

プラスミドキット
QuickGene Plasmid kit S II
(PL-S2)

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. プロトコール	9
【Overview Flow Chart】	9
8-1 試薬の準備	9
8-2 ライセート作製プロトコール	11
8-3 QG-810を用いた分離プロトコール	14
8-4 QG-Mini80を用いた分離プロトコール	17
8-5 QG-Mini480を用いた分離プロトコール	21
9. トラブルシューティング	25
10. オーダリング・インフォメーション	28
付録 QG-810パラメータについて	29

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、簡単に組換え大腸菌からプラスミド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。
QuickGene-810 (以下QG-810) : 約6分
QuickGene-Mini80 (以下QG-Mini80) : 約4分
- 48サンプル同時に分離操作を行うことができます。
QuickGene-Mini480 (以下QG-Mini480) : 約40分
- タンパク質やカオトロピック塩を含まない、高純度のプラスミドDNAが得られます。得られた高品質のプラスミドDNAはPCR、制限酵素処理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処理分のプラスミドDNA分離用試薬が含まれています。

<input type="checkbox"/> RNase	EDP-01	600 μ l
<input type="checkbox"/> Resuspension Buffer	RDP	20ml
<input type="checkbox"/> Alkaline Solution	ADP	20ml
<input type="checkbox"/> Neutralization Buffer	NDP	30ml
<input type="checkbox"/> Lysis Buffer	LDP	20ml
<input type="checkbox"/> Wash Buffer	WDP	64ml
<input type="checkbox"/> Elution Buffer	CDP	100ml
<input type="checkbox"/> Cartridges (カートリッジ)	CA	96個
<input type="checkbox"/> Collection Tubes (コレクションチューブ)	CT	96個
<input type="checkbox"/> Caps (キャップ)	CAP	96個
<input type="checkbox"/> 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。試薬は指定の温度で保存した場合、購入後9カ月間安定です。より安定に保つためEDP-01は開梱後、冷蔵(2 ~ 8 $^{\circ}$ C)で保存することをお勧めします。

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%) (LDP、WDPの調製に使用)

② 器具・機材

- QuickGene
- 未使用の遠沈管* (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)
- マイクロ遠心機 (18,000×g (14,100rpm) 程度の遠心が可能なもの)
 - * 遠沈管は、QG-810で、所定量の特級エタノールを添加したWDP、CDPを入れる容器として使用します。QG-Mini80/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 (WDP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 (CDP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 (WDP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 (CDP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

◆ EDP-01 (RNase)

- 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は、水で十分に洗ってください。

◆ RDP (Resuspension 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は、水で十分に洗ってください。

◆ ADP (Alkaline Solution)

- 薬品の特性：● 触れると皮膚、目を刺激します。
- 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。
 - ADPIはpHが高いため、未使用のまま廃棄する場合は、中和を行うなど適切な処理を行ってください。

◆ NDP (Neutralization Buffer)

- 薬品の特性：● 触れると皮膚、目を刺激します。
- 吸入する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は、水で十分に洗ってください。
 - 通気性のよい場所で取扱ってください。
 - 容器を完全密閉して保管してください。

◆ LDP (Lysis 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は、水で十分に洗ってください。

◆ WDP (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は、水で十分に洗ってください。

◆ CDP (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は、水で十分に洗ってください。

◆ 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、使用後廃棄する場合

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 (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 (<http://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、ハイコピープラスミドDNAをトランスフォームした大腸菌のLB培地1～2mlの培養液からのプラスミドDNA分離を基準量としています。
- 収量はサンプルの状態により変動します。サンプル量が多い場合、細胞溶解が十分にできなかったり、収量が低下する可能性があります。
- endA+の大腸菌の使用は、キットの性能が発揮されない可能性があります。
- 凍結サンプルで、凍結、融解を繰り返した場合は、収量が低下したり、プラスミドDNAサイズが短くなることがあります。

◆ 試薬に関する注意事項

- ADPは室温が低い場合、白い析出物が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。

◆ 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50μlのCDPで溶出を行うことを前提としています。CDP量は変更可能ですが、溶出効率に変化する可能性があります。
- 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 (p.25)
 - QG-Mini80をご使用の場合：8-4 (p.17)
 - QG-Mini480をご使用の場合：8-5 (p.21)
- 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。
- プラスミド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

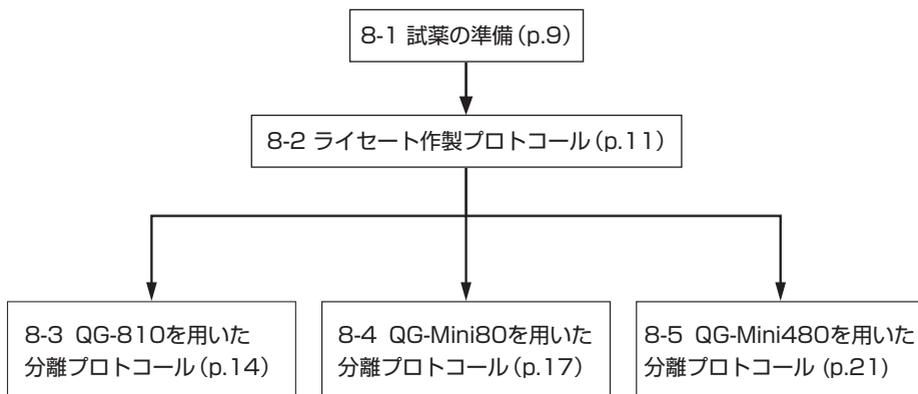
本キットは、ハイコピープラスミドDNAをトランスフォームした大腸菌のLB培地1～2mlの培養液からのプラスミドDNA分離に対応しています。収量はサンプルの状態により変動します。表2にpBlueScript IIベクターへ1kbの遺伝子を組み換えたプラスミドDNAをDH5 α へトランスフォームし、LB培地で、37℃、一晚培養した1mlの培養液から分離したプラスミドDNAの収量および純度例を示します（データは8検体の平均値）。

表2 プラスミドDNAの収量および純度

サンプル	プラスミドDNA 回収量 (μg)	A260/280	A260/230
pBlueScript II/GAPDH/DH5 α 1 \times 10 ⁹ 個	21.4	1.99	2.49

8. プロトコール

[Overview Flow Chart]



8-1 試薬の準備

◆EDP-01 (600 μ l)

EDP-01はより安定に保つため、冷蔵(2～8 $^{\circ}$ C)で保存することをお勧めします。

◆RDP (20ml)

使用前に、RDPボトルにEDP-01を全量添加し、よく混和してください。EDP-01を添加したRDPは冷蔵(2～8 $^{\circ}$ C)で保存し、6カ月を目安にご使用いただくことをお勧めします。

◆ADP (20ml)

使用前に混和してください。激しく振ると泡立ちますので避けてください。

ADPは室温が低い場合、白い析出物が生じることがあります。析出物が生じた場合は、37 $^{\circ}$ Cで溶解後、室温に戻してから使用してください。使用後は、直ちに蓋をしっかりと閉めてください。開放したまま放置すると活性が低下します。

◆NDP (30ml)

使用前に十分に混和してください。

◆LDP (20ml)

濃縮状態でお届けします。

使用前に、ボトルに正確に44mlの特級エタノール(>99%)を添加し、よく混和してください。激しく振ると泡立ちますので避けてください。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、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。

◆WDP(64ml)

濃縮状態でお届けします。

使用前に、ボトルに256ml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、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。

◆CDP(100ml)

核酸溶出時には、必ずCDPを使用してください。

◆WDP(特級エタノール添加済み)、およびCDP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、WDP、CDP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のパフファスタンド(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 WDP、CDP必要量

カートリッジ数	WDP (QG-810)	CDP (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 : WDP 8.0ml、CDP 7.4ml

カートリッジ数に応じてWDP、CDPを加算してください。

1カートリッジあたりWDP 1.5ml、CDP 50 μ l使用します。

例えばカートリッジ2本使用する場合は、11mlのWDPとQG-810では7.5mlのCDPが必要です。

※WDP、CDP用の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処理あたり組換え大腸菌のLB培地1～2mlの培養液からのハイコピープラスミドDNAの分離に対応しています。

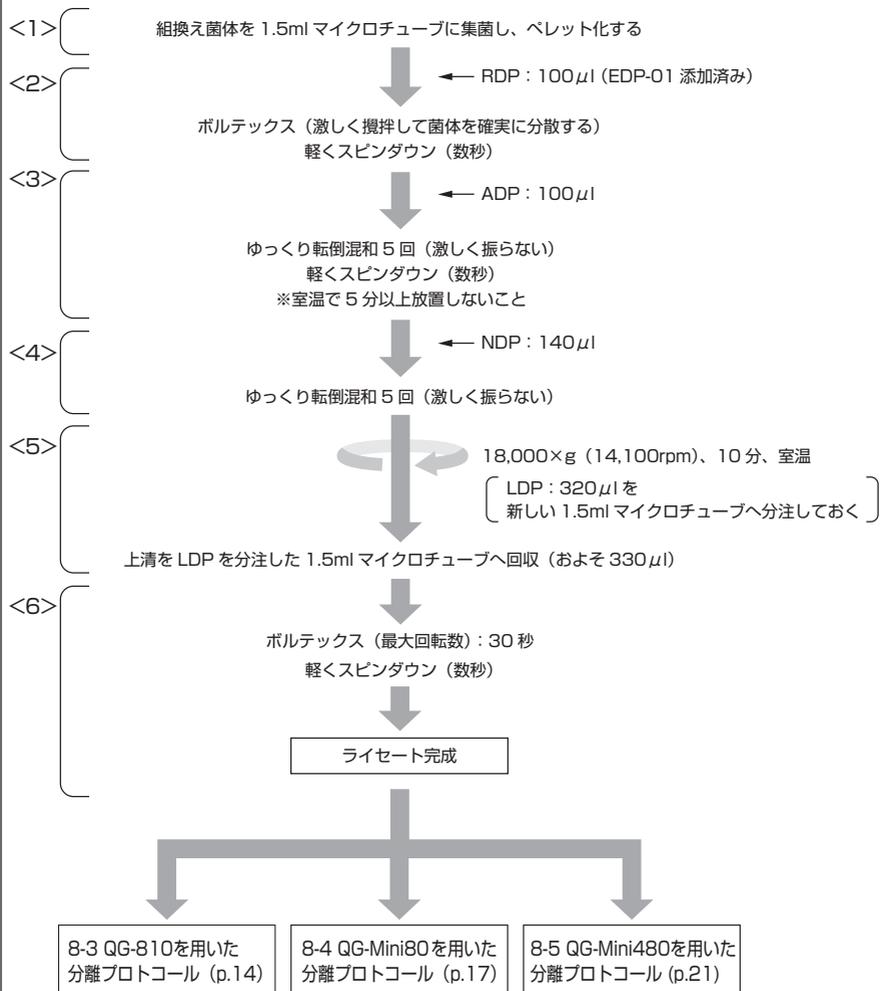
【分離を始める前の重要事項】

- 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。
- 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。
- 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。
- ADPIはpHが高いため、未使用のまま廃棄する場合は中和を行うなど適切な処理を行ってください。
- 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。

【分離を始める前の確認事項】

- 分離を始める前に、RDPボトルにEDP-01が全量添加されていることを確認してください。
- LDPは濃縮状態でお届けします。分離を始める前に、必ず44ml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。
- WDPは濃縮状態でお届けします。分離を始める前に、必ず256ml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



ライセート作製プロトコール詳細

<1> 組換え大腸菌を2ml程度のLB培地で12～16時間培養し、培養液1～2mlを1.5mlマイクロチューブへ分注し、マイクロ遠心機(3,300×g(6,000rpm))にて10分程度を目安で集菌し、培地をできるだけ除去します。

強くペレット化しすぎると、再分散が難しくなります。

<2> RDPボトルにEDP-01を全量添加しよく混ぜてください。組換え大腸菌ペレットにRDP(EDP-01添加済み)を100μl添加します。

ボルテックスで激しく攪拌して確実に分散させてください。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。

分散が不十分の場合は溶菌が進まず、プラスミドDNAの収量が低下します。

EDP-01を添加したRDPは、冷蔵(2～8℃)で保存し、6カ月を目安にご使用いただくことをお勧めします。

<3> ADPを100μl添加し、直ちにゆっくりと5回転倒混和してください。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。

激しく振らないでゆっくりとかつ確実に液を混合させてください(ADPを添加すると、粘性のある液に変わります)。激しく混合すると多くのゲノムDNAが共に分離されます。ゆっくり過ぎて液の混合が不十分の場合、プラスミドDNAの収量が低下します。また、室温で5分以上放置すると、プラスミドDNAが変性することがあります。

ADPのボトルは使用后、蓋をしっかりと閉めてください。開放したまま放置すると活性が低下します。ADPは室温が低い場合、白い析出物が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。

<4> NDPを140μl 添加し、直ちにゆっくりと5回転倒混和してください。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。

激しく振らないでゆっくりとかつ確実に液を混合させてください(NDPを添加すると、白色の沈殿が生成します)。激しく混合すると多くのゲノムDNAが共に分離されます。ゆっくり過ぎて液の混合が不十分の場合、プラスミドDNAの収量が低下します。

<5> マイクロ遠心機18,000×g(14,100rpm)で、10分間室温にて遠心し、沈殿と上清を分離します。遠心分離をしている間に、LDP(特級エタノール添加済み)320μlを新しい1.5mlマイクロチューブへ分注しておきます。そこへ沈殿物が混入しないように遠心上清(およそ330μl)を添加します。

沈殿物が混入するとプラスミドDNAと共に多くのゲノムDNAが分離されますので注意してください。

<6> 最大回転数で30秒間ボルテックスした後、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)。

混合が不十分の場合、プラスミドDNAの収量が低下します。

ライセート完成後は、速やかにQuickGenel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)

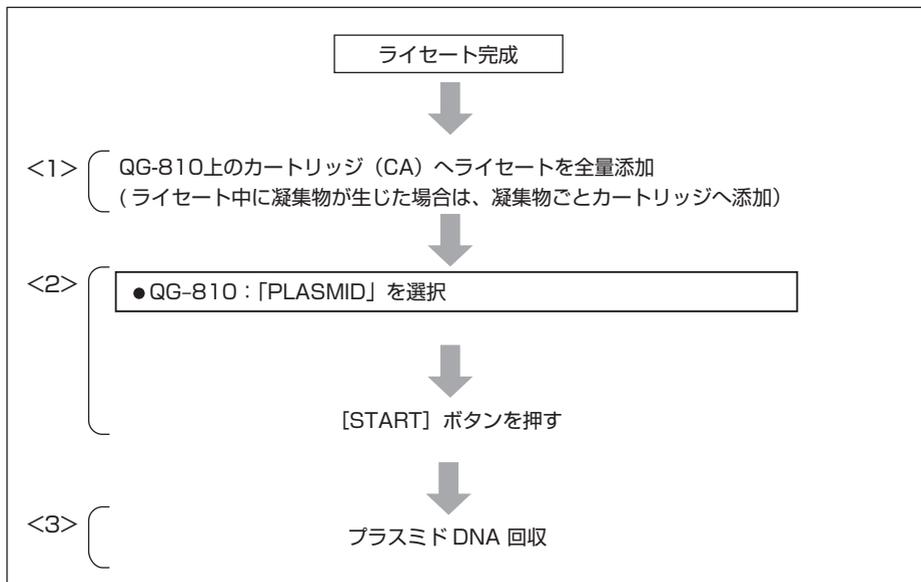
8-4 QG-Mini80を用いた分離プロトコール(p.17)

8-5 QG-Mini480を用いた分離プロトコール(p.21)

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。
- WDPに256ml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、「PLASMID」モードを選択してください。
- 各試薬、カートリッジ(CA)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方法、および各試薬のセット位置については、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、WDP(特級エタノール添加済み)、CDP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WDP、CDP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。
- 感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用後破棄する場合は、感染性産業廃棄物に該当しますので適切な処置を行ってください。

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。

<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 (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」(QG-810)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。

ご注意 分離動作中(「PROCESSING」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、継続して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 : QG-810 取扱説明書の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〉 ピピーッ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)からのプラスミドDNA溶出量は、50 μ lです。

分離されたプラスミドDNAは、キャップ(CAP)をしっかりと閉めて保存してください。プラスミドDNAを長期間保存する場合は、-20℃以下で保存することをお勧めします。

<4> ウェイストチューブ(WT)を取り出します。ウェイス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。

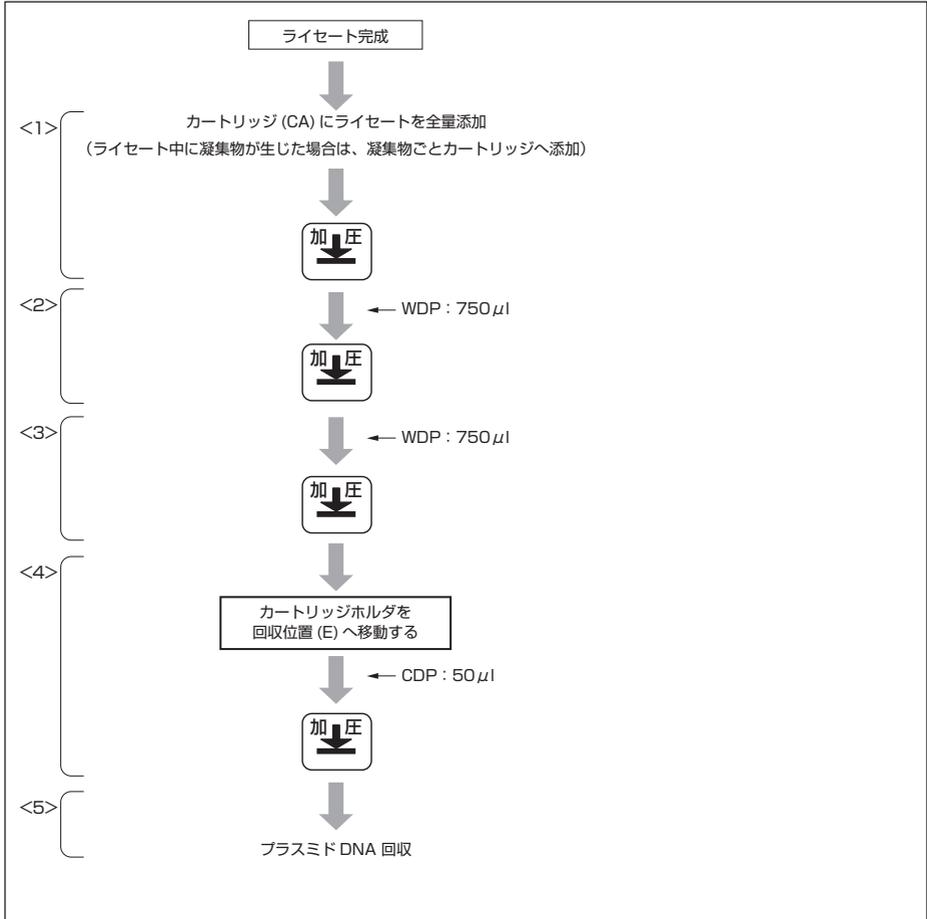
8-4 QG-Mini80を用いた分離プロトコール

- ご使用になる前にQG-Mini80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。
- WDPに256ml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。
- 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。
- チューブホルダにチューブアダプタを取り付け、コレクションチューブ(CT)をセットしてください。コレクションチューブの代わりに1.5mlマイクロチューブを使用することもできます。この場合、チューブアダプタは不要です。
- カートリッジホルダをチューブホルダの洗浄位置(W)に差し込み、カートリッジ(CA)をセットします。その際、カートリッジホルダの右の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をセットしてください。
- チューブホルダ(カートリッジホルダセット済み)をQG-Mini80本体にセットする際は、奥に突き当たるまで押し込んでください。
- ライセートおよびWDP(特級エタノール添加済み)を加圧する際は、QG-Mini80本体トレイ上のWASHラベルが完全に見えていることを確認してください。
- CDPを加圧する際は、QG-Mini80本体トレイ上のWASHラベルがチューブホルダの下に隠れて見えないことを確認してください。
- 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。
- 感染性的おそれのあるサンプルを使用し、使用後破棄する場合は、感染性産業廃棄物に該当しますので適切な処置を行ってください。

QG-Mini80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 チューブホルダ(カートリッジホルダセット済み)をQG-Mini80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 チューブホルダ(カートリッジホルダセット済み)をQG-Mini80本体から取り出す



QG-Mini80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。チューブホルダ (カートリッジホルダセット済み) をQG-Mini80本体にセットします。その際、本体トレイ上のWASHラベルが完全に見えていることを確認してください。QG-Mini80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。

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に添加します。

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。

加圧はおおよそ1分で自動的にストップします。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〉 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、WDP 750 μ l をカートリッジ (CA) へ添加します。チューブホルダ (カートリッジホルダセット済み) をQG-Mini80本体にセットします。その際、本体トレイ上のWASHラベルが完全に見えていることを確認してください。QG-Mini80本体の加圧スイッチを手前に回し、加圧を開始します。WDP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。

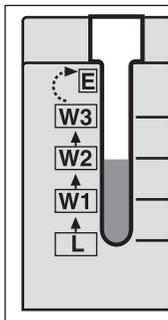
加圧はおおよそ1分で自動的にストップします。加圧が自動的にストップした後もWDPがカートリッジ内に残っている場合は、加圧スイッチをいったん元の位置に戻し、再度加圧スイッチを手前に回して加圧を行ってください。

- <3> 〈洗浄2回目〉 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、WDP 750 μ l をカートリッジ (CA) へ添加します。チューブホルダ (カートリッジホルダセット済み) をQG-Mini80本体にセットします。その際、本体トレイ上のWASHラベルが完全に見えていることを確認してください。QG-Mini80本体の加圧スイッチを手前に回し、加圧を開始します。WDP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。

加圧はおおよそ1分で自動的にストップします。加圧が自動的にストップした後もWDP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回目のWDP加圧終了後、チューブホルダの廃液目盛りの廃液高さは「W2」の位置になります (下記イラスト参照)。

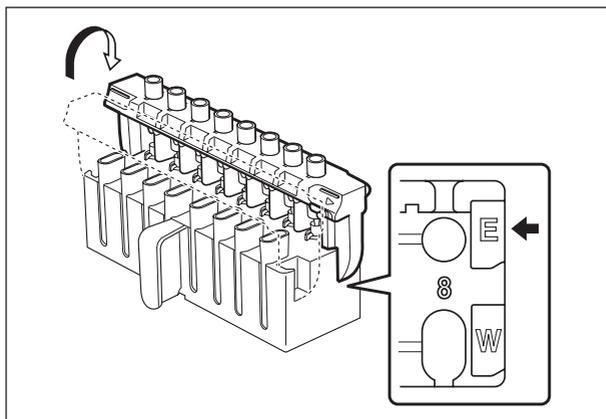
3回以上WDPを添加しないでください。カートリッジに廃液が付着してコンタミネーションを起こしたり、ウェイトチューブ (WT) から廃液があふれたりすることがあります。



<4> 〈回収〉 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、リリースレバーに触れないように注意しながら、カートリッジホルダを回収位置(E)に移動します(下記イラスト参照)。CDP 50 μ lをカートリッジ(CA)へ添加し、チューブホルダ(カートリッジホルダセット済み)をQG-Mini80本体にセットします。その際、本体トレイ上のWASHラベルがチューブホルダの下に隠れて見えなくなっていることを確認してください。

QG-Mini80本体の加圧スイッチを手前に回し、加圧を開始します。CDP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。

加圧はおよそ1分で自動的にストップします。加圧が自動的にストップした後もCDP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。



<5> チューブホルダ(カートリッジホルダセット済み)を引き出します。チューブホルダからカートリッジホルダをはずし、カートリッジ(CA)を捨てます。カートリッジホルダ右のリリースレバーを右端にスライドさせるとカートリッジが落下します。コレクションチューブ(CT)を取り出し、専用チューブラック(別売)にコレクションチューブを並べ、キャップ(CAP)をしっかりと閉めます。専用チューブラックをお持ちでない場合は、キャップを開けてから、コレクションチューブを取り出してください。コレクションチューブの代わりに1.5mlマイクロチューブを使用した場合は、1.5mlマイクロ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。ウェイトチューブ(WT)と廃液を規定に従って捨ててください。

プラスミドDNAを長期間保存する場合には、 -20°C 以下で保存することをお勧めします。

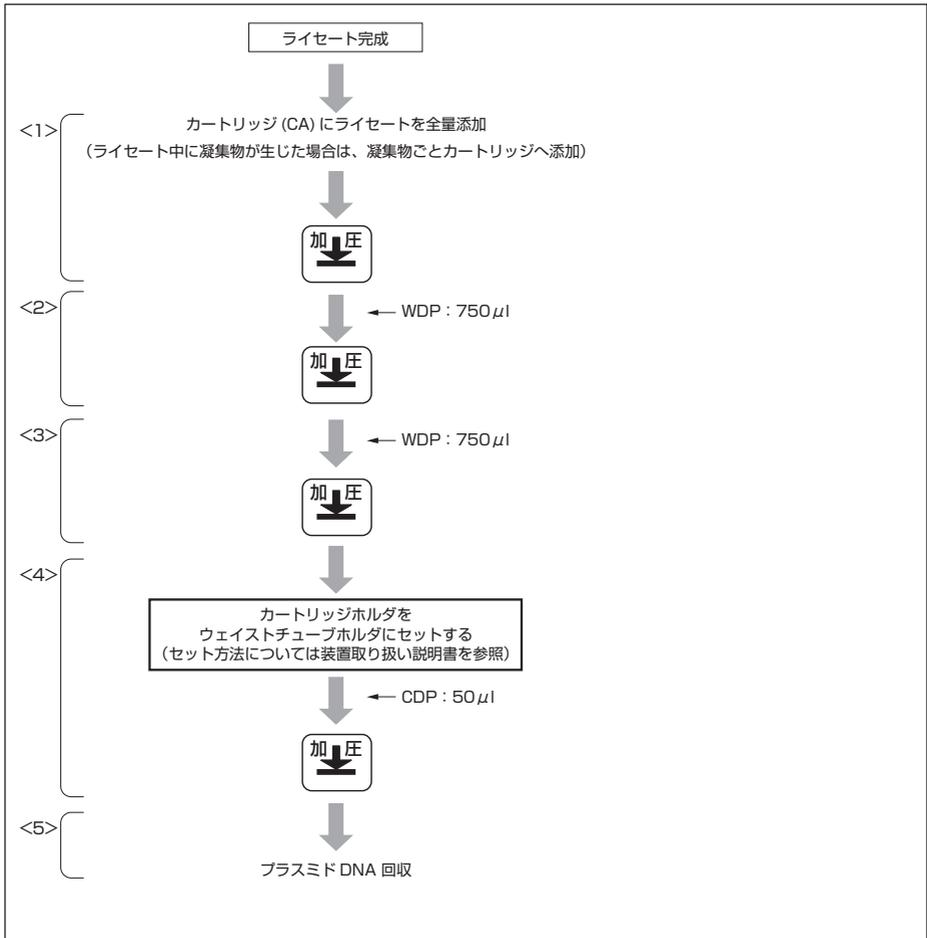
8-5 QG-Mini480を用いた分離プロトコール

- 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。
- WDPIに256ml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。
- 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。
- 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。
- 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ミゾに合わせて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設定してください。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ミゾに確実にセットされていることを確認してください。
- 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。
- 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載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、「QuickGene-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)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。
- 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。

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 カートリッジホルダをコレクションチューブホルダにセットする。
- ⑤ 加圧スイッチを手前に回して加圧開始
- ⑥ 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〉8-2(p.13)で調整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。ウェイトチューブホルダ(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、ウェイ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事を確認し、加圧スイッチを元の位置に戻します。

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に添加します。

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。

加圧はおおよそ70秒で自動的にストップします。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〉ウェイトチューブホルダ(カートリッジホルダセット済み)を引き出し、WDP 750 μ lをカートリッジ(CA)へ添加します。ウェイトチューブホルダ(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。WDP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。

加圧はおおよそ70秒で自動的にストップします。加圧が自動的にストップした後もWDP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。

<3> 〈洗浄2回目〉ウェイトチューブホルダ(カートリッジホルダセット済み)を引き出し、WDP 750 μ lをカートリッジ(CA)へ添加します。ウェイトチューブホルダ(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。WDP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。

加圧はおおよそ70秒で自動的にストップします。加圧が自動的にストップした後もWDP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。

<4> 〈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乗っていることを確認してください。ウェイトチューブホルダ(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：2 操作方法 2.3」を参照してください。CDP 50 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。CDP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。

加圧はおおよそ70秒で自動的にストップします。加圧が自動的にストップした後もWDP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。

<5> 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)を引き出します。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、セパレーターをカートリッジ(CA)とコレクションチューブ(CT)の間に差し込みます。カートリッジホルダをコレクションチューブホルダから取り外し、カートリッジ(CA)を捨てます。コレクションチューブ(CT)にキャップ(CAP)を付け、コレクションチューブホルダより取り出します。ウェイトチューブをウェイトチューブホルダから取り出し、廃棄してください。取り出したウェイトチューブと廃液は、規定に従って廃棄してください。

プラスミドDNAを長期間保存する場合には、 -20°C 以下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、以下の対策をご参照ください。

(*) : QG-810をご使用の場合

(**) : QG-Mini80/QG-Mini480をご使用の場合

(1) プラスミドDNAの収量が低い、プラスミドDNAが得られない

原因	対策
菌体の溶解が不十分	① RDPでの菌体分散が不十分です。よく分散させてください。 ② ADPの攪拌混合が不十分です。液をゆるやかにかつ完全に混合してください。 ③ 使用菌体量が多すぎます。LB培地の12～16時間の培養液1～2ml程度を目安としてください。
試薬量が不適切	プロトコールに従った液量を添加してください。 RDPにはEDP-01を全量添加して使用してください。 (8-1 p.9参照)
サンプル量が不適切	LB培地12～16時間の培養液1～2ml程度を目安としてください。菌がよく増殖していることを確認してください。培養時間が長すぎる培養液には溶菌した細胞が含まれ、分解した核酸が含まれます。
LDP添加後のボルテックスが不十分	LDP添加後は、最大回転数で充分にボルテックス(30秒)してください。
LDPに所定量の特級エタノールを添加していない	LDP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)
WDPに所定量の特級エタノールを添加していない	WDP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)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(CA)に添加してください。
プラスミドDNAの溶出にCDP以外の試薬を使った	プラスミドDNA溶出時にはCDPを使用してください。
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。
セット試薬の不足(*)	QG-810にセットした試薬が充分であることを確認してください。
モードの選択、パラメータの設定が不適切(*)	正しくパラメータ設定したモードで分離操作してください。

(2) RNAが回収された

原因	対策
RNAの分解が不十分	RDPボトルへEDP-01を全量添加し、よく混ぜてから使用してください。サンプル量が多すぎる場合は、サンプル量を所定量(LB培地の12～16時間培養液1～2ml程度)まで下げて使用してください。

(3) ゲノムDNAが回収された

原因	対策
細胞溶解が不適切	ADP、あるいはNDPを添加、混合する工程では、転倒混和により確実に液を混合し、激しく攪拌しないでください。 ADPを添加、混合する工程では、5分以上放置しないでください。
サンプルが不適切	培養時間が長いと溶菌した細胞が増えてしまいますので、12～16時間程度の培養を目安にしてください。
遠心後の上清回収時に沈殿物が混入した	NDP添加後の沈殿が混入しないように上清を回収してください。

(4) カートリッジ (CA) が詰まった

原因	対策
サンプルが多すぎる	所定量 (LB培地の12～16時間の培養液1～2ml程度) まで菌体量を減らしてください。
遠心分離されていない	NDP処理後に沈殿を遠心分離してください。

(5) PCRなど、続けて行う実験がうまくいかない

原因	対策
使用したプラスミドDNA量が不適切	260nm吸光度から濃度を確認してください。
プラスミドDNAの分解	プラスミドDNA回収後は-20℃で保存することをお勧めします。古い培養液から分離すると、プラスミドDNAが分解していることがあります。菌ペレットをすぐに使用しない場合は、ペレットで凍結保存(-80℃)しておくことをお勧めします。分離前に室温に戻してから操作してください。
所定の洗浄条件で行っていない (**)	洗浄はWDP (特級エタノール添加済み) 750 μlで2回行ってください。

(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℃) で保存してください。 析出物が生じた場合は、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) 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
CDP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CDP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。
CDP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、CDPを50 μ l 添加してください。
CDP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、またはカートリッジホルダをウェイトチューブホルダからコレクションチューブホルダの所定の位置に移動させていない(**)	CDP添加時は必ず、カートリッジホルダを回収位置 (E) に移動させてから、またはカートリッジホルダをウェイトチューブホルダからコレクションチューブホルダの所定の位置に移動させてから添加を行ってください。

(8) 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。

10. オーダリング・インフォメーション

製 品	Cat #
QuickGene DNA tissue kit S QuickGene DNA組織キット	DT-S
QuickGene DNA whole blood kit S QuickGene DNA全血キット	DB-S
QuickGene RNA tissue kit S II QuickGene RNA組織キットII	RT-S2
QuickGene RNA cultured cell kit S QuickGene RNA培養細胞キット	RC-S
QuickGene RNA cultured cell HC kit S QuickGene RNA培養細胞HCキット	RC-S2
QuickGene RNA blood cell kit S QuickGene RNA血液細胞キット	RB-S
QuickGene Plasmid kit S II QuickGene プラスミドキットII	PL-S2

付録 QG-810パラメータについて

QG-810をご使用の方は、「PLASMID」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	2
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	50
19	ELUT PEAK	100
20	ELUT DIP TM	0

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**

本取扱説明書に使用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 14-5 クラボウ寝屋川テクノセンター 3 階
TEL (072) 820-3079 FAX (072) 820-3095

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

PL-S2_HB-J_V30