

新型コロナウイルス SARS-CoV-2 検査マニュアル version 3.5
東京慈恵会医科大学 熱帯医学講座

(本プロトコールは、以下を参照・改変したものである)

“**Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time RT- PCR**” (Protocol and preliminary evaluation as of Jan 13, 2020) (by Victor Corman, Tobias Bleicker, Sebastian Brünink, Christian Drosten Charité Virology, Berlin, Germany; Olfert Landt, Tib-Molbiol, Berlin, Germany; Marion Koopmans, Erasmus MC, Rotterdam, The Netherlands; Maria Zambon, Public Health England, London; Malik Peiris, University of Hong Kong)

1. RNA 抽出

(注意事項)

- * 咽頭拭い液が付着したチップ等は全てオートクレーブ処理後に、医療廃棄物として廃棄する
- * RNA 抽出エリアと RT-qPCR 試薬調製エリアを分ける
- * サンプルから発生したエアロゾルによるコンタミを防止するため、フィルターチップを用いる
- * 手袋への RNA の付着に十分注意し、適宜交換する
- * チューブ立てや遠心機では、チューブ間の間隔を空ける
- * チューブのフタを開ける際には、内側に触れないように、また飛沫が発生しないように注意する
- * チップへのサンプル付着によるコンタミを防ぐため、試薬を加える際には、検体毎にチップを交換する
- * 慌てず、ゆっくりした動作で作業を行う

1.1 試薬

・High pure viral RNA purification kit (Roche, #11 858 882 001)

(Working Solution の準備)

| | |
|-------------------------------------|--|
| 1) Inhibitor Removal Buffer (黒キャップ) | 20 ml の 99.5% エタノール(RNA 用)を Inhibitor Removal Buffer のボトルに加え、室温で保存 |
| 2) Wash Buffer (青キャップ) | 40 ml の 99.5% エタノール(RNA 用)を Wash Buffer のボトルに加え、室温で保存 |
| 3) Poly (A) Carrier RNA ストック | 400 μ L の Elution Buffer 中に Poly (A) Carrier RNA を溶解する。次いで、50 μ L ずつ分注し、-20°C で保存する(12 か月安定) |
| 4) PBS 溶液 | — |

1.2 プラスチック器具類等

- ・各サイズのフィルターチップ(RNA 用)
- ・1.5 mL チューブ(RNA 用)
- ・グローブ、オートクレーブパック、オートクレーブ可能な容器(廃棄物・廃液用)

1.3 手順

・サンプルリストの準備(※サンプル番号は都度振り直し、少ない桁数で表記)

| サンプル番号 | 患者氏名・ID 等 |
|----------------|---------------|
| 1 | ジケイタロウ XXXXXX |
| 2 | ジケイハナコ YYYYYY |
| ... | ... |
| N ₁ | 陰性対照(スワブ無し) |

・使用する試薬を予め取り分ける

| 試薬名 | μ L | サンプル数 x1.05 |
|--------------------------|---------|-------------|
| Inhibitor Removal Buffer | 500 | |
| Wash Buffer | 900 | |
| Elution Buffer | 50 | |

・Binding Buffer を調整する

| 試薬名 | μL | サンプル数 x1.05 |
|----------------------|---------------|-------------|
| Poly (A) Carrier RNA | 4 | |
| PBS | 200 | |
| Binding Buffer | 400 | |

(安全キャビネット内での作業)

- ↓ 1.5 mL チューブにサンプル番号を記入して、並べる
- ↓ 600 μL の Binding Buffer を加える
- ↓ 安全キャビネット内でスワブを袋から取り出す
- ↓ スワブの表記を確認し、チューブにイニシャルを記入する
- ↓ スワブを Binding Buffer 中で 20 秒間攪拌する(上下に 50 ストローク)

(※注意)スワブはチューブの底に強く触れないこと。柄がたわむとチューブの口が汚染される可能性がある。

(※注意)一般的なプロトコルでは、スワブを一度 PBS などのバッファーに浸して、その溶液から RNA を抽出することが多い。比較検討した結果、本法ではスワブを直接 Binding Buffer に入れる方法を採用している。

- ↓ 10 分間室温でインキュベートする

【安全キャビネット内でスワブとそのケース、グローブをオートクレーブバックに入れ結束バンドで封をし、オートクレーブで滅菌後、医療用廃棄物として廃棄する】

(実験台での作業)※標準的な RNA の取扱いに準ずること

- ↓ キットから High Pure フィルターを取りだし、サンプル番号を書く
- ↓ High Pure フィルターを、同じキット内の廃液用チューブにセットする
- ↓ サンプルの入ったチューブを 8000 x g で 30 秒間遠心する
- ↓ 全量を、High Pure フィルターにアプライする
- ↓ High Pure フィルターとチューブごと、8000 x g で 15 秒間遠心する
- ↓ High Pure フィルターを、新しい廃液用チューブにセットする
- ↓ 500 μL の Inhibitor Removal Buffer (黒キャップ) を、High Pure フィルターにアプライする
- ↓ High Pure フィルターとチューブごと、8000 x g で 1 分間遠心する
- ↓ High Pure フィルターを、新しい廃液用チューブにセットする
- ↓ (洗い 1 回目) 450 μL の Wash Buffer (青キャップ) を、High Pure フィルターにアプライする
- ↓ High Pure フィルターとチューブごと、8000 x g で 1 分間遠心する
- ↓ High Pure フィルターを、新しい廃液用チューブにセットする
- ↓ (洗い 2 回目) 450 μL の Wash Buffer (青キャップ) を、High Pure フィルターにアプライする
- ↓ High Pure フィルターとチューブごと、8000 x g で 1 分間遠心する
- ↓ High Pure フィルターを、新しい 1.5 mL チューブ(キット内包ではない)にセットする
- ↓ (液落とし) High Pure フィルターとチューブごと、15000 x g で 10 秒間遠心する
- ↓ High Pure フィルターを、新しい 1.5 mL チューブ(キット内包ではない)にセットする
- 【あらかじめ、このチューブにサンプル番号とイニシャルを記入・用意しておく】
- ↓ 50 μL の Elution Buffer を、High Pure フィルターにアプライする
- ↓ High Pure フィルターとチューブごと、8000 x g で 1 分間遠心する
- ↓ High Pure フィルターを捨て、RNA 溶液を含んだ 1.5 mL チューブを回収する
- ↓ 以降の検査等に用いるまで時間がある場合には、 -80°C にて冷凍保存する
- ↓ 廃液・廃棄物等は、全てオートクレーブで滅菌後、医療用廃棄物として廃棄する

2. RT-qPCR

2.1 試薬・機器

- ・M-MLV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher, #28025013)
- ・TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, #4444557)
- ・Thermal Cycler (Bio-Rad)
- ・StepOnePlus (Applied Biosystems)
- ・MicroAmp Fas 96-well Reaction Plate (Applied Biosystems, #4346907)、または MicroAmp Optical 8-strip (Applied Biosystems, #4323032/4358293)
- ・ポジティブコントロール RNA (SARS-CoV-2 RNA, JPN/AI/I-004, $10E^3$ copies/ μ L)
- ・プライマー/プローブ (E gene の検出をおこない、必要に応じて N または RdRP gene の遺伝子を検出する)

追記 N 遺伝子のプローブは E 遺伝子に比べて 2-3 桁感度が低く、使用にあたっては注意が必要である

| 遺伝子 | ID | 配列 | ストック濃度 |
|------|---------------|-------------------------------------|------------|
| RdRP | RdRP_SARSr-F2 | GTGARATGGTCATGTGTGGCGG | 15 μ M |
| | RdRP_SARSr-R1 | CARATGTTAAASACACTATTAGCATA | 20 μ M |
| | RdRP_SARSr-P2 | FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-IBFQ | 10 μ M |
| | RdRP_SARSr-P1 | FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-IBFQ | 10 μ M |
| E | E_Sarbeco_F1 | ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT | 10 μ M |
| | E_Sarbeco_R2 | ATATTGCAGCAGTACGCACACA | 10 μ M |
| | E_Sarbeco_P1 | FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-IBFQ | 10 μ M |
| N | N_Sarbeco_F1 | CACATTGGCACCCGCAATC | 15 μ M |
| | N_Sarbeco_R1 | GAGGAACGAGAAGAGGCTTG | 20 μ M |
| | N_Sarbeco_P1 | FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-IBFQ | 10 μ M |

2.2 手順 (RT 反応)

- ・氷上で本数分のプレミックス A を作成する

N = 検体数 (N_1 (スワブ無し陰性対照も含む)) + 2 個 (陰性対照/陽性対照)

| 試薬名 | μ L | 本数 x1.05 |
|---|---------|----------|
| RdRP_SARSr-R1 (20 μ M) | 0.5 | |
| E_Sarbeco_R2 (10 μ M) | 0.3 | |
| N_Sarbeco_R1 (100 μ M) | 0.2 | |
| 10 mM dNTP Mix (2.5 mM each dATP, dGTP, dCTP, dTTP at neutral pH) | 0.5 | |

↓ 上記のプレミックス A を PCR 用チューブに 1.5 μ L ずつ分注

↓ 各チューブに 5 μ L のサンプルを加える

順番は以下を推奨する

- * 最初に陰性対照の RNase Free Water
- * 次にサンプル RNA
- * 最後に陽性対照

↓ 蓋をして、スピンドウン

↓ ボルテックスして、スピンドウンする

↓ Thermal Cycler を用いて、65°C で 5 分間インキュベート

↓ 速やかに氷上に戻す

- ・本数分のプレミックス B を作成する

| 試薬名 | μ L | 本数 x1.05 |
|------------------------|---------|----------|
| 5x first strand buffer | 2.0 | |
| 100 mM DTT | 1.0 | |
| M-MLV RTase | 0.5 | |

↓ 上記のプレミックス B を、プレミックス A とサンプルが入った PCR 用チューブに 3.5 μ L ずつ分注

↓ 蓋をして、スピンドウン

- ↓ピペティングで優しく攪拌して、スピンドウンする
- ↓ Thermal Cycler を用いて、37°C で 50 分間、続けて 70°C で 15 分間インキュベート
- ↓ 速やかに氷上に戻す

2.3 手順 (qPCR 反応)

- ・StepOnePlus で反応プログラムを設定する

| 温度 | 時間 | サイクル数 |
|------|------|-------|
| 50°C | 2 分 | 1 回 |
| 95°C | 20 秒 | 1 回 |
| 95°C | 1 秒 | 45 回 |
| 60°C | 20 秒 | |

- ・本数分の プレミックス C を作成する (E gene のプローブセットの場合)

| 試薬名 | μL | 本数 x1.05 |
|--------------------------------------|-----|----------|
| Nuclease free water | 3.9 | |
| E_Sarbeco_F1 | 1.8 | |
| E_Sarbeco_R2 | 1.8 | |
| E_Sarbeco_P1 | 0.5 | |
| TaqMan Fast Advanced Master Mix (2x) | 10 | |

- ↓ 上記のプレミックス C を、新しい PCR 用チューブまたはプレートに 18 μL ずつ分注
- ↓ 各チューブまたはウェルに、RT 反応済のサンプル溶液 2 μL を加える
- ↓ ピペティングで優しく攪拌する
- ↓ 蓋またはシールをして、スピンドウンする
- ↓ StepOnePlus にセットし、反応を開始する

以上