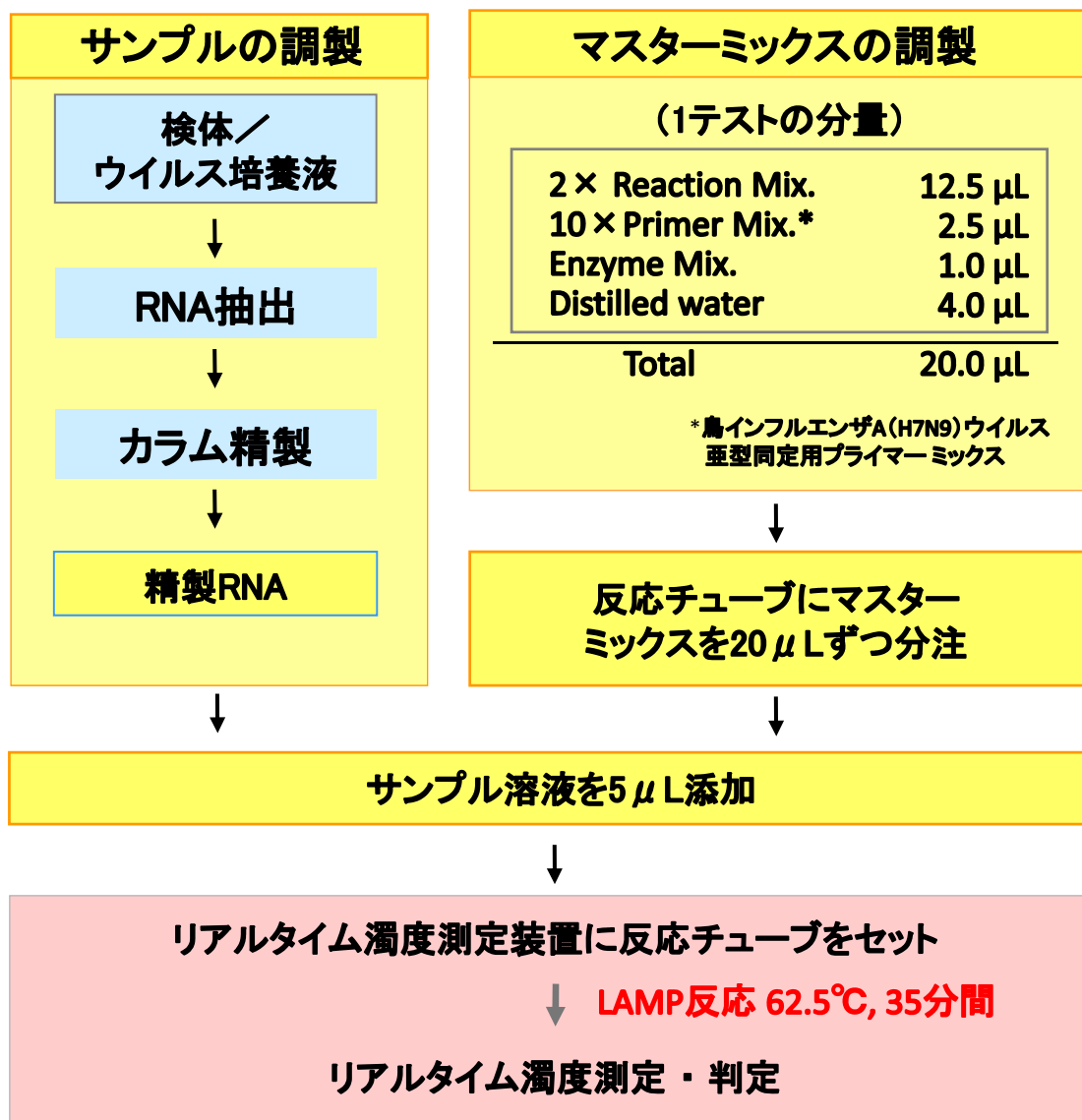


鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルス亜型同定用プライマーを用いた使用方法



LoopampEXIA

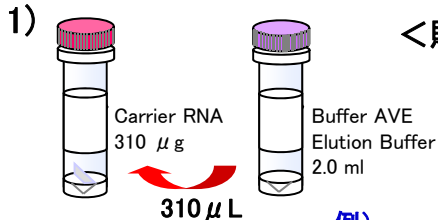


RT-160C

QIAamp® Viral RNA Mini Kit 購入後の試薬調製

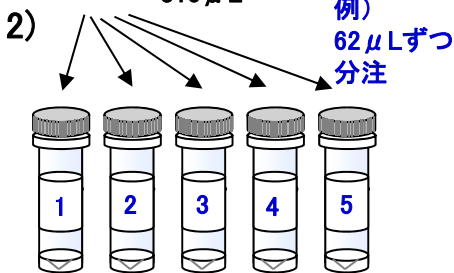
キット内容	QIAamp Viral RNA Mini Kit (50) の場合	QIAamp Viral RNA Mini Kit (250) の場合
	50 QIAamp Mini Spin Columns	250 QIAamp Mini Spin Columns
	Collection Tubes (2 ml)	Collection Tubes (2 ml)
	Carrier RNA	Carrier RNA
	Buffer AVE / Protease Solvent	Buffer AVE / Protease Solvent
	Buffer AVL	Buffer AVL
	Buffer AW1 (concentrate, 19 ml)	Buffer AW1 (concentrate, 95 ml)
	Buffer AW2 (concentrate, 13 ml)	Buffer AW2 (concentrate, 66 ml)

1. Buffer AVL・キャリアRNAの調製

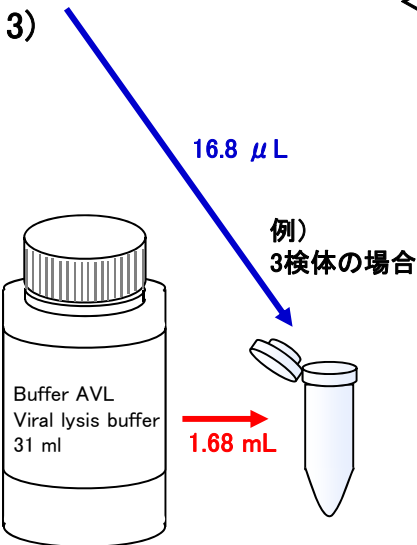


<購入時: キャリアRNA・ Buffer AVEの調製 >

- ・ 310 µg のキャリアRNA(凍結乾燥)が入ったチューブに 310 µL のBuffer AVE を添加する(1 µg/µLとなる)。
⇒ キャリアRNA・ Buffer AVE (全量で 55検体分)



- ・ キャリアRNAを完全に溶解し、これを適切量で分注して-20°Cで保存する。
(⇒5本に分注(1本約62 µL)すると、1本あたり11検体分
3本に分注(1本約103 µL)すると、1本あたり18~19検体分)
※ このキャリアRNA・ Buffer AVE の凍結融解は3回まで可能。



<検査時: Buffer AVL とキャリアRNA・ Buffer AVE を混和 >

- ・ Buffer AVLに沈殿が生じていないかチェックし、沈殿している場合は 80°Cでインキュベートし、沈殿を溶解する。
- ・ 処理する検体数から必要なBuffer AVL とキャリアRNA・ Buffer AVE 混和物の容量を確認し、混合する。
- ・ チューブを静かに10回転倒混和する。泡立ちを避けるため、ボルテックスは使用しない。

検体数	Buffer AVL 量(mL)	キャリアRNA・ Buffer AVE 量(µL)	検体数	Buffer AVL 量(mL)	キャリアRNA・ Buffer AVE 量(µL)
1	0.56	5.6	13	7.28	72.8
2	1.12	11.2	14	7.84	78.4
3	1.68	16.8	15	8.40	84.0
4	2.24	22.4	16	8.96	89.6
5	2.80	28.0	17	9.52	95.2
6	3.36	33.6	18	10.08	100.8
7	3.92	39.2	19	10.64	106.4
8	4.48	44.8	20	11.20	112.0
9	5.04	50.4	21	11.76	117.6
10	5.60	56.0	22	12.32	123.2
11	6.16	61.6	23	12.88	128.8
12	6.72	67.2	24	13.44	134.4

※ 上記の混和物は必要に応じて調製し、2~8°Cで最高48時間まで安定。2~8°Cで保存すると沈殿物が生じるので、使用直前に80°C (5分以内)に温めて再溶解する。
加熱は6回までとし、80°Cでのインキュベーションは5分を超えないようにする。

2. Buffer AW1の調製

最初に使用する際、濃縮Buffer AW1 に下記量のエタノール(96~100%)を加える。

プレップ数	濃縮AW1	エタノール	最終容量
50	19 mL	25 mL	44 mL
250	95 mL	125 mL	220 mL

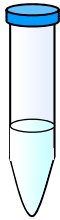
3. Buffer AW2の調製

最初に使用する際、濃縮Buffer AW2 に下記量のエタノール(96~100%)を加える。

プレップ数	濃縮AW1	エタノール	最終容量
50	13 mL	30 mL	43 mL
250	66 mL	160 mL	226 mL


臨床検体からのインフルエンザウイルスRNA抽出の例

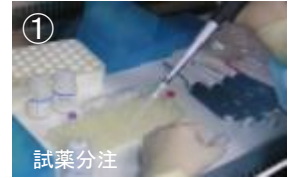
検体材料




ウイルス輸送培地 (2~3mL) にスワブを懸濁する。


RNA抽出 < QIAamp Viral RNA Mini Kit を使用する場合 >

①  ← Buffer AVL/ Carrier RNA 560 μ L 注入
 ← 試験材料液(上清) 140 μ L 添加、キャップを閉め、15秒間ボルテックス
 1.5mLチューブ
 10分間インキュベート(室温放置)後、スピンドウン
 (感染性因子やRNaseは不活化されます)




②  ← エタノール 560 μ L 添加
 キャップを閉め、15秒間ボルテックス、スピンドウン



③  ← 上記混合液 630 μ L 注入
 キャップを閉め、6,000 \times g (8,000rpm)、1分間遠心


④のスピncラムを新しい空のコレクションチューブに再度セット

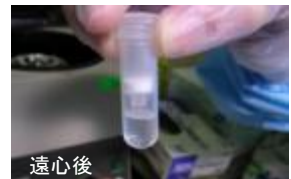
スピncラム & 2mLコレクションチューブ


④  → コレクションチューブ、ろ液を廃棄
 スピncラム コレクションチューブ

2回繰り返す




⑤  スピncラムを新しいコレクションチューブに移す
 ← Buffer AW1 500 μ L 添加
 キャップを閉め、6,000 \times g (8,000rpm)、1分間遠心





⑥  → コレクションチューブ、ろ液を廃棄

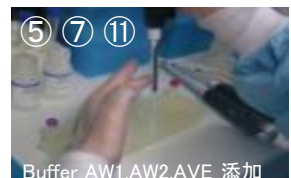



⑦  スピncラムを新しいコレクションチューブに移す
 ← Buffer AW2 500 μ L 添加
 キャップを閉め、20,000 \times g (14,000rpm)、3分間遠心




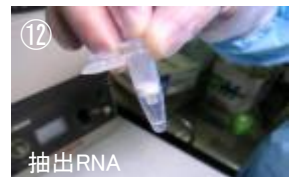
⑧  → コレクションチューブ、ろ液を廃棄

⑨  スピncラムを新しいコレクションチューブに移す
 キャップを閉め、20,000 \times g (14,000rpm)、1分間遠心



⑩  → コレクションチューブ、ろ液を廃棄
 1.5mLマイクロチューブに移す

⑪  ← Buffer AVE 60 μ L 添加
 キャップを閉め、1分間インキュベート後、6,000 \times g (8,000rpm)、1分間遠心



1.5mLチューブ

3

RNA抽出液

抽出したRNAは速やかに遺伝子検査に使用し、保存する場合はできるだけ-70℃以下で保存する。

1. 鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルス亜型同定用プライマーの調製方法

※ 必ず氷上で行ってください

(1) 合成プライマーの調製(各プライマーを100pmol/ μ Lに調製)

Data Sheetに記載の
XXX μ LのTE Buffer (TE)をチューブに添加し
100pmol/ μ Lに調製します。

TE Buffer (TE) XXX μ L

※Data Sheetに記載
For 100 μ molar Solution
(100pmol/ μ L) dilute in: XXX μ L

※ TE Buffer (オートクレーブ)
Tris 10mmol/L
EDTA 1mmol/L
(pH 7.5)



データシートに記載のnmol数 \times 10の
TE bufferで溶解すると、100pmol/ μ Lになります。
EX. 12.3nmol \Rightarrow 123 μ Lで溶解します。

(2) 10 \times Primer Mixの調製(調製後は、冷凍保存)

滅菌マイクロチューブに①で調製した各プライマーを以下の容量で加え、転倒混和した後、スピンドウンする。

※冷凍保存した場合、室温で解凍し、解凍後は直ちに氷上で保存します。

	1テスト分	100テスト分
AH7N9-FIP	0.4 μ L	40 μ L
AH7N9-BIP	0.4 μ L	40 μ L
AH7N9-Loop-F	0.2 μ L	20 μ L
AH7N9-Loop-B	0.2 μ L	20 μ L
AH7N9-F3	0.05 μ L	5 μ L
AH7N9-B3	0.05 μ L	5 μ L
Distilled Water	1.2 μ L	120 μ L
Total volume	2.5 μ L	250 μ L

以下に、RNA増幅試薬キットを用いた使用方法を記載します。
詳細は、使用説明書をご参照ください。

2. マスターミックスの調製 ※必ず氷上で行ってください

(1) マスターミックス調製用滅菌チューブに各試薬を必要なテスト数分、下表の割合(1テストあたり)で分注します。

	1テスト分	10テスト分
2 × Reaction Mix. (RM)	12.5μL	125μL
10 × Primer Mix.	2.5μL	25μL
Enzyme Mix. (EM)	1.0μL	10μL
Distilled Water (DW)	4.0μL	40μL
Total volume	20μL	200μL

(2) 分注後、チューブを軽く数回叩いて混合する(以下、タッピングと呼ぶ。)か、又は転倒混和により十分混合した後、微量簡易遠心機に数秒かけて(以下、スピンドウンと呼ぶ。)、これをマスターミックスとします。なお、調製したマスターミックスはすぐに使用してください。

3. マスターミックスとサンプル溶液の混合 ※必ず氷上で行ってください

(1) Loopamp 反応チューブに、サンプル反応用のマスターミックス20μL を分注します。

(2) サンプル溶液5μL を添加し全量25μL とします。このとき、ピペッティング又はキャップを閉めた上でのタッピングにより良く混合した後、スピンドウンします。また、混合の際は気泡が立たないように注意します。

4. LAMP反応

※ LAMP反応は、Loopampリアルタイム濁度測定装置(LoopampEXIA. LA-320C, RT-160C)をご使用ください。

(1) Loopamp リアルタイム濁度測定装置に予め設定されているプログラムを選択します。

<反応条件>

62.5°C、35分

<プログラム名>

LoopampEXIA : AIV-H7, LA-320C : FluH7, RT-160C : Avian Flu H7

(2) Loopamp反応チューブの蓋が確実に閉まっていることを確認した後、装置にセットし、反応を開始します。

(3) LAMP反応終了後、80°C、5分間、酵素失活を行い反応を停止させます(Loopampリアルタイム濁度測定装置の場合は、自動的に移行します。)

(4) 判定は、自動的に行われます。

※ 注意事項

反応後のチューブはキャップを開けずに、焼却処理又は密閉できるビニール袋を二重に施し、廃棄の基準に従って処理してください。増幅産物の飛散防止のため、廃棄の際にオートクレーブ処理は行わないでください。