



ハンドブック

DNA 組織キット
QuickGene DNA tissue kit L (DT-L)

Ver.1.0

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. プロトコール	9
【Overview Flow Chart】.....	9
7 - 1. 試薬の準備.....	9
7 - 2. ライセート作成プロトコール.....	12
7 - 3. QG-Auto240L を用いた分離プロトコール-全自動プロトコール-.....	11
7 - 4. QG-Auto240L を用いた分離プロトコール-半自動プロトコール-.....	14
7 - 5. QG-Mini8L を用いた分離プロトコール	15
7 - 6. QG-610L を用いた分離プロトコール	17
8. トラブルシューティング	19
9. オーダリング・インフォメーション	23
付録 1 自動核酸分離装置 QG-610L パラメータについて	24

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。

- このキットをご使用いただくことにより、簡便に動物組織からゲノム DNA 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。
 - QuickGene-Auto240L(以下 QG-Auto240L)を使用する場合:24 サンプル 約 65 分
※QG-Auto240L のみサンプルセットから DNA 回収までの所要時間
 - QuickGene-Mini8L(以下 QG-Mini8L)を使用する場合:8 サンプル 約 50 分
 - QuickGene-610L(以下 QG-610L)を使用する場合:6 サンプル 約 16 分
- 得られた高純度(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 48 処理分のゲノム DNA 分離用試薬が含まれています。

試薬名・構成部品名	数量	容量
ProteinaseK (EDT)	4本	2.5ml
Tissue Lysis Buffer (MDT)	4本	25ml
Lysis Buffer (LDT)	4本	30ml
Wash Buffer (WDT)	4本	160ml
Elution Buffer (CDT)	1本	100ml
Cartridges (CAL2)	1袋	48個
Waste Tubes (WTL)	1袋	48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。より安定に保つため EDT は開梱後、冷蔵(2~8 $^{\circ}$ C)で保存する事をお勧めします。

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%)(分子生物学用グレード/純度 \geq 99.5%)

※必要に応じて用意していただく試薬

- RNaseA

[推奨品]

・Ribonuclease A $\left(\begin{array}{l} \text{Sigma-Aldrich Cat. No. R5125} \quad *1, *2 \\ \text{R5500} \quad *1, *2 \\ \text{R6513} \quad *1 \\ \text{R4642} \end{array} \right)$

・Ribonuclease A (MP Biomedicals Cat. No. 101076 *1, *2)

・RNase A (QIAGEN Cat. No. 19101)

・RNase A (Thermo Fisher Scientific Cat. No. 12091)

*1: 10mM Tris HCl pH7.5、15mM NaCl を用いて 100mg/ml 溶液を調製してください。

*2: R5125、R5500、101076、0675 は 100℃ 15 分処理をして DNase 活性を失活してから使用してください。

② 器具・機材

- QG-Auto240L または QG-Mini8L, QG-610L
- 15 ml および 50 ml の遠沈管(*)
- 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(溶出液のコレクションチューブとして使用) (**)
- チューブスタンド

(*): 15 ml (または 50 ml) 遠沈管は、サンプルを前処理する容器として使用します。

50 ml 遠沈管は、QG-610L で回収液(CDB)を入れる容器として使用します。

(**): ボールロック付マイクロチューブは、ご使用になれません。

- 遠心機(2,500xg(3,500rp)程度の遠心が可能な物)

③ QG-610L, QG-Mini8L 使用時に追加で必要なもの

- チューブミキサー(2,500rpm 程度の攪拌ができるもの)
- 卓上恒温水槽(70℃で 50 ml または 15 ml 遠沈管を保温可能なもの)

④ QG-Auto240L 使用時に追加で必要なもの

- サンプル用チューブ(***)

採血管サイズ: 6ml: ϕ 13 x 100mm

10ml: φ 16 x 100mm

- Matrix チューブ(****)
*Matrix™ 2D Barcoded Open-Top Storage Tubes Cat. No. 3791, 3792
 - 消耗品キット(240L-CK)
- (***) 適した採血管サイズのチューブを使用してください。
(****) :1.5 ml マイクロチューブを回収用で使用する場合は不要。

4. 取扱上の安全注意事項

◆ Proteinase EDT

- 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。

◆ Tissue Lysis Buffer MDT

- 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。

◆ Lysis Buffer LDT

- 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。

◆ Wash Buffer WDT

- 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。

◆ Elution Buffer CDT

- 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。

◆ LDT は、温度の高い場所での使用、保存は避けてください。

◆ LDT 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、使用後廃棄する場合は、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、溶融、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

- 本キットは基本的に動物組織 5～100mg からのゲノム DNA の分離に対応しています。
- 動物から切除した新鮮または凍結組織を準備してください。
- 処理可能な組織量は組織の状態、部位などに変動します。ご使用のサンプルによっては、組織量等を再度検討いただく必要があります。
- 処理可能量を超えた組織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(CAL2)が目詰まりを起こす可能性があります。
- ゲノム DNA と共に RNA が精製されます。RNA の混入が好ましくない場合は、RNase 処理を行ってください。
- サンプルを室温で放置したり、凍結、融解を繰り返した場合、ゲノム DNA が分解したり収量が低下することがあります。

◆ 試薬に関する注意事項

- MDT 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、55℃で溶解後、室温に戻してから使用してください。
- LDT 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、37℃で溶解後、室温に戻してから使用してください。
- LDT は、温度の高い場所での使用、保存は避けてください。
- LDT 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。

◆ 操作に関する注意事項

- すべての操作は室温(15～30℃)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。
- 分離の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 500 μ l の CDT で溶出を行うことを前提にしています。CDT 量は変更可能ですが、溶出効率が変化する可能性があります。
- QG-610L でご使用になる場合は、特級エタノールを指定量添加した洗浄液(WDT)をボトルのまま、回収液(CDT)は指定の遠沈管に分注後、決められた場所にセットしてください。使い始めには必ずディスチャージを実施してください。詳しくは、QG-610L の取扱説明書をご覧ください。

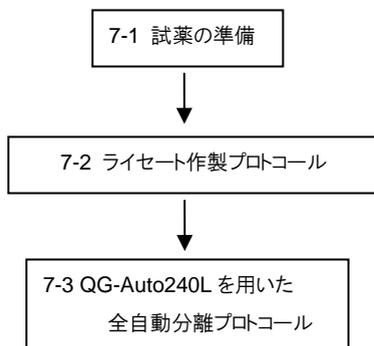
6. 品質管理

- 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。
- ゲノム DNA の収量や品質は 260nm の吸光度、260 nm/280nm の吸光度比によって確認しています。

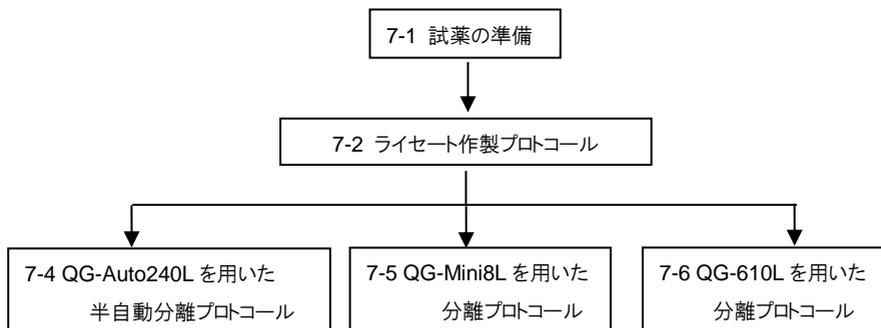
7. プロトコール

【Overview Flow Chart】

① QG-Auto240L-全自動プロトコールの場合-



② QG-Auto240L-半自動プロトコール-, QG-Mini8L, QG-610L の場合-



7 - 1. 試薬の準備

◆EDT

EDT はより安定に保つため、冷蔵(2~8℃)で保存することをお勧めします。

◆MDT

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、55℃で溶解後、室温に戻してから使用してください。

◆ LDT

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。

◆ WDT

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。

◆ CDT

ゲノム DNA 溶出時には、必ず CDT を使用してください。

◆ WDT(特級エタノール添加済み)および CDT の必要量(QG-610L をご使用の場合)

下表を参考に、QG-610L を使用する場合、分離処理をするサンプル数に応じて、所定量の特級エタノールを加えた洗浄液(WDT)はボトルのまま、回収液(CDT)は指定の遠沈管に移して必要量を準備してください。準備した液は、QG-610L のホルダーの所定の位置にセットしてください。

サンプル数	所定量の特級エタノールを加えた洗浄液(WDT)	回収液(CDT)
6	160ml(ボトル半分)	11 ml
12	320ml(ボトル 1 本)	16 ml
18	480ml(ボトル 1.5 本)	24 ml
24	640ml(ボトル 2 本)	32 ml
30	800ml(ボトル 2.5 本)	40 ml
36	960ml(ボトル 3 本)	48ml
42	1120ml(ボトル 3.5 本)	56ml
48	1280ml(ボトル 4 本)	64ml

7 - 2. ライセート作製プロトコール

- 本キットは 1 処理あたり動物組織 5~100mg に対応しています。動物から切除した新鮮または凍結組織を準備してください。
- サンプル量は以下の分離フローに記載された量を厳守してください。指定された量を超えてセットされた場合には、分離効率が低下する場合があります。また、機器動作に支障をきたす場合もありますのでご注意ください。
- 組織溶解に使用するシェーカーを 55℃に設定してください。
- ウォーターバスの温度を 70℃に設定してください。
- 動物から切り取った組織は、所定量を直ちに MDT へ浸してください。
- すぐに使用しない場合は、液体窒素で素早く凍結し、冷凍保存(-20℃または-80℃)してください。
- サンプルを室温で放置したり、凍結、融解を繰り返すと、ゲノム DNA が分解したり、収量が低下することがあります。

1. 動物から切除した新鮮または凍結組織を準備してください。
組織サンプルは所定量(基本的には 5~100mg)を使用してください。
組織量が多すぎた場合、目詰まり、顕著な収量減少、精度低下の可能性がります。目詰まりした場合は、組織量を減らして検討してください。
室温で組織を放置しないでください。ゲノム DNA が分解してしまいます。
2. 組織をハサミ、ハンマーなどで 1.5 ~ 2mm 角の小ブロックにし、動物組織重量を測定し、15ml(または 50ml)遠沈管に入れてください。MDT を 1.8 ml、続いて EDT を 200 μ l 添加します。
凍結組織を使用する場合、組織を室温にしてから直ちに MDT を添加してください。新鮮な組織を使用する場合は、所定量の組織へ直ちに MDT を添加してください。
3. 55℃にて攪拌しながら、組織を完全に溶解させます。攪拌しなかった場合、所定量の組織でも完全に溶解しない場合があります。できれば加温できるシェーカーなどで攪拌してください。加温できるシェーカーをお持ちでない場合は、ヒートブロックなどを使用し、時々ボルテックスして組織をよく溶解してください。56℃で 5 分間、恒温水槽でインキュベートします。インキュベーション時間は、5 分間延長までは収量に影響しません。
溶解時間は組織の種類により変わります。例えば、脳・肺・腎臓の場合は 16 時間程度、肝臓の場合は 3 時間程度を目安としてください。溶解しにくい場合は、時間を延長してください。
4. 不溶分を除くため、2,500xg(3,500rpm)、3 分、室温にて遠心します。残渣分(溶け残り、ゼラチン状のもの)を吸い取らないように、新しい 15ml 遠沈管に上清を移してください。

5. RNase 処理

ゲノム DNA と共に RNA が精製されます。RNA の混入が好ましくない場合は、RNase 処理を行ってください。RNase 処理をしない場合は、〈6〉へ進んでください。

RNase A を 100µl 添加してください。ボルテックスを 5 秒程度行うことで RNase A をサンプル液とよく混ぜてください。室温にて 2 分間インキュベーションします。

組織の種類により RNA の含有量が違います。含有量が低い組織の場合、使用する RNase A 量を減量することができます。

※組織溶解液を QG-Auto240L で全自動運転する場合は、「7 - 3. QG-Auto240L を用いた分離プロトコール-全自動プロトコール-」へ進んでください。

6. サンプル液に LDT を 1.8 ml 添加し、最大回転数で 15 秒間ボルテックスします。
LDT の混和がボルテックスで不十分なときは、タッピング、ピペッティングあるいは転倒混和などでよく混ぜてください。
LDT 液添加時に混合液が白くなったり沈殿物が生じることがありますが、70℃ に加温すると溶解します。
7. 70℃にて 10 分間インキュベーションします。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。
8. 特級エタノール(>99%)を 2.4 ml 添加し、最大回転数で 15 秒間ボルテックスします。
(ライゼート完成)。
混和がボルテックスで不十分なときは、タッピング、ピペッティングあるいは転倒混和などでよく混ぜてください。

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

8-3 QG-Auto240L を用いた分離プロトコール-半自動プロトコール- (p.19)

8-4 QG-Mini8L を用いた分離プロトコール (p.22)

8-5 QG-610L を用いた分離プロトコール (p.27)

7 - 3. QG-Auto240L を用いた分離プロトコール-全自動プロトコール-

- ご使用になる前に QG-Auto240L 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。
- QG-Auto240L で組織プロトコールを使用する際は、「CUSTOM」プロトコールへ別途パラメータ変更が必要となります。
- 各付属品、消耗品をセットする順番を守り、正しくセットしてください。
- ウェイストチューブ、カートリッジ、コレクションチューブは正しい位置にセットしてください。

〈1〉(試薬のセット) QG-Auto240L 用の試薬容器に必要な量の試薬を分取します。試薬の入っ

た試薬容器をセット位置番号に合わせて試薬容器ホルダーにセットします。使用しない試薬、およびウェストチューブのセット位置には空の試薬容器をセットします。試薬容器ホルダーを本装置の試薬容器ホルダスロットにセットします。洗浄液ボトルをドロー内の洗浄液ボトルラックにセットします。

- <2>(消耗品/付属品の準備)1.2ml チップ、および 10ml チップを試薬チップホルダにセットします。サンプル数分のウェストチューブをウェストチューブホルダにセットします。セット後、カートリッジホルダを上から取り付けます。サンプル数分のカートリッジをカートリッジホルダにセットします。セット後、ホルダーのカバーを閉じ、3 箇所のロックをかけます。サンプル数分のコレクションチューブをコレクションチューブホルダにセットします。
- <3>(ホルダー・廃棄コンテナのセット)準備した各ホルダーを装置のそれぞれの対応するスロットにセットします。装置の廃棄コンテナラックに廃棄コンテナをセットします。廃棄コンテナは必ず付属のものを空の状態ですくセットしてください。付属でないもの、中身が入った状態のものを使用、または誤ったセット状態で使用した場合、廃棄物が溢れる可能性があります。
- <4>(ライセートチューブのセット) QG-Auto240L 本体のライセートユニットの攪拌カバーを開け、空のライセートチューブをセットします。ライセートチューブをセットした後、カチッと音がするまで攪拌カバーを閉めます。
- <5>(サンプルの準備)「7-2:1~5」で作成した組織溶解液 2ml を専用のサンプルチューブに添加します。サンプルチューブをサンプルホルダにセットします。サンプルチューブ(組織溶解液添加済)がセットされたサンプルホルダを装置にセットします。
- <6>(分離操作)QG-Auto240L 取扱説明書「3.6 装置の起動方法」を参照し、装置の電源を入れてモードセレクト画面へ移行します。「AUTOMATED OPERATION」を選択し、動物組織 DNA 用にカスタマイズされたプロトコール「CUSTOM」を選択します。セットしたサンプル数を選択し、サンプル数と一致していることを確認し、「OK」ボタンを押します。使用する試薬について、画面に表示されている情報を参照し、必要量が正しい位置にセットしている事を確認します。確認した試薬の「CHECK」ボタンを押し、「OK」ボタンを押します。「START」ボタンを押すと、自動運転を開始します。
- <7>(運転終了・分離サンプルの回収)「AUTOMATIC OPERATION END」の画面が表示されたら運転終了です。装置の電源スイッチを押し、電源を切ります。QG-Auto240L 本体からコレクションチューブホルダを取り出します。コレクションチューブの蓋を閉めて、コレクションチューブホルダから取り出します。すぐにゲノム DNA を使用しない場合は、コレクションチューブの蓋を確実に閉めて、4℃または-20℃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℃で保存することをお勧めします。

7 - 4. QG-Auto240L を用いた分離プロトコール-半自動プロトコール-

- ご使用になる前にQG-Auto240L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。
- 各付属品、消耗品をセットする順番を守り、ウェストチューブ、カートリッジ、コレクションチューブは正しい位置にセットしてください。
- 詳しくはQG-Auto240L取扱説明書:4操作方法-半自動プロトコール-を参照ください。

QG-Auto240L 分離プロトコール詳細(半自動)

- <1>(試薬のセット) QG-Auto240L 用の試薬容器に必要な量の試薬を分取します。試薬の入った試薬容器をセット位置番号に合わせて試薬容器ホルダーにセットします。使用しない試薬、およびウェストチューブのト位置には空の試薬容器をセットします。試薬容器ホルダーを本装置の試薬容器ホルダスロットにセットします。洗浄液ボトルをドロー内の洗浄液ボトルラックにセットします。
- <2>(消耗品/付属品の準備)1.2ml チップ、および 10ml チップを試薬チップホルダにセットします。サンプル数分のウェストチューブをウェストチューブホルダにセットします。セット後、カートリッジホルダを上から取り付けます。サンプル数分のカートリッジをカートリッジホルダにセットします。セット後、ホルダーのカバーを閉じ、3 箇所のロックをかけます。サンプル数分のコレクションチューブをコレクションチューブホルダにセットします。
- <3>(ホルダー・廃棄コンテナのセット)準備した各ホルダーを装置のそれぞれの対応するスロットにセットします。装置の廃棄コンテナラックに廃棄コンテナをセットします。廃棄コンテナは必ず付属のものを空の状態ですく正しくセットしてください。付属でないもの、中身が入った状態のものを使用、または誤ったセット状態で使用した場合、廃棄物が溢れる可能性があります。
- <4>(ライセートチューブのセット)7-2 で作製したライセートを QG-Auto240L 専用のライセートチューブに添加します。QG-Auto240L 本体のライセートユニットの攪拌カバーを開け、ライセートの入ったライセートチューブをセットします。ライセートチューブをセットした後、カチッと音がするまで攪拌カバーを閉めます。
- <5>(分離操作)QG-Auto240L 取扱説明書「3.6 装置の起動方法」を参照し、装置の電源を入れてモードセレクト画面へ移行します。「AUTOMATED OPERATION」を選択し、動物組織 DNA 用にカスタマイズされたプロトコール「CUSTOM」を選択します。セットしたサンプル数を選択し、サンプル数と一致していることを確認し、「OK」ボタンを押します。使用する試薬について、画面に表示されている情報を参照し、必要量が正しい位置にセットしている事を確認します。確認した試薬の「CHECK」ボタンを押し、「OK」ボタンを押します。「START」ボタンを押すと、自動運転を開始します。
- <6>(運転終了・分離サンプルの回収)「AUTOMATIC OPERATION END」の画面が表示されたら運転終了です。装置の電源スイッチを押し、電源を切ります。QG-Auto240L 本

体からコレクションチューブホルダを取り出します。コレクションチューブの蓋を閉めて、コレクションチューブホルダから取り出します。すぐにゲノム DNA を使用しない場合は、コレクションチューブの蓋を確実に閉めて、4℃または-20℃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℃で保存することをお勧めします。

7 - 5. QG-Mini8L を用いた分離プロトコール

- ご使用になる前にQG-Mini8L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。
- 各付属品、消耗品をセットする順番を守り、正しくセットしてください。
- ウェイストチューブ、カートリッジ、コレクションチューブは正しい位置にセットしてください。
- WDT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-Mini8Lのチューブホルダにウェイストチューブとコレクションチューブをセットしてください。
- コレクションチューブとウェイストチューブをセットした後、QG-Mini8Lのチューブホルダの上からカートリッジホルダをセットします。QG-Mini8Lのカートリッジホルダはカートリッジの真下がウェイストチューブとなるようにセットしてください。各チューブをセットした位置と対応する位置となるようにカートリッジホルダにカートリッジをセットします。
- LDT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-Mini8L 分離プロトコール詳細

<1>(ライセート添加)7-2 で調整したライセート全量をカートリッジ(CAL2)に注入します。その際、カートリッジの縁およびカートリッジ周辺にライセートが触れないように気をつけてください。ライセートを注入したカートリッジホルダの列に加圧シールプレートをセットします。カートリッジホルダとチューブホルダを本体にセットし、カートリッジホルダの列が加圧ノズルの真下に来る位置までホルダーをゆっくりと押し込みます。QG-Mini8L 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。加圧はおおよそ 70 秒で自動的に終了します。加圧が自動的にストップした後もライセートがカートリッジ内に残っている場合は、加圧スイッチをいったん元の位置に戻し、再度加圧スイッチを手前に回して加圧を行ってください。

<2>(洗浄 1 回目)カートリッジホルダとチューブホルダを手前に引き出し、ピペットを使用し、WDT 7.5ml を加圧シールプレートの穴からカートリッジへ添加します。加圧シールプレートに洗浄液が付着した場合は、やわらかい紙などでふき取ってください。洗浄液を注入したカートリッジホルダの列に加圧シールプレートをセットします。カートリッジホルダとチューブホルダを本体にセットし、カートリッジホルダの列が加圧ノズルの真下に来る位

置までホルダーをゆっくりと押し込みます。QG-Mini8L 本体の加圧スイッチを手前に回し、加圧を開始します。洗浄液がカートリッジ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)カートリッジホルダとチューブホルダを手前に引き出し、ピペットを使用し、WDT 6.5ml を加圧シールプレートの穴からカートリッジへ添加します。加圧シールプレートに洗浄液が付着した場合は、やわらかい紙などでふき取ってください。洗浄液を注入したカートリッジホルダの列に加圧シールプレートをセットします。カートリッジホルダとチューブホルダを本体にセットし、カートリッジホルダの列が加圧ノズルの真下に来る位置までホルダーをゆっくりと押し込みます。QG-Mini8L 本体の加圧スイッチを手前に回し、加圧を開始します。洗浄液がカートリッジ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)カートリッジホルダとチューブホルダを手前に引き出し、ピペットを使用し、WDT 5.5ml を加圧シールプレートの穴からカートリッジへ添加します。加圧シールプレートに洗浄液が付着した場合は、やわらかい紙などでふき取ってください。洗浄液を注入したカートリッジホルダの列に加圧シールプレートをセットします。カートリッジホルダとチューブホルダを本体にセットし、カートリッジホルダの列が加圧ノズルの真下に来る位置までホルダーをゆっくりと押し込みます。QG-Mini8L 本体の加圧スイッチを手前に回し、加圧を開始します。洗浄液がカートリッジ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)カートリッジホルダとチューブホルダを手前に引き出します。カートリッジホルダを上側へ持ち上げ、チューブホルダから外し、カートリッジの下側がコレクションチューブと対応する位置へ移動させます。ピペットを使用し、CDT を加圧シールプレートの穴からカートリッジへ添加します。回収液を注入したカートリッジホルダの列に加圧シールプレートをセットします。カートリッジホルダとチューブホルダを本体にセットし、カートリッジホルダの列が加圧ノズルの真下に来る位置までホルダーをゆっくりと押し込みます。室温にて90秒間インキュベート後、QG-Mini8L 本体の加圧スイッチを手前に回し、加圧を開始します。溶出液がカートリッジ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。詳しい操作方法は、QG-Mini8L 取扱説明書(p.22 2:操作方法-回収)を参照ください。

<6>カートリッジホルダとチューブホルダを引き出し、カートリッジホルダのはずし、カートリッジ(CAL2)を捨てます。コレクションチューブの蓋をしっかりと閉めてから取り出してください。すぐにゲノム DNA を使用しない場合は、コレクションチューブの蓋をしっかりと閉めた後、4℃または-20℃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℃で保存することをお勧めします。

7 - 6. QG-610L を用いた分離プロトコール

- ご使用になる前にQG-610L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。
- 各付属品、消耗品をセットする順番を守り、正しくセットしてください。
- ウェイストチューブ、カートリッジ、コレクションチューブは正しい位置にセットしてください。
- 洗浄液(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。
- 洗浄液(WDT)、回収液(CDT)をセット後、ディスチャージ操作を必ず行ってください。
- LDT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-610L 分離プロトコール詳細

<1>(分離モードの選択)動物組織からのゲノム DNA 分離の場合は、「DNA TISSUE」を選択してください。「DNA TISSUE」が無い場合、他のファイルを修正して使用してください。(パラメータ設定については、付録 1 を参照ください)

- 最高収量用に溶出回数を 2 回に増やす場合

QG-610L の取扱説明書のパラメータ設定方法をご参照のうえ、「EXPERT」モードの「ELUT COUNT」の設定を1→2に変更してください。

溶出回数を1回に戻す場合は、「ELUT COUNT」の設定を2→1に変更してください。

<2>(消耗品のセット)装置のフロントカバーを開けてホルダー一式を取り出します。コレクションチューブをコレクションチューブホルダへ差し込みます。次にウェイストチューブをホルダーキヤリッジに差し込みます。

<3>(試薬のセット)所定量の特級エタノールを添加した洗浄液(WDT)および指定の遠沈管に移した回収液(CDT)をそれぞれホルダーの所定の位置にセットします。

- 処理数に応じて必要な試薬量が異なります。

- 各試薬のセット位置は、QG-610L の取扱説明書をご参照ください。

<4>(ディスチャージ操作)ディスチャージトレイがセットされていることを確認してください。フロントカバーを閉じ、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洗浄液(WDT)、回収液(CDT)が注入されず、正確な結果が得られません。

<4>(ライセート添加)7-3 で調整したライセート全量をカートリッジ(CAL2)に注入します。その際、カートリッジの縁およびカートリッジ周辺にライセートが触れないように気をつけてください。ライセートを注入後、カートリッジホルダの蓋をロックし、ホルダー一式を装置へセットします。

<5>(分離開始)装置のフロントカバーを閉めます。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、【START】ボタンを押してください。分離操作が始まるとオ

ペレーションパネルに【EXECUTING】と表示されます。分離操作中はフロントカバーを開けないでください。万一開けると、分離操作が強制終了します。

<6>(回収) ピピーっ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下表のように表示されます。

v	正常終了
-	異常終了
—	カートリッジなしまたは分離前にエラー発生

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、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を取り出します。コレクションチューブの蓋を確実に閉めて保存してください。長期間ゲノム DNA を保存される場合は、-20℃で保存することをお勧めします。

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) DNA の収量が低い、DNA が得られない

原因	対策
組織の保存方法が不適切	組織の種類、大きさ、量、保管期間、保存条件でゲノムDNA収量は変わります。不適切な保存条件では収量が低下します。適切な条件でサンプルを保存してください。動物から組織を取り出したら、所定量を直ちにMDTへ浸すか、直ちに液体窒素で凍らせ、凍結(-20℃または-80℃)保存してください。
組織溶解が不完全	EDTを含むMDTに、組織を完全に浸して溶解してください。溶解するときに、組織を細かく切ってください。 加温できるシェーカーを用いてシェーキングを行い、よく攪拌してください。シェーカーを使用しない場合は、55℃にて加温しながら時々ボルテックスで混和してください。必要に応じて溶解インキュベーション時間を延長してください。 組織量が5mg以上の場合で、本キットで初めて分離する組織の場合は、組織5mgあたりのEDT:MDT比が20μl:180μlになるように比例計算で調整してください。LDT(動物組織の場合は180μl、マウス尾の場合はLDTと特級エタノール(>99%)混合液 420μl)と組織溶解後の遠心上清を混合するときは、遠心上清のうち200μlを採取してください。
試薬、サンプル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、溶解した組織サンプル→LDT→特級エタノール(>99%)の順で添加してください。尾の場合は、エタノールを加えたLDTをサンプルへ添加してください。
試薬の容量比が不適切	組織溶解後の遠心上清をロスした場合は、遠心上清量、LDT液量およびエタノール液量を「遠心上清:LDT:特級エタノール(>99%)=200:180:240」に、マウス尾の場合は「遠心上清:LDTと特級エタノール混合液=200:420」に調節してください。
溶解液(LDB)添加後のホモジナイズが不十分	溶解液(LDB)添加直後に、上下に激しく振とう混和を十分行い、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。
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WDT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。必要以上に加圧してしまった場合、溶出時のインキュベーション時間を4分に延長すると収量が戻る可能性があります。
カートリッジ(CA)内の液が抜けた後放置した(**)	QG-Mini80/QG-Mini480での分離を始めたら、途中で放置せずに最後まで続けてください。万一放置した場合、溶出時のインキュベシヨ

	ン時間を4分に延長すると収量が戻る可能性があります。
組織量が多すぎた	所定量まで組織量を減らしてください(表2 p.8参照)。マウス尾先端部の場合、約5mmが5mgに相当します。
LDT添加後のボルテックスが不十分	LDT添加直後に、最大回転数で十分にボルテックス(15秒)または転倒混和してください。
WDTに所定量の特級エタノールを添加していない	WDT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.11参照)
カートリッジ(CA)ヘライセー 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。
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。
CDT量が不適切(*)	QG-810: パラメータが変更されているか確認してください。特に、CDT量のパラメータ「ELUT VOL」が間違っていないこと(「200」であること)を確認してください。また、ラインに気泡が残っていたらディスチャージ操作を行ってください。パラメータの設定についてはQG-810の取扱説明書も併せて参照してください。 QG-Mini80/QG-Mini480: CDT量が200µlであることを確認してください。
試薬に析出物が生じた	(6)「試薬に析出物が生じた」参照
ゲノムDNAの溶出にCDT以外 の試薬を使った	ゲノムDNA溶出時にはCDTを使用してください。
古いWDTを使用した(*)	QG-810に1日以上セットされたWDTは使用しないでください。
DNAの分解	(3)「DNAが分解した」参照
カートリッジ(CA)内の液が抜 けた後、放置した(**)	QG-Mini80/QG-Mini480での分離を始めたら、途中で放置をせずに最後まで続けてください。

(2) カートリッジ(CAL2)が詰まる

原因	対策
組織量が多すぎた	所定量まで組織量を減らしてください(表2 p.8参照)。マウス尾先端部の場合約5mmが5mgに相当します。
LDT添加後のボルテックスが不十分	LDT添加直後に、最大回転数で十分にボルテックス(15秒)または転倒混和してください。
加圧時間が足りない(**)	もう一度、1分間加圧してください。
組織溶解が不完全	EDTを含むMDTに、組織を完全に浸して溶解してください。溶解するときに、組織を細かく切ってください。 加温できるシェーカーを用いてシェーキングを行い、よく攪拌してください。

	シェーカーを使用しない場合は、55℃にて加温しながら時々ボルテックスで混和してください。必要に応じて溶解インキュベーション時間を延長してください。
組織の不溶解物が詰まった	MDTとEDTで溶け残った残渣を、遠心(8,000xg(10,000rpm)、3分)して取り除いてからLDTを添加してください。
QG-810: 完了後の表示が「ー」となっているもしくはカートリッジにライセートまたはWDTが残っている(*)QG-Mini80/QG-Mini480: 加圧操作を繰り返してもライセートやWDTが抜けきらない(**)	「補足(p.35)」を参考に、カートリッジ(CA)からフィルターを取り外して、DNAのリカバリーを試してください。
カートリッジ(CA)内の液が抜けた後、放置した(**)	QG-Mini80/QG-Mini480での分離を始めた後、途中で放置をせずに最後まで続けてください。
ゲノムDNAの溶出にCDT以外の試薬を使った	ゲノムDNA溶出時にはCDTを使用してください。

(3) DNAが分解した

原因	対策
組織の保存方法が不適切	動物から組織を取り出した後、所定量を直ちにMDTへ浸すか、直ちに液体窒素で凍らせ、凍結保存(-20℃または-80℃)してください。

(4) DNAの純度が低い

原因	対策
所定の洗浄条件で行っていない(**)	洗浄はWDT 750μlで3回行ってください。
試薬、サンプル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、溶解した組織サンプル→LDT→特級エタノール(>99%)の順で添加してください。尾の場合は、エタノールを加えたLDTをサンプルへ添加してください。
試薬の容量比が不適切	組織溶解後の遠心上清をロスした場合は、遠心上清量、LDT液量およびエタノール液量を「遠心上清:LDT:特級エタノール(>99%)=200:180:240」に、マウス尾の場合は「遠心上清:LDTと特級エタノール混合液=200:420」に調節してください。
LDT添加後のボルテックスが不十分	LDT添加直後に、最大回転数で十分にボルテックス(15秒)または転倒混和してください。
WDTに所定量のエタノールを添加していない	WDT使用前には、必ず所定量の特級エタノール(>99%)を添加したことをご確認ください。(8-1 p.11参照)

(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	260nm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) 試薬に沈殿物が生じた

原因	対策
低温に保存している	指定の温度(15 ~ 28℃)で保存してください。 析出物が生じた場合は、MDTは55℃、その他の試薬は37℃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。

(7) LDT→エタノール添加後、あるいはLDTとエタノール混合液添加後に白色沈殿物が発生

原因	対策
室温が低い	この沈殿物は、55℃のインキュベーションで溶解されます。溶解後、室温に戻してから分離操作をしてください。
組織量が多すぎた	組織量が所定量(表2 p.10参照)より少なかったことをご確認の上、凝集物ごとカートリッジ(CA)に添加してください。

(8) 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
CDT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4(p.12)に従い、必要量のCDTをセットしてください。また、QG-810の取扱説明書を参照し、ディスチャージ操作を必ず行ってください。
CDT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、CDTを200µl添加してください。
CDT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(**)	CDT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。

(9) カートリッジ(CA)がカートリッジホルダに保持されない

原因	対策
カートリッジホルダ右のリリースレバーが左端に戻っていない(**)	リリースレバーが左端に戻っていることを確認してからカートリッジ(CA)をセットしてください。

9. オーダリング・インフォメーション

製品	Cat #
QuickGene DNA tissue kit L	DT-L
QuickGene DNA 組織キット L	
QuickGene cfDNA Isolation Kit CF-L	CF-L
QuickGene 循環セルフリーDNA キット	
QuickGene Auto240L Consumables Kit	240L-CK
消耗品キット	

付録 1 自動核酸分離装置 QG-610L パラメータについて

QG-610L では「DNA WHOLE BLOOD」モードは、下表のパラメータ設定となっています。このキットでの分離は、このパラメータに基づいて実施してください。詳しい変更の仕方は、QG-610L の取扱説明書をご参照ください。

表示順	パラメータ	
	動作項目	DNA WHOLE BLOOD
1	BIND PEAK	120
2	WASH COUNT	3
3	WASH PEAK	90
4	WASH VOL1	7500
5	WASH VOL2	6500
6	WASH VOL3	5500
7	WASH VOL4	0
8	WASH VOL5	0
9	WAS2 COUNT	0
10	WAS2 PEAK	90
11	WAS2 VOL1	7500
12	WAS2 VOL2	6500
13	WAS2 VOL3	5500
14	WAS2 VOL4	0
15	WAS2 VOL5	0
16	ELUT VOL	500
17	ELUT PEAK	100

***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/>