

RNA組織キットⅡ
QuickGene RNA tissue kit SⅡ
(RT-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	10
7. 製品説明	11
8. プロトコール	11
【Overview Flow Chart】	11
8-1 試薬の準備	12
8-2 ライセート作製プロトコール	14
8-3 QG-810/QG-800を用いた分離プロトコール	21
8-4 QG-Mini80を用いた分離プロトコール	26
9. トラブルシューティング	32
10. オーダリング・インフォメーション	38
付録1 QG-810パラメータについて	39
付録2 QG-800パラメータについて	41
付録3 QuickGene RNA tissue kit S II (RT-S2) データ例	44

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、簡便に動物組織(5 ~ 30mg)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/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10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、ノーザンブロットティングなどのアプリケーションに適しています。

QuickGeneを用いて分離を行う際は、各装置の取扱説明書をよくお読みください。

2. キット内容物と保存条件

2-1 キット内容物

以下の内容物が入っていますので確認してください。

キットには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	LRT	85ml
<input type="checkbox"/> Solubilization Buffer	SRT	40ml
<input type="checkbox"/> Wash Buffer	WRT	120ml
<input type="checkbox"/> Elution Buffer	CRT	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。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) (LRT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WRT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)
- ・ 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
- 未使用の遠沈管*1 (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)
- ホモジナイザー：下記3種類のホモジナイザーが使用可能です。
 - a. 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)
 - b. Rotor-Statorホモジナイザー
(KINEMATICA AG製 : Polytron PT3100など)
 - c. マイクロチューブ用ペッスルホモジナイザー*2
(KIMBLE KONTES製PELLET PESTLE with tube 1.5ml Cat.No. 749520-0090
PELLET PESTLE Cordless Motor Cat.No.749540-0000など)
- ホモジナイザーに対応したチューブ
 - a. ボールミル型ホモジナイザーの場合
トミー精工製Micro Smash MS-100用 : トミーメディコ 2mlチューブ (Cat. No.TM-625)*3
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)
 - b. Rotor-Statorホモジナイザーの場合
2mlチューブなど
 - c. マイクロチューブ用ペッスルホモジナイザーの場合
ペッスル添付の1.5mlチューブなど
- ボール (ジルコニア5mmφ) : ボールミル型ホモジナイザーの場合
- マイクロ遠心機 (17,000×g (15,000rpm) 程度の遠心が可能なもの)
 - *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WRT、CRT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 専用モーターを使用してください。
 - *3 滅菌済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で使用の場合)

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(WRT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(CRT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(WRT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(CRT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

◆ LRT (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。
● 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。

◆ SRT (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。

◆ WRT (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。

◆ CRT (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。

◆ LRTは、温度の高い場所での使用、保存は避けてください。

◆ LRT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、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量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、基本的に動物組織5～30mgからのtotal RNA分離・精製に対応しています。

表2 ホモジナイザー種によるマウス正常組織 処理可能最大組織量
Balb/cマウス(メス、7週齢) 正常組織での例です。

組織	ボールミル	Rotor-Stator	ベッスル
肝臓	30mg	15mg	15mg
脳	40mg	40mg	20mg
肺	30mg	15mg	15mg
腎臓	30mg	5mg	×
脾臓	30mg	20mg	10mg
胸腺	30mg*	5mg	5mg
心臓	30mg*	5mg	×

×：適用できません

※ 胸腺・心臓の場合は、他の組織と比べてホモジナイズ条件を強くする必要があります。例えばトミー精工製Micro Smash MS-100の場合は、ホモジナイズ時間を長くしないと、最悪の場合目詰まりのおそれがあります(表5 p.16参照)。

- 本キットで初めて分離されるサンプルの場合は、組織量10mgから分離をスタートし、予備実験を行ってください。
- 組織サンプルをホモジナイズする前に、表2を参考に、サンプル処理量を必ず確認してください。
- 表2に示した処理可能量を超えた組織量をオーバーロードしてしまうと、性能が顕著に低下し、最悪の場合カートリッジ(CA)が目詰まりを起こす可能性があります。
- 処理可能組織量は、組織の状態、部位、ホモジナイズ条件などにより変動します。組織状態、部位、ホモジナイズ条件によっては処理可能組織量が30mg未満となることもあります。
- 動物から採取した新鮮な組織、または凍結保存組織(-80℃)を使用します。組織を凍結保存する際は、液体窒素で急速に凍結させ、直ちに-80℃にて保管してください。
- 凍結組織を使用する場合は、組織が融けないうちに速やかに所定量をはかりとってください。
- 凍結組織を室温に放置したり、一度融解したものは使用しないでください。

- 図1にマウス正常組織(肝臓、肺)の重量とサイズの対応例を実寸大で示します。組織重量を確認し、重量に応じたプロトコルを用いて分離を行ってください。
(15~30mg : p.15、5~15mg : p.18)

図1：マウス正常組織(肝臓、肺)の重量とサイズの対応例
Balb/cマウス(メス、7週齢)正常組織での例です。

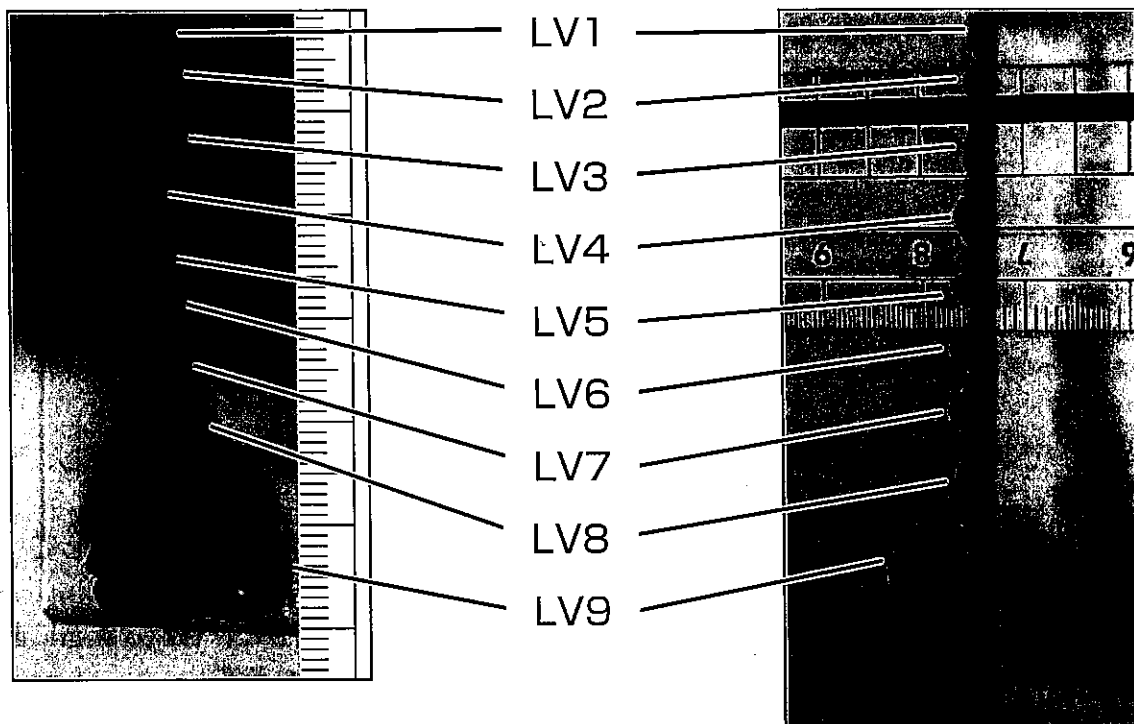
肝臓

No.	実測値	長軸	短軸	高さ
LV1	2.3mg	1.5mm	1.5mm	0.5mm
LV2	5.0mg	2.0mm	2.0mm	1.0mm
LV3	11.6mg	4.0mm	4.0mm	1.0mm
LV4	16.2mg	5.0mm	4.0mm	2.0mm
LV5	21.7mg	5.0mm	3.5mm	2.5mm
LV6	25.6mg	6.0mm	5.0mm	2.5mm
LV7	30.7mg	7.0mm	5.0mm	2.5mm
LV8	56.7mg	8.0mm	7.0mm	2.5mm
LV9	850.2mg	20.0mm	14.0mm	8.0mm

↑ Rotor-Stator, ペッスル 処理可能範囲 ↓

↑ ボールミル 処理可能範囲 ↓

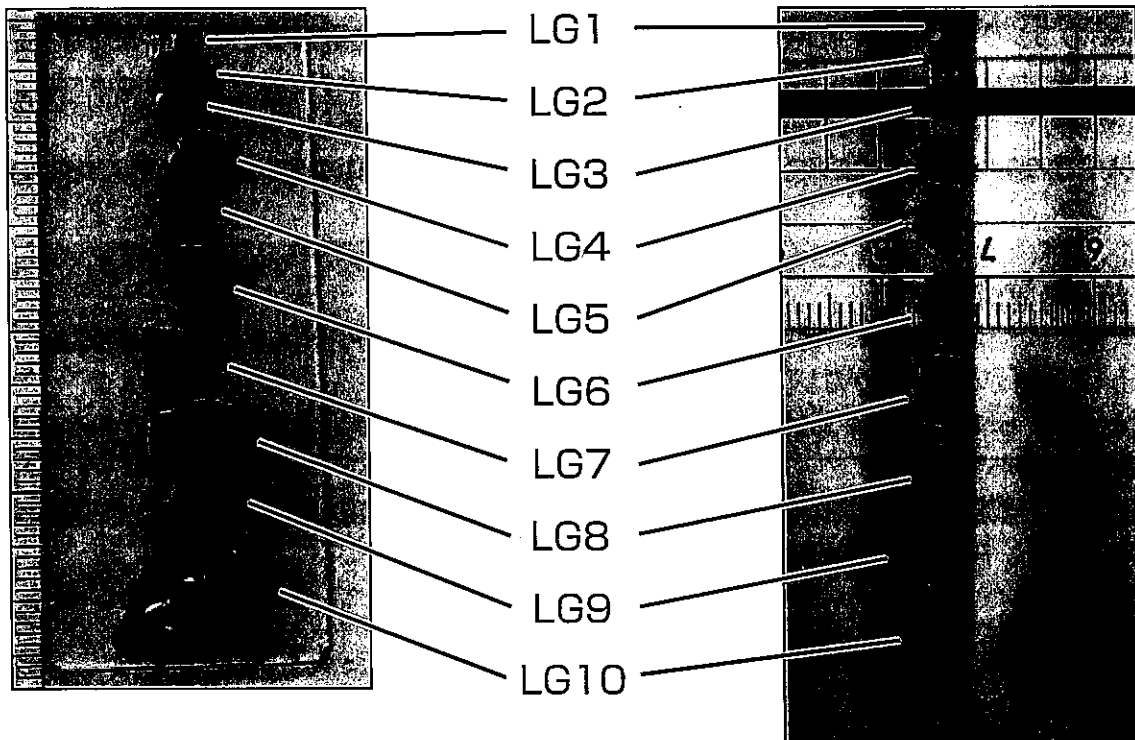
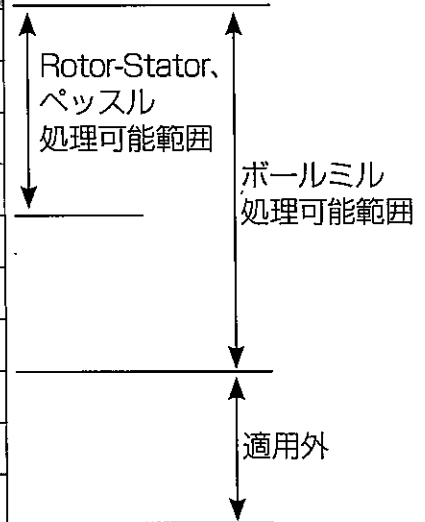
↑ 適用外 ↓



※LV2~LV7が5~30mgに対応しています。また、LV9はマウス1匹分の肝臓になります。

肺

No	実測値	長軸	短軸	高さ
LG1	1.7mg	1.5mm	1.5mm	1.0mm
LG2	6.8mg	5.0mm	2.5mm	2.0mm
LG3	8.7mg	4.5mm	3.0mm	2.5mm
LG4	15.3mg	5.0mm	2.5mm	2.5mm
LG5	20.8mg	6.0mm	4.0mm	2.5mm
LG6	25.2mg	7.0mm	5.0mm	2.5mm
LG7	30.2mg	7.0mm	5.5mm	3.0mm
LG8	40.4mg	9.5mm	6.0mm	3.0mm
LG9	46.2mg	8.0mm	5.0mm	4.0mm
LG10	134.3mg	15.0mm	11.0mm	4.0mm



※LG2～LG7が5～30mgに対応しています。また、LG10はマウス1匹分の肺になります。

◆ 試薬に関する注意事項

- LRT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。
- 本キットは100μlのCRTでtotal RNAを溶出することを前提としています。CRT液量は変更可能ですが、溶出効率が増減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/QG-800をご使用の場合：8-3 (p.21)、付録1 (p.39)、付録2 (p.41)
QG-Mini80をご使用の場合：8-4 (p.26)
- 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。

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 tissue kit S II (RT-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

マウス正常組織より本キットを用いて分離した際のtotal RNA収量、純度例は表3のとおりです。

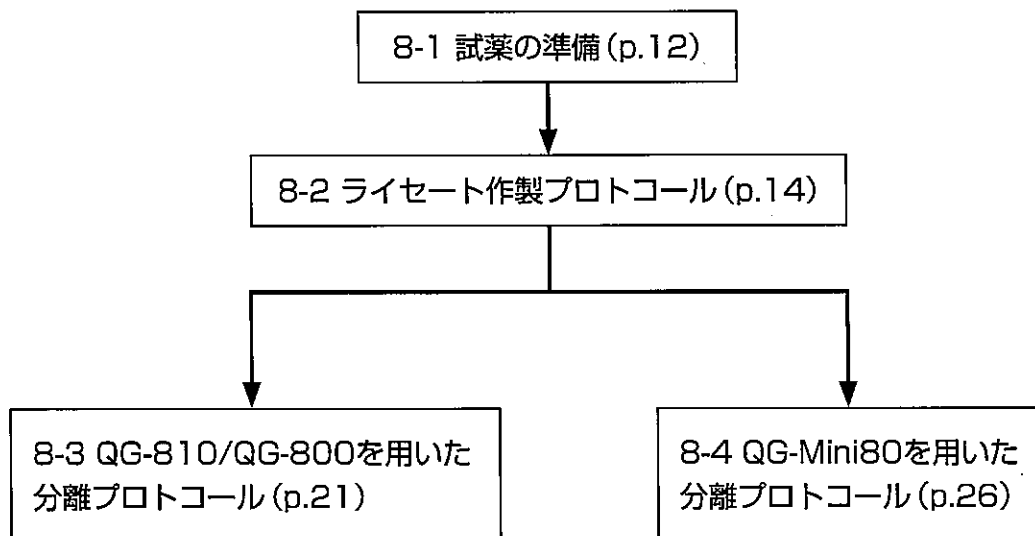
表3 total RNA収量・純度例 (Balb/cマウス(メス、7週齢)正常組織) (ボールミル型ホモジナイザー (トミー精工製Micro Smash MS-100)でホモジナイズ、DNase処理あり)

組織	処理組織量	収量例	A260/280
肝臓	30mg	100 ~ 120 μ g	2.2
脳	30mg	15 ~ 20 μ g	2.1
肺	30mg	20 ~ 25 μ g	2.2
腎臓	30mg	50 ~ 60 μ g	2.3
脾臓	30mg	40 ~ 50 μ g	2.2
胸腺	30mg	40 ~ 60 μ g	2.2
心臓	30mg	15 ~ 20 μ g	2.2

- 収量は組織の状態、部位などにより変動します。

8. プロトコール

[Overview Flow Chart]



8-1 試薬の準備

◆LRT (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500 μ l使用します)分注し、LRT1ml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、ドラフト内で調整してください。

◆SRT (40ml)

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。

◆WRT (120ml)

濃縮状態でお届けします。

使用前に、ボトルに280ml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。

◆CRT (100ml)

RNA溶出時には、必ずCRT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(<3> p.23、p.29)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。

◆WRT (特級エタノール添加済み) およびCRTの必要量 (QG-810/QG-800をご使用の場合)

表4を参考に、分離処理をするカートリッジ数に応じて、WRT、CRT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4 WRT、CRT必要量

カートリッジ数	WRT (QG-810/QG-800)	CRT (QG-810)	CRT (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 : WRT 8.0ml、CRT 7.4ml

QG-800 : WRT 8.0ml、CRT 6.4mlです。

カートリッジ数に応じてWRT、CRTを加算してください。

1カートリッジあたりWRT 2.25ml、CRT 100 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WRTとQG-810では7.6mlのCRT、QG-800では6.6mlのCRTが必要です。

※WRT、CRT用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、基本的に動物組織5～30mgからのtotal RNA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.15、18) 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。
- すべての操作は室温(15～28℃)で行ってください。
- 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。
- LRT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】

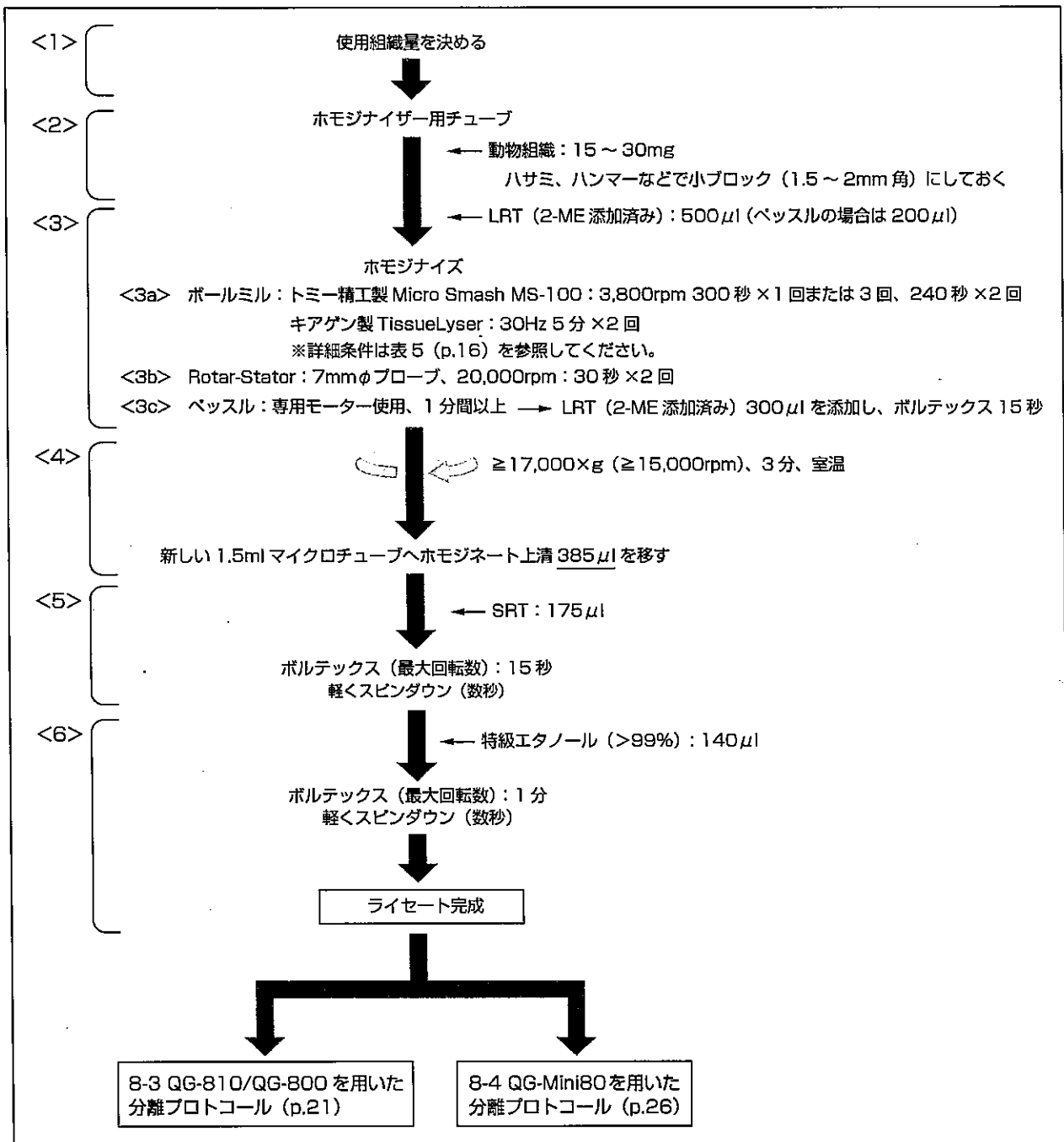
- WRTは濃縮状態でお届けします。分離を始める前に、必ず280mlの特級エタノール(>99%)が添加されていることを確認してください。

使用する組織量によってライセート作製プロトコールが異なりますので、組織量をご確認の上適切なプロトコールを選んでください。

15～30mg : p.15

5～15mg : p.18

組織量15～30mg：ライセート作製フロー



組織量15～30mg：ライセート作製プロトコール詳細

<1> 動物から切除した新鮮もしくは凍結組織を準備してください。

使用する動物組織重量を決めてください。

表2（p.7）を参考に、使用する組織量を決めてください。組織量が多すぎた場合、目詰まり、顕著な収量減少、精度低下の可能性があります。目詰まりした場合は、組織量を減らして検討してください。表2（p.7）に載っていない組織種の場合は、使用組織量を10mgとし、組織量5～15mgのライセート作製プロトコール（p.18）に従って処理を行ってください。

<2> 組織をハサミ、ハンマーなどで1.5～2mm角の小ブロックにし、動物組織重量を測定し、各ホモジナイザーに対応したチューブに入れてください(3-② p.5)。ボールミル型ホモジナイザーを用いる場合は、対応したチューブにあらかじめ5mmφジルコニアボールを入れておき、組織をはかりとってください。

組織重量測定は速やかに行ってください。凍結組織重量測定時にはRNAの分解を避けるため、できるだけ凍結状態を保ったまま秤量してください。ドライアイスや液体窒素中に凍結サンプルが入ったチューブを立てるなどして、LRT(2-ME添加済み)を添加するまで凍結状態を保ってください。

<3> LRT(2-ME添加済み)を500μl添加し、LRT中で組織をホモジナイズしてください。ペッスルをご使用の場合は、最初に200μlを添加し、後から300μl追加します(<3c>参照)。

組織の破碎およびホモジナイズには、下記<3a>～<3c>の方法があります。ホモジナイザーによって上限処理量が異なりますので、表2(p.7)を参照して、実験を開始してください。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。

凍結したチューブにLRTを添加する際、チューブの中身が吹き出したりチューブが割れないように注意してください。

<3a> ボールミル型ホモジナイザーの場合

5mmφジルコニアボールをあらかじめ入れたホモジナイザー用チューブ(3-② p.5)に重量を測定した組織サンプルを入れます。500μlのLRTを加え、装置添付の説明書に従って、サンプルが均一になるまでホモジナイズしてください。

回転数や処理時間は、組織種類や状態によって変動します。ホモジナイズ条件例は下記のとおりです。3-②(p.5)を参照して、必ず指定されたチューブを使用してください。

表5 組織量15～30mgの場合のボールミル型ホモジナイズ条件例

	トミー精工製 Micro Smash MS-100	キアゲン製 TissueLyser
肝臓・脳・肺 腎臓・脾臓	3,800rpm 300秒	30Hz 5分×2回
胸腺*	3,800rpm 240秒×2回*	
心臓	3,800rpm 300秒×3回	

※ 胸腺の場合、トミー精工製Micro SmashではMS-100R(冷却機付)の方が収量が高いとがあります。

下記の場合はホモジナイズチューブが破損することがありますので、避けてください。

- 指定された回転数を超えてホモジナイズを行う場合
- プロトコールに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

<3b> Rotor-Statorホモジナイザーの場合

Rotor-Statorホモジナイザーで処理できる組織量はボールミル型ホモジナイザーより少なくなります(表2 p.7参照)。

重量を測定した組織サンプルを、適切なサイズのホモジナイザー用チューブに入れます。7mmφのプロープを用いる場合は、2mlマイクロチューブなどを使用してください。500μlのLRTを加え、速やかにRotor-Statorホモジナイザーを用いて20,000rpmにて30秒間×2回ホモジナイズしてください。

10mmφ以上のプロープの場合はさらに大きなサイズのチューブが必要です。回転数や処理時間は、組織種類や状態によって変動します。組織破片が見られる場合は、処理時間を延長してください。また泡がチューブからあふれないように注意してください。プロープをチューブの壁につけてホモジナイズすると、幾分泡が立ちにくくなります。

<3c> マイクロチューブ用ペッスルホモジナイザーの場合

ペッスルホモジナイザーでは処理できない組織もあります(表2 p.7参照)。

重量を測定した組織サンプルを1.5mlチューブに入れます。200 μ lのLRTを加え、専用モーターにペッスルを取り付け、速やかに1分間以上ホモジナイズしてください。

ペッスルをチューブの底に押し付けてははやや浮かす、を繰り返してください。

ホモジナイズ完了後、300 μ lのLRTを添加し、ボルテックスを15秒行ってください。

十分にホモジナイズできていない場合、表2 (p.7) 提示の処理量以下でも目詰まりする可能性があります。

<4> 組織破片を分離除去するため、 $\geq 17,000 \times g$ ($\geq 15,000$ rpm) で3分、室温にて遠心します。

底に沈んだ組織破片などを吸い込まないように注意して、ホモジネート上清385 μ lを新しい1.5mlマイクロチューブに移します。

組織破片を持ち込むと、目詰まりの可能性があります。組織破片がうまく分離できないときや、泡が気になる場合は、遠心の回転数および遠心時間を増やしてください。

やむを得ず放置される場合、1時間までは収量に影響を与えません。<5>以降は途中で止めずに最後まで続けて操作を行うようにしてください。

<5> SRTを175 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。

<3>~<4>にてホモジネートをロスした場合は、SRT液量および<6>のエタノール液量比を「ホモジネート:SRT:エタノール=11:5:4」に調節してください。

<6> 特級エタノール(>99%)を140 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)。

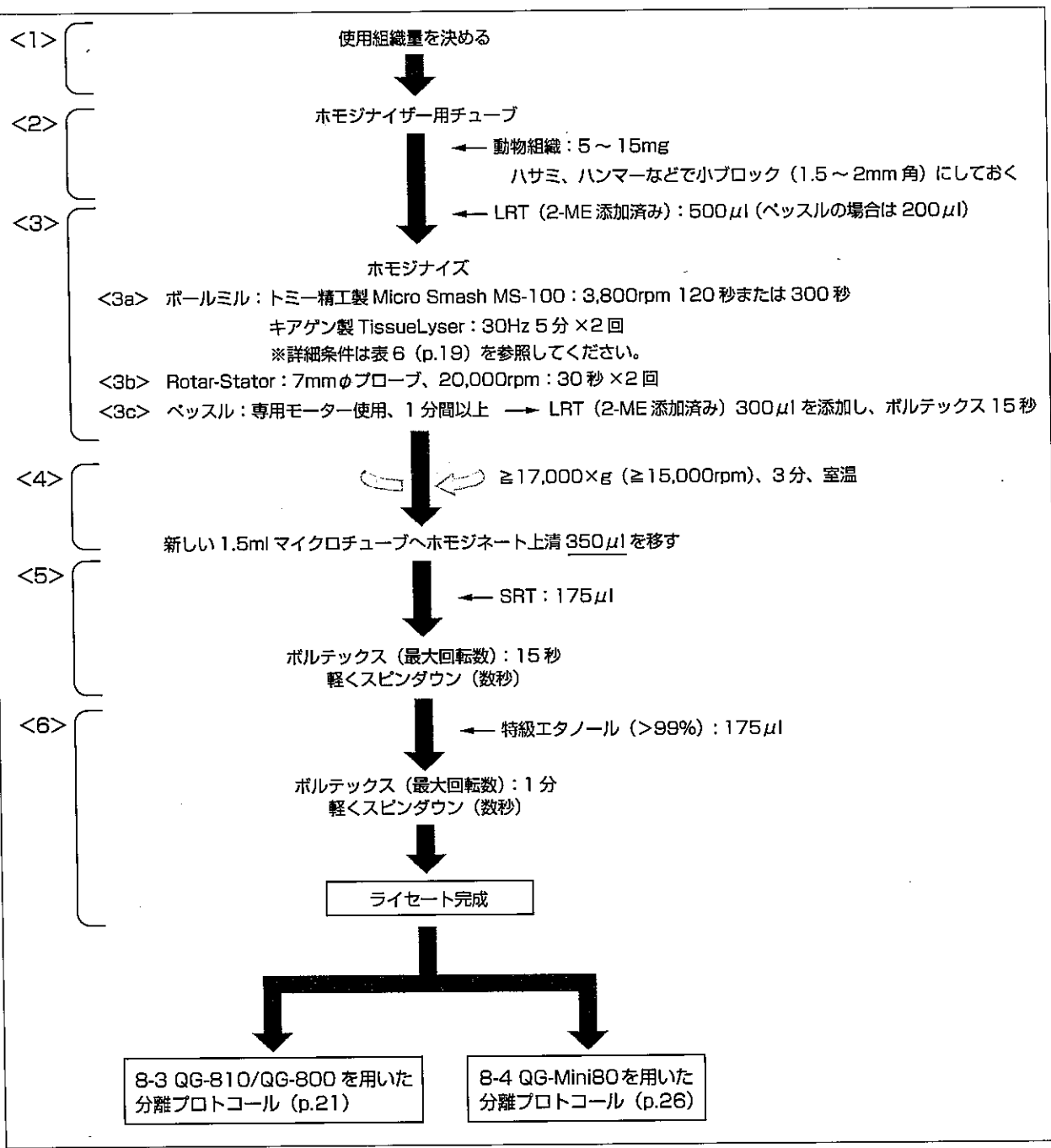
このステップでボルテックスを充分行わないと、収量が低下することがあります。

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.21)

8-4 QG-Mini80を用いた分離プロトコール (p.26)

組織量5～15mg：ライセート作製フロー



ライセート作製プロトコール

組織量5～15mg：ライセート作製プロトコール詳細

<1> 動物から切除した新鮮もしくは凍結組織を準備してください。

使用する動物組織重量を決めてください。

表2 (p.7) を参考に、使用する組織量を決めてください。組織量が多すぎた場合、目詰まり、顕著な収量減少、精度低下の可能性があります。目詰まりした場合は、組織量を減らして検討してください。表2 (p.7) に載っていない組織種の場合は、使用組織量は10mgとしてください。

<2> 組織をハサミ、ハンマーなどで1.5～2mm角の小ブロックにし、動物組織重量を測定し、各ホモジナイザーに対応したチューブに入れてください(3-② p.5)。ボールミル型ホモジナイザーを用いる場合は、対応したチューブにあらかじめ5mmφジルコニアボールを入れておき、組織をはかりとってください。

組織重量測定は速やかに行ってください。凍結組織重量測定時にはRNAの分解を避けるため、できるだけ凍結状態を保ったまま秤量してください。ドライアイスや液体窒素中に凍結サンプルが入ったチューブを立てるなどして、LRT (2-ME添加済み) を添加するまで凍結状態を保ってください。

<3> LRT(2-ME添加済み)を500μl添加し、LRT中で組織をホモジナイズしてください。ペッスルをご使用の場合は、最初に200μlを添加し、後から300μl追加します(<3c>参照)。

組織の破砕およびホモジナイズには、下記<3a>～<3c>の方法があります。ホモジナイザーによって上限処理量が異なりますので、表2 (p.7) を参照して、実験を開始してください。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。

凍結したチューブにLRTを添加する際、チューブの中身が吹き出したりチューブが割れないように注意してください。

<3a> ボールミル型ホモジナイザーの場合

5mmφジルコニアボールをあらかじめ入れたホモジナイザー用チューブ(3-② p.5)に重量を測定した組織サンプルを入れます。500μlのLRTを加え、装置添付の説明書に従って、サンプルが均一になるまでホモジナイズしてください。

回転数や処理時間は、組織種類や状態によって変動します。ホモジナイズ条件例は下記のとおりです。3-② (p.5) を参照して、必ず指定されたチューブを使用してください。

表6 組織量5～15mgの場合のボールミル型ホモジナイズ条件例

	トミー精工製 Micro Smash MS-100	キアゲン製 TissueLyser
肝臓・脳・肺	3,800rpm 120秒	30Hz 5分×2回
腎臓・脾臓 胸腺・心臓	3,800rpm 300秒	

下記の場合はホモジナイズチューブが破損することがありますので、避けてください。

- 指定された回転数を超えてホモジナイズを行う場合
- プロトコールに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

<3b> Rotor-Statorホモジナイザーの場合

重量を測定した組織サンプルを、適切なサイズのホモジナイザー用チューブに入れます。7mmφのプローブを用いる場合は、2mlマイクロチューブなどを使用してください。500μlのLRTを加え、速やかにRotor-Statorホモジナイザーを用いて20,000rpmにて30秒間×2回ホモジナイズしてください。

10mmφ以上のプローブの場合はさらに大きなサイズのチューブが必要です。回転数や処理時間は、組織種類や状態によって変動します。組織破片が見られる場合は、処理時間を延長してください。また泡がチューブからあふれないように注意してください。プローブをチューブの壁につけてホモジナイズすると、幾分泡が立ちにくくなります。

<3c> マイクロチューブ用ペッスルホモジナイザーの場合

ペッスルホモジナイザーでは処理できない組織もあります(表2 p.7参照)。

重量を測定した組織サンプルを1.5mlチューブに入れます。200μlのLRTを加え、専用モーターにペッスルを取り付け、速やかに1分間以上ホモジナイズしてください。ペッスルをチューブの底に押し付けてはやや浮かす、を繰り返してください。

ホモジナイズ完了後、300μlのLRTを添加し、ボルテックスを15秒行ってください。

十分にホモジナイズできていない場合、表2 (p.7) 提示の処理量以下でも目詰まりする可能性があります。

<4> 組織破片を分離除去するため、 $\geq 17,000 \times g$ ($\geq 15,000\text{rpm}$) で3分、室温にて遠心します。

底に沈んだ組織破片などを吸い込まないように注意して、ホモジネート上清350μlを新しい1.5mlマイクロチューブに移します。

組織破片を持ち込むと、目詰まりの可能性があります。組織破片がうまく分離できないときや、泡が気になる場合は、遠心の回転数および遠心時間を増やしてください。

やむを得ず放置される場合、1時間までは収量に影響を与えません。<5>以降は途中で止めずに最後まで続けて操作を行うようにしてください。

<5> SRTを175μl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。

<3>~<4>にてホモジネートをロスした場合は、SRT液量および<6>のエタノール液量比を「ホモジネート：SRT：エタノール=2：1：1」に調節してください。

<6> 特級エタノール(>99%)を175μl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)。

このステップでボルテックスを充分行わないと、収量が低下することがあります。

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。

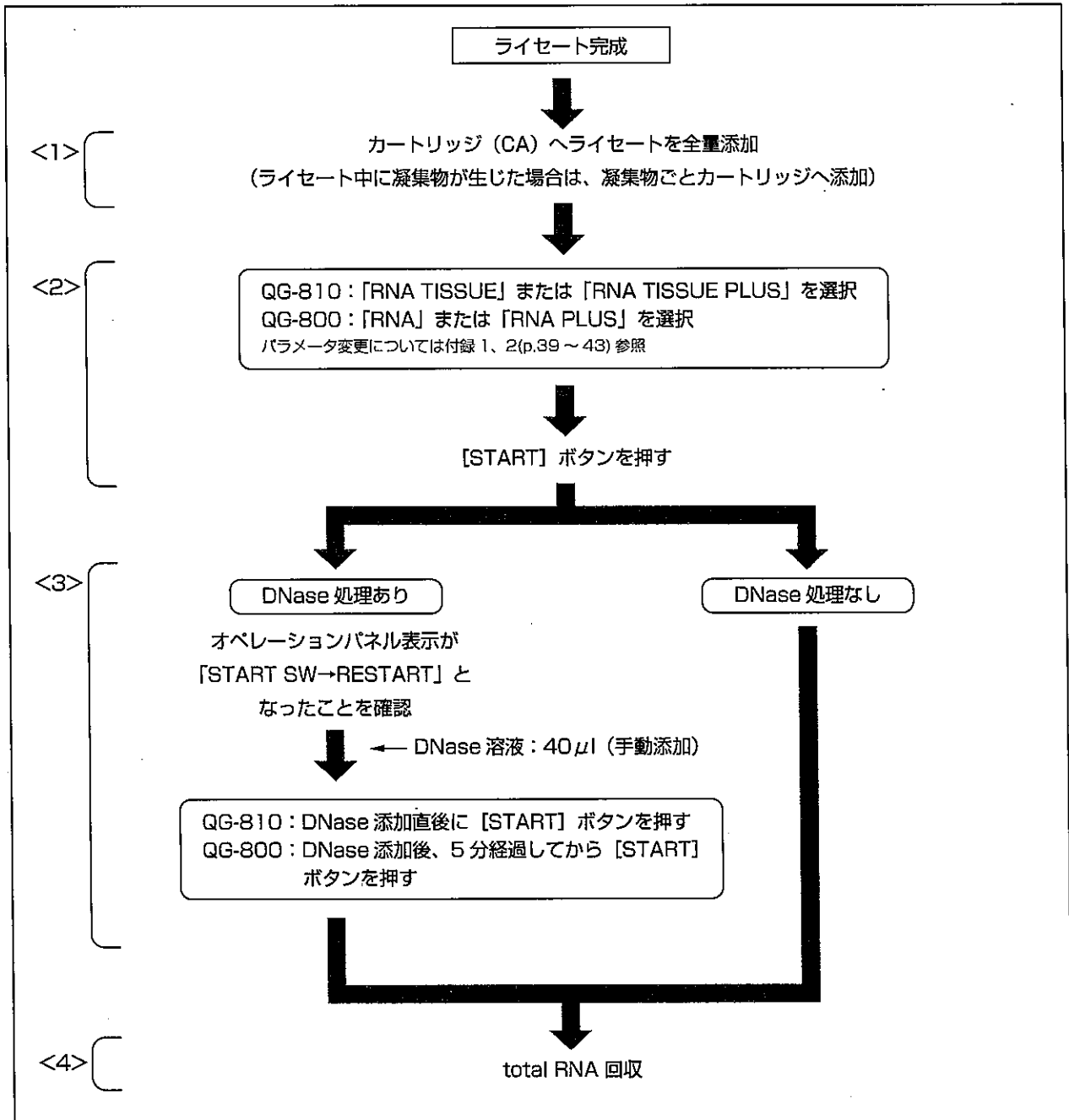
8-3 QG-810/QG-800を用いた分離プロトコール (p.21)

8-4 QG-Mini80を用いた分離プロトコール (p.26)

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。
- WRTに280ml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 TISSUE」または「RNA TISSUE PLUS」モードを選択してください。(付録1 p.39参照)
- QG-800の分離モードは、「RNA」または「RNA PLUS」モードを選択してください。(付録2 p.41参照)
- 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.13を参考に、WRT(特級エタノール添加済み)、CRT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WRT(特級エタノール添加済み)、CRT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。
- LRT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



QG-810/QG-800分離フロー

QG-810/QG-800分離プロトコール詳細

<1> <ライセート添加> 8-2 (p.14) 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、2 (p.39、41) 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7で確認してください。

表7 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、使用后廃棄する場合」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
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550 μ l 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	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40μl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、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1 p.39 [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8 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、100μlです。

CRT液量は50μlまで下げられます。その場合は、QG-810の「ELUT DIP TM」パラメータを「240」とすることをお勧めします。(付録1 p.39参照)

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。
- WRTに280ml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WRT (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。
- CRT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。

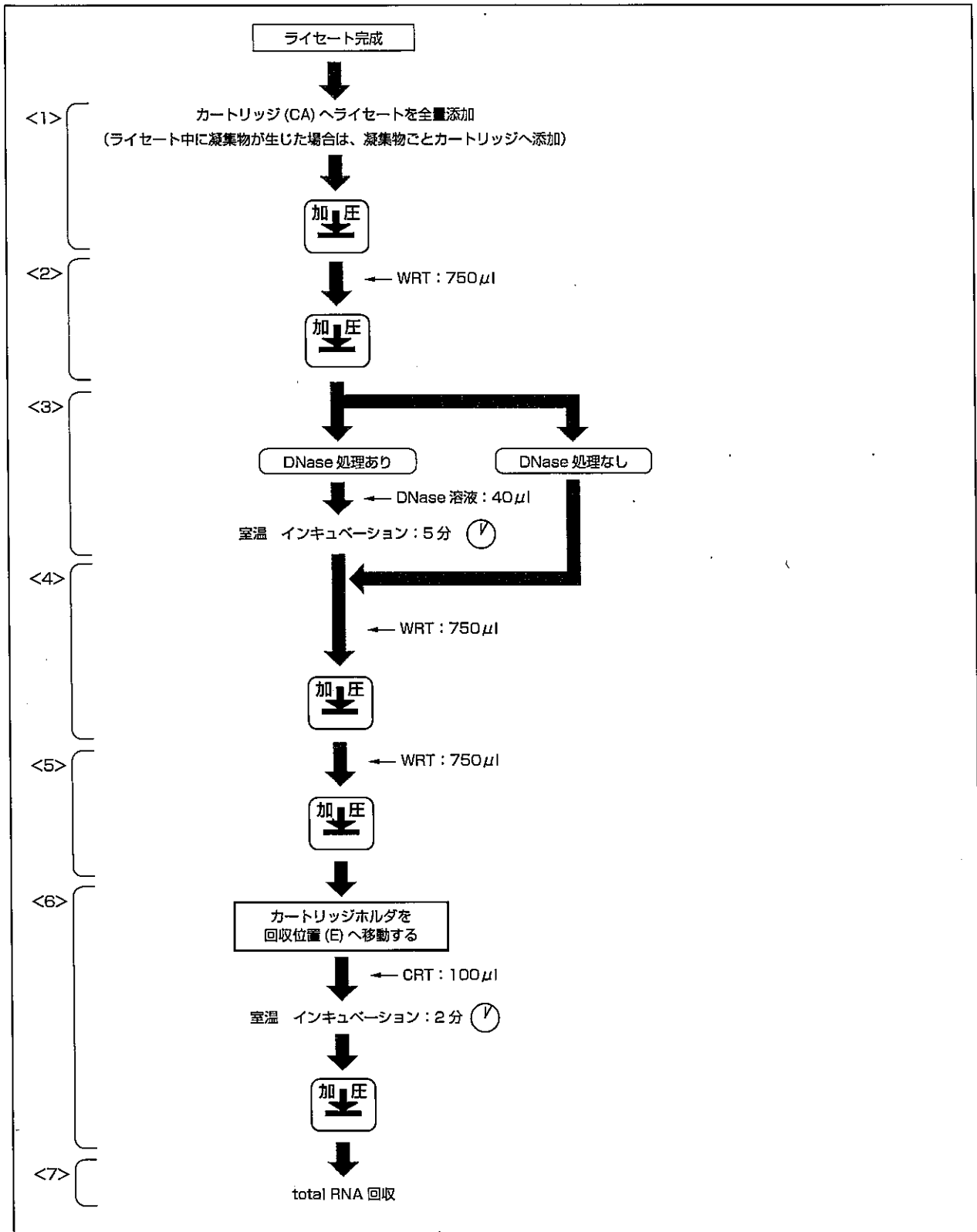
- カートリッジ (CA) 内のフィルターにピペットチップが触れないように注意してください。
- 加圧操作を繰り返しても液が残っているカートリッジ (CA) がある場合はそのカートリッジだけを上へ引き抜き、トラブルシューティング ((4) p.34) に従い別途処理を行ってください。

- LRT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-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

QG-Mini80分離プロトコール詳細

<1> <ライセート添加> 8-2 (p.14) 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。

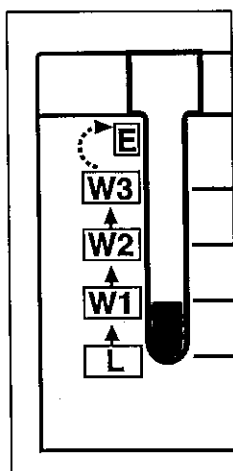
ライセート完成後は、速やかに分離操作を行ってください。

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、WRT 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。WRT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WRT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。

洗浄1回目のWRT加圧終了後、チューブホルダの廃液目盛りの廃液高さは、「W1」の位置になります (下記イラスト参照)。



<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
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550 μ l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/ 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分間インキュベートします。

DNase処理は必ず洗浄1回目の後に行ってください。

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WRT(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。

<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、WRT 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。WRT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。

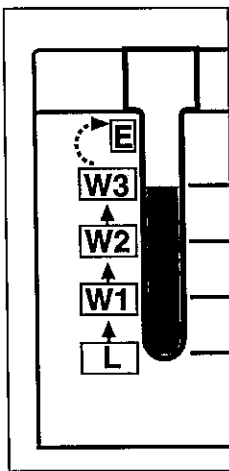
加圧はおよそ1分で自動的にストップします。加圧が自動的にストップした後もWRTがカートリッジ内に残っている場合は、加圧スイッチをいったん元の位置に戻し、再度加圧スイッチを手前に回して加圧を行ってください。

<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、WRT 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。WRT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WRT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WRT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WRT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。

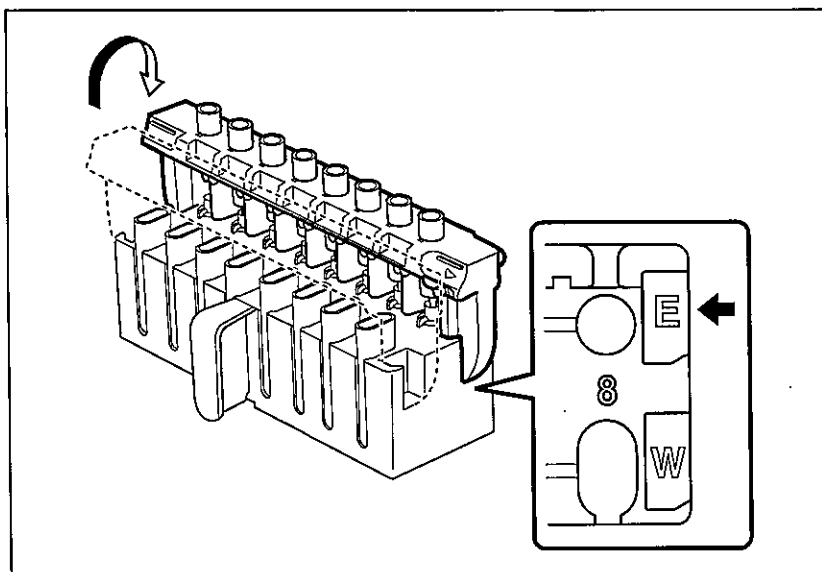


<6> <回収> チューブホルダ(カートリッジホルダセット済み)を引き出し、リリースレバーに触れないように注意しながら、カートリッジホルダを回収位置(E)に移動します(下記イラスト参照)。CRT 100 μ lをカートリッジ(CA)へ添加し、チューブホルダ(カートリッジホルダセット済み)をQG-Mini80本体にセットします。その際、本体トレイ上のWASHラベルがチューブホルダの下に隠れて見えなくなっていることを確認してください。

室温にて2分間インキュベート後、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。CRT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CRT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。

CRT液量は50 μ lまで下げられますが、その場合、インキュベーション時間を4分に延長することをお勧めします。



<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、キャップを閉めてから、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 $^{\circ}$ Cまたは-80 $^{\circ}$ 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(ボールミル型ホモジナイザーの場合)

原因	対策
指定回転数以上で使用した	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LRT (500 μ l) を添加してください。
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5mm ϕ)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
組織の保存状態が悪い	組織の種類、大きさ、量、保管期間、保存条件でRNA収量は変わります。組織をすぐに用いない場合は、液体窒素で急速に凍結後、 -80°C にて保存してください。一度融けたものは使わないでください。
処理組織量が不適切	表2 (p.7) を参照して適切な組織量範囲で分離してください。
LRT (2-ME添加済み) 添加後のホモジナイズが不十分	8-2<3> (p.16, 19) に従い、充分ホモジナイズしてください。ボールミル型ホモジナイザーの場合は、ホモジナイザーの設定値、ボール(ジルコニア5mm ϕ)が入っていることを確認してホモジナイズしてください。
組織量に対応したプロトコルを使っていない	組織量に応じて、15~30mg用プロトコル (p.15) または5~15mg用プロトコル (p.18) を選択してください。
LRTに2-MEが添加されていない	LRTを使用前に必要量分注し、LRT1ml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。
カートリッジが目詰まりした (オペレーション表示 QG-810: -, QG-800: x)	「補足(p.37)」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。
ライセート作製時、SRTまたは特級エタノールを所定量添加していない	SRT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SRT、特級エタノール液量を調節してください。
試薬の添加順序が不適切	ホモジネートにSRTを添加してボルテックス後、特級エタノール(>99%)を添加してください。
WRTに所定量の特級エタノールを添加していない	WRT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.12参照)
カートリッジ(CA)へ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。


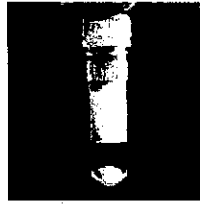
原因	対策
QG-810の場合は「ELUT DIP TM」パラメータ、QG-800の場合は「CLCT DIP TM」パラメータが正しい値に変更されていない(*)	付録1、2(p. 39～43)を参照して、QG-810の場合は「ELUT DIP TM」パラメータが「120」に、QG-800の場合は「CLCT DIP TM」パラメータが「240」に変更されていることを確認してください。
CRT量が不適切(*)	QG-810/QG-800：パラメータが変更されているか確認してください。特にCRT量のパラメータ(「ELUT VOL」(QG-810)または「CLCT VOL」(QG-800))が間違っていないこと(「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/QG-800の取扱説明書も併せて参照してください。 QG-Mini80：CRT量が100μlである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、WRTをカートリッジ(CA)に添加せず加圧した(**)	DNase溶液を添加し、5分間インキュベーション後、WRTを添加してから加圧を行ってください。
溶出時にインキュベーションしていない(**)	CRTをフィルター上に添加後、2分間インキュベーションしてください。
CRT量を50μlにした	CRT量を50μlとする場合は、溶出時のインキュベーション時間を4分間(QG-810の場合、「ELUT DIP TM」パラメータを「240」)とすることをお勧めします(付録1 p.39参照)。
室温が低すぎまたは高すぎた	指定の室温範囲(15～28℃)にて操作してください。
RNAの溶出にCRT以外の試薬を使った	RNAの溶出にはCRTを使用してください。
カートリッジ(CA)内の液が抜けた後放置した(**)	QG-Mini80で分離を始めたら、途中で放置せずに最後まで続けてください。万一放置した場合、溶出時のインキュベーション時間を4分にすると収量が戻る可能性があります。
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反応バッファを所定量添加していない(DNase処理を行う場合)	DNase液を調製時に、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液を添加時にフィルターに穴を開けてしまった(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液を添加してください。
RNAの分解	(5)「RNAが分解した」参照

(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. 39～43)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：WRT 750μlで3回洗浄を行ってください。
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。

原因	対策
組織の保存状態が悪い	組織サンプルの種類、大きさ、量、保管期間、保存条件でRNA収量は変わります。一度融解したものは使わないでください。
LRT (2-ME添加済み) 添加後のホモジナイズが不充分	8-2<3> (p.16、19) に従い、充分ホモジナイズしてください。ボールミル型ホモジナイザーの場合は、ホモジナイザーの設定値、ボール(ジルコニア5mmφ)が入っていることを確認してホモジナイズしてください。
ライセート作製時、SRTまたは特級エタノールを所定量添加していない	SRT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SRT、特級エタノール液量を調節してください。
WRTに所定量の特級エタノールを添加していない	WRT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.12参照)
RNAの溶出にCRT以外の試薬を使った	RNAの溶出にはCRT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
組織量に対応したプロトコールを使っていない	組織量に応じて、15～30mg用プロトコール(p.15)または5～15mg用プロトコール(p.18)を選択してください。 本キットで初めて分離する組織の場合は、10mgから試してください。
処理組織量が多すぎる	表3(p.11)を参照して、処理組織量を下げてください。 例) 肝臓30mgのサイズ 
LRT (2-ME添加済み) 添加後のホモジナイズが不充分	8-2<3> (p.16、19) に従い、充分ホモジナイズしてください。または、ホモジナイズ時間を延長してください。ボールミル型ホモジナイザーの場合、ホモジナイザーの設定値、ボール(ジルコニア5mmφ)が入っていることを確認してホモジナイズしてください。 例) 肝臓ホモジナイズ後の状態例 
ホモジナイズ後遠心を行い、上清を分取する際に、上清と一緒に残渣をとってしまった	遠心操作を繰り返すか、遠心時間を延長して、残渣を確実に取り除いてください。
カートリッジ(CA) 加圧時間が不充分(**)	再加圧してください。
ライセート作製時、SRTまたは特級エタノールを所定量添加していない	SRT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SRT、特級エタノール液量を調節してください。
WRTに所定量の特級エタノールを添加していない	WRT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.12参照)
室温が低すぎまたは高すぎた	指定の室温範囲(15～28℃)にて操作してください。

原因	対策
カートリッジ (CA) 内の液が抜けた後放置した (**)	カートリッジ (CA) の加圧操作を始めたなら、途中で放置せずに最後まで続けてください。
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WRT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WRTが抜けきらない (**)	「補足 (p.37)」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。

(5) RNAが分解した

原因	対策
組織の保存方法が不適切	組織をすぐに用いない場合は、液体窒素で急速に凍結後、 -80°C にて保存してください。一度融けた組織は使わないでください。
LRTに2-MEが添加されていない	LRTを使用前に必要量分注し、LRT 1mlあたり10 μl 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) 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。
組織にLRT (2-ME添加済み) 添加後、室温に放置した	LRT添加後は速やかにホモジナイズ工程へ進めてください。
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.39 ~ 43) を参照して、「WASH VOL 1 ~ 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 : WRT 750 μl 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を使用した	3-① (p.5) 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 (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
CRTのセット量が不足またはディスチャージ操作を行っていない (*)	表4 (p.13) に従い、必要量のCRT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。
CRT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、CRTを100μl添加してください。
CRT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 (**)	CRT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.23) 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) 以降を参照してください。

<2> WRT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WRT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) 以降を参照してください。

QG-Mini80の場合：

<1> ライセート加圧工程で詰まった場合

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.28) 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) 以降を参照してください。

<2> 洗浄加圧工程で目詰まりした場合

カートリッジ (CA) に残ったWRT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350 μ lのLRT (2-ME添加済み) を分取しておきます。
- 2) 耳鼻科用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2、3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LRT (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、他のチューブに入れます (リカバリー完了後、廃棄します)。
- 7) 8-2 組織量5 ~ 15mgからtotal RNAを分離する方法の<5> (p.20) のSRT 175 μ l添加から再開し、total RNAを回収してください。

図2 ピンセットをカートリッジ (CA) に入れた様子

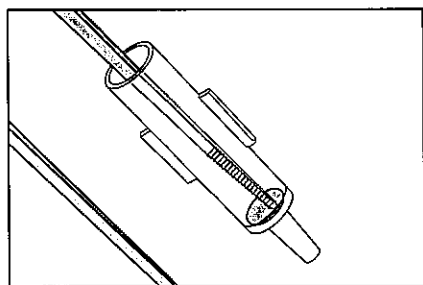
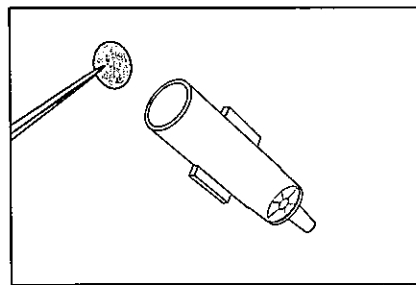


図3 フィルターを取り外したところ



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 S II	PL-S2

付録1 QG-810パラメータについて

QG-810をご使用の場合、「RNA TISSUE PLUS」モードまたは「RNA TISSUE」モードは下表のパラメータ設定となっています。本キットでの分離は「RNA TISSUE PLUS」モードまたは「RNA TISSUE」モードの「ELUT DIP TM」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 TISSUE PLUS (DNase処理あり)			RNA TISSUE (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		750	750		750
5	WASH VOL2	750		750	750		750
6	WASH VOL3	750		750	750		750
7	WASH VOL4	750		750	750		750
8	WASH VOL5	750		750	750		750
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		750	750		750
14	WAS2 VOL2	750		750	750		750
15	WAS2 VOL3	750		750	750		750
16	WAS2 VOL4	750		750	750		750
17	WAS2 VOL5	750		750	750		750
18	ELUT VOL	100		100	100		100
19	ELUT PEAK	100		100	100		100
20	ELUT DIP TM	120		30	120		30

※CRT量を50 μ lにする場合は「ELUT VOL」パラメータを「50」に変更してください。その場合は「ELUT DIP TM」パラメータを「240」とすることをお勧めします。

<パラメータ変更方法>

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

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 DIP TM」の設定値を「120」に変更する場合：[MODE] ボタンで「ELUT DIP TM」を表示→設定値を「30」から「120」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 TISSUE

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をご使用の場合、「RNA PLUS」または「RNA」モードは下表のパラメータ設定となります。「ISOLATE A」「ISOLATE B」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。下表のとおりパラメータを変更してください。

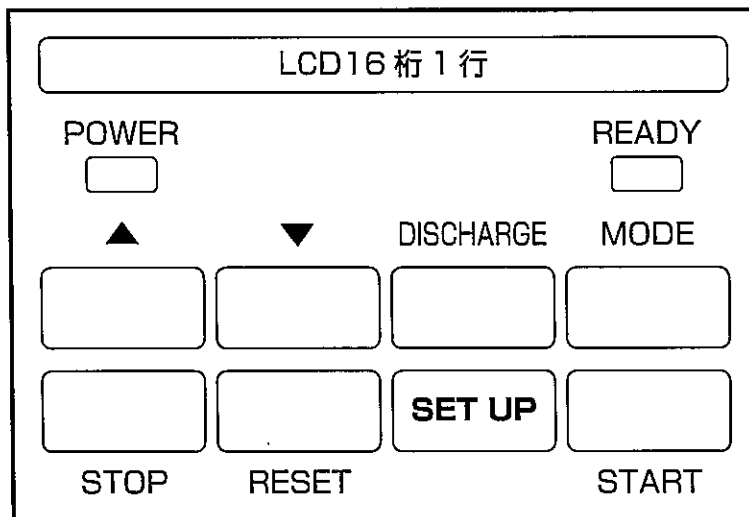
※グレーの行は初期値から変更不要な項目です。

表示順	動作項目	RNA PLUS (DNase処理あり)				RNA (DNase処理なし)			
		パラメータ	ユーザ 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 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	100		100	200	100		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

<パラメータ変更方法>

1. 「MAINTE MODE」への変更

- 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「TPOO : 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」を表示させます）。
- 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れの現在の設定
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。
p.41の表を参照して「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 : MAINTENANCE 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。

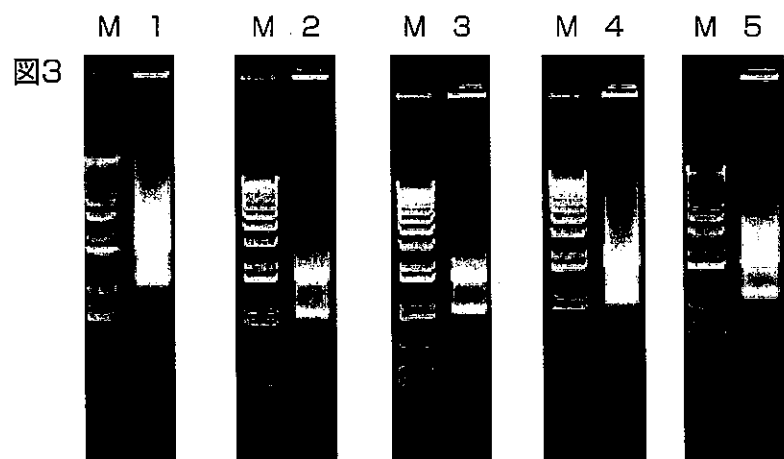
⑤ 一旦電源を切り、再度電源をONにします。電源をONにすると指定されたモード名 (例えば「ISOLATE A」) が表示され、通常の操作待ち状態になります。

※この操作をしないと通常の操作待ち状態にはなりません。

付録3 QuickGene RNA tissue kit S II (RT-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分離したtotal RNAの電気泳動結果です。



番号	サンプル(DNase処理あり)
1	肝臓
2	脳
3	肺
4	腎臓
5	脾臓

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を希釈し、G3PDH 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：total RNA 500ng

酵素：SuperScript II (Life Technologies社製)

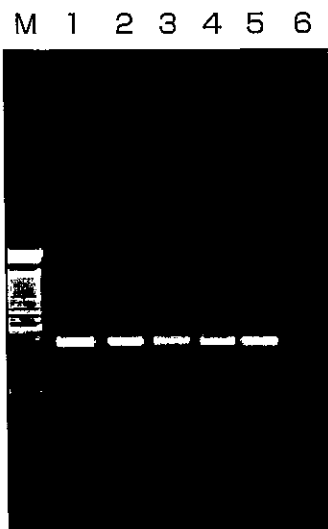
<PCR条件>

テンプレート：cDNA (10pg/ μ l total RNA相当)

プライマー：G3PDH プライマー

酵素：Takara Taq Hot Start Version (TaKaRa社製)

図4



番号	サンプル(DNase処理あり)
1	肝臓
2	脳
3	肺
4	腎臓
5	脾臓
6	ネガティブコントロール

M：マーカー (100bp DNA Ladder：
Life Technologies社製)

泳動条件：1% Agarose/1×TAE

10pg/ μ l total RNA相当のcDNAを用いて、G3PDH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/>