

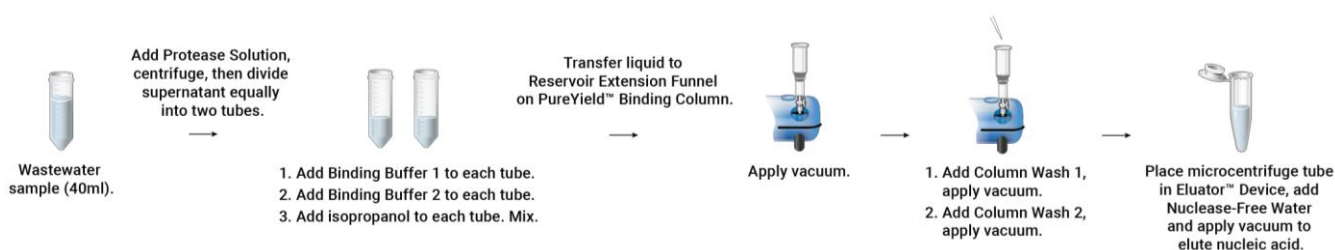
Maxwell® RSC Enviro Total Nucleic Acid Kit (カタログ番号 AS1831) 日本語プロトコル

キットに含まれる構成部品はすべて 15~30℃で保管してください。

1. 実験の流れ

以下の2段階の手順で核酸精製を行います。

① 下水サンプル中の核酸の捕捉および濃縮



② Maxwell を用いた核酸精製

To 0.5 ml of nucleic acid extracted using the Midi Column:



2. キット以外にご用意いただくもの

- Maxwell RSC Instrument (Cat# AS4500, AS8500)
- イソプロパノール
- 95%エタノール
- 1.5ml マイクロチューブ
- 50ml コニカルチューブ
- 卓上遠心機 (3,000×g 以上)
- スイングバケットロータ (50ml チューブ対応)
- ヒートブロックもしくはウォーターバス (いずれも 60℃対応)
- 吸引マニフォールド (例: Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold Cat# A7231)



- Eluator™ Vacuum Elution Device (Cat# A1071)
- 吸引ポンプ (例 : Welch Vacuum Pump Cat# A6724)

補足 : A7231、A1071、A6724 のセット品(Cat# JKC005)も利用可能です。

3. 下水サンプル中の核酸の捕捉および濃縮

試薬の調製

1. Column Wash 1 (CWE)のボトルにイソプロパノールを 57ml 加える。
2. Column Wash 2 (RWA)のボトルに 95%エタノールを 350ml 加える。

調製後の試薬は 15~30℃で保管可能です。揮発を防ぐため、密栓して保存してください。

核酸の捕捉と濃縮

3. 40ml の下水サンプルを 50ml コニカルチューブに分取する。

補足 : 低温殺菌または未殺菌のどちらの下水サンプルも処理できます。

低温殺菌するには、サンプルを 60℃で 1 時間インキュベートします。

4. 溶出用の Nuclease-Free Water を 60℃に加温しておく (1 サンプルあたり 600μl 程度必要)。
 5. ステップ 3 のチューブに Protease Solution を 0.5ml 加え、転倒混和し、室温で 30 分間インキュベートする。
 6. 3,000×g で 10 分間、遠心する。
 7. 上清を 20ml ずつ新しい 50ml コニカルチューブに移す。
- * PureYield カラムの詰まりを防ぐため、遠心でサンプルに含まれる固形物をしっかり沈殿させ、持ち込まないように除去することが重要です。

補足 : 沈殿物からの核酸精製を行う場合は、5.補足情報 2 に従って精製を行ってください。

8. 各チューブに Binding Buffer 1 (BBD)を 6ml、Binding Buffer 2 (BBE)を 0.5ml 加え、転倒混和して混合する。
9. 各チューブにイソプロパノールを 24ml 加え、転倒混和して混合する。
10. Reservoir Extension Funnel を PureYield™ Binding Columns に取り付け、カラムを吸引マニフールドに接続する。
11. ステップ 9 の溶液全量を PureYield™ Binding Columns に取り付けた Reservoir Extension Funnel に移し、吸引を開始する。
12. 5ml の Column Wash 1 を加え、吸引する。



13. 20ml の Column Wash 2 を加え、吸引する。
14. すべて吸引されたら、さらに 30 秒間、吸引を続ける。
15. 吸引を止め、カラムをマニフォールドから取り外す。
16. Eluator™ Vacuum Elution Device に 1.5ml マイクロチューブと PureYield™ Binding Columns セットする(右図)。
17. Eluator™ Vacuum Elution Device をマニフォールドに取り付ける。
18. ステップ 4 で 60℃に加温しておいた Nuclease-Free Water 250μl を PureYield™ Binding Columns に加え、吸引する。
19. もう一度 Nuclease-Free Water(60℃)を 250μl 加え、吸引する。全量 500μl の溶出液が回収される。



4. Maxwell を用いた核酸精製

1. サンプル数に応じて、ウェル#1(一番大きいウェル)が奥側になるようにカートリッジをデッキトレイに配置する。
2. カートリッジをデッキトレイに押し込み、固定する(向きが正しくないと嵌りません)。その後、カートリッジのシールを丁寧に剥がす。

注意：カートリッジ上部にシールやその接着剤が残らないようにしてください。

剥がす際は左下から右上方向に向けて斜めに剥がすときれいに剥がし易いです。

3. 各カートリッジのウェル#8(一番手前)にプランジャーを挿入する。
4. 各カートリッジに Elution Tube をセットし、80μl の Nuclease-Free Water を加える。

注意：Elution Tube の蓋は絶対に閉めないでください。

5. セクション 3 のステップ 19 の溶出液に Binding Buffer 1 を 150μl、Binding Buffer 2 を 50μl 加え、全量をウェル#1 に移す。
6. [Enviro Total Nucleic Acid] メソッドを選択し、精製を開始する。

注意：精製を開始する前に以下の点をもう一度確認してください。

- ・カートリッジが正しくセットされていること。
- ・サンプルがウェル#1 に添加されていること。
- ・Elution Tube に Nuclease-Free Water 添加されていること。
- ・Elution Tube の蓋が開いていること。
- ・ウェル#8 にプランジャーがセットされていること。

7. 精製が終了したら本体の前扉を開け、Elution Tube の蓋を閉める。



8. Elution Tube を取り出し、適切に保管する。

- ・ $-30^{\circ}\text{C} \sim -10^{\circ}\text{C}$ で保管してください。
- ・ 凍結・解凍を繰り返すのは避けてください。
- ・ 精製された TNA は、直接 RT-qPCR に使用可能です。

9. 使用済みのカートリッジとプランジャーを、施設のガイドラインに従って廃棄する。

5. 補足情報

下水サンプル 40ml 以外のボリュームを用いる場合

下表に従って試薬の量を調製することで実施可能です。

表. サンプル量と試薬量の比率

Sample volume (ml)	Protease Solution (ml)	Binding Buffer 1 (ml)	Binding Buffer 2 (ml)	Isopropanol (ml)
5	0.1	1.5	0.125	6
10	0.125	3	0.25	12
20	0.25	6	0.5	24
40	0.5	12	1	48
80	1	24	2	96

※サンプル量が 40ml を超える場合には、Protease Solution (Cat# A1442)、Binding Buffer 1 (Cat# A2981)、Binding Buffer 2 (Cat# MC1501) の各単品製品を追加でご用意いただく必要があります。

汚泥や沈殿固形物から精製する場合

1. 2ml までのサンプルに Nuclease-Free Water を 8ml 加える。
2. Protease Solution を 200 μl 加え、よく混合し、室温で 30 分間インキュベートする。
3. Binding Buffer 1 (BBD) を 3ml、Binding Buffer 2 (BBE) を 250 μl 、イソプロパノールを 12ml 加え、転倒混和して混合する。
4. 3,000 $\times g$ で 10 分間、遠心する。
5. 上清を PureYield™ Binding Columns に取り付けした Reservoir Extension Funnel に移し、吸引を開始する。

補足：溶液を移す際に、沈殿物を持ち込まないように注意してください。

6. 以降は本プロトコル「セクション 3 のステップ 12」から同様に実施する。

