

Agencourt RNAdvance Viral XP 追加プロトコル ウィルスからの RNA 抽出



本追加プロトコルは簡易版です。使用前には、正式な製品マニュアルと Supplemental Protocol (英文)を必ずご一読ください。

本追加プロトコルでは、バイラルトランスポート溶液 200 μ L から RNA を抽出することができます。1.5 mL チューブまたは 96 ウェル 1.2 mL プレートでの抽出に対応します。

Material Supplied by the User

1.5 mL チューブの場合

1.5 mL マイクロチューブ

例: Eppendorf, 0030119401

A29182 Agencourt SPRIStand 6 Position Tube Magnet

96 ウェル反応プレートの場合

96 ウェル 1.2 mL ディープウェルプレート

例: Thermo Fisher Scientific, AB-1127

上のプレート用のシール

例: Thermo Fisher Scientific, 0580

A32782 Agencourt SPRIPlate 96R Ring Super Magnet Plate

試薬

70%エタノール (ヌクレアーゼフリー水で用時調製)

ヌクレアーゼフリー水

Purification Procedure

1. サンプル調製

- a. サンプルを最高速で 10 秒間ボルテックスし、再懸濁します。
- b. 軽く遠心することにより、キャップに付いた液体を回収します。

2. 溶解

- a. サンプル 200 μ L を 1.5 mL マイクロチューブまたは 96 ウェルプレートに移します。
- b. Lysis LBF 150 μ L を加えます。
- c. ピペティング 10 回または十分に混合します。
- d. 室温で 20 分間反応します。

3. 結合

- a. Bind VBE のボトルをボルテックスし、磁性ビーズを再懸濁します。
- b. Bind VBE 350 μ L を加えます。
- c. ピペティング 10 回または十分に混合します。
- d. 室温で 5 分間静置します。
- e. 磁気上で 10 分間(または上清が透明になるまで)静置し、磁性ビーズを分離します。
- f. 磁気上で、磁性ビーズを乱さぬように上清を除去します。
- g. 磁気から下ろします。

4. 洗浄

- a. 70%エタノール 400 μ L を加えます。
- b. ピペティング 10 回または十分に混合します。
- c. 磁気上で 2 分間(または上清が透明になるまで)静置し、磁性ビーズを分離します。
- d. 磁気上で上清を除去し、磁気から下ろします。
- e. 4.a~4.d のステップを繰り返し行い、合計 2 回の 70%エタノール洗浄を行います。
- f. 磁気上で 1 分間静置(または液体が見えなくなるまで。ピペットを使っての除去も可能)し、磁性ビーズを乾燥させます。
- g. 磁気から下ろします。

5. 溶出

- a. ヌクレアーゼフリー水 40 μ L を加えます。
- b. ピペティング 10 回または十分に混合します。

- c. 室温で 5 分間静置します。
- d. 磁気上で 2 分間(または上清が透明になるまで)静置し、磁性ビーズを分離します。
- e. 溶出 RNA を含む上清を、磁性ビーズを乱さないように回収します。



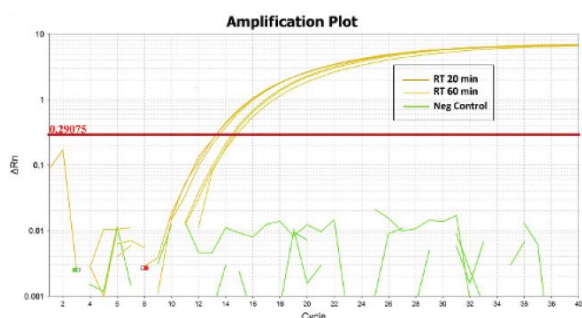
Example Data

コロナウイルス 229E 株培養液 (ZeptoMetrix Cat# 0810229CF) に浸したスワブを PBS 200 μ L に再懸濁し、RNAdvance Viral XP を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA 5.5 μ L を Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix (Bio Rad Cat#: 12010220) を使用して qRT-PCR の 10 μ L 反応系に使用した。Applied Biosystems QuantStudio 6 Flex real-time PCR system (Thermo Fisher) を用いて、PCR 40 サイクルの蛍光をモニターした。各条件にて 3 回の実験を行った。RT は常温、ND は未決定を示す。以下のプライマーおよびプローブ (Thermo Fisher) を使用した:

229E-FP: 5'-TTCCGACGTGCTCGAACTTT-3'

229E-RP: 5'-CCAACACGGTTGTGACAGTGA-3'

229E-TP: FAM-5'-TCCTGAGGT CAATGCA-3'-NFQMGB; nt 506 to 521



Sample Input	Lysis Conditions	Ct values	Std Dev
229E	RT / 20 min	13.45	.155
229E	RT / 60 min	14.57	.195
Water (-control)	RT / 60 min	ND	ND

2 種類の溶解条件 (室温 20 分および 60 分) について評価した。両条件間で 1.12 の Ct 値差が見られ、20 分の溶解条件が RNA 抽出に適していることを示す結果となった。しかし、これらの溶解条件において、ウイルスの不活化については未確認であることを注意する必要がある。

200512_SUP-JP_RNAdvanceViralXP_ViralRNA_20

ベックマン・コールター株式会社

本社: 〒135-0063 東京都江東区有明3-5-7 TOC有明ウエストタワー

お客様専用 ☎ 0120-566-730 ☎ 03-6745-4704 ☎ 03-5530-2460
 ✉ bckkcas@beckman.com 🌐 <http://www.beckmancoulter.co.jp>