



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

1. ご注意点

磁性体ビーズを用いた核酸精製では、喀痰の粘性が収率・純度に大きな影響を及ぼします。DTT 処理により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。

2. プロトコル

ユーザーが用意するもの

- 1.5 ml 遠心チューブ
- ボルテックスミキサー
- PBS(-) (細胞培養グレード)
- DTT, Molecular Grade (Promega Cat#V3151 もしくは V3155)
- DNase I (lyophilized) (Promega Cat#Z358A-C)
- RQ1 DNase 10X Reaction Buffer (Promega Cat#M198A-C)
- 56℃に設定されたヒートブロック

試薬の準備

1. 10% DTT in PBS

終濃度が 10%(重量体積パーセント)になるように、DTT を PBS(-)溶液に溶解する。
用事調製が望ましいが、保存する場合には分注し-20℃保存する(1 年程度保存可能)。

2. DNaseI 溶液

DNase I (lyophilized) のバイアルに、275 µl の Nuclease-Free Water を添加する。
蓋をしてバイアルをおだやかに転倒混和し溶解する(ボルテックスミキサーは使用しない)。
溶解した DNase I 溶液は凍結融解を避けるため分注し-20℃保存する(6 ヶ月保存可能)。



喀痰検体の前処理

国立感染症研究所発行の「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1 別添 1 喀痰検体の前処理法 ver.1」を参考に、DTT を用いた喀痰溶解法による喀痰検体の前処理法を例示する。

1. 喀痰容量に対し 1 倍量の 10% DTT in PBS を加えボルテックスミキサーで混合する。
2. 室温で 15 分間インキュベートする。
3. 1/10 量の RQ1 DNase 10X Reaction Buffer と 1/100 量の DNase I 溶液を加える。
4. 室温で 10 分間インキュベートする。

サンプルの準備

5. (4)で調製した検体 200 µl を 1.5 ml 遠心チューブへ移す。

注：検体量を増やす場合には、別途ご相談ください

6. Lysis buffer 200 µl と Proteinase K 20 µl を加え 10 秒間以上撹拌する。

7. 56℃で 10 分間インキュベートします。

注：抽出コントロール核酸を使用する場合、ステップ 7 の後にライセートに追加することができます。このキットにはコントロールは含まれていません。

調製したライセートは、Reliaprep Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (カタログ番号 AX4820)を用いた核酸精製にも使用できます。

核酸精製

1. サンプル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**

※ 注意：サンプル数に応じて、左右のバランスよく配置してください。

2. 同数の Elution Tube をセットし、50~100 μ l の
Nuclease-Free Water を加える。

※ Elution Tube はグッと強く押し込んでください。

※ **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. 56℃のインキュベーションが完了したサンプル全量を、カートリッジ
のウエル 1 に添加する。

※ ウェル 1 は最も大きなウェルです。カートリッジラベルに
一番近く、Elution tube からは最も遠い位置にあります。

5. Maxwell® RSC Instrument 本体にて、Viral Total
Nucleic Acid のメソッドを選択し、Maxwell® RSC/CSC
Deck Tray をセットして、精製操作を行う。



3. 溶出した核酸の保存

Elution Tube に磁性体ビーズが混入する場合があります。磁性体ビーズ自体は RT-qPCR 反応に影響を与えませんが、必要に応じて、10,000xg、1 分間遠心し、上清を RT-qPCR に用いてください。

ウイルス RNA は安定性が低いいため、できる限り抽出直後に RT-qPCR を行ってください。すぐに使用しない場合は、溶出したウイルス RNA を -70℃ に保存します。

推奨事項：本キットは米国 FDA より新型コロナウイルス検査での EUA を得ています。