

QIAamp® MinElute® Virus Spin プロトコールとトラブルシューティング

血漿、血清、無細胞体液からのウィルス RNA および
DNA の同時精製

目次	ページ
プロトコール	
血漿および血清サンプルからのウィルス核酸精製	2
トラブルシューティング	5



プロトコール：血漿および血清からのウィルス核酸精製

これは、QIAamp MinElute Virus Spin Kit およびマイクロ遠心機を用いて、200 μ l の血漿あるいは血清からのウィルス核酸を分離するためのプロトコールです。QIAcube™を用いた QIAamp MinElute Virus Spin Kit の自動化には、QIAcube User Manual（英語版）および関連する protocol sheet をご覧ください。

実験を始める前の重要事項

- 全ての遠心操作は室温（15～25℃）で行ないます。

実験開始前の準備事項

- サンプルを室温（15～25℃）に戻します。
- ステップ 14 の溶出で使用する Buffer AVE を室温に戻します。
- ステップ 4 および 13 で使用するヒートブロックを 56℃に設定します。
- Buffer AW1、Buffer AW2 および QIAGEN Protease を英語版 Handbook 15～18 ページの指示に従い調製します。
- 英語版 Handbook 16 ページの説明に従って Buffer AVE で溶解調製したキャリア RNA を Buffer AL に添加します。

操作手順

1. **25 μ l の QIAGEN Protease を 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別売）にピペットで入れる。**

注：QIAGEN Protease を溶解する場合には 2 つのバッファーがあります。通常の血漿・血清、リン酸を含むサンプルの場合は Buffer AVE を推奨します。リン酸を含まないサンプルの場合のみ、Protease Resuspension Buffer を使用してください。詳細は英語版 Handbook 15～16 ページの “Preparation of QIAGEN Protease” をご覧ください。

2. **マイクロ遠心チューブに 200 μ l の血漿あるいは血清を加える。**

サンプル容量が 200 μ l より少ない場合には、0.9%の塩化ナトリウム溶液を適量加えて、プロテアーゼとサンプルのトータル量が 225 μ l になるようにします。

3. **200 μ l の Buffer AL (28 μ g/ml のキャリア RNA を含む) を加える。蓋を閉めて、ボルテックスで 15 秒間混和する。**

効率的な溶解を確実にこなうためには、サンプルと Buffer AL を完全に混和し、均一な溶液にすることが必須です。

注：QIAGEN Protease を Buffer AL に直接添加しないでください。

4. **ヒートブロック（56℃）で 15 分間インキュベートする。**

5. 1.5 ml チューブをスピンドウンして蓋の内側に付いた液滴を回収する。
6. 250 μ l のエタノール (96 ~ 100%) をサンプルに加え、蓋を閉め、ボルテックスで 15 秒間完全に混和する。エタノールを加えたライセートを室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間インキュベートする。

注：室温が 25°C を超える場合には、ライセートに添加する前にエタノールを氷上で冷やしてください。

7. 1.5 ml チューブをスピンドウンして蓋の内側に付いた液滴を回収する。
8. ステップ 7 のライセート全量を QIAamp MinElute Column の縁を濡らさないようにアプライする。蓋を閉め、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml コレクションチューブにセットして、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。

遠心操作の後、ライセートが完全にカラムを通過していない場合には、QIAamp MinElute Column が空になるまでさらに高速で再度遠心操作する。

9. 推奨：QIAamp MinElute Column を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように 500 μ l の Buffer AW1 を添加する。蓋を閉め、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml コレクションチューブにセットして、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。

注：本ステップは、阻害物質を含むサンプルを処理する際に、ウイルス核酸精製の性能を高めます。

10. QIAamp MinElute Column を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように 500 μ l の Buffer AW2 を添加する。蓋を閉め、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml コレクションチューブにセットして、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。

11. QIAamp MinElute Column を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように 500 μ l のエタノール (96 ~ 100%) を添加する。蓋を閉め、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。ろ液の入ったコレクションチューブを捨てる。

エタノールのキャリーオーバーがダウンストリームのアプリケーションで問題になることがあります。ある種の遠心ローターは減速の際に振動するため、エタノールを含むろ液が QIAamp MinElute Column に接触することがあります。また、QIAamp MinElute Column とコレクションチューブをローターから取り除く際に、ろ液が QIAamp MinElute Column と接触することもあります。

12. QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml コレクションチューブにセットする。最高速度 (20,000 x g ; 14,000 rpm) で 3 分間遠心操作してメンブレンを完全に乾燥させる。

13. 推奨：QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml コレクションチューブにセットし、蓋を開き、56°C で 3 分間インキュベートしてメンブレンを完全に乾燥する。このステップにより残っている液体が蒸発します。

14. **QIAamp MinElute Column** を新しい 1.5 ml マイクロ遠心チューブ (別売) にセットし、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。**QIAamp MinElute Column** の蓋を静かに開けて、**20 ~ 150 μ l** の **Buffer AVE** あるいは **RNase フリー水** をメンブレンの中央にアプライする。蓋を閉め、室温で 1 分間インキュベートする。最高速度 (**20,000 x g ; 14,000 rpm**) で 1 分間遠心操作する。

重要：溶出バッファーを室温に戻したことを確認します。少量で溶出を行なう場合は (50 μ l 以下)、溶出バッファーをメンブレンの中央にアプライし、カラムに結合した RNA および DNA が完全に溶出されるようにします。

溶出バッファーの量はダウンストリームのアプリケーションでの必要性に応じて調節可能です。再回収される溶出液量は、カラムにアプライした溶出バッファーよりも約 5 μ l 少なくなります。Buffer AVE あるいは水をアプライした **QIAamp MinElute Column** を遠心操作の前に 5 分間室温でインキュベートすると、一般には DNA と RNA 収量は増加します。

トラブルシューティング

コメント

溶出液中に核酸がほとんどあるいは全くない

- a) キャリア RNA を Buffer AL に添加していない Buffer AVE でキャリア RNA を調製後、Buffer AL に混和する（英語版 Handbook 16 ページ）。新しいサンプルで再度調製を行なう。
- b) キャリア RNA が分解 Buffer AVE で溶解したキャリア RNA を -20°C で保存しなかった、あるいは凍結・解凍サイクルを繰り返した。あるいは Buffer AL・キャリア RNA 混和物を $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ で 48 時間以上保存した。Buffer AVE に溶解したキャリア RNA の新しいチューブを準備し、Buffer AL と混和する。新しいサンプルで再度調製を行なう。
- c) Buffer AL・キャリア RNA 混合物の混和が不十分 Buffer AL とキャリア RNA の入ったチューブを少なくとも 10 回静かに上下に転倒させて混和する。
- d) 96～100%エタノールではなく低濃度のものを使用 新しいサンプルと 96～100%エタノールで精製操作をやり直す。メタノールやメチルエチルケトンのような物質を含んだ変性アルコールは使用しない。
- e) RNA が分解 スタートサンプルの RNA が分解されていないかチェックする。スタートサンプル（血漿、血清、体液）中の RNase により RNA が分解されることがある。採集直後のサンプル、あるいは冷凍／冷蔵保存したサンプルをすぐに調製したことを確認する。バッファあるいは水中に RNase コンタミがないことをチェックし、操作中に RNase が作用していないことを確認する。Buffer AVE か RNase フリー水を溶出に使用する。
- f) Buffer AVE に RNase がコンタミ Buffer AVE の入ったチューブを繰り返し使用する場合、RNase のコンタミに注意する。RNase がコンタミした場合には、Buffer AVE の瓶を新しいものに換える。新しいサンプルで再度調製を行なう。
- g) Buffer AW1 あるいは Buffer AW2 の調製が不正確 Buffer AW1 および AW2 濃縮液を 96～100%のエタノールで正確に希釈したことを確認する。新しいサンプルで再度調製を行なう。

コメント

-
- | | | |
|----|--|--|
| h) | Buffer AW1 あるいは Buffer AW2 を低濃度エタノールで調製 | Buffer AW1 あるいは AW2 濃縮液を 96 ~ 100% エタノールで希釈したことを確認する。メタノールやメチルエチルケトンのような物質を含んだ変性アルコールは使用しない。新しいサンプルで再度調製を行なう。 |
| i) | Protease Resuspension Buffer を不適切なスタートサンプルと一緒にした | Protease Resuspension Buffer は、リン酸を含むサンプルやインターナルコントロール（ウイルス輸送液、細胞培養上清、PBS）と一緒にしない。サンプルやインターナルコントロールがリン酸を含む場合、QIAGEN Protease を Buffer AVE で溶解することを推奨する。英語版 Handbook 15 ~ 16 ページの “Preparation of QIAGEN Protease” を参照。 |

RNA/DNA を用いたダウンストリームの酵素反応で、良い結果が得られない

- | | | |
|----|---------------------------|--|
| a) | 溶出液に核酸が少ない、あるいは全くない | “溶出液中に核酸が少ないあるいは全くない” の項で原因を調べる。可能なら反応液に添加する溶出液量を増やす。 |
| b) | サンプルの凍結と解凍を 2 回以上行なわない | 凍結／解凍を繰り返さない（英語版 Handbook 15 ページ参照）。新鮮なあるいは 1 回だけ解凍したサンプルを常に使用する。 |
| c) | サンプル中のウイルス濃度が低い | サンプルを長期間、室温で放置した。新しいサンプルで再度調製を行なう。 |
| d) | Buffer AL 中でのサンプル溶解が不十分 | QIAGEN Protease を長時間、高温度で使用した。新しいサンプルと新しい QIAGEN Protease で精製操作をやり直す。 |
| e) | 溶出液中のキャリア RNA が多すぎるか少なすぎる | 増幅反応に最適なキャリア RNA の最大量を決める。それに従って、添加するキャリア RNA の濃度を調節する（英語版 Handbook 16 ページの “Addition of carrier RNA to Buffer AL” を参照）。 |
| f) | 感度が低下 | 増幅反応に適した溶出液の最大量を決める。それに従って、増幅反応に加える溶出液量を増やすか減らす。溶出液量は比例して調節する。 |

コメント

- g) ダウンストリーム・アッセイでの精製核酸のパフォーマンスが、洗浄バッファの調製後の経過日数とともに変動
洗浄用 Buffer AW1 あるいは Buffer AW2 の塩分およびエタノール成分が、次の実験まで長期間放置されたために分離した。各調製前に、バッファを完全に混和する。
- h) 逆転写酵素と Taq DNA ポリメラーゼの組み合わせを変更して使用
酵素を変更した場合には、Buffer AL に添加するキャリア RNA と溶出液の量を再調整することが必要。

一般的な操作

- a) QIAamp MinElute Column の目詰まり
凍結／解凍を繰り返したことにより、血漿中の寒冷沈降物が生じることがある。これは、QIAamp MinElute Column をブロックする。血漿の凍結／解凍を 1 回以上繰り返さない。
寒冷沈降物が生じた場合には、サンプル調製を始める前に英語版 Handbook 15 ページの “Sample storage” に記述されているように、遠心操作によりサンプルを清澄化する。
- b) 溶出量の変動
異なるタイプのサンプルを処理した場合、溶出量の変動するのは正常。

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube™, MinElute® (QIAGEN Group).

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

記載の QIAGEN 製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。

© 2010 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

株式会社 キアゲン ■ 〒 104-0054 ■ 東京都中央区勝どき 3-13-1 ■ Forefront Tower II

Tel: 03-6890-7300 ■ Fax: 03-5547-0818 ■ E-mail: techservice-jp@qiagen.com

