

英語版 May 2011 に対応

QIAamp® UCP Pathogen Mini プロトコールとトラブルシューティング

全血、スワブ、培養液、体液からの微生物 DNA 精製



Sample & Assay Technologies

目次

プロトコール

400 μ l の全血からの病原体 DNA の前処理 (機械的な前溶解処理プロトコール)	3
400 μ l の全血からの病原体 DNA の前処理 (前溶解処理なしプロトコール)	5
体液あるいは培養液からの微生物 DNA の前処理 (バクテリア 2×10^9 、酵母 5×10^7 まで) (機械的な前溶解処理プロトコール)	6
体液あるいは培養液からの微生物 DNA の前処理 (バクテリア 2×10^9 あるいは酵母 5×10^7 まで) (前溶解処理なしプロトコール)	8
眼、鼻、咽頭やその他のスワブからの微生物 DNA の前処理 (機械的な前溶解処理プロトコール)	9
眼、鼻、咽頭やその他のスワブからの微生物 DNA の前処理 (前溶解処理なしプロトコール)	11
病原体および微生物 DNA 精製 (吸引プロトコール)	12
病原体および微生物 DNA 精製 (スピンプロトコール)	14
トラブルシューティング	16

プロトコール：400 μ l の全血からの病原体 DNA の前処理（機械的な前溶解処理プロトコール）

本プロトコールでは、全血から病原体 DNA を精製するために Pathogen Lysis Tube を用いて機械的溶解を前もって行ないます。

実験開始前の準備事項

- 検体を室温（15～25℃）に戻します。
- Buffer ATL または Buffer APL2 中に沈殿物が形成されている場合は 56℃ で溶解してください。
- プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（12、14 ページ）で使用するために、ウォーターバスまたはヒートブロックを 56℃ に加熱してください。
- ウォーターバスまたはヒートブロックを用意し、両病原体および微生物 DNA 精製用プロトコールのステップ 4 用に 70℃ に加熱します。
- “プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（吸引プロトコール）” のステップ 12、“プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（スピンプロトコール）” のステップ 13 で使用する溶出用 Buffer AVE を室温（15～25℃）に戻します。
- 英語版 Handbook 14 ページの説明に従って Buffer APW1 および Buffer APW2 を調製したことを確認してください。
- 使用前に、100 μ l の Reagent DX を 15 ml の Buffer ATL に添加します。少量が必要な場合は、1.5 ml の Buffer ATL を滅菌済みの 2 ml 容器に入れてから 10 μ l の Reagent DX を添加します。Reagent DX を添加後、よく混和します。調製した溶液は室温（15～25℃）で 6 ヶ月安定です。

操作手順

1. **100 μ l の Buffer ATL (Reagent DX 含有) を新しい Pathogen Lysis Tube に添加する。**
血液中のバクテリアおよび真菌の溶解には Pathogen Lysis Tubes (L) を推奨します。
2. **400 μ l の血液を添加し、10 秒間ボルテックスする。**
3. **Pathogen Lysis Tube を Microtube Foam Insert にセットし、最高スピードで 10 分間ボルテックスする。**

代替方法：Pathogen Lysis Tube を TissueLyser LT にセットして 50 Hz で 10 分間破碎するか、あるいは FastPrep-24 instrument を使用して、6.5 m/s の速度で 45 秒間の振盪を 5 分間のインターバルをおいて 2 回行なってください。

4. ボルテックス終了後 **Pathogen Lysis Tube** を取り出し、蓋内側の液滴を回収するために **8,000 x g** で 5 秒間チューブを遠心操作する。
5. ステップ 4 の上清 **400 µl** を新しい **2 ml** のマイクロ遠心チューブに入れる。
6. 12 ページの “プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（吸引プロトコール）”、あるいは 14 ページの “プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（スピンプロトコール）” に続ける。

プロトコール：400 μ l の全血からの病原体 DNA の前処理（前溶解処理なしプロトコール）

本プロトコールは全血からの病原体 DNA の精製用です。

実験開始前の準備事項

- 検体を室温（15～25℃）に戻します。
- Buffer ATL または Buffer APL2 中に沈殿物が形成されている場合は 56℃ で溶解してください。
- プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（12、14 ページ）で使用するために、ウォーターバスまたはヒートブロックを 56℃ に加熱してください。
- ウォーターバスまたはヒートブロックを用意し、両病原体および微生物 DNA 精製用プロトコールのステップ 4 用に 70℃ に加熱しておきます。
- “プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（吸引プロトコール）” のステップ 12、“プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（スピンプロトコール）” のステップ 13 で使用する溶出用 Buffer AVE を室温（15～25℃）に戻します。
- 英語版 Handbook 14 ページの説明に従って Buffer APW1 および Buffer APW2 を調製したことを確認してください。

操作手順

1. 400 μ l の血液を新しい 2 ml チューブに入れる。
2. 12 ページの “プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（吸引プロトコール）”、あるいは 14 ページの “プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（スピンプロトコール）” に続ける。

プロトコール：体液あるいは培養液からの微生物 DNA の前処理 (バクテリア 2×10^9 、酵母 5×10^7 まで) (機械的な前溶解処理プロトコール)

本プロトコールでは、体液あるいは培養液 (バクテリア 2×10^9 、酵母 5×10^7 まで) から微生物 DNA を精製するために、Pathogen Lysis Tube を用いて機械的溶解を前もって行ないます。

実験開始前の準備事項

- 検体を室温 (15 ~ 25°C) に戻します。
- Buffer ATL または Buffer APL2 中に沈殿物が形成されている場合は 56°C で溶解してください。
- プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製 (12、14 ページ) で使用するのために、ウォーターバスまたはヒートブロックを 56°C に加熱してください。
- ウォーターバスまたはヒートブロックを用意し、両病原体および微生物 DNA 精製用プロトコールのステップ 4 用に 70°C に加熱しておきます。
- “プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製 (吸引プロトコール)” のステップ 12、“プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製 (スピンプロトコール)” のステップ 13 で使用する溶出用 Buffer AVE を室温 (15 ~ 25°C) に戻します。
- 英語版 Handbook 14 ページの説明に従って Buffer APW1 および Buffer APW2 を調製したことを確認してください。
- 使用前に、100 μ l の Reagent DX を 15 ml の Buffer ATL に添加します。少量が必要な場合は、1.5 ml の Buffer ATL を滅菌済みの 2 ml 容器に入れてから 10 μ l の Reagent DX を添加します。Reagent DX を添加後、よく混和します。調製した溶液は室温 (15 ~ 25°C) で 6 ヶ月安定です。

操作手順

1. 1.5 ml までの体液あるいは培養液を Pathogen Lysis tube に入れて最高速度で 5 分間遠心操作する (>14,000 x g)。
2. 上清を除去し棄てる。必要ならば、ステップ 1 および 2 を繰り返す。
ピペットを用いて上清を慎重に取り除きます。ガラスビーズと一緒に除去しないように気をつけます。
3. 500 μ l の Buffer ATL (Reagent DX 含有) を添加し、ペレットを再懸濁する。

4. **Pathogen Lysis Tube** を **Microtube Foam Insert** にセットし、最高スピードで 10 分間ボルテックスする。

代替方法：Pathogen Lysis Tube を TissueLyser LT にセットして 50 Hz で 10 分間破碎するか、あるいは FastPrep-24 instrument を使用して、6.5 m/s の速度で 45 秒間の振盪を 5 分間のインターバルをおいて 2 回行なってください。

5. ボルテックス終了後 **Pathogen Lysis Tube** を取り出し、蓋内側の液滴を回収するために **8,000 x g** で 5 秒間チューブを遠心操作する。
6. **Pathogen Lysis Tube** から上清 **400 µl** を新しい **2 ml** のマイクロ遠心チューブに入れる。ガラスビーズを上清と一緒に取り出さないように気をつける。
7. 12 ページの “プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（吸引プロトコール）”、あるいは 14 ページの “プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（スピンプロトコール）” に続ける。

プロトコール：体液あるいは培養液からの微生物 DNA の前処理（バクテリア 2×10^9 あるいは酵母 5×10^7 まで）（前溶解処理なしプロトコール）

本プロトコールは、体液あるいは培養液（バクテリア細胞 2×10^9 あるいは酵母 5×10^7 まで）からの微生物 DNA の精製が可能です。

実験開始前の準備事項

- 検体を室温（15 ～ 25℃）に戻します。
- Buffer ATL または Buffer APL2 中に沈殿物が形成されている場合は 56℃ で溶解してください。
- プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（12、14 ページ）で使用するのために、ウォーターバスまたはヒートブロックを 56℃ に加熱してください。
- ウォーターバスまたはヒートブロックを用意し、両病原体および微生物 DNA 精製用プロトコールのステップ 4 用に 70℃ に加熱しておきます。
- “プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（吸引プロトコール）” のステップ 12、“プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（スピンプロトコール）” のステップ 13 で使用する溶出用 Buffer AVE を室温（15 ～ 25℃）に戻します。
- 英語版 Handbook 14 ページの説明に従って Buffer APW1 および Buffer APW2 を調製したことを確認してください。

操作手順

1. 1.5 ml までの体液を 2 ml チューブに入れて、最大速度 (>14,000 x g) で 5 分間遠心操作する。
2. 上清を除去し棄てる。必要に応じてステップ 1 および 2 を繰り返す。
3. 400 μ l の Buffer ATL を添加し、細胞ペレットを再懸濁する。
4. 12 ページの “プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（吸引プロトコール）”、あるいは 14 ページの “プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（スピンプロトコール）” に続ける。

プロトコール：眼、鼻、咽頭やその他のスワブからの微生物 DNA の前処理（機械的な前溶解処理プロトコール）

本プロトコールでは、眼、鼻、咽頭、その他スワブから微生物 DNA を精製するために、Pathogen Lysis Tube を用いて機械的溶解を前もって行ないます。

実験開始前の準備事項

- 検体を室温（15～25℃）に戻します。
- Buffer ATL または Buffer APL2 中に沈殿物が形成されている場合は 56℃ で溶解してください。
- この前処理プロトコールのステップ 3 および両病原体および微生物 DNA 精製用プロトコールで使用するため、サーモシェーカーを 56℃ に加熱しておきます。
- ウォーターバスまたはヒートブロックを用意し、両病原体および微生物 DNA 精製用プロトコールのステップ 4 用に 70℃ に加熱しておきます。
- “プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（吸引プロトコール）” のステップ 12、“プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（スピンプロトコール）” のステップ 13 で使用する溶出用 Buffer AVE を室温（15～25℃）に戻します。
- 英語版 Handbook 14 ページの説明に従って Buffer APW1 および Buffer APW2 を調製したことを確認してください。
- 使用前に、100 µl の Reagent DX を 15 ml の Buffer ATL に添加します。少量が必要な場合は、1.5 ml の Buffer ATL を滅菌済みの 2 ml 容器に入れてから 10 µl の Reagent DX を添加します。Reagent DX を添加後、よく混和します。調製した溶液は室温（15～25℃）で 6 ヶ月安定です。

操作手順

1. スワブの先を切り落として 2 ml のマイクロ遠心チューブに入れる。
2. 650 µl の Buffer ATL（Reagent DX 含有）を添加する。
3. サーモシェーカーにチューブをセットして、600 rpm で振盪させながら 56℃ で 10 分間インキュベートする。
4. 2 ml のマイクロ遠心チューブを開いて全溶液を慎重に Pathogen Lysis Tube へ移す。
5. Pathogen Lysis Tube を Microtube Foam Insert にセットし、最高スピードで 10 分間ボルテックスする。

代替方法：Pathogen Lysis Tube を Tissuelyser LT にセットして 50 Hz で 10 分間破砕するか、あるいは FastPrep-24 instrument を使用して、6.5 m/s の速度で 45 秒間の振盪を 5 分間のインターバルをおいて 2 回行なってください。

6. ボルテックス終了後 **Pathogen Lysis Tube** を取り出し、蓋内側の液滴を回収するために **8,000 x g** で 5 秒間チューブを遠心操作する。
7. **Pathogen Lysis Tube** から上清 (約 **400 µl**) を新しい **2 ml** のマイクロ遠心チューブに入れる。ガラスビーズを上清と一緒に取り出さないように気をつける。
8. 12 ページの “プロトコール：病原体および微生物 **DNA** 精製 (吸引プロトコール)”、あるいは 14 ページの “プロトコール：病原体および微生物 **DNA** 精製 (スピンプロトコール)” に続ける。

プロトコール：眼、鼻、咽頭やその他のスワブからの微生物 DNA の前処理（前溶解処理なしプロトコール）

これは、眼、鼻、咽頭、その他スワブから微生物 DNA を精製するためのプロトコールです。

実験開始前の準備事項

- 検体を室温（15～25℃）に戻します。
- Buffer ATL または Buffer APL2 中に沈殿物が形成されている場合は 56℃ で溶解してください。
- この前処理プロトコールのステップ 3 および両病原体および微生物 DNA 精製用プロトコールで使用するため、サーモシェーカーを 56℃ に加熱しておきます。
- ウォーターバスまたはヒートブロックを用意し、両病原体および微生物 DNA 精製用プロトコールのステップ 4 用に 70℃ に加熱しておきます。
- プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（吸引プロトコール）のステップ 12、プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（スピンプロトコール）のステップ 13 で使用する溶出用 Buffer AVE を室温（15～25℃）に戻します。
- 英語版 Handbook 14 ページの説明に従って Buffer APW1 および Buffer APW2 を調製したことを確認してください。

操作手順

1. スワブの先端を切り落として 2 ml のマイクロ遠心チューブに入れる。
2. 500 µl の Buffer ATL を添加する。
3. サーモシェーカーにチューブをセットして、600 rpm で振盪させながら 56℃ で 10 分間インキュベートする。
4. 2 ml のチューブを開いて全溶液を慎重に新しい 2 ml のチューブに移す。
5. 12 ページの“プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（吸引プロトコール）”、あるいは 14 ページの“プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（スピンプロトコール）”に続ける。

プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製 (吸引プロトコール)

本プロトコールは、吸引法（推奨）を用いて、前処理した 400 µl サンプルから微生物 DNA を精製するためのものです。前処理した 400 µl のサンプルからのスピンプロトコールを用いた DNA 精製は、14 ページのスピンプロトコール “プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（スピンプロトコール）” をご覧ください。

操作手順

1. 40 µl の **proteinase K** を添加し、10 秒間ボルテックスして検体を混和する。
2. 検体を 56°C で 10 分間インキュベートする。
3. 検体に 200 µl の **Buffer APL2** を添加する。蓋を閉めて、パルスボルテックスで 30 秒間混和する。

注：効率的に病原体を溶解するためには、検体と **Buffer APL2** を十分に混和し、完全に均一な溶液を形成することが重要です。

4. 70°C で 10 分間インキュベートする。
5. チューブをスピンドウンし、蓋の内側に付着した溶液を回収する。
6. 300 µl エタノールをライセートに添加する。蓋を閉め、15 ~ 30 秒間パルスボルテックスして完全に混和する。
7. **QIAamp UCP Mini Column** の **Tube Extender** にステップ 6 のライセートを慎重にアプライする。真空ポンプのスイッチを入れる。すべてのライセートがカラムを通過した後、真空ポンプのスイッチを切り、吸引力を 0 mbar にする。**Tube Extender** を慎重に取り外し、廃棄する。

クロスコンタミを回避するために、**Tube Extender** を取り除く際に隣接する **QIAamp UCP Mini Column** の上を通らないように注意します。

8. 600 µl の **Buffer APW1** を **QIAamp UCP Mini Column** に添加する。カラムの蓋を開けたままで真空ポンプのスイッチを入れる。すべての **Buffer APW1** が **QIAamp UCP Mini Column** を通過した後、真空ポンプのスイッチを切り、吸引力を 0 mbar にする。
9. 750 µl の **Buffer APW2** を **QIAamp UCP Mini Column** に添加する。カラムの蓋を開けたままで真空ポンプのスイッチを入れる。すべての **Buffer APW2** が **QIAamp UCP Mini Column** を通過した後、真空ポンプのスイッチを切り、吸引力を 0 mbar にする。
10. **QIAamp Mini Column** の蓋を閉める。吸引マニホールドから取り除き、**VacConnector** は捨てる。**QIAamp UCP Mini Column** を新しい 2 ml コレクションチューブに移し、最高速度 (20,000 x g ; 14,000 rpm) で 3 分間遠心操作する。
11. **QIAamp UCP Mini Column** を新しい 2 ml のコレクションチューブにセットする。蓋を開き、56°C で 3 分間インキュベートして、メンブレンを完全に乾燥させる。

12. QIAamp UCP Mini Column を新しい 1.5 ml 溶出用チューブに移し、コレクションチューブは捨てる。20 ~ 100 μ l の Buffer AVE を QIAamp UCP Mini メンブレンの中央に慎重にアプライする。蓋を閉め、室温で 1 分間インキュベートする。

重要：溶出バッファーを室温に戻したことを確認します。少量（50 μ l 未満）で溶出を行なう場合は、メンブレンの中央に溶出バッファーをアプライすることで、カラムに結合した DNA が完全に溶出されるようにします。溶出バッファーの量は、ダウンストリームのアプリケーションでの必要性に応じて調節可能です。回収される溶出液量は、カラムにアプライした溶出用バッファー量よりも 5 μ l（最高）少なくなります。

13. 最高速度（20,000 x g ; 14,000 rpm）で 1 分間遠心操作し、DNA を溶出する。
14. ステップ 12 および 13 を繰り返す。

プロトコール：サンプル調製（スピンプロトコール）

本プロトコールは、マイクロ遠心機を用いて、前処理した 400 μ l サンプルから微生物 DNA を精製します。吸引プロトコールを用いた前処理した 400 μ l サンプルからの DNA 精製は、12 ページの“プロトコール：病原体および微生物 DNA 精製（吸引プロトコール）”をご覧ください。

操作手順

1. 40 μ l の **proteinase K** を添加し、10 秒間ボルテックスする。
2. 検体を 56°C で 10 分間インキュベートする。
3. 検体に 200 μ l の **Buffer APL2** を添加する。蓋を閉めて、パルスボルテックスで 30 秒間混和する。
注：効率的に病原体を溶解するためには、検体と **Buffer APL2** を十分に混和し、完全に均一な溶液を形成することが重要です。
4. 70°C で 10 分間インキュベートする。
5. チューブをスピンドウンし、蓋の内側に付着した溶液を回収する。
6. 300 μ l のエタノールをライセートに添加する。蓋を閉め、15 ~ 30 秒間パルスボルテックスして完全に混和する。
7. ステップ 6 の混合液 600 μ l を **QIAamp UCP Mini Spin Column** (2 ml コレクションチューブ中) にカラムの縁を濡らさないように注意してアプライする。蓋を閉めて 6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心分離する。**QIAamp UCP Mini Spin Column** を新しい 2 ml コレクションチューブ (付属品) に移し、ろ液の入っているコレクションチューブは廃棄する。
遠心分離中のエアゾール形成を避けるために、各スピнкаラムは密閉してください。
8. **QIAamp UCP Mini Spin Column** にステップ 6 の残りの混合液をアプライし、ステップ 7 を繰り返す。
9. **QIAamp UCP Mini Spin Column** を慎重に開き、カラムの縁を濡らさないように 600 μ l の **Buffer APW1** を添加する。蓋を閉めて 6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心分離する。**QIAamp UCP Mini Spin Column** を新しい 2 ml コレクションチューブ (別途準備) に移し、ろ液の入っているコレクションチューブは廃棄する*。
10. **QIAamp UCP Mini Spin Column** を慎重に開き、カラムの縁を濡らさないように 750 μ l の **Buffer APW2** を添加する。蓋を閉めて最高速度 (20,000 x g、14,000 rpm) で 3 分間遠心分離する。

* フロースルー液は **Buffer APL2** あるいは **Buffer APW1** を含んでいるので、漂白剤と一緒にしないでください。“Safety Information” は英語版 Handbook 7 ページをご覧ください。

11. 推奨:QIAamp UCP Mini Spin Columnを新しい2 mlのコレクションチューブ(別途準備)にのせ、ろ液の入っている古いコレクションチューブは廃棄する。最高速度で1分間遠心操作を行なう。

このステップにより Buffer APW2 のキャリーオーバーの可能性を排除することができます。

12. QIAamp UCP Mini Columnを新しい2 mlのコレクションチューブにセットする。蓋を開き、56℃で3分間インキュベートして、メンブレンを完全に乾燥させる。
13. QIAamp UCP Mini Columnを新しい1.5 ml 溶出用チューブに移し、コレクションチューブは捨てる。20 ~ 100 μ l の Buffer AVE を QIAamp UCP Mini メンブレンの中央に慎重にアプライする。蓋を閉め、室温で1分間インキュベートする。

重要: 溶出バッファーを室温に戻したことを確認します。少量 (50 μ l 未満) で溶出を行なう場合は、メンブレンの中央に溶出バッファーをアプライすることで、カラムに結合した DNA が完全に溶出されるようにします。溶出バッファーの量は、ダウンストリームのアプリケーションでの必要性に応じて調節可能です。回収される溶出液量は、カラムにアプライした溶出用バッファー量よりも5 μ l (最高) 少なくなります。

14. 最高速度 (20,000 \times g ; 14,000 rpm) で1分間遠心操作し、DNAを溶出する。
15. ステップ13および14を繰り返す。

トラブルシューティング

コメント

微生物・病原体 DNA が溶出液にほとんどあるいは全く溶出されていない

- a) 採血管に EDTA 以外の抗凝固剤が入っている
EDTA 以外の抗凝固剤では血液中の DNA が急速に分解する可能性がある。新しい検体で精製操作を再度行なう。
- b) 病原体の機械的な溶解が不完全
Pathogen Lysis Tube を Vortex-Genie の Microtube foam insert を用いて 10 分間ボルテックスするか、TissueLyser LT にセットして 50 Hz で 10 分間破碎するか、または FastPrep-24 instrument を使用し、45 秒間の振盪を 5 分間のインターバルをおいて 2 回行なったことを確認する。
- c) 96 ~ 100%ではなく低濃度のエタノールを使用
新しい検体と 96 ~ 100%エタノールで精製操作を繰り返す。メタノールやメチルエチルケトンのような物質を含んだ変性アルコールは使用しない。
- d) Buffer APW1 あるいは Buffer APW2 の調製が不正確
オリジナルの Buffer APW1 および Buffer APW2 濃縮液をエタノールで正確に希釈したか確認する（英語版 Handbook 14 ページ参照）。新しい検体で精製操作を再度行なう。
- e) Buffer APW1 あるいは Buffer APW2 を 70%エタノールで調製
オリジナルの Buffer APW1 および Buffer APW2 濃縮液を 96 ~ 100%エタノールで正確に希釈したか確認する（英語版 Handbook 14 ページ参照）。新しい検体で精製操作を再度行なう。
- f) QIAamp UCP Mini Column を室温（15 ~ 25℃）で 1 分間インキュベートしなかった
Buffer AVE を添加後、QIAamp UCP Mini Column を室温で 1 分間インキュベートする。

コメント

溶出した核酸を用いたダウンストリーム実験で良い結果がでない

- | | |
|---|--|
| a) 溶出液中に DNA が少ないか皆無 | “微生物・病原体 DNA が溶出液にほとんどあるいは全く溶出されていない” (16 ページ) の項で原因を調べる。可能なら、アッセイに使用する溶出液量を増やす。 |
| b) 使用した溶出液量が適切でない | ダウンストリーム反応に適した溶出液の最大量を決める。それに従って、ダウンストリーム反応に加える溶出液量を増やすか減らす。それに従って溶出に用いるバッファー量を調節する。 |
| c) バッファー類を完全に混和していない | 洗浄用 Buffer APW2 の塩分およびエタノール成分が、次の実験まで長期間放置されたために分離した。各精製実験前に、常にバッファーを完全に混和する。 |
| d) Buffer APW1 と Buffer APW2 の順番を間違えて使用 | Buffer APW1 と Buffer APW2 をプロトコールの順序に従って使用したか確認。新しい検体で再度精製を行なう。 |
| e) ダウンストリーム反応の感度が低下 | ダウンストリーム反応にテンプレートとして添加する溶出液の量を調節する。 |
| f) 溶出溶液中にエタノールが残留 | それぞれのプロトコールに記載されている乾燥ステップを行なう。 |

Buffer APL2 の添加後、白色沈殿物を形成

Buffer APL2 の添加後、白色沈殿物を形成	ほとんどの場合、Buffer APL2 の添加後に形成した沈殿物は 70℃でのインキュベーション中に溶解される。この沈殿物は操作やその後のアプリケーションに影響しない。
---------------------------	--

Buffer ATL あるいは Buffer APL2 中の白色沈殿物

白色沈殿物は低温での保存あるいは長期保存により形成される	Buffer ATL あるいは Buffer APL2 中のほとんどの沈殿物は 56℃でのインキュベーションにより溶解される。この沈殿物はキットの性能に影響しない。沈殿物を高温で溶解しても、精製される核酸の収量あるいは品質に影響を及ぼさない。
------------------------------	---

コメント

メンブレンが目詰まり

- a) 吸引力が-800 ~
-900 mbar に達して
いない

吸引マニホールドをしっかりと閉じていない。吸引装置のスイッチを入れた後、吸引マニホールドの蓋を下に押す。吸引力が十分であるかチェックする。

QIAvac 蓋のガスケットが劣化している。吸引マニホールドのシールをチェックし、必要なら交換する。

VacValve に欠陥がある。VacValve をすべて取り外し、VacConnector を直接 luer extension に挿入する。QIAamp UCP Mini Column を VacConnector に挿入し、カラムの蓋を閉じ、真空ポンプのスイッチを入れる。吸引力が十分であるかチェックする。必要ならば VacValve を交換する。

真空ポンプへの連結部で漏れがある。Luer cap で luer extension をすべて閉じて、真空ポンプのスイッチを入れる。ポンプのスイッチを入れた後（かつ vacuum regulator valve を閉じた後）、吸引力が安定しているかをチェックする。必要ならポンプと吸引マニホールドの連結部を交換する。

上記全てをチェック後、吸引力が十分でない場合は、より吸引力の強い真空ポンプと交換する。

- b) タンパク質分解が
不完全

Proteinase K を長時間・高温度で保管した場合、活性が低下することがある。新しい検体と新しく調製した Proteinase K を用いて操作を繰り返す。

コメント

- c) メンブレンが目詰まり VacValve (使用している場合) を閉じて、Tube Extender のライセートが漏れないように Tube Extender、QIAamp UCP Mini Column、VacConnector、VacValve を QIAvac 24 Plus マニホールドから取り外す。Tube Extender に残っているライセートを、新しい 2 ml チューブに慎重に移す。装置 (上記参照) から QIAamp UCP Mini Column を取り外し、2 ml のコレクションチューブにセットし、1 分間あるいはサンプルが完全にメンブレンを完全に通過するまで最高速度で遠心操作する。QIAamp UCP Mini Column、Tube Extender、VacConnector およびオプションの VacValve をもう一度組み立てる。残りのサンプルライセートを Tube Extender に移し、吸引ポンプのスイッチを入れ、VacValve を開き、残りのライセートを QIAamp UCP Mini Spin Column に通過させる。
- QIAamp UCP Mini Spin Column の目詰まりが続く場合、上の操作を繰り返す。

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp® (QIAGEN Group); TurboMix® (Bete Fog Nozzle, Inc.).

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。

© 2011 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

