

## 別添資料 2 (ひな形) A 検査に関わる外部精度管理調査実施要領

### 1.概要

- A 検査の迅速診断に用いる PCR 法の 感度比較、 遺伝子同定に用いる塩基配列の比較調査
- 参加施設は B 力所程度を予定
- 報告期限は到着後 3 週間以内 (C 月 D 日) をお願いします
- 本報告による分析結果は報告書に参加衛研名を匿名にして使用し返却します。

### 2.目的

#### ア.エンドポイント測定\*

A 検査の迅速診断に用いる PCR 法は XX コピーまで検出可能 (適宜、参照論文リファアする) とされている。国内では様々な酵素系を用いており、これまで反応系の違いによる横断的な調査はなされたことがないため、同一陽性コントロールを用いてエンドポイントの比較調査を行う。

\*アウトカムを想定。同じプライマーを用いた PCR 系で比較する、或はプライマーを指定せず各施設で実施する PCR で EQA を実施する場合などがある。

#### イ. 塩基配列による同定法の比較\*

感染症発生動向調査 X 類 A 検査では血清型 (ゲノタイプ) を報告。EQA にて 同定の基準になる方法、 用いる配列の比較調査を行う。

\*機器の保守状況を含めて波形の質を評価するならば、同一ロットの **sequencing standards** を同時に配布することも考慮

### 3.準備

#### 1) 外部精度管理調査用配布品の概要

- 用いる市販 RNA コントロール (適宜変更)  
例) **Amplirun Enterovirus 71 RNA control (Lot16MBC019001, 19800GC/ul)**
- RNA 保管用試薬  
**RNA stable Tube kit (BIOMATRICA 93221-001)**
- **TE buffer (pH8.0)**

以上を調製し以下配布

配布品は 3 種類

**Sample 1:**エンドポイント比較用試料 (例 **TE 30ul** でリカバーするとメーカー表示換算 **00GC/ul**) 1 本

**Sample 2:**塩基配列による同定用試料 (例 **TE 30ul** でリカバーするとメーカー表示換算 **2200GC/ul**) 1 本

**TE buffer (pH=8.0)** 分注品 1 本

配布方法は冷凍\*宅急便、ドライアイスなし)

\*短いフラグメントを用いるリアルタイム PCR なら常温でも可。ただし事前に要検討

## 2) サンプルの準備方法

チューブに添付した **TE buffer 30u\***を加え試料をリカバー

試料はチューブの底に黄色に着色し乾燥状態。

(受領後、すぐに検査を行わなければリカバーせず**-80**度保管)

\*リカバーする **TE** の量を変えて濃度調整可能。少ないとリカバー困難。**30ul** 以上を勧める。

**TE buffer 30ul** を入れ **15** 分放置 (室温)

穏やかに数回ピペティングし溶解\*(粘性あり)。

\***TEbuffer** を入れ、溶解するとピンクに着色する。

## 4.比較調査の方法

### ア. エンドポイント測定

#### 1) 方法と報告内容

- サンプルを上記に従い準備
- **10** 倍希釈列 (**10<sup>-1</sup> ~ 10<sup>-3</sup>**まで) を作成\*  
\*エンドポイントが中心になるよう事前に条件を検討しておくこと評価しやすく、批評家者の負担も軽減 (試薬)
- 以降、各検査室で実施している方法で原液及び希釈した試料を用いて **A** 検査の **PCR** を実施し、エンドポイントを確認 (原液、**-1**、**-2**、**-3**)
- エンドポイントは電気泳動によるバンドを目視で確認
- 写真を撮影し、エンドポイントとともに報告 (以下、例)

	原液	<b>-1</b>	<b>-2</b>	<b>-3</b>	陰性コントロール
サンプル	++++	+++	+/-	-	-

- 写真も添付（マーカの濃度とアプライ量も）

2) エンドポイント測定結果

(繰り返した場合は、その結果も示していただくようお願いします。)

	原液	-1	-2	-3	陰性コントロール
<b>Sample 1</b> (1回目)					
(2回目)					
(3回目)					

電気泳動写真

マーカの濃度、サンプルアプライ量

- 3) 比較に必要な情報（以下は例、貴研究所で実施している内容に適宜変更ください。マニュアルの写し添付でも結構です）

**PCR** 使用機器名：

例) **ABI GeneAmp9700**

- 2) 反応系（逆転写、**DNA polymerase** などの酵素、容量など下記の例を参考）

**cDNA** 作成

以下例

**SuperScript II (200 U/ul) (サーモフィッシャー)使用**

		反応系 5 $\mu$ l
<b>EV VP1 cDNA (RT) kit</b>		<b>1.5</b>
<b>0.1 M DTT</b>		<b>0.5</b>
<b>RNase Inhibitor (40U/ul)</b>		<b>0.25</b>
<b>SuperScript II (200 U/ul)</b>		<b>0.25</b>
		<b>Total 2.5 <math>\mu</math>l + vRNA 2.5 <math>\mu</math>l</b>
<b>22</b>	<b>10min</b>	
<b>42</b>	<b>60min</b>	
<b>95</b>	<b>5min</b>	
<b>4</b>	<b>hold</b>	

**1st PCR**

(以下例)

**Taq DNA Polymerase (5U/ul), (Roche) 使用**

		反応 25 $\mu$ l
<b>*Enterovirus VP1 PCR 1KIT</b>		<b>15</b>
<b>DW + Taq DNA Polymerase (5U/ul)</b>		<b>5</b>
		<b>Total 20 <math>\mu</math>l + cDNA 5 <math>\mu</math>l</b>
<b>95</b>	<b>30sec</b>	
<b>42</b>	<b>30sec</b>	
<b>60</b>	<b>45sec</b>	<b>35 cycle</b>
<b>4</b>		

**2nd PCR**

		反応 25 $\mu$ l
<b>*Enterovirus VP1 PCR 2 KIT</b>		<b>19.5</b>
<b>DW+FS Taq (5U/ul)*</b>		<b>5</b>
		<b>Total 24.5 <math>\mu</math>l + 1st PCR 反応物 0.5 <math>\mu</math>l</b>
<b>95</b>	<b>6min</b>	
<b>95</b>	<b>30sec</b>	
<b>60</b>	<b>20sec</b>	
<b>72</b>	<b>15sec</b>	<b>35 cycle</b>

#### 4

\* 感染研の **CODEHOP PCR** によるエンテロウイルス同定のとおり作成

**RNA** のアプライ量     **2.5  $\mu$ l**  
ゲルの濃度             **2.0% agarose gel**  
**PCR** 産物のアプライ量         **5  $\mu$ l**  
マーカーの種類と濃度     **100bp DNA Ladder Markers (Genetics) 100  $\mu$ g/ml**  
アプライ量                 **5  $\mu$ l (約 100ng/ $\mu$ l)**

#### イ. 塩基配列による同定法の比較

##### 1) 方法と報告内容

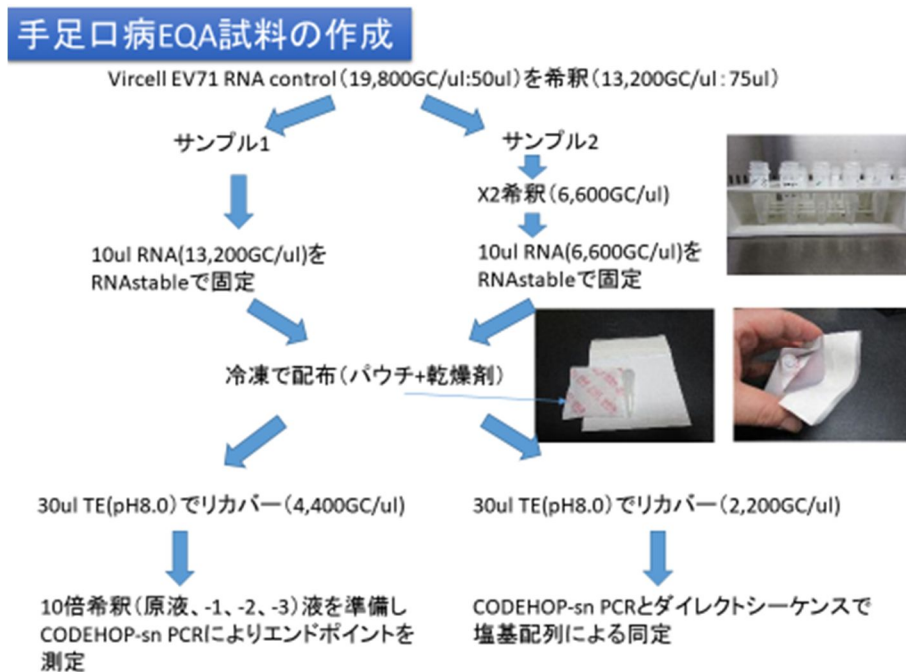
- **Sample 2** を **30ul TE** で、**Sample 1** と同様リカバー
- **PCR** 法にてゲノムを増幅。
- 各施設で実施している方法で **PCR** 産物を精製し、塩基配列解析

##### 2) 結果の報告

	同定結果	同定法 (A 検査に用いる標準法など)
<b>Sample 2</b>		

- 同定に用いた編集済み塩基配列データ (**FASTA** 形式で添付かメールにテキストでお願いします)
- **ABI** ファイル (センスとアンチセンス側をメールに添付し送付ください)

## 試料調製法の例



- **RNastable** を用いた **RNA** の乾燥固定は添付マニュアルを参照のこと。
- マニュアルにはキャビネット内で、ふたを開けて **1 晩** 放置あるいは SpeedVac による遠心濃縮を示している。
- なお密閉容器と乾燥剤を用いればチューブ当たり 10ul 程度なら冷蔵庫内で乾燥可能 (1 晩)



密閉し、乾燥剤をいれ乾燥

- 乾燥した RNA 試料は、リカバー時に TE 量を変えることで濃度の調整が可能最初から薄く調製すると RNA は不安定。したがって固定時は、濃く調整しリカバー時の TE で調整することがポイント。

- 事前に固定化した RNA の回収効率を定性的あるいは定量的に確認しておくこと。

注釈：フルゲノムの **RNA** コントロールを使用する場合は検出方法を指定せず、プラインドテストにも適応可能。この場合、想定される各 **PCR** 系について事前に再現性を確認しておくことが必要