

RNA培養細胞HCキット
QuickGene RNA cultured cell HC kit S
(RC-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	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
【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/QG-800を用いた分離プロトコール	18
8-4 QG-Mini80を用いた分離プロトコール	23
9. トラブルシューティング	29
10. オーダリング・インフォメーション	36
付録1 QG-810パラメータについて	37
付録2 QG-800パラメータについて	39
付録3 QuickGene RNA cultured cell HC kit S (RC-S2) データ例	42

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80 μ m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、簡単に培養細胞からtotal RNAを分離することができます。接着細胞では6cmから10cmディッシュ相当の細胞数、浮遊細胞では 3×10^6 個から 15×10^6 個の細胞数を処理することができます。
- 6cmディッシュでは8サンプル、10cmディッシュでは4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/QuickGene-800 (以下QG-810/QG-800) : 約15分 (DNase処理なしの場合)

QuickGene-Mini80 (以下QG-Mini80) : 約14分 (DNase処理なしの場合)

- 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、ノーザンブロッティング、マイクロアレイ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6cmディッシュの場合は96処理分(10cmディッシュの場合は48処理分)のtotal RNA分離用試薬が含まれています。

<input type="checkbox"/> Lysis Buffer	LRP	85ml
<input type="checkbox"/> Solubilization Buffer	SRP	40ml
<input type="checkbox"/> Wash Buffer	WRP	360ml
<input type="checkbox"/> Elution Buffer	CRP	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℃)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。

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)(LRPに添加して使用)
- 特級エタノール(>99%)(ライセート調製時およびWRP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 | (Life Technologies : Cat. No. 18068-015) |
| ・ DNase I, Amplification Grade | (Sigma-Aldrich : Cat. No. AMP-D1) |
| ・ Deoxyribonuclease (RT Grade) | (ニッポンジーン : Cat. No. 313-03161) |
| ・ DNase I, RNase-Free | (Life Technologies : Cat. No. AM2222) |
| ・ RNase-Free DNase Set | (QIAGEN : Cat. No. 79254) |

② 器具・機材

- QuickGene
- ボールミル型ホモジナイザー
(トミー精工製Micro Smash MS-100、またはキアゲン製TissueLyser)
- 未使用の遠沈管*1(大/小のセット)
- ホモジナイザーに対応したマイクロチューブ
トミー精工製MS-100用: トミーメディコ2mlチューブ(Cat. No. TM-625)*2
キアゲン製TissueLyser用: TreffLab製2.0mlクリックキャップ(Cat. No. 96.9329.9.01)
- ボール(ジルコニア5mmφ)
- 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)
- 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)
- 簡易卓上遠心機

*1 遠沈管は、QG-810/QG-800で、所定量の特級エタノールを添加したWRP、CRPを入れる容器として使用します。QG-Mini80をご使用の場合は不要です。

*2 滅菌済みチューブは強度が弱いので避けてください。

遠沈管の推奨品は、表1(p.6)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/QG-800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 (WRP用)	50ml コニカルチューブ (BDファルコンなど)
		小さい遠沈管 (CRP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 (WRP用)	175ml コニカルチューブ (BDファルコンなど)
		小さい遠沈管 (CRP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

◆ LRP (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保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は、水で十分に洗ってください。

◆ SRP (Solubilization 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。

◆ WRP (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。

◆ CRP (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。

◆ LRPは温度の高い場所での使用、保存は避けてください。

◆ LRP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、使用后廃棄する場合

感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用后廃棄する場合は、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、熔融、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、MSDS (製品安全データシート) を参照してください。MSDS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1処理あたりコンフルエントに培養された10cmディッシュに相当する細胞数を上限として対応しています。細胞数を必ずカウントし、表4 (p.11) の範囲内であることを確認してから使用してください。
- カートリッジに添加するサンプル量は各プロトコール (p.12 ~ 28) に応じて適切な量 (表4 p.11参照) を厳守してください。指定された量を超えてセットすると、目詰まりや収量の低下を引き起こす場合があります。
- 目詰まりした場合は、細胞数を減らして検討してください。
- 収量はサンプルの状態 (細胞の種類、培養状態、増殖のステージなど) により変動します。

◆ 試薬に関する注意事項

- LRP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

- 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。
- ホモジナイズを行う際、指定された回転数を超えて運転を行ったり、指定以外のマイクロチューブを使用すると、チューブが破損する場合があります。必ず指定された回転数およびマイクロチューブを使用してホモジナイズを行ってください。
- 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/QG-800をご使用の場合 : 8-3 (p.18)、付録1 (p.37)、付録2 (p.39)

QG-Mini80をご使用の場合 : 8-4 (p.23)

〈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

- キットロット間の性能差がないことを確認しています。
- QuickGene RNA cultured cell HC kit S (RC-S2) には、RNaseのコンタミネーションがないことを確認しています。
- total RNA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。また、RT-PCR増幅能があることを保証しています。

7. 製品説明

本キットは、培養細胞からのtotal RNAの分離に対応しています。total RNA回収例 (DNase処理あり) を表2に示します。

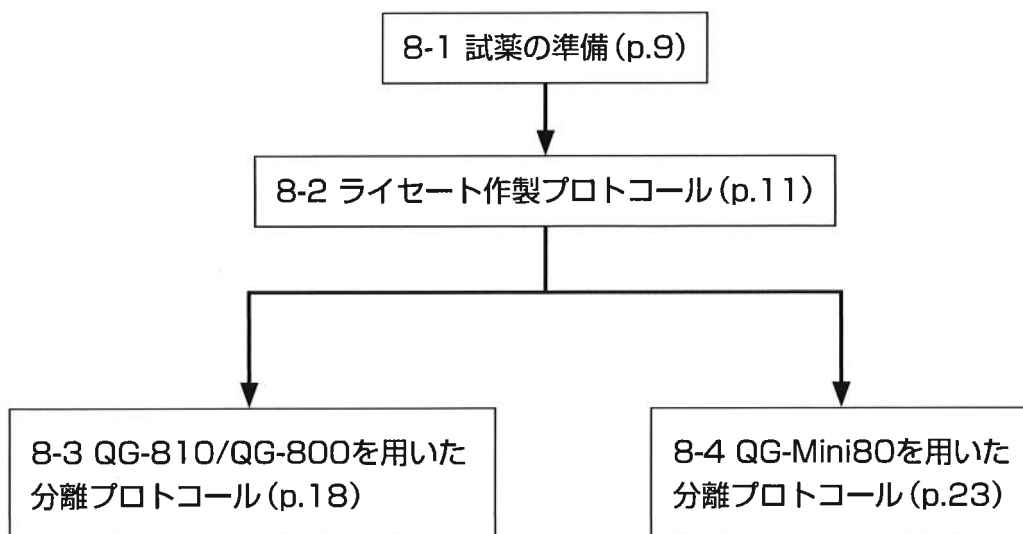
表2 ディッシュサイズと細胞数、および本キットで分離したtotal RNA収量
(トミー精工製Micro Smash MS-100にてホモジナイズ、DNase処理あり)

ディッシュ サイズ (浮遊細胞は 相当数)	接着細胞 ()内は細胞ベレットからの回収量								浮遊細胞	
	HeLa		HEK293		COS-7		NIH/3T3		HL60	
	細胞数 ($\times 10^6$ 個)	収量 (μg)	細胞数 ($\times 10^6$ 個)	収量 (μg)	細胞数 ($\times 10^6$ 個)	収量 (μg)	細胞数 ($\times 10^6$ 個)	収量 (μg)	細胞数 ($\times 10^6$ 個)	収量 (μg)
6cm	1.5 ~ 3.5	45 ~ 70	3.0 ~ 5.0	40 ~ 90	0.5 ~ 1.5	20 ~ 40	1.0 ~ 2.5	25 ~ 30	3.0 ~ 5.0	25 ~ 40
10cm	3.5 ~ 5.5	100 ~ 150 (80 ~ 120)	5.0 ~ 8.0	90 ~ 150	2.0 ~ 3.0	100 ~ 150 (60 ~ 90)	3.0 ~ 5.0	80 ~ 90	5.0 ~ 15	80 ~ 150
		8.0 ~ 15*	50 ~ 150							

※ 10cmディッシュで培養したHEK293細胞では、細胞数が 8×10^6 個未満の場合と 8×10^6 個以上の場合でプロトコールが異なります(表4 p.11参照)。

8. プロトコール

【Overview Flow Chart】



8-1 試薬の準備

◆LRP (85ml)

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で完全に溶解後、室温に戻してから使用してください。

使用前に必要量分注し、LRP 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。

◆SRP (40ml)

使用前に十分に混和してください。

◆WRP (360ml)

濃縮状態でお届けします。

使用前に、ボトルに40ml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。

◆CRP (100ml)

RNA溶出時には、必ずCRPを使用してください。

◆DNase溶液 (DNase処理をする場合)

分離プロトコール詳細 (8-3 <3> p.21、8-4 <3> p.26) 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。

◆WRP (特級エタノール添加済み) およびCRPの必要量 (QG-810/QG-800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、WRP、CRP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.6参照) に移し、QG-810/QG-800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 WRP、CRP必要量

カートリッジ数	WRP (QG-810/ QG-800)	CRP (QG-810)	CRP (QG-800)
8	26ml	9ml	8ml
16	44ml	11ml	11ml
24	62ml	13ml	13ml
32	80ml	15ml	15ml
40	99ml	17ml	17ml
48	117ml	19ml	19ml
56	135ml	21ml	21ml
64	154ml	22ml	22ml
72	172ml	24ml	24ml

※ディスチャージなどに必要な液量は

QG-810 : WRP 8.0ml、CRP 7.4ml

QG-800 : WRP 8.0ml、CRP 6.4mlです。

カートリッジ数に応じてWRP、CRPを加算してください。

1カートリッジあたりWRP 2.25ml、CRP 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、12.5mlのWRPとQG-810では7.5mlのCRP、QG-800では6.5mlのCRPが必要です。

※WRP、CRP用の遠沈管のサイズは表1 (p.6) 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、6cmから10cmディッシュ相当の細胞数からのRNA分離に対応しています。使用するプロトコールはディッシュサイズと細胞数によって異なります。表4を参照して最適なプロトコールを選んでください。

表4 プロトコール対応表

ディッシュサイズ	細胞の例		対応プロトコール	掲載ページ
	細胞種 ^{※1}	細胞数($\times 10^6$ 個)		
6cm	HeLa	1.5 ~ 3.5	A	12 ページ
	HEK293	3.0 ~ 5.0		
	COS-7	0.5 ~ 1.5		
	NIH/3T3	1.0 ~ 2.5		
	HL60	3.0 ~ 5.0 ^{※3}		
10cm	HeLa	3.5 ~ 5.5	B	14 ページ
	HEK293	5.0 ~ 8.0 ^{※2}		
	COS-7	2.0 ~ 3.0		
	NIH/3T3	3.0 ~ 5.0		
	HL60	5.0 ~ 15 ^{※3}		
	HEK293	8.0 ~ 15 ^{※2}	B'	16 ページ

※1：表4に記載のない細胞種から分離される場合は、6cmディッシュのサブコンフルエント相当の細胞数から分離を開始し、適切な細胞数を検討してください。細胞種によっては細胞数を増やすことが可能ですが、目詰まりを起こす可能性がありますので、過剰量の細胞数の処理は避けてください。

※2： 8.0×10^6 個を超える細胞数をディッシュ上で直接溶解する場合は、プロトコールB'を使用してください。ペレット化する場合は、 15×10^6 個までプロトコールBで処理できます。

※3：浮遊細胞の場合は各ディッシュサイズに相当する培養液量で培養した時の細胞数を示しています。

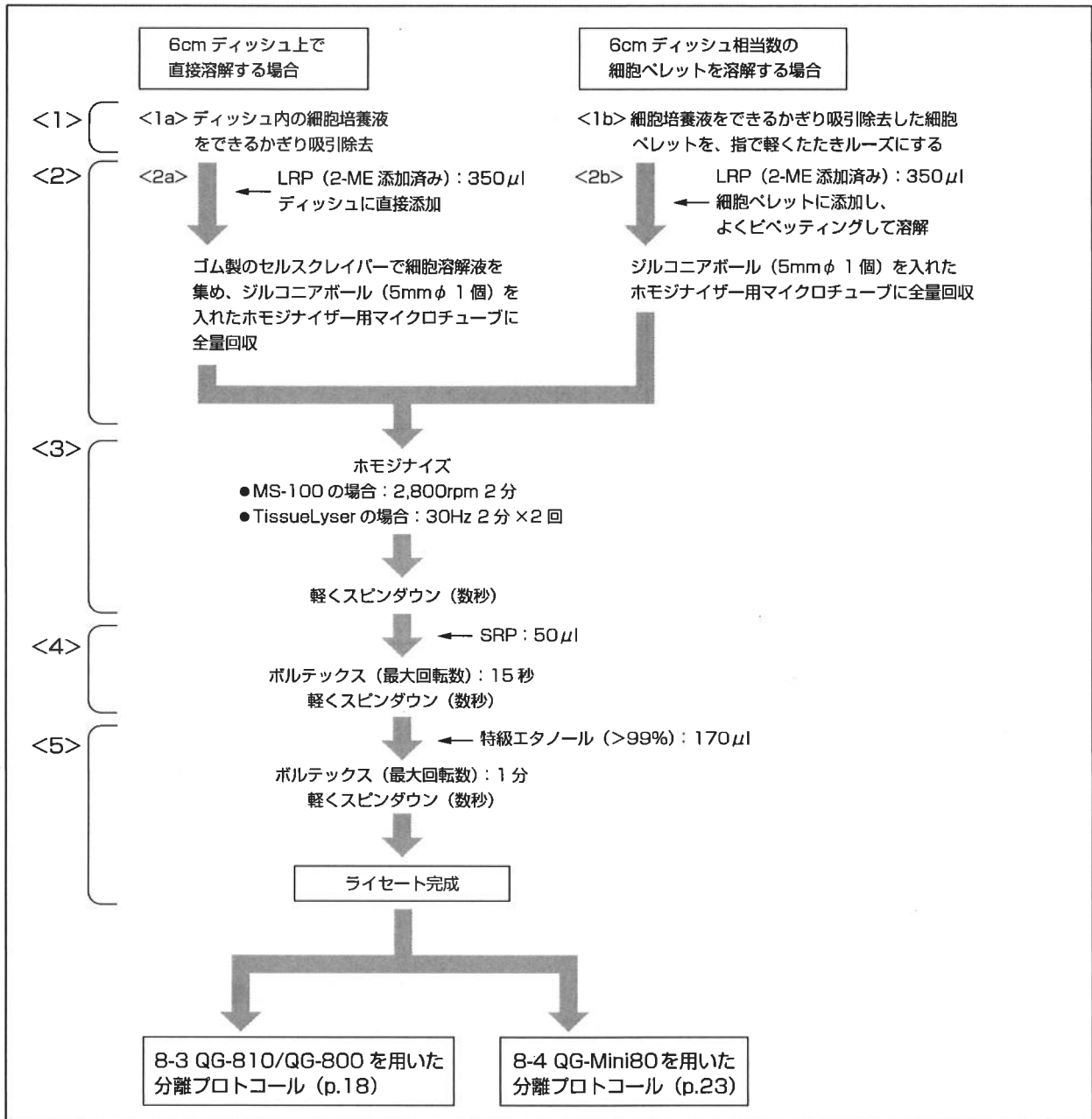
【分離を始める前の重要事項】

- 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、14、16) 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。
- LRP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】

- WRPIは濃縮状態でお届けします。分離を始める前に、必ず40ml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。

プロトコールA：ライセート作製フロー



プロトコールA：ライセート作製プロトコール詳細

6cmディッシュで培養した細胞からのtotal RNA分離プロトコールです。

本プロトコールで対応する細胞数の範囲は表4 (p.11) を参照してください。

細胞数をきちんとカウントしてください。適切な細胞数でない場合、顕著な収量減少、精度低下、または目詰まりを起こす可能性があります。目詰まりした場合は、細胞数を減らしてから検討してください。

<1> <1a> 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。

<1b> 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。300×gで5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

300×gで5分間遠心操作を行い、上清を捨て、細胞ペレットを必要に応じてPBSにて洗浄します。300×gで5分間遠心し、上清をできるだけ取り除き、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、-70℃以下で保存することも可能です。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。

<2> LRP (2-ME添加済み) を添加して細胞を溶解します。

<2a> ディッシュの場合

350μlのLRP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を表面からはがすとともによく混ぜ、細胞溶解液を各ホモジナイザーに対応したマイクロチューブに入れます。マイクロチューブには、5mmφのジルコニアボールを1個あらかじめ入れておきます。

<2b> 細胞ペレットの場合

350μlのLRPを添加します。数回ピペッティングを行った後、各ホモジナイザーに対応したマイクロチューブに、細胞溶解液を全量入れます。マイクロチューブには、5mmφのジルコニアボールを1個あらかじめ入れておきます。

<3> ホモジナイズは、下記の方法を用いて行うことができます。それぞれの装置の取扱説明書をよくお読みになり、ホモジナイズしてください。

● トミー精工製ホモジナイザー (Micro Smash MS-100) の場合

2,800rpmで2分間ホモジナイズ処理を行います。

● キアゲン製ホモジナイザー (TissueLyser) の場合

30Hzで2分間ホモジナイズ処理を2回行います。

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。

下記の場合はホモジナイズ用マイクロチューブが破損することがありますので、指定の条件を守って使用してください。

- ・ 指定された回転数を超えてホモジナイズを行う場合
- ・ プロトコール記載の液量とは異なる液量でホモジナイズを行う場合
- ・ 5mmφジルコニアボール以外のボールを使用する場合

<4> SRPを50μl添加し、最大回転数で15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。

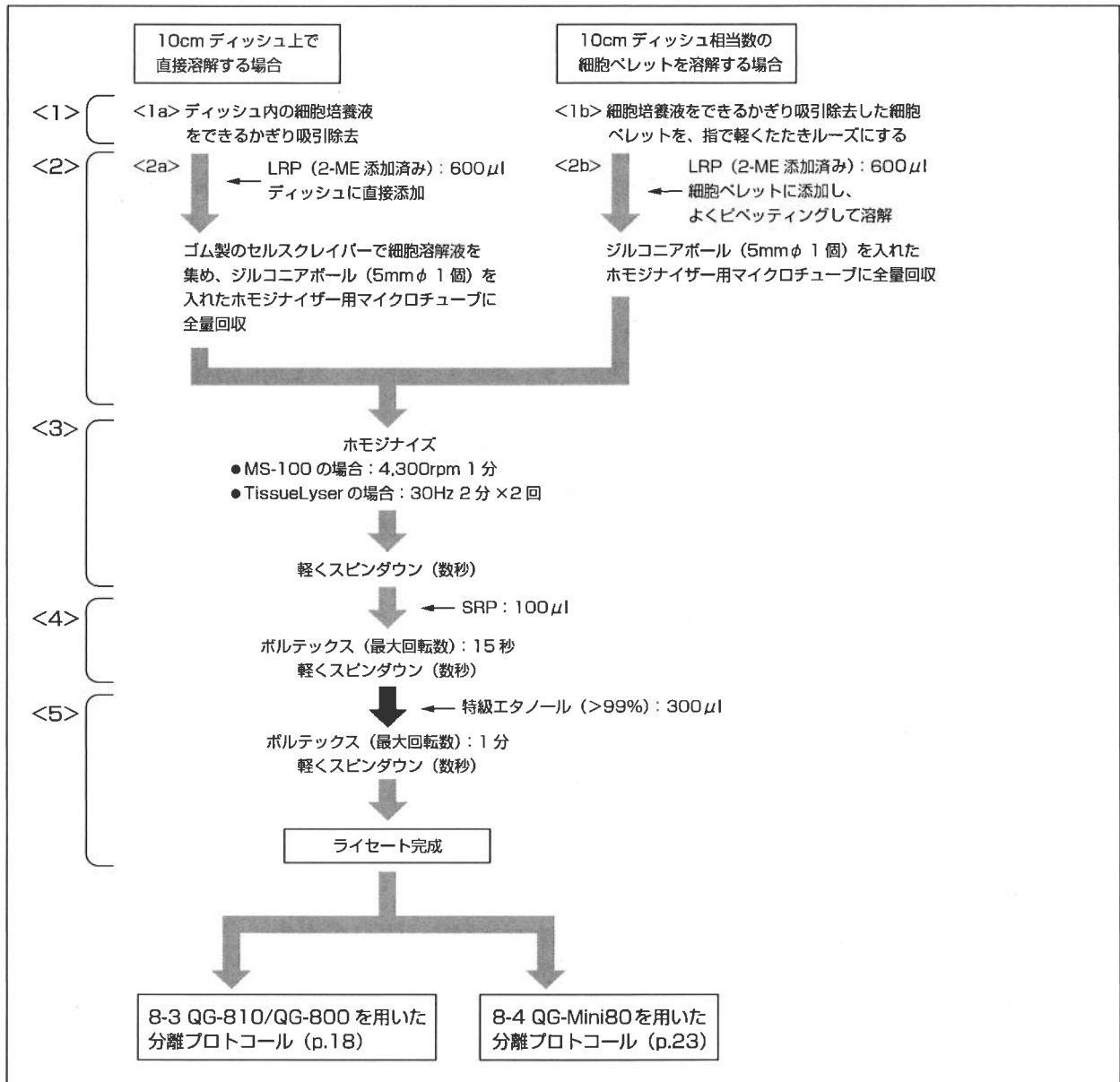
<5> 特級エタノール(>99%)を170μl添加し、最大回転数で1分間ボルテックスします。数秒間スピンドウンして、マイクロチューブの蓋や壁に付着した液を収集します(ライセート完成)。

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/QG-800を用いた分離プロトコール (p.18)

8-4 QG-Mini80を用いた分離プロトコール (p.23)

プロトコールB：ライセート作製フロー



プロトコールB：ライセート作製プロトコール詳細

10cmディッシュで培養した細胞からのtotal RNA分離プロトコールです。

本プロトコールで対応する細胞数の範囲は表4 (p.11) を参照してください。

細胞数をきちんとカウントしてください。適切な細胞数ではない場合、顕著な収量減少、精度低下、または目詰まりを起こす可能性があります。目詰まりした場合は、細胞数を減らしてから検討してください。

<1> <1a> 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。

<1b> 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。300×gで5分間遠心操作を行い、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

300×gで5分間遠心操作を行い、上清を捨て、細胞ペレットを必要に応じてPBSにて洗浄します。300×gで5分間遠心し、上清をできるだけ取り除き、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、-70℃以下で保存することも可能です。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。

<2> LRP (2-ME添加済み) を添加して細胞を溶解します。

<2a> ディッシュの場合

600μlのLRP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を表面からはがすとともによく混ぜ、細胞溶解液を各ホモジナイザーに対応したマイクロチューブに入れます。マイクロチューブには、5mmφのジルコニアボールを1個あらかじめ入れておきます。

<2b> 細胞ペレットの場合

600μlのLRPを添加します。数回ピペッティングを行った後、各ホモジナイザーに対応したマイクロチューブに、細胞溶解液を全量入れます。マイクロチューブには、5mmφのジルコニアボールを1個あらかじめ入れておきます。

<3> ホモジナイズは、下記の方法を用いて行うことができます。それぞれの装置の取扱説明書をよくお読みになり、ホモジナイズしてください。

● トミー精工製ホモジナイザー (Micro Smash MS-100) の場合

4,300rpmで1分間ホモジナイズ処理を行います。

● キアゲン製ホモジナイザー (TissueLyser) の場合

30Hzで2分間ホモジナイズ処理を2回行います。

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。

下記の場合はホモジナイズ用マイクロチューブが破損することがありますので、指定の条件を守って使用してください。

- ・ 指定された回転数を超えてホモジナイズを行う場合
- ・ プロトコール記載の液量とは異なる液量でホモジナイズを行う場合
- ・ 5mmφジルコニアボール以外のボールを使用する場合

<4> SRPを100μl添加し、最大回転数で15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。

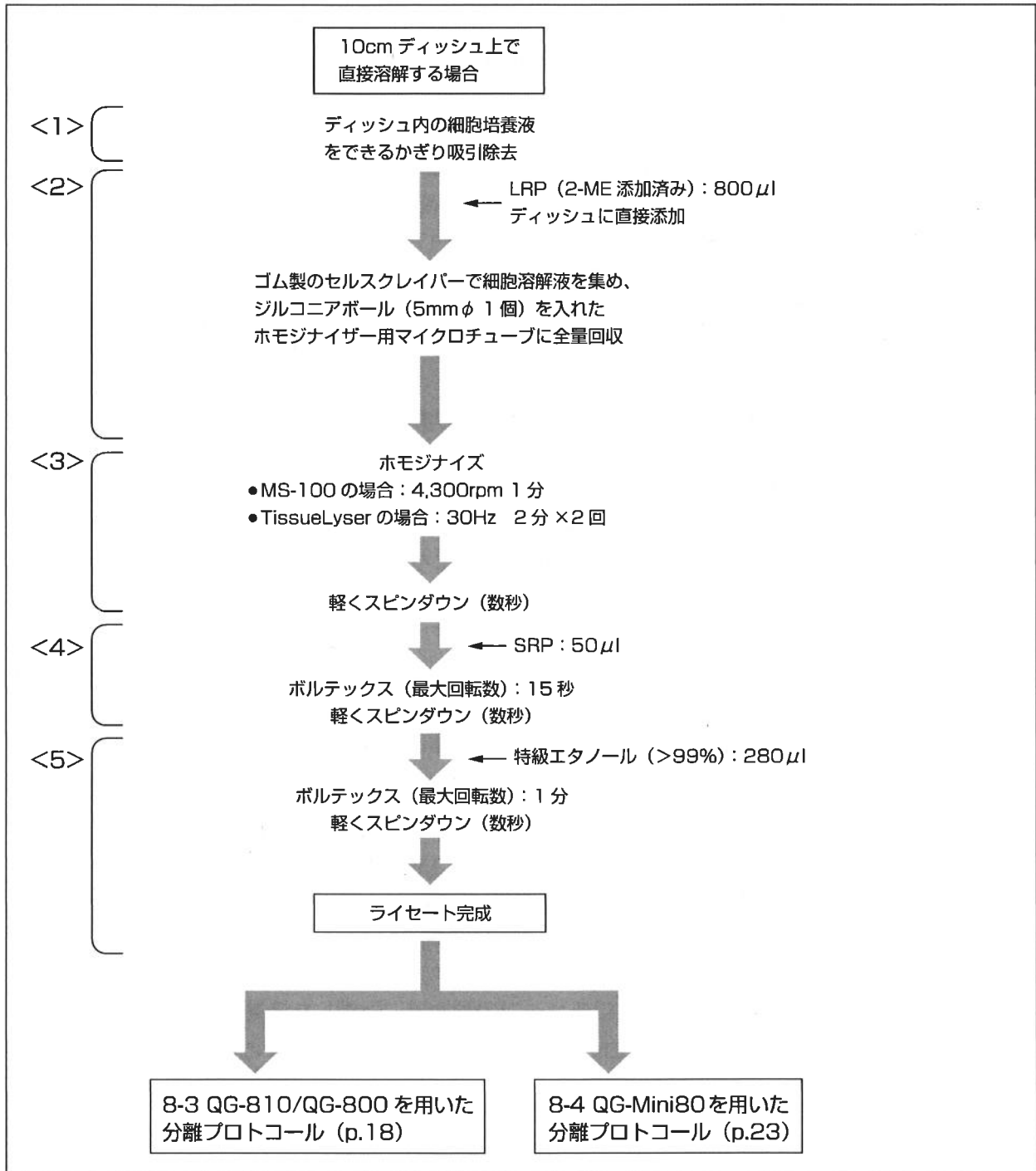
<5> 特級エタノール(>99%)を300μl添加し、最大回転数で1分間ボルテックスします。数秒間スピンドウンして、マイクロチューブの蓋や壁に付着した液を収集します(ライセート完成)。

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/QG-800を用いた分離プロトコール (p.18)

8-4 QG-Mini80を用いた分離プロトコール (p.23)

プロトコールB' : ライセート作製フロー



プロトコールB'：ライセート作製プロトコール詳細

プロトコールBを使用して、目詰まりを起こす場合に検討してください。この様な細胞種として、例えば、10cmディッシュで培養したHEK293 (8×10^6 個～ 15×10^6 個) などがあります。細胞をペレット化する場合は 8×10^6 個～ 15×10^6 個でもプロトコールB' は使わず、プロトコールBで処理してください。

<1> 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> 800 μ lのLRP (2-ME添加済み) 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を表面からはがすとともによく混ぜ、細胞溶解液を各ホモジナイザーに対応したマイクロチューブに入れます。マイクロチューブには、5mm ϕ のジルコニアボールを1個あらかじめ入れておきます。

<3> ホモジナイズは、下記の方法を用いて行うことができます。それぞれの装置の取扱説明書をよくお読みになり、ホモジナイズしてください。

- トミー精工製ホモジナイザー (Micro Smash MS-100) の場合
4,300rpmで1分間ホモジナイズ処理を行います。
- キアゲン製ホモジナイザー (TissueLyser) の場合
30Hzで2分間ホモジナイズ処理を2回行います。

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。

下記の場合はホモジナイズ用マイクロチューブが破損することがありますので、指定の条件を守って使用してください。

- ・ 指定された回転数を超えてホモジナイズを行う場合
- ・ プロトコール記載の液量とは異なる液量でホモジナイズを行う場合
- ・ 5mm ϕ ジルコニアボール以外のボールを使用する場合

<4> SRPを50 μ l添加し、最大回転数で15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。

<5> 特級エタノール (>99%) を280 μ l添加し、最大回転数で1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)。

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/QG-800を用いた分離プロトコール (p.18)

8-4 QG-Mini80を用いた分離プロトコール (p.23)

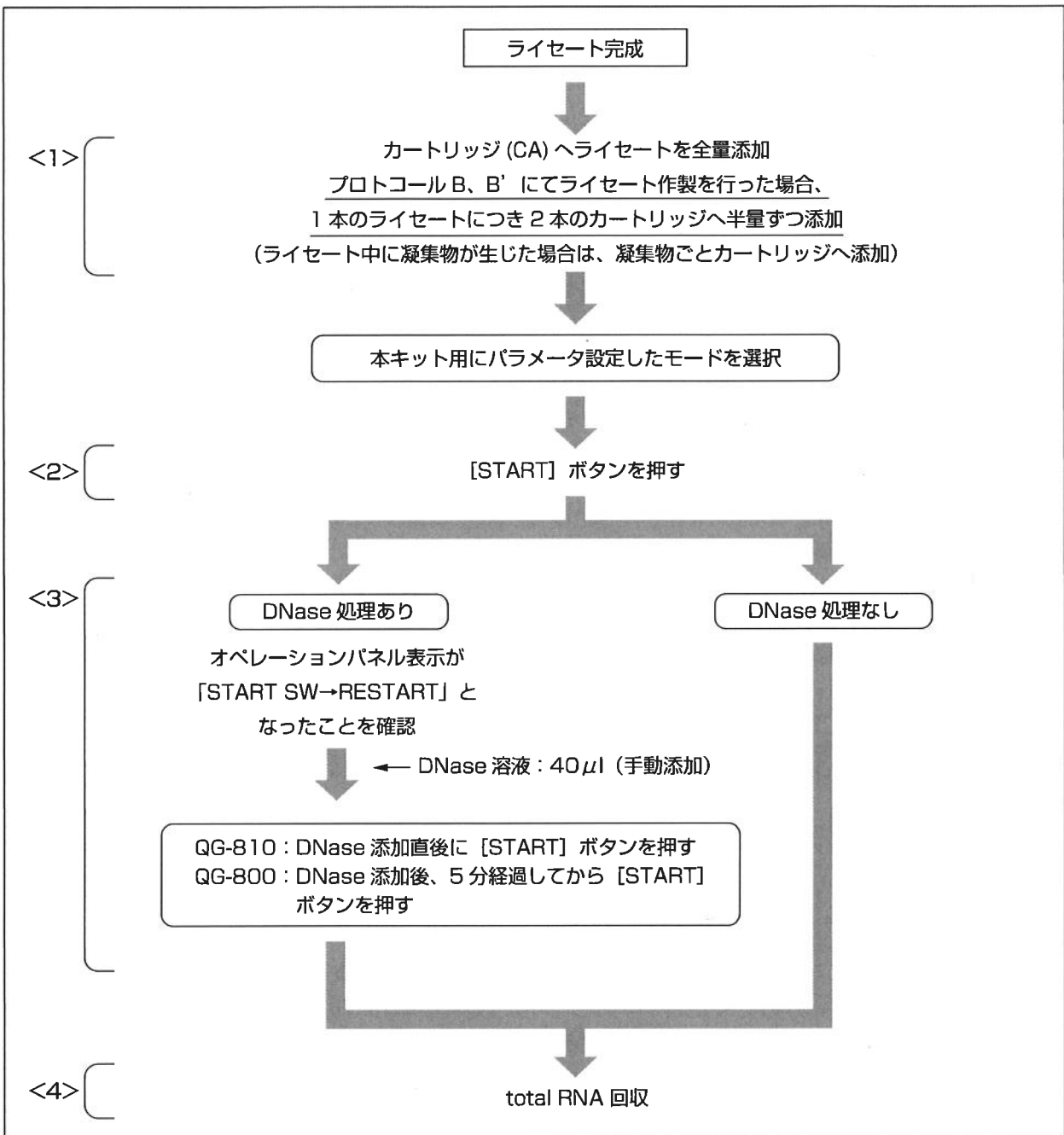
8-3 QG-810/QG-800を用いた分離プロトコール

- ご使用になる前にQG-810/QG-800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。
- WRPに40ml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 CELL PLUS」または「RNA CELL」モードを選択してください。(付録1 p.37参照)
- QG-800の分離モードは「RNA PLUS」または「RNA」モードを選択してください。(付録2 p.39参照)
- 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の方法、および各試薬のセット位置については、QG-810/QG-800の取扱説明書をお読みください。
- QG-810/QG-800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、WRP(特級エタノール添加済み)、CRPをQG-810/QG-800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WRP(特級エタノール添加済み)、CRP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。
- LRP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-810/QG-800分離フロー

* 付録1、2 (p.37、39) を参照して各パラメータの変更を行ってください。

* プロトコールB、B' にてライセート作製を行った場合、サンプル1個につきカートリッジ (CA) 2本使用します。



QG-810/QG-800分離プロトコール詳細

<1> <ライセート添加> プロトコールAにてライセート作製を行った場合、サンプル1個につきカートリッジ1本を、プロトコールB、B'にてライセート作製を行った場合、サンプル1個につきカートリッジ2本をQG-810/QG-800にセットします。

ライセートを数回ピペッティングし、プロトコールAのライセートの場合は1本のカートリッジへライセート全量を、プロトコールB、B'のライセートの場合は、2本のカートリッジへ半分ずつ添加します。

ピペッティングは充分に行ってください。特にプロトコールB、B'のライセートの場合、ライセートをカートリッジ2本に分けますので、ピペッティングが不十分ですと、収量の偏りや目詰まりを起こす可能性があります。

ライセート上部の泡は、カートリッジへ添加しないようにしてください。サンプル間のコンタミネーションを起こす可能性があります。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、凝集物ごとライセートを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、2 (p.37、39)を参照してください。QG-810/QG-800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)または「EXECUTING」(QG-800)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5で確認してください。

表5 分離中にフロントカバーを開けた場合の動作

	QG-810	QG-800
分離動作	停止	停止
分離継続	可能*1	不可*2

*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。

*2 QG-800: 使用した前処理サンプルは、再度使用することはできませんので廃棄処分してください。サンプルの廃棄に関しては、本書p.6「4. 取扱上の安全注意事項 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」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/40 μ l
DNase I, Amplification Grade	Life Technologies	18068-015		
DNase I, Amplification Grade	Sigma-Aldrich	AMP-D1		
Deoxyribonuclease (RT Grade)	ニッポンジーン	313-03161	2	40U/40 μ l
DNase I, RNase-Free	Life Technologies	AM2222		
RNase-Free DNase Set* ¹	QIAGEN	79254		
			3	3.4Kunitz units/40 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/ 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

調製方法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

調製方法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。

<3-2> DNaseオンカラム処理方法

QG-810/QG-800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。

いずれのDNase溶液の場合も、1カートリッジあたり40 μ l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。

QG-810をご使用の場合は<3-2a>、QG-800をご使用の場合は<3-2b>へ進んでください。

<3-2a> QG-810を使用する場合

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」に変わります)。5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.37 「WAS2 WAIT T」)。

<3-2b> QG-800を使用する場合

DNase溶液添加後、フロントカバーを閉め、室温で5分間カートリッジ上でインキュベートします。5分後 [START] ボタンを押し、分離動作を再開します (オペレーションパネルの表示が「EXECUTING」に変わります)。

- <4> <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6 分離結果

	QG-810	QG-800	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total RNA溶出量は、50 μlです。プロトコールB、B' の場合は、1個のサンプルにつき2本のコレクションチューブにtotal RNAが回収されますので、1本のコレクションチューブにまとめてください。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℃または-80℃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 (CA) も処分します。ディスプレイトレイの廃液も捨ててください。

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。
- WRPに40ml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WRP(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。
- CRP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。

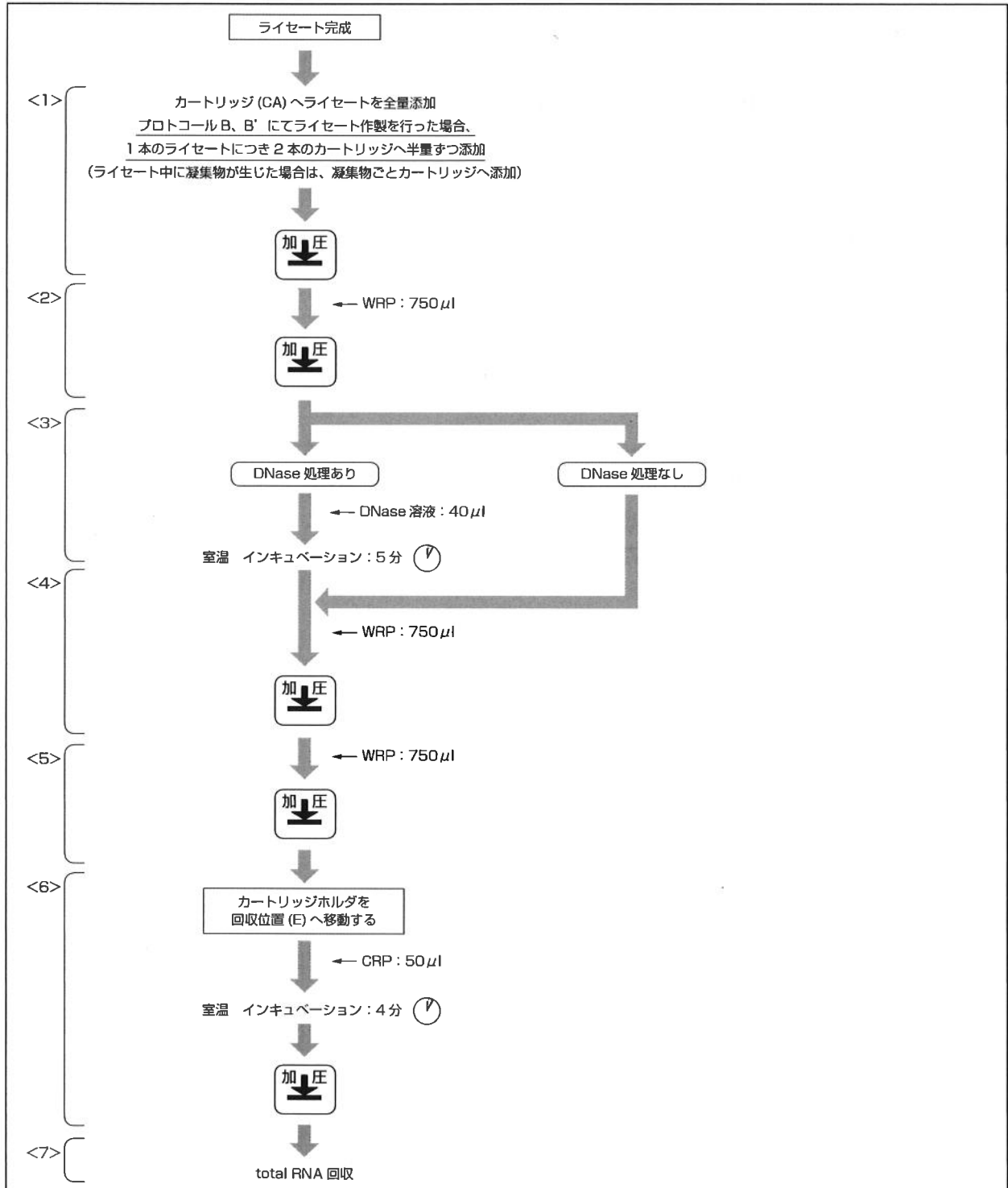
- 加圧操作を繰り返しても液が残っているカートリッジ(CA)がある場合はそのカートリッジだけを上へ引き抜き、トラブルシューティング((4) p.31)に従い別途処理を行ってください。

- 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。
- LRP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-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
- ※プロトコールB、B'にてライセート作製を行った場合、サンプル1個につきカートリッジ (CA) 2本使用します。



QG-Mini80分離プロトコール詳細

<1> <ライセート添加> プロトコールAにてライセート作製を行った場合、サンプル1個につきカートリッジ (CA) 1本を、プロトコールB、B'にてライセート作製を行った場合、サンプル1個につきカートリッジ2本をQG-Mini80にセットします。

ライセートを数回ピペッティングし、プロトコールAのライセートの場合は1本のカートリッジへライセート全量を、プロトコールB、B'のライセートの場合は、2本のカートリッジへ分量ずつ添加します。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ることを確認します。

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。

ピペッティングは充分に行ってください。特にプロトコールB、B'のライセートの場合、ライセートをカートリッジ2本に分けますので、ピペッティングが不十分ですと、収量の偏りや目詰まりを起こす可能性があります。

ライセート上部の泡は、カートリッジへ添加しないようにしてください。サンプル間のコンタミネーションを起こす可能性があります。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、凝集物ごとライセートをカートリッジへ添加します。

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、WRP 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。WRP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WRP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>に進んでください。
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/40 μ l
DNase I, Amplification Grade	Life Technologies	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	Life Technologies	AM2222	2	40U/40 μ l
RNase-Free DNase Set ^{※1}	QIAGEN	79254	3	3.4Kunitz units/40 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/ 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

調製方法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

調製方法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。

<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。いずれのDNase溶液の場合も、カートリッジ(CA)1本あたり40 μ l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-Mini80本体にセットし、室温で5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WRP(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> 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、WRP 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。WRP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。

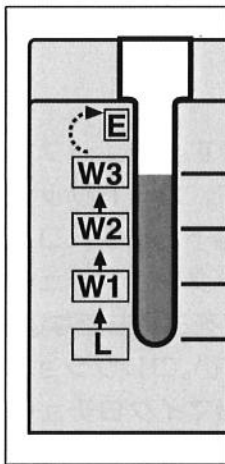
加圧はおよそ1分で自動的にストップします。加圧が自動的にストップした後もWRPがカートリッジ内に残っている場合は、加圧スイッチをいったん元の位置に戻し、再度加圧スイッチを手前に回して加圧を行ってください。

- <5> <洗浄3回目> 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、WRP 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。WRP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WRP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。

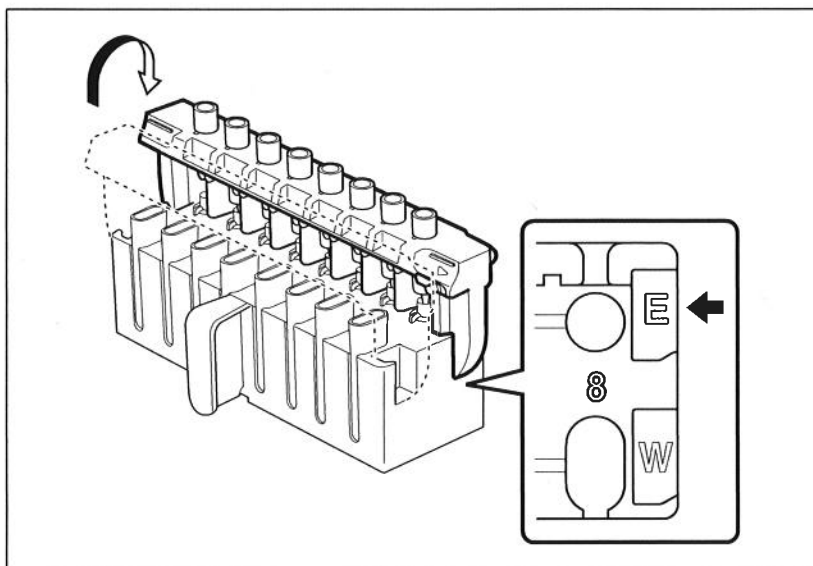
3回目のWRP加圧終了後、チューブホルダの廃液目盛りの廃液高さは「W3」の位置になります(下記イラスト参照)。

4回以上WRP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、ウェストチューブ(WT)から廃液があふれたりすることがあります。



<6> <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)。CRP 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。4分間室温でインキュベート後、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。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CRP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> 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。

プロトコールB、B' の場合は、1個のサンプルにつき2本のコレクションチューブにtotal RNAが回収されますので、1本のコレクションチューブにまとめてください。

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/QG-800をご使用の場合
(**): QG-Mini80をご使用の場合

(1) ホモジナイズチューブが破損した

原因	対策
指定回転数以上でホモジナイザーを使用した	指定された回転数で使用してください。
ホモジナイズ時の液量が足りない	所定量のLRPを細胞に添加し、全量をホモジナイズ用マイクロチューブに添加してください。
指定のボール以外のボールを使った	指定のボール(ジルコニア5mmφ)を1個使用してください。
指定のホモジナイズ用マイクロチューブ以外のマイクロチューブを使った	ホモジナイザーに対応したマイクロチューブを使用してください。

(2) RNAの収量が低い、RNAが得られない

原因	対策
ディッシュからの培養液除去が不十分	培養液が残っているとLRPの濃度が薄まり収量低下が生じる可能性があります。ディッシュから培養液をできるかぎり除去してください。
細胞数の範囲が不適切	細胞数のカウントを行い、表4(p.11)を参照して、適切な細胞数の範囲で分離を行ってください。細胞数が適用範囲よりも少ない場合は、QuickGene RNA cultured cell kit S (RC-S)を検討してください。
LRPに2-MEが添加されていない	LRPを使用前に必要量分注し、LRP1mlあたり10μl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融解後、充分にタッピングし、ペレットを完全にほぐしてください。
LRPに析出物が発生している	使用前にLRPに析出物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℃で溶解後、室温に戻してから使用してください。
LRP添加後のホモジナイズが不十分	ホモジナイザーの回転数、時間、ジルコニアボールの添加を確認してホモジナイズを行ってください。
SRPまたはエタノールを所定量添加していない	SRPまたは特級エタノール(>99%)を所定量添加してください。
WRPに所定量の特級エタノールを添加していない	WRP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に添加してください。
ライセートをカートリッジ(CA)2本に分ける際、均等に分けていない	ライセートをカートリッジに添加する時は十分にピペティングをし、分量ずつ添加してください。(プロトコールB、B'のみ)
必要以上の加圧を行った(**)	ライセートやWRPがカートリッジ(CA)からなくなったらすぐに加圧をやめてください。また、加圧時間を可能な限り一定にするために、試料量等を可能な限り統一することをお勧めします。

原因	対策
CRP量が不適切	QG-810/QG-800：パラメータが変更されているか確認してください。特にCRP量のパラメータ（「ELUT VOL」(QG-810)または「CLCT VOL」(QG-800)）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、ディスチャージを行って、ラインに気泡が残っていないことを確認してください。 パラメータの設定についてはQG-810/QG-800の取扱説明書も併せて参照してください。 QG-Mini80：CRP量が50 μ lであることを確認してください。
セット試薬の不足(*)	QG-810/QG-800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。
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溶液の調製時に、所定量のDNase反応バッファーを添加したことを確認してください。
DNase溶液を添加し、5分間インキュベーション後、WRPをカートリッジ(CA)に添加せずに加圧した(**)	DNase溶液を添加し、5分間インキュベーション後、WRPをカートリッジに添加してから加圧してください。
パラメータの「ELUT DIP TM (QG-810)」または「CLCT DIP TM (QG-800)」が「240」に変更されていない(*)	付録1、2(p.37、39)を参照して、「ELUT DIP TM (QG-810)」または「CLCT DIP TM (QG-800)」が「240」に変更されていることを確認してください。
CRPを添加後、インキュベーション時間を4分間とっていない(**)	CRPを添加後、4分間インキュベーションしてください。
古いWRPを使用した(*)	QG-810/QG-800に1日以上セットされたWRPは使用しないでください。
RNAの分解	(5)「RNAが分解した」参照
室温が高い	室温(15～28℃)で使用してください。
DNase溶液を添加時にフィルターに穴を空けてしまった (DNase処理を行う場合)	フィルターに触れないようにしてDNase溶液を添加してください。QG-810の場合、ホルダキャリッジを取り出し、背面側からチップの先端を確認しながらDNase溶液を添加してください。
カートリッジが目詰まりした (オペレーション表示 QG-810:ー、QG-800:×)(*)	「補足(p.34)」を参考に、カートリッジ(CA)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。
カートリッジ(CA)内の液が抜けた後放置した(**)	QG-Mini80で分離を始めたなら、途中で放置せずに最後まで続けてください。

(3) RNAの純度が低い

原因	対策
所定の洗浄条件で行っていない	QG-810/QG-800：付録1、2(p.37～41)を参照して、「WASH VOL1～5」および「WAS 2 VOL1～5」パラメータが「750」に変更されていることを確認してください。 QG-Mini80：WRP 750μlで洗浄を3回行ってください。
カートリッジ(CA)へのライセート添加時に泡立った	添加時に泡を入れると泡が最後まで残り、純度低下の原因になります。添加時に泡を入れないよう注意してください。
RNAの溶出にCRP以外の試薬を入れた	RNAの溶出にはCRPを使用してください。

(4) カートリッジ(CA)が詰まった

原因	対策
使用細胞数が多すぎる	表4(p.11)を参照して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融解後、充分にタッピングし、ペレットを完全にほぐしてください。
LRP添加後のホモジナイズが不十分	ホモジナイザーの回転数、時間、ジルコニアボールの添加を確認してホモジナイズを行ってください。
ライセート作製時、SRPまたはエタノールを所定量添加していない	SRPまたは特級エタノール(>99%)を所定量添加してください。ホモジナイズ工程などでロスした場合は、ホモジネート液量に合わせてSRP、特級エタノール液量を調節してください。
エタノール添加後のホモジナイズが不十分	特級エタノール(>99%)添加後は、最大回転数で充分にボルテックスしてください。
ライセートをカートリッジ(CA)2本に分ける際、均等に分けていない	ライセートをカートリッジに添加する時は充分にピペティングをし、分量ずつ添加してください。(プロトコールB、B'のみ)
カートリッジ(CA)の加圧時間が不充分(**)	再加圧してください。
QG-810/ QG-800：完了後の表示が「-(QG-810)または×(QG-800)」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WRPが残っている(*) QG-Mini80：加圧操作を繰り返してもライセートやWRPが抜けきらない(**)	「補足(p.34)」を参考に、カートリッジ(CA)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。
WRPに所定量の特級エタノールを添加していない	WRP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)内の液が抜けた後放置した(**)	QG-Mini80で分離を始めたら、途中で放置せずに最後まで続けてください。

(5) RNAが分解した

原因	対策
LRPに2-MEが添加されていない	LRPを使用前に必要量分注し、LRP 1mlあたり10μl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	すべての試薬、カートリッジ(CA)、コレクションチューブ(CT)およびキャップ(CAP)はRNaseフリーであることを確認済みですが、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。

(6) 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	DNase処理を行ってください。DNAの分解が不完全の場合は、(7)を参照してください。
RNAの分解	(5)「RNAが分解した」参照
所定の洗浄条件で行っていない	QG-810/QG-800：付録1、2(p.37～41)を参照して、「WASH VOL1～5」および「WAS2 VOL 1～5」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-Mini80：WRP 750μlで3回洗浄を行ってください。

(7) 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溶液を使用した	3-①(p.5)を参照して、推奨のDNase溶液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(CA)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：「WAS2 WAIT T」パラメータの設定値が「5」になっていることを確認してください。 QG-800またはQG-Mini80：室温(15～28℃)で5分間インキュベーションを行ってください。
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。

(8) 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℃で溶解後、室温に戻してから使用してください。

(9) 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
CRP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CRPをセットしてください。 また、QG-810/QG-800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。
CRP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、CRPを50 μ l 添加してください。
CRP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(**)	CRP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。

(10) 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。

補足：目詰まりしたカートリッジ(CA)からのRNAリカバリー方法

QG-810/QG-800の場合：

- <1> ライセートがカートリッジ(CA)に残っている場合
カートリッジ(CA)に残ったライセートを新しいカートリッジに移し、8-3 <1>(p.20)以降の操作を再度行ってください。
目詰まりしたカートリッジ(CA)のフィルターからのリカバリーは、下記1)以降を参照して行ってください。
- <2> WRPがカートリッジ(CA)に残っている場合
カートリッジ(CA)に残ったWRPを捨ててください。
目詰まりしたカートリッジ(CA)のフィルターからのリカバリーは、下記1)以降を参照して行ってください。

QG-Mini80の場合：

- <1> ライセート加圧工程で目詰まりした場合
カートリッジ(CA)に残ったライセートを新しいカートリッジに移し、8-4<1>(p.25)以降の操作を再度行ってください。
目詰まりしたカートリッジのフィルターからのリカバリーは下記1)以降を参照して行ってください。
- <2> WRP加圧工程で目詰まりした場合
カートリッジ(CA)に残ったWRPを捨ててください。
目詰まりしたカートリッジのフィルターからのリカバリーは下記1)以降を参照して行ってください。

【目詰まりしたカートリッジ(CA)からのRNAリカバリー方法】

- 1) あらかじめ、1.5mlマイクロチューブに以下の液量のLRP(2-ME添加済み)を分取しておきます。リカバリーの際のプロトコールも、ライセート作製時に選択したプロトコールと同じものを選択してください。
プロトコールA 350 μ l
プロトコールB 300 μ l
プロトコールB' 400 μ l
- 2) 耳鼻科用ピンセットまたは先曲り先細ピンセットを準備します。
ピンセット先をバーナーで炙るか、RNase除去剤で拭くなどして、RNaseのコンタミネーションには十分に注意してください。
- 3) 図1、2を参考に、ピンセットの先でフィルターの外周を押さえつけながら、フィルターをカートリッジ(CA)より外してください。
- 4) 取り外したフィルターを1)で準備した1.5mlマイクロチューブ中のLRP(2-ME添加済み)に浸漬し、10分間室温にてインキュベーションします。
- 5) 最大回転数で1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。
- 6) フィルターを取り出し、残った溶液に対して、プロトコールに応じて以下の液量のSRPを添加します。
プロトコールA 50 μ l
プロトコールB 50 μ l
プロトコールB' 25 μ l
- 7) 最大回転数で15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。
- 8) 特級エタノール(>99%)をプロトコールに応じて以下の量添加します。

プロトコールA 170 μ l

プロトコールB 150 μ l

プロトコールB' 140 μ l

9) 最大回転数で1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。

10) いずれのプロトコールの場合も、カートリッジ (CA) 1本に9) の処理によって調製した溶液を全量添加し、p.20またはp.25の<1>以降の分離操作を行ってください。

図1 ピンセットをカートリッジ (CA) に入れた様子

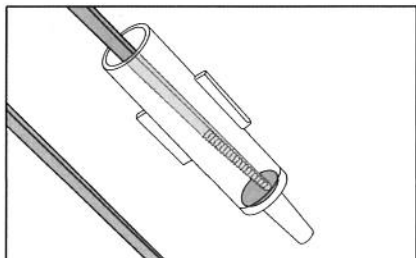
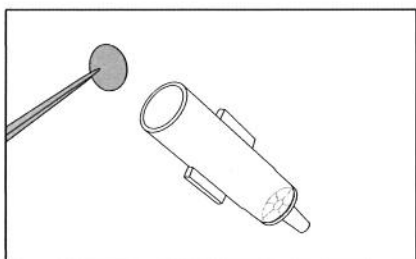


図2 フィルターを取り外したところ



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SII	PL-S2

付録1 QG-810パラメータについて

QG-810をご使用の方は、「RNA CELL PLUS」または「RNA CELL」モードのパラメータを変更する必要があります。下表のとおりパラメータを変更してください。

QG-810取扱説明書も併せて参照してください。

※ 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 CELL PLUS (DNase処理あり)			RNA CELL (DNase処理なし)		
		パラメータ	ユーザー 確認欄	モード 初期値	パラメータ	ユーザー 確認欄	モード 初期値
1	BIND PEAK	120		120	120		120
2	WASH COUNT	1		1	3		3
3	WASH PEAK	110		110	110		110
4	WASH VOL1	750		500	750		500
5	WASH VOL2	750		500	750		500
6	WASH VOL3	750		500	750		500
7	WASH VOL4	750		500	750		500
8	WASH VOL5	750		500	750		500
9	WASH DIP TM	150		150	150		150
10	WAS2 WAIT T	5		5	0		0
11	WAS2 COUNT	2		2	0		0
12	WAS2 PEAK	110		110	110		110
13	WAS2 VOL1	750		500	750		500
14	WAS2 VOL2	750		500	750		500
15	WAS2 VOL3	750		500	750		500
16	WAS2 VOL4	750		500	750		500
17	WAS2 VOL5	750		500	750		500
18	ELUT VOL	50		100	50		100
19	ELUT PEAK	100		100	100		100
20	ELUT DIP TM	240		30	240		30

<パラメータ変更方法>

1. [MODE] ボタンにて分離モード「RNA CELL PLUS」または「RNA CELL」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 CELL

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 (CRP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「100」から「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 CELL

操作待ち状態に戻ります。

付録2 QG-800パラメータについて

QG-800をご使用の方は、「RNA PLUS」「RNA」モードを本キット用モードとしてお使いください。「ISOLATE B」「ISOLATE A」モードを本キット用モードとして使用することもできます。その際、下表のとおりパラメータを変更する必要があります。QG-800取扱説明書も併せて参照してください。

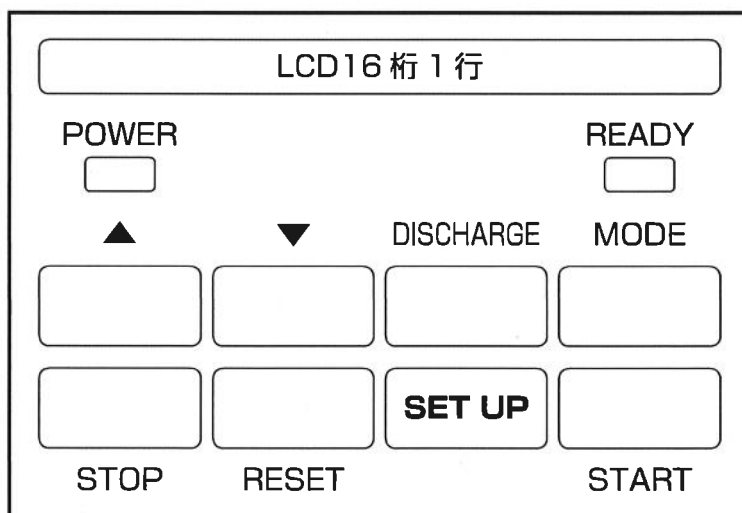
※グレーの行は初期値から変更不要な項目です。

表示順	動作項目	DNase処理あり				DNase処理なし			
		パラメータ	ユーザー 確認欄	「RNA PLUS」 モード 初期値	「ISOLATE B」モード 初期値	パラメータ	ユーザー 確認欄	「RNA」 モード 初期値	「ISOLATE A」モード 初期値
1	SAMP SPEED	10		10	10	10		10	10
2	SAMP PEAK	120		120	120	120		120	120
3	SAMP UP TIME	10		10	10	10		10	10
4	SAMP RETRY	160		160	160	160		160	160
5	SAMP LOWER	75		75	75	75		75	75
6	SAMP DOWN TM	25		25	25	25		25	25
7	SAMP R DN T	50		50	50	50		50	50
8	SAMP FALL	50		50	50	50		50	50
9	WASH COUNT	1		1	3	3		3	3
10	WASH SPEED	3		3	3	3		3	3
11	WASH PEAK	110		110	110	110		110	110
12	WASH UP TIME	10		10	10	10		10	10
13	WASH RETRY	140		140	140	140		140	140
14	WASH LOWER	70		70	70	70		70	70
15	WASH DOWN TM	15		15	15	15		15	15
16	WASH R DN T	50		50	50	50		50	50
17	WASH FALL	50		50	50	50		50	50
18	WASH VOL1	750		500	750	750		500	750
19	WASH VOL2	750		500	750	750		500	750
20	WASH VOL3	750		500	750	750		500	750
21	WASH VOL4	750		500	750	750		500	750
22	WASH VOL5	750		500	750	750		500	750
23	WASH DIP TM	150		150	0	150		150	0
24	WAS2 COUNT	2		2	0	0		0	0
25	WAS2 SPEED	3		3	3	3		3	3
26	WAS2 PEAK	110		110	110	110		110	110
27	WAS2 UP TIME	10		10	10	10		10	10
28	WAS2 RETRY	140		140	140	140		140	140
29	WAS2 LOWER	70		70	70	70		70	70
30	WAS2 DOWN TM	15		15	15	15		15	15
31	WAS2 R DN T	50		50	50	50		50	50
32	WAS2 FALL	50		50	50	50		50	50
33	WAS2 VOL1	750		500	750	750		500	750
34	WAS2 VOL2	750		500	750	750		500	750
35	WAS2 VOL3	750		500	750	750		500	750
36	WAS2 VOL4	750		500	750	750		500	750
37	WAS2 VOL5	750		500	750	750		500	750
38	CLCT VOL	50		100	200	50		100	200
39	CLCT COUNT	1		1	1	1		1	1
40	CLCT SPEED	5		5	5	5		5	5
41	CLCT PEAK	120		120	120	120		120	120
42	CLCT UP TIME	20		20	20	20		20	20
43	CLCT RETRY	160		160	140	160		160	140
44	CLCT LOWER	65		65	65	65		65	65
45	CLCT DOWN TM	15		15	15	15		15	15
46	CLCT R DN T	50		50	50	50		50	50
47	CLCT FALL	50		50	50	50		50	50
48	CLCT DIP TM	240		30	0	240		30	0

<設定を変更するとき>

1. 「MAINTE MODE」の変更

- ① [START] ボタンと [▼] ボタンを押したまま電源をONにします。
- ② オペレーションパネルに「TP MODE」が表示されてから [START] ボタンと [▼] ボタンをはなします。
- ③ オペレーションパネルに「TP00 : SENSOR TEST」と表示されるので [▲] または [▼] ボタンではじめの「0」を「F」に変更します。続いて [MODE] ボタンを押し、次の「0」を「B」に変更します。最終的に「TPFB」とします。
- ④ 以上の操作で表示は「TPFB : SETUP MENU」となります。
- ⑤ [START] ボタンを押し「MENU : USER MODE」とした後、[▲] ボタンを押し「MENU : MAINTE MODE」とします。
- ⑥ 「MENU : MAINTE MODE」と表示したままで、[RESET] ボタンと [SET UP] ボタン ([RESET] ボタンと [START] ボタンの間の名称非表示ボタン) を同時に押します。やや時間を置いてREADYランプが3回点滅したら電源を切り、再度電源をONにします。
- ⑦ 電源をONにします。「MODE」ボタンを押し、パラメータ変更を行うモードを表示させます (例えば「ISOLATE A」)。
- ⑧ この状態で [SET UP] ボタン ([RESET] ボタンと [START] ボタンの間の名称非表示ボタン) を押すと「SETUP START」と表示され、約1秒後に現在のモード状態 (例えば「ISOLATE A」) を表示し、さらに約1秒後にパラメータの最初の項目とその現在の設定値が表示されます。末尾の「*」は現在設定されている値を示します。

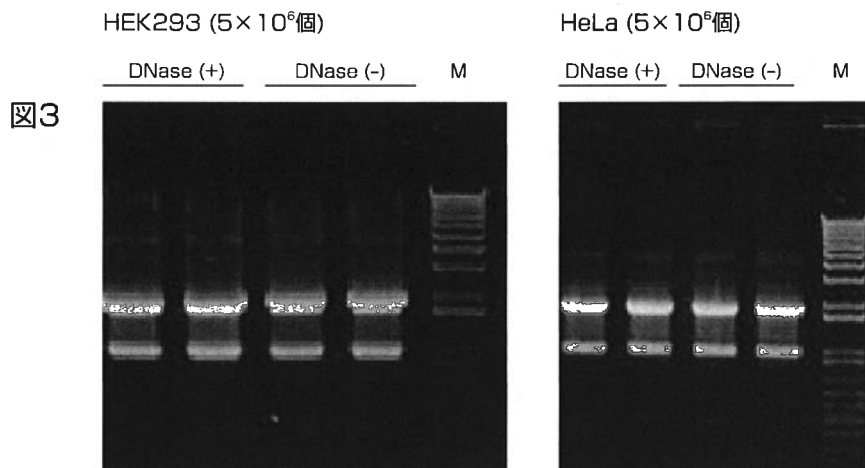


-
2. [MODE] ボタンを必要回数押して変更したい項目を表示させます。
1つ前の項目に戻りたいときは、[DISCHARGE] ボタンを押します。
最後の項目まで行くと最初の項目に戻ります。
表 (p.39) を参照して「パラメータ」の欄にあるパラメータ値への変更を行ってください。
 3. [▲] または [▼] ボタンを押して設定値を変更します。
[▲] ボタンは設定値アップ、[▼] ボタンは設定値ダウンです。
[▲] または [▼] ボタンを押し続けると連続して設定値が変化します。
最大設定値から設定値アップすると最小設定値になります。最小設定値から設定値ダウンすると最大設定値になります。
 4. 続けて他の項目を変更するときは2、3を繰り返します。
 5. [SET UP] ボタン ([RESET] ボタンと [START] ボタンの間の名称非表示ボタン) を押します。
オペレーションパネルに「SETUP WRITING」と約1秒間表示され設定した内容が記憶されます。
オペレーションパネルに「SETUP FINISH」と約1秒間表示され通常の操作待ち状態に戻ります。
※セットアップ中に設定した内容をキャンセルして終了するには、[STOP] ボタンを押します。電源を切断することによっても設定した内容をキャンセルすることができます。
 6. 「USER MODE」へ戻す
 - ① 電源を切ります。
 - ② 1-①～1-④の操作を行います。
 - ③ [START] ボタンを押し「MENU : MAINT MODE」とした後、[▼] ボタンを押し「MENU : USER MODE」とします。
 - ④ 「MENU : USER MODE」と表示したままで、[RESET] ボタンと [SET UP] ボタン ([RESET] ボタンと [START] ボタンの間の名称非表示ボタン) を同時に押します。やや時間を置いてREADYランプが3回点滅します。
 - ⑤ 一旦電源を切り、再度電源をONにします。電源をONにすると指定されたモード名 (例えば「ISOLATE A」) が表示され、通常の操作待ち状態になります。
※ この操作をしないと通常の操作待ち状態にはならず、分離を行うことができません。

付録3 QuickGene RNA cultured cell HC kit S (RC-S2) データ例

● total RNAの電気泳動 (非変性ゲル電気泳動)

図3は本キットを用いて各種培養細胞から分離したtotal RNAの電気泳動結果です。



M: マーカー (1Kb Plus DNA Ladder: Life Technologies社製)
泳動条件: 1% Agarose/1×TAE

● RT-PCR

図4は本キットを用いて分離したtotal RNA (DNase処理あり) を希釈 (10pg/μl または 1pg/μl) し、β-actin mRNAをターゲットに下記条件でRT-PCRを行った結果です。

<RT条件>

テンプレート: 各 total RNA 500ng
酵素: SuperScript II (Invitrogen社製)

<PCR条件>

テンプレート: cDNA (10pg/μl または 1pg/μl total RNA 相当分)
プライマー: β-actinプライマー
酵素: Takara Taq Hot Start Version (TaKaRa社製)

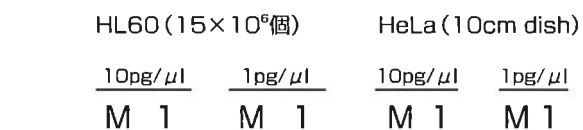


図4

番号	サンプル
1	本キットで分離したtotal RNA

M: マーカー (100bp DNA Ladder: Life Technologies社製)
泳動条件: 1% Agarose/1×TAE

1pg/μl total RNA相当のcDNAを用いて、β-actinの増幅が確認できました。

***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。

 **KURABO**

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/>

