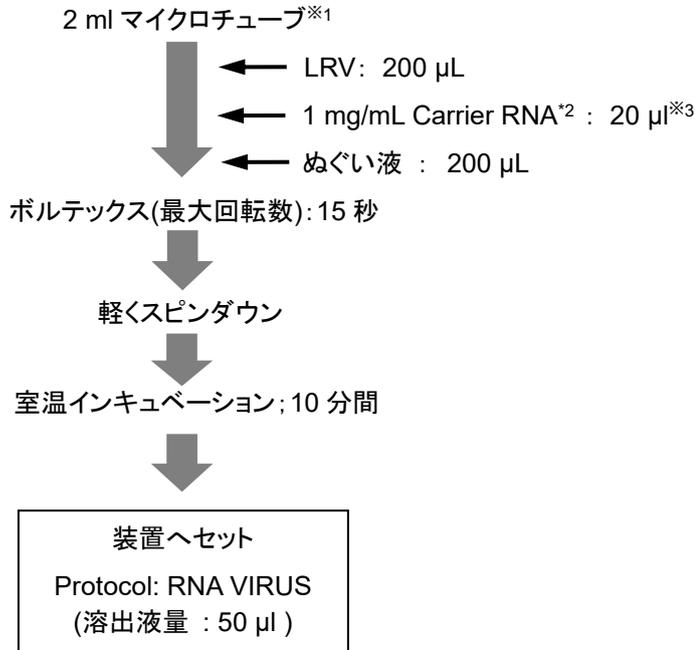


RH-a-1

【自動処理】
咽頭ぬぐい液からのコロナウイルス(SARS-CoV-2) total RNA 分離
■ プロトコル


^{*1} 推奨のマイクロチューブ
#BM4020(ビーエム機器)
#72.695.700(SARSTEDT)
#72.695.500S(SARSTEDT)

^{*2} 推奨の Carrier RNA
#4382878: Carrier RNA
(Thermo Fisher Scientific 社
Applied Biosystems™)

^{*3} Carrier RNA の投入量は、1 サンプル当たり 20 µg となるように入れてください。
例: 1 mg/mL Carrier RNA 20 µl など

*サンプルチューブのセット方法については、
Quick Start Guide または取扱説明書を参照してください。

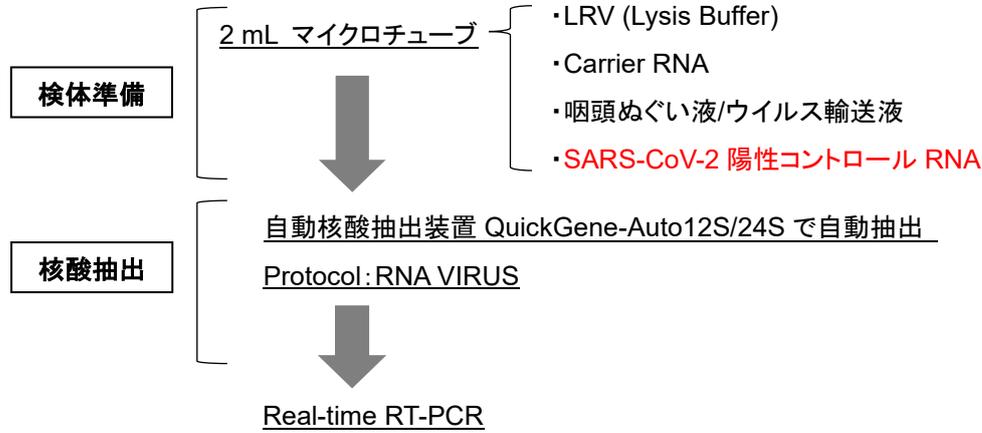
1. 185 µl の Solubilization Buffer (SRV)を添加
2. ピペッティングにより攪拌
3. 185 µl のエタノール(>99%)と混合
4. ピペッティングにより攪拌
5. ライセートをカートリッジにアプライ
6. 加圧
7. Wash Buffer(WRV)で 3 回洗浄
8. 溶出液 (CRV)を添加し、
9. インキュベーション(室温、2 分)
10. Total RNA をコレクションチューブに回収

Total RNA

サンプルの種類・保存条件などによっては分離できない場合もあります。
データに関しては保証しておりません。
分離した核酸には目的以外の核酸(例: DNA 分離には RNA)が含まれています。

材料・方法

検証フロー図



検体準備

- 使用試薬
 - ウイルス輸送液: スギヤマゲン社 ウイルス輸送液(SGVTM-3R)
 - 検体採取スワブ: Puritan Medical Products Company LLC 社 キャップシュア検体採取スワブ (25-806 1WC EC)
 - SARS-CoV-2 陽性コントロール RNA: Thermo Fisher Scientific 社 AcroMetrix™ Coronavirus 2019 RNA Control(954519)
 - Carrier RNA: Thermo Fisher Scientific 社 Applied Biosystems™ Carrier RNA(4382878)
1. ウイルス輸送液を用意。
 2. 検体採取スワブで咽頭を十分にぬぐい、ウイルス輸送液 3 mL が入った 15 ml チューブに添加 (以下、咽頭ぬぐい液)。
 3. 上記咽頭ぬぐい液に人為的に SARS-CoV-2 の陽性コントロール RNA を添加し、検体として使用。

核酸抽出

SARS-CoV-2 の陽性コントロール RNA、咽頭ぬぐい液、Carrier RNA 20 µg を含む検体 200 µL から AS-RV キット及び自動核酸抽出装置 QuickGene-Auto12S を使用して RNA を抽出した (溶出 50 µL)。

検体	陽性コントロール RNA 添加量	サンプル番号
咽頭ぬぐい液/ウイルス輸送液 + SARS-CoV-2 陽性コントロール RNA	100 copy / 検体(200 µL)	K1
	500 copy / 検体(200 µL)	K2
Negative Control 咽頭ぬぐい液/ウイルス輸送液	添加なし	NC

サンプルの種類・保存条件などによっては分離できない場合もあります。
データに関しては保証しておりません。
分離した核酸には目的以外の核酸 (例: DNA 分離には RNA) が含まれています。

Real-time RT-PCR

抽出したサンプル(10 μ L)と SARS-CoV-2 検出キットを使用し、Real-time RT-PCR を実施する。

- 使用試薬キット
タカラバイオ社 SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit (RC300A) (陽性判定: Ct 値 < 40 cycle)
- 使用装置
Thermo Fisher Scientific 社 QuantStudio® 5 リアルタイム PCR システム

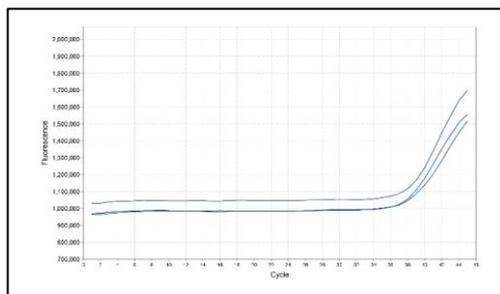
結果

Real-time RT-PCR 試験: K1, K2, NC

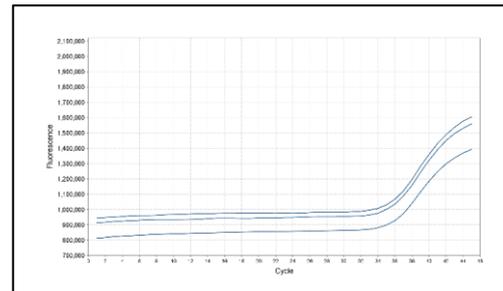
✓ Real-time RT-PCR 結果

コピー数	100 copies/検体	500 copies/検体	Negative Control	PCR Positive control (1×10 ⁵ copies/well)
サンプル番号	K1	K2	NC	PC
Ct 値	36.6	34.6	未検出	23.7

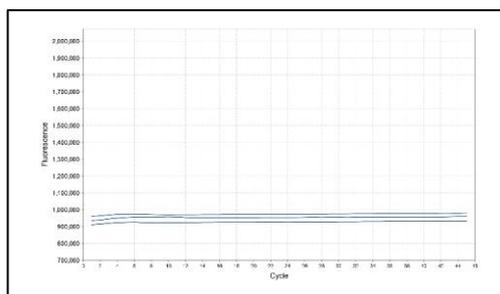
✓ Real-time RT-PCR 結果(増幅グラフ)



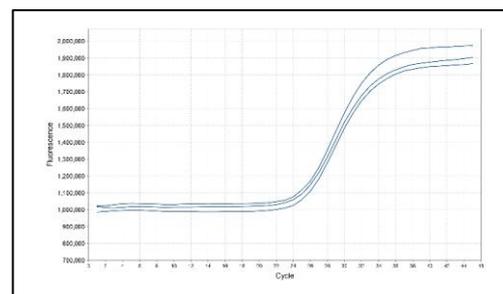
サンプル K1 (100 copies/検体)



サンプル K2 (500 copies/検体)



Negative Control



PCR Positive control

- ✓ 核酸抽出試薬キット QuickGene AutoS RNA Virus kit (AS-RV) 及び自動核酸抽出装置 QuickGene-Auto12S を使用して SARS-CoV-2 の陽性コントロール RNA (100, 500 copies) と、咽頭ぬぐい液を含む検体から RNA を抽出し、その RNA サンプルから SARS-CoV-2 遺伝子を検出できた。

サンプルの種類・保存条件などによっては分離できない場合もあります。
データに関しては保証しておりません。
分離した核酸には目的以外の核酸(例: DNA 分離には RNA)が含まれています。