

Pegcision® Kit

下水(10 mL)中のウイルス濃縮と RNA 精製用 取扱説明書

Pegcision® Kit は、下水中のウイルスの濃縮を約 30 分で行える研究用試薬です。下水疫学調査や環境調査などに使用します。本取扱説明書は、下水試料に含有するウイルスの濃縮手順と QIAGEN 社 QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いた RNA 精製の手順を示します。

<Kit 構成>

Solution	シールの色	溶液の特徴	内容量
I	●赤色	茶褐色の磁性粒子分散液	25 mL
II	●黄色	無色透明	15 mL
III	●緑色	無色透明	30 mL
IV	●青色	無色透明の高粘度	85 mL

<必要な試薬類>

品名	メーカー	品番	備考
エタノール(99.5)	富士フィルム和光純薬	057-00451	相当品で可
超純水	—	—	抵抗値 18 MΩ・cm 以上
QIAamp Viral RNA Mini Kit	QIAGEN	52904	指定品

<必要な器具類>

品名	メーカー	品番	備考
DynaMag™-15 Magnet	Thermo Fisher Scientific	12301D	相当品で可
DynaMag™-2 Magnet	Thermo Fisher Scientific	12321D	相当品で可
2 mL マイクロチューブ	アズワン	1-1600-04	相当品で可
15 mL 遠沈管	アズワン	VIO-50Ba	相当品で可

<準備事項>

- 全ての作業(遠心分離も含む)は室温(15~25°C)で行いますが、試薬類は室温に戻さずそのまますぐに使用できます(QIAamp Viral RNA Mini Kit は除く)。
- Sol.I は使用前に転倒混和などで分散させてください。
- Sol. II と III に析出が見られる場合、そのまま使用できますが、気になる場合は 37°Cで溶解してください。
- RNA 精製工程から始める場合は、<操作手順>9 の分散液を溶解させてから行ってください。
- Buffer AVL (QIAamp Viral RNA Mini Kit 内試薬)を使用する際は、Carrier RNA を添加する調製を事前に行つてください。調製量は別途 QIAamp Viral RNA Mini Kit 付属のプロトコルを参照してください。

<操作手順>

下水中のウイルス濃縮工程

1. 15 mL 遠沈管に下水サンプル 10 mL を入れる。
2. Sol. I を 500 µL 添加し、転倒混和を 10 回以上した後、10 分間静置する。
3. Sol. II を 330 µL 添加後、Sol. III を 550 µL 添加する。
4. 転倒混和を 10 回以上行った後、Sol. IV を 1.7 mL 添加する。
5. Sol. IV の沈殿がなくなるまで激しく転倒混和し、5 分間静置する。
6. DynaMag-15 Magnet に遠沈管を入れ、20 分間静置し磁性粒子を管壁に集める。
7. 粒子のペレットを吸わないように気を付けながら上清を除去する。
8. 超純水を 500 µL 添加し、ピペットで管壁についた磁性粒子を分散させる(約 0.5~1.0 mL の分散液になる)。
9. 分散液全量を 2.0 mL マイクロチューブへ移す。

※ここで RNA 精製工程へ進まず、分散液を凍結保存(-80°C)し、分散液を融解させれば以降の過程から抽出することが可能である。すぐに RNA 精製工程に進む場合は以下の通りに従う。

RNA 精製工程

1. 2.0 mL マイクロチューブを用意し、Buffer AVL を 560 µL 添加する。
2. 下水中のウイルス濃縮工程で得た分散液を 140 µL 添加する。
※分散液は使用前によくボルテックスなどで混和しておく。
3. ボルテックスで 15 秒間混和したのち、軽くスピンドウンする。
4. DynaMag-2 Magnet にマイクロチューブを入れ、10 分間静置し磁性粒子を壁に集める。
5. 新たな 2.0 mL マイクロチューブを用意し、エタノール(99.5)を 560µL 添加する。
6. 4の上清を 5 に全量添加し、ボルテックスで 15 秒間混和したのち、軽くスピンドウンする。
7. DynaMag-2 Magnet にマイクロチューブを入れ、2~3 分間静置し磁性粒子を壁に集める。
※磁性粒子が残っていない場合は壁に集まらない可能性がある。
8. 上清を QIAamp Mini カラム(2 mL コレクションチューブ中)の縁を濡らさないように注意し 630 µL 添加する。
9. ふたを閉め 6,000 xg で 1 分間遠心分離し、QIAamp Mini カラムを新しい 2 mL コレクションチューブに移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる。
※カラム内のフィルターが橙や茶褐色になることがあるが、問題ない。
10. もう一度 8~9 を繰り返す。

11. 注意深くふたを開け、Buffer AW1 を 500 μL 添加し、ふたを閉め 6,000 $\times g$ で 1 分間遠心分離し、QIAamp Mini カラムを新しい 2 mL コレクションチューブに移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる。
12. 注意深くふたを開け、Buffer AW2 を 500 μL 添加し、ふたを閉め 20,000 $\times g$ で 3 分間遠心分離し、QIAamp Mini カラムを新しい 2 mL コレクションチューブに移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる。
13. Buffer AW2 のキャリーオーバーを避けるため、20,000 $\times g$ で 1 分遠心し、QIAamp Mini カラムを新しい 2.0 mL マイクロチューブに移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる。
14. 注意深くふたを開けカラムの中心に Buffer AVE を 60 μL 添加し、ふたを閉め 1 分間インキュベートし、6,000 $\times g$ で 1 分間遠心分離する。
15. カラムを捨て、サンプルを使用するまで-80°Cで保存する。

★下水中の新型コロナウイルス検出を行う場合は、タカラバイオ社製品「SARS-CoV-2 Detection RT-qPCR Kit for Wastewater (#RC390A)」の使用を推奨します。

