後、1000 x *g*で短時間 (5~10秒間) 遠心分離します。

注: サンプル添加量は調整可能です。例えば、低タイターが予想される場合はサンプル量を15 μLまで加えることができます。

2.3. 逆転写反応

2.3.1. 以下の条件でサーマルサイクラーを設定します:

Parameter	Stage/step			
	Annealing	Polymerase extension	Polymerase inactivation	Hold
Temperature	25°C	50°C	80°C	4°C
Time	10 min	15 min	10 min	Indefinitely

2.3.2. サンプルをサーマルサイクラーに入れ、プログラムを実行します。

注: サンプルは4°Cまたは氷上で最大8時間保持できます。より長期間保存する場合は、-20°Cで凍結します。

3. ターゲットのPCR増幅

3.1. 各サンプルについて、順方向および逆方向のシーケンス反応を実施します。したがって、最初のPCR増幅では、同一の反応系を二重に設定する必要があります。96ウェルプレート設定の例を以下に示します:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SC2M1-3 primers	SC2M1-3 primers	SC2M1-42 primers	SC2M1-42 primers	SC2M1-71 primers	SC2M1-71 primers	SC2M1-3 primers	SC2M1-3 primers	SC2M1-42 primers	SC2M1-42 primers	SC2M1-71 primers	SC2M1-71 primers
B	SC2M1-8 primers	SC2M1-8 primers	SC2M1-55 primers	SC2M1-55 primers	SC2M1-72 primers	SC2M1-72 primers	SC2M1-8 primers	SC2M1-8 primers	SC2M1-55 primers	SC2M1-55 primers	SC2M1-72 primers	SC2M1-72 primers
C	SC2M1-14 primers	SC2M1-14 primers	SC2M1-56 primers	SC2M1-56 primers	SC2M1-74 primers	SC2M1-74 primers	SC2M1-14 primers	SC2M1-14 primers	SC2M1-56 primers	SC2M1-56 primers	SC2M1-74 primers	SC2M1-74 primers
D	SC2M1-15 primers	SC2M1-15 primers	SC2M1-59 primers	SC2M1-59 primers	No primers	No primers	SC2M1-15 primers	SC2M1-15 primers	SC2M1-59 primers	SC2M1-59 primers	No primers	No primers
E	SC2M1-18 primers	SC2M1-18 primers	SC2M1-60 primers	SC2M1-60 primers	NTC	NTC	SC2M1-18 primers	SC2M1-18 primers	SC2M1-60 primers	SC2M1-60 primers	NTC	NTC
F	SC2M1-29 primers	SC2M1-29 primers	SC2M1-62 primers	SC2M1-62 primers	Positive control	Positive control	SC2M1-29 primers	SC2M1-29 primers	SC2M1-62 primers	SC2M1-62 primers	Positive control	Positive control
G	SC2M1-38 primers	SC2M1-38 primers	SC2M1-64 primers	SC2M1-64 primers	Blank	Blank	SC2M1-38 primers	SC2M1-38 primers	SC2M1-64 primers	SC2M1-64 primers	Blank	Blank
H	SC2M1-39 primers	SC2M1-39 primers	SC2M1-68 primers	SC2M1-68 primers	Blank	Blank	SC2M1-39 primers	SC2M1-39 primers	SC2M1-68 primers	SC2M1-68 primers	Blank	Blank

注: 同じcDNAサンプルを用いた反応は、同一の色分けをしています。

注: 上記のレイアウトは、B.1.1.7株で突然変異が認められているすべての部位に対して解析を行うためのものです。この一部を用いて解析する場合は、レイアウトを適宜調整することができます。

注: コントロール用のウェルを設定することを推奨します。「プライマーなし」コントロールの場合は、サンプルは加えますが、増幅用プライマーは加えません。ネガティブコントロール (NTC) については、サンプルを加えずにcDNA合成を行い、いずれかのプライマーペアを用いて増幅します。ポジティブコントロールには、SARS-CoV-2が存在することがわかっているサンプルと、任意のプライマーを使用してください。

3.2. 96ウェルPCRプレートの各ウェルと添加量:

- 10Xプライマーミックス1μLを2回ずつ(上表に示されているように)
- 2X BigDye Direct PCR Master Mixを5μL(キット構成成分)
- ステップ2.3で合成したcDNAサンプルを1μL
 - 残ったcDNA試料は-20°Cで凍結保存することができます。
- 水(総量10μLになるように)

3.3. プレートを密封し、2~3秒間Vortexミキサーで攪拌し、1000 x gで短時間(5~10秒)遠心します。

3.4. プレートをサーマルサイクラーにセットし、以下のプログラムを実行します:

Parameter	Stage/step				
	Polymerase activation	Cycling (35 cycles)			Hold
		Denaturation	Annealing	Extension	
Temperature	95°C	96°C	62°C	68°C	4°C
Time	10 min	3 sec	15 sec	30 sec	Indefinitely

注: サンプルは4°Cまたは氷上で最大8時間保持できます。長期間保存する場合は、-20°Cで凍結します。

注: 反応溶液量が10μLを超えないようにしてください。サイクルシーケンスとBigDye Xterminatorのステップは、10μLで最適化されています。

4. サイクルシーケンス

4.1. ステップ3.4のPCRが完了したら、プレートを直接サイクルシーケンスに用いることができます。

4.2. プレートからシールを取り外します。

4.3. 各ウェルと添加量は以下の通りです：

- BigDye Direct Sequencing Master Mix を2 μ L(キット構成)
- BigDye Direct M13 ForwardまたはM13 Reverseプライマーを1 μ L(キット構成)

注：2つ調製したPCR反応系の1つにM13 Forwardプライマーを、もう1つの反応系にM13 Reverseプライマーを加えることが重要です。プレート設定に基づく例を以下に示します。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SC2M1-3 M13 For	SC2M1-3 M13 Rev	SC2M1-42 M13 For	SC2M1-42 M13 Rev	SC2M1-71 M13 For	SC2M1-71 M13 Rev	SC2M1-3 M13 For	SC2M1-3 M13 Rev	SC2M1-42 M13 For	SC2M1-42 M13 Rev	SC2M1-71 M13 For	SC2M1-71 M13 Rev
B	SC2M1-8 M13 For	SC2M1-8 M13 Rev	SC2M1-55 M13 For	SC2M1-55 M13 Rev	SC2M1-72 M13 For	SC2M1-72 M13 Rev	SC2M1-8 M13 For	SC2M1-8 M13 Rev	SC2M1-55 M13 For	SC2M1-55 M13 Rev	SC2M1-72 M13 For	SC2M1-72 M13 Rev
C	SC2M1-14 M13 For	SC2M1-14 M13 Rev	SC2M1-56 M13 For	SC2M1-56 M13 Rev	SC2M1-74 M13 For	SC2M1-74 M13 Rev	SC2M1-14 M13 For	SC2M1-14 M13 Rev	SC2M1-56 M13 For	SC2M1-56 M13 Rev	SC2M1-74 M13 For	SC2M1-74 M13 Rev
D	SC2M1-15 M13 For	SC2M1-15 M13 Rev	SC2M1-59 M13 For	SC2M1-59 M13 Rev	No primers M13 For	No primers M13 Rev	SC2M1-15 M13 For	SC2M1-15 M13 Rev	SC2M1-59 M13 For	SC2M1-59 M13 Rev	No primers M13 For	No primers M13 Rev
E	SC2M1-18 M13 For	SC2M1-18 M13 Rev	SC2M1-60 M13 For	SC2M1-60 M13 Rev	NTC M13 For	NTC M13 Rev	SC2M1-18 M13 For	SC2M1-18 M13 Rev	SC2M1-60 M13 For	SC2M1-60 M13 Rev	NTC M13 For	NTC M13 Rev
F	SC2M1-29 M13 For	SC2M1-29 M13 Rev	SC2M1-62 M13 For	SC2M1-62 M13 Rev	Positive control M13 For	Positive control M13 Rev	SC2M1-29 M13 For	SC2M1-29 M13 Rev	SC2M1-62 M13 For	SC2M1-62 M13 Rev	Positive control M13 For	Positive control M13 Rev
G	SC2M1-38 M13 For	SC2M1-38 M13 Rev	SC2M1-64 M13 For	SC2M1-64 M13 Rev	Blank	Blank	SC2M1-38 M13 For	SC2M1-38 M13 Rev	SC2M1-64 M13 For	SC2M1-64 M13 Rev	Blank	Blank
H	SC2M1-39 M13 For	SC2M1-39 M13 Rev	SC2M1-68 M13 For	SC2M1-68 M13 Rev	Blank	Blank	SC2M1-39 M13 For	SC2M1-39 M13 Rev	SC2M1-68 M13 For	SC2M1-68 M13 Rev	Blank	Blank

4.4. プレートを密閉します。Vortexミキサーに2~3秒間かけた後、1000 x *g*で短時間(5~10秒間)遠心します。

4.5. プレートをサーマルサイクラーにセットし、以下のプログラムを実行します：

Parameter	Stage/step						
	Post PCR cleanup	Post PCR inactivation	Polymerase activation	Cycling (25 cycles)			Hold
				Denaturation	Annealing	Extension	
Temperature	37°C	80°C	96°C	96°C	50°C	60°C	4°C
Time	15 min	2 min	1 min	10 sec	5 sec	75 sec	Indefinitely

5. シーケンス反応後のクリーンアップ

5.1. 反応プレートを1000 x gで1分間遠心した後、シールを外します。

5.2. 適切なサイズのチューブでSAM溶液とBigDye XTerminator溶液の混合液を調製します。

5.2.1. すべてのサンプルに必要なSAM溶液とXTerminator 溶液の量を計算します。1ウェルあたりSAM溶液45 μ L、XTerminator 溶液 10 μ Lが必要です。

5.2.2. ピペットチップを用いて、計算したSAM溶液を新しいチューブに加えます。

注:ピペッティング前にSAM溶液に結晶物がないことを確認してください。結晶物がある場合はSAM溶液を37°Cに加熱し、溶解してください。使用する前に室温まで冷ましてください。

5.2.3. XTerminator 溶液の容器を、液が均一になるまで、少なくとも10秒間、最大速度で攪拌します。

5.2.4. 広径のピペットチップを用いて、計算された量のXTerminator 溶液をチューブに加えます。

重要:液体の上部から溶液を取ることは避けます。

5.2.5. 溶液が均一になるまで攪拌します。

5.3. 各ウェルにSAM溶液/XTerminator溶液を55 μ Lずつ加えます。

重要:液体の上部から溶液を取ることは避けます。プレートに分注する際、SAM溶液/XTerminator溶液を8~10ウェルごとに再度攪拌し、溶液を均一化しながら分注します。

5.4. Applied Biosystems™ MicroAmp™ Optical Adhesive Filmでシールします。プレートがしっかりと密閉されていることを確認します。

5.5. 反応プレートを40分間Vortexミキサーで攪拌します。

5.6. スイングバケット型遠心機で、プレートを1000 x gで2分間遠心します。

6. データ収集

6.1. sequencing standard (Z-dye set matrixおよびsequencing standard) で機器が校正されていることを確認してください。

- 詳しくは、「Applied Biosystems™ 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide」または「Applied Biosystems™ SeqStudio™ Genetic Analyzer Getting Started Guide」を参照してください。

6.2. MicroAmp Optical Adhesive Filmを取り除き、96ウェルプレートセプタに取り替えます。

6.3. シーケンサにプレートを設定します。

6.4. キャピラリの長さ、キャピラリの本数、およびポリマーの種類に応じて、適切なランモジュールを選択または作成します。推奨されるデフォルトのランモジュールを以下に示します：

- 50cmのキャピラリを備えた3500xL用：

- Instrument protocol: BDxFastSeq50_POP7xI_Z

注：36 cmキャピラリを取り付けている場合は、instrument protocolの50が36になっているものを選択してください。

- Analysis Module: BDTv3.1_PA_Protocol-POP7

- SeqStudio用：

- MedSeqBDX

7. シーケンスプログラムを用いて結果を解析する

Sequence Scanner v2.0(Win7版)は、エレクトロフェログラムを見るための無料ソフトウェアです。このソフトウェアは、サマリテーブルやエレクトロフェログラム、および.ab1ファイルの生データを含む、高レベルのシーケンスデータのクオリティチェックまたは一般的なデータレビューを簡単に行うことができます。

7.1. ソフトウェアを入手するには、thermofisher.com/pages/WE28396/ をご覧ください。

7.2. Sequence Scanner Software v2.0 を使用して、品質管理レポートを作成します。各シーケンスについて、trace score、CRL、QV20+スコアを決定します。

7.3. 推奨される判定基準:

- 3つの閾値のうち2つが満たされていれば、シーケンスは良好と判断されます:

- Trace score:31以上
- CRL:50以上
- QV20+:50以上

- 3つの閾値のうち2つが満たされれば、シーケンスは不良と判断されます:

- Trace score:14未満
- CRL:24未満
- QV20+ :24未満

- 上記の基準に当てはまらないシーケンスは不確定であり、やり直すべきです。

7.4. BLAST™ アラインメントまたは別のアラインメントツールを用いて、配列をSARS-CoV-2ゲノムにアラインメントします。

- 読み取り長全体で85%を超えるアラインメントは、SARS-CoV-2ゲノムと相同であると見なされます。
- SARS-CoV-2と相同でない配列はすべて破棄します。

7.5. これらのアンプリコンにおける系統解析では、次の基準を満たす必要があります:

- 両方向のシーケンス共に良好(7.3)
- 推定系統外の領域におけるSARS-CoV-2ゲノム(7.4)との相同性
- テンプレートなしのコントロール反応(7.3)における陰性の判定

7.6. 機器の誤作動、オペレーターのエラー、その他の明白な原因など、システムの性能に起因しない理由で不合格となったテストランは、無効ランとします。無効なランは再試験され、試験報告書に記録されます。

研究用にもみ使用できます。診断用には使用いただけません。
© 2021 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.
実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。
価格、製品の仕様・外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。
標準販売条件はこちらをご覧ください。thermofisher.com/jp-tc **DNE061-B21060B**

サーモフィッシャーサイエンティフィック ライフテクノロジーズジャパン株式会社

テクニカルサポート ☎ 0120-477-392 ✉ jptech@thermofisher.com
オーダーサポート TEL : 03-6832-6980 FAX : 03-6832-9584
営業部 TEL : 03-6832-9300 FAX : 03-6832-9580

 facebook.com/ThermoFisherJapan  [@ThermoFisherJP](https://twitter.com/ThermoFisherJP)

thermofisher.com

販売店

ThermoFisher
SCIENTIFIC