

# Japan NIID Protocol - Translation

し、16,000 ×g で1分遠心する。

- 3) Collection tube 中の廃液を捨て、SV minicolumn を戻し、エタノール添加済みの Membrane Wash Solution を 700µl アプラインし、16,000 ×g で1分遠心する。
- 4) Collection tube 中の廃液を捨て、SV minicolumn を戻し、エタノール添加済みの Membrane Wash Solution を 500 µl アプラインし、16,000 ×g で5分遠心する。
- 5) Collection tube 中の廃液を捨て、SV minicolumn を戻し、16,000 ×g で1分遠心する。
- 6) SV minicolumn を 1.5ml チューブに挿入し、30µl の TE バッファー(あるいは DDW) をアプラインし、室温で1分間培養し、16,000 ×g で1分遠心する。抽出液をシークエンス解析に用いる。

### 3.6. (シークエンス解析を行う場合)シークエンス解析

ORF1a セットでは①NIID\_WH-1\_Seq\_F519 および②NIID\_WH-1\_Seq\_R840

S セットでは③NIID\_WH-1\_Seq\_F24383 および④NIID\_WH-1\_Seq\_R24865

を用いてサイクルシークエンス反応を行い、定通りにシークエンス解析を行う。

配列が得られたら Blast 解析等を行い、MN908947 の配列と比較し、ほぼ一致(おおむね 95%以上)するようであれば陽性とする。一致しない場合、ヒト染色体配列など明らかに 2019-nCoV と異なる配列であった場合は陰性とする。シークエンス解析で波形が重なるなどして明瞭な配列が得られなかった場合、シークエンスのメンテナンス状況を考慮したうえで、シークエンス解析をサイクルシークエンスから改めて行う。2 回目の解析でも明瞭な配列が得られない場合は、なんらかの非特異増幅である可能性が高いと考えられるため、陰性とする。

・ORF1a セット、S セットのどちらか一方で 2019-nCoV 配列が確認できれば陽性と判断する。

### 4. TaqMan プローブを用いたリアルタイム one-step RT-PCR 法による 2019-nCoV の検出

#### 4.1. 機材および試薬

マイクロピペット (10, 20, 200, 1000 µl)、DDW、滅菌微量遠心チューブ (1.5ml)、96well リアルタイム PCR 反応プレート等、8 連ストリップキャップまたはプレートシール、リア

ルタイム PCR 装置、プライマー、TaqMan プローブ、QuantiTect® Probe RT-PCR Kit (QIAGEN Cat#204443 等) [AgPath-ID One-step RT-PCR Reagents (Thermo Fisher Scientific Cat# AM1005 等)、TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Fisher Scientific Cat# 4,444,432 等)、One Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time)(タカラバイオ Cat#RR064A 等)、One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (タカラバイオ Cat#RR600A 等)、One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix with UNG (タカラバイオ Cat#RR601A 等)、THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (東洋紡 Cat#QPS-101 等)]のライトサイクラー、ABI、タカラバイオ機器等での動作確認済

9

病原体検出マニュアル  
2019-nCoV Ver. 2. 7  
令和2年3月4日

*"This protocol was confirmed by using:*

*QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN)*

*AgPath-ID One-step RT-PCR Reagents (Thermo)*

*TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo)*

*One Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Takara)*

*One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (Takara)*

*One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix, with UNG (Takara)*

*with LightCycler, ABI instruments and Takara instruments.*

*But other reagents can be used if the sensitivity can be assured."*

Takara Bio Europe

infoEU@takarabio.com • +33 (0)1 3904 6880

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES. © 2020 Takara Bio Inc. All Rights Reserved. All trademarks are the property of Takara Bio Inc. or its affiliate(s) in the U.S. and/or other countries or their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions. Additional product, intellectual property, and restricted use information is available at takarabio.com.



Clontech Takara cellartis  
www.takarabio.com