



ハンドブック

DNA 全血キット
QuickGene DNA whole blood kit S
(DB-S)

Ver.7.0

Contents

| | |
|-------------------------------------|----|
| 1. はじめに | 4 |
| 2. キット内容物と保存条件 | 4 |
| 2 - 1. キット内容物 | 4 |
| 2 - 2. 保存条件 | 4 |
| 3. キット以外にご準備いただくもの | 5 |
| 4. 取扱上の安全注意事項 | 6 |
| 5. 使用上の注意事項 | 7 |
| 6. 品質管理 | 8 |
| 7. 製品説明 | 8 |
| 8. プロトコル | 9 |
| 8 - 1. 試薬の準備 | 9 |
| 8 - 2. ライセート作製プロトコル | 11 |
| 8 - 3. QG-810 を用いた分離プロトコル | 14 |
| 8 - 4. QG-Mini480 を用いた分離プロトコル | 17 |
| 9. トラブルシューティング | 20 |
| 付録 1 QG-810 パラメータについて | 25 |

ご注意

本キットに含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。
診断および臨床用試薬として使用しないでください。

1. はじめに

薄さ 100 μ m 以下の多孔質フィルターを用い、加圧法による核酸分離システムを実現しました。
このキットの特徴は以下のとおりです。

- このキットをお使いいただくことにより、簡便に全血からゲノム DNA を分離することができます。
- 8 サンプル同時に分離操作を行うことができます。
ライセートセット後の分離時間は以下のとおりです。
QG-810 の場合：8 サンプル 約 6 分
- 48 サンプル同時に分離操作を行うことができます。
QG-Mini480 の場合：48 サンプル 約 45 分
 - 高純度（タンパク質やカオトロピック塩を含まない）のゲノム DNA が得られます。得られた高品質のゲノム DNA は PCR、制限酵素処理、サザンブロットティングなどのアプリケーションに適しています。

QuickGene を用いて分離を行う際は、各装置の取扱説明書をよくお読みください。

2. キット内容物と保存条件

2 - 1. キット内容物

以下の内容物が入っていますので確認してください。

キットには 96 処理分のゲノム DNA 分離用試薬が含まれています。

| | | |
|--------------------------------|-----|-------|
| □ Protease(凍結乾燥品) | EDB | 1 本 |
| □ Lysis Buffer | LDB | 30ml |
| □ Wash Buffer | WDB | 160ml |
| □ Elution Buffer | CDB | 100ml |
| □ Cartridges(カートリッジ) | CA | 96 個 |
| □ Collection Tubes(コレクションチューブ) | CT | 96 個 |
| □ Caps(キャップ) | CAP | 96 個 |
| □ Waste Tubes(ウェイストチューブ) | WT | 96 個 |

2 - 2. 保存条件

指定の温度(15 ~ 28 $^{\circ}$ C)で保存してください。有効期限は外箱に表示しています。

溶解後の EDB を冷蔵(4 $^{\circ}$ C)で保存した場合、2 か月間安定です。2 か月以上保存された EDB は使用しないでください。

溶解後の EDB を冷凍保存することにより少なくとも 6 か月は性能維持して保管できます。その場合は、少量ずつ分注するなどして、凍結、解凍の繰り返しは避けてください。

3. キット以外にご準備いただくもの

① 試薬

- 特級エタノール(>99%) (ライセート調製および WDB の希釈に使用)
- スクエアゼフリー水 (クリーンベンチ等内で開封・使用)

② 器具・機材

- QuickGene
 - 遠沈管* (大/小のセット)
 - マイクロピペット
 - マイクロピペット用チップ
 - 1.5ml マイクロチューブ
 - チューブスタンド
 - チューブミキサー (2,500rpm 程度の攪拌ができるもの)
 - 簡易卓上遠心機
 - ヒートブロックまたはウォーターバス (56°C で使用可能なもの)
- * 遠沈管は、QG-810 で、所定量の特級エタノールを添加した WDB、CDB を入れる容器として使用します。QG-Mini480 をご使用の場合は不要です。

遠沈管の推奨品は、表 1 のとおりです。使用するカートリッジ数に応じて使い分けてください。

表 1 遠沈管の種類 (QG-810 ご使用の場合)

| バッファスタンド (または遠沈管ホルダ)のサイズ | 対応する カートリッジ数 | 遠沈管の種類 | 品名 |
|-----------------------------|-----------------|----------------|---------------------------------|
| 標準 | ～ 16 | 大きい遠沈管 (WDB 用) | 50 ml コニカルチューブ (BD ファルコンなど) |
| | | 小さい遠沈管 (CDB 用) | 15 ml コニカルチューブ (BD ファルコンなど) |
| 大 | ～ 72 | 大きい遠沈管 (WDB 用) | 175 ml コニカルチューブ (BD ファルコンなど) |
| | | 小さい遠沈管 (CDB 用) | 50 ml コニカルチューブ (BD ファルコンなど) |

4. 取扱上の安全注意事項

◆ Protease EDB

- 取扱上のご注意：●目に入れたり、飲んだりしないでください。
- 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

◆ LDB (Lysis Buffer)

- 薬品の特性：●飲むと有害の可能性があります。
- 取扱上のご注意：●目に入れたり、飲んだりしないでください。
- 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。
 - この薬品を扱う場合は、適切な保護手袋および保護めがねを着用してください。

◆ WDB (Wash Buffer)

- 取扱上のご注意：●目に入れたり、飲んだりしないでください。
- 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

◆ CDB (Elution Buffer)

- 取扱上のご注意：●目に入れたり、飲んだりしないでください。
- 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

◆ LDB は、温度の高い場所での使用、保存は避けてください。

◆ LDB を含む溶液や廃液は、絶対に漂白剤と混合しないでください。

◆ 感染性のおそれのあるサンプルを使用する場合

感染性のおそれのあるサンプルを扱う場合は、適切な保護具を着用してください。

◆ 感染性のおそれのあるサンプルを使用し、廃棄する場合

感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用后廃棄する場合は、感染性産業廃棄物に該当しますので関連する法に従い、焼却、熔融、滅菌、消毒などの処理をしてください。なお、処分業者に委託する場合は、特別管理産業廃棄物処分業の許可を受けた業者へ、特別管理産業廃棄物管理票(マニフェスト)を添えて処理を委託してください。

◆ 参考情報

各試薬の性状および取扱いに関する詳細情報は、SDS(製品安全データシート)を参照してください。SDSは弊社ホームページ(<https://www.kurabo.co.jp/bio/>)からダウンロードできます。

5. 使用上の注意事項

◆ サンプルに関する注意事項

- 検体の容量が 200 μ l 以下の場合、PBS(滅菌済)等で希釈して 200 μ l になるように調製してください。
- EDTA・2Na、EDTA・2K またはヘパリンで採血した全血を使用してください。
- 全血は、できる限り採血後 3 日以内のものを使用してください。長期間保存した後の血液を用いた場合、収量の低下や DNA の分解を生じることがあります。
- 白血球が 2×10^6 個を超えた場合、ゲノム DNA 収量が低下することがあります。この場合は PBS(滅菌済)等で希釈して 2×10^6 個以下になるように調製してください。
- また、白血球数が 5×10^6 個を超えた場合、カートリッジ(CA)が詰まる可能性があります。PBS(滅菌済)等で希釈して分離を行うことをお勧めします。

◆ 試薬に関する注意事項

- EDB 凍結乾燥品をヌクレアーゼフリー水で溶解時、環境中からの微生物等の混入を避けるため、クリーンベンチまたは安全キャビネット(以下、クリーンベンチ等)の中で溶解作業を行うことを推奨します。
- EDB にヌクレアーゼフリー水を添加後は時々攪拌しながら 15~30°C に 30 分以上置き、粉末が完全に溶解していることを確認してから使用してください。溶解が不十分の場合、目的の収量が得られないことやカートリッジ(CA)が詰まる場合があります。

◆ 操作に関する注意事項

- すべての操作は 15~30°C で行ってください。低温または高温での使用の場合、キットの性能が発揮されないことがあります。
- チューブミキサーは 2,500rpm 以上の攪拌ができるものを使用してください。ボルテックスが弱いと溶解が不十分となり、目的の収量が得られないことやカートリッジ(CA)が詰まる場合があります。
- 分離の途中では時間をおかず、操作は素早く行ってください。
- 収量はサンプルの状態により変動します。標準的なゲノム DNA 収量は全血 200 μ l あたり 4 ~ 8 μ g です。
- 下記ページを参照し、QuickGene の準備をした上でライセート作製を開始することをお勧めします。

QG-810 をご使用の場合:8-3(p.14)、付録 1(p.25)

QG-Mini480 をご使用の場合:8-4(p.17)

- 詳しくは、QuickGene の取扱説明書を参照してください。

6. 品質管理

- キットロット間の性能差がないことを確認しています。
- ゲノム DNA の収量や品質は 260nm の吸光度、260nm/280nm の吸光度比によって確認しています。

7. 製品説明

本キットは、全血からのゲノム DNA の分離に対応します。基本処理可能量は 200 μ l です。全血 (200 μ l) から分離したゲノム DNA の収量および純度 (A260/280) を表 2 に示します。

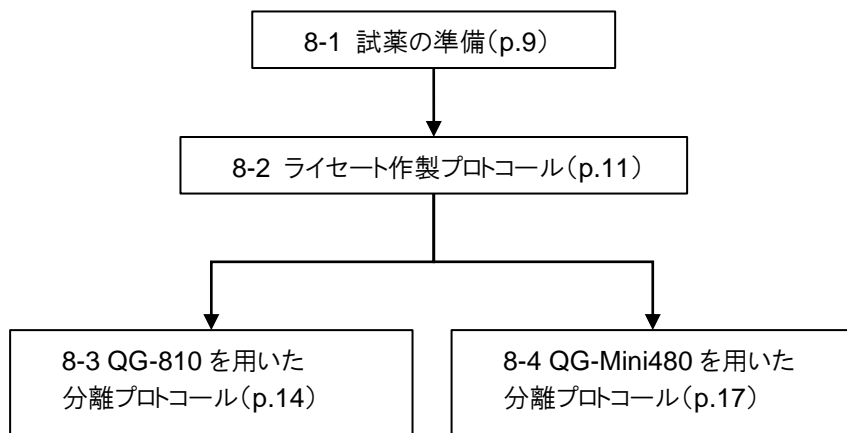
表 2

| サンプル | ゲノム DNA 収量 (μ g) | A260/280 |
|------------------|-----------------------|----------|
| 全血 (200 μ l) | 4 ~ 8 | 1.97 |

- 収量はサンプルの状態により変動します。
- ゲノム DNA と共に RNA が精製されます。

8. プロトコール

[Overview Flow Chart]



8 - 1. 試薬の準備

◆ EDB(凍結乾燥品)

凍結乾燥品を含む瓶に3.3mlのヌクレアーゼフリー水を添加し、完全に溶解させてください。環境中からの微生物等の混入を避けるため、クリーンベンチまたは安全キャビネット(以下はクリーンベンチ等)の中で溶解作業を行うことを推奨します。

溶解後の EDB は冷蔵(4°C)で保存する場合、2 か月間安定です。2 か月以上保存された EDB は使用しないでください。

冷凍保存することにより少なくとも 6 か月は性能を維持して保管できます。その場合は少量ずつ分注するなどして、凍結、解凍の繰り返しは避けてください。

EDB は以下の方法で完全に溶解させてから使用してください。

クリーンベンチ等内で 3.3ml のヌクレアーゼフリー水を添加後、蓋をして転倒混和します。

時々攪拌しながら 15～30°C に 30 分以上置き、粉末が完全に溶解していることを確認してから使用してください。溶解が不十分の場合、目的の収量が得られないことやカートリッジ(CA)が詰まることがあります。

◆ LDB(30ml)

使用前に十分に混和してください。

析出物が生じた場合は、37°C で溶解後、15～30°C に戻してから使用してください。

◆ WDB(160ml)

濃縮状態でお届けします。

使用前に、ボトルに 160ml の特級エタノール(>99%)を添加し、よく混和してください。エタノール添加後はボトル蓋ラベルの「ethanol added?」チェックボックスにチェックを入れてください。また、エタノール添加後は揮発を防ぐために、ボトルの蓋をしっかりと閉めてください。

◆ CDB(100ml)

ゲノム DNA 溶出時には、必ず CDB を使用してください。

◆ WDB(特級エタノール添加済み)および CDB の必要量(QG-810 をご使用の場合)

表 3 を参考に、分離処理をするカートリッジ数に応じて、WDB、CDB の必要量を準備してください。準備した液は指定の遠沈管(表 1 p 5 参照)に移し、QG-810 のバッファスタンド(または遠沈管ホルダ)の所定の位置にセットしてください。

表 3 WDB、CDB 必要量

| カートリッジ数 | WDB (QG-810) | CDB (QG-810) |
|---------|-----------------|-----------------|
| 8 | 26ml | 9ml |
| 16 | 44ml | 11ml |
| 24 | 62ml | 13ml |
| 32 | 80ml | 15ml |
| 40 | 99ml | 17ml |
| 48 | 117ml | 19ml |
| 56 | 135ml | 21ml |
| 64 | 154ml | 22ml |
| 72 | 172ml | 24ml |

※ディスチャージなどに必要な液量は、

QG-810:WDB 8.0ml 、 CDB 7.4ml

カートリッジ数に応じて WDB、CDB を加算してください。

1 カートリッジあたり、WDB 2.25ml、CDB 200 μ l を使用します。

例えばカートリッジを 2 本使用する場合は、12.5ml の WDB と 7.8ml の CDB が必要です。

※WDB、CDB 用遠沈管のサイズは表 1(p.5)を参照してください。

8 - 2. ライセート作製プロトコール

本キットは、1 処理あたり全血(200 µl)からのゲノム DNA の分離のみに対応しています。

【分離を始める前の注意事項】

- 試薬類は 15～30°C戻してから使用してください。
- ヒートブロックまたはウォーターバスを 56°Cに設定してください(ステップ<3>(p.13)で使用します)
- サンプルおよび試薬の液量はライセート作製フロー(p.12)に記載された液量を厳守してください。
- 分離の途中では時間をおかず、操作は素早く行ってください。
- クロスコンタミネーションを防ぐために毎回ピペットチップを交換することをお勧めします。
- LDB を含む溶液や廃液は、絶対に漂白剤と混合しないでください。
- 感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用後廃棄する場合は、感染性産業廃棄物に該当しますので適切な処理を行ってください。

【分離を始める前の確認事項】

- WDB は濃縮状態でお届けします。分離を始める前に必ず 160ml の特級エタノール(>99%)が添加されていることを確認してください。


ライセート作製フロー

<1> 1.5ml マイクロチューブ(<1a><1b><1c>の順序は厳守)

- ← <1a> EDB(ヌクレアーゼフリー水で溶解済み): 30 μ l
- ← <1b> 全血: 200 μ l
- ← <1c> LDB: 250 μ l

すぐにピペッティング5回(あるいは転倒混和5回)

<2> ボルテックス(最大回転数): 15 秒
軽くスピンドウン(数秒)

<3> 56°C インキュベーション: 2 分 

<4> ← 特級エタノール(>99%): 250 μ l

ボルテックス(最大回転数): 15 秒
軽くスピンドウン(数秒)

ライセート完成

8-3 QG-810 を用いた
分離プロトコール(p.14)

8-4 QG-Mini480 を用いた
分離プロトコール(p.17)

ライセート作製プロトコール詳細

<1><1a>から<1c>までの工程の順序は必ずお守りください。EDB を 1.5ml マイクロチューブに添加した後、直接 LDB を添加しないでください。順序を変えた場合、目的の収量が得られなくなります。

<1a>EDB(ヌクレアーゼフリー水で溶解済み)30 μ l を 1.5ml マイクロチューブの底に添加します。

<1b>全血 200 μ l を添加します。

全血添加後、直ちに<1c>にお進みください。長時間放置した場合、目的の収量が得られないことがあります。

<1c>LDB 250 μ l を添加し、すぐにピペッティングを 5 回行います。

ピペッティングの代わりに転倒混和を 5 回行っても構いません。確実に溶解を行うために、LDB 添加後の液を十分に混合することは極めて重要です。

ピペッティング(あるいは転倒混和)を確実に、EDB、全血、LDB が十分に混合するようにしてください。

<2>最大回転数で 15 秒間ボルテックスします。数秒間スピンドアウンして、マイクロチューブの蓋や壁に付着した液を収集します。

ボルテックスは、最大回転数で 15 秒間確実に行ってください。推奨は、2,500rpm 以上です。これ以下の回転数のボルテックスしかお持ちでないときは、<1c>でのピペッティング(あるいは転倒混和)を念入りに行ってください。

混合が不十分の場合、目的の収量が得られないことやカートリッジ(CA)が詰まる場合があります。

<3>56°Cで 2 分間インキュベートします。

インキュベーション時間の延長は、5 分までは収量に影響しません。

<4>特級エタノール(>99%)を 250 μ l 添加し、最大回転数で 15 秒間ボルテックスします。数秒間スピンドアウンして、マイクロチューブの蓋や壁に付着した液を収集します(ライセート完成)。

サンプルとエタノールが十分に混合するようにしてください。ボルテックスは、<2>と同様の回転数をご使用ください。

ライセート完成後は、速やかに QuickGene にて分離操作を行ってください。

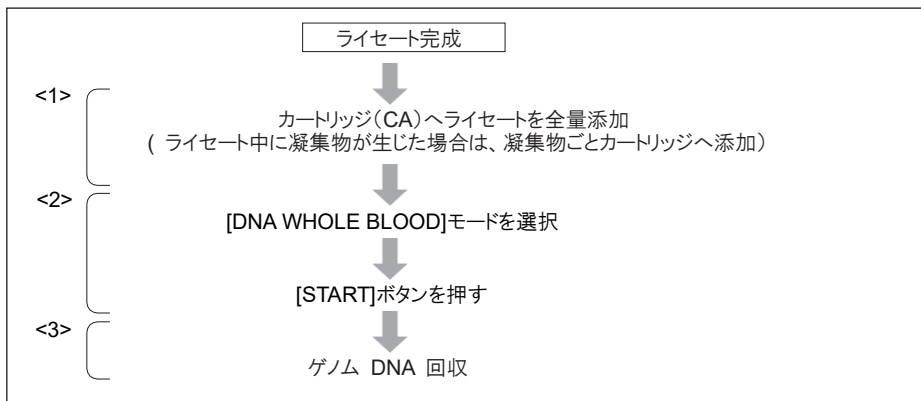
8-3 QG-810 を用いた分離プロトコール(p.14)

8-4 QG-Mini480 を用いた分離プロトコール(p.17)

8 - 3. QG-810 を用いた分離プロトコール

- ご使用になる前に QG-810 の取扱説明書をよくお読みになり、必要な準備をしてください。
- WDB に 160 ml の特級エタノール(>99%)が添加されていることを確認してください。
- QG-810 の分離モードは、「DNA WHOLE BLOOD」モードを選択してください。
- 各試薬、カートリッジおよび各チューブはクリーンルームで生産されております。ご使用の際はヌクレアーゼの混入を避けるため、手袋を着用してセットしてください。
- カートリッジ(CA)および各チューブのセットの方法、および各試薬のセットの位置については、QG-810 の取扱説明書をお読みください。
- QG-810 のフロントカバーを開けて、専用のコレクションチューブ(CT)、ウェイトチューブ(WT)をチューブホルダ(またはコレクションチューブホルダ)に差し込みます。カートリッジは専用カートリッジ(CA)を使用してください。
- p.10 を参考に、WDB(特級エタノール添加済み)、CDB を QG-810 にセットしてください。
- カートリッジ(CA)の位置がずれていると、液がこぼれたり、分離操作ができないおそれがあります。
- フロントカバーを閉め、オペレーションパネルの[DISCHARGE]ボタンを押してください。
- ディスチャージ操作を行わないと、管内の残留エアの影響で規定量の WDB、CDB が注入されず、正確な結果が得られません。
- カートリッジ(CA)内のフィルターにピペットチップが触れないように注意してください。
- LDB を含む溶液や廃液は、絶対に漂白剤と混合しないでください。
- 感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用后廃棄する場合は、感染性産業廃棄物に該当しますので、適切な処理を行ってください。

QG-810 分離フロー



QG-810 分離プロトコール詳細

<1><ライセート添加>8-2(p.11)で調製したライセート全量をカートリッジ(CA)へ添加します。

ライセート中に凝集物が生じた場合は、ピペティングにより凝集物を浮かせ、全量を凝集物ごとカートリッジへ添加します。ライセート完成後は、速やかに分離操作を行ってください。やむを得ず放置される場合は、ライセート完成後 30 分以内に分離してください。

<2><分離>分離モードは、本キット用にパラメータ設定したモードを選択してください。

パラメータの確認方法は、付録 1(p.25)を参照してください。QG-810 のフロントカバーを閉め、オペレーションパネルに適切なモードが表示されていることを確認してから、[START]ボタンを押します。

分離操作が始まるとオペレーションパネルに「PROCESSING」と表示されます。QG-810 をご使用の場合、分離状況が各ランプ(BINDING、WASHING、ELUTION)の点滅によって確認できます。

分離動作中(「PROCESSING」または「EXECUTING」と表示されているときは)、フロントカバーを開けないでください。万一開けると、分離動作が停止し、継続分離できない場合があります。表 4 で確認してください。

表 4 分離中にフロントカバーを開けた場合の動作

| | QG-810 |
|------|--------|
| 分離動作 | 停止 |
| 分離継続 | 可能*1 |

*1 QG-810 取扱説明書 p.29「3.6 分離処理中にフロントカバーを開いた場合の対処方法」を参照してください。

<3><分離終了>ピープと音が鳴れば分離終了です。
オペレーションパネルには分離結果が表示されます。

表 5 分離結果

| | QG-810 | 備 考 |
|-----------|---------------|----------------------------|
| 正常終了 | ✓ (チェック) | |
| 分離不良 | — (ハイフン) | カートリッジの詰まり |
| カートリッジ未装着 | — (アンダーバー) | カートリッジなし、または 分離前にエラーが発生 |

装置が完全に停止していることを確認した後、フロントカバーを開け、チューブホルダ(またはコレクションチューブホルダ)より、コレクションチューブ(CT)を取り出します。カートリッジ(CA)からのゲノム DNA 溶出量は、200 μ l です。

CDB 液量は 50 μ l まで下げられますが、その場合、溶出効率が 2 割ほど低下する可能性があります。

CDB 液量の変更は付録 1(p.25 QG-810 の場合)を参照してください。

全血 200 μ l からの標準的なゲノム DNA 収量は、4 ~ 8 μ g です。

すぐにゲノム DNA を使用しない場合は、キャップ(CAP)をしっかりと閉めた後、4°Cまたは-20°Cで保存してください。長期間ゲノム DNA を保存される場合、-20°Cで保存することをお勧めします。

<4>ウェイトチューブ(WT)を取り出します。ウェイトチューブと廃液を規定に従って捨ててください。カートリッジホルダを取り外し、カートリッジ(CA)も処分します。ディスチャージレートの廃液も捨ててください。

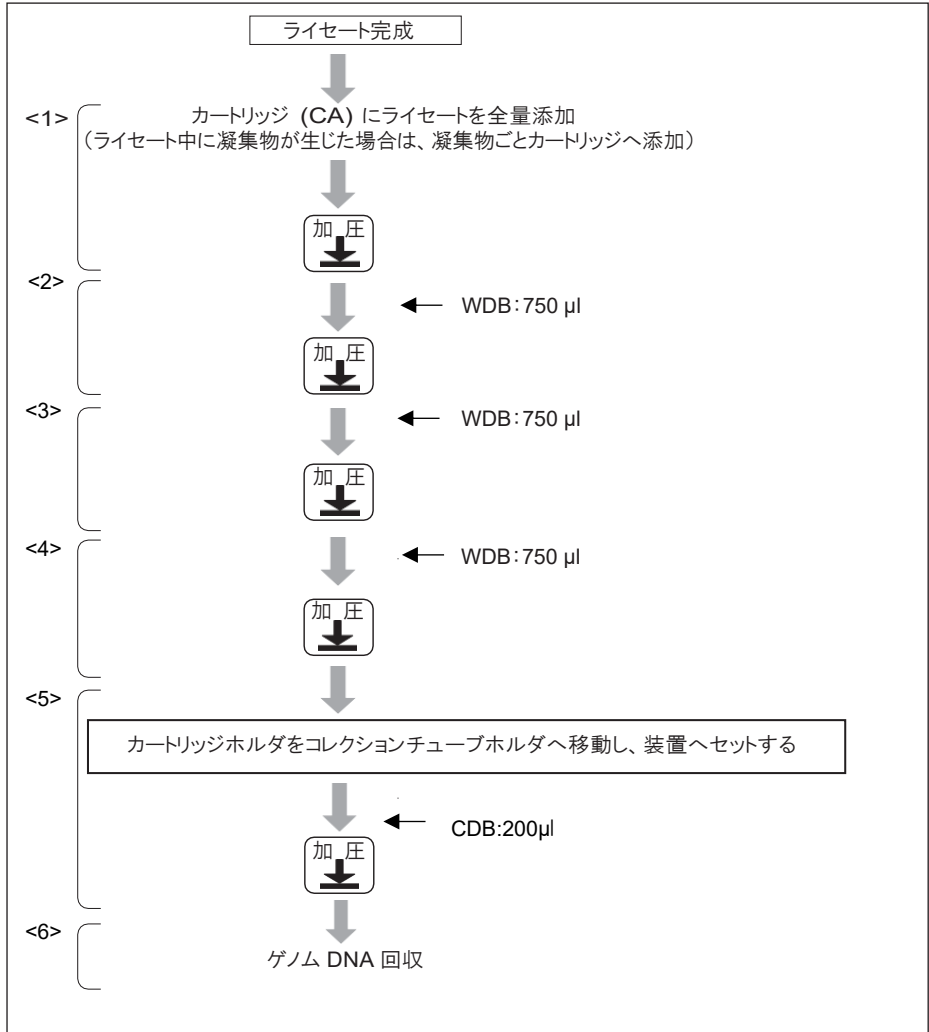
8 - 4. QG-Mini480 を用いた分離プロトコール

- ご使用になる前に QG-Mini480 の取扱説明書をよくお読みになり、必要な準備をしてください。
- WDB に 160ml の特級エタノール (>99%) が添加されていることを確認してください。
- QG-Mini480 のウェイトチューブホルダにウェイトチューブ(WT)をセットしてください。
- QG-Mini480 のコレクションチューブホルダにコレクションチューブ(CT)をセットし、セパレーターを上から被せてください。
- QG-Mini480 のカートリッジホルダをウェイトチューブホルダにセットし、カートリッジ(CA)をセットしてください。その際、カートリッジホルダがウェイトチューブホルダの溝に合わせでセットされていることを確認してください。装置にホルダをセットする際、ホルダの取っ手側が装置手前になります。
- ライセートをアプライした列に加圧シールプレートをセットしてください。加圧シールプレートはパッキン面がカートリッジ側になるようにセットし、加圧シールプレートの両端がカートリッジホルダの溝に確実にセットされていることを確認してください。
- QG-Mini480 のカートリッジホルダとウェイトチューブホルダ(あるいはコレクションチューブホルダ)を装置本体にセットする際、ウェイトチューブホルダ及びコレクションチューブホルダは各列で固定されるようになっています。各列が加圧ノズルの真下にくる位置までホルダをゆっくりと押し込んでください。
- QG-Mini480 のカートリッジホルダをウェイトチューブホルダより取り外し、コレクションチューブホルダにセットする際は、セパレーターがコレクションチューブホルダの上に乗っていることを確認してください。カートリッジホルダをコレクションチューブホルダの所定の位置にセットし、セパレーターを抜き取ってください。詳しくは、「QG-Mini480 の取扱説明書:2 操作方法」を参照してください。
- カートリッジ(CA)内のフィルターにピペットチップが触れないように注意してください。
- LDB を含む溶液や廃液は、絶対に漂白剤と混合しないでください。
- 感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用后廃棄する場合は、感染性産業廃棄物に該当しますので、適切な処理を行ってください。

QG-Mini480 分離フロー

分離フロー中の加圧マーク  は下記操作を意味しています。

- ① ウェイストチューブホルダ(カートリッジホルダセット済み)を QG-Mini480 本体にセットする
- ② 加圧スイッチを手前に回して加圧開始
- ③ カートリッジ(CA)内に液が残っていないことを確認してから加圧スイッチを元の位置に戻す
- ④ コレクションチューブホルダ(カートリッジホルダセット済み)を QG-Mini480 本体から取り出す



QG-Mini480 分離プロトコール詳細

- <1> (ライセート添加) 調製したライセート全量をカートリッジ(CA)へ添加します。カートリッジホルダの所定の位置に加圧シールプレートをセットします。ウェストチューブホルダ(カートリッジホルダセット済み)を QG-Mini480 本体にセットします。その際、ウェストチューブホルダの取っ手側が装置手前となります。カートリッジの 1 列目に加圧ノズルの真下にくる位置までホルダをゆっくりと押し込み、QG-Mini480 本体の加圧スイッチを手前に回し、加圧を開始します。ライセートがカートリッジ内に残っていないことを確認し、加圧スイッチを元の位置に戻します。
- <2> (洗浄 1 回目) ウェストチューブホルダ(カートリッジホルダセット済み)を引き出し、WDB 750 μ l をカートリッジ(CA)へ添加します。ウェストチューブホルダ(カートリッジホルダセット済み)を QG-Mini480 本体にセットします。QG-Mini480 本体の加圧スイッチを手前に回し、加圧を開始します。WDB がカートリッジ内に残っていないことを確認し、加圧スイッチを元の位置に戻します。
- <3> (洗浄 2 回目) ウェストチューブホルダ(カートリッジホルダセット済み)を引き出し、WDB 750 μ l をカートリッジ(CA)へ添加します。ウェストチューブホルダ(カートリッジホルダセット済み)を QG-Mini480 本体にセットします。QG-Mini480 本体の加圧スイッチを手前に回し、加圧を開始します。WDB がカートリッジ内に残っていないことを確認し、加圧スイッチを元の位置に戻します。
- <4> (洗浄 3 回目) ウェストチューブホルダ(カートリッジホルダセット済み)を引き出し、WDB 750 μ l をカートリッジ(CA)へ添加します。ウェストチューブホルダ(カートリッジホルダセット済み)を QG-Mini480 本体にセットします。QG-Mini480 本体の加圧スイッチを手前に回し、加圧を開始します。WDB がカートリッジ内に残っていないことを確認し、加圧スイッチを元の位置に戻します。
- <5> (回収) セパレーターがコレクションチューブホルダの上に載っていることを確認してください。

ウェストチューブホルダ(カートリッジホルダセット済み)を引き出し、カートリッジホルダをウェストチューブホルダより取り外し、コレクションチューブホルダの所定の位置にセットします。セパレーターを引き抜き、カートリッジホルダをコレクションチューブホルダの溝にセットします。詳しくは、「QuickGene-Mini480 の取扱説明書」を参照してください。CDB 200 μ l をカートリッジ(CA)へ添加し、コレクションチューブホルダ(カートリッジホルダセット済み)を QG-Mini480 本体にセットします。QG-Mini480 本体の加圧スイッチを手前に回し、加圧を開始します。CDB がカートリッジ内に残っていないことを確認し、加圧スイッチを元の位置に戻します。

全血 200 μ l からの標準的なゲノム DNA 収量は、4 ~ 8 μ g です。すぐにゲノム DNA を使用しない場合は、キャップまたは 1.5ml マイクロチューブの蓋をしっかりと閉めた後、4°C または -20°C で保存してください。長期間ゲノム DNA を保存される場合、-20°C で保存することをお勧めします。

9.トラブルシューティング

トラブルが生じた場合には、以下の対策を参照してください。 (*):QG-810 をご使用の場合

(**):QG-Mini480 をご使用の場合

(1)DNA の収量が低い、DNA が得られない

| 原因 | 対策 |
|------------------------------|---|
| 全血の保存方法が不適切 | 全血は、できる限り採血後 3 日以内のものを使用してください。長期間保存した後の血液を用いた場合、収量の低下や DNA の分解が生じる可能性があります。 |
| EDB の溶解が不十分 | クリーンベンチ等内で 3.3ml のヌクレアーゼフリー水を添加後、蓋をして転倒混和します。時々攪拌しながら 15~30℃に 30 分以上置き、粉末が完全に溶解していることを確認してから使用してください。 |
| EDB の酵素活性が不十分 | 溶解後の EDB は冷蔵(4℃)で保存する場合、2 か月間安定です。2 か月以上保存された EDB は使用しないでください。冷凍保存することにより少なくとも 6 か月は性能を維持して保管できます。その場合は少量ずつ分注するなどして、凍結、解凍の繰り返しは避けてください。 |
| 試薬、全血の添加順序が不適切 | ライセート調製時、1.5ml マイクロチューブには、EDB(ヌクレアーゼフリー水 3.3ml で溶解済み)→全血→LDB の順で添加してください。 |
| 全血量が不適切 | 全血量が多すぎる場合は、所定量(200 μ l)まで減らしてください。全血量が所定量(200 μ l)以下の場合には、PBS 等で希釈して 200 μ l になるように調製してください。 |
| 白血球数が多すぎる | 白血球数が 2×10^6 個を超えた場合、DNA 収量が低下することがあります。その場合は、PBS 等で希釈して 2×10^6 個以下になるように調製してください。 |
| LDB 添加後のホモジナイズが不十分 | LDB 添加直後に、ピペッティング(あるいは転倒混和)を行い、その後十分にボルテックス(15 秒)してください。ボルテックスは最大回転数(2,500rpm 以上推奨)で行ってください。 |
| ライセート作製時、特級エタノールを所定量添加していない | 特級エタノール(>99%)を所定量添加してください。 |
| 特級エタノール添加後のホモジナイズが不十分 | エタノール添加後、十分にボルテックス(15 秒)してください。ボルテックスは最大回転数(2,500rpm 以上推奨)で行ってください。 |
| WDB に所定量の特級エタノールを添加していない | WDB 使用前には、必ず所定量の特級エタノール(>99%)を添加したことを確認してください。(8-1 p.9 参照) |
| カートリッジ(CA)へライセート全量を添加しきれていない | ライセートに凝集物が見られた場合は、凝集物も含めて全量をカートリッジに添加してください。 |
| CDB 量が不適切(**) | CDB 量が 50 μ l 以上であることを確認してください。 |

| | |
|----------------------------|--|
| フィルターが破れてしまった | カートリッジ(CA)内のフィルターにピペットチップが触れないように注意してください。 |
| 必要以上の加圧を行った(**) | ライセートや WDB がカートリッジ(CA)から抜けたら、できるだけすぐに加圧をやめてください。 |
| カートリッジ(CA)内の液が抜けた後放置した(**) | QuickGene での分離を始めたなら、途中で放置せずに最後まで続けてください。 |
| ゲノム DNA の溶出に CDB 以外の試薬を使った | ゲノム DNA 溶出時には CDB を使用してください。 |
| 古い WDB を使用した(*) | QG-810 に 1 日以上セットされた WDB は使用しないでください。 |
| DNA の分解 | (3)「DNA が分解した」参照 |
| セット試薬の不足(*) | QG-810 にセットした試薬が十分であることを確認してください。 |

(2)カートリッジ(CA)が詰まった

| 原因 | 対策 |
|-----------------------|---|
| 全血量が多すぎる | 所定量(200 µl)まで全血量を減らしてください。 |
| 白血球数が多すぎる | 白血球数が 5×10^6 個を超えた場合、カートリッジ(CA)が目詰まりを起こす可能性があります。 2×10^6 個を超えた場合、収量が低下しますので PBS 等で希釈して 2×10^6 個以下になるように調製して分離を行うことをお勧めします。 |
| LDB 添加後のホモジナイズが不十分 | LDB 添加直後に、ピペッティング(あるいは転倒混和)を十分行い、その後十分にボルテックス(15 秒)してください。ボルテックスは最大回転数(2,500rpm 以上推奨)で行ってください。 |
| 特級エタノール添加後のホモジナイズが不十分 | 特級エタノール添加後十分にボルテックス(15 秒)してください。ボルテックスは最大回転数(2,500rpm 以上推奨)で行ってください。 |

(3)DNAが分解した

| 原因 | 対策 |
|-------------|---|
| 全血の保存方法が不適切 | 全血は、できる限り採血後 3 日以内のものを使用してください。長期間保存した血液を用いた場合、収量の低下や、DNA の分解が生じることがあります。 |

(4)DNAの純度が低い

| 原因 | 対策 |
|-----------------------------|--|
| 全血の保存方法が不適切 | 全血は、できる限り採血後 3 日以内のものを使用してください。長期間保存した血液を用いた場合、収量の低下や、DNA の分解が生じることがあります。 |
| EDB の酵素活性が不十分 | 溶解後の EDB は冷蔵(4°C)で保存する場合、2 か月間安定です。2 か月以上保存された EDB は使用しないでください。 冷凍保存することにより少なくとも 6 か月は性能を維持して保管できます。その場合は少量ずつ分注するなどして、凍結、解凍の繰り返しは避けてください。 |
| 試薬、全血の添加順序が不適切 | ライセート調製時、マイクロチューブには、EDB(ヌクレアーゼフリー水 3.3ml で溶解済み)→全血→LDB の順で添加してください。 |
| LDB 添加後のホモジナイズが不十分 | LDB 添加直後に、ピペッティング(あるいは転倒混和)を行い、その後十分にボルテックス(15 秒)してください。ボルテックスは最大回転数(2,500rpm 以上推奨)で行ってください。 |
| ライセート作製時、特級エタノールを所定量添加していない | 特級エタノール(>99%)を所定量添加してください。 |
| 特級エタノール添加後のホモジナイズが不十分 | 特級エタノール添加後十分にボルテックス(15 秒)してください。ボルテックスは最大回転数(2,500rpm 以上推奨)で行ってください。 |
| WDB に所定量の特級エタノールを添加していない | WDB 使用前には、必ず所定量の特級エタノール(>99%)を添加したことを確認してください。(8-1 p.9 参照) |
| 所定の洗浄条件で行っていない(**) | 洗浄は WDB(特級エタノール添加済み)750 µl で 3 回行ってください。 |
| ゲノム DNA の溶出に CDB 以外の試薬を使った | ゲノム DNA 溶出時には CDB を使用してください。 |

(5)PCR など、続けて行う実験がうまくいかない

| 原因 | 対策 |
|----------------|--------------------------|
| 使用した DNA 量が不適切 | 260 nm 吸光度から濃度を確認してください。 |
| DNA の純度が低い | (4)「DNA の純度が低い」参照 |
| DNA の分解 | (3)「DNA が分解した」参照 |

(6) 試薬に析出物が生じた

| 原因 | 対策 |
|-----------|--|
| 低温で保存している | 指定の温度(15~28°C)で保存してください。 析出物が生じた場合は、37°Cで溶解後、15~30°Cに戻してから使用してください。 |

(7) コレクションチューブ(CT)または 1.5ml マイクロチューブにサンプルが回収されない(空である)

| 原因 | 対策 |
|---|--|
| CDB のセット量が不足またはディスチャージ操作を行っていない(*) | 表 3(p.10)に従い、必要量の CDB をセットしてください。また、QG-810 の取扱説明書を参照してディスチャージ操作を必ず行ってください。 |
| CDB を添加していない(**) | カートリッジホルダを回収位置(E)に移動させた後、CDB を 200 µl 添加してください。 |
| CDB 添加の際、カートリッジホルダを回収位置(E)に移動させていない(**) | CDB 添加時は必ずカートリッジホルダをチューブホルダの回収位置(E)に移動させてから添加を行ってください。 |

付録 1 QG-810 パラメータについて

QG-810 をご使用の方は、「DNA WHOLE BLOOD」モードを選択してください。パラメータは下表の通りです。

| 表示順 | LCD 表示 | パラメータ |
|-----|-------------|-------|
| 1 | BIND PEAK | 120 |
| 2 | WASH COUNT | 3 |
| 3 | WASH PEAK | 110 |
| 4 | WASH VOL1 | 750 |
| 5 | WASH VOL2 | 750 |
| 6 | WASH VOL3 | 750 |
| 7 | WASH VOL4 | 750 |
| 8 | WASH VOL5 | 750 |
| 9 | WASH DIP TM | 0 |
| 10 | WAS2 WAIT T | 0 |
| 11 | WAS2 COUNT | 0 |
| 12 | WAS2 PEAK | 110 |
| 13 | WASH VOL1 | 750 |
| 14 | WASH VOL2 | 750 |
| 15 | WASH VOL3 | 750 |
| 16 | WASH VOL4 | 750 |
| 17 | WASH VOL5 | 750 |
| 18 | ELUT VOL | 200 |
| 19 | ELUT PEAK | 100 |
| 20 | ELUT DIP TM | 0 |

※CDB 量を 50 μ l にする場合は「ELUT VOL」パラメータを「50」に変更してください。

なお、パラメータの変更方法は QG-810 の取扱説明書をご参照ください。

＊トレードマークと免責事項

本取扱説明書に記載されている登録名などは、特に表示がない場合でも法律によってその権利が保証されています。



●製造販売元

倉敷紡績株式会社

環境メカトロニクス事業部 バイオメディカル部

〒 572-0823 大阪府寝屋川市下木田町 14-30 クラボウ先進技術センター 2階

TEL (072) 820-3079 FAX (072) 820-3095

URL; <https://www.kurabo.co.jp/bio/>

