

MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit を用いた高感度ウイルス核酸検出

概要

- 感染性疾患の研究・管理にはヒト体液中のウイルス検出が不可欠ですが、ウイルス含有量が極めて少ないサンプルからウイルス由来の核酸 (DNA/RNA) を抽出するのは必ずしも容易ではありません。
- 新しい Applied Biosystems™ MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit は、含有ウイルス量が多いものから少ないものまで、多様な生体サンプルからウイルス核酸を抽出できます。
- タイプの異なるさまざまなサンプルに添加したわずか 50 コピーのウイルスインプットを検出できる MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit は、ウイルス含有サンプルからの高感度かつシンプルな核酸抽出を可能にします。
- 本アプリケーションノートでは、サイトメガロウイルス (CMV) とエプスタイン・バール・ウイルス (EBV) からの核酸抽出における、本キットと Thermo Scientific™ KingFisher™ Flex 核酸・タンパク質・細胞自動抽出・精製装置の使用例をご紹介します。

はじめに

感染性疾患の研究・管理にはヒト体液中のウイルス検出が不可欠です。ウイルス負荷試験 (viral load testing) によって、抗ウイルス療法の有効性評価はもちろん、ウイルス感染の進行をモニタリングしたり初期段階で感染を明らかにしたりすることができますが、アッセイや検査の検出限界を満たす十分な量のウイルス核酸をサンプルから抽出するのは必ずしも容易ではありません。

ウイルス負荷試験は、潜伏感染と活動性感染の鑑別診断や、感染経過の位置付けや確認に有用です。例えば、CMV ウイルス量検査は、臓器移植患者に対する先制治療の開始時期を決定したり、活動性感染と無症候性感染を見分けたりするのに役立ちます。また、CMV の DNA コピー数を基に活動性 CMV 感染の発現を予測することもでき、値が大きいほど症候性疾患のリスクが高くなると報告されています [1]。EBV ウイルス量検査についても同様に、臓器移植患者における EBV 関連移植後リンパ増殖性疾患の診断に重要な役割を果たしています [2]。また、EBV は複数のがんの遠因ともいわれており [3]、(ウイルス量が少ない) 初期段階での EBV 検出によって早期治療に結びつけることができるでしょう。



新しいMagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kitは、含有ウイルス量が多いものから少ないものまで、多様な生体サンプルからウイルス核酸を抽出できます。本キットを用いると、シンプルかつ迅速で自動化も容易なワークフローを通して、400 μ Lのサンプルに含まれるわずか50 コピーのウイルスから核酸を抽出できます。それでは、さまざまなコピー数のCMVやEBVを添加したタイプの異なるヒトサンプルを対象に、本キットとKingFisher Flexシステムを用いた核酸抽出例を見ていきましょう。

材料・方法

サンプルおよびコントロール

400 μ Lのヒト全血、尿、血漿に既知量のCMVおよびEBVインタクトコントロール (ZeptoMetrix、カタログ番号:NATCMV-ERCM、NATEBV-ERCM) を添加した希釈系列を用いて、抽出範囲を確認しました。

トータル核酸の抽出

MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kitと96ウェルプレートのKingFisher Flexシステムを用いて異なるウイルスコピー数を添加した全血・尿・血漿サンプルから、サンプル濃度を最大限とするために、50 μ Lの抽出溶液に核酸を抽出しました。図1にワークフローを示します。

PCRによるウイルス検出

抽出した各サンプルから4 μ Lずつを分取し、Applied Biosystems™ TaqMan™ アッセイ (CMV用、EBV用) とTaqMan™ Fast Virus One-Step Master Mixを用いて (事前増幅ステップなし)、Applied Biosystems™ QuantStudio™ 12K FlexリアルタイムPCRシステムでリアルタイムPCR (duplicate) を行いました。高速サイクル (95 $^{\circ}$ Cで20秒を1サイクル、95 $^{\circ}$ Cで3秒および60 $^{\circ}$ Cで30秒を45サイクル) の条件下で反応させ、感度を上げるためにサイクル数を標準的な40サイクルから45サイクルに変更しました。



結果

リアルタイムPCR解析結果(図2)が示すように、MagMAX Viral/Pathogenキットを用いるとわずか50コピーのウイルスから核酸を抽出できました。核酸濃度の低下に伴い予想通りの割合で平均 C_t 値が上昇しており、回収効率が線形性を描くことが見て取れます。サンプルタイプが異なっても結果は一貫しており、本プロトコルと試薬の頑健性と柔軟性が確認されました。

結論

タイプの異なるさまざまなサンプルに添加したわずか50コピーのウイルスインプットを検出できるMagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kitは、ウイルス含有サンプルからの高感度かつシンプルな核酸抽出を可能にします。本手法は、ウイルス疾患の研究・管理における重要な課題のひとつを解決できる効率的なワークフローといえます。

参考文献

- Humar A, Gregson D, Caliendo AM et al. (1999) Clinical utility of quantitative cytomegalovirus viral load determination for predicting cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. *Transplantation* 68:1305–1311.
- Gulley ML, Tang W (2010) Using Epstein-Barr viral load assays to diagnose, monitor, and prevent post-transplant lymphoproliferative disorder. *J Clin Microbiol* 23:350–366.
- Young-Hyeh K (2015) EBV and human cancer. *Exp Mol Med* 47(1):e130.

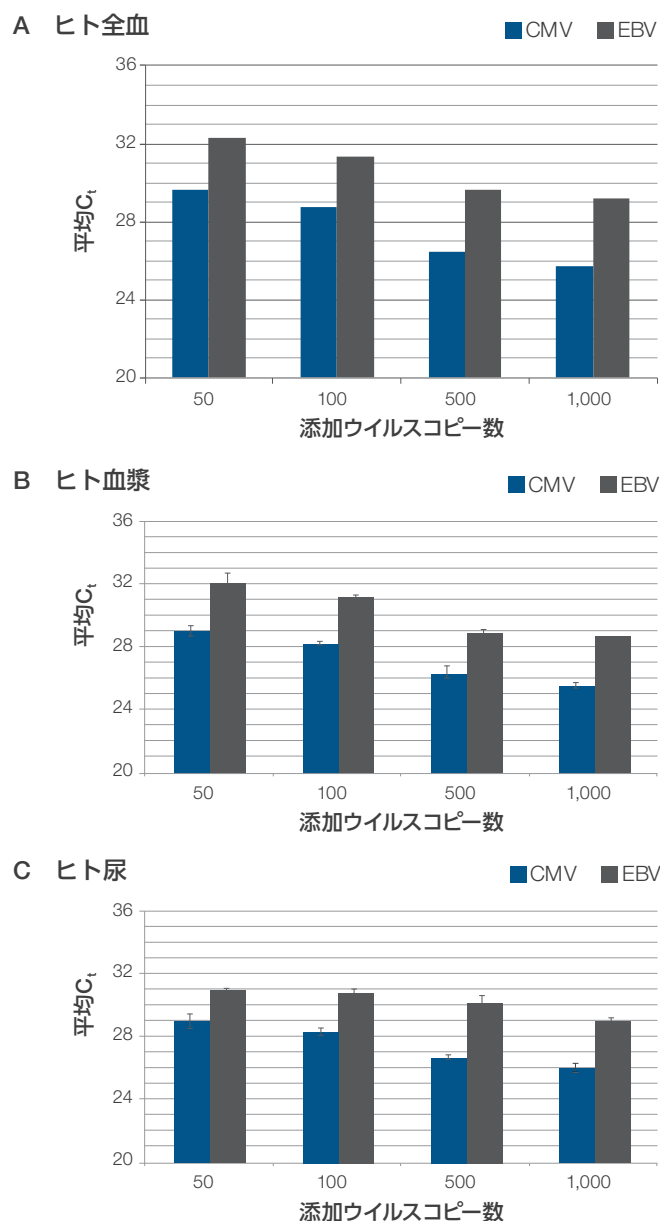


図2. さまざまなEBVおよびCMVインプットコピー数における平均 C_t 値(リアルタイムPCR TaqManアッセイ) (A) 全血、(B) 血漿、(C) 尿サンプルに添加した各種スパイクインコントロールの回収結果

詳細はこちらをご覧ください thermofisher.com/magmaxviralpath

研究用에만使用できます。診断用には使用いただけません。

© 2022 Thermo Fisher Scientific Inc.

All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc., used under permission and license.

実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。

価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。

標準販売条件はこちらをご覧ください。thermofisher.com/jp-tc SPA045-A22110B

販売店

サーモフィッシャーサイエンティフィック
ライフテクノロジーズジャパン株式会社

テクニカルサポート ☎ 0120-477-392 ✉ jptech@thermofisher.com

オーダーサポート TEL : 03-6832-6980 FAX : 03-6832-9584

営業部 TEL : 03-6832-9300 FAX : 03-6832-9580

[facebook.com/ThermoFisherJapan](https://www.facebook.com/ThermoFisherJapan)

[@ThermoFisherJP](https://twitter.com/ThermoFisherJP)

[thermofisher.com](https://www.thermofisher.com)