

QIAamp[®] *cador*[™] Pathogen Mini プロトコールとトラブルシューティング

動物の全血、血清、血漿、その他の体液、スワブおよび
洗浄液、組織からのウイルス RNA および DNA、
バクテリア DNA の精製



目次

プロトコール

| | |
|--|----|
| 液状サンプル中の病原体核酸の精製 | 3 |
| Pretreatment B1 — 全血あるいは前処理した組織中の溶解困難な バクテリア用 | 6 |
| Pretreatment B2 — 無細胞体液中の溶解困難なバクテリア用 | 7 |
| Pretreatment B3 — 大量の無細胞体液中の溶解容易なバクテリア用 | 8 |
| Pretreatment T1 — 組織の機械的破碎 | 9 |
| Pretreatment T2 — 組織の酵素分解 | 10 |
| Pretreatment T3 — 迅速な組織の部分破碎 | 12 |
| Pretreatment T4 — 特殊な組織のための有機溶媒抽出 | 13 |
| トラブルシューティング | 15 |

プロトコール：液状サンプル中の病原体核酸の精製

本プロトコールは、液状サンプルや前処理した組織サンプルからのウイルス RNA および DNA、ならびに溶解容易なバクテリア DNA の精製用です。スタートサンプル量は最大 200 μ l まで使用できます。

実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に英語版 Handbook 14 ページの “Important Notes” をお読みください。
- Buffers ACB、Buffer AW1、および Buffer AW2 と Carrier RNA が英語版 Handbook 17 ページの “Preparing reagents” の説明に従って調製されていることを確認します。
- Buffer VXL あるいは Buffer ACB に沈殿物がないことを確認します。必要に応じて、Buffer VXL または ACB を 37°C で 30 分間インキュベートし、時々攪拌して沈殿物を溶解します。

実験開始前の準備事項

- 必要に応じて、サンプルを解凍し室温（15 ~ 25°C）に戻します。
- サンプル量が 200 μ l より少ない場合には、PBS あるいは 0.9% NaCl を加えて最終容量を 200 μ l に調整します。
- 必要に応じて、Buffer VXL と Carrier RNA の混合液を Table 3（英語版 Handbook 18 ページ）に従って調製し、ステップ 3 で使用します。

注意：Buffer VXL/Carrier RNA/ インターナルコントロールの混合液の容量が、実施するサンプル精製のトータル数に必要な量の 10% 増しになるように調製します。

表 5. Buffer VXL/Carrier RNA 混合液の調製

| 試薬名 | サンプル数 | | |
|----------------------------------|-------------|------------|------------|
| | 1 | 12* | 30* |
| Buffer VXL | 100 μ l | 1.32 ml | 3.3 ml |
| Carrier RNA (1 μ g/ μ l) | 1 μ l | 13 μ l | 33 μ l |

* ピペティングのエラーと蒸発の可能性を補うために、必要な容量の 110% を調製します。

操作手順

1. **20 µl の proteinase K を 2 ml のマイクロ遠心チューブ（別売）にピペットで入れる。**
2. **200 µl の液状サンプルを proteinase K に添加する。**
注意：サンプル量が少ない場合は、PBS あるいは 0.9% NaCl を加えて容量を 200 µl に調整します。
3. **100 µl の Buffer VXL を添加する。蓋を開けて、パルスボルテックスで混和する。**
十分に溶解するために、サンプルと Buffer VXL を混和し、完全に均一な溶液にします。Buffer ATL の入った液状サンプルを取り扱う場合（組織の酵素分解の後など）、沈殿が生じることがあります。沈殿物は 56℃ の短時間のインキュベーションで溶解できます。しかし、続くプロトコールのステップには影響を及ぼすことはありません。
注意：無細胞サンプルを取り扱う際には、100 µl の Buffer VXL あたり 1 µg の Carrier RNA を使用前に添加してください。全血や組織などの細胞を多量に含むサンプルを取り扱う際には Carrier RNA を添加しないでください。
4. **20 ~ 25℃ で 15 分間インキュベートする。**
5. **スピンドウンして 2 ml チューブの蓋の内側に付着した溶液を回収する。**
6. **350 µl の Buffer ACB をサンプルに添加し、蓋を開けてパルスボルテックスで十分に混和する。**
使用前に Buffer ACB 濃縮液にイソプロパノールを添加したことを確認します。
7. **2 ml チューブをスピンドウンして蓋の内側に付着した溶液を回収する。**
8. **2 ml コレクションチューブにセットした QIAamp Mini Column のカラムの縁を濡らさないように注意して、ステップ 7 のライセートをアプライする。蓋を開けて 6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心分離する。QIAamp Mini Column を新しい 2 ml コレクションチューブに移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる。**
遠心操作の後、ライセートが完全にカラムを通過していない場合には、QIAamp Mini Column が空になるまでさらに高速（最高 20,000 x g ; 14,000 rpm）で遠心操作を行ないます。
9. **QIAamp Mini Column を開き、カラムの縁を濡らさないように 600 µl の Buffer AW1 を添加する。蓋を閉め 6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。QIAamp Mini Column を新しい 2 ml コレクションチューブにセットして、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。**
10. **QIAamp Mini Column を開き、カラムの縁を濡らさないように 600 µl の Buffer AW2 を添加する。蓋を閉め 6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。QIAamp Mini Column を新しい 2 ml コレクションチューブにセットして、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。**

11. 最高速度 (20,000 x g ; 14,000 rpm) で 2 分間遠心操作してメンブレンを乾燥させる。
12. QIAamp Mini Column を新しい 1.5 ml マイクロチューブ (別途準備) にセットして、ろ液を含むコレクションチューブは捨てる。QIAamp Mini Column の蓋を開き、50 ~ 150 μ l の Buffer AVE をメンブレンの中央にアプライする。蓋を閉めて、室温 (15 ~ 25°C) で 1 分間インキュベートする。最高速度 (20,000 x g ; 14,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。

重要：溶出バッファーを室温に戻したことを確認します。少量で溶出を行なう場合は (<75 μ l)、溶出バッファーをメンブレンの中央にアプライし、カラムに結合した RNA および 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。

遠心分離中の騒音を減少するために、遠心操作を 6,000 x g で行なうこともできます。最終的に、再回収される溶出液量は、カラムにアプライした溶出バッファーよりも約 5 μ l 少なくなります。

Pretreatment B1 — 全血あるいは前処理した組織中の溶解困難なバクテリア用

この前処理は、全血あるいは前処理した組織中の溶解困難なバクテリアから DNA を抽出するためのものです。

実験を始める前の重要事項

- Buffer ATL ならびにガラスピースが入った Pathogen Lysis Tubes L (Reagent DX 含有) は別途ご注文が必要です (英語版 36 ページの “Ordering Information” 参照)。
- Buffer ATL は保存中に沈殿物を形成することがあります。必要に応じて、56℃ で加熱して沈殿物を完全に溶かします。

実験開始前の準備事項

- 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。
2. 400 μ l の血液あるいはその他の液状サンプルを加える。
スタートサンプル量が少ない場合は、PBS あるいは 0.9% NaCl を加えて容量を 400 μ l に調整します。
3. Pathogen Lysis Tube を、Microtube Foam Insert をセットしたボルテックスに置き、最高スピードで 10 分間混和する。
あるいは、Pathogen Lysis Tube を Tissuelyser LT で 50 Hz、10 分間処理、または FastPrep-24 で速度 6.5 m/s、45 秒を 2 回のセットで、間に 5 分間の休止時間を入れて処理します。
4. Pathogen Lysis Tube をボルテックスから取り出し、スピンドウンして蓋の内側に付着した溶液を回収する。
上清 200 μ l をスタートサンプルとして 3 ページのプロトコール “液状サンプル中の病原体核酸の精製” に使用します。

Pretreatment B2 — 無細胞体液中の溶解困難なバクテリア用

この前処理は、血清などの無細胞体液から溶解困難なバクテリアから DNA を抽出するためのものです。

実験を始める前の重要事項

- Buffer ATL、ならびにガラスビーズが入った Pathogen Lysis Tubes L または S (Reagent DX 含有) は別途ご注文が必要です (英語版 36 ページの “Ordering Information” 参照)。

注意: L または S のどちらのチューブを使用するかは、ターゲットのバクテリアにより異なります。

- Buffer ATL は保存中に沈殿物を形成することがあります。必要に応じて、56°C で加熱して沈殿物を完全に溶かします。

実験開始前の準備事項

- 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°C) で 6 ヶ月安定です。

操作手順

1. 1.5 ml までの液状サンプルを Pathogen Lysis Tube に入れて最高速度 (>14,000 x g) で 5 分間遠心操作する。
2. 上清を除去し捨てる。必要に応じて、ステップ 1 と 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。ガラスビーズを一緒に除去しないように気をつけます。
3. 500 µl 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 をセットしたボルテックスに置き、最高スピードで 10 分間混和する。
あるいは、Pathogen Lysis Tube を Tissuelyser LT で 50 Hz、10 分間処理、または FastPrep-24 で速度 6.5 m/s、45 秒のセットを 2 回、間に 5 分間の休止時間を入れて処理します。
5. Pathogen Lysis Tube をボルテックスから取り出し、スピンドウンして蓋の内側に付着した溶液を回収する。
上清 200 µl をスタートサンプルとして 3 ページのプロトコール “液状サンプル中の病原体核酸の精製” に使用します。

Pretreatment B3 — 大量の無細胞体液中の溶解容易な バクテリア用

このオプションの前処理は、血清などの無細胞体液から溶解容易なバクテリア DNA を抽出するために、大量のサンプルを用いて感度を増やすためにデザインされています。

操作手順

1. 1.5 ml までの液状サンプルを 2 ml のマイクロ遠心チューブに入れて、最高速度 (>14,000 x g) で 5 分間遠心操作する。
2. 上清を除去し捨てる。必要に応じて、ステップ 1 と 2 を繰り返す。
3. 激しくボルテックスしてペレットを PBS 200 μ l で再懸濁する。
ステップ 3 の 200 μ l をスタートサンプルとして 3 ページのプロトコール “液状サンプル中の病原体核酸の精製” に使用します。

Pretreatment T1 — 組織の機械的破碎

この前処理は、ほとんどの種類の組織からウイルス RNA およびウイルス DNA の抽出に使用します。ここで使用する遠心分離ステップは、バクテリア DNA には適していません。

実験を始める前の重要事項

- ステンレススチール製ビーズは別途ご注文が必要です（英語版 36 ページの“Ordering Information” 参照）。

操作手順

1. ステンレススチールビーズ（平均粒径 5 mm）1 個が入った 2 ml のマイクロ遠心チューブに 25 mg 以下の組織を入れる。

一定重量中に非常に多くの細胞数を含む組織（脾臓など）に関しては、スタートサンプル量を減らして（5 ~ 10 mg）ご使用ください。

繊維性組織を調製する場合には、破碎開始前に組織を小さくカットすると破碎効率がよくなります。

2. 300 μ l の PBS あるいは 0.9% NaCl 溶液を各チューブに入れる。
3. TissueLyser II Adapter Set にチューブをセットする。
4. TissueLyser II で 25 Hz、2 分間破碎する。

オプション：繊維性組織を調製する場合には、アダプターセットを外して、TissueLyser II に一番近いチューブが一番遠くなるようにチューブのラックを回転し、アダプターセットをもう一度組み立てます。TissueLyser II にセットし 25 Hz でさらに 2 分間破碎します。

5. アダプターセットを外す。サンプルを 14,000 x g、室温（15 ~ 25°C）で 2 分間遠心操作する。
6. ステップ 5 の上清 200 μ l をスタートサンプルとして 3 ページのプロトコール“液状サンプル中の病原体核酸の精製”に使用する。

繊維性組織に関しては完全な破碎が行えない場合があります。固形粒子が精製プロトコールに混入しないことを確認してください。

Pretreatment T2 — 組織の酵素分解

この前処理は、ほとんどの種類の組織からのバクテリア DNA およびウイルス DNA 抽出に適しています。溶解条件は RNA の完全性を十分に保持することはできないので、ウイルス RNA には適していません。

実験を始める前の重要事項

- Buffer ATL は別途ご注文が必要です（英語版 36 ページの “Ordering Information” 参照）。

実験開始前の準備事項

- Buffer ATL は保存中に沈殿物を形成することがあります。必要に応じて、56°C で加熱して沈殿物を完全に溶かします。
- 前処理プロトコールのステップ 3 で使用するサーモミキサーブロック、シェーカー付ウォーターバスあるいは rocking platform を前もって 56°C に設定します。

操作手順

1. **25 mg 以下の組織を細かくカットし、2 ml のマイクロ遠心チューブに入れる。180 μ l の Buffer ATL を添加する。**

一定重量中に非常に多くの細胞数を含む組織（脾臓など）に関しては、スタートサンプル量を減らして（5 ~ 10 mg）ご使用ください。効率的に溶解するために、組織を小さくカットすることをお奨めします。

2. **20 μ l の proteinase K を添加する。蓋を閉めて、ボルテックスで完全に混和する。チューブをスピンドウンして蓋に付着した溶液を回収する。**

注意：この前処理を使用する場合、続く精製プロトコール（3 ページのプロトコール “液状サンプル中の病原体核酸の精製”）のステップ 1 で proteinase K を使用しないでください。この酵素分解により、後のステップでのこの試薬を使う必要はありません。

- 3. 組織が完全に溶解するまで、56℃で一定に攪拌しながらインキュベートする。**
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1～3時間で完了します。オーバーナイトの溶解が可能です。特殊な種類のサンプルに関しては検証が必要です。

インキュベーション後、ライセートに粘性が観察されることがありますが、ゼラチン状であってはなりません。インキュベーションとボルテックス操作の後にゼラチン状のペレットが残っている場合には、56℃での proteinase K 分解のためのインキュベーション時間を延長するか proteinase K の量を 40 µl まで増やします。このタイプの組織で次回調製する際は、スタートサンプルの量を減らします。

サーモミキサー、シェーカー付ウォーターバスあるいは rocking platform が入手不可能な場合は、ヒートブロックあるいはウォーターバスでインキュベートし、サンプルを溶解するために、時々ボルテックスします。

- 4. オプション（ウイルス DNA あるいは溶解容易な細菌の DNA 用；溶解困難な細菌には適していない）：溶解後、チューブに固形の組織あるいは残渣がある場合は、50 µl の Buffer ATL を添加する。ボルテックスにより混和し、6,000 x g (8,000 rpm) で1分間遠心操作を行なう。上清 200 µl をステップ 5 で使用する。**

- 5. ステップ 5a あるいは 5b でスタートサンプルとして 200 µl のライセートを使用する。**

重要：固形粒子が次のプロトコールに混入していないことを確認してください。

- 5a. ウイルス DNA あるいは溶解容易な細菌の DNA 分離に関しては、プロトコール“液状サンプル中の病原体核酸の精製”（3 ページ）で直接行なう。**

注意：上述したように、精製プロトコールのステップ 1 で proteinase K を使用しないでください。

- 5b. 溶解困難な細菌の DNA 分離に関しては、Pretreatment B1（6 ページ）を行なう。**

Pretreatment T3 — 迅速な組織の部分破碎

この前処理は、完全に組織を破碎する必要がないアプリケーションに適しています。これは組織からのウイルス RNA および DNA、バクテリア DNA の抽出用です。

実験を始める前の重要事項

いくつかの組織と病原体では、激しい振盪のみで細胞がバラバラになったり、組織構造から病原体が遊離します。しかし、通常、遊離した細胞はこの前処理により破碎されません。細胞溶解は、続くプロトコール“液状サンプル中の病原体核酸の精製”（3 ページ）で行なわれます。このプロトコールの適合性は、細胞接着の強さおよび／あるいは組織内の病原体の局在性、および病原体の検出に必要な感度により異なり、組織と病原体の組み合わせごとに検証しなければなりません。

操作手順

1. 最大 25 mg の組織を 2 ml のマイクロ遠心チューブに入れる。
2. 500 μ l の PBS をサンプルに添加し、蓋を閉める。
さらに大量の組織を使用する際は、PBS の容量とチューブの大きさを適宜変更してください。組織と PBS の割合を約 1 : 20 (m/v) にしてください。チューブの容量が、激しい振盪を行なっても問題ないことを確認してください。
3. Foam adapter を垂直あるいは水平方向に固定したボルテックスに、チューブをセットする。
4. 最高速度で 5 分間ボルテックスする。ステップ 5 に進む。
重要：ボルテックスの後、サンプルを 1 分以上放置しないでください。サンプルを 1 分以上放置した場合は、もう一度ボルテックスで数秒間振盪します。
5. 上清 200 μ l をスタートサンプルとして 3 ページのプロトコール“液状サンプル中の病原体核酸の精製”に使用します。
固形粒子が精製プロトコールに混入していないことを確認してください。
- 5a. ウイルス DNA あるいは溶解容易なバクテリアの DNA 分離に関しては、プロトコール“液状サンプル中の病原体核酸の精製”（3 ページ）で直接行なう。
- 5b. 溶解困難なバクテリアの DNA 分離に関しては、Pretreatment B1（6 ページ）を行なう。

Pretreatment T4 — 特殊な組織のための有機溶媒抽出

この前処理は、脳または脾臓などの脂質および／またはヌクレアーゼを多く含む組織から、ウイルス RNA および DNA や溶解容易なバクテリアの DNA を抽出するためのものです。

実験を始める前の重要事項

フェノールおよびクロロホルムは別途お求めください。平衡化フェノール溶液；pH 8（例；Sigma, cat. no. P4557）の使用をお奨めします。これらの化学物質の安全要求事項をよく理解したことを確認してください。詳細は製品メーカーの相当する SDS (safety data sheet) をご覧ください。セーフロックの蓋が付いた適切なチューブをご使用ください。

実験開始前の準備事項

- ステップ 8 で使用するマイクロ遠心機を 4℃ に冷却します。

操作手順

1. ステンレススチールビーズ（平均直径 5 mm）1 個が入った 2 ml のマイクロ遠心チューブに 25 mg 以下の組織を入れる。

一定重量中に非常に多くの細胞数を含む組織（脾臓など）に関しては、スタートサンプル量を減らして（5 ~ 10 mg）ご使用ください。

繊維性組織を調製する場合には、破碎開始前に組織を小さくカットすると破碎効率がよくなります。

2. 400 μ l の PBS あるいは 0.9% NaCl 溶液と、200 μ l の TE 飽和フェノール（pH 8）を各チューブに添加し、蓋を固く閉める。
3. TissueLyser II Adapter Set にチューブをセットする。
4. TissueLyser II にセットして 25 Hz で 2 分間破碎する。

オプション：繊維性組織を調製する場合には、アダプターセットを外して、TissueLyser II に一番近いチューブが一番遠くなるようにチューブのラックを回転し、アダプターセットをもう一度組み立てます。TissueLyser II にセットし 25 Hz でさらに 2 分間破碎します。

5. アダプターセットを外す。ホモジネート溶液が入ったチューブを実験台上に室温（15 ~ 25℃）で 2 ~ 3 分間放置する。

このステップは核タンパク複合体の解離を促進します。

6. 100 μ l のクロロホルムを添加する。ホモジネート溶液が入った各チューブの蓋をしっかりと閉め、ボルテックスあるいはチューブを転倒混和して、15 秒間激しく振盪する。

完全に混合することは次のステップで液層を分離するために重要です。

7. ホモジネート溶液が入ったチューブを実験台上に置き、室温（15～25℃）で3分間放置する。
8. 4℃、12,000 x g で15分間遠心する。

遠心後にサンプル溶液は3つの層に分かれます：上層の無色で核酸を含む水層；白色の中間層；一番下の有機溶媒層。脂肪含有量が特に高い組織では、有機溶媒層の下にさらに透明な層が見られることがあります。水層の容量は約300 µl です。

重要：プロトコール“液状サンプル中の病原体核酸の精製”（3ページ）と同じ遠心機を使用する場合は、遠心機を室温に戻します。
9. ステップ8の上層200 µl をスタートサンプルとして3ページのプロトコール“液状サンプル中の病原体核酸の精製”に使用します。

トラブルシューティング

コメント

病原体 DNA あるいは RNA が溶出液中にほとんどない、あるいは皆無

- a) Buffer ACB が正しく調製されていない
- ボトルに記載されている様に、Buffer ACB 濃縮液を正確な量のイソプロパノールで希釈したことを確認。100%のイソプロパノールを使用する。新しいサンプルで精製プロトコルを再度行なう。
- b) Buffer AW1 あるいは Buffer AW2 が正しく調製されていない
- Buffer AW1 および Buffer AW2 濃縮液を、ボトルに記載されているように正確な量のエタノールで希釈したことを確認する。96 ~ 100%エタノールを使用する。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。新しいサンプルで精製プロトコルを再度行なう。
- c) サンプルの溶解が不十分
- Proteinase K が高温で非常に長期保存されていた。新しいサンプルと新しく調製した proteinase K を用いて精製操作を繰り返す（英語版 Handbook 5 ページ、“Storage” 参照）。
- いくつかの DNA ウイルスやバクテリアについては、加熱溶解が溶解効率を向上することがある。この場合、proteinase K の添加後にサンプルを完全に混和し、70℃で 15 分間インキュベートする。
- d) 溶出前に QIAamp Mini Column を Buffer AVE でインキュベートしていない
- Buffer AVE を添加後、QIAamp Mini Column を室温(15 ~ 25℃) で 1 分間インキュベートする。
- e) Carrier RNA を Buffer VXL に未添加
- 細胞数が少ないサンプルの場合、Carrier RNA を使用しないと、病原体核酸の回収が減少することがある。これらのサンプルについては、Carrier RNA を Buffer AVE で溶解調製し、溶解調製した Carrier RNA を Buffer VXL に添加する（英語版 Handbook 17 ページ参照）。新しいサンプルで再度調製を行なう。

コメント

-
- f) Carrier RNA が分解 Buffer AVE で溶解した Carrier RNA を -20°C で保管しなかった。あるいは凍結・融解を繰り返した。あるいは BufferVXL-carrier RNA 混和物を $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ で 48 時間以上保存した。Buffer AVE で溶解した Carrier RNA の新しいチューブを準備し、Buffer AL と混和する。新しいサンプルで再度調製を行なう。
- g) Buffer VXL-carrier RNA 混合物の混和が不十分 Buffer AL と Carrier RNA の入ったチューブを少なくとも 10 回静かに上下に転倒させて混和する。
- h) Buffer AVE 中に RNase がコンタミ Buffer AVE の入ったチューブを繰り返し使用する場合、ウイルス RNA を分解する RNase のコンタミに注意する。RNase がコンタミした場合には、Buffer AVE の瓶を新しいものに換える。新しいサンプルで再度調製を行なう。
- i) サンプル中の核酸が精製前に既に分解 サンプルの凍結・融解を 2 回以上行なった、あるいは室温で長期間保存した。常に新鮮なサンプルあるいは一回のみ解凍したサンプルを使用する。新しいサンプルで精製プロトコルを再度行なう。

DNA あるいは RNA を用いたダウンストリーム・アプリケーションで良い結果がでない

- a) 溶出液中の DNA あるいは RNA が少ないか皆無 “病原体 DNA あるいは RNA が溶出液にほとんどない、あるいは皆無” (15 ページ) の項で原因を調べる。
- b) 増幅反応液中の溶出液の量が多すぎる いくつかのサンプル種は、バックグラウンドになる核酸 (例;動物全血、組織) または PCR 阻害物質 (糞便) を多く含むことがある。バックグラウンドになる核酸が多いと増幅反応を阻害することがあり、阻害物質の完全な除去には、特別な処理が必要になることがある。スタートサンプル量および/あるいは増幅反応液に添加する溶出液の量を減らす。

コメント

- c) 溶出液中に Carrier RNA が多すぎる 増幅反応に適した Carrier RNA の最大量を決める。それに応じて Buffer VXL に添加する Carrier RNA の量を調節する。
- d) アッセイでの精製核酸のパフォーマンスが、洗浄バッファの調製後の経過日数とともに変動 洗浄用 Buffer AW1 あるいは Buffer AW2 の塩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。各調製前に、バッファを完全に混和する。
- e) 溶出溶液中にエタノールが残留 プロトコール“液状サンプル中の病原体核酸の精製”(3 ページ)にある乾燥ステップ(ステップ 11)を行なう。

バッファ中に沈殿物

- a) Buffer VXL あるいは Buffer ACB 中に沈殿物 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 VXL または ACB を 37℃ で 30 分間インキュベートし、時々攪拌して沈殿物を溶解する。
- b) サンプル・Buffer VXL 混和物中に沈殿物 Buffer ATL の入った液状サンプルを取り扱う場合(組織の酵素分解の後など)、Buffer VXL をサンプルに添加後、沈殿が生じることがある(3 ページのプロトコール“液状サンプル中の病原体核酸の精製”のステップ 3)。沈殿物は続くプロトコール・ステップには影響しない。しかし、沈殿物は 56℃ の短時間のインキュベーションで溶解可能。

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, *cador*™ (QIAGEN Group).

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。

最新のライセンス情報および製品ごとの否認声明に関しては www.qiagen.co.jp の "Trademarks and Disclaimers" をご覧ください。QIAGEN キットの Handbook および User Manual は www.qiagen.co.jp から入手可能です。

© 2013 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

