

Nucleic Acid Purification Kit

MagExtractor™
-Viral RNA-

(Code No. NPK-401F)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A4030K

— 目次 —

[1] はじめに	(1)
[2] ご使用になる前に	(1)
[3] キットに含まれるもの	(2)
[4] 抽出を始める前に	(2)
1. キットの他に必要なもの	(2)
2. 試薬の準備	(3)
3. サンプルの準備	(3)
4. 抽出フロー	(3)
[5] プロトコール	(4)
1. MFX-2000/2100を用いたウイルスRNAの抽出	(4)
(1) プロトコールの選択	(4)
(2) 加温ブロック, 回収ブロックの温度設定	(5)
(3) 専用フィルター付きチップのセット	(5)
(4) 専用チューブのセット	(5)
(5) 試薬のセット	(6)
(6) サンプルのセット	(8)
(7) 抽出開始	(8)
(8) サンプルの回収	(9)
2. マニュアル(用手法)によるウイルスRNAの抽出	(10)
[6] トラブルシューティング	(12)
(1) ビーズがうまく分注されない	(12)
(2) 磁性ビーズが凝集し、ほぐれない	(12)
(3) 回収RNA溶液が着色する	(12)
(4) RT-PCRがうまくいかない	(13)

ご注意)

本キットに含まれる試薬はすべて研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。本キットの使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

FALCON は、BECTON DICKINSON社の登録商標です。

[1] はじめに

MagExtractor™ -Viral RNA-は、カオトロピック剤の存在下で核酸がシリカに吸着する性質を利用したウイルスRNA抽出用試薬です。本キットを自動核酸抽出装置 MFX-2000/2100で使用することにより、血清や血漿からウイルスRNAを、簡便に自動抽出することができます*1。また、本キットは、マニュアル(用手)抽出法のキットとしてもお使いいただけます。なお、MFX-2000/2100を用いて抽出を行う際はMFX-2000/2100の取扱い説明書もあわせてお読みください。

特長

- 核酸抽出用装置MFX-2000/2100を用いることにより、血清や血漿からウイルスRNAを自動抽出することが可能です。
- フェノール、クロロホルムなどの危険な溶媒を使用しないため、安全です。
- エタノール沈殿操作、遠心分離操作を必要としないため、短時間(約15分)での抽出が可能です。
- 抽出されたRNAはDEPC処理済蒸留水中に回収されますので、直ちにRT-PCR等の検出に用いることができます。

[2] ご使用になる前に

MagExtractor™ -Viral RNA-は以下のサンプルに対応します。

対応サンプル	サンプル量
血清、血漿など	~300 µl

- 凍結融解を繰り返したものなど、サンプルの状態によっては、抽出効率の低下がみられることがあります。
- 本キットではRNAとDNAを分離することはできません。従って、サンプル中にDNAが存在する場合は、回収RNAにDNAが混入することがあります。

*1 MFX-2000/2100には、別途MagExtractor™ -Viral RNA- 用ソフト(オプション/ Code No.:MFX-601)が必要です。さらに、加温機能が必要となりますので、MFX-2000の場合には、標準仕様(加温, 簡易保冷機能付き / Code No.:MFX-102)または特別仕様(加温, 電子冷却機能付き/ Code No.:MFX-103)の機種をお使いください。

[3] キットに含まれるもの

本キットには100サンプル分の抽出ができる試薬が含まれています。以下の温度で保存してください。

77ml	.. 溶解・吸着液(タンパク質変性剤含有) 4°C
154ml	.. 洗浄液 I (タンパク質変性剤含有) 4°C
200ml	.. 洗浄液 II (低塩濃度緩衝液) 4°C
10ml	.. 溶出液(RNase free蒸留水) 4°C
8ml	.. 磁性ビーズ 4°C

- 試薬は、ご使用前にあらかじめ室温に戻してからご使用ください。特に、溶解・吸着液は4°Cにて塩が析出する場合がありますので、室温に戻した後、攪拌し、析出した塩を完全に再溶解させた後にご使用ください。
- 溶解・吸着液と洗浄液 I には、高濃度のタンパク質変性剤が含まれていますので、取扱いには十分注意し、手袋を着用するなどの予防措置を講じてください。万一、試薬が皮膚に付着した場合には、十分に水洗を行い、また、目に入った場合には、直ちに水洗した後に医師の手当を受けてください。
- 溶解・吸着液は、2-メルカプトエタノールと100:1 (v/v) の割合で混合して使用します。2-メルカプトエタノールは、キットには添付されておりませんので、別途ご用意ください。混合液は4°C保存で3ヶ月間はご使用いただけます。

[4] 抽出を始める前に

1. キットの他に必要なもの

(1) 試薬

- 2-メルカプトエタノール (2ME) (「特級」以上のものをお薦めします)

(2) 器具・機材

MFX-2000/2100をご使用になる場合

- 抽出専用チューブ (Code No.: MFX-301)
- 抽出専用6連チューブ (Code No.: MFX-302)
- 専用フィルター付きチップ (Code No.: MFX-402A)
- 試薬セット用チューブ (50ml用, 15ml用, 2ml用)^{*1}

^{*1} 試薬セット用チューブには、以下の製品をおすすめします。50mlチューブ：BLUE MAX 2170, 15mlチューブ：BLUE MAX Jr 2196(いずれもBECTON DICKINSON社製), 2mlマイクロチューブ：2220, 2200 (イナオプティカ社製), 72.693, 72.694 (アシスト社製) のいずれか

マニュアル(用手法)でご使用になる場合

- 磁気スタンド(市販のもの)*1
- チューブミキサー
- ヒートブロック(ウォーターバスでも可)(65°C)
- 簡易卓上遠心機(3,000~5,000r.p.m.くらいの簡易遠心の出来るもの)

2. 試薬の準備

- 溶解・吸着液は、2MEと100:1(v/v)の割合で混合してから使用します。必要量だけ調製する場合は、1回分あたり、700 μ lの溶解・吸着液と7 μ lの2MEを混合します。また、全量調製する場合は、溶解・吸着液のボトル(77ml)に770 μ lの2MEを加え調製します。この混合液(溶解・吸着液(2ME含))は4°Cにて保存してください(3ヶ月間保存可能)。
- 全ての試薬は、あらかじめ室温に戻してからご使用ください。

3. サンプルの準備

- 本キットを用いてMFX-2000/2100にて抽出を行う場合、血清/血漿をそのまま装置にセットするプロトコールと、溶解・吸着液(2ME含)にてあらかじめ溶解(Lysis)した血清/血漿をセットするプロトコールがあります。
(詳細は、[5]-1-(1)プロトコールの選択をご参照ください。)
- あらかじめサンプルを溶解する場合は、血清/血漿~300 μ lに、液量がトータル800 μ lになるように溶解・吸着液(2ME含)を加え、良く攪拌後、スピンドアウンしてください。この際、血清/血漿を300 μ l以上用いますと、抽出効率の低下・抽出動作の異常を招きますのでご注意ください。

4. 抽出フロー

MagExtractor™ -Viral RNA-を用いた抽出フローを以下に示します。

サンプル(血清/血漿~300 μ l)

- l←溶解・吸着液(2ME含).....[サンプルの溶解]
- l←磁性ビーズ:約10分間.....[ウイルスRNAの磁性ビーズへの吸着]
- l B/F分離
- l←洗浄液 I :約30秒(2回).....[非特異的吸着物の除去]
- l B/F分離
- l←洗浄液 II :約20秒(2回).....[タンパク質変性剤の除去]
- l B/F分離
- l←溶出液:約2分間(65°C).....[ウイルスRNAの磁性ビーズからの溶離]
- l B/F分離
- 上清回収(約50 μ l)

*1 弊社マグネチックスタンドMagical Trapper (Code No.:MGS-101)などがご使用いただけます。

[5] プロトコール

本キットは、MFX-2000/2100にて使用することにより自動抽出ができるほか、マニュアル(用手)法にてでもご使用いただけます。マニュアルにて抽出を行う場合には10ページの「2. マニュアルによるウイルスRNAの抽出」をご覧ください。

1. MFX-2000/2100を用いたウイルスRNAの抽出

MFX-2000/2100をご使用になる前には、MFX-2000/2100の取扱い説明書を必ずお読みください。本キットをMFX-2000/2100にて使用する場合、MFX-2000/2100にはMagExtractor™ -Viral RNA-用ソフト(オプション/Code No. :MFX-601)がインストールされている必要があります。さらに、加温機能が必要となりますので、MFX-2000の場合には、標準仕様(加温, 簡易保冷機能付き / Code No. : MFX-102)または特別仕様(加温, 電子冷却機能付き/ Code No. : MFX-103)の機種をお使いください。

(1) プロトコールの選択

MFX-2000/2100にはウイルスRNA抽出用プロトコールとして以下の4つが用意されています。これらは、MFX-2000/2100による溶解・吸着液の自動分注の有無(アリ, ナシの2通り)及び、処理する血清／血漿量(100 μ l, 300 μ lの2通り)の組み合わせにより設定されています。溶解吸着液の自動分注の無いプロトコール(41,42)を選択された場合は、血清／血漿に溶解・吸着液を加えてあらかじめ溶解したサンプルをセットします。必要に応じていずれかを選択してください。

プロトコール番号	液晶の表示	サンプル
41	V- RNA:ブンチュウナシ100	溶解済血清/血漿(800 μ l)*
42	V- RNA:ブンチュウナシ300	溶解済血清/血漿(800 μ l)*
43	V- RNA:ブンチュウアリ100	血清/血漿(100 μ l)
44	V- RNA:ブンチュウアリ300	血清/血漿(300 μ l)

*血清/血漿にあらかじめ溶解吸着液を加えて、全量を800 μ lとしたものをセットします。この際、用いた血清／血漿量が \sim 100 μ lの場合はプロトコール41番を、100 \sim 300 μ lの場合は、プロトコール42番を選択します。

- 1回の運転では、1つのプロトコールのみ選択可能です。
- 抽出に必要な時間は、試薬分注の時間を除いて1サンプルあたり約15分です。

(2) 加温ブロック、冷却(回収)ブロックの温度設定

加温ブロック、冷却ブロックを以下の温度に設定します。

	加温ブロック	冷却ブロック
設定温度	65℃	10℃

- 簡易保冷ブロックの場合、ブロックを冷蔵庫もしくは低温室であらかじめ冷やしておきます。簡易保冷ブロックは短時間の回収液の保冷に適しています。
- ブロックの温度の設定方法は、MFX-2000/2100の取扱い説明書をご参照ください。

(3) 専用フィルター付きチップのセット

専用フィルター付きチップ(Code No.:MFX-402A)を、チップラックにセットします。セット本数は次表を参考にしてください。

サンプル数(N)	必要チップ本数
1~12	N+3
13~24	N+5

- 必ず専用のフィルター付きチップ(Code No.:MFX-402A)をご使用ください。
- チップを規定本数より多くセットすることは特に問題ありません。
- チップはガンマー線滅菌されております。手袋を着用してセットしてください。
- チップはチップラックの左下より縦向きに必要量を並べます。詳しいセット位置はMFX-2000/2100の取扱い説明書をお読みください。

(4) 専用チューブのセット

専用チューブ(Code No.:MFX-301)を抽出ラックのA ~ E、加温ブロック、冷却ブロックにサンプル数分セットします。

- 抽出ラックのA ~ E、加温ブロックには専用チューブ以外はセットしないでください。トラブルの原因となることがあります。
- 冷却ブロックにはスクリュウキャップ式の1.5mlチューブをセットすることもできます(回収液の保存により適しています)。
- 詳しいセット方法はMFX-2000/2100の取扱い説明書をお読みください。

(5) 試薬のセット

試薬はそれぞれ指定の大きさのチューブに移し、試薬ラックの所定の位置にセットします。サンプル数に応じて必要な試薬量が異なります。7ページの表に従って試薬をセットしてください。

試薬名	セット位置	チューブ
溶解・吸着液(2ME含) ¹	1	50mlチューブ
洗浄液 I	2	
洗浄液 II	3	
磁性ビーズ	7	2mlマイクロチューブ
溶出液	10	15mlチューブ
*1 プロトコール43、44でのみ必要		

- 試薬の分注は、少量の場合はピペッターを用い、多量の場合は試薬チューブの横の目盛りを目安に行ってください。
- 磁性ビーズはあらかじめよく攪拌して試薬ラックにセットしてください。
- 抽出後残った試薬は、再びお使い頂けますが、長時間放置した場合、乾燥などにより液組成が変化する可能性がありますので、ご注意ください。特に磁性ビーズを長時放置した場合、懸濁液中の塩が析出することがあります。このような場合には、新しい試薬をご使用ください。
- 規定量を越える量の試薬をセットしないでください。ノズルの汚染や液ダレの原因になります。
- 溶出液はキットの溶出液(DEPC処理済蒸留水)以外にも、低塩濃度の中性溶液であれば用いることができます。ただし、その場合の抽出効率等については、あらかじめ予備実験を行い、ご確認ください。

【各試薬の分注量】

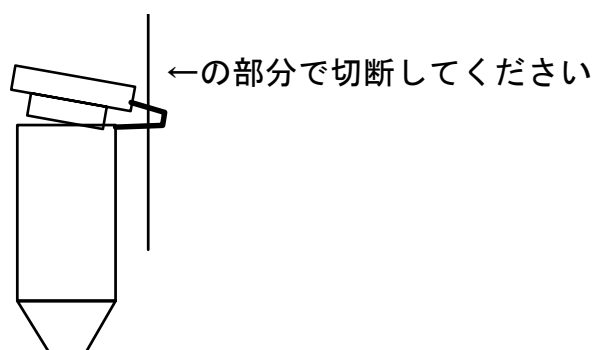
試薬名	溶解・吸着液	洗浄液 I	洗浄液 II	磁性ビーズ	溶出液	
チューブの 大きさ	50ml	50ml	50ml	2.0ml	15ml	
セット位置	1	2	3	7	10	
各試薬チューブに分注する試薬量 (ml)						
サンプル数	1	5	5	5	0.5	0.5
	2					
	3			10		
	4		10			
	5					1
	6			15	0.8	
	7	10	15			
	8			20		
	9					1.5
	10					
	11		20	25	1.1	
	12					
	13					
	14	15	25	30		
	15					
	16				1.4	
	17			35		2
	18		30			
	19			40		
	20					
	21	20	35		1.7	
	22			45		
	23					
	24					

サンプル数に応じた各試薬の分注量の目安を記載しています。余剰分を含んでいますので、この数値に従って試薬を試薬チューブへ分注し、セットしてください。

(6) サンプルのセット

血清/血漿(プロトコール43番の場合100 μ l、44番の場合300 μ l)、あるいは、あらかじめ溶解・吸着液(2ME含)を加えて溶解させた溶解済み血清/血漿(プロトコール41、42番の場合、いずれも全量800 μ l)を抽出ラックのサンプルセット位置にセットします。サンプルのセット位置には1~24までの番号が抽出ラックの各ホールの手前にナンバリングされています。

- サンプルの調製はスクリューキャップ式の1.5mlサンプルチューブをおすすめします。キャップを外した状態で、セット位置にセットしてください。
- 通常の1.5mlチューブが使われる場合は、キャップの部分をはさみ等で切断し、セットしてください。切断の際はくれぐれも安全にご注意ください。



(7) 抽出開始

以下の要領で、装置をスタートさせます。

- サンプル、試薬チューブ(試薬量)、専用チューブ(抽出ラック、加温ブロック、冷却ブロック)、専用チップが説明書通りにセットされていることを確認し、また、試薬チューブは完全に垂直になっているかも確認します。
- 各ラックのセット位置と、ステージが完全に奥まで収納されていることを確認し、前面扉を閉めてください。
- 液晶画面にプロトコール番号、サンプル数を入力します。
- 抽出処理に必要なチップ数が表示されますので確認後、必要に応じてチップラック上の最初のチップをとる位置を入力します。
- “スタートキーヲオシテクダサイ”と画面に表示されていることを確認して“START”キーを押してください。
- 抽出操作が始まると液晶画面に“ドウサチュウ”と表示されます。

(8) サンプルの回収

抽出操作が終了したら、前面の扉を開けてサンプルを取り出します。

- 抽出が完了すると、抽出されたウイルスRNAは回収ブロック上のチューブに回収されます。また、液晶画面には、再び“スタートキーヲオシテクダサイ”と表示されます。
- 装置が完全に停止していることを確認した後、回収ブロックよりチューブを取り出し、使用するまでは氷上にて保存してください（長期間保存する場合は、-20℃以下にて保存してください）。
- 回収液量はおよそ55 μ lとなります。
- 回収液中に微量の磁性ビーズが混入することがあります。このような場合には、RT-PCR等の解析に用いる前に、一度軽く遠心し、上清をご使用ください。
- 回収液には低濃度の界面活性剤が残留し、泡立ちが見られる場合がありますが、RT-PCR等の解析にはそのままご使用いただけます。

2. マニュアル(用手法)によるウイルスRNAの抽出

本キットはマニュアル法でもご利用いただけます。

- 磁性ビーズの分離には、市販の1.5mlマイクロチューブ用磁気スタンドを使用されることをおすすめしますが、卓上遠心機で3,000r.p.m.、5秒間程度の遠心分離によって分離することも可能です。
- ヒートブロックをあらかじめ65°Cにセットしておきます。

【操作フロー】

血清/血漿 ~300 μ l ①

l \leftarrow 700 μ l 溶解・吸着液 ②

l 10sec 攪拌 (ボルテックス攪拌強度: 最大)

l \leftarrow 50 μ l 磁性ビーズ溶液 (転倒攪拌して均一に混和した後に加える) ③

l 10min 攪拌 (ボルテックス攪拌強度: 最大)

l B/F 分離 ④

l \leftarrow 700 μ l 洗浄液 I ⑤

l 10sec 攪拌 (ボルテックス攪拌強度: 最大)

l B/F 分離 ⑥

l \leftarrow 700 μ l 洗浄液 I ⑦

l 10sec 攪拌 (ボルテックス攪拌強度: 最大)

l B/F 分離

l \leftarrow 900 μ l 洗浄液 II ⑧

l 10sec 攪拌 (ボルテックス攪拌強度: 最大)

l B/F 分離 ⑨

l \leftarrow 900 μ l 洗浄液 II ⑩

l 10sec 攪拌 (ボルテックス攪拌強度: 最大)

l B/F 分離

l スピンドウン後, 再度上清を除去 ⑪

l \leftarrow 55 μ l 溶出液 ⑫

l 5sec 攪拌 (粒子を懸濁)

l 65°C, 2min 放置 ⑬

l 5sec 攪拌

l スピンドウン ⑭

上清 (約50 μ l)

- ①1.5mlマイクロチューブに血清あるいは血漿(～300 μ l)を分注します。
- ②溶解・吸着液700 μ lを加え、良く攪拌後、スピンドウンします。
- ③磁性ビーズ50 μ lを加えた後、チューブミキサーを使用して10分間激しく攪拌します。
 - 磁性ビーズは、あらかじめよく懸濁してからお使いください。
 - 攪拌強度を最大にしたチューブミキサーを使用して室温で攪拌してください。この際、磁性ビーズが沈降せずに、十分に懸濁されていることを確認してください。
- ④チューブを磁気スタンドにセットし磁性ビーズを磁石に寄せ、さらに数回転倒混和することにより、キャップの内側についた磁性ビーズを完全に磁石に寄せます。続いて、磁気スタンドごと軽く振り、キャップに付いた溶液を落とした後、ピペットにて上清を取り除きます。
 - チューブを磁気スタンドにセットした状態で、マイクロピペットを使用して可能な限り上清を除去してください。
 - 磁気スタンドがない場合は、簡易卓上遠心機を用い3,000r.p.m.前後で約5秒間遠心します。遠心により粒子がほぐれにくくなることがありますので、攪拌時に粒子が懸濁されていることを確認してください。
- ⑤チューブに洗浄液 I を700 μ l加えた後、ボルテックスミキサーを使用して、10秒間程度、激しく攪拌します。
 - 磁性ビーズが、均一に分散するまで行ってください。
- ⑥ステップ④の操作を行います。
- ⑦ステップ⑤⑥をもう一度繰り返します。
- ⑧チューブに洗浄液 II を900 μ l加えた後、ボルテックスミキサーを使用して、10秒間程度、激しく攪拌します。
 - 磁性ビーズが、均一に分散するまで行ってください。
- ⑨ステップ④の操作を行います。
- ⑩ステップ⑧⑨をもう一度繰り返します。
- ⑪チューブを磁気スタンドからはずし、軽く遠心(スピンドウン)した後、再度ていねいに上清を取り除きます。
- ⑫溶出液55 μ lを加えた後、5秒間程度攪拌し、磁性ビーズを完全に懸濁させます。
- ⑬65°Cにて2分間加熱した後、再度5秒間程度攪拌し、ウイルスRNAを磁性ビーズから溶出させます。
- ⑭磁気スタンドあるいはスピンドウンにより磁性ビーズを集めた後、ウイルスRNAの含まれる上清を回収します。使用するまでは氷上にて保存します。
(長期間保存する場合は、-20°C以下にて保存してください。)

[6] トラブルシューティング

トラブルが生じた場合には、以下の対策をご参照ください。

(1) 磁性ビーズがうまく分注されない

原因	対策
磁性ビーズの沈降による固化	ボルテックスを行って均一になるまで懸濁させてください。なお、懸濁後は、速やかに(10分以内に)抽出をスタートするようにしてください。
蒸発による磁性ビーズ懸濁液成分の濃縮、結晶化	今後のトラブルを防ぐために、2mlチューブに残ったビーズは廃棄してください。また、保存の際や短時間でも放置される場合には、ボトルやチューブのフタを強く締めるようにしてください。

- その他の機器動作に関するトラブルシューティングは、MFX-2000/2100の取扱い説明書にも記載していますので、そちらのほうもあわせてご覧ください。

(2) 磁性ビーズが凝集し、ほぐれない

原因	対策
サンプル過剰	サンプルを過剰に処理した場合、粒子が凝集し、正常に抽出できない場合があります。また、凍結融解を繰り返したするなど、サンプルによっては、100mlでも凝集がみられる場合があります。サンプル量を減らした条件で再度検討してください。
セット試薬の不足	MFX-2000/2100で自動抽出する際に、試薬のセット量が少なかった場合、抽出が正常にできない場合があります。抽出チューブに試薬が残っているかを確認してください。

(3) 回収RNA溶液が着色する

原因	対策
磁性ビーズの混入	磁性ビーズが回収液に混入すると回収液が茶色く見えることがあります。回収液を軽く遠心して、上清をご使用ください。

(4) RT-PCRがうまくいかない

原因	対策
磁性ビーズの混入	磁性ビーズがRT-PCR反応液に混入すると反応を阻害することがあります。回収液を軽く遠心して、上清をご使用ください。
RNAの分解	過剰のサンプルを用いて抽出したRNA溶液にはRNaseが残存することがあります。サンプル量を減らした条件で再度検討してください。
PCR増幅産物の混入	水、正常血清等をサンプルとしたネガティブコントロールにバンドが見られる場合は、以前に増幅したPCR増幅産物のコンタミが考えられます(キャリアオーバーコンタミネーション)。抽出を行うエリア、PCR反応溶液を調製するエリア、検出(電気泳動等)を行うエリアを区別し、抽出及び反応溶液を調製するエリアにPCR増幅産物を持ち込まない等の対策を講じてください。



【製造・販売元】

ー納期・注文に関するお問い合わせー

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (大阪)
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (東京)
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目 17 番 10 号 住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

ー製品の内容・技術に関するお問い合わせー

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00 (土、日、祝を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <http://www.toyobo.co.jp/bio>