

microRNA キット
QuickGene-AutoS microRNA Kit
(AS-miR)

Contents

1. はじめに	3
2. キット内容物と保存条件	3
2 - 1. キット内容物	3
2 - 2. 保存条件	3
2 - 3. 試薬ストリップの内容物	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	
5. 使用上の注意事項	
6. 品質管理	8
7. プロトコール	9
7 - 1. 試薬の準備	9
7 - 2. ライセート作製プロトコール	
7 - 2 - 1. 血漿・血清からの microRNA 分離プロトコール	10
7 - 2 - 2. 尿からの microRNA 分離プロトコール	10
7 - 2 - 3. 培養細胞からの microRNA 分離プロトコール	10
7 - 3. 試薬ストリップの準備	12
7 - 4. QG-Auto12S/24S 分離操作	12
8. トラブルシューティング	13
9. オーダリング・インフォメーション	14

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)の分離工程で使用する試薬キットです。

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、血漿、血清、尿、培養細胞などの検体から microRNA を始めとした低分子 RNA を分離することができます。
- ライセートセット後の分離時間は以下のとおりです。
 - QG-Auto12S: 約 35 分 * 12 サンプル同時に分離操作を行うことができます。
 - QG-Auto24S: 約 35 分 * 24 サンプル同時に分離操作を行うことができます。
- 得られた microRNA は RT-PCR などのアプリケーションに適しています。
- 一部の試薬は処理サンプルごとに個別に封入されています。

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。

キットには 48 処理分の microRNA 分離試薬と消耗品が含まれています。

☐ Lysis Buffer LRM	26 ml
☐ Deproteinization Buffer ZRM	3.5 ml
☐ 試薬ストリップ	48 個
☐ 1 ml Long Tips	48 個
☐ Waste Tubes	48 個

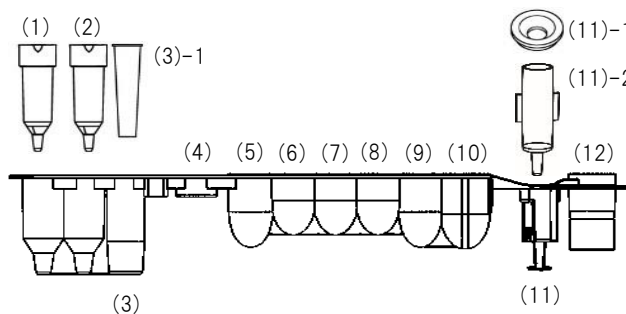
2 - 2. 保存条件

指定の温度(15℃～28℃)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。

ウェル番号	構成名・試薬名・用途	区分	規格
(1)	Short Tip	成型品	2 個/ストリップ
(2)	Short Tip	成型品	
(3)	1 ml Long Tip 挿入位置	成型品	1 個/ストリップ
(3)-1	Tip Pack		1 個/ストリップ
(4)	Sample tube セット位置		1 個/ストリップ
(5)	IPA	試薬	450 μ l/ウェル
(6)	-	-	-
(7)	RRM (Wash Buffer)	試薬	750 μ l/ウェル
(8)	WRM (Wash Buffer)	試薬	750 μ l/ウェル
(9)	WRM (Wash Buffer)	試薬	750 μ l/ウェル
(10)	WRM (Wash Buffer)	試薬	750 μ l/ウェル
(11)	Cartridge セット位置	成型品	1 個/ストリップ
(11)-1	Pressure Adapter		1 個/ストリップ
(11)-2	Cartridge		1 個/ストリップ
(12)	CRM (Elution Buffer)	試薬	250 μ l/ウェル



3. キット以外にご準備いただくもの

①試薬

- 0.5 mol/L TCEP 溶液
[推奨品]
・0.5 mol/L TCEP Solution
(富士フイルム和光純薬株式会社：207-20151)

②器具・機材

- QuickGene-Auto12S/QuickGene-Auto24S
- 遠心分離機(最大遠心力が 14,000 × g 以上のもの) (サンプル調製用)
- マイクロピペット
- マイクロピペット用チップ
- 1.5 ml マイクロチューブ(サンプル調製用)
- 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(RNA 回収用)
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

③培養細胞からの microRNA 分離時に必要なもの

- 前処理用シリカカラム
推奨品：エコノスピン for RNA (ジーンデザイン：EP-21201)

4. 取扱上の安全注意事項

◆ ZRM (Deproteinization 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 : ● 皮膚に触れないようにすること。目に入らないようにすること。

● 屋外又は換気の良い場所だけで使用すること。

● 保護手袋/保護衣/保護面を着用すること。

◆ LRM (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 : ● 皮膚に触れないようにすること。目に入らないようにすること。

● 屋外又は換気の良い場所だけで使用すること。

● 保護手袋/保護衣/保護面を着用すること。

◆ WRM (Wash Buffer)

薬品の特性 : ● 引火性の液体を含む。

● 熱/火花/裸火/高温のもののような着火源から遠ざかること。

取扱上のご注意 : ● 皮膚に触れないようにすること。目に入らないようにすること。

● 屋外又は換気の良い場所だけで使用すること。

● 保護手袋/保護衣/保護面を着用すること。

◆ RRM (Wash Buffer)

薬品の特性 : ● 引火性の液体を含む。

● 熱/火花/裸火/高温のもののような着火源から遠ざかること。

取扱上のご注意 : ● 皮膚に触れないようにすること。目に入らないようにすること。

● 屋外又は換気の良い場所だけで使用すること。

● 保護手袋/保護衣/保護面を着用すること。

◆ CRM (Elution Buffer)

取扱上のご注意 : ● 皮膚に触れないようにすること。目に入らないようにすること。

● 屋外又は換気の良い場所だけで使用すること。

● 保護手袋/保護衣/保護面を着用すること。

◆ IPA

薬品の特性 : ● 引火性の液体を含む。

● 熱/火花/裸火/高温のもののような着火源から遠ざかること。

● 安全労働法上の第2種有機溶剤に該当します。

取扱上のご注意：● 皮膚に触れないようにすること。目に入らないようにすること。

● 屋外又は換気の良い場所だけで使用すること。

● 保護手袋/保護衣/保護面を着用すること。

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

◆ LRM は、温度の高い場所での使用、保存は避けてください。

◆ LRM 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。

◆ 感染のおそれのある検体を使用し、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、特別管理産業廃棄物処分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

- 感染のおそれのある検体を使用する場合は、適切なバイオハザード対策を取ってください。
- 感染のおそれのある検体を扱う場合は、適切な保護具(防護服、防護帽子、白衣、手袋(2重)、マスクなど)を着用してください。
- 本キットで初めて分離されるサンプルの場合は、予備実験を行ってください。
- 処理可能量を超えたサンプル量をオーバーロードしてしまうと、性能が顕著に低下し、最悪の場合カートリッジ(CA)が目詰まりを起こす可能性があります。

◆ 試薬に関する注意事項

- 廃液の処理作業を含む作業全般において、薬品による負傷を抑えるために適切な保護具を着用してください。
- LRM は保存中に析出物を生じることがあります。析出物が生じた場合は、37℃で溶解後、室温に戻してから使用してください。

◆操作に関する注意事項

- 全ての操作は室温（15～28℃）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 50 μ L の CRM で microRNA を溶出することを前提にしています。CRM 量によって、溶出効率が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 or 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℃）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>

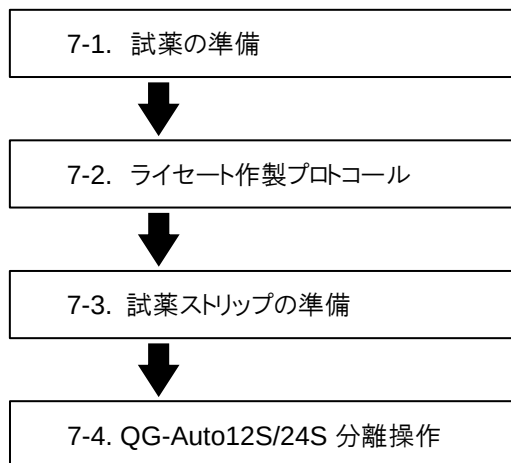
- RNase のコンタミネーションを防ぐため、RNA や分離用試薬を取扱うときは、適切な手袋を着用してください。
- RNase フリーまたは滅菌したプラスチック製品のご使用をお勧めします。
- ガラスや金属製品を使う場合は 200℃にて 16 時間以上乾熱滅菌した後、使用してください。

6. 品質管理

- 全てのロットで品質管理基準を満たすことを確認しています。

7. プロトコル

〔Overview Flow Chart〕



7 - 1. 試薬の準備

◆LRM

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℃で溶解後、室温に戻してから使用してください。使用前に必要量(1 サンプルあたり 300 μ L 使用します)を分注し、LRM 1 mL あたり 20 μ L の 0.5 mol/L TCEP 溶液を添加してください。

7 - 2. ライセート作製プロトコル

本キットは、基本的に血漿、血清、尿などの検体からの microRNA 分離に対応しています。使用する検体の種類によってライセート作製プロトコルが異なりますので、検体の種類をご確認の上適切なプロトコルを選んでください。

【分離を始める前の重要事項】

- 試薬類は室温に戻してから使用してください。
- 試薬の液量は各ライセート作製フローに記載された液量を厳守してください。

- 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。
- すべての操作は室温(15～28℃)で行ってください。
- 分離の途中で時間をおかず、操作は素早く行ってください。
- LRM 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。
- 感染のおそれのある検体を使用する場合は、安全キャビネットの使用など適切な対応を取ってください。
- 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。
- 廃液の処理作業を含む作業全般において、薬品による負傷や感染リスクを抑えるために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。

7 - 2 - 1. 血漿、血清からの microRNA 分離プロトコール

<1>から<8>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 RNA 収量が得られない可能性があります。

感染のおそれのある検体を使用する場合、BSL2+実験室内の安全キャビネット内で実験操作を行ってください。

<1> 2 mL マイクロチューブに血漿もしくは血清 300 μ L を入れます。

<2> LRM(TCEP 添加済) 300 μ L を添加します。

<3> 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。

<4> 5 分間室温でインキュベーションします。

<5> ZRM 60 μ L を添加します。

<6> 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。

<7> 14,000 $\times$ g、10 分、室温にて遠心します。

<8> 新しい 2 mL マイクロチューブに上清 525 μ L を移します。

7 - 2 - 2. 尿からの microRNA 分離プロトコール

<1>から<5>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 RNA 収量が得られない可能性があります。

<1> 2 mL マイクロチューブに尿 300 μ L を入れます。

<2> LRM(TCEP 添加済) 300 μ L を添加します。

- <3> 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。
- <4> 5 分間室温でインキュベーションします。
- <5> 新しい 2 mL マイクロチューブにライセート 525 μ L を移します。

7 - 2 - 3. 培養細胞からの microRNA 分離プロトコール

最大で約 1×10^6 個の培養細胞から、microRNA などの低分子 RNA を含む total RNA を分離することができます。

<1>から<5>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 RNA 収量が得られない可能性があります。

<1> 細胞数を正確にカウントしてください。

細胞数が多すぎた場合、顕著な収量減少、純度低下、場合によっては目詰まりが起こります。また目詰まりした場合は、細胞数を減らしてください。

<1a> 細胞ペレットの場合

・接着細胞からペレットを作製する場合

フラスコ、またはディッシュから細胞をトリプシン処理によりはがし細胞数をカウントしてください。1.5 mL マイクロチューブに細胞懸濁液を集め、室温にて $300 \times g$ で 3 分間遠心し、上清をできるだけ取り除きます。

・浮遊細胞からペレットを作製する場合

必要に応じて PBS にて洗浄した後、1.5 mL マイクロチューブに細胞懸濁液を集め、室温にて $300 \times g$ で 3 分間遠心し、上清をできるだけ取り除きます。

細胞ペレットは、後で使用するために細胞回収後速やかに液体窒素中で急速凍結し、 -80°C 以下で保存する事も可能です。凍結する場合は、凍結前に細胞数をカウントしてください。

<1b>ディッシュの場合

・細胞培養液はフラスコまたはディッシュから可能な限り吸引除去してください。

<2> LRM(TCEP 添加剤)を添加して細胞を溶解します。

<2a>細胞ペレットの場合

・細胞ペレットの入ったマイクロ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、525 μ L の LRM を添加し、ピペッティングでよく混合します。なお、細胞数が 1×10^6 個以下のときは、タッピングは不要です。

<2b>ディッシュの場合

・525 μ L の LRM をフラスコまたはディッシュに添加し、セルスクレイパーなどで細胞と LRM をよく混ぜます。1.5 mL マイクロチューブに細胞溶解液を回収し、ピペッティングでよく混合します。

<3> 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。

<4> <1>～<3>で調製したライセート全量を注意深くカートリッジ(エコノスピン)へ添加します。カートリッジの蓋をしっかりと閉め、室温にて $14,000 \times g$ で 1 分間遠心します。

<5> 新しい 2 mL マイクロチューブに遠心後のライセート全量を移します。

7 - 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 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.4 (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。

7 - 4. QG-Auto12S/24S 分離操作

- 事前に 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> ホーム画面の「CUSTOMIZED PROTOCOL」を選択し、「Isolation E」もしくは「MICRO RNA」を選択します。

お使いの装置に入っている名称のプロトコールを選択してください。

<4> 「Elution Volume」欄でご希望の溶出液量を選択します。

なお、標準的な溶出量は 50 μ L です。

<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。

- 分離操作が始まると操作パネルに分離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> 運転が終了するとピープ音が鳴り、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 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。

8. 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
検体の保存状態が悪い	検体の種類、量、保管期間、保存条件で RNA 収量は変わります。検体をすぐに使用しない場合は一度融けたものは使わないでください。
処理検体量が不適切	適切な検体量の範囲で分離してください。 例えば、血漿を検体として使用する場合、指定量は 300 μ L です。
LRM 添加後の攪拌が不十分	LRM 添加後は充分に攪拌してください。 血漿・血清を検体として使用する場合、攪拌後は 5 分間のインキュベーションを行ってください。
ZRM 添加後の攪拌が不十分	ZRM 添加後は充分に攪拌してください。 血漿・血清を検体として使用する場合、最大回転数で 30 秒間ボルテックスを行ってください。
LRM に TCEP 溶液を指定量添加していない	LRM 1 mL に対して 0.5 mol/L TCEP 溶液 20 μ L を添加してください。

(2) カートリッジが詰まった

原 因	対 策
検体に対応したプロトコルを使っていない	検体の種類に応じたプロトコルを選択してください。 例えば、血漿を検体として使用する場合は血漿・血清からの microRNA 分離プロトコルを使用してください。
処理検体量が不適切	適切な検体量の範囲で分離してください。 例えば、血漿を検体として使用する場合、指定量は 300 μ L です。
LRM 添加後の攪拌が不十分	LRM 添加後は充分に攪拌してください。 血漿・血清を検体として使用する場合、攪拌後は 5 分間のインキュベーションを行ってください。
ZRM 添加後の攪拌が不十分	ZRM 添加後は充分に攪拌してください。 血漿・血清を検体として使用する場合、最大回転数で 30 秒間ボルテックスを行ってください。

(3) RT-PCR など、続けて行う実験がうまくいかない

原 因	対 策
検体に対応したプロトコールを使っていない	検体の種類に応じたプロトコールを選択してください。 例えば、血漿を検体と使用する場合は血漿・血清からのマイクロ RNA 分離プロトコールを使用してください。

9. オーダリング・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
QuickGene-AutoS RNA Virus Kit	48 回入	AS-RV
QuickGene-AutoS DNA FFPE Kit	48 回入	AS-DF
QuickGene-AutoS RNA FFPE Kit	48 回入	AS-RF

＊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; <https://www.kurabo.co.jp/bio/>

AS-miR_HBJ_V10