

RNA培養細胞キット

**QuickGene RNA cultured cell kit S
(RC-S)**

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	19
8-5 QG-Mini480を用いた分離プロトコール	25
9. トラブルシューティング	31
10. オーダリング・インフォメーション	37
付録 QG-810パラメータについて	38

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、簡便に培養細胞からtotal RNA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17分 (DNase処理なしの場合)
QuickGene-Mini80 (以下QG-Mini80) : 約16分 (DNase処理なしの場合)
- 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60分
- 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、ノーザンブロット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	LRC	75ml
<input type="checkbox"/> Wash Buffer	WRC	210ml
<input type="checkbox"/> Elution Buffer	CRC	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。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

- 2-メルカプトエタノール (2-ME) (LRC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WRCの調製に使用)

※必要に応じて用意していただく試薬

- 滅菌済みPBS (凍結細胞再分散用)
- DNase

[推奨品]

- ・ RQ1 RNase-Free DNase (Promega : Cat. No. M6101)
- ・ DNase I, Amplification Grade (Thermo Fisher Scientific : 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 (Thermo Fisher Scientific : Cat. No. AM2222)
- ・ RNase-Free DNase Set (QIAGEN : Cat. No. 79254)

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 (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 (5,000×g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WRC、CRC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 (WRC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 (CRC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 (WRC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 (CRC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

◆ LRC (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。
- 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。

◆ WRC (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。

◆ CRC (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。

◆ LRCは温度の高い場所での使用、保存は避けてください。

◆ LRC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。

◆ 感染性的おそれのあるサンプルを使用する場合

感染性的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。

◆ 感染性的おそれのあるサンプルを使用し、使用後廃棄する場合

感染性的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、1処理あたり培養細胞 1×10^6 個を上限としております。指定された細胞数を超えて分離すると、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

- LRC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。

◆ 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。
- 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.38)
 - QG-Mini80をご使用の場合：8-4 (p.19)
 - QG-Mini480をご使用の場合：8-5 (p.25)
- 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℃にて16時間以上乾熱滅菌した後、使用してください。

◆ その他の注意事項

- 回収されたtotal RNAの非変性ゲル電気泳動を行う場合、高分子側のバンドにテーリングが生じる場合がありますが、RNAの品質上問題はありません。

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 kit S (RC-S) 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

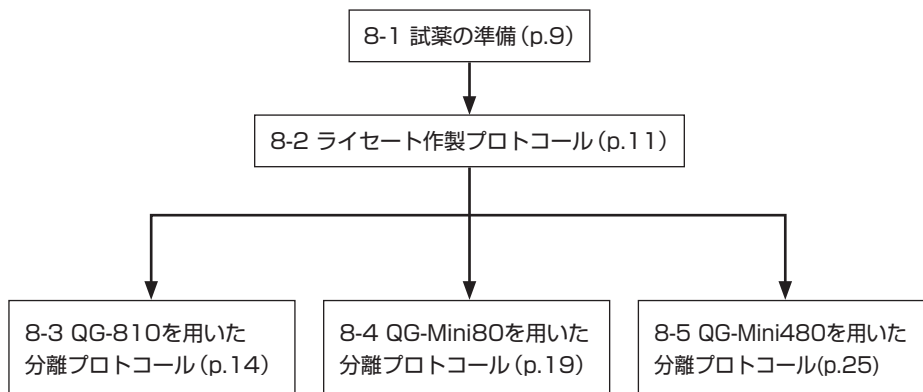
本キットは、培養細胞 (最大 1×10^6 個) からのtotal RNAの分離・精製に対応しています。培養細胞 1×10^6 個あたりのtotal RNAの収量および純度例を表2に示します。

表2 浮遊細胞 (HL60, 1×10^6 個) に対する本キットでのtotal RNA分離例

	DNase処理あり	DNase処理なし
収量 (μg)	9.7	11.7
A260/280	1.94	1.90
A260/230	2.08	2.18

8. プロトコール

[Overview Flow Chart]



8-1 試薬の準備

◆LRC (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℃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520μl使用します)。分注し、LRC 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。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。

◆WRC (210ml)

濃縮状態でお届けします。

使用前に、ボトルに90ml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。

◆CRC (100ml)

RNA溶出時には、必ずCRCを使用してください。

◆DNase溶液 (DNase処理をする場合)

各分離プロトコール詳細 (<3>p.17、p.22、p.28)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。

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

カートリッジ数	WRC (QG-810)	CRC (QG-810)
8	20ml	9ml
16	32ml	11ml
24	44ml	13ml
32	56ml	15ml
40	69ml	17ml
48	81ml	19ml
56	93ml	21ml
64	106ml	22ml
72	118ml	24ml

※ディスチャージなどに必要な液量は以下です。

QG-810 : WRC 8.0ml、CRC 7.4ml

カートリッジ数に応じてWRC、CRCを加算してください。

1カートリッジあたりWRC 1.5ml、CRC 100 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WRCとQG-810では7.6mlのCRCが必要です。

※WRC、CRC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処理あたり培養細胞 1×10^6 個を上限として対応しています。

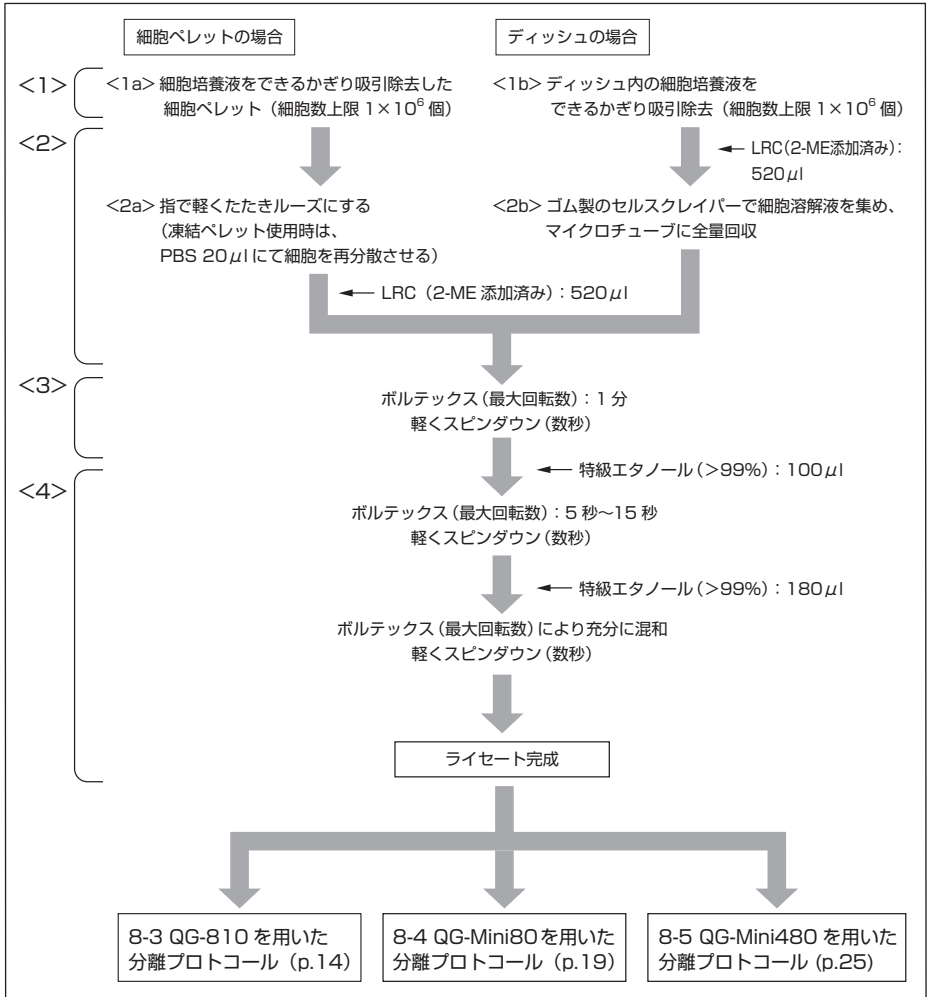
【分離を始める前の重要事項】

- 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。
- LRC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】

- WRCは濃縮状態でお届けします。分離を始める前に、必ず90ml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> 細胞数をきちんとカウントしてください。

細胞数が多すぎた場合、顕著な収量減少・精度低下・場合によっては目詰まりが起きます。また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。

<1a> 細胞ペレットの場合

- 接着細胞からペレットを作製する場合

フラスコ、またはディッシュから細胞をトリプシン処理によりはがし細胞数をカウントしてください。室温にて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

室温にて300×gで5分間遠心操作を行い、上清を捨て、細胞のペレットを必要に応じてPBSにて洗浄します。室温にて300×gで再度5分間遠心操作を行い、上清をできるだけ取り除きます。

細胞ペレットは、後で使用するために細胞回収後速やかに液体窒素中で急速凍結し、-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。

<1b> ディッシュの場合

細胞培養液はフラスコまたはディッシュから可能な限り吸引除去してください。

<2> LRCを添加して細胞を溶解します。

LRCには用時調製で2-MEを添加してください(p.9参照)。

<2a> 細胞ペレットの場合

細胞ペレットの入ったマイクロチューブを指で軽くたたくこと(タッピング)で細胞をルーズにした後、520μlのLRCを添加します。

凍結ペレット使用時はペレットにPBS 20μl程度を添加し、タッピングにより細胞を再分散後、LRCを添加してください。

<2b> ディッシュの場合

520μlのLRCをフラスコまたはディッシュに添加し、セルスクレイパーなどで細胞とLRCをよく混ぜ、マイクロチューブに細胞溶解液を回収します。

<3> 最大回転数で1分間ボルテックスしてホモジナイズします。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。

<4> 特級エタノール(>99%)を100μl添加し、最大回転数で5秒から15秒程度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。さらにエタノールを180μl添加し、ボルテックスにより充分に混和します。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)

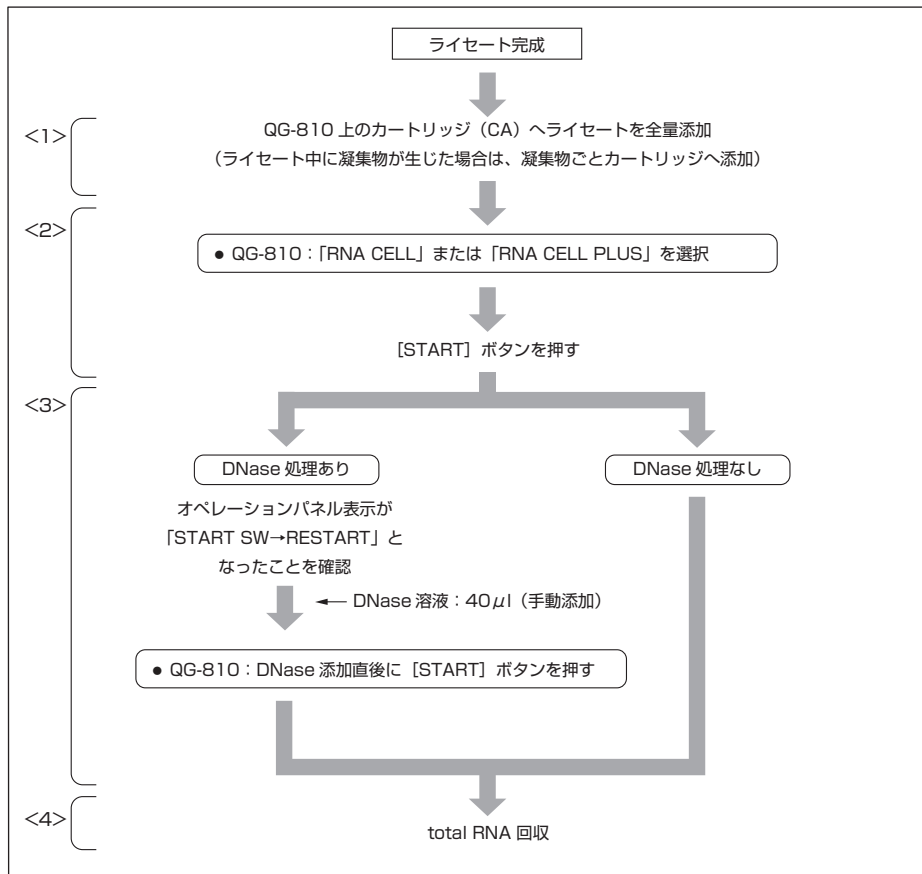
8-4 QG-Mini80を用いた分離プロトコール(p.19)

8-5 QG-Mini480を用いた分離プロトコール(p.25)

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。
- WRCに90ml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」または「RNA CELL PLUS」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(CA)を使用してください。
- p.10を参考に、WRC(特級エタノール添加済み)、CRC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WRC、CRC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。
- LRC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.38) 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*

* 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> <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	Thermo Fisher Scientific	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	Thermo Fisher Scientific	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。

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、5分後に自動的に分離動作が再開されます。

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 p.38「WAS2 WAIT T」)。

<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total RNA溶出量は、100 μ lです。

すぐにtotal RNAを使用しない場合は、キャップをしっかりと閉めた後、-20 $^{\circ}$ Cまたは-80 $^{\circ}$ 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(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。

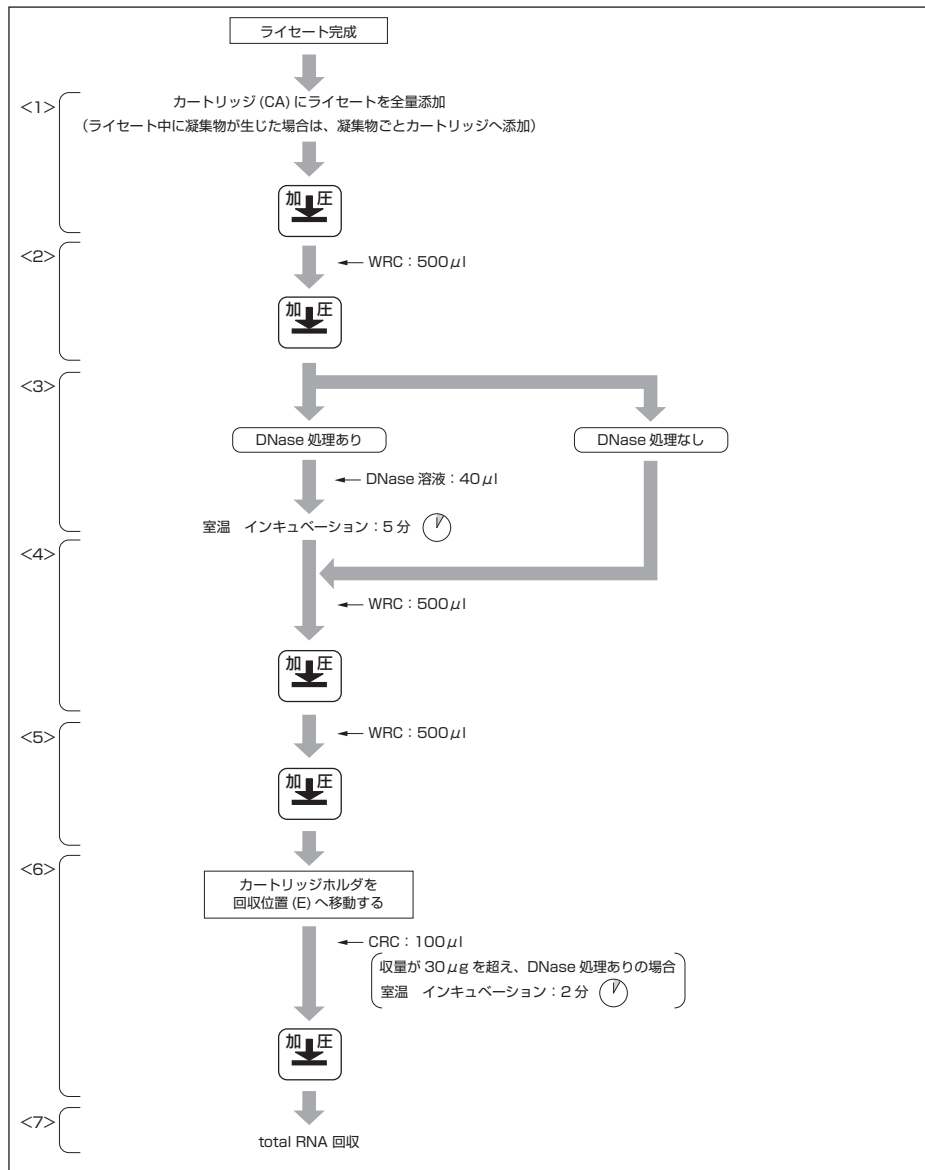
8-4 QG-Mini80を用いた分離プロトコール

- 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。
- WRCに90ml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ストチューブ(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WRC(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。
- CRC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。
- LRC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。
- 感染性的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-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。

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、WRC 500 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。WRC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WRC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	Thermo Fisher Scientific	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	Thermo Fisher Scientific	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WRC(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、WRC 500 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。WRC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。

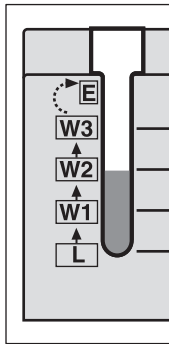
加圧はおよそ1分で自動的にストップします。加圧が自動的にストップした後もWRCがカートリッジ内に残っている場合は、加圧スイッチをいったん元の位置に戻し、再度加圧スイッチを手前に回して加圧を行ってください。

<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、WRC 500 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。WRC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WRC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。

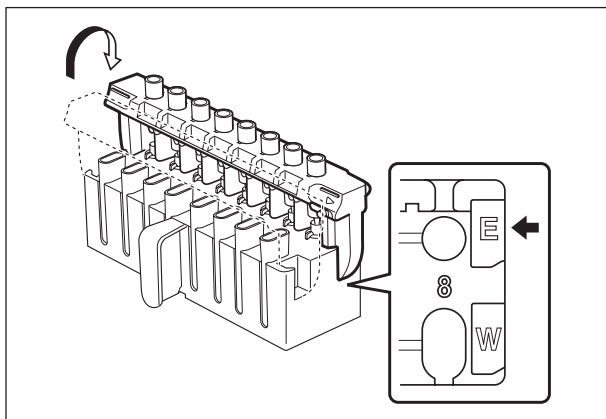
3回目のWRC加圧終了後、チューブホルダの廃液目盛りの廃液高さは「W3」ではなく「W2」の位置になります(下記イラスト参照)。

4回以上WRC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。



<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)。CRC 100 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。DNase処理を行い、収量が30 μ gを超えることが予測される場合には、2分間のインキュベーションを行います。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。CRC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CRC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。ウェストチューブ(WT)と廃液を規定に従って捨ててください。

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。

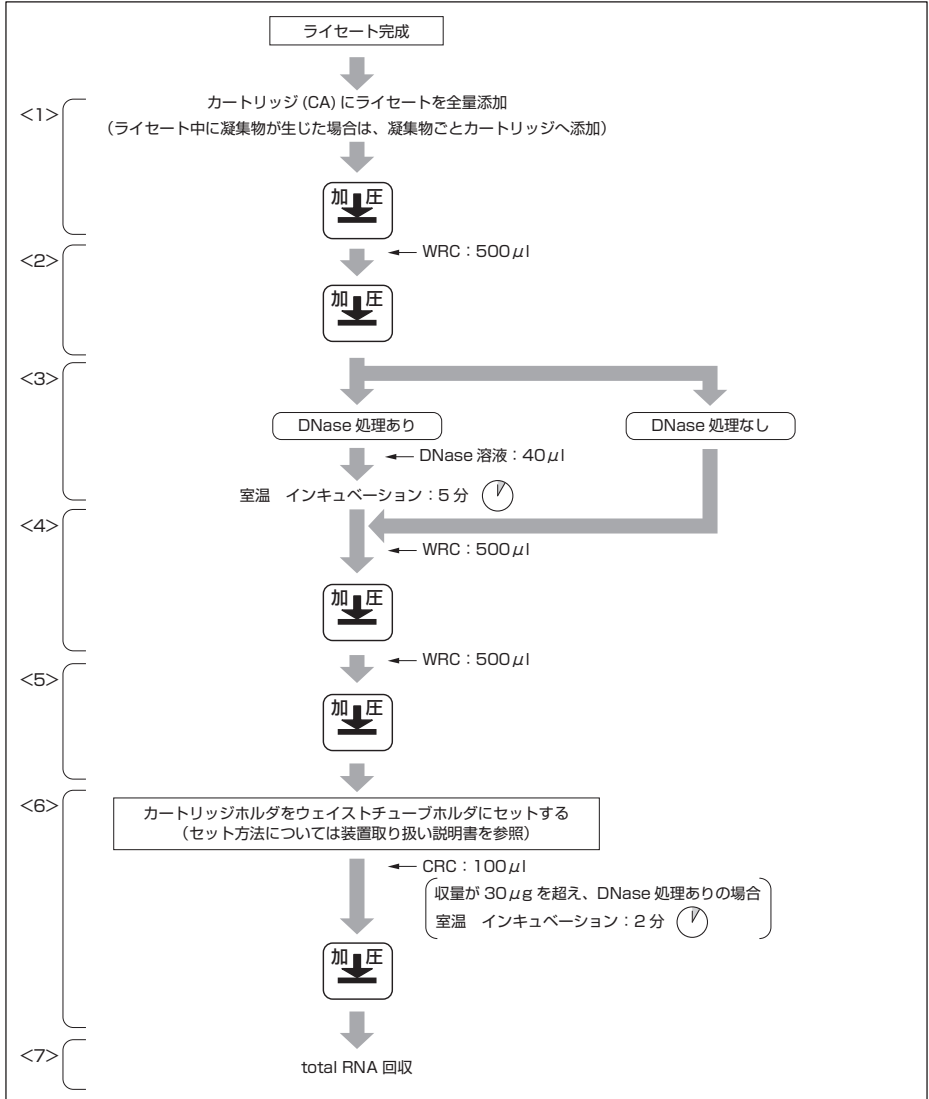
8-5 QG-Mini480を用いた分離プロトコール

- 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。
- WRCに90ml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にセットしてください。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。
- 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 ((3)、p.32)に従い別途処理を行ってください。
- 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。
- LRC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 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.11)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、WRC 500 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。WRC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WRC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/40μl
DNase I, Amplification Grade	Thermo Fisher Scientific	18068-015		
DNase I, Amplification Grade	Sigma-Aldrich	AMP-D1		
Deoxyribonuclease (RT Grade)	ニッポンジーン	313-03161	2	40U/40μl
DNase I, RNase-Free	Thermo Fisher Scientific	AM2222		
RNase-Free DNase Set*1	QIAGEN	79254	3	3.4Kunitz units/40μl

※1：1,500Kunitz unitsの入ったボトルに添付のRNaseフリー水を550μl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	20μl
10×Reaction Buffer	4μl
ヌクレアーゼフリー水	16μl

調製方法2)

2U/μl DNase I	20μl
10×Reaction Buffer	4μl
ヌクレアーゼフリー水	16μl

調製方法3)

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

※2：QIAGEN社プロトコルどおりに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40μl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WRC(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、WRC 500 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-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。WRC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WRC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、WRC 500 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-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。WRC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WRC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回以上WRC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。

- <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。

CRC 100 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。収量が30 μ gを超えることが予測される場合には、2分間のインキュベーションを行います。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。CRC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CRC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(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。

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) RNAの収量が低い、RNAが得られない

原因	対策
フラスコまたは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LRCの濃度が薄まり収量低下が生じる可能性があります。フラスコまたは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、適切な細胞数の範囲で分離を行ってください。
LRCに2-MEが添加されていない	LRCを使用前に必要量分注し、LRC 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。
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、PBSを20 μ l添加し、十分にタッピングし、ペレットを完全にほぐしてください。
LRCに析出物が発生している	使用前にLRCに析出物など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℃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。
LRC添加後のホモジナイズが不十分	最大回転数で1分間ボルテックスしてください。
WRCに所定量の特級エタノールを添加していない	WRC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。
CRC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CRC量のパラメータ([ELUT VOL])が間違っていないこと([100]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-Mini80/QG-Mini480: CRC量が100 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、WRC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、WRCをカートリッジに添加してから加圧してください。
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。
CRCを添加後、インキュベーション時間を2分間とっていない(**)	DNase処理を行い、収量が30 μ gを超える場合には、カートリッジ(CA)にCRCを添加後、2分間のインキュベーションを行ってください。

原因	対策
CRCのインキュベーション時間が短い(**)	本プロトコルでは、DNase処理を行い、収量が30 μ gを超える場合を除き、CRCのインキュベーション時間を設けておりませんが、CRCのインキュベーション時間を長くすることで、収量が増加する場合があります。
CRC添加量が多い(**)	添加するCRCの液量を減らすことでRNAの濃度を上げることができます。ただし、RNAの収量は減ります。この収量減は、CRC添加後のインキュベーション時間を長くすることで、軽減できる場合があります。
RNAの分解	(4)「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。

(2) RNAの純度が低い

原因	対策
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。
所定の洗浄条件で行っていない(**)	洗浄はWRC(特級エタノール添加済み) 500 μ lで3回行ってください。
RNAの溶出にCRC以外の液を使用した	溶出時にはCRCを使用してください。
使用細胞数が多すぎる	細胞数を減らしてください。

(3) 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	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溶解後、20 μ lのPBS加えて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。
WRCに所定量の特級エタノールを添加していない	WRC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)
LRC添加後のホモジナイズが不十分	最大回転数で1分間ボルテックスしてください。
特級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、充分に最大回転数でボルテックスしてください。
ボルテックスが不十分	本キットではLRC添加後のボルテックスは1分間を推奨しておりますが、ボルテックスをより長く行うことで目詰まりを改善できる場合があります。エタノール添加後のボルテックスも同様の効果があります。ただし、RNA収量などの分離性能が低下する場合があります。
加圧時間が足りない(**)	もう一度、70秒間加圧してください。
QG-810: 完了後の表示が「- (QG-810)」となっているもしくはカートリッジにライセートまたはWRC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WRC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、RNAのリカバリーを試してください。

(4) RNAが分解した

原因	対策
LRCに2-MEが添加されていない	LRCを使用前に必要量分注し、LRC 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。

(5) 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 (「RNA CELL PLUS」(QG-810) モード) によってDNase処理を行ってください。DNAの分解が不完全の場合は、(6) を参照してください。
RNAの分解	(4) 「RNAが分解した」参照
所定の洗浄条件で行っていない (**)	洗浄はWRC (特級エタノール添加済み) 500μlで3回行ってください。

(6) DNAの分解が不完全 (DNase処理ありの場合)

原因	対策
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-Mini80/QG-Mini480の場合、室温 (15~28℃) で5分インキュベーションを行ってください。QG-810の場合、「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。
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。

(7) 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。

(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
CRC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CRC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。
CRC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、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CRCを100 μ l添加してください。
CRC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(**)	CRC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。

(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。

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.15) 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> WRCがカートリッジ (CA) に残っている場合
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3) 以降を参照して行ってください。

QG-Mini80/QG-Mini480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、QG-Mini80は8-4<1> (p.21)、QG-Mini480は8-5<1> (p.27) 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> WRC加圧工程で目詰まりした場合
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3) 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】

上記<1>の場合は下記1) 以降、上記<2>の場合は下記3) 以降を参照してください。

準備：耳鼻科用ピンセットまたは先曲り先細ピンセット

- 1) 目詰まりしたカートリッジ内に残ったライセートを除去します。
- 2) WRC500 μ l をカートリッジに添加し、数回ゆっくりピペティングします。
- 3) カートリッジ内のWRCをピペットで吸うかデカンテーションして除去します。
- 4) あらかじめ、1.5mlマイクロチューブに200 μ l のCRCを分取しておきます。
- 5) 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充分にお気をつけください。
- 6) 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。
- 7) 取り外したフィルターを4) で準備した1.5mlマイクロチューブ中のCRCに浸漬し、65°Cで10分間インキュベーションします。
- 8) 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。
- 9) 8) の溶液を別の1.5mlマイクロチューブに移し、320 μ l のLRC (2-ME添加済み) を添加します。
- 10) 最大回転数にてボルテックスを1分間行った後、数秒間スピンドウンを行います。
- 11) 特級エタノール (>99%) を100 μ l 添加します。
- 12) 最大回転数にてボルテックスを10秒間行った後、数秒間スピンドウンを行います。
- 13) 特級エタノール (>99%) を180 μ l 添加します。
- 14) 最大回転数にてボルテックスを5秒間行った後、数秒間スピンドウンを行います。

-
- 15) カートリッジ (CA) 1本に14) の処理によって調製した溶液を全量添加し、以下の分離操作を行ってください。
8-3 (p.15)、8-4 (p.21) または8-5 (p.27) の< 1 >以降

図1 ピンセットをカートリッジ (CA) に入れた様子

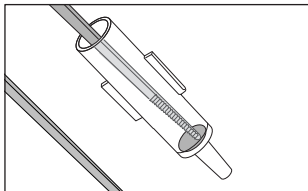
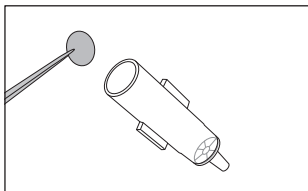


図2 フィルターを取り外したところ



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、「RNA CELL PLUS」または「RNA CELL」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	
		RNA CELL PLUS (DNase処理あり)	RNA CELL (DNase処理なし)
1	BIND PEAK	120	120
2	WASH COUNT	1	3
3	WASH PEAK	110	110
4	WASH VOL1	500	500
5	WASH VOL2	500	500
6	WASH VOL3	500	500
7	WASH VOL4	500	500
8	WASH VOL5	500	500
9	WASH DIP TM	150	150
10	WAS2 WAIT T	5	0
11	WAS2 COUNT	2	0
12	WAS2 PEAK	110	110
13	WASH VOL1	500	500
14	WASH VOL2	500	500
15	WASH VOL3	500	500
16	WASH VOL4	500	500
17	WASH VOL5	500	500
18	ELUT VOL	100	100
19	ELUT PEAK	100	100
20	ELUT DIP TM	30	30

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障されています。



●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/>

RC-S_HB-J_V60