

Technical Data

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の抽出評価試験

評価製品

High Pure Viral Nucleic Acid Kit (ロシュ・ダイアグノスティックス, Cat.No.11858874001)
Ribospin™ vRD II (GeneAll, Cat.No. GA322-150, GA322-108)

目的

High Pure Viral Nucleic Acid Kit と Ribospin™ vRD IIを用いて、
Preservative Fluids*からの新型コロナウイルスの抽出とqPCRによる検出を行った。

下記のデータは、ジェネシスヘルスケア株式会社 様のご厚意により掲載させて頂きました。

実験方法

ロシュ・ダイアグノスティックス High Pure Viral Nucleic Acid Kit



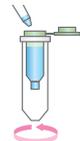
2.5 mLのBinding BufferにPolyAを50 µL添加し、よく混合して、Working Solutionを作成する



スワブ検体 200 µLにWorking Solution 200 µL
Proteinase K solutionを50 µL加えて速やかに混合し
72°Cで10分インキュベート



100 µLのBinding Bufferを加えて混ぜる



High Pure Filter Tubeをコレクションチューブに挿入し、
サンプルをHigh Pure Filter Tubeに移して8000×gで1 min遠心
High Pure Filter Tubeをコレクションチューブから取り出して、
コレクションチューブと排出液を廃棄



High Pure Filter Tubeを新しいコレクションチューブに挿入し、
500 µLのInhibitor Removal Bufferを加えて8000×gで1 min遠心
High Pure Filter Tubeをコレクションチューブから取り出して、
コレクションチューブと排出液を廃棄



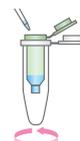
High Pure Filter Tubeを新しいコレクションチューブに挿入し、
450 µLのWash Bufferを加えて8000×gで1 min遠心
High Pure Filter Tubeをコレクションチューブから取り出して、
コレクションチューブと排出液を廃棄



High Pure Filter Tubeを新しいコレクションチューブに挿入し、
450 µLのWash Bufferを加えて8000×gで1 min遠心
High Pure Filter Tubeをコレクションチューブから取り出して、
排出液を廃棄



High Pure Filter Tubeを元のコレクションチューブに挿入し、
最大スピード (約13000×g) で10 sec遠心
High Pure Filter Tubeをコレクションチューブから取り出して、
コレクションチューブと排出液を廃棄



High Pure Filter Tubeを新しい1.5 mLチューブに挿入して、
50 µLのElution Bufferを加えて8000×gで1 min遠心

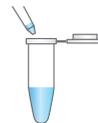
GeneAll Ribospin™ vRD II



600 µLのBuffer NVLに
キャリアRNAを14 µL添加しよく混合する



スワブ検体 200 µLを加えて
10 secボルテックスし
室温で10分インキュベート



350 µLのBuffer RB1を加えて
10 secボルテックス



カラムをコレクションチューブに挿入し、
サンプルをカラムに移して室温で10000×gで
30 sec遠心
カラムをコレクションチューブから取り出して、
排出液を廃棄



カラムを元のコレクションチューブに挿入し、
500 µLのBuffer RBWを加えて
室温で10000×gで30 sec遠心
カラムをコレクションチューブから取り出して、
排出液を廃棄



カラムを元のコレクションチューブに挿入する
500 µLのBuffer RNWを加えて
室温で10000×g, 30 sec遠心
カラムをコレクションチューブから取り出して、
排出液を廃棄



カラムを元のチューブに挿入し、室温で
最大スピード (約13000×g) で1 min遠心
カラムをコレクションチューブから取り出して、
コレクションチューブと排出液を廃棄



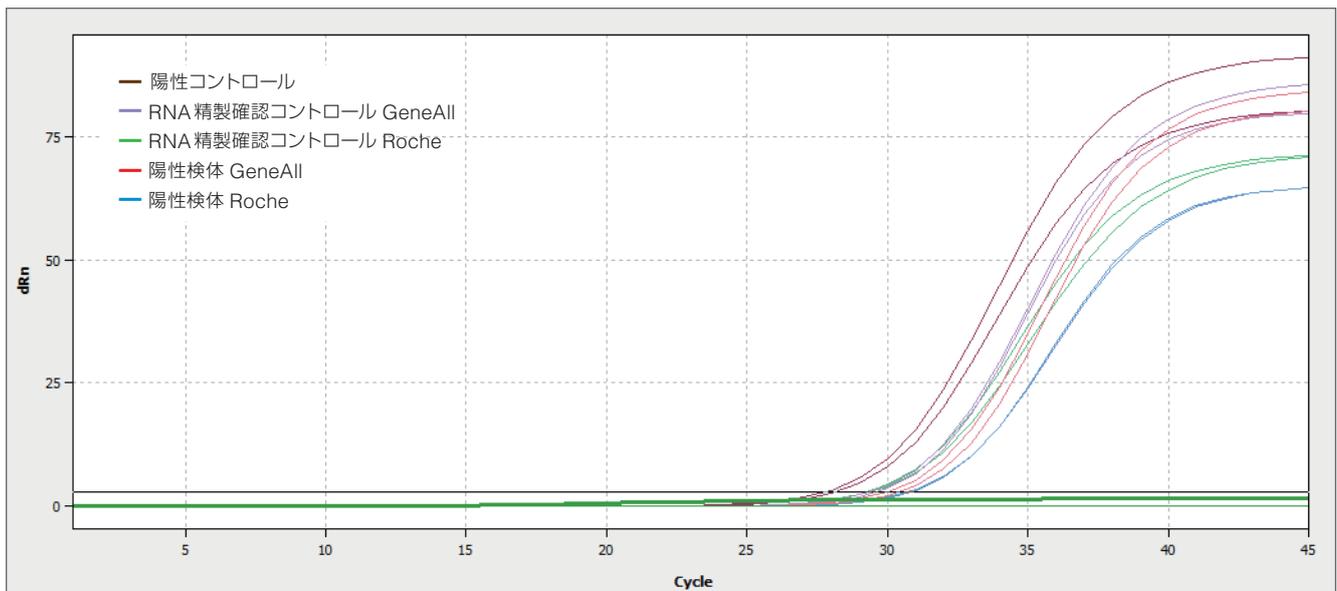
カラムを新しい1.5 mLチューブに挿入し、
50 µLのNuclease-free waterを加えて
1 min放置し、室温で10000×gで1 min遠心

評価方法

- 陽性コントロール：最終濃度 10^4 COPYになるよう希釈を行い、qPCR反応液に加えた
- RNA精製確認コントロール：200 μ LのPreservative Fluids*へ 5×10^4 COPY/ μ Lの陽性コントロール（国立感染症研究所より提供）を5 μ L添加したものを各種キットで抽出した
- 陽性検体：陽性判定されたPreservative Fluids*で4°C保存されたもの（陽性保管検体）を使用した
陽性保管検体から200 μ Lを採り、検体を含まないPreservative Fluids*溶液を400 μ L加えた希釈液から200 μ Lを使用した
- qPCR装置：qTOWER384 (analytikjena Cat.No. 844-00553-2)
- 使用プレート：LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 white (Roche Cat.No. 04729749001)
- qPCR反応試薬：One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix (Takara Cat.No. RR600A)
- qPCR反応組成：

2×Master mix	6.25 μ L
Forward primer (10 μ M)	0.5 μ L
Reverse primer (10 μ M)	0.7 μ L
TaqMan probe (5 μ M)	0.2 μ L
DW	2.85 μ L
Template RNA	2.0 μ L
Total	12.5 μ L

結果



N2セットにおける増幅曲線

抽出キット	High Pure Viral Nucleic Acid Kit		Ribospin™ vRD II	
ターゲット	N2		N2	
陽性検体 (Cq)	29.26	29.36	29.33	29.61
陽性コントロール (Cq)	30.79	30.73	30.01	30.40

まとめ

N2セットにて評価したところ、High Pure Viral Nucleic Acid Kit（ロシュ・ダイアグノスティクス社）と Ribospin™ vRD II（GeneAll社）は同等の検出結果が得られた。

* グアジニンベースのウィルスの不活化及びRNA等の核酸安定保存が可能な輸送・保存用試薬