



ハンドブック

RNA 血液細胞キット
QuickGene RNA blood cell kit S
(RB-S)

Ver.4.2

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.....	7
7. 製品説明.....	8
8. プロトコール.....	8
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. QG-810 を用いた分離プロトコール.....	13
8 - 4. QG-Mini480 を用いた分離プロトコール.....	18
9. トラブルシューティング.....	24
10. オーダーリング・インフォメーション.....	28
付録 1 QG-810 パラメータについて.....	29
付録 2 溶血方法について.....	31

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 を分離することができます。
- QuickGene-810 を使用して、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 20 分（DNase 処理なしの場合）
- QuickGene-Mini480 を使用して、48 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-Mini480（以下 QG-Mini480）：約 70 分
- タンパク質を含まず、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。

QuickGene 核酸分離システム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 total RNA 分離用試薬が含まれています。

<input type="checkbox"/> Lysis Buffer	LRB	75 ml
<input type="checkbox"/> Wash Buffer	WRB	280 ml
<input type="checkbox"/> Elution Buffer	CRB	100 ml
<input type="checkbox"/> Cartridges（カートリッジ）	CA2	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°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。

3. キット以外にご準備いただくもの

①試薬

- 0.5mol/L TCEP 溶液(中性)(LRB に添加して使用)
[推奨品]0.5mol/L TCEP 溶液, 中性
(富士フィルム和光純薬株式会社; Cat. No.207-20151)
- 特級エタノール(>99%)(ライセート調製時および WRB の調製に使用)

※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)
 - ・DNase I, Amplification Grade (Thermo Fisher Scientific: Cat. No. 18068-015)
 - ・RNase-Free DNase Set (QIAGEN: Cat. No. 79254)
 - ・DNase I, Amplification Grade (Sigma-Aldrich: Cat. No. AMP-D1)

②器具・機材

- QuickGene 核酸分離システム
- 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(RNase フリー)
- 1.5ml マイクロチューブ(RNase フリー)
- 2.0ml マイクロチューブ(RNase フリー)(必要に応じて)
- 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)
- 5mm φ ジルコニアボール(必要に応じて)
- 簡易卓上遠心機
※遠沈管は QG-810 で、所定量の特級エタノールを添加した WRB、CRB 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(WRB用)	50ml コニカルチューブ (BDファルコンなど)
		小さい遠沈管(CRB用)	15ml コニカルチューブ (BDファルコンなど)
大	～ 72	大きい遠沈管(WRB用)	175ml コニカルチューブ (BDファルコンなど)
		小さい遠沈管(CRB用)	50ml 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

◆ 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。

◆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

- 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。
- 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.13)、付録 1 (p.29)
QG-Mini480 をご使用の場合:8-4 (p.18)

詳しくは、QuickGene の取扱説明書を参照してください

<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

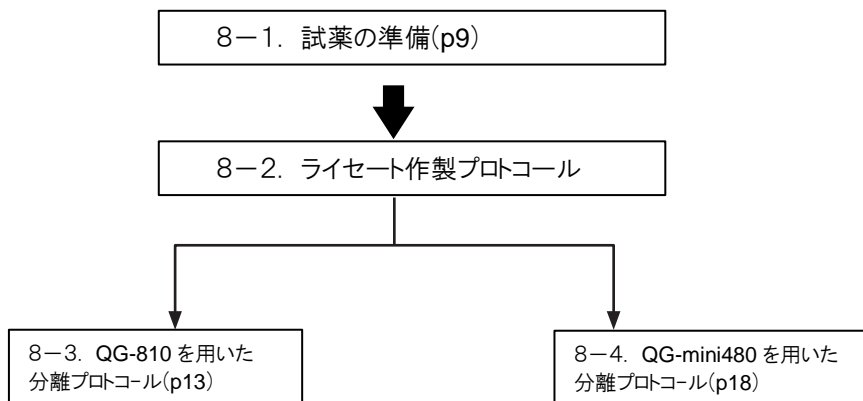
本キットは、溶血後の白血球(健康な成人の血液由来で最大 1.5×10^7 個)からの total RNA の分離・精製に対応しています。健康な成人の血液 1 μ l 中にはおよそ 4,000~7,000 個の白血球が含まれます。白血球 1.5×10^7 個は白血球数 7,000 個/ μ l の方の血液で約 2 ml に相当します。Total RNA 回収例(DNase 処理あり)を表 2 に示します。

表 2 total RNA 回収例

白血球数[個]	収量(μ g)	A260/280
1×10^7	4.3	2

8. プロトコール

[Overview Flow Chart]



8 - 1. 試薬の準備

◆LRB(75ml)

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 20 μ l の 0.5mol/L TCEP 溶液(中性)(以下は TCEP)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。

◆WRB(280ml)

濃縮状態でお届けします。

使用前に、ボトルに 120ml 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。

◆CRB(100ml)

溶出時には、必ず CRB を使用してください。

◆DNase溶液(DNase処理をする場合)

各分離プロトコル詳細(8-3<3> p.16、8-4<3> p.21)を参照して調製してください。

調製後は直ちに使用してください。

◆WRB(特級エタノール添加済み)および CRB 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、WRB、CRB 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 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 WRB、CRB必要量

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

カートリッジ数に応じて WRB、CRB を加算してください。

1 カートリッジあたり WRB 2.25ml、CRB 50 μ l 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 WRB と 7.5ml の CRB が必要です。

※ WRB、CRB 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 1.5×10^7 個を上限とする白血球に対応しています。

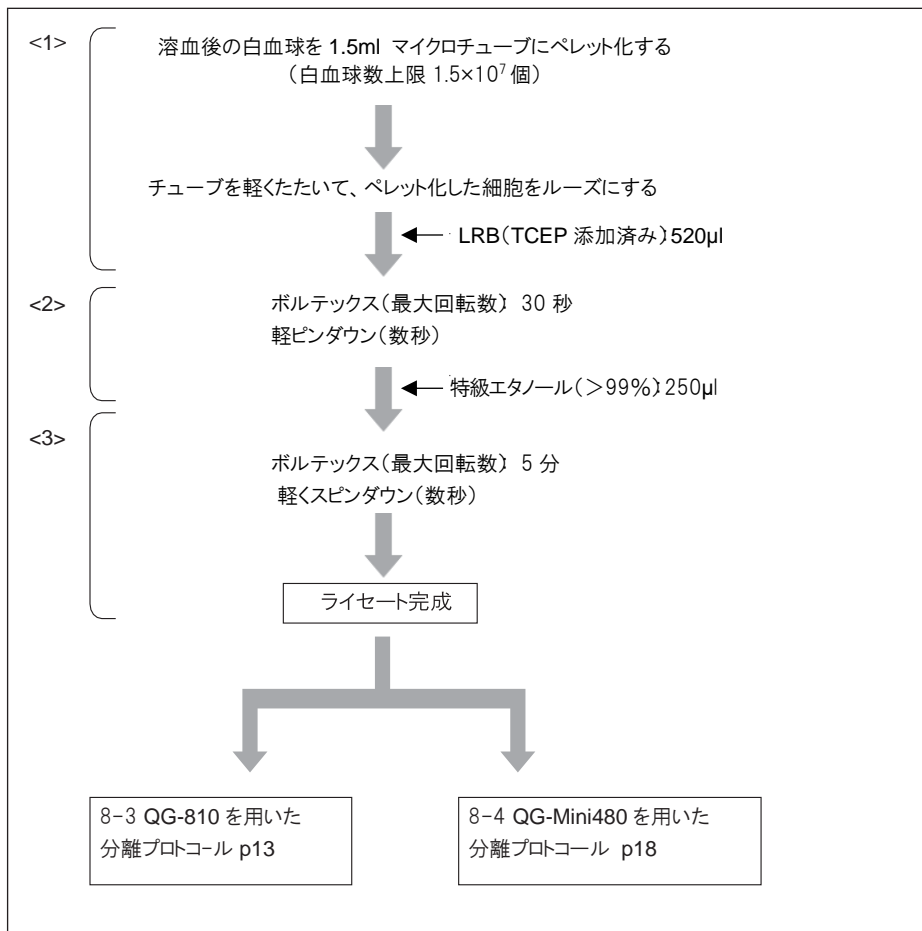
【分離を始める前の重要事項】

- 試薬類は室温に戻してから使用してください。
- 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。
- 健常な成人の血液 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 2ml に相当します。
- 凍結血液は使用しないでください。
- サンプルおよび試薬の液量はライセート作製フロー(p.11)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。
- 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。

【分離を始める前の確認事項】

- WRB は濃縮状態でお届けします。分離を始める前に必ず 120ml 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> 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こります。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 TCEP を添加してください(p.9 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き(タッピング)で細胞をルーズにした後、520 μ l の LRB(TCEP 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($\sim 1.5 \times 10^7$ 個)をペレット化した場合:

チューブを指で軽くたたき(タッピング)で細胞をルーズにした後、520 μ l の LRB(TCEP 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、1.5ml 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 5mm 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 2ml マイクロチューブを使用してください。

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。

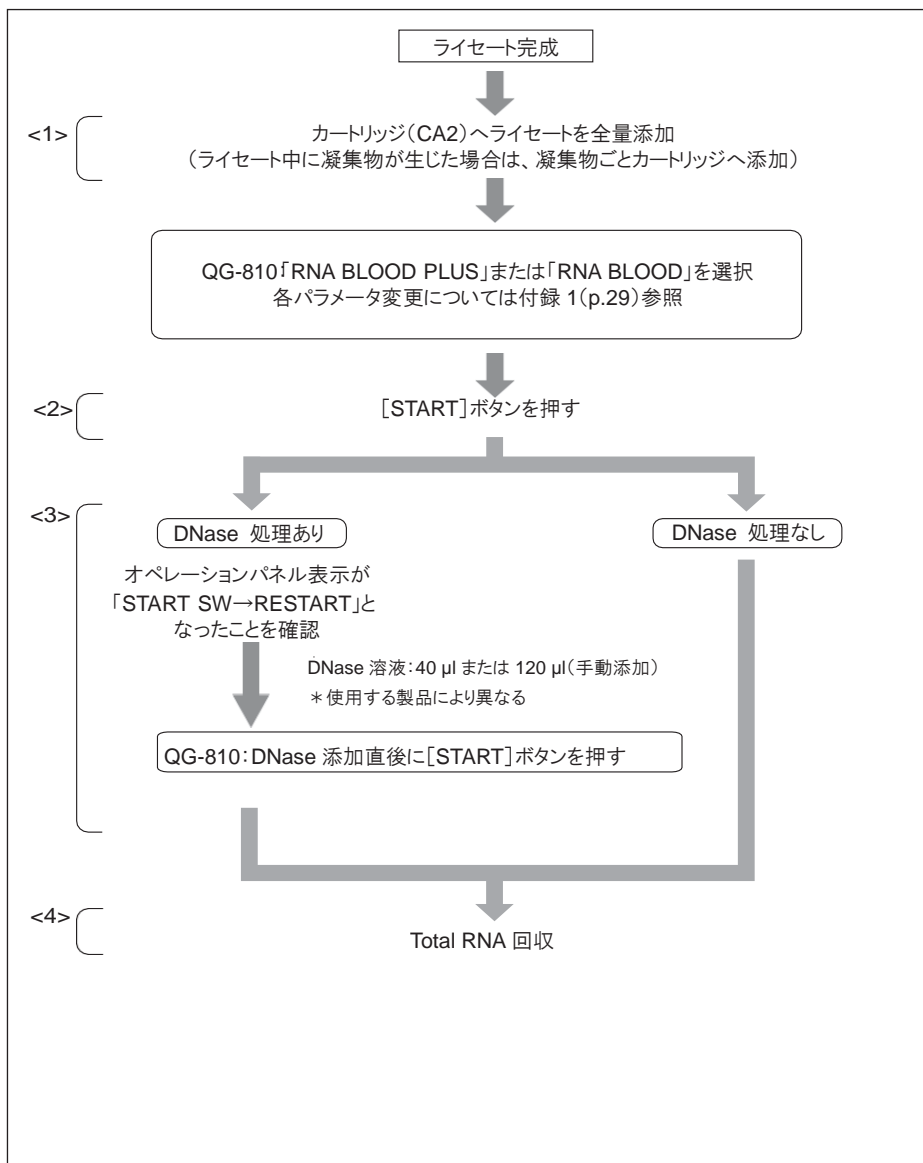
8-3 QG-810 を用いた分離プロトコール(p.13)

8-4 QG-Mini480 を用いた分離プロトコール(p.18)

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。
- WRB に 120ml 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、「RNA BLOOD PLUS」、「RNA BLOOD」モードを選択してください。
(付録 1 p.29)
- 各試薬、カートリッジ(CA2)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(CA2)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(CA2)を使用してください。
- p.9 を参考に、WRB(特級エタノール添加済み)、CRB を QG-810 にセットしてください。
- カートリッジ(CA2)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 WRB、CRB が注入されず、正確な結果が得られません。
- カートリッジ(CA2)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。
- 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 抽出フロー



QG-810 抽出プロトコール詳細

<1> 〈ライセート添加〉8-2(p.10)で調製したライセート全量をカートリッジ(CA2)へ添加します。
ライセート中に凝集物が生じた場合は、ピペッ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 1(p.29)を参照してください。QG-810 のフロントカバーを開め、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。

ご注意 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> <DNase 処理>DNase 処理をしない場合は、<4>へ進んでください。

以下の表に従い、DNase 溶液を調製してください。

<3-1> 各社推奨DNase溶液調製

製品名	メーカー名	Cat.No.	調製方法	終濃度
RQ1 RNase-Free DNase	Promega	M6101	1	20U/40μl
DNase I, Amplification Grade	Thermo Fisher Scientific	18068-015		
RNase-Free DNase Set ^{※1}	QIAGEN	79254	2	3.4Kunitz units/40μl
DNase II, Amplification Grade	Sigma-Aldrich	AMP-D1	3	60U/120μl

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

調製方法 1)

1U/μl DNase I	20 μl
10×Reaction Buffer	4 μl
ヌクレアーゼフリー水	16 μl

調製方法 2)

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

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

調製方法 3)

1U/μl DNase II	60 μl
10×Reaction Buffer	12 μl
ヌクレアーゼフリー水	48 μl

<3-2> DNaseオンカラム処理方法

QG-810のオペレーションパネルに「START SW → RESTART」と表示されていることを確認し、フロントカバーを開けます。

<3-1>で調製したDNase溶液をカートリッジ内のフィルターに直接添加します。Promega社、Thermo Fisher Scientific社、QIAGEN社のDNase溶液の場合は、カートリッジ(CA2)

1本あたりDNase溶液40 μ lをフィルター上に添加します。Sigma-Aldrich社のDNase溶液の場合は、カートリッジ1本あたり120 μ lをフィルター上に添加します。

※DNase溶液添加時にチップの先がフィルターに触れないよう注意してください。

DNase溶液添加の際、ホルダキャリッジを装置から取り出し、背面側からDNase溶液を添加するとチップの先端が見えやすく、操作がしやすくなります。DNase溶液添加後は、ホルダキャリッジを元の場所にセットしなおします。フロントカバーを閉め、[START]ボタンを押します。オペレーションパネルの表示が、「PROCESSING」に変わり、15分後に自動的に分離動作が再開されます。

15分間の反応時間はパラメータ設定によって変更することが可能です(付録1 p.29 「WAS2 WAIT T」)。

- <4> <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	3 (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(CA2)からのtotal RNA溶出量は、50 μ lです。

すぐに total RNA を使用しない場合はキャップ(CAP)をしっかりと閉めた後、-20°Cまたは-80°Cで保存してください。

- <5> 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(CA2)も処分します。ディスチャージトレイの廃液も捨ててください。

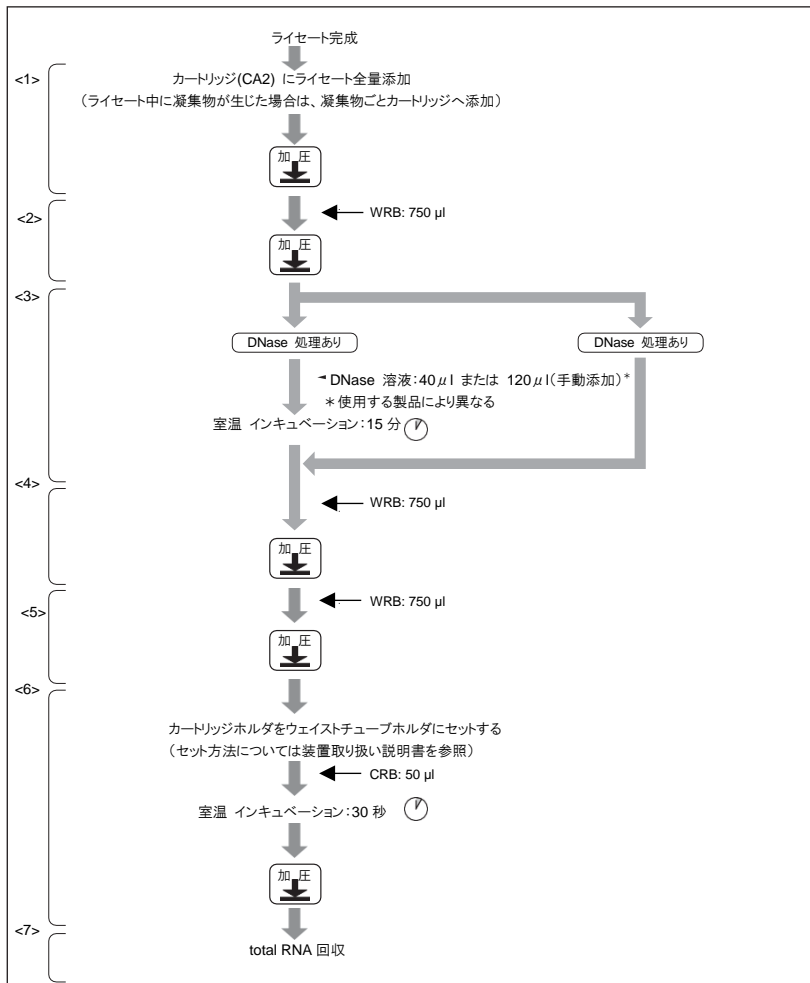
8 - 4. QG-Mini480 を用いた分離プロトコール

- 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。
- WRB に 120ml 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 (CA2) 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。
- 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、「QuickGene-Mini480 の取扱説明書:2 操作方法」を参照してください。
- 加圧操作を繰り返しても液が残っているカートリッジ (CA2) がある場合は、そのカートリッジだけを上へ引き抜き、トラブルシューティング ((2), p.25) に従い別途処理を行ってください。
- カートリッジ (CA2) 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。
- 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 チューブホルダ(カートリッジホルダセット済み)をQG-Mini480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(CA2)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.10)で調整したライセートを数回ピペッティングし、カートリッジへ全量添加します。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設定します。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 列目が加圧ノズルの真下にな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、ピペッ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。加圧はおよそ 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、WRB 750 μ l をカートリッジ(CA2)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) 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。WRB 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 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 WRB 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><DNase 処理>DNase 処理をしない場合は、<4>へ進んでください。

以下の表に従い、DNase 溶液を調製してください。

<3-1> 各社推奨DNase溶液調製

製品名	メーカー名	Cat.No.	調製方法	終濃度
RQ1 RNase-Free DNase	Promega	M6101	1	20U/40μl
Dnase I, Amplification Grade	Thermo Fisher Scientific	18068-015		
RNase-Free DNase Set ^{※1}	QIAGEN	79254	2	3.4Kunitz units/40μl
DNase I, Amplification Grade	Sigma-Aldrich	AMP-D1	3	60U/120μl

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

調製方法 1)

1U/μl DNase I	20 μl
10×Reaction Buffer	4 μl
ヌクレアーゼフリー水	16 μl

調製方法 2)

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

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

調製方法 3)

1U/μl DNase II	60 μl
10×Reaction Buffer	12 μl
ヌクレアーゼフリー水	48 μl

<3-2> DNaseオンカラム処理方法

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。Promega 社、Life Technologies 社、QIAGEN 社の DNase の場合は、カートリッジ(CA2)1 本あたり DNase 溶液 40μl をフィルター上に添加します。Sigma-Aldrich 社の DNase の場合は、カートリッジ 1 本あたり 120μl をフィルター上に添加します。添加後、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、室温で 15 分間インキュベーションします。

DNase 溶液添加時にピペットチップの先がフィルターに触れないよう注意してください。インキュベーション中は加圧しないでください。

必ず洗浄 2 回目(<4>)の WRB(特級エタノール添加済み)を添加してから加圧してください。DNase 処理は必ず洗浄 1 回目の後に行ってください。

<4><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、WRB 750 μ l をカートリッジ(CA2)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。WRB 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 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 WRB 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><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、WRB 750 μ l をカートリッジ(CA2)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。WRB 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 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 WRB 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。

<6><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。

CRB 50 μ l をカートリッジ(CA2)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。4 分間室温でインキュベート後、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。CRP 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 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 CRB 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。

<7>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(CA2)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(CA2)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。すぐに total RNA 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、 -20°C または -80°C 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。(＊):QG-810 をご使用の場合

(＊＊): QG-Mini480 をご使用の場合

(1) RNA の収量が低い、RNA が得られない

原因	対策
LRB に TCEP 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 20 µl の 0.5M TCEP 溶液 (TCEP)を添加してください。
細胞の溶解が不十分	使用前には LRB に析出物などが無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(TCEP 添加済み)添加後のボルテックスが不十分	8-2(p.10)に従い、充分ボルテックスしてください。
WRB に所定量の特級エタノールを添加していない	WRB 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(CA2)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。
CRB 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CRB量のパラメータ(「ELUT VOL」(QG-810)が間違っていないこと(「50」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-Mini480:CRB量が50µlであることを確認してください。
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。
カートリッジ(CA2)内の液が抜けた後放置した(＊＊)	QG-Mini480 で分離を始めたら、途中で放置せず最後まで続けてください。
RNA の溶出に CRB 以外の試薬を使った	RNA の溶出には CRB を使用してください。
古い WRB を使用した(＊)	QG-810に1日以上セットされたWRBは使用しないでください。
溶出時にインキュベーションしていない	QG-810:「ELUT DIP TM」(QG-810)のパラメータが間違っていないこと(「30」であることを)確認してください。 QG-Mini480:CRBをフィルター上に添加後、30秒間インキュベートしてください。
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。
カートリッジ(CA2)が目詰まりした(オペレーション表示 QG-810:—)	「補足(p.27)」を参考に、カートリッジからフィルターを取り外して、RNA のリカバリーを試してください。

(2) カートリッジが詰まった

原因	対策
LRB(TCEP 添加後)またはエタノール添加後のボルテックスが不十分	8-2(p.10)に従い、充分ボルテックス(それぞれ 30 秒、5 分)してください。また、ライセートをカートリッジ(CA2)に添加する際、数回ピペッティングを行い、よく混合してから添加してください。 オプション:エタノール添加時にボール(ジルコニア 5mmφ)1 個を入れ 5 分間ボルテックスを行うと、より効果的にホモジナイズされます。その際には、2ml マイクロチューブを利用してください。

使用白血球数が多すぎる	白血球数を減らしてください。
白血球の溶解が不十分	LRB(TCEP 添加後)添加後、エタノール添加後は十分にボルテックス(それぞれ 30 秒、5 分)してから使用してください。
加圧時間が不十分(**)	再加圧してください。
カートリッジ(CA2)内の液が抜けた後放置した(**)	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。
QG-810: 完了後の表示が「-(QG-810)」となっているもしくは、ライセートまたは WRB が抜けきらない(*) QG-Mini480: 加圧操作を繰り返しても、ライセートや WRB が抜けきらない(**)	「補足(p.27)」を参考にして、DNase 処理を行い、RNA のリカバリーを試してください。
WRB に所定量の特級エタノールを添加していない	WRB 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)

(3)RNA が分解した

原因	対策
血液の保存が不適切	凍結血液は使用しないでください。また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。
LRB に TCEP が添加されていない	LRB を使用前に必要な量分注し、LRB 1ml あたり 20 μ l TCEP 溶液を添加してください。
RNase のコンタミネーション	すべての試薬、カートリッジ(CA2)、コレクションチューブ(CT)およびキャップ(CAP)がRNaseフリーであることは確認済みですが、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 使用中もできるだけ氷上で取扱ってください。

(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	260nm 吸光度から濃度を確認してください。
ゲノム DNA の混入	「RNA BLOOD PLUS」(QG-810)を選択してDNase処理してください。DNAの分解が不完全の場合は、下記(5)を参照してください。
RNA の分解	(3)「RNA が分解した」参照
異物のコンタミネーションが多い(**)	1 回目の WRB を添加した後、室温で 2 分間インキュベートしてください。 2 回目、3 回目の洗浄はインキュベーションの必要はありません。
所定の洗浄条件で行っていない	QG-810: 付録1(p.29)を参照して、「WASH VOL1~5」および「WAS2 VOL1~5」パラメータを「750」に変更していることを確認してください。 QG-Mini480: WRB 750 μ l で 3 回洗浄を行ってください。

(5) DNA の分解が不完全(DNase 処理ありの場合)

原因	対策
推奨ではない DNase を使用した	8-3<3>(p.16)、8-4<3>(p.21)、を参照して、推奨のDNaseを使用してください。
DNase 溶液がフィルター全体に行き渡っていない	DNase 溶液添加時に、DNase 溶液がカートリッジ(CA2)中のフィルター全体に行き渡っているか確認してください。
DNase 活性量が不十分	推奨の DNase 活性量を使用してください。
DNase 処理時間が不十分	QG-810:パラメータ「WAS2 WAIT T」が間違っていないこと(「15」であることを確認してください)。 QG-Mini480:室温(15 ~ 28°C)で15分間インキュベートしてください。
DNase を所定量添加していない	DNase 溶液調製時に、所定量の DNase を添加したか、確認してください。

(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。

(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
CRB のセット量が不足またはデイスチャージ操作を行っていない(*)	表 3(p.9)に従い、必要量の CRB 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イスチャージ操作を必ず行ってください。
CRB を添加していない(**)	カートリッジホルダを回収位置に移動させた後、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た後に CRB を 50 μ l 添加してください。
CRB 添加の際、カートリッジホルダを回収位置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(**)	CRB 添加時は必ず、カートリッジホルダを回収位置に移動させてから、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(CA2)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(CA2)をセットしてください。

補足：目詰まりしたカートリッジ(CA2)からの RNA リカバリー方法

QG-810 の場合：

カートリッジ(CA2)に残ったライセートを新しいカートリッジに移し、8-3<3>(p.16)以降の操作を再度行ってください。

フロントカバーを閉め、室温で 15 分間インキュベーションし、モードを確認し、[START] ボタンを押して最初から開始してください。

QG-Mini480 の場合：

<1> ライセート加圧時に目詰まりした場合

<1-1> ライセート加圧時に目詰まりした場合

カートリッジ(CA2)に残ったライセートはそのままにし、8-4<3>(p.21)に従って DNase 処理を行ってください。その際、ピペットチップの先がフィルターに触れないように注意しながら、DNase 溶液をできるだけフィルター近くに添加してください。DNase 処理時間は 15 分間です。

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。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、洗浄 1 回目(8-4 <2>(p.20))以降の工程を行ってください。

完全に DNA を除きたい場合は通常と同様に、洗浄 1 回目の後に DNase 処理を行ってください

<1-2> さらに洗浄 1 回目で目詰まりした場合

カートリッジ(CA2)に残った WRB はそのままにし、再度 8-4 <3>(p.21)に従って DNase 処理を行ってください。その際、ピペットチップの先がフィルターに触れないように注意しながら、DNase 溶液をできるだけフィルター近くに添加してください。DNase 処理時間は 15 分間です。

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。WRB がカートリッジ 内に残っていないことを確認し、洗浄 2 回目(8-4 <4>(p.22)参照)以降の工程を行ってください。

<2> WRB 加圧時に目詰まりした場合

カートリッジ(CA2)に残った WRB はそのままにし、8-4 <3> (p.21)に従って DNase 処理を行ってください。その際、ピペットチップの先がフィルターに触れないように注意しながら、DNase 溶液をできるだけフィルター近くに添加してください。DNase 処理時間は 15 分間です。

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。WRB がカートリッジ内に残っていないことを確認し、洗浄 2 回目(8-4 <4>(p.22)参照)以降の工程を行ってください。

完全に DNA を除きたい場合は、WRB 通過後に再度 8-4 <3>(p.21)に従って、DNase 溶液を添加し、DNase 処理(処理時間 15 分間)を行ってください。その後、8-4 <4>(p.22)の洗浄 2 回目以降の工程を行ってください。

10. オーダーリング・インフォメーション

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

付録 1 QG-810 パラメータについて

QG-810をご使用の方は、ご使用にならないモードを2つ選択し、「RENAME」モードで分離モード名を変更します。DNase処理を行うときは「RNA BLOOD PLUS」に、DNase処理を行わないときは「RNA BLOOD」に変更してください。

分離モード名の変更だけではパラメータは変更されませんので、下表を参考に各パラメータの設定を行ってください。特に「RNA BLOOD PLUS」に変更の際は、「WAS2 WAIT T」のパラメータの変更ご注意ください。

なお、分離モード名の変更およびその他詳細については、QG-810取扱説明書も併せてご参照ください。

※ グレーの行は初期値から変更不要な項目です。

表示順	LCD表示	RNA BLOOD PLUS (DNase処理あり)		RNA BLOOD (DNase処理なし)		モード初期値						
		パラメータ	ユーザー 確認欄	パラメータ	ユーザー 確認欄	DNA WHOLE BLOOD	RNA CELL	RNA CELL PLUS	DNA TISSUE	RNA TISSUE	RNA TISSUE PLUS	PLASMID
1	BIND PEAK	120		120		120	120	120	120	120	120	120
2	WASH COUNT	1		3		3	3	1	3	3	1	2
3	WASH PEAK	110		110		110	110	110	110	110	110	110
4	WASH VOL1	750		750		750	500	500	750	750	750	750
5	WASH VOL2	750		750		750	500	500	750	750	750	750
6	WASH VOL3	750		750		750	500	500	750	750	750	750
7	WASH VOL4	750		750		750	500	500	750	750	750	750
8	WASH VOL5	750		750		750	500	500	750	750	750	750
9	WASH DIP TM	150		150		0	150	150	0	150	150	0
10	WAS2 WAIT T	15		0		0	0	5	0	0	5	0
11	WAS2 COUNT	2		0		0	0	2	0	0	2	0
12	WAS2 PEAK	110		110		110	110	110	110	110	110	110
13	WASH VOL1	750		750		750	500	500	750	750	750	750
14	WASH VOL2	750		750		750	500	500	750	750	750	750
15	WASH VOL3	750		750		750	500	500	750	750	750	750
16	WASH VOL4	750		750		750	500	500	750	750	750	750
17	WASH VOL5	750		750		750	500	500	750	750	750	750
18	ELUT VOL	50		50		200	100	100	200	100	100	50
19	ELUT PEAK	100		100		100	100	100	100	100	100	100
20	ELUT DIP TM	30		30		0	30	30	90	30	30	0

＜パラメータ変更方法＞

1. [MODE]ボタンにて分離モード「RNA BLOOD PLUS」または「RNA BLOOD」を選択してください。
2. [▲][▼]ボタンを同時に押します。

〈オペレーションパネルの表示例〉

SETUP START



RNA BLOOD

現在のモード状態が表示されます。



BIND PEAK : 120*

- ・パラメータの最初の項目が表示されます。
- ・右の数字は現在の設定値です。
- ・*マークは現在の設定値を表します。

3. [MODE]ボタンを押して、変更したい項目(CRB量を変更する場合は「ELUT VOL」)を表示させます。1つ前の項目に戻るときは、[DISCHARGE]ボタンを押してください。
4. 設定値を下記のとおり変更します。
 - [▲]ボタン: 設定値が上がります。
 - [▼]ボタン: 設定値が下がります。

〈変更操作例〉

「ELUT VOL」の設定値を「50」に変更する場合:

[MODE]ボタンで「ELUT VOL」を表示→設定値を「50」に変更

5. [START]ボタンを押し、設定を保存します。

〈オペレーションパネルの表示例〉

SETUP WRITING

設定内容を保存します。



SETUP COMPLETED



RNA BLOOD

操作待ち状態に戻ります。

付録 2 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)中で転倒混和等でよく混合する。

例: 全血1mlにHB 5mlを添加し、よく混合する。

* 10mlの血液を50mlチューブで処理する時はHBは40ml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 \times 10⁷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 \times 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1ml使用した場合HBを2ml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 \times 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障されています。



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/>