

ハンドブック

RNA ウイルスキット
QuickGene-AutoS RNA virus Kit
(AS-RV)

Contents

1. はじめに	3
2. キット内容物と保存条件	3
2 - 1. キット内容物	3
2 - 2. 保存条件	3
2 - 3. 試薬ストリップの内容物.....	4
3. キット以外にご準備いただくもの.....	5
4. 取扱上の安全注意事項	5
5. 使用上の注意事項	6
6. 品質管理	8
7. プロトコール	9
7 - 1. 試薬の準備.....	9
7 - 2. ライセート作製プロトコール.....	10
7 - 2 - 1. 培養細胞上清液からの RNA 抽出プロトコール.....	10
7 - 2 - 2. めぐい液(鼻咽頭、鼻腔、咽頭など)からの RNA 抽出プロトコール.....	11
7 - 3. 試薬ストリップの準備.....	11
7 - 4. QG-Auto12S/24S 分離操作	11
8. トラブルシューティング.....	12
9. オーダリング・インフォメーション	14

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。
診断および臨床用試薬として使用しないでください。

1. はじめに

本キットは、QuickGene-Auto12S(以下 QG-Auto12S)、あるいは QuickGene-Auto24S(以下 QG-Auto24S)の抽出工程で使用する試薬キットです。

本キットの特徴は以下のとおりです。

- 一部の試薬は処理サンプルごとに個別に封入されています。
- 本キットと QG-Auto12S、あるいは QG-Auto24S をご使用いただくことにより、ぬぐい液(鼻咽頭、鼻腔、咽頭など)、培養細胞上清液、血清、血漿、唾液などのウイルス感染検体から total RNA を抽出することができます。
- 抽出時間は以下のとおりです。
 - QG-Auto12S: 約 25 分 * 12 サンプル同時に抽出操作を行うことができます。
 - QG-Auto24S: 約 25 分 * 24 サンプル同時に抽出操作を行うことができます。
- タンパク質やカオトロピック塩を含まない total RNA が得られます。得られた total RNA は RT-PCR などのアプリケーションに適しています。

2. キット内容物と保存条件

2 - 1. キット内容物

以下の内容物が入っています。

キットには 48 処理分の total RNA 抽出試薬と消耗品が含まれています。

<input type="checkbox"/> Lysis Buffer LRV	42.5 ml
<input type="checkbox"/> 試薬ストリップ	48 個
<input type="checkbox"/> 1 ml Long Tips	48 個
<input type="checkbox"/> Waste Tubes	48 個

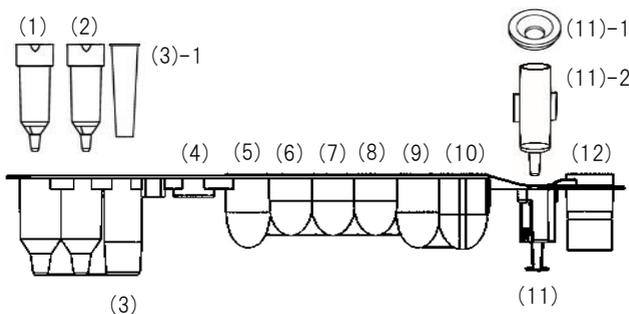
2 - 2. 保存条件

指定の温度(15°C~28°C)で保存してください。有効期限は外箱に表示しています。

2 - 3. 試薬ストリップの内容物

試薬ストリップ 1 本あたり、以下の内容物が入っています。

ウェル番号	構成名・試薬名・用途	区分	規格
(1)	Short Tip	成型品	2 個/ストリップ
(2)	Short Tip	成型品	
(3)	1 ml Long Tip 挿入位置	成型品	1 個/ストリップ
(3)-1	Tip Pack		1 個/ストリップ
(4)	Sample tube セット位置		1 個/ストリップ
(5)	EtOH (>99%) Ethanol)	試薬	185 μ l/ウェル
(6)	SRV (Solubilization Buffer)	試薬	185 μ l/ウェル
(7)	-	-	-
(8)	WRV (Wash Buffer)	試薬	750 μ l/ウェル
(9)	WRV (Wash Buffer)	試薬	750 μ l/ウェル
(10)	WRV (Wash Buffer)	試薬	750 μ l/ウェル
(11)	Cartridge セット位置	成型品	1 個/ストリップ
(11)-1	Pressure Adapter		1 個/ストリップ
(11)-2	Cartridge		1 個/ストリップ
(12)	ERV (Elution Buffer)	試薬	250 μ l/ウェル



3. キット以外にご準備いただくもの

①必要に応じて用意していただく試薬

- Carrier RNA
[推奨品]
 - ・Poly(A) (Sigma-Aldrich: P4903-25MG)
 - ・Poly(A) (Roche: 10108626001)
 - ・Carrie RNA (Thermo Fisher Scientific: 4382878)
 - ・Carrier RNA (Poly rA) (Qiagen: 1068337)

②器具・機材

- QuickGene-Auto12S/QuickGene-Auto24S
- マイクロピペット
- マイクロピペット用チップ
- 2 ml マイクロチューブ(サンプル用)
推奨品: BM 機器 Cat. 4020、SARSTEDT Cat.72.695.700、Cat.72.695.500S
推奨品以外のチューブを使用する場合は、事前にストリップ及び装置ヒーター部分との適合性を確認してください。
- 1.5 ml or 2 ml マイクロチューブ(RNA 回収用)
推奨品: BM 機器 Cat.BM4015、Cat.BM4020、SARSTEDT Cat.72.706.700
推奨品以外のチューブを使用する場合は、事前にコレクションホルダーとの適合性を確認してください。
- チューブスタンド

4. 取扱上の安全注意事項

◆ SRV (Solubilization Buffer)

取扱上のご注意 : ● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

- 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

◆ LRV (Lysis Buffer)

薬品の特性 : ● 飲むと有害の可能性があります。

取扱上のご注意 : ● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

- 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

- この薬品を扱う場合は適切な保護手袋および保護めがねを着用してください。

◆ WRV (Wash Buffer)

薬品の特性 : ● 引火性の液体を含むので、火気に十分注意してください。

-
- 取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。
- 火気に注意するとともに、吸入、皮膚への接触に十分注意してください。
 - 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

◆ CRV (Elution Buffer)

- 取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。
- 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

◆ EtOH (Ethanol)

薬品の特性：● 引火性の高い液体なので、火気に十分注意してください。

- 取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。
- 火気に注意するとともに、吸入、皮膚への接触に十分注意してください。
 - 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

◆ 試薬ストリップは、指定の温度(15℃～28℃)以外での使用、保存は避けてください。

◆ LRV は、温度の高い場所での使用、保存は避けてください。

◆ LRV を含む溶液や廃液は、絶対に漂白剤と混合しないでください。

◆ 感染のおそれのある検体を使用する場合

感染のおそれのある検体を扱う場合は、適切な保護具を着用してください。

◆ 感染のおそれのある検体を使用し、廃棄する場合

感染性産業廃棄物に該当しますので、関連する法に従い、焼却、溶解、滅菌、消毒などの処理をしてください。なお、処分業者に委託する場合は、特別管理産業廃棄物処分量の許可を受けた業者へ、特別管理産業廃棄物管理票(マニフェスト)を添えて処理を委託してください。

◆ 参考情報

各試薬の性状および取り扱いに関する詳細情報は、SDS(安全データシート)をお読みください。SDSは弊社ホームページ(<https://www.kurabo.co.jp/bio/>)からダウンロードできます。

5. 使用上の注意事項

◆ サンプルに関する注意事項

- 感染のおそれのある検体を使用する場合は、適切なバイオハザード対策を取ってください。
- 感染のおそれのある検体を扱う場合は、適切な保護具(防護服、防護帽子、白衣、手袋(2重)、マスクなど)を着用してください。
- 本キットで初めて分離されるサンプルの場合は、咽頭ぬぐい液から分離をスタートし、予備

実験を行ってください。

- 処理可能量を超えたサンプル量をオーバーロードしてしまうと、性能が顕著に低下し、最悪の場合カートリッジ(CA)が目詰まりを起こす可能性があります。
- 処理可能検体量は、検体の状態によって異なる場合があります。

◆試薬に関する注意事項

- LRV は保存中に析出物を生じることがあります。析出物が生じた場合は、37℃で溶解後、室温に戻してから使用してください。

◆操作に関する注意事項

- 全ての操作は室温(15~28℃)で行ってください。低温または高温でご使用の場合、キットの性能が発揮されないことがあります。
- 分離途中では時間をおかず、操作は素早く行ってください。
- 本キットは 50 µl の CRV で total RNA を溶出することを前提にしています。CRV 量はサンプルの状態によって、溶出効率が変化する可能性があります。
- 運転開始前に、以下の点を確認してください。
 - コレクションホルダーに Waste Tube、1.5 ml or 2 ml マイクロチューブ(回収用容器)がセットされていること
 - 試薬ストリップに 1 ml Long Tip、2 ml マイクロチューブ(ライセート入り)がセットされていること
 - 試薬ホルダーに試薬ストリップが正常にセットされていること
 - 試薬ホルダーのフタが完全に閉まっていること
 - 試薬ホルダー、コレクションホルダーがホルダーガイドに正しくセットされていること
- すべての操作は室温(15~28℃)で行ってください。低温または高温での使用の場合、キットの性能が発揮されないことがあります。詳しい作業環境情報については、QG-Auto12S/24S 本体取扱説明書をお読みください。
- やむを得ない場合を除き、運転の途中で装置の電源を切らないでください。同じ工程からの運転再開はできません。
- 詳しくは、QG-Auto12S/24S の本体取扱説明書をお読みください。

<RNase のコンタミネーション防止について>

- RNase のコンタミネーションを防ぐため、RNA や分離用試薬を取扱うときは、適切な手袋を着用してください。
- RNase フリーまたは滅菌したプラスチック製品のご使用をお勧めします。

-
- ガラスや金属製品を使う場合は 200℃にて 16 時間以上乾熱滅菌した後、使用してください。

6. 品質管理

- 全てのロットで品質管理基準を満たすことを確認しています。
- Total RNA の収量や品質は RT-PCR の増幅効率によって確認しています。

7. プロトコール

[Overview Flow Chart]



7 - 1. 試薬の準備

◆LRV

使用前に十分に混和してください。

析出物が生じた場合は、37℃で溶解後、室温に戻してから使用してください。

◆Carrier RNA 溶液

以下の表に従い、Carrier RNA 溶液を調整してください。

◇各社推奨 Carrier RNA 溶液調整

製品名	メーカー名	Cat.No.	投入量
Poly(A)	Sigma-Aldrich	P9403-25MG	20 µg /sample
Poly(A)	Roche	10108626001	
Carrier RNA (Poly rA)	Qiagen	1068337	
Carrier RNA	Thermo Fisher Scientific	4382878	

調整方法

1 サンプルあたりの投入量が 20 µg となるように調整してください。

Carrier RNA 溶液は、最大 20 µL 以内の溶液量になるように濃度調整してください。

7 - 2. ライセート作製プロトコール

本キットは、基本的に鼻咽頭ぬぐい液、培養細胞上清液、血清などの検体からのウイルス RNA 分離に対応しています。使用する検体の種類によってライセート作製プロトコールが異なりますので、検体の種類をご確認の上適切なプロトコールを選んでください。

【分離を始める前の重要事項】

- 試薬類は室温に戻してから使用してください。
- 試薬の液量は各ライセート作製フローに記載された液量を厳守してください。
- クロスコンタミネーションを防ぐために毎回ピペットチップを交換することをお勧めします。
- すべての操作は室温(15~28℃)で行ってください。
- 分離の途中で時間をおかず、操作は素早く行ってください。
- LRV を含む溶液や廃液は、絶対に漂白剤と混合しないでください。
- 感染のおそれのある検体を使用する場合は、BSL2+実験室内、あるいは BLS2 実験室内の安全キャビネット内で行ってください。
- 感染性のおそれのある検体の前処理を行う場合は、BSL2 実験室内の安全キャビネット内で行ってください。
- 感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用后廃棄する場合は、感染性産業廃棄物に該当しますので、適切な処理を行ってください。
- 薬品による負傷、感染リスクを抑えるため、適切な保護具を着用してください。
- 試薬ストリップ、各チューブを使用する際はヌクレアーゼの混入を避けるため、手袋を着用してください。
- 詳しくは QG-Auto12S/24S の本体取扱説明書をお読みください。

7 - 2 - 1. 培養細胞上清液からの RNA 抽出プロトコール

<1>から<4>の工程の順序は必ずお守りください。

順序を変えた場合、目的の RNA 収量が得られない可能性があります。

<1>2.0 ml マイクロチューブに LRV 200 μ L を入れます。

<2>調整した Carrier RNA 溶液を指定量添加します。

Carrier RNA 溶液は 1 サンプルあたり 20 μ g となるように添加してください。

また、Carrier RNA 溶液は 20 μ L 以下となるように濃度調整してください。

例えば、1 mg/mL Carrier RNA 溶液を添加する場合、Carrier RNA 溶液は 20 μ L 添加します。

<3>培養細胞上清液 200 μ l を添加します。

<4>最大回転数で 30 秒間ボルテックスします。数秒間スピンドウンして、マイクロチューブの蓋

や壁に付着した液を収集します。

7 - 2 - 2. めぐい液(鼻咽頭、鼻腔、咽頭など)からの RNA 抽出プロトコール

<1>から<5>の工程の順序は必ずお守りください。

順序を変えた場合、目的の RNA 収量が得られない可能性があります。

<1>2.0 ml マイクロチューブに LRV 200 μ L を入れます。

<2>調整した Carrier RNA 溶液を指定量添加します。

Carrier RNA 溶液は 1 サンプルあたり 20 μ g となるように添加してください。

また、Carrier RNA 溶液は 20 μ L 以下となるように濃度調整してください。

例えば、1 mg/mL Carrier RNA 溶液を添加する場合、Carrier RNA 溶液は 20 μ L 添加します。

<3>めぐい液(鼻咽頭、鼻腔、咽頭など)から 200 μ l を添加します。

<4>最大回転数で 30 秒間ボルテックスします。数秒間スピンドアウンして、マイクロチューブの蓋や壁に付着した液を収集します。

<5>10 分間室温でインキュベーションします。

感染のおそれのある検体を使用する場合、BLS2+実験室内の安全キャビネット内でインキュベーションしてください。

7 - 3. 試薬ストリップの準備

- 試薬ストリップ、各チューブを使用する際はヌクレアーゼの混入を避けるため、手袋を着用してください。
- 詳しくは QG-Auto12S/24S の本体取扱説明書をお読みください。

<1>作業台にコレクションホルダーと試薬ホルダーを準備します。

<2>コレクションホルダーにウェイトチューブと、1.5 ml あるいは 2.0 ml マイクロチューブをセットします。

<3>試薬ストリップを箱から取り出して試薬ホルダーにセットし、ライセートの入った 2 ml マイクロチューブと 1 ml Long Tip を所定の位置(p.5 (4))に挿します。試薬ストリップの内容物が正しい位置にセットされていることを確認してください。

7 - 4. QG-Auto12S/24S 分離操作

- 事前に QG-Auto12S/24S の取扱説明書をよくお読みください。
- 試薬ストリップ、各チューブを使用する際はヌクレアーゼの混入を避けるため、手袋を着用してください。

<1> コレクションホルダーと試薬ホルダーを装置にセットします。

<2> 装置本体の電源を入れます。

初期チェックと初期動作を行った後、ホームポジションに停止します。

- <3> ホーム画面の「CUSTOMIZED PROTOCOL」を選択し、「RNA VIRUS」を選択します。
- <4> 「Elution Volume」欄でご希望の溶出液量を選択します。
- <5> 「Check List」欄に記載のある消耗品が、試薬ホルダーとコレクションホルダー、あるいは試薬カートリッジに装填されていることを確認します。装填されていればチェックボックスをタッチしてチェックマークを入れます。
- <6> 「Next」ボタンをタッチします。
- <7> 「Protocol Information」の記載内容を確認して「Start」ボタンをタッチすると運転が開始されます。
 - 抽出操作が始まると操作パネルに抽出工程が表示されます。
 - 運転状況は工程名(LYSIS, BINDING, WASH, ELUTE, FINISH)の点滅によって確認できます。
 - 運転中は本体のフロントドアを開けないでください。万一フロントドアを開けた場合は、QG- Auto12S/24S の取扱説明書をお読みになって動作を再開してください。
 - 一時停止をする場合は、操作パネルの「Pause」ボタンをタッチしてください。終了の確認画面が表示されますので、「Yes」を押して終了してください。
- <8> 運転が終了するとビーブ音が鳴り、工程名が「FINISH」と表示され点滅します。装置が完全に停止していることを確認した後、フロントドアを開け、試薬ホルダーとコレクションホルダーを取り出し、回収チューブを取り出します。
 - すぐに total RNA を使用しない場合は、チューブの蓋をしっかりと閉め、-20°C または -80°C で保存してください。

8. トラブルシューティング

トラブルが生じた場合には、以下の対策を参照してください。

(1) RNA の収量が低い、RNA が得られない

原因	対策
検体の保存状態が悪い	検体の種類、量、保管期間、保存条件で RNA 収量は変わります。検体をすぐに使用しない場合は一度融けたものは使わないでください。
処理検体量が不適切	適切な検体量の範囲で分離してください。 例えば、鼻咽頭ぬぐい液の場合、指定量は 200 μ l となります。
LRV 添加後の攪拌が不充分	LRV 添加後は十分に攪拌してください。 鼻咽頭ぬぐい液、血清を検体として使用する場合、攪拌後は 10 分間のインキュベーションを行ってください。
Carrier RNA 溶液を指定量添加していない	ライセート中の Carrier RNA 量は 20 μ g となるように添加してください。また、添加する Carrier RNA 溶液量は 20 μ l 以下で添加してください。
Carrier RNA 溶液が劣化している	一度融解した Carrier RNA 溶液を再凍結させたものは使用しないでください。

(2) カートリッジが詰まった

原因	対策
検体に対応したプロトコールを使っていない	検体の種類量に応じてプロトコールを選択してください。
処理検体量が不適切	適切な検体量の範囲で分離してください。 例えば、鼻咽頭ぬぐい液の場合、指定量は 200 μ l となります。
LRV 添加後の攪拌が不十分	LRV 添加後は十分に攪拌してください。 鼻咽頭ぬぐい液、血清を検体として使用する場合、攪拌後は 10 分間のインキュベーションを行ってください。
細胞培養液を遠心を行い、上清を分取する際に、上清と一緒に残渣(培養細胞)をとってしまった	遠心操作を繰り返すか、遠心時間を延長して、残渣(培養細胞)を確実に取り除いてください。

(3) RT-PCR など、続けて行う実験がうまくいかない

原因	対策
Carrier RNA 溶液を指定量添加していない	ライセート中の Carrier RNA 量は 20 μ g となるように添加してください。また、添加する Carrier RNA 添加量が少ない場合、RNA 回収率が低下する場合があります。
Carrier RNA 溶液が劣化している	一度融解した Carrier RNA 溶液を再凍結させたものは使用しないでください。

9. オーダリング・インフォメーション

製 品	内 容	Cat #
QuickGene-AutoS DNA Blood Kit	48 回入	AS-DB
QuickGene-AutoS DNA Tissue Kit	48 回入	AS-DT
QuickGene-AutoS Plasmid Kit	48 回入	AS-PL
QuickGene-AutoS RNA Blood Kit	48 回入	AS-RB
QuickGene-AutoS RNA Tissue Kit	48 回入	AS-RT
QuickGene-AutoS RNA Cultured Cell Kit	48 回入	AS-RC
QuickGene-AutoS DNA FFPE Kit	48 回入	AS-DF

＊トレードマークと免責事項

本取扱説明書に記載されている登録名などは、特に表示がない場合でも法律によってその権利が保証されています。



●製造元

倉敷紡績株式会社

環境メカトロニクス事業部 バイオメディカル部

〒572-0823 大阪府寝屋川市下木田町14-30

TEL (072) 820-3079 FAX (072) 820-3095

URL; <http://www.kurabo.co.jp/bio/>

AS-RV_HB-J_V10