

QIAamp® MinElute™ Media プロトコールとトラブルシューティング

液状輸送・保存培地中の核酸精製（吸引システムを使用）

目次	ページ
プロトコール	
培地からの核酸精製	2
トラブルシューティング	5



プロトコール：培地からの核酸精製

輸送・保存培地中の子宮頸管スワブ検体（例、PreservCytあるいはSurePath溶液）などの液状サンプル250 µlからのgDNA、バクテリア、ウイルスDNA精製

実験を始める前の重要事項

- 本プロトコールは吸引システムを使用しています。吸引マニホールド（cat.no.19413 QIAvac 24 Plus）と34リットル/分、-800から-900mbrの吸引能力を有する吸引ポンプが必要です。
- 全ての遠心操作は室温（15～25℃）で行ないます。
- QIAamp MinElute カラムにライセートあるいは洗浄液をアプライ後（ステップ12、13、14）、少なくとも1分間経過してから吸引ポンプのスイッチを入れます。すべての溶液がカラムを通過後、少なくとも1分間経過してから吸引ポンプのスイッチを切って、常圧に戻します。

実験を始める前の準備事項

- サンプルを室温（15～25℃）に戻します。
- ステップ18で使用する溶出用Buffer AVEを室温に戻します。
- Buffer ALあるいはBuffer ATLが沈殿物を形成している場合には、70℃に温めて静かに攪拌することにより沈殿物を溶かします。
- ステップ4で使用するヒートブロック、サーモミキサーあるいは加熱振とうインキュベーターを56℃に、ステップ7で使用するヒートブロック、サーモミキサーあるいは加熱振とうインキュベーターを70℃にセットします。
- 英語版 Handbook 16ページの説明に従ってBuffer AW2を調製したことを確認します。
- 英語版 Handbook 15ページの説明に従ってBuffer AVEで溶解調製したキャリアRNAをBuffer ALに添加します。

操作手順

1. 80 µlのBuffer ATLを2 mlのマイクロ遠心チューブ（別途準備）にピペットで入れる。
2. 次に、250 µlのサンプルを添加する。
3. 20 µlのQIAGEN proteinase Kを添加する。ふたをして、10秒間ボルテックスして混和する。
4. 56℃で30分間インキュベートする。

サンプルを振とうすることにより核酸収量が増加します。900 rpmにセットしたサーモミキサーを使用すると最大の収量が得られます。ヒートブロックを使用する際には、インキュベーション中にサンプルを時々ボルテックスします。

5. 数秒間遠心操作して2 mlチューブのふたの内側に付いたサンプルを集める。
6. 250 μ lのBuffer AL (10 μ g/mlのキャリアRNAを含む) を加える。ふたをして、10秒間ボルテックスして混和する。

溶解を効率的に行うために、サンプル、Buffer ATL、QIAGEN proteinase K、Buffer ALを完全に混和して均一な溶液にします。

Buffer ALをBuffer ATLに添加した際に白い沈殿物が生じることがあります。この沈殿物は調製法には影響しません。これはステップ7でのインキュベーションの間に溶解します。

7. 70 で15分間インキュベートする。

サンプルを振とうすることにより核酸収量が増加します。900 rpmにセットしたサーモミキサーを使用すると最大の収量が得られます。ヒートブロックを使用する際には、インキュベーション中にサンプルを時々ボルテックスします。

8. 数秒間遠心操作して2 mlチューブのふたの内側に付いたサンプルを集める。
9. サンプルに300 μ lのエタノール (96 ~ 100 %) を加える。ふたをして、15秒間ボルテックスして完全に混和する。エタノールを加えたライセートを室温 (15 ~ 25) で5分間インキュベートする。

注 ; 実験室の温度が25 を超える場合には、ライセートに添加する前にエタノールを氷上で冷やしてください。

10. 数秒間遠心操作して2 mlチューブのふたの内側に付いたサンプルを集める。
11. 吸引マニホールド上のVacConnectorにQIAamp MinEluteカラムを差し込む。QIAamp MinEluteカラムを開いてエクステンション・チューブを入れる。
注 ; 2 mlのコレクションチューブはステップ16の乾燥のための遠心操作で使用しますので保管して下さい。
12. ステップ10のライセート全量をQIAamp MinEluteカラムのエクステンション・チューブに慎重にアプライする。吸引ポンプのスイッチを入れる。ライセートが完全にカラムを通過した後、吸引ポンプのスイッチを切り、吸引圧を0 mbarに戻す。

他のすべてのQIAamp MinEluteカラムのVacValves (英語版HandBook 14ページの“Processing QIAamp MiniElute columns on QIAvac 24 or QIAvac 24 Plus”を参照) を閉じたにもかかわらず個々のサンプルのライセートがメンブレンを通過しなかった場合には、QIAamp MinEluteカラムを新しい2 mlコレクションチューブにのせ、ふたを閉め最高速度で3分間、あるいはライセートが完全に通過するまで遠心操作を行います。2 mlのコレクションチューブの別売りもしています。英語版Handbook 32ページの“ Ordering Information ” をご覧ください。

注 ; 迅速かつ簡便に常圧にするためにはVacuum Regulatorをご利用ください (英語版Handbook 11ページの“ Equipment and Reagents to Be Supplied by User ” 参照) 。

13. QIAamp MinElute カラムのエクステンション・チューブに 750 μ l の Buffer AW2 を添加する。吸引ポンプのスイッチを入れる。Buffer AW2 が完全に QIAamp MinElute カラムを通過した後、吸引ポンプのスイッチを切り、吸引圧を 0 mbar に戻す。
14. QIAamp MinElute カラムのエクステンション・チューブに 750 μ l のエタノール (96 ~ 100 %) を添加する。吸引ポンプのスイッチを入れる。エタノールが完全に QIAamp MinElute カラムを通過した後、吸引ポンプのスイッチを切り、吸引圧を 0 mbar に戻す。
15. エクステンション・チューブを除去し棄てる。
注 ; クロスコンタミを避けるために、取り除いたエクステンション・チューブが隣の QIAamp MinElute カラムの上を通過しないようにします。
16. QIAamp MinElute カラムのふたをする。カラムを吸引マニホールドから取り外し、VacConnector を棄てる。ステップ 11 で保管していた新しい 2 ml コレクションチューブに QIAamp MinElute カラムをセットする。メンブレンを完全に乾燥するために、最高速度 (20,000 x g, 14,000 rpm) で 3 分間遠心操作する。
17. QIAamp MinElute カラムを新しい 1.5 ml コレクションチューブ (付属) にセットして、ろ過液が入った 2 ml のコレクションチューブを捨てる。QIAamp MinElute カラムのふたを開いて、室温 (15 ~ 25) で 15 分間カラムをインキュベートする。
注 ; あるいは、QIAamp MinElute のふたを開いて、56 で 3 分間の高速なインキュベーションを行うことも可能です。
18. 120 μ l の Buffer AVE を QIAamp MinElute カラムのメンブレン中央にアプライする。ふたを閉めて、室温 (15 ~ 25) 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 : Buffer AVE を室温に戻したことを確認します。Buffer AVE をアプライした QIAamp MinElute カラムを遠心操作の前に室温で 5 分間インキュベートすると、収量は一般に増加します。
溶出バッファーの量は 20 ~ 150 μ l で変更可能です。ダウンストリーム・アプリケーションに応じて調節してください。溶出バッファーの量を減らすと溶出液は濃縮され、測定感度が上昇します。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。

トラブルシューティングガイド

コメント

溶出液中に核酸がほとんど、あるいはまったくない

- a) キャリアRNAをBuffer ALに添加していない
Buffer AVEでキャリアRNAを調製後、Buffer ALで混和する（英語版 Handbook15 ページ）。新しいサンプルで再度精製操作を行う。
- b) キャリアRNAが分解
Buffer AVEで調製したキャリアRNAを-20 で保存しなかった、あるいは凍結・解凍を何度も繰り返した。あるいはBuffer AL-キャリアRNA混和物を2~8 で48時間以上保存した。新しいチューブでキャリアRNAをBuffer AVEに溶解し、これとBuffer ALと混和する。新しいサンプルで再度精製操作を行う。
- c) サンプル中の標的核酸の濃度が低い
サンプルを長時間室温（15 ~ 25 ）で放置した。新しいサンプルで再度精製操作を行う。
- d) Buffer AL中でサンプルが十分溶解されていない
QIAGEN proteinase Kを長時間、高温で使用した。新しいサンプルと新しく調製したQIAGEN proteinase Kを用いて再度精製操作を行う。
- e) Buffer AL- キャリアRNA混合物の混和が不十分
Buffer ALとキャリア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。
- f) 96 ~ 100 %エタノールではなく低濃度のものを使用
新しいサンプルと96 ~ 100 %エタノールで精製操作をやり直す。
- g) Buffer AW2が正しく調製されていない
Buffer AW2濃縮液が正確な量のエタノールで希釈されていることを確認。新しいサンプルで再度精製操作を行う。
- h) Buffer AW2を70 %エタノールで調製
Buffer AW2濃縮液を96 ~ 100 %エタノールで希釈したことを確認。新しいサンプルで再度精製操作を行う。

RNAあるいは**DNA**を用いたダウンストリームの酵素反応で、よい結果が得られない

- a) 溶出液中に核酸がほとんど、あるいはまったくない
上記の“ 溶出液中に核酸がほとんど、あるいは全くない ” の項目で原因を調べる。可能なら反応液に添加する溶出液量を増やす。
- b) 溶出液中のキャリアRNA量が多すぎる、あるいは少なすぎる
増幅反応に最適なキャリアRNAの最大量を決める。それに従って、Buffer ALに添加するキャリアRNAの濃度を調節する（英語版 Handbook 15 ページの “Addition of carrier RNA to Buffer AL” を参照）。

コメント

- c) 感度が低下 増幅反応に適した溶出液の最大量を定める。それに従って、増幅反応に加える溶出液量を増やすか減らす。溶出バッファの量はこれに比例して調節する。
- d) ダウンストリーム・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共に変動 Buffers AW2の塩類やエタノール成分が長期間使用せずに放置した後分離した。各調製前に、バッファを完全に混和する。
- e) 逆転写酵素と *Taq* DNA ポリメラーゼの新しい組み合わせを使用 酵素を変更した場合には、Buffer ALに添加するキャリアRNAと溶出液の量を再調整することが必要。
- f) PCRが阻害されている サンプルの種類によっては、Buffer AW1 (本キットには入っていない。オーダーインフォメーションは英語版 Handbook 32 ページ参照)での洗浄ステップが QIAamp MinElute Media 操作で必要になることがある。ステップ 12 の操作が完了後、QIAamp MinElute カラムのエクステンション・チューブに、エタノールを添加済みの Buffer AW1 600 μ l を添加する。吸引ポンプのスイッチを入れる。Buffer AW1 が完全に QIAamp MinElute カラムを通過した後、吸引ポンプのスイッチを切り、吸引圧を 0 mbar に戻す。ステップ 13 に続ける。

一般的な操作

- a) QIAamp MinElute Column の目詰まり QIAamp MinElute カラムを吸引マニホールドから取り外し、2 ml のコレクションチューブにセットする。サンプルが完全にメンブレンを通過するまで最高速度で遠心操作する。
- b) 溶出液量が変動する 異なる種類のサンプルを同時に吸引マニホールドで処理した場合、溶出液量がサンプル間で変動することがある。

コメント

c) 吸引力が800 ~ 900 mbarに達していない

QIAvac 24吸引マニホールドが固く閉じられていない。吸引装置のスイッチを入れた後、吸引マニホールドのふたを下に押す。吸引力が十分にあるかチェックする。

QIAvac 24ふたのガスケットが擦り切れている。マニホールドのシールをチェックして、必要なら取り替える。

VacValveが古くなった。すべてのVacValveを取り外し、VacConnectorを直接luer extension/slotに挿入する。QIAamp MinEluteカラムをVacConnectorにセットし、カラムのふたを閉め、吸引装置のスイッチを入れる。吸引力が十分にあるかチェックする。必要ならVacValveを取り替える。

吸引ポンプの連結が漏れている。ルアーキャップを付ける（QIAvac 24を使用）かVacValve（QIAvac 24 Plusを使用）を閉めてすべてのluer extensions/slotsを閉じ、吸引ポンプのスイッチを入れる。吸引ポンプのスイッチを入れ（吸引制御装置のバルブを閉じ）た後、吸引圧が安定しているかどうかをチェックする。必要に応じてポンプと吸引マニホールド間の連結を交換する。

上記の項目をすべて試みても問題が解決しない場合には、強力な吸引ポンプを使用する。

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



WWW.QIAGEN.CO.JP

2301110 02/2004