

RNA 血液細胞キット
QuickGene-AutoS
RNA Blood Cell Kit
(AS-RB)

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
2 - 3. 試薬ストリップの内容物.....	5
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. プロトコール	9
8 - 1. 試薬の準備.....	9
8 - 2. ライセート作製プロトコール.....	10
8 - 3. 試薬ストリップの準備.....	11
8 - 4. QG-Auto12S/24S 分離操作.....	11
9. トラブルシューティング.....	13
10. オーダーリング・インフォメーション	15
付録1 溶血方法について	15

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

本キットは、QuickGene-Auto12S(以下 QG-Auto12S)、あるいは QuickGene-Auto24S(以下 QG-Auto24S)の抽出工程で使用する試薬を処理サンプル個別に封入した試薬キットです。

本キットの特徴は以下のとおりです。

- 本キットと QG-Auto12S、あるいは QG-Auto24S をご使用いただくことにより、簡便・迅速に溶血後の白血球(健常な成人の血液由来で最大 1.5×10^7 個)から total RNA を抽出することができます。
- 抽出時間は以下のとおりです。
 - QG-Auto12S:約 45 分 *12 サンプル同時に抽出操作を行うことができます。
 - QG-Auto24S:約 45 分 *24 サンプル同時に抽出操作を行うことができます。
- タンパク質やカオトロピック塩を含まない、高純度の total RNA が得られます。得られた高品質の total RNA は RT-PCR、ノーザンブロットングなどのアプリケーションに適しています。

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 48 処理分の total RNA 抽出試薬と消耗品が含まれています。

<input type="checkbox"/> Lysis Buffer LRB	37.5 ml
<input type="checkbox"/> 試薬ストリップ	48 個
<input type="checkbox"/> 1 ml Long Tips	48 個
<input type="checkbox"/> Waste Tubes	48 個

2 - 2. 保存条件

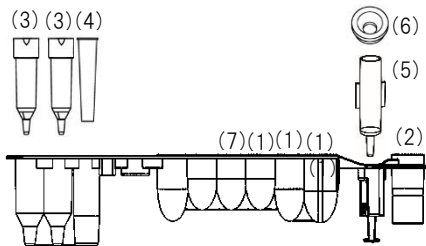
指定の温度(15°C~28°C)で保存してください。有効期限は外箱に表示しています。

2 - 3. 試薬ストリップの内容物

試薬ストリップ 1 本あたり、以下の内容物が入っています。

- | | | | | | |
|--------------------------|-----------------------------|-----|-------------|--------|-------|
| <input type="checkbox"/> | Wash Buffer | WRB | 750 μ l | x 3 箇所 | 下図(1) |
| <input type="checkbox"/> | Elution Buffer | CRB | 250 μ l | | 下図(2) |
| <input type="checkbox"/> | Short Tip | | 2 個 | | 下図(3) |
| <input type="checkbox"/> | Tip pack | | 1 個 | | 下図(4) |
| <input type="checkbox"/> | Cartridge | | 1 個 | | 下図(5) |
| <input type="checkbox"/> | Pressure Adapter | | 1 個 | | 下図(6) |
| <input type="checkbox"/> | DNase solution [※] | | | | 下図(7) |

※DNase 処理ありの場合に使用



3. キット以外にご準備いただくもの

① 試薬

- 2-メルカプトエタノール(2-ME)(LRB に添加して使用)
- 特級エタノール(>99%)(ライセート調整に使用)

※必要に応じて用意していただく試薬

- DNase
[推奨品]
 - ・RQ1 RNase-Free DNase (Promega: Cat. No. M6101)
 - ・Deoxyribonuclease(RT Grade) (ニッポンジーン: Cat. No. 313-03161)
 - ・DNase I, RNase-Free (Thermo Fisher Scientific: Cat. No. AM2222)
 - ・RNase-Free DNase Set (QIAGEN: Cat. No. 79254)

② 器具・機材

- QuickGene-Auto12S/QuickGene-Auto24S
- マイクロピペット

- マイクロピペット用チップ
- 2 ml マイクロチューブ(サンプル用)
 推奨品：BM 機器 Cat. 4020、SARSTEDT Cat.72.695.700、Cat.72.695.500S
 推奨品以外のチューブを使用する場合は、事前にストリップ及び装置ヒーター部分との適合性を確認してください。
- 1.5 ml or 2 ml マイクロチューブ(DNA 回収用に使用)
 推奨品：BM 機器 Cat.BM4015、Cat.BM4020、SARSTEDT Cat.72.706.700
 推奨品以外のチューブを使用する場合は、事前にコレクションホルダーとの適合性を確認してください。
- チューブスタンド
- チューブミキサー(2,500 rpm 程度の攪拌ができるもの)
- 簡易卓上遠心機(5,000 xg 程度の遠心が可能なもの)

4. 取扱上の安全注意事項

◆LRB(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。

- 通気性のよい場所で取り扱ってください。この薬品を扱う場合は、適切な保護手袋および防護めがねを着用してください。
- 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。
- 火気のある場所、温度の高い場所での使用、保存は避けてください。
- 容器を完全密閉して保管してください。

◆WRB (Wash Buffer)

薬品の特性 : ● 引火性の液体を含むので、火気に十分注意してください。

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。

- 火気に注意するとともに、吸入、皮膚への接触に十分注意してください。
- 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。

◆CRB(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。

◆ 試薬ストリップは、指定の温度(15°C~28°C)以外での使用、保存は避けてください。

◆LRB は温度の高い場所での使用、保存は避けてください。

◆LRB 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

感染性産業廃棄物に該当しますので、関連する法に従い、焼却、溶解、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り扱いに関する詳細情報は、SDS(安全データシート)をお読みください。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

- 凍結血液は使用しないでください。
- 目詰まりした場合は、白血球数を減らして検討してください。
- 収量はサンプルの状態(血液が由来する方の健康状態等)により変動します。

◆ 試薬に関する注意事項

- LRB は保存中に析出物が生じることがあります。析出物が生じた場合、37°Cで溶解後、室温に戻してから使用してください。
- LRB は温度が高い場所での使用、保存は避けてください。また、漂白剤を含む消毒剤を混合しないでください。

◆ 操作に関する注意事項

- 全ての操作は室温(15~28°C)で行ってください。低温または高温でご使用の場合、キットの性能が発揮されないことがあります。
- 分離途中では時間をおかず、操作は素早く行ってください。
- 本キットは CRB で溶出を行うことを前提にしています。CRB 量は変更可能ですが、溶出量によっては、溶出効率に変化する可能性があります。
- 運転開始前に、以下の点を確認してください。
 - コレクションホルダーに Waste Tube、1.5 ml または 2 ml マイクロチューブ(回収用容器)がセットされていること
 - 試薬ストリップに 1 ml Long Tip、2 ml マイクロチューブ(ライセート入り)がセットされてい

ること

- 試薬ホルダーに試薬ストリップが正常にセットされていること
- 試薬ホルダーのフタが完全に閉まっていること
- 試薬ホルダー、コレクションホルダーがホルダーガイドに正しくセットされていること
- すべての操作は室温(15~28°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。詳しい作業環境情報については、QG-Auto12 S/24S 本体取扱説明書をお読みください。
- やむを得ない場合を除き、運転の途中で装置の電源を切らないでください。同じ工程からの運転再開はできません。
- 詳しくは、QG-Auto12S/24S の本体取扱説明書をお読みください。

<RNase のコンタミネーション防止について>

- RNase のコンタミネーションを防ぐため、RNA や分離用試薬を取扱うときは、適切な手袋を着用してください。
- RNase フリーまたは滅菌したプラスチック製品のご使用をお勧めします。
- ガラスや金属製品を使う場合は 200°Cにて 16 時間以上乾熱滅菌した後、使用してください。

6. 品質管理

- 品質管理基準を設け、全てのロットで品質に問題のないことを確認しています。
- Total RNA の収量や品質は 260 nm の吸光度、260 nm/280 nm の吸光度比によって確認しています。

7. 製品説明

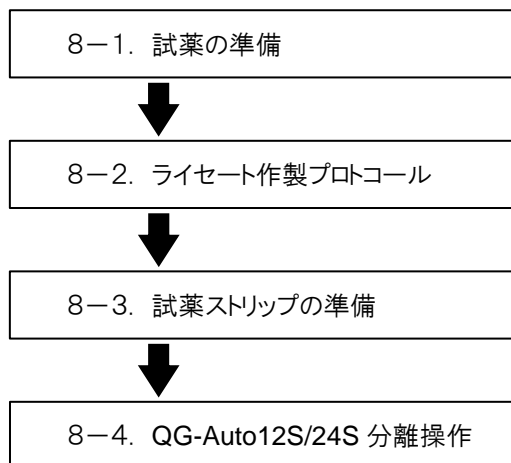
本キットは、溶血後の白血球(健康な成人の血液由来で最大 1.5×10^7 個)からの total RNA の分離・精製に対応しています。健康な成人の血液 1 μ l 中にはおよそ 4,000~7,000 個の白血球が含まれます。白血球 1.5×10^7 個は白血球数 7,000 個/ μ l の方の血液で約 2 ml に相当します。Total RNA 回収例(DNase 処理あり)を表 1 に示します。

表 1 total RNA 回収例

サンプル	収量(μ g)	A260/280
1.5×10^7	5.1	2.30

8. プロトコール

〔Overview Flow Chart〕



8 - 1. 試薬の準備

◆LRB

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、室温に戻してから使用してください。使用前に必要な量(1 サンプルあたり 520 μ l 使用します)。分注し、LRB 1ml あたり 10 μ l の 2-メルカプトエタノール(2-ME)を添加してください。その際は適切な保護具を着用し、ドラフト内で調製してください。

◆DNase 溶液(DNase 処理をする場合)

以下の表に従い、DNase 溶液を調整してください。

調整後は試薬ストリップの指定の箇所(p.5 試薬ストリップ内容を参照)に添加してください。

◇各社推奨 DNase 溶液調整

製品名	メーカー名	Cat.No.	調整方法	終濃度
RQ1 RNase-Free DNase	Promega	M6101	1	20U/40 μ l
DNase I, Amplification Grade	Thermo Fisher Scientific	18068-015		
DNase I, Amplification Grade	Sigma-Aldrich	AMP-D1		
Deoxyribonuclease (RT Grade)	ニッポンジーン	313-03161		
DNase I, RNase-Free	Thermo Fisher Scientific	AM2222	2	40U/40 μ l
RNase-Free DNase Set ^{※1}	QIAGEN	79254	3	3.4Kunitz units/4 μ l

※1:1,500Kunitz units の入ったボトルに添付の RNase フリー水を 550 μ l 添加後、DNase ストック溶液を調整してください(DNase 添付の取扱説明書も参照してください)。

調整方法 1)

1U / μ l DNase I	20 μ l
10 \times Reaction Buffer	4 μ l
ヌクレアーゼフリー水	16 μ l

調整方法 2)

2U / μ l DNase I	20 μ l
10 \times Reaction Buffer	4 μ l
ヌクレアーゼフリー水	16 μ l

調整方法 3)

2.7Kunitz units / μ l DNase I ^{※2}	1.25 μ l
Buffer RDD	35 μ l
ヌクレアーゼフリー水	3.75 μ l

※2:QIAGEN 社プロトコールどおりに DNase 溶液を調整すると、DNase 活性が過剰となる可能性があります。上記条件での DNase 溶液調整をお勧めします。

8 - 2. ライセート作製プロトコール



ご注意

<1>から<3>の工程の順序は必ずお守りください。

順序を変えた場合、目的の収量が得られない可能性があります。

- 必ず白血球数をカウントし、 1.5×10^7 個以下であることを確認してから使用してください。健康な成人の血液 1 μ l 中にはおよそ 4,000~7,000 個の白血球が含まれます。白血球 1.5×10^7 個/ μ l の血液で約 2 ml に相当します。
- 薬品による負傷、感染リスクを抑えるため、適切な保護具を着用してください。
- 試薬ストリップ、各チューブを使用する際はヌクレアーゼの混入を避けるため、手袋を着用してください。
- 詳しくは QG-Auto12S/24S の本体取扱説明書をお読みください。

<1>全血を溶血した後の白血球をペレット化します。

白血球数が多すぎた場合、顕著な収量減少・精度低下、場合によっては目詰まりが起きます。白血球数をきちんとカウントし、 1.5×10^7 個以下であることを確認してください。また目詰まりした場合は、白血球数を減らして検討してください。

LRB には用時調製で 2-ME を添加してください(p.8 参照)。

<1a> 1.5ml マイクロチューブで溶血後の白血球($\sim 1.5 \times 10^7$ 個)をペレット化した場合:

チューブを指で軽くたたくこと(タッピング)で細胞をルーズにした後、520 μ l

の LRB(2-ME 添加済み)を添加します。ピペッティングで LRB と細胞をよく混合します。

<1b> 1.5ml マイクロチューブ以外で溶血後の白血球(～ 1.5×10^7 個)をペレット化した場合:

チューブを指で軽くたたくこと(タッピング)で細胞をルーズにした後、520 μ l の LRB(2-ME 添加済み)を添加します。ピペッティングで LRB と細胞をよく混合しながら、1.5 ml マイクロチューブに移します。

<2> 最大回転数で 30 秒間ボルテックスします。数秒間スピンドウンして、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 30 秒間確実に行ってください。

<3> 特級エタノール(>99%)を 250 μ l 添加し、最大回転数で 5 分間ボルテックスします。数秒間スピンドウンして、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)。

ボルテックスは<2>と同様、最大回転数で 5 分間確実に行ってください。

オプション:ボルテックス時にボール(ジルコニア 5 mm ϕ)1 個を入れるとより効果的にホモジナイズされます。その際には 2 ml マイクロチューブを使用してください。

8 - 3. 試薬ストリップの準備

- 試薬ストリップ、各チューブを使用する際はスクレアーゼの混入を避けるため、手袋を着用してください。
- 詳しくは QG-Auto12S/24S の本体取扱説明書をお読みください。

<1>作業台にコレクションホルダーと試薬ホルダーを準備します。

<2>コレクションホルダーにウェストチューブと、1.5 ml あるいは 2.0 ml マイクロチューブをセットします。

<3>試薬ストリップを箱から取り出して試薬ホルダーにセットし、ライセートの入った 2 ml マイクロチューブと 1 ml Long Tip を所定の位置(p.5 (4))に挿します。試薬ストリップの内容物が正しい位置にセットされていることを確認してください。

8 - 4. QG-Auto12S/24S 分離操作

- 運転開始前に QG-Auto12S/24S の取扱説明書をよくお読みください。
- 試薬ストリップ、各チューブを使用する際はスクレアーゼの混入を避けるため、手袋を着用してください。

<1> コレクションホルダーと試薬ホルダーを装置にセットします。

<2> 装置本体の電源を入れます。

初期チェックと初期動作を行った後、ホームポジションに停止します。

- <3> ホーム画面で「RNA Blood cell」を選択します。
- <4> 「Elution Volume」欄でご希望の溶出液量を選択します。
- <5> 「Check List」欄に記載のある消耗品が、試薬ホルダーとコレクションホルダー、あるいは試薬カートリッジに装填されていることを確認します。装填されていればチェックボックスをタッチしてチェックマークを入れます。
- <6> 「Next」ボタンをタッチします。
- <7> 「Protocol Information」の記載内容を確認して「Start」ボタンをタッチすると運転が開始されます。
 - 抽出操作が始まると操作パネルに抽出工程が表示されます。
 - 運転状況は工程名(LYSIS, BINDING, WASH, ELUTE, FINISH)の点滅によって確認できます。
 - 運転中は本体のフロントドアを開けないでください。万一フロントドアを開けた場合は、QG-Auto12S/24S の取扱説明書をお読みになって動作を再開してください。
 - 一時停止をする場合は、操作パネルの「Pause」ボタンをタッチしてください。終了の確認画面が表示されますので、「Yes」を押して終了してください。
- <8> 運転が終了するとビーブ音が鳴り、工程名が「FINISH」と表示され点滅します。装置が完全に停止していることを確認した後、フロントドアを開け、試薬ホルダーとコレクションホルダーを取り出し、回収チューブを取り出します。
 - すぐに total RNA を使用しない場合はチューブの蓋をしっかりと閉め、-20℃または-80℃で保存してください。

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。

(1) RNA の収量が低い、RNA が得られない

原因	対策
LRB に 2-ME が添加されていない	LRB を使用前に必要な量分注し、LRB 1 ml あたり 10 μ l の 2-メルカプトエタノール(2-ME)を添加してください。
細胞の溶解が不十分	使用前には LRB に析出物などがないことを確認してください。もし析出物が認められた場合は、37°C で溶解後、室温に戻してから使用してください。
LRB(2-ME 添加済み)添加後のボルテックスが不十分	8-2(p.11)に従い、充分ボルテックスしてください。
DNase 反応バッファーを所定量添加していない (DNase 処理を行う場合)	DNase 溶液を試薬ストリップの所定位置に DNase 反応バッファーを添加したことを確認してください。
RNA の分解	(3) 「RNA が分解した」を参照
室温が高い	室温(15~28°C)で使用してください。

(2) カートリッジが詰まった

原因	対策
使用細胞数が多すぎる	細胞数を減らしてください。
細胞ペレットの分散が不十分	ペレットは充分タッピングして完全にほぐしてください。特に凍結ペレットの場合は細胞溶解後、20 μ l の PBS 加えて十分にタッピングし、ペレットを完全にほぐしてください。
LRC 添加後のボルテックスが不十分	最大回転数で 1 分間ボルテックスしてください。
ボルテックスが不十分	本キットでは LRC 添加後のボルテックスは 1 分間を推奨しておりますが、ボルテックスをより長く行うことで目詰まりを改善できる場合があります。

(3)RNA が分解した

原因	対策
LRCに2-MEが添加されていない	LRCを使用前に必要量分注し、LRC 1mlあたり10 µlの2-メルカプトエタノール(2-ME)を添加してください。
RNaseのコンタミネーション	操作中・保存中にRNaseが混入する可能性があります。RNaseの混入がないように注意してください。
DNaseへのRNaseの混入(DNase処理を行う場合)	推奨しているRNase-Free DNaseを使用してください。DNaseについての詳細は各メーカーにお問い合わせください。
RNAが加温された	RNAは加温すると分解することがあります。 RNA使用中も出来るだけ氷上で取り扱ってください。

(4)RT-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RNA量が不適切	260 nm 吸光度から濃度を確認してください。
ゲノムDNAの混入	DNase処理方法によってDNase処理を行ってください。DNAの分解が不完全の場合は(6)を参照してください。
RNAの分解	(3)「RNAが分解した」参照

(5)DNAの分解が不完全(DNase処理ありの場合)

原因	対策
DNase溶液が指定の箇所に指定量添加されていない	DNase溶液は試薬ストリップの指定の箇所に添加してください(p.5 試薬ストリップの内容物を参照)。DNase溶液の調整については、p.9~10 試薬の準備を参照ください。
DNase活性料が不十分	推奨のDNase活性量を使用してください。

(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にて加温し、析出物を溶解後、室温に戻してから使用してください。

10. オーダーリング・インフォメーション

製 品	内 容	Cat #
QuickGene-AutoS DNA Blood Kit	48 回入	AS-DB
QuickGene-AutoS DNA Tissue Kit	48 回入	AS-DT
QuickGene-AutoS Plasmid Kit	48 回入	AS-PL
QuickGene-AutoS RNA Blood Kit	48 回入	AS-RB
QuickGene-AutoS RNA Tissue Kit	48 回入	AS-RT
QuickGene-AutoS RNA Cultured Cell Kit	48 回入	AS-RC

付録 1 溶血方法について

一例として弊社で実施している溶血方法を紹介します。

溶血剤(HB)

NH ₄ Cl	150mM
NaHCO ₃	10mM
EDTA(pH8.0)	0.1mM

1. ヒト全血 1 容量と HB 5 容量を適当な大きさのチューブ(別売)中で転倒混和等よく混合する。

例：全血 1 ml に HB 5 ml を添加し、よく混合する。

* 10 ml の血液を 50 ml チューブで処理する時は HB は 40 ml にしてください。

注：全血は適切な量を使用してください。健康な成人の血液には 1 μ l あたり 4,000～7,000 個の白血球が含まれます。本キットでは白血球 1.5×10^7 個までが処理可能です。白血球数がより多い血液を処理する場合には血液量を減らしてください。

2. 氷上で 10～15 分間インキュベートする。インキュベーション中に 2 回ボルテックスもしくは転倒混和でよく混合する。

赤血球の溶解が進むと、インキュベーション中に混濁した懸濁液が透明になってきます。必要な場合には、インキュベーション時間を 20 分に延長してください。

3. 4℃で 2 分間、2,000×g で遠心分離後、上清を完全に除去する。

遠心分離後白血球はペレットを形成します。ペレットを壊さないように上清を完全に除去してください。

4. 細胞ペレットに使用した全血量に対して 2 容量の HB を添加し、細胞をよく懸濁する。

例：ステップ 1 で全血を 1 ml 使用した場合 HB を 2 ml 添加します。

このステップにより、赤血球は通常除去されます。大量の赤血球が残留している場合は、この段階で更に氷上で 5～10 分間インキュベートしてください。

5. 4℃で 2 分間、2,000×g で遠心分離後、上清を完全に除去する。



分離プロトコールにしたがって、分離作業を行う。

* 溶血作業終了後は時間をおかず、分離作業を行ってください。

＊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

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

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