

# High Pure Viral RNA Kit

RT-PCR を目的としたウイルス RNA の分離用キット

Cat. No. 1 858 882

100 精製反応

バージョン 5, 2003 年 4 月  
保存温度: 15 ~25

## 1. まえがき

### 1.2 キットの内容

#### 危険性のある化学物質

結合バッファ (Binding Buffer) および阻害剤除去用バッファ (Inhibitor Removal Buffer) に は、塩酸グアニジンが含まれています。この化学物質は、皮膚への接触や、吸入、誤飲した場合に有害です。常に人間や動物用の食物から離れた場所で、これらのバッファの使用および保存を行って下さい。常に手袋を着用し、標準的な安全上の注意点を守って操作を行って下さい。

#### キットの内容

ボトル キャップ	ラベルの表示	内容
1 緑キャップ	Binding Buffer 結合バッファ	・ 25 ml x 2 バイアル ・ 4.5 M 塩酸グアニジン, 50 mM Tris-HCl, 30% TritonR X-100 (v/v), pH 6.6 (25 )
2	Poly [A]	・ 凍結乾燥、2 mg poly[A] キャリアー RNA ・ RNA の結合用
3a 黒キャップ	Inhibitor Removal Buffer (阻害剤除去用バッファ ー)	・ 阻害剤除去用バッファ 33 ml ・ 5 M 塩酸グアニジン, 20 mM Tris-HCl, pH 6.6 (25 ) (20 ml エタノールを加えた 後の最終濃度)
3 青キャップ	Wash Buffer 洗浄バッファ	・ 20 ml ・ 20 mM NaCl 2 mM Tris-HCl, pH 7.5 (25 ) (80 ml エタノールを加えた後の最終濃度)
5	Elution Buffer 溶出バッファ	・ 30 ml ・ スクレアーゼフリー、滅菌再蒸留水
6	High Pure Filter Tubes フィルターチューブ	High Pure フィルターチューブ 50 本 x 2 袋。 グラスファイバー製フリスを 2 層充填した ポリプロピレン製チューブ。700 µl までの量 の試料用。
7	Collection Tubes 回収用チューブ	回収用チューブ (2 ml 用) 8 袋

#### 追加で必要となる設備

- ・ 無水エタノール
- ・ 標準的な卓上型マイクロ遠心分離機、13,000 x g の遠心力を持つもの  
滅菌済み 1.5 ml 用マイクロ遠心チューブ

## 2. はじめに

### 2.1 製品の概要

#### キットの原理

ウイルス核酸を逆転写ポリメラーゼチェーンリアクション (RT-PCR) により解析する際の前駆条件として、血清、または血漿 から解析の対象であるウイルス核酸を分離することが必要です。試料を特製の溶解/結合バッファ (Lysis/Binding buffer) 中でインキュベートすることにより、試料中のウイルスが溶解されます。続いて、カオトロピック塩存在下で、核酸がグラスファイバーの表面に特異的に結合します (1)。この結合反応は、水分子の規則正しい配列構造が壊れ核酸がグラスファイバー製フリスの表面と相互作用することにより、わずかな秒の間に起こります。その結果グラスファイバー製フリスに核酸が吸着しやすくなります。この結合反応は核酸に特異的であるため、核酸と結合したフリスを洗浄することにより、塩、タンパク、およびその他の不純物が取り除かれ、核酸が精製されます。最終的に、低塩濃度バッファまたは水を用いて核酸を溶出します。

#### 基本的な操作ステップ

	操作の説明
1	結合バッファを用いてインキュベートし、血清または血漿を溶解します。
2	High Pure フィルターチューブに充填されたグラスファイバーに核酸が結合します。
3	グラスファイバーに結合した核酸を、特製の阻害剤除去用バッファ (Inhibitor Removal Buffer) を用いて洗浄し、RT-PCR を阻害する不要物を除去します。100U/ml より高濃度のヘパリンを含む試料物質についても、このバッファを用いた不純物除去が可能です。
4	グラスファイバーに結合した核酸を洗浄し、塩、タンパク、およびその他の細胞性不純物を除去し、核酸を精製します。
5	4 で精製された核酸を、溶出バッファ (Elution Buffer) を用いて回収します。

#### アプリケーション

High Pure Viral RNA Kit は、血清または血漿からウイルス RNA を精製することを目的としてデザインされています。

精製されたウイルス RNA をスクレアーゼフリーの水で溶出した後、直接 RT-PCR に使用します。この精製方法では、有機溶媒を用いた抽出や核酸の沈殿などを必要とする従来法に比べ、操作時間が節約されます。

キット中のバッファを使用することにより、このキットを用いて分離した核酸をテンプレートとした PCR または RT-PCR の精度が向上します。特に、ヘパリン処理された血液や臨床用プール血清を試料として、増幅反応の感度および再現性が向上することが知られています。

#### 試料物質

以下の試料物質 200 µl からウイルス核酸を精製します。

- ・ 血清
- ・ 血漿

#### 調製時間

操作全般にかかる時間: 20 分間

実際に手で操作を行う時間: 10 分未満

#### 精製回数

RT-PCR 用のウイルス RNA を 100 回精製することが可能です。

#### 品質管理

MS2 RNA の希釈系列を調製し、キットのプロトコールに従ってフィルターチューブにのせ、洗浄した後に溶出します。この溶出液から 3.5 µl をとり、RT-PCR による解析を行います。増幅産物をアガロースゲル上で検出します。200 µl の試料当たり、少なくとも  $2 \times 10^5$  RNA 分子が保証されています。代表的な実験により、PCR 反応当たり約 350 RNA 分子レベルの感度が得られることが確認されています。

#### キットの保存と安定性

キットの内容物は、15 ~ 25 °C にてラベルに表示される期限まで安定です。

ノート: ポリ (A) キャリアー RNA の再懸濁溶液を分注して保存して下さい。分注は -15 ~ -25 °C にて 12 ヶ月間安定です。

#### 3. 操作および操作に必要な設備

##### 3.1 フローチャート

1. ポリ (A) を含む結合バッファ 400 µl を加えます。
2. 血清または血漿 200 µl
3. よく混合します。High Pure フィルターチューブと回収用チューブとを組み立て、試料をフィルターチューブ上部のバッファ受けにのせます。
4. 8000 x g にて 15 秒間遠心分離します。
5. 回収用チューブと排出液を捨てます。
6. 阻害剤除去用バッファ 500 µl をフィルターチューブの上部バッファ受けに加えます。
7. 8000 x g にて 1 分間遠心分離します。
8. 回収用チューブと排出液を捨てます。
9. 洗浄バッファ 450 µl をフィルターチューブの上部バッファ受けに加えます。
10. 8000 x g にて 1 分間遠心分離します。
11. 回収用チューブと排出液を捨てます。
12. 洗浄バッファ 450 µl をフィルターチューブの上部バッファ受けに加えます。
13. 8000 x g にて 1 分間遠心分離します。
14. 回収用チューブと排出液を捨てます。
15. 溶出バッファ 50 µl をフィルターチューブの上部バッファ受けに加えます。
16. 最大スピードにて 10 秒間遠心分離します。
17. 精製されたウイルス RNA

##### 3.2 溶液の調製

##### 各種溶液の調製

下表を参照して下さい。

溶液の名称	溶液の再懸濁または調製	溶液の保存および安全性	用途
ポリ (A) キャリアー RNA	溶出バッファ (バイアル 5) 0.4 ml 中にポリ (A) キャリアー RNA (バイアル 2) を溶解します。50 µl に分注します。	-15 ~ -25	希釈溶液の調製
	希釈溶液: ポリ (A) キャリアー RNA の 50 µl 分注溶液を融解し、結合バッファ (バイアル 1) 5 ml 中によく混合します。	常に用時調製します。保存はできません。	ステップ 1
阻害剤除去用バッファ	阻害剤除去用バッファ (バイアル 3a) に無水エタノール 20 ml を加え、よく混合します。	15 ~ 25 °C にて、キットのラベルに表示される期限まで安定。	ステップ 5 の阻害物質の除去
洗浄バッファ	各洗浄バッファ (バイアル 3) にエタノール 80 ml を加え、よく混合します。	15 ~ 25 °C にて、キットのラベルに表示される期限まで安定。	ステップ 7, 9 の残存する不純物からの除去。

### 3.3 血清または血漿からのウイルス RNA の精製

#### 操作

下表を参照下さい。

ノート: 最適なインキュベーションにより収量を 2 倍に増加させ、より感度を高めることが可能です。  
試料に結合バッファー (Binding Buffer) を加えた後、単にこの混合液を 15~25 にて 10 分間インキュベートするだけです。時間に制約がある場合には、このインキュベーションのステップを省略することも可能です。

操作	
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>血清または血漿 200 µl に、キャリアー RNA を加えて調製済みの結合バッファーを 400 µl 加えます。</li> <li>よく混合します。</li> <li>ノート: より量の多い試料を用いる場合、総ての組成を同じ割合で増量し、何回かに分けてフィルターチューブにのせます。</li> </ul>
2	<ul style="list-style-type: none"> <li>High Pure フィルターチューブを回収用チューブに挿入します。</li> <li>試料の全量を、フィルターチューブ上部のバッファー受けにピペットで加えます。</li> </ul>
3	High Pure フィルターチューブを回収用チューブに挿入したまま、標準的な卓上型マイクロ遠心分離機内を用いて、約 8000 × g にて 15 秒間遠心分離します。
4	<ul style="list-style-type: none"> <li>フィルターチューブを回収用チューブから取り出し、回収用チューブと排出液を捨てます。</li> <li>フィルターチューブを、新しい回収用チューブに挿入します。</li> </ul>
5	<ul style="list-style-type: none"> <li>阻害剤除去用バッファー 500 µl を、フィルターチューブ上部のバッファー受けに加えます。</li> <li>8000 × g にて 1 分間遠心分離します。</li> </ul>
6	<ul style="list-style-type: none"> <li>フィルターチューブを回収用チューブから取り出し、回収用チューブと排出液を捨てます。</li> <li>フィルターチューブを、新しい回収用チューブに挿入します。</li> </ul>
7	<ul style="list-style-type: none"> <li>洗浄バッファー 450 µl を、フィルターチューブ上部のバッファー受けに加えます。</li> <li>8000 × g にて 1 分間遠心分離します。</li> </ul>
8	<ul style="list-style-type: none"> <li>フィルターチューブを回収用チューブから取り出し、回収用チューブと排出液を捨てます。</li> <li>フィルターチューブを、新しい回収用チューブに挿入します。</li> </ul>
9	<ul style="list-style-type: none"> <li>洗浄バッファー 450 µl を、フィルターチューブ上部のバッファー受けに加えます。</li> <li>8000 × g にて 1 分間遠心分離します。</li> <li>フィルターチューブを回収用チューブに挿入したまま遠心分離機内に設置し、最大スピード (約 13,000 × g) にて 10 秒間スピンし、洗浄バッファーを完全に除去します。</li> </ul>
10	<ul style="list-style-type: none"> <li>フィルターチューブを回収用チューブから取り出し、回収用チューブと排出液を捨てます。</li> <li>フィルターチューブを、新しいヌクレアーゼフリーの 1.5 ml 反応チューブに挿入します。</li> </ul>
11	<ul style="list-style-type: none"> <li>溶出バッファー (Elution Buffer) 50 µl を、フィルターチューブ上部のバッファー受けに加えます。</li> <li>フィルターチューブを反応チューブに挿入したまま、8000 × g にて 1 分間遠心分離します。</li> </ul>
12	安定化されたウイルス RNA が、マイクロ遠心チューブ内に溶出されます。

#### 試料の保存

下表を参照下さい。

ウイルス核酸試料の使用または保存	使用または保存方法
直接使用する場合	溶出されたウイルス RNA を直接 RT-PCR に使用します。
直接使用せず、保存する場合	使用時まで溶出されたウイルス RNA を -80 にて保存します。

### 4. 結果

#### 実験結果

RNA ウィルス (HCV, HGV, HIV) 陽性試料を用いて、High Pure Viral RNA Kit の性能が確認され、RT-PCR による解析で特異性および感度について良好な結果が示されています。

### 5. 付録

#### 5.1 トラブルシューティング

##### トラブルシューティング表

下表を参照下さい。

問題点	原因として考えられること	対処方法
核酸の収量および精製度が低い	キットの保存条件が最適でなかった。	キットを受け取ったら、直ちに 15~25 にて保存します。
	バッファーまたはその他の試薬が劣化する条件下に置かれた。	<ul style="list-style-type: none"> <li>総てのバッファーを 15~25 にて保存します。</li> <li>総ての試薬ボトルについて、それぞれ使用後に栓をしっかりと閉め、pH、安定性、およびコンタミネーションフリーの状態を保ちます。</li> <li>凍結乾燥 Poly(A) 試薬を再懸濁した後に分注し、-15~-25 にて保存します。</li> </ul>
	洗浄バッファー (Wash Buffer) または阻害剤除去用バッファー (Inhibitor Removal Buffer) にエタノールを加えなかった。	<ol style="list-style-type: none"> <li>これらのバッファーの使用前に、無水エタノールを加えます。</li> <li>エタノールを加えた後、バッファーをよく混合し、15~25 にて保存します。</li> <li>バッファーの容器に、エタノール添加の有無について常に記入するようにします。</li> </ol>
試薬と試料とが完全に混合されていなかった。	各試薬を加えた後、必ず試料チューブをよく混合します。	

核酸が水にほとんど溶出されない	水の pH が適切でなかった。	キットで供給される以外の水やバッファーを使用してフィルターチューブから核酸を溶出する場合、それらの pH がキットに含まれる溶出バッファー (Elution Buffer) と同じであることを確認します。
精製 RNA の吸光度 ( $A_{260nm}$ ) の値が高すぎる。	グラスファイバーが核酸とともに溶出され、吸光度測定の妨げになっている。	<ol style="list-style-type: none"> <li>溶出された精製 RNA を含むチューブから High Pure フィルターチューブを取り出し、精製 RNA を含むチューブを最大スピードで 1 分間スピンします。</li> <li>上清を新しいチューブに移します。この際にもとのチューブの底に沈んでいるグラスファイバーを取り出さないよう注意します。</li> </ol>
RNA の収量が低い	RNase 活性レベルが高い。	<ul style="list-style-type: none"> <li>RNase フリーの操作環境になるよう、注意を払います。</li> <li>試料を直ちに処理するか、あるいは使用時まで -80 にて保存します。</li> <li>溶出した RNA を RT-PCR などの試料として直接使用するか、あるいは速やかに -80 にて保存します。</li> </ul>
	キャリアー RNA が完全に溶解されていない。	Poly(A) キャリアー RNA は、結合バッファー中に溶解して保存中に沈殿を生じます。溶液の調製 (3.2) に概説される注意事項に該当し、キャリアー RNA を加えた溶解/結合バッファー溶液を調製します。

#### 5.2 操作に役立つヒント

##### 遠心分離

標準的な卓上型マイクロ遠心分離機 (Eppendorf 5415C など) を使用する際の、回転数 (rpm) と遠心力 (g) との対照表として、下表をご利用下さい。

回転数 (rpm)	遠心力 (×g)
14 000	13 000
12 000	10 000
10 000	7 000
8 000	4 500
5 500	2 200
5 000	2 000

#### 5.3 リファレンス

1 Vogelstein, B. & Gilletpie, D. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 615-619

#### 5.4 関連製品

##### キット

製品名	包装単位	製品番号
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	100 精製反応	1 858 874
High Pure PCR Template Preparation Kit	100 精製反応	1 796 828
High Pure Viral Nucleic Acid Buffer Set	100 反応	2 011 875
High Pure 16 System Viral Nucleic Acid Kit	96 反応	2 011 816

##### 単純試薬

製品名	包装単位	製品番号
Reverse Transcriptase, M-MuLV	500 ユニット	1 062 603
Reverse Transcriptase AMV	500 ユニット	1 495 062
	1000 ユニット	109 118

Triton は Rohm & Haas Company, Philadelphia, PA. USA の商標です。

6. 操作のクイックリファレンス

	操作	容量	rpm/時間 温度/時間
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>血清または血漿に、キャリアーRNA の希釈溶液(キャリアーRNA を加えた結合バッファー)を加えます。</li> <li>よく混合します。</li> </ul>	200 µl 400 µl	
2	<ul style="list-style-type: none"> <li>High Pure フィルターチューブを、回収用チューブに挿入します。</li> <li>試料全量をフィルターチューブ上部のバッファー受けにピペットで加えます。</li> </ul>		
3	High Pure フィルターチューブを回収用チューブに挿入したまま、標準的な卓上型遠心分離機を用いて遠心分離します。		8000 x g にて 15 秒間
4	<ul style="list-style-type: none"> <li>フィルターチューブを回収用チューブから取り出し、回収用チューブと排出液を捨てます。</li> <li>フィルターチューブを、新しい回収用チューブに挿入します。</li> </ul>		
5	<ul style="list-style-type: none"> <li>フィルターチューブ上部のバッファー受けに、阻害剤除去用を加えます。</li> <li>遠心分離します。</li> </ul>	500 µl	8000 x g にて 1 分間
6	<ul style="list-style-type: none"> <li>フィルターチューブを回収用チューブから取り出し、回収用チューブと排出液を捨てます。</li> <li>フィルターチューブを、新しい回収用チューブに挿入します。</li> </ul>		
7	<ul style="list-style-type: none"> <li>フィルターチューブ上部のバッファー受けに、洗浄バッファーを加えます。</li> <li>遠心分離します。</li> </ul>	450 µl	8000 x g にて 1 分間
8	<ul style="list-style-type: none"> <li>回収用チューブと排出液を捨てます。</li> <li>フィルターチューブを、ヌクレアーゼフリーの 1.5 ml 反応チューブに挿入します。</li> </ul>		
8	<ul style="list-style-type: none"> <li>フィルターチューブ上部のバッファー受けに、洗浄バッファーを加えます。</li> <li>遠心分離します。</li> <li>High Pure フィルターチューブを回収用チューブに挿入したまま、さらにスピンドル、洗浄バッファーを完全に取り除きます。</li> </ul>	450 µl	8000 x g にて 1 分間 最大スピード(約 13,000 x g)にて 10 秒間
9	<ul style="list-style-type: none"> <li>回収用チューブと排出液を捨てます。</li> <li>フィルターチューブをヌクレアーゼフリーの 1.5 ml 反応チューブに挿入します。</li> </ul>		
10	<ul style="list-style-type: none"> <li>フィルターチューブ上部のバッファー受けに、溶出バッファーを加えます。</li> <li>フィルターチューブを反応チューブに挿入したまま、遠心分離します。</li> </ul>	50 µl	8000 x g にて 1 分間
11	反応チューブ(マイクロ遠心チューブ)に、安定なウイルス RNA が溶出されます。		



ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社  
〒105-0014 東京都港区芝 2 丁目 6 番 1 号  
www.roche?applied-science.com  
TEL. No. : 03-5443-5287  
FAX. No. : 03-5443-7098  
E-Mail : tokyo.biochemicals@roche.com

本製品能書(英語版)は下記 URL よりご覧頂けます。

<http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1585882a.pdf>