

RH-X2

咽頭ぬぐい液からの新型コロナウイルス（2019-nCoV）total RNA 分離 （陽性コントロール品）

■ プロトコル 1

■ 検体採集

滅菌綿棒（フロックスワブなど）で咽頭を十分にぬぐい、
綿棒を専用 RNA ウイルス検体保存液 2mL が入った滅菌スピッツ管に入れ、
蓋をシパラフィルムでシールする。4°C 冷蔵輸送

■ 検体前処理

検体（上記ぬぐい液を含む検体保存液）200 μ l を 1.5ml チューブに添加

↓ ← LRT : 200 μ l、混合

室温インキュベーション 10 分間

↓

ボルテックス（最大回転数）：15 秒間、スピンドウン

↓ ← SRT : 175 μ l

ボルテックス（最大回転数）：15 秒間、スピンドウン

↓ ← >99% エタノール : 175 μ l

ボルテックス（最大回転数）：1 分間、スピンドウン

↓

ライセートを装置にセット
QG-Mini480 また QG-Mini80

*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. ライセートをカートリッジにアプライ
2. 加圧
3. Wash Buffer(WRT) ^{*2} で 1 回目洗浄、加圧
4. Wash Buffer(WRT) ^{*2} で 2 回目洗浄、加圧
5. Wash Buffer(WRT) ^{*2} で 3 回目洗浄、加圧
6. 溶出液 (CRT) を 100 μ l^{*3} 添加し、
7. 室温インキュベーション 2 分
8. 加圧

Total RNA

●KURABO 核酸抽出キット
QuickGene RNA tissue kit S II に
下記の試薬が含まれます：
LRT, SRT, WRT, CRT

●別途に用意していただく試薬
>99% エタノール
専用ウイルス検体保存液*1

*1 専用ウイルス検体保存液
クラボウにお問い合わせ
ください。

*2 エタノール添加済の Wash Buffer
(WRT) をご使用してください。

*3 推奨溶出液量は 100 μ l です。
溶出液の容量は 50 μ l まで減
らすことができますが、その
場合、溶出効率が低下する可
能性があります。

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があります。
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

検体準備

1. 専用 RNA ウイルス検体保存液（以下検体保存液）を用意する。
2. 滅菌綿棒で咽頭を十分にぬぐい、専用 RNA ウイルス検体保存液 2mL が入った滅菌スピッツ管に入れる。
3. 上記ぬぐい液を含む検体保存液に人為的に 2019-nCoV の陽性コントロール RNA を添加し、検体として使用する。

核酸抽出

2019-nCoV の陽性コントロール RNA、咽頭ぬぐい液を含む検体保存液（以下検体）から 2 種の核酸抽出試薬を使用し RNA を抽出する。

- Group K：倉敷紡績株式会社 QuickGene RNA tissue kit S II キット、QuickGene Mini80 使用（以下クラボウ社核酸抽出試薬）
- Group D：D 社核酸抽出キット使用（中国体外診断試薬グレード）（以下 D 社核酸抽出試薬）

検体	Group K クラボウ社 核酸抽出試薬で抽出した サンプル番号	Group D D 社 核酸抽出試薬で抽出した サンプル番号
陰性コントロール 2019-nCoV RNA 陽性コントロール が含まれていない	KN	DN
検体 1 2019-nCoV RNA 陽性コントロール 約 215,000copies 相当/検体	K1	D1
検体 2 2019-nCoV RNA 陽性コントロール 約 24,500copies 相当/検体	K2	D2

Real-time RT-PCR

上記クラボウ社と D 社核酸抽出試薬で抽出したサンプルと 2019-nCoV 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：D 社 2019 新型コロナウイルス（2019-nCoV）（ORFlab/N）遺伝子検査試薬キット核酸（中国体外診断試薬グレード）
- 使用装置
試験：ThermoFisher 社 Applied Biosystems 7500（サンプル K1, K2, D1, D2, KN, DN）

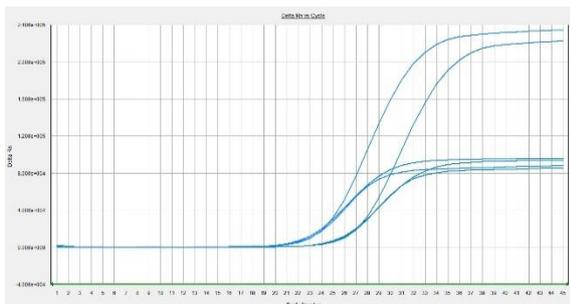
結果

Real-time RT-PCR 試験 : K1, K2, D1, D2, KN, DN

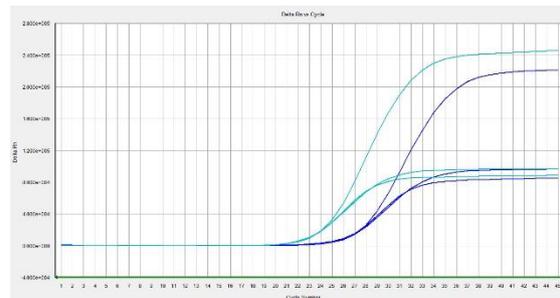
✓ Real-time RT-PCR 結果 (CT 値)

核酸抽出試薬	ターゲット遺伝子/ コピー数	約 215,000 copies	約 24,500 copies	陰性対照
		K1, D1	K2, D2	KN, DN
クラボウ社	ORF1ab	24.1	27.6	検出せず
	N	24.7	27.9	検出せず
D 社	ORF1ab	24.2	27.2	検出せず
	N	24.7	27.8	検出せず

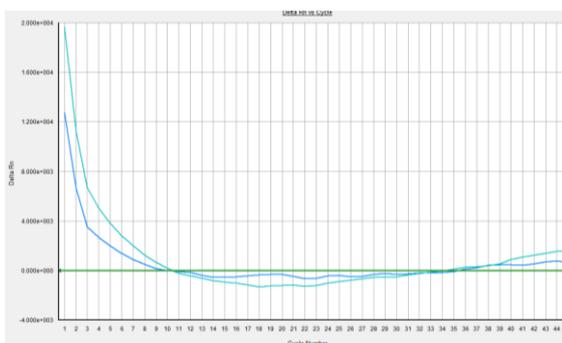
✓ Real-time RT-PCR 結果 (増幅グラフ)



(クラボウ社) サンプル K1, K2



(D 社) サンプル D1, D2



陰性対照サンプル KN, DN

- ✓ 倉敷紡績株式会社 (クラボウ社) 核酸抽出試薬キット QuickGene RNA tissue kit S II を使用して 2019-nCoV の陽性コントロール RNA と咽頭ぬぐい液を含む検体保存液から RNA を抽出し、その RNA サンプルから 2019 新型コロナウイルスの ORF1ab と N 遺伝子を検出できた。CT 値は D 社体外診断試薬グレードの核酸抽出試薬と明確な差異が認められなかった。