

ウイルス RNA 抽出キット

ISOSPIN Viral RNA

マニュアル（第 1 版）

Code No. 310-08931

NIPPON GENE CO., LTD.

I 製品説明

「ISOSPIN Viral RNA」（アイソスピン ヴァイラル RNA）は、スピнкаラムを用いて喀痰、鼻咽頭ぬぐい液、唾液、血清等の体液からウイルス RNA を抽出・精製するためのキットです。

本キットは、カオトロピックイオン存在下で RNA がシリカへ吸着する原理を応用しており、フェノールやクロロホルムなどの毒性有機溶媒を使用しません。使用するスピнкаラムは、カラム容積を最大限確保しており、内封されたシリカメンブレンは、十分な RNA 吸着容量と高い溶出効率を備えています。

本キットでは、ウイルスの溶解や夾雑タンパク質の分解に最適な抽出液と Proteinase K を採用しており、約 30 分で高純度の RNA を容易に得ることができます。

<特長>

- ・約 30 分間でウイルス RNA を精製可能
- ・自社開発のスピнкаラムにより、高い操作性を実現
- ・PCR 法等で高感度に検出可能

<RNA ウイルス抽出実績>

- ・新型コロナウイルス
- ・ポリオウイルス
- ・E 型肝炎ウイルス（HEV）
- ・重症熱性血小板減少症候群ウイルス（SFTSV）

II キット内容・保存温度

ISOSPIN Viral RNA (Code No. 310-08931)

キット構成	容量 (50 回用)	保存温度	備考
Proteinase K	1 ml × 1 本	-20℃	
NIRV Extraction Buffer	18 ml × 1 本	室温	
NIRV Wash1 Buffer	30 ml × 1 本	室温	エタノール含有※
NIRV Wash2 Buffer	30 ml × 1 本	室温	エタノール含有※
ddWater	1 ml × 3 本	室温	
Spin Column	50 本 × 1 袋	室温	上部パーツ：カラム 下部パーツ：Collection Tube
Collection Tube	50 本 × 2 袋	室温	

輸送・保管温度： 室温（到着後、Proteinase K は-20℃保存）

（注意）

- ※ NIRV Wash1 Buffer、NIRV Wash2 Buffer にはエタノールが含まれています。
ご使用後は、蒸発を防ぐため速やかに蓋を閉め、保管して下さい。

（備考）

Proteinase K と NIRV Extraction Buffer を予め混合してから使用することも可能です。ただし、予め混合した状態で一時保存される場合は、すぐに-80℃で凍結保存し、一週間以内に使用して下さい。凍結融解は数回（2、3回）まで可能です。凍結した混合溶液は室温で溶かし、もし析出物が現れた場合はよく混ぜて溶かしてからご使用下さい。なお、-20℃保存では凍結しないため酵素活性が低下します。

III 使用上の注意

- ・ 作業検査環境への汚染を防ぐため、使用の際には溶液を飛散させたり、溶液に触れたピペットチップが他の器具や試薬に接触したりしないようご注意ください。
- ・ 本品は、試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。
- ・ 試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱わないで下さい。
- ・ 本品の取り扱いは、マニュアル記載内容通りに行ってください。
- ・ マニュアル記載内容と異なった取り扱いによるトラブルにつきましては、弊社では責任を負いかねます。
- ・ 安全性データシート（SDS）は、ニッポンジーン Web サイト（www.nippongene.com）よりご覧になれます。

IV プロトコール

本プロトコールは、遠心分離機を使った方法です。

バキュームマニホールド（吸引法）を使用する場合、カラムとマニホールドとの適合に問題がないか確認の上ご使用下さい。また、バキュームマニホールドを使用する場合においても、**<基本プロトコール>**および**<オプションプロトコール（スケールアップ）>**の手順⑫以降は遠心分離機をご使用下さい。

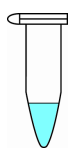
液体試料の例：

- ・ 喀痰（前処理したもの、等）
- ・ 鼻咽頭ぬぐい液（ウイルス輸送液等に入ったもの、等）
- ・ 咽頭ぬぐい液
- ・ 唾液
- ・ 血清
- ・ 無細胞体液
- ・ 培養細胞上清

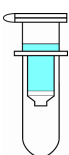
<キット以外に必要なもの>

- 機 器：**
- ・ ボルテックスミキサー
 - ・ ヒートブロック（喀痰サンプル等の場合）
 - ・ 卓上遠心機
 - ・ 遠心分離機
- 器 具：**
- ・ マイクロピペット
 - ・ ピペットチップ
 - ・ 1.5 ml マイクロチューブ
- 試 薬：**
- ・ エタノール（96～100%）

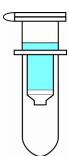
<基本プロトコール>



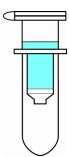
- ① 1.5 ml チューブに 20 μ l の Proteinase K と、360 μ l の NIRV Extraction Buffer を入れる。そこに 140 μ l の液体試料を加えた後、15 秒間ボルテックスで攪拌する。
- ② 室温* で 10 分間インキュベートする。
(* 喀痰サンプル等の場合、56°C, 10 分間)
- ③ チューブの蓋を開ける前に、スピンドウンして蓋の内側に付着した溶液をチューブの底に集める。
- ④ 400 μ l のエタノールを③に加え、15 秒間ボルテックスで攪拌した後、軽くスピンドウンする。



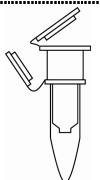
- ⑤ Spin Column に④の混合液を全量 (~920 μ l) 添加する。
- ⑥ 遠心 (8,000 \times g、15 秒間、室温) する。
- ⑦ ろ液を Collection Tube ごと廃棄し、カラムを新しい Collection Tube に移す。



- ⑧ Spin Column に 500 μ l の NIRV Wash1 Buffer を添加する。
- ⑨ 遠心 (8,000 \times g、15 秒間、室温) する。
- ⑩ ろ液を Collection Tube ごと廃棄し、カラムを新しい Collection Tube に移す。



- ⑪ Spin Column に 500 μ l の NIRV Wash2 Buffer を添加する。
- ⑫ 遠心 (8,000 \times g、2 分間、室温) する。
- ⑬ ろ液を Collection Tube ごと廃棄する。このとき、カラムにろ液が付かないよう慎重に取り外す。



- ⑭ カラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上に移す。
- ⑮ RNA を溶出させるため、60 μ l の ddWater (RNase free) をメンブレン中央に滴下した後、2 分間室温で静置する。
- ⑯ 遠心 (8,000 \times g、2 分間、室温) する。
- ⑰ RNA 溶液が 1.5 ml マイクロチューブの中に回収される。

<簡易・基本プロトコール>

1.5 ml チューブ

- ← 20 μ l の Proteinase K を添加
- ← 360 μ l の NIRV Extraction Buffer を添加
- ← 液体試料 (140 μ l)

ボルテックスで 15 秒間攪拌

室温で 10 分間静置 (喀痰サンプル等の場合 56°C, 10 分間)

軽くスピンドウン

- ← 400 μ l のエタノールを添加し、ボルテックスで 15 秒間攪拌
- 軽くスピンドウン

Spin Column に混合液を全量 (~920 μ l) 添加

- ← 遠心 (8,000 \times g, 15 秒間, 室温)
- ろ液を Collection Tube ごと廃棄し、カラムを新しい Collection Tube に装着

- ← 500 μ l の NIRV Wash1 Buffer を添加

- ← 遠心 (8,000 \times g, 15 秒間, 室温)
- ろ液を Collection Tube ごと廃棄し、カラムを新しい Collection Tube に装着

- ← 500 μ l の NIRV Wash2 Buffer を添加

- ← 遠心 (8,000 \times g, 2 分間, 室温)
- ろ液を Collection Tube ごと廃棄 (ろ液がカラムに付かないよう注意する)

カラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上に移す

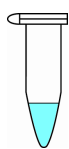
- ← 60 μ l の ddWater (RNase free) をメンブレン中央に滴下

室温で 2 分間静置

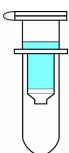
- ← 遠心 (8,000 \times g, 2 分間, 室温)

RNA 溶液

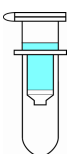
< オプションプロトコール (スケールアップ) >



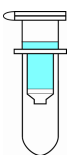
- ① 1.5 ml チューブに 20 μ l の Proteinase K と、350 μ l の NIRV Extraction Buffer を入れる。そこに 250 μ l の液体試料を加えた後、15 秒間ボルテックスで攪拌する。
- ② 室温* で 10 分間インキュベートする。(* 喀痰サンプル等の場合、56°C, 10 分間)
- ③ チューブの蓋を開ける前に、スピンドウンして蓋の内側に付着した溶液をチューブの底に集める。
- ④ 350 μ l のエタノールを③に加え、15 秒間ボルテックスで攪拌した後、軽くスピンドウンする。



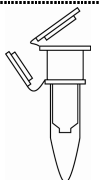
- ⑤ Spin Column に④の混合液を全量 (~970 μ l) 添加する。
(泡立ちが生じないように慎重に添加する)
- ⑥ 遠心 (8,000 \times g、15 秒間、室温) する。
- ⑦ ろ液を Collection Tube ごと廃棄し、カラムを新しい Collection Tube に移す。



- ⑧ Spin Column に 500 μ l の NIRV Wash1 Buffer を添加する。
- ⑨ 遠心 (8,000 \times g、15 秒間、室温) する。
- ⑩ ろ液を Collection Tube ごと廃棄し、カラムを新しい Collection Tube に移す。



- ⑪ Spin Column に 500 μ l の NIRV Wash2 Buffer を添加する。
- ⑫ 遠心 (8,000 \times g、2 分間、室温) する。
- ⑬ ろ液を Collection Tube ごと廃棄する。このとき、カラムにろ液が付かないよう慎重に取り外す。



- ⑭ カラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上に移す。
- ⑮ RNA を溶出させるため、60 μ l の ddWater (RNase free) をメンブレン中央に滴下した後、2 分間室温で静置する。
- ⑯ 遠心 (8,000 \times g、2 分間、室温) する。
- ⑰ RNA 溶液が 1.5 ml マイクロチューブの中に回収される。

<簡易・オプションプロトコール (スケールアップ) >

1.5 ml チューブ

- ← 20 μ l の Proteinase K を添加
- ← 350 μ l の NIRV Extraction Buffer を添加
- ← 液体試料 (250 μ l)

ボルテックスで 15 秒間攪拌

室温で 10 分間静置 (喀痰サンプル等の場合 56°C, 10 分間)

軽くスピンドウン

- ← 350 μ l のエタノールを添加し、ボルテックスで 15 秒間攪拌
- 軽くスピンドウン

Spin Column に混合液を全量 (~970 μ l) 添加 (泡立ちが生じないように慎重に添加する)

← 遠心 (8,000 \times g, 15 秒間, 室温)
ろ液を Collection Tube ごと廃棄し、カラムを新しい Collection Tube に装着

- ← 500 μ l の NIRV Wash1 Buffer を添加

← 遠心 (8,000 \times g, 15 秒間, 室温)
ろ液を Collection Tube ごと廃棄し、カラムを新しい Collection Tube に装着

- ← 500 μ l の NIRV Wash2 Buffer を添加

← 遠心 (8,000 \times g, 2 分間, 室温)
ろ液を Collection Tube ごと廃棄 (ろ液がカラムに付かないよう注意する)

カラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上に移す

- ← 60 μ l の ddWater (RNase free) をメンブレン中央に滴下

室温で 2 分間静置

← 遠心 (8,000 \times g, 2 分間, 室温)

RNA 溶液

V トラブルシューティング

トラブル	予想される原因	対 策
低収量	抽出以前に、試料中の RNA が RNase により分解している。	<ul style="list-style-type: none"> 新鮮な試料を用いる。 試料採取後、すぐに RNA を抽出するか、速やかに凍結させる。 必要な場合には試料に RNase Inhibitor を添加する。 凍結・融解を繰り返した試料は RNA 抽出に使用しない。
	抽出操作中、試料の溶解が不十分である。	<ul style="list-style-type: none"> プロトコルのステップ①で、試料と Proteinase K と NIRV Extraction Buffer を確実に混和させる。
	抽出操作中、RNA が断片化している。	<ul style="list-style-type: none"> ボルテックスは 15 秒間以上行わない。インキュベート後は特に過度な攪拌を避ける。
	RNA がチューブに吸着している。	<ul style="list-style-type: none"> 核酸低吸着チューブを使用する。
	RNase がコンタミしている。	<ul style="list-style-type: none"> RNase フリーのチューブを使用する。 RNase フリーの試薬を使用する。 フィルター付きピペットチップを使用する。
	試料中にウイルス量が少ない。	<ul style="list-style-type: none"> オプションプロトコル(スケールアップ)を試す。
DNA の混入	試料中の細胞量が多い。	<ul style="list-style-type: none"> 可能であれば、細胞を遠心分離等で除去した後の液体試料を抽出に使用する。 DNA フリーの RNA が必要な場合は、精製して得られた RNA 溶液の DNase 処理を行う。

【関連製品】

- ・ Distilled Water, Deionized, Sterile (ニッポンジーン Code No. 316-90101, 318-90105)
- ・ DNase I (RNase free) (ニッポンジーン Code No. 314-08071)
- ・ RNase Inhibitor (ニッポンジーン Code No. 315-08121)
- ・ Collection Tube (ニッポンジーン Code No. 319-08141, 315-08143)

VI 備考

本製品は、富山大学 学術研究部医学系 微生物学講座の森永芳智教授・谷英樹准教授との共同研究の成果をもとに開発されました。

マニュアル記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なしに変更する場合があります。

お問い合わせ先

株式会社ニッポンジーン
研究試薬部 学術営業課

TEL 076 - 451 - 6548

URL <https://www.nippongene.com/siyaku/>

お問い合わせは、お電話もしくはWEB フォームより承っております。