

2019年9月

QIAamp[®] DSP Circulating NA Kit 使用説明書（ハンドブック）

バージョン 1



50

IVD

CE

REF



R4 MAT

61504

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

1118364JA

Sample to Insight



目次

使用目的	4
概要と説明	4
操作手順の原則	5
サンプル量	5
サンプルの溶解	7
QIAamp Mini カラム膜への吸着	7
残存汚染物質の除去	7
純粋な核酸の溶出	8
核酸の収量とサイズ	8
プロトコールの説明	9
キットに含まれる材料	10
キットの内容	10
キット以外に必要な材料	11
警告と注意	12
試薬の保管と取り扱い	15
標本の保管と取り扱い	16
操作手順	17
緩衝液と試薬の調製	24
Breeze プロトコール：1～5 mL のヒト血漿から循環核酸を精製	27
クラシックプロトコール：1～5 mL のヒト血漿からの循環核酸の精製	32
品質管理	37
制限事項	37

図記号	38
参照	40
お問い合わせ先	40
トラブルシューティングガイド	41
付録 A：血漿の分離と保管に関する勧告	44
付録 B: RNA 取り扱いの一般的注意事項	46
注文情報	47
製品説明書の改訂履歴	48

使用目的

QIAamp DSP Circulating NA Kit は、シリカ膜技術（QIAamp テクノロジー）を使用して、ヒト血漿サンプルから循環無細胞 DNA および RNA を分離、精製するシステムです。

この製品は、分子生物学技術について訓練を受けた技師や医師をはじめとするプロフェッショナルなユーザー向けの製品です。

QIAamp DSP Circulating NA Kit は、体外診断用です。

概要と説明

遊離循環核酸は通常、<1000 bp (DNA) 、<1000 nt (RNA) 、または 20 nt (miRNA) という短いフラグメントでヒト血漿中に存在します。一般にヒト血漿中の遊離循環核酸濃度は低く、またヒトサンプル中に 1~100 ng/mL と大きな個体差があります (1~5) 。

QIAamp DSP Circulating NA Kit は、ヒト血漿の循環核酸を効率よく精製できます。新鮮なサンプルでも凍結サンプルでも使用可能です。エクステンションチューブと QIAvac 24 Plus での真空処理により、開始サンプル量は最大 5 mL まで可能で、溶出量が 20~150 μ L と柔軟であるため、低濃度の核酸種の濃縮が可能です。

溶出した遊離循環ゲノム DNA や RNA は、そのままダウンストリームアプリケーションへの使用や保存が可能です。QIAamp DSP Circulating NA Kit は、タンパク質やヌクレアーゼなどの不純物を効率よく除去します。

操作手順の原則

QIAamp DSP Circulating NA の操作手順は 4 ステップ（溶解、結合、洗浄、溶出）で構成されており、QIAvac システムの QIAamp Mini カラムを使用して行います。この頑健な手法は、感染の可能性があるサンプルを取り扱う際、サンプル間の交差汚染を最小限に抑制し、ユーザーの安全性を高めるのに有用です。

このシンプルな手法では、最大 24 サンプルを 2 時間以内に同時処理することができます。

サンプル量

QIAamp Mini カラムは、20 nt という短い断片化核酸を結合することができますが、収量はサンプル量やサンプル中の循環核酸濃度に応じます（一般に 1~100 ng/mL 血漿）。QIAamp DSP Circulating NA の操作手順は、最大 5 mL までのサンプル量に最適化されています。

QIAamp DSP Circulating NA Kit の操作手順

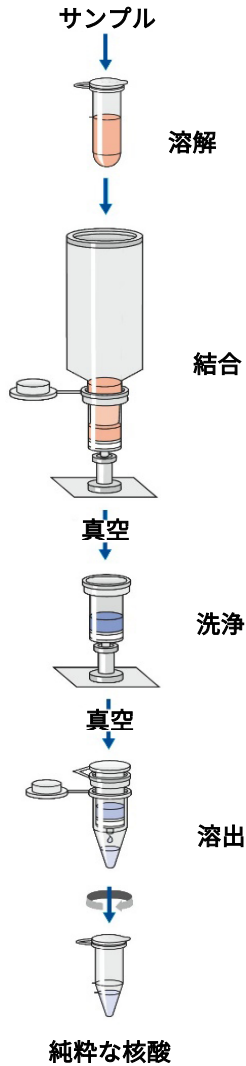


図 1. QIAamp DSP Circulation NA Kit の操作手順の概要

サンプルの溶解

液体中の遊離循環核酸は通常タンパク質に結合するかベシクルに包まれているため、核酸を放出し QIAamp Mini カラムに選択的に結合させるための効率的な溶解ステップが必要になります。そのため、サンプルを、プロテイナーゼ K と Buffer ACL の存在下で高温の高温変性条件下で溶解します。これによって DNase と RNase が不活性化し、結合したタンパク質、脂質、ベシクルから核酸が放出されます。

QIAamp Mini カラム膜への吸着

循環核酸の膜への結合を最適化するため、溶解物に Buffer ACB を加えて結合条件を調整します。次に、溶解物を QIAamp Mini カラムに移します。溶解物が真空圧で吸引されるにつれて、大量の溶解物から循環核酸がシリカ膜に吸着します。PCR などのダウンストリーム酵素反応を阻害する可能性があるタンパク質などの汚染物質の大半は、塩と pH 条件により、QIAamp Mini カラム膜に保持されません。

プロトコールには、真空マニホールド (QIAvac Connecting System を備えた QIAvac 24 Plus など) と約 800~900 mbar の真空を作り出せる真空ポンプ (QIAGEN® Vacuum Pump など) が必要です。Vacuum Regulator (QIAvac Connecting System の一部) を使用して、真空圧を容易に監視し真空リリースを間便に行う必要があります。

残存汚染物質の除去

核酸は膜に結合したままですが、汚染物質は 3 回の洗浄ステップで効率的に洗い流されます。

純粋な核酸の溶出

溶出は Buffer AVE を使用して行われます。単一ステップで、高純度の循環核酸が、室温に平衡化した Buffer AVE に溶出します。50~150 μL の柔軟な溶出量に対応しています。高濃度の核酸が必要な場合は、溶出量を 20 μL まで下げることができます。溶出量が 50 μL 未満の場合、核酸溶出液の濃度は高くなりますが、総収量が低下する可能性があります。

回収される溶出液量は、カラムに適用される溶出緩衝液の量よりも最大 5 μL 少なくなります。

核酸の収量とサイズ

生体サンプルから分離した遊離循環核酸の収量は通常 1 μg 未満であるため、分光光度計での測定は困難です。QIAamp DSP Circulating NA Kit を使用してサンプルから得られる循環 DNA と RNA の絶対収量は、回収した個人のサンプルによって異なるほか、他の要因（特定の疾患状態など）にも依存します。また、抽出した核酸中に存在する担体 RNA は、UV 吸光度の読み取りに影響を与える可能性があります（ページ 25 参照）。収量の判定には定量的増幅法が推奨されます。

QIAamp DSP circulating NA Kit を使用して精製した循環核酸のサイズ分布は、アガロースゲル電気泳動やターゲット特異的標識プローブ⁵へのハイブリダイゼーション、またはマイクロフルイディック電気泳動溶液（Agilent Bioanalyzer など）によって確認できます。

プロトコールの説明

本ハンドブックでは 2 種類のプロトコールについて説明します。

「Breeze プロトコール：1～5 mL のヒト血漿から循環核酸を精製」 (ページ 27) は、最大 5 mL の血漿を 1 mL きざみで処理するプロトコールで、実施時間と所要時間の短縮に向けて最適化されています。

「クラシックプロトコール：1～5 mL のヒト血漿からの循環核酸の精製」 (ページ 32) は、最大 5 mL の血漿を 1 mL きざみで処理するプロトコールで、QIAamp DSP circulating NA Kit ハンドブック改訂第 3 版 (R3) のプロトコールと同じです。

キットに含まれる材料

キットの内容

QIAamp DSP Circulating NA Kit			(50)
カタログ番号			61504
プレップ数			50
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tube (洗浄チューブ (WT) (2 mL) を備えた QIAamp Mini カラム)	COL	50
EXT	Column Extenders (カラムエクステンダー) (20 mL)	COL EXT	2 x 25
WT	Wash Tube (洗浄チューブ) (2 mL)	WASH TUBE	50
ET	Elution Tube (溶出チューブ) (1.5 mL)	ELU TUBE	50
VC	VacConnector	VAC CON	50
ACL*	Lysis Buffer (溶解緩衝液) *	LYS BUF	220 mL
ACB*	Binding Buffer (結合緩衝液) * (濃縮)	BIND BUF CONC	300 mL
ACW1*	Wash Buffer 1 (洗浄緩衝液 1) * (濃縮)	WASH BUF 1 CONC	19 mL
ACW2†	Wash Buffer 2 (洗浄緩衝液 2) † (濃縮)	WASH BUF 2 CONC	13 mL
AVE†	Elution Buffer (溶出緩衝液) † (紫色の キャップ)	ELU BUF	5 x 2 mL
PROTK	QIAGEN Proteinase K (QIAGEN プロテイナーゼ K)	PROTK	4 x 7 mL
担体	Carrier RNA (担体 RNA) (赤色のキャップ)	CAR RNA	310 µg
	ハンドブック	H B	1

* カオトロピック塩が含まれます。警告と注意についてはページ 12 を参照してください。

† 保存料としてアジ化ナトリウムを含む。

キット以外に必要な材料

薬品を取り扱う際には、必ず適切な白衣を着用し、使い捨ての手袋と保護メガネを使用してください。詳細は、製品の供給元が提供する適切な安全データシート(safety data sheets, SDS)を参照してください。

測定器が製造者の推奨通りに点検され、校正されていることを確認してください。

すべてのプロトコール用

- ピペット（調節可能）
- 滅菌ピペットチップ（交差汚染を防ぐため、エアロゾルバリヤ付きピペットチップが推奨されます）
- 56°C または 60°C で 50 mL 遠心管を保持できる水槽または加熱ブロック *
- 2 mL の洗浄チューブを保持できる 56°C の加熱ブロックまたは類似物（クラシックプロトコールのみ）*
- 微量遠心機（2 mL チューブ用ロータ付き）*
- 50 mL 遠心管
- QIAvac 24 Plus vacuum manifold（カタログ番号 19413）
- QIAvac Connecting System（カタログ番号 19419）または同等品
- Vacuum Pump（カタログ番号 84010 [米国、カナダ]、84000 [日本]、84020 [その他]）または -800~-900 mbar の真空を作り出せる同等のポンプ
- エタノール（96~100%）†
- イソプロパノール（100%）
- 破碎氷片（「クラシックプロトコール：1~5 mL のヒト血漿からの循環核酸の精製」のみ）
- 一部のサンプルはリン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline, PBS）で希釈する必要があります。
- オプション：VacValve（カタログ番号 19408）

* 機器が製造者の推奨通りに点検され、校正されていることを確認してください。

† メタノールやメチルエチルケトンなどの他の物質が含まれるため、変性アルコールは使用しないでください。

警告と注意

体外診断用医薬品

薬品を取り扱う際には、必ず適切な白衣を着用し、使い捨ての手袋と保護メガネを使用してください。詳細は、適切な安全データシート(safety data sheets, SDS)を参照してください。これらは、各 QIAGEN キットおよびキットコンポーネントの SDS について検索、表示、印刷が可能な www.qiagen.com/safety から、便利でコンパクトな PDF 形式でオンライン入手できます。

警告

人身傷害の危険



サンプル調製廃棄物に直接漂白剤や酸性の溶液を混ぜないでください。

Buffer ACL、Buffer ACB、Buffer ACW1 にはグアニジン塩が含まれており、漂白剤と混ぜると高反応性化合物が生じる可能性があります。

このような緩衝液を含む液がこぼれた場合は、適切な実験室用洗剤と水で洗浄してください。こぼれた液に感染病原体が含まれる可能性がある場合は、まず汚染された部分を実験室用洗剤と水で洗浄し、その後次亜塩素酸ナトリウムの 1% (v/v) 水溶液で洗浄してください。

次のハザードおよび警告の表示は、QIAamp DSP Circulating NA Kit のコンポーネントに適用されます。

Buffer ACB



含有物質: チオシアン酸グアニジン危険飲み込むと有害。皮膚に接触したり吸入すると有害のおそれ。重篤な皮膚の薬傷・眼の損傷。長期継続的影響により水生生物に有害。酸と接触すると非常に有毒なガスが発生。防護用手袋、防護服、目、顔面の防護具を使用します。目に入った場合: 注意して水で数分間洗い流してください。コンタクトレンズを装着しており、はずすことが困難でなければ、コンタクトレンズをはずし、洗眼を続けます。即時に毒物センターに電話するか、医師の診察を受けてください。

Buffer ACL



含有物質: チオシアン酸グアニジン危険飲み込むと有害。皮膚に接触したり吸入すると有害のおそれ。重篤な皮膚の薬傷・眼の損傷。長期継続的影響により水生生物に有害。酸と接触すると非常に有毒なガスが発生。防護用手袋、防護服、目、顔面の防護具を使用します。目に入った場合: 注意して水で数分間洗い流してください。コンタクトレンズを装着しており、はずすことが困難でなければ、コンタクトレンズをはずし、洗眼を続けます。即時に毒物センターに電話するか、医師の診察を受けてください。

Buffer ACW1



含有物質: 塩酸グアニジン警告飲み込んだり吸入すると有害。皮膚の刺激の原因となります。重大な目刺激の原因となります。防護用手袋、防護服、目、顔面の防護具を使用します。

プロテイナーゼ K



含有物質: プロテイナーゼ K 危険。皮膚への軽い刺激の原因となります。吸入した場合、アレルギーやぜんそくの症状をもたらし、呼吸の困難につながります。粉塵、機体、噴霧、蒸気、スプレー噴射の吸入を避けてください。防護用手袋、防護服、目、顔面の防護具を使用します。呼吸用保護具を着用します。曝露または曝露の懸念がある場合：毒物センターに電話するか、または医師の診察を受けてください。患者を空気の新鮮な場所に移し、呼吸しやすい姿勢で休息させてください。

試薬の保管と取り扱い

QIAamp Mini カラムは 2~8°C の乾燥した場所で保管し、緩衝液はすべて室温 (15~25°C) で保存してください。QIAamp Mini カラムと緩衝液をこのような条件下で保存すると、キットボックスに表示されている有効期限まで性能が低下することはありません。

凍結乾燥した担体 RNA は、コンポーネントラベルに表示されている有効期限まで室温 (15~25°C) で保存してください。担体 RNA は Buffer AVE に溶解し、溶解した担体 RNA は、Breeze プロトコールではページ 28、クラシックプロトコールではページ 33 に記載の通り、直ちに Buffer ACL に添加してください。この溶液は新たに調製する必要があり、2~8°C で最大 48 時間安定しています。Buffer AVE に溶解した担体 RNA の未使用分は、アリコットに分けて -30°C~-15°C で保存してください。

QIAamp DSP Circulating NA Kit には、すぐに使用できるプロテインキナーゼ K 溶液が含まれており、特別に調製した保存緩衝液に溶解します。プロテインキナーゼ K は、室温 (15~25°C) で保存すると、コンポーネントラベルに記載の有効期限まで安定しています。

標本の保管と取り扱い

血液の保管と取り扱い

無細胞核酸の分解と細胞核酸の放出を避けるため、全血を 2~8°C で最大 6 時間保存することを推奨します (EDTA サンプルなど)。安定化した採血管を使用する際は、製造業者が示す保管条件を考慮してください。保管条件は、具体的なダウンストリームアプリケーションやターゲットと組み合わせて検証することを推奨します。

血漿の保管と取り扱い

特に RNA の場合、抗凝固剤として EDTA を使用する場合は、献血直後に血漿分離と核酸分離を行うことを推奨します。短期保管の場合には、血漿は 2~8°C で最大 24 時間保管できます。

長期保管の場合、安定化および非安定化採血管由来の血漿アリコットは、-20°C (ターゲットが DNA の場合のみ) または -80°C (ターゲットが DNA と RNA の場合) で最低 4 週間保管できます。

溶出した核酸の保管

溶出した核酸は 1.5 mL 溶出管 (付属) に回収します。精製した循環核酸は、2~8°C で最大 24 時間保管できます。24 時間以上保管する場合は、DNA では -30~-15°C、RNA ダウンストリームアプリケーションでは -90~-60°C で保管することを推奨します。

操作手順

はじめる前の重要な留意点

QIAvac 24 Plus

QIAvac 24 Plus は、最大 24 個の QIAGEN スピнкаラムを並行して高速かつ効率的に真空処理できるよう設計されています。サンプルと洗浄液は、遠心分離ではなく真空によってカラム膜を通して吸引されるため、精製手順がスピードアップし実施時間が短縮されます。

QIAvac Connecting System と組み合わせると、QIAvac 24 Plus をフロースルーシステムとして使用できます。サンプルフロースルーを別の廃液ボトルに回収します。

QIAvac 24 Plus のメンテナンスについては、*QIAvac 24 Plus* ハンドブックの取り扱いガイドラインを参照してください。

QIAvac 24 Plus での QIAamp Mini カラムの処理

QIAamp Mini カラムは、使い捨ての VacConnector と再利用可能な VacValve を用いて QIAvac 24 Plus で処理します。VacValve (オプション) を QIAvac 24 Plus マニホールドのルアースロットに直接挿入すると一定の流速が確保されるため、様々な容量のサンプルの並行処理を容易に行うことができます。サンプルの流量が大幅に異なる場合は、一貫した真空を確保するために使用する必要があります。VacConnector は、QIAamp Mini カラムと VacValve の間、または QIAamp Mini カラムと QIAvac 24 Plus のルアースロットの間に収まる使い捨てコネクタです。精製中にスピнкаラムと VacValve が直接接触しないようにすることで、サンプル間の交差汚染を防ぎます。VacConnector は、1 回使用

したら破棄します。大量の溶液を使用するため、QIAvac Connecting System（または廃棄ボトルを備えた同様のセットアップ）が必要です（図 2 参照）。

QIAvac 24 Plus の取り扱いガイドライン

- QIAvac 24 Plus は必ず安全なベンチトップか作業エリアに設置してください。落下した場合、QIAvac 24 Plus マニホールドに亀裂が生じる可能性があります。
- QIAvac 24 Plus は常に清潔で乾燥した状態で保管してください。洗浄手順については、QIAvac 24 Plus ハンドブックを参照してください。
- QIAvac 24 Plus のコンポーネントは、特定の溶媒には耐性がありません（表 1）。このような溶媒がユニットにこぼれた場合は、水で十分に洗い流してください。
- 一貫した性能を確保するため、QIAvac 24 Plus マニホールドのいかなる部分にもシリコンや真空グリースを塗布しないでください。
- 加圧下の真空マニホールドの近くで作業する際は、常に注意を払い、安全眼鏡を着用してください。
- スペアまたは交換部品に関する情報については、QIAGEN テクニカルサービスまたは最寄りの代理店にお問い合わせください。
- 真空圧は、真空マニホールド内部と大気との差圧（標準大気圧は 1013 mbar または 760 mm Hg）であり、QIAvac Connecting System を使用して測定できます（図 2 参照）。本プロトコールでは、-800~-900 mbar の真空を作り出せる真空ポンプが必要です（QIAGEN Vacuum Pump など）。これ以上の真空圧は避けてください。推奨値より低い真空圧を使用すると、核酸の収量と純度が低下し、膜が詰まるリスクが高まります。

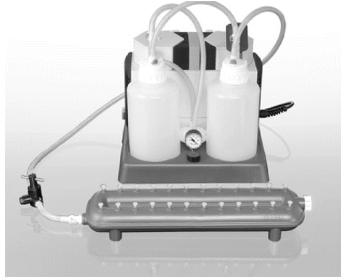


図 2. QIAvac 24 Plus、QIAvac Connecting System、Vacuum Pump

表 1. QIAvac 24 Plus の耐薬品性

耐性を示す化学薬品		耐性示さない化学薬品
酢酸	カオトロピック塩	ベンゼン
クロム酸	濃縮アルコール	フェノール
SDS	塩化ナトリウム	クロロホルム
Tween® 20	尿素	トルエン
塩素漂白剤	塩酸	エーテル
水酸化ナトリウム		

QIAvac 24 Plus vacuum manifold のセットアップ

1. QIAvac 24 Plus を真空源に接続します。QIAvac Connecting System を使用する場合は、QIAvac 24 Plus ハンドブックの付録 A に記載の通り、システムをマニホールドと真空源に接続します。
2. VacValve (オプション) を、使用する QIAvac 24 Plus の各ルアースロットに挿入します (図 3 参照)。使用しないルアースロットをルアープラグで閉じるか、挿入した VacValve を閉じます。

サンプルの流量が大幅に異なる場合は、真空を一定に保つために VacValve を使用する必要があります。

3. VacConnector を各 VacValve に挿入します (図 3 参照)。

VacConnector が空気中に存在する可能性がある汚染物質に曝露されないよう、精製開始直前にこのステップを実行します。

4. QIAamp Mini カラムをマニホールド上の VacConnector に配置します (図 3 参照)。

注: プリスターパックから洗浄チューブを取り出し、精製プロトコールに使用します。

5. カラムエクステンダー (20 mL) を各 QIAamp Mini カラムに挿入します (図 3 参照)。

注: サンプルの漏れを防ぐため、カラムエクステンダーが QIAamp Mini カラムにしっかりと挿入されていることを確認します。

6. 核酸精製についてはプロトコールの指示に従ってください。使用後は、VacConnector を適切に廃棄してください。

真空適用時は、QIAamp Mini カラムの蓋を開けたままにします。

ステップとステップの間は真空をオフにして、処理中に一貫した均一な真空が適用されるようにします。高速真空リリースには、Vacuum Regulator を使用する必要があります (QIAvac Connecting System の一部)。

注: サンプルがスピンのカラムから完全に吸引されると各 VacValve を個別に閉じることができると、容積や粘度の異なるサンプルの並行処理が可能です。

7. サンプル処理後、QIAvac 24 Plus を洗浄します (QIAvac 24 Plus ハンドブックの「QIAvac 24 Plus のクリーニングと除染」参照)。

注: Buffer ACL、ACB、ACW1 は漂白剤を含む消毒剤には対応していません。警告と注意についてはページ 12 を参照してください。

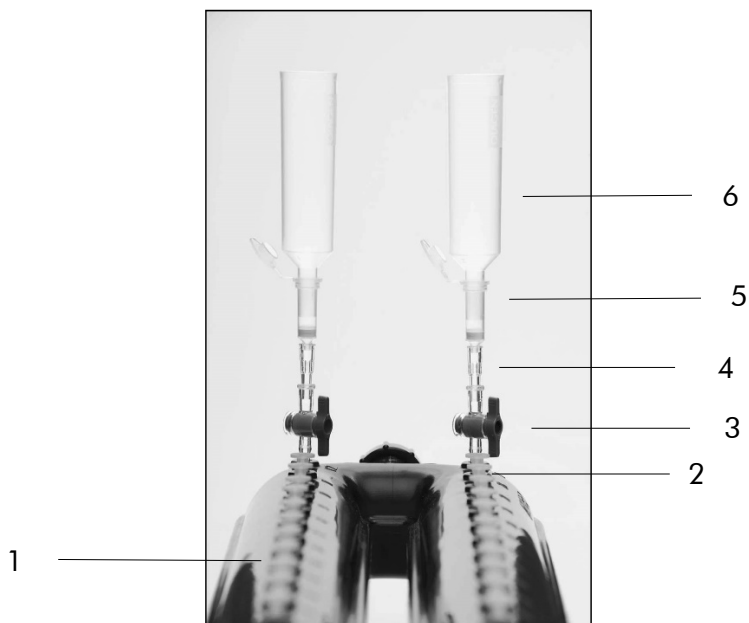
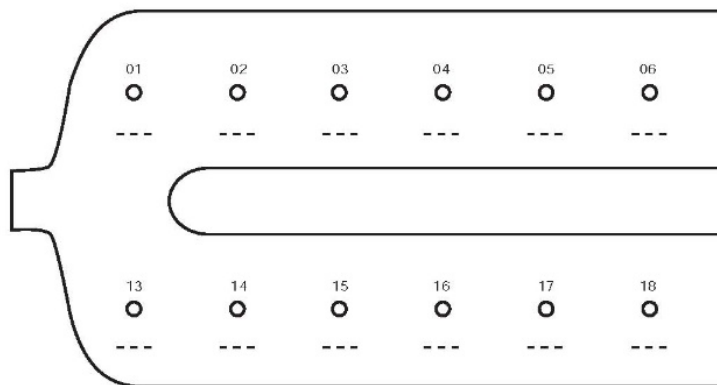


図 3. VacValve、VacConnector、カラムエクステンダーを使用した QIAamp Mini カラムを備えた QIAvac 24 Plus のセットアップ。

- | | |
|--|-------------------|
| 1 QIAvac 24 Plus vacuum manifold | 4 VacConnector |
| 2 QIAvac 24 Plus のルアースロット
(ルアープラグで閉鎖) | 5 QIAamp Mini カラム |
| 3 VacValve** | 6 カラムエクステンダー |

サンプルの混同を防ぐため、図 4 のスキームにしたがって、QIAvac 24 Plus 真空システムに使用するチューブと QIAamp Mini カラムにラベルを付けることを推奨します。この図をコピーしてサンプル名のラベルを付けられます。

* 別途購入する必要があります。



日付： _____

オペレーター： _____

実行 ID： _____

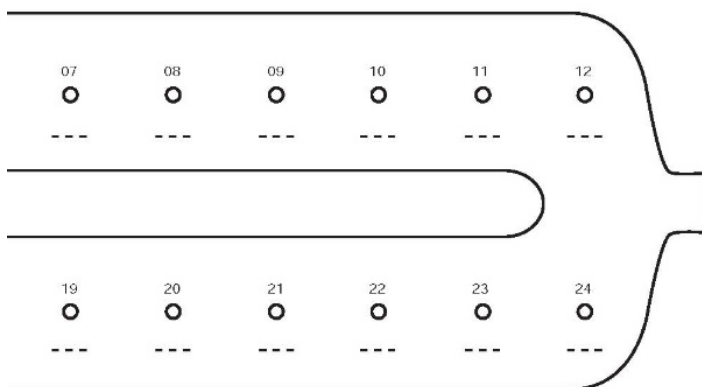


図 4. QIAvac 24 Plus 真空システムで使用するチューブと QIAamp Mini カラムのラベリングスキーム

緩衝液と試薬の調製

Buffer ACB

使用前に、200 mL のイソプロパノール（100%）を 300 mL の濃縮 Buffer ACB に加え、500 mL の Buffer ACB とします。イソプロパノール添加後、よく混ぜます。

Buffer ACW1 *

使用前に、25 mL のエタノール（96～100%）を 19 mL の濃縮 Buffer ACW1 に加え、44 mL の Buffer ACW1 とします。エタノール添加後、よく混ぜます。

Buffer ACW2 †

使用前に、30 mL のエタノール（96～100%）を 13 mL の濃縮 Buffer ACW2 に加え、43 mL の Buffer ACW2 とします。エタノール添加後、よく混ぜます。

担体 RNA を Buffer ACL に添加*

担体 RNA には 2 つの目的があります。ひとつは、特にサンプル中の標的分子が非常に少ない場合に、QIAamp Mini 膜への核酸の結合を強化することです。もうひとつは、大量の担体 RNA を添加すると、まれに RNase 分子が Buffer ACL 中のカオトロピック塩と洗浄剤による変性を受けず、RNA の分解の可能性が低下します。

付属の凍結乾燥担体 RNA の量は、キットに付属の Buffer ACL に十分な量です。担体 RNA の推奨濃度は、QIAamp DSP Circulating NA プロトコールを多様な増幅システムと互換

* カオトロピック塩を含む。警告と注意はページ 1112 を参照。

† 保存料としてアジ化ナトリウムを含む。

性のある一般的な精製システムとして使用できるよう調整されており、幅広い RNA および DNA ターゲットに適しています。

増幅システムの効率は、反応に存在する核酸の総量に応じて異なります。キットの溶出液には循環核酸と担体 RNA の両方が含まれており、大半の場合、担体 RNA の量は循環核酸の量を大きく超えます。そのため、UV 吸光度の読み取りによる単離循環核酸の定量は、測定結果が担体 RNA の存在によって決まるため適切ではありません。

増幅反応で最高レベルの感度を得るため、Buffer ACL に添加する担体 RNA の量を減らす必要がある場合があります。

オリゴ dT プライマーを含む増幅システムでは、遊離循環核酸の分離中に担体 RNA を追加しないでください。

1550 μL の Buffer AVE* を、310 μg の凍結乾燥担体 RNA を入れたチューブに加え、濃度 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の溶液とします。担体 RNA を完全に溶解し、便利なサイズのアリコットに分け、-30~-15°C で保存します。担体 RNA のアリコットを 3 回以上凍結融解しないでください。

担体 RNA は Buffer ACL に溶解しないことにご注意ください。Buffer AVE に溶解後、Buffer ACL に追加します。

プロトコールの表にしたがって、サンプルのバッチごとに必要な Buffer ACL 担体 RNA 混合液の量を計算します。同時に処理するサンプル数を選択します。

*保存料としてアジ化ナトリウムを含む。

チューブまたはボトルをそっと 10 回反転させ、混合します。泡立たないよう、ボルテックスしないください。

注: サンプル調製手順は、サンプルあたり最大 1.0 µg の担体 RNA に対して最適化されています。これより少量の担体 RNA がお使いの増幅システムに適していると示されている場合、必要な量の溶解担体 RNA のみを Buffer ACL を含むチューブに移します。1 回の調製に必要な担体 RNA 1 µg ごとに、溶解した担体 RNA 5 µL を Buffer ACL に追加します。（サンプルあたり 1.0 µg 未満の担体 RNA を使用すると有益な場合があります。サンプルタイプごとおよびダウンストリームアッセイごとに検証する必要があります。）

Breeze プロトコール：1～5 mL のヒト血漿から循環核酸を精製

本プロトコールは、1～5 mL のヒト血漿から循環 DNA および RNA を精製するためのもので、実施時間と所要時間が短縮するように最適化されています。QIAamp DSP circulating Kit バージョン 1/R3 を使用する既存のユーザー検証ワークフローについては、「クラシックプロトコール：1～5 mL のヒト血漿からの循環核酸の精製」をご参照ください(ページ 32)。

はじめる前の重要な留意点

- 遠心分離ステップはすべて、室温（15～25°C）で行います。
- ステップとステップの間は真空をオフにして、プロトコールステップ中に一貫した均一な真空が適用されるようにします。
- **注:** 真空ポンプ圧を-800～-900 mbar にします。
- サンプル温度を室温にします。
- リン酸緩衝生理食塩水を使用して、サンプル量を最も近い正確な容積（1 mL～5 mL）にします。
- ページ 19 に記載する通り、QIAvac 24 Plus をセットアップします。
- 水槽または加熱ブロックを 56°C まで加熱し、ステップ 3 で 50 mL 遠心管とともに使用します。
- 使用前に、QIAamp Mini スピнкаラムを最低 1 時間室温にします。
- ページ 24 の指示にしたがって、Buffer ACB、Buffer ACW1、Buffer ACW2 が調製（イソプロパノールまたはエタノールを添加）されていることを確認してください。
- 表 2 の指示にしたがって、Buffer AVE に再構成した担体 RNA を Buffer ACL に加えます。

表 2.1~5 mL のヒト血漿サンプルの処理に必要な Buffer ACL と担体 RNA (Buffer AVE に溶解) の量

血漿 (mL) のセット アップ	A	B	C	D	E	Buffer AVE 中の 担体 RNA (μL)
	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	
サンプル数	Buffer ACL (mL)					
1	0.9	1.8	2.6	3.5	4.4	5.6
2	1.8	3.5	5.3	7.0	8.8	11.3
3	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	16.9
4	3.5	7.0	10.6	14.1	17.6	22.5
5	4.4	8.8	13.2	17.6	22.0	28.1
6	5.3	10.6	15.8	21.1	26.4	33.8
7	6.2	12.3	18.5	24.6	30.8	39.4
8	7.0	14.1	21.1	28.2	35.2	45.0
9	7.9	15.8	23.8	31.7	39.6	50.6
10	8.8	17.6	26.4	35.2	44.0	56.3
11	9.7	19.4	29.0	38.7	48.4	61.9
12	10.6	21.1	31.7	42.2	52.8	67.5
13	11.4	22.9	34.3	45.8	57.2	73.1
14	12.3	24.6	37.0	49.3	61.6	78.8
15	13.2	26.4	39.6	52.8	66.0	84.4
16	14.1	28.2	42.2	56.3	70.4	90.0
17	15.0	29.9	44.9	59.8	74.8	95.6
18	15.8	31.7	47.5	63.4	79.2	101.3
19	16.7	33.4	50.2	66.9	83.6	106.9
20	17.6	35.2	52.8	70.4	88.0	112.5
21	18.5	37.0	55.4	73.9	92.4	118.1
22	19.4	38.7	58.1	77.4	96.8	123.8
23	20.2	40.5	60.7	81.0	101.2	129.4
24	21.1	42.2	63.4	84.5	105.6	135.0

操作手順：Breeze プロトコール

1. QIAGEN Proteinase K、血漿、Buffer ACL をこの順番で 50 mL 遠心管（別途ご用意ください）にピペットで移します。

セットアップ	A	B	C	D	E
ProtK (μL)	100	200	300	400	500
血漿 (mL)	1	2	3	4	5
ACL (mL)	0.8	1.6	2.4	3.2	4

2. キャップを閉め、パルスボルテックスにより 5 回 x 2 秒間混合します。

チューブ内に目に見えるボルテックス泡が形成されていることを確認してください。効率的に溶解するためには、サンプルと Buffer ACL を完全に混合して均一な溶液を得る必要があります。

注: この時点で操作手順を中断しないでください。直ちにステップ 3 に進み、溶解インキュベーションを開始します。

3. 56°C (±1°C) で 15 (±1) 分間インキュベートします。
4. チューブを実験台に戻し、キャップを外します。
5. チューブ内の溶解物に Buffer ACB を加えます。ステップ 1 のセットアップにしたがって量を選択します。

セットアップ	A	B	C	D	E
ACB (mL)	1.8	3.6	5.4	7.2	9

6. キャップを閉め、パルスボルテックスにより 5 回 x 2 秒間完全に混合します。

チューブ内に目に見えるボルテックス泡が形成されていることを確認してください。効率的に溶解するためには、溶解物と Buffer ACB を完全に混合して均一な溶液を得る必要があります。

7. チューブの溶解物-Buffer ACB 混合液を室温で 5 (±1) 分間インキュベートします。
8. QIAamp Mini カラムを QIAvac 24 Plus 上の VacConnector に挿入します (ページ QIAvac 24 Plus vacuum manifold のセットアップの「19」参照)。20 mL のカラムエクステンダーを、開いている QIAamp Mini カラムに挿入します。

サンプルが漏れないように、カラムエクステンダーを QIAamp Mini カラムにしっかりと挿入してください。

注: ステップ 13 のドライスピンのために洗浄チューブを保管します。

9. ステップ 7 の溶解物を QIAamp Mini カラムのカラムエクステンダーに慎重に入れます。真空ポンプのスイッチを入れます。すべての溶解物がカラムに完全に吸引されたら、真空ポンプのスイッチを切り圧力を 0 mbar までリリースします。カラムエクステンダーを慎重に取り外し、廃棄します。

大量のサンプル溶解物 (5 mL のサンプルから開始する場合は約 18 mL) が真空の力で QIAamp Mini 膜を通過するには、最大で 20 分かかる場合があります。

真空圧を高速かつ簡便にリリースするには、Vacuum Regulator を使用する必要があります (QIAvac Connecting System の一部)。

注: 交差汚染を防ぐため、カラムエクステンダーを取り外している時に QIAamp Mini カラムを交差させないように注意します。

10. 600 μ L の Buffer ACW1 を QIAamp Mini カラムに入れます。カラムの蓋を開けたままにして、真空ポンプのスイッチを入れます。Buffer ACW1 がすべて QIAamp Mini カラムに吸引されたら、真空ポンプのスイッチを切り、圧力を 0 mbar までリリースします。
11. 750 μ L の Buffer ACW2 を QIAamp Mini カラムに入れます。カラムの蓋を開けたままにして、真空ポンプのスイッチを入れます。Buffer ACW2 がすべて QIAamp Mini カラムに吸引されたら、真空ポンプのスイッチを切り、圧力を 0 mbar までリリースします。

12. 750 μL のエタノール (96~100%) を QIAamp Mini カラムに入れます。カラムの蓋を開けたままにして、真空ポンプのスイッチを入れます。エタノールがすべてスピнкаラムに吸引されたら、真空ポンプのスイッチを切り、圧力を 0 mbar までリリースします。
13. QIAamp Mini カラムの蓋を閉じます。真空マニホールドから取り外し、VacConnector を廃棄します。QIAamp Mini カラムを清潔な 2 mL 洗浄チューブに入れ (ステップ 8)、最高速度 (20,000 \times g; 14,000 rpm) で 3 (\pm 0.5) 分間遠心分離します。
14. QIAamp Mini カラムを新しい 2 mL 洗浄チューブに入れます。蓋を開け、アセンブリーを室温で 3 分間インキュベートして膜を完全に乾燥させます。
15. QIAamp Mini カラムを清潔な 1.5 mL 溶出チューブ (付属) に入れ、ステップ 14 の 2 mL 洗浄チューブを廃棄します。20~150 μL の Buffer AVE を、QIAamp Mini カラム膜の中心に慎重に置きます。蓋を閉め、室温で 3 (\pm 0.5) 分間インキュベートします。
重要: 溶出 Buffer AVE が室温 (15~25°C) と平衡になるようにします。少量 (<50 μL) で溶出する場合、膜中心に溶出緩衝液を分注し、結合した核酸を完全に溶出させる必要があります。
溶出量には柔軟性があり、ダウンストリームアプリケーションの要件に応じて調整可能です。
少量の Buffer AVE で溶出する場合、核酸濃度が高くなりますが、総収量は少なくなる可能性があります。
回収される溶出液量は、QIAamp Mini カラムの膜に適用される溶出量より最大 5 μL 少なくなることがあります。
注: 低い NA 収量が想定される場合、ローバインドチューブ (別途ご用意ください) での溶出を推奨します。
16. マイクロ遠心機を用いて最高速度 (20,000 \times g; 14,000 rpm) で 1 分間遠心分離し、核酸を溶出させます。

クラシックプロトコール：1～5 mL のヒト血漿からの循環核酸の精製

本プロトコールは、QIAamp DSP circulating NA Kit ハンドブック改訂第 3 版 (R3) のプロトコールと同じであり、1～5 mL のヒト血漿用の既存のユーザー検証ワークフローなどと使用します。

はじめる前の重要な留意点

- 遠心分離ステップはすべて、室温 (15～25°C) で行います。
- ステップとステップの間は真空をオフにして、プロトコールステップ中に一貫した均一な真空が適用されるようにします。

注: 真空ポンプ圧を-800～-900 mbar にします。

- サンプル温度を室温にします。
- リン酸緩衝生理食塩水を使用して、サンプル量を最も近い正確な容積 (1 mL～5 mL) にします。
- ページ 19 に記載する通り、QIAvac 24 Plus をセットアップします。
- 水槽または加熱ブロックを 60°C まで加熱し、ステップ 3 で 50 mL 遠心管とともに使用します。
- 加熱ブロックを 56°C まで加熱し、ステップ 14 で 2 mL 洗浄チューブとともに使用します。
- 使用前に、QIAamp Mini スピнкаラムを最低 1 時間室温にします。
- ページ 24 の指示にしたがって、Buffer ACB、Buffer ACW1、Buffer ACW2 が調製 (イソプロパノールまたはエタノールを添加) されていることを確認してください。
- 表 3 の指示にしたがって、Buffer AVE に再構成した担体 RNA を Buffer ACL に加えます。

表 3.1~5 mL のヒト血漿サンプルの処理に必要な Buffer ACL と担体 RNA (Buffer AVE に溶解) の量

血漿 (mL) のセット アップ	A	B	C	D	E	Buffer AVE 中の 担体 RNA (μL)
	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	
サンプル数	Buffer ACL (mL)					
1	0.9	1.8	2.6	3.5	4.4	5.6
2	1.8	3.5	5.3	7.0	8.8	11.3
3	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	16.9
4	3.5	7.0	10.6	14.1	17.6	22.5
5	4.4	8.8	13.2	17.6	22.0	28.1
6	5.3	10.6	15.8	21.1	26.4	33.8
7	6.2	12.3	18.5	24.6	30.8	39.4
8	7.0	14.1	21.1	28.2	35.2	45.0
9	7.9	15.8	23.8	31.7	39.6	50.6
10	8.8	17.6	26.4	35.2	44.0	56.3
11	9.7	19.4	29.0	38.7	48.4	61.9
12	10.6	21.1	31.7	42.2	52.8	67.5
13	11.4	22.9	34.3	45.8	57.2	73.1
14	12.3	24.6	37.0	49.3	61.6	78.8
15	13.2	26.4	39.6	52.8	66.0	84.4
16	14.1	28.2	42.2	56.3	70.4	90.0
17	15.0	29.9	44.9	59.8	74.8	95.6
18	15.8	31.7	47.5	63.4	79.2	101.3
19	16.7	33.4	50.2	66.9	83.6	106.9
20	17.6	35.2	52.8	70.4	88.0	112.5
21	18.5	37.0	55.4	73.9	92.4	118.1
22	19.4	38.7	58.1	77.4	96.8	123.8
23	20.2	40.5	60.7	81.0	101.2	129.4
24	21.1	42.2	63.4	84.5	105.6	135.0

操作手順：クラシックプロトコール

1. QIAGEN Proteinase K、血漿、Buffer ACL をこの順番で 50 mL 遠心管（別途ご用意ください）にピペットで移します。

セットアップ	A	B	C	D	E
ProtK (μL)	100	200	300	400	500
血漿 (mL)	1	2	3	4	5
ACL (mL)	0.8	1.6	2.4	3.2	4

2. キャップを閉め、パルスボルテックスによって 30 秒間混合します。

チューブ内に目に見えるボルテックス泡が形成されていることをご確認ください。

効率的に溶解するためには、サンプルと Buffer ACL を完全に混合して均一な溶液を得る必要があります。

注: この時点で操作手順を中断しないでください。直ちにステップ 3 に進み、溶解インキュベーションを開始します。

3. 60°C (±1°C) で 30 (±2) 分間インキュベートします。
4. チューブを実験台に戻し、キャップを外します。
5. チューブ内の溶解物に Buffer ACB を加えます。ステップ 1 のセットアップにしたがって量を選択します。

セットアップ	A	B	C	D	E
ACB (mL)	1.8	3.6	5.4	7.2	9

6. キャップを閉め、パルスボルテックスにより 30 秒間完全に混合します。

チューブ内に目に見えるボルテックス泡が形成されていることをご確認ください。効率的に溶解するためには、溶解物と Buffer ACB を完全に混合して均一な溶液を得る必要があります。

7. チューブ内の溶解物-Buffer ACB の混合を、5 (±1) 分間氷上でインキュベートします。
8. QIAamp Mini カラムを QIAvac 24 Plus 上の VacConnector に挿入します (ページ 19 の「QIAvac 24 Plus vacuum manifold のセットアップ」参照)。20 mL のカラムエクステンダーを、開いている QIAamp Mini カラムに挿入します。

サンプルが漏れないように、カラムエクステンダーを QIAamp Mini カラムにしっかりと挿入してください。

注: ステップ 13 のドライスピンのために洗浄チューブを保管します。

9. ステップ 7 の溶解物を QIAamp Mini カラムのカラムエクステンダーに慎重に入れます。-800~-900 mbar の圧力をかけて真空ポンプのスイッチを入れます。すべての溶解物がカラムに完全に吸引されたら、真空ポンプのスイッチを切り圧力を 0 mbar までリリースします。カラムエクステンダーを慎重に取り外し、廃棄します。

大量のサンプル溶解物 (5 mL のサンプルから開始する場合は約 18 mL) が真空の力で QIAamp Mini 膜を通過するには、最大で 20 分かかる場合があります。

真空圧を高速かつ簡便にリリースするには、Vacuum Regulator を使用する必要があります (QIAvac Connecting System の一部)。

注: 交差汚染を防ぐため、カラムエクステンダーを取り外している時に QIAamp Mini カラムを交差させないように注意します。

10. 600 μ L の Buffer ACW1 を QIAamp Mini カラムに入れます。カラムの蓋を開けたままにして、真空ポンプのスイッチを入れます。Buffer ACW1 がすべて QIAamp Mini カラムに吸引されたら、真空ポンプのスイッチを切り、圧力を 0 mbar までリリースします。
11. 750 μ L の Buffer ACW2 を QIAamp Mini カラムに入れます。カラムの蓋を開けたままにして、真空ポンプのスイッチを入れます。Buffer ACW2 がすべて QIAamp Mini カラムに吸引されたら、真空ポンプのスイッチを切り、圧力を 0 mbar までリリースします。

12. 750 μL のエタノール (96~100%) を QIAamp Mini カラムに入れます。カラムの蓋を開けたままにして、真空ポンプのスイッチを入れます。エタノールがすべてスピнкаラムに吸引されたら、真空ポンプのスイッチを切り、圧力を 0 mbar までリリースします。
13. QIAamp Mini カラムの蓋を閉じます。真空マニホールドから取り外し、VacConnector を廃棄します。QIAamp Mini カラムを清潔な 2 mL 洗浄チューブに入れ (ステップ 8)、最高速度 (20,000 \times g; 14,000 rpm) で 3 (\pm 0.5) 分間遠心分離します。
14. QIAamp Mini カラムを新しい 2 mL 洗浄チューブに入れます。蓋を開け、アSEMBリーを 56°C (\pm 1°C) で 10 (\pm 1) 分間インキュベートし、膜を完全に乾燥させます。
15. QIAamp Mini カラムを清潔な 1.5 mL 溶出チューブ (付属) に入れ、ステップ 13 の 2 mL 洗浄チューブを廃棄します。20~150 μL の Buffer AVE を QIAamp Mini カラム膜の中心に慎重に置きます。蓋を閉め、室温で 3 (\pm 0.5) 分間インキュベートします。
重要: 溶出 Buffer AVE が室温 (15~25°C) と平衡になるようにします。少量 (<50 μL) で溶出する場合、膜中心に溶出緩衝液を分注し、結合した核酸を完全に溶出させる必要があります。
溶出量には柔軟性があり、ダウンストリームアプリケーションの要件に応じて調整可能です。
少量の Buffer AVE で溶出する場合、核酸濃度が高くなりますが、総収量は少なくなる可能性があります。
回収される溶出液量は、QIAamp Mini カラムに適用される溶出量より最大 5 μL 少なくなることがあります。
注: 低い NA 収量が想定される場合、ローバインドチューブ (別途ご用意ください) での溶出を推奨します。
16. マイクロ遠心機を用いて最高速度 (20,000 \times g; 14,000 rpm) で 1 分間遠心分離し、核酸を溶出させます。

品質管理

QIAGEN の ISO 認証済み品質管理システムにより、QIAamp DSP Circulating NA Kit の各ロットは既定の仕様に対して検査され、一貫した製品品質が確保されます。

制限事項

循環無細胞核酸を分離するシステム性能は、以下の採血管から生成されたヒト血漿サンプルを使用して確立されています。








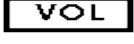

- K2-EDTA (Beckton Dickinson、カタログ番号 367525)
- PAXgene Blood ccfDNA Tube (PreAnalytiX、カタログ番号 768115)
- Cell-Free DNA BCT (Streck、カタログ番号 218962)

QIAGEN の性能評価試験の対象外の操作手順については、システム性能を検証する責任はユーザーにあります。

診断結果に悪影響が及ぶリスクを最小限に抑えるため、ダウンストリームプロセスを適切に管理する必要があります。さらなる検証には、分析手順の ICH Q2 (R1) バリデーションにおける医薬品規制調和国際会議 (ICH) のガイドライン：Text And Methodology (テキストと方法) が推奨されます。

本品がもたらすすべての診断結果は、他の臨床、ラボ操作による所見と併用して解釈されるべきものです。

図記号

図記号	図記号の定義
	<N>回の試験に必要な試薬が含まれます。
	使用者
	体外診断薬キット
	納品時
	納入時に開封：QIAamp Mini Spin カラムを 2~8°C で保管
	カタログ番号
	番号
	ロット番号
	マテリアル番号
	コンポーネント
	容量
	追加
	温度制限



製造者



製品説明書参照



エタノールをボトルに追加後、現在の日付を記入します



エタノール



イソプロパノールをボトルに追加後、現在の日付を記入します



イソプロパノール



含有物質



結果



チオシアン酸グアニジン



塩酸グアニジン



BRIJ 58



グローバルトレードアイテム番号

参照

1. Levy, B. (2019) *Prenatal Diagnosis*. Methods in Molecular Biology. 2nd ed. New York: Humana Press.
2. Hahn, S. and Zimmermann, B.G. (2010) Cell-free DNA in maternal plasma: has the size-distribution puzzle been solved? *Clin Chem*. 56, 1210-1211.
3. Anfossi, S., Babayan, A., Pantel, K., and Calin, G. (2018) Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nat Rev Clin Oncol* 15, 541-563.
4. Babayan, A. and Pantel, K. (2018) Advances in liquid biopsy approaches for early detection and monitoring of cancer. *Genome Med* 10, 21.
5. Terrinoni, A., et al (2019) The circulating miRNAs as diagnostic and prognostic markers. *Clin Chem Lab Med*. 57, 932-953.

お問い合わせ先

テクニカルサポートおよび詳細については、弊社のテクニカルサポートセンター (support.qiagen.com)にお問い合わせください。または QIAGEN テクニカルサービス部門もしくは最寄りの販売代理店までお問い合わせください(お問い合わせ先については、本書の裏表紙または弊社ウェブサイト www.qiagen.com をご覧ください)。

トラブルシューティングガイド

このトラブルシューティングガイドは何らかの問題が発生した際にお役立てください。連絡先情報については、裏表紙または www.qiagen.com をご覧ください。

コメントと推奨事項

溶出液中に核酸がほとんどまたはまったくない

- | | | |
|----|--|--|
| c) | 非安定化血漿の使用 | 非安定化血漿サンプルは DNA の分解を促進する可能性があります。CEN/TS 16835-3:2015 に従うことを推奨します。新しいサンプルで精製手順を繰り返してください。 |
| b) | 採血から血漿調製までの時間が長い | 有核血球が分解してゲノム DNA を血漿に放出し、標的核酸が希釈される可能性があります。 |
| c) | 複数回凍結融解したサンプル | DNA 分解につながる可能性があるため凍結融解の繰り返しは避けてください。必ず新鮮なサンプル、または 1 回のみ融解したサンプルを使用してください。 |
| d) | サンプル中のターゲット DNA が低濃度 | 血漿サンプルが室温で長時間放置されました。新しいサンプルで精製手順を繰り返してください。
注： 血漿中の無細胞 NA 濃度が低い人もいます。その場合、サンプル量を増やし溶出液量を少なくする必要があります。 |
| e) | Buffer ACL へのサンプル溶解が非効率的 | QIAGEN Proteinase K が長時間高温状態にあると、活性が失われる可能性があります。新しいサンプルと新鮮な QIAGEN Proteinase K を用いて手順を繰り返してください。 |
| f) | Buffer ACL-担体 RNA 混合物の混合が不十分 | Buffer ACL-担体 RNA の入ったチューブを最低 10 回静かに反転させて、Buffer ACL と担体 RNA を混合します。 |
| g) | 96~100%ではなく低濃度エタノールを使用 | 新しいサンプルと 96~100%エタノールを用いて精製手順を繰り返してください。メタノールやメチルエチルケトンなどの他の物質が含まれるため、変性アルコールは使用しないでください。 |
| h) | Buffer ACB が正しく調製されていない | 濃縮 Buffer ACB が正しい量のイソプロパノールで再構成されたことを確認してください（エタノールではありません、ページ 24 参照）。 |
| i) | Buffer ACW1 または Buffer ACW2 が正しく調製されていない | 濃縮 Buffer ACW1 と Buffer ACW2 が正しい量のエタノールで希釈されていることを確認してください（ページ 24 参照）。新しいサンプルで精製手順を繰り返してください。 |

コメントと推奨事項

- i) Buffer ACW1 または Buffer ACW2 が 70%エタノールで調製されている
濃縮 Buffer ACW1 と Buffer ACW2 が 96~100%エタノールで希釈されていることを確認してください（ページ 24 参照）。新しいサンプルで精製手順を繰り返してください。

DNA や RNA がダウンストリーム酵素反応で十分な性能を示さない

- a) 溶出液中に DNA がほとんどまたはまったくない
考えられる理由については、上記「溶出液中に核酸がほとんどまたはまったくない」を参照してください。可能な場合は、反応に添加する溶出液の量を増やしてください。
- b) 使用した溶出量が不適切
ダウンストリームアプリケーションに適した最大溶出液量を決定してください。それにしたがって、ダウンストリームアプリケーションに追加する溶出液量を調製してください。溶出量はそれに合わせて調整できます。
注: 少量の Buffer AVE で溶出すると、核酸濃度は高くなりますが総収量が低下する可能性があります。
- c) 緩衝液が完全に混合されていない
次の実行までの放置時間が長いと、洗浄 Buffer ACW2 の塩とエタノール成分が分離します。各実行前に必ず緩衝液を完全に混合してください。
- d) 担体 RNA による干渉
溶出液中の担体 RNA がダウンストリームの酵素反応を妨げる場合は、担体 RNA の量を減らすか完全に省略する必要がある場合があります。

取り扱い全般

- a) Clogged QIAamp Mini カラム
流量を減少すると、真空時間を延長することができます。
または、VacValve を使用する場合は閉じて、カラムエクステンダー中の溶解産物を失わないように注意しながら、QIAamp Mini カラムからカラムエクステンダー-VacConnector-VacValve アセンブリーを慎重に取り外してください。
QIAamp Mini カラムを真空マニホールドから取り外し、2 mL の洗浄チューブに入れ、サンプルが膜を完全に通過するまで最高速度で回転させてください。残りの溶解産物を含むカラムエクステンダー-VacConnector-VacValve アセンブリーを交換してください。真空ポンプのスイッチを入れ、VacValve を開き、残りの溶解産物の充填を続けてください。
QIAamp Mini カラムが詰まり続ける場合は、上記の手順を繰り返してください。
凍結融解の繰り返しにより、血漿中に寒冷沈降物が形成された可能性があります。これにより QIAamp Mini カラムが詰まる可能性があります。凍結融解を繰り返した血漿は使用しないでください。
寒冷沈降物が目に見える場合には、16,000 x g で 5 分間遠心分離してサンプルを透明にしてください。

コメントと推奨事項

- b) 溶出量の変動 サンプルによっては最終溶出液量に影響が及ぶ可能性があります。回収される溶出液量は、QIAamp Mini カラムに適用される溶出量より最大 5 µL 少なくなることがあります。
- c) -800~-900 mbar の真空圧に到達していない 真空マニホールドがしっかり閉じていません。真空スイッチをオンにして、真空マニホールドの蓋を押し下げてください。真空圧に達しているか確認してください。
- QIAvac の蓋のガスケットが摩耗しています。マニホールドのシールを目視で確認し、必要に応じて交換してください。
- VacValve が摩耗しています。すべての VacValve を取り外し、VacConnector を直接ルアーエクステンションに挿入してください。
- QIAamp Mini カラムを VacConnector に挿入し、カラムの蓋を閉じて真空のスイッチを入れてください。真空圧に達しているか確認してください。必要に応じて VacValve を交換してください。
- 真空ポンプへの接続に漏れがあります。すべてのルアーエクステンションをルアーキャップで閉じ、真空ポンプのスイッチを入れてください。ポンプのスイッチを入れ（さらに Vacuum Regulator バルブを閉じた）後、真空圧が安定しているか確認してください。必要に応じて、ポンプと真空マニホールドの接続部を交換してください。
- それでも真空圧に到達しない場合は、真空ポンプをより強力なポンプと交換してください。

付録 A：血漿の分離と保管に関する勧告

採血管（PAXgene ccfDNA チューブや Streck 無細胞 DNA チューブなど）の安定化については、血漿の分離と保管に関する製造業者の指示に従ってください。保管条件は、具体的なダウンストリームアプリケーションやターゲットと組み合わせて検証することを推奨します。

非安定化 BCT では、CEN/TS 16835-3:2015 に従うことを推奨します。

血液サンプルからの循環無細胞核酸の分離は、本プロトコールに従うことを推奨します。本プロトコールには、細胞破片を取り除くことでサンプル中の細胞またはゲノム DNA 量を減少させる高 g 力遠心分離ステップが含まれています。

1. EDTA 全血を BD Vacutainer®チューブ（または抗凝固剤として EDTA を含む他の主要な血液チューブ）に入れ、スイングアウトローターと適切なバケットを備えた 4°C に冷却した遠心分離機に入れます。
2. 血液サンプルを 4°C、1900 x g（3000 rpm）で 10 分間遠心分離します。
3. 血漿-細胞界面層を乱さないように注意しながら、血漿上清を慎重に吸引します。10 mL の主要血液チューブ 1 本から約 4~5 mL の血漿が得られます。

注: この段階で、血漿を使用して循環核酸を抽出できます。しかしその後の高スピード遠心分離により、細胞破片と、損傷した有核血球由来のゲノム DNA と RNA による循環核酸の汚染がさらに除去されます。

4. 吸引した血漿を新しい遠心管に移します。
5. 血漿サンプルを 4°C、16,000 x g（固定角ローター使用）で 10 分間遠心分離します。これによって、細胞破片に付着している余分な細胞核酸が除去されます。

6. 上清を慎重に取り出し、ペレットを乱さないように注意しながら新しいチューブに移します。
7. 同日に血漿を核酸抽出に使用する場合は、その後の処理まで 2~8°C で保管します。
長期保管する場合は、安定化および非安定化採血管由来の血漿アリコットを-20°C (ターゲットが DNA) または-80°C (ターゲットが RNA) で最低 4 週間保管できます。循環核酸抽出に血漿を使用する前に、室温で血漿チューブを融解します。
8. **オプション:** 寒冷沈降物を除去するため、血漿サンプルを 16,000 x g (固定角ローターを使用) で 5 分間遠心分離します。
オプション: 上清を新しいチューブに移し、循環核酸抽出プロトコールを開始します。

付録 B: RNA 取り扱いの一般的注意事項

RNA の取り扱い

リボヌクレアーゼ (RNases) は非常に安定した、活性の高い酵素で、通常補因子なしで機能します。RNases の不活性化は困難で、微量でも RNA を破壊します。そのため、プラスチックやガラス器具は RNase による汚染を取り除いてから使用してください。精製の手順の最中とその後で、RNases が RNA に不意に混入しないよう、細心の注意を払ってください。RNase フリーな環境を作り維持するため、RNA の取り扱い中に容器類 (使い捨てであるかを問わず) と溶液の前準備および使用にあたって以下の点に注意してください。

取り扱い全般

RNA の取り扱いでは、適切な微生物学的無菌操作を常に行います。手やほこりの粒子が細菌やカビを運ぶことがあります。これは RNase 汚染の最も多くみられる原因です。試薬と RNA サンプルを取り扱う際には、皮膚表面や機器のほこりからの RNase 汚染を防止するため、常にゴムまたはビニール手袋を使用してください。手袋は頻繁に交換し、チューブの蓋はできる限り閉じるようにします。精製した RNA をダウンストリームで使用するためにピペットで操作する場合、氷で冷却します。

使い捨てプラスチック製品

すべての操作手順で、殺菌済みの RNase を含まない使い捨てポリプロピレン器具の使用が推奨されます。

注文情報

製品	内容	カタログ番号
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	調製 50 回用: QIAamp Mini カラム、カラムエクステンダー、 VacConnector、QIAGEN Proteinase K、試薬、緩衝液、採取用試験管	61504
アクセサリ		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	1~24 スピンカラム処理用真空マニ ホールド : QIAvac 24 Plus Vacuum manifold、ルアープラグ、 クイックカップリング	19413
Vacuum Pump*	ユニバーサル真空ポンプ	84010 [米国とカナダ] 84000 [日本] 84020 [その他]
QIAvac Connecting System*	真空マニホールドと真空ポンプを接 続するシステム : トレイ、廃棄ボト ル、チューブ、カップリング、バル ブ、ゲージ、24VacValve を含む	19419

* 真空プロトコールで使用

最新のライセンス情報と製品ごとの免責事項については、該当する QIAGEN キットハンドブックまたはユーザーマニュアルをご覧ください。QIAGEN キットハンドブックとユーザーマニュアルは www.qiagen.com から取得でき、もしくは QIAGEN テクニカルサービスないしは各地の代理店でご用意いたします。

製品説明書の改訂履歴

日付	変更
R4 09/2019	使用目的をヒト血漿のみから無細胞核酸へ変更。「Breeze」プロトコルの組み入れ。尿と miRNA のプロトコルを含めない。 安全情報の更新。

QIAamp DSP Circulating NA Kit 限定ライセンス契約

本製品を使用することにより、本製品の購入者またはユーザーは以下の条項に合意し、本契約を締結したものとみなします。

1. 本製品は共に提供されるプロトコルと本ハンドブックに沿ってのみ、本キットに含まれるコンポーネントと共にのみ使用できます。QIAGEN は、本製品と共に提供されるプロトコル、本ハンドブック、www.qiagen.com に掲載された追加プロトコルに説明されているものを除き、所有する知的財産の下、このキットに含まれるコンポーネントをこのキットに含まれていないコンポーネントと一緒に使用または組み込むライセンスを一切許諾しません。追加プロトコルには、QIAGEN のユーザーが QIAGEN の他のユーザーに提供しているものがあります。このようなプロトコルは QIAGEN による完全なテストや最適化が施されていません。QIAGEN はこれらを保証せず、また、これらが第三者の権利を侵害しないことを保証しません。
2. 明示されたライセンスを除き、QIAGEN は本キット、その使用、またはこの両方が第三者の権利を侵害しないことを保証しません。
3. 本キットとそのコンポーネントは 1 回のみの使用についてライセンスが許諾され、その再利用、再生、再販はできません。
4. QIAGEN は明確に表示されたものを除き、明示、黙示を問わず、他のライセンス許諾から明確に免責されます。
5. 本キットの購入者とユーザーは、上記の禁止事項に示した行為を行わず、またかかる行為を容易にする一切の手段を許容しないことに同意します。QIAGEN は、本限定ライセンス契約の禁止事項の執行を法廷に対して強要することができ、本キット、本限定ライセンス契約、およびそのコンポーネントに関する所有する知的財産権行使の一切の行為において、弁護士費用を含む調査と法的措置の経費を回収するものとします。

最新の契約条項は www.qiagen.com を参照してください。

Trademarks: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIAamp[®] (QIAGEN Group); BD Vacutainer[®] (Becton, Dickinson and Company); Tween[®] (ICI Americas Inc.).
本文書で使用した登録済みの名称、商標などは、具体的な表示がない場合であっても法的保護の対象から外れることを意味しません。

1118364 102019 HB-0466-005 © 2019 QIAGEN 無断複写・転載を禁じます。

