



ReliaPrep™ Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, Custom (カタログ番号 AX4820) を用いた喀痰からの RNA 抽出

1. ご注意点

喀痰の粘性はカラム目詰まりや RNA の収率、純度などに影響を及ぼします。DTT 処理により粘性を十分に取り除いた検体を核酸精製に用いてください。

本法は、Binding Buffer (BBA)の代わりにイソプロパノールを用いることで、高収率にウイルス RNA を精製するためのカスタムプロトコルです。キットにはイソプロパノールは含まれていないため、別途ご準備ください。**Binding Buffer (BBA)は使用しません。**

本キットは吸引法には対応しておりません。

2. プロトコル

ユーザーが用意するもの

- 1.5ml マイクロ遠心チューブ
- 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
- 14,000×g に対応したマイクロ遠心分離機
- イソプロパノール

*** すべての遠心は、14,000×g、室温(15～25℃)で実施してください。**



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、275μl 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 秒間以上攪拌する。

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、Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (カタログ番号 AS1330) を用いた自動核酸精製にも使用できます。



核酸精製

8. (7)の間に ReliaPrep™ Binding Column を空の Collection Tube にセットします。
9. ヒートブロックからチューブを取り外します。イソプロパノール 250 µl を加え、チューブに蓋をし、ボルテックスミキサーで 10 秒間ボルテックスして混合します。
10. チューブの内容物を Binding Column に加え、蓋をして微量遠心機に入れます。
11. 1 分間遠心します。Binding Column 内のライセートがメンブレンを完全に通過したことを確認します。ライセートがメンブレン上に残っている場合は、カラムをさらに 1 分間遠心します。
12. フロースルーを含む Collection Tube を取り外し、液体を有害廃棄物として廃棄します。
13. Binding Column を新しい Collection Tube にセットします。500 µl の Column Wash Solution (CWD) をカラムに加え、3 分間遠心します。フロースルーを廃棄します。
注：Collection Tube は使い捨てです。洗浄のたびに新しい Collection Tube をご使用ください。
14. 手順 13 を 2 回繰り返し、合計 3 回洗浄します。
15. Binding Column をきれいな 1.5ml マイクロ遠心チューブに入れます。
16. 50–100µl の Nuclease-Free Water をカラムに加え、1 分静置したのち、1 分間遠心します。
17. Binding Column を捨て、溶出液を保存します。Binding Column や Collection Tube の再利用は避けてください。

3. 溶出した核酸の保存

ウイルス RNA は安定性が低いため、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。