

新型コロナウイルス検出プロトコール ver. 2.1

本プロトコールは国立感染症研究所の病原体検出マニュアルを元に作成したものである。

操作上の注意

- 検体（唾液、鼻咽頭ぬぐい液等）が付着した実験器具（または疑いがあるもの）はすべてオートクレーブ処理後に廃棄する。
- 検体は、感染防護具（ディスポーザブルガウン、グローブ、マスク）を装着の上、バイオセーフティールーム ウイルス室の安全キャビネット内で取り扱う。
- 使用した感染防護具は必ずオートクレーブ処理後に廃棄する（ゴーグルはアルコールによる消毒を行う）。着脱時は、外側を内側に丸め込む様に脱ぎ、外側には触れない様にする。
- 安全キャビネットの使用後は、アルコールを噴霧した後、10分間以上UV照射を行う。
- 抽出したRNAをバイオセーフティ区域外に持ち出す際には、専用箱にいれ必ずアルコールによる消毒を行う。
- RNAを取り扱う際には、コンタミネーションを防ぐためにグローブは頻繁に交換する。
- 試薬調製エリアとPCR産物を扱う場所（PCR機器のある場所）を物理的に分ける。
- チューブ立てや遠心機では、チューブ間の間隔を空ける。
- チューブのフタをあける際は、飛沫が飛ばないように注意する。
チューブオープナーを利用する。

I. RNA抽出 (QIAamp Viral RNA Mini kit) バイオセーフティールーム内!!

I-i. 試薬調製

1. サンプルを室温（15～25℃）に戻す。
2. Carrier RNA 溶液 1 μg/μL の調製
Carrier RNA（凍結乾燥品）310 μg の入ったチューブに Buffer AVE を 310 μL 添加し、1 μg/μL の溶液を調製する。Carrier RNA 溶液は、-20℃ 保存で、3回まで凍結融解可能であるため、適宜分注して保存する。
50 μL ずつ分注し、-20℃ 保存（バイオセーフティ室冷凍庫）。
3. Buffer AVL/Carrier RNA 混和物の調製（陰性コントロール用に1本多く準備する）。
Buffer AVL の沈殿を確認し、沈殿を生じていた場合は、80℃ でインキュベートし、沈殿を溶解した後、調製に使用する。1 サンプルあたり Buffer AVL 0.56 mL、Carrier RNA 溶液 5.6 μL になるように Buffer AVL/Carrier RNA 混和物を調製する（以下の式を参照）。
必要な AVL (mL) サンプル数 × 0.56 mL
Carrier RNA (μL) 必要な AVL (mL) × 10 μL/mL
調製した混合物は、2～8℃ で 48 時間安定である。この温度で保存すると沈殿が生じるため、使用直前に 80℃ で加温し溶解する（加熱は5分以内、回数は6回まで）。

4. Buffer AW1、Buffer AW2 の調製

96~100%エタノールを Buffer AW1 に 130 mL、 Buffer AW2 に 160 mL 加える(済み)。

I-ii. RNA 抽出 **ステップ3まではグローブを2重にして行う。**

1. 1.5 mL チューブに Buffer AVL/Carrier RNA 560 μ l を入れる。
以降用いるものも含め 1.5 mL チューブはキットには付属していないので別に用意した RNase free チューブを用いる。
2. 検体 140 μ L をチューブに加え、Buffer を充分混合するため 15 秒間 vortex にかける。
陰性コントロールは、Nuclease free water を 140 μ L 添加する。
粘性が高い場合、P-1000 を用いる方が良い。
3. 室温 (15~25°C)で 10 分間インキュベートする。
この段階で多くのウイルス粒子は不活化されるが、廃液やカラムは感染性廃棄物として取り扱う。
4. 卓上遠心機でスピンドウンした後、96~100%エタノール 560 μ L をチューブに添加し、15 秒間 vortex をかけた後、卓上遠心機でスピンドウンする。
5. QIAamp スピнкаラムを 2 mL コレクションチューブにセットし、4.の液を縁をぬらさないように 630 μ L 加える。
6. 蓋を閉め、6,000 \times g、1 分間遠心する。以降の遠心操作も含めすべて室温で行う。
7. QIAamp スピнкаラムを新しい 2 mL コレクションチューブに移し、注意深くカラムを開き残りの 4.の液を 630 μ L 入れ、同様に遠心し、全ての液が無くなるまで繰り返す。
溶液がスピнкаラム上にとどまっているときは回転数を上げ、すべての溶液を完全に通過させる (6,000 \times g、3 分間や 8,000 \times g、1 分間)。
粘性が高いサンプルの場合、沈殿物が残ることがある。吸わない様に注意する。
フタを空けるときは、チューブオープナーを用いる。
8. QIAamp スピнкаラムを新しい 2 mL コレクションチューブに移す。QIAamp スピнкаラムを開け、Buffer AW1 を 500 μ L 添加する。蓋を閉め、6,000 \times g、1 分間遠心し、QIAamp スピнкаラムを新しい 2 mL コレクションチューブに移す。
9. QIAamp スピнкаラムを開け、Buffer AW2 を 500 μ l 入れる。蓋を閉め、20,000 \times g、3 分間遠心する。スピнкаラムとろ液等が接触することが無いよう静かに取り出す。
接触した時には 10.を行う。
Buffer AW2 が残ると PCR に悪影響を及ぼすことがある。
10. QIAamp スピнкаラムを新しい 2 mL のコレクションチューブに移し、Max speed (20,000 \times g)で 1 分間遠心する。
11. QIAamp スピнкаラムを新しい 1.5 mL チューブに移し、QIAamp スピнкаラムの蓋を開け、室温に戻した Buffer AVE を 60 μ L 添加する。蓋を閉めて 1 分静置後、6,000 \times g、1 分間遠心し、ろ液を回収する。抽出 RNA は氷上で結果が出るまで保存する。

RNA 抽出試薬、ピペット等実験器具は安全キャビネットから出す前に消毒用エタノールで清拭し消毒する。

II. TaqMan プローブを用いた one-step RT-PCR 法による 2019-nCoV の検出 **各実験室**

以降の操作は、マスク、グローブを装着し、すべて氷上で行う。また、コンタミネーションを避けるために、フィルターチップを使用し、PCR 産物との共存を避ける。

さらに、2人以上で確認することで試薬の添加ミスを防ぐ。

II-i. RT-PCR

1. 陽性コントロール (AcroMetrix Coronavirus 2019 RNA control cat# 954519) の準備
Low positive control (500 copies/ μL) を氷上で解凍する (凍結融解は3回まで、2~8°C 保存の場合は7日間安定)。

陽性コントロールは 5 μL ずつ分注して-20°C 保存。

2. 反応液の調製 TaqMan Fast Virus 1-step master mix (cat# 4444432)
必要量の 10%程度多めに調製する。

	Set #-1	Set #-2
4 × Master mix	5	5
20 × Primer probe mix	1	1
Nuclease free water	9	9
Total	15 μL	15 μL

Set #-1, N_Sarbeco; Set#-2, NIID_2019-nCOV_N

Primer probe mix は 200 μL ずつ分注して-20°C 保存。

3. プレートに 15 μL ずつ反応液を加える。
4. 検体 RNA を 5 μL ずつ添加する。
5. 陽性コントロールを 1 μL ずつ加え、さらに Nuclease free water を 4 μL 添加する。

飛沫が起こらないように注意深くピペッティングを行う。

飛沫が起こらないように注意深くピペッティングを行う。

陽性コントロールによるコンタミネーションを防ぐため、検体 RNA が入った場所は、シールあるいはカバーすることが望ましい。

最終的な反応液は以下の様になる。

	Set #-1	Set #-1	Set #-2	Set #-2
4 × Master mix	5	5	5	5
20 × Primer probe mix	1	1	1	1
Nuclease free water	9	13	9	13
検体 RNA	5	-	5	-
コントロール RNA	-	1	-	1
Total	20 μL	20 μL	20 μL	20 μL

6. 以下の反応条件で反応を行う。Reporter FAM

逆転写反応	50°C	5 分間	
PCR 反応	95°C	20 秒間	
	95°C	3 秒間	} 40 cycles
	60°C	30 秒間	

II-ii. 結果判定

試験成立の条件

陽性コントロールの増幅曲線の立ち上がりが 40 サイクル以内にみられ、かつ陰性コントロールの増幅曲線の立ち上がりが見られない。

判定基準

陽性→ Set#1 および#2 で反応時間内に増幅が確認

Set#2 で増幅が確認

陰性→ いずれも増幅曲線が認められない

再検→ Set#1 のみで陽性

II-iii. 廃棄方法

RNA 抽出時に用いたチップ類、廃液、ガウン、手袋

安全キャビネット内で小型オートクレーブバックに入れ口を閉じた後、安全キャビネット外に持ち出し、大型オートクレーブバックに入れた後、当日中にオートクレーブ処理を行い廃棄する。

検体 (唾液)

結果判定後にオートクレーブバックに廃棄する。当日中にオートクレーブ処理を行い廃棄する。

抽出 RNA

結果判定後にオートクレーブバックに廃棄する。

PCR プレートおよび PCR に用いたチップ類

通常の PCR 産物と同様実験系不燃物として廃棄する。