

この使用説明書をよく読んでから使用してください

研究用試薬

NASBA Amplification キット

【はじめに】

NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) 法は、主として RNA の鋳型に対して一本鎖の RNA 断片を *in vitro* で特異的に直接増幅する方法です。NASBA 法はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) と同様に酵素を用いて核酸を増幅する方法ですが、PCR と異なりその増幅反応に温度サイクルを必要としません。さらに、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) にて RNA を増幅する場合、操作が煩雑で時間も要していましたが、NASBA 法を用いれば 1 回の反応で済み、2 時間以内で終了します。

【一般的な注意】

1. 本製品は研究用試薬です。診療上の診断に用いることはできません。
2. 使用説明書に記載以外の使用方法については保証を致しません。
3. 使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。詳細は機器メーカーにお問い合わせください。
4. 本製品は核酸 (RNA) を対象とし、大量の RNA を生成する試薬です。検体や増幅産物の取扱いを誤ると検査結果に大きく影響しますので、遺伝子操作に関する注意点をよく理解して実施してください。

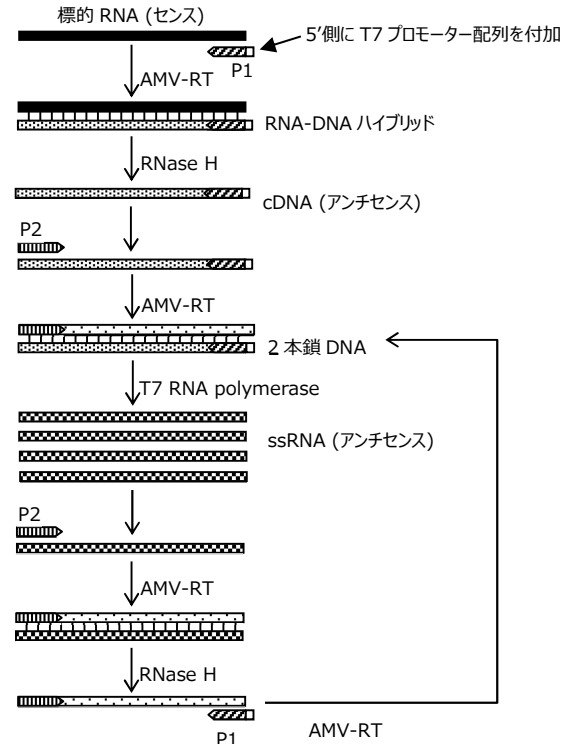
【形状・構造等 (キットの構成)】

1. NASBA試薬 (Lyophilized Reaction Buffer) : dNTPs, NTPs
2. NASBA溶解液
3. NASBA酵素試薬 (Lyophilized Enzyme Mix) : AMV-RT, RNase H, T7 RNA polymerase
4. NASBAコントロールプライマー : ヒトβ-actinプライマー

【測定原理】

1. 原理
NASBA 法は標的 RNA に特異的な 2 種類のプライマー及び 3 種類の酵素 (AMV-RT, RNase H, T7 RNA polymerase) を用いた遺伝子増幅法です。
標的 RNA (センス) に相補的な P1 プライマー (P1) は 5' 側に T7 RNA polymerase のプロモーター配列が付加されています。P2 プライマー (P2) は、P1 が伸長して生じるアンチセンス cDNA 鎖に相補的な配列を有しています。P1 を標的 RNA にアニールさせると、AMV reverse transcriptase (AMV-RT) により P1 からの伸長反応 (アンチセンス cDNA の合成) が始まります。この伸長反応で形成された RNA-DNA ハイブリッドの標的 RNA は RNase H により分解され、ハイブリッドは cDNA (アンチセンス) 1 本鎖となります。この 1 本鎖になった cDNA に P2 がアニールし、P2 は AMV-RT の DNA polymerase 活性により伸長し、T7 RNA polymerase のプロモーターを含む 2 本鎖 DNA が形成されます。このプロモーター配列を T7 RNA polymerase が認識して、P2 の 5' - 末端までを含む標的 RNA に対しアンチセンス配列の RNA コピーを多数合成します。この時 1 本鎖の RNA は、RNase H の基質にならないので分解されません。新しく合成されたアンチセンス RNA を鋳型として、P2 からのセンス cDNA の合成及び RNase H による RNA-DNA ハイブリッドの分解が行われます。1 本鎖になった cDNA (センス) の 3' - 末端に P1 がアニールし、AMV-RT により 2 本鎖 DNA が伸長され、再び T7 プロモーター配列からアンチセンス配列の RNA コピーが多数合成されます。この一連のステップが一定温度で連続的に起こることにより、指数関数的に RNA が合成されます。この結果生じる主な増幅産物は、アンチセンス RNA です。

2. 原理図



3. 特徴

- 1) 標的 RNA (センス) を鋳型とし、ssRNA (アンチセンス) を増幅します。
- 2) 2本鎖DNAは鋳型にならないので、RNAの特異的増幅が可能です。
- 3) 増幅反応を一定温度で行うため、特別な装置は不要です。

【操作上の注意】

1. 測定試料の性質、採取方法
 - 1) あらかじめ検体からRNAを抽出してください。
 - 2) 検体からのRNA抽出には、各施設で使用されているRNA抽出法に従ってください。RNA抽出試薬 (EXTRAGEN II 等) を使用する際は、各キットの使用説明書に従ってください。
 - 3) RNA濃度が高すぎるとNASBA反応を阻害することがありますので、total RNA 0.1 µg前後の検体量を使用してください。
2. その他
 - 1) RNase等による分解防止のため、検体からのRNA抽出操作を含め操作全般にわたって必ずマスク及びグローブを着用してください。
 - 2) 増幅操作は、なるべくクリーンベンチで行ってください。
 - 3) NASBAコントロールプライマーは、ヒトβ-actinに特異的なプライマーセットです。NASBA Amplification キットの試薬調製及び操作の精度管理用として、ヒト検体 (total RNA) に対して使用してください。

【用法・用量 (操作方法)】

1. 準備

1) プライマー

標的とする RNA に相補的な配列を含む P1 及び P2 の 2 種類を準備してください。P1 の 5'側に T7 プロモーター配列が含まれていることが必要です。

T7 プロモーター配列

: 5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAG

2) 精製水 (RNase free water)

分子生物学グレードのものを準備してください。

2. 必要な器具・器材・試料等

1) マイクロピペット (10 µL、200 µL)、フィルターチップ

2) ヒートブロック (41°C、65°C)

3) ボルテックスミキサー

4) 小型卓上遠心機

3. 試薬の調製方法

**

1) NASBA反応溶液

NASBA 溶解液をスピンドウンした後、NASBA 試薬 1 チューブに NASBA 溶解液 110 µL を加え、直ちにボルテックスミキサーを用いて十分に溶解してください。

調製後は氷上に置かず、常温で静置してください。

保存する場合は 4°C で 1 週間、-20°C 以下で 1 か月間使用できます。凍結融解は 2 回まで反応に影響しません。

*

2) NASBAコントロールプライマー

4 µmol/L に調製されています。そのまま使用してください。

**

3) 反応液

NASBA反応溶液 10 µL に P1、P2 を最終濃度 0.4 µmol/L とするようにそれぞれ加え、穏やかにボルテックスミキサーを用いて混和してください。

キット添付の NASBA コントロールプライマーを用いる場合は、NASBA 反応溶液 10 µL に 1 µL 添加し、穏やかにボルテックスミキサーを用いて混和してください。

調製後は遠心しないでください。チューブ壁面に液滴がある場合は手でチューブを振り落とす程度にしてください。

調製後は氷上に置かず、常温で静置してください。

**

4) NASBA酵素液

NASBA 酵素試薬 1 チューブに精製水 (RNase free water) 55 µL を加え、10 秒程度待ってからタッピングなどにより溶解・混和してください。

ボルテックスミキサー等による激しい混和は、酵素が失活するため行わないでください。

4. 操作法 (NASBA法)

1) 0.5 mL チューブに反応液を 10 µL ずつ分注し、常温で静置します。

2) 抽出 RNA を 5 µL ずつ各チューブに分注し、10 回ピペッティングして混合します。

注 1: チューブ内で液が散った場合は遠心機でスピンドウンしてください。衝撃による RNA 分解を防ぐため、ボルテックスミキサー等による混和は行わないでください。

3) 各チューブを 65°C のヒートブロックで 5 分間加温します。

注 2: 増幅効率の高い項目では 65°C の反応は省略可能です。

4) 41°C のヒートブロックで 5 分間加温します。

5) 41°C のヒートブロック上で、チューブ内の反応液に直接 NASBA 酵素液を 5 µL ずつ添加し、4、5 回ピペッティングして混合します。そのまま 41°C のヒートブロックで 90 分間加温します。

注 3: NASBA 酵素液を添加後、最初の 5 分間は NASBA 反応の重要な過程であるため、温度低下を招く遠心等の操作は行わないでください。

6) 反応終了後、速やかに検出操作に移行してください。

NASBA 増幅産物は -20°C で数週間保存可能ですが、長期間保存を行う場合は -70°C 以下で保存してください。

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上 (危険防止) の注意

1) 検体は感染の危険性があるものとして取扱いには十分注意してください。また、検体に接触した器具等は検体と同様、感染の危険性のあるものとして取扱ってください。

2) 試薬が誤って眼や口に入った場合は、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当を受けてください。

2. 使用上の注意

1) 各試薬は保存温度を厳守してください。試薬保存にあたっては、コンタミネーションに注意してください。

2) 増幅反応に使用する試薬は 2 種類ありますので、調製時及び操作時に取り違えないように注意してください。

3) ラベルに記載されている使用期限内に使用してください。

4) ロットの異なる試薬を混合して使用しないでください。

3. 廃棄上の注意

1) 本製品を廃棄する場合は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の関連法規に従って処理してください。

2) 本製品が漏出又は飛散した場合は、少量のときは吸水紙等で拭き取り、大量のときは水で洗い流してください。

3) 本製品の容器等は他の目的に転用しないでください。

【貯蔵方法・有効期間】

1. 貯蔵方法: -20°C 以下 遮光保存

2. 有効期間: 12 か月 (使用期限は容器ラベル及び外箱に表示)

****【包装単位】**

製品名		管理コード	包装
NASBA Amplification キット	NASBA 試薬	BI-0250	10 テスト用 × 5
	NASBA 溶解液		115 µL × 5
	NASBA 酵素試薬		10 テスト用 × 5
	NASBA コントロールプライマー		6 µL × 1

【主要文献】

1) J. Compton: Nature, 350: 91-92 (1991)

2) 川口竜二、他: 臨床検査, 41, 13: 1798-1801 (1997)

3) 宝田裕、他: 遺伝子医学, 2: 105-110 (1998)

【問い合わせ先】

株式会社カインス 学術部

〒113-0033 東京都文京区本郷 2-38-18

TEL 03 (3816) 4480 FAX 03 (3816) 6544

【製造販売元】

株式会社 **カインス**

〒113-0033 東京都文京区本郷 2-38-18

TEL 03 (3816) 4485