

# QIAamp<sup>®</sup> UltraSens<sup>™</sup> Virus Kit

## プロトコールとトラブルシューティング

1 ml 血漿あるいは血清からのウィルス RNA、DNA を高い  
効率で精製

目次	ページ
実験を始める前の注意事項	2
インターナル・コントロール	2
遠心分離機の至適化	2
サンプル保存	2
試薬の調製	3
QIAamp Spin Column の取り扱い	4
QIAamp Ultrasens Virus プロトコール	5
トラブルシューティング	9

英語版 Handbook  
January 2003 に対応



## 実験を始める前の重要事項

初めてRNAを取り扱う方は、実験を始める前に“Handling RNA”(Handbook 23ページ)をお読みください。プロトコールのすべてのステップは室温(15~25℃)で迅速に行ってください。

### インターナル・コントロール

インターナル・コントロールは、キャリアRNAおよびBuffer ACと共に、ステップ2でサンプルに添加されます。サンプルに添加されるインターナル・コントロール量が少量の場合には、キャリアRNAと内部コントロールのマスターミックスを準備されることをお勧めします。これにより、より多い容量(より正確なピペティングが可能のために、サンプル間のばらつきが減少)を、わずか一度のピペティングステップで、各サンプルに添加することが可能になります。

注：血漿と血清にはRNaseが豊富に含まれています。処理前のサンプルにキャリアRNAあるいはインターナル・コントロールを添加しないでください。

### 遠心分離操作の至適化

核酸を最適に回収するために、プロトコールの遠心ステップ(5および12)は重要です。 $g$ 値を調節できる遠心機をこのプロトコールでご使用になることを、お勧めします。もし入手不可能な場合には、次のように換算できます：

$$rcf = 1.12 \times r \times (rpm/1000)^2$$

rcfは相対遠心力( $g$ )、 $r$ はローターの半径(mm)、rpmは遠心機の1分間の回転数です。

### ステップ5：核酸・試薬コンプレックスのペレット化

$g$ 値が高すぎるとペレットは圧縮され、再懸濁が困難になります。ある種のマイクロ遠心機モデルでは、 $g$ 値の至適化が必要なことがあります。1200× $g$ で遠心操作後、ペレットが固すぎる場合には、100× $g$ 毎に $g$ 値を減らして、ペレットを容易に再懸濁できるが、上清にデブリス・フリーになるような $g$ 値を決定し、遠心操作後、デブリスが存在する場合には、上清にデブリスがなくなるまで、100× $g$ 毎に $g$ 値を増やしてください。

特定の遠心機で正確な $g$ 値を見つけたら、その遠心機での血漿と血清サンプルにすべて使用できます。変更の必要はありません。

### ステップ12：QIAampメンブレンへの核酸の結合

コンプレックス核酸がQIAampメンブレンに確実に結合するために、このステップでは3000~5000× $g$ の遠心操作が必要です。より高い $g$ 値はスピncラムフロースルー中に核酸をロスする原因になります。

### サンプル保存

収集と遠心操作後、血漿あるいは血清サンプルは2~8℃で6時間まで保存できます。長期保存には-20℃~-80℃で凍結保存されることをお勧めします。凍結した血漿あるいは血清サンプルの解凍は一度だけにしてください。凍結・解凍を繰り返すと、タンパク

質の変性および沈澱を引き起こし、その結果ウイルスの力価が低下し、ウイルス核酸の収量低下にもつながります。さらに、凍結解凍を繰り返すとそのたびに cryoprecipitates が形成され、サンプル調製を妨害し、感度が低下します。しかし、通常は、cryoprecipitates はプロトコールの始めに Buffer AC 中で溶解されるので、これを除去する必要はありません。

## 試薬調製

### キャリア RNA

凍結乾燥したキャリア RNA の各チューブに 310 µl Buffer AVE を添加し、1 µg/µl 溶液に調整します。キャリア RNA を完全に溶かして、使いやすい容量に分注して、-20 °C で保存します。3 回以上のキャリア RNA 溶液の凍結・解凍を繰り返さないでください。

注：サンプル調製操作は、サンプル当たり 5.6 µg のキャリア RNA 用に最適化されています。特殊な増幅システムで少量のキャリア RNA が必要な場合には、プロトコールに記載されているより少ない量のキャリア RNA をサンプルに添加します（サンプル当たりのキャリア RNA 量が 5.6 µg 以下では、それぞれの特殊なサンプルタイプ毎に確認してください）。未使用のキャリア RNA は捨てます。

### Buffer AB

使用前に、ボトルに記載されているように Buffer AB 濃縮液に適切な量のエタノール（96 ~ 100 %）を添加します。Buffer AB 濃縮液は粘性があるため、ボトルを 10 回上下に動かして完全にミックスし、均一な溶液を調製してください。一度濃縮液を希釈すると室温（15 ~ 25 °C）で安定です。エタノールで希釈した Buffer AB は室温で密閉して保存すると 7 ヶ月安定です。

### Buffer AW1\*

ボトルに記載されている様に使用前にエタノール（96 ~ 100 %）を Buffer AW1 に添加します。Buffer AW1 は密閉して室温で 1 年間安定です。

### Buffer AW2†

ボトルに記載されている様に使用前にエタノール（96 ~ 100 %）を Buffer AW2 に添加します。Buffer AW2 は密閉して室温で 1 年間安定です。

\* 刺激性のあるカオトロピック塩を含んでいます。適切な安全策を講じ、取り扱いの際は手袋を着用してください。漂白剤を含む消毒薬とは併用しないでください。

† アジ化ナトリウムを含んでいます。適切な安全策を講じ、取り扱いの際は手袋を着用してください。アジドを含んだ溶液の廃棄は、研究所の廃液処理ガイドラインに従ってください。

## QIAamp Spin Columnの取り扱い

核酸増幅テクノロジーの感度は非常に高いために、QIAamp スピんカラム取り扱いの際、次のようなクロスコンタミを避ける注意が必要です。

- QIAamp スピんカラムにサンプルを注意深くアプライします。カラムの縁を濡らさないようにQIAamp スピんカラムにサンプルをピペティングします。
- すべての分注ステップで、ピペット・チップを交換します。エアロゾル防止つきチップの使用をお勧めします。
- ピペット・チップでQIAamp メンブレンに触れないでください。
- すべてのボルテックスステップの後、ふたの内側についた水滴を除去するために1.5 ml マイクロ遠心機チューブを簡単に遠心します。
- 操作中は手袋を着用してください。手袋がサンプルに接触した場合には、すぐに手袋を交換してください。
- マイクロ遠心機にセットする前にQIAamp スピんカラムのふたをします。プロトコールに記述されているように遠心操作を行います。QIAamp スピんカラムとコレクションチューブをマイクロ遠心機から取り除きます。QIAamp スピんカラムを新しいコレクションチューブにセットします。ろ過液とコレクションチューブを捨てます。ろ過液は有害廃棄物を含む可能性があるため、適切に処理してください。
- 一度に一個だけQIAamp スピんカラムを開き、エアロゾル発生を避けてください。
- 多数のサンプルを効率的に並行処理するために、ラックにコレクションチューブをセットし、この中に遠心操作後のQIAamp スピんカラムを入れます。ろ過液を含んだコレクションチューブを捨て、QIAamp スピんカラムをセットした新しいコレクションチューブをマイクロ遠心機に直接設置します。

# QIAamp UltraSens Virus プロトコール

## 注意事項

- 2ページの“ 実験を始める前の重要事項 ”をお読みください。
- サンプルを室温に戻します。
- Buffers AB、AW1、およびAW2とキャリアRNAが3ページの説明に従って調製されていることを確認します。Buffer ABとエタノールを10回上下に転倒させて、完全に攪拌し、粘性のある濃縮バッファが完全に溶解していることを確認します。
- Buffer ARを水浴で60 にします。
- プロトコールのインキュベーションステップでは振盪インキュベータ - の使用をお勧めします。
- すべての遠心ステップは室温で行ってください。

## プロトコール

1. 室温（15 ~ 25 ）に戻した血漿あるいは血清1 mlを、2 mlの遠心チューブ（別売り）にピペットで入れる。

Buffer AC を添加する前に血漿がチューブに入っていることが重要です。

サンプルが1 ml以下の場合には、PBS（phosphate-buffered saline）で1 mlに調整します。

調製には少なくとも200  $\mu$ lの血漿あるいは血清が必要です。

血漿に含まれているRNaseが、次のステップでふたに添加するキャリアRNAを急速に分解するので、マイクロ遠心チューブのふたに血漿のコンタミネーションがないことを確認してください。

2. マイクロ遠心チューブ中のサンプルの上に**0.8 mlのBuffer AC**をピペットで入れる。チューブのふたにキャリアRNA **5.6  $\mu$ l**をピペットで添加する。

このプロトコールはまた少量のキャリアRNAでも使用可能ですが、多量のキャリアRNAがダウンストリーム・アプリケーションを妨害することがわかっている場合のみ、5.6  $\mu$ g以下のキャリアRNAの使用をお勧めします。サンプル当たり5.6  $\mu$ g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で検討評価してください。

注：RNA回収率がばらつくので、サンプルにBuffer ACとキャリアRNAを添加する前にそれらをミックスしないでください。

Buffer ACを血漿に添加後、血漿中のRNaseは不活性化されます。

インタ - ナル・コントロールはこのステップで添加します。インタ - ナル・コントロールをキャリアRNAと一緒にマイクロ遠心チューブのふたにピペットで添加します。サンプルに添加するインタ - ナル・コントロール量が1  $\mu$ l以下の場合には、キャリアRNAとインタ - ナル・コントロールのマスターミックスを調製し、これをチューブのふたにピペットで添加することをお勧めします。例えば、マスターミックス

が5.6 µlキャリアRNAに対し0.5 µlのインタ - ナル・コントロールを含む場合、チューブのふたに6.1 µlのマスターミックスをピペットで添加します。ピペッティング操作の回数を減少することで、サンプル間のばらつきが減少します。

3. ふたを閉め、マイクロ遠心チューブを3回上下に転倒させ、その後10秒間ボルテックスを行い、溶液を完全にミックスする。

キャリアRNAを完全にサンプル中で溶解させるために、最初にチューブを上下に転倒させることは重要です。

4. 室温（15 ~ 25 ）で10分間インキュベーションを行う。

HIV、HCV、およびHBVの最適な回収には10分間のインキュベーションで十分です。15分以上サンプルの溶解を行わないでください。

5. サンプルを1200 x gで3分間遠心操作する。

この遠心ステップは精製操作の重要なステップです。稀なケースとして、用いる遠心機の最適な遠心スピードを決めるための実験が必要となることがあります。遠心操作後ペレットの再懸濁が困難、あるいは上清にデブリスが残っている場合には、2ページの“遠心分離操作の至適化”を参照してください。

遠心操作後、上清は清澄化され（デブリスは浮遊していない）、ペレットはマイクロ遠心チューブを逆さまにした時、そのままの形を保っていなければなりません。

6. 上清を完全に除去し棄てる。

ペレットをルーズにするためには、以下のような操作が効果的です。すなわち、上清除去後、チューブのふたを閉め、このふたを持って、チューブの底を数回指で叩きます。サンプルのボルテックスも、強固なペレットには有効です。チューブのふたにペレット片が残っていないことを確認してください。

7. 60 に温めた300 µl Buffer ARと20 µl proteinase Kを添加する。

Buffer ARを60 にプレヒーティングすると、ペレットの溶解が容易になり、proteinase Kの活性が増加します。

ピペッティングステップの回数を減少するため、温めたBuffer ARとproteinase Kのマスターミックスを新しく調製し、サンプルに添加します。例えば、サンプル10個には、3.3 mlの温めたBuffer ARを220 µlのproteinase K（ピペッティングミスのロスを考慮して両方とも10%過剰の量で調製）とミックスします。ボルテックスで10秒間ミックスして、320 µlのマスターミックスを各サンプルに添加します。

8. ペレットが完全に再懸濁されるまでボルテックスする。

注：核酸の回収を最大にするためには、ペレットが完璧に再懸濁されることが非常に重要です。たくさんのサンプルを効率的に再懸濁するには、二つのサンプルを同時に5 ~ 10秒間ボルテックスし、それから次のサンプルを2本同時にボルテックスします。これを3 ~ 5回繰り返して、それぞれのサンプルを完璧に再懸濁させます。この方法でボルテックスを連続して行った後、インキュベーションを行うと、proteinase K分解が促進されます。

9. ミキシングスピードを最大にセットして、ミキサー・インキュベータ - で **40** で **10**分間インキュベートを行う。

注： proteinase K分解は40 で10分間で十分です。このインキュベーション時間を超えないでください。

Eppendorf Thermomixer Compact (あるいは類似品) のようなミキサーインキュベータ - が入手できない場合には、ヒ - ティング・ブロックあるいは水浴を用いて40 で10分間サンプルをインキュベートし、インキュベーション5分後に5秒間ボルテックス、10分後に5秒間ボルテックスします。ボルテックスの間、サンプルの温度が低下しないように気をつけてください。

10. チューブのふたの内側についた水滴を除去するために、簡単に遠心操作をする。
11. **300  $\mu$ l Buffer AB**を添加し、ボルテックスで完璧にミックス、簡単に遠心してチューブのふたについた水滴を除去する。
12. 縁を濡らさないように**700  $\mu$ l**ライセートを**QIAamp**スピncラム ( **2 ml**コレクションチューブに設置した ) に注意してアプライする。キャップを閉めて**3000 ~ 5000 g**で1分間遠心操作を行う。
13. **QIAamp**スピncラムを**2 ml**の新しいコレクションチューブ ( 付属品 ) に設置し、ろ過液を含んだチューブを捨てる。注意深く**QIAamp**スピncラムを開き、**500  $\mu$ l Buffer AW1**を添加する。**6000 x g ( 8000 rpm )**で1分間遠心操作を行う。  
このステップでの、より高いg値での遠心操作は、精製操作には影響しません。
14. **QIAamp**スピncラムを新しい**2 ml**コレクションチューブ ( 付属品 ) にセットし、ろ過液の入ったチューブを棄てる。注意深く**QIAamp**スピncラムを開き、**500  $\mu$ l Buffer AW2**を添加する。最高速度 ( **20,000 x g、14,000 rpm** ) で3分間遠心操作する。

ある種の遠心ローターでは減速の際に振動し、ろ過液が**QIAamp**スピncラムに接触することがあります。また、**QIAamp**スピncラムとコレクションチューブをローターから除去する際、ろ過液が**QIAamp**スピncラムの底に接触することもあります。これらの場合、下記のステップをオプションで行ってください。

( オプション ) **QIAamp**スピncラムを新しい**2 ml**コレクションチューブ ( 別売り ) に設置し、ろ過液の入ったコレクションチューブを棄てる。最高速度で1分間遠心操作を行う。

15. **QIAamp** スピнкаラムを新しい1.5 ml マイクロ遠心チューブ（別売り）に設置する。ろ過液の入ったコレクションチューブを棄てる。注意深く **QIAamp** スピнкаラムを開く。ウイルス核酸を溶出するために、**30 µl Buffer AVE** をスピнкаラムメンブレンに注意深くアプライする。**6000 x g (8000 rpm)** で1分間遠心操作を行う。

高い溶出効率を得るために、QIAampメンブレン全体を Buffer AVE で潤すことが重要です。

16. さらに **30 µl Buffer AVE** を添加し、**6000 x g (8000 rpm)** で1分間遠心操作を行い、溶出を繰り返す。

2度の溶出ステップにより、ウイルス核酸を最高の回収率で得ることができます。

さらに多量の溶出液が必要な場合には、溶出後に Buffer AVE でろ過液を希釈するよりも、2回の溶出ステップで用いる Buffer AVE 量を増やします（例えば2 x 30 µlの代わりに2 x 50 µlを用いる）。



# トラブルシューティング

## コメントおよび対処法

---

核酸の回収率が低いあるいは回収できない

- a) キャリアRNAをサンプルに添加していない  
キャリアRNAを添加して、新しいサンプルで精製操作を繰り返す。
- b) キャリアRNAが分解  
Buffer ACを添加する前に、キャリアRNAと血漿を接触させない。ふたの内側が血漿でコンタミしていないことを確認する。血漿サンプルをまずマイクロ遠心チューブに添加し、攪拌する前にBuffer ACをサンプルに添加したことを確認する。
- c) EthanolをBuffer AB、AW1、AW2に添加していない  
Buffers AB、AW1、AW2をエタノールで希釈したことを確認（3ページの”試薬調製”を参照）。精製操作を新しいサンプルで繰り返す。
- d)  $g$  値が核酸コンプレックスの遠心あるいは核酸のシリカゲルメンブレン結合に適していない  
各遠心ステップで $g$ 値が推奨される範囲に入っていることを確認する。Handbook 9ページのコメントと6ページのプロトコールステップ5と12を参照する。
- e) サンプルの脂質含有量が高い  
血漿サンプルの脂質含有量が高いと、乳濁し、ペレットは小さいか全く無くなる。新鮮な1.5 mlのサンプル液を用いて、マイクロ遠心機で10,000 x  $g$ で2分間遠心操作する。脂質分画はペレットとサンプルの上に薄い層を形成する。新しい2 mlマイクロ遠心チューブ（別売り）に清澄化された血漿1 mlをピペットで入れ、スタンダードプロトコールに従ってサンプル処理を行う。
- 注：この操作は各ウイルスタイプで確認する。例えば高脂質含量のウイルスフリーの血漿に既知量のウイルスを添加し、回収されたウイルス核酸の定量を行う。

ダウンストリームの酵素反応で核酸がうまくパフォームしない。

- |                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| a) 感度の低下                             | 増幅反応に適した溶出液の最大量を決める。必要なら、増幅反応に添加する溶出量を減らす。   |
| b) Buffer AW1 およびAW2が間違っ<br>た順序で使われた | Buffer AW1 およびAW2がプロトコール中で正しい順序で使用されていることを確認する。新しいサンプルで精製操作を繰り返す。  |
| c) 溶出液中にキャリアRNAが多すぎる                 | 増幅反応に適したキャリアRNAの最大量を決める。適宜、サンプルに添加するキャリアRNA量を調整する。精製操作には1 µgのキャリアRNAで十分。   |
| d) ヒトゲノムDNAがダウン<br>ストリームの増幅反応を妨害     | 血漿に含まれているヒトゲノムDNAがウイルス核酸と一緒に精製された。DNAウイルスでは特異性を高めるために、PCR条件を至適化する。RNAウイルスではRT-PCR条件を至適化する、あるいは溶出液のDNase分解を行う。<br><br>注：サンプル中のDNAウイルスを検出したい場合にはDNase分解プロトコールを使用しない。DNase分解プロトコールを用いる場合には、常に5.6 µgのキャリアRNAを使用する。 |

— Memo —

---

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](mailto:techservice-jp@qiagen.com)  
[www.qiagen.co.jp](http://www.qiagen.co.jp)

