

英語版 April 2009 に対応

EZ1™ DNA Investigator プロトコールとトラブルシューティング

EZ1 装置を用いた法医学サンプルとバイオセキュリティー
サンプルからの自動化されたDNA精製



Sample & Assay Technologies

目次

前処理用プロトコール

| | |
|----------------------|----|
| 全血の前処理 | 3 |
| 乾燥血液の前処理 | 4 |
| 唾液の前処理 | 6 |
| 法医学的に採取したスワブサンプルの前処理 | 7 |
| 爪垢の前処理 | 9 |
| チューインガムの前処理 | 10 |
| タバコ吸殻の前処理 | 11 |
| 郵便切手の前処理 | 13 |
| 繊維上の斑痕の前処理 | 15 |
| ヒト組織の前処理 | 17 |
| 精子細胞が混合した上皮細胞の前処理 | 18 |
| 毛髪の前処理 | 20 |
| 骨あるいは歯の前処理 | 21 |
| 土壌の前処理 | 23 |
| その他の法医学サンプルの前処理 | 24 |

DNA 精製用プロトコール

| | |
|--------------------------------|----|
| DNA 精製 (Trace Protocol) | 26 |
| DNA 精製 (“Tip Dance” Protocol) | 29 |
| DNA 精製 (Large-Volume Protocol) | 32 |

| | |
|-------------|----|
| トラブルシューティング | 35 |
|-------------|----|

| | |
|-----------------------|----|
| Appendix A : 少量DNAの精製 | 37 |
|-----------------------|----|

プロトコール：全血の前処理

このプロトコールは、新鮮血あるいは凍結した血液からのトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA精製用にデザインされています。

スタートサンプル量

このプロトコールは最大 200 μ l のヒト全血処理用にデザインされています。

血液サンプルの保存

EDTA、ACD、またはヘパリン* 処理したヒト全血は、新鮮あるいは凍結のいずれでも使用できます。凍結サンプルは、操作を始める前に軽く攪拌しながら室温（15～25℃）で溶解してください。精製したDNAの収量と品質は血液の保存条件に依存します。新鮮な血液サンプルほど、より良い結果が得られる傾向があります。

- 短期保存（10日間まで）の場合、抗凝固剤としてEDTAなどを含むチューブに採血し、2～8℃で保存します。しかし、サザンブロット法などの様に、より長鎖のフラグメントサイズを必要とするアプリケーションの場合は、2～8℃で最長3日間（この期間後、DNAの分解が徐々に生じるため）までの保存を推奨します。
- 長期保存の場合、一般的な抗凝固剤（高分子DNAが必要な場合は、EDTAが望ましい）を含むチューブに血液を採取し、-70℃でチューブを保存します。

実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に英語版 Handbook 15 ページの “Important Notes” をお読みください。
- Proteinase Kはこのプロトコールでは必要ありません。

操作手順

1. 全血を室温（15～25℃）で溶解し、攪拌して均一にする。
2. サンプル 200 μ l をEZ1 サンプルチューブ（2 ml）に移す。
200 μ l 未満のサンプルの場合は、Buffer G2 を添加して 200 μ l にします。
3. 続いて 26 ページのプロトコール：DNA精製（Trace Protocol）を行なう。

* 試薬類を取り扱う際には適切な実験着、使い捨て手袋、保護眼鏡を常に着用してください。詳細は製品メーカーの相当するMSDS（material safety data sheet）をご覧ください。

プロトコール：乾燥血液の前処理

このプロトコールは、乾燥血液からのトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA精製用にデザインされています。ここでは、サンプル採取および乾燥血液サンプルのProteinase Kを用いた予備溶解について記載しています。

スタートサンプル量

ろ紙上の乾燥血液は、効率的な保存形態です。またこのサンプル保存法は安価で、輸送する際も安全です。乾燥血液が染み込んだろ紙から切り取ったディスク（直径3 mm）は約5 μ lの全血に存在する白血球細胞を含んでいます。このような乾燥血液のついたペーパーディスクを4枚使用することを推奨します。

実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に英語版 Handbook 15 ページの “Important Notes” をお読みください。

実験開始前の準備事項

- ろ紙は吸水性が高いため、通常、ステップ4で多量の分解バッファーをサンプルに添加する必要があります。吸水性のあるサンプルに十分な量の分解バッファーを添加するため、使用前に Buffer G2 を精製水で必ず希釈します。希釈は、n+1のサンプル数（nは分解するサンプル数）に対して必要な量の Buffer G2 を精製水で1：1の割合（1容量の Buffer G2 に対して1容量の蒸留水）で行ないます。希釈した Buffer G2 はDNAの収量あるいは品質に影響を及ぼしません。
- ステップ6でのProteinase K分解用に、サーモミキサー、ヒートブロック、あるいはウォーターバスを56℃に加熱します。
- ステップ7で使用するために、サーモミキサー、ヒートブロック、あるいはウォーターバスを95℃に加熱します。

操作手順

1. ろ紙上に印した円の中に各血液サンプルを70 μ l スポットする。血液を空気乾燥させる。
未処理あるいは抗凝固剤（EDTA、ACD、ヘパリン）*で処理した血液どちらでも使用できます。
2. それぞれの乾燥血液サンプルから、ペーパーパンチを用いて直径3 mmのディスクを4枚切り取る。
3. 4枚のディスクを1セットとし、2 mlのサンプルチューブに入れる。

* 試薬類を取り扱う際には適切な実験着、使い捨て手袋、保護眼鏡を常に着用してください。詳細は製品メーカーの相当するMSDS（material safety data sheet）をご覧ください。

4. 希釈した 190 μ l の Buffer G2 をサンプルに添加する。サンプルへのバッファの吸収量を確認しながら、必要に応じてサンプル容量が 190 μ l になるまでサンプルチューブに希釈した Buffer G2 を追加する。

注：“実験を始める前の準備事項”に記載したように希釈した Buffer G2 を用意します。

5. 10 μ l の Proteinase K を添加後、10 秒間ボルテックスにより完全に混和する。
6. 56 °C で 15 分間インキュベートする。

インキュベーション中にチューブを 1 ~ 2 回ボルテックスするか、サーモミキサーにチューブをセットします。

7. 推奨：95 °C で 5 分間インキュベートする。

サンプルを 95 °C でインキュベーションすることにより DNA 収量が増加することがあります。

8. 必要に応じて、蓋の内側に付いた水滴を落とすためにチューブを指先で軽く叩く。

9. 続いて 29 ページのプロトコール：DNA 精製 (“Tip Dance” Protocol) を行なう。

“Tip Dance” Protocol を用いる場合、通常チューブ内の固形物質を除去する必要はありません。

あるいはチップの目詰まりのリスクを回避するため、チューブから固形物質を全部除去します。ピンセットを用いて固形物をチューブの壁に押し付け液体を回収し、最大のサンプル量を得られるようにします。サンプル量は約 200 μ l になります。続いて 26 ページのプロトコール：DNA 精製 (Trace Protocol) を行ないます。

プロトコール：唾液の前処理

このプロトコールは、唾液サンプルからのトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA精製用にデザインされています。ここでは、Proteinase Kを用いた唾液サンプルの予備溶解について記載しています。

スタートサンプル量

50 μ l以下の唾液サンプルを使用します。サンプルが希薄で容量が多い場合は、32ページのプロトコール：DNA精製（Large-Volume Protocol）を参照してください。

実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に英語版 Handbook 15ページの“Important Notes”をお読みください。

実験開始前の準備事項

- ステップ4でのProteinase K分解用に、サーモミキサー、ヒートブロック、あるいはウォーターバスを56℃に加熱します。

操作手順

1. 2 mlのサンプルチューブに唾液を最高50 μ l入れる。
2. トータル容量が190 μ lになるようにサンプルにBuffer G2を140～190 μ l添加する。
3. 10 μ lのProteinase Kを添加後、10秒間ボルテックスにより完全に混和する。
4. 56℃で15分間インキュベートする。
インキュベーション中にチューブを1～2回ボルテックスするか、サーモミキサーにチューブをセットします。
5. 必要に応じて、蓋の内側に付いた水滴を落とすためにチューブを指先で軽く叩く。
6. 続いて26ページのプロトコール：DNA精製（Trace Protocol）を行なう。

プロトコール：法医学的に採取したスワブサンプルの前処理

このプロトコールは、法医学的に採取したスワブサンプルからのトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA 精製用にデザインされています。ここでは、法医学的に採取したスワブサンプルを Proteinase K により予備溶解する方法について記載しています。

スタートサンプル量

スワブサンプルは採取した当日に調製するか、後日調製するために保存します。-20℃での保存を推奨していますが、室温で24ヶ月保存されたスワブサンプルからもシングルコピー遺伝子の増幅に適切なDNAが得られたことが証明されています。

実験を始める前の重要事項

- このプロトコールは以下のタイプのスワブを用いてテストされました：プラスチック綿棒あるいはDACRONチップ（プラスチックの柄と綿の付いた Puritan® applicator あるいは DACRON チップは次のメーカーから入手することができます：Hardwood Products Company, www.hwppuritan.com, item nos. 25-806 1PC and 25-806 1PD; and from Daigger, www.daigger.com, cat. nos. EF22008D and EF22008DA）。ナイロン製細胞診ブラシやその他のタイプのスワブも使用できます。
- 操作を始める前に英語版 Handbook 15 ページの “Important Notes” をお読みください。

実験開始前の準備事項

- サンプル採取の後、スワブあるいはブラシは最低2時間自然乾燥します。
- スワブは吸水性が高いため、通常、ステップ2で多量の分解バッファーをサンプルに添加する必要があります。吸水性のあるサンプルに十分な量の分解バッファーを添加するため、使用前に Buffer G2 を精製水で必ず希釈します。希釈は、 $n+1$ のサンプル数（ n は分解するサンプル数）に対して必要な量の Buffer G2 を精製水で 1 : 1 の割合（1 容量の Buffer G2 に対して 1 容量の蒸留水）で行いません。希釈した Buffer G2 は DNA の収量あるいは品質に影響を及ぼしません。
- ステップ4での Proteinase K 分解用に、サーモミキサー、ヒートブロック、あるいはウォーターバスを 56℃ に加熱します。
- ステップ5で使用するために、サーモミキサー、ヒートブロック、あるいはウォーターバスを 95℃ に加熱します。

操作手順

1. 適切な器具（例；ハサミ）でスワブあるいはブラシの末端を慎重に切り取るか、折って 2 ml のサンプルチューブに入れる。
2. 希釈した 290 μ l の Buffer G2 をサンプルに添加する。
注：“実験を始める前の準備事項”に記載したように希釈した Buffer G2 を用意します。
3. 10 μ l の Proteinase K を添加後、10 秒間ボルテックスにより完全に混和する。
ブラシサンプルを処理する場合、ブラシをチューブの底に集めるためにチューブを簡単に遠心（10,000 x g で 30 秒）します。
4. 56 °C で 15 分間インキュベートする。
インキュベーション中にチューブを 1 ~ 2 回ボルテックスするか、サーモミキサーにチューブをセットします。
5. 推奨：95 °C で 5 分間インキュベートする。
サンプルを 95 °C でインキュベーションすることにより DNA 収量が増加することがあります。
6. 必要に応じて、蓋の内側に付いた水滴を落とすためにチューブを指先で軽く叩く。
7. 続いて 29 ページのプロトコール：DNA 精製（“Tip Dance” Protocol）を行なう。
“Tip Dance” Protocol を用いる場合、通常チューブ内のスワブあるいはブラシを除去する必要はありません。
あるいはチップの目詰まりのリスクを回避するため、チューブから固形物質を全部除去します。その際はピンセットを用いてスワブあるいはブラシをチューブの壁に押し付け液体を回収し、最大のサンプル量が得られるようにします。サンプル量は約 200 μ l です。続いて 26 ページのプロトコール：DNA 精製（Trace Protocol）を行ないます。

プロトコール：爪垢の前処理

このプロトコールは、法医学的に採取した爪サンプルからのトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA 精製用にデザインされています。ここでは、Proteinase K を用いた爪サンプルの予備溶解について記載しています。

スタートサンプル量

必ず 40 mg 以下の生体サンプルを使用してください。

実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に英語版 Handbook 15 ページの “Important Notes” をお読みください。

実験開始前の準備事項

- ステップ 4 での Proteinase K 分解用に、サーモミキサー、ヒートブロック、あるいはウォーターバスを 56℃ に加熱します。

操作手順

1. 爪垢サンプルを 2 ml のサンプルチューブに入れる。
2. 190 μ l の Buffer G2 をサンプルに添加する。
3. 10 μ l の Proteinase K を添加後、10 秒間ボルテックスにより完全に混和する。
4. 56℃ で 15 分間インキュベートする。

インキュベーション中にチューブを 1～2 回ボルテックスするか、サーモミキサーにチューブをセットします。

5. 必要に応じて、蓋の内側に付いた水滴を落とすためにチューブを指先で軽く叩く。
6. 続いて 29 ページのプロトコール：DNA 精製 (“Tip Dance” Protocol) を行なう。

“Tip Dance” Protocol を用いる場合、通常チューブ内の固形物質を除去する必要はありません。

あるいはチップの目詰まりのリスクを回避するため、チューブから固形物質を全部除去します。ピンセットを用いて固形物をチューブの壁に押し付け液体を回収し、最大のサンプル量が得られるようにします。サンプル量は約 200 μ l になります。続いて 26 ページのプロトコール：DNA 精製 (Trace Protocol) を行ないます。

プロトコール：チューインガムの前処理

このプロトコールは、法医学的に採取したチューインガムサンプルからのトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA精製用にデザインされています。ここでは、Proteinase Kを用いたチューインガムサンプルの予備溶解について記載しています。

スタートサンプル量

40 mg以下のチューインガムを小片にカットして使用することを推奨します。

実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に英語版 Handbook 15ページの“Important Notes”をお読みください。

実験開始前の準備事項

- ステップ4でのProteinase K分解用に、サーモミキサー、ヒートブロック、あるいはウォーターバスを56℃に加熱します。

操作手順

1. チューインガムサンプルを2 mlのサンプルチューブに入れる。
2. 190 μ lのBuffer G2をサンプルに添加する。
3. 10 μ lのProteinase Kを添加後、10秒間ボルテックスにより完全に混和する。
4. 56℃で15分間インキュベートする。
インキュベーション中にチューブを1～2回ボルテックスするか、サーモミキサーにチューブをセットします。
5. 必要に応じて、蓋の内側に付いた水滴を落とすためにチューブを指先で軽く叩く。
6. チューブから固形物質を全て取り除く。ピンセットを用いて固形物をチューブの壁に押し付け液体を回収し、最大のサンプル量が得られるようにする。サンプル量は約200 μ lになる。続いて26ページのプロトコール：DNA精製（Trace Protocol）を行なう。

プロトコール：タバコ吸殻の前処理

このプロトコールは、法医学的に採取したタバコ吸殻サンプルからのトータル(ゲノムおよびミトコンドリア) DNA 精製用にデザインされています。ここでは、タバコ吸殻の紙に含まれる唾液や上皮細胞を Proteinase K により予備溶解する方法について記載しています。

スタートサンプル量

タバコ吸殻の吸い口に近い紙あるいはフィルターを約 1 cm² 使用することを推奨します。

実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に英語版 Handbook 15 ページの “Important Notes” をお読みください。

実験開始前の準備事項

- タバコ吸殻は吸水性が高いため、通常、ステップ2で多量の分解バッファーをサンプルに添加する必要があります。吸水性のあるサンプルに十分な量の分解バッファーを添加するため、使用前に Buffer G2 を精製水で必ず希釈します。希釈は、n+1 のサンプル数 (n は分解するサンプル数) に対して必要な量の Buffer G2 を精製水で 1 : 1 の割合 (1 容量の Buffer G2 に対して 1 容量の蒸留水) で行ないます。希釈した Buffer G2 は DNA の収量あるいは品質に影響を及ぼしません。
- ステップ4での Proteinase K 分解用に、サーモミキサー、ヒートブロック、あるいはウォーターバスを 56℃ に加熱します。
- ステップ5で使用するために、サーモミキサー、ヒートブロック、あるいはウォーターバスを 95℃ に加熱します。

操作手順

1. タバコ吸殻サンプルを 2 ml のサンプルチューブに入れる。
2. 希釈した 190 µl の Buffer G2 をサンプルに添加する。サンプルへのバッファーの吸収量を確認しながら、必要に応じてサンプル容量が 190 µl になるまでサンプルチューブに希釈した Buffer G2 を追加する。

注：“実験を始める前の準備事項” に記載したように希釈した Buffer G2 を用意します。

3. 10 µl の Proteinase K を添加後、10 秒間ボルテックスにより完全に混和する。
4. 56℃ で 15 分間インキュベートする。

インキュベーション中にチューブを 1～2 回ボルテックスするか、サーモミキサーにチューブをセットします。

5. 推奨：95℃で5分間インキュベートする。

サンプルを95℃でインキュベーションすることによりDNA収量が増加することがあります。

6. 必要に応じて、蓋の内側に付いた水滴を落とすためにチューブを指先で軽く叩く。

7. 続いて29ページのプロトコール：DNA精製（“Tip Dance” Protocol）を行なう。

“Tip Dance” Protocolを用いる場合、通常チューブ内の固形物質を除去する必要はありません。

あるいはチップの目詰まりのリスクを回避するため、チューブから固形物質を全部除去します。ピンセットを用いて固形物をチューブの壁に押し付け液体を回収し、最大のサンプル量が得られるようにします。サンプル量は約200 µlになります。続いて26ページのプロトコール：DNA精製（Trace Protocol）を行ないます。

プロトコール：郵便切手の前処理

このプロトコールは、郵便切手からのトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA 精製用にデザインされています。ここでは、Proteinase Kを用いた郵便切手サンプルの予備溶解について記載しています。

スタートサンプル量

0.5～2.5 cm² 片の切手を使用することを推奨します。

実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に英語版 Handbook 15 ページの “Important Notes” をお読みください。

実験開始前の準備事項

- 郵便切手は吸水性が高いため、通常、ステップ2で多量の分解バッファーをサンプルに添加する必要があります。吸水性のあるサンプルに十分な量の分解バッファーを添加するため、使用前に Buffer G2 を精製水で必ず希釈します。希釈は、n+1 のサンプル数（n は分解するサンプル数）に対して必要な量の Buffer G2 を精製水で 1：1 の割合（1 容量の Buffer G2 に対して 1 容量の蒸留水）で行ないます。希釈した Buffer G2 は DNA の収量あるいは品質に影響を及ぼしません。
- ステップ4での Proteinase K 分解用に、サーモミキサー、ヒートブロック、あるいはウォーターバスを 56℃ に加熱します。
- ステップ5で使用するために、サーモミキサー、ヒートブロック、あるいはウォーターバスを 95℃ に加熱します。

操作手順

1. 郵便切手を 2 ml のサンプルチューブに入れる。
2. 希釈した 190 μ l の Buffer G2 をサンプルに添加する。サンプルへのバッファーの吸収量を確認しながら、必要に応じてサンプル容量が 190 μ l になるまでサンプルチューブに希釈した Buffer G2 を追加する。

注：“実験を始める前の準備事項” に記載したように希釈した Buffer G2 を用意します。

3. 10 μ l の Proteinase K を添加後、10 秒間ボルテックスにより完全に混和する。
4. 56℃ で 15 分間インキュベートする。

インキュベーション中にチューブを 1～2 回ボルテックスするか、サーモミキサーにチューブをセットします。

5. 推奨：95℃ で 5 分間インキュベートする。

サンプルを 95℃ でインキュベーションすることにより DNA 収量が増加することがあります。

6. 必要に応じて、蓋の内側に付いた水滴を落とすためにチューブを指先で軽く叩く。
7. 続いて29ページのプロトコール：DNA精製（“Tip Dance” Protocol）を行なう。

“Tip Dance” Protocolを用いる場合、通常チューブ内の固形物質を除去する必要はありません。

あるいはチップの目詰まりのリスクを回避するため、チューブから固形物質を全部除去します。ピンセットを用いて固形物をチューブの壁に押し付け液体を回収し、最大のサンプル量が得られるようにします。サンプル量は約200 μ lになります。続いて26ページのプロトコール：DNA精製（Trace Protocol）を行ないます。

プロトコール：繊維上の斑痕の前処理

このプロトコールは、繊維上の斑痕（例；繊維や皮についた血液や唾液）からのトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA精製用にデザインされています。ここでは、Proteinase Kを用いた繊維上の斑痕の予備溶解について記載しています。いくつかのサンプルでは溶解に多量のバッファーが必要になることがあります；32ページのプロトコール：DNA精製（Large-Volume Protocol）を参照ください。

実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に英語版 Handbook 15 ページの “Important Notes” をお読みください。

実験開始前の準備事項

- 繊維は吸水性が高いため、通常、ステップ2で多量の分解バッファーをサンプルに追加する必要があります。吸水性のあるサンプルに十分な量の分解バッファーを追加するため、使用前に Buffer G2 を精製水で必ず希釈します。希釈は、n+1 のサンプル数（n は分解するサンプル数）に対して必要な量の Buffer G2 を精製水で 1：1 の割合（1 容量の Buffer G2 に対して 1 容量の蒸留水）で行ないます。希釈した Buffer G2 は DNA の収量あるいは品質に影響を及ぼしません。
- ステップ4での Proteinase K 分解用に、サーモミキサー、ヒートブロック、あるいはウォーターバスを 56℃ に加熱します。
- ステップ5で使用するために、サーモミキサー、ヒートブロック、あるいはウォーターバスを 95℃ に加熱します。

操作手順

1. 繊維サンプルを 2 ml のサンプルチューブに入れる。
2. 希釈した 190 μ l の Buffer G2 をサンプルに追加する。サンプルへのバッファーの吸収量を確認しながら、必要に応じてサンプル容量が 190 μ l になるまでサンプルチューブに希釈した Buffer G2 を追加する。
注：“実験を始める前の準備事項” に記載したように希釈した Buffer G2 を用意します。
3. 10 μ l の Proteinase K を添加後、10 秒間ボルテックスにより完全に混和する。
4. 56℃ で 15 分間インキュベートする。
インキュベーション中にチューブを 1～2 回ボルテックスするか、サーモミキサーにチューブをセットします。
5. 推奨：95℃ で 5 分間インキュベートする。
サンプルを 95℃ でインキュベーションすることにより DNA 収量が増加することがあります。

6. 必要に応じて、蓋の内側に付いた水滴を落とすためにチューブを指先で軽く叩く。
7. 続いて29ページのプロトコール：DNA精製（“Tip Dance” Protocol）を行なう。

“Tip Dance” Protocolを用いる場合、通常チューブ内の固形物質を除去する必要はありません。

あるいはチップの目詰まりのリスクを回避するため、チューブから固形物質を全部除去します。ピンセットを用いて固形物をチューブの壁に押し付け液体を回収し、最大のサンプル量が得られるようにします。サンプル量は約200 μ lになります。続いて26ページのプロトコール：DNA精製（Trace Protocol）を行ないます。

プロトコール：ヒト組織の前処理

このプロトコールは、ヒト組織からのトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA 精製用にデザインされています。ここでは、Proteinase Kを用いた組織サンプルの予備溶解について記載しています。

実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に英語版 Handbook 15 ページの “Important Notes” をお読みください。

実験開始前の準備事項

- ステップ 4でのProteinase K分解用に、サーモミキサー、ヒートブロック、あるいはウォーターバスを56℃に加熱します。

操作手順

1. スクリューキャップのついた1.5 mlのチューブ（別途準備）に組織サンプルを入れる。
2. 190 μ lのBuffer G2を添加する。

組織片がBuffer G2に完全に浸っていることを確認します。

3. Proteinase K溶液10 μ lを添加し、チューブを軽く指で叩いて静かに混合する。
4. 組織が完全に溶解するまで56℃でインキュベートする。サンプルを均一にするためにインキュベーション中に1時間に2～3回ボルテックス操作する、またはサーモミキサー、シェーカー付きのウォーターバスあるいはシェーカーを使用する。

溶解時間は使用する組織タイプにより変動します。通常、溶解は3時間で完了します。溶解を一晩中行なっても調製には影響しません。

5. ピペットで数回アップダウンしてサンプルをホモジナイズする。2 mlの新しいサンプルチューブに上清を移す。
6. 続いて29ページのプロトコール：DNA精製 (“Tip Dance” Protocol) を行なう。

“Tip Dance” Protocolを用いる場合、通常チューブ内の固形物質を除去する必要はありません。

あるいはチップの目詰まりのリスクを回避するため、チューブから固形物質を全部除去します。その際は溶解していない大きさの組織片を取り除き、300 x gで1分間遠心します。サンプル量は約200 μ lになります。続いて26ページのプロトコール：DNA精製 (Trace Protocol) を行ないます。

プロトコール：精子細胞が混合した上皮細胞の前処理

このプロトコールは、精子細胞が混合した上皮細胞からのトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA精製用にデザインされています。ここでは、Proteinase KとDTT（dithiothreitol）を用いたサンプルの予備溶解について記載しています。

実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に英語版 Handbook 15 ページの “Important Notes” をお読みください。
- ある種のサンプルタイプ（例；繊維）は吸水性が高いため、通常、ステップ2で多量の分解バッファーをサンプルに添加する必要があります。

実験開始前の準備事項

- ステップ4と12でのProteinase K分解用に、サーモミキサー、ヒートブロック、あるいはウォーターバスを56℃に加熱します。

操作手順

1. 法医学サンプルを1.5 mlか2 mlのサンプルチューブに入れる。
2. 190 μ lのBuffer G2をサンプルに添加する。
3. 10 μ lのProteinase Kを添加後、10秒間ボルテックスにより完全に混和する。
4. 56℃で15分間インキュベートする。
インキュベーション中にチューブを1～2回ボルテックスするか、サーモミキサーにチューブをセットします。
5. チューブの蓋の内側についた水滴を除去するために、簡単に遠心操作をする。
6. チューブから固形物質を全て取り除く。
ピンセットを用いて固形物をチューブの壁に押し付け液体を回収し、最大のサンプル量が得られるようにします。
サンプル量は約200 μ lになります。
7. チューブを15,000 x gで5分間遠心操作する。精子細胞ペレットを乱さないように慎重に上清を新しいチューブに移す。
上皮細胞からのDNAは、26ページのプロトコール：DNA精製（Trace Protocol）、あるいは上皮細胞画分が希薄な場合には、32ページのプロトコール：DNA精製（Large-Volume Protocol）に従って上清を含むチューブから精製できます。
注：細胞ペレットが観察されないことがあります。
8. ペレットを500 μ lのBuffer G2で再懸濁して精子細胞を洗浄する。チューブを15,000 x gで5分間遠心し、上清をデカンテーションにより捨てる。
9. ステップ8を2回あるいは3回繰り返す。
10. ペレットに180 μ lのBuffer G2を添加して、ペレットを再懸濁する。

11. 10 μ l の Proteinase K と 10 μ l の 1 M DTT を添加後、10 秒間ボルテックスにより完全に混和する。
12. シェーカー付きインキュベーターかサーモミキサーを用いて 56 °C、850 rpm で一晩インキュベートする。
13. チューブの蓋の内側についた水滴を除去するために、簡単に遠心操作をする。精子細胞からの DNA はこのチューブから精製できる。
14. 続いて 26 ページのプロトコール：DNA 精製 (Trace Protocol) を行なう。
上皮細胞と精子細胞が別々に入った 2 本のチューブを DNA 精製に直ぐに使用できます。

プロトコール：毛髪の前処理

このプロトコールは、抜けた毛髪サンプルの毛根からのトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA精製用にデザインされています。ここでは、Proteinase KとDTT（dithiothreitol）を用いた毛髪サンプルの予備溶解について記載しています。

スタートサンプル量

抜けた毛髪の毛根から0.5～1 cmの部分を使用することを推奨します。

実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に英語版 Handbook 15ページの“Important Notes”をお読みください。

実験開始前の準備事項

- ステップ4と6でのProteinase K分解用に、サーモミキサー、ヒートブロック、あるいはウォーターバスを56℃に加熱します。

操作手順

1. 毛髪サンプルを2 mlのサンプルチューブに入れる。
2. 180 μ lのBuffer G2をサンプルに添加する。
3. 10 μ lのProteinase Kと10 μ lの1M DTTを添加後、10秒間ボルテックスにより完全に混和する。
4. 反応液を56℃で少なくとも6時間インキュベートする。
インキュベーション中にチューブを1～2回ボルテックスするか、サーモミキサーにチューブをセットします。
5. 10 μ lのProteinase Kと10 μ lの1 M DTTを添加後、10秒間ボルテックスにより完全に混和する。
6. 少なくとも2時間、あるいは毛髪サンプルが完全に溶解するまで56℃でインキュベートする。
7. 必要に応じて、蓋の内側に付いた水滴を落とすためにチューブを指先で軽く叩く。
8. 続いて29ページのプロトコール：DNA精製（“Tip Dance” Protocol）を行なう。
“Tip Dance” Protocolを用いる場合、通常チューブ内の固形物質を除去する必要はありません。
あるいはチップの目詰まりのリスクを回避するため、チューブから固形物質を全部除去します。ピンセットを用いて固形物をチューブの壁に押し付け液体を回収し、最大のサンプル量が得られるようにします。続いて26ページのプロトコール：DNA精製（Trace Protocol）を行ないます。

プロトコール：骨あるいは歯の前処理

このプロトコールは、骨や歯からのトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA 精製用にデザインされています。ここでは、骨や歯の EDTA による石灰質除去および Proteinase K を用いた予備溶解について記載しています。

スタートサンプル量

必ず 200 mg 以下の生体サンプルを使用してください。

実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に英語版 Handbook 15 ページの “Important Notes” をお読みください。
- TissueLyser の取り扱いに熟知した後、このプロトコールを始めてください。TissueLyser Handbook（日本語版プロトコールとトラブルシューティングあり）を参照してください。

実験開始前の準備事項

- ステップ 3 での石灰質除去のために、サーモミキサー、ヒートブロック、あるいはウォーターバスを 37℃ に加熱します。

操作手順

1. 骨や歯の表面を綺麗に取り除く。TissueLyser システムあるいは同様のビーズミルを用いて骨あるいは歯根を粉砕し細かい粉末にする。

TissueLyser を使用する際には、骨サンプルとボールを粉砕ジャーに入れます。粉砕ジャーの中のボールと骨断片の上に液体窒素を注ぎます。温度が平衡になるまで待ちます（液体窒素の沸騰が停止する）。デカンテーションにより過剰な液体窒素を棄て、粉砕ジャーの蓋を閉め、TissueLyser にセットします。骨を 30 Hz で 1 分間、あるいは骨が粉末になるまで粉砕します（粉砕時間は骨のタイプ、状態、大きさにより異なる）。

2. 粉末の骨 150 ~ 200 mg を 2 ml のマイクロ遠心チューブに入れる。
3. 600 ~ 700 μ l の 0.5 M EDTA (pH 8.3) を添加し、37℃ で 24 ~ 48 時間インキュベートする。

インキュベーションの後、次のインキュベーションステップのために 56℃ に設定します。

4. 20 μ l の Proteinase K を添加し、56℃ で 3 時間インキュベートする。

5. **6,000 rpm**で4分間遠心操作を行なう。上清 **200 μ l**をEZ1 サンプルチューブに移す。**26ページ**のプロトコール：**DNA 精製 (Trace Protocol)** で処理する場合は上清 **200 μ l**を、**32ページ**のプロトコール：**DNA 精製 (Large-Volume Protocol)** で処理する場合は上清 **500 μ l**をEZ1 サンプルチューブに移す。
6. 引き続き**26ページ**のプロトコール：**DNA 精製 (Trace Protocol)**、または**32ページ**のプロトコール：**DNA 精製 (Large-Volume Protocol)** を行なう。

プロトコール：土壌の前処理

このプロトコールは、土壌からのトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA精製用にデザインされています。ここでは、土壌サンプルの予備溶解と InhibitEX® 錠剤（弊社テクニカルサポートにお問い合わせください）による阻害物質の吸着について記載しています。

スタートサンプル量

土壌タイプに依存しますが、最高0.5 gまでの土壌を使用します。綿毛化構造の土壌では、スタートサンプルの量を減らします。

実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に英語版 Handbook 15 ページの “Important Notes” をお読みください。
- Proteinase Kはこのプロトコールでは必要ありません。
- このプロトコールでは InhibitEX 錠剤（弊社テクニカルサポートにお問い合わせください）が必要です。

実験開始前の準備事項

- ステップ2で使用するために、サーモミキサー、ヒートブロック、あるいはウォーターバスを95℃に加熱します。

操作手順

1. 土壌サンプルを2 mlのサンプルチューブに入れる。
2. 900 μ lの蒸留水を添加する。ボルテックス操作で土壌を再懸濁後、95℃で10分間インキュベートする。
3. チューブを4,000 x gで10分間遠心操作する。上清を別のサンプルチューブ（2 ml）に分注し、190 μ l Buffer G2を添加する。ボルテックス操作により攪拌する。
4. InhibitEX 錠剤を1錠添加して、室温（15～25℃）で1分間インキュベートする。
5. ボルテックスにより混和し、10,000 x gで2分間遠心操作を行なう。26ページのプロトコール：DNA精製（Trace Protocol）で処理する場合は上清200 μ lを、32ページのプロトコール：DNA精製（Large-Volume Protocol）で処理する場合は上清500 μ lをEZ1サンプルチューブに移す。
6. 引き続き26ページのプロトコール：DNA精製（Trace Protocol）、または32ページのプロトコール：DNA精製（Large-Volume Protocol）を行なう。

プロトコール：その他の法医学サンプルの前処理

このプロトコールは、法医学的に採取した様々なサンプルからのトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA 精製用にデザインされています。ここでは、Proteinase K を用いたサンプルの予備溶解について記載しています。

実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に英語版 Handbook 15 ページの “Important Notes” をお読みください。

実験開始前の準備事項

- ある種のサンプルタイプ（例；血液斑が付着した繊維）は吸水性が高いため、通常、ステップ2で多量の分解バッファーをサンプルに添加する必要があります。吸水性のあるサンプルに十分な量の分解バッファーを添加するため、使用前に Buffer G2 を精製水で必ず希釈します。n+1 のサンプル数（n は分解するサンプル数）に対して必要な量の Buffer G2 を精製水で 1：1 の割合（1 容量の Buffer G2 に対して 1 容量の蒸留水）で希釈します。希釈した Buffer G2 は DNA の収量あるいは品質に影響を及ぼしません。
- ステップ4での Proteinase K 分解用に、サーモミキサー、ヒートブロック、あるいはウォーターバスを 56℃ に加熱します。

操作手順

1. 法医学サンプルを 2 ml のサンプルチューブに入れる。
2. サンプルの種類によりステップ 2a（吸収性のないサンプル）かステップ 2b（吸収性の高いサンプル）を行なう。
 - 2a. 吸収性のないサンプル：
190 μ l の Buffer G2 をサンプルに添加する。
 - 2b. 吸収性の高いサンプル：
希釈した 190 μ l の Buffer G2 をサンプルに添加する。サンプルへのバッファーの吸収量を確認しながら、必要に応じてサンプル容量が 190 μ l になるまでサンプルチューブに希釈した Buffer G2 を追加する。
注：“実験を始める前の準備事項” に記載したように希釈した Buffer G2 を用意します。
3. 10 μ l の Proteinase K を添加後、10 秒間ボルテックスにより完全に混和する。
4. 56℃ で 15 分間インキュベートする。
インキュベーション中にチューブを 1～2 回ボルテックスするか、サーモミキサーにチューブをセットします。
5. 必要に応じて、蓋の内側に付いた水滴を落とすためにチューブを指先で軽く叩く。

6. 続いて29ページのプロトコール：DNA精製（“Tip Dance” Protocol）を行なう。

“Tip Dance” Protocolを用いる場合、通常チューブ内の固形物質を除去する必要はありません。

あるいはチップの目詰まりのリスクを回避するため、チューブから固形物質を全部除去します。ピンセットを用いて固形物をチューブの壁に押し付け液体を回収し、最大のサンプル量が得られるようにします。サンプル量は約200 μ lになります。続いて26ページのプロトコール：DNA精製（Trace Protocol）を行ないます。

プロトコール：DNA精製（Trace Protocol）

このプロトコールは、このハンドブックの適切なプロトコール（3～25ページ）に従って前処理された法医学的なサンプルからのトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA精製用にデザインされています。ここでは、EZ1装置のセットアップおよびスタートのための簡単な操作法について記載しています。

実験を始める前の重要事項

- EZ1 DNA Investigator Kitを初めて使う際には、英語版 Handbook 15ページの“Important Notes”をお読みください。
- 試薬はグアニジン塩を含んでおり、漂白剤を含む殺菌剤と一緒にしないでください。Safety informationは英語版 Handbook 8ページをご覧ください。
- 実験の全ステップは室温（15～25℃）で行なってください。セットアップ操作は迅速に進めてください。
- 操作手順のステップにおいて、次の2種類の値から選択してください。▲；EZ1 AdvancedあるいはEZ1 Advanced XLを使用、●；BioRobot® EZ1を使用

実験開始前の準備事項

- 試薬カートリッジを2～8℃で保存していた場合には、操作する温度に戻してから使用します。英語版 Handbook 20ページ、“Equilibrating reagent cartridges”をお読みください。
- サンプルチューブから固形物質を全て取り除きます。ピンセットを用いて固形物をチューブの壁に押し付け液体を回収し、最大のサンプル量が得られるようにします。
- 試薬カートリッジ中の溶解バッファーが保存中に沈殿物を形成することがあります。必要な場合には、37℃で加温し再溶解した後、室温（15～25℃）で使用します。

操作手順

1. ▲EZ1 Advanced DNA Investigator CardをEZ1 AdvancedのEZ1 Advanced Card用スロットに、あるいはEZ1 Advanced XL DNA Investigator CardをEZ1 Advanced XLのEZ1 Advanced XL Card用スロットに、あるいは●EZ1 DNA Investigator CardをBioRobot EZ1のEZ1 Card用スロットに完全に差し込む。
2. EZ1装置のスイッチを入れる。
3. “START” ボタンを押し、工程を開始する。▲モニターの解説に従ってデータをトラッキングする。
4. “1”（Trace protocol用）を押す。

5. 溶出バッファーおよび容量を選択する：水で溶出する場合には“1”を、TEバッファーで溶出する場合には“2”を押す。“1”、“2”、“3”（あるいは“4”、EZ1 Advanced XLのみ）を押して溶出量を選択する。
6. ディスプレイ上に表示されたテキストにより操作する場合にはいずれかのキーを押して、ワークテーブルのセットアップをスタートする。
テキストは、ワークテーブルへの試薬のセットの仕方を要約したものです。ワークテーブル上に必要な試薬をセットする時は手袋を着用してください。
7. 装置のドアを開ける。
8. 試薬カートリッジを2回転倒し、磁性粒子を混和する。カートリッジを軽く叩いてウェルの底に試薬を回収する。磁性粒子が完全に再懸濁されていることを確認する。
9. カートリッジラックに試薬カートリッジをセットする。
注：試薬カートリッジをカートリッジラックに差し込んだ後、カチツという音がするまでカートリッジを確実に押し込んでください。
10. チップラックの最初の列に蓋を開けたままの溶出チューブをセットする。
11. チップラックの2列目にフィルターチップの入ったチップホルダーをセットする。
12. チップラックの後列に、分解したサンプルが入ったサンプルチューブを蓋を開けたままセットする。
サンプルはこのハンドブックの各々のプロトコールに従って前処理します。
注：data tracking optionを使用する際はデータの混乱を回避するために、サンプルIDがサンプルと同じ順番であることを確認します。
13. 装置のドアを閉める。
14. “START” ボタンを押して、精製工程を開始する。
自動化精製法は15～20分かかります。
15. プロトコールが終了するとディスプレイ上に“Protocol finished”と表示される。
▲ “ENT” を押して、Report fileを作成する。
EZ1 AdvancedおよびEZ1 Advanced XLは10個までのReport fileを保存できます。Report fileを直接印刷することも、コンピューターに転送することも可能です。
16. 装置のドアを開ける。

17. 精製DNAを含む溶出チューブを回収する。このDNA溶液は直ぐに使用でき、2～8℃で24時間、あるいは-20℃で長期間保存可能。サンプル調製廃液を棄てる*。

精製したDNAをリアルタイムPCRで解析する場合には、磁性粒子のコンタミリスクを最小限に抑えるため、適切なマグネットを用いて溶出液の入ったチューブから磁性粒子を分離し、溶出液を新しいチューブに移します。

18. ▲オプション：モニターの解説に従って、UVによりワークテーブル表面のコンタミを除去する。
19. 他のプロトコールを実施するためには、“ESC”を押し、適切なプロトコールに記載されているようにサンプルを前処理して、ステップ4からの操作に従う。その他の場合には、“STOP”を2回押してディスプレイの最初の画面に戻り、装置のドアを開けて、EZ1装置のスイッチを切る。
20. EZ1装置を清掃する。

装置のメンテナンスに関してはEZ1装置のUser Manualに従ってください。

* これはグアニジン塩を含んでいるので漂白剤を含む消毒薬とは一緒に使用しないでください。Safety informationは英語版Handbook 8ページをご覧ください。

プロトコール：DNA精製（“Tip Dance” Protocol）

このプロトコールは、このハンドブックの適切なプロトコール（3～25ページ）に従って前処理された法医学的なサンプルからのトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA精製用にデザインされています。ここでは、EZ1装置のセットアップおよびスタートのための簡単な操作法について記載しています。

この“Tip Dance” protocolでは、ピペッティングの間、ワークテーブルの前後方向の動作により、フィルターチップがサンプルチューブ内で前後に移動します。このプロトコールにより、スワブ、繊維、血液ディスク、タバコの吸殻のような固体サンプルをサンプルチューブ内で直接処理することが可能です。チップを詰まらせる可能性のある固体サンプルを除去するために事前に遠心操作を行なう必要はありません。しかし、脱脂綿のような毛羽のあるスタートサンプルを処理する場合は、繰り返し実験ができないサンプル、あるいは貴重なサンプルでは固形物質を除去することを推奨します（ピンセットを用いて固形物をチューブの壁に押し付け液体を回収し、最大のサンプル量が得られるようにします）。

実験を始める前の重要事項

- EZ1 DNA Investigator Kitを初めて使う際には、英語版 Handbook 15ページの“Important Notes”をお読みください。
- 試薬はグアニジン塩を含んでおり、漂白剤を含む殺菌剤と一緒にしないでください。Safety informationは英語版 Handbook 8ページをご覧ください。
- 実験の全ステップは室温（15～25℃）で行なってください。セットアップ操作は迅速に進めてください。
- 操作手順のステップにおいて、次の2種類の値から選択してください。▲；EZ1 AdvancedあるいはEZ1 Advanced XLを使用、●；BioRobot EZ1を使用

実験開始前の準備事項

- 試薬カートリッジを2～8℃で保存していた場合には、操作する温度に戻してから使用します。英語版 Handbook 20ページ、“Equilibrating reagent cartridges”をお読みください。
- 試薬カートリッジ中の溶解バッファーが保存中に沈殿物を形成することがあります。必要な場合には、37℃で加温し再溶解した後、室温（15～25℃）で使用します。

操作手順

1. ▲EZ1 Advanced DNA Investigator CardをEZ1 AdvancedのEZ1 Advanced Card用スロットに、あるいはEZ1 Advanced XL DNA Investigator CardをEZ1 Advanced XLのEZ1 Advanced XL Card用スロットに、あるいは●EZ1 DNA Investigator CardをBioRobot EZ1のEZ1 Card用スロットに完全に差し込む。

2. EZ1 装置のスイッチを入れる。
3. “START” ボタンを押し、工程を開始する。▲モニターの解説に従ってデータをトラッキングする。
4. “2” (Trace TD protocol 用) を押す。
5. 溶出バッファーおよび容量を選択する：水で溶出する場合には“1”を、TE バッファーで溶出する場合には“2”を押す。“1”、“2”、“3” (あるいは“4”、EZ1 Advanced XLのみ) を押して溶出量を選択する。
6. ディスプレイ上に表示されたテキストにより操作する場合にはいずれかのキーを押し、ワークテーブルのセットアップをスタートする。
テキストは、ワークテーブルへの試薬のセットの仕方を要約したものです。ワークテーブル上に必要な試薬をセットする時は手袋を着用してください。
7. 装置のドアを開ける。
8. 試薬カートリッジを2回転倒し、磁性粒子を混和する。カートリッジを軽く叩いてウェルの底に試薬を回収する。磁性粒子が完全に再懸濁されていることを確認する。
9. カートリッジラックに試薬カートリッジをセットする。
注：試薬カートリッジをカートリッジラックに差し込んだ後、カチツという音がするまでカートリッジを確実に押し込んでください。
10. チップラックの最初の列に蓋を開けたままの溶出チューブをセットする。
11. チップラックの2列目にフィルターチップの入ったチップホルダーをセットする。
12. チップラックの後列に、分解したサンプルが入ったサンプルチューブを蓋を開けたままセットする。
サンプルはこのハンドブックの各々のプロトコールに従って前処理します。
注：data tracking option を使用する際はデータの混乱を回避するために、サンプルIDがサンプルと同じ順番であることを確認します。
13. 装置のドアを閉める。
14. “START” ボタンを押し、精製工程を開始する。
自動化精製法は15～20分かかります。
15. プロトコールが終了するとディスプレイ上に“Protocol finished”と表示される。
▲ “ENT” を押して、Report file を作成する。
EZ1 Advanced および EZ1 Advanced XL は10個までのReport file を保存できます。Report file を直接印刷することも、コンピューターに転送することも可能です。
16. 装置のドアを開ける。

17. 精製DNAを含む溶出チューブを回収する。このDNA溶液は直ぐに使用でき、2～8℃で24時間、あるいは-20℃で長期間保存可能。サンプル調製廃液を棄てる*。

精製したDNAをリアルタイムPCRで解析する場合には、磁性粒子のコンタミリスクを最小限に抑えるため、適切なマグネットを用いて溶出液の入ったチューブから磁性粒子を分離し、溶出液を新しいチューブに移します。

18. ▲オプション：モニターの解説に従って、UVによりワークテーブル表面のコンタミを除去する。
19. 他のプロトコールを実施するためには、“ESC”を押し、適切なプロトコールに記載されているようにサンプルを前処理して、ステップ4からの操作に従う。その他の場合には、“STOP”を2回押ししてディスプレイの最初の画面に戻り、装置のドアを閉めて、EZ1装置のスイッチを切る。
20. EZ1装置を清掃する。

装置のメンテナンスに関してはEZ1装置のUser Manualに従ってください。

* これはグアニジン塩を含んでいるので漂白剤を含む消毒薬とは一緒に使用しないでください。Safety informationは英語版Handbook 8ページをご覧ください。

プロトコール：DNA精製（Large-Volume Protocol）

このプロトコールは、このハンドブックの適切なプロトコール（3～25ページ）に従って前処理された法医学的なサンプルからのトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA精製用にデザインされています。ここでは、EZ1装置のセットアップおよびスタートのための簡単な操作法について記載しています。

スタートサンプル量

本プロトコールを用いて前処理したサンプルを最大500 µlまで調製できます。この方法により、斑痕のように拡散して低濃度DNAを有するサンプルから効率的にDNAが精製できるだけでなく、完全な溶解のために容量が増加したサンプルからのDNA精製も可能です。これらのサンプルでは、必要に応じてBuffer G2量を増加します。Proteinase Kの量は通常増加する必要はありません。

スタンダードなTrace protocolと同じ溶出量でより多量のサンプルを調製できるため、高感度なダウンロードアプリケーションで使用可能な高濃度のDNAを高収量で得ることが可能です。

実験を始める前の重要事項

- EZ1 DNA Investigator Kitを初めて使う際には、英語版 Handbook 15ページの“Important Notes”をお読みください。
- 試薬はグアニジン塩を含んでおり、漂白剤を含む殺菌剤と一緒にしないでください。Safety informationは英語版 Handbook 8ページをご覧ください。
- 実験の全ステップは室温（15～25℃）で行なってください。セットアップ操作は迅速に進めてください。
- このプロトコールでは別途にBuffer MTL（QIAGENテクニカルサポートにお問い合わせください）が必要です。
- 操作手順のステップにおいて、次の2種類の値から選択してください。▲；EZ1 AdvancedあるいはEZ1 Advanced XLを使用、●；BioRobot EZ1を使用

実験開始前の準備事項

- 試薬カートリッジを2～8℃で保存していた場合には、操作する温度に戻してから使用します。英語版 Handbook 20ページ、“Equilibrating reagent cartridges”をお読みください。
- サンプルチューブから固形物質を全て取り除きます。ピンセットを用いて固形物をチューブの壁に押し付け液体を回収し、最大のサンプル量が得られるようにします。
- 試薬カートリッジ中の溶解バッファーが保存中に沈殿物を形成することがあります。必要な場合には、37℃で加温し再溶解した後、室温（15～25℃）で使用します。

操作手順

1. ▲EZ1 Advanced DNA Investigator CardをEZ1 AdvancedのEZ1 Advanced Card用スロットに、あるいはEZ1 Advanced XL DNA Investigator CardをEZ1 Advanced XLのEZ1 Advanced XL Card用スロットに、あるいは●EZ1 DNA Investigator CardをBioRobot EZ1のEZ1 Card用スロットに完全に差し込む。
2. EZ1装置のスイッチを入れる。
3. “START” ボタンを押し、工程を開始する。▲モニターの解説に従ってデータをトラッキングする。
4. “3” (Large-volume protocol用) を押す。
5. 溶出バッファーおよび容量を選択する：水で溶出する場合には“1”を、TEバッファーで溶出する場合には“2”を押す。“1”、“2”、“3” (あるいは“4”、EZ1 Advanced XLのみ) を押して溶出量を選択する。
6. ディスプレイ上に表示されたテキストにより操作する場合にはいずれかのキーを押し、ワークテーブルのセットアップをスタートする。
テキストは、ワークテーブルへの試薬のセットの仕方を要約したものです。ワークテーブル上に必要な試薬をセットする時は手袋を着用してください。
7. 装置のドアを開ける。
8. 試薬カートリッジを2回転倒し、磁性粒子を混和する。カートリッジを軽く叩いてウェルの底に試薬を回収する。磁性粒子が完全に再懸濁されていることを確認する。
9. カートリッジラックに試薬カートリッジをセットする。
注：試薬カートリッジをカートリッジラックに差し込んだ後、カチツという音がするまでカートリッジを確実に押し込んでください。
10. チップラックの最初の列に蓋を開けたままの溶出チューブをセットする。
11. チップラックの2列目にフィルターチップの入ったチップホルダーをセットする。
12. 分解したサンプルを含む各サンプルチューブに400 µlのBuffer MTLを添加する。Buffer MTLと分解したサンプルが入ったサンプルチューブを蓋を開けたままチップラックの後列にセットする。
サンプルはこのハンドブックの各々のプロトコールに従って前処理します。
注：Data tracking optionを使用する際はデータの混乱を回避するために、サンプルIDがサンプルと同じ順番であることを確認します。
13. 装置のドアを閉める。
14. “START” ボタンを押し、精製工程を開始する。
自動化精製法は15～20分かかります。

15. プロトコルが終了するとディスプレイ上に“Protocol finished”と表示される。
▲ “ENT” を押して、Report file を作成する。

EZ1 Advanced および EZ1 Advanced XL は 10 個までの Report file を保存可能です。Report file を直接印刷することも、コンピューターに転送することも可能です。

16. 装置のドアを開ける。
17. 精製 DNA を含む溶出チューブを回収する。この DNA 溶液は直ぐに使用でき、2~8℃で24時間、あるいは-20℃で長期間保存可能。サンプル調製廃液を棄てる*。

精製した DNA をリアルタイム PCR で解析する場合には、磁性粒子のコンタミリスクを最小限に抑えるため、適切なマグネットを用いて溶出液の入ったチューブから磁性粒子を分離し、溶出液を新しいチューブに移します。

18. ▲オプション：モニターの解説に従って、UVによりワークテーブル表面のコンタミを除去する。
19. 他のプロトコルを実施するためには、“ESC” を押し、適切なプロトコルに記載されているようにサンプルを前処理して、ステップ4からの操作に従う。その他の場合には、“STOP” を2回押してディスプレイの最初の画面に戻り、装置のドアを開けて、EZ1 装置のスイッチを切る。
20. EZ1 装置を清掃する。

装置のメンテナンスに関してはEZ1 装置のUser Manualに従ってください。

* これはグアニジン塩を含んでいるので漂白剤を含む消毒薬とは一緒に使用しないでください。Safety information は英語版 Handbook 8 ページをご覧ください。

トラブルシューティング

コメント

一般的な操作

- a) ディスプレイ上にエラーメッセージ
EZ1 装置に付属しているユーザーマニュアルを参照する。
- b) Report file の印刷ができない
“PC/Printer” serial port を介してプリンターと EZ1 Advanced/EZ1 Advanced XL が接続されていることを確認する。
プリンターに接続する serial port にセットしているかどうか確認する。
- c) Report file が PC に転送されない
“PC/Printer” serial port を介して PC と EZ1 Advanced/EZ1 Advanced XL が接続されていることを確認する。
PC に接続する serial port にセットしているかどうか確認する。
- d) 間違えた Q-Card ID を入力
Q-Card ID ではなく間違えた ID を入力すると、EZ1 Advanced/EZ1 Advanced XL は ID をアクセプトせず、正しい ID が入力されるまで Q-Card ID を要求する。“STOP” を 2 回押して、メインメニューに戻る。

DNA 収量が低い

- a) 磁性粒子が完全に再懸濁されていない
磁性粒子を再懸濁するために必ず数回試薬カートリッジを転倒する。
- b) 試薬が十分に吸引されていない
磁性粒子を再懸濁するために試薬カートリッジを転倒した後、ウエルの底に試薬がたまるようにカートリッジを軽く叩く。
- c) 精製した DNA を精製水で保存
精製水の代わりに TE バッファーで溶出する。TE バッファーでの溶出は同等のパフォーマンスを実現し、少量の精製 DNA を長期間保存する際に安定である。
- d) ピペッティング容量がばらつく
ピペッティング精度を上げるために、reagent cartridge 中のバッファー容量が正確であること、またフィルターチップがチップアダプターに完全にフィットしていることを確認する。サンプルを完全に混和したこと、reagent cartridge が使用期限を過ぎていないことを確認する。装置に添付のユーザーマニュアルに記載されている方法で定期的にメンテナンスをする。ユーザーマニュアルに記載されている方法でフィルターチップがフィットしていることを定期的にチェックする。

コメント

DNAを用いたダウンストリーム実験で良い結果がでない

- a) ダウンストリームアプリケーションに使用したDNA量が不十分 可能であれば、より多量の溶出液を使用して再度ダウンストリームアプリケーションを繰り返す。
- b) ダウンストリームアプリケーションで使用したDNA量が多すぎる 多量のDNAはいくつかの酵素の反応を阻害することがある。溶出液を希釈するか、ダウンストリームアプリケーションでより少ない量を使用する。分光光度計で260 nmでの吸光度を測定し、精製DNAを定量する（英語版 Handbook 21 ページの “Quantification of DNA” を参照）。

Appendix A : 少量DNAの精製

このプロトコールは、法医学的なサンプルからのトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA精製用にデザインされています。ここでは、サンプルライセートへのキャリアRNAの添加について記述しています。詳細は次の文献をご覧ください； Kishore, R., Hardy, W.R., Anderson, V.J., Sanchez, N.A., and Buoncristiani, M.P.H. (2006) Optimization of DNA extraction from low-yield and degraded samples using the BioRobot EZ1 and BioRobot M48. J. Forensic Sci. Vol. **51**, No. 5, 1055.

本操作はQIAGENによる検証・至適化はされていません。

実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に英語版 Handbook 15 ページの “Important Notes” をお読みください。

実験開始前の準備事項

- 310 µg のキャリアRNA（凍結乾燥）が入ったチューブに 310 µl のヌクレアーゼフリー水あるいはTEバッファーを添加し、1 µg/µl の溶液を調製します。
- キャリアRNAを完全に溶解し、これを1回分ずつ分注して-70℃で保存します。

操作手順

1. 適切なプロトコール（3～25ページ）に従って、サンプルの前処理を行なう。
2. 解凍した 1 µl のキャリアRNA（1 µg）を各ライセートに添加する。キャリアRNAとサンプルライセートをインキュベートする必要はない。
3. 即座に次のいずれかの精製プロトコールを続けて行なう：26ページのプロトコール：DNA精製（Trace Protocol）、29ページのプロトコール：DNA精製（“Tip Dance” Protocol）、32ページのプロトコール：DNA精製（Large-Volume Protocol）。

Trademarks: QIAGEN®, BioRobot®, EZ1™, InhibitEX® (QIAGEN Group); Dacron® (E. I. du Pont de Nemours and Company); Puritan® (Hardwood Products Company).

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

記載のQIAGEN製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。

© 2009 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

株式会社 キアゲン ■ 〒104-0054 ■ 東京都中央区勝どき3-13-1 ■ Forefront Tower II

Tel:03-6890-7300 ■ Fax:03-5547-0818 ■ E-mail:techservice-jp@qiagen.com

