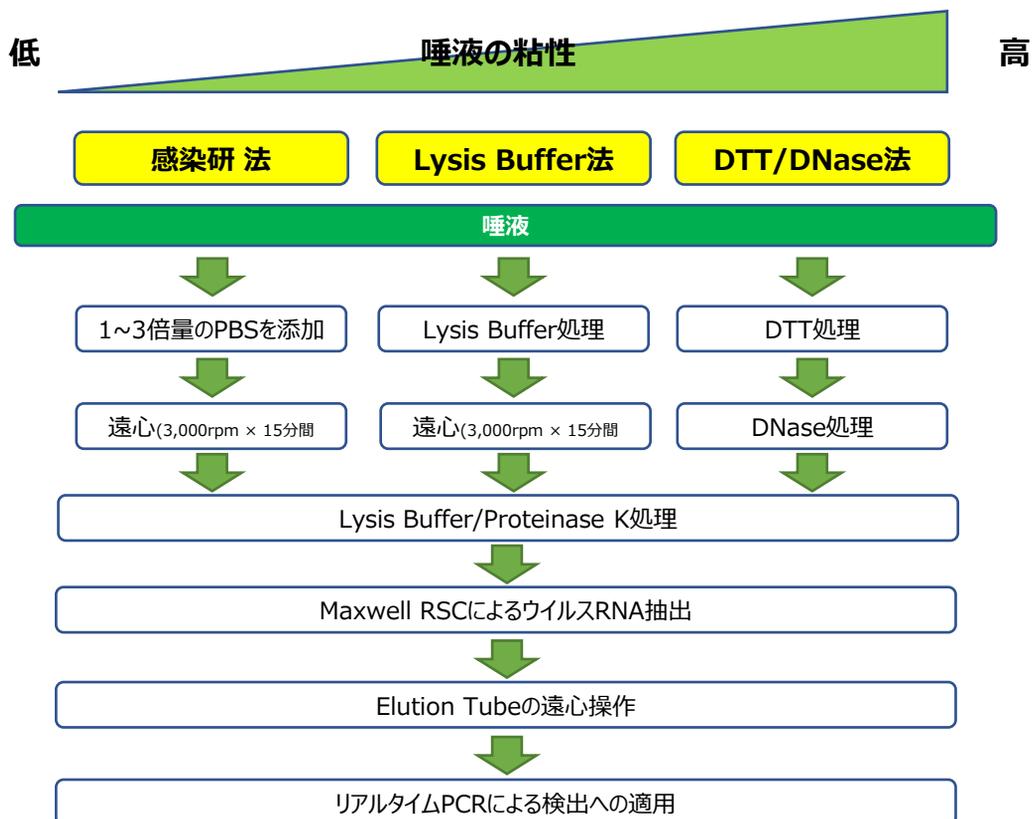


Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (カタログ番号AS1330) を用いた唾液からのRNA抽出

目次

目次 / プロトコル概要	1
はじめに / 機器の準備	2
精製の準備 / 唾液の前処理	3
検体の調製	4
カートリッジの準備	5
核酸精製	6
核酸精製終了後の作業	7
機器の片付け	8
Maxwell RSC Q&A / 日常のクリーニング方法	9

プロトコル概要



はじめに

磁性体ビーズを用いた核酸精製では、検体の粘性が収率・純度に大きな影響を及ぼします。
このため、喀痰様の唾液ではDTTやDNase処理をお勧めします。
唾液に含まれる粘性に応じて、グアンジン塩や遠心操作などを行い、粘性を十分に取り除いた検体を、
Maxwell[®] RSC Instrumentおよび試薬での核酸精製に用いてください。

機器の準備

1. Maxwell RSC Instrument本体の電源を入れる。
スイッチは本体の背面にあります。
(| がON、○がOFF)



2. Surface本体の電源を入れる。
スイッチは左肩にあります。

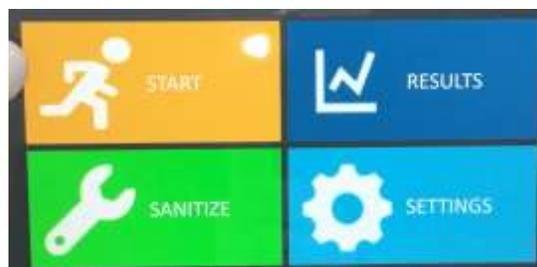


※MaxwellとSurfaceの電源を入れる順番は、どちらからでも問題ありません。

3. Maxwell RSC Instrumentのソフトウェアをダブルクリックで起動する。



4. 右図のホーム画面となる。



検体の調製

以下、共通プロトコール

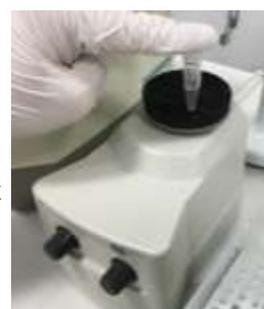
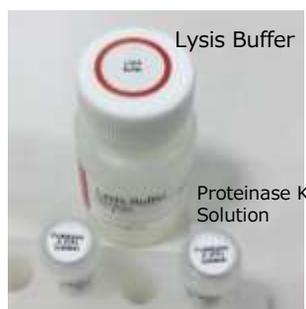
1. 上清 200 μ lを1.5ml遠心チューブへ移す。

※ 唾液の粘性が収率・純度に大きな影響を及ぼしますので、粘性を含む成分は、移さないようにご注意ください。



2. Lysis Buffer 200 μ lと Proteinase K Solution 20 μ lを加え、10秒間以上撹拌する。

注：検体の粘性により短時間のボルテックスでは十分に撹拌できていないことがあります。パルスおよび10秒以上のボルテックスにより十分に撹拌してください。



3. フタ裏に付着した溶液をスピンドウンする。

4. 56℃に設定されたヒートブロックで10分間インキュベートする。

注：抽出コントロール核酸を使用する場合、この手順4の後に加えることができます。Maxwellのキットにはコントロールは含まれていません。

5. このインキュベーションの間に、カートリッジの準備に進む。

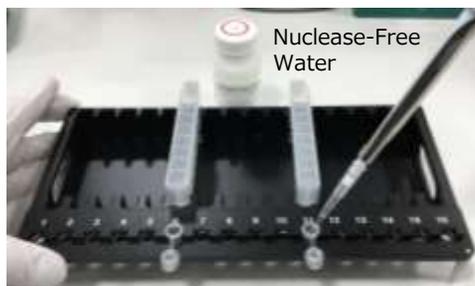


カートリッジの準備

1. 検体数分の**カートリッジ**をMaxwell RSC/CSC Deck Trayに立て、順にアルミシールを剥がす。
※ **カートリッジの両端がカチッというまで、しっかりとセットする。**



2. 同数の**Elution Tube**をセットし、**50 μlのNuclease-Free Water**を加える。
※ Elution Tubeは下までグッと強く押し込んでください。
※ Elution Tubeのフタは、図のように手間側に向けてください。
※ Elution Tubeのフタは絶対に閉めないでください。



3. カートリッジのウエル8に、**プランジャー**を置く。



4. インキュベーション後のサンプルを全量(約420μl)をカートリッジのウエル#1に加え、**3-4回のピペティングを行い、十分に攪拌する。**



核酸精製

1. 【 START 】を選択する。
2. 【 Viral Total Nucleic Acid / AS1330 】を選択する。
“☆”はお気に入りです。★にすると、常に上位に表示されます。

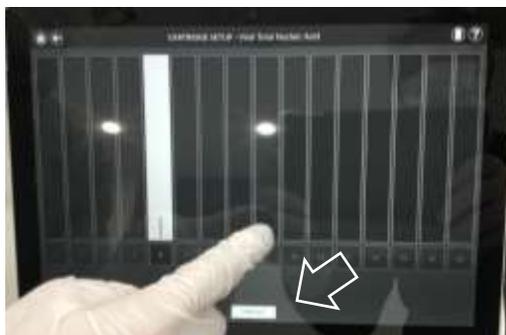


3. さらに、右端の【 PROCEED 】を選択する。



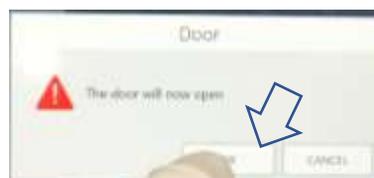
4. 黒色の長方形の部分を、どこでもいので、選択する。

- Maxwell RSC Instrumentは、カートリッジの位置を認識しませんので、どの箇所でも対応します。
- 選択することにより、下の【 PROCEED 】が選択できるようになります。



5. 下の【 PROCEED 】を選択する。

6. 【 OK 】を選択して、ドアを開ける。
ドアが前方に開きます、機器前方に物を置かないでください。



7. 準備の完了したDeck TrayをMaxwell RSC 本体にセットする。
• 液跳ねしないように、奥側から置き、手前側をゆっくとおろしてください。

- プランジャー
 - Elution Tube
 - Elution Buffer、または、Water
- 以上の3点がセットされていることを目視にて確実に確認してください。**

重要



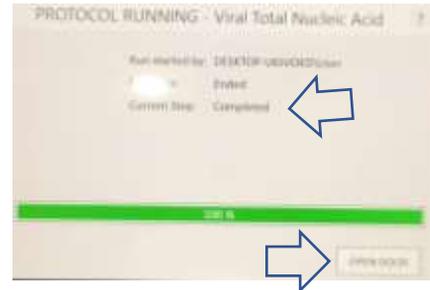
Maxwell RSC 48では、PlungerとElution TubeのセットをCCDカメラでチェックすることができます。

8. 【 START 】を選択する。
Maxwell RSCによる約32分間の精製工程が始まります。



核酸精製終了後の作業

1. “Completed”の表示を確認して、【 OPEN DOOR 】を選択する。



2. Elution Tubeのフタを閉める。

3. Deck Trayを、Maxwell RSC本体から取り出す。
※ セット時とは逆に、手前側を持ち上げ、引き出してください。



4. 抽出したRNAを含むElution Tubeを、 $>10,000 \times g$ 、1分間の遠心を行う。
※ 検体の粘度に依存して、Elution Tubeには磁性体ビーズが混入します。遠心した上清を以降のリアルタイムPCR反応にご使用ください。
なお、磁性体ビーズはリアルタイムPCR反応に影響しません。

重要

5. 抽出したRNAを含むElution Tubeを適切な場所に保管する。
※ RNAは分解されやすい物質であるため、できるかぎり迅速にPCR検査に適用することをお勧めいたします。
 - － すぐに使用する場合： 4℃や氷上に、一時的に置く
 - － すぐに使用しない場合： 新しい保管用チューブに移し、上清を移し、-70℃に保管する。
RNaseの働きを抑えるため、できるかぎり低温で保管することがのぞましい。
6. Deck Trayからカートリッジを取り外し、施設の廃棄基準に従って、廃棄する。
7. Deck TrayをMaxwell RSC本体に戻す。

機器の片づけ

1. 画面右上の扉マークを押して、ドアを閉める。

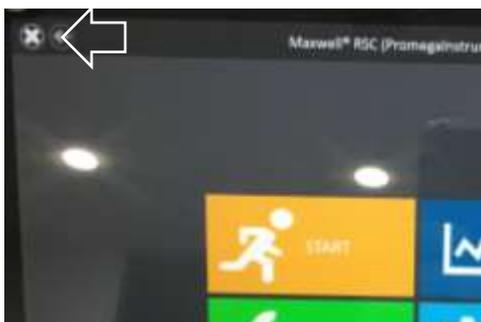


2. 画面左上の“ホーム”マークを選択する。
ホーム画面に戻ります。



※ 必要に応じて、“Sanitization”からUV照射を行ってください。

3. 画面左上の“×”マークを選択する。さらに【 YES 】を選択して、ソフトウェアを終了する。



3. Surface本体の電源をOFFにする。
スイッチは左肩にあります。



4. Maxwell RSC Instrument本体の電源をOFFにする。
スイッチは本体の背面にあります。
(| がON、○がOFF)



Maxwell RSCとSurfaceの電源をOFFにする順番は、どちらからでも問題ありません。

Maxwell RSC Q&A

Q. Elution Tubeに黒い磁性体ビーズの混入が見られます。原因と対処法を教えてください。



A. Maxwellでは、検体と磁性体ビーズをBinding Buffer中で攪拌します。そのため、検体に由来する粘性成分が磁性体ビーズに付着し、その粘度に依存して、Elution Tubeに磁性体ビーズが混入します。また、Maxwellの機器・試薬の性能上、粘性のない検体の場合でも、微量の磁性体ビーズが混入します。抽出後のElution Tubeは、 $>10,000 \times g$ 、1分間の遠心を行い、上清を以降のリアルタイムPCR反応にご使用ください。なお、磁性体ビーズ自体はリアルタイムPCR反応に影響しません。

Q. Lysis BufferとProteinase K Solutionのプレミックスを調製して、保管することができますか？

A. Lysis Bufferには、タンパク質変性剤であるグアニジン塩が含まれます。グアニジン塩はProteinase Kを速やかに失活するため、プレミックスは直前に調製してください。保管はできません。

Q. Deck Trayだけを追加購入することはできますか？

A. 追加で別に購入できます。Maxwell RSC Deck Tray (カタログ番号 SP6019、定価 311,000円)にてお取り扱いしております。

Q. UVランプは内蔵していますか。推奨の照射時間はありますか。

A. UVランプは内蔵されており、“SANITIZE”よりUVランプをONにできます。照射時間は汚染度に依存しますが、10~15分間を設定する方を多くお見受けいたします。SANITIZATION SETTINGより、ソフトウェア起動時または抽出終了時にUV照射を促す設定ができます。



■ 日常のクリーニング方法

使用後はすみやかに下記の部分を70%エタノールで拭って、クリーニングしてください。



Plunger Bar /
Magnetic Rod Assembly /
プラットフォーム



Maxwell RSC/CSC Deck Tray

本プロトコールはプロメガ本社での検討結果および実際にお使いいただいているお客様の手法を元に作成しております。常に最新情報に更新しておりますので、予告なく内容を変更する場合がございます。