

QIAamp® Viral RNA Mini プロトコールとトラブルシューティング

ウイルス RNA 精製 :

血漿

血清

無細胞体液

培養細胞上清



目次

| | |
|------------------------------|-----------|
| 重要事項 | 3 |
| 試薬調製 | 3 |
| プロトコール | |
| ウイルス RNA 精製（スピンプロトコール） | 6 |
| ウイルス RNA 精製（吸引プロトコール） | 9 |
| サンプル濃縮 | 13 |
| 尿からの細胞、バクテリアあるいはウイルス DNA 分離用 | 14 |
| トラブルシューティング | 15 |

重要事項

初めて RNA を取り扱う方は、実験を始める前に “Handling RNA” (英語版 Handbook 36 ページ、Appendix) をお読みください。QIAamp Viral RNA Mini プロトコルの全てのステップは迅速に室温 (15 ~ 25°C) で行なってください。

採血・遠心分離後の血漿 (未処理あるいはヘパリン以外の血液抗凝固剤で処理) あるいは血清は 2 ~ 8°C で 6 時間保存可能です。長期間の保存は、分注して -20°C ~ -80°C での凍結保存をお奨めします。凍結保存した血漿あるいは血清サンプルの解凍は 1 回だけにします。解凍・融解を繰り返すとタンパク質の変性や沈殿が生じ、その結果ウイルスカ価が減少し、分離されるウイルス RNA の収量も減少します。さらに解凍・融解により形成された沈降物が QIAamp メンブレンの目詰まりを起こします。冷却による凝集が観察される場合には、6,800 x g で 3 分間スピンドウンしてペレットにします。ペレットを乱さないように迅速に上清を分離します。本ステップによりウイルスカ価は低下しません。

QIAamp Viral RNA Mini Kit は、DNA から RNA を分離するにはデザインされていません。細胞性 DNA の混入を避けるために、英語版 Handbook 10 ページの “Cellular DNA contamination” のガイドラインに従ってください。

QIAamp Viral RNA Mini 操作では、200 ヌクレオチド以上の RNA を全て分離することができます。この条件下では低分子 RNA は定量的に結合しません。

試薬調製

キャリア RNA を Buffer AVL* に添加

310 µg のキャリア RNA (凍結乾燥) が入ったチューブに 310 µl の Buffer AVE を添加し、1 µg/µl の溶液を調製します。キャリア RNA を完全に溶解し、これを適した量に分注して -20°C で保存します。キャリア RNA 溶液の凍結融解は 3 回まで可能です。

Buffer AVL に沈殿が生じていないかチェックして、必要なら 80°C でインキュベートして沈殿を溶解します。表 1 を用いて、同時に処理するサンプル数から、サンプルのバッチあたりに必要な Buffer AVL とキャリア RNA ・ Buffer AVE の混和物の容量を計算します。サンプル数が多い場合には下の式を用いて容量を計算します：

$$\begin{aligned}n \times 0.56 \text{ ml} &= y \text{ ml} \\y \text{ ml} \times 10 \text{ µl/ml} &= z \text{ µl}\end{aligned}$$

ここで：n = 同時に処理するサンプル数

y = 計算から求めた Buffer AVL の容量

z = Buffer AVL に添加するキャリア RNA ・ Buffer AVE 混和物の量

チューブを静かに 10 回転倒混和してください。泡立ちを避けるためにボルテックスで混和しないでください。

* カオトロピック塩を含んでいます。適切で安全な対策を講じ、操作の際には手袋をご使用ください。漂白剤を含む消毒剤と混合しないでください。Safety information は英語版 Handbook 6 ページをご覧ください。

表 1. QIAamp Viral RNA 操作に必要な Buffer AVL とキャリア RNA ・ Buffer AVE 混和物の量

| サンプル数 | Buffer AVL 量 (ml) | キャリア RNA ・ Buffer AVE 量 (μl) | サンプル数 | Buffer AVL 量 (ml) | キャリア RNA ・ Buffer AVE 量 (μl) |
|-------|-------------------|------------------------------|-------|-------------------|------------------------------|
| 1 | 0.56 | 5.6 | 13 | 7.28 | 72.8 |
| 2 | 1.12 | 11.2 | 14 | 7.84 | 78.4 |
| 3 | 1.68 | 16.8 | 15 | 8.40 | 84.0 |
| 4 | 2.24 | 22.4 | 16 | 8.96 | 89.6 |
| 5 | 2.80 | 28.0 | 17 | 9.52 | 95.2 |
| 6 | 3.36 | 33.6 | 18 | 10.08 | 100.8 |
| 7 | 3.92 | 39.2 | 19 | 10.64 | 106.4 |
| 8 | 4.48 | 44.8 | 20 | 11.20 | 112.0 |
| 9 | 5.04 | 50.4 | 21 | 11.76 | 117.6 |
| 10 | 5.60 | 56.0 | 22 | 12.32 | 123.2 |
| 11 | 6.16 | 61.6 | 23 | 12.88 | 128.8 |
| 12 | 6.72 | 67.2 | 24 | 13.44 | 134.4 |

注：このサンプル調製手順は、サンプルあたり 5.6 μg のキャリア RNA 用に至適化されています。キャリア RNA の量が少ない方がお客様の増幅システムに適している場合には、Buffer AVL が入ったチューブに必要な量の溶解したキャリア RNA のみを入れてください（サンプルあたり 5.6 μg 以下のキャリア RNA を使用する場合は、個々のサンプルタイプおよびダウンストリーム・アッセイごとに検討評価してください）。

Buffer AVL ・ キャリア RNA は必要に応じて調製し、2 ～ 8℃で最高 48 時間まで安定です。この溶液は 2 ～ 8℃で保存すると沈殿物が生じますが、使用直前に 80℃に温めて再溶解します。Buffer AVL ・ キャリア RNA 溶液の加熱は 6 回までにしてください。80℃でのインキュベーションは 5 分を超えないようにします。頻繁な加熱やインキュベーション時間の延長によりキャリア RNA の分解が生じるため、ウイルス RNA の収量が低下し、RT-PCR の誤った結果に繋がります。これは特に力価の低いサンプルで生じます。

Buffer AW1*

Buffer AW1 は濃縮液でお届けします。最初に使用する際に、容器と表 2 に記載されている様に適切な量のエタノール (96 ~ 100%) を加えます。Buffer AW1 は密閉して室温 (15 ~ 25°C) で 1 年間安定ですが、キットの有効期間までのみです。

表 2. Buffer AW1 の調製

| Kit cat. no. | プレップ数 | 濃縮 AW1 | エタノール | 最終容量 |
|--------------|-------|--------|--------|--------|
| 52904 | 50 | 19 ml | 25 ml | 44 ml |
| 52906 | 250 | 98 ml | 130 ml | 228 ml |

Buffer AW2†

Buffer AW2 は濃縮液でお届けします。最初に使用する際に、容器と表 3 に記載されている様に適切な量のエタノール (96 ~ 100%) を濃縮 Buffer AW2 に加えます。Buffer AW2 は密閉して室温で 1 年間安定ですが、キットの有効期間までのみです。

表 3. Buffer AW2 の調製

| Kit cat. no. | プレップ数 | 濃縮 AW2 | エタノール | 最終容量 |
|--------------|-------|--------|--------|--------|
| 52904 | 50 | 13 ml | 30 ml | 43 ml |
| 52906 | 250 | 66 ml | 160 ml | 226 ml |

* カオトロピック塩を含んでいます。適切で安全な対策を講じ、操作の際には手袋をご使用ください。漂白剤を含む消毒剤と混合しないでください。Safety information は英語版 Handbook 6 ページをご覧ください。

† 防腐剤としてアジ化ナトリウムを含有。

プロトコール：ウイルス RNA 精製 (スピンプロトコール)

本プロトコールは、血漿、血清、尿、細胞培養液、無細胞体液など 140 µl からウイルス RNA を精製します。QIAcube™と QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いたウイルス RNA の自動化精製には、QIAcube User Manual（英語版）および関連する protocol sheet をご覧ください。

スタートサンプル量が 560 µl（140 µl の倍数）までは、これに比例して最初の容量を増やし、プロトコールに従って、数回に分けて QIAamp Mini カラムにアプライします。ウイルスカ価の非常に少ないサンプルでは、サンプル精製を始める前に濃縮が必要です：プロトコール“サンプル濃縮”参照（13 ページ）。

あるいは、ウイルス DNA および RNA の精製を同時に行なう次のキットのどれかひとつを用いて大量のサンプルを処理します。

- QIAamp MinElute® Spin Kit* 200 µl
- QIAamp MinElute Vacuum Kit 500 µl
- QIAamp UltraSens® Virus Kit 1,000 µl

実験を始める前の重要事項

- 本プロトコールを始める前に 3 ページの“重要事項”および英語版 Handbook 15 ~ 22 ページの“Important Notes”をお読みください。
- 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 11 で使用する溶出用 Buffer AVE を室温に戻します。
- 5 ページの説明に従って Buffer AW1 および AW2 を調製したことを確認します。
- 3 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 AVL に添加します。

操作手順

1. 1.5 ml マイクロ遠心チューブにキャリア RNA を含む Buffer AVL 560 µl をピペッティングする。

サンプル量が 140 µl 以上の場合には、Buffer AVL・キャリア RNA の量を比例して増加させ（例；サンプル量 280 µl には 1,120 µl の Buffer AVL・キャリア RNA が必要）、容量の大きいチューブを使用します。

* QIAcube 上で完全自動化が可能です。プロトコールは www.qiagen.com/MyQIAcube をご覧ください。

2. マイクロ遠心チューブ中の **Buffer AVL**・キャリア RNA に血漿、血清、尿、培養細胞上清あるいは無細胞体液 **140 µl** を添加し、**15 秒間パルスボルテックス**する。
効率的に溶解するためには、サンプルと Buffer AVL が十分に混和し、完全に均一な溶液を形成していることが重要です。1 回だけ解凍したことのある凍結サンプルも使用可能です。
3. **室温 (15 ~ 25°C) で 10 分間インキュベート**する。
室温で 10 分間のインキュベーション後ウイルス粒子は完全に溶解します。インキュベーション時間の延長は、精製される RNA の品質および収量には影響しません。Buffer AVL 中で RNase は不活性化されます。感染病性因子は完全に不活性化されるとは限らないので、処理した廃液やカラムは感染性廃棄物として取り扱うことをお勧めします。
4. **チューブをスピンドウンして蓋の内側に付着した溶液を回収**する。
5. **エタノール (96 ~ 100%) 560 µl** をサンプルに添加し、**15 秒間パルスボルテックス**した後、チューブをスピンドウンして蓋の内側に付着した溶液を回収する。
エタノール以外のアルコールを使用すると RNA の収量および純度が低下します。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でください。サンプル量が 140 µl 以上の場合には、エタノールの量を比例して増加させます (例; サンプル量 280 µl には 1,120 µl のエタノールが必要)。効率的に RNA をメンブレンに結合させるためには、サンプルとエタノールが十分にミックスし完全に均一な溶液を形成していることが重要です。
6. **QIAamp Mini カラム (2 ml コレクションチューブ中) の縁を濡らさないように注意して、ステップ 5 から 630 µl の上清をアプライ**する。蓋を閉めて **6,000 x g (8,000 rpm)** で 1 分間遠心分離する。**QIAamp Mini カラムを新しい 2 ml コレクションチューブに移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる**。
遠心分離中のクロスコンタミネーションを避けるために、各スピнкаラムは密閉してください。
遠心分離中の騒音を少なくするために、遠心分離は 6,000 x g (8,000 rpm) で行ないます。最高速度での遠心操作はウイルス RNA の収量および品質には影響しません。遠心操作後、溶解液がメンブレンを完全に通過しなかった場合には、溶液が完全に通過するまで、より高速で遠心操作を行なってください。
7. **注意深く QIAamp Mini カラムを開きステップ 6 を繰り返す**。
サンプル量が 140 µl 以上の場合には、すべてのライセートがスピнкаラムにロードされるまで、この操作を繰り返してください。

8. 注意深く QIAamp Mini カラムを開き、500 μ l の Buffer AW1 を添加する。蓋を閉めて 6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心分離する。QIAamp Mini カラムを新しい 2 ml コレクションチューブ (付属品) に移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる*。

スタートサンプル量が 140 μ l 以上の場合でも、Buffer AW1 の量を増加する必要はありません。

9. 注意深く QIAamp Mini カラムを開き、500 μ l の Buffer AW2 を添加する。蓋を閉めて最高速度 (20,000 x g、14,000 rpm) で 3 分間遠心分離する。ステップ 11 をすぐに行なうか、あるいは Buffer AW2 のキャリアオーバーを避けるには、ステップ 10 を行なった後でステップ 11 に進む。

注：溶出液中に Buffer AW2 が混入していると、ダウンストリームアプリケーションに影響を及ぼすことがあります。ある種の遠心ローターは減速の際に振動するため、Buffer AW2 を含むろ液が QIAamp Mini カラムに接触することがあります。また、QIAamp Mini カラムとコレクションチューブをローターから取り出す際に、ろ液が QIAamp Mini カラムと接触することもあります。このような場合には、追加のステップ 10 を行ないます。

10. 推奨：QIAamp Mini カラムを新しい 2 ml コレクションチューブ (別途準備) に移し、ろ液の入った古いコレクションチューブは捨てる。最高スピードで 1 分間遠心操作を行なう。

11. 新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ (別途準備) に QIAamp Mini カラムをセットする。ろ液の入った古いコレクションチューブを捨てる。注意深く QIAamp Mini カラムを開き、室温に戻した Buffer AVE を 60 μ l 添加する。蓋を閉め室温で 1 分間インキュベートする。6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。

60 μ l の Buffer AVE を用いた 1 回の溶出により、ウイルス RNA の少なくとも 90% が QIAamp Mini カラムから溶出されます。40 μ l の Buffer AVE で 2 回溶出することで収量は 10% まで増加します。30 μ l 以下で溶出を行なうと収量が減少し、溶出液中の最終 RNA 濃度も増加しません。

ウイルス RNA は -20°C あるいは -70°C で保存する場合 1 年まで安定です。

* Buffer AW1 を含んだろ液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety information は英語版 Handbook 6 ページをご覧ください。

プロトコール: ウイルス RNA 精製 (吸引プロトコール)

本プロトコールは、QIAvac 24 Plus (Cat. no. 19413) あるいは相当する吸引マニホールドを用いて血漿、血清、尿、細胞培養液、無細胞体液など 140 µl からウイルス RNA を精製します。スタートサンプル量が 560 µl (140 µl の倍数) までは、これに比例して最初の容量を増やし、プロトコールに従って、数回に分けて QIAamp Mini スピンカラムにアプライします。ウイルスカ価の非常に少ないサンプルでは、サンプル精製を始める前に濃縮が必要です: プロトコール “サンプル濃縮” 参照 (13 ページ)。

あるいは、ウイルス DNA および RNA の精製を同時に行なう次のキットのどれかひとつを用いて大量のサンプルを処理します。

- QIAamp MinElute Spin Kit[†] 200 µl
- QIAamp MinElute Vacuum Kit 500 µl
- QIAamp UltraSens Virus Kit 1,000 µl

実験を始める前の重要事項

- 本プロトコールを始める前に 3 ページの “重要事項” および英語版 Handbook 15 ~ 22 ページの “Important Notes” をお読みください。
- 全ての遠心操作は室温 (15 ~ 25°C) 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°C) に戻します。
- ステップ 10 で使用する溶出用 Buffer AVE を室温に戻します。
- 5 ページの説明に従って Buffer AW1 および AW2 を調製したことを確認します。
- 3 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 AVL に添加します。
- VacConnector および VacValve を用いた操作では、英語版 Handbook 21 ページの説明に従って QIAvac 24 Plus をセットします。

[†] QIAcube 上で完全自動化が可能です。プロトコールは www.qiagen.com/MyQIAcube をご覧ください。

操作手順

1. キャリア RNA を含む Buffer AVL 560 μ l を 1.5 ml マイクロ遠心チューブにピペットで分注する。

サンプル量が 140 μ l 以上の場合には、Buffer AVL・キャリア RNA の量を比例して増加させ（例；サンプル量 280 μ l には 1,120 μ l の Buffer AVL・キャリア RNA が必要）、容量の大きいチューブを使用します。

2. マイクロ遠心チューブ中の Buffer AVL・キャリア RNA に血漿、血清、尿、培養細胞上清あるいは無細胞体液 140 μ l を添加し、パルスボルテックスによりサンプルを 15 秒間混和する。

効率的に溶解するためには、サンプルと Buffer AVL が十分に混和し、完全に均一な溶液を形成していることが重要です。1 回だけ解凍したことのある凍結サンプルも使用可能です。

3. 室温（15 ~ 25°C）で 10 分間インキュベートする。

室温で 10 分間のインキュベーション後ウイルス粒子は完全に溶解します。インキュベーション時間の延長は、精製される RNA の品質および収量には影響しません。Buffer AVL 中で RNase は不活性化されます。感染病性因子は完全に不活性化されるとは限らないので、処理した廃液やカラムは感染性廃棄物として取り扱うことをお勧めします。

4. チューブをスピンドウンして蓋の内側に付着した溶液を回収する。

5. エタノール（96 ~ 100%）560 μ l をサンプルに添加し、15 秒間パルスボルテックスした後、チューブをスピンドウンして蓋の内側に付着した溶液を回収する。QIAvac 24 Plus 吸引マニホールド上の VacConnector に QIAamp Mini カラムを差し込む。

エタノール以外のアルコールを使用すると RNA の収量および純度が低下します。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でください。サンプル量が 140 μ l 以上の場合には、エタノールの量を比例して増加させます（例；サンプル量 280 μ l には 1,120 μ l のエタノールが必要）。効率的に RNA をメンブレンに結合させるためには、サンプルとエタノールが十分に混和し、完全に均一な溶液を形成していることが重要です。プリスターパックに入っているコレクションチューブはステップ 14 の遠心分離の際に使用できます。

6. メインの吸引バルブ（吸引ポンプと吸引マニホールドの間）とネジ蓋バルブ（QIAvac 24 Plus 吸引マニホールドの端）が閉じていることを確認する。吸引ポンプのスイッチを入れる。

接続しているシステム（使用中）のみの吸引を行ない、吸引マニホールドの吸引はしないでください。

注：迅速かつ簡便に吸引するために QIAvac Connecting System あるいは Vacuum Regulator をご利用ください。英語版 Handbook 43 ページ、“Ordering Information” をご覧ください。

7. ステップ 5 のライセート液 630 μl をカラムの縁を濡らさないように注意して QIAamp Mini カラムに分注する。ピペッチチップが QIAamp Mini カラム・メンブレンに接触しないように気をつける。

8. メインの吸引バルブを開く。吸引中は QIAamp Mini カラムの蓋が開いていることを確認する。全てのライセートが QIAamp Mini カラムから流出した後、メインの吸引バルブを閉じ、マニホールドに空気を通すためにネジ蓋バルブを開く。マニホールドの圧力が下がった後、ネジ蓋バルブを閉じる。

メインの吸引バルブを閉じた後は、接続しているシステム（使用中）のみの吸引を行ない、吸引マニホールドの吸引はしないでください。

他の全ての QIAamp Mini カラムの VacValves を閉じたにもかかわらず、このステップで溶解液の全てがメンブレンを通過しなかった場合には、QIAamp Mini カラムを新しい 2 ml コレクションチューブ（別途準備）にのせ、蓋を閉め最高速度で 3 分間、あるいは溶解液が完全に通過するまで遠心操作を行ないます。7 ページのスピンプロトコールのステップ 7 に従って遠心分離します。コレクションチューブのみも販売しています。英語版 Handbook 42 ページ、“Ordering Information” をご覧ください。

遠心分離中の騒音を少なくするために、遠心分離は 6,000 \times g (8,000 rpm) で行ないます。最高速度での遠心分離は、ウイルス RNA の収量あるいは純度に影響しません。

9. ステップ 7 および 8 を繰り返す。

サンプル量が 140 μl 以上の場合には、全てのライセートが QIAamp Mini カラムを通過するまで、この操作を繰り返してください。

10. QIAamp Mini カラムの縁を濡らさないように 750 μl の Buffer AW1 を添加する。ピペッチチップが QIAamp Mini カラム・メンブレンに接触しないように気をつける。

スタートサンプル量が 140 μl 以上の場合でも、Buffer AW1 の量を増加する必要はありません。

11. メインの吸引バルブを開く。Buffer AW1 の全てが QIAamp Mini カラムから流出した後、メインの吸引バルブを閉じ、マニホールドに空気を通すためにネジ蓋バルブを開く。マニホールドの圧力が下がった後、ネジ蓋バルブを閉じる。

12. QIAamp Mini カラムの縁を濡らさないように 750 μl の Buffer AW2 を添加する。ピペッチチップが QIAamp Mini カラム・メンブレンに接触しないように気をつける。カラムの蓋を開けたままにする。

13. メインの吸引バルブを開く。Buffer AW2 の全てが QIAamp Mini カラムから流出した後、メインの吸引バルブを閉じ、マニホールドに空気を通すためにネジ蓋バルブを開く。マニホールドの圧力が下がった後、ネジ蓋バルブを閉じる。

14. **QIAamp Mini** カラムの蓋を閉める。吸引マニホールドから取り除き、**VacConnector** は捨てる。ステップ 5 で保管していた新しい 2 ml コレクションチューブに **QIAamp Mini** カラムをのせる。メンブレンを完全に乾燥するために、最高速度で 1 分間遠心操作する。
15. 新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ (別途準備) に **QIAamp Mini** カラムをセットする。ろ液の入ったコレクションチューブを捨てる。注意深く **QIAamp Mini** カラムを開く。室温 (15 ~ 25°C) に戻した **Buffer AVE** 60 μ l を添加する。蓋を閉め室温で 1 分間インキュベートする。6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。

60 μ l の **Buffer AVE** を用いた 1 回の溶出により、ウイルス RNA の少なくとも 90% が **QIAamp Mini** カラムから溶出されます。40 μ l の **Buffer AVE** で 2 回溶出することで収量は 10% まで増加します。30 μ l 以下で溶出を行なうと収量が減少し、溶出液中の最終 RNA 濃度も増加しません。

ウイルス RNA は -20°C あるいは -70°C で保存する場合 1 年まで安定です。

プロトコール：サンプル濃縮

血漿、血清、尿、脳脊髄液、骨髄およびその他の体液でウイルスカ価が非常に低いことがあります。このような場合には、最高 3.5 ml までのサンプルを濃縮して最終容量を 140 μ l にすることをお薦めします。

実験を始める前の重要事項

- Centricon®-100 (Amicon: 2 ml, Cat.No. 4211)、Microsep 100 (Filtron: 3.5 ml, Cat. No. OD100C40)、Ultrafree®-CL (Millipore: 2 ml, Cat. No. UFC4 THK 25) あるいはその他の会社の同様の遠心マイクロ濃縮ユニットを使用します。

操作手順

1. 各社のプロトコールに従って遠心マイクロ濃縮ユニットにサンプルを最高 3.5 ml アプライする。
2. 各社のプロトコールに従って最終量が 140 μ l になるように遠心操作を行なう。ある種のサンプル、特に粘性のある血漿は 140 μ l に濃縮するのは困難な場合もあります。最高 6 時間の遠心操作が必要になることがあります。
3. 1.5 ml マイクロ遠心チューブに濃縮したサンプル 140 μ l をピペットで分注し、6 ページの“ウイルス RNA 精製 (スピンプロトコール)”に進む。

プロトコール：尿からの細胞、バクテリアあるいはウイルス DNA 分離用

QIAamp Viral RNA Mini 調製法で用いる Buffer AVL は、尿中に存在する不特定多数の PCR 阻害物質を不活性化します。従って、PCR 用に用いる尿からの細胞、バクテリアあるいはウイルス DNA 分離には 6 ページの“ウイルス RNA 精製（スピンプロトコール）”を使用することをお勧めします。

尿には微量の細胞、バクテリアあるいはウイルスしか含まれていないことがあります。このような場合には、下記に従って 3.5 ml までのサンプルを 140 μ l に濃縮することをお勧めします。

グラム陽性バクテリアからの DNA 分離に関しては、弊社テクニカルサポートにお問い合わせください (Tel : 03-6890-7300、E-mail : techservice-jp@qiagen.com)。

実験を始める前の重要事項

- Centricon-100 (Amicon: 2 ml、Cat.No. 4211)、Microsep 100 (Filtron: 3.5 ml、Cat. No. OD100C40)、Ultrafree-CL (Millipore: 2 ml、Cat. No. UFC4 THK 25) あるいはその他の会社の同様の遠心マイクロ濃縮ユニットを使用します。

操作手順

1. 各社のプロトコールに従って遠心マイクロ濃縮ユニットにサンプルを最高 **3.5 ml** アプライする。
2. 各社のプロトコールに従って最終量が **140 μ l** になるように遠心操作を行なう。
粘性のある検体は 140 μ l に濃縮するのは困難な場合もあります。最高 6 時間の遠心操作が必要になることがあります。
3. **1.5 ml** マイクロ遠心チューブに濃縮したサンプル **140 μ l** をピペットで分注し、**6 ページ**の“ウイルス RNA 精製（スピンプロトコール）”に進む。

トラブルシューティング

コメント

溶出溶液中の RNA が少ないか皆無

- | | |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Buffer AVL にキャリア RNA を未添加 | Buffer AVE で溶解したキャリア RNA を、3 ページの記述に従って Buffer AVL と混和する。新しいサンプルで再度 RNA 精製を行なう。 |
| b) キャリア RNA が分解 | Buffer AVE で溶解したキャリア RNA を -20°C で保管しなかった。あるいは凍結・融解を繰り返した。または Buffer AVL・キャリア RNA を $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ で 48 時間以上保管した。新しいチューブに入ったキャリア RNA を Buffer AVE で溶解し、Buffer AVL と混和する。新しいサンプルで再度 RNA 精製を行なう。 |
| c) サンプルの凍結・融解を何度も繰り返した | サンプルの凍結・融解の繰り返しは避ける。新鮮なサンプルあるいは 1 回だけ解凍したサンプルを常に使用する。 |
| d) サンプル中のウイルス濃度が低い | 遠心マイクロ濃縮ユニットを用いてサンプル量を $140\ \mu\text{l}$ に濃縮する。新しいサンプルで再度 RNA 精製を行なう。13 ページの“プロトコール: サンプル濃縮”を参照。 |
| e) Buffer AVL 中でのタンパク質変性が不完全 | $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ での保存中に Buffer AVL・キャリア RNA に形成した沈澱物を、使用前に加熱により溶解しなかった。沈澱物を溶解して、新しいサンプルで再度 RNA 精製を行なう。 |
| f) Buffer AVL の調製が不正確 | Buffer AVL 中の沈澱物をチェックする。 80°C でのインキュベーションにより沈澱物を溶解する。 |
| g) ライセートにエタノールを未添加 (ステップ 5) | 新しいサンプルで再度精製を行なう。 |
| h) パーセンテージの低いアルコールを使用 | 新しいサンプルで再度 RNA 精製を行なう。ステップ 5 で $96\sim 100\%$ のエタノールを使用する。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。 |
| i) エタノールの代わりにイソプロパノールを使用 | 必ずエタノールを使用することを推奨。イソプロパノールの使用により収量は減少する。 |

コメント

-
- | | |
|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| j) RNA が分解 | 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。サンプル処理はできるだけ迅速に行なう。必要な場合には、サンプルに RNase Inhibitor を添加する。バッファーおよび水の RNase コンタミをチェックし、調製中に RNase が混入しないように注意する。 |
| k) Buffer AVE 中に RNase がコンタミ | コンタミしている Buffer AVE は捨てる。新しいサンプルと Buffer AVE 用の新しいチューブで再度 RNA 精製を行なう。Buffer AVE は別途購入可能。英語版 Handbook 42 ページの ordering information 参照。 |
| l) Buffer AW1 あるいは AW2 の調製が不正確 | オリジナルの Buffer AW1 および AW2 をエタノール（96 ~ 100%）で正確に希釈したか確認する。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 DNA 精製を行なう。 |
| m) Buffer AW1 あるいは AW2 を 70%エタノールで調製 | Buffer AW1 あるいは AW2 を 96 ~ 100%エタノールで調製したかチェックする。新しいサンプルで再度精製を行なう。 |
| n) Buffer AW1 と AW2 の順序を間違えて使用 | Buffer AW1 および Buffer AW2 をプロトコールの順序に従って使用したか確認。新しいサンプルで再度精製を行なう。 |

精製した RNA が続いて行なう酵素反応で適切に作用しない

- | | |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) 溶出液中の RNA が少ないか皆無 | 原因を上記の“溶出溶液中の RNA が少ないか皆無”の項目を参照してチェックする。 |
| b) Buffer AVL 中でウイルス溶解が不完全 | 実験前の温度変化により Buffer AVL・キャリア RNA 中に沈澱物が形成。調製前に Buffer AVL・キャリア RNA 中に沈澱物がないことを確認して、新しいサンプルで再度 RNA 精製を行なう。 |
| c) Buffer AVL の調製が不正確 | キャリア RNA を Buffer AVE で溶解した後、Buffer AVL に添加したかを確認（3 ページ）。 |
| d) 溶出液中にキャリア RNA が多すぎる | 使用する RT-PCR システムに最適なキャリア RNA の最大量を決定する。それに応じてキャリア RNA の Buffer AVL への添加量を調製する。 |
| e) 感度が低下 | 使用している RT-PCR システムへの溶出液の最大添加量を決定する。RT-PCR に添加する溶出液の量を減らす。 |

コメント

- f) Buffer AW1 と AW2 の順序を間違えて使用 Buffer AW1 および Buffer AW2 をプロトコールの順序に従って使用したか確認。新しいサンプルで再度精製を行なう。
- g) 逆転写酵素と *Taq* DNA ポリメラーゼの新しい組み合わせ 使用酵素を変更した場合、Buffer AVL へのキャリア RNA 添加量を調節する必要がある。

DNA コンタミネーション

サンプル中に DNA および RNA が存在

DNA の同時精製を避けるため、ウイルス RNA 調製に無細胞体液の使用を推奨。脳脊髄液、骨髄液、尿、多くのスワブの様な細胞を含むサンプルは、遠心分離あるいはろ過により細胞を除去する。遠心分離の場合には、 $1,500 \times g$ で 10 分間で細胞をペレット化し、上清をウイルス RNA 分離用を使用する。DNA フリーの RNA が必要な場合には、サンプルあるいは溶出液を RNase フリーの DNase で分解する。溶出液中の DNase は、必ず熱処理 (70°C で 15 分間) により不活性化する。

一般的な操作

- a) ライセートがメンブレンを完全に通過しない
- スピンプロトコール使用の場合：最高速度で 1 分間あるいは全ライセートがメンブレンを通過するまで遠心分離する。
- 吸引プロトコールを使用の場合：吸引ステップの際に、吸引状態が完全でなかったか、スピнкаラムの蓋が閉まっていた。吸引力を増加し、吸引中は蓋を開けておく。吸引力が増加できない場合には、QIAamp Mini カラムを新しい 2 ml コレクションチューブに移し、蓋を閉めて $6,000 \times g$ (8,000 rpm) で 3 分間、あるいはライセートが完全にメンブレンを通過するまで遠心分離する。QIAamp Mini カラムを新しい 2 ml コレクションチューブに移し、ろ液の入ったチューブは捨てる。7 ページのスピンプロトコールのステップ 7 に従って遠心分離する。

コメント

- b) メンブレンの目詰まり 凍結・融解の繰り返しにより血漿中に寒冷沈澱物が生じた。2回以上凍結・融解を繰り返した血漿は使用しない。
- c) サンプル間のクロス
コンタミ QIAamp Mini カラムの取り扱い中にサンプル間のクロスコンタミを避けるために、英語版 Handbook 18 ページの “Handling of QIAamp Mini spin columns” に従う。新しいサンプルで再度 RNA 精製を行なう。
- d) 吸引力が高すぎるか、
低すぎる 吸引力が高すぎる場合は、QIAamp メンブレンが損傷を受ける。吸引力が低すぎる場合は、RNA 収量および純度が低下する。吸引制御装置（英語版 Handbook 43 ページの Ordering Information を参照）を使用し、吸引力を -800 から -900 mbar に調節する。

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube™, MinElute®, UltraSens® (QIAGEN Group); Centricon®, Ultrafree® (Millipore Corp.).

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。

© 1999–2010 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

